

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 ที่ดีที่สุด โดยการวิเคราะห์ตามแนวทาง 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	25.5
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* มีความคล้ายกันทางพันธุกรรมกันกับ *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 แผนภูมียังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง 5 แฟมิลียเหล่านี้ได้ Ng et al. (2008)

ได้จัดให้แฟมิลี Eriphiidae, Oziidae และ Menippidae อยู่ Superfamily เดียวกัน แต่แผนภูมิฯ
ให้นำน้ำหนักความแตกต่างทางพันธุกรรมของแฟมิลีเท่ากัน

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

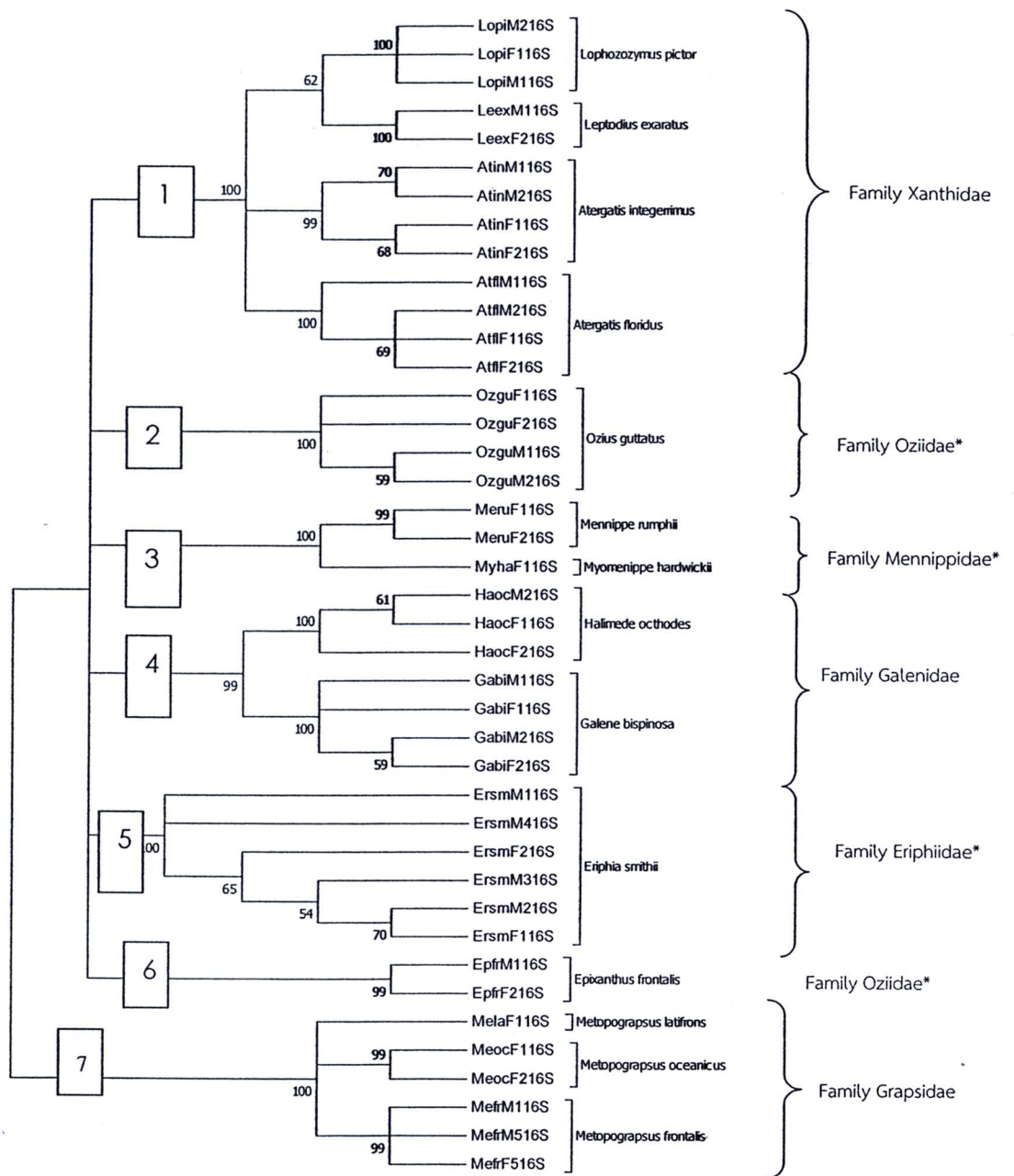
ยีน 18S rRNA

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) ความแตกต่างของสายนิ
วคลีโอไทด์ของชนิดเดียวกันมีค่าตั้งแต่ 0 (ปูเกือบทุกชนิด ยกเว้น *O. guttatus* และ *Met.*
oceanicus) ถึง 0.002 (*Met. oceanicus*) (ตารางที่ 6) ส่วนความต่างระหว่างชนิดปุมีค่าตั้งแต่ 0
(3 คู่ได้แก่ *Atergatis integerrimus* และ *A. floridus*; *Halimede octhodes* กับ *Leptodius exaratus*
และ *Met. latifrons* กับ *Met. frontalis*) ถึง 0.032 (*Met. oceanicus* กับ *H. octhodes*, *G.*
bispinosa และ *Le. exaratus*)

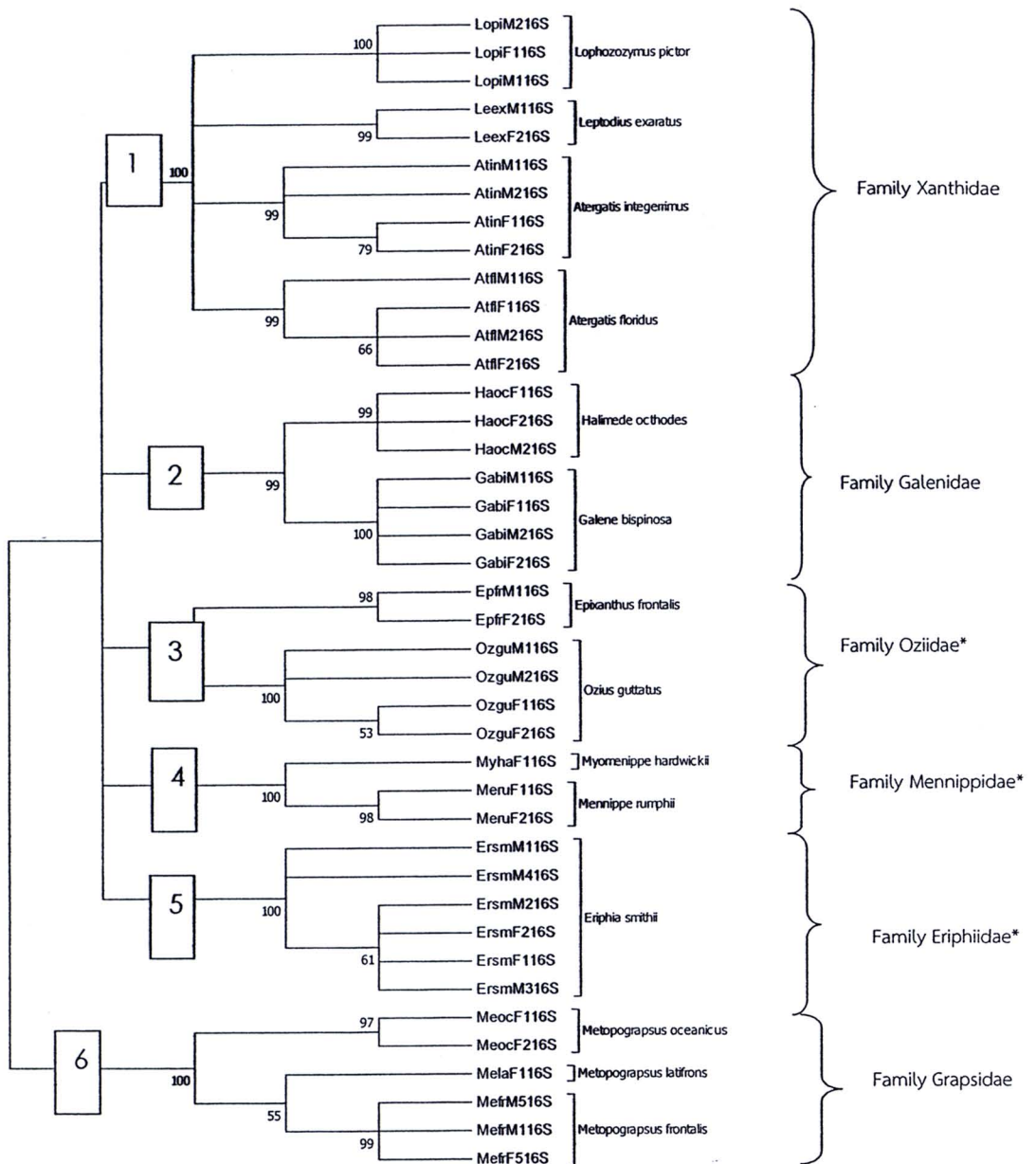
แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ประเมินจากทั้งสองวิธี คือ Minimum evolution
(ภาพที่ 7) และ Maximum likelihood (ภาพที่ 8) ให้คำตอบที่คล้ายกันคือ ยีนตำแหน่งนี้ยังไม่
สามารถจัดหมวดหมู่ปูในระดับสปีชีส์ได้ตรงตามลักษณะสัณฐานได้ เช่น ในกลุ่มจิ้งนัส *Atergatis*,
Metopograpsus และระหว่าง *O. guttatus* และ *Ep. frontalis* ทั้งสองวิธีการสามารถจัดกลุ่มได้
คล้ายกัน 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 octhodes*, *Le.*
exaratus และ *Galene bispinosa* (ค่า bootstrap = 100%) อย่างไรก็ตามวิธี Maximum
likelihood จัดให้กลุ่ม 1, 2 และ 4 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากกว่า กลุ่มอื่น (ค่า bootstrap
= 50%) จะเห็นได้ว่า ยีน 18SrRNA ยังไม่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างปูที่ใช้เป็นกลุ่ม
outgroup (Family Grapsidae) กับ ingroup ได้

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

<i>Halimede octhodes</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



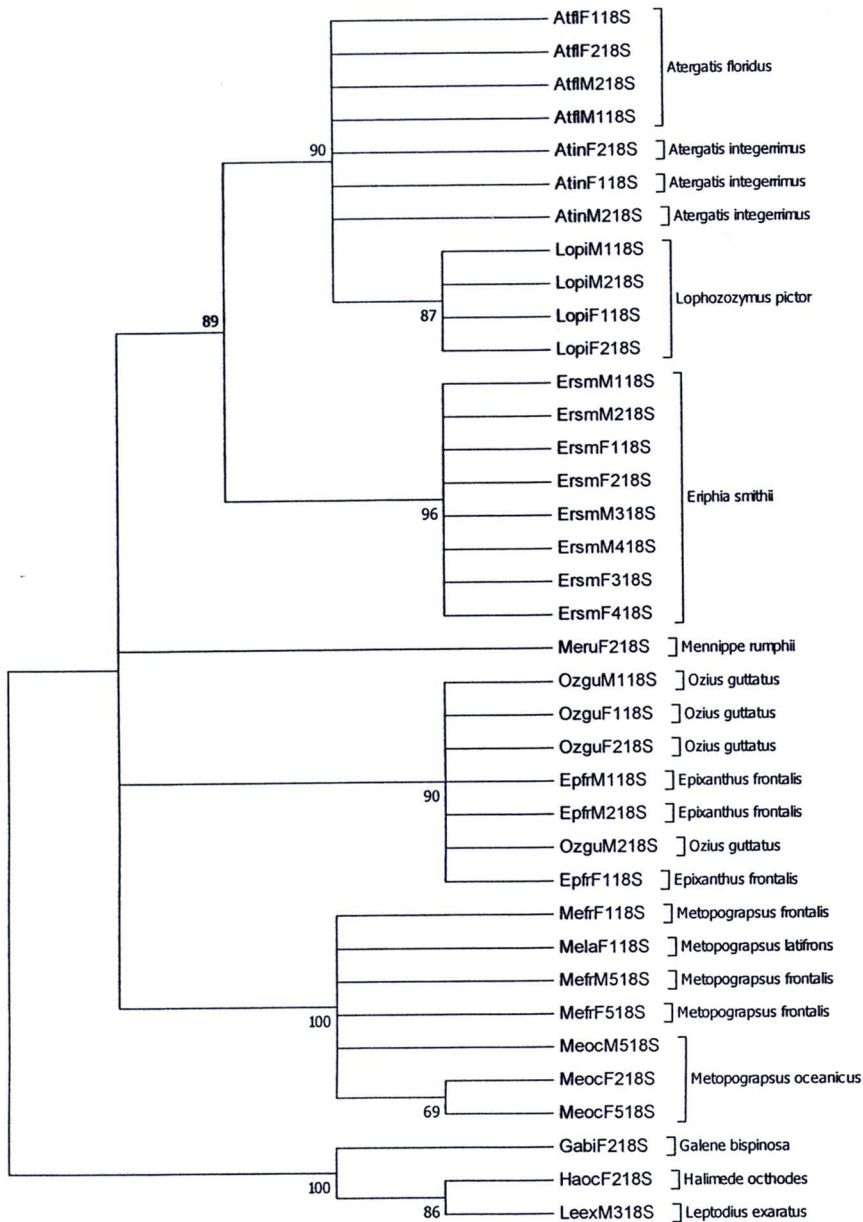
ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16SrRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Minimum Evolution เฟอร์เซ็นสนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง สัดส่วนของความยาวแขนที่จัดกลุ่มอนุกรมวิธานบนแผนภูมิฯ 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



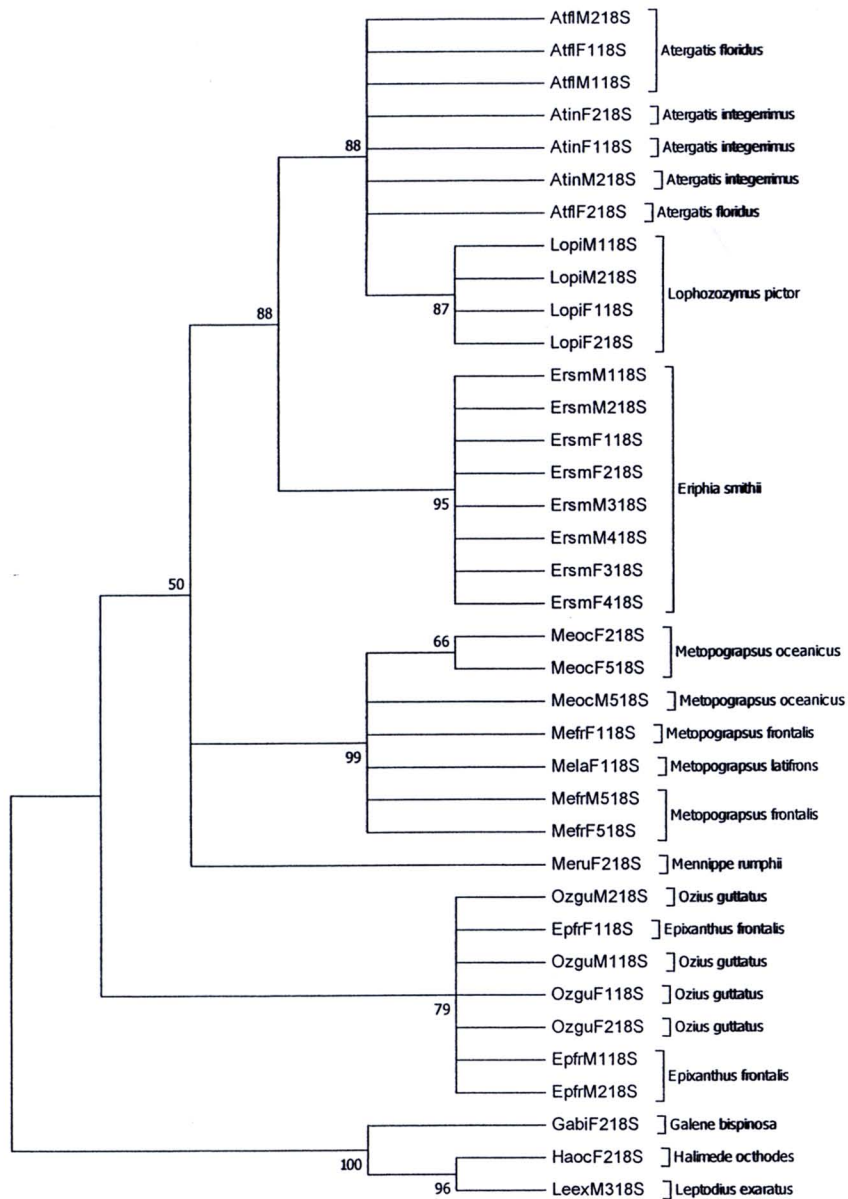
ภาพที่ 6 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Maximum likelihood ที่อยู่บนฐานของโมเดล Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G) ซึ่งมีค่า log likelihood มากที่สุด (-2925.0396) เปอร์เซ็นต์สนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (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 (แนวทแยงมุม) โดยคำนวณจากจำนวนการแทนที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเฉลี่ยระหว่างทุกคู่สายนิวคลีโอไทด์ (37 สาย ที่ความยาว 751 นิวคลีโอไทด์) ด้วยโมเดล Juke-Cantor ที่รวมความแปรปรวนของอัตราการเปลี่ยนทางวิวัฒนาการระหว่างตำแหน่ง (G) ส่วนค่า Standard error แสดงเหนือเส้นทแยงมุม N/C คือไม่สามารถคำนวณค่าได้เนื่องจากมีจำนวนสายนิวคลีโอไทด์เพียงสายเดียวในกลุ่ม

<i>Halimede octhodes</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	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	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	0.006
<i>Atergatis integerrimus</i>	0.028	0.028	0.028	0.000	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005
<i>Atergatis floridus</i>	0.028	0.028	0.028	0.000	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005
<i>Lophozozymus pictor</i>	0.029	0.029	0.029	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	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	0.004	0.004	0.005	0.005
<i>Ozius guttatus</i>	0.024	0.024	0.024	0.009	0.009	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	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	0.003	0.003	0.003	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	0.005
<i>Metopograpus frontalis</i>	0.030	0.030	0.030	0.016	0.016	0.019	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015	0.015	0.000	0.000	0.001
<i>Metopograpus latifrons</i>	0.030	0.030	0.030	0.016	0.016	0.019	0.016	0.016	0.016	0.016	0.015	0.015	0.000	N/C	0.001
<i>Metopograpus oceanicus</i>	0.032	0.032	0.032	0.018	0.018	0.021	0.018	0.017	0.018	0.018	0.016	0.016	0.001	0.001	0.002



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



ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 18S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Maximum likelihood ที่อยู่บนฐานของโมเดล Juke-Cantor (JC+G) ซึ่งมีค่า log likelihood มากที่สุด (-1350.4617) เปรอร์เซ็นต์สนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง ความยาวแขนระหว่างกลุ่มอนุกรมวิธานบนแผนภูมิ 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

