

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ค.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



รายงานฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูบางชนิดที่พบบริเวณพื้นที่
ปากปากพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะเสม็ด จังหวัดชลบุรี

โดย วันศุกร์ เสนานาญ, Ade Yamindago และ นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

๒๕๐๔๗๗๗
29 ส.ค. 2555

เริ่มบริการ
30 พ.ค. 2555

301415

ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล)

ปีงบประมาณ 2554

บทคัดย่อ

แม้ว่าการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะภายนอก (morphology) ยังมีความจำเป็นในการแยกชนิดสิ่งมีชีวิต และเป็นวิธีมาตรฐานที่นักอนุกรมวิธานใช้ทั่วโลก แต่เครื่องมือดังกล่าวก็มีข้อจำกัดในบางกรณี เนื่องจากบางลักษณะที่ใช้แยกจำแนก หรือสปีชีส์อาจไม่ได้สะท้อนถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ หรือมีความคาบเกี่ยวของลักษณะในกลุ่มอนุกรมวิธานที่ต่างกัน การศึกษานี้จึงได้ศึกษาความหลากหลายของปูน้ำเค็ม 14 สปีชีส์ จาก 6 แฟมิลี (Xanthidae, Galenidae, Eriphiidae, Oziidae, Menippidae และ Grapsidae) ที่พบบริเวณหมู่เกาะแสมสารโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16SrRNA บนไมโทคอนเดรีย และ 18SrRNA บนนิวเคลียส ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และศักยภาพของการใช้ดีเอ็นเอในการจัดจำแนกชนิด

ผลการศึกษาพบว่าสายนิวคลีโอไทด์ ยีน 16S rRNA และ 18SrRNA ที่ใช้มีขนาดเท่ากับ 515 และ 751 คู่เบสตามลำดับ แต่ดีเอ็นเอทั้งสองสายมีความแปรปรวนไม่เท่ากัน โดยยีน 16SrRNA มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่ายีน 18S rRNA โดยมีจำนวนตำแหน่งที่มีความแปรปรวน คิดเป็นร้อยละ 47.57 ของสายนิวคลีโอไทด์ (245 จาก 515 คู่เบส) ในขณะที่ ยีน 18S rRNA มีตำแหน่งที่มีความแปรปรวนเพียงร้อยละ 4.89 ของสายนิวคลีโอไทด์เท่านั้น (37 จาก 751 คู่เบส) ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จึงมีศักยภาพในการอธิบายความแตกต่างระหว่างหน่วยอนุกรมวิธาน และจัดหมวดหมู่ได้มากกว่ายีน 18SrRNA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16SrRNA สามารถจัดตัวอย่างได้ตรงตามสปีชีส์ที่แยกโดยหลักฐานได้อย่างชัดเจนในทุกสปีชีส์ และสามารถจัดกลุ่มสปีชีส์โดยวิธี Maximum Likelihood ได้ตรงตามการจัดอนุกรมวิธานระดับแฟมิลี ได้เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ (1) *Lophozoaymus pictor*, *Leptodius exaratus*, *Atergatis integerrimus*, *A. floridus*, (2) *Halimede oethodes* และ *Galene bispinosa*, (3) *Mennipe rumphii* และ *Myomenippe hardwickii*, (4) *Eriphia smithii*, (5) *Met. frontalis*, *Met. latifrons* และ *Met. oceanicus* (outgroup), (6) *Ozius guttatus* และ *Epixanthus frontalis* โดยมีค่า bootstrap สนับสนุนการจัดกลุ่มด้วยทั้งสองวิธีการ อยู่ในช่วง 74-100% อย่างไรก็ตาม การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง 5 แฟมิลีที่เคยอยู่ในแฟมิลี Xanthidae Alcock, 1938 ในระดับ ซูเปอร์แฟมิลีได้ โดยแฟมิลี Eriphiidae, Oziidae และ Menippidae อยู่ซูเปอร์แฟมิลีเดียวกัน ไม่ได้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในระดับที่มากกว่า ซูเปอร์แฟมิลีอื่น ข้อมูลในส่วนนี้จะพื้นฐานข้อมูลที่สำคัญในอนาคตในการจัดจำแนกตัวอย่างที่อาจมีสภาพที่ไม่สามารถแยกโดยหลักฐานได้ หรือในช่วงชีวิตที่อาจแยกยากโดยหลักฐาน (เช่น ระยะตัวอ่อน)

Abstract

Although morphological characters are typically useful for taxonomy, the variation in some characters may not reflect evolution relationships among taxa due to convergent evolution or the morphological-based identification may be difficult with taxa with highly variable characters. This study, therefore, analyzed genetic divergence among 14 species from 6 families collected from Samaesarn Islands using partial sequences of 16SrRNA and 18SrRNA genes. The aims are to evaluate phylogenetic relationships among taxa and the potential of these DNA fragments as a species diagnostic tool.

We analyzed 515 and 751 base pairs of 16SrDNA and 18SrDNA sequences respectively. Sequences of 16SrRNA gene appeared to be more variable than those of 18SrRNA with the variable sites accounting for 47.57 % of the total length (245/515 bp). In contrast, the 18SrDNA sequences only contained 4.89% of variable sites (37/751 base pairs). Our results suggested that 16SrDNA sequences proved to be more effective in identify 'correct' species and revealed phylogenetic relationships compared to 18SrDNA.

16SrDNA sequences correctly assigned all 14 species according to the morphology-based identification. A phylogenetic analysis based on Maximum likelihood method revealed at least 6 clades according to their families. These group included (1) *Lophozoaymus pictor*, *Leptodius exaratus*, *Atergatis integerrimus*, *A. floridus*, (2) *Halimede octhodes* and *Galene bispinosa*, (3) *Mennipe rumphii* and *Myomenippe hardwickii*, (4) *Eriphia smithii*, (5) *Met. frontalis*, *Met. latifrons* and *Met. oceanicus* (outgroup), and (6) *Ozius guttatus* and *Epixanthus frontalis* with the bootstrap supporting each node ranging from 74-100%. However, the analysis could not resolve relationships at a Superfamily level. Families Eriphiidae, Oziidae and Menippidae belong to the same Superfamily, Eriphioidea, but the phylogenetic tree showed the same level of difference between these families compares to members of other Superfamily. Our data provide important database for future species identification for parts or specimens with missing main characters or a life stage that is difficult to identify morphologically.

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อ	ก
abstract	ข
สารบัญ	ค
สารบัญภาพ	ง
สารบัญตาราง	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
กรอบแนวคิดงานวิจัย และเอกสารที่เกี่ยวข้อง	2
วิธีการศึกษา	10
ผลการศึกษา	16
วิจารณ์ผลการศึกษา	25
สรุปผลการศึกษา	35
เอกสารอ้างอิง	36

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	ส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ 6
ภาพที่ 2	ลักษณะแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ 7
ภาพที่ 3	แนวการสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยใช้วิธีทางคณิตศาสตร์ และ ประเภทของข้อมูลที่ใช้ 7
ภาพที่ 4	แผนที่พื้นที่ปลูกผักพื้นสมุทรพืชทางทะเล เกาะแสมสารและเกาะใกล้เคียง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี 10
ภาพที่ 5	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16SrRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Minimum Evolution 20
ภาพที่ 6	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Maximum likelihood 21
ภาพที่ 7	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Minimum Evolution 23
ภาพที่ 8	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Maximum likelihood 24
ภาพที่ 9	สัณฐานของปูในสกุล <i>Metopograpsus</i> ที่พบบริเวณหมู่เกาะแสมสาร (a) <i>Met. latifrons</i> , (b) <i>Met. frontalis</i> และ (c) <i>Met. oceanicus</i> 27
ภาพที่ 10	การ align ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูน้ำเค็มสกุล <i>Metopograpsus</i> 3 สปีชีส์คือ <i>Met. frontalis</i> (Mefr), <i>Met. latifrons</i> (Mela) และ <i>Met. oceanicus</i> (Meoc) 27
ภาพที่ 11	การจัดกลุ่มของสปีชีส์ และแฟมิลี โดยการวิเคราะห์ cluster analysis จากค่า Bray-Curtis similarity index 30

ภาพที่ 12	การจัดกลุ่มสปีชีส์โดยวิธี multidimensional scaling (MDS) จากค่า Bray-Curtis similarity index ที่คำนวณจาก ความคล้ายกันของสัณฐาน 21 ลักษณะ และซ้อนทับด้วย Superfamily ที่แสดงเป็นสัญลักษณ์แบบต่างๆ	30
ภาพที่ 13	การจัดกลุ่มสปีชีส์โดยวิธี multidimensional scaling (MDS) จากค่า Bray-Curtis similarity index ที่คำนวณจาก ความคล้ายกันของสัณฐาน 21 ลักษณะ และซ้อนทับด้วยการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ แบบ Maximum Likelihood	31
ภาพที่ 14	ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16SrRNA บนไมโทคอนเดรีย ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากหมู่เกาะแสมสารและ GenBank	34

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ชนิดของปูที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้	11
ตารางที่ 2	รายละเอียดของส่วนผสมฟีดอาร์ของยีน 16SrRNA และ 18SrRNA	13
ตารางที่ 3	รายละเอียดของไพรเมอร์ พร้อมรายละเอียดของอุณหภูมิที่ไพรเมอร์ เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ	13
ตารางที่ 4	ความหลากหลายทางพันธุกรรม และข้อมูลสถิติของลำดับนิวคลีโอ ไทด์บางส่วนของ ยีน 16SrRNA และ 18SrRNA ที่ใช้ในการศึกษาใน ครั้งนี้	16
ตารางที่ 5	ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน 16SrRNA ภายใน (แนวทแยง มุม) และระหว่างสปีชีส์ (แนวล่างเส้นทแยงมุม)	19
ตารางที่ 6	ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน 18SrRNA ภายใน (แนวทแยง มุม) และระหว่างสปีชีส์ (แนวล่างเส้นทแยงมุม)	22
ตารางที่ 7	ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถแยกชนิดสิ่งมีชีวิตได้	26
ตารางที่ 8	รายชื่อสปีชีส์ของปูในกลุ่มปูใบ้ ที่มีสายนิวคลีโอไทด์ของยีน 16SrDNA ที่มีในฐานข้อมูล GenBank	32

กิตติกรรมประกาศ

โครงการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้ง ปูและกั้ง ที่พบบริเวณพื้นที่ปกปักพันธุกรรม
พืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ในปีที่ 1 ได้สำเร็จลุล่วงลงไป ด้วยความร่วมมือจาก
หลายฝ่าย และการสนับสนุนของหน่วยงานต่างๆ รวมถึงนิสิตระดับปริญญาตรี และโทของภาควิชา
วาริชศาสตร์

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพ
รัตนราชสุดาฯ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และ หน่วยสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือ
ยุทธการ ที่สนับสนุนงบประมาณ และความช่วยเหลืออื่นๆ ขณะออกเก็บตัวอย่าง ภาควิชาวาริช
ศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการเก็บ
ตัวอย่าง และอนุเคราะห์สถานที่ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ขอขอบคุณ คุณขวัญเรือน ศรีนุ้ย สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ในการช่วยเก็บตัวอย่าง
และคุณสุภาพร สอนแก้ว ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ในการช่วยวิเคราะห์ตัวอย่าง
บางส่วน ขอขอบคุณนิสิตระดับปริญญาตรีของภาควิชาวาริชศาสตร์ทุกท่าน

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น และมีสภาพทางภูมิศาสตร์ที่เอื้อให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ซึ่งรวมถึงทรัพยากรทางทะเล ประเทศไทยน่าจะมีสิ่งมีชีวิตอยู่ประมาณ 124,003 ชนิด หรือร้อยละ 8.9 ของสิ่งมีชีวิตอยู่ในโลกทั้งหมด ซึ่งรวมถึงชนิดพันธุ์ที่ทราบชื่อแล้ว และที่ยังไม่พบ (วิสุทธิ ไบไม้, 2548) อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของมนุษย์กำลังคุกคามความหลากหลายทางชีวภาพดังกล่าว ซึ่งเปรียบเสมือนต้นทุนทางทรัพยากรของประเทศ ดังนั้นด้วยสายพระเนตรกว้างและยาวไกล พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ทรงเห็นถึงความสำคัญของการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช โดยทรงเริ่มดำเนินงานพัฒนาและอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ และความหลากหลายทางชีวภาพ ตั้งแต่ปี 2503 เป็นต้นมา โดยมีพระราชดำริให้ดำเนินการสำรวจรวบรวมปลูกดูแลรักษาพรรณพืชต่างๆ ที่หายากและกำลังจะหมดไป ต่อมาในปี พ.ศ. 2535 สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้ทรงประสานพระราชปณิธานต่อโดยมีพระราชดำริกับนายแก้วขวัญ วัชโรทัย เลขาธิการพระราชวัง ให้ดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศโดยพระราชทานให้โครงการสวนพระองค์ฯ สวนจิตรลดา เป็นผู้ดำเนินการจัดสร้างธนาคารพืชพรรณขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 เป็นต้นมา

สัตว์กลุ่มกิ้ง ปู และกั้งนับเป็นสัตว์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ (กรมประมง, 2544) และสำคัญต่อระบบนิเวศน์ โดยเป็นส่วนหนึ่งของห่วงโซ่อาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่มีขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกหมวดหมู่ของกิ้ง ปู และกั้งยังมีความสับสนอยู่มาก และมีการปรับเปลี่ยนการเรียกชื่ออยู่เสมอ อีกทั้งยังมีสัตว์ชนิดใหม่ๆ ที่เพิ่งจะถูกค้นพบ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการรวบรวมและเรียบเรียงให้การจัดหมวดหมู่สัตว์กลุ่มนี้ไปในทิศทางเดียวกัน แม้ว่าการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะภายนอก (morphology) ยังมีความจำเป็นในการแยกชนิดสิ่งมีชีวิต และเป็นวิธีมาตรฐานที่นักอนุกรมวิธานใช้ทั่วโลก แต่เครื่องมือดังกล่าวก็มีข้อจำกัดในบางกรณี เนื่องจากบางลักษณะที่ใช้แยกจิ้งนัส หรือสปีชีส์อาจไม่ได้สะท้อนถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเครื่องมือใหม่ๆ ในระดับดีเอ็นเอ เพื่อช่วยในการจัดจำแนกและจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสัตว์กลุ่มกิ้ง ปู และกั้งทะเล (เช่น Kim and Abele, 1990; Tudge and Cunningham, 2002; Schubart et al., 2006) นอกจากนี้ประชาคมวิทยาศาสตร์ระดับโลก ได้เล็งเห็นความจำเป็นในการพัฒนาฐานข้อมูลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตประเภทต่างๆ ที่ผ่านการทดสอบและเทียบความถูกต้อง (verify) กับตัวอย่างอ้างอิง (voucher specimen) เพื่อให้การจำแนกชนิดเป็นไปอย่างรวดเร็ว สำหรับการปฏิบัติงานที่อาจจะหาผู้เชี่ยวชาญได้ยาก เช่น การตรวจสอบชนิดพืชและสัตว์ที่นำเข้า หรือ การคัดกรองศัตรูพืช หรือ เชื้อก่อโรค (เช่น Consortium on the barcode of life; <http://www.barcoding.si.edu/>)

การศึกษานี้ใช้ตัวแทนยีนของทั้งจากไมโทคอนเดรีย (16SrRNA) และจากนิวเคลียส (18SrRNA) ในการสะท้อนรูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสัตว์กลุ่มกิ้ง ปู และกั้ง

เนื่องจากยีนแต่ละประเภทมีความโดดเด่นเฉพาะตัวที่อาจให้รูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เหมือนหรือแตกต่างกัน โดยยีนบนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ มักมีอัตราการเกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์สูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส (ประมาณ 5-10 เท่า) ไม่มีการรวมยีนหรือการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (Recombination) และมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมจากแม่สู่ลูก (Avisé, 2004) ซึ่งต่างจากยีนในนิวเคลียสที่มี recombination และ ถ่ายทอดสู่รุ่นลูกจากทั้งทางพ่อและแม่ การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมทั้งสองประเภทน่าจะสามารถสะท้อนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มอนุกรมวิธาน (taxonomic unit) ที่มีความใกล้เคียงกัน ได้แม่นยำกว่าการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมประเภทเดียว การวิเคราะห์ที่ดีที่สุดคือการใช้ข้อมูลหลายๆ ประเภทรวมถึง สันฐาน ดีเอ็นเอในนิวเคลียส และดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย

รายงานฉบับนี้จะเสนอผลการวิจัยที่แล้วเสร็จในปีที่ 1 ของการวิจัย นั่นคือ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูน้ำเค็มทั้งสิ้น 14 สปีชีส์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (ปีที่ 1)

1. พัฒนาเครื่องมือทางชีวโมเลกุลในการแยกชนิดปู ที่พบบริเวณเกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะนางเล็ด และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
2. พัฒนาฐานข้อมูลพันธุกรรมระดับชนิดของปู ที่พบบริเวณเกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะนางเล็ด และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบางกลุ่มอนุกรมวิธานของปู ที่พบบริเวณเกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะนางเล็ด และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบนไมโทคอนเดรีย และยีนในนิวเคลียส

กรอบแนวคิดงานวิจัย และเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เป็นความรู้พื้นฐานในการเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต ในอดีตนักอนุกรมวิธานมักพึ่งพาสันฐาน (ซึ่งในสัตว์กลุ่มกุ้ง ปู และกั้ง ลักษณะที่สำคัญจะรวมถึงสีลำตัว ระบายสี รูปร่าง และพื้นผิวของเปลือก) ในจัดจำแนกชนิด ซึ่งการอนุมานความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลักษณะสันฐานเพียงอย่างเดียว อาจทำให้แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้คลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง เนื่องจากลักษณะสันฐานที่ใช้ในการแยกชนิดบางอย่างอาจไม่ได้สะท้อนความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ หรืออัตราการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการ ดังนั้นจึงมีการนำเครื่องหมายพันธุกรรมมาช่วยใช้ในการจัดจำแนกและจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหน่วยอนุกรมวิธาน (เช่น จินัส หรือ สปีชีส์) ของสิ่งมีชีวิต

เครื่องหมายพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

เครื่องหมายพันธุกรรม ซึ่งหมายถึงสารพันธุกรรมที่บ่งชี้ความแตกต่างระหว่างชนิดประชากร หรือ บุคคล ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันมีหลากหลายประเภท เช่น โมเลกุลของโปรตีน ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สร้างโปรตีน (ยีน) และ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่สร้างโปรตีน ทั้งที่อยู่ในนิวเคลียส และ ออร์แกเนลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย เครื่องหมายพันธุกรรมที่เหมาะสมสำหรับการแยกครอบครัว สกฤ และสปีชีส์ ควรเป็นเครื่องหมาย ที่มีอัตราการกลายที่เหมาะสม ไม่ช้า หรือเร็วเกินไป

ข้อสำคัญในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุลนั้น คือ การเลือกยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ให้อัตราการเกิดวิวัฒนาการ (Rate of Evolution) เหมาะสมกับระดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สนใจ โดยยีนที่มีอัตราวิวัฒนาการช้า เช่น ยีน 16S rRNA และ COI บนไมโทคอนเดรีย จะเหมาะกับการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตระหว่างชนิดและระหว่างสกุล (Billington, 2003; Baldwin et al., 1998; Chu et al., 1999; Maggioni et al., 2001)

เครื่องหมาย ที่นิยมใช้ในการจัดความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้แก่ ยีน 12SrRNA (Robel et al., 2007), 16S rRNA (เช่น Baldwin et al., 1998; Lavery et al., 2004; Maggioni et al., 2001) และ COI (Consortium on the barcode of life, Hebert et al. 2004; วนิสากันหมณี, 2550) บนไมโทคอนเดรีย และ ยีน 18S rRNA ในนิวเคลียส (เช่น Kim and Abele, 1990; Tudge and Cunningham, 2002) การศึกษานี้ได้ใช้ตัวแทนยีนของทั้งจากไมโทคอนเดรีย และจากในนิวเคลียสเนื่องจาก ยีนแต่ละประเภทมีความโดดเด่นเฉพาะตัวที่อาจให้รูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เหมือนหรือแตกต่างกัน

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในสัตว์เป็นดีเอ็นเอรูปวงแหวนขนาดเล็ก (Double-Stranded Loop DNA) ขนาดประมาณ 14,000-26,000 คู่เบส ประกอบด้วยยีนที่สังเคราะห์โปรตีน 13 ยีน ยีนที่สร้าง rRNA 2 ยีน และ t rRNA 22 ยีน ตามลำดับ โดยมีอัตราการกลายพันธุ์สูงสุดในส่วนของ Control Region (D-Loop) และต่ำสุดในส่วนที่ยีนที่ควบคุมการสร้าง RNA ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีอัตราการเกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์สูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส (ประมาณ 5-10 เท่า) ไม่มีการรวมยีนหรือการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (Recombination) และมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมจากแม่สู่ลูก คุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้สารพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียสามารถเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่เหมาะสมในการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษร่วมกันได้ (Avisé, 2004; Billington, 2003; Lowe et al., 2004)

ส่วนในนิวเคลียส มีความหลากหลายของรูปแบบดีเอ็นเอให้เลือกค่อนข้างมาก โดยมีทั้งยีน และส่วนที่ไม่ใช่ยีน แต่ในการศึกษาวิวัฒนาการระดับสปีชีส์ หรือ หมาดหมูที่ใหญ่กว่านี้ มักใช้ยีน

เนื่องจาก มีระดับการกลายที่ไม่สูงจนกลบความแตกต่างระหว่างชนิด ทั้งนี้ศักยภาพของยีนแต่ละยีนในการจัดหมวดหมู่ค่อนข้างจะเฉพาะเจาะจงกับสายทางวิวัฒนาการหนึ่งๆ (lineage) และจำนวนกลุ่มอนุกรมวิธานที่อยู่ในฐานข้อมูลมีจำนวนน้อยกว่าข้อมูลยีนบนไมโทคอนเดรีย อย่างไรก็ตาม ยีนในนิวเคลียสก็มีคุณสมบัติที่น่าสนใจ กล่าวคือเป็นยีนที่สามารถเกิด recombination และการถ่ายทอดจากทั้งทางพ่อและแม่ ยีนในนิวเคลียสที่มีการใช้ในกลุ่มปู ได้แก่ ยีน 18SrRNA (Ahyong et al. 2007), Arginine Kinase (Mahon and Neigel, 2008) และ ยีน Histone3 (Schubart and Reuchel, 2010)

กลไกการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต ได้แก่การกลายพันธุ์ (Mutation) โดยแบ่งรูปแบบของการกลายพันธุ์เป็น 2 รูปแบบ คือ ระดับโครโมโซม และระดับนิวคลีโอไทด์ โดย การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม รวมถึง

1. การย้ายสลับที่ระหว่างชิ้นส่วนโครโมโซมต่างคู่ (Translocation) ส่งผลกระทบต่อหน้าที่ของยีน
2. การกลับทิศของชิ้นส่วนโครโมโซม (Inversion)
3. การมีบางส่วนของโครโมโซมขาดหายไป (Deletion) หรือเกินมา (Insertion or Duplication)
4. การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

ในขณะที่ การกลายพันธุ์ระดับยีน เป็นการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีนจาก อัลลีลหนึ่งไปเป็นอีกอัลลีลหนึ่งซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ ซึ่งได้แก่ การแทนที่คู่เบส (Nucleotide or Base Substitution) และ การสูญเสียหรือการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ (deletion and insertion) การแทนที่คู่เบส คือ การแทนที่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. การแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน (Transition) คือ การเกิดการย้ายโปรตอน หรืออิเล็กตรอนของไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของเบสเอง ทำให้เบส อะดีนีน (Adenine - A) สลับแทนที่กับ กัวนีน (Guanine - G) ในกลุ่มเบสพิวรีน (Purine) หรือ ไซโตซีน (Cytosine - C) สลับแทนที่กับ ไทมีน (Thymine - T) ในกลุ่มเบสไพริมิดีน (Pyrimidine)
2. การแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่ม (Transversion) มักเกิดในช่วงการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอ เป็นการแทนที่เบสในกลุ่มพิวรีน (A, G) ด้วยเบสกลุ่มไพริมิดีน (C, T) หรือเกิดในทางกลับกัน

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

กุ้ง และปูบางชนิดที่พบที่บางเกาะของหมู่เกาะแสมสาร ได้แก่ กุ้งตืดชั้น (ครอบครัว Caridae) ปูในครอบครัว Portunidae, Grapsidae และ Xanthidae (นางนุช ตั้งเกริกโอฬาร, ติดต่อส่วนตัว) สำหรับสัตว์กลุ่มดังกล่าวได้มีรายงานข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมอยู่บ้าง ซึ่งงานทั้งหมดเป็นงานของต่างประเทศ Mathews and Anker (2009) ได้รายงานความสัมพันธ์ของ species complex ของกุ้งตืดชั้น (snapping shrimp, ครอบครัว Alpheidae) จินัส Alpheidae บริเวณ ทะเลคาริเบียน, อ่าวเม็กซิโก, ฟลอริดา, บราซิล และทะเลแปซิฟิกฝั่งตะวันออกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ COI บนไมโทคอนเดรียและยีน myosin heavy chain ในนิวเคลียส กุ้งเหล่านี้มีความแตกต่างกันเพียงแค่สีของลำตัว และการมี/ไม่มีแถบบริเวณก้ามเท่านั้น ผู้วิจัยพบว่า ใน species complex นี้ประกอบไปด้วยอย่างน้อย 19 สปีชีส์

ตัวอย่างการศึกษาความสัมพันธ์ของปูในครอบครัว Portunidae ได้มีรายงานในประเทศจีน (เช่น Chu et al. 1999) ทวีปอเมริกา (เช่น Robels et al. 2006) และ บริเวณอ่าวเม็กซิโกและมหาสมุทรแอตแลนติกฝั่งตะวันตก (เช่น Mantelatto et al., 2007) Chu et al. (1999) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปูจินัส *Charybdis* 4 ชนิดโดยใช้ยีน COI บนไมโทคอนเดรีย ซึ่งผู้วิจัยพบการแบ่งแยกชนิดที่สอดคล้องกับสปีชีส์ โดย *C. alpinis* และ *C. japonica* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าชนิดอื่น (*C. acuta* และ *C. feriatius*) ในทวีปอเมริกา Robels et al. (2006) ใช้ 16S และ 12S rRNA ในการแยกสปีชีส์ในจินัส *Callinectes* ซึ่งประกอบไปด้วย 16 ชนิดในบริเวณที่ศึกษา (แยกโดยสปีชีส์) และพบว่ามีความสัมพันธ์ที่แท้จริงเพียง 12 ชนิดที่น่าจะเป็นสปีชีส์ที่แท้จริง

บ่อยครั้งที่การศึกษาทางพันธุกรรม ให้ผลสอดคล้องกับ การแยกชนิดโดยใช้สปีชีส์ เช่น การศึกษาของ Chu et al. (1999) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลพันธุกรรมบางชุด ก็ให้ผลไม่สอดคล้องกับลักษณะทางสปีชีส์ เช่น ความสัมพันธ์ของปูบางสปีชีส์ภายในจินัส *Callinectes* หรือ จินัส *Portunus* นอกจากนี้ยีนบนไมโทคอนเดรีย อาจให้ผลที่แตกต่างจากยีนในนิวเคลียส ดังนั้นเพื่อให้ได้ภาพความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริง จึงควรต้องใช้ข้อมูลหลายชุดไม่ว่าจะเป็นข้อมูลสปีชีส์ ยีนบนไมโทคอนเดรีย และ ยีนในนิวเคลียส

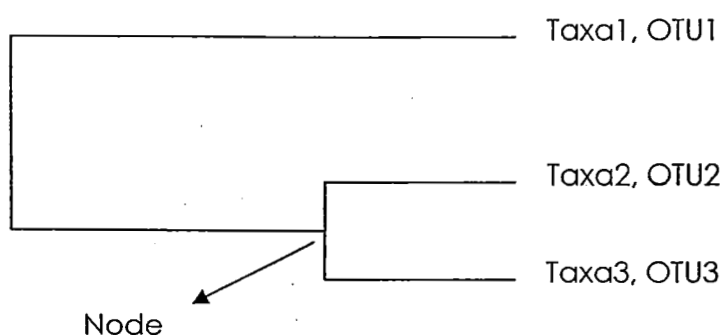
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การจัดหมวดหมู่ของกลุ่มทางอนุกรมวิธาน (operating taxon unit หรือ OUT) หรือ taxa (เช่น ครอบครัว สกุล และ สปีชีส์) ให้สอดคล้องกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มักจะ

แสดงการจัดกลุ่ม (cluster) ในลักษณะของแผนภูมิแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree, ภาพที่ 1) โดยกลุ่มอนุกรมวิธานที่อยู่ใน cluster เดียวกันจะมีความสัมพันธ์มากกว่า กลุ่มอนุกรมวิธานที่อยู่กลุ่มอื่น แผนภูมิต้นไม้จะประกอบด้วยส่วนที่เป็นปม (Nodes) โดยยอด (Tips) หรือปมภายนอก (Terminal Nodes) แสดงถึง OTUs และกิ่ง (Branches) ที่เชื่อมระหว่างปมจะแสดงถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่มีบรรพบุรุษร่วมกันระหว่าง OTUs (ภาพที่ 1) โดยรูปแบบของแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการในลักษณะนี้ว่า Topology

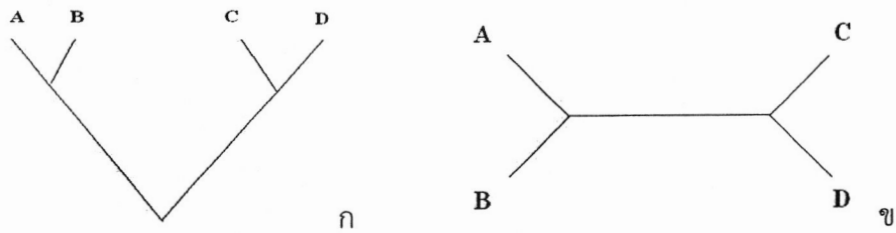
การสร้างแผนภูมิต้นไม้ จำเป็นต้องใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ที่ค่อนข้างจำเพาะ (เช่น Hillis and Moritz 1990; Lemey et al. 2009) โดยใช้ข้อมูล 2 ประเภทคือ

1. ข้อมูลที่จัดเป็นหมวดหมู่ได้ชัดเจน (discrete data) ซึ่งอาจเป็นใช้ได้ทั้งข้อมูลสัณฐาน และ ข้อมูลสารพันธุกรรม เช่น การมี/ไม่มีลักษณะหนึ่งๆ (หนามที่ก้านหนีบของปู หรือ รูปร่างคราเปส ของปูต่างชนิด) การมี/ไม่มีนิวคลีโอไทด์เบสหนึ่งๆ บนสายดีเอ็นเอ และการมีลำดับเบสที่แตกต่างกันที่ตำแหน่งเดียวกันระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ โดย OTUs ที่มีความคล้ายคลึงกันมากจะมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากกว่า OTUs อื่น
2. ดัชนีความเหมือน/แตกต่าง (distance data) โดยการแปลงชุดข้อมูล ระหว่าง คู่กลุ่มอนุกรมวิธาน เป็นตารางของค่าความห่างทางพันธุกรรม (Distance Matrix) ทั้งนี้การคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมอาจใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์ที่สะท้อนอัตราทางวิวัฒนาการของยีนหนึ่งๆ OTUs ที่มีค่าความห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุดเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากที่สุด

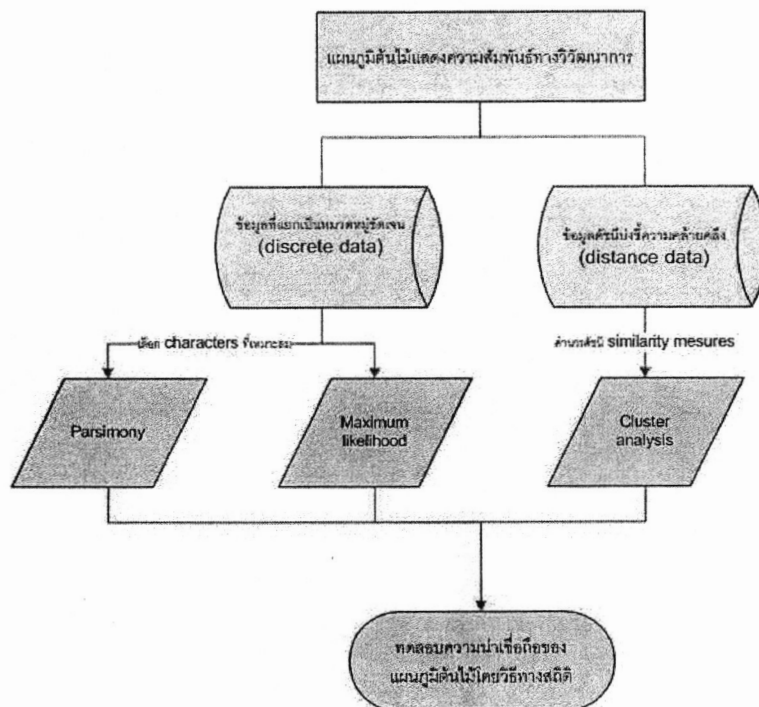


ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

Phylogenetic Tree สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ Rooted Tree (ภาพที่ 2ก.) และ Unrooted Tree (ภาพที่ 2ข.) โดยการสร้าง Phylogenetic Tree ส่วนใหญ่มักสร้างในรูป Unrooted Tree ก่อน ซึ่งจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OTUs ที่ทำการศึกษาแต่ไม่สามารถระบุตำแหน่งของการมีบรรพบุรุษร่วมได้ ส่วน Rooted Tree เป็นการตรึงราก Unrooted Tree กับ กลุ่มอนุกรมวิธานที่มีความห่างทางพันธุกรรม(Outgroup) กับ OTUs เพื่อตรึงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ศิริราช กลิ่นบุหงา, 2544; Halliburton, 2004)



ภาพที่ 2 ลักษณะแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการแบบ ก. Rooted Tree ข. แบบ Unrooted Tree



ภาพที่ 3 แนวการสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยใช้วิธีทางคณิตศาสตร์ และ ประเภทของข้อมูลที่ใช้

เมื่อพิจารณาข้อมูลแบบใดแบบหนึ่ง (สัณฐาน ดีเอ็นเอในนิวเคลียส หรือ ดีเอ็นเอบนไมโทคอนเดรีย) อาจได้แผนภูมิต้นไม้หลายรูปแบบที่อาจสอดคล้อง หรือ ขัดแย้งกับการใช้ข้อมูลอีกชุดหนึ่ง การศึกษานี้จะทดสอบสมมติฐานโดยการยอมรับ หรือ ปฏิเสธ รูปแบบแผนภูมิต้นไม้ที่สร้างจากข้อมูลชุดหนึ่งๆ (สัณฐาน หรือ พันธุกรรม) และ ข้อมูลทั้งสองชุดรวมกัน

การสร้างแผนภูมิต้นไม้ มักใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ และ สถิติ 3 แบบ (Hillis and Moritz 1990; ภาพที่ 3) คือ (1) maximum parsimony คือ การสร้างต้นไม้ที่ใช้จำนวนการเปลี่ยนแปลงของลักษณะน้อยที่สุด (2) maximum likelihood คือ การหาต้นไม้ที่มีค่าความน่าจะเป็นมากที่สุดโดยคิดจากอัตราการเปลี่ยนแปลงของลักษณะ เช่น อัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งหนึ่งๆ และ (3) การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยใช้ข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรม

1. Maximum Parsimony Method

วิธีนี้ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลที่เป็น Discrete Data โดยใช้จำนวนการเปลี่ยนแปลงของลักษณะ ซึ่งในการวิเคราะห์ความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิตนั้น ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่สามารถนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการได้ต้องเป็น Informative Site นั่นคือต้องมีเบสแตกต่างกันอย่างน้อย 2 เบส และพบเบสที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 OTUs โดยแผนภูมิต้นไม้ที่ดีที่สุดจะมีจำนวนการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุดในทุก ๆ ตำแหน่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Halliburton, 2004; Swofford and Sullivan, 2009) โดยวิธีการหา Tree แบบ Heuristic Search จะสร้าง Core Tree เริ่มต้นก่อนขึ้นด้วยวิธีที่เรียกว่า Stepwise Addition Algorithm จากนั้นจะทำการสลับตำแหน่งของกิ่งเพื่อหา Tree ที่ดีที่สุดและเพิ่มตัวอย่างเข้าไปใน Core Tree แบบสุ่มตัวอย่าง (Random) โดยพิจารณาตามหลักของ Maximum Parsimony โดยต้นไม้ที่ดีที่สุด คือการจัดกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการที่น้อยที่สุด

2. Maximum Likelihood Method

วิธีนี้ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตจากการคำนวณค่าความน่าจะเป็นของอัตราการเปลี่ยนแปลงของลักษณะ (เช่น การแทนที่นิวคลีโอไทด์) เพื่อหาแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่มีค่าความน่าจะเป็นสูงสุด ซึ่งส่วนใหญ่มักใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ คำนวณค่าความน่าจะเป็นของ Phylogenetic Tree จากผลรวมของค่าความน่าจะเป็นของการแทนที่นิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งนั้น (Lowe et al., 2004) โดยอัตราการเกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์ต่างรูปแบบ (Transition/ Transversion) จะมีค่าเท่ากันหรือแตกต่างกันอยู่กับแบบจำลองการ

แทนที่นิวคลีโอไทด์ (Model of Nucleotide Substitution) เช่น Jukes-Cartor One Parameter และ Kimura's Two Parameter เป็นต้น (Halliburton, 2004; Lowe et al., 2004)

3. Distance Method

วิธีนี้ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการจับหมวดหมู่ OTUs ตามระยะทางทางพันธุกรรม (Genetic Distance) โดยคู่ OTUs ที่มีค่าความห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุดจะมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากที่สุดและจะถูกจัดเป็น OTUs ใหม่ 1 OTUs เพื่อนำมาคำนวณค่าความห่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ OTUs ในรูป Distance Matrix ใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนครบทุก OTUs จะได้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่าง OTUs ที่ทำการศึกษาทั้งหมด โดยมีกนนิยมใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) ในการสร้าง Phylogenetic Tree (Halliburton, 2004)

การประเมินค่าความเชื่อมั่นในการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้น นิยมวิธี Bootstrapping ซึ่งเป็นการสุ่มจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เดิม โดยเป็นการสุ่มและแทนที่นิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งในชุดข้อมูลเดิมจนได้เป็นชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่ เพื่อนำไปสร้าง Phylogenetic Tree ใหม่ด้วยวิธีการสร้างแผนภูมิเดิม ขบวนการนี้จะทำซ้ำหลายครั้งจนได้แผนภูมิต้นไม้หลากหลาย Topology ซึ่งท้ายที่สุดจะได้แผนภูมิต้นไม้ที่แสดงค่าความเชื่อมั่นในรูปร้อยละของรูปแบบแผนภูมิที่สร้างขึ้นใหม่ ซึ่งจะสัมพันธ์กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เดิม โดยกิ่งที่มีค่าความเชื่อมั่น 100% น่าจะแสดงแม่นยำของการจัดกลุ่ม (Felsenstein, 1985)

การเลือกรูปแบบการจัดกลุ่มที่พบใน Phylogenetic Tree เป็นผลสรุปจาก Tree ทั้งหมด ซึ่งอาจเกิดจากการทดสอบ Bootstrapping หรือเป็นผลมาจากการสร้าง Tree จากวิธีต่าง ๆ เช่น Maximum Parsimony แล้วได้ Tree จำนวนหนึ่งที่มีสัณฐานของ Phylogenetic Tree แตกต่างกัน แต่มีจำนวนการกลายพันธุ์เท่ากันและเป็นการกลายพันธุ์ที่น้อยที่สุดเช่นกัน วิธีการสร้าง 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

วิธีการศึกษา

การรวบรวมตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างปูน้ำเค็มจำนวนทั้งสิ้น 14 สปีชีส์จากครอบครัว Galenidae, Xanthidae, Eriphiidae, Oziidae, Menippidae และ Grapsidae (ซึ่งเป็นกลุ่มปูใบ้ และปูแสม) (ตารางที่ 1) จากบริเวณเกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะนางเก้อ และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (ภาพที่ 4) โดยจะใช้ตัวอย่างที่จัดจำแนกชนิดด้วยสัณฐาน จากโครงการย่อย ความหลากหลายทางชีวภาพของกุ้ง ปู และ กั้ง บริเวณเกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะนางเก้อ และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี และใช้จำนวนตัวอย่าง 1-5 ตัวอย่างต่อสปีชีส์ เก็บรักษาตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95%



ภาพที่ 4 แผนที่พื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืชทางทะเล เกาะแสมสารและเกาะใกล้เคียง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (จากแผนการวิจัย ทรัพยากรชีวภาพทางทะเลในพื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี : องค์ความรู้พื้นฐานสู่วิถีไทยและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน)

ตารางที่ 1 ชนิดของปูที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ โดยใช้ระบบทางอนุกรมวิธานระดับแฟมิลี และสปีชีส์ของ Ng et al. 2008

	Family (Ng et al. 2008), Superfamily (Ng et al. 2008)	Species (สัญลักษณ์)	จำนวนตัวอย่าง 16SrRNA, 18SrRNA
	Ingroup		
1.	Galenidae Alcock, 1898; Galenoidae Samouelle, 1819	<i>Halimede oethodes</i> (Haoc)	3, 1
2.		<i>Galene bispinosa</i> (Gabi)	3, 1
3.	Xanthidae MacLeay, 1838; Xanthoidea MacLeay, 1838	<i>Leptodius exaratus</i> (Leex)	3, 1
4.		<i>Atergatis integerrimus</i> (Atin)	4, 3
5.		<i>Atergatis floridus</i> (Atfl)	4, 3
6.		<i>Lophozozymus pictor</i> (Lopi)	3, 1
7.	Eriphiidae* MacLeay, 1838; Eriphioidea MacLeay, 1838	<i>Eriphia smithii</i> (Ersn)	6, 8
8.	Oziidae* Dana, 1851; Eriphioidea MacLeay, 1838	<i>Ozius guttatus</i> (Ozgu)	4, 3
9.		<i>Epixanthus frontalis</i> (Epfr)	4, 3
10.	Menippidae* Ortmann, 1893; Eriphioidea MacLeay, 1838	<i>Myomenippe hardwickii</i> (Myha)	1, 0
11.		<i>Menippe rumphii</i> (Meru)	2, 1
	Outgroups		
1.	Grapsidae** MacLeay, 1838; Grapsoidea MacLeay, 1838	<i>Metopograpsus frontalis</i> (Mefr)	3, 3
2.		<i>Metapograpsus oceanicus</i> (Meoc)	1, 0
3.		<i>Metopograpsus latifrons</i> (Mela)	1, 1

หมายเหตุ * เป็นสมาชิก superfamily เดียวกันคือ Eriphioidea MacLeay, 1838 และ ** เป็นสมาชิกของ superfamily ที่มีสัณฐานแตกต่างจากปูชนิดที่ 1-11

การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการจะประกอบไปด้วย (1) การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อของตัวอย่างปู (2) การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) (3) การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ซึ่งจะแยกดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน โดยใช้กระแสไฟฟ้า และตรวจการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide (4) การทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์เพื่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% ด้วยวิธีการสกัดมาตรฐาน (Aljanabi and Martinez 1997) หรือใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan R.O.C) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดแล้วด้วยสารละลาย TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 8.0) จนกว่าจะมีการวิเคราะห์ขั้นถัดไป

เพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรีย และยีน 18S rRNA ในนิวเคลียสโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ปฏิกิริยาลูกโซ่; PCR; ตารางที่ 2) ใน 1 ปฏิกิริยา (30 µl) จะใช้ส่วนผสมดังนี้ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ ประมาณ 10-100 ng บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า (เจือจางจากสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า) นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTPs) ความเข้มข้นทั้ง 4 เบส 0.24-0.1 mM แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 1.5 mM ไพรมเมอร์แต่ละสาย ที่ความเข้มข้น 0.2 µmol และ Taq DNA polymerase 2 unit

การเพิ่มดีเอ็นเอในสารละลายปฏิกิริยาจะผ่านการเพิ่มลดอุณหภูมิในเครื่อง thermocycler (Gene Amp System 9700, Applied Biosystems, USA) โดยวัฏจักรการเพิ่มลดอุณหภูมิประกอบไปด้วย 3 ชุด คือ (1) วัฏจักร 1 รอบของการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็น 2 เส้น (denaturing temperature, 94°C) เป็นเวลา 3 นาที (2) วัฏจักร 40 รอบของ denaturing temperature นาน 1 นาที การลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรมเมอร์เกาะกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature, 48 และ 49 °C, ตารางที่ 3) เป็นเวลา 1 นาที และการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เอนไซม์ DNA polymerase ข้อมสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ให้สมบูรณ์ (extension temperature, 72 °C) เป็นเวลา 1.5 นาที และ (3) วัฏจักร 1 รอบ ของ extension temperature นาน 10 นาที (ดัดแปลงจาก Fratini et al. 2005; Giribet et al. 1996)

ตารางที่ 2. รายละเอียดของส่วนผสมปฏิกิริยาของยีน 16SrRNA และ 18SrRNA ในปฏิกิริยา 30 µl

Composition	16S rRNA (Fratini et al., 2005)	18S rRNA (Giribet et al., 1996)
10X PCR buffer	3 µl	3 µl
dNTPs (10 µM)	0.24 mM	0.1 mM
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 mM	1.5 mM
Forward Primer (10 µM)	0.5 µM	0.42 µM
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µM	0.42 µM
Distilled water		
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.5 U	0.5 U
DNA template	10-20 ng	10-20 ng
Total	30 µl	30µl

ตารางที่ 3 รายละเอียดของไพรเมอร์ พร้อมรายละเอียดของอุณหภูมิที่ไพรเมอร์ เกาะกับดีเอ็นเอ
ต้นแบบ (annealing temperature) ที่ทดสอบในการศึกษาในครั้งนี้

Gene	Primer Sequences	Size (bp)	Annealing temp	Reference
16SrRNA	F : 5'-AGA TAG AAA CCA ACC TGG-3' R : 5'-TGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'	~600 bp	48°C	Fratini et al., 2005
18SrRNA	5F : 5'-GCG AAA GCA TTT GCC AAG AA-3' 9R : 5'-GAT CCT TCC GCA GGT TCA CCT AC-3'	~800 bp	49°C	Giribet et al., 1996

ประเภทของเครื่องหมายพันธุกรรม

การศึกษานี้วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเครื่องหมายพันธุกรรม 2 ประเภท คือ ยีนบนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ 1 ยีนคือ ยีน 16S rRNA และยีนที่อยู่ในนิวเคลียส 1 ยีน คือยีน 18S rRNA เนื่องจากยีนเหล่านี้มีระดับของการกลายพันธุ์เหมาะสมสำหรับการแยกจีโนส และสปีชีส์ สำหรับสัตว์กลุ่มปูน้ำเค็ม

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยชุดทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ สำเร็จรูป (HiYield Gel/PCR DNA Fragment extraction kit, RBC Bioscience) เพื่อกำจัดนิวคลีโอไทด์อิสระ และชิ้นไพรเมอร์ส่วนเกิน ตรวจสอบความเข้มข้น และปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ที่ทำความสะอาดแล้ว ด้วย agarose gel (Winfrey et al. 1994) ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ สารดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จะเรืองแสง ภายใต้แสง UV เทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 คู่เบส (M23 100 bp) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI 3100 (บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวใช้ระบบวิเคราะห์ห่ออิเล็กทรอนิกส์อัตโนมัติ (automated sequencer) ซึ่งอาศัยหลักการตรวจสอบคลื่นแสงที่ปลดปล่อยจากฉลากเรืองแสงบนเครื่องหมายพันธุกรรม เมื่อกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ ข้อมูลจะเป็น electropherogram ที่แสดง peak ของเบสหนึ่งๆ

การวิเคราะห์ข้อมูล

จัดและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ความสอดคล้องกันระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ และ ความชัดเจนของ peak) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Sequence Scanner v. 1 (Applied Biosystems, USA) จากนั้นจัดเรียง (align) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แก้ไขแล้วของตัวอย่าง โดยใช้ algorithm ClustalW ที่มีอยู่ในซอฟต์แวร์ BioEdit version 7.05.3 (Hall, 1999) หลักการของการ align คือ การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อยสองเส้นให้มีจำนวนนิวคลีโอไทด์เหมือนกันมากที่สุด และมีจำนวนช่องว่างที่เพิ่ม (gap) น้อยที่สุด การ align จะบ่งบอกตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์ระหว่างสาย นิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายนิวคลีโอไทด์ ของปู ชนิดต่างๆ โดยใช้ข้อมูลดังต่อไปนี้ คือ (1) ค่าเฉลี่ยจำนวนเบสองค์ประกอบของแต่ละเบส (Bases Composition) (2) จำนวนตำแหน่งที่มีความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ (Variable sites) และที่สามารถนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Parsimony informative sites) (3) ความแตกต่างทางวิวัฒนาการระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ 7 สาย ที่แสดงเป็นจำนวนการแทนที่เบสต่อตำแหน่ง (ได้แนวเส้นทะแยงมุม) และค่า standard error (เหนือแนวเส้นทะแยงมุม) โดยใช้ Maximum Composite Likelihood model (Tamura et al., 2011) ค่าดัชนีเหล่านี้สามารถคำนวณได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA version 5.0 (Tamura et al., 2011)

ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้แผนภูมิต้นไม้ ที่สร้างจากข้อมูลพื้นฐาน และ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีนบนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ และยีนในนิวเคลียส) โดยวิธีต่อไปนี้ คือ (1) Minimum Evolution (Rzhetsky and Nei, 1992) ซึ่งใช้การสร้างเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งในแต่ละหน่วยอนุกรมวิธาน แผนภูมิที่ดีที่สุดจะเป็นแผนภูมิฯ ที่มีค่ารวมของความยาวแขน (branch length) ระหว่างสายนิวคลีโอไทด์บนแผนภูมิ น้อยที่สุด และ (2) Maximum likelihood ซึ่งมีการทดสอบหาอัตราการแทนที่นิวคลีโอไทด์ ที่เหมาะกับสายนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยโมเดลที่อธิบายอัตราการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่าง ที่ดีที่สุด คือโมเดลที่ให้ค่า BIC (Bayesian Information Criterion) ต่ำที่สุด แผนภูมิที่ดีที่สุดสำหรับการจัดกลุ่มโดยวิธีนี้ คือแผนภูมิที่มีค่า likelihood สูงสุด ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มของหน่วยอนุกรมวิธาน ได้จากการสุ่มข้อมูล Parsimony information sites แบบ bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง (ได้ 1000 แผนภูมิฯ) จากนั้นนำเสนอการแผนภูมิฯ ที่จัดกลุ่มโดยรวม (Consensus Tree) แบบ Majority Rule (จะนำเสนอตัวเลขสนับสนุนการจัดกลุ่มเฉพาะที่ปรากฏในแผนภูมิมากกว่า 50%) วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Mega version 5.0 (Tamura et al., 2011)

ผลการศึกษา

ความแปรปรวนของของลำดับนิวคลีโอไทด์

สายนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ (หลังจากการจัดเรียงนิวคลีโอไทด์) ในการศึกษาครั้งนี้ มีความยาวทั้งสิ้น 515 และ 757 คู่เบส สำหรับบางส่วนของยีน 16S rRNA และ 18S rRNA ตามลำดับ (ตารางที่ 4) โดยสายนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA มีองค์ประกอบของเบส T, C, A และ G ของทุกสายนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ (41 สาย) เฉลี่ยเท่ากับ 35.2 %, 19.3 %, 34.5% และ 10.9% ตามลำดับ และยีน 18S rRNA มีองค์ประกอบของเบส T, C, A และ G ของทุกสายนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ (37 สาย) เฉลี่ยเท่ากับ 22.2%, 28.7%, 23.6% และ 25.5% ตามลำดับ ซึ่งองค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ของสายนิวคลีโอไทด์ของปูทุกชนิดที่มีข้อมูล มีค่าใกล้เคียงกัน (ข้อมูลไม่ได้แสดง) โมเดลทางวิวัฒนาการ (การกลายที่ตำแหน่งต่างๆ) ที่อธิบายความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ดีที่สุดโดยการวิเคราะห์ตามแนวทาง Bayesian สำหรับยีน 16S rRNA และ 18S rRNA คือ Hasegawa-Kishino-Yano ที่มีอัตราของการวิวัฒนาการที่แตกต่างกันระหว่างตำแหน่งที่อธิบายโดย Gamma distribution (HKY+G) และ Jukes-Cantor ที่มีอัตราของการวิวัฒนาการที่แตกต่างกันระหว่างตำแหน่งที่อธิบายโดย Gamma distribution (JC+G) ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ความหลากหลายทางพันธุกรรม และข้อมูลสถิติของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ ยีน 16SrRNA และ 18SrRNA ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

	16SrRNA gene	18SrRNA gene
Total number of nucleotides (bp)	515	757
Gaps	44	6
Number of sequence	41	37
Number of taxa	14	13
Number of Haplotype	30	11
Variable sites	245 (47.57%)	37 (4.89%)
Parsimony informative sites	230 (44.66%)	30 (3.96%)
Mean T content	35.2	22.2
Mean C content	19.3	28.7
Mean A content	34.5	23.6
Mean G content	10.9	23.6
Best model	HKY+G	JC+G

ระดับความคล้ายคลึงของสายนิวคลีโอไทด์ภายในและระหว่างชนิด

ยีน 16S rRNA

เมื่อเปรียบเทียบสายนิวคลีโอไทด์ของปูทะเลที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสารจำนวนทั้งสิ้น 14 ชนิด (41 สาย) พบว่ามีตำแหน่งที่มีความแปรปรวนทั้งสิ้น 245 จาก 515 คู่เบส คิดเป็นร้อยละ 47.57 และมีตำแหน่งที่เป็นประโยชน์ต่อการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (parsimony informative sites) จำนวนทั้งสิ้น 230 จาก 515 คู่เบส คิดเป็นร้อยละ 44.66 (ตารางที่ 3) ความแตกต่างของสายนิวคลีโอไทด์ของปูชนิดเดียวกันมีค่าตั้งแต่ 0.000 (*Metapograpsus frontalis*) ถึง 0.007 (*Ozius guttatus*) (ตารางที่ 4) ส่วนความต่างระหว่างชนิดปูมีค่าตั้งแต่ 0.059 (*Met. frontalis* และ *Met. latifrons*) ถึง 0.694 (*Met. frontalis* กับ *Lophozozymus pictor*) นอกจากนี้ยีนนี้สามารถจัดกลุ่มสปีชีส์ได้ตรงตามสปีชีส์ที่แยกโดยลักษณะสัณฐาน

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ประเมินจากทั้งสองวิธี คือ Minimum evolution (ภาพที่ 5) และ Maximum likelihood (ภาพที่ 6) ให้คำตอบที่เหมือนกันคือ ยีนตำแหน่งนี้สามารถจัดหมวดหมู่ปูในระดับสปีชีส์ได้ตรงตามลักษณะสัณฐาน โดยจัดกลุ่มปูสปีชีส์เดียวกันอยู่กลุ่มเดียวกัน และสามารถแบ่งหมวดหมู่ในระดับกลุ่ม (clades) ได้คล้ายกัน คือ 6-7 กลุ่ม ได้แก่ (1) *Lophozozymus pictor*, *Leptodius exaratus*, *Atergatis integerrimus*, *A. floridus*, (2) *Halimede oethodes* และ *Galene bispinosa*, (3) *Mennipe rumphii* และ *Myomenippe hardwickii*, (4) *Eriphia smithii*, (5) *Met. frontalis*, *Met. latifrons* และ *Met. oceanicus* (outgroup), (6) *Ozius guttatus* และ *Epixanthus frontalis* ซึ่งในกลุ่มสุดท้ายนี้แบ่งเป็นสองกลุ่มย่อยตามสกุล เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Minimum evolution ค่า bootstrap สนับสนุนการจัดกลุ่มด้วยทั้งสองวิธีการ อยู่ในช่วง 54-100%

วิธีการวิเคราะห์ทั้งสองแบบสามารถจัดปูที่อยู่ในสกุล *Metopograpsus* (Family Grapsidae) แยกออกจากปูอีก 5 ครอบครัว ซึ่งเคยอยู่ใน Family Xanthidae ตามการจัดหมวดหมู่ของ Sakai (1979) โดยภายใน Family Grapsidae ปูแสม *Met. frontalis* มีความคล้ายกันทางพันธุกรรมกับกับ *Met. latifrons* มากกว่า *Met. oceanicus* นอกจากนี้ การจัดกลุ่มแบบ Maximum likelihood โดยใช้ข้อมูลของยีน 16SrRNA ยังตรงกับการจัดหมวดหมู่โดยสัณฐานในระดับแฟมิลียที่อธิบายโดย Ng et al. (2008) (ภาพที่ 6) ที่ได้ทบทวนการจัดกลุ่ม Family Xanthidae ที่เสนอไว้ใน Sakai (1979) ใหม่โดยเสนอให้เพิ่มระดับ Superfamily เป็น 8 กลุ่ม และสร้าง/ปรับแฟมิลียให้มีถึง 16 กลุ่ม (ตัวอย่างจากแสมสารเป็นตัวแทนของ 5 แฟมิลียในการจัดหมวดหมู่ตาม Ng et al. (2008) คือ Galenidae, Xanthidae, Eriphiidae, Oziidae, และ Menippidae) อย่างไรก็ตาม แผนภูมิฯ ยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง 5 แฟมิลีย เหล่านี้ได้ Ng et al. (2008)

ได้จัดให้แฟมิลี Eriphiidae, Oziidae และ Menippidae อยู่ Superfamily เดียวกัน แต่แผนภูมิฯ ให้น้ำหนักความแตกต่างทางพันธุกรรมของแฟมิลีเท่ากัน

แม้ว่าการจัดกลุ่มโดยวิธี Minimum Evolution จะให้ผลส่วนใหญ่คล้ายกับ การจัดกลุ่มแบบ Maximum likelihood แต่การจัดกลุ่มแบบ Minimum Evolution ยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง *Ozius guttatus* และ *Expanthus frontalis* ซึ่งเป็นสกุลที่อยู่ใน Family Oziidae เหมือนกันได้

ยีน 18S rRNA

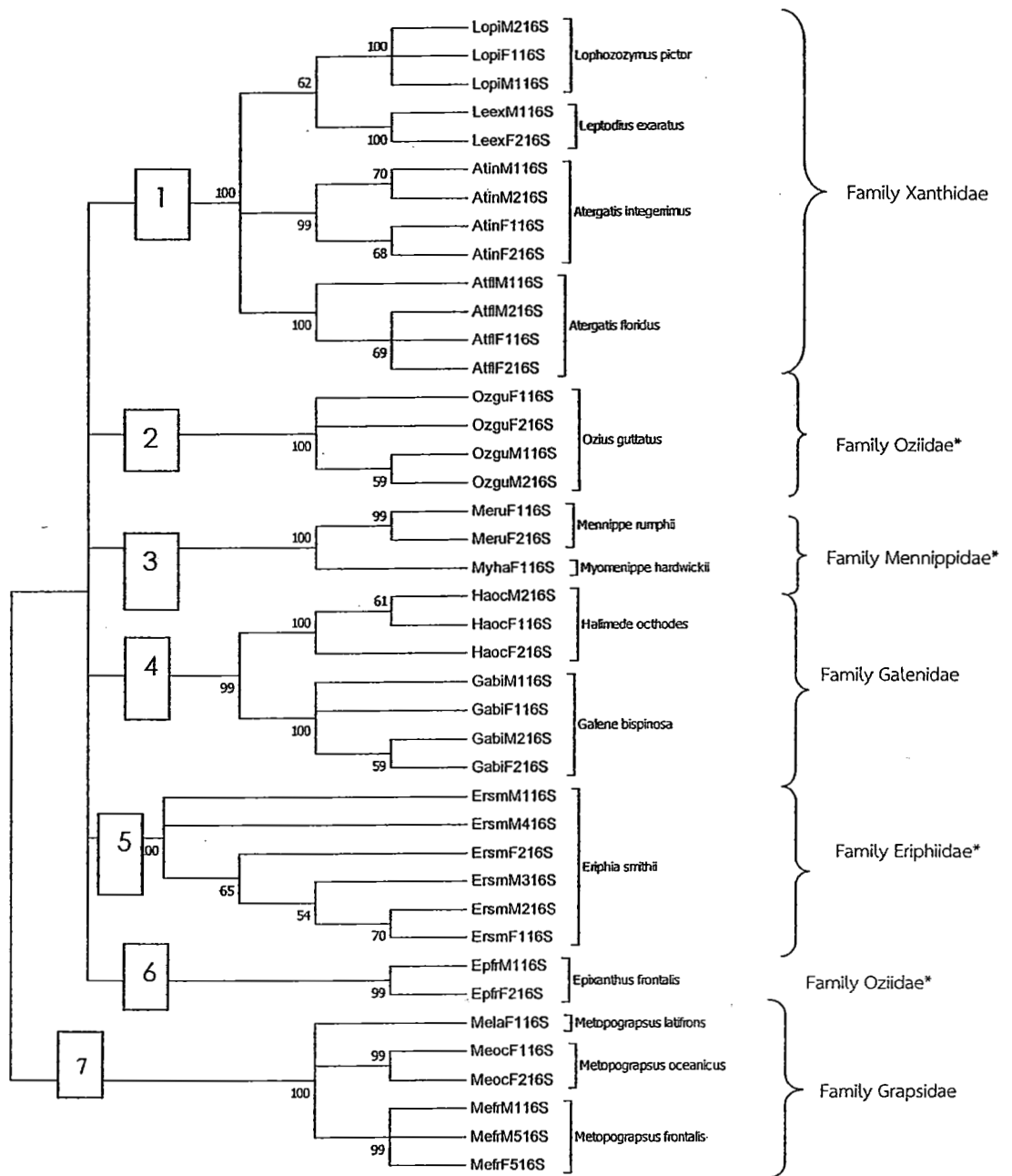
เมื่อเปรียบเทียบสายนิวคลีโอไทด์ของปูทะเลที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสารจำนวนทั้งสิ้น 13 ชนิด (37 สาย) พบว่ามีตำแหน่งที่มีความแปรปรวนทั้งสิ้น 37 จาก 757 คู่เบส คิดเป็นร้อยละ 4.89 และมีตำแหน่งที่เป็นประโยชน์ต่อการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (parsimony informative sites) จำนวนทั้งสิ้น 30 จาก 757 คู่เบส คิดเป็นร้อยละ 3.96 (ตารางที่ 3) ความแตกต่างของสายนิวคลีโอไทด์ของปูชนิดเดียวกันมีค่าตั้งแต่ 0 (ปูเกือบทุกชนิด ยกเว้น *O. guttatus* และ *Met. oceanicus*) ถึง 0.002 (*Met. oceanicus*) (ตารางที่ 6) ส่วนความต่างระหว่างชนิดปูมีค่าตั้งแต่ 0 (3 คู่ได้แก่ *Atergatis integerrimus* และ *A. floridus*; *Halimede oethodes* กับ *Leptodius exaratus* และ *Met. latifrons* กับ *Met. frontalis*) ถึง 0.032 (*Met. oceanicus* กับ *H. oethodes*, *G. bispinosa* และ *Le. exaratus*)

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ประเมินจากทั้งสองวิธี คือ Minimum evolution (ภาพที่ 7) และ Maximum likelihood (ภาพที่ 8) ให้คำตอบที่คล้ายกันคือ ยีนตำแหน่งนี้ยังไม่สามารถจัดหมวดหมู่ปูในระดับสปีชีส์ได้ตรงตามลักษณะสัณฐานได้ เช่น ในกลุ่มจิ้งส *Aetergatis*, *Metopograpsus* และระหว่าง *O. guttatus* และ *Ep. frontalis* ทั้งสองวิธีสามารถจัดกลุ่มได้คล้ายกัน คือ 5 กลุ่ม ได้แก่ (1) *Lo. pictor*, *A. integerrimus*, *A. floridus*, และ *E. smithii* (ค่า bootstrap = 86-89%) (2) *Men. rumphii*

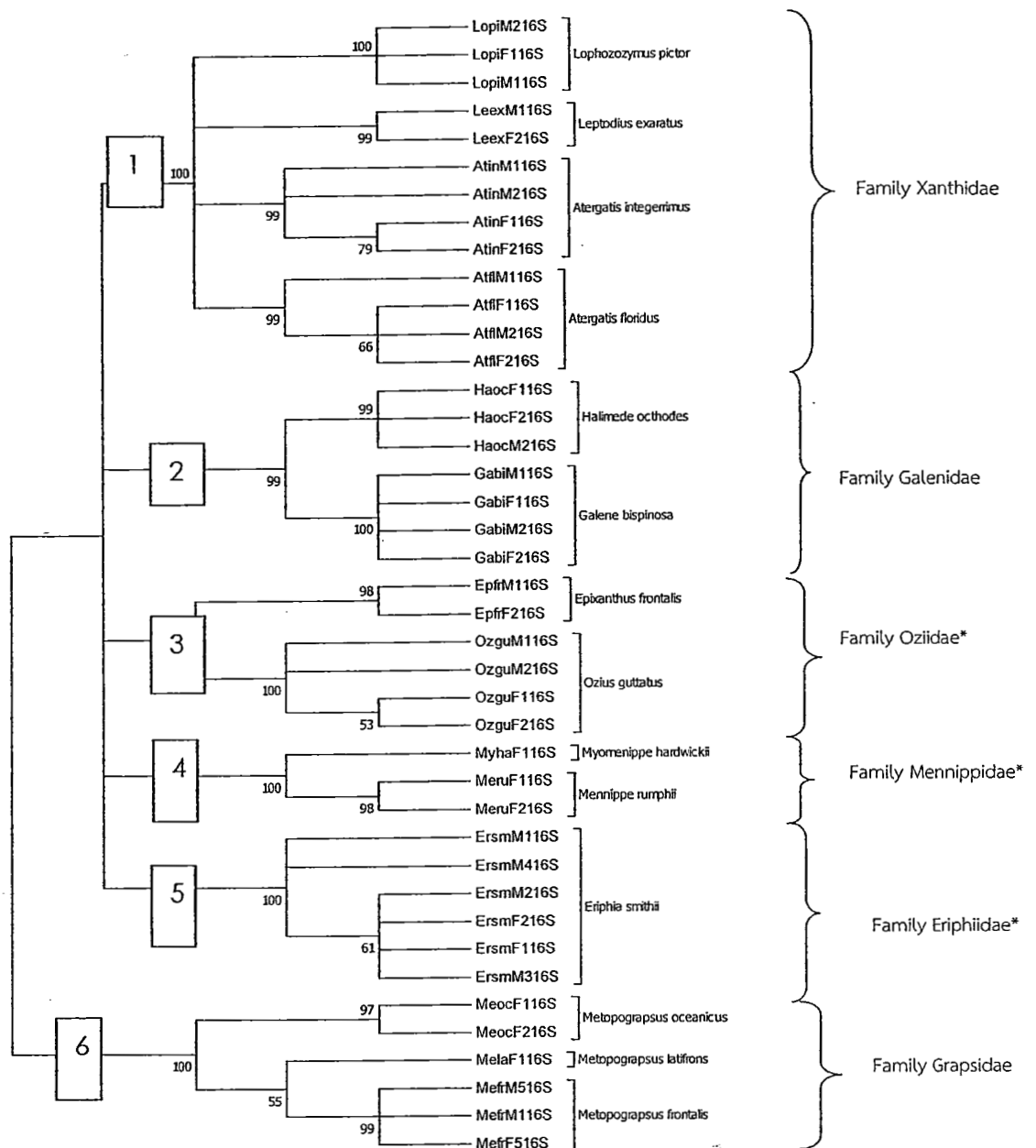
(3) *Ozius guttatus* และ *Epixanthus frontalis* (ค่า bootstrap = 76-90%) (4) *Met. frontalis*, *Met. latifrons* และ *Met. oceanicus* (ค่า bootstrap = 100%) (5) *Halimede oethodes*, *Le. exaratus* และ *Galene bispinosa* (ค่า bootstrap = 100%) อย่างไรก็ตามวิธี Maximum likelihood จัดให้กลุ่ม 1, 2 และ 4 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากกว่า กลุ่มอื่น (ค่า bootstrap = 50%) จะเห็นได้ว่า ยีน 18S rRNA ยังไม่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างปูที่ใช้เป็นกลุ่ม outgroup (Family Grapsidae) กับ ingroup ได้

ตารางที่ 5 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายใน (แนวทแยงมุม) และระหว่างสปีชีส์ (แนวเส้นทแยงมุม) โดยคำนวณจากจำนวนการแทนที่นิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง
 เฉลี่ยระหว่างทุกคู่สายนิวคลีโอไทด์ (41 สาย ที่ความยาว 471 นิวคลีโอไทด์) ด้วยโมเดล Maximum composite likelihood ที่รวมความแปรปรวนของอัตราการ
 เปลี่ยนทางวิวัฒนาการระหว่างตำแหน่ง (G) ส่วนค่า Standard error แสดงเหนือเส้นทแยงมุม N/C คือไม่สามารถคำนวณค่าได้เนื่องจากมีจำนวนสายนิวคลีโอไทด์
 เพียงสายเดียวในกลุ่ม

<i>Halimede oethodes</i>	0.003	0.043	0.105	0.104	0.101	0.142	0.099	0.091	0.072	0.079	0.087	0.170	0.167	0.161
<i>Galene bispinosa</i>	0.164	0.002	0.129	0.124	0.113	0.162	0.100	0.102	0.081	0.109	0.101	0.170	0.165	0.167
<i>Leptodius exaratus</i>	0.395	0.463	0.002	0.035	0.030	0.039	0.100	0.087	0.083	0.111	0.098	0.185	0.177	0.183
<i>Atergatis floridus</i>	0.391	0.449	0.132	0.001	0.023	0.045	0.090	0.080	0.085	0.110	0.093	0.180	0.171	0.183
<i>Atergatis integerrimus</i>	0.381	0.415	0.112	0.088	0.001	0.040	0.090	0.084	0.084	0.119	0.100	0.175	0.166	0.178
<i>Lophozozymus pictor</i>	0.514	0.581	0.156	0.172	0.153	0.001	0.113	0.098	0.106	0.149	0.125	0.200	0.192	0.199
<i>Eriphia smithii</i>	0.375	0.369	0.373	0.336	0.341	0.415	0.005	0.070	0.061	0.076	0.073	0.147	0.142	0.139
<i>Ozius guttatus</i>	0.348	0.382	0.328	0.301	0.316	0.364	0.276	0.007	0.042	0.078	0.092	0.143	0.148	0.151
<i>Epixanthus frontalis</i>	0.269	0.301	0.312	0.317	0.312	0.395	0.234	0.158	0.002	0.071	0.073	0.123	0.112	0.121
<i>Myomenippe hardwickii</i>	0.297	0.397	0.411	0.407	0.436	0.544	0.287	0.295	0.270	N/C	0.026	0.184	0.189	0.179
<i>Mennippe rumphii</i>	0.330	0.372	0.364	0.343	0.371	0.459	0.278	0.346	0.280	0.094	0.006	0.166	0.163	0.160
<i>Metopograpsus frontalis</i>	0.599	0.592	0.654	0.627	0.606	0.694	0.532	0.513	0.449	0.644	0.588	0.000	0.017	0.018
<i>Metopograpsus latifrons</i>	0.594	0.580	0.631	0.600	0.587	0.669	0.510	0.539	0.410	0.661	0.575	0.059	N/C	0.018
<i>Metopograpsus oceanicus</i>	0.569	0.586	0.649	0.640	0.616	0.691	0.506	0.544	0.445	0.626	0.566	0.064	0.065	0.002



ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16SrRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Minimum Evolution เปอร์เซ็นสนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง สัดส่วนของความยาวแขนที่จัดกลุ่มอนุกรมวิธานบนแผนภูมิฯ คือค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณโดยวิธี Maximum Composite Likelihood ซึ่งมีหน่วยเป็นจำนวนการแทนที่เบสต่อตำแหน่ง สร้างแผนภูมิเริ่มต้นโดยวิธี Neighbor-Joining การหาแผนภูมิฯ ใช้วิธี Close-Neighbor-Interchange (CNI) algorithm ใช้ข้อมูลจาก codon ทุกตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 1st, 2nd, 3rd และ Noncoding) จำนวนทั้งสิ้น 477 ตำแหน่ง

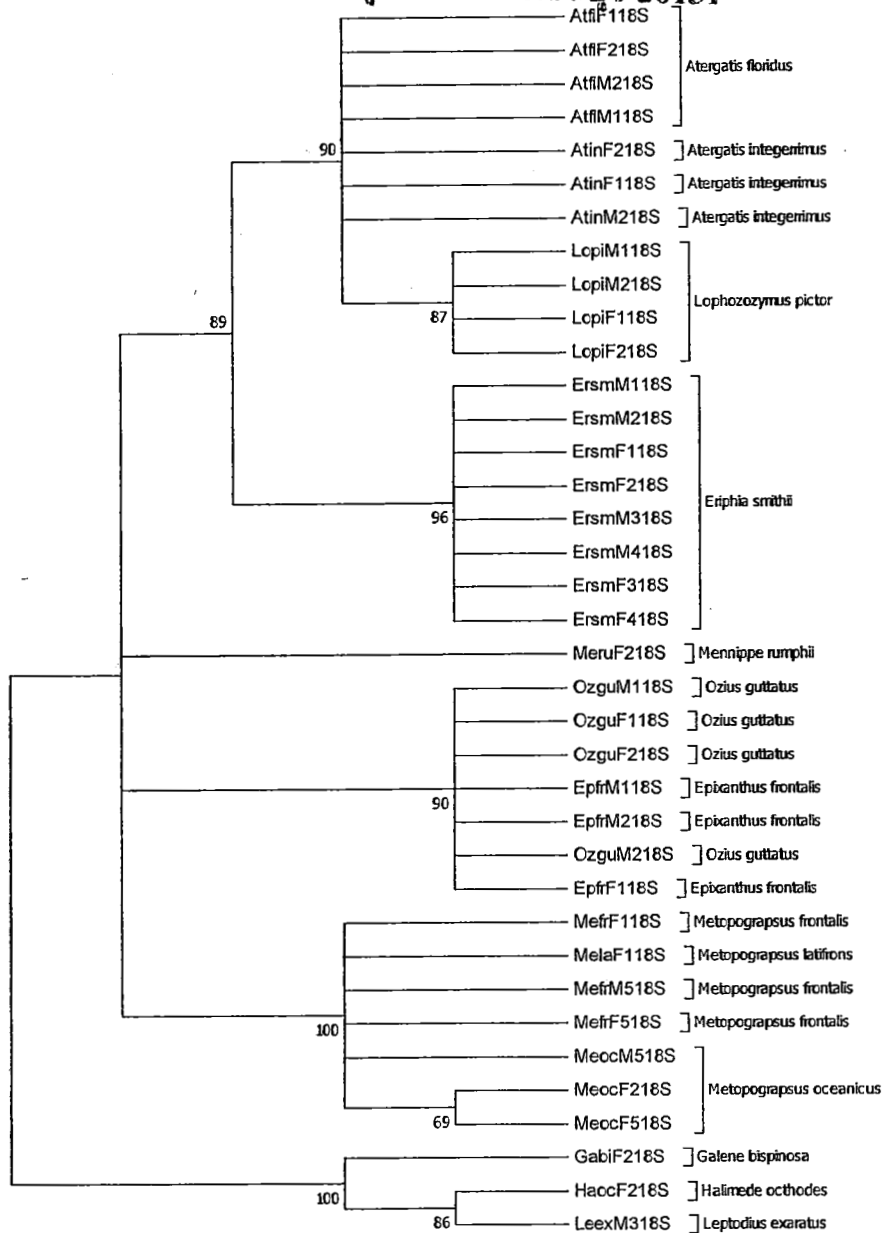


ภาพที่ 6 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยวิธีการ Maximum likelihood ที่อยู่บนฐานของโมเดล Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G) ซึ่งมีค่า log likelihood มากที่สุด (-2925.0396) เปอร์เซ็นต์สนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง ความยาวแขนระหว่างกลุ่มอนุกรมวิธานบนแผนภูมิฯ คือจำนวนการแทนที่เบสต่อตำแหน่ง แผนภูมิเริ่มต้นสำหรับการหาแผนภูมิที่ดีที่สุด (heuristic search) ที่สร้างโดยวิธี maximum parsimony (ถ้าจำนวนตำแหน่งน้อยกว่า 100 คู่เบส หรือ ¼ ของสายนิวคลีโอไทด์) หรือ BIONJ method with MCL distance matrix ใช้ข้อมูลจาก codon ทุกตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 1st, 2nd, 3rd และ Noncoding) จำนวนทั้งสิ้น 477 ตำแหน่ง

ตารางที่ 6 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายใน (แนวทแยงมุม) และระหว่างสปีชีส์ (แนวเส้นแนวมุม) โดยคำนวณจากจำนวนการแทนที่นิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งเฉลี่ยระหว่างทุกคู่สายนิวคลีโอไทด์ (37 สาย ที่ความยาว 751 นิวคลีโอไทด์) ด้วยโมเดล Juke-Cantor ที่รวมความแปรปรวนของอัตราการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการระหว่างตำแหน่ง (G) ส่วนค่า Standard error แสดงเหนือเส้นทแยงมุม N/C คือไม่สามารถคำนวณค่าได้เนื่องจากมีจำนวนสายนิวคลีโอไทด์เพียงสายเดียวในกลุ่ม

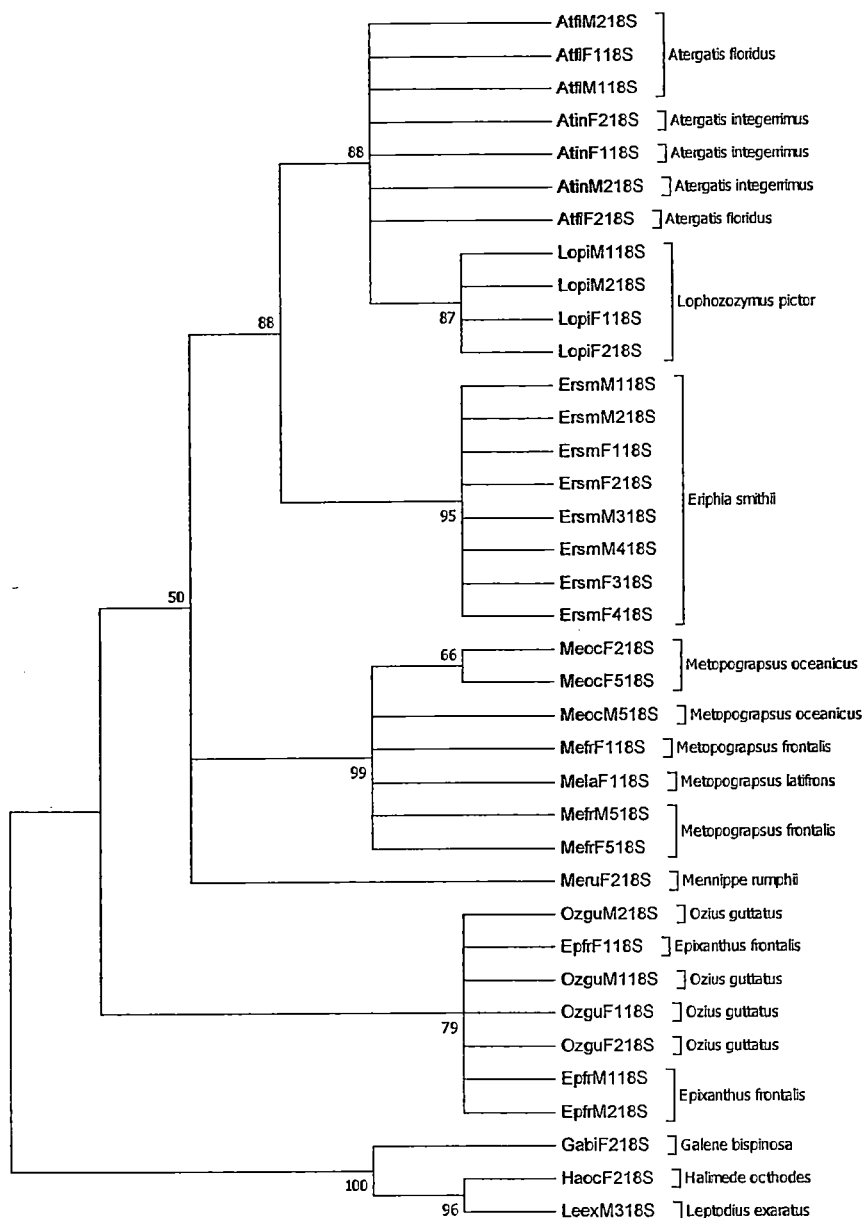
<i>Halimede oethodes</i>	N/C	0.003	0.000	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Galene bispinosa</i>	0.005	N/C	0.003	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Leptodius exaratus</i>	0.000	0.005	N/C	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Atergatis integerrimus</i>	0.028	0.028	0.028	0.000	0.000	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005	0.005
<i>Atergatis floridus</i>	0.028	0.028	0.028	0.000	0.000	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005	0.005
<i>Lophozozymus pictor</i>	0.029	0.029	0.029	0.003	0.003	0.000	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005
<i>Eriphia smithii</i>	0.028	0.029	0.028	0.005	0.005	0.008	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005
<i>Ozius guttatus</i>	0.024	0.024	0.024	0.009	0.009	0.011	0.010	0.001	0.003	0.000	0.005	0.005	0.005	0.005
<i>Mennippe rumphii</i>	0.026	0.026	0.026	0.009	0.009	0.012	0.011	0.007	N/C	0.003	0.005	0.005	0.005	0.005
<i>Epixanthus frontalis</i>	0.023	0.023	0.023	0.008	0.008	0.011	0.009	0.001	0.007	0.000	0.005	0.005	0.005	0.005
<i>Metopograpsus frontalis</i>	0.030	0.030	0.030	0.016	0.016	0.019	0.016	0.016	0.016	0.015	0.000	0.000	0.001	0.001
<i>Metopograpsus latifrons</i>	0.030	0.030	0.030	0.016	0.016	0.019	0.016	0.016	0.016	0.015	0.000	N/C	0.001	0.001
<i>Metopograpsus oceanicus</i>	0.032	0.032	0.032	0.018	0.018	0.021	0.018	0.017	0.018	0.016	0.001	0.001	0.002	0.002

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ค.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



ภาพที่ 7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Minimum Evolution เปอร์เซ็นต์สนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง สัดส่วนของความยาวแขนที่จัดกลุ่มอนุกรมวิธานบนแผนภูมิ คือค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณโดยวิธี Juke-Cantor ซึ่งมีหน่วยเป็นจำนวนการแทนที่เบสต่อตำแหน่ง สร้างแผนภูมิเริ่มต้นโดยวิธี Neighbor-Joining การหาแผนภูมิ ใช้วิธี Close-Neighbor-Interchange (CNI) algorithm ใช้ข้อมูลจาก codon ทุกตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 1st, 2nd, 3rd และ Noncoding) จำนวนทั้งสิ้น 751 ตำแหน่ง

301415



ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยวิธีการ Maximum likelihood ที่อยู่บนฐานของโมเดล Juke-Cantor (JC+G) ซึ่งมีค่า log likelihood มากที่สุด (-1350.4617) เปอร์เซ็นต์สนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง ความยาวแขนระหว่างกลุ่มอนุกรมวิธานบนแผนภูมิฯ คือจำนวนการแทนที่เบสต่อตำแหน่ง แผนภูมิเริ่มต้นสำหรับการหาแผนภูมิที่ดีที่สุด (heuristic search) ที่สร้างโดยวิธี maximum parsimony (ถ้าจำนวนตำแหน่งน้อยกว่า 100 คู่เบส หรือ ¼ ของสายนิวคลีโอไทด์) หรือ BIONJ method with MCL distance matrix ใช้ข้อมูลจาก codon ทุกตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 1st, 2nd, 3rd และ Noncoding) จำนวนทั้งสิ้น 751 ตำแหน่ง

อภิปรายผล

ความสามารถในการแยกชนิดปูของยีน 16SrRNA และ 18SrRNA

เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่าง 2 ยีนแล้ว ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16 SrRNA สามารถยืนยันชนิดได้ดีกว่ายีน 18SrRNA โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16SrRNA สามารถจัดตัวอย่างปูน้ำเค็มได้ตรงตามสปีชีส์ที่แยกโดยฐานได้อย่างชัดเจน ในเกือบทุกสปีชีส์ ในขณะที่ยีน 18SrRNA สามารถจัดสปีชีส์ได้เพียงบางกลุ่มเท่านั้น เช่น *Lophozozymus pictor* ทั้งนี้ น่าจะเป็นผลจากจำนวนตำแหน่งที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่าง มีจำนวนน้อยเกินไป

ส่วนของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 16SrRNA น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นบาร์โคดดีเอ็นเอสำหรับปูน้ำเค็มได้ ซึ่งบาร์โคดดีเอ็นเอหมายถึงสายนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่เป็นสมบัติเฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ และมีความแตกต่างจาก สิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Hajibabaei et al. 2007; www.barcodeoflife.org) ดังนั้นบาร์โคดดีเอ็นเอจึงไม่ควรมีความแปรปรวนภายในชนิดมากนัก ในขณะที่ ต้องแสดงความแตกต่างระหว่างชนิดได้ดี ทั้งนี้ต้องมีเทียบมาตรฐานของบาร์โคด และสร้างฐานข้อมูลระดับสากล เพื่อให้สามารถใช้บาร์โคดที่เป็นชนิดดีเอ็นเอเดียวกัน เปรียบเทียบกับ สิ่งมีชีวิตต่างๆ จากทั่วโลก

ในปัจจุบันมีการผลักดันให้ใช้ยีนบางตำแหน่งเป็นมาตรฐาน (ตารางที่ 7; Consortium for the Barcoding of Life, CBOL, www.barcodeoflife.org) เช่น ในสัตว์ จะเป็นบางส่วนของยีน cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรีย ส่วนในพืช ได้มีการใช้ยีนดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ คือ ยีน large subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcL) และ ยีนส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง ยีน trnH tRNA และยีน photosystem II protein D1 (psbA) และดีเอ็นเอจากส่วนที่เรียกว่า internal transcribed sequence (ITS) ของยีนในนิวเคลียส เนื่องจาก COI ไม่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างชนิดได้ดีพอในพืช

ฐานข้อมูลแหล่งใหญ่ (GenBank และ Barcode of Life Data Systems) มีจำนวนสายนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องแล้ว มีจำนวนสูงกว่า 1,500,00 สายนิวคลีโอไทด์ (www.ibol.org/resources/barcode-library/) ซึ่งเป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตทุกกลุ่ม ทั้งสิ้นประมาณ 147,877 ชนิด ยีน COI สามารถแยกชนิดในสัตว์กลุ่ม Decapoda ได้ค่อนข้างดี โดย Matzen da Silva et al. (2011) ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ COI บาร์โคดของ 15,272 สายนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นตัวแทนของ 528 สปีชีส์, 213 เจเนอรา และ 67 แฟมิลี และได้พบความแตกต่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณโดย K2P distance (%) ภายในสปีชีส์ อยู่ในช่วง 0-4.60 ความแตกต่างภายในจีนัส อยู่ในช่วง 2.509-32.75 ความแตกต่างภายในแฟมิลี อยู่ในช่วง 6.694-48.348 เปอร์เซ็นต์ และภายในออร์เดอร์ในช่วง 8.509-54.094

นอกจากนี้ ในกลุ่มตัวอย่างที่มีความคล้ายคลึงทางสัณฐานมาก เช่น สปีชีส์ในสกุล *Metopograpsus* (ปูแสม) (ภาพที่ 9) ที่แยกจากกันโดยรูปร่างกระดอง สีของก้ามหนีบ และการมี/ไม่มีหนามบนก้ามหนีบ เท่านั้น ชิ้นส่วนของ 16SrRNA ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ยังสามารถบ่งชี้ความแตกต่างได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 10) โดยสามารถมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันระหว่างชนิดทั้งสิ้น 32-38 ตำแหน่งจาก 507 ตำแหน่ง ในขณะที่ความแปรปรวนภายในแต่ละชนิดมีเพียง 0-2 ตำแหน่งจาก 507 ตำแหน่งเท่านั้น ระดับความแตกต่างระหว่างชนิดในครั้งนี้ (6.5-7.4 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยีน COI สามารถตรวจสอบได้ (มีค่าความต่างภายในจีโนมของสัตว์กลุ่ม Decapoda อยู่ในช่วง 2.509-32.75, Matzen da Silva et al. 2011)

ตารางที่ 7 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถแยกชนิดสิ่งมีชีวิตได้ (ที่มา: Hajibabaei et al. 2007)

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	ตำแหน่ง	จำนวนสายนิวคลีโอไทด์			
		สัตว์	พืช	โปรติสต์	รา
COI-barcode ¹	ไมโทคอนเดรีย	195,777	520	1,931	410
16SrDNA ²	ไมโทคอนเดรีย	41,381	221	2,059	285
Cytochrome b	ไมโทคอนเดรีย	88,324	165	1,920	1084
ITS1-rDNA ²	นิวเคลียส	12,175	57,693	68,839	56675
ITS2-rDNA ²	นิวเคลียส	13,923	58,065	67,332	56349
18SrDNA ²	นิวเคลียส	21,063	17,121	32,290	33327
rbcl ²	พลาสติด	NA	30,663	37328	NA

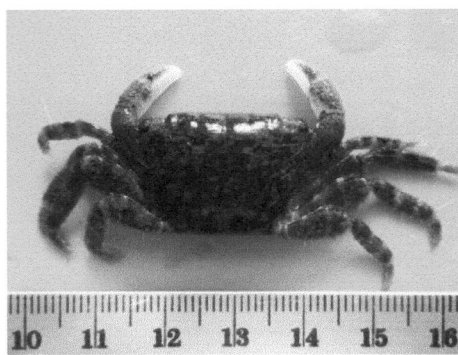
หมายเหตุ ¹ มาจากฐานข้อมูลของ Barcode of Life Data Systems

² มาจากฐานข้อมูล GenBank

NA (not available) ไม่มีข้อมูล



(a)



(b)



(c)

ภาพที่ 9 สันฐานของปูในสกุล *Metopograpsus* ที่พบบริเวณหมู่เกาะแสมสาร (a) *Met. latifrons*, (b) *Met. frontalis* และ (c) *Met. oceanicus*

MefrM116S	AAATTTAAAG	GTCGAACAGA	CCTTCTTTTA	CAACTGCTGC	AATTGTAAAG	AAATTTTAAT	60
MefrM516S							60
MefrF516S							60
MelaF116S			C...	A.			60
MeocF116S							60
MeocF216S							60
MefrM116S	TCAACATCGA	GGTCGCAAAC	TTTTCTGTGC	ATAAGAACTC	TCAAAAAAAAA	TTACGCTGTT	120
MefrM516S							120
MefrF516S							120
MelaF116S			T.....	T.....			120
MeocF116S			T.....				120
MeocF216S			T.....				120

ภาพที่ 10 การ align ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูน้ำเค็มสกุล *Metopograpsus* 3 สปีชีส์คือ *Met. frontalis* (Mefr), *Met. latifrons* (Mela) และ *Met. oceanicus* (Meoc) สีที่แรเงาแสดงถึงชนิดที่แตกต่างกัน

MefrM116S	ATCCCTAAAG	TAACTTAACC	TTTTAATCTT	TAT	TTAGGA	TCTTCTATAA	ACTTTACTCA	179
MefrM516S				..				179
MefrF516S				..				179
MelaF116S			..G.....	C..C.....		..T.C...	..A.....	180
MeocF116S				C A-		TC..T..		179
MeocF216S				C A-		TC..T..		179
MefrM116S	TTTATCTTT	GTTACAAAAT	TTAAGCAGTT	ACTGAAAATT	TTACTTCTAT	CGCCCCAATA		238
MefrM516S								238
MefrF516S								238
MelaF116S	T....	..C.T....		..A.....	C....			239
MeocF116S	T	..CTT....	A.....	G.....				239
MeocF216S	T	..CTT....	A.....	A.....				239
MefrM116S	AAATAAAAAC	TGTGTAATAT	ACTTTTATTT	ACTTTGATAA	TTTAATA	TA	ATACTTAATT	297
MefrM516S								297
MefrF516S								297
MelaF116S	...C.....	..AC.....	A-	..T...A.C..	A..	C.G..		298
MeocF116S		..A.....	..C..	..C.A.....	..C G A..	..T.C..		299
MeocF216S		..A.....	..C..	..C.A.....	..C G A..	..T.C..		299
MefrM116S	AATATCAAGC	TTTATAGGGT	CTTATCGTCT	TTTAAAGTTA	TTTAAGCCTT	TTCACTTAAA		357
MefrM516S								357
MefrF516S								357
MelaF116S	.G.....			C.C.				358
MeocF116S	..T..			..T..				359
MeocF216S	..T..			..T..				359
MefrM116S	AGTTAAATTC	AACAATTATT	ATAGAGACAG	ACCTTCTTTT	GTCCAGCCAT	TCATACGAGA		417
MefrM516S								417
MefrF516S								417
MelaF116S		..T.....		..TT.....				418
MeocF116S		GGT..	C..	..TT.....				419
MeocF216S		GGT..	C..	..TT.....				419
MefrM116S	TTCCAATTAA	AAAAGTAGTG	ATTATGCTAC	CTTTGCACGG	TCAAGATACC	GCGGCCCTTT		477
MefrM516S								477
MefrF516S								477
MelaF116S		..A..			..A.....			478
MeocF116S		..A..			..A.....			479
MeocF216S		..A..			..A.....			479
MefrM116S	AAATTTATTT	TATCAGTGGG	CAGACTA					504
MefrM516S								504
MefrF516S								504
MelaF116S	C....							505
MeocF116S	CC..							506
MeocF216S	AC..							506

ภาพที่ 10 (ต่อ) การ align ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูน้ำเค็มสกุล *Metopograpsus* 3 สปีชีส์คือ *Met. frontalis* (Mefr), *Met. latifrons* (Mela) และ *Met. oceanicus* (Meoc)

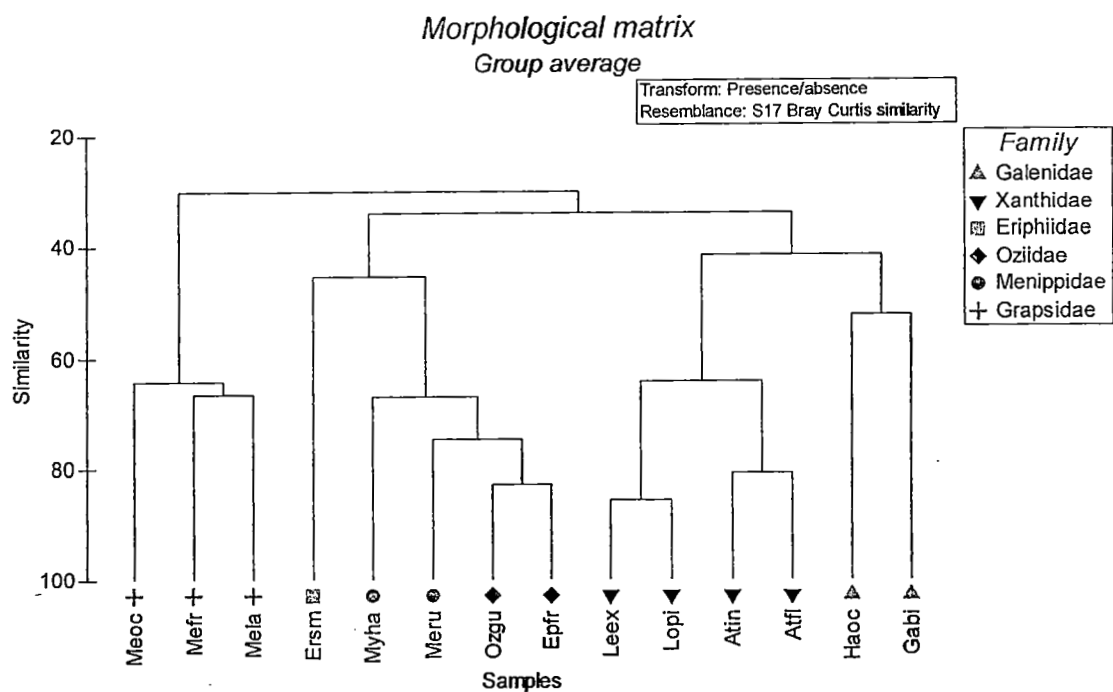
ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปูใบ้ ในกลุ่ม *Xanthidae* Alcock, 1989 *sensu* Sakai (1976)

ปูในกลุ่มปูใบ้ หรือปูน้ำเค็มในกลุ่ม *Xanthid* หรือที่เคยอยู่ใน Family *Xanthidae* Alcock, 1989 *sensu* Sakai (1976) เป็นกลุ่มที่ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์จากทั่วโลก เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายชนิดสูง (130 สกุล และกว่า 500 สปีชีส์จากทั่วโลก) และมีลักษณะพื้นฐานที่แปรปรวนมาก ดังนั้นจึงมีการทบทวนการจัดกลุ่มอนุกรมวิธานหลายครั้ง (e.g., Sakai 1976, Ng et al. 2008) โดยครั้งล่าสุดเป็นการปรับเปลี่ยนโดย Ng et al. (2008) ที่มีการเพิ่มระดับ

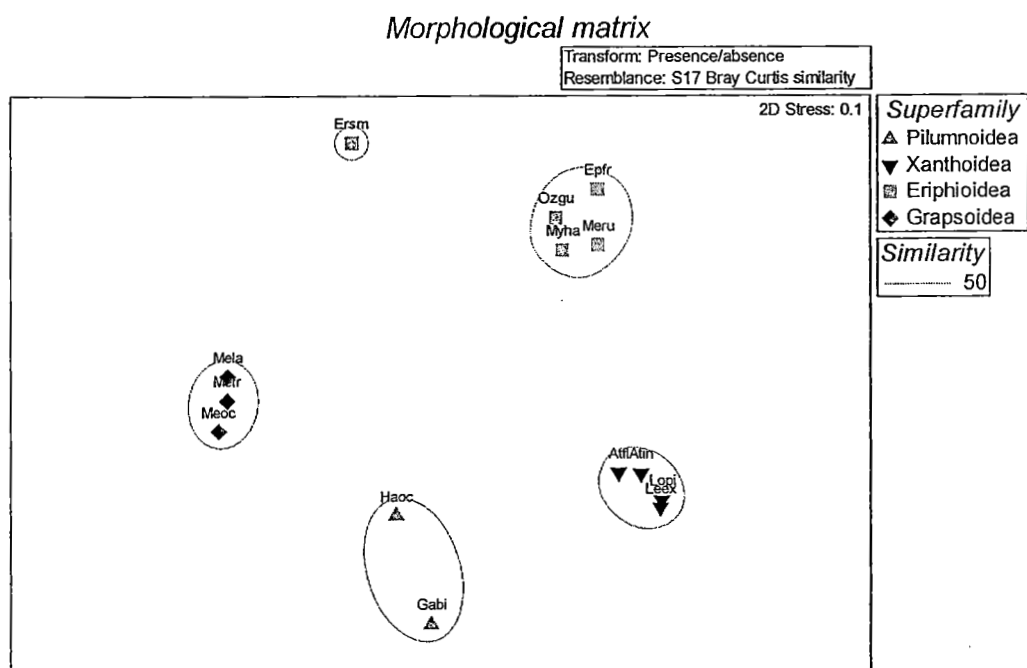
Superfamily 8 กลุ่ม และปรับ/เพิ่ม family เป็น 16 กลุ่ม แม้ว่าแต่ละ Family จะมีความแตกต่างของสัณฐาน แต่ไม่มี family ใดที่มีลักษณะเฉพาะ family จึงทำให้เกิดข้อสงสัยว่า การทบทวนและปรับอนุกรมวิธานของปูกลุ่มนี้จะสะท้อนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือไม่ หรือระดับความแตกต่างโดยสัณฐานเท่าใดจึงจะเพียงพอในการจัดสปีชีส์ให้อยู่ใน family หรือ superfamily ที่ต่างกัน

สำหรับตัวอย่างปูใบจากหมู่เกาะแสมสาร การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมในการศึกษานี้บ่งชี้ว่าการทบทวนอนุกรมวิธานโดย Ng et al. (2008) ที่ใช้สัณฐาน ส่วนใหญ่จะสะท้อนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (อ้างอิงจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16SrRNA โดยวิธี Maximum likelihood) ในระดับจีนัส และแฟมิลี แต่ยังไม่สะท้อนความสัมพันธ์ในระดับ Superfamily โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใน Superfamily Eriphioidea ซึ่งประกอบด้วย families Oziidae, Menippidae และ Eriphiidae โดยใน 3 families นี้ควรมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกันมากกว่า แฟมิลีอื่น แต่ผลการทดสอบทางพันธุกรรม บ่งชี้ว่าความแตกต่างภายใน Superfamily นี้ มีระดับพอๆ กับความแตกต่างของสมาชิกใน Superfamily นี้ กับ Superfamily อื่น

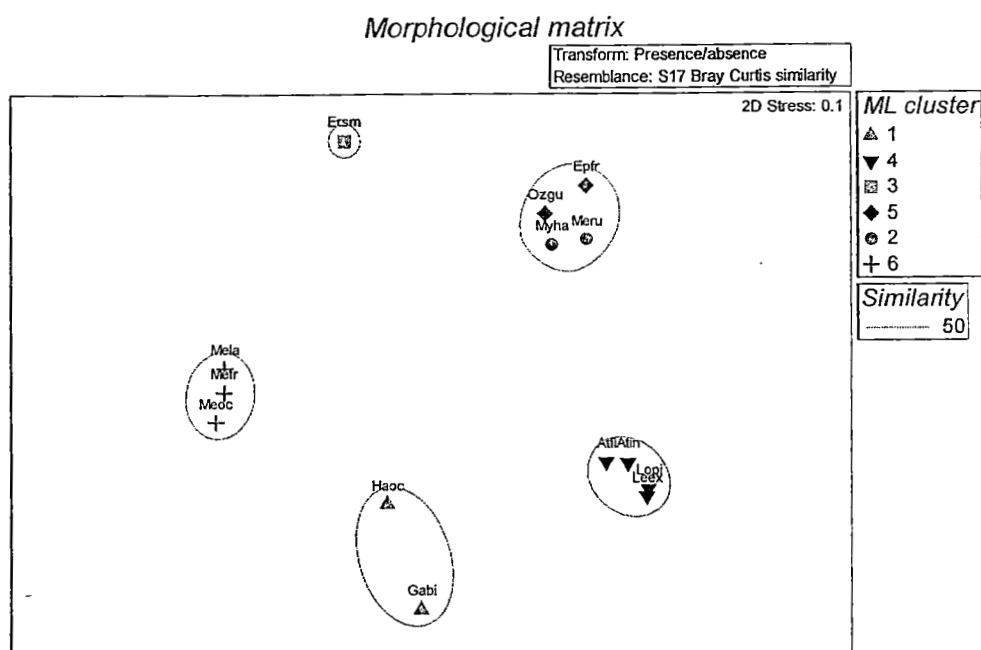
เมื่อพิจารณาระดับความคล้ายกันของสัณฐาน (21 ลักษณะ) ของสปีชีส์ที่พบที่หมู่เกาะแสมสาร ที่อธิบายโดย Sakai (1976) และ Ng et al. (2008) พบว่าเกือบทุก families มีการจัดกลุ่มที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ยกเว้น families Oziidae และ Menippidae (ภาพที่ 11) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายใน Superfamily Eriphioidea พบว่า Families Oziidae และ Menippidae เกาะกลุ่มอยู่ร่วมกัน ในขณะที่ Eriphiidae แยกไปเป็นกลุ่มต่างหาก (ภาพที่ 12) ซึ่งเมื่อพิจารณาผลทางการจัดกลุ่มทางพันธุกรรม ร่วมกับผลการวิเคราะห์ข้อมูลสัณฐาน (ภาพที่ 13) พบว่า Families Oziidae และ Minippidae มีความใกล้เคียงกันทั้งสัณฐาน แต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เห็นเพียงพอที่จะแยกครอบครัวได้หรือไม่ ในขณะที่ Family Eriphiidae มีความแตกต่างกับทั้งสองแฟมิลี ใน Superfamily เดียวกัน อยู่ในระดับที่น่าจะแยกเป็น Superfamily ใหม่ได้ (เทียบเท่ากับความแตกต่างระหว่าง Superfamilies Xanthoidea และ Pilumnoidea)



ภาพที่ 11 การจัดกลุ่มของสปีชีส์ และแฟมิลี โดยการวิเคราะห์ cluster analysis จากค่า Bray-Curtis similarity index ที่คำนวณจาก ความคล้ายกันของสัณฐาน 21 ลักษณะ



ภาพที่ 12 การจัดกลุ่มสปีชีส์โดยวิธี multidimensional scaling (MDS) จากค่า Bray-Curtis similarity index ที่คำนวณจาก ความคล้ายกันของสัณฐาน 21 ลักษณะ และซ้อนทับด้วย Superfamily ที่แสดงเป็นสัญลักษณ์แบบต่างๆ และวงกลมแสดงระดับความคล้ายกันมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 13 การจัดกลุ่มสปีชีส์โดยวิธี multidimensional scaling (MDS) จากค่า Bray-Curtis similarity index ที่คำนวณจาก ความคล้ายกันของสัณฐาน 21 ลักษณะ และซ้อนทับด้วยการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ แบบ Maximum Likelihood ที่แสดงเป็นสัญลักษณ์แบบต่างๆ และวงกลมแสดงระดับความคล้ายกันมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาการจัดหมวดหมู่ทางพันธุกรรมของปูกลุ่มนี้จากหลายแหล่งทั่วโลก (โดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล Genbank, ตารางที่ 8) พบว่าสายลำดับนิวคลีโอไทด์ 16SrRNA สามารถจัดสปีชีส์ได้ดีในเกือบทุก Genera ยกเว้น *Menippe* (*Minippe rumphii* และ *Min. nodifrons*), *Atergatus* (*Atergatus floridus* กับสปีชีส์อื่นในจีนัสเดียวกัน), *Pilumnus* (*P. vespertilio* กับอีกสองสปีชีส์) และ *Eurypanopeus* (*E. planissimus* ไม่ได้จัดกลุ่มกับอีกสองสปีชีส์) และสามารถจัดกลุ่มในระดับ family ได้ดีในระดับหนึ่ง โดยส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยสปีชีส์ตามที่ควรจะเป็น ยกเว้นใน Families Xanthidae, Panopeidae และ Pseudorhombilidae ซึ่งเป็นสมาชิกของ Superfamily Xanthoidea เหมือนกัน ที่สมาชิกของแต่ละ families มีการจัดกลุ่มปนกัน แม้ว่าจะมีการแสดงการจัดกลุ่มในระดับ Superfamily ที่สอดคล้องกับอนุกรมวิธาน ทั้งนี้จะสะท้อนความแปรปรวนของสัณฐานของปูในกลุ่มนี้เอง ที่น่าจะต้องมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างในแต่ละสปีชีส์ และควรต้องมีการทบทวนการเรียกชื่อให้เป็นไปในทิศทางเดียวกันอีกด้วย

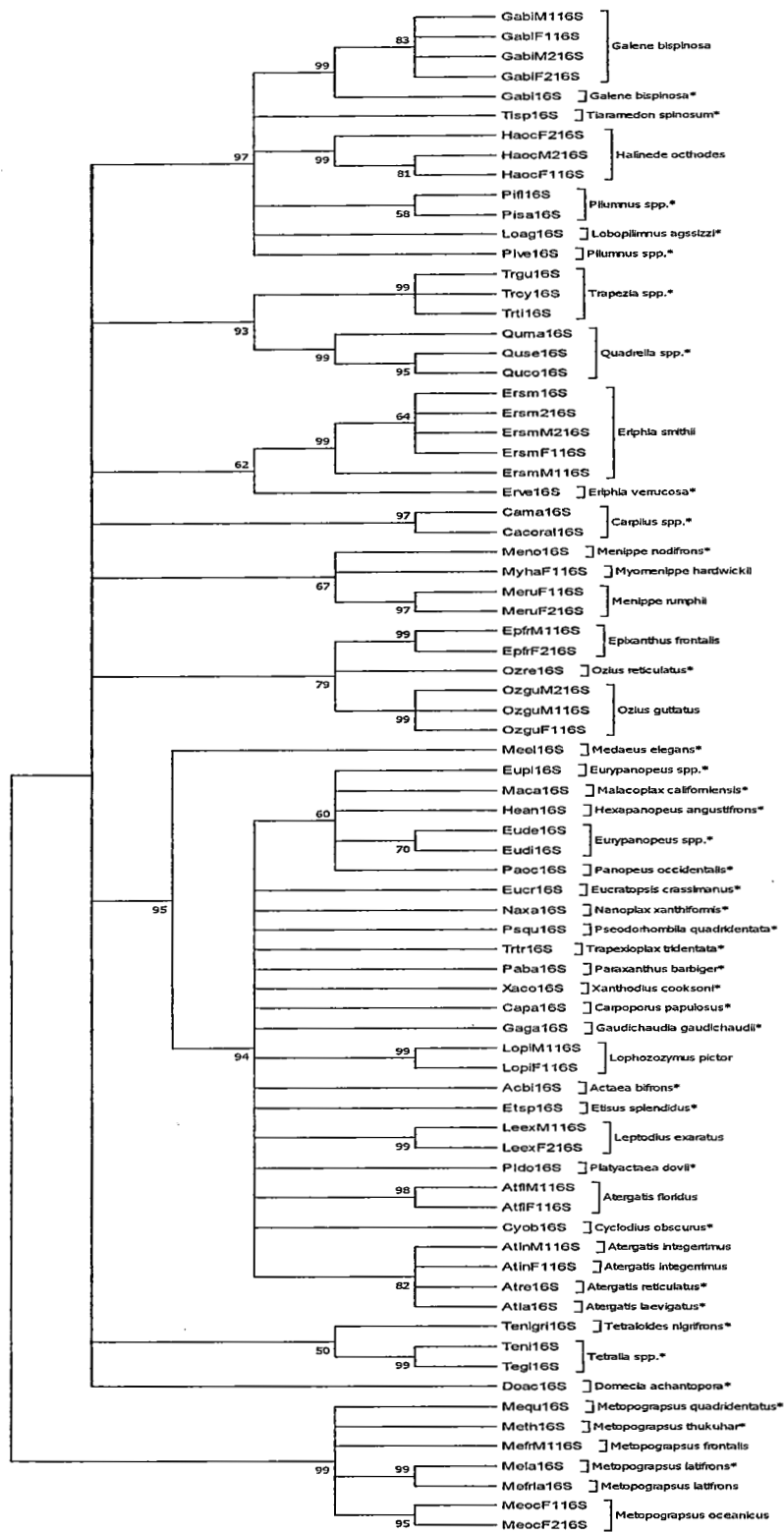
แม้ว่าการจัดกลุ่มใน Superfamily Xanthoidea และ Pilumnoidea จะสอดคล้องกับหมวดหมู่อนุกรมวิธานโดยสัณฐาน ความสัมพันธ์ในระดับ Superfamilies อื่นๆ ยังไม่ชัดเจน โดยที่แผนภูมิฯ ยังไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ families ได้ดี เช่นใน Superfamilies Eriphioidea, และ Trepezoidea ที่สมาชิกกระจายอยู่คนละกลุ่ม (แม้ว่าจะจัดกลุ่มตาม family ได้ดี)

ตารางที่ 8. รายชื่อสปีชีส์ของปูในกลุ่มปูใบ้ ที่มีสายนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rDNA ที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยการเรียกชื่อ family และ superfamily เป็นไปตามกับจัดหมวดหมู่โดย Ng et al. (2008).

Superfamily	Family (Ng et al. 208)	Species	GenBank Accession Number
Xanthoidea MacLeay, 1838	Xanthidae MacLeay, 1838	<i>Atergatis reticulatus</i>	DQ062726.1
		<i>Atergatis laevigatus</i>	FJ548944.1
		<i>Platyactaea dovii</i>	GU144451.1
		<i>Paraxanthus barbiger</i>	FJ031221.1
		<i>Medaeus elegans</i>	GU144447.1
		<i>Xanthodius cooksoni</i>	GU144445.1
		<i>Gaudichaudia gaudichaudii</i>	FJ687223.1
		<i>Cyclodius obscurus</i>	GU144459.1
		<i>Actaea bifrons</i>	GU144458.1
		<i>Carpoporus papulosus</i>	GU144457.1
		<i>Etisus splendidus</i>	GQ249175.1
	Panopeidae Ortmann, 1893	<i>Panopeus occidentalis</i>	EU863394.2
		<i>Eucratopsis crassimanus</i>	EU863392.2
		<i>Eurypanopeus depressus</i>	EU863390.2
		<i>Eurypanopeus dissimilis</i>	EU863387.2
		<i>Eurypanopeus planissimus</i>	EU863386.2
		<i>Hexapanopeus angustifrons</i>	EU863385.2
	Pseudorhombilidae Alcock, 1900	<i>Malacoplax californiensis</i>	GU144460.1
		<i>Pseudorhombila</i>	GU144454.1
		<i>quadridentata</i>	GU144436.1
		<i>Nanoplax xanthiformis</i>	EU863344.2
Trapezioidea Miers, 1886	Trapeziidae Miers, 1886	<i>Trapezia tigrina</i>	FJ548963.1
		<i>Trapezia guttata</i>	FJ548962.1
		<i>Trapezia cymodoce</i>	FJ548961.1
		<i>Quadrella serenei</i>	FJ548955.1
		<i>Quadrella maculosa</i>	FJ548954.1
		<i>Quadrella coronata</i>	FJ548953
	Domeciidae Ortmann, 1893	<i>Domecia achantopora</i>	FJ548949.1
	Tetraliidae Castro, Ng & Ah Yong, 2004	<i>Tetralia nigrolineata</i>	FJ548959.1
		<i>Tetralia glaberrima</i>	FJ548958.1
		<i>Tetraloides nigrifrons</i>	FJ548960.1

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Superfamily		Family (Ng et al. 208)	Species	GenBank Accession Number
Pilumnoidea Samouelle, 1819		Pilumnidae Samouelle, 1819	<i>Pilumnus floridanus</i>	EU863403.2
			<i>Pilumnus sayi</i>	GU144435.1
			<i>Pilumnus vespertilio</i>	FJ548952.1
			<i>Lobopilumnus agassizii</i>	EU863402.2
			<i>Tiaramedon spinosum</i>	GU144441.1
		Galenidae Alcock, 1898	<i>Galene bispinosa</i>	GU144444.1
Eriphioidea 1838	MacLeay,	Oziidae Dana, 1851	<i>Ozius reticulatus</i>	GU144446.1
		Eriphiidae MacLeay, 1838	<i>Eriphia verrucosa</i>	EU863398.2
			Eriphiidae sp	EU284155.1
		Menippidae Ortmann, 1893	<i>Menippe nodifrons</i>	AJ130817.1
Carpilioidea 1893	Ortmann,	Carpiliidae Ortmann, 1893	<i>Carpilius maculatus</i>	GU144450.1
			<i>Carpilius corallinus</i>	AF503462.1
Grapsoidea 1838	MacLeay,	Grapsidae MacLeay, 1838	<i>Metopograpsus latifrons</i>	AJ784028.2
			<i>Metopograpsus</i>	DQ062732
			<i>quadridentatus</i>	AJ784027.2
			<i>Metopograpsus thukuhar</i>	



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA บน ไมโทคอนเดรีย ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูจากหมู่เกาะแสมสาร และ GenBank ด้วยวิธีการ Maximum likelihood ที่อยู่บนฐานของโมเดล TN93+G+I * แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก ฐานข้อมูล GenBank

สรุปผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ลำดับทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน ของยีน 16SrRNA และ 18SrRNA ของปูกลุ่มปูใบ้ (Family Xanthidae Alcock, 1898 sensu Sakai (1979)) แสดงให้เห็นว่ายีน 16SrRNA สามารถยืนยันชนิดปูได้ดีกว่ายีน 18SrRNA และสามารถจัดหมวดหมู่ของสปีชีส์ที่พบในบริเวณหมู่เกาะแสมสาร ในระดับแฟมิลี และ ซูเปอร์แฟมิลีได้ ตรงกับการจัดหมวดหมู่ตามลักษณะสัณฐานที่จัดใหม่โดย Ng et al. (2008)
2. อย่างไรก็ตาม ยีนดังกล่าวยังไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแฟมิลี Oziidae, Menippidae และ Eriphiidae ซึ่งอยู่ในซูเปอร์แฟมิลีเดียวกันได้ แม้ว่าจะสามารถแยก family ทั้งสามออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงน่าจะเป็นประเด็นที่น่าสนใจว่า การจัดแฟมิลีทั้งสามให้อยู่ซูเปอร์แฟมิลีเดียวกัน โดยสัณฐาน อาจยังไม่สะท้อนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ทั้งนี้อาจต้องมีการยืนยันด้วยยีนอื่น เช่นยีน COI อีกครั้งหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง 2544. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2544. กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เอกสารฉบับที่ 10/2545
- วนิสา กัณทมนี. 2550. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกุ้งสกุล *Metapeneaus* บางชนิดที่พบทางภาคตะวันออกของประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ COI บนไมโทคอนเดรีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา
- วิสุทธิ ใบไม้. 2538. สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) กรุงเทพฯ. 254 หน้า.
- Ahyong, S.T., Lai, J.C.Y., Sharkey, D., Colgan, D.J., Ng, P.K.L. (2007). Phylogenetics of the brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda): The status of Podotremata based on small subunit nuclear ribosomal RNA. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 45, 576-586.
- Aljanabi, SM, & I. Martinez. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Research* 25: 4692-4693.
- Awise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution* (2nd ed.). Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Baldwin, J.D, Bass, A.L. Bowen, B.W., Clark Jr , W.H. 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 399-467.
- Billington, N. 2003. Mitochondrial DNA. Pages 59-100 in E. M Hallerman (eds). *Population genetics: Principles and applications for fisheries scientist*. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland.
- Chu, K.H., Tong, J., Chan, T. 1999. Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of *Charybdis* (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 461-468
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

- Fratini, S., Vannini, M., Cannicci, S., Schubart, C.D. (2005). Tree-climbing Mangrove Crabs, a case of convergent evolution. *Evolutionary Ecological Research* 7: 219-233.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23:167-172.
- Hall, T. (2001). BioEdit version 5.0.6. Department of Microbiology, North Carolina State University.
- Halliburton, R. (2004). *Introduction to Population Genetics*. Pearson Prentice Hall. New Jersey
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., Dooh, R. 2004. Barcodes of Life.
<http://www.barcodinglife.com/>
- Hillis, D.M., Moritz, C. (eds.) 1990. *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Kim, W., Abele, L.G. 1990. Molecular Phylogeny of Selected Decapod Crustaceans Based on 18s rRNA Nucleotide Sequences. *Journal of Crustacean Biology* 10: 1-13
- Lavery, S., Chan, T.Y., Tam, Y.K. Chu, K.H. 2004. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* s.l. derived from mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 39 – 49.
- Lemey P., Salemi, M., Vandamme, A. (eds) 2009. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*, Second Edition. New York: Cambridge University Press.
- Lowe, A., Harris, S., Ashton, P. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Publishing. Oxford, UK.
- Maggioni, R., Rogers, A.D., Maclean, N., Incao, F. D. 2001. Molecular phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based on

- mitochondrial 16S partial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 66-73.
- Mahon, B.C., Neigel, J.E. (2008). Utility of arginine kinase for resolution of phylogenetic relationships among brachyuran genera and families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 718-727.
- Mantelatto, F.L., Robles, R., Felder, D.L. 2007. Molecular phylogeny of the western Atlantic species of the genus *Portunus* (Crustacea, Brachyura, Portunidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 150: 211-220.
- Mathews, L.M., Anker, A. 2009. Molecular phylogeny reveals extensive ancient and ongoing radiations in a snapping shrimp species complex (Crustacea, Alpheidae, *Alpheus armillatus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 268-281.
- Matzen da Silva, J., Creer, S., dos Santos, A., Costa, A.C., Cunha, M.R., Costa, F.O., Carvalho, G.R. 2011. Systematic and evolution insights derived from mtDNA COI barcode diversity in the Decapoda (Crustacea: Malacostraca). *PLoS ONE* 6(5): e1949.
- Ng, P.K.L., Guinot, D., Davie, P.J.F. (2008). *Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world*. The Raffles Bulletin of Zoology, 17, 1-286.
- Robles, R. Schubart, C.D., Conde, J.E., Carmona-Suárez, C., Alvarez, F., Villalobos, J.L., Felder, D.L. (2007). Molecular phylogeny of the American Callinectes Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae), based on two partial mitochondrial genes. *Mar. Biol.* 1265-1274.
- Sakai, T. 1976. Crabs of Japan and adjacent seas. The Carcinological Society of Japan.
- Schubart, C.D., Canicci, S. Vannini, M., Fratini, S. 2006. Molecular phylogeny of Grapsoid Crabs (Decapoda, Brachyura) and allies base on two mitochondrial genes and a proposal for refraining from current superfamily classification. *Journal Compilation*, 1-7.
- Schubart, C.D., Reuschel, S. 2010. A proposal for a new classification of Portunidea and Cancroidea (Brachyura: Heterotremata) based on two independent molecular phylogenies. *Decapod crustacean phylogenetic*. Editor. Joel W

Martin , Keith A. Crandall , and Darryl L. Felder. Series Edited by Stefan Koenemann. CRC Press.

Swofford, D.L., Sullivan, J. 2009. Phylogeny Inference based on parsimony and other methods using PAUP*. Section III : The Phylogenetic Handbook: A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing (2nd ed.). Edited by Philippe Lemey, Marco Salemi and Anne-Mieke Vandamme. New York: Cambridge University Press.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Tudge, C.C., Cunningham, C.W. 2002. Molecular phylogeny of the mud lobsters and mud shrimps (Crustacea : Decapoda : Thalassinidea) using nuclear 18S rDNA and mitochondrial 16S rDNA. *Invertebrate. Systematics* 16(6): 839 – 847.