

อภิปรายผล

ความสามารถในการแยกชนิดของยีน 16SrRNA และ 18SrRNA

เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง 2 ยีนแล้ว ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16 SrRNA สามารถยืนยันชนิดได้ดีกว่ายีน 18SrRNA โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16SrRNA สามารถจัดตัวอย่างปูน้ำเค็มได้ตรงตามสปีชีส์ที่แยกโดยสัณฐานได้อย่างชัดเจน ในเกือบทุกสปีชีส์ ในขณะที่ยีน 18SrRNA สามารถจัดสปีชีส์ได้เพียงบางกลุ่มเท่านั้น เช่น *Lophozoaemus pictor* ทั้งนี้จะเป็นผลจากจำนวนตำแหน่งที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่าง 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 ได้มีการใช้ชนิดดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ คือ ยีน large subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcL) และ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง 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 ความแตกต่างภายในยีนส อยู่ในช่วง 2.509-32.75 ความแตกต่างภายในแฟมิลี อยู่ในช่วง 6.694-48.348 เพอร์เซ็นต์ 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

หมายเหตุ¹ มาจากฐานข้อมูลของ Barcode of Life Data Systems

² มาจากฐานข้อมูล GenBank

NA (not available) ไม่มีข้อมูล



(a)



(b)



(c)

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

MefrM116S	AAATTAAAG	GTCGAACAGA	CCTTCTTTTA	CAACTGCTGC	AATTGTAAAG	AAATTTTAAT	60
MefrM516S							60
MefrF516S							60
MelaF116S			C.....	A.....			60
MeocF116S							60
MeocF216S							60
MefrM116S	TCAACATCGA	GGTCGCAAAC	TTTTCTGTCTG	ATAAGAACTC	TCAAAAAAAA	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	TAACCTAACC	TTTTAATCTT	TAT	TTAGGA	TCTTCTATAA	ACTTTACTCA	179
MefrM516S								179
MefrF516S								179
MelaF116S			..G.....	C..C.....		...T.C...	.A.....	180
MeocF116S								179
MeocF216S								179
MefrM116S	TTTATCTTT	GTTACAAAAT	TTAAGCAGTT	ACTGAAAATT	TTACTTCTAT	CGCCCCAATA		238
MefrM516S								238
MefrF516S								238
MelaF116S	T....	..C.T....		...A.....	...C.....			239
MeocF116S								239
MeocF216S								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								299
MeocF216S								299
MefrM116S	AATATCAAGC	TTTATAGGGT	CTTATCGTCT	TTTTAAGTTA	TTTAAGCCTT	TTCACTTAAA		357
MefrM516S								357
MefrF516S								357
MelaF116S	.G.....			C.C.				358
MeocF116S								359
MeocF216S								359
MefrM116S	AGTTAAATTC	AACAATTATT	ATAGAGACAG	ACCTTCCTTT	GTCCAGCCAT	TCATACGAGA		417
MefrM516S								417
MefrF516S								417
MelaF116S		..T.....		..TT.....				418
MeocF116S		GGT.....		TT.....				419
MeocF216S		GGT.....		TT.....				419
MefrM116S	TTCCAAATTA	AAAAGTAGTG	ATTATGCTAC	CTTTGCACGG	TCAAGATACC	GCGGCCCTTT		477
MefrM516S								477
MefrF516S								477
MelaF116S		A..			A..			478
MeocF116S								479
MeocF216S								479
MefrM116S	AAATTTATTT	TATCAGTGGG	CAGACTA					504
MefrM516S								504
MefrF516S								504
MelaF116S	C.....							505
MeocF116S								506
MeocF216S								506

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

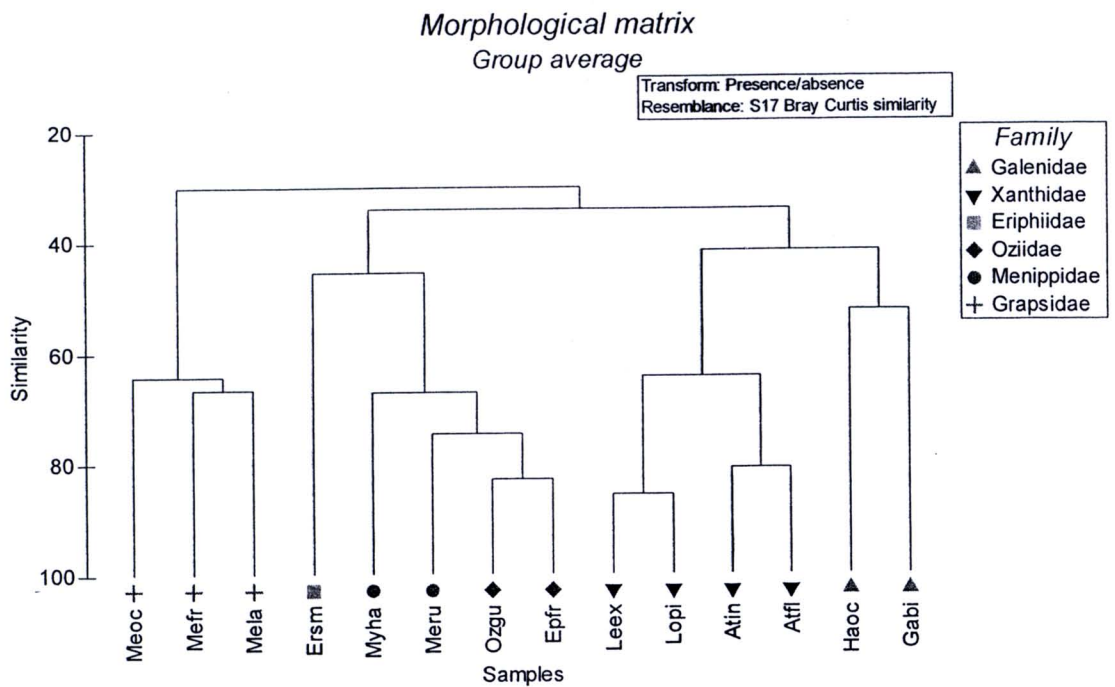
ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปูใบ้ ในกลุ่ม Xanthidae Alcock, 1989 sensu Sakai (1976)

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

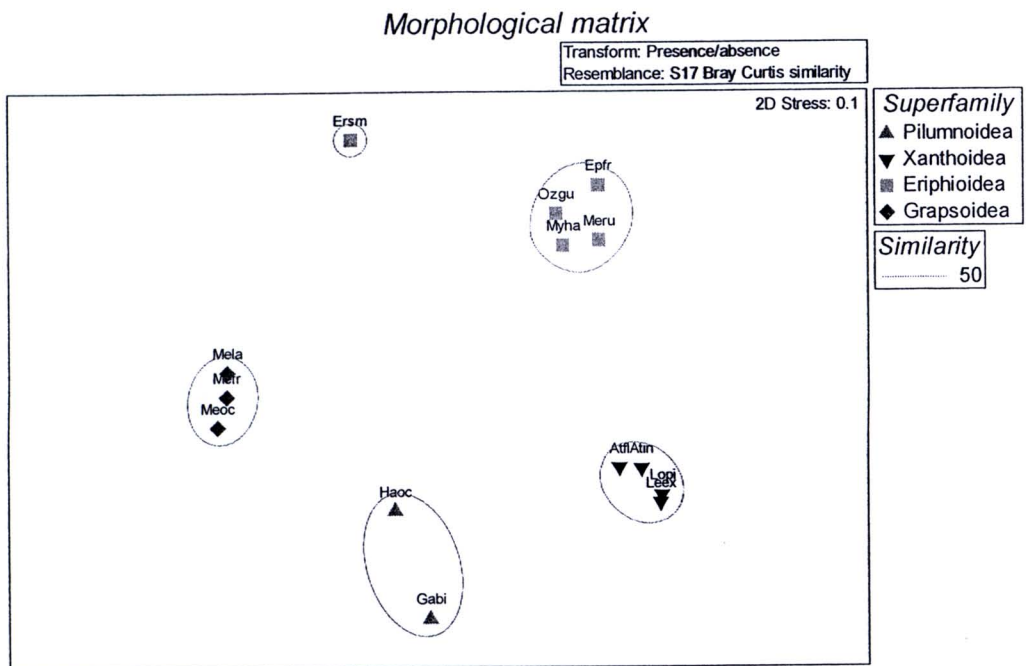
Superfamily 8 กลุ่ม และปรับ/เพิ่ม family เป็น 16 กลุ่ม แม้ว่าแต่ละ Family จะมีความแตกต่างของสัณฐาน แต่ไม่มี family ใดที่มีลักษณะเฉพาะ family จึงทำให้เกิดข้อสงสัยว่า การทบทวนและปรับอนุกรมวิธานของปูกลุ่มนี้จะสะท้อนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือไม่ หรือระดับความแตกต่างโดยสัณฐานเท่าใดจึงจะเพียงพอในการจัดสปีชีส์ให้อยู่ใน 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 นี้ควรจะมี ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกันมากกว่า แฟมิลีอื่น แต่ผลการทดสอบทางพันธุกรรม บ่งชี้ว่าความแตกต่างภายใน Superfamily นี้ มีระดับพอๆ กับความแตกต่างของสมาชิกใน Superfamily นี้ กับ Superfamily อื่น

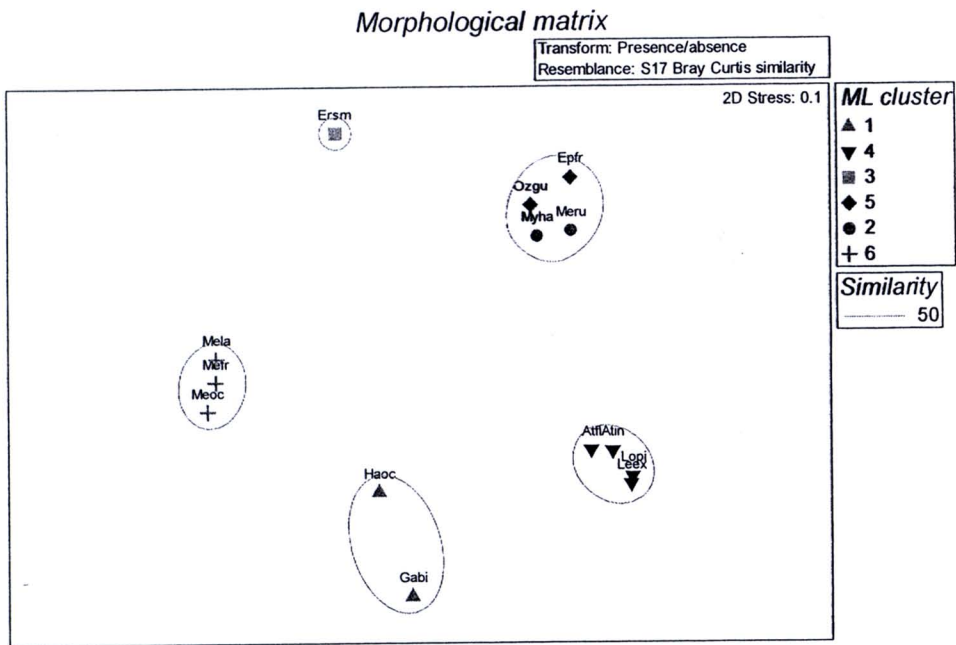
เมื่อพิจารณาระดับความคล้ายกันของสัณฐาน (21 ลักษณะ) ของสปีชีส์ที่พบที่หมู่เกาะแสมสาร ที่อธิบายโดย Sakai (1976) และ Ng et al. (2008) พบว่าเกือบทุก families มีการจัดกลุ่มที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ยกเว้น families Oziidae และ Menippidae (ภาพที่ 11) และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายใน Superfamily Eriphioidea พบว่า 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 ที่คำนวณจากความคล้ายกันของสัณฐาน 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

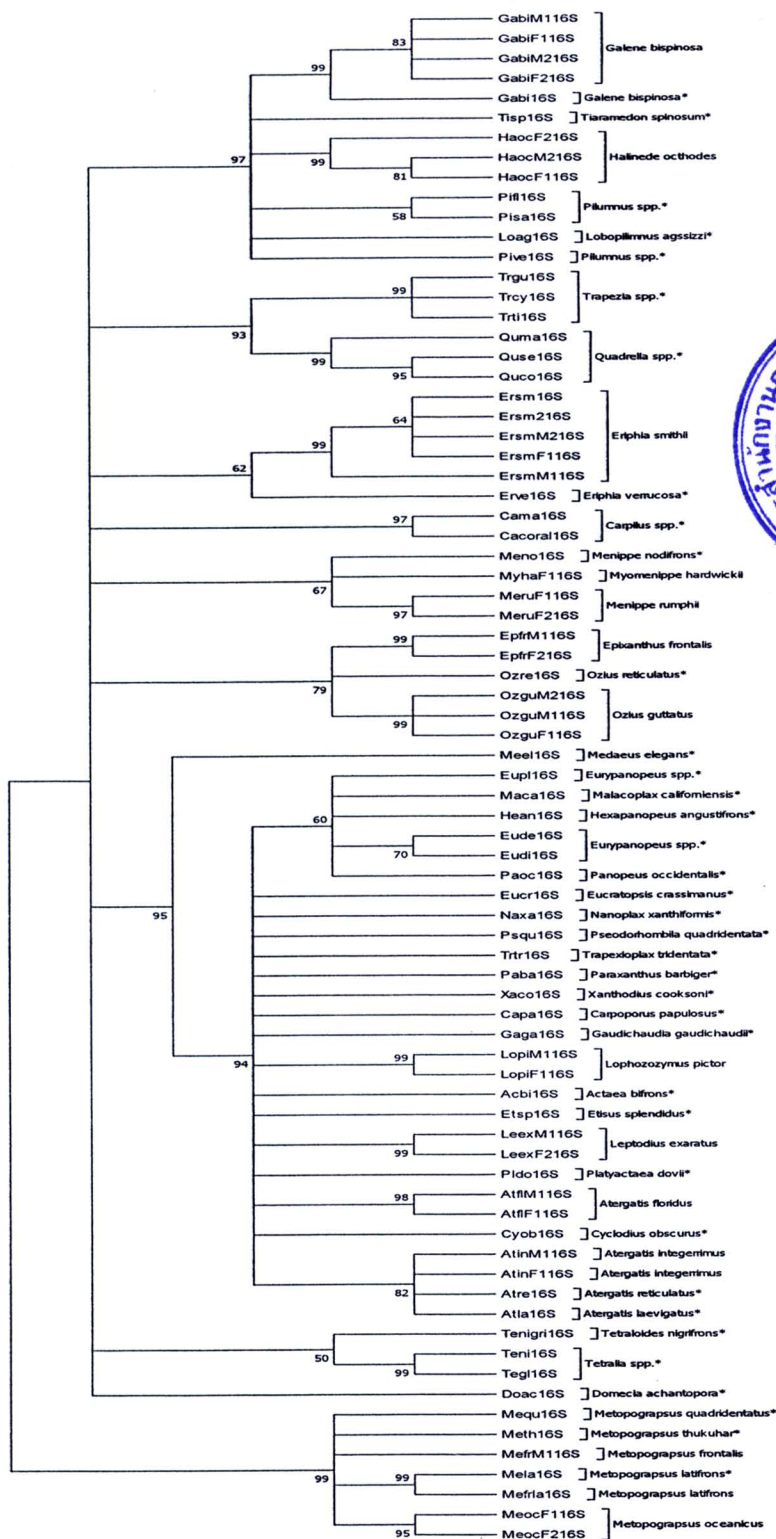
แม้ว่าการจัดกลุ่มใน Superfamily Xanthoidea และ Pilumnoidea จะสอดคล้องกับหมวดหมู่อนุกรมวิธานโดยสัณฐาน ความสัมพันธ์ในระดับ Superfamilies อื่นๆ ยังไม่ชัดเจน โดยที่แผนภูมิฯ ยังไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ของแต่ละ families ได้ดี เช่นใน Superfamilies Eriphioidea, และ Trepezoidea ที่สมาชิกกระจายอยู่คนละกลุ่ม (แม้ว่าจะจัดกลุ่มตาม 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
		<i>Malacoplax californiensis</i>	GU144460.1
	Pseudorhombilidae Alcock, 1900	<i>Pseudorhombila</i>	GU144454.1
		<i>quadridentata</i>	GU144436.1
		<i>Nanoplax xanthiformis</i>	EU863344.2
		<i>Trapezioplax tridentata</i>	
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
		<i>Domecia achantopora</i>	FJ548949.1
	Domeciidae Ortmann, 1893		
	Tetraliidae Castro, Ng & Ahyong, 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 agssizii</i>	EU863402.2
			<i>Tiaramedon spinosum</i>	GU144441.1
	Galenidae Alcock, 1898		<i>Galene bispinosa</i>	GU144444.1
Eriphioidea 1838	MacLeay, 1838	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, 1893	Carpiliidae Ortmann, 1893	<i>Carpilius maculatus</i>	GU144450.1
			<i>Carpilius corallinus</i>	AF503462.1
Grapsoidea 1838	MacLeay, 1838	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