



อภินิมิตหมาย

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงสร้างพันธุกรรมของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* complex (Anura: Rhacophoridae) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI)

Genetic structure of *Polypedates leucomystax* complex (Anura: Rhacophoridae) in Thailand based on molecular marker, cytochrome-c oxidase subunit I (COI)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย : ดร.กิตติศักดิ์ พุทธิชาติ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ร่วมวิจัย : ดร.ฉัตรมงคล สุวรรณภูมิ  
สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ  
มหาวิทยาลัยพะเยา

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน 1 ส.ค. 2562

เลขทะเบียน 1020539

เลขเรียกหนังสือ 6L

668

E 272

16751

2560

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2560

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการเรื่อง โครงสร้างพันธุกรรมของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* complex (Anura: Rhacophoridae) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 เป็นจำนวนเงิน 220,000 บาท (สองแสนสองหมื่นบาทถ้วน)

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้สนับสนุนงบประมาณสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณคณะผู้ร่วมทำงานเพื่อช่วยเหลืองานในโครงการวิจัย ที่ได้ช่วยเหลือเก็บข้อมูล รวบรวมข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการศึกษาครั้งนี้ ให้สำเร็จไปได้ด้วยดี อีกทั้งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัย

27 มกราคม 2561



## แบบสรุปผู้บริหาร [Executive summary]

### 1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

#### 1.1 ชื่อโครงการวิจัย

ภาษาไทย: โครงสร้างพันธุกรรมของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* complex (Anura: Rhacophoridae) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI)

ภาษาอังกฤษ: Genetic structure of *Polypedates leucomystax* complex (Anura: Rhacophoridae) in Thailand based on molecular marker, cytochrome c oxidase subunit I (COI)

#### 1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

##### หัวหน้าโครงการ

ดร.กิตติศักดิ์ พุทธชาติ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

โทรศัพท์ 0-5596-3350 โทรสาร 0-5596-3301

อีเมลล์ kittisakbu@nu.ac.th

#### 1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำการวิจัย

ได้รับเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2560

งบประมาณที่ได้รับ 220,000 บาท (สองแสนสองหมื่นบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย ตั้งแต่มกราคม พ.ศ.2560 ถึงธันวาคม พ.ศ.2560

### 2. สรุปโครงการวิจัย

*Polypedates leucomystax* (Gravenhorst, 1829) หรือ ปาดบ้าน จัดอยู่ในวงศ์ปาดโลกเก่า (Rhacophoridae) สามารถพบปาดบ้านได้ทั่วไปทั้งประเทศ และการกระจายตัวที่กว้างขวางนี้ทำให้เกิดการแบ่งกลุ่มประชากรย่อยๆ (subpopulation) ซึ่งมีลักษณะทางภูมิศาสตร์เช่น ภูเขา แม่น้ำ เป็นต้น เป็นต้น เป็นตัวขัดขวางการเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ในแต่ละกลุ่มประชากรย่อย (subpopulation) ปัจจัยเหล่านี้เป็นแรงขับทำให้ปาดบ้านมีความซับซ้อนของสปีชีส์ (complex species) ปัจจุบันข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและพันธุกรรมของ *P. leucomystax* complex ทำให้ค้นพบว่า *P. leucomystax* complex นั้นประกอบด้วยหลายสปีชีส์ ได้แก่ *P. braueri*, *P. leucomystax*, *P. macrotis*, *P. megacephalus* และ *P. mutus* (Matsui et al. 1986; Kuraishi et al. 2011; Kuraishi et al. 2013) โดยมีการรายงานว่าเป็นประเทศไทยสามารถพบได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *P. leucomystax*, *P. mutus*, *P. macrotis* และ *P. colletti* (Taylor 1962; Heyer 1971; Chan-ard 2003; Frost 2013) เมื่อเร็วๆนี้ ในการศึกษาของ Rujirawan และคณะ (2013) พบปาดสปีชีส์ใหม่ *P. discantus* ที่จังหวัดสงขลา ประเทศไทย ซึ่งแยกจากปาดบ้าน *P. leucomystax* species complex มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทป์ 16S rRNA ของไมโทคอนเดรียแตกต่างกับ *P. leucomystax* และ *P. megacephalus* อย่างชัดเจน นอกจากนี้ *P. discantus* ยังมีความแตกต่างของเสียงร้อง (advertisement call) อีกด้วย (Rujirawan et al., 2013) แสดงให้เห็นว่าปาดบ้านนั้นมีความซับซ้อนของสปีชีส์อยู่สูงมาก และคาดว่าน่าจะยังมีสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species) อยู่อีก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการสำรวจโครงสร้างทางพันธุกรรมของ *P. leucomystax* species complex ในประเทศไทยจากข้อมูลทาง

โมเลกุลของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) เพื่อที่จะเข้าใจถึงการกระจายตัวและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปาดบ้าน *P. leucomystax* species complex ในประเทศไทย

จากข้อมูลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยยีน mitochondrial COI ของปาดในกลุ่ม *P. leucomystax* complex จากประเทศไทยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ น่าน (*P. cf impresus*), Northern D (*P. cf megacephalus*), Southern (*P. cf leucomystax*) และ Northern A (*Polypedates* sp.) เราสังเกตเห็นว่าประชากรของ northern D น่านและ *Polypedates* sp. น่าจะมีการวิวัฒนาการแบบ sympatry แต่ประชากรปาดเหล่านี้ น่าจะมีการวิวัฒนาการแบบ allopatric กับประชากรปาดทางตอนใต้ (*P. cf leucomystax*) เนื่องจากแยกคอคอดกระเพราะว่าบริเวณคอคอดกระมีสภาพภูมิอากาศบริเวณทางตอนเหนือและใต้มีความแตกต่างกัน ดังนั้นสภาพภูมิอากาศอาจเป็นส่วนสำคัญในการจำกัดการเคลื่อนย้ายของประชากรปาดทั้งสองชนิด และด้วยความผันแปรของสภาพอากาศในช่วง Pliocene และ Pleistocene เป็นสถานการณ์ที่เป็นไปได้ว่า จะส่งผลทำให้เกิดการกระจายตัวของ *P. leucomystax* complex ไปในบริเวณต่าง ๆ ของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศจีน รวมถึงการนำไปสู่ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาดในเขตภาคใต้และภาคเหนือในประเทศไทยอีกด้วย

### 3. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการศึกษาที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการระดับนานาชาติในวารสาร PeerJ ที่มี impact factor 2.2

Buddhachat K, Suwannapoom C. (2018) Phylogenetic relationships and genetic diversity of the *Polypedates leucomystax* complex in Thailand. PeerJ 6:e4263

<https://doi.org/10.7717/peerj.4263>

ชื่อโครงการวิจัย : โครงสร้างพันธุกรรมของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* complex (Anura: Rhacophoridae) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโทคอนเดรีย cytochrome c oxidase subunit I (COI)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย : ดร.กิตติศักดิ์ พุทธิชาติ

### บทคัดย่อ

การอนุกรมวิธานของกบปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* complex มีความท้าทายในการศึกษาชีวภูมิศาสตร์ ในการศึกษาอธิบายการกระจายตัวของมันและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่แตกต่างกันในประเทศไทยซึ่งประเทศไทยเป็นบริเวณที่เชื่อมต่อกับกลุ่มประชากรของกลุ่ม *P. leucomystax* ของหมู่เกาะ Sunda กับประชากรอินโดจีน (แผ่นดินใหญ่) โดยอาศัยการวิเคราะห์ mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) จากปาดบ้านจำนวน 266 ตัว จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียพบว่าปาดบ้านแบ่ง 4 กลุ่มในประเทศไทย ประกอบด้วยภาคเหนือ (clade A: *Polypedates* sp.), น่าน (clade B: *P. cf. impresus*), ภาคใต้ (clade C: *P. cf. leucomystax*) และภาคเหนือ D (clade D: *P. cf. megocephalus*) จากข้อมูล Phylogeny และ haplotype networks ระบุว่า clades A, B และ D น่าจะมีการวิวัฒนาการแบบ sympatric ในทางตรงกันข้าม clade C (*P. cf. leucomystax*) และ clade D (*P. cf. megocephalus*) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมเนื่องจากอุปสรรคทางภูมิศาสตร์ของ Isthmus of Kra ส่งผลให้มีการกระจาย allopatric สภาพภูมิอากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความแตกต่างของปริมาณน้ำฝนในแต่ละด้านของคอคอด Kra อาจมีบทบาทสำคัญในการจำกัดการอพยพของปาดทั้งสองกลุ่ม สำหรับประชากรภายในของ clades C หรือ D ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางทางภูมิศาสตร์และทางพันธุกรรม การขยายตัวของประชากรเกิดขึ้นใน clade C ในขณะที่ clade D มีประชากรคงที่ *P. leucomystax* complex ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความหลากหลายมากน่าจะมีอิทธิพลจากสภาพภูมิอากาศที่ทำให้เกิดการจำเพาะเจาะจงของแต่ละพื้นที่ทำให้เกิดการวิวัฒนาการทั้งแบบ allopatric และ/หรือ sympatric

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางชีวภาพ ชีวภูมิศาสตร์ วิวัฒนาการ

**Project Title:** Genetic structure of *Polypedates leucomystax* complex (Anura: Rhacophoridae) in Thailand based on molecular marker, cytochrome c oxidase subunit I (COI)

**Researcher:** Kittisak Buddhachat, Ph.D.

### Abstract

Taxonomic uncertainty of the Asian tree frog *Polypedates leucomystax* complex presents the challenging task of inferring its biogeographical history. Here, we describe its dispersion and the genetic relationships among different populations in Thailand, where we ~~connect the population of the *P. leucomystax* complex of the Sunda Islands to the Indochina~~ (mainland) population based on analyses of 266 sequences of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. Our maternal genealogy implies that there are four well-supported lineages in Thailand, consisting of Northern A (clade A: *Polypedates* sp.), Nan (clade B: *P. cf. impresus*), Southern (clade C: *P. cf. leucomystax*) and Northern D (clade D: *P. cf. megacephalus*), with Bayesian posterior probability >0.9. Phylogeny and haplotype networks indicate that clades A, B and D are sympatric. In contrast, clade C (*P. cf. leucomystax*) and clade D (*P. cf. megacephalus*) are genetically divergent due to the geographical barrier of the Isthmus of Kra, resulting in an allopatric distribution. Climatic conditions, in particular differences in rainfall on each side of the Isthmus of Kra, may play an important role in limiting the immigration of both clades. For the within-populations of either clades C or D, there was no significant correlation between geographic and genetic distance by the isolation-by-distance test, indicating intraspecific-dispersal of each clade. Population expansion occurred in clade C, whereas clade D showed a constant population. Taken together, the *P. leucomystax* complex in South East Asia may have diversified under climatic pressure, leading to allopatric and/or sympatric speciation.

**Key words:** Biodiversity, Biogeography, Evolution

## สารบัญ

บทที่		หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	ก
	แบบสรุปลำดับบริหาร	ข
	บทคัดย่อภาษาไทย	ง
	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
	สารบัญ	ฉ
	สารบัญตาราง	ช
	สารบัญภาพ	ซ
1	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
2	การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
3	วิธีดำเนินการวิจัย	5
4	ผลการศึกษาวิจัย	7
5	อภิปรายผลการศึกษาวิจัย	11
6	สรุปผลการศึกษาวิจัย	13
	เอกสารอ้างอิง	14
	ภาคผนวก	17



สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างปาด <i>P. leucomystax</i> complex ในประเทศไทย	5
2	การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของปาด <i>P. leucomystax</i> complex ในประเทศไทย: major lineages clades, putative scientific name, number of individuals (N), number of mtDNA haplotypes (n), number of polymorphic sites (P), parsimony-informative sites (PI) and singleton sites (S), haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity ( $\pi$ ).	7
3	สถิติในการศึกษาประวัติศาสตร์ของภูมิศาสตร์ประชากรของปาด <i>P. leucomystax</i> complex ในประเทศไทยระหว่างกลุ่ม Northern B clade (putative <i>P. megacephalus</i> ) และ Southern clade (putative <i>P. leucomystax</i> ).	10





## สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการกระจายของ haplotype ของประชากรป่าด <i>P. leucomystax</i> complex ในประเทศไทยโดยการใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจาก mitochondrial COI	8
2	การกระจายรูปแบบของ haplotype ของยีน mitochondrial COI (A) และความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ส่งผลให้เกิดการแยกของประชากรป่าด <i>P. leucomystax</i> complex ในเขตภาคเหนือและภาคใต้ (B)	9
3	ความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมและระยะห่างทางภูมิศาสตร์ด้วยวิธี linear regression model ของประชากรป่าด <i>P. leucomystax</i> complex ในเขตภาคเหนือ (A) และ ภาคใต้ (B)	9
4	mismatch distribution ของป่าด <i>P. leucomystax</i> complex ของประชากรในเขตภาคเหนือ (A) และ ภาคใต้ (B)	10



## บทที่ 1

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ความก้าวหน้าทางการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มากขึ้นทำให้ทราบว่า มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดนั้นมีสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species) รวมถึงในสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในอันดับกบ (Anura) พบว่ามีความหลากหลายสูงมากในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (South-East Asia; SEA) ทำให้พบว่าสัตว์ในอันดับกบหลายชนิดในบริเวณนี้มีความซับซ้อนสูง (complex species) ตัวอย่างเช่น *Microhyla fissipe* (Yuan et al., 2016), *Staurois tuberilinguis* (Matsui et al., 2007), *Microhyala ornata* (Matsui et al. 2005) และรวมถึงปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* (Kuraishi et al., 2013; Rujirawan et al., 2013)

*Polypedates leucomystax* (Gravenhorst, 1829) หรือ ปาดบ้าน จัดอยู่ในวงศ์ปาดโลกเก่า (Rhacophoridae) พบว่าลักษณะสีของลำตัวนั้นมีความผันแปรสูงทำให้มีความแตกต่างกันมาก และสามารถเปลี่ยนสีลำตัวได้อย่างรวดเร็ว มีการกระจายตัวที่กว้างขวางมากเกือบทั่วไปในทวีปเอเชีย ตั้งแต่บังกลาเทศ, บรูไน, กัมพูชา, จีน, อินเดีย, อินโดนีเซีย, ลาว, มาเลเซีย, พม่า, เนปาล, ฟิลิปปินส์, สิงคโปร์, ไทย, เวียดนาม และเป็นไปได้ว่าอาจมีที่ภูฏานด้วย (Taylor 1962; Inger 1966; Brown et al., 2010) เนื่องจากปาดบ้านสามารถปรับตัวได้ดีในสภาวะสิ่งแวดล้อมทั้งที่เป็นสภาพธรรมชาติ เช่น ป่าดิบชื้น ทุ่งหญ้า หรือแม้แต่ในเมือง เช่น ในบ้านพักอาศัย เป็นต้น ในประเทศไทย สามารถพบปาดบ้านได้ทั่วไปทั้งประเทศ และการกระจายตัวที่กว้างขวางนี้ทำให้เกิดการแบ่งกลุ่มประชากรย่อยๆ (subpopulation) ซึ่งมีลักษณะทางภูมิศาสตร์เช่น ภูเขา แม่น้ำ เป็นต้น เป็นตัวขัดขวางการเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ในแต่ละกลุ่มประชากรย่อย (subpopulation) ปัจจัยเหล่านี้เป็นแรงขับทำให้ปาดบ้านมีความซับซ้อนของสปีชีส์ (complex species) ปัจจุบันข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและพันธุกรรมของ *P. leucomystax* complex ทำให้ค้นพบว่า *P. leucomystax* complex นั้นประกอบด้วยหลายสปีชีส์ ได้แก่ *P. braueri*, *P. leucomystax*, *P. macrotis*, *P. megacephalus* และ *P. mutus* (Matsui et al. 1986; Kuraishi et al. 2011; Kuraishi et al. 2013) โดยมีการรายงานว่าในประเทศไทยสามารถพบได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *P. leucomystax*, *P. mutus*, *P. macrotis* และ *P. colletti* (Taylor 1962; Heyer 1971; Chan-ard 2003; Frost 2013) เมื่อเร็วๆ นี้ ในการศึกษาของ Rujirawan และคณะ (2013) พบปาดสปีชีส์ใหม่ *P. discantus* ที่จังหวัดสงขลา ประเทศไทย ซึ่งแยกจากปาดบ้าน *P. leucomystax* species complex มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทป์ 16S rRNA ของไมโทคอนเดรียแตกต่างกับ *P. leucomystax* และ *P. megacephalus* อย่างชัดเจน นอกจากนี้ *P. discantus* ยังมีความแตกต่างของเสียงร้อง (advertisement call) อีกด้วย (Rujirawan et al., 2013) แสดงให้เห็นว่าปาดบ้านนั้นมีความซับซ้อนของสปีชีส์อยู่สูงมาก และคาดว่าจะยังมีสปีชีส์ซ่อนเร้น (cryptic species) อยู่อีก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการสำรวจโครงสร้างทางพันธุกรรมของ *P. leucomystax* species complex ในประเทศไทยจากข้อมูลทางโมเลกุลของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) เพื่อที่จะเข้าใจถึงการกระจายตัวและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปาดบ้าน *P. leucomystax* species complex ในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของป่าดงบ้าน *P. leucomystax* complex โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ COI เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม
2. ประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic differentiation) ของ *P. leucomystax* ในแต่ละบริเวณของประเทศไทย



## บทที่ 2

### การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax* (Gravenhorst, 1829)) หรือชื่อทั่วไป common tree frog, four-lined tree frog, golden tree frog, striped tree frog จัดอยู่ในวงศ์ปาดโลกเก่า (Rhacophoridae) มีขนาดลำตัวปานกลาง มีความยาวจากปากถึงรูก้นประมาณ 50-75 มิลลิเมตร ลำตัวเรียวยาวแบน ผิวหนังที่ส่วนหัวจะเชื่อมติดกับกะโหลกส่วน nasal bone และ frontoparietal bone ผิวหนังของปาดบ้านสามารถเปลี่ยนสีลำตัวได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่าสีและลวดลายบนผิวหนังของปาดชนิดนี้มีความผันแปรสูงมาก เพราะบางตัวไม่มีลวดลายบนหลัง บางตัวอาจมีจุดสีดำเล็กกระจายและมีไม่มาก บางตัวทางด้านท้ายของตาและบริเวณหัวไหล่มีปื้นสีดำรูปนาฬิกาทรายหรือบางครั้งเป็นรูปตัวเอกซ์ภาษาอังกฤษ เป็นต้น ลูกอ๊อดมีขนาดตัวใหญ่ ลำตัวสีเทาหรือสีน้ำตาลอมเทาขึ้นกับสภาพแหล่งน้ำที่อยู่ ทางด้านหน้าของหัวในตำแหน่งตรงกลางมีจุดสีขาวหรือสีเงิน 1 จุด ทางเล็กแต่แผ่นครีบหางใหญ่และโปร่งใส ปากอยู่ทางด้านล่างของหัว ช่องปากเล็ก ตุ่มฟันในอุ้งปากมีจำนวนแถวและลักษณะการเรียงตัวเป็นสูตร I:4+4/1+1:II หรือ I:3+3/1+1:II จะงอยปากใหญ่และขอบของจะงอยปากบนและล่างมีรอยหยัก การกระจายตัวของปาดบ้านสามารถพบได้ทั่วไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ บังกลาเทศ, บรูไน, กัมพูชา, จีน, อินเดีย, อินโดนีเซีย, ลาว, มาเลเซีย, พม่า, เนปาล, ฟิลิปปินส์, สิงคโปร์, ไทย, เวียดนาม และอาจรวมถึงภูฏานด้วย บางครั้งอาจจะพบปาดบ้านที่ญี่ปุ่นได้เนื่องจากการนำเข้า

จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลทางอนุชีววิทยาและเสียงร้อง พบว่าปาดบ้าน *P. leucomystax* มีลักษณะเป็นสปีชีส์ซับซ้อน (complex species) คือมีหลายสปีชีส์ที่มักมีความสับสนและจัดว่าเป็น *P. leucomystax* โดย *P. collecti* เป็นชนิดหนึ่งที่แยกออกมาจาก *P. leucomystax* ด้วยข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน (Inger, 1966) รวมถึง *P. macrotis* แต่ก่อนเป็น subspecies หนึ่งของ *P. leucomystax* เนื่องจากอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกันและมีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างกันเล็กน้อย แต่ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีความแตกต่างกันมากถึง 8.7-11.6% จึงแยกออกมาเป็นสปีชีส์ใหม่ (Inger, 1966; Inger and Stuebing 1997) จากข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ พบว่า *P. leucomystax* และ *P. macrotis* มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดและมีการวิวัฒนาการออกจากกัน (divergence evolution) ในช่วงต้นของยุค Pliocene (Brown et al., 2010; Kuraishi et al., 2013) Brown และคณะ (2010) ศึกษาการกระจายตัวของปาดบ้าน *P. leucomystax* โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ 16S rRNA แสดงให้เห็นว่า *P. leucomystax* ที่อาศัยอยู่ตามหมู่เกาะของอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์มีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มน้อยกว่ากลุ่มที่อาศัยอยู่ในส่วนของแผ่นดิน (mainland) ปัจจุบันยังพบว่าประชากรของปาดบ้านยังมีการเพิ่มจำนวนประชากรมากขึ้น โดยปัจจัยที่นำไปทำให้เกิดการกระจายตัวของปาดบ้านไปยังหมู่เกาะต่างๆ น่าจะมาจากกิจกรรมของมนุษย์มากกว่าการลדתของระดับน้ำทะเลในยุคน Pleistocene กิจกรรมที่เป็นสาเหตุหลักน่าจะมาจากการขนส่งผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Kuraishi และคณะ (2013) ทำวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ของปาดบ้าน *P. leucomystax* complex ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จากยีนไมโทคอนเดรีย คือ 12S rRNA, tRNA<sup>val</sup> และ 16S rRNA และยีนในนิวเคลียส คือ brain-derived neurotrophic factor (BDNF), sodium/calcium exchange 1 (NCX), POMC, Rag-1, Rhod และ Try จากข้อมูลยีนไมโทคอนเดรียทำให้สามารถแบ่ง *P. leucomystax* complex ออกได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ south China (*P. cf. mutus1*), north China (*P. braueri*), Indochina (*P. megacephalus*), Malay (*P. sp.*) และ Sunda (*P. leucomystax*) ในขณะที่ยีนนิวเคลียสสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

Indochina (*P. megacephalus*) และ Sunda (*P. leucomystax*) จุดที่แบ่งสองกลุ่มนี้คือบริเวณคอคอดกระ (the Isthmus of Kra) ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ประเทศไทย จุดเริ่มต้นของการเกิดความแตกต่างของสองสปีชีส์ *P. leucomystax* และ *P. megacephalus* น่าจะเกิดในช่วงปลายยุค Pliocene และต้น Pleistocene (1.4-4.0 million year before present; MYBP) ปัจจุบันนี้พบว่า *P. leucomystax* complex มีสปีชีส์อื่นที่คลุมเครือรวมอยู่ถึง 5 สปีชีส์ ได้แก่ *P. braueri*, *P. leucomystax*, *P. macrotis*, *P. megacephalus*, *P. mutus* (Matsui et al. 1986; Kuraishi et al. 2011; Kuraishi et al. 2013) ความหลากหลายของสปีชีส์ *P. leucomystax* คาดว่าน่าจะเกิดขึ้นในยุค Pliocene และมีการแพร่กระจายอย่างมากหลังยุค Pleistocene โดยเกิดน่าจะมาจากกิจกรรมของมนุษย์โดยเฉพาะการขนส่งสินค้าทางการเกษตรเนื่องจากป่าบ้านเหล่านี้มักหลบซ่อนตัวอยู่ตามใบและลำต้นของผลิตผลทางการเกษตร และเมื่อเร็วๆ นี้ทางตอนใต้ของประเทศไทยได้พบสปีชีส์ใหม่ *P. discantus* ซึ่งพบที่จังหวัดสงขลา โดยพบว่ามีลักษณะของทางสัณฐานและพันธุกรรมมีความแตกต่างจาก *P. leucomystax* และ *P. megacephalus* อย่างชัดเจน (Rujirawan et al., 2013)

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าพื้นที่บริเวณประเทศไทยนั้นเป็นจุดศูนย์กลางของความหลากหลายของป่าบ้านโดยสามารถพบการกระจายของป่าในสกุล *Polypedates* หลายชนิด โดยเฉพาะ *P. leucomystax* ปัจจุบันนี้ยังคงมีความซับซ้อนของสปีชีส์อยู่ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเก็บตัวอย่างป่าบ้าน *P. leucomystax* ตลอดทั่วประเทศเพื่อประเมินโครงทางพันธุกรรมของ *P. leucomystax* โดยดูความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic differentiation) ของกลุ่มประชากรย่อยและศึกษาปัจจัยที่เป็นตัวขัดขวางการกระจายตัวของยีน (gene flow) ในประชากรที่ไปสู่การแบ่งเป็นกลุ่มประชากรย่อย (subpopulation) เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับแนวทางในการวางแผนการอนุรักษ์ความหลากหลายของป่าบ้านต่อไป

บทที่ 3  
วิธีการดำเนินการวิจัย

1020539



สำนักหอสมุด

3.1 การเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอและการหาลำดับดีเอ็นเอ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างปาดบ้านในจังหวัดน่าน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี เลย นครราชสีมา สระบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ระนอง นครศรีธรรมราช จำนวนทั้งหมด 266 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1 ปาดที่ถูกเก็บจะถูกการุณยฆาตภายใต้ใบอนุญาตหมายเลข NU-AE591028 ของสถาน สัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยตัวอย่างที่เก็บได้จากการศึกษานี้จะแช่ใน 95% เอทานอล เพื่อรักษาตัวอย่างและฆ่าตัวอย่างเก็บดับไว้ในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร และนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNA extraction kit (RBC Bioscience, Singapore) ดีเอ็นเอของตัวอย่างปาดจะถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ส.ก. 2562

บริเวณ mitochondrial COI ด้วยวิธี PCR โดยการใช้ pre-denaturation ที่ 94 °C นาน 5 นาที และตาม ด้วยจำนวน 35-40 รอบ ของอุณหภูมิ ที่ประกอบด้วย 94 °C นาน 30 s, 50 °C นาน 30 s และ 72 °C นาน 1 นาทีหลังจากนั้นตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 7 นาที ซึ่งจะได้ขนาดของผลผลิต PCR เท่ากับ 688 bp จากนั้นผลผลิต PCR ถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทป์ที่บริษัท macrogen

ตาราง 1 ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างปาด *P. leucomystax* complex ในประเทศไทย

ตำแหน่ง	จำนวน	ระดับความสูงจาก ระดับน้ำทะเล (เมตร)	ลองติจูด	ละติจูด
น่าน	12	665	18.980974	101.182594
กาญจนบุรี	20	917	14.69329	98.40535
เลย	11	939	17.48193	101.34982
นครราชสีมา	14	865	14.49336	101.87364
เชียงใหม่ แม่วาง	7	678	18.657305	98.681831
เชียงใหม่ ดอยสะเก็ด	13	402	18.98777	99.11455
เชียงใหม่ อมก๋อย	13	460	17.47137	98.45785
แม่ฮ่องสอน	44	396	19.24797	97.99542
สระบุรี	12	105	14.70993	100.81819
เพชรบุรี	22	329	14.70993	100.81819
ประจวบคีรีขันธ์	15	23	11.43678	99.56011
ระนอง	14	18	9.6052	98.4669
นครศรีธรรมราช	37	97	8.76902	99.80349
ภูเก็ต	17	31	7.96804	98.33589
ชุมพร	15	103	10.110278	99.082778

### 3.2 Phylogeny

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปาดที่ได้จากการศึกษาบริเวณ COI ร่วมกับดีเอ็นเอของปาดจากฐานข้อมูล GenBank; *P. impresus*: KP996822 (China), KP996846 (China), KP087862-70 (Laos); *P. leucomystax*: KR087871-2 (Thailand) และ *P. megacephalus*: KR087879, KR087881 (Thailand). จากนั้นใช้โปรแกรม MrModeltest v2.3 (Nylander, 2004) เพื่อทดสอบหาโมเดลของ DNA substitution ที่เหมาะสมโดยใช้ค่า Akaike information criterion (AIC) พบว่าโมเดล GTR+I+G เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อจากนั้นใช้ model ไปสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Bayesian inference ใช้โปรแกรม MrBAYES 3.1.2. (Ronquist and Huelsenbeck 2003) โดยใช้ค่า random starting tree เท่ากับ 5 ล้านรุ่น โดยทำการเก็บข้อมูลทุก ๆ 1,000 รุ่น โดยใช้ 4 Markov chain Monte Carlo chain (MCMC) และคำนวณค่า log-likelihood scores ในการสร้าง tree ด้วยโปรแกรม Tracer v1.5 (Rambaut et al., 2013) และสำหรับโครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย maximum-likelihood-analysis ใช้โปรแกรม RAxML 7.0.4 (Stamatakis, Hoover & Rougemont, 2008) โดยใช้โมเดล GTR+I+G และใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000

### 3.3 โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปาด (Population genetic)

ลำดับดีเอ็นเอ COI ของปาดจำนวน 266 ตัวอย่างถูกนำมาจัดเรียงด้วย ClustalW โดยใช้โปรแกรม MEGA6.0 จากนั้นคำนวณหาจำนวนของตำแหน่งที่เป็น polymorphic sites, the parsimony-informative sites, singleton sites, the number of haplotypes, haplotype diversity (Hd) และ nucleotide diversity ด้วยโปรแกรม DnaSP v5.0 (Librado & Rozas, 2009) คำนวณหาความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วย corrected p-distance นอกจากนี้ใช้โปรแกรม Barrier 2.2 (Manni, Guérard & Heyer, 2004) เพื่อหาบริเวณที่ทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรปาดในกลุ่ม Northern D clade และ the Southern clade หาความสัมพันธ์ของรูปแบบ haplotype ที่มีการกระจายตัวตามพื้นที่เก็บตัวอย่าง ด้วยวิธี median-joining algorithm (Bandelt et al., 1999) โดยใช้โปรแกรม PopART

### 3.4 ประวัติศาสตร์ทางภูมิประชากรศาสตร์ของปาด (Demographic history)

ทดสอบประวัติศาสตร์ทางประชากรศาสตร์ของประชากรระหว่างประชากร *P. megacephalus* และ *P. leucomystax* ในประเทศไทย ด้วย Neutrality tests of Tajima's D (Tajima, 1989) และ Fu's Fs (Fu, 1997) ซึ่งถ้าค่าเป็นบวกแสดงว่าประชากรในอดีตนั้นเพียงผ่านกระบวนการ bottleneck effect มา แต่ถ้าค่าเป็นลบแสดงว่าประชากรนี้มีการขยายของประชากรอย่างมาก นอกจากนี้ได้ศึกษาการคงที่ของขนาดประชากรด้วยวิธี Pairwise mismatch distribution (Roger & Harpending, 1992) โดยถ้าโครงสร้างของประชากรมีลักษณะหลายยอดแสดงว่าประชากรนั้นมีความเสถียรภาพ แต่ถ้ามีเพียงยอดกราฟอันเดียวแสดงให้เห็นว่าประชากรนั้นกำลังขยายตัวอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังทดสอบ the raggedness index (rg) ซึ่งถ้าค่าที่ออกมาค่าน้อยมากแสดงว่าประชากรนั้นกำลังเกิดการขยายจำนวนของประชากร (Harpending, 1994)

## บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย

### 4.1 คุณลักษณะของลำดับดีเอ็นเอในประชากรปาด

ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ mitochondrial COI ของประชากรปาดมีขนาด 688 bp ซึ่งลำดับดีเอ็นเอทั้งหมดในการศึกษานี้นำไปฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank หมายเลข MG583020-MG583285 หลังจากนั้นนำมาจัดเรียงให้ลำดับดีเอ็นเอตรงกันและตัดแต่งให้มีขนาดที่เท่ากันได้ขนาด 437 bp และนำไปวิเคราะห์พบว่า มีตำแหน่ง parsimony-informative sites ที่ไม่ใช่ singleton site จำนวน 82 ตำแหน่ง ซึ่งแบ่งไป haplotype ได้จำนวน 15 รูปแบบ โดยมีค่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 0.0664 และความหลากหลายของ haplotype เท่ากับ 0.9 ดังตารางที่ 2

ตาราง 2 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของปาด *P. leucomystax* complex ในประเทศไทย: major lineages clades, putative scientific name, number of individuals (*N*), number of mtDNA haplotypes (*n*), number of polymorphic sites (*P*), parsimony-informative sites (*PI*) and singleton sites (*S*), haplotype diversity ( $H_d$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ).

Clade	Putative species	<i>N</i>	<i>n</i>	$\pi$	$H_d$	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>PI</i>
A (the Northern A)	<i>Polypedates</i> sp.	40	2	0.0037	0.4089	4	0	4
B (Nan)	<i>P. impresus</i>	12	1	0	0	0	0	0
C (the Southern)	<i>P. megacephalus</i>	131	7	0.0048	0.746	15	1	14
D (the Northern D)	<i>P. leucomystax</i>	83	5	0.0073	0.7526	7	0	7
Total		266	15	0.0664	0.9	82	0	82

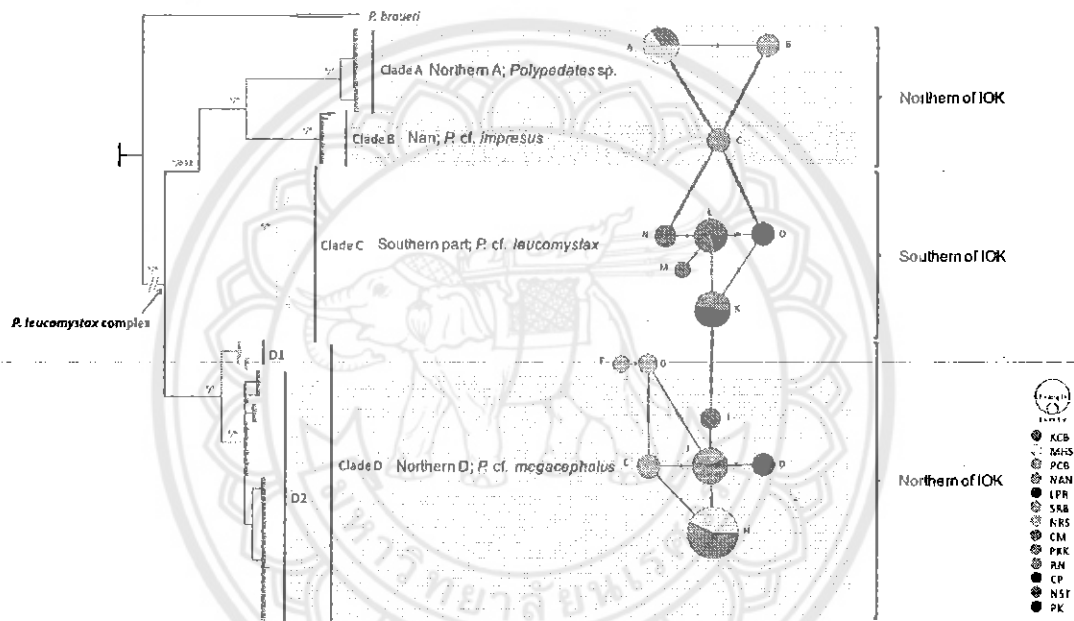
### 4.2 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการและการกระจายของ haplotype

จากการสร้างสายวิวัฒนาการของปาดในประเทศไทยด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ mitochondrial COI พบว่า *P. leucomystax* complex แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ clade A (Northern A), *Polypedates* sp.; clade B (Nan), *P. cf. impresus*; clade C (Southern), *P. cf. leucomystax*; and clade D (Northern D), *P. cf. megacephalus* (รูป 1) จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า clade A มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ clade B ที่พบในจังหวัดน่าน อย่างไรก็ตามพบอีกว่าปาดในกลุ่มของ clade A ซึ่งอยู่ในจังหวัดกาญจนบุรี แม่ฮ่องสอน และเพชรบุรีมีการใช้พื้นที่อาศัยร่วมกับปาดในกลุ่ม clade D ซึ่งน่าจะเป็น *P. cf. megacephalus* ที่มีการกระจายอยู่บริเวณเหนือคอคอดกะ ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน กาญจนบุรี เพชรบุรี สระบุรี เลย นครราชสีมา และประจวบคีรีขันธ์ ในขณะที่ปาดกลุ่ม clade C ที่คาดว่าน่าจะเป็น *P. cf. leucomystax* พบว่ามีการกระจายตัวอยู่ทางตอนใต้ของคอคอดกะในพื้นที่จังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช ภูเก็ต และระนอง (รูป 2A) และจากการทำนายพื้นที่ที่เกิดการแยกทางพันธุกรรมของปาดในกลุ่ม clade D และ C โดยการอาศัยของมูลค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยโปรแกรม Barrier 2.2 พบว่าประชากรทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันอย่างมากรอบบริเวณคอคอดกะ (รูป 2B)

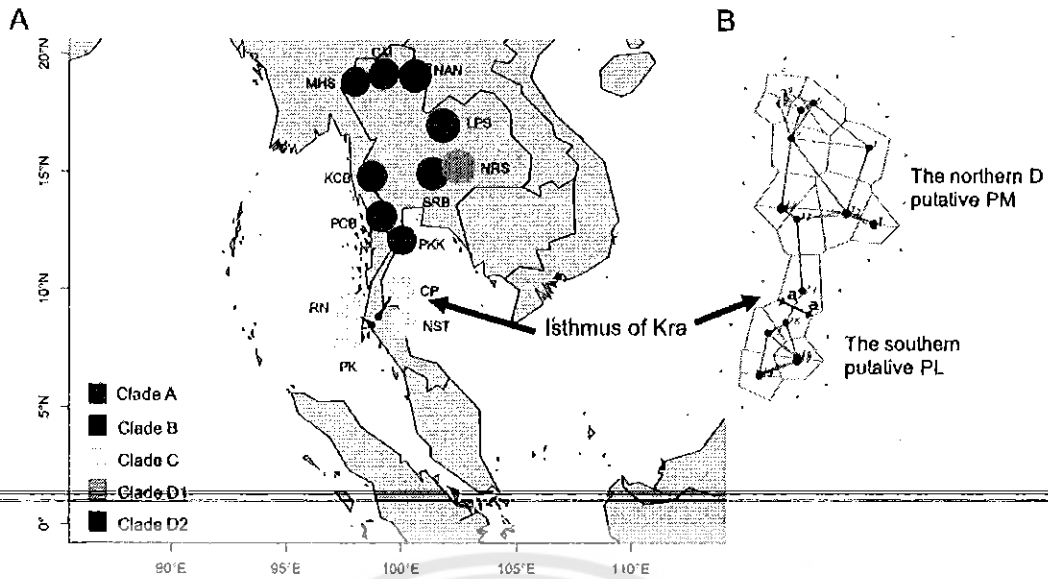
จากการศึกษาเครือข่ายของ haplotype ในประชากรปาดด้วยวิธี minimum spanning network ดังรูป 1 แสดงให้เห็นว่า clade D มีจำนวนของ haplotype สูงสุดคือ 7 แบบ ( $H_d = 0.746$ )



รองลงมาได้แก่ clade C จำนวน 5 แบบ ( $H_d = 0.7526$ ) (ตาราง 2) รูปแบบ haplotype A และ B เป็นรูปแบบเฉพาะที่พบได้ในกลุ่มของ clade A อย่างเดียว รวมถึง haplotype C ที่พบได้เฉพาะในกลุ่มของ clade B เช่นกัน นอกจากนี้รูปแบบ haplotype D-I เป็นแบบที่พบได้ในกลุ่ม clade D และมี haplotype J ที่เป็น haplotype ร่วมที่สามารถพบได้ในหลายพื้นที่เป็นวงกว้างของบริเวณที่อยู่เหนือคอคอดกะ ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ นอกจากนี้ในกลุ่ม clade D พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันแบ่งออกเป็นสองกลุ่มได้แก่ clade D1 และ clade D2 โดยที่ haplotype F และ G จะพบได้เฉพาะในกลุ่มของ clade D1 สำหรับประชากรปาดในกลุ่ม clade C ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น *P. cf. leucomystax* เป็นกลุ่มที่จัดว่ามีความหลากหลายของชนิด haplotype สูงโดยมี haplotype เฉพาะกลุ่มได้แก่ haplotype M, N และ O และมี haplotype ที่ร่วมกันหลายพื้นที่ได้แก่ haplotype K และ L

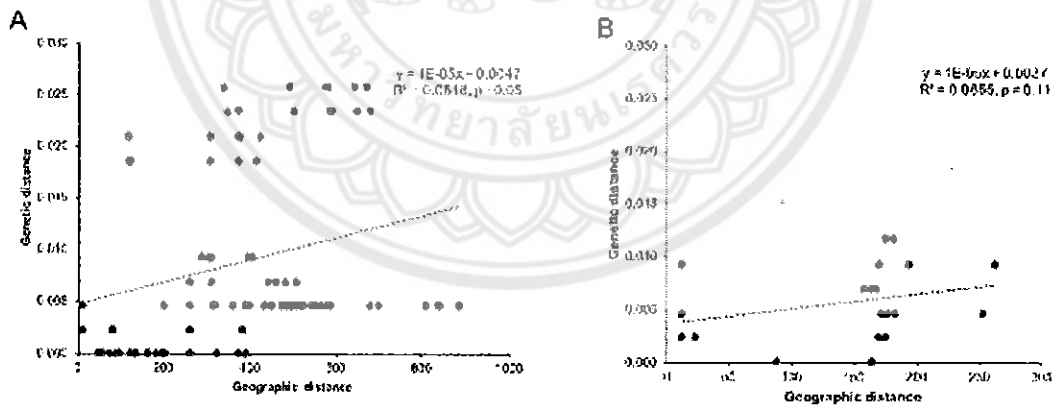


รูป 1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการกระจายของ haplotype ของประชากรปาด *P. leucomystax* complex ในประเทศไทยโดยการใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจาก mitochondrial COI



รูป 2 การกระจายรูปแบบของ haplotype ของยีน mitochondrial COI (A) และความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ส่งผลให้เกิดการแยกของประชากรปาด *P. leucomystax* complex ในเขตภาคเหนือและภาคใต้ (B)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (geographical distance) ของแต่ละกลุ่มประชากรของ clade D และ C ด้วยวิธี linear regression model แสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมเกิดขึ้นถึงแม้ว่าจะมีพื้นที่อยู่อาศัยห่างจากกันก็ตาม (รูป 3)



รูป 3 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมและระยะห่างทางภูมิศาสตร์ด้วยวิธี linear regression model ของประชากรปาด *P. leucomystax* complex ในเขตภาคเหนือ (A) และ ภาคใต้ (B)

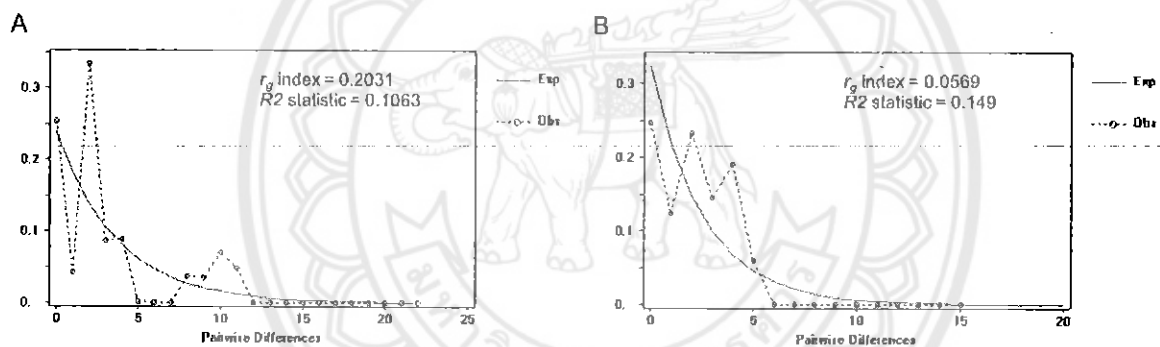
#### 4.3 ประวัติศาสตร์ทางภูมิประชากรศาสตร์ของปาด (Demographic history)

จากการวิเคราะห์พื้นที่ที่สำคัญในการแยกกลุ่มประชากรของปาดพบว่าบริเวณรอบ ๆ คอคอดกะเป็นบริเวณที่แยกปาดออกเป็น clade C (*P. cf leucomystax*) และ clade D (*P. cf magacephalus*) neutrality test ด้วยวิธีของ Tajima's D และ Fu's Fs มีค่าเป็นบวกแต่ไม่มีนัยสำคัญยกเว้น Fu's Fs ของกลุ่ม clade C ที่มีค่าเป็นบวกและมีนัยสำคัญ (ตาราง 3)

ตาราง 3 สถิติในการศึกษาประวัติศาสตร์ของภูมิศาสตร์ประชากรของปาด *P. leucomystax* complex ในประเทศไทยระหว่างกลุ่ม Northern B clade (putative *P. megacephalus*) และ Southern clade (putative *P. leucomystax*).

Clade	Tajima's <i>D</i>		Fu's <i>F<sub>s</sub></i>	
	<i>D</i>	<i>P</i> value	<i>F<sub>s</sub></i>	<i>P</i> value
The Northern D	0.439	>0.1	3.213	0.045
The Southern	1.176	>0.1	3.031	0.071

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ด้วย mismatch distribution ของประชากรใน clade D มีลักษณะหลายยอดเอียงซ้ายและมีค่า  $r_g$  เท่ากับ 0.2031 ในขณะที่ประชากร clade C มีลักษณะเป็นยอดแค่ง่าเดียวและมีค่า  $r_g$  ต่ำมาก 0.0569 (รูป 4) แสดงให้เห็นว่าประชากร clade D มีขนาดประชากรคงที่แต่ประชากรในกลุ่ม clade C นั้นมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น



รูป 4 mismatch distribution ของปาด *P. leucomystax* complex ของประชากรในเขตภาคเหนือ (A) และ ภาคใต้ (B)

## บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษาวิจัย

อนุกรมวิธานของปาด *P. leucomystax* complex ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Asian frog tree เป็นที่ถกเถียงกันอยู่เนื่องจากปาดกลุ่มนี้มีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวาง จากประเทศเนปาลไปยังเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นเพื่อทำความเข้าใจโครงสร้างประชากรและชีวภูมิศาสตร์ของปาด *P. leucomystax* complex ในประเทศไทยที่ซึ่งมีความสำคัญต่อการกระจายตัวทางพันธุกรรมของปาดในกลุ่มนี้ ยีน mitochondrial COI ของปาดเหล่านี้จึงถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับวงศ์ตระกูลที่มีการสืบเชื้อสายผ่านทาง mitochondria ในการศึกษาพบว่าปาด *P. leucomystax* complex ในประเทศไทยประกอบด้วย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Northern D clade (clade D), Southern clade (clade C), Nan clade (clade B) และ Northern A clade (clade A) ซึ่งคาดว่าแต่ละกลุ่มเหล่านี้อาจเป็นปาดชนิด *P. megacephalus*, *P.*

*leucomystax*, *P. impresus* และ *Polypedates* sp. ตามลำดับ แม้ว่า mtDNA phylogeny จะแสดงให้เห็นการแยกกลุ่มของปาดในแต่ละ clades แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่การเกิด mtDNA introgression ก็สามารถพบได้บ่อยระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันและอยู่ในพื้นที่ที่ติดกัน (secondary contact) (Toews และ Brelsford, 2012, Zielinski et al., 2013, Wielstra et al., 2017a และ Wielstra et al. 2017b) การเกิด mtDNA introgression ในประชากรสิ่งมีชีวิตที่มีการวิวัฒนาการแบบ sympatric หรือบริเวณรอบ ๆ ขอบของการกระจายพันธุ์ระหว่างของสิ่งมีชีวิตสองชนิดนั้นอาจเกิดจากแยกการสืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ ตัวอย่างเช่น ซาลาแมนเดอร์ (crested newt) ในสกุล *Triturus* (บริเวณใต้ของทะเล Marmara) ที่พบการเกิด introgression แสดงให้เห็นถึงการเคลื่อนไหวของบริเวณที่เกิดการผสมระหว่างชนิด (hybrid zone) (Wielstra et al., 2017b) ดังนั้นการใช้ข้อมูล mitochondria DNA เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกชนิด ดังนั้นการใช้วิธีการแบบบูรณาการ เช่น สันฐานวิทยา ชีวเคมีนิเวศวิทยาและ / หรือดีเอ็นเอทางนิวเคลียร์ จะต้องมีการนำมาประเมินอนุกรมวิธานของ *P. leucomystax* complex เพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น (Padial et al., 2010) จากการศึกษาของ Kuraishi et al. (2013) พบว่ากลุ่มตัวอย่างของ *P. leucomystax* complex จากอินโดนีเซียโดยใช้ดีเอ็นเอจากนิวเคลียส ได้แก่ nuclear brain-derived neurotrophic factor (BDNF) และ recombination activating gene 1 (RAG-1) เกิดการใช้ haplotype ร่วมกันกับตัวอย่างที่ได้มาจากทางตอนใต้ของ IOK แสดงให้เห็นว่าปาดในกลุ่มนี้อาจจะเกิดการผสมผสมกันอย่างลึกซึ้งระหว่างชนิดกันตั้งแต่บรรพบุรุษหรือการคัดแยกเชื้อสายที่ไม่สมบูรณ์

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Bayesian analysis แสดงให้เห็นความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ของสายพันธุ์ปาดระหว่างกลุ่มภาคเหนือและภาคใต้ นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Monmonier ยังชี้ให้เห็นว่าคอคอดกะ (isthmus of Kra) ที่อยู่ระหว่าง 11 ถึง 13 ° N ตามแนวชายแดนไทยนั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างทั้งสองประชากรอย่างมากซึ่งสอดคล้องกับความแตกต่างทางพันธุกรรมที่มีนัยสำคัญระหว่างประชากรทั้งสองด้านของคอคอด Kuraishi และคณะ (2013) สำรองโครงสร้างประชากรของ *P. leucomystax* complex ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่า *P. megacephalus* มีการกระจายตัวในบริเวณเขตอินโดจีน (ทางตอนเหนือของไทย ลาว เวียดนามและตอนใต้ของจีน) (Kuraishi et al., 2013; Pan et al) ในขณะที่ช่วงของ *P. leucomystax* จะกระจายตัวในเขต Sunda regions ได้แก่ ภาคใต้ของประเทศไทยและหมู่เกาะมาเลย์ (Brown et al., 2010; Kuraishi et al., 2013) จากข้อมูลการกระจายชนิดของปาดในประเทศไทยเราจึงคาดการณ์ว่ากลุ่มปาดที่กระจายทางด้านเหนือของคอคอดกะ

(clade D) น่าจะเป็น *P. megacephalus* และกลุ่มประชากรปาดที่กระจายอยู่ทางด้านใต้ของคอคอดกระ (clade C) น่าจะเป็น *P. leucomystax* คอคอดกระจัดว่าเป็นบริเวณที่มีความโดดเด่นในการเป็นเขตแดนที่กั้นการกระจายของสิ่งมีชีวิตของทั้งกลุ่มสัตว์และพืชดอก จากการศึกษาของ Bruyn และคณะ (2005) ได้ใช้หลักฐานทางพันธุกรรมจาก *Macrobrachium rosenbergii* (กุ้งน้ำจืดที่มีการแพร่กระจายในวงกว้าง) เพื่อตั้งสมมติฐานการเกิดทะเลที่ตัดข้ามคอคอดกระเป็นระยะเวลากว่า 1 ล้านปีทำให้เกิดการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์อย่างไม่ต่อเนื่องกับกุ้งชนิดนี้ ในทางตรงกันข้าม Hughes และคณะ (2011) ใช้ข้อมูลพื้นฐานของฟอสซิลทางทะเลและข้อมูลทางธรณีวิทยาเสนอว่าการเกิดความแตกต่างของชนิดสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันบริเวณทางเหนือและใต้ของคอคอดกระน่าจะเกิดจากอิทธิพลของเขตภูมิอากาศมากกว่าการท่วมของน้ำทะเลหรือการรुकล้ำ ณ จุดใด ๆ ที่ใกล้กับคอคอดกระแล้วทำให้แยกพื้นที่บริเวณนี้ออกเป็นสองด้าน นอกจากนี้ยังมีหลักฐานของความแตกต่างของชนิดสัตว์ที่สามารถบินได้ เช่น นกและค้างคาวเกิดขึ้นที่บริเวณคอคอดกระอีกด้วย (Hughes et al., 2011) สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่าอุปสรรคทางธรณีบริเวณคอคอดกระอาจมีบทบาทนี้ไม่น่าจะเป็นอุปสรรคที่จะส่งผลให้เกิดการแยกเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ได้ (vicariance) จากการวิเคราะห์สภาพภูมิอากาศของ Hughes และ (2011) สามารถกำหนดเขตภูมิอากาศในอินโดจีนและคาบสมุทรมลายูได้เป็น 4 โซน โดยเขตภูมิอากาศจะมีลักษณะที่คล้ายกันที่ตั้งแต่ช่วง Interglacial สุดท้ายจนถึงสภาพปัจจุบัน ที่น่าสนใจคือความแตกต่างทางภูมิอากาศ เช่น การควบแน่น อุณหภูมิและฤดูกาลระหว่างเขตภาคกลาง (ทางตอนเหนือของ IOK) และเขตภาคใต้ (ทางใต้ของ IOK) ด้วยเหตุนี้เราจึงเสนอว่าสภาพภูมิอากาศเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการสร้างการกระจายเชิงพื้นที่ของปาดระหว่างกลุ่มทางตอนเหนือและใต้ของคอคอดกระ นอกจากนี้ haplotype network ยังแสดงให้เห็นว่าปาดในเขตภาคเหนือและภาคใต้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุดและมีการกระจายตัวที่กว้างขึ้นในประเทศไทยแม้ว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *P. megacephalus* (ทางตอนเหนือคอคอดกระ) กับ *P. leucomystax* (ทางตอนใต้ของคอคอดกระ) น่าจะเกิดขึ้นในช่วง Pliocene หรือตอนต้นของช่วง Pleistocene (1.4-4.0 MYBP) (Kuraishi et al., 2013) นอกจากนี้เรายังสันนิษฐานว่าประชากรของปาดทางตอนใต้น่าจะมีการขยายตัวและตั้งรกรากมาทางตอนเหนือของอินโดจีนซึ่งส่งผลให้เกิดความหลากหลายของชนิดเนื่องข้อมูลประวัติศาสตร์ทางภูมิประชากรศาสตร์ที่แสดงให้เห็นว่า mismatch distribution ของประชากรปาดทางตอนใต้นั้นลักษณะการกระจายแบบ unimodal และค่า raggedness น้อยมาก (รูป 3)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทางแม่ภายในกลุ่มประชากรของปาดในเขตเหนือ (clade D) แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมของปาดจากจังหวัดนครราชสีมาที่มี haplotype ที่เป็นแบบเฉพาะถิ่นและน่าจะเกิดขึ้นตามธรรมชาติ แต่มีค่า Bayesian posterior possibility เพียงแค่ 0.7 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาลักษณะภูมิประเทศบริเวณนี้พบว่าประชากรของจากจังหวัดนครราชสีมาที่จัดว่าเป็น clade D1 นั้นจะถูกแบ่งออกจากกลุ่มประชากรอื่น ๆ ภายใน clade D โดยใช้เทือกเขาสองแห่ง ได้แก่ ดงพญาเย็นและสันกำแพง นี่อาจเป็นอุปสรรคต่อการเคลื่อนที่ของยีนระหว่างประชากรปัจจุบันในเขตตอนเหนือของกลุ่ม clade D ระหว่างประชากรทางด้านตะวันออก (clade D1) และตะวันตก (clade D2) ของประเทศไทย แต่น่าเสียดายที่จำนวนประชากรในกลุ่มนี้มีจำกัด ดังนั้นเพื่อตรวจสอบยืนยันเพิ่มเติมว่าเทือกเขาดงพญาเย็นและสันกำแพงเป็นอุปสรรคต่อการไหลเวียนของยีนใน *P. megacephalus* หรือไม่

## บทที่ 6

### สรุปผลการศึกษาวิจัย

จากข้อมูลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยยีน mitochondrial COI ของปาดในกลุ่ม *P. leucomystax* complex จากประเทศไทยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ น่าน (*P. cf impresus*), Northern D (*P. cf megacephalus*), Southern (*P. cf leucomystax*) และ Northern A (*Polypedates* sp.) เราสังเกตเห็นว่าประชากรของ northern D น่านและ *Polypedates* sp. น่าจะมีการวิวัฒนาการแบบ sympatry แต่ประชากรปาดเหล่านี้ น่าจะมีการวิวัฒนาการแบบ allopatric กับประชากรปาดทางตอนใต้ (*P. cf leucomystax*) เนื่องจากแยกคอคอดกระเพราะว่าบริเวณคอคอดกระมีสภาพภูมิอากาศบริเวณทางตอนเหนือและใต้มีความแตกต่างกัน ดังนั้นสภาพภูมิอากาศอาจเป็นส่วนสำคัญในการจำกัดการเคลื่อนย้ายของประชากรปาดทั้งสองชนิด และด้วยสภาพแปรปรวนของสภาพอากาศในช่วง Pliocene และ Pleistocene เป็นสถานการณ์ที่เป็นไปได้ว่าที่ส่งผลทำให้เกิดการกระจายตัวชนิด *P. leucomystax* complex ไปในบริเวณต่าง ๆ ของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศจีน รวมถึงการนำไปสู่ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาดในเขตภาคใต้และภาคเหนือในประเทศไทยอีกด้วย



## เอกสารอ้างอิง

- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48.
- Blair C, Davy CM, Ngo A, Orlov NL, Shi HT, Lu SQ, Gao L, Rao DQ, Murphy RW. 2013. Genealogy and demographic history of a widespread amphibian throughout Indochina. *Journal of Heredity* 104:72–85.
- Brown, R.M., Linkem, C.W., Siler, C.D., Sukumaran, J., Esselstyn, J.A., Diesmos, A.C., Iskandar, D.T., Bickford, D., Evans, B.J., McGuire, J.A. and Grismer, L., 2010. Phylogeography and historical demography of *Polypedates leucomystax* in the islands of Indonesia and the Philippines: Evidence for recent human-mediated range expansion?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), pp.598-619.
- Chan-ard, T. 2003. A photographic guide to amphibians in Thailand. Darnsutha. Press Co., Ltd., Bangkok, 175 pp.
- de Bruyn M, Nugroho E, Hossain MM, Wilson JC, Mather PB. 2005. Phylogeographic evidence for the existence of an ancient biogeographic barrier: the Isthmus of Kra Seaway. *Heredity* 94: 370-378.
- Frost DR. 2013. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. New York: American Museum of Natural History. [electronic database] Available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (accessed 22 June 2017).
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Hall R. 1998. The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea. In: Hall R, Holloway JD, eds. *Biogeography and geological evolution of SE Asia*. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 99–131.
- Harpending HC. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 591-600.
- Heyer WR. 1971. *Mating calls of some frogs from Thailand*. Chicago: Field Museum of Natural History.
- Hughes AC, Satasook C, Bates PJ, Bumrungsri S, Jones G. 2011. Explaining the causes of the zoogeographic transition around the Isthmus of Kra: using bats as a case study. *Journal of Biogeography* 38: 2362-2372.
- Inger, R.F. and Stuebing, R.B. 1997. *A field guide to the frogs of Borneo*. Kota Kinabalu: Natural History Publications.
- Inger, R.F., 1966. Systematics and zoogeography of the Amphibia of Borneo. *Fieldiana Zoology*, 52, pp.1-402.

- Kuraishi N, Matsui M, Hamidy A, Belabut DM, Ahmad N, Panha S, Sudin A, Yong HS, Jiang JP, Ota H, Thong HT, Nishikawa K. 2013. Phylogenetic and taxonomic relationships of the *Polypedates leucomystax* complex (Amphibia). *Zoologica Scripta* 42:54–70.
- Kuraishi N, Matsui M, Ota H, Chen S-L. 2011. Specific separation of *Polypedates braueri* (Vogt, 1911) from *P. megacephalus* (Hallowell, 1861) (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Zootaxa* 2744:53–61.
- Kuraishi, N., Matsui, M., Ota, H. and Chen, S.L., 2011. Specific separation of *Polypedates braueri* (Vogt, 1911) from *P. megacephalus* (Hallowell, 1861) (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Zootaxa*, 2744(1), pp.53-61.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452.
- Manni F, Guérard E, Heyer E. 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology* 76:173–190.
- Matsui M, Ito H, Shimada T, Ota H, Saidapur SK, Khonsue W, Tanaka-Ueno T, Wu GF. 2005. Taxonomic relationships within the pan-oriental narrow-mouth toad *Microhyla ornata* as revealed by mtDNA analysis (Amphibia, Anura, Microhylidae). *Zoological Science* 22:489–495.
- Matsui M, Mohamed M, Shimada T, Sudin A. 2007. Resurrection of *Staurois parvus* from *S. tuberilinguis* from Borneo (Amphibia, Ranidae). *Zoological Science* 24:101–106.
- Matsui M, Seto T, Utsunomiya T. 1986. Acoustic and karyotypic evidence for specific separation of *Polypedates megacephalus* from *P. leucomystax*. *Journal of Herpetology* 20:483–489.
- Matsui, M., Ito, H., Shimada, T., Ota, H., Saidapur, S.K., Khonsue, W., Tanaka-Ueno, T. and Wu, G. F., 2005. Taxonomic relationships within the Pan-Oriental narrow-mouth toad *Microhyla ornata* as revealed by mtDNA analysis (Amphibia, Anura, Microhylidae). *Zoological science*, 22(4), pp.489-495.
- Matsui, M., Mohamed, M., Shimada, T. and Sudin, A., 2007. Resurrection of *Staurois parvus* from *S. tuberilinguis* from Borneo (Amphibia, Ranidae). *Zoological Science*, 24(1), pp.101-106.
- Nylander JA. 2004. MrModeltest v2.3. [program distributed by the author] Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7:16.
- Pan S, Dang N, Wang J, Zheng Y, Rao D, Li J. 2013. Molecular phylogeny supports the validity of *Polypedates impresus* Yang 2008. *Asian Herpetological Research* 4:124–133.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. 2013. Tracer v1.5. Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 22 June 2017).



- Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rujirawan A, Stuart BL, Aowphol A. 2013. A new tree frog in the genus *Polypedates* (Anura: Rhacophoridae) from southern Thailand. *Zootaxa* 3702:545-565.
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57:758-771.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- ~~Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary~~  
 Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Taylor EH. 1962. The amphibian fauna of Thailand. *University of Kansas Science Bulletin* 43:265-599.
- Toews DP, Brelsford A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21:3907-3930.
- Wielstra B, Burke T, Butlin RK, Arntzen JW. 2017a. A signature of dynamic biogeography: enclaves indicate past species replacement. *Proceedings of the Royal Society B* 284:20172014.
- Wielstra B, Burke T, Butlin RK, Avcı A, Üzümlü N, Bozkurt E, Olgun K, Arntzen JW. 2017b. A genomic footprint of hybrid zone movement in crested newts. *Evolution Letters* 1:93-101. DOI:10.1002/evl3.9.
- Woodruff DS. 2010. Biogeography and conservation in Southeast Asia: how 2.7 million years of repeated environmental fluctuations affect today's patterns and the future of the remaining refugial-phase biodiversity. *Biodiversity and Conservation* 19:919-941.
- Yuan Z-Y, Suwannapoom C, Yan F, Poyarkov NA Jr, Nguyen SN, Chen H-m, Chomdej S, Murphy RW, Che J. 2016. Red River barrier and Pleistocene climatic fluctuations shaped the genetic structure of *Microhyla fissipes* complex (Anura: Microhylidae) in southern China and Indochina. *Current Zoology* 62:531-543.
- Yuan, Z.Y., Suwannapoom, C., Yan, F., Poyarkov, N.A., Nguyen, S.N., Chen, H.M., Chomdej, S., Murphy, R.W. and Che, J., 2016. Red River barrier and Pleistocene climatic? uctuations shaped the genetic structure of *Microhyla fissipes* complex (Anura: Microhylidae) in southern China and Indochina. *Current Zoology*, doi:10.1093/cz/zow042.
- Zieliński P, Nadachowska-Brzyska K, Wielstra B, Szkotak R, Covaciu-Marcov SD, Cogălniceanu D, Babik W. 2013. No evidence for nuclear introgression despite complete mtDNA replacement in the Carpathian newt (*Lissotriton montandoni*). *Molecular Ecology* 22:1884-1903.





# Phylogenetic relationships and genetic diversity of the *Polypedates leucomystax* complex in Thailand

Kittisak Buddhachat<sup>1,\*</sup> and Chatmongkon Suwannapoom<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

<sup>2</sup> School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao, Thailand

\*These authors contributed equally to this work.

## ABSTRACT

Taxonomic uncertainty of the Asian tree frog *Polypedates leucomystax* complex presents the challenging task of inferring its biogeographical history. Here, we describe its dispersion and the genetic relationships among different populations in Thailand, where we connect the population of the *P. leucomystax* complex of the Sunda Islands to the Indochina (mainland) population based on analyses of 266 sequences of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. Our maternal genealogy implies that there are four well-supported lineages in Thailand, consisting of Northern A (clade A: *Polypedates* sp.), Nan (clade B: *P. cf. impresus*), Southern (clade C: *P. cf. leucomystax*) and Northern D (clade D: *P. cf. megacephalus*), with Bayesian posterior probability >0.9. Phylogeny and haplotype networks indicate that clades A, B and D are sympatric. In contrast, clade C (*P. cf. leucomystax*) and clade D (*P. cf. megacephalus*) are genetically divergent due to the geographical barrier of the Isthmus of Kra, resulting in an allopatric distribution. Climatic conditions, in particular differences in rainfall on each side of the Isthmus of Kra, may play an important role in limiting the immigration of both clades. For the within-populations of either clades C or D, there was no significant correlation between geographic and genetic distance by the isolation-by-distance test, indicating intraspecific-dispersal of each clade. Population expansion occurred in clade C, whereas clade D showed a constant population. Taken together, the *P. leucomystax* complex in South East Asia may have diversified under climatic pressure, leading to allopatric and/or sympatric speciation.

Submitted 21 August 2017  
Accepted 23 December 2017  
Published 16 January 2018

Corresponding author  
Kittisak Buddhachat,  
kittisakbu@nu.ac.th,  
k\_buddhachat@yahoo.com

Academic editor  
Graham Wallis

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 10

DOI 10.7717/peerj.4263

© Copyright  
2018 Buddhachat and Suwannapoom

Distributed under  
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Subjects Biodiversity, Biogeography, Evolutionary Studies

Keywords Allopatric, Amphibian, Demographic expansion, Evolution

## INTRODUCTION

Southeast Asia contains a substantial genetic diversity of amphibians. Recent molecular phylogenetic analyses have disclosed many anuran lineages that contain cryptic species. Historically, complex changes in the region's geology and climate (e.g., Pleistocene climatic oscillations) altered the topology and environmental conditions, resulting in an initial fragmentation of habitat. These mechanisms generated the high species richness observed today (Hall, 1998; Woodruff, 2010). Of interest to our research were the numerous frog species in Southeast Asia whose taxonomy is still controversial, such as *Microhyla fissipes*

How to cite this article Buddhachat and Suwannapoom (2018), Phylogenetic relationships and genetic diversity of the *Polypedates leucomystax* complex in Thailand. PeerJ 6:e4263; DOI 10.7717/peerj.4263

(Yuan et al., 2016), *Staurois tuberilinguis* (Matsui et al., 2007), *Microhyla ornata* (Matsui et al., 2005) and *Polypedates leucomystax* (Kuraishi et al., 2013; Rujirawan, Stuart & Aowphol, 2013). Accurate species delimitation is essential to better understand their speciation and diversification and their biogeography for conservation purposes.

The Asian tree frog, the *P. leucomystax* (Gravenhorst, 1829) complex, is an Asian Rhacophoridae frog. These species are widely distributed in Southeast Asia, South China and India. In addition, this species has phenotypic plasticity and exhibits high adaptation to the local environment, leading to its existence in diverse habitats such as forests and even buildings. These high levels of phenotypic plasticity present a great challenge for classification. Phylogenetic and taxonomic relationships of the *P. leucomystax* complex throughout Southeast Asia exhibit adaptive radiation (Kuraishi et al., 2013; Pan et al., 2013; Rujirawan, Stuart & Aowphol, 2013). At least six valid species, including *P. braueri*, *P. impresus*, *P. leucomystax*, *P. macrotis*, *P. megacephalus* and *P. mutus* have been distinguished in the *P. leucomystax* complex based on their morphology, advertisement calls and molecular data (Matsui, Seto & Utsunomiya, 1986; Brown et al., 2010; Kuraishi et al., 2011; Kuraishi et al., 2013; Pan et al., 2013). Five species of genus *Polypedates*, *P. colletti*, *P. leucomystax*, *P. macrotis*, *P. megacephalus* and *P. mutus*, can be found in Thailand (Taylor, 1962; Heyer, 1971; Frost, 2013; Kuraishi et al., 2013; Pan et al., 2013; Rujirawan, Stuart & Aowphol, 2013). Brown et al. (2010) indicated that much of the genetic divergence of the *P. leucomystax* complex was discovered in mainland rather than insular populations distributed throughout thousands of islands of the Malay Archipelago, presumably resulting from range expansion mediated by transportation of agricultural products. Recently, a new species, *P. discantus*, belonging to the *P. leucomystax* species complex from southern Thailand was discovered using data on morphological characteristics, advertisement calls and molecular evidence, which showed that this species was highly dissimilar to *P. leucomystax* and *P. megacephalus* (Rujirawan, Stuart & Aowphol, 2013). Several studies have confirmed the existence of cryptic species of the *P. leucomystax* complex (Matsui, Seto & Utsunomiya, 1986; Kuraishi et al., 2011; Blair et al., 2013; Kuraishi et al., 2013; Pan et al., 2013).

In this study, we investigated the genetic variation, phylogenetic relationships and other relevant factors that limit the dispersal of the *P. leucomystax* complex in Thailand. The present results illustrate the range of distribution of putative *P. leucomystax* and putative *P. megacephalus*, which is influenced by climatic conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection, DNA extraction and sequencing

A total of 266 adult *P. leucomystax* complex individuals were collected from 15 different localities in Thailand (Table 1). All samples were dissected to obtain the liver, which was then stored in absolute ethanol. Sample collection and euthanization were approved by the Center For Animal Research Naresuan University under project number NU-AE591028. Genomic DNA was extracted from liver tissue using a DNA extraction kit (RBC Bioscience, Singapore) and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further use. Individual DNA was used as a template for

Table 1 Localities of sample collection for *Polypedates leucomystax* complex in Thailand.

Locality	Abbreviation	Number	Altitude (m above sea level)	Longitude	Latitude
Nan province	NAN	12	665	18.980974	101.182594
Kanchanaburi province	KCB	20	917	14.69329	98.40535
Loei province: Phu Ruea	LPR	11	939	17.48193	101.34982
Nakhon Ratchasima province	NRS	14	865	14.49336	101.87364
Chiang Mai province: Mae Wang	CM	7	678	18.657305	98.681831
Chiang Mai province: Doi Saket	CM	13	402	18.98777	99.11455
Chiang Mai province: Omkoi	CM	13	460	17.47137	98.45285
Mae Hong Son province	MHS	44	396	19.24797	97.99542
Saraburi province	SRB	12	105	14.70993	100.81819
Phetchaburi province	PCB	22	329	14.70993	100.81819
Prachuap Khiri Khan province	PKK	15	23	11.43678	99.56011
Ranong province	RN	14	18	9.6052	98.4669
Nakhon Si Thammarat province	NST	37	97	8.76902	99.80349
Phuket province: Thalang	PK	17	31	7.96804	98.33589
Chumphon province	CP	15	103	10.110278	99.082778

PCR amplification of the mitochondrial COI gene using Taq DNA polymerase in a total volume of 25  $\mu$ L under the following conditions: an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35–40 cycles at 94 °C for 30 s, 50 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 7 min. PCR products were visualized on 1.5% agarose gel under UV illuminator. The expected size of the partial mitochondrial COI gene sequence was 688 bp. Subsequently, all PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then sequenced (Macrogen, Seoul, South Korea).

### Phylogeny

Bayesian inference (BI) and maximum likelihood (ML) were employed for constructing a phylogenetic tree based on the following partial COI sequences of the *P. leucomystax* complex that were retrieved from GenBank: *P. impresus*: KP996822 (China), KP996846 (China), KP087862–KP087870 (Laos); *P. leucomystax*: KR087871–KR087872 (Thailand); and *P. megacephalus*: KR087879, KR087881 (Thailand). First, the best-fit model of DNA sequence evolution for this locus was identified with the Akaike information criterion (AIC) implemented in MrModeltest v2.3 (Nylander, 2004), resulting in the GTR+I+G model as the best fit with AIC. Subsequently, a Bayesian tree was constructed based on the base substitution calculated from the GTR+I+G model through MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) with two independent searches with random starting trees for five million generations, in which the diagnostic was calculated every 1,000 generations and compared using four Markov chain Monte Carlo chains (temp = 0.2). The log-likelihood scores were used for plotting the convergence in Tracer v1.5 (Rambaut et al., 2013) and building a consensus tree, which was completed by the removal of the first 25% of the generations from each run. For maximum likelihood analysis, RAxML 7.0.4 was carried

out (Stamatakis, Hoover & Rougemont, 2008) using the GTR+I+G model for nucleotide substitution (same as the BI analysis) with 1,000 bootstrap replicates.

### Population genetics and structure

A total of 266 sequences of mitochondrial *COI* were aligned using ClustalW (implemented in MEGA 6.0 with default parameters). The number of polymorphic sites, the parsimony-informative sites, singleton sites, the number of haplotypes, haplotype diversity ( $H_d$ ), and nucleotide diversity for each clade were calculated using DnaSP v5.0 (Librado & Rozas, 2009). Genetic distances among taxa were calculated using the corrected  $p$ -distance model in MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013). Furthermore, we detected a boundary line in the genetic landscape between the Northern D clade and the Southern clade using Barrier 2.2 (Manni, Guérard & Heyer, 2004). A minimum spanning network was constructed using PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) to define the relationships among haplotypes and the distribution of haplotypes in each locality (Bandelt, Forster & Röhl, 1999). To evaluate the effect of geographic distance on the genetic divergence among populations of the Northern D clade and among populations of the Southern clade, a linear regression model was carried out.

### Demographic history

To investigate the demographic history of *P. megacephalus* and *P. leucomystax* populations in Thailand, multiple approaches were explored using DnaSP (Librado & Rozas, 2009). Neutrality tests of Tajima's  $D$  (Tajima, 1989) and Fu's  $F_s$  (Fu, 1997) for the two species were completed. A significantly positive value indicates a process of subdivision or a recent population bottleneck, whereas a population expansion results in a significantly negative value. Pairwise mismatch distribution was used assuming a constant population size (Rogers & Harpending, 1992). Multimodal mismatch distribution implies stability of the population, while unimodal mismatch distribution reflects an expanding population. In addition to these methods, the raggedness index ( $r_g$ ) of the observed distribution was calculated (Harpending, 1994). A small  $r_g$  indicates a demographic expansion.

## RESULTS

### Sequence characteristics

A total of 266 samples of the *P. leucomystax* complex yielded 688 bp fragments of the mitochondrial *COI* gene. All new sequences in this study were deposited in the GenBank database (MG583020–MG583285). After multiple alignment of all *COI* sequences, the sequences were trimmed to the same length (437 bp) before downstream analysis. We observed 82 polymorphic sites, which are also 82 parsimony-informative sites without a singleton site, resulting in the acquisition of 15 haplotypes (Table 2). Overall nucleotide and haplotype diversity were 0.0664 and 0.9000, respectively (Table 2).

### Phylogenetic analyses and haplotype distribution

Based on 266 mitochondrial *COI* sequences of the *P. leucomystax* complex, a matrilineal genealogy was generated, and our results indicated that the *P. leucomystax* complex in

**Table 2 Summary of the *P. leucomystax* complex in Thailand.** Major lineages clades, putative scientific name, number of individuals (*N*), number of mtDNA haplotypes (*n*), number of polymorphic sites (*P*), parsimony-informative sites (*PI*) and singleton sites (*S*), haplotype diversity ( $H_d$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ).

Clade	Putative species	<i>N</i>	<i>n</i>	$\pi$	$H_d$	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>PI</i>
A (the Northern A)	<i>Polypedates</i> sp.	40	2	0.0037	0.4089	4	0	4
B (Nan)	<i>P. impresus</i>	12	1	0	0	0	0	0
C (the Southern)	<i>P. megacephalus</i>	131	7	0.0048	0.746	15	1	14
D (the Northern D)	<i>P. leucomystax</i>	83	5	0.0073	0.7526	7	0	7
<b>Total</b>		<b>266</b>	<b>15</b>	<b>0.0664</b>	<b>0.9</b>	<b>82</b>	<b>0</b>	<b>82</b>

Thailand consists of four clades: clade A (Northern A), *Polypedates* sp.; clade B (Nan), *P. cf. impresus*; clade C (Southern), *P. cf. leucomystax*; and clade D (Northern D), *P. cf. megacephalus* (Fig. 1). With respect to phylogenetic inference, clade A was treated as a sister group of clade B, which was found in Nan. Clade A, however, can be seen in genetic samples obtained from the Kanchanaburi (KCB), Mae Hong Son (MHS) and Phetchaburi (PCB) provinces and shared a habitat with clade D, which was recognized as *P. cf. megacephalus*; its distribution range was in the far north of the Isthmus of Kra at Chiang Mai (CM), MHS, KCB, PCB, Saraburi (SRB), Loei (LPR), Nakhon Ratchasima (NRS) and Prachuap Khiri Khan (PKK). The dispersal areas of clade C, as represented by *P. cf. leucomystax*, included Chumphon (CP), Nakhon Si Thammarat (NST), Phuket (PK) and Ranong (RN), which are south of the Isthmus of Kra (Fig. 2A). Barrier 2.2 was employed to determine a barrier for immigration between clade C and clade D populations based on the dataset of genetic distance (Kimura's two-parameter model). Likely, the Isthmus of Kra (IOK) represents a significant barrier to restrict immigration based on the great genetic distance that was noted around IOK (Fig. 2B).

A minimum spanning network among the mitochondrial haplotypes was also constructed as shown in Fig. 1. Clade D exhibited the highest number of haplotypes at seven ( $H_d = 0.746$ , followed by clade C with five haplotypes ( $H_d = 0.7526$ ) (Table 2). Haplotypes A and B, seen in clade A, and haplotype C found in clade B were unique haplotypes. Haplotypes D–I were noted in clade D, while populations of northern, western and upper southern Thailand (KCB, PCB and PKK, respectively) shared haplotype J. Haplotypes F and G of clade D are considerably divergent from the rest of clade D and we partition it in two subclades: D1 and D2. Clade C (*P. cf. leucomystax*) had high haplotype diversity and contained three unique haplotypes (M, N and O) and two shared haplotypes (K and L).

Analyses of the linear regression model between the genetic distance of the mitochondrial *COI* gene sequence and the geographical distance found no significant isolation-by-distance effect among populations of clade C (*P. cf. leucomystax*) and clade D (*P. cf. megacephalus*) (Fig. 3).

### Demographic history

When we defined a significant barrier around the Isthmus of Kra (IOK) leading to the genetic divergence between clade C (*P. cf. leucomystax*) and clade D (*P. cf. megacephalus*),

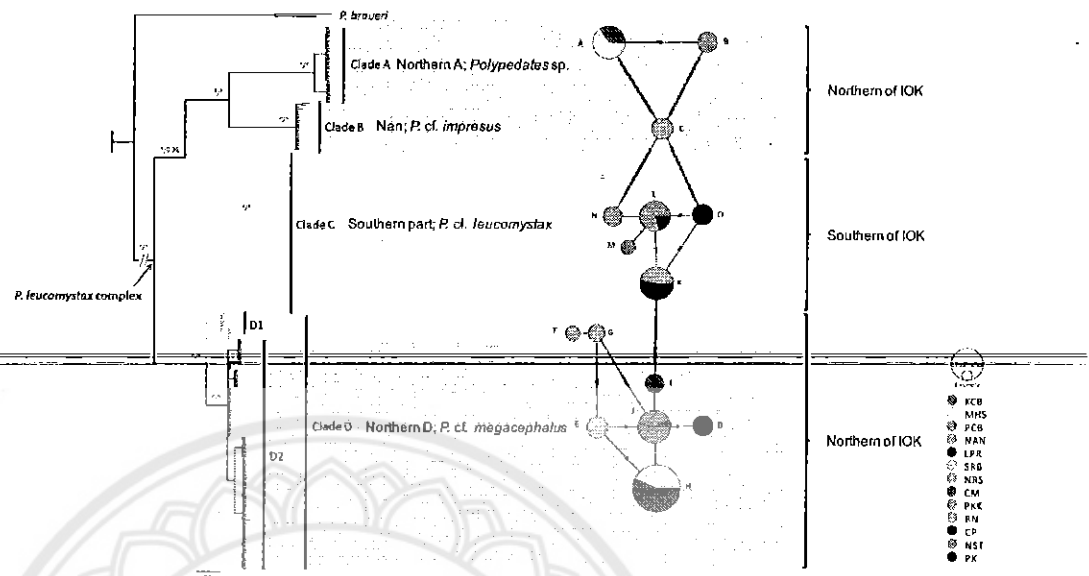


Figure 1 Phylogeographic relationships and a minimum spinning network of all haplotype of the *Polypedates leucomystax* complex among populations in Thailand. It consists of clade A as *Polypedates* sp., clade B as *P. cf. impresus*, clade C (the Southern clade) as *P. cf. leucomystax*, and clade D (the Northern D clade) as *P. cf. megacephalus*, as well as outgroups (KR087858, KP996762 = *P. braueri*) inferred from Bayesian analysis of mitochondrial COI gene sequences. Bayesian posterior probability values are expressed above internodes. The asterisks above branches represent bootstrap support for Bayesian posterior probabilities and maximum likelihood (>95%). Scale bar represents 0.5 nucleotide substitutions per site. IOK represents the Isthmus of Kra.

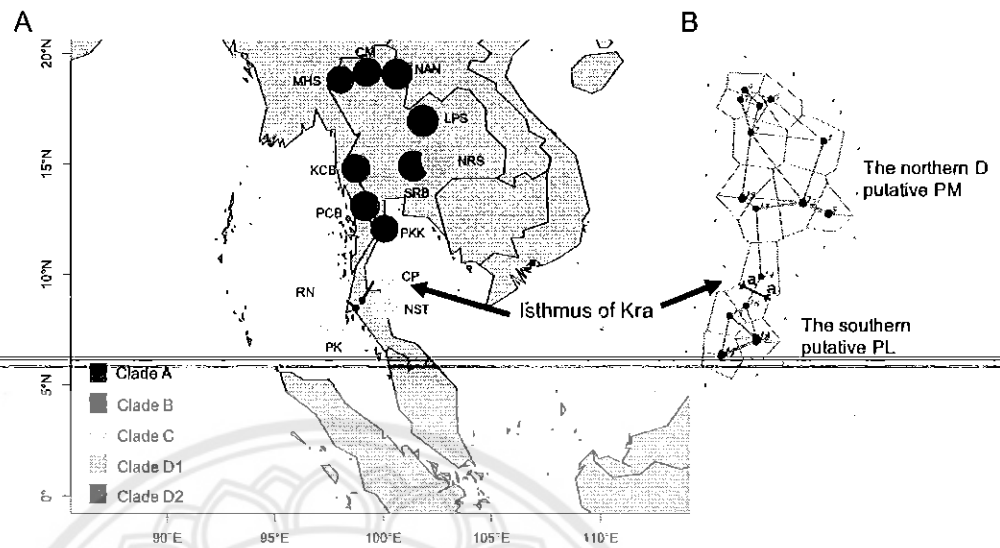
Full-size [DOI: 10.7717/peerj.4263/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.4263/fig-1)

neutrality tests (Tajima's  $D$  and Fu's  $F_s$ ) of both species were not significantly positive, whereas Fu's  $F_s$  of clade C was significantly positive (Table 3). Furthermore, the mismatch distribution was tested as a result of a left-skewed multimodal mismatch distribution for clade D with moderate  $r_g$  (0.2031) but a unimodal mismatch distribution for clade C with a low  $r_g$  (0.0569) (Fig. 4). Overall, these results suggested a constant population size of clade D and a population expansion of clade C.

## DISCUSSION

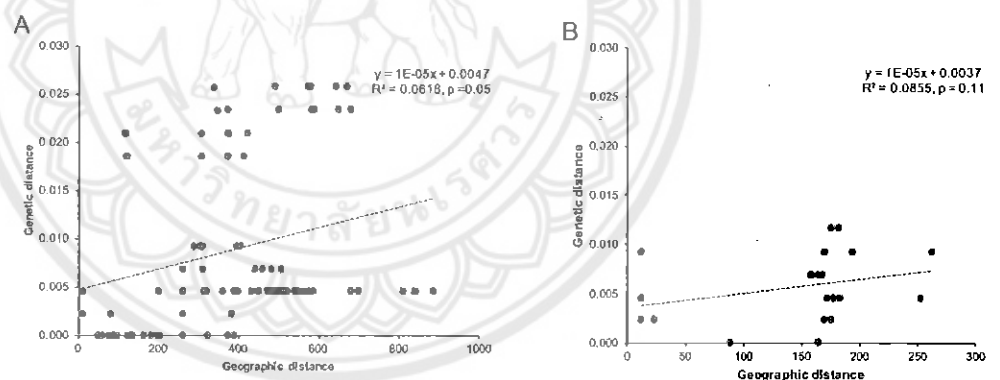
The taxonomy of the Asian tree frog of the *P. leucomystax* complex is contentious due to the species' widespread distribution from Nepal to South East Asia and similar morphologies. To better understand the population structure and biogeography of the *P. leucomystax* complex in Thailand, where there is a substantial area for their genetic dispersal, the COI mitochondrial gene sequences of these species were analysed. Our matrilineal genealogy implied four well-supported lineages, consisting of a Northern D clade (clade D), a Southern clade (clade C), a Nan clade (clade B) and a Northern A clade (clade A); based on their sequences and distributions, they might be treated as *P. megacephalus*, *P. leucomystax*, *P. impresus* and *Polypedates* sp., respectively.





**Figure 2** Clade distribution of the *P. leucomystax* complex throughout Thailand (A) and the genetic differentiation across the Northern D clade (putative *P. megacephalus*; PM) and the Southern clade (putative *P. leucomystax*; PL) (B). The abbreviations for each locality are given in Table 1. Different colors represent the different clades. "a" represents a significant barrier to partition the distribution of the two clades, by Barrier version 2.2.

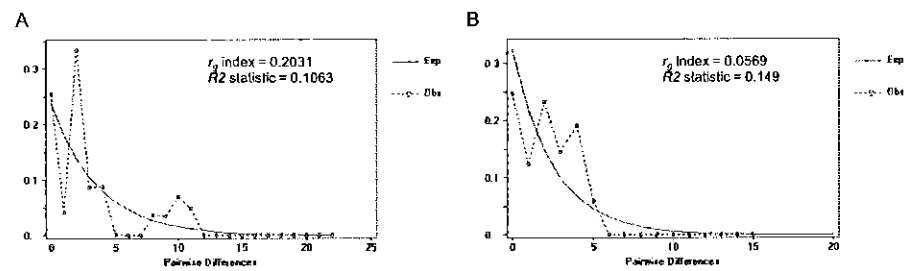
Full-size [DOI: 10.7717/peerj.4263/fig-2](https://doi.org/10.7717/peerj.4263/fig-2)



**Figure 3** The correlation of genetic distance and linear geographic distance (km) for (A) the Northern D clade (putative *Polypedates megacephalus*) and (B) the Southern clade (putative *Polypedates leucomystax*).

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.4263/fig-3](https://doi.org/10.7717/peerj.4263/fig-3)

Although the mtDNA phylogeny reveals the presence of distinct clades, mtDNA introgression is frequently observed where closely related species are in secondary contact (Toews & Brelsford, 2012; Zieliński et al., 2013; Wielstra et al., 2017a; Wielstra et al., 2017b). This can occur particularly in sympatric populations or at the boundaries of species distributions resulting from incomplete reproductive isolation. For instance, a pair of crested newt species (genus *Triturus*) form a hybrid zone (south of the Marmara



**Figure 4** Mismatch distribution of the mitochondrial COI gene in (A) the Northern D clade (putative *Polypedates megacephalus*) and (B) the Southern clade (putative *Polypedates leucomystax*). The raggedness ( $r_g$ ) index is calculated to evaluate the population expansion of each species. Ramos-Onsins and Rozas's  $R_2$  statistic represents the population growth.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.4263/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.4263/fig-4)

**Table 3** Summary of statistics used to compute the demographic history of populations of the Northern B clade (putative *P. megacephalus*) and the Southern clade (putative *P. leucomystax*).

Clade	Tajima's $D$		Fu's $F_s$	
	$D$	$P$ value	$F_s$	$P$ value
The Northern D	0.439	>0.1	3.213	0.045
The Southern	1.176	>0.1	3.031	0.071

Sea); where introgression suggests movement of the hybrid zone (Wielstra et al., 2017b). Therefore, the use of mitochondria DNA data alone is not sufficient for species delineation. An integrative approach, consulting additional data such as morphology, bioacoustics, ecology, and/or nuclear DNA, would be required to more accurately assess the taxonomy of the *P. leucomystax* complex (Padial et al., 2010). Kuraishi et al. (2013) found one sample of the *P. leucomystax* complex from Indochina shared nuclear brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and recombination activating gene 1 (RAG-1) haplotypes with one sample from the south of IOK, possibly suggesting deep coalescence or incomplete lineage sorting.

Bayesian inference strongly supported the geographic distinction of species in the Northern D clade and the Southern clade. Furthermore, Monmonier's algorithm suggested that the Isthmus of Kra (IOK; located between 11 and 13°N along the Thai Peninsula) corresponds to a considerable phylogeographic break as evidenced by the large genetic divergence between the populations on either side of the isthmus. Kuraishi et al. (2013) explored the population structure of *P. leucomystax* complex in Southeast Asia and revealed that *P. megacephalus* is restricted to Indochina (the northern Thailand, Laos, Vietnam and southern China) (Kuraishi et al., 2013; Pan et al., 2013), while the range of *P. leucomystax* is restricted to the Sunda regions (southern Thailand and Malay Archipelago) (Brown et al., 2010; Kuraishi et al., 2013). Based on their distribution, we ascribe the Northern D clade to *P. megacephalus* and the Southern clade to *P. leucomystax*. The Isthmus of Kra has been well-characterized as a considerable biogeographic boundary of both faunal and floral assemblages that are limited on either side. De Bruyn et al. (2005) used genetic evidence from *Macrobrachium rosenbergii* (freshwater shrimp with a broad distribution) to

hypothesize that the existence of a seaway across the IOK over a million year contributed to its geographically discontinuous distribution. In contrast, *Hughes et al. (2011)*, based on marine fossils and geological data, proposed that the occurrence of species with distinct distributions in the north and south of the IOK is related to the influence of the climatic zone rather than either marine inundation or breaches at any point near the IOK. In addition, flying animals such as birds and bats also have a restricted species distribution which is bounded by the IOK (*Hughes et al., 2011*). This indicates that the geophysical barriers at the IOK, such as the waterway, are unlikely to be significant biogeographical boundaries causing vicariance of various species at the IOK. *Hughes et al. (2011)* also ~~determined the climatic zone in Indochina and the Malay Peninsula is the result of four~~ climatic zonations, which are displayed as similar climatic zones found in each time period from the Last Interglacial Period to the current conditions. Of interest is the climatic divergence in precipitation, temperature and seasonality between the central zone (north of IOK) and the southern zone (south of IOK). Based on this, we suggest climate was a significant factor in shaping the spatial distribution of the genetic lineage between the Northern and Southern clades. The haplotype network also shows that the Northern D clade and the Southern clade have the highest genetic diversity and a wide range distribution in Thailand, although the most recent divergence time between *P. megacephalus* (putative Northern D clade) and *P. leucomystax* (putative Southern clade) was estimated to be in the late Pliocene or early Pleistocene (1.4–4.0 MYBP) (*Kuraishi et al., 2013*). We assumed that the populations of the Southern clade (putative *P. leucomystax*) expanded and colonized the northern part of Indochina, leading to the diversification of the species. This hypothesis is partially supported by the results of the unimodal pairwise difference and the small value of the raggedness index in the Southern clade (Fig. 3).

Within the population of the Northern D clade, maternal genealogy demonstrated that the genetic samples from Nakhon Ratchasima province (NRS) seemed to represent a naturally occurring divergence because of the emergence of endemic haplotypes; however, it was a low-supported lineage, with 0.7 Bayesian posterior probability (BPP). When we considered the topography of this region, the population of NRS as clade D1 is partitioned from the other populations within clade D by the two mountain ranges, Dong Phraya Yen and Sankamphaeng. This may be a possible barrier to gene flow among the modern populations of Northern D between eastern (clade D1) and western (clade D2; NRS) Thailand. Unfortunately, only a limited number of populations from the east of Thailand were investigated in this study. Further work for validating whether Dong Phraya Yen and Sankamphaeng are a barrier to gene flow in *P. megacephalus* is required. According to the demographic history, the population of Northern D was a stable population, but the population of Southern clade showed a relatively similar unimodal distribution with a small raggedness index, possibly indicating a population expansion. This result was similar to that observed in the population of *P. leucomystax* in the northern Philippines (*Brown et al., 2010*). This scenario implied a genetically homogenous population, especially in the population of Phuket Island, which shared a haplotype with NST, probably caused by a recent population expansion due to the founder effect. Although the population of the Northern D clade expanded, it was limited to localities south of the Isthmus of Kra.

## CONCLUSIONS

Our matrilineal genealogy of the *P. leucomystax* complex in Thailand suggested four lineages, i.e., Nan (putative *P. impresus*), Northern D (putative *P. megacephalus*), Southern (putative *P. leucomystax*) and Northern A (*Polypedates* sp.) clades. We noted that the populations of the Northern D, Nan and *Polypedates* sp. clades are in sympatry, while their distributions are allopatric to the southern clade (*P. leucomystax*) due to the separation by the Isthmus of Kra. Climatic conditions may be a major contributor to limited migration of the current populations of both clades, but climatic oscillation in the Pliocene and Pleistocene is a highly possible scenario that drove speciation resulting in diversification of the *P. leucomystax* complex in Southeast Asia and China, which includes the divergence of the southern and northern clades in Thailand.

## ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

### Funding

This work was supported by research funding from Naresuan University, Phitsanulok, Thailand (No. R2560C166) and the Thailand Research Fund (TRF) (DBG6180001). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:  
Naresuan University, Phitsanulok, Thailand: R2560C166.  
Thailand Research Fund: DBG6180001.

### Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

### Author Contributions

- Kittisak Buddhachat and Chatmongkon Suwannapoom conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, wrote the paper, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.

### Animal Ethics

The following information was supplied relating to ethical approvals (i.e., approving body and any reference numbers):

Sample collection and euthanasia were approved by the Center For Animal Research Naresuan University under project number NU-AE591028.

### DNA Deposition

The following information was supplied regarding the deposition of DNA sequences:

The sequence were supplied in a Supplemental file and also deposited in GenBank under accession numbers MG583020 to MG583285.

## Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.4263#supplemental-information>.

## REFERENCES

- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48  
DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036.
- Blair C, Davy CM, Ngo A, Orlov NL, Shi HT, Lu SQ, Gao L, Rao DQ, Murphy RW. 2013.** Genealogy and demographic history of a widespread amphibian throughout Indochina. *Journal of Heredity* 104:72–85 DOI 10.1093/jhered/ess079.
- Brown RM, Linkem CW, Siler CD, Sukumaran J, Esselstyn JA, Diesmos AC, Iskandar DT, Bickford D, Evans BJ, McGuire JA, Grismer L, Supriatna J, Andayani N. 2010.** Phylogeography and historical demography of *Polypedates leucomystax* in the islands of Indonesia and the Philippines: evidence for recent human-mediated range expansion? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57:598–619  
DOI 10.1016/j.ympev.2010.06.015.
- De Bruyn M, Nugroho E, Hossain MM, Wilson JC, Mather PB. 2005.** Phylogeographic evidence for the existence of an ancient biogeographic barrier: the Isthmus of Kra Seaway. *Heredity* 94:370–378 DOI 10.1038/sj.hdy.6800613.
- Frost DR. 2013.** Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. New York: American Museum of Natural History. Available at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. [electronic database] (accessed on 22 June 2017).
- Fu YX. 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- Hall R. 1998.** The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea. In: Hall R, Holloway JD, eds. *Biogeography and geological evolution of SE Asia*. Leiden: Backhuys Publishers, 99–131.
- Harpending HC. 1994.** Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66:591–600.
- Heyer WR. 1971.** *Mating calls of some frogs from Thailand*. Chicago: Field Museum of Natural History.
- Hughes AC, Satasook C, Bates PJ, Bumrungsri S, Jones G. 2011.** Explaining the causes of the zoogeographic transition around the Isthmus of Kra: using bats as a case study. *Journal of Biogeography* 38:2362–2372 DOI 10.1111/j.1365-2699.2011.02568.x.
- Kuraishi N, Matsui M, Hamidy A, Belabut DM, Ahmad N, Panha S, Sudin A, Yong HS, Jiang JP, Ota H, Thong HT, Nishikawa K. 2013.** Phylogenetic and taxonomic relationships of the *Polypedates leucomystax* complex (Amphibia). *Zoologica Scripta* 42:54–70 DOI 10.1111/j.1463-6409.2012.00562.x.
- Kuraishi N, Matsui M, Ota H, Chen S-L. 2011.** Specific separation of *Polypedates braueri* (Vogt, 1911) from *P. megacephalus* (Hallowell, 1861) (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Zootaxa* 2744:53–61.

- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452 DOI 10.1093/bioinformatics/btp187.
- Manni F, Guérard E, Heyer E. 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology* 76:173–190 DOI 10.1353/hub.2004.0034.
- Matsui M, Ito H, Shimada T, Ota H, Saidapur SK, Khonsue W, Tanaka-Ueno T, Wu GF. 2005. Taxonomic relationships within the pan-oriental narrow-mouth toad *Microhyla ornata* as revealed by mtDNA analysis (Amphibia, Anura, Microhylidae). *Zoological Science* 22:489–495 DOI 10.2108/zsj.22.489.
- ~~Matsui M, Mohamed M, Shimada T, Sudin A. 2007. Resurrection of *Staurois parvus* from *S. tuberilinguis* from Borneo (Amphibia, Ranidae). *Zoological Science* 24:101–106 DOI 10.2108/zsj.24.101.~~
- Matsui M, Seto T, Utsunomiya T. 1986. Acoustic and karyotypic evidence for specific separation of *Polypedates megacephalus* from *P. leucomystax*. *Journal of Herpetology* 20:483–489 DOI 10.2307/1564245.
- Nylander JA. 2004. MrModeltest v2.3. [program distributed by the author]. Uppsala: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7:16 DOI 10.1186/1742-9994-7-16.
- Pan S, Dang N, Wang J, Zheng Y, Rao D, Li J. 2013. Molecular phylogeny supports the validity of *Polypedates impresus* Yang 2008. *Asian Herpetological Research* 4:124–133 DOI 10.3724/SP.J.1245.2013.00124.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. 2013. *Tracer v1.5*. Available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 22 June 2017).
- Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9:552–569.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574 DOI 10.1093/bioinformatics/btg180.
- Rujirawan A, Stuart BL, Aowphol A. 2013. A new tree frog in the genus *Polypedates* (Anura: Rhacophoridae) from southern Thailand. *Zootaxa* 3702:545–565 DOI 10.11646/zootaxa.3702.6.3.
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57:758–771 DOI 10.1080/10635150802429642.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729 DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Taylor EH. 1962. The amphibian fauna of Thailand. *University of Kansas Science Bulletin* 43:265–599 DOI 10.5962/bhl.part.13347.

- Toews DP, Brelsford A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21:3907–3930 DOI 10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x.
- Wielstra B, Burke T, Butlin RK, Arntzen JW. 2017a. A signature of dynamic biogeography: enclaves indicate past species replacement. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284:20172014 DOI 10.1098/rspb.2017.2014.
- Wielstra B, Burke T, Butlin RK, Avcı A, Üzümlü N, Bozkurt E, Olgun K, Arntzen JW. 2017b. A genomic footprint of hybrid zone movement in crested newts. *Evolution Letters* 1:93–101 DOI 10.1002/evl3.9.
- ~~Wondruff DS. 2010. Biogeography and conservation in Southeast Asia: how 2.7 million~~  
years of repeated environmental fluctuations affect today's patterns and the future of the remaining refugial-phase biodiversity. *Biodiversity and Conservation* 19:919–941 DOI 10.1007/s10531-010-9783-3.
- Yuan Z-Y, Suwannapoom C, Yan F, Poyarkov Jr NA, Nguyen SN, Chen H-M, Chomdej S, Murphy RW, Che J. 2016. Red River barrier and Pleistocene climatic fluctuations shaped the genetic structure of *Microhyla fissipes* complex (Anura: Microhylidae) in southern China and Indochina. *Current Zoology* 62:531–543 DOI 10.1093/cz/zow042.
- Zieliński P, Nadachowska-Brzyska K, Wielstra B, Szkotak R, Covaciu-Marcov SD, Cogălniceanu D, Babik W. 2013. No evidence for nuclear introgression despite complete mtDNA replacement in the Carpathian newt (*Lissotriton montandoni*). *Molecular Ecology* 22:1884–1903 DOI 10.1111/mec.12225.