บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การรวบรวมตัวอย่างกุ้งทะเลจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

ตัวอย่างกุ้งทะเลครอบครัว Penaeidae ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาแหล่งน้ำธรรมชาติในภาคตะวันออก (ตารางที่ 3-1) ตัวอย่างกุ้งทะเลที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติในภาคตะวันออก ได้แก่ กุ้งสกุล *Metapenaeus*, *Penaeus*, *Fenneropenaeus*, *Litopenaeus* และ *Parapenaeopsis* (*Metapenaeus ensis* - กุ้งตะกาดหิน, *M. moyebi* - กุ้งตะกาดขาว, *M. affinis* - กุ้งตะกาด, *M. brevicornis* - กุ้งหลังไข่, *M. tenuipes* - กุ้งหัวมันน้ำจืด, *Penaeus monodon* - กุ้งกุลาดำ, *Fenneropenaeus merguiensis* - กุ้งแชบ๊วย, *Litopenaeus vannamei* - กุ้งขาว และ *Parapenaeopsis hungerfordi* - กุ้งปล้อง) ซึ่งรวบรวมจากบริเวณปากแม่น้ำจันทบุรีและท่าเทียบเรือสิงห์อำนวย อ.แหลมสิงห์ จ.จันทบุรี, ปากแม่น้ำตราด อ.คลองใหญ่ จ.ตราด และปากแม่น้ำบางปะกง อ.บางปะกง และ อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา โดยจำแนกชนิดกุ้งที่ได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติโดยใช้ลักษณะภายนอกตามหลักเกณฑ์อนุกรมวิธานของ นงนุช ลีลาปิยะนาถ (2532) และ Pérez-Farfante, and Kensley, (1997) และเก็บรักษาตัวอย่างกุ้งทะเลในตู้แช่ -40 °C เพื่อใช้วิเคราะห์สารพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการต่อไป

การรวบรวมตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งทะเลครอบครัว Penaeidae จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ สกุล *Metapenaeus, Penaeus, Fenneropenaeus, Farfantepenaeus, Litopenaeus, Parapenaeopsis, Parapenaeus, Metapenaeopsis, Melicertus, Masupenaeus* และ *Trachypenaeus* (*Metapenaeus joyneri, Penaeus monodon, Fenneropenaeus merguiensis, F. indicus, F. chinensis, F. penicillatus, Farfantepenaeus subtilis, F. paulensis, Litopenaeus vannamei, L. stylirostris, L. setiferus, L. schmitti, Parapenaeopsis hungerfordi, P. hardwickii, Metapenaeopsis lamellate, M. barbata, Melicertus latisulcatus, M. longistylus, Masupenaeus japonicus* และ *Trachypenaeus curvirostris*) ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA และ COI ตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank เป็นชุดข้อมูลบางส่วนที่ใช้ในศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกุ้งกลุ่ม Penaeidae ของ อมรรัตน์ พงศ์ดารา และคณะ (2547) Baldwin et al. (1998) Chu et al. (2004) Maggioni et al. (2001) และ Quan et al. (2004) ส่วนกุ้งในสกุล *Solenocera* ครอบครัว *Solenoceridae* (*Solenocera crassicornis*) จากฐานข้อมูล GenBank ใช้สำหรับเป็นกลุ่มอนุกรมวิธานนอกกลุ่ม (Outgroup)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-1 ชนิดกุ้งทะเล จำนวนตัวอย่าง และแหล่งรวบรวมตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Family		Gene							
		16S rRNA				COI			
		N	Code	GenBank Assession No.	Location	N	Code	GenBank Assession No.	Location
Penaeidae	*Penaeus monodon*	5	PeMo001_SR	-	ฉะเชิงเทรา	3	PeMo034_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			PeMo016_SR	-	ฉะเชิงเทรา		PeMo033_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			PeMo070_SR	-	ฉะเชิงเทรา		PeMo147_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			PeMo100_SR	-	ฉะเชิงเทรา		-	-	-
			PeMo147_SR	-	ฉะเชิงเทรา		-	-	-
		1	PeMo01_GSR	AF125383	สงขลา		-	-	-
	Fenneropenaeus indicus	1	FeIn01_GSR	AF279815	China		FeIn02_GCF	AF284431	Thailand
	F. merguiensis	3	FeMe072_SR	-	ฉะเชิงเทรา	1	FeMe02_GCF	AF284432	Thailand
			FeMe101_SR	-	ฉะเชิงเทรา		-	-	-
			FeMe148_SR	-	ฉะเชิงเทรา		-	-	-
		1	FeMe01_GSR	AF279814	China		-	-	-
	F. chinensis	1	FeCh01_GSR	AY264908	China		-	-	-
	F. penicillatus		-	-	-	1	FePe02_GCF	AY264898	China
	Litopenaeus stylirostris	1	LiSt01_GSR	AF255057	China		-	-	-
	L. setiferus	1	LiSe01_GSR	AF279819	China		-	-	-
	L. schmitti	1	LiSc01_GSR	AF192086	China		-	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

Family		Gene							
		16S rRNA				COI			
		N	Code	GenBank Assession No.	Location	N	Code	GenBank Assession No.	Location
Penaeidae	*Litopenaeus vanamei*	3	LiVa005_SR	-	ฉะเชิงเทรา	1	LiVa03_GCF	AY264901	China
			LiVa103_SR	-	ฉะเชิงเทรา		-	-	-
			LiVa149_SR	-	ฉะเชิงเทรา		-	-	-
		1	LiVa01_GSR	AF279818	China		-	-	-
	Metapenaeus tenuipes	7	MeTe109_SR	-	ฉะเชิงเทรา	5	MeTe152_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeTe161_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeTe161_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeTe010_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeTe172_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeTe122_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeTe208_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeTe152_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeTe209_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeTe078_SR	-	ฉะเชิงเทรา		-	-	-
			MeTe121_SR	-	ฉะเชิงเทรา		-	-	-
	M. ensis	5	MeEn012_SR	-	ฉะเชิงเทรา	5	MeEn123_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeEn082_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeEn173_CF	-	ตราด
			MeEn111_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeEn189_CF	-	จันทบุรี
			MeEn123_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeEn190_CF	-	จันทบุรี
			MeEn153_SR	-	ตราด		MeEn215_CF	-	ตราด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

Family		Gene							
		16S rRNA				COI			
		N	Code	GenBank Assession No.	Location	N	Code	GenBank Assession No.	Location
Penaeidae	*Metapenaeus moyebi*	5	MeMo096_SR	-	ฉะเชิงเทรา	6	MeMo154_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeMo124_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeMo166_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeMo125_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeMo188_CF	-	จันทบุรี
			MeMo154_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeMo192_CF	-	จันทบุรี
			MeMo216_SR	-	ตราด		MeMo216_CF	-	ตราด
			-	-	-		MeMo217_CF	-	ตราด
	M. affinis	5	MeAf115_SR	-	ฉะเชิงเทรา	5	MeAf127_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeAf117_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeAf155_CF	-	จันทบุรี
			MeAf126_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeAf179_CF	-	ตราด
			MeAf127_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeAf182_CF	-	ตราด
			MeAf155_SR	-	จันทบุรี		MeAf187_CF	-	จันทบุรี
	M. brevicornis	3	MeBr023_SR	-	ฉะเชิงเทรา	6	MeBr151_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeBr089_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeBr160_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			MeBr107_SR	-	ฉะเชิงเทรา		MeBr204_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			-	-	-		MeBr205_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			-	-	-		MeBr206_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			-	-	-		MeBr213_CF	-	ฉะเชิงเทรา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

Family		Gene							
		16S rRNA				COI			
		N	Code	GenBank Assession No.	Location	N	Code	GenBank Assession No.	Location
	M. joyneri		MeJo01_GSR	AY622203	China		-	-	-
	Parapenaeopsis hungerfordi	6	PaHu075_SR	-	ฉะเชิงเทรา	6	PaHu159_CF	-	ตราด
			PaHu088_SR	-	ฉะเชิงเทรา		PaHu170_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			PaHu119_SR	-	ฉะเชิงเทรา		PaHu195_CF	-	จันทบุรี
			PaHu120_SR	-	ฉะเชิงเทรา		PaHu196_CF	-	จันทบุรี
			PaHu141_SR	-	จันทบุรี		PaHu199_CF	-	ฉะเชิงเทรา
			PaHu150_SR	-	จันทบุรี		PaHu200_CF	-	ฉะเชิงเทรา
		1	PaHu01_GSR	AY622206	China		-	-	-
	Parapenaeopsis hardwickii	2	PaHa01_GSR	AY622205	China	1	PaHa01_GCF	AY264895	China
			PaHa02_GSR	AY264910	China		-	-	-
	Marsupenaeus japonicus	2	MaJa01_GSR	AF279820	China	1	MaJa02_GCF	AY264896	China
			MaJa02_GSR	AY264911	China		-	-	-
Penaeidae	*Metapenaeopsis barbata*	1	MOBa01_GSR	AF105052	China		-	-	-
	M. lamellata	1	MOLa01_GSR	AF105043	China		-	-	-
	Trachypenaus curvirostris	1	TrCu01_GSR	AY264916	China	1	TrCu01_GCF	AY264903	China
	Farfantepenaeus subtilis	1	FaSu01_GSR	AF192068	UK		-	-	-
	F. paulensis	1	FaPa01_GSR	AF192060	UK		-	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

Family		Gene							
		16S rRNA				COI			
		N	Code	GenBank Assession No.	Location	N	Code	GenBank Assession No.	Location
	Melicertus longistylus	1	McLo01_GSR	AF279823	China		-	-	-
	M. latisulcatus	1	McLa01_GSR	AF279821	China		-	-	-
Solenoceridae	*Solencera crassicornis*	1	SoCr01_GSR	AY264915	China	1	SoCr01_GCF	AY264902	China

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในการประเมินความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน 16S rRNA และ COI ตัวอย่างกุ้งกลุ่ม Penaeidae บางชนิดที่พบทางภาคตะวันออกของประเทศไทยและลำดับนิวคลีโอไทด์กุ้งในกลุ่ม Penacidae ของยีนเดียวกัน ในฐานข้อมูล GenBank นั้น ได้กำหนดอักษรย่อแทนสกุล ชนิด ลำดับ ชนิดของยีน และสายดีเอ็นเอ Forward หรือ Reverse ของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ดังตัวอย่างเช่น PeMo001_SR โดย

Pe หมายถึง อักษรแทนชื่อสกุล *Penaeus*

Mo หมายถึง อักษร 2 ตัวแรกของชื่อชนิด *monodon*

001 หมายถึง หมายเลขประจำตัวอย่างกุ้งที่ศึกษา

S หมายถึง ยีน 16S rRNA

R หมายถึง สายดีเอ็นเอเส้น Reverse

นอกจากนี้ อักษร G หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

--- อักษร C หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน COI

--- อักษร F หมายถึง สายดีเอ็นเอเส้น Forward

ตัวอย่างเช่น LiVa03_GCF

Li หมายถึง อักษรแทนชื่อสกุล *Litopenaeus*

Va หมายถึง อักษร 2 ตัวแรกของชื่อชนิด *vannamei*

03 หมายถึง หมายเลขประจำตัวอย่างกุ้งที่ศึกษา

G หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank

C หมายถึง ยีน COI

F หมายถึง สายดีเอ็นเอเส้น Forward

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

1. สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Salt Extraction ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Aljanabi and Martinez (1994) โดยเริ่มจากตัดเนื้อเยื่อตัวอย่างกุ้งออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ลงในหลอด Microcentrifuge Tube 1.5 ml ที่มี Lysis Buffer (100 mM Tris HCl 100mM EDTA 0.5% SDS 0.2M NaCl) และ Proteinase K (20 mg/ ml) เพื่อทำการย่อยโปรตีนออกจากเนื้อเยื่อ จากนั้นนำสารละลายไป Incubate ที่ 55 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 - 8 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนในสารละลายโดยใช้ 7.5 M Ammonium Acetate และตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้ Isopropanol 100%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ในสารละลาย TE Buffer (10 mM Tris-HCL pH 7.4 1 mM EDTA pH 8)

2. วัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากจีโนม (Genomic DNA)

วัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส แนวนอน (รุ่น Sub-Cell GT, BIO-RAD, U.S.) บนอะกาโรสเจล 1% โดยดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยใช้กระแสไฟฟ้า 65 โวลท์ ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ แล้วจึงเทียบปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λDNA) ที่ทราบปริมาณแน่นอน โดยดูความเข้มของสารเรืองแสงของดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ภายใต้แสง UV (รุ่น ETX-40-M, VILBER LOURMAT, France)

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณส่วนของยีน 16S rRNA และ COI บนไมโตคอนเดรีย ด้วยเครื่อง PCR Thermocycler (รุ่น TGradient 96, Biometra, England) โดยเทคนิค PCR อาศัยการเพิ่มและลดอุณหภูมิต่อเนื่องซ้ำกันหลาย ๆ รอบ ซึ่งเป็นการจำลองการซ่อมแซมดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA Polymerase สารละลาย 1 ปฏิกิริยา (10 µl) ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 ความเข้มข้นสารละลายที่ใช้ใน 1 ปฏิกิริยา PCR โดยมีปริมาณสุทธิ 10 µl

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนประกอบของ PCR Master Mixture	
	16S rRNA	COI
DNA Template	10-50 ng	10-50 ng
10 x PCR Buffer	1 x	1 x
$MgCl_2$	1.5 µM	4 µM
dNTPs	400 µM	800 µM
Forward Primer	0.5 µM	0.25 µM
Reverse Primer	0.5 µM	0.25 µM
Taq DNA Polymerase	1 Unit	1 Unit

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนของยีน 16S rRNA และ COI บนไมโตคอนเดรีย อาศัยการเพิ่มลดอุณหภูมิ 35 รอบ และการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณต้น และ ปลายชิ้นส่วน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ดีเอ็นเอ (ไพรเมอร์) ดังตาราง 3-3 โดยการเพิ่มและลดอุณหภูมิแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. Denaturation เป็นการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอเส้นคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที (ทั้งสองยีน)

2. Annealing Stage ไพรเมอร์ทั้งสองด้าน (Forward และ Reverse) จับกับปลายด้าน 3´ ของดีเอ็นเอต้นแบบ ที่อุณหภูมิ 52 °C (ยีน 16S rRNA) และ 45-47 °C (ยีน COI) เป็นเวลา 45 วินาที

3. Extenstion เอมไซม์ DNA Polymerase เร่งการเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3´ ของไพรเมอร์เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่อุณภูมิ 72 °C (ทั้งสองยีน)

ตารางที่ 3-3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ COI บนไมโตคอนเดรีย และสภาวะที่เหมาะสมของ PCR

Gene	Primer Sequence	Size (bp)	PCR Condition		Ref.
16S rRNA	F: CGC-CTG-TTT-ATC-AAA-AAC-AT	475	94°C - 4 นาที		
	R: CCG-GTC-TGA-ACT-CAG-ATC-ACG-T		94°C - 45 วินาที		Simon et al. 1994
			52°C - 45 วินาที	35	
			72°C - 1 นาที	รอบ	
			72°C - 5 นาที		
COI	F: CAA-CAT-TTA-TTT-TGA-TTT-TTT-GG	801	94°C - 4 นาที		อมรรัตน์ พงศ์ดารา และคณะ, 2547
	R: TCC-AAT-GCA-CTA-ATC-TGC-CAT-ATT-A		94°C - 45 วินาที		
			45-47°C - 45 วินาที	35	
			72°C - 1 นาที	รอบ	
			72°C - 10 นาที		

4. ตรวจสอบขนาด ปริมาณ และทำความสะอาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR

ตรวจสอบขนาด และปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR (ผลผลิต PCR)โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส บนอะกาโรส เจล 1% โดยใช้กระแสไฟฟ้า 65 โวลท์ ประมาณ 1 ชั่วโมง เทียบขนาดและปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยสารละลาย เอธิเดียมโบรไมด์ (0.001 mg/ ml) โดย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประเมินความสามารถในการเคลื่อนที่บนแผ่นเจลของชิ้นดีเอ็นเอ และความเข้มของสารเรืองแสงของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่างที่ย้อมติดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ กับ ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด และปริมาณ (M23: 100 bp + 1.5 Kb DNA Ladder, SibEnzyme) ภายใต้แสง UV

ทำความสะอาดผลผลิต PCR ด้วยชุดทำความสะอาด (QIAQUICK PCR Purification Kit, QIAGEN) ความเข้มข้นของผลผลิต PCR ทำความสะอาดแล้วอยู่ในช่วง 30-200 ng/ µl จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (Automated Sequencer รุ่น ABI 3730 XL) ที่หน่วยวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริษัท MACROGEN Inc. ประเทศเกาหลีใต้

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

1. การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (Alignment of DNA Sequences)

ตรวจสอบความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA และ COI บนไมโตคอนเดรียที่ได้จากผลผลิต PCR โดยใช้สายตาตรวจสอบจากโปรแกรม Sequence Scaner V 1.0 (Applied Biosystems, 2005) และยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน 16S rRNA และ COI ของตัวอย่างกุ้งทะเลที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันในกุ้งกลุ่ม Penaeidae จากฐานข้อมูล GenBank

จัดเรียง (Align) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง (OTU) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตำแหน่งเดียวกันของตัวอย่างอื่นในกุ้งกลุ่ม OTUs (ชนิด) เดียวกัน ทั้งที่วิเคราะห์ในการวิจัยนี้ และจากฐานข้อมูล GenBank จนลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกันสูงสุด ซึ่งอาจจำเป็นต้องแทรกลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยช่องว่าง (Gap) เพื่อเพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ โดยหลักการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง OTUs ที่ดีนั้นจะต้องมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกันสูงสุดและมีจำนวนช่องว่างที่แทรกเพิ่มเติมน้อยที่สุด จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Clustal X (Thompson, Gibson, Plewniak, Jeanmougin, & Higgins, 1997)

2. วิเคราะห์ระดับความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกุ้งแต่ละชนิด โดยคำนวนค่าเฉลี่ยจำนวนเบสองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Bases Composition) ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 (Kumer, Tamura, & Nei, 2005) ค่าความหลากหลายนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Diversity: π) จำนวนรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Number of Haplotype: h) ความหลากหลายของรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Haplotype Diversity; Hd) Polymorphic sites

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และ Informative Sites ด้วยโปรแกรม DnaSP 4.0 (Rozas, Sanchez-DelBarrio, Messeguer, & Rozas, 2003)

3. ประเมินแบบจำลองการแทนที่นิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบหาแบบจำลองของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมกับข้อมูลด้วยโปรแกรม MODELTEST 3.06 (Posada & Crandall, 1998) สำหรับการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum Likelihood Method- ML และ Neighbor-Joining Method-NJ (Saitou & Nei, 1987) ได้ทั้งสิ้น 3 แบบ (ตารางที่ 3-4) ซึ่งได้แก่ แบบจำลอง General Time Reversible with a Aropostion of Invariable Sites (GTR+I) และ Hasegawa, Kishino, Yano 85 with a Propostion of Invariable Sites and with a Gamma Distribution Model (HKY+I+G) เหมาะสมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (ชุดข้อมูลกุ้งภาคตะวันออกและชุดข้อมูลกุ้งภาคตะวันออก+GenBank ตามลำดับ) และ แบบจำลอง General Time Reversible with a Propostion of Invariable Sites and with a Gamma Distribution Model (GTR+I+G) เหมาะสมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (ทั้ง 2 ชุดข้อมูล)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-4 แบบจำลองและดัชนีของแบบจำลองการแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมกับข้อมูลด้วยโปรแกรม MODELTEST 3.06 (Posada & Crandall, 1998) สำหรับการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี ML และ NJ

		16S rRNA		COI	
ชุดข้อมูล		ภาคตะวันออก	ภาคตะวันออก+GenBank	ภาคตะวันออก	ภาคตะวันออก+GenBank
แบบจำลองการแทนที่		GTR+I	HKY+G	GTR+I+G	GTR+I+G
Base Frequencies	A	0.3451	0.3838	0.2949	0.3255
	C	0.1963	0.177	0.212	0.1961
	G	0.1403	0.082	0.1511	0.1233
	T	0.3183	0.3572	0.3421	0.3551
Substitution Model					
	Ti/ TV Ratio	-	2.4013	-	-
Rate Matrix	R (a) [A-C]	2.0787	-	2.3085	1.2433
	R (b) [A-G]	4.7735	-	13.9379	21.3389
	R (c) [A-T]	3.0384	-	7.2066	7.0771
	R (d) [C-G]	0.4316	-	0.9863	3.7155
	R (e) [C-T]	10.0161	-	34.8843	43.9411
	R (f) [G-T]	1	-	1	1
Among-Site Rate Variation					
	Proportion of Invariable Sites (I)	0.6243	0	0.5628	0.5713
	Variable Sites (G)	Equal Rates for All Sites	Gamma Distribution Shape	Gamma Distribution Shape	Gamma Distribution Shape
Gamma Distribution Shape Parameter		-	0.2658	2.8106	1.6541

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การคำนวนระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ตัวอย่าง (Pairwise Genetic Distance)

คำนวนค่า Genetic Distance ระหว่างคู่ตัวอย่าง แบบ GTR+I และ GTR+I+G โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 16S rRNA และ COI ตามลำดับ โดยโปรแกรม PAUP*4.0 Beta 10 (Swofford, 2001)

5. สร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree)

เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่าง OTUs ของตัวอย่างกุ้งทะเลกลุ่ม Peneoid และ Outgroup จาก ชิ้นส่วนยีน 16S RNA และ COI บนไมโตคอนเดรีย ผู้วิจัยได้สร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดย 3 วิธี คือ (1) Maximum Parsimony (MP) (2) Neighbor - Joining (NJ) โดยใช้ ข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ OTU และ (3) Maximum Likelihood (ML) โดยใช้ข้อมูลของแต่ละยีน และ ใช้การสุ่มซ้ำ Informative Sites โดยวิธี Bootstraping เพื่อแสดงความเชื่อมั่นทางสถิติ (Robustness)

5.1 วิธี Maximum Pasimony (MP)

หารูปแบบ Phylogenic Tree ที่ดีที่สุด (มีจำนวนการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง OTUs น้อยที่สุด) และทำการสุ่มซ้ำ Informative Sites จากข้อมูลด้วยวิธี Bootstrap 1,000 ครั้ง จากนั้นสร้าง Phylogenetic Tree โดยวิธี Heuristic Search ด้วยวิธี Stepwise Addition Algorithm แบบสุ่ม (Random) จากชุดข้อมูลทั้งหมด และเลือกหารูปแบบการจัดกลุ่มที่พบใน Phylogenetic Tree 1,000 ชุด (Consensus Tree) โดยใช้หลักเกณฑ์ Majority Rule ด้วยโปรแกรม PAUP*4.0 Beta 10 (Swofford, 2001)

5.2 วิธี Neighbor-Joining (NJ)

หารูปแบบการจัดกลุ่มจากค่าความห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ OTUs โดยใช้ HKY85 Genetic Distance สำหรับยีน 16S rRNA และ GTR Genetic Distance สำหรับยีน COI และลำดับนิวคลีโอไทด์รวมของยีน 16S rRNA และ COI ทำการสุ่มซ้ำ Informative Sites ด้วยวิธี Bootstrap 1,000 ครั้ง จากนั้นสร้าง Distance Matrix 1,000 ชุด จากนั้นนำแต่ละชุดข้อมูลมาสร้าง Phylogenetic Tree และ เลือกหารูปแบบการจัดกลุ่มที่พบใน Phylogenetic Tree 1,000 ชุด (Consensus Tree) โดยใช้หลักเกณฑ์ Majority Rule ด้วยโปรแกรม PAUP*4.0 Beta 10 (Swofford, 2001)

5.3 วิธี Maximum Likelihood (ML)

สร้าง Phylogenetic Tree ภายใต้แบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสม เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่ม OUTs โดยพิจารณาความเป็นไปได้ (ค่า Likelihood ของตำแหน่งหนึ่ง ๆ จะเท่ากับผลรวมของความน่าจะเป็นที่บรรพบุรุษจะมีนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ต่าง ๆ ที่เป็นไปได้ในทุกรูปแบบภายใต้แบบจำลองการแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่กำหนด) ของ Phylogenetic Tree ภายใต้ข้อกำหนดว่า สัณฐานของ Phylogenetic Tree ใดให้ค่า Likelihood สูงสุดจะเป็น Tree ที่ดีที่สุดในการอธิบายความแตกต่างของกลุ่ม OTUs การสร้างแผนภูมิวิธีนี้ใช้การคำนวณที่ค่อนข้างซับซ้อน จึงต้องอาศัยเครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูง และ ต้องเวลาในการวิเคราะห์นาน ดังนั้นการศึกษานี้ทำการสุ่มซ้ำเพื่อแสดงความสม่ำเสมอของการจัดกลุ่มเพียง 100 ครั้ง โดยสร้าง Phylogenetic Tree วิธี Heuristic Search ด้วยวิธี Stepwise Addition Algorithm แบบสุ่ม (Random) จากชุดข้อมูลทั้งหมด และเลือกหารูปแบบการจัดกลุ่มที่พบใน Phylogenetic Tree 100 ชุด (Consensus Tree) โดยใช้หลักเกณฑ์ Majority Rule ด้วยโปรแกรม PAUP*4.0 Beta 10 (Swofford, 2001)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University