



245697



รายงานฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูบางชนิดที่พบบริเวณพื้นที่
ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี

โดย วันศุกร์ เสนานาญ, Ade Yamindago และ นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล)

ปีงบประมาณ 2554



รายงานฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูบางชนิดที่พบบริเวณพื้นที่
ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

โดย วันศุกร์ เสนานาญ, Ade Yamindago และ นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา



ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล)

ปีงบประมาณ 2554

แม้ว่าการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะภายนอก (morphology) ยังมีความจำเป็นในการแยกชนิดสิ่งมีชีวิต และเป็นวิธีมาตรฐานที่นักอนุกรมวิธานใช้ทั่วโลก แต่เครื่องมือดังกล่าวก็มีข้อจำกัดในบางกรณี เนื่องจากบางลักษณะที่ใช้แยกจำแนก หรือสปีชีส์อาจไม่ได้สะท้อนถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ หรือมีความคาบเกี่ยวของลักษณะในกลุ่มอนุกรมวิธานที่ต่างกัน การศึกษานี้จึงได้ศึกษาความหลากหลายชนิดของปูน้ำเค็ม 14 สปีชีส์ จาก 6 แฟมิลี (Xanthidae, Galenidae, Eriphiidae, Oziidae, Menippidae และ Grapsidae) ที่พบบริเวณหมู่เกาะแสมสารโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ ยีน 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 phyloetic 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	แผนที่พื้นที่ปลูกพันธุ์กรรมพืชทางทะเล เกาะเสมสารและเกาะใกล้เคียง 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> ที่พบบริเวณหมู่เกาะเสมสาร (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

	หน้า
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 ไทด์บางส่วน ของ 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