

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การแพร่กระจายและความหลากหลายกึ่งในครอบครัว Penaeidae

กึ่งทะเลครอบครัว Penaeidae ประกอบด้วยกึ่ง 26 สกุล โดยสกุล *Metapenaeopsis* และ *Metapenaeus* มีจำนวนชนิด 72 และ 26 ชนิด ตามลำดับ ในทั้งหมด 206 ชนิด (ตารางที่ 2-1) กึ่งทะเลครอบครัว Penaeidae มีการแพร่กระจายในเขตร้อน (Tropical) และเขตอบอุ่น (Subtropical) โดยมีความหลากหลายของชนิดบริเวณมหาสมุทรแปซิฟิกฝั่งตะวันตกและตะวันออก (Indo-West and East Pacific) 18 และ 13 ชนิด แอตแลนติกฝั่งตะวันออกและตะวันตก (Eastern and Western Atlantic) 11 และ 9 ชนิด และตอนใต้ของแอนตาร์กติกา (Southern Antarctica) 1 ชนิด กึ่งในครอบครัวนี้ส่วนใหญ่เป็นทรัพยากรประมงกลุ่มครัสเตเชียที่สำคัญ โดยมีผลผลิตกึ่งในสกุลนี้ (แหล่งน้ำธรรมชาติและการเพาะเลี้ยง)โดยรวมมากกว่าครึ่งของผลผลิตกึ่งทั่วโลก (Pérez-Farfante & Kensley, 1997)

ตารางที่ 2-1 สกุล จำนวนชนิดที่พบและบริเวณการแพร่กระจายของกึ่งครอบครัว Penaeidae (Pérez-Farfante & Kensley, 1997)

No.	Genus	N. of Species	Geographic Division
1.	<i>Artemesia</i>	1	Western Atlantic Ocean
2.	<i>Atypopenaeus</i>	5	Indo-West Pacific Ocean
3.	<i>Farfantepenaeus</i>	8	East Pacific Ocean, Eastern and Western Atlantic Ocean
4.	<i>Fenneropenaeus</i>	5	Indo-West Pacific Ocean
5.	<i>Funchalia</i>	5	Eastern and Western Atlantic Ocean, Indo-West Pacific Ocean, Southern Antarctica Ocean
6.	<i>Heteropenaeus</i>	1	Indo-West Pacific Ocean
7.	<i>Litopenaeus</i>	5	East Pacific Ocean, Western Atlantic Ocean
8.	<i>Macropetasma</i>	1	Eastern Atlantic Ocean
9.	<i>Marsupenaeus</i>	1	Eastern Atlantic Ocean, Indo-West Pacific Ocean
10.	<i>Megokris</i>	4	Indo-West Pacific Ocean
11.	<i>Melicertus</i>	7	Eastern Atlantic Ocean, Indo-West Pacific Ocean
12.	<i>Miyadiella</i>	2	Indo-West Pacific Ocean
13.	<i>Metapenaeus</i>	26	Eastern Atlantic Ocean, Indo-West Pacific Ocean

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

No.	Genus	N. of Species	Geographic Division
14.	<i>Metapenaeopsis</i>	72	East and Indo-West Pacific Ocean, Eastern and Western Atlantic Ocean
15.	<i>Parapenaeopsis</i>	19	Eastern Atlantic Ocean, East and Indo-West Pacific Ocean
16.	<i>Parapenaeus</i>	13	Indo-West Pacific Ocean, Eastern and Western Atlantic Ocean
17.	<i>Pelagopenaeus</i>	1	East and Indo-West Pacific Ocean, Eastern and Western Atlantic Ocean
18.	<i>Penaeopsis</i>	6	Indo-West Pacific Ocean, Eastern and Western Atlantic Ocean
19.	<i>Penaeus</i>	3	Eastern Atlantic Ocean, Indo-West Pacific Ocean
20.	<i>Protrachypene</i>	1	East Pacific Ocean
21.	<i>Rimapenaeus</i>	6	East Pacific, Western Atlantic Ocean
22.	<i>Tanypenaeus</i>	1	Western Atlantic Ocean
23.	<i>Trachypenaeopsis</i>	3	Indo-West Pacific Ocean, Western Atlantic Ocean
24.	<i>Trachypenaeus</i>	1	Indo-West Pacific Ocean
25.	<i>Trachysalambria</i>	8	East and Indo-West Pacific Ocean, Eastern Atlantic Ocean
26.	<i>Xiphopenaeus</i>	1	East Pacific Ocean, Western Atlantic Ocean

ในแถบมหาสมุทรแปซิฟิกฝั่งตะวันตก ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่นิยมเพาะเลี้ยงและทำประมงกุ้งกลุ่ม Penaeidae จากการศึกษานอง นงนุช ลีลาปิยะนาค (2532) พบตัวอย่างกุ้งทะเลรอบครัว Penaeidae ในประเทศไทยทั้งหมด 7 สกุล 44 ชนิด ได้แก่ สกุล *Metapenaeus* 12 ชนิด, *Parapenaeopsis* 9 ชนิด, *Metapenaeopsis* 7 ชนิด, *Trachypenaeus* 6 ชนิด, *Atypopenaeus* 1 ชนิด, *Parapenaeus* 1 ชนิด และ *Penaeus* ประกอบด้วย *P. (Melicertus)* 3 ชนิด, *P. (Penaeus)* 2 ชนิด, *P. (Fenneropenaeus)* 2 ชนิด, *P. (Marsupenaeus)* 1 ชนิด โดยมีการแพร่กระจายตลอดแนวชายฝั่งทะเลของประเทศไทย

ในประเทศไทย กุ้งในสกุล *Metapenaeus* เป็นกุ้งสกุลหนึ่งที่มีความหลากหลายของชนิด (12 ชนิด จากทั้งหมด 44 ชนิด) และมีแพร่กระจายในหลายบริเวณ ทั้งบริเวณป่าชายเลน ปากแม่น้ำ ชายฝั่งทะเล รวมทั้งทะเลสาบน้ำกร่อย ในช่วงความเค็มตั้งแต่ 4-35 ppt (อังสุณีย์ ชุณหปราณ และ ชัชวาล อินทรมนศิริ, 2545; Chu et al., 1995) ทำให้กุ้งในสกุลนี้มีความชุกชุมและการแพร่กระจาย

กว้าง ดังนั้นกุ้งในสกุลนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลาย พื้นที่ เช่น ใต้หวัน ออสเตรเลีย คูเวต และไทย เป็นต้น (กรมประมง, 2546; Bishop & Khan, 1999; Chu, et al., 1995; Courtney et al., 1995)

ในภาคตะวันออกของประเทศไทยพบการแพร่กระจายของกุ้งในสกุล *Metapenaeus* ตลอดแนวชายฝั่งทะเลและแม่น้ำสำคัญในการทำประมงหลายสาย เช่น แม่น้ำบางปะกง แม่น้ำจันทบุรี แม่น้ำตราด เป็นต้น จึงพบกุ้งในสกุลนี้หลากหลายถึง 8 ชนิด ได้แก่ *Metapenaeus ensis*, *M. tenuipes*, *M. brevicornis*, *M. affinis*, *M. moyebi*, *M. intermedius*, *M. lysianassa* และ *M. conjunctus* (นงนุช ลีลาปิยะนาท, 2532) (ตารางที่ 2-2) โดยผลผลิตส่วนใหญ่ได้จากการจับจากธรรมชาติทั้งจากประมงเชิงพาณิชย์และประมงพื้นบ้าน ปัจจุบันการวางแผนการจัดการทรัพยากรกุ้งสกุล *Metapenaeus* ในระยะยาวเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีการศึกษาพื้นฐานด้านชีววิทยานิเวศวิทยา การจัดหมวดหมู่และลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ รวมถึงความรู้พื้นฐานด้านอื่นๆ ของกุ้งสกุลนี้อยู่ในระดับน้อย

ตารางที่ 2-2 การกระจายชนิดกุ้งในสกุล *Metapenaeus* บริเวณภาคตะวันออก
(นงนุช ลีลาปิยะนาท, 2532)

ชนิด/ จังหวัด	ฉะเชิงเทรา	ชลบุรี	ระยอง	จันทบุรี	ตราด
<i>Metapenaeus ensis</i>	+	+	+	+	+
<i>M. affinis</i>		+			+
<i>M. moyebi</i>				+	+
<i>M. brevicornis</i>	+	+			
<i>M. tenuipes</i>	+				
<i>M. intermedius</i>	+				
<i>M. lysianassa</i>		+			+
<i>M. conjunctus</i>	+				

การจัดหมวดหมู่ จำแนกชนิดและลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

อนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตเป็นวิชาแขนงหนึ่งทางชีววิทยา ที่ศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกชนิด การกำหนดชื่อทางวิทยาศาสตร์ จัดจำแนกและลำดับหมวดหมู่ตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น โดยจัดสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันน้อยที่สุดไว้ในหมวดหมู่ใหญ่และจำแนกเป็นหมวดหมู่ย่อยลงไปเป็นลำดับตามลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากขึ้น

การศึกษาที่ผ่านมามักใช้ลักษณะสัณฐาน (Morphology) เป็นเกณฑ์ โดยในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลมาพิสูจน์ สนับสนุน และลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสกุลสัตว์ที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกัน

1. การจัดหมวดหมู่ จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐาน

มักใช้ลักษณะเฉพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จำแนก ระบุชนิดและจัดหมวดหมู่ตามระดับความคล้ายคลึงของลักษณะ ในการจำแนกหมวดหมู่ของกุ้งทะเลมักใช้ตำแหน่งของหนามบนการาเปส ความแตกต่างของลักษณะกรี จำนวนฟันกรี ลักษณะรอยสลักของลำตัวและการาเปส ลักษณะและรูปแบบของอวัยวะเพศ ขาเดิน ร่องและสันตัว เป็นเกณฑ์ในการจัดหมวดหมู่และจำแนกชนิด

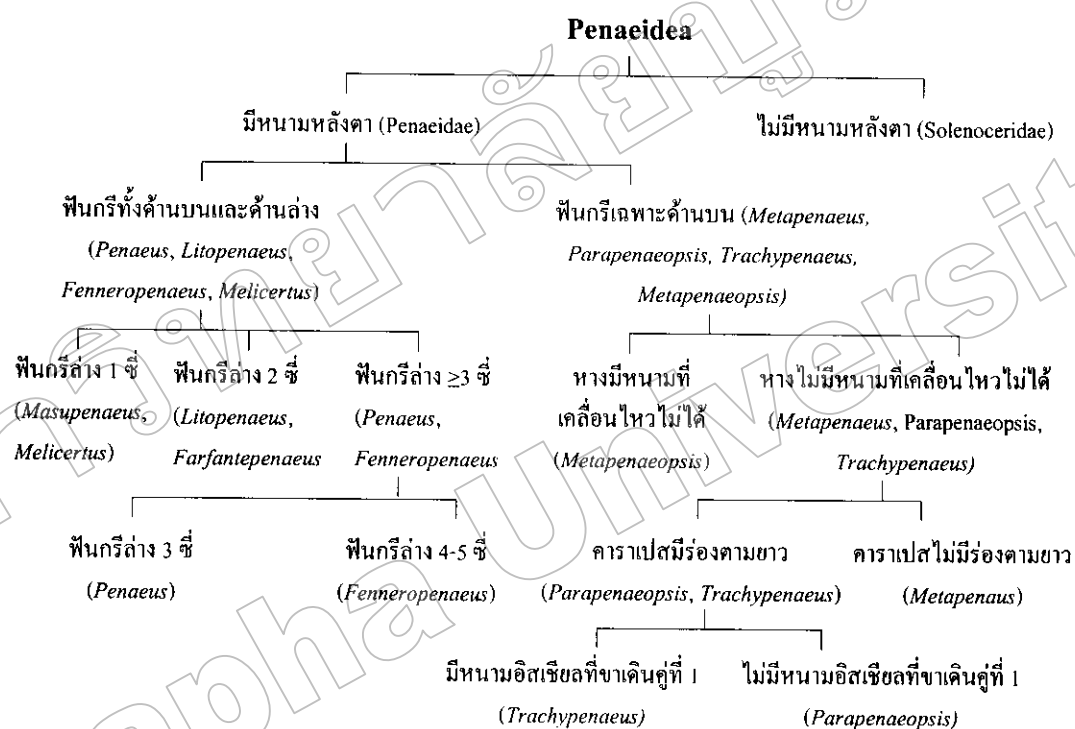
การจัดหมวดหมู่และจำแนกชนิดกุ้งทะเลครอบครัว Penaeidae (นงนุช ลีลาปิยะนาถ, 2532; Pérez-Farfante & Kensley, 1997; Kubo, 1949)



การจัดหมวดหมู่และจำแนกชนิดกุ้งทะเลครอบครัว Penaeidae (สกุล *Penaeus*, *Litopenaeus*, *Fenneropenaeus*, *Masupenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Melicertus*, *Metapenaeus*, *Parapenaeopsis*, *Trachypenaeus* และ *Metapenaeopsis*) โดยใช้สัณฐานบางลักษณะสามารถจัดลำดับความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (ภาพที่ 2-1) คือ (1) กลุ่มสกุล *Penaeus* เดิม ซึ่งประกอบด้วย *Penaeus*, *Litopenaeus*, *Fenneropenaeus*, *Masupenaeus*, *Farfantepenaeus* และ *Melicertus* และ (2) กลุ่มสกุล *Metapenaeus*, *Parapenaeopsis*, *Trachypenaeus* และ *Metapenaeopsis* ซึ่งลักษณะที่ใช้แยก 2 กลุ่มนี้คือ การมีและไม่มีฟันด้านล่างของกรี โดยกลุ่มแรกมีทั้งฟันด้านบนและล่างของกรี และกลุ่มที่ 2 มีเฉพาะด้านบน

ภายในกลุ่มสกุล *Penaeus* เดิม สกุล (ย่อย) ที่มีลักษณะคล้ายกันมากสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) *Masupenaeus* + *Melicertus* (2) *Litopenaeus* + *Farfantepenaeus* และ (3) *Penaeus* + *Fenneropenaeus* ซึ่งจำนวนฟันด้านล่างของกรีเป็นลักษณะเด่นที่ใช้ในการจัดกลุ่ม

ภายในกิ่งกลุ่มสกุล *Metapenaeus*, *Parapenaeopsis*, *Trachypenaeus* และ *Metapenaeopsis* สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) *Metapenaeopsis* และ (2) *Metapenaeus* + *Parapenaeopsis* + *Trachypenaeus* โดยใช้ลักษณะการพบและไม่พบหนามที่เคลื่อนไหวได้ที่หาง (Movable Spine) ในการจัดกลุ่ม ส่วนลักษณะการพบและไม่พบร่องตามยาวบริเวณคาราเปส (Longitudinal Structure) ใช้ในการแยกกิ่งสกุล *Metapenaeus* ออกจากสกุล *Parapenaeopsis* + *Trachypenaeus*

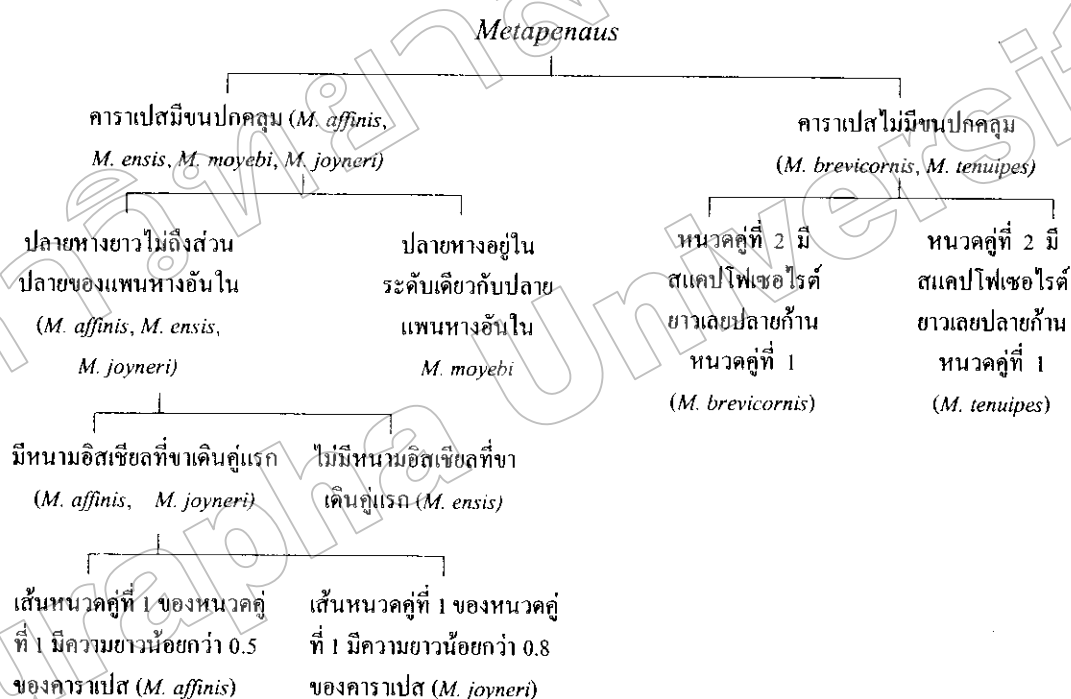


ภาพที่ 2-1 แผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มระดับสกุลของกุ้งครอบครัว Penaeidae โดยใช้ลักษณะบางลักษณะ

ภายในสกุล *Metapenaeus* สามารถแบ่งกิ่ง (*Metapenaeus affinis*, *M. ensis*, *M. moyebi*, *M. joyneri*, *M. brevicornis* และ *M. tenuipes*) เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 2-2) คือ (1) *M. affinis* + *M. ensis* + *M. moyebi* + *M. joyneri* และ (2) *M. brevicornis* + *M. tenuipes* โดยใช้การมีขนและไม่มีขนบนคาราเปสเป็นลักษณะเด่นในการแยก

กิ่งกลุ่ม *M. affinis* + *M. ensis* + *M. moyebi* + *M. joyneri* แบ่งชนิดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ 2 กลุ่ม คือ (1) *M. moyebi* และ (2) *M. affinis* + *M. ensis* + *M. joyneri* ซึ่งใช้ความยาวปลายหางเทียบกับความยาวแพนหางอันในเป็นลักษณะในการแบ่ง ส่วนกิ่งกลุ่ม *M. affinis* +

M. ensis + *M. joyneri* สามารถแยกชนิด *M. ensis* โดยใช้การพบหนามและไม่พบหนามอัสเซียล การจัดหมวดหมู่และจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะฐานนั้น อาจไม่ได้สะท้อนถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จากลักษณะที่คล้ายคลึงกันนั้น ไม่ใช่ลักษณะร่วมที่ถ่ายทอดจากบรรพบุรุษร่วมกัน (Coancestor) แต่เป็นลักษณะที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากการแยกชนิดหรือลักษณะที่เหมือนกันโดยบังเอิญ (Convergent Evolution) นอกจากนี้ นักอนุกรมวิธานยังมีความเห็นขัดแย้งในการจัดหมวดหมู่และจำแนกชนิด ในกรณีของกึ่งทะเล การจัดหมวดหมู่และจำแนกชนิดระดับสกุลและสกุลย่อยยังคงไม่เป็นที่สิ้นสุด (นงนุช ลีลาปิยะนาค, 2532; Kubo, 1949; Pérez-Farfante & Kensley, 1997) เป็นต้น



ภาพที่ 2-2 แผนภูมิแสดงการจัดกลุ่มภายในกึ่งสกุล *Metapenaeus* โดยใช้ฐานบางลักษณะ

รายละเอียดของฐานที่ใช้จำแนกครอบครัว สกุลและชนิดภายในสกุลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีดังนี้

การจำแนก Families ของ Superfamily Penaeioidea

- 1) ไม่มีหนามหลังตา (Postorbital Spine)..... 2
- มีหนามหลังตา..... Solenoceridae

- 2) เปลือกไม่แข็งและขาว่ายน้ำ (Peleopod) คู่ที่ 3-5 เป็นแบบไปรามัส (Biramous)..... 3
- เปลือกแข็ง ขาว่ายน้ำคู่ที่ 3-5 เป็นแบบยูนิรามัส (Uniramous) และไม่มีเอนโดพอด (Endopods) Sicyoniidae
- 3) มีฟันกรร (Postrostral Teeth) มากกว่า 2..... 4
- มีฟันกรร 1 หรือ 2 บางครั้งพบ 3..... Benthescymidae
- 4) โปรซาร์เทมา (Prosartema) ลดรูปเป็นซีโทส บอส (Setose Boss)..... Aristeidae
- โปรซาร์เทมาพัฒนาดี..... Penaeidae

การจำแนก Genera ของ Family Penaeidae

- 1) มีทั้งฟันกรรล่าง (Dorsal Teeth) และฟันกรรบน (Ventral Teeth) (ยกเว้น *Funchalia* มีเฉพาะฟันกรรล่าง) และมีเหงือกแบบพลูโรแบร็งเคีย (Pleurobranchia) บนโซไมท์ (Somite) ที่ 14..... 2
- มีเฉพาะฟันกรรล่าง เหงือกไม่เป็นแบบพลูโรแบร็งเคียบนโซไมท์ที่ 14..... 4
- 2) มีจำนวนฟันกรรด้านล่าง ≤ 2 ชื่อ..... *Litopenaeus*
- มีจำนวนฟันกรรด้านล่าง ≥ 3 ชื่อ..... 3
- 3) มีจำนวนฟันกรรด้านล่าง 3 ชื่อ ที่โลกเป็นแบบปิด ฟิแทสมาบริเวณเวนทราล คอสตายาวถึงขอบปลายของพู่ด้านข้าง..... *Penaeus*
- มีจำนวนฟันกรรด้านล่าง 4-5 ชื่อ ที่โลกเป็นแบบปิด ฟิแทสมาบริเวณเวนทราล คอสตายาวถึง..... *Fenneropenaeus*
- 4) มีเหงือกแบบพลูโรแบร็งเคียบนโซไมท์ที่ 13 พบเอกโซโปไดต์ (Exopods) บนแมกซิลลิเพด (Maxillipeds) และขาเดินด้านหน้า 4 คู่ แต่ไม่พบในคู่ที่ 5 *Metapenaeus*
- ไม่มีเหงือกแบบพลูโรแบร็งเคียบนโซไมท์ที่ 13 พบเอกโซโปไดต์ที่ขาเดินทุกคู่ หรืออาจไม่พบใน 4 คู่หลัง..... *Parepenaeopsis*

ลำดับการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อกุ้งทะเลสกุล *Fenneropenaeus* Pérez Farfante,

1969 และลักษณะเด่นทางสัณฐาน

กุ้งสกุล *Fenneropenaeus* มีประวัติการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อจำนวน 5 ครั้ง ดังนี้

Cancer - Osbeck, 1765.

Penaeus - Alcock, 1905. - De Man, 1911. - Kubo, 1949. - Dall, 1957.

Penaeus (Fenneropenaeus) Pérez-Farfante, 1969. - Liu & Zhong, 1988. - Hayashi, 1992.

Penaeus (Penaeus) - Burukovsky, 1972.

Fenneropenaeus - Pérez-Farfante, 1997

กุ้งทะเลสกุล *Fenneropenaeus* ที่ทำการศึกษามี 1 ชนิด คือ

Fenneropenaeus merguensis มีลักษณะเด่นดังนี้ กะโหลกตรงยกสูงขึ้น โคนกรีมมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม สันข้างกรียวเกือบถึงพื้นกรีนเหนือกระเพาะอาหาร สันที่อยู่ระหว่างกระเพาะอาหารกับตา (Gastro-Orbital Carina) ไม่ชัดเจน ยาวประมาณ 1 ใน 3 ของระยะระหว่างหลังตา (Post-Ocular) ถึงหนามดับ ความยาวของเดกทิลัส (Dactylus) ของแมกซิลลิปีดที่ 3 ในตัวเต็มวัยเพศผู้ยาวเป็น 0.5-0.6 เท่าของความยาวโปรโปดัส (Propodus) มีขน (Setae) ยาวบริเวณส่วนโคนของโปรโปดัส ตัวเต็มวัยมีลำตัวสีครีมปนเหลือง..... *Fenneropenaeus merguensis* (De Man) (ภาพที่ 2-3 ก)

ลำดับการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อกุ้งทะเลสกุล *Litopenaeus* Pérez-Farfante, 1969 และลักษณะเด่นทางสัณฐาน

กุ้งสกุล *Litopenaeus* มีประวัติการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อจำนวน 4 ครั้ง ดังนี้

Cancer - Linnaeus, 1767.

Penaeus - Smith, 1885b. - De Man, 1911. - Burkenroad, 1934b. - Dall, 1957.

- Thallwitz, 1892. - Alcock, 1905.

Penaeus (Litopenaeus) - Pérez-Farfante, 1969. - Burukovsky, 1972.

- Pérez-Farfante, 1975.

Litopenaeus - Pérez-Farfante, 1997

กุ้งทะเลสกุล *Litopenaeus* Pérez-Farfante, 1969 ที่ศึกษาในครั้งนี้มี 1 ชนิด คือ

Litopenaeus vannamei มีลักษณะเด่นดังนี้ มีพื้นกรีนบน 8-9 ซี่ พื้นกรีนล่าง 2 ซี่ สันข้างกรียวเกินถึงพื้นกรีนที่อยู่เหนือ กระเพาะอาหาร เส้นหนวด (Antennular Flagellum) ยาวเท่ากับ ความยาวปล้องแรกของก้านหนวด (Antennular Peduncle) ปลายแอฟฟินดิกมาสตูลินา (Appendix Masculine) ยาวเป็น 2.2 เท่าของความกว้าง ในเพศผู้ปลายของพู่กลางของพีแทสมาสั้นกว่าปลายของพู่ด้านข้าง ในเพศเมียสเตอไรท์ (Sternite) ระหว่างขาเดินคู่ที่ 4 มีลักษณะปลายแหลม ด้านหนึ่งเว้าเข้า ด้านหนึ่งนูนออก และบริเวณขาเดินคู่ที่ 5 คอกซอลเพลท (Coxal Plate) พัฒนาไม่เด่นชัด *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 (ภาพที่ 2-4 ก)

**ลำดับการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อกุ้งทะเลสกุล *Penaeus* Fabricius, 1798 และ
ลักษณะเด่นทางสัณฐาน**

กุ้งสกุล *Penaeus* มีประวัติการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อจำนวน 3 ครั้ง ดังนี้

Penaeus - Weber, 1795. - Fabricius, 1798. - Latreille, 1803. - Smith, 1885b.
- De Man, 1911. - Lamarck, 1818. - Alcock, 1901. - Burkenroad, 1983.
Penaeus (Penaeus) - Pérez-Farfante, 1969. - Burukovsky, 1972. - Motoh and Buri,
1984. - Liu and Zhong, 1988. - Hayashi, 1992.

Penaeus - Pérez-Farfante, 1997

กุ้งทะเลสกุล *Penaeus* ที่ทำการศึกษามี 1 ชนิด คือ *Penaeus monodon* มีลักษณะ
เด่นดังนี้ สันตบยาวตรงอยู่ในแนวนอน, ร่องข้างกริยาวถึงก่อนฟันกริเหนือกระเพาะอาหาร ขาเดิน
คู่ที่ 5 ไม่มีเอกโซโปไดต์ ลำตัวสีน้ำตาลดำหรือน้ำตาลแดงสลับขาว มีแถบขาวพาดขวางเฉพาะ
ส่วนขอบของปล้องไม่ถึงขอบด้านข้างของปล้อง หนวดคู่ที่ 2 สีดำมีลายแต่มาเห็นไม่ชัด

..... *Penaeus monodon* Fabricius (ภาพที่ 2-5 ก)

**ลำดับการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อกุ้งทะเลสกุล *Parapenaeopsis* Alcock, 1901 และ
ลักษณะเด่นทางสัณฐาน**

กุ้งสกุล *Parapenaeopsis* มีประวัติการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อจำนวน 8 ครั้ง ดังนี้

Penaeus - H. Milne Edwards, 1837.

Penaeopsis - Bate, 1881.

Penaeus (Parapenaeopsis) - Alcock, 1901.

Metapenaeus - Alcock, 1901.

Parapenaeopsis - Alcock, 1901. - De Man, 1911. - Balss, 1914a. - Kubo, 1949.
- Barnard, 1950. - Dall, 1957. - Racek and Dall, 1965. - Liu and Zhong, 1988.

Trachypenaeus - Balss, 1916.

Parapenaeopsis - Burkenroad, 1934a. - Burkenroad, 1983. - Dall et al., 1990.

Parapenaeopsis - Pérez-Farfante, 1997

กุ้งทะเลสกุล *Parapenaeopsis* ที่ทำการศึกษามี 1 ชนิด คือ *Parapenaeopsis*
hungerfordi มีลักษณะเด่นดังนี้ ไม่มีอีพิปอดิต (Epipodite) ที่ขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 มีฟันกริเหนือ
กระเพาะอาหาร ลำตัวมีสีเขียวปนเหลือง มีจุดสีเขียวปนดำ ในแต่ละปล้องบริเวณขอบส่วนปลาย
ด้านบนของท้องมีแถบสีดำพาดขวาง..... *Parapenaeopsis hungerfordi* Alcock (ภาพที่ 2-6 ก)

ลำดับการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อกุ้งทะเลสกุล *Metapenaeus* Wood-Mason, 1891

และลักษณะเด่นทางสัณฐาน

กุ้งทะเลสกุล *Metapenaeus* มีประวัติการเปลี่ยนแปลงการเรียกชื่อจำนวน 7 ครั้ง ดังนี้

Penaeus - Miers, 1878.

Mangalura - Miers, 1878. - Burkenroad, 1959. - Holthuis, 1962. - Burkenroad, 1963a. - Holthuis, 1963. - Burkenroad, 1983.

Metapenaeus Wood - Mason, 1891. - Burkenroad, 1934a. - Kubo, 1949. - Barnard, 1950. - Holthuis, 1962. - Burkenroad, 1963b. - Holthuis, 1963. - Miquel, 1982. - Motoh and Buri, 1984. - Dall et al., 1990.

Penaeus (Metapenaeus) - Alcock, 1901.

Metapanaeus - Alcock, 1905.

Penaeopsis - Edwards and Bouvier, 1909. - De man, 1911. - Schmitt, 1926.

Metapenaeus - Pérez-Farfante, 1997

กุ้งทะเลในสกุล *Metapeanaeus* ที่ทำการศึกษามี 5 ชนิด จำแนกชนิดได้ดังนี้

- 1) หาง (Telson) มีหนามด้านข้าง (Lateral Spines) 3 คู่.....-
- หางไม่มีหนามด้านข้าง.....2
- 2) ส่วนหน้าพุงกลาง (Distomedian) ของพีแทสมามีดึ่งยื่นออกมา ที่ไถกัมของเพศเมีย ที่ปฏิสนธิแล้วมักมีแผ่นสีขาวมาปิด คาราเปสไม่มีขนปกคลุม.....3
- ส่วนหน้าพุงกลางของพีแทสมาไม่มีดึ่งยื่นออกมา ที่ไถกัมของเพศเมียที่ปฏิสนธิแล้วไม่มีแผ่นสีขาวมาปิด คาราเปสมีขนปกคลุม.....5
- 3) กรีเรียยาวโค้งขึ้นเล็กน้อย ในเพศผู้ หนามเบเซียล (Basial Spine) ที่แมกซิลลิเปดคู่ที่ 3 ยาวและมีลักษณะเหมือนตะขอ พีแทสมาดึ่งที่ยื่นออกมาของพุงกลางสั้น ในเพศเมีย แผ่นด้านข้าง (Lateral Plate) ของที่ไถกัมซ่อนได้ แผ่นด้านหน้า (Anterior Plate) และมีลักษณะคล้ายลิ้น (Tongue-Like)-
- กรีเรียยาวสูงขึ้นเด่นชัด ในเพศผู้ หนามเบเซียล (Basial Spine) แมกซิลลิเปดคู่ที่ 3 ไม่เป็นตะขอ ดึ่งที่ยื่นออกมาของพุงกลางพีแทสมายาว บางส่วนของแผ่นด้านข้างที่ไถกัมไม่ซ่อนได้ แผ่นด้านหน้า.....4
- 4) หนวดคู่ที่ 2 มีสแคปโฟเซอไรต์ยาวเลยปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 ในเพศผู้ ส่วนหน้าพุงด้านข้างพีแทสมาคลี่ออกด้านข้าง ดึ่งส่วนหน้าของพุงกลางมีลักษณะเรียวยาว ในเพศเมีย แผ่นด้านหน้าที่ไถกัมมีขนาดใหญ่กว่าแผ่นข้าง.....

-*Metapenaeus brevicornis* (H. Milne-Edwards) (ภาพที่ 2-7 ก, ข, ค)
- หนวดคู่ที่ 2 มีสแคปโฟเซอไรต์ยาวเลยปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 ในเพศผู้ ส่วนหน้าของพู่ด้านข้างที่แทสมาลีออกทางด้านหน้า ดั้งส่วนหน้าของพู่กลางมีลักษณะคล้ายริบบิ้น (Ribbon-Like) ในเพศเมีย แผ่นด้านหน้าทีโลกัมมีขนาดเล็กกว่าแผ่นด้านข้าง*M. tenuipes* Kubo (ภาพที่ 2-8 ก, ข, ค)
 - 5) ปลายหางยาวไม่ถึงส่วนปลายของแพนหางอันใน6
 - ปลายหางอยู่ในระดับเดียวกับปลายแพนหางอันใน*M. moyebi* (Kishinouye) (ภาพที่ 2-11 ก, ข, ค)
 - 6) ไม่มีหนามอิสเซิลที่ขาเดินคู่ที่ 1 ในเพศผู้ พู่กลางของพีแทสมาลีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมชี้ไปด้านหน้า ในเพศเมีย ส่วนท้ายของแผ่นด้านข้างทีโลกัมมีลักษณะเว้าบริเวณขอบเป็นสันนูนสูงขึ้นมา*M. ensis* (De Man) (ภาพที่ 2-9 ก, ข, ค)
 - มีหนามอิสเซิลที่ขาเดินคู่ที่ 1 ในเพศผู้ ดังที่ยื่นออกมาของพู่กลางพีแทสมาลี มีรูปร่างคล้ายเสี้ยวพระจันทร์ ในเพศเมีย แผ่นด้านข้างทีโลกัมมีลักษณะแบนกลม 2 แผ่น ด้านบนและล่างซ้อนทับกันเล็กน้อย*M. affinis* (H. Milne-Edwards) (ภาพที่ 2-10 ก, ข, ค)

ตารางที่ 2-3 ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกกุ้งชนิดต่าง ๆ

ชนิดกุ้ง	กรีและจำนวนซี่ฟัน	พีแทสมา	ทีโลกัม	ลวดลายสีลำตัวและหาง
<i>Fenneropenaeus merguensis</i> (ภาพที่ 2-3 ก, ข, ค)	กริยาวตรงสีน้ำตาลเข้ม ปนแดง โคนกริมี่ ลักษณะเป็นรูป สามเหลี่ยม ฟันกริ ด้านบน 7-9 ซี่ ด้านล่าง 4-6 ซี่	พู่ด้านข้างทั้งสอง โค้งงอเข้าด้านใน บริเวณผิวด้านบน ของพู่ด้านข้างมี ลักษณะคล้าย หนามขนาดเล็ก จำนวนมาก	แผ่นด้านข้างเจริญ ดี มีลักษณะกลม คล้ายแผ่นเหรียญ แผ่นด้านหน้ามี ขนาดเล็ก ด้านบน กึ่งกลางระหว่าง แผ่นด้านข้างคล้าย ครึ่งวงกลม มีบริเวณ ขนรอบนอก	สีครีมปน เหลืองมีจุด น้ำตาล เขียวแก่ ขาเดินและขา ว่ายน้ำมีสี เหลือง สีมชมพู หรือสีน้ำตาล แพนหางมีสี น้ำตาลปลายมี สีเหลืองปน น้ำเงิน

ตารางที่ 2-3 (ต่อ)

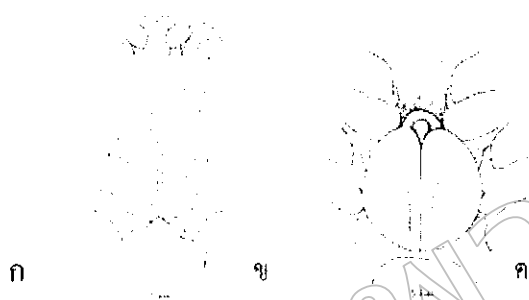
ชนิดกุ้ง	กรีและจำนวนซี่ฟัน	พีแทสมา	ทีไลกัม	ลวดลายสีลำตัว และหาง
<i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i> (ภาพที่ 2-4 ก, ข, ค)	กริยาวตรงสีน้ำตาลเข้ม ปนแดง โคนกริมี ลักษณะเป็นรูป สามเหลี่ยม ฟันกริ ด้านล่าง 2 ซี่ ด้านบน 8-9 ซี่	ปลายของพูกกลาง สั้นกว่าปลายของ พูด้านข้าง	ทีไลกัมเป็นแบบ เปิด, สเตอริไนท์ ระหว่างขาเดินคู่ที่ 4 มีลักษณะปลาย แหลม ด้านหนึ่ง เว้าเข้า ด้านหนึ่ง นูนออก	เปลือกบาง สีขาวอมชมพู ขาเดินและ ขาว่ายน้ำน้ำ สีขาวยาวด้าน ในมีสีแดง ปลายแพนหาง มีสีแดง
<i>Penaeus monodon</i> (ภาพที่ 2-5 ก, ข, ค)	กริยาวเรียวโค้งขึ้น ฟัน กริด้าน บน 7-8 ซี่ ด้านล่าง 3 ซี่ สันหลัง กริยาวเกือบถึง ด้านหลังของคาราเปส	ส่วนปลายของพูก ด้านข้างโค้งเข้า ด้านในเกือบคลุม ส่วนพูดตรงกลาง ซึ่งต่ำกว่าพูก ข้างฐานขนกัน อยู่ทางด้านบน ของแผ่นด้านข้าง	แผ่นด้านข้าง เจริญดี ยาวเป็น 2 เท่าของ ความกว้าง แผ่นกลางเป็นรูป สามเหลี่ยม 2 อัน	ลายสีน้ำตาลดำ/ สีน้ำตาลแดง สลับขาว แถบ สีขาวยาวขวาง เฉพาะส่วนบน ของปล้อง แต่ไม่ถึงขอบ ด้านข้าง
<i>Parapenaeopsis</i> <i>hungerfordi</i> (ภาพที่ 2-6 ก, ข, ค)	กริโค้งยาวเป็นรูป ซิกมอยด์ ฟันกริ ด้านบน 6-8 ซี่ ด้านล่างเรียบไม่มีซี่ฟัน	พูด้านข้างเจริญดีมี ขนาดใหญ่เป็นรูป สี่เหลี่ยมผืนผ้า บริเวณขอบส่วน ปลายด้านในแต่ละ ข้างของพูด้านข้าง จะมีปลายแหลม ยื่นออกมาและโค้ง งอเข้าหากัน ส่วน พูกกลางมีขนาดเล็ก	แผ่นด้านหน้ายาว และมีร่องตามยาว อยู่บริเวณ ส่วนกลาง ส่วนล่างของแผ่น ด้านข้างแผ่ออก ลักษณะคล้าย ปีกนก ส่วนบน ของแผ่นมีขน ปกคลุม จำนวนมาก	สีเขียวปน เหลือง จุก สีเขียวปนดำ ผิวเรียบเป็นมัน และมีขน มีลาย สีดำพาดขวาง ทุกปล้อง หาง และแพนหาง สีเขียวปนดำ ขาเดินสีน้ำตาล ปนแดง โคนขา ว่ายน้ำ สีขาว ปลายสีแดงเข้ม

ตารางที่ 2-3 (ต่อ)

ชนิดกุ้ง	กรีและจำนวนซี่ฟัน	พีแทสมา	ทีไลกัม	ลวดลายสีลำตัวและหาง
<i>Metapenaeus brevicornis</i> (ภาพที่ 2-7 ก, ข, ค)	กริยาวตรง โคนกริมี่ ลักษณะเป็นรูป สามเหลี่ยม ฟันกริ ด้านหน้าส่วนบนเรียบ ไม่มีซี่ฟัน ด้านหลังมีซี่ ฟัน 5-6 ซี่ ฟันกริ ด้านล่างเรียบ ไม่มีซี่ฟัน	ส่วนหน้าของพู ด้านข้างยื่นและ คลีออกด้านนอก ส่วนหน้าของ พูกลางมีดิ่งยื่น ออกมาลักษณะ เรียวแหลม	แผ่นด้านหน้า รูปสามเหลี่ยม ขนาดใหญ่กว่า แผ่น ด้านข้าง ซึ่งอยู่ด้านล่าง ของแผ่นด้านหน้า	สีเหลืองมีจุด น้ำตาลแดงและ เขียว แพนหาง สีแดง เพศเมีย ที่มีไข่ ตัวจะมี แถบสีเขียวปน เหลืองพาดยาว ขาเดินกับลำตัว สีเดียวกัน ขา ว่ายน้ำสีเหลือง สีค่อนข้าง เหลือง มีจุดสี น้ำตาลแดงและ เขียว มีลักษณะ คล้าย <i>M. brevicornis</i>
<i>M. tenuipes</i> (ภาพที่ 2-8 ก, ข, ค)	กริยาวเรียวโค้งขึ้น เล็กน้อย โคนกริ รูปสามเหลี่ยม ฟันกริ ด้านหน้าส่วนบนเรียบ ไม่มีซี่ฟัน ด้าน หลัง 6-7 ซี่ ฟันกริ ด้านล่างเรียบ ไม่มีฟัน	ส่วนหน้าของพู ด้านข้างคลีออก ด้านหน้า ส่วนหน้าของ พูกลาง มีดิ่งยื่น ออกมาคล้าย รีบบิ้น	แผ่นด้านหน้าเป็น จุดกลมขนาดเล็ก ตรงกลางแผ่นด้าน ส่วนแผ่นด้านข้าง ติดกันรูปร่างกรวย มีปลายด้านบนเว้า เป็นแฉก	สีน้ำตาลปน เขียว จุดน้ำตาล ดำ แดงและ เขียว ขาเดินสี ขาวจุดสีน้ำตาล แดง แพนหางสี เดินสีขาวจุด สีน้ำตาลแดง ปลายสีน้ำเงิน การาเปสมีขน เล็ก ๆ ยกเว้น ขอบด้านล่าง
<i>M. ensis</i> (ภาพที่ 2-9 ก, ข, ค)	กริตรงยาว ฟันกริ ด้านบนมี 8-10 ซี่ ด้านล่างไม่มีซี่ฟัน	พูกลางยาว ¼ ของ ความยาวพีแทสมา ทั้งหมดและมี ลักษณะเป็นรูป สามเหลี่ยมชี้ตรง ไปข้างหน้า ซ้อนทับพู ด้านหน้า	ส่วนหน้าของแผ่น ด้านหน้ามีลักษณะ ยาวเป็นรูปคล้าย พัด ส่วนท้ายของ แผ่นด้านข้างมี ลักษณะโค้งเว้า บริเวณขอบเป็น สันนูนขึ้นมา	สีน้ำตาลปน เขียว จุดน้ำตาล ดำ แดงและ เขียว ขาเดินสี ขาวจุดสีน้ำตาล แดง แพนหางสี เดินสีขาวจุด สีน้ำตาลแดง ปลายสีน้ำเงิน การาเปสมีขน เล็ก ๆ ยกเว้น ขอบด้านล่าง

ตารางที่ 2-3 (ต่อ)

ชนิดกุ้ง	กรีและจำนวนซี่ฟัน	พีแทสมา	ทีไลกัม	ลวดลายสีลำตัวและหาง
<i>M. affinis</i> (ภาพที่ 2-10 ก, ข, ค)	กริยาวเรียว ส่วนปลาย โค้งเล็กน้อย ฟันกริ ด้านบนมี 8-10 ซี่ ด้านล่างเรียบ ไม่มีซี่ฟัน	พุกกลางส่วนหน้า ของแต่ละข้างมี รูปร่างคล้าย เลี้ยวพระจันทร์ ซ้อนทับส่วนหน้า ของพูด้านข้าง แต่ สามารถมองเห็น ปลายของพู ด้านข้างโผล่ ออกมาเล็กน้อย	มีขนปกคลุม จำนวนมาก แผ่น ด้านบนมีรูปร่าง คล้ายเครื่องบิน แต่มีขนาดใหญ่ แผ่น ด้านข้างแบน กลมแบ่งออกเป็น 2 แผ่น คือ แผ่น ด้านบน/แผ่น ด้านล่าง ซ้อนกัน เล็กน้อย	สีน้ำตาล จุด สีเขียวแดง และ น้ำตาล แพนหาง สีน้ำตาลแดง เข้ม ส่วนปลาย สีฟ้ามีขนสีแดง รอบ ขาเดินสี น้ำตาลอมแดง มีจุดสีแดง ขา ว่ายน้ำมีสีแดง
<i>M. moyebi</i> (ภาพที่ 2-11 ก, ข, ค)	กริตรงยาว ส่วนปลาย โค้งขึ้นเล็กน้อย ฟันกริ ด้านบน 9-10 ซี่ฟัน ด้านล่างไม่มี กริมิ ความยาวประมาณ ¼ ของความยาว คาราเปส	พุกกลางส่วนหน้า ยื่นออกมาเล็กน้อย มีลักษณะเป็นแผ่น คล้ายเกร็ดปลา	ขอบส่วนหน้าของ แผ่นด้านบนโค้ง เป็นรูปสามเหลี่ยม และมีคุ่มยื่นขึ้น 3 คุ่ม แต่ละคุ่มมี ขนาดเท่ากัน ส่วนแผ่นด้าน ข้างมีลักษณะแบน ขอบยกขึ้น เล็กน้อย	สีน้ำตาลเทา จุดสีเขียว ขาวว่ายน้ำสีแดง อมชมพู มีขน สีน้ำตาล ปลายหางสี น้ำเงิน ขอบแพนหาง สีเขียว ขนสี น้ำตาลแดง



หมายเหตุ: ชื่อวิทยาศาสตร์ *Fenneropenaeus merguensis* (De Man, 1888)

ชื่อภาษาอังกฤษ Banana Shrimp

ชื่อภาษาไทย กุ้งแชบ๊วย

ภาพที่ 2-3 ก. *Fenneropenaeus merguensis* ข. พิเศษมา ค. ที่ไลกัม



หมายเหตุ: ชื่อวิทยาศาสตร์ *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

ชื่อภาษาอังกฤษ Pacific White Shrimp, Whiteleg Shrimp

ชื่อภาษาไทย กุ้งขาว

ภาพที่ 2-4 ก. *Litopenaeus vannamei* ข. พิเศษมา ค. ที่ไลกัม

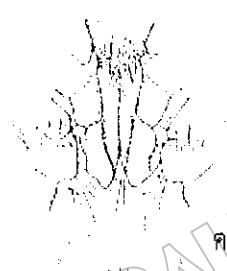


หมายเหตุ: ชื่อวิทยาศาสตร์ *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798)

ชื่อภาษาอังกฤษ Black-Tiger Shrimp, Giant Tiger Shrimp

ชื่อภาษาไทย กุ้งกุลาดำ

ภาพที่ 2-5 ก. *Penaeus monodon* ข. พิเศษมา ค. ที่ไลกัม

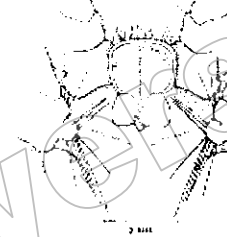


หมายเหตุ: ชื่อวิทยาศาสตร์ *Parapenaeopsis hungerfordi* (Alcock, 1905)

ชื่อภาษาอังกฤษ Pink Tiger Shrimp

ชื่อภาษาไทย กุ้งปล้อง

ภาพที่ 2-6 ก. *Parapenaeopsis hungerfordi* ข. พีแทสมา ค. ทีโลกัม

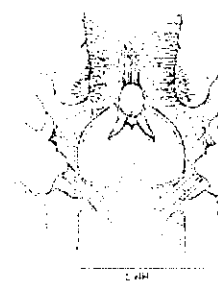
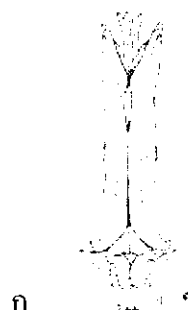


หมายเหตุ: ชื่อวิทยาศาสตร์ *Metapenaeus brevicornis* (H.Milne Edward, 1837)

ชื่อภาษาอังกฤษ Yellow Shrimp

ชื่อภาษาไทย กุ้งเหลือง กุ้งหลังไข่

ภาพที่ 2-7 ก. *Metapenaeus brevicornis* ข. พีแทสมา ค. ทีโลกัม

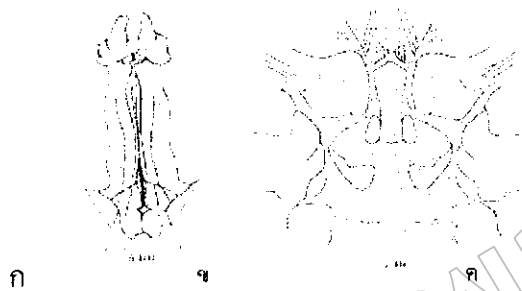
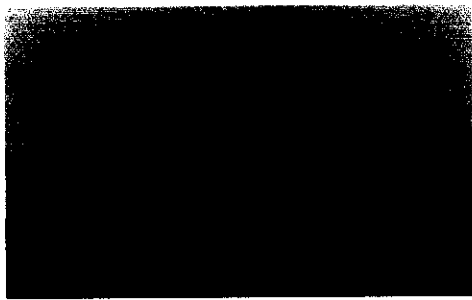


หมายเหตุ: ชื่อวิทยาศาสตร์ *Metapenaeus tenuipes* (Kubo, 1949)

ชื่อภาษาอังกฤษ Stork Shrimp

ชื่อภาษาไทย กุ้งหัวมนน้ำจืด

ภาพที่ 2-8 ก. *Metapenaeus tenuipes* ข. พีแทสมา ค. ทีโลกัม



หมายเหตุ: ชื่อวิทยาศาสตร์ *Metapenaeus ensis* (De Haan, 1844)

ชื่อภาษาอังกฤษ Pink Shrimp, Greasy-Back Shrimp

ชื่อภาษาไทย กุ้งตะกาดหิน กุ้งโด้กน้ำลึก

ภาพที่ 2-9 ก. *Metapenaeus ensis* ข. ฟัเทสมา ค. ที่ไลกัม

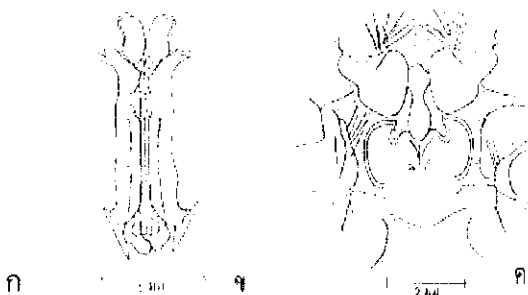
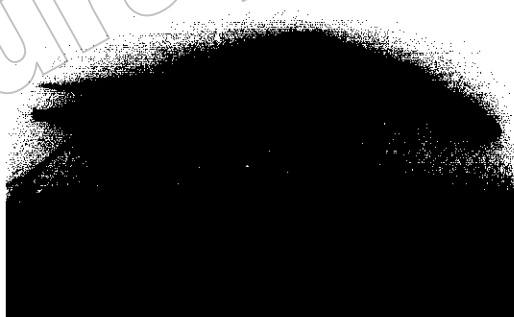


หมายเหตุ: ชื่อวิทยาศาสตร์ *Metapenaeus affinis* (De Haan, 1844)

ชื่อภาษาอังกฤษ Pink Shrimp, Greasy-Back Shrimp

ชื่อภาษาไทย กุ้งตะกาด

ภาพที่ 2-10 ก. *Metapenaeus affinis* ข. ฟัเทสมา ค. ที่ไลกัม



หมายเหตุ: ชื่อวิทยาศาสตร์ *Metapenaeus moyebi* (Kishinouye, 1896)

ชื่อภาษาอังกฤษ Pink Shrimp

ชื่อภาษาไทย กุ้งตะกาดขาว

ภาพที่ 2-11 ก. *Metapenaeus moyebi* ข. ฟัเทสมา ค. ที่ไลกัม

2. การจัดหมวดหมู่ จำแนกชนิดและลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยเครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic Markers)

เครื่องหมายพันธุกรรมเป็นสารพันธุกรรมที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษามีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกัน (อมรรัตน์ พงศ์ดารา และคณะ, 2547) โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลที่ใช้รวมกับการตรวจสอบความแปรปรวนของเครื่องหมายพันธุกรรม ได้แก่ อิเล็กโตรโฟรีซิส ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) (ในกรณีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) อาร์เอฟแอลพี-พีซีอาร์ (RFLP-PCR) และอาร์เอฟดี-พีซีอาร์ (RAPD-PCR) เครื่องหมายพันธุกรรมแบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีนและระดับดีเอ็นเอ โดยสารพันธุกรรมทั้ง 2 ระดับ มีความละเอียดในการบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับที่ต่างกัน

เครื่องหมายพันธุกรรมระดับโปรตีน (Protein Marker)

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมระดับโปรตีนนั้น จะอาศัยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) ตรวจสอบความแตกต่างของประจุ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลโปรตีน ในการจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชนิดกึ่งทะเล มีการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมระดับโปรตีนอยู่บ้าง เช่น การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างกึ่งในสกุล *Penaeus* 7 ชนิด และ *Metapenaeus* 3 ชนิด ที่พบบริเวณทะเลจีนใต้ โดยตรวจสอบเอนไซม์ 15 ชนิด 17 ตำแหน่ง และใช้ Nei's Genetic Distance ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชนิดกึ่งในทั้ง 2 สกุล (Tam & Chu, 1993) ข้อมูลที่ได้แสดงว่ามีการจัดกลุ่มชนิดกึ่งเป็น 2 กลุ่มตามสกุลและภายในแต่ละสกุลอย่างชัดเจน โดยกลุ่มที่ (1) สกุล *Metapenaeus* โดย *Metapenaeus affinis* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *M. ensis* มากกว่า *M. joyneri* และกลุ่มที่ (2) สกุล *Penaeus* โดยสกุลย่อย *Fenneropenaeus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Penaeus Litopenaeus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Farfantepenaeus* และ *Melicertus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Masupenaeus* โดยการจัดกลุ่มภายในสกุลย่อยชัดเจนในเกือบทุกสกุล ยกเว้น *P.(Fenneropenaeus) chinensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Penaeus* มากกว่ากึ่งชนิดอื่นในสกุลย่อย *Fenneropenaeus* ส่วน *P.(Marsupenaeus) japonicus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *P. (Melicertus) latisulcatus* แต่ระยะความห่างทางพันธุกรรมระหว่างสกุลย่อย 2 สกุลนี้ มีมากกว่าสกุลย่อย *Fenneropenaeus* กับ *Penaeus*

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมระดับโปรตีนอาจมีข้อจำกัดในเรื่องอื่นที่ใช้ในการตรวจสอบและการเก็บตัวอย่าง โดยจำเป็นต้องเลือกวิเคราะห์เนื้อเยื่อและโปรตีนหรือเอนไซม์ ยังคงออกฤทธิ์อยู่ ดังนั้นจำเป็นต้องรักษาตัวอย่างในสภาพสดและส่วนใหญ่ต้องฆ่าสิ่งมีชีวิตนั้น

ทำให้ไม่เหมาะกับการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่ใกล้สูญพันธุ์หรือเนื้อเยื่อที่ผ่านการเก็บรักษามาระยะเวลาหนึ่ง (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543)

เครื่องหมายพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอ (DNA Marker)

เครื่องหมายพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอเป็นการศึกษาสารพันธุกรรม ที่พบอยู่ในนิวเคลียส (Nuclear DNA) หรือพบอยู่ในออร์แกเนลล์ส่วนอื่น ๆ เช่น ไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA: mtDNA) โดยสารพันธุกรรมที่พบทั้ง 2 ส่วนมีคุณสมบัติทางพันธุกรรมแตกต่างกัน จึงเหมาะในการใช้ศึกษาในวัตถุประสงค์ที่ต่างกัน ในปัจจุบันมีผู้นิยมใช้เครื่องหมายพันธุกรรมดีเอ็นเออย่างแพร่หลาย (อมรรัตน์ พงศ์คารา, วัชรสุตา หวลกะสิน, วราพร วรรณนา, อุดสาห์ จันทรอำไพ และ วิไลวรรณ โชติเกียรติ, 2547; Baldwin, Bass, Bowen, & Clark, 1998; Billington, 2003; Chu, Lavery, Chan, & Tam, 2004; Klinbunga, Ampayup, Tassanakajon, Jarayabhand, & Yoosukh, 2000; Maggioni, Roger, Maclean, & Incao, 2001; Quan et al., 2004) ซึ่งเป็นผลมาจากตัวเลือกของประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่หลากหลายและสามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การศึกษาระดับดีเอ็นเอในนิวเคลียส

ดีเอ็นเอที่พบในนิวเคลียสนิยมใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมหลายระดับ เช่น การจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต (Klinbunga et al., 2000) ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรสิ่งมีชีวิต (Rhodes, Lewis, Chapman & Sodovy, 2003; Rivera, Kelley, & Roderick, 2004; Wolfus, Gracia, & Alcivar-Warren, 1997) เป็นต้น เนื่องจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีการรวมยีนหรือการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (Recombination) และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมเพียงเล็กน้อยได้ดีแต่อาจไม่เหมาะในการใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิต

การจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ดีเอ็นเอในนิวเคลียสนั้นมักเป็นการหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจงกับชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น การพัฒนาเครื่องหมายขนาด 536 bp สำหรับจำแนกหอยนางรมชนิด *Crassostrea belcheri* จากหอยนางรมอีก 4 ชนิด (*C. iredalei*, *Saccostrea cucullata*, *S. forskali* และ *Striostrea (Parastriostrea) mytiloides*) (Klinbunga et al., 2000)

การศึกษาระดับดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในสัตว์เป็นดีเอ็นเอรูปวงแหวนขนาดเล็ก (Double-Stranded Loop DNA) ขนาดประมาณ 14,000-26,000 คู่เบส ประกอบด้วยยีนที่สังเคราะห์โปรตีน 13 ยีน ยีนที่สร้าง rRNA 2 ยีน และ tRNA 22 ยีน ตามลำดับ โดยมีการกลายพันธุ์สูงสุดในส่วนของ Control

Region (D-Loop) และต่ำสุดในส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้าง RNA ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมี อัตราการเกิดการแทนที่ นิวคลีโอไทด์สูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส (ประมาณ 5-10 เท่า) มีการคงอยู่ ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนส่วนที่มีการเกิดวิวัฒนาการ ไม่พบการรวมยีน หรือการแลกเปลี่ยน สารพันธุกรรมและมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมจากแม่สู่ลูก คุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้สาร พันธุกรรมในไมโทคอนเดรียสามารถเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่เหมาะสมในการประเมิน ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษร่วมกันได้ (Avice, 2004; Billington, 2003; Lowe et al., 2004)

กลไกการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมใน สิ่งมีชีวิต ได้แก่การกลายพันธุ์ (Mutation) โดยแบ่งรูปแบบของการกลายพันธุ์เป็น 2 รูปแบบ คือ

1. การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม

1.1 การย้ายสลับที่ระหว่างชิ้นส่วนโครโมโซมต่างคู่ (Translocation) ส่งผลกระทบต่อ หน้าที่ของยีน

1.2 การกลับทิศของชิ้นส่วนโครโมโซม (Inversion)

1.3 การมีบางส่วนของโครโมโซมขาดหายไป (Deletion) หรือเกินมา (Insertion or Duplication)

1.4 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

2. การกลายพันธุ์ระดับยีน เป็นการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีนจาก อัลลีลหนึ่งไปเป็น อีกอัลลีลหนึ่งซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

2.1 การแทนที่คู่เบส (Nucleotide or Base Substitution) คือ การแทนที่เบสในสาย โพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

2.2 การแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน (Transition) คือ การเกิดการย้ายโปรตอน หรืออิเล็กตรอนของไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของเบสเอง ทำให้เบส อะดีนีน (Adenine - A) สลับ แทนที่กับ กัวนีน (Guanine - G) ในกลุ่มเบสพิวรีน (Purine) หรือ ไซโตซีน (Cytosine - C) สลับ แทนที่กับ ไทมีน (Thymine - T) ในกลุ่มเบสไพริมิดีน (Pyrimidine)

2.2.1 การแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่ม (Transversion) มักเกิดในช่วงการซ่อมแซม ตัวเอง ของดีเอ็นเอ เป็นการแทนที่เบสในกลุ่มพิวรีน (A, G) ด้วยเบสกลุ่มไพริมิดีน (C, T) หรือเกิด ในทางกลับกัน

2.2.2 เฟรมชิฟท์ มิวเทชัน (Frameshift Mutation) คือ การกลายพันธุ์ที่เกิดจาก การสูญเสีย (Deletion) หรือการเพิ่ม (Insertion) นิวคลีโอไทด์ในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

ทำให้กรอบการแปลรหัสพันธุกรรม นับจากตำแหน่งนั้นเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้โปรตีนที่สังเคราะห์ได้เปลี่ยนไป (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2541; สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี [สสวท.], 2548)

การกลายพันธุ์อาจเปลี่ยนแปลงหรือไม่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตาม การเกิดการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เช่น การเพิ่ม การสูญเสีย และการกลับทิศของสายดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้ยากกว่าการเกิดการแทนที่คู่เบส (Lowe et al., 2004)

ข้อสำคัญในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุลนั้น คือ การเลือกยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ให้มีอัตราการเกิดวิวัฒนาการ (Rate of Evolution) เหมาะสมกับระดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สนใจ โดยยีนที่มีอัตราวิวัฒนาการช้า เช่น ยีน 16S rRNA และ COI บนไมโทคอนเดรีย จะเหมาะกับการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตระหว่างชนิดและระหว่างสกุล (Billington, 2003; อมรรรัตน์ พงศ์ดารา และคณะ, 2547; Baldwin et al., 1998; Chu et al., 2004; Maggioni et al., 2001)

ยีนที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ ยีน COI ซึ่งเป็นยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ ไซโตโครม ออกซิเดส ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอน (Electron Transport Chain) ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (Respiratory Chain) (สุนันทา ภิญญาวัจน์, 2535) และยีน 16S rRNA (16S rDNA) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างกรดไรโบนิวคลีอิก (Ribonucleic Acid: RNA) ที่เป็นส่วนประกอบของไรโบโซม (Ribosomal RNA: rRNA) เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial Ribosome) ของยูคาริโอต (Eukaryote) มีขนาดเล็กและคล้ายกับไรโบโซมของโพรคาริโอต (Prokaryote) ประกอบด้วยหน่วยย่อย 12S และ 16S rRNA (อภัสสรารามิทธิ์, 2543; Billington, 2003)

ตัวอย่างการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโทคอนเดรียในการแยกชนิดกุ้งขาวนำเข้า *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* และกุ้งที่พบในน่านน้ำไทย 6 ชนิด ได้แก่ *P. (Penaeus) monodon*, *P. (P.) semisulcatus*, *P. (Fenneropenaeus) merguensis*, *P. (F.) silasi*, *P. (F.) indicus* และ *Metapenaeus* sp. 1 ชนิด โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa* I (PCR-RFLP) ของยีน Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) บนไมโทคอนเดรีย จากข้อมูลความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอสามารถแยกชนิดกุ้งขาวนำเข้า *P. (L.) vannamei* และกุ้งอีก 6 ชนิด ได้ โดยกุ้ง *P. (L.) vannamei* มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอจำเพาะ 4 ขนาด คือ 142 bp, 152 bp, 240 bp และ 360 bp (อมรรรัตน์ พงศ์ดารา และคณะ, 2547)

ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกุ้งทะเลกลุ่ม Penaeidae ยีนบนไมโทคอนเดรียพบในหลายการศึกษา (อมรรรัตน์ พงศ์ดารา และคณะ, 2547; Baldwin et al., 1998;

Maggioni et al., 2001; Lavery et al., 2004; Quan et al., 2004) เช่น การประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกุ้งทะเลกลุ่ม Penaeidae ระหว่าง *Penaeus*(*Litopenaeus*) *vannamei* *P. (Penaeus) monodon*, *P. (P.) semisulcatus* *P. (Fenneropenaeus) merguiensis* *P. (F.) silasi* *P. (F.) indicus* และ *Metapenaeus affinis* รวม 7 ชนิด (อมรรัตน์ พงศ์คารา และคณะ, 2547) โดยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI บนไมโทคอนเดรีย ขนาด 850-900 คู่เบส พบว่า กุ้งขาวนาเข้า *L. vannamei* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกุ้งทั้ง 7 ชนิดที่พบในประเทศไทย โดยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในสกุลย่อย *Fenneropenaeus* มีดังนี้ *P. (F.) merguiensis* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *P. (F.) silasi* มากกว่า *P. (F.) indicus* ส่วนกุ้งสกุลย่อย *Penaeus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับกุ้งสกุล *Metapenaeus* โดย *P. (P.) semisulcatus* มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Metapenaeus affinis* มากกว่า *P. (Penaeus) monodon* ให้ผลขัดแย้งกับการจัดอนุกรมวิธานโดยสัณฐานและการศึกษาข้อมูลระดับโมเลกุลอื่นๆ (Quan et al., 2004)

Baldwin et al. (1998) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างชนิดกุ้งทะเลในสกุล *Penaeus* จำนวน 6 สกุลย่อย รวม 13 ชนิด คือ *Penaeus*(*Marsupenaeus*) *japonicus*, *P. (Penaeus)*, *monodon*, *P. (P.) semisulcatus*, *P. (Fenneropenaeus) indicus*, *P. (F.) merguiensis* *P. (F.) canaliculatus*, *P. (Litopenaeus) vannamei*, *P. (Litopenaeus) stylirostris*, *P. (Litopenaeus) setiferus*, *P. (Farfantepenaeus) duorarum*, *P. (F.) paulensis*, *P. (F.) brasiliensis* และ *P. (Melicertus) kerathurus* ที่พบบริเวณมหาสมุทรแอตแลนติกฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตกของอินโดแปซิฟิกและแปซิฟิกฝั่งตะวันออก(Indo Pacific and Eastern Pacific)โดยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI บนไมโทคอนเดรีย และพบว่า แบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ (1) ประกอบด้วยสกุลย่อย *Farfantepenaeus* *Litopenaeus* *Penaeus* และ *Fenneropenaeus* (*Farfantepenaeus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Litopenaeus*) โดยมีการจัดกลุ่มภายในสกุลย่อยตามลักษณะสัณฐาน ยกเว้นความสัมพันธ์ระหว่าง *P. (L.) setiferus* (Open Thelycum) และ *P. (F.) paulensis* (Close Thelycum) และกลุ่มที่ (2) คือ ประกอบด้วยสกุลย่อย *Melicertus* และ *Masupenaeus* ซึ่งการจัดกลุ่มภายในสกุลย่อยของกุ้งในกลุ่มนี้ไม่เป็นไปตามการจัดกลุ่มภายในสกุลย่อยโดยลักษณะสัณฐาน (*P. (M.) japonicus* เป็นกุ้งชนิดเดียวในสกุลย่อย *Marsupenaeus*) (Baldwin et al., 1998)

การศึกษาของ Maggioni et al. (2001) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสกุลย่อย 2 สกุลของกุ้งสกุล *Penaeus* จำนวน 10 ชนิด คือ *Farfantepenaeus paulensis*, *F. brasiliensis*, *F. subtilis*, *F. duorarum*, *F. aztecus*, *Litopenaeus schmitti*, *L. setiferus* และ *Xiphopenaeus kroyeri*

ที่พบบริเวณมหาสมุทรแอตแลนติกฝั่งตะวันตกและ *L. vannamei* และ *L. stylirostris* ที่พบบริเวณมหาสมุทรแปซิฟิกฝั่งตะวันออก โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ขนาด 485-488 คู่เบส และพบว่าการจัดกลุ่มชนิดเป็นไปตามการจัดสกุลย่อยแต่ละสกุลของกิ้งในสกุล *Penaeus* โดยใช้ลักษณะพื้นฐาน

Lavery et al. (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสกุลย่อยของกิ้งสกุล *Penaeus sensu lato* จำนวน 6 สกุลย่อย รวม 26 ชนิด โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ COI บนไมโทคอนเดรีย และพบว่าการจัดกลุ่มระดับสกุลคล้ายกับการศึกษาของ Baldwin et al. (1998) และยังคงรวมสกุลย่อย *Melicertus* อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Marsupenaeus*

Quan et al. (2004) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกิ้ง Penaeoidea 12 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Penaeus*(*Marsupenaeus*) *japonicus* *P. (Fenneropenaus)* *chiensis* *P. (F.) penicillatus* *P. (F.) canaliculatus* *P. (L.) vannamei* *Trachypenaeus* *curvirostris* *Metapenaeus* *affinis* *M. ensis* *Metapenaeopsis* *barbata* *Parapenaeus* *fissurioides* *Parapenaeopsis* *hardiwickii* และ *Solenocera* *crassicornis* โดยใช้ข้อมูลสายนิวคลีโอไทด์รวมของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI และ 16S rRNA บนไมโทคอนเดรีย พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ (1) ประกอบด้วยกิ้งที่อยู่ในสกุล *Penaeus* ทั้งหมด (*P. (M.) canaliculatus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *P. (M.) japonicus* *P. (F.) chinensis* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *P. (F.) penicillatus* มากกว่า *P. (L.) vannamei*) กลุ่มที่ (2) ประกอบด้วยกิ้งในสกุล *Metapenaeus* *Parapenaeopsis* และ *Trachypenaeus* (*P. hardiwickii* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *T. curvirostris*) และกลุ่มที่ (3) ประกอบด้วยสกุล *Solenocera* *Metapenaeopsis* และ *Parapenaeus* (*M. barbata* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *P. fissurioides* มากกว่า *S. crassicornis*) ซึ่งเป็นการจัดกลุ่มที่ขัดแย้งกับการจัดอนุกรมวิธาน โดยพื้นฐานตามหลักเกณฑ์ของ Burkenroad (1993) ที่จัดให้ *S. crassicornis* อยู่ต่างครอบครัว ส่วนการประเมินเวลาการแยกแหว่งกิ้งกลุ่ม *Penaeus*-*Metapenaeus* มีระยะเวลา 6.38-7.98 ล้านปีก่อนยุค Post-Miocene และการแยกภายในกิ้งกลุ่ม *Penaeus* และ *Metapenaeus* มีระยะเวลา 0.08-0.4 ล้านปีก่อนยุค Late Pleistocene โดยจากผลการศึกษาพบว่า ยีน COI เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ดีในการวิเคราะห์ความแตกต่างระดับชนิด ส่วนยีน 16S rRNA สามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับชนิดและสกุลในกลุ่มครัสเตเชียได้

3. ข้อมูลที่ใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

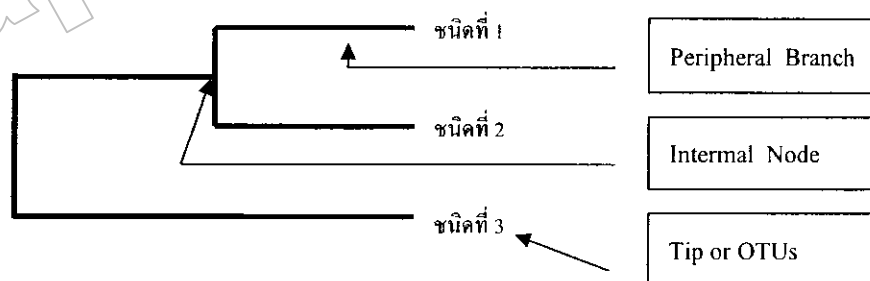
ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา หรือทางพันธุศาสตร์โมเลกุล สามารถนำมาใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยแบ่งรูปแบบข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาออกเป็น 2 ประเภท คือ

3.1 Discrete Data เป็นข้อมูลความเหมือนและแตกต่างของลักษณะที่มีการแบ่งเป็นกลุ่มอย่างชัดเจนและไม่ต่อเนื่องกันในแต่ละ OTUs เช่น การมีหรือไม่มีฟันด้านล่างของกรีกุ้งทะเล (การศึกษาลักษณะสัณฐาน) ความเหมือนหรือต่างกันของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์หนึ่ง ๆ (การศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรม) เป็นต้น โดย OTUs ที่มีความคล้ายคลึงกันมากจะมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากกว่า OTUs อื่น

3.2 Distance Data ได้จากการคำนวณดัชนีแสดงระดับความแตกต่างของลักษณะในแต่ละ OTUs เป็นค่าความห่างทางพันธุกรรม (Genetic Distance) และทำการเปรียบเทียบในรูปแบบตารางของค่าความห่างทางพันธุกรรม (Distance Matrix) แต่ละคู่ของ OTUs เพื่อทำการแยกและจัดกลุ่ม OTUs (Cluster Analysis) โดย OTUs ที่มีค่าความห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุดเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากที่สุด (ศิริวุธ กลิ่นบุหงา, 2544)

4. ส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree)

ประกอบด้วยส่วนที่เป็นปม (Nodes) โดยยอด (Tips) หรือปมภายนอก (Terminal Nodes) แสดงถึง OTUs และกิ่ง (Branches) ที่เชื่อมระหว่างปมจะแสดงถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการการมีบรรพบุรุษร่วมกันระหว่าง OTUs (ภาพที่ 2-12) โดยรูปแบบของแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการในลักษณะนี้ว่า Topology

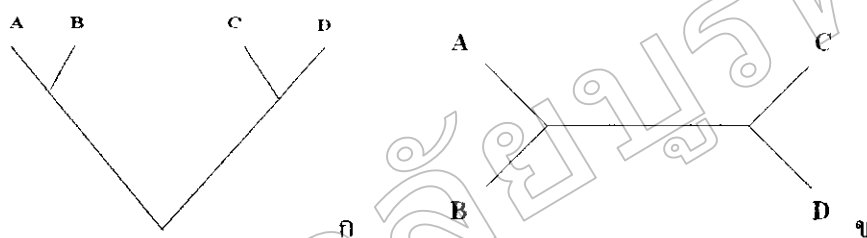


ภาพที่ 2-12 ส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้

5. แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนิยมแสดงในรูปแบบ Phylogenetic Tree โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ Rooted Tree (ภาพที่ 2-13 ก.) และ Unrooted Tree (ภาพที่ 2-13 ข.)

โดยการสร้าง Phylogenetic Tree ส่วนใหญ่มักสร้างในรูป Unrooted Tree ก่อน ซึ่งจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OTUs ที่ทำการศึกษาแต่ไม่สามารถระบุตำแหน่งของการมีบรรพบุรุษร่วมได้ ส่วน Rooted Tree เป็นการตรึงราก Unrooted Tree กับกลุ่มอนุกรมวิธานที่มีความห่างทางพันธุกรรม (Outgroup) กับ OTUs เพื่อตรึงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (สิริวรุท กลิ่นบุหงา, 2544; Halliburton, 2004)



ภาพที่ 2-13 ก. แผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการแบบ Rooted Tree ข. แบบ Unrooted Tree

6. วิธีการสร้าง Phylogenetic Tree

วิธีการสร้าง Phylogenetic Tree แบ่งออกเป็น 3 วิธีการหลัก ๆ คือ Maximum Parsimony, Maximum Likelihood และ Distance Method โดยแต่ละวิธีมีหลักการนำข้อมูลมาประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตแตกต่างกันจึงอาจให้ผลการประเมินแตกต่างกันออกไป ค่าสนับสนุนทางสถิติของ Topology ของ Phylogenetic Tree จะหาจากแบบของแผนภูมิต้นไม้ที่สร้างขึ้นจากการสุ่มข้อมูลซ้ำหลายครั้ง (ภาพที่ 2-14)

6.1 Maximum Parsimony Method

วิธีนี้ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต (Discrete Data) โดยอาศัยจำนวนการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการที่น้อยที่สุด ซึ่งในการวิเคราะห์ความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิตนั้น ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่สามารถนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการได้ Informative Site นั้นต้องมีเบสแตกต่างกันอย่างน้อย 2 เบส และพบเบสที่แตกต่างในอย่างน้อย 2 OTUs โดยแผนภูมิต้นไม้ที่ดีที่สุดจะมีจำนวนการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุดในทุก ๆ ตำแหน่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Halliburton, 2004; Russell, 2001) โดยวิธีการหา Tree แบบ Heuristic Search จะสร้าง Core Tree เริ่มต้นก่อนขึ้นด้วยวิธีที่เรียกว่า Stepwise Addition Algorithm จากนั้นจะทำการสลับตำแหน่งของกิ่งเพื่อหา Tree ที่ดีที่สุดและเพิ่มตัวอย่างเข้าไปใน Core Tree แบบสุ่มตัวอย่าง (Random) โดยพิจารณาตามหลักของ Maximum Parsimony

6.2 Maximum Likelihood Method

วิธีนี้ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตจากการคำนวณค่าความน่าจะเป็นของอัตราการเปลี่ยนแปลงของลักษณะ (เช่น การแทนที่นิวคลีโอไทด์) เพื่อหาแผนภูมิต้นไม้ แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่มีค่าความน่าจะเป็นสูงสุด ซึ่งส่วนใหญ่มักใช้ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ ค่าความน่าจะเป็นของ Phylogenetic Tree จากผลรวมของค่าความน่าจะเป็นของการแทนที่นิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งนั้น (Lowe et al., 2004) โดยอัตราการเกิดการแทนที่ นิวคลีโอไทด์ต่างรูปแบบ (Transition/ Transversion) จะมีค่าเท่ากันหรือแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแบบจำลองการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (Model of Nucleotide Substitution) เช่น Jukes-Cantor One Parameter และ Kimura's Two Parameter เป็นต้น (Halliburton, 2004; Lowe et al., 2004)

6.3 Distance Method

วิธีนี้ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการจัดหมวดหมู่ OTUs ตามระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic Distance) โดยคู่ OTUs ที่มีค่าความห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุดจะมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากที่สุดและจะถูกจัดเป็น OTUs ใหม่ 1 OTUs เพื่อนำมาคำนวณหาความห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ OTUs ในรูป Distance Matrix ใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนครบทุก OTUs จะได้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่าง OTUs ที่ทำการศึกษา ทั้งหมด โดยมักนิยมใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) ในการสร้าง Phylogenetic Tree (Halliburton, 2004; Russell, 2001)

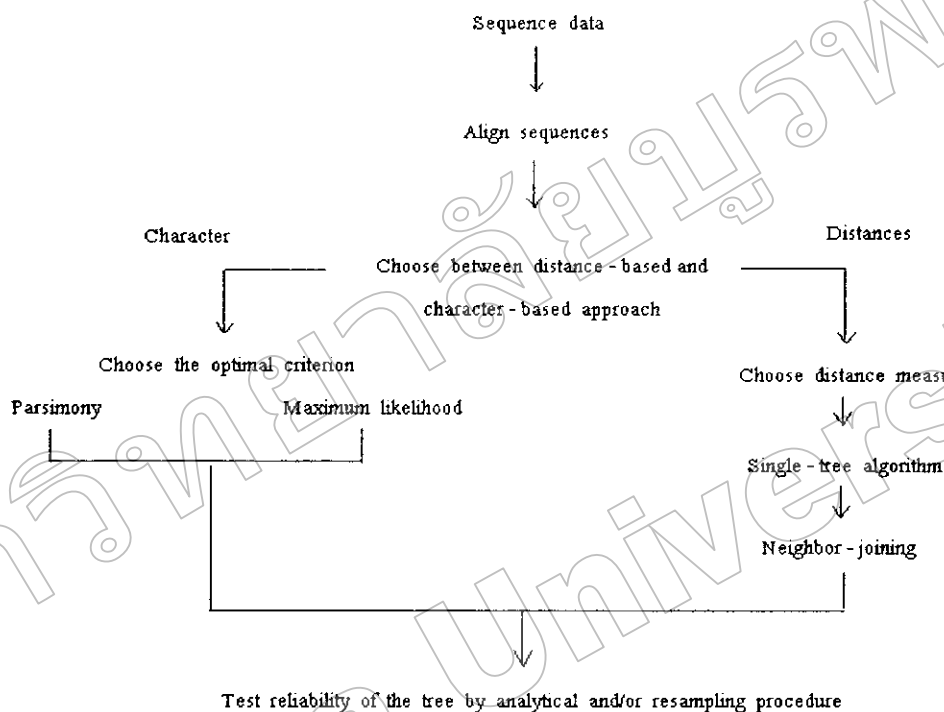
6.4 ค่าสนับสนุนทางสถิติ (Statistic Supporting Value)

การประเมินค่าความเชื่อมั่นในการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้น นิยมวิธี Bootstrapping ซึ่งเป็นการสุ่มจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เดิม โดยเป็นการสุ่มและแทนที่ นิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งในชุดข้อมูลเดิมจนได้เป็นชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่ เพื่อนำไปสร้าง Phylogenetic Tree ใหม่ด้วยวิธีการสร้างแผนภูมิเดิม ขบวนการนี้จะทำซ้ำหลาย ครั้งจนได้แผนภูมิต้นไม้หลากหลาย Topology ซึ่งท้ายที่สุดจะได้แผนภูมิต้นไม้ที่แสดงค่าความเชื่อมั่นในรูปร้อยละของรูปแบบแผนภูมิที่สร้างขึ้นใหม่ ซึ่งจะสัมพันธ์กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เดิม โดยกิ่งที่มีค่าความเชื่อมั่น 100% น่าจะแสดงแนวโน้มของการจัดกลุ่ม (Felsenstein, 1985)

6.5 การเลือกรูปแบบการจัดกลุ่มที่พบใน Phylogenetic Tree (Consensus Tree)

การเลือกรูปแบบการจัดกลุ่มที่พบใน Phylogenetic Tree เป็นผลสรุปจาก Tree ทั้งหมด ซึ่งอาจเกิดจากการทดสอบ Bootstrapping หรือเป็นผลมาจากการสร้าง Tree จากวิธีต่าง ๆ เช่น Maximum Parsimony แล้วได้ Tree จำนวนหนึ่งที่มีสัณฐานของ Phylogenetic Tree แตกต่างกัน แต่มีจำนวนการกลายพันธุ์เท่ากันและเป็นการกลายพันธุ์ที่น้อยที่สุดเช่นกัน วิธี การสร้าง Consensus Tree ที่นิยมใช้กันอยู่มี 2 วิธี คือ วิธี Strict ซึ่งจะสร้าง Consensus Tree

ด้วยข้อกำหนดว่ากิ่งใด ๆ ที่ปรากฏใน Consensus Tree จะต้องปรากฏใน Phylogenetic Tree ทั้งหมด (100%) ที่นำมาพิจารณา และวิธี Majority Rule ซึ่งจะสร้าง Consensus Tree ซึ่งมีข้อกำหนดว่ากิ่งที่ปรากฏใน Consensus Tree จะต้องปรากฏเป็นส่วนใหญ่ของ Phylogenetic Tree ที่นำมาพิจารณา



ภาพที่ 2-14 การสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

1. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction-PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือที่เรียกว่า In Vitro Enzyme Gene Amplification เป็นเทคนิคที่นิยมใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้มากขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาไม่นาน ทั้งนี้ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งหมดหรือส่วนปลายของดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อใช้สังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ซึ่งใช้เป็นจุดตั้งต้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (ไพรเมอร์) เอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA Polymerase) ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ให้ได้ ดีเอ็นเอเส้นที่สมบูรณ์ คือออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ และสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เพื่อให้สภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR สามารถสร้างสายดีเอ็นเอเป้าหมายเพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่าจากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 โมเลกุล

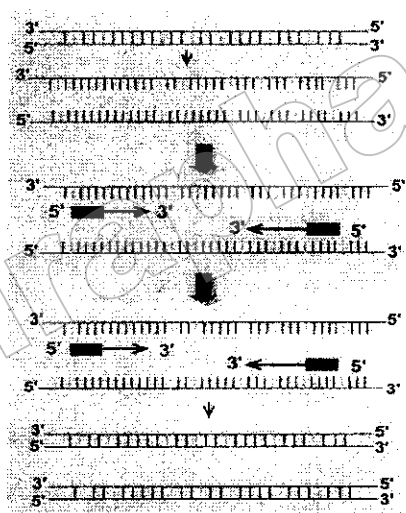
ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR อาศัยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขึ้นลงต่อเนื่องซ้ำกันหลาย ๆ รอบ โดยปฏิกิริยา PCR 1 รอบ (ภาพที่ 2-15 ก) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1.1 Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอแม่แบบเส้นคู่เป็นสายเดี่ยว 2 สาย โดยใช้ความร้อนประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส

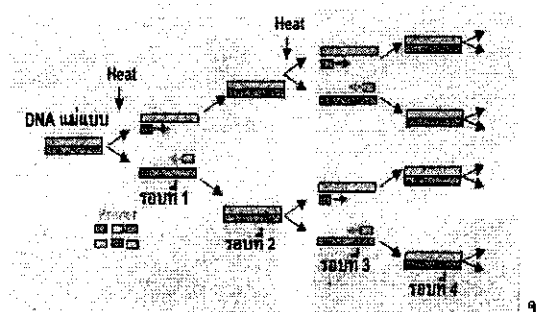
1.2 Primer Annealing Step เป็นขั้นตอนที่ให้ไพรเมอร์ทั้ง 2 ไพรเมอร์เข้าจับที่ตำแหน่งจำเพาะของดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้ง 2 สาย อุณหภูมิช่วงนี้จะลดลงอยู่ในช่วง 45-58 องศาเซลเซียส

1.3 Primer Extension ขั้นตอนนี้ DNA Polymerase จะช่วยเร่งการเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ซึ่งเป็นการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ อุณหภูมิที่ให้ในช่วงนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับทั้ง 3 ขั้นตอน ซ้ำกันหลายๆ รอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งเรียกว่า Amplified Product หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) จำนวนมากมายโดยลักษณะการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จะเป็นแบบทวีคูณ (ภาพที่ 2-15 ข) แล้วนำไปแยกและวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (วิชัย บุญแสง, 2541)



ก



ข

ภาพที่ 2-15 ก. ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR 1 รอบ ข. การสังเคราะห์เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแบบทวีคูณ

2. อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นกระบวนการที่โมเลกุลของดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าบนอะกาโรสเจล (Agarose Gel) หรือโพลีอะคริลาไมด์เจล (Polyacrylamide Gel) ซึ่งมี

โครงสร้างเป็นเส้นใยเชิงซ้อนสานกันเป็นตาข่ายที่สามารถควบคุมขนาดรูของเจลได้เพื่อให้โมเลกุลชนิดดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านได้ โดยดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ผ่านเจลได้เร็วและดีกว่าดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก

การเลือกใช้ชนิดของเจลขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ทำการศึกษา โดยโพลีอะครีลาไมด์เจล สามารถแยกโมเลกุลดีเอ็นเอขนาด 5 - 2000 bp และสามารถแยกโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันแม้เพียง 1 bp ส่วนอะกาโรสเจลมีอำนาจการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอต่ำกว่าโพลีอะครีลาไมด์เจล แต่สามารถแยกโมเลกุลดีเอ็นเอในช่วงขนาดที่กว้างกว่า คือ 200 bp-60 Kb ที่ความเข้มข้นของอะกาโรสต่างกัน (ตารางที่ 2-4) การตรวจขนาดของชิ้นส่วนโมโตคอนเดรียดีเอ็นเอมักใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล เช่น การวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ การตรวจสอบความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ RAPD ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น (อมรรัตน์ พงศ์ดารา และคณะ, 2547; Klinbunga et al., 2000; Baldwin et al., 1998; Hualkasin, 2003)

ตารางที่ 2-4 ช่วงการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยการใช้อะกาโรสเจลที่ปริมาณอะกาโรสต่าง ๆ (อุไรวรรณ วิจารณ์กุล, 2545)

ปริมาณอะกาโรสในเจล (% w/v)	ช่วงการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอเชิงเส้นอย่างมีประสิทธิภาพ (Kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

นอกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านรูของเจลด้วยอัตราที่ขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอแล้ว ความต่างศักย์เป็นโวลต์ที่ใช้ในสนามไฟฟ้าก็มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของดีเอ็นเอด้วยเช่นกัน ซึ่งการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นส่วนกลับกับความต่างศักย์ที่ใช้ กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้น อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้น แต่ประสิทธิภาพในการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอลดลง นอกจากนี้องค์ประกอบและความเข้มข้นของไอออนิกในอิเล็กโตรโฟรีซิสบัฟเฟอร์ก็ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ โดย

บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของไอออนิกมาก การเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะมีประสิทธิภาพสูง (อุไรวรรณ วิจารณ์กุล, 2545) เมื่อโมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าบนอะกาโรสเจล (Agarose Gel) สามารถตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยการเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดด้วยการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide) ซึ่งจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอให้สีส้มเมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543)

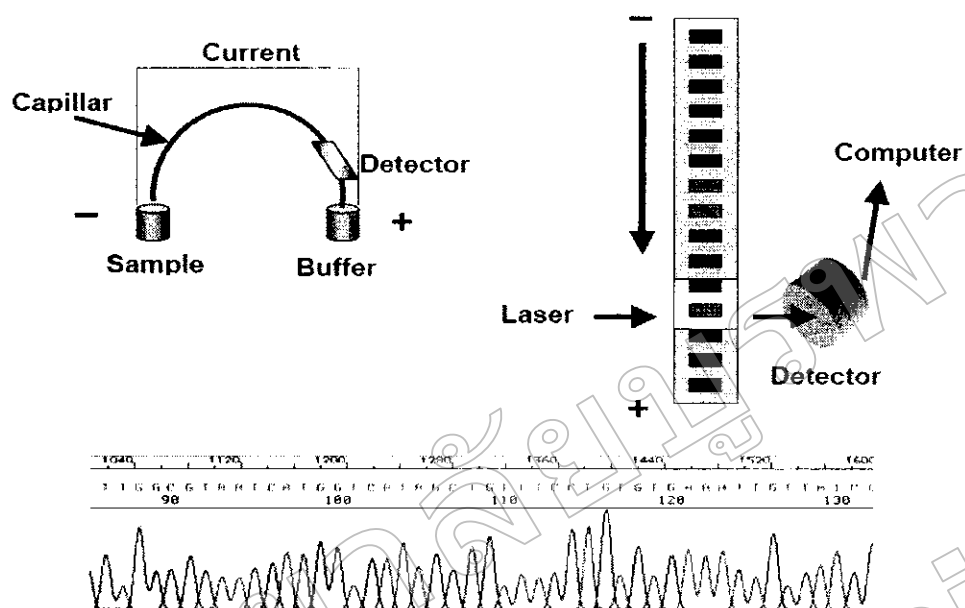
3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ คือ การทำให้เกิดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดของโมเลกุลต่างกันเพียง 1 เบส แล้วทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้นโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะเคลื่อนที่เป็นสัดส่วนกับขนาดโมเลกุลซึ่งไม่ขึ้นกับชนิดของเบสจึงสามารถอ่านลำดับเบสที่ต่างขนาดกันได้ทีละ 1 เบส เดิมการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอมีการพัฒนา 2 วิธี คือ

3.1 วิธีทางเคมี วิธีนี้ถูกพัฒนาโดย Maxam และ Gilbert ในปี 1977 เป็นกรนำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับเบสจำนวนมากรวมมาแบ่งออกเป็น 4 ส่วน โดยแต่ละส่วนนำมาทำปฏิกิริยากับสารจำเพาะที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เบสใดเบสหนึ่งหรือสองเบสและกำจัดเบสเหล่านั้นออก แล้วตัดสายดีเอ็นเอโดยตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตำแหน่งที่ไม่มีเบสออก ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันตามตำแหน่งเบสที่ทำปฏิกิริยาในแต่ละส่วน

3.2 วิธีไดค็อกซี-เทอร์มินชัน วิธีนี้เป็นวิธีของ Sanger และคณะ ปี 1977 หลักการของวิธีการนี้คล้ายกับ PCR (ภาพที่ 2-15) โดยแบ่งการสร้างสายดีเอ็นเอออกเป็น 4 ส่วน ในแต่ละส่วนจะใช้ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอเป้าหมายเพียงสายเดียวและจะหยุดปฏิกิริยาการสร้างสายดีเอ็นเอในลำดับเบสที่มีการใช้ไดค็อกซีนิวคลีโอไทด์แทนการใช้ไดค็อกซีนิวคลีโอไทด์ในปกติในแต่ละส่วน (4 ส่วน) จะใช้ไดค็อกซีนิวคลีโอไทด์ต่างชนิดกัน โดยไดค็อกซีนิวคลีโอไทด์จะมีโครงสร้างเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นโครงสร้างของดีเอ็นเอโดยทั่วไปแต่ขาดกลุ่มไฮดรอกซิล (3'-OH) ทำให้ไม่สร้างพันธะฟอสเฟตกับนิวคลีโอไทด์ตัวต่อไป ผลที่ได้จากการสังเคราะห์จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่มีความยาวเท่ากับระยะจากไพรเมอร์ถึงตำแหน่งที่ ไดค็อกซีนิวคลีโอไทด์นั้น ๆ มาจับ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการหาลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอหลากหลายวิธี เช่น การใช้ Fluorescence-Labeled Didcoxy-Terminators โดยมีการแสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนเจล และการใช้ Dye Labeled Terminators ด้วยวิธี Capillary Electrophoresis (ภาพที่ 2-15) ซึ่งสามารถแสดงผลโดยไม่ต้องผ่านเจล (Integrated DNA Technology: IDT, 2005)



ภาพที่ 2-16 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอโดยใช้ Dye Labeled Terminators
ด้วยวิธี Capillary Electrophoresis (IDT, 2005)