## ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของปูทะเล (*Scylla* spp.) ชนิดต่างๆ

#### Sequence Divergence of Mitochondrial DNA among Mud Crabs, Scylla spp.

#### คำนำ

ปูทะเล (mud crab: Scylla spp.) เป็นสัตว์น้ำเค็มที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง โดยพบว่าในช่วงปี พ.ศ. 2543 - 2545 มีปริมาณปูทะเลที่จับได้ทั้งประเทศถึงประมาณ 16,100,000 กิโลกรัม คิคเป็นมูลค่า ้ล้านบาท โดยมีแนวโน้มของปริมาณปูที่จับได้ลดลงทุกปี คือ ในปี 2543, 2544 และ 2545 มี 1.200 ประมาณที่จับได้เท่ากับ 6.9, 5.4 และ 3.8 ล้านกิโลกรัม ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2549) ปริมาณเฉลี่ยของปูที่ถูกจับในช่วงคังกล่าวคือประมาณ 5,000,000 กิโลกรัมต่อปี ซึ่งเป็นปริมาณที่ ้สูงมาก ปัจจุบันจะเห็นได้ว่า นอกจากปูทะเลที่จับได้จากธรรมชาติบริเวณชายฝั่งทะเลภาคใต้ทั้ง 2 ฝั่ง ้งองประเทศไทยมีปริมาณลคลงแล้ว ขนาคของปูที่จับได้ก็มีขนาคเล็กลงด้วย ซึ่งชี้ให้เห็นว่ากวามอุดม ้สมบูรณ์ของปูทะเลของประเทศไทยกำลังลคลง (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545) คังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ ทั้งหน่วยงานภาครัฐและเอกชนจะต้องให้ความสนใจและเข้ามาจัดการทรัพยากรประมงชนิดนี้อย่าง ้จริงจัง แต่อย่างไรก็ตาม การวางแผนการจัดการปทะเลของประเทศไทยยังคงไม่สามารถคำเนินการได้ ้อย่างครบถ้วนสมบรณ์ เนื่องจากยังขาดข้อมถพื้นฐานที่สำคัญเกี่ยวกับการจำแนกชนิด (species) ซึ่ง ้ตามปกติแล้วความไม่ชัดเจนเกี่ยวกับอนุกรมวิชานจะทำให้แผนการจัคการที่เกิดขึ้นมองข้ามสิ่งมีชีวิต ้บางชนิคไปเนื่องจากสิ่งมีชีวิตชนิคนั้นอาจมีอยู่ในจำนวนน้อย หรือแผนการจัคการคังกล่าวอาจทำให้ ้เกิดการผสมข้ามชนิดขึ้นโดยฝีมือมนุษย์ ซึ่งทำให้ความเหมาะสมในการอยู่รอดของลูกผสมที่เกิดขึ้น ถุดถุง (Frankham et al., 2002)

ปัญหาการจำแนกชนิดของปูทะเลในประเทศไทยเกิดขึ้นมาแล้วเป็นเวลาอย่างน้อย 50 ปี จนกระทั่งปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าปูทะเลในประเทศไทยมีกี่ชนิด แต่ถ้าพิจารณาจากเอกสาร ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องจะพบว่ามีปูทะเลถึง 5 ชนิด ในขณะที่ชาวประมงและเอกสารทางวิชาการหลายๆ ฉบับ กล่าวว่า ปูทะเลในประเทศไทยมี 3 กลุ่มเท่านั้น คือ กลุ่มปูแดง ปูขาวและปูเขียว ซึ่งการวิจัยนี้มี วัตถุประสงค์เพื่อประเมินสถานะการเป็นชนิดของปูทะเลที่รวบรวมจากถิ่นอาศัยทั่วประเทศไทย โดยใช้ ข้อมูลสำหรับการจำแนกชนิดจากแหล่งข้อมูล 3 ประเภทด้วยกันคือ ความแตกต่างของลักษณะภายนอก ความแตกต่างของลักษณะ morphometric และความแตกต่างของลำคับนิวกลีโอไทค์ ซึ่งข้อมูลทั้งหมด น่าจะช่วยสนับสนุนหรือปรับปรุงการจำแนกชนิดของปูทะเลที่มีอยู่ในปัจจุบันให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

## <u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

เพื่อการจำแนกชนิดของปูทะเลในสกุล Scylla ที่พบในประเทศไทย โดยอาศัยข้อมูลจาก ลักษณะภายนอก ลักษณะ morphometric และความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโตคอนเครีย ดีเอ็นเอ

#### การตรวจเอกสาร

#### <u>ชีวประวัติของปูทะเล</u>

ปูทะเลเป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มปูซึ่งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีโครงร่างแข็งห่อหุ้มลำตัว มี รยางค์เชื่อมเป็นข้อต่อ ลักษณะสำคัญของปูที่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนและถือว่าเป็นการ ปรับตัวได้ดีกว่ากลุ่ม decapod อื่นๆ คือ บริเวณส่วนท้องของปู (abdomen) มีการลดรูปลงแล้วพับเข้าไป อยู่บริเวณด้านใต้ของทรวงอก (cephaloghorax) ลักษณะดังกล่าวนับเป็นพัฒนาการที่มีส่วนช่วยให้ปูมี การเคลื่อนไหวได้คล่องตัวมากขึ้น (ชลธี, 2539)

ปูทะเลเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันซึ่งความแตกต่างนี้จะเห็นได้ชัดเจนเมื่อ โดเต็มวัย ปูเพศผู้จะมีก้ามขนาดใหญ่ ส่วนท้อง (abdomen) ประกอบด้วยปล้อง 6 ปล้อง ปล้องที่ 1 มี ลักษณะแคบเล็ก ในขณะที่ปล้องที่ 6 มีฐานกว้างปลายเรียวแคบและได้พัฒนาเป็นแผ่นบางๆ พับติดกับ อกเรียกว่า จับปิ้ง ส่วนเพศเมียมีก้ามเล็ก ปูเพศเมียที่ยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์จับปิ้งจะมีลักษณะเล็กเรียว แต่ จะขยายกว้างเป็นรูปครึ่งวงกลมจนเกือบเต็มหน้าอก มีปลายมนกลม ที่ขอบปล้องมีขนละเอียดทุกปล้อง เพื่อประโยชน์ในการอุ้มไข่เมื่อโตเต็มวัย โดยชาวประมงเรียกปูเพศเมียที่ยังไม่สมบูรณ์เพศนี้ว่า ปูกระ เทย เพราะจับปิ้งมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างปูเพศผู้และปูเพศเมีย (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545)

ปูทะเลมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลในเขต Indo-Pacific นับตั้งแต่ชายฝั่งทะเล ทางด้านตะวันออกของทวีปแอฟริกา เรื่อยมาจนถึงหมู่เกาะโอกินาวาของประเทศญี่ปุ่นรวมถึงบางพื้นที่ ชายฝั่งทะเลในประเทศออสเตรเลียและอีกหลายหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก สำหรับในประเทศไทย พบปูทะเลอาศัยและแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามบริเวณชายฝั่งทะเลทั้งด้านอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นพื้นที่ป่าชายเลนและปากแม่น้ำ โดยถิ่นอาศัยของปูทะเลจะเป็นบริเวณชายฝั่ง ทะเลในเขตน้ำขึ้น-น้ำลง (intertidal zone) ปูทะเลชอบบุครูอาศัยอยู่มากตามริมร่องน้ำ ตามลำกลองในป่า ชายเลน หรือตามริมชายกลองบริเวณปากแม่น้ำ และจะมีจำนวนลดน้อยลงในบริเวณที่ห่างจากพื้นที่ป่า ชายเลนออกไป การขุดรูอาศัยในบริเวณที่มีอาหารธรรมชาติอุดมสมบูรณ์ การขุดรูอาศัยของปูทะเล โดยทั่วไปมีความลึกประมาณ 80 เซนดิเมตร ช่องทางลงของรูปูจะทำมุม 30 องศากับแนวภายนอก นอกจากนั้น ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำภายในรูจะต่ำกว่าภายนอกอีกด้วย รูของปูทะเลที่ สร้างขึ้นนี้จะเป็นโครงสร้างที่ถาวร เป็นที่สำหรับให้ปูทะเลสามารถใช้อยู่อาศัยต่อกันไปได้กราวละ หลายรุ่น (generation) และเป็นประโยชน์ต่อปูทะเลในการป้องกันดัวเองในช่วงเวลาที่มีการลอกคราบ และผสมพันธุ์ (ชลรี, 2539) ปูทะเลที่มีขนาดแตกต่างกันจะมีอาณาเขตและบริเวณของแหล่งอาศัยหากินแตกต่างกัน โดยที่ปู ทะเลที่มีขนาดเล็กหรือเป็นปูที่ยังอยู่ในระยะวัยอ่อน (juvenile) มักจะเข้าไปหลบภัยและอาศัยอยู่ภายใน ป่าชายเลนตามบริเวณลูกลอง บางกรั้งอาจพบปูเหล่านี้หลบอาศัยอยู่ใต้ก้อนหิน พงหญ้าทะเลหรือ สาหร่าย และหลบอยู่ระหว่างรากไม้ชายเลน โดยปูทะเลที่มีขนาดเล็กนั้น ส่วนใหญ่มักจะจับได้จาก บริเวณที่อยู่ลึกเข้าไปในป่าชายเลนใกล้แผ่นดิน ในขณะที่ปูทะเลขนาดใหญ่กว่ามักจะพบตามบริเวณริม ชายป่าใกล้กับทะเล โดยการที่ปูทะเลในวัยที่แตกต่างกันมีบริเวณอยู่อาศัยและบริเวณหาอาหารแตกต่าง กันจะช่วยลดการแก่งแย่งพื้นที่อาศัยและหาอาหารได้เป็นอย่างดี (ชลธี, 2539)

#### อนุกรมวิชานปูทะเล

ปูทะเลถูกจัดอยู่ในสกุล *Scylla* ซึ่งการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานในฐานข้อมูล Taxonomy Browser (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html, 2006) เป็นดังต่อไปนี้

superkingdom	Eukaryota	
kingdom	Metazoa	
phylum	Arthropoda	
subphylum	n Crustacea	L
class	Malaco	straca
subclas	ss Euma	lacostraca
super	rorder Euc	arida
ord	ler De	ecapoda
S	uborder	Pleocyemata
	infreorder	Brachyura
	superfamily	Portunoidea
	family	Portunidae
	genus	Scylla
	species	Scylla olivacea
	species	Scylla paramamosain
	species	Scylla serrata
	species	Scylla tranquebarica

4

ปูทะเลในสกุล Scylla ถูกจัดอยู่ในครอบครัว (family) Portunidae ซึ่งเป็นครอบครัวเดียวกับปูม้า (สกุล Portunus และสกุล Callinectes) ปูหิน (สกุล Thalamita) รวมทั้งปูลาย (สกุล Charybdis) โดย บรรจง และ บุญรัตน์ (2545) ได้นำเสนอประวัติของการจำแนกชนิดปูทะเลในสกุล Scylla ไว้ดังนี้ ปู ทะเลชนิดแรกในสกุล Scylla ได้ถูกจัดจำแนกโดย Dr. Petrus Forskal ซึ่งได้ศึกษาตัวอย่างที่ได้จากเมือง Jiddah (ประเทศซาอุดิอาราเบีย) ในโครงการสำรวจทางสมุทรศาสตร์ในบริเวณทะเลแดงระหว่างปี ค.ศ. 1761 – 1767 โดย Forskal ได้ตั้งชื่อปูตัวอย่างที่พบว่า Cancer serratus แต่ปูตัวอย่างดังกล่าวได้สูญ หายไปขณะที่ส่งกลับไปประเทศเคนมาร์กเพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิง ดังนั้น C. serratus ที่เสนอโดย Forskal จึงไม่มีตัวอย่างใดๆ ให้อ้างอิงมาจนถึงปัจจุบัน ต่อมาในปี ค.ศ. 1789 มีการจำแนกปูทะเลโดย Otto O. Fabricius ซึ่งได้ศึกษาปูทะเลตัวอย่างจากเมือง Traquebar (Tarangambadi) ประเทศอินเดีย โดย ใด้มีการตั้งชื่อปู่ตัวอย่างที่ศึกษาว่า Portunus tranquebaricus แต่ในปี ค.ศ. 1833 de Haan เสนอแนะว่า ปู ้ ตัวอย่างของ Fabricicus น่าจะใช้ชื่อ Scylla serrata ซึ่งให้ความหมายและบอกนิสัยของปชนิคนี้มากกว่า ใช้ชื่อว่า Portunus tranquebaricus เพราะปู่ตัวอย่างมีนิสัยชอบอยู่ในรู คำว่า Scylla ในภาษากรีกหมายถึง สัตว์ประหลาด (monster) ที่อาศัยอยู่ในถ้ำในทะเล หลักจากนั้นอีกประมาณ 20 ปี คือในปี ค.ศ. 1852 Dana จึงได้เสนอว่าปูดังกล่าวควรจะใช้ชื่อว่า Scylla tranquebaricus var. oceanica ในปีต่อๆ มาได้มี ้ผู้สนใจและทำการศึกษาด้านอนุกรมวิชานของปูทะเลที่เกี่บรวบรวมจากบริเวณต่างๆ อีกเป็นจำนวนมาก เช่น ในปี 1899 Alcock ทำการศึกษาปทะเลที่เก็บจากน่านน้ำของอินเดียและทำการตีพิมพ์ผลงานออกมา หลายชิ้น แต่การวิเคราะห์ชนิดของปทะเลก็ยังสับสน เพราะไม่มีตัวอย่างปทะเลที่วิเคราะห์แล้วมาใช้ ้สำหรับเปรียบเทียบและอ้างอิง ต่อมาในปี ค.ศ. 1949 Estampador ทำการศึกษาปูทะเลในน่านน้ำของ ประเทศฟิลิปปินส์ ได้แบ่งปุทะเลออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มแรกเรียกว่า banhawin เป็นกลุ่มปุทะเลที่มี ้นิสัยชอบขุดรูอยู่ในบริเวณป่าชายเลน โดย Estampador ได้เรียกปกลุ่มนี้ว่า S. serrata ส่วนปฏิกกลุ่ม ้เรียกว่า manosain เป็นปที่ไม่อาศัยอยู่ในรแต่ดำรงชีวิตอยู่ในทะเลอย่างอิสระ ปกลุ่มนี้ Estampador ได้ แบ่งออกเป็น 2 ชนิค คือ S. oceanica และ S. tranquebarica สำหรับปทะเล S. serrata ที่อาศัยอย่ในรตาม ้ป่าชายเลนนั้นจะมีบางส่วนมีสีสันแตกต่างไปจาก S. serrata ทั่วๆ ไป โดย Estampador เชื่อว่าปดัง กล่าวคือ S. serrata เช่นกัน แต่ต่างสายพันธ์กับ S. serrata ทั่วๆ ไป ดังนั้นจึงกำหนดชื่อให้ว่า S. serrata var. paramamosain ในระยะแรกรายงานของ Estampador ใด้รับการโต้แย้งจากนักอนุกรมวิธานด้านป มากพอสมควร เพราะลักษณะภายนอกที่ใช้ในการจำแนกที่ Estampador เสนอนั้นอาจเปลี่ยนแปลงไป ใด้ตามสภาพแวคล้อมในบริเวณถิ่นอาศัย แต่ต่อมา Estampador ได้ยืนยันว่าการวิเกราะห์ของเขานั้น ถูกต้อง เพราะปุทะเลทั้งสามชนิดนั้นมีการพัฒนาและการเจริญเติบโตของไข่ น้ำเชื้อตัวผู้ จำนวนและ โครงสร้างของโครโมโซม (chromosome) แตกต่างกัน ซึ่งในปี ค.ศ. 1952 Serene ได้นำหลักเกณฑ์ใน การจำแนกชนิดที่เสนอโดย Estampador ในปี 1949 ไปใช้จัดจำแนกปทะเลในน่านน้ำเวียดนาม และ รายงานผลว่า ปุทะเลที่พบในน่าน้ำของเวียดนามนั้นก็มี 3 ชนิด และ 1 สายพันธ์เช่นเดียวกับปุทะเลที่พบ ในประเทศฟิลิปปินส์ แต่ในปี ค.ศ. 1960 นักอนุกรมวิชานปูทะเลจากประเทศออสเตรเลีย 2 ท่าน คือ Stephenson และ Campbell ได้ตั้งข้อสังเกตและไม่เห็นด้วยกับ Estampador และ Serene โดยเสนอแนะ ว่าปูทะเลที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างกันนั้นเป็นปูทะเลชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ (Fushimi and Watanabe, 1999) ต่อมา Keenan *et al.* (1998) ได้ทำการปรับปรุงการจำแนกชนิดของปูทะเลในสกุล *Scylla* ใหม่ โดยใช้ศึกษาปูทะเลตัวอย่างที่รวบรวมปูจากบริเวณทะเลแดง (Red Sea) และจากบริเวณ Indo – Pacific *Scylla* และได้จำแนกปูทะเลเป็น 4 ชนิดคือ *S. serrata, S. olivacea, S. tranquebarica* และ *S. paramamosain* 

#### 3. การจำแนกชนิดปูทะเลในประเทศไทย

สำหรับการจำแนกชนิดปูทะเลในประเทศไทยนั้น Suvatti (1950) รายงานว่าในประเทศไทยมีปู ทะเลในสกุล *Scylla* เพียงชนิดเดียวคือ *S. serrata* ซึ่งสอดกล้องกับไพบูลย์ (2516) ที่ได้ทำการศึกษา เกี่ยวกับอนุกรมวิชานของปู *Scylla* ในปี พ.ศ. 2514 และพบว่าในประเทศไทยมีปูทะเลอยู่เพียงชนิดเดียว คือ *S. serrata* เช่นเดียวกัน

ชชาติและบูรณ์ (2522) ได้ศึกษาลักษณะภายนอกของปูทะเล (*Scylla* spp.) ที่รวบรวมจาก ้บริเวณใกล้เคียงสถานีประมงจังหวัดจันทบุรี พบว่าสามารถแบ่งตามลักษณะภายนอกออกได้เป็น 3 กลุ่ม ้คือ กลุ่มปูแดง กลุ่มปูเขียวและกลุ่มปูงาว และได้วัดลักษณะของปูตัวอย่างจำนวน 3 ลักษณะคือ ECW, ICW และ FW ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการวัดพบว่า กลุ่มปูขาวและกลุ่มปูแคงจะกล้ายกันเฉพาะ ในลักษณะของหนามขอบกระคอง (ความยาวของ ECW ลบด้วยความยาวของ ICW หรือ ECW - ICW) แต่แตกต่างจากปเขียว โดยพบว่าการวิเคราะห์ ANOVA โดยไม่พิจารณาถึงขนาดของปตัวอย่างให้ค่า F ระหว่างกลุ่มปูเท่ากับ 1,422.883 (df = 2) และเมื่อนำความแตกต่างของขนาดปูตัวอย่างมาร่วมวิเคราะห์ จะให้ค่า F ระหว่างกลุ่มปูเท่ากับ 1,723.612 (df = 2) ส่วนกลุ่มปูแคงและกลุ่มปูเขียวจะคล้ายกันเฉพาะใน ้ลักษณะของความกว้างระหว่างตา (FW) และแตกต่างจากกลุ่มปูขาว ผลการวิเคราะห์ความแตกต่าง ระหว่างกลุ่มโดยวิเคราะห์ ANOVA ที่พิจารณาและไม่พิจารณาขนาดของตัวอย่างพบว่าให้ค่า F เท่ากับ 104.784 (df = 2) และ 720.384 (df = 2) ตามลำคับ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เสนอชื่อวิทยาศาสตร์ของปูแต่ละ กลุ่มที่พบโดยเทียบเคียงสีของปตัวอย่างแต่ละกลุ่มกับรายงานของ Estampador (1949) ไว้ว่า ปแดง (ป คำ) ใค้แก่ S. serrata (Forskal) และ S. serrata paramamosain ปูเขียวได้แก่ S. tranquebarica และ ปูขาว ้ได้แก่ S. oceanica ในขณะเดียวกันก็ได้เสนอเพิ่มเติมว่า ควรมีผลการศึกษาความแตกต่างระหว่างกลุ่มป ้ที่พบในด้านชีวประวัติ อัตราการเจริญเติบโต และการเพาะพันธุ์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาด้าน อนกรมวิธานว่าความแตกต่างเหล่านั้นควรจะจัดอย่ในระดับของชนิดหรือพันธ์ (varieties)

แต่หลังจากนั้นสุรินทร์ (2540) รายงานว่าปูทะเลของไทยมีชนิคเคียวคือ S. serrata แต่มี 3 พันธุ์คือ ปูดำ (ทองคำ) ปูขาว (ทองหลาง) และ ปูเขียว (ทองโหลง)

Naiyanetr (1998) รายงานเกี่ยวกับชนิดปูทะเลว่ามี 2 ชนิดคือ S. serrata และ S. tranquebarica โดย S. serrata พบได้ทั่วไปทั่งทางฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทย ส่วน S. tranquebarica พบได้ เฉพาะฝั่งอ่าวไทย แต่ในปีเดียวกัน Keenan et al. (1998) จำแนกปูทะเล Scylla เป็น 4 ชนิดคือ S. serrata, S. olivacea, S. tranquebarica และ S. paramamosain โดยจากปูตัวอย่างทั้งหมดมีปูทะเลจากประเทศ ไทยทั้งหมด 6 ตัว แบ่งเป็น ปูตัวผู้ 4 ตัวและตัวเมีย 1 ตัวจากจังหวัดตราดได้ถูกจัดจำแนกเป็นชนิด S. paramamosain และ ปูตัวเมีย 1 ตัวจากจังหวัดภูเก็ตได้ถูกจัดจำแนกเป็นชนิด S. olivacea ซึ่งปูทั้ง 2 ชนิด นี้ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย บรรจง และ บุญรัตน์ (2545) ได้กล่าวว่า "รายงานของ Keenan et al. (1998) ได้สร้างความสับสนให้แก่การจัดจำแนกชนิดของปูทะเลของประเทศไทยเหมือนกัน" ขณะเดียวกันก็ได้รายงานว่าปูทะเลของประเทศไทยจำแนกได้เป็น 3 ชนิด คือ ปูดำหรือปูแดง (S. serrata Forskal, 1755) ปูขาวหรือปูทองหลาง (S. oceanica Dana, 1852) และปูเขียว ปูทองโหลงหรือปูลาย (S. tranquebarica Fabricius, 1789) และแข้งผลการจำแนกของ Keenan et al. (1998) ว่าปูตัวอย่างของ S. olivacea ดังกล่าวนี้มีลักษณะภายนอกคล้ายปูดำของไทยซึ่งถูกเรียกว่า S. serrata

ส่วนการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการจำแนกชนิดมีน้อยมาก โดย Fuseya and Watanabe (1996) ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยวิธี allozyme electrophoresis จากปูทะเลตัวอย่างที่รวบรวมตั้งแต่เกาะมาดากัสกาในทวีปแอฟริกาใด้ถึงประเทศญี่ปุ่นในทวีปเอเซีย รวมทั้งจากจันทบุรีและสุราษฎร์ธานีในประเทศไทย และจำแนกปูทั้งหมดตาม Estampador (1949) เป็น 3 ชนิดคือ *S. serrata, S. oceanica* และ *S. tranquebarica* โดยปูตัวอย่างจากประเทศไทยจำแนกได้ 2 ชนิด คือ *S. serrata* และ *S. tranquebarica* ซึ่งทั้ง 2 ชนิดเก็บตัวอย่างได้จากจังหวัดจันทบุรีและสุราษฎร์ ธานี ผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) จากข้อมูล allozyme 11 ชนิดพบว่ามี ค่าเฉลี่ย 0.059 ผู้วิจัยสรุปว่าข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic distance) จากข้อมูล allozyme 11 ชนิดพบว่ามี การจำแนกชนิดปูของ Estampador (1949) นอกจากนี้ Klinbunga *et al.* (2000) ได้เก็บตัวอย่างปูจาก จังหวัดตราดและจันทบุรี โดยได้จำแนกชนิดของปูตัวอย่างตาม Estampador (1949) เป็น 3 ชนิดคือ *S. serrata* (ปูแดง), *S. oceanica* (ปูขาว) และ *S. tranquebarica* (ปูเขียว) และวิเคราะห์ Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมราม (genetic distance) ระหว่างชนิดคังกล่าว ตั้งแต่ 0.425 – 0.751 ในขณะที่ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรภายในชนิดอยู่ระหว่าง 0.171 – 0.199 ผลการสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์เริงวิวัฒนาการจากระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้ โดยวิธี neighbor-joining แสดงให้เห็นว่าปูตัวอย่างแยกสายวิวัฒนาการออกเป็น 3 กลุ่มอย่างจัดเจน นอกจากนี้เมื่อพิจารณา genotype ของ RAPD ที่พบในปูตัวอย่างพบว่า ปูตัวอย่างแต่ละชนิคมี genotype ที่ไม่ปรากฏในปูชนิคอื่น ซึ่งเป็นหลักฐานแสดงให้เห็นว่า ไม่มีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม (genetic exchange) ระหว่างปูทั้ง 3 ชนิคคังกล่าว คังนั้นจึงสรุปว่า ปูทะเลในบริเวณจังหวัคตราคและจันทบุรีมี 3 ชนิค

จากรายงานทั้งหมดที่กล่าวถึงแสดงให้เห็นว่า จากอดีตถึงปัจจุบันยังคงไม่มีความชัดเจนเกี่ยวกับ อนุกรมวิธานของปูทะเลที่พบในประเทศไทยใน 2 ประเด็นคือ ประเด็นที่ 1 เกี่ยวกับจำนวนชนิดของปู ทะเล จะเห็นได้ว่าจำนวนชนิดของปูทะเลที่เคยมีรายงานในประเทศไทยมีตั้งแต่ 1 ชนิดไปจนถึง 3 ชนิด ความไม่ชัดเจนประเด็นที่ 2 เกี่ยวข้องกับเรื่องชื่อวิทยาศาสตร์ของปูทะเล เมื่อรวบรวมชื่อวิทยาศาสตร์ ของปูทะเลที่เคยมีรายงานในประเทศไทยจะพบว่ามีถึง 5 ชื่อ คือ *S. serrata, S. oceanica, S. tranquebarica, S. olivacea* และ *S. paramamosain* แต่บรรจงและบุญรัตน์ (2545) และ Klinbunga *et al.* (2000) รายงานไว้เพียง 3 ชนิด คือ *S. serrata, S. oceanica* และ *S. tranquebarica* ซึ่งรายงานทั้ง 2 ฉบับ ดังกล่าวนี้ตรงกับข้อมูลจากชาวประมงที่ว่ามีปูทะเลที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างกันอยู่ 3 กลุ่มเช่นกัน ขณะเดียวกัน บรรจงและบุญรัตน์ (2545) ได้ตั้งข้อสังเกตว่า ปู *S. olivacea* มีลักษณะคล้ายคลึงกับปูดำ (ซึ่งถูกเรียกโดยรายงานหลายฉบับว่า *S. serrata*) ดังนั้นปัญหาเรื่องการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์ก็เป็น เรื่องที่ต้องมีการกำนึงถึงและศึกษาทบทวนเช่นกัน

สำหรับปัญหาความไม่ชัดเจนเกี่ยวกับจำนวนชนิดของปูทะเลในประเทศไทยนั้นน่าจะมีสาเหตุ มาจาก 2 เหตุผลหลักคือ ตัวอย่างปูที่ใช้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่จะเป็นปูตัวอย่างจากฝั่งทะเล อ่าวไทย โดยมากเป็นปูทะเลจากเขตจังหวัดตราดและจันทบุรีเป็นหลัก ส่วนปูทะเลจากจังหวัดอื่นๆ โดยเฉพาะปูทะเลจากฝั่งอันดามันมีข้อมูลน้อยมาก เหตุผลอีกประการคือ การจัดจำแนกส่วนใหญ่ใช้ ข้อมูลจากลักษณะภายนอกเป็นหลัก รายงานการใช้ข้อมูลจากแหล่งอื่นที่มีประโยชน์ในการจัดจำแนก สิ่งมีชีวิต เช่น ความแตกต่างของลักษณะ morphometric หรือ ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ยังคงมีน้อยอยู่

## 4. <u>การประเมินสถานะความเป็นชนิดของสิ่งมีชีวิต</u>

เพื่อสร้างความชัดเจนเกี่ยวกับการจำแนกชนิดของปูทะเลในประเทศไทยจำเป็นจะต้องประเมิน สถานะของปูทะเลแต่ละกลุ่มที่พบในประเทศไทยว่าควรจัดเป็นชนิดหรือไม่ ซึ่งในการประเมินว่า สิ่งมีชีวิตตัวอย่างกลุ่มหนึ่งๆ ควรกำหนดให้มีสถานะเป็นชนิดหรือไม่นั้นสามารถพิจารณาได้โดยอาศัย กำจำกัดความของกำว่าชนิดซึ่งกำจำกัดดังกล่าวจะเรียกว่า species concept (Hey, 2000) จากอดีตถึง ปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์ได้การเสนอคำจำกัดความไว้เป็นจำนวนมาก ซึ่งคำจำกัดความที่แตกต่างกันก็ จะมีประเด็นในการพิจารณาแตกต่างกัน แต่คำจำกัดความเหล่านั้นจะอยู่บนหลักการสำคัญประการใด ประการหนึ่งดังต่อไปนี้

หลักการที่ 1. การสืบเชื้อสายมาจากค้นตระกูลเดียวกัน (common descent) ตามหลักการนี้ สมาชิกของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะต้องสืบเชื้อสาย หรือมีค้นกำเนิดมาจากประชากรที่เป็นบรรพบุรุษ ร่วมเดียวกัน (แต่ไม่จำเป็นต้องสืบเชื้อสายมาจากพ่อแม่กู่เดียวกัน)

หลักการที่ 2. กลุ่มที่เล็กที่สุดที่สามารถแบ่งแยกใด้ (smallest distinct grouping) สมาชิกของ สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันต้องมีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของกลุ่มร่วมกัน

หลักการที่ 3. การเป็นกลุ่มสังคมที่มีการผสมพันฐ์กันได้ภายในกลุ่ม (reproductive community) ซึ่งตามหลักการนี้จะสามารถใช้จำแนกได้เฉพาะสิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเท่านั้น โดยสิ่งมีชีวิต ชนิดเดียวกันจะสามารถผสมพันธุ์กันได้เฉพาะกับสมาชิกภายในชนิดเดียวกันเท่านั้น และจะไม่ผสม พันธุ์กับสมาชิกของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

ซึ่งคำจำกัดความของนักวิทยาศาสตร์แต่ละท่านก็มีจุดเด่นจุดด้อยแตกต่างกันไป ในการให้ ความหมายของคำว่า "species" (Mayr, 1964; Ayala, 1978; Mallet, 1995; Avise and Wollenberg, 1997) ดังจะขอกล่าวถึงคำจำกัดความของนักวิทยาศาสตร์บางท่านเพื่อจะใช้เป็นแนวทางการพิจารณาสถานะ ความเป็นชนิดของปูทะเลในการศึกษาครั้งนี้

The morphological species concept ได้ให้กำจำกัดกวามของกำว่า species ไว้ว่า "species กือ กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะภายนอกเหมือนหรือกล้ายกัน" ("A species is a group of individuals or populations with the same or similar morphological characters.") ข้อมูลที่ใช้ในการจัดจำแนกคือ ลักษณะภายนอกของสิ่งมีชีวิตตัวอย่าง โดยสิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่ในชนิดเดียวกัน ต้องมีลักษณะภายนอกที่ ปรากฏเป็นเอกลักษณ์ร่วมกันเฉพาะกลุ่มและลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์นั้นจะต้องแตกต่างจากลักษณะที่ เป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ซึ่งคำจำกัดกวามของกำว่าชนิดดังกล่าวนี้ คือกวามรู้พื้นฐานที่ Carl Linnaeus (May 23, 1707 – January 10, 1778) ใช้ในการพัฒนากวามรู้ทางด้าน Systematic ของสิ่งมีชีวิต (Mayr, 1964)

The genetic species concept (Lotsy, 1918 อ้างโดย Mayr, 1964) ได้ให้คำจำกัดความของคำว่า species ไว้ว่า "species คือ กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน" ("A species is a group of genetically identical individuals") ซึ่งถ้าพิจารณาแนวคิดนี้อย่างเคร่งครัดจากข้อมูลทางพันธุกรรมแล้ว ้จะพบว่ามีความผิดพลาดอย่างชัดเจน นั้นคือ พันธุกรรมของกลุ่มสิ่งมีชีวิตในระดับต่ำกว่าชนิด (species) ทั้งในระดับ subspecies หรือ ประชากร (Mayr, 1964) หรือแม้แต่ในระดับแต่ละบุคคล (Jeffreys et al., 1985) ก็มีความแตกต่างกันทั้งสิ้น ดังนั้นถ้าจะพิจารณา genetic species concept จากข้อเท็จจริงดังกล่าวก็ ้น่าจะพิจารณาโดยใช้กำว่า "คล้ายคลึง" (similarity) แทนการใช้กำว่า "เหมือน" (identical)โดยกวาม กล้ายกลึงทางพันธุกรรมสามารถแปลความหมายได้จากก่า genetic divergence หรือก่าระยะห่างทาง พันธุกรรม (genetic distance) ถ้ำ genetic divergence หรือระยะห่างทางพันธุกรรมมากแสดงว่ามีความ กล้ายกลึงทางพันธุกรรมน้อย ในทางตรงข้าม หากก่า genetic divergence หรือก่าระยะห่างทาง พันธุกรรมมีค่าน้อยก็แสดงว่ามีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมาก โดย Bradley and Baker (2001) ได้ แสดงให้เห็นระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของยืน Cytb ระหว่างชนิดภายในสกุลเดียวกันของหนู ้ จำนวน 4 สกุล และก้างกาว 7 สกุล ซึ่งในกรณีของยืน Cytb พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมซึ่งแสดง ในรูปของค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่น้อยกว่า 2% (< 2%) จะเป็นความแตกต่างภายในชนิด (ซึ่งไม่มี การแบ่งแยกประชากรภายในชนิค) ถ้าอยู่ระหว่าง 2% ถึง 11% เป็นความแตกต่างระหว่างประชากร ภายในชนิคเคียวกัน (conspecific population) แต่ถ้ามากกว่า 11% จะเป็นความแตกต่างระหว่างชนิค ซึ่ง ้จากข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้เห็นได้ว่า ระยะห่างทางพันธุกรรมที่มากกว่า 11% ของยืน Cytb สามารถใช้ใน การกำหนดสถานะความเป็นชนิดในกลุ่มหนูและค้างคาวได้ตาม genetic species concept

The biological species concept (Mayr, 1964) ให้คำจำกัดความของคำว่า species ไว้ว่า "species คือ กลุ่มที่มีการผสมพันธุ์กันภายในกลุ่มและ ไม่มีการผสมกับกลุ่มอื่น" ("Species are groups of actually or potentially interbreeding natural populations, which are reproductively isolated from other such groups.") การประเมินสถานะความเป็นชนิดตาม biological species concept มีประเด็นที่ต้อง พิจารณา 2 ประการคือ ประเด็นของคำว่า "interbreeding" และ "reproductive isolate" ตามคำจำกัดความ ดังกล่าวนี้ สิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งๆ จะถูกจัดเป็นชนิดกีต่อเมื่อสมาชิกของกลุ่มสามารถผสมพันธุ์กันได้ เฉพาะกับสมาชิกภายในกลุ่มเดียวกันและจะไม่ผสมพันธุ์กับสมาชิกของกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ถึงแม้ว่า biological species concept จะพิจารณาความเป็นชนิดจากคุณสมบัติเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ (reproductive proporties) ของสิ่งมีชีวิตตัวอย่าง แต่ถ้ามีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่ากลุ่มของสิ่งมีชีวิตดัวอย่างที่ศึกษาไม่ มีหรือไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ตามธรรมชาติระหว่างกลุ่มแล้ว กลุ่มสิ่งมีชีวิตดังกล่าวก็สามารถ จัดเป็นสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันได้เช่นกัน โดยหลักฐานที่ใช้อาจเป็นลักษณะภายนอก จำนวนหรือรูปร่าง โครโมโซม หรือข้อมูลจากการวิเคราะห์พันธุศาสตร์โมเลกุล สำหรับการใช้ข้อมูลพันธุศาสตร์โมเลกุล จะอยู่บนหลักการที่ว่า สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีการผสมพันธุ์กันได้ภายในกลุ่ม (หรืออยู่ใน reproductive community เดียวกัน) ซึ่งทำให้สมาชิกภายในกลุ่มมีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันหรือมี พันธุกรรมที่ปะติดปะต่อกัน (genetic cohesiveness) ดังนั้น ถ้าพิจารณาความแตกต่างทางพันธุกรรม ภายในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจะเกิดขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปและ ต่อเนื่อง (smooth and continuous) ในขณะที่สิ่งมีชีวิตที่อยู่ต่าง reproductive community กันจะมีความ แตกต่างทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงแบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous) อย่างเห็นได้ชัด (Hickman *et al.*, 1993)

The phylogenetic species concept (Cracraft, 1983 อ้างโดย Cracraft, 1992; Avise and Wollenberg, 1997) ได้ให้จำกัดความของคำว่า species ไว้ว่า "species คือ กลุ่มที่เล็กที่สุดที่ภายในกลุ่มมี รูปแบบของความเป็นพ่อแม่ของบรรพบุรุษและลูกหลาน" ("the smallest diagnosable cluster of individual organisms within which there is a parental pattern of ancestry and descent") คำจำกัดความ ้ดังกล่าวนี้จะกำหนดให้สิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งๆ มีสถานะเป็นชนิดถ้าสิ่งมีชีวิตกลุ่มนั้นมีลักษณะที่ปรากฏ และได้รับการถ่ายทอดร่วมกัน (synapomorphic character หรือ shared - derived character) มาจาก บรรพบุรุษร่วมเดียวกัน รูปแบบความสัมพันธ์ภายในชนิดตาม phylogenetic species concept จะเป็น แบบ monophyletic group (Avise and Wollenberg, 1997) ซึ่งรูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่ม สิ่งมีชีวิตจะเป็นไปได้ใน 3 รูปแบบ คือ mohophyly, paraphyly หรือ polyphyly โดยความสัมพันธ์แบบ monophyly จะเป็นรูปแบบที่สมาชิกทั้งหมดสืบเชื้อสายมาจากบรรพบุรุษร่วมถ่าสุดในสายวิวัฒนาการ (most recent common ancestor) เดียวกัน (ภาพที่ 1 ก.) ความสัมพันธ์แบบ paraphyly จะเป็นรูปแบบ ้ความสัมพันธ์ที่สมาชิกทั้งหมดมีบรรพบรุษร่วมล่าสุดในสายวิวัฒนาการร่วมกัน แต่มีการแยกสาย ้ วิวัฒนาการระหว่างสมาชิกภายในกลุ่มอย่างน้อย 2 สาย (ภาพที่ 1 ข.) และความสัมพันธ์แบบ polyphyly ้ คือความสัมพันธ์ของกล่มสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบรษร่วมล่าสดในสายวิวัฒนาการอย่ต่างสายวิวัฒนาการกัน (ภาพที่ 1 ค.) ซึ่งความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตจะเป็นแบบใคแบบหนึ่งใน 3 แบบคังกล่าว (Hickman et al., 1993)



<u>ภาพที่ 1</u> แสดงแผนภาพจำลองความสัมพันธ์แบบ monophyly(ก.) paraphyly (ข.) และ polyphyly (ค.) ของสิ่งมีชีวิต

ที่มา: ภาพคัคแปลงจาก Hickman et al. (1993)

สำหรับการประเมินสถานะความเป็นชนิดของปูทะเลในอดีตส่วนใหญ่จะอาศัยข้อมูลจาก ลักษณะภายนอกเป็นหลัก ซึ่งก็จะประเมินตามคำจำกัดความ morphological species นั้นเอง อย่างไรก็ ตามยังมีข้อมูลที่จากแหล่งอื่นที่มีศักยภาพในการประเมินสถานะความเป็นชนิดอีก 2 แหล่งคือ ความ แตกต่างของลักษณะ morphometric และความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยืนในไมโตคอน เดรียดีเอ็นเอ

## 5. การศึกษาความแตกต่างของลักษณะ morphometric เพื่อการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต

ถึงแม้ว่าการจัดจำแนกโดยใช้ข้อมูลลักษณะ morphometric จะถือได้ว่าเป็นการจัดจำแนกจาก ้ลักษณะภายนอก แต่ข้อมูลที่ใช้แตกต่างกันคือ การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะภายนอกเป็นข้อมูลที่ได้จาก การสังเกตการปรากฏหรือไม่ปรากฏของลักษณะที่เกี่ยวข้องในการจัดจำแนก หรืออาจสังเกตุจากกวาม แตกต่างของลักษณะที่ปรากฏ แต่ข้อมูลลักษณะ morphometric เป็นข้อมูลลักษณะภายนอกที่ได้จากการ ้วัดความยาวหรือความสูงของลักษณะที่สนใจ โดยลักษณะ morphometric เป็นลักษณะปริมาณซึ่งเมื่อ วิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติแล้วสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิด (Luthy et al., 2004) เช่น Parnaby (2002) จำแนกค้างคาวชนิดใหม่ในสกุล Nyctophilus โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric ด้วยวิธี Canonical Variate Analysis (CVA) โดยใช้ข้อมูลที่วัดจากกะโหลกและฟันจาก ้ตัวอย่างก้างกาวในที่ถูกจัดไว้ในสกุล Nyctophilus แต่มีลักษณะภายนอกแตกต่างจากก้างกาวในสกุล เดียวกัน เปรียบเทียบกับค้างคาวอีก 2 ชนิดในสกุลดังกล่าวคือ N. bifax และ N. gouldi ผลการวิเคราะห์ CVA ซึ่งแสดงโดยการเขียนกราฟของตัวแปร CVA 1 และ CVA2 แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่าง ้ถักษณะ morphometic ระหว่างกลุ่มตัวอย่างให้เห็นอย่างชัดเจน โดยได้แสดงให้เห็นกลุ่ม (cluster) ที่ แตกต่างกัน 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างจาก N. bifax กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างจาก N. gouldin และกลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มของตัวอย่างที่น่าจะเป็นชนิคใหม่ของ Nyctophilus จากผลการแยกกลุ่ม ที่ได้ ทำให้มีการเสนอให้ตัวอย่างดังกล่าวเป็นชนิดใหม่กือ N. nebulosus (grouping) ในสกล Nyctophilus นอกจากนี้ Luthy et al. (2005) ได้แสดงความแตกต่างของตัวอ่อน (larva) ของปลา 3 ชนิด คือ sailfish (Istiophorus platypterus), white marlin (Tetrapturus albidus) และ blue marlin (Makaira nigricans) ซึ่งมีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งปลาทั้ง 3 ชนิคเป็นเป็นสมาชิกของครอบครัว (family) Istiophoridal ซึ่งสมาชิกของปลาครอบครัวนี้จะจำแนกความแตกต่างของตัวอ่อนโคยใช้ ้ลักษณะภายนอกได้ยากมาก โดยได้วิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric 6 ลักษณะ ด้วย ้ วิธี CVA ผลที่ได้ซึ่งแสดงโดยการเขียนกราฟระหว่างตัวแปร CVA1 และ CVA2 พบว่าได้ให้เห็นกลุ่ม (cluster) จำนวน 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสมาชิกของปลา blue malin กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ้สมาชิกของของปลา blue malin และ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสมาชิกของปลา sailfish ซึ่งผลที่ได้นี้แสดง ให้เห็นว่าการวิเคราะห์ข้อมลลักษณะ morphometric ด้วยวิธี CVA สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง ้สิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ นอกจากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลาแล้ว ยังพบว่า ลักษณะ mophometric สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างชนิคในสัตว์เลื้อยคลานได้เช่นกัน โดย Malhotra et al. (2004) ใช้การวิเคราะห์ลักษณะ morphometric แสดงความแตกต่างของงู 3 ชนิด คือ Trimeresurus vogeli (ชนิคใหม่ของสกุล Trimeresurus), T. gumprechti และ T. stejnegeri โดยใช้ทั้งข้อมูลที่วัดจาก ้อวัยวะภายนอกและอวัยวะภายใน ผลการวิเคราะห์ CVA ที่แสดง โดยกราฟของตัวแปร CVA1 และ

CVA2 แสดงให้เห็นกลุ่ม 3 กลุ่มตามชนิดของงูอย่างชัดเจน คือ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มตัวอย่างจาก T. vogeli กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มตัวอย่างจาก T. gumprechti และ กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มของตัวอย่างจาก T. stejnegeri โดย ผลจากการใช้เฉพาะข้อมูลจากอวัยวะภายนอกอย่างเดียวคล้ายกลึงกับผลการวิเคราะห์ที่ใช้ข้อมูลทั้งจาก อวัยวะภายนอกและอวัยวะภายในร่วมกัน

สำหรับการใช้ข้อมูลลักษณะ morphometric เพื่อการจำแนกความแตกต่างระหว่างปูทะเลที่มี ลักษณะภายนอกต่างกัน 2 กลุ่มคือ ปูดำ ("black" morph) กับปูขาว ("white" morph) ที่เก็บตัวอย่างจาก 4 บริเวณในเอเซียตะวันออกเฉียงใด้ พบว่าสามารถจำแนกปูออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ปูขาวจาก จังหวัดสุราษฎร์ ธานีและเวียตนาม กลุ่มที่ 2 ปูดำจากจังหวัดระนองและมาเลเซีย และกลุ่มที่ 3 ปูดำจาก จังหวัดสุราษฎร์ ธานี ผลการศึกษาที่ได้นี้ยืนยันการแบ่งกลุ่ม (grouping) อย่างชัดเจนเฉพาะกลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2 ส่วนปูกลุ่มที่ 3 น่าจะเป็นตัวกลายพันธุ์ของปูกลุ่มที่ 1 มากกว่าจะเป็นชนิดที่สาม (Overton *et al.*, 1997) นอกจากนั้น (Keenan *et al.*, 1998) ได้แสดงให้เห็นผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างปูที่ ถูกจัดจำแนกออกเป็น 4 ชนิด คือ *S. serrata*, *S. olivacea*, *S. tranquebarica* และ *S. paramamosain* โดย ใช้ข้อมูลลักษณะ morphometric พบว่าสามารถจำแนกออกได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้ จากลักษณะภายนอกและความแตกต่างของลำดับนิวกลีโอไทด์

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ข้อมูลจากลักษณะ morphometric ที่ได้จากการวัดความยาว อวัยวะน่าจะมีประโยชน์ในการนำมาใช้เพื่อการจำแนกชนิดปูทะเลที่พบในประเทศไทย โดยวิธีการ วิเคราะห์ข้อมูลลักษณะ morphometric ที่มีประสิทธิภาพคือ การวิเคราะห์ Canonical Variate Analysis (CVA) ซึ่ง 2 วิธีดังกล่าวสามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตทั้งในระดับชนิดและระดับ ประชากร (population) การวิเคราะห์ CVA เป็นการวิเคราะห์เพื่อการจำแนกกลุ่มของตัวอย่างด้วยข้อมูล จากตัวแปรหลายหลายตัวแปร ตัวแปรที่ใช้อาจเป็นข้อมูลที่ได้จากการนับจำนวนหรือการวัดความยาว จากตัวอย่างที่ศึกษา การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี CVA จะดำเนินการโดยการสร้างตัวแปรใหม่ซึ่งเรียกว่า canonical variable ด้วยสมการ canonical discriminant function ซึ่งจะทำการรวมเอาข้อมูลจากตัวแปรที่ เกี่ยวข้องกับการจำแนกกลุ่มเข้าด้วยกัน สมการ canonical discriminant function เป็นดังนี้

#### $\mathbf{Z} = \mathbf{a}_1 \mathbf{x}_1 + \mathbf{a}_2 \mathbf{x}_2 + \ldots + \mathbf{a}_p \mathbf{x}_p$

เมื่อ Z คือตัวแปรใหม่ที่ถูกสร้างขึ้น (Canonical variable); a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>, ..., a<sub>p</sub> คือ สัมประสิทธิ์ของ สมการการจำแนกกลุ่ม; x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub>, ..., x<sub>p</sub> คือ ตัวแปรที่ให้ข้อมูลในการจำแนกกลุ่ม จำนวน canonical discriminant function เท่า กับ k-1 เมื่อ k คือ จำนวนกลุ่มอย่างที่ศึกษา ตัวแปร canonical variable ที่ถูก สร้างขึ้นจากสมการที่ 1 (CVA1) และสมการที่ 2 (CVA2) จะถูกนำไปเขียนกราฟเพื่อแสดงความ แตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (Jobson, 1992)

#### 6. การศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอเพื่อการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต

ไมโตกอนเครียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) ในสัตว์เป็นดีเอ็นเอเกลียวกู่มีโครงสร้างเป็น วงกลมปลายปิด (Nass, 1966) ยกเว้นไมโตกอนเครียเครียจีโนมของพารามีเซียม (Paramecium aurelea) ที่เป็นดีเอ็นเอเกลี่ยวกู่ที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (Pritchard et al., 1990) ขนาดของไมโตกอนเครียจีโนม ในสัตว์ตามปกติแล้วจะมีขนาดประมาณ 16 kb ประกอบด้วย 37 ยืน โดยเป็นยืนกำหนดรหัส rRNA 2 ยืน กำหนดรหัส โปรดีนจำนวน 13 ยืน และกำหนดรหัส tRNA จำนวน 22 ยืน (Boore, 1999) ข้อมูลที่ได้ จากถำดับนิวกลีโอไทด์ในไมโตกอนเครียดีเอ็นเอถูกใช้ประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิง วิวัฒนาการและพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ เนื่องจากไมโตกอนเครียดีเอ็นเอจะมีการวิวัฒนาการที่ เร็วกว่ายืนในนิวเกลียส ทำให้ผลการศึกษาสามารถตรวจพบความแตกต่างจากตัวอย่างที่ศึกษาแม้จะเกิด การเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (Ferris et al.,1981) ไมโตกอนเครียดีเอ็นเอสามารถแยกสกัดได้ง่ายและ ส่วนใหญ่แล้วจะมีปริมาฉดีเอ็นเอที่สกัดได้จำนวนมากพอที่จะใช้ในศึกษา นอกจากนี้ไมโตกอนเครีย ดีเอ็นเอมีการถ่ายทอดผ่านเฉพาะทางแม่และตามปกติแล้วจะเกิด recombination น้อยมาก ทำให้ เหมาะสมในการใช้เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอโดยเฉพาะดำแหน่งของยืน tRNA ก็สามารถใช้ เป็นประโยชน์ได้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนากรในระดับสูงขึ้นเช่น ระดับไฟลั่ม (phylum) เป็นดัน (Dowling et al., 1996)

ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ข้อมูลจากไมโตกอนเดรียดีเอ็นเอนั้นพบว่าการศึกษา ส่วนใหญ่มักจะใช้ข้อมูลจากลำดับนิวกลีโอไทด์บางส่วนหรือลำดับนิวกลีโอไทด์ทั้งหมดของยืนใดยืน หนึ่ง โดยยืนที่มีการใช้กันโดยทั่วไปคือ ยืน cytochrome b (Cytb), cytochrome c oxidase subunit I (COI), 16S ribosomal RNA (16S rRNA) ซึ่งข้อมูลลำดับนิวกลีโอไทด์ของยืนดังกล่าวจะถูกใช้เพื่อการ วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิตตัวอย่าง ผลที่ได้จากการวิเคราะห์จะนำไปสู่การ ประเมินสถานะความเป็นชนิดได้ในที่สุด เช่น กรณีความสับสนเนื่องจากการจัดจำแนกโดยข้อมูล ลักษณะภายนอกของกุ้งสกุล Farfantepenaeus โดยพบว่ามีการจัดกุ้ง 2 กลุ่มที่มีลักษณะภายนอก กล้ายกันเป็นกุ้งชนิดเดียวกัน คือ F. subtilis และ F. subtilis morphotype II ผลการศึกษาความแตกต่าง ของลำดับนิวกลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าความแตกต่างของลำดับ นิวกลีโอไทด์ภายในกุ้ง F. subtilis และ F. subtilis morphotype II มีค่าประมาณ 0.002 และ 0.004 ตามลำดับ ส่วนความแตกต่าง

้ของลำคับนิวคลีโอไทค์ระหว่างกุ้ง 2 กลุ่มคังกล่าวอยู่ที่ประมาณ 0.04 ในขณะที่ความแตกต่างระหว่าง สกุลเมื่อเปรียบเทียบ Farfantepenaeus กับสกุลอื่นๆ จะอยู่ในช่วงประมาณ 0.085 – 0.13 ซึ่งเมื่อ เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันฐกรรมภายใน F. subtilis หรือ F. subtilis morphotype II กับความ แตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง F. subtilis กับ F. subtilis morphotype II แล้วจะพบว่ามีค่าแตกต่างกัน ้ประมาณ 10 – 20 เท่า ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบนี้แสดงให้เห็นความไม่ต่อเนื่องของความแตกต่างทาง พันธุกรรมภายในกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างชัคเจน ซึ่งความไม่ต่อเนื่อง ดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่ากุ้งทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีการผสมพันฐ์กันระหว่างกลุ่มหรืออยู่ต่าง reproductive community กันนั้นเอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งทั้ง 2 กลุ่ม (F. subtilis และ F. subtilis morphotype II) เป็นกุ้งต่างชนิด กันตาม biological species concept (Maggioni et al., 2001) นอกจากนี้ยังสามารถพบการศึกษาลักษณะ เดียวกันในสัตว์มีกระดูกสันหลังได้เช่นกัน คือจากการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของชิ้นดีเอ็นเอ ที่ประกอบด้วยหลายยืนซึ่งครอบคลุมตั้งแต่ยืน Cytb จนถึง 16S rRNA ในไมโตคอนเครียจีโนมของปลา coelacanth ที่มีถิ่นอาศัยต่างกัน 2 กลุ่มคือกลุ่มหนึ่งอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งของทวีปแอฟริกา ส่วนอีกกลุ่ม อาศัยอยู่ในบริเวณน่านน้ำประเทศอิน โดนีเซีย พบว่าปลาทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างของลำคับนิวคลี ้โอไทด์ประมาณ 4% ในขณะที่ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายกลุ่มประชากรที่มีถิ่นอาศัยในทวีปแอฟ ริกาน้อยมาก (Schliewen et al., 1993) ผลที่ได้นี้ก็แสดงให้เห็นความไม่ต่อเนื่องของความแตกต่างทาง พันธุกรรมภายในกับระหว่างกลุ่มเช่นกัน ซึ่งผลที่ได้นำไปสู่ข้อสรุปว่าปลาทั้ง 2 กลุ่มนี้ไม่มีการผสม พันธุ์ข้ามกลุ่มกัน ดังนั้นปลาทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวจึงเป็นปลาต่างชนิดกันตาม biological species concept (Holder et al., 1999)

ดังนั้นจากที่กล่าวมาพบว่า ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตจากข้อมูลความแตกต่างทาง พันธุกรรมสามารถพิจารณาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มเปรียบเทียบกับความแตกต่าง ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม ถ้าความแตกต่างดังกล่าวเห็นได้อย่างชัดเจน (จากกรณีกุ้ง F. subtilis และ F. subtilis morphotype II ความแตกต่างดังกล่าวต่างกันประมาณ 10 – 20 เท่า) ก็จะกำหนดให้สิ่งมีชีวิตทั้ง สองกลุ่มดังกล่าวเป็นสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน หรืออาจประเมินจากการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม ระหว่าง กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ถ้าไม่มีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มก็แสดงให้เห็นว่าไม่มีการผสม พันธุ์กันระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ดังนั้นแต่ละกลุ่มตัวอย่างก็ควรถูกจัดให้มีสถานะเป็นชนิด เช่นในกรณีที่ Klinbunga et al. (2000) ศึกษา RAPD ของปูทะเล 3 กลุ่มจากภาคตะวันออกของประเทศไทยแล้วพบว่า ไม่ปรากฏ genotype ของ RAPD ร่วมกันระหว่างกลุ่มปู ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีการแลกเปลี่ยน พันธุกรรมระหว่างกลุ่มปู ซึ่งทำให้มีข้อสรุปว่า ปูทะเลในบริเวณดังกล่าวประกอบด้วยปู 3 ชนิด ซึ่งทั้ง ข้อมูลความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในและระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ร่วมทั้งข้อมูลการแลกเปลี่ยนทาง พันธุกรรมเป็นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มตัวอย่าง

อย่างไรก็ตาม นอกจากยืน Cvtb, COI, 16S rRNA แล้วยังพบว่าพบว่ายืน NADH dehydrogenase subunit 1 (NDI) ก็สามารถแสดงความแตกต่างของถำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตและ ้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิตตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน โคยข้อคื ของยืน ND1 จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้คือ เป็นยืนที่มีความแตกต่างของลำคับนิวคลีโอไทค์เมื่อ เปรียบเทียบระหว่างชนิคสูง (โคยประมาณจะมากกว่า 10%) แต่มีความแตกต่างของลำคับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบภายในชนิดต่ำ (โดยประมาณจะไม่ถึง 1%) ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ใน ้สิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น Ruedi and Mayer (2001) ได้ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ้ยืน NDI ของค้างคาวสกุล Myotis จำนวน 44 ตัวอย่าง พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากตัวอย่าง ในชนิดเดียวกันน้อยกว่า 1% ในขณะที่ความแตกต่างระหว่างชนิดภายในสกุล Myotis สูงกว่า 10% ซึ่ง สอดกล้องกับผลการศึกษาของ Kossl et al. (1999) ที่ได้ศึกษาความแตกต่างของค้างคาวอีกสกุลคือ Pteronotus จำนวน 4 ชนิดคือ P. davvi, P. parnellii, P. quadridens และ P. macleavii พบว่ามีความ แตกต่างทางพันธุกรรมภายในสกุลใกล้เคียงกับสกุล Myotis คือมีความแตกต่างระหว่างชนิดอยู่ในช่วง ระหว่าง 11.4 – 14.7% นอกจากนั้น ยังพบว่า Tagliaro et al. (2000) แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างทาง พันธุกรรมของยืน ND1 ภายในลิงสกุล Callithrix อยู่ในช่วงระหว่าง 0.00 – 1.83% แต่เมื่อเปรียบเทียบ กับ C. pygmaea พบว่าจะมีความแตกต่างอยู่ในช่วง 10.22 – 11.71% นอกจากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แล้ว Johannesen et al. (2005) ยังรายงานว่า แมงมุม 3 ชนิคในสกุล Eresus ซึ่งประกอบด้วย E. walckenaeri, E. cinnaberinus และ E. sandaliatus มีความแตกต่างทางพันธกรรมระหว่างชนิดของยืน ND1 อยู่ในช่วงระหว่าง 14 – 16.8 % ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมของยืน ND1 ระหว่างชนิดภายใน สกุลเดียวกันในระดับสูงดังกล่าวยังพบได้ในหอยสกุล *Quadrula* อีกด้วย โดยจากผลการศึกษาความ แตกต่างทางพันธุกรรมของยืน ND1 จากหอยสกุลดังกล่าวจำนวน 17 ชนิดพบว่ามีความแตกต่างภายใน ชนิดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.15 – 3.29% ในขณะที่ความแตกต่างระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 3.65 – 15.35% (Serb et al., 2003) จะเห็นได้ว่าระดับของความแตกต่างของถำดับนิวกถีโอไทค์ของยืน ND1 เมื่อ เปรียบเทียบระหว่างชนิดในสกล (genus) เดียวกันจะสามารถเห็นได้ชัดเจนกว่าเมื่อศึกษาโดยใช้ยืน Cvtb, COI หรือ 16S rRNA ซึ่งยืนเหล่านี้จะมีความแตกต่างระหว่างชนิดประมาณ 4-6 % แต่ในกรณีของ ้ยืน ND1 จะมีความแตกต่างมากกว่า 10% คังข้อมูลจากการศึกษาในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่กล่าวแล้ว คังนั้น การศึกษาความแตกต่างของถำดับนิวคลีโอไทด์ของยืน ND1 น่าจะเป็นข้อมูลที่มีประสิทธิภาพในการ จำแนกชนิดปูทะเล

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### <u>อุปกรณ์</u>

## 1. <u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

1.1 ปูตัวอย่างประกอบด้วยปูทะเลที่เก็บจากแหล่งเก็บตัวอย่างจังหวัดจันทบุรี-จังหวัดตราด จังหวัดสุราษฎร์ชานี และจังหวัดระนอง (ภาพที่ 2) และปูม้าซึ่งจะใช้เป็น outgroup เพื่อกำหนดตำแหน่ง ของ node ที่เป็นบรรพบุรุษร่วมของปูทะเลในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ได้เก็บตัวอย่าง จากจังหวัดตราด จำนวนปูแต่ละกลุ่มแสดงในตารางที่ 1

<u>ิ ตารางที่ 1</u> แสดงจำนวนปูตัวอย่างกลุ่มต่างๆ จากแหล่งเก็บตัวอย่างแต่ละแหล่ง

	ปูดำ	ปูเขียว	ปูม่วง	ปู่ขาว	ปู่ม้า
จังหวัดตราด - จันทบุรี	20	-	20	20	10
จังหวัดระนอง	20	21	16	18	-
จังหวัดสุราษฎร์ธานี	20	-	-	20	-
ประเทศพม่า	20	-	-	-	-

1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) Sigma SK20,

Germany

- 1.3 เครื่อง Thermocycler สำหรับ Polymerase Chain Reaction (PCR)
- 1.4 เครื่องฉายแสง ultraviolet และอุปกรณ์ถ่ายภาพ
- 1.5 ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis
- 1.6 หม้อนึ่งความคันสูง (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko, Japan
- 1.7 หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 1.8 หลอดพลาสติดสำหรับทำปฏิกิริยา PCR (PCR tube)
- 1.9 ใมโครปีเปตชนิดปรับปริมาตรได้ ขนาด 10 20 100 200 และ 1,000 ใมโครลิตร
- 2.0 อุปกรณ์วัดความยาว (vernier caliper) ความละเอียด 0.02 มิลลิเมตร(Mitutoyo co., Japan)



<u>ภาพที่ 2</u> แสดงตำแหน่งของแหล่งเก็บตัวอย่างจังหวัดจันทบุรี-จังหวัดตราด (ก) จังหวัดสุราษฎร์ธานี (ข) และจังหวัดระนอง (ก)

## 2. สารเคมีเพื่อการสกัดดีเอ็นเอและกำจัดสิ่งแปลกปลอมใน PCR product

2.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction Kit)

QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany)

2.2 ชุดทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (PCR product purification Kit)

QIAquick PCR purification Kit

## 3. เครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับการคำนวณ

เกรื่องกอมพิวเตอร์ติดตั้งอุปกรณ์ประมวลผล Intell Pentium 4 CPU 2.40 GH<sub>z</sub> ติดตั้ง RAM ขนาด 1.0 GB ต่อเชื่อมอินเตอร์เน็ต (internet)

#### 4. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

Blastn (Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide) จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov
/BLAST ใช้เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล
GenBank (http://www.ncbi .nlm.nih.gov)

 CAP3 (Huang and Madan, 1999) ใช้เพื่อเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการหาลำดับนิ วคลีโอไทด์แต่ละครั้งจากชิ้นดีเอ็นเอเดียวกัน (Sequence Assembly) โดยใช้บริเวณเชื่อมต่อเป็นบริเวณที่ เหลื่อมกันของผลที่ได้แต่ละครั้ง

 ClustalW (Chenna et al., 2003) ใช้เพื่อการทำ Alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้าง ไฟล์ที่จำเป็นเพื่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

4. DnaSP (DNA Sequence Polymorphism) version 4.10 (Rozas *et al.*, 2003) ใช้เพื่อนับ จำนวน haplotype, ระบุ haplotype ของปูตัวอย่าง และนับจำนวนและระบุตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์ (polymorphic site)

6. MEGA (Molecular Evolution Genetics Analysis) version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) ใช้เพื่อ หาจำนวนการแทนที่เบสแบบ Transition (TS) แบบ Transversion (TV) การแทนที่ทั้งหมด (TS+TV) และ สัดส่วน TS/TV

7. MODELTEST (Posada and Crandall, 1998) ใช้ทดสอบลำดับนิวกลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษา กวามสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อหาแบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสม  8. Oligo (เขียนโปรแกรมโดย R. Kalendar, 1999, Institute of Biotechnology, Helsinki http://www.biocenter.helsinki.fi) ใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์และคำนวณหาอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการทำ PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

 9. PAUP<sup>\*</sup> beta version (Phylogenetic Analysis Using Parsimony <sup>\*</sup>and other methods) version
4.0 (Swofford, 1998) ใช้เพื่อการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมและสร้าง phylogenetic tree จากข้อมูล ลำดับนิวคลีโอไทด์

11. Sequin version 6.0 (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/sequin/) ตามปกติแล้วโปรแกรม Sequin ออกแบบเพื่อใช้ประโยชน์ในการเตรียมข้อมูลลำคับนิวคลีโอไทค์ให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมเพื่อส่งเข้า สู่ฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้เพื่อนับ จำนวนนิวคลีโอไทค์แต่ละชนิดและนิวคลีโอไทค์ทั้งหมด เพื่อหาองค์ประกอบนิวคลีโอไทค์แต่ละชนิด

12. SPSS for windows version 12.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago) ใช้คำนวณ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสุงสุด-ต่ำสุด และวิเคราะห์ canonical variate analysis ของข้อมูล ลักษณะ morphometric

14. TREEVIEW version 1.6.6 (Page, 1996) ใช้เพื่อแสดงผล phylogenetic tree ที่ได้จากการ สร้างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อื่นๆ ที่ไม่แสดงผลด้วยตัวเอง

#### <u>วิธีการ</u>

#### 1. <u>การเก็บรวบรวมปูตัวอย่าง</u>

การเก็บรวบรวมปูทะเลตัวอย่างคำเนินการใน 3 แหล่งคือ จังหวัดจันทบุรี-จังหวัดตราด จังหวัด ระนอง และจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้วิธีซื้อปูจากชาวประมงโดยตรงหรือจากพ่อค้าคนกลางที่ รวบรวมปูจากชาวประมงในหมู่บ้าน เพื่อให้แน่ใจว่าปูที่ได้เป็นปูจากธรรมชาติของบริเวณเป้าหมาย อย่างแท้จริง การรวบรวมปูตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะรวบรวมปูทะเลทุกกลุ่มที่เคยมี รายงานว่าพบในประเทศไทยให้ครบทุกกลุ่ม โดยยึดเกณฑ์การจำแนกจากรายงานของชูชาติและบูรณ์ (2522) และ บรรจงและบุญรัตน์ (2545) โดยมีลักษณะในการสังเกตเบื้องต้นดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่ง จากรายงานทั้ง 2 ฉบับสรุปได้ว่าในประเทศไทยควรจะมีปูอย่างน้อย 3 กลุ่มที่มีลักษณะภายนอกแตกต่าง กัน โดยปูตัวอย่างที่รวบรวมเป็นปูตัวผู้ขนาดประมาณ 200 กรัม หรือมีความกว้างกระดองที่วัดจากโคน หนามกู่ที่ 9 มากกว่า 90 มิลลิเมตร ปูตัวอย่างที่รวบรวมจากแหล่งเก็บตัวอย่างต่างๆ จะถูกเคลื่อนย้ายมาที่ ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสร์ จากนั้นปูตัวอย่างที่รวบรวมได้นี้จะใช้ทั้ง ในการศึกษาความแตกต่างของลักษณะภายนอก ความแตกต่างของลักษณะ morphometric และ ความ แตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ

		กลุ่มปูตัวอย่าง	
ลักษณะ	ปูดำ	ปู่ขาว	ปูเขียว (ทองโหลง)
1. สึกระคอง	สีน้ำตาลปนเทา	สีเขียว	สีเขียวปนเทา
	สีน้ำตาลปนเขียว	สีเขียวปนเหลือง	สีเขียวปนม่วง
2. ลายร่างแหบนขาว่ายน้ำ	ไม่ปรากฏ	สีเขียว	สีม่วงแคง
		ลวคลายละเอียด	ลายช่องใหญ่ หยาบ
3. Middle carpus spine	ไม่ปรากฎ	ปรากฎชัดเจน	ปรากฏชัดเจน
		เป็นหนามสั้นๆ	เรียวยาว แหลม
4. ลายจุดบนก้ำม	ไม่ปรากฏ	ปรากฏเป็นสีเขียว	สีม่วงแคง
		สีเขียวอมเหลือง	สีม่วงน้ำตาล

<u>ตารางที่ 2</u> หลักเกณฑ์เบื้องต้นในการจำแนกปูทะเลตามชูชาติและบูรณ์ (2522) และ บรรจงและบุญ รัตน์ (2545)

#### 2. การศึกษาความแตกต่างของลักษณะภายนอกของปูตัวอย่าง

ลักษณะภายนอกที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างปูทะเลแต่ละกลุ่มที่รวบรวมได้จะ พิจารณาจากลักษณะต่างๆ ที่เคยถูกนำเสนอในรายงานการจำแนกชนิคปูทะเลที่มีการยอมรับกัน โดยทั่วไป 2 ฉบับ คือ Estampador (1949) และ Keenan et al. (1998) โดยรายงานทั้ง 2 ฉบับนี้เสนอ เกณฑ์การจำแนกจากลักษณะภายนอกที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม โดยสรุปจากรายงานทั้ง 2 ฉบับพบว่า มีลักษณะภายนอกที่สำคัญในการจำแนกชนิคปูทะเลดังนี้ 1. สีของกระดอง 2. สีบริเวณก้าม 3. รูปร่าง ของหนามระหว่างตา 4. รูปทรงของหนามขอบกระดอง 5. หนามบริเวณข้อมือ และ 6. ลักษณะและ ตำแหน่งของลายร่างแห

#### 3. การศึกษาความแตกต่างของลักษณะ morphometric ของปูทะเล

ปูตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้วิเคราะห์เป็นปูเพศผู้ เพื่อป้องกันปัญหาความคลาดเคลื่อนอันเนื่องจาก ความแตกต่างของลักษณะระหว่างเพศผู้กับเพศเมีย (dimorphism) และปูที่ใช้จะมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย ประมาณ 200 กรัม หรือมีขนาดความกว้างกระดองประมาณ 90 มิลลิเมตรขึ้นไป ซึ่งเป็นขนาดปูที่โตเต็ม วัยแล้ว ปูตัวอย่างจากปูทะเลที่แบ่งกลุ่มตามลักษณะภายนอกแล้วจะนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของ ลักษณะ morphometric โดยใช้เฉพาะปูตัวอย่างเพศผู้ที่มีน้ำหนักโดยเฉลี่ยประมาณ 200 กรัม หรือมี ขนาดความกว้างกระดองประมาณ 90 มิลลิเมตรขึ้นไป ซึ่งเป็นขนาดปูที่โตเต็มวัยแล้ว ปูตัวอย่างแต่ละ ตัวจะถูกวัดลักษณะต่างๆ จากอวัยวะต่างๆ (ภาพที่ 3) ด้วย vernier caliper ความละเอียด 0.02 มิลลิเมตร โดยมีลักษณะที่วัดจำนวน 51 ลักษณะ (ตารางที่ 3) ประกอบด้วยลักษณะของกระดอง 19 ลักษณะ ลักษณะ ความยาวของก้อง (abdominal length) และ ความหนาของลำตัว (body depth) ข้อมูลที่ได้จาก การวัดจะถูกใช้ในการวิเคราะห์ Canonical Variant Analysis (CVA) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for windows version 12.0 (SPSS Inc., Chicago)



<u>กาพที่ 3</u> แสดงลักษณะ morphometric ที่วัดจากอวัยวะต่างๆ ของปู ความหมายของอักษรย่อของ ลักษณะที่วันเป็นดังต่อไปนี้ Carapace width at spine 2 (CW2), Internal carapace length (ICL), Left carapace length (LC), Right carapace length (RC), Internal carapace width (ICW), External carapace width (ECW), Carapace width at spine 8 (CW8), Frontal median spine height (FMSH), Distance between frontal median spine (DFMS), Distance between left-pair frontal spine (DLPFS), Distance between rightpair frontal spine (DRPFS), Distance between left frontal spine to left orbit (DLFSorb), Distance between right frontal spine to right orbit (DRFSorb), Frontal width (FW), Frontal margin (FM), Carapace width at spine 1 (CW1), Distance between Left and right frontal spine (DLRFS), Left orbit width (LOW), Right orbit width (ROW), Abdominal length (AL), carpus length (CL), carpus width (CW), dactyl length (DL), dactyl length (DW), pollex length (PoL), pollex width (PoW), propodus length (PL), propodus width (PW), merus length (ML), merus width (3PMW), Total cheliped length (TLCL), Third periopod merus length (3PML), Third periopod merus width (LoPW), Upper paddle length (UpPL), Upper paddle width (UpPW) uat Total length of swimming leg (TPL)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Overton *et al*. (1997) และ Keenan *et al*. (1998)

NO.	Morphometric characters	Abbreviation	NO.	Morphometric characters	Abbreviation
1	Frontal median spine height	FMSH	27	Left carpus length	LCL
2	Distance between frontal median spine	DFMS	28	Right carpus length	RCL
3	Distance between left-pair frontal spine	DLPFS	29	Left carpus width	LCW
4	Distance between right-pair frontal spine	DRPFS	30	Right carpus width	RCW
5	Distance between left frontal spine to left orbit	DLFSorb	31	Left dactyl length	LDL
6	Distance between right frontal spine to right orbit	DRFSorb	32	Right dactyl length	RDL
7	Internal carapace width	ICW	33	Left merus length	LML
8	External carapace width	ECW	34	Right merus length	RML
9	Carapace width at spine 8	CW8	35	Left merus width	LMW
10	Total left cheliped length	TLCL	36	Right merus width	RMW
11	Total right cheliped length	TRCL	37	Left propodus width	LPW
12	Left propodus length	LPL	38	Right propodus width	RPW
13	Right propodus length	RPL	39	Third periopod merus length	3PML
14	Third periopod total length	3PTL	40	Third periopod merus width	3PMW
15	Total length of swimming leg	TPL	41	Lower paddle length	LoPL
16	Abdominal length	AL	42	Lower paddle width	LoPW
17	Frontal width	FW	42	Upper paddle width	UpPW
18	Internal carapace length	ICL	44	Upper paddle length	UpPL
19	Left carapace length	LC	45	Body depth	BD
20	Right carapace length	RC	46	Frontal margin	FM
21	Left dactyl length	LDW	47	Carapace width at spine 1	CW1
22	Right dactyl length	RDW	48	Distance between Left and right frontal spine	DLRFS
23	Left pollex length	LPoL	49	Left orbit width	LOW
24	Right pollex length	RPoL	50	Right orbit width	ROW
25	Left pollex width	LPoW	51	Carapace width at spine 2	CW2
26	Right pollex width	RPoW			

<u>ตารางที่ 3</u> ลักษณะ morphometric จำนวน 51 ลักษณะที่วัดจากปูแต่ละตัว พร้อมทั้งอธิบายอักษรย่อของแต่ละลักษณะ

### 4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย  $tRNA^{Ser(UCN)}$ - $ND1-tRNA^{Leu(CUN)}$ 

4.1.1 การสกัด Total genomic DNA

ปูทะเลตัวอย่างที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ ภายหลังการวัดลักษณะ morphometric เรียบร้อยแล้ว ถูกนำมาแช่แข็งไว้ที่ -20 °C เนื้อเยื่อปูทะเลจากขาเดินคู่ที่ 1 หรือ 2 น้ำหนักประมาณ 50 – 70 มิลลิกรัม ถูกนำมาใช้ในการสะกัด total genomic DNA โดยใช้ชุดสกัด QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) และคำเนินการสกัดดีเอ็นเอตามกำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

4.1.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างปูทะเลแต่ละ กลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากยิน ND1 แต่เพื่อให้ได้ข้อมูลมากขึ้นจึงศึกษายิน tRNA อีก 2 ยืนที่อยู่ใกล้เคียง เพิ่มเติมไปพร้อมกันด้วย ดังนั้นชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> ใช้คู่ไพรเมอร์ SS30 และ SS31 ซึ่งมีลำดับนิวกลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 4 ด้วยวิธี PCR ไพรเมอร์ SS30 มีตำแหน่งอยู่ใน ยืน Cytb (ภาพที่ 4) ออกแบบโดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวกลีโอไทด์ของยืน Cytb ของปูทะเลซึ่งหาลำคับ นิวกลีโอไทด์โดยโลรงการ "การจำแนกชนิดของปูทะเลในสกุล Scylla 4" (สำนักงานกองทุนสนับสนุน การวิจัย; RDG 472004) ส่วนไพรเมอร์ SS31 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ในยืน 16S rRNA (ภาพที่ 4) ออกแบบโดย ใช้ข้อมูลจากลำดับนิวกลีโอไทด์บางส่วนของยืน 16S rRNA จากฐานข้อมูล GenBank (AF109321,AF109319, AF109318 และ AF109320) การออกแบบไพรเมอร์ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Oligo V9.11

SS30 →		WS31F VS31R GS31R ← BS31R	R1 1 1	← SS31
Cytb	tRNA Ser	ND1	tRNA Ser	16S rRNA

<u>ภาพที่ 4</u> แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* (ไฟรเมอร์ SS30 และ SS31) โดยตำแหน่งเริ่มต้นการหาลำดับนิวกลีโอไทด์ คือ ตำแหน่งของไพรเมอร์ SS31 และแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ลำดับที่ 2 ในการหาลำดับ นิวกลีโอไทด์ด้วยวิชี walking primer ของปูดำ (BS31R1) ปูเขียว (GS31R1) ปูม่วง (VS31R1) และ ปูขาว (WS31R1)

<u>ิตารางที่ 4</u> แสดงลำดับนิวกลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต่างๆ ของปูทะเล

Primer's name	nucleotide sequence	Tm ( <sup>o</sup> C)
SS30	5'-TTAAAGA(t/c)ATTGTAGG(g/a)TTTATTG	53.6
SS31	5'-AAGTTACTTTAGGGATAACAGCG	50.9
BS31R1	5'-GGTTATATAGGATTGCTTCAGCC	55.0
GS31R1	5'-AGTAAGGAACAAACTGTACCGAT	51.7
VS31R1	5'-TTCAACCATTTTCCGATGCTG	55.2
WS31R1	5'-TTCAAATTCGTAAAGGCCCAA	56.5

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยเตรียมในหลอด PCR (PCR-tube) ขนาด 0.5 มิลลิลตร (TreffLab, Switzerland) ให้มีปริมาตรทั้งหมด 50  $\mu$ l ซึ่งประกอบด้วย 10xHigh Fidelity PCR buffer ปริมาตร 5  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP mix ปริมาตร 4  $\mu$ l, primer SS30 ปริมาตร 4  $\mu$ l, primer SS31 ปริมาตร 2  $\mu$ l, High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentus Life Sciences, USA) ปริมาตร 0.5  $\mu$ l (2.5 unit), Total DNA 6  $\mu$ l (10-100 ng) และ H<sub>2</sub>O 23.5  $\mu$ l โดยมี thermal cycling condition ดังต่อไปนี้คือ

	Initial denaturation	94°C	1 min	
	Denaturation	94 <sup>°</sup> C	30 sec	
	Annealing	50°C	30 sec	> 35 cycles
	Elongation	68°C	2 min	
ແລະ	Final elongation	68°C	10 min	

ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปูม้าด้วยวิธี PCR ใช้ไพรเมอร์ SS1 และ SS10 (ตารางที่ 5) โดยเตรียมในหลอด PCR (PCR-tube) ขนาด 0.5 มิลลิลตร (TreffLab, Switzerland) ให้มีปริมาตร ทั้งหมด 50  $\mu$ l ซึ่งประกอบด้วย 10xHigh Fidelity PCR buffer ปริมาตร 5  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP mix ปริมาตร 4  $\mu$ l, primer SS30 ปริมาตร 4  $\mu$ l, primer SS1 และ SS10 ปริมาตร อย่างละ 2  $\mu$ l, High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentus Life Sciences, USA) ปริมาตร 0.5  $\mu$ l (2.5 unit), Total DNA 6  $\mu$ l (10-100 ng) และ H<sub>2</sub>O 23.5  $\mu$ l โดยมี thermal cycling condition ดังต่อไปนี้คือ



<u>ตารางที่ 5</u> แสดงลำดับนิวกลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิเกราะห์ลำดับนิวกลีโอไทด์ของปู ม้า

Primer's name	nucleotide sequence	Tm ( <sup>°</sup> C)
SS1	5'-ACGTTACATCTTTAGCCTCTAATG	53.0
SS10	5'-AAATATATTAGATCAAGGTGCAGC	53.3
PSS1F2	5'-CCTGCTCACATTCAACCGGAA	56.2
PSS1F3	5'-CATAAGCTTGTCATACCGAAGACG	56.6
PSS10R3	5'-GCTGTCTCTTTCATTAAAATTGA	51.1

### 4.2 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์และการหาลำคับนิวคลีโอไทด์

สิ่งปนเปื้อนใน PCR product ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ DNA polymerase, dNTP, ไพร เมอร์และเกลือ MgCl, จะถูกทำบริสุทธิ์ (purification) โดยใช้ QIAquick PCR purification Kit เพื่อให้ได้ ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ จากนั้นส่งดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาลำดับนิวกลีโอไทด์ที่ MACROGEN Inc., (ประเทศ เกาหลีใต้) เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งของปูทะเลและปูม้ามีขนาดยาวเกินกว่า 1 kb ดังนั้น เมื่อ ได้ผลจากการหาลำดับนิวกลีโอไทด์กรั้งแรกแล้ว จะใช้ลำดับนิวกลีโอไทด์ที่ได้ในการออกแบบไพร เมอร์ในลำดับต่อๆ ไป (walking primer) โดยในกรณีของปูทะเลใช้ไพรเมอร์ในการหาลำดับนิวกลีโอ ไทด์เป้าหมายทั้งหมด 2 ไพรเมอร์สำหรับปูแต่ละกลุ่ม คือ ไพรเมอร์ SS31 และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับปู แต่ละกลุ่ม BS31R1, GS31R1, VS31R1 และ WS31R1 ดังแสดงลำดับนิวกลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ปู กะเลจำนวน 4 กลุ่ม (จะกล่าวถึงรายละเอียดต่อไป) ในตารางที่ 4 และแสดงตำแหน่งในภาพที่ 4 สำหรับ ปูม้าก็ดำเนินการเตรียม PCR product สำหรับหาลำดับนิวกลีโอไทด์เช่นเดียวกับปูทะเล แต่ใช้ไพเมอร์ดัง แสดงในตารางที่ 5

## 4.3 การวิเคราะห์ลำคับนิวคลีโอไทค์เพื่อสร้างชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่สมบูรณ์

้ถำคับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการหาถำคับนิวคลีโอไทด์แต่ละครั้งจะถูกตรวจสอบ ้ความถูกต้องซ้ำโดยการตรวจสอบกับถำคับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยการใช้โปรแกรม เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทค์เป้าหมายอย่างแท้จริง Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ้งากนั้นจะทำการเชื่อมต่อลำคับนิวกลีโอไทค์ที่ได้งากการหาลำคับนิวกลีโอไทค์งากแต่ละไพรเมอร์ของ ูปแต่ละตัว เพื่อสร้างเป็นลำดับนิวกลีโอไทค์ที่สมบูรณ์ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้โปรแกรม CAP3 (Huang and Madan, 1999) ลำดับนิวกลีโอไทด์ที่ได้จะยาวกว่าลำดับนิวกลีโอไทด์เป้าหมายอยู่เล็กน้อย เนื่องจากจะมีลำคับนิวกลีโอไทค์ของยืน Cvtb และ 16S rRNA ซึ่งเป็นยืนที่เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ รวมอยู่ด้วย จึงทำการหาตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ส่วนเกิน โดยการเทียบเกียงตำแหน่งของยืนต่างๆ ใน ชิ้นดีเอ็นเอที่หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ในการศึกษาครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทค์บริเวณ tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> ของปู่ม้า Portunus trituberculatus ซึ่งการเทียบเคียงตำแหน่งจะใช้การทำ alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html) อย่างไรก็ตาม การดำเนินการ ้ดังกล่าวก็ยังไม่สามารถระบุตำแหน่งที่แน่นอนของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายได้ เนื่องจากบริเวณปลาย 5' และ 3' ของชิ้นคีเอ็นเอเป้าหมาย *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* เป็นยืนกำหนครหัสของ tRNA ดังนั้น การเทียบเกียงตำแหน่งของนิวกลีโอไทด์แต่เพียงอย่างเดียวจึงยังให้ผลไม่แน่นอน เพราะอาจเกิดการ กลายพันธุ์แบบ addition/deletion ขึ้นภายในโครงสร้างที่เป็น loop ของยืน tRNA แล้วทำให้ขนาดของ

ยีนเปลี่ยนไป ดังนั้นเพื่อให้สามารถระบุตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นและสิ้นสุดของชิ้นดีเอ็นเอ
เป้าหมายของปูแต่ละตัวที่แน่นอนจึงต้องมีการจัดโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของยีน
tRNA ทั้ง 2 ยีนของปูตัวอย่างทุกตัว แล้วใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโครงสร้างทุติยภูมิมาระบุ
ตำแหน่ง ซึ่งจะทำให้ได้ตำแหน่งเริ่มต้นและสิ้นสุดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่แน่นอน จากนั้นจึงกำจัด
นิวคลีโอไทด์ส่วนเกินออกจากชิ้นดีเอ็นเอที่หาลำดับนิวคลีโอไทด์มาได้ เมื่อกำจัดนิวคลีโอไทด์ส่วนเกิน
ออกไปแล้วก็จะได้ นิวคลีโอไทด์จากบริเวณเป้าหมายที่ครบสมบูรณ์ของปูแต่ละตัว การจัดเรียงตัวของ
ยีนและองค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ของปูทะเลและปูม้าจะเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตจากไฟลั่ม Arthropod
(ตารางที่ 6)

4.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปูทะเล

4.5.1 การทำ alignment ชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย  $tRNA^{Ser(UCN)}$ -ND1- $tRNA^{Leu(CUN)}$ 

นำลำดับนิวกลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายปูตัวอย่างทั้งหมดซึ่งประกอบด้วย ปู ทะเล 4 กลุ่ม และปูม้ามา alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW1.83 (Chenna et al., 2003) ที่ทำงานได้ด้วย ระบบปฏิบัติการ WindowsXP ในขั้นตอนนี้จะไม่ใช้โปรแกรมที่ให้บริการผ่าน internet แต่จะใช้ โปรแกรมที่ติดตั้งในเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ใช้วิเคราะห์ผล เนื่องจากจุดประสงค์ในการทำ alignment ไม่ ด้องการแต่เพียงผลการเปรียบเทียบตำแหน่งของนิวกลีโอไทด์เท่านั้น แต่ยังด้องการผลในรูปของไฟล์ที่ มีการจัดรูปแบบต่างๆ (โดยเฉพาะ \*.phy, \*.fasta และ \*.nxs) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในขั้นต่อๆ ไป

4.5.2 การหาปริมาณการกลายพันธุ์แบบการแทนที่เบส

ปริมาณการกลายพันธุ์แบบการแทนที่เบสอันประกอบด้วยจำนวนการกลายพันธุ์ แบบ Transition (TS) การกลายพันธุ์แบบ Transversion (TV) การกลายพันธุ์ทั้งหมด (TS + TV) และ สัดส่วนการกลายพันธุ์แบบ TS ต่อ TV (TS/TV) จะคำนวณโดยโปรแกรม MEGA 3.1 (Kumar, *et al*, 2004) ข้อมูลการกลายพันธุ์ในรูปแบบต่างๆ ที่คำนวณได้จะใช้เป็นข้อมูลสำหรับทดสอบการอิ่มตัวของ การแทนที่เบส (substitution saturation test) ต่อไป

ชื่อสิ่งมีชีวิต	ซับไฟลั่ม	ชื่อสามัญ	Accession No.	เอกสารอ้างอิง
	(Subphylum)	(common name)	ใน GenBank	
Carios capensis	Chelicerata	softbacked tick	NC_005291	Fukunaga (2004)
				Unpublished
Ixodes hexagonus	Chelicerata	hedgehog tick	NC_002010	Black and Roehrdanz (1998)
Artemia franciscana	Crustacea	brine shrimp	NC_001620	Perez et al. (1994)
Callinectes sapidus	Crustacea	blue crab	AY363392	Place et al. (2005)
Eriocheir japonica	Crustacea	Chinese mitten crab	AY274302	Sun et al. (2005)
sinensis				
Geothelphusa dehaani	Crustacea	-	AB187570	Segawa and Aotsuka (2005)
Pagurus longicarpus	Crustacea	hermit crab	NC_003058	Hickerson and
				Cunningham (2000)
Panulirus japonicus	Crustacea	Japanese spiny	NC_004251	Yamauchi et al. (2002)
		lobster		
Penaeus monodon	Crustacea	black tiger shrimp	AF217843	Wilson et al. (2000)
Portunus trituberculatus	Crustacea	Japanese blue crab	NC_005037	Yamauchi et al. (2003)
Pseudocarcinus gigas	Crustacea	Australian giant	AY562127	Miller et al. (2005)
		crab		
Apis mellifera	Hexapoda	common honey bee	L06178	Crozier and Crozier (1993)
Bombyx mori	Hexapoda	domestic silkworm	NC_002355	Lee et al. (1999)
				Unpublished
Drosophila	Hexapoda	fruit fly	AF200829	Ballard (1999) Unpublished
melanogaster				
Lithobius forficatus	Myriapoda	-	AJ270997	Hwang et al. (2001)
Narceus annularus	Myriapoda	millipede	NC_003343	Lavrov et al. (2002)

## <u>ตารางที่ 6</u> แสดงสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการเปรียบเทียบการจัดเรียงตัวของยืนและองค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ ของไมโตคอนเครียจีโนมกับปูทะเลและปูม้า

# 4.5.3 การทดสอบการอิ่มตัวของการกลายพันธุ์

การทคสอบการอิ่มตัวของการแทนที่เบสใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบการเกิดการ กลายพันธุ์ซ้ำ (multiple hit) ของนิวคลีโอไทด์ที่เคยเกิดการกลายพันธุ์ไปแล้วในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ ศึกษา ซึ่งมักจะเกิดกับการกลายพันธุ์แบบ transition ถ้าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษามีการอิ่มตัว ของการแทนที่เบสแล้วลำดับนิวกลีโอไทด์ดังกล่าวจะไม่สามารถให้ข้อมูลใดๆ เกี่ยวกับความสัมพันธ์ เชิงวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิตตัวอย่าง (Xia et al., 2003) เนื่องจากมีข้อมูลบางส่วนหายไปจากผลของ การเกิด multiple hit การทดสอบการอิ่มตัวของการกลายพันธุ์ของนิวกลีโอไทด์ ดำเนินการโดยแยก พิจารณาการกลายพันธุ์ออกเป็น 3 รูปแบบ คือ การกลายพันธุ์แบบ transition (TS) การกลายพันธุ์แบบ transversion (TV) และการกลายพันธุ์ทั้งหมด (TS + TV) โดยวิธีการเขียนกราฟระหว่างจำนวนการ กลายพันธุ์แต่ละรูปแบบ (แกน Y) กับระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างแต่ละกู่ตัวอย่าง (pariwise distance) ที่กำนวณจากแบบจำลองการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม (แกน X) โดยเปรียบเทียบระหว่างข้อมูล ทั้ง 2 ประเภทจากปูแต่ละกู่ ผลที่ได้จากกราฟจะแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการกลาย พันธุ์กับระยะห่างทางพันธุกรรม (Miya et al., 2002) ถ้าความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์สอดคล้องกับ ระยะห่างพันธุกรรม นั้นคือ เมื่อระยะห่างทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้นก็มีการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น แสดงว่าการ กลายพันธุ์ในรูปแบบนั้นยังไม่อิ่มตัว ซึ่งแสดงว่าลำดับนิวกลีโอไทด์ที่ทดสอบให้ข้อมูลความสัมพันธ์ เชิงวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา แต่ถ้าผลจากกราฟแสดงว่าเมื่อระยะห่างทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น แล้วจำนวนการกลายพันธุ์ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งกลับกงที่แสดงว่าเมื่อระยะห่างกางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น เริงวิวัฒนาการแทนที่เบสในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งกลับกงที่แสดงว่ามสัมพันธ์เริงวิวัฒนาการจากลำดับ นิวกลีโอไทด์ดังกล่าวจะไม่สะท้อนความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเป้าหมายอย่างแท้จริง

4.5.4 การหาแบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสม

แบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม และการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum likelihood ใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MODELTEST (Posada and Crandall, 1998)

4.5.5 การคำนวณค่า nucleotide divergence และระยะห่างทางพันธุกรรม

ค่า nucleotide divergence เป็นค่าที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง สิ่งมีชีวิต 2 ประชากรหรือ 2 ชนิดที่มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ โดยใช้ข้อมูลจากจำนวนการ แทนที่เบสที่พบเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากกลุ่มสิ่งมีชีวิตตัวอย่าง ซึ่งจะมีการนำสภาวะ หลากรูปแบบ (polymorphism) ภายในแต่ละประชากรหรือแต่ละชนิดมาร่วมพิจารณาด้วย โดย Nei and Kumur (2000) ได้แสดงค่า nucleotide divergence ในรูปของค่าการแทนที่นิวคลีโอไทด์สุทธิระหว่าง 2 ประชากร (the number of net nucleotide substitution between the two population หรือ d<sub>A</sub>) ซึ่งคำนวณ ได้จาก

$$d_{A} = d_{XY} - (d_{X} + d_{Y})/2$$

เมื่อ d<sub>xy</sub> คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนการแทนที่ระหว่างประชากร X และ Y d<sub>x</sub> คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนการแทนที่เบสที่พบในประชากร X (หรือเรียกว่า Nucleotide diversity ของประชากร X) d<sub>y</sub> คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนการแทนที่เบสที่พบในประชากร Y (หรือเรียกว่า Nucleotide diversity ของประชากร Y)

ค่า d<sub>A</sub> จะมีแนวโน้มต่ำกว่าการแทนที่เบสจริง (underestimate) ที่เกิดขึ้นถ้าวิเคราะห์ ข้อมูลจากกลุ่มสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่มีการแยกสายวิวัฒนาการมายาวนาน เนื่องจากช่วงเวลาที่ยาวนาน ดังกล่าวมีโอกาสเกิดการแทนที่เบสซ้ำขึ้นในบริเวณดีเอ็นเอที่ศึกษา ทำให้จำนวนการแทนที่เบสที่นับได้ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่าจำนวนการกลายพันธุที่เกิดขึ้นจริง แต่ความคลาด เคลื่อนดังกล่าวนี้จะมีน้อยมากหรือไม่มีเลยเมื่อทำการศึกษาในระดับประชากรหรือชนิดที่มีช่วงเวลาการ แยกสายวิวัฒนาการเกิดขึ้นไม่นาน โดยค่า d<sub>A</sub> จะกำนวณด้วยโปรแกรม DnaSP (Rozas *et al.*, 2003)

การกำนวณระขะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เป็นการกำนวณกวาม แตกต่างระหว่างถำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่ศึกษา โดยใช้ข้อมูลการแทนที่เบสที่ได้จาก การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่ศึกษาเช่นเดียวกับการกำนวณก่า genetic divergence แต่การกำนวณระขะห่างทางพันธุกรรมจะกระทำภายใต้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ เหมาะสมของการแทนที่เบสซึ่งพบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่ศึกษา ซึ่งแบบจำลอง ทางคณิตศาสตร์ของการแทนที่เบสมีนักวิทยาศาสตร์เสนอไว้เป็นจำนวนมาก โดยแบบจำลองเหล่านี้มี จุดประสงค์ตรงกันก็เพื่อป้องกันการประเมินจำนวนการแทนที่เบสที่น้อยกว่าความเป็นจริง (Nei and Kumur, 2000) โดยแบบจำลองการแทนที่เบสจะมีข้อกำหนดเกี่ยวกับก่าทางสถิติต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ การแทนที่เบส ซึ่ง Posada and Buckley (2004) ได้สรุปไว้ 4 ประการ คือ 1. ความถี่ของเบสแต่ละชนิด (base frequencies;  $\pi$ ) 2. ตำแหน่งที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ (Invariable site; I) 3. อัตรา การแทนที่ระหว่างนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (substitution rate among nucleotide;  $\Phi$ ) และ 4. กวาม แตกต่างของอัตราการแทนที่เบสระหว่างเบสที่มีตำแหน่งแตกต่างกันในสายลำดับนิวกลีโอไทด์ (Rate heterogeneity;  $\Gamma$ )

โดยในการศึกษาครั้งนี้ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างปู่ตัวอย่างแต่ละคู่ (pairwise) จะคำนวณโดยใช้โปรแกรม PAUPv.4.0b (Swofford, 1998) โดยใช้แบบจำลองการแทนที่เบสที่เลือก โดยโปรแกรม MODELTEST (Posada and Crandall, 1998) ซึ่งระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณได้จะ ใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ข้อมูลใน 2 แนวทางคือ แนวทางที่ 1 ระยะห่างทางพันธุกรรมจะถูกเฉลี่ยให้ อยู่ในรูปของระยะห่างทางพันธุกรรมภายในและระหว่างกลุ่มปูตัวอย่าง เพื่อใช้แสดงถึงความแตกต่าง ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มปูตัวอย่าง แนวทางที่ 2 ข้อมูลซึ่งอยู่ในรูประยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างปู แต่ละกู่ (pairwise distance) จะใช้ในการสร้าง phylogenetic tree ของปูทั้งหมด (ปูทะเล 74 ตัว และปูม้า 10 ตัว)

### 4.5.6 การสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ)

ผลการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างปู่ตัวอย่างแต่ละคู่ (pairwise genetic distance) จะใช้ในการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี NJ ด้วยโปรแกรม PAUP<sup>\*</sup> v 4.0 beta (Swofford, 1998) ทดสอบความเชื่อมั่นของ tree ที่ได้ด้วยการทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ แล้วสร้าง consensus tree ด้วย วิธี 50% majority rule ซึ่งจะแสดง branch ใดๆ ใน concensus tree ก็ต่อเมื่อ branch นั้นปรากฏใน tree ที่ได้จากการทดสอบ bootstrap มากกว่าครึ่งหนึ่ง (50%) ของ tree ทั้งหมด

#### 4.5.7 การสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Parsimony (MP)

Phylogenetic tree ที่สร้างโดยวิธี MP ดำเนินการโดยใช้โปรแกรม PAUP v 4.0 beta10 (Swofford, 1998) กำหนดให้หาสัณฐานที่ดีที่สุดโดย heuristic search ใช้ข้อมูลเฉพาะ parisimony informative site กำหนดให้ดำแหน่ง gap เป็นข้อมูลสูญหาย (missing data) สร้าง provisional MP tree ด้วยวิธี Stepwise addition algorithm ลำดับการใช้ข้อมูลเป็นไปโดยสุ่ม การทำ branch swapping ใช้วิธี tree-bisection-reconnection (TBR) rearrangement ไม่กำหนดจำนวนสูงของ สัณฐาน (topology) ที่ทดสอบ ความเชื่อมั่นของ phylogenetic tree ใช้การทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ แต่ละซ้ำนำข้อมูลเข้าสู่การวิเคราะห์ 10 รอบ

#### 4.5.8 การสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML)

Phylogenetic tree สร้างโดยวิธี ML โดยกำหนดแบบจำลองและค่าทางสถิติที่ เกี่ยวข้องตามผลการทดสอบของโปรแกรม MODELTEST (Posada and Crandall, 1998) กำหนดให้หา สัณฐานที่ดีที่สุดโดย heuristic search โดยใช้ Branch-swapping algorithm สร้าง provisional MP tree ด้วยวิธี Stepwise addition algorithm ลำดับการใช้ข้อมูลเป็นไปโดยสุ่ม การทำ branch swapping ใช้วิธี tree-bisection-reconnection (TBR) rearrangement ไม่กำหนดจำนวนสูงของสัณฐานที่ทดสอบ กำหนดให้นำข้อมูลเข้าสู่การวิเคราะห์ 10 รอบ

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. <u>ผลการจำแนกชนิดปูทะเลโดยใช้ลักษณะภายนอก (external morphology classification)</u>

พิจารณาจำแนกปูทะเลแต่ละกลุ่มจากมีลักษณะภายนอกในลักษณะดังนี้ สีของกระดอง จำนวน หนาม รูปทรงของหนาม และการปรากฏของลายร่างแห สามารถจำแนกปูทะเลตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยปูแต่ละกลุ่มมีลักษณะดังต่อไปนี้

1.1 ปูดำ (ภาพที่ 5) มีลักษณะดังนี้

- 1. หนามระหว่างตาสั้นโค้งมน ความสูงอยู่ในระดับเสมอกันหรือเกือบเสมอกันทุกอัน
- 2. กระดองสีดำหรือเขียว

 ถ้ามปล้องกลาง (carpus) บริเวณขอบนอก (margin) ของมีหนามแหลม 1 อัน บริเวณที่ เหลือเรียบ ทั้ง 2 ถ้าม

 บริเวณด้านบนของก้าม (ฝ่ามือหรือ palm) หลังตำแหน่งที่นิ้ว (dactyl) สอดเข้าในฝ่ามือ มีหนามแหลม 1 อันอยู่ด้านใน ส่วนด้านนอกหนามอาจลดรูปจนเรียบ หรืออาจมีปุ่มปลายป้านมน หรือ ปุ่มปลายแหลม 1 อัน โดยหนามอันในขนาดใหญ่กว่าอันนอก

5. หนามขอบกระคอง (anterolateral carapace spine) มีขนาคใหญ่ ขอบนอก (margin) ของหนามขอบกระคองโค้งชัดเจน

 5. ระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 9 (วัดจากปลายหนามด้ายซ้ายจนถึงปลายหนาม ด้านขวา) สั้นกว่าระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 8

 7. ขาว่ายน้ำและขาเดินไม่มีลายร่างแห ก้ามไม่มีลายร่างแห ด้านนอกสีโทนแดง โดยเฉพาะบริเวณปลายนิ้ว


<u>ภาพที่ 5</u> ปูดำ

- 1.2 ปูขาว (ภาพที่ 6) มีลักษณะดังนี้
  - 1. หนามระหว่างตายาวแหลมคม หนาม 2 อันกลางยาวกว่าหนาม 2 อันด้านข้าง
  - 2. กระดองโทนสีเขียว

 ก้ามปล้องกลางบริเวณขอบนอกมีหนามแหลมคม 2 อัน หรือ หนามแหลม 1 อันกับ ปุ่มหรือรอยนูนอีก 1 อัน ก้ามซ้ายและขวาอาจมีรูปทรงหนามของก้ามปล้องกลางต่างกัน

 4. บริเวณด้านบนของก้ามหลังตำแหน่งที่นิ้วสอดเข้าในฝ่ามือมีหนามแหลมคม 2 อัน อันในใหญ่กว่าอันนอก

 หนามขอบกระดองมีขนาดใหญ่ ขอบนอกของหนามขอบกระดองเกือบทุกอันเป็น เส้นตรง

 5. ระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 9 ยาวกว่าหรือเท่ากับระยะทางระหว่างปลาย หนามคู่ที่ 8

 7. ขาว่ายน้ำมีลายร่างแหที่มีช่องขนาดเล็ก ก้ามด้านนอกสีพื้นสีเขียวอมเหลือง มีจุด หรือเส้นสีเขียวเข้มหรือน้ำตาลกระจายไม่เป็นระเบียบ



<u>ภาพที่ 6</u> ปูขาว

1.3 ปูเขียว (ภาพที่ 7) มีลักษณะดังต่อไปนี้

1. หนามระหว่างตายาวเรียว หนาม 2 อันกลางยาวกว่าหนาม 2 อันด้านข้าง

2. กระดองโทนสีเขียว ส่วนใหญ่สีเขียวมะกอก

ถ้ามปล้องกลางบริเวณขอบนอกมีหนามยาวแหลมคม 2 อัน ทั้ง 2 ถ้าม

บริเวณค้านบนของก้ามหลังตำแหน่งที่นิ้วสอคเข้าในฝ่ามือมีหนามยาวแหลมคม 2
อัน อันในใหญ่กว่าอันนอก

 หนามขอบกระดองมีขนาดเล็กเรียว ขอบนอกของหนามขอบกระดองเป็นเส้นตรง หรือ โด้งเล็กน้อย

 5. ระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 9 ยาวกว่าหรือเท่ากับระยะทางระหว่างปลาย หนามคู่ที่ 8

7. ขาว่ายน้ำและขาเดินทุกขามีลายร่างแหที่มีช่องขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน ก้ามมีสีพื้น เป็นสีเขียวมีลายร่างแหที่มีช่องขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน



<u>ภาพที่ 7</u> ปูเขียว

1.4 ปูม่วง (ภาพที่ 8) มีลักษณะดังนี้

- 1. หนามระหว่างตายาวโค้งมน ความสูงอยู่ในระดับเสมอกันหรือเกือบเสมอกันทุกอัน
- 2. กระคองโทนสีเขียว
- 3. ก้ามปล้องกลางบริเวณขอบนอกมีหนามยาวแหลมคม 2 อัน ทั้ง 2 ก้าม

บริเวณด้านบนของก้ามหลังตำแหน่งที่นิ้วสอดเข้าในฝ่ามือมีหนามขาวแหลมคม 2
อัน อันในใหญ่กว่าอันนอก

5. หนามขอบกระดองโค้ง

 5. ระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 9 ยาวกว่าหรือเท่ากับระยะทางระหว่างปลาย หนามคู่ที่ 8

7. ขาว่ายน้ำมีลายร่างแหที่มีช่องขนาคใหญ่ ก้ามไม่มีลายร่างแห ด้านนอกสีโทนแคง

หรือม่วง



<u>ภาพที่ 8</u> ปูม่วง

1.5 ข้อเสนอแนะวิธีการจำแนกชนิดปูทะเลโดยวิธีตัดสินจาก external morphology

จากการศึกษาปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มสามารถสังเกตความแตกต่างๆ ได้จากลักษณะภายนอก หลายๆ ลักษณะ ร่วมกัน โดยจากการศึกษาไม่พบว่ามีลักษณะหนึ่งลักษณะใดที่สามารถจำแนกปูทั้ง 4 กลุ่มออกจากกันได้อย่างชัดเจน จากการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มที่รวบรวมได้ พบว่ามีลักษณะภายนอกที่สำคัญที่สามารถนำมาใช้จำแนกปูแต่ละกลุ่มออกจากกันได้ดังนี้

ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก

- ลายร่างแห (polygonal pattern) บนขาว่ายน้ำและบาเดิน (ภาพที่ 9)
- รูปร่างของหนามระหว่างตา (ภาพที่ 10)
- สีบริเวณด้านนอกของก้าม (ภาพที่ 11)

ข้อเสนอแนะวิธีการจำแนกชนิดปูทะเลสกุล Scylla ทั้ง 4 กลุ่มด้วยลักษณะภายนอก

1. ไม่มีลายร่างแหบนขาว่ายน้ำ

1.1 กระดองสีดำหรือเขียว หนามระหว่างตาสั้นและ โด้งมน บริเวณด้านนอกก้ามมีสีโทน แดงและ ไม่ปรากฏลายร่างแห ขอบนอกของก้ามปล้องกลาง มีหนามแหลมเพียง 1 อัน......ปูดำ

2. มีลายร่างแหบนขาว่ายน้ำ

2.1 หนามระหว่างตายาว แหลมคม มีรูปร่างสามเหลี่ยม

กระดองสีเขียวอ่อน บริเวณด้านนอกก้ามมีสีพื้นเป็นสีเหลืองอมเขียว และมีจุดสีเขียวเข้มหรือ น้ำตาลปรากฏกระจัดกระจาย ขอบนอกของก้ามปล้องกลางมีหนามแหลม 2 อัน หรือ หนามแหลม 1 อัน รอยนูน 1 อัน......ปูงาว

2.2 หนามระหว่างตาโค้งมนหรือเรียวยาว

2.2.1 สีบริเวณด้านนอกของก้ามเป็นสีโทนม่วง ไม่มีลายร่างแห

กระดองสีเขียวมะกอก หนามระหว่างตายาวโด้งมน บริเวณด้านนอกก้ามมีสีออกโทนม่วงไม่

ปรากฏลายร่างแห อาจปรากฏลายร่างแหบนขาเดินคู่ที่ 3 ขอบนอกของก้ามปล้องกลางมีหนาม 2 อัน

.....ปูม่วง

2.2.2 สีบริเวณด้านนอกของก้ามมีสีพื้นเป็นสีเขียว มีลายร่างแหชัดเจน กระดองสีเขียวมะกอก หนามระหว่างตาเรียวยาว บริเวณด้านนอกก้ามมีสีพื้นสีเขียวมีลาย ร่างแหเห็นได้ชัดเจนและปรากฏลายร่างแหบนขาเดินทุกขา ขอบนอกของก้ามปล้องกลางมีหนาม 2 อัน ......ปูเขียว



<u>ภาพที่ 9</u> แสดงรูปแบบของลายร่างแหบนขาว่ายน้ำและขาเดินของ (ก) ปูดำ ไม่ปรากฏลายร่างแห (ข) ปูขาว ปรากฏลายร่างแหที่มีช่องตาข่ายขนาดเล็กบนขาว่ายน้ำและขาเดินคู่ที่ 3 (ค) ปูม่วง ปรากฏลายร่างแหที่มีช่องตาข่ายขนาดใหญ่บนขาว่ายน้ำและขาเดินทุกขา และ (ง) ปูเขียว ปรากฏลายร่างแหที่มีช่องตาข่ายขนาดใหญ่บนขาว่ายน้ำและขาเดินคู่ที่ 3



<u>ภาพที่ 10</u> แสดงหนามระหว่างช่องตาของ (ก) ปูดำ หนามสั้นโด้งมน (ข) ปูขาว หนามยาวแหลม มี สัณฐานเป็นสามเหลี่ยม (ค) ปูเขียว หนามยาวเรียว หนามคู่กลางยาวกว่าคู่ด้านนอก และ (ง) ปู ม่วง หนามยาวโด้งมน ความสูงใกล้เคียงกัน



<u>ภาพที่ 11</u> แสดงก้ามของ (ก) ปูดำ มีสีโทนแดง ไม่ปรากฏลายร่างแห (ข) ปูขาว มีสีพื้นเป็นสีเหลือง ปรากฏจุดสีน้ำตาลหรือสีเขียวเข้มกระจัดกระจายไม่เป็นระเบียบ (ค) ปูเขียว สีพื้นเป็นสี เขียวปรากฏลายร่างแหที่ช่องตาข่ายขนาดใหญ่ และ (ง) ปูม่วง มีสีพื้นเป็นสีม่วงและไม่ ปรากฏลายร่างแห

### 2. ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric

ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของลักษณะ morphometric ทั้ง 51 ลักษณะ (ตารางที่ 7) ด้วอย่างจากปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มจำนวน 183 ตัว ประกอบด้วย ปูดำ 80 ตัว ปูเขียว 9 ตัว ปูม่วง 36 ตัว และปูขาว 58 ตัว จากแหล่งเก็บตัวอย่าง 5 แหล่ง ผลจากการวิเคราะห์ CVA โดยใช้โปรแกรม SPSS (SPSS Inc., Chicago) แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของลักษณะ morphometric ระหว่างปูดำ ปูเขียว ปูม่วงและปูขาว (Wilk's Lambda = 0.016; F<sub>(39,495,271)</sub> = 38.143; *P* < 0.001) และแสดงให้เห็นว่าจากลักษณะที่วัดทั้งหมด 51 ลักษณะมีลักษณะที่ให้ข้อมูลเพื่อการจำแนกกลุ่ม (informative character) ระหว่างปูทั้ง 4 กลุ่มจำนวน 13 ลักษณะ ประกอบด้วยลักษณะที่วัดจากกระดอง 6 ลักษณะ (FMSH, DFMS, DLPFS, ECW, CW1 และ FM) ลักษณะที่วัดจากก้าม 4 ลักษณะ (RPoW, RCL, RCW และ RDL) ลักษณะที่วัดจากขาว่ายน้ำ 2 ลักษณะ (LoPL และ UpPL) และ ลักษณะความ หนาของลำตัว (BD) โดยไม่พบว่าลักษณะที่วัดจากขาเดินคู่ที่ 3 ข้างขวาเกี่ยวข้องกับการจำแนกกลุ่ม ตารางที่ 8 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical ซึ่งประกอบด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ 3 สมการ โดยสมการที่ 1 และ 2 เพียนได้ดังนี้

- CVA1 = (2.431)(FMSH) + (0.912)(DFMS) + (-0.087)(DLPFS) + (0.132)(ECW) + (0.310)(RPoW) + (-0.335)(RCL) + (-0.333)(RCW) + (0.052)(RDL) + (-0.199)(LoPL) + (0.674)(UpPL) + (-0.136) (BD) + (-0.414)(FM) + (-0.157)(CW1) + 3.775
- CVA2 = (0.155)(FMSH) + (0.354)(DFMS) + (0.568)(DLPFS) + (-0.273)(ECW) + (0.222)(RPoW) + (0.807)(RCL) + (-0.772)(RCW) + (-0.411)(RDL) + (0.339)(LoPL) + (0.186)(UpPL) + (0.693)(BD) + (0.437)(FM) + (-0.681)(1CW) + 7.349

			Scylla groups		
	black	White	Green	Violet	Total
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Morphometric	Range	Range	Range	Range	Range
characters	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)
$\mathrm{BD}^{\mathrm{a},\mathrm{b}}$	$42.05\pm2.15$	$42.55 \pm 4.34$	$41.08 \pm 4.78$	$40.89 \pm 3.21$	$41.92 \pm 3.48$
	36.68 - 47.24	27.72 - 54.24	35.56 - 46.80	36.48 - 48.96	27.72 - 54.24
AL	$37.29 \pm 1.77$	$38.66 \pm 3.16$	$39.16 \pm 4.72$	$38.71 \pm 2.91$	$38.19 \pm 2.84$
	32.50 - 41.18	33.54 - 48.42	34.06 - 46.58	34.04 - 45.44	32.50 - 48.42
FMSH <sup>a,b</sup>	$1.22\pm0.19$	$2.18\pm0.43$	$2.41\pm0.41$	$1.95\pm0.27$	$1.79\pm0.55$
	0.86 - 1.72	1.42 - 3.78	1.88 - 3.08	1.46 - 2.66	0.86 - 3.78
DFMS <sup>a,b</sup>	$5.24\pm0.37$	$5.91\pm0.68$	$5.75\pm0.55$	$5.69\pm0.55$	$5.60\pm0.61$
	4.52 - 6.48	4.72 - 7.94	4.82 - 6.62	4.84 - 6.92	4.52 - 7.94
<b>DLPFS</b> <sup>a</sup>	$5.99\pm0.40$	$5.52\pm0.48$	$5.64 \pm 0.61$	$5.59\pm0.47$	$5.72\pm0.50$
	5.08 - 6.96	4.46 - 6.84	4.86 - 6.48	4.40 - 7.00	4.40 - 7.00
DRPFS	$6.05\pm0.44$	$5.56\pm0.52$	$5.65\pm0.56$	$5.65\pm0.48$	$5.76\pm0.53$
	4.88 - 7.04	4.72 - 6.88	4.94 - 6.34	4.84 - 7.10	4.72 - 7.10
DLFSOrb	$5.91\pm0.44$	$5.65\pm0.46$	$5.72\pm0.81$	$5.81\pm0.54$	$5.78\pm0.50$
	5.12 - 7.16	4.82 - 7.08	4.06 - 6.90	5.00 - 7.08	4.06 - 7.16
DRFSOrb	$5.94\pm0.44$	$5.71\pm0.49$	$5.78\pm0.74$	$5.91\pm0.45$	$5.84\pm0.49$
	5.00 - 7.04	5.02 - 7.24	4.20 - 6.82	5.14 - 6.90	4.20 - 7.24
ICW	$102.50 \pm 4.73$	$105.32\pm9.58$	$105.39 \pm 11.49$	$105.00\pm7.97$	$104.22\pm7.90$
	96.24 - 113.86	94.42 - 133.50	91.00 - 121.00	91.88 - 124.82	91.00 - 133.50
$ECW^{a,b}$	$106.71 \pm 5.34$	$110.23\pm9.59$	$114.55\pm12.07$	$111.91 \pm 8.29$	$109.54 \pm 8.40$
	94.28 - 120.10	99.46 - 140.84	98.34 - 129.86	97.96 - 132.50	94.28 - 140.84
CW8	$107.02\pm5.19$	$108.91 \pm 9.83$	$112.17 \pm 12.76$	$110.29 \pm 8.22$	$108.70 \pm 8.29$
	94.32 - 119.14	94.36 - 140.28	96.04 - 128.26	96.04 - 130.90	94.32 - 140.28
FW	$43.00\pm2.00$	$41.17 \pm 3.17$	$41.50 \pm 4.46$	$43.75\pm2.97$	$42.43 \pm 3.00$
	38.14 - 48.32	37.00 - 49.82	35.04 - 47.30	39.30 - 50.84	35.04 - 50.84

<u>ตารางที่ 7</u> แสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสูงสุด-ต่ำสุดของลักษณะ morphometric 51 ลักษณะ

			Scylla groups		
	black	White	Green	Violet	Tot
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean
Morphometric	Range	Range	Range	Range	Ran
characters	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-
ICL	$71.66 \pm 3.27$	$72.82\pm6.11$	$73.52\pm8.15$	$73.32\pm5.58$	72.54 ±
	63.12 - 79.40	63.98 - 90.46	64.40 - 85.02	64.22 - 86.88	63.12 -
LC	$47.73\pm2.57$	$50.17 \pm 4.88$	$52.53\pm6.42$	$50.19 \pm 4.07$	49.40 ₫
	42.80 - 54.20	44.58 - 64.54	45.68 - 61.60	43.46 - 60.64	42.80 -
RC	$48.29 \pm 4.70$	$50.27 \pm 4.90$	$52.82 \pm 6.72$	$50.19 \pm 3.97$	49.66 ±
	42.60 - 78.02	42.24 - 64.60	45.36 - 61.94	43.60 - 60.54	42.24 -
$\mathbf{FM}^{\mathbf{a},\mathbf{b}}$	$28.71 \pm 1.44$	$27.48 \pm 2.15$	$27.22 \pm 3.51$	$28.39 \pm 1.96$	28.12 ±
	25.68 - 32.52	24.72 - 34.36	19.88 - 31.56	25.66 - 33.34	19.88 -
CW1 <sup>a,b</sup>	$56.68\pm2.52$	$53.76 \pm 4.45$	$53.80\pm6.91$	$57.83 \pm 3.96$	55.74
	50.68 - 63.80	47.92 - 66.22	40.78 - 61.34	51.38 - 67.82	40.78 -
DLRFS	$17.35\pm0.99$	$16.98 \pm 1.43$	$17.01 \pm 2.31$	$17.17 \pm 1.24$	17.16
	14.36 - 19.42	14.74 - 20.88	12.08 - 19.24	14.88 - 20.94	12.08 -
CW2	$66.79 \pm 5.22$	$65.29 \pm 5.52$	$65.20 \pm 8.74$	$67.71 \pm 10.23$	66.37
	54.36 - 96.66	57.94 - 80.76	48.28 - 75.92	14.56 - 81.08	14.56 -
LOW	$14.33\pm0.75$	$13.41 \pm 1.30$	$13.56 \pm 1.81$	$14.93 \pm 1.13$	14.09
	12.46 - 16.12	10.52 - 17.06	10.80 - 16.10	13.06 - 17.40	10.52 -
ROW	$14.22\pm0.76$	$13.37 \pm 1.27$	$13.39 \pm 1.78$	$14.93 \pm 1.12$	14.03
	12.34 - 16.16	10.90 - 17.44	10.24 - 15.68	13.24 - 17.52	10.24 -
LDW	$10.86 \pm 1.33$	$11.62 \pm 1.87$	$10.53 \pm 1.67$	$11.57 \pm 1.87$	11.27 =
	8.14 - 13.52	8.26 - 16.68	8.74 - 13.26	8.72 - 16.56	8.14 -
RDW	$12.88 \pm 1.80$	$12.56\pm2.39$	$12.32\pm1.82$	$12.53 \pm 1.99$	12.66
	8.54 - 17.14	9.08 - 19.62	10.54 - 15.10	9.22 - 17.66	8.54 -
LPoL	$33.43 \pm 3.84$	$32.60 \pm 4.54$	$29.24 \pm 4.55$	$32.29 \pm 4.17$	32.65
	27.62 - 49.04	25.22 - 46.48	24.06 - 35.96	25.16 - 41.70	24.06 -
RPoL	$33.66 \pm 3.42$	$32.84 \pm 4.99$	$31.45 \pm 4.66$	$34.02\pm4.25$	33.33 ±
	28.26 - 41.64	25.26 - 49.16	26.78 - 37.66	26.96 - 44.66	25.26 -

			Scylla groups		
	black	White	Green	Violet	Total
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$
Morphometric	Range	Range	Range	Range	Range
characters	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-M
LPoW	$14.42\pm2.16$	$14.37\pm2.57$	$12.02\pm2.06$	$14.23\pm2.64$	14.23 $\pm$
	10.88 - 18.86	10.30 - 20.14	9.70 - 15.26	10.46 - 20.64	9.70 - 20
RPoW <sup>a</sup>	$15.61\pm2.19$	$15.14\pm3.08$	$13.70\pm2.32$	$15.13 \pm 2.62$	$15.23 \pm$
	11.56 - 20.62	10.48 - 24.00	11.00 - 17.00	11.04 - 22.54	10.48 - 2
LCL	$32.33 \pm 2.82$	$31.61 \pm 3.81$	$29.93 \pm 4.02$	$31.08 \pm 3.41$	31.66±
	26.60 - 39.42	26.68 - 43.84	24.74 - 36.12	25.24 - 38.18	24.74 - 4
RCL <sup>a,b</sup>	$33.41 \pm 2.96$	$32.40 \pm 4.13$	$31.16 \pm 4.22$	$31.57\pm3.35$	$32.52 \pm$
	28.00 - 40.56	25.64 - 45.52	25.82 - 37.36	26.18 - 39.72	25.64 - 4
LCW	$22.87 \pm 2.09$	$22.01 \pm 2.54$	$21.17 \pm 2.83$	$21.93 \pm 2.14$	$22.26\pm$
	19.10 - 28.46	17.74 - 30.00	17.08 - 26.00	17.84 - 26.74	17.08 - 3
$RCW^{a}$	$23.64 \pm 2.25$	$22.45\pm2.82$	$22.27 \pm 2.88$	$22.46 \pm 2.39$	$22.88\pm$
	19.24 - 29.10	18.16 - 30.64	18.92 - 27.04	18.22 - 28.24	18.16 - 3
LDL	$35.62 \pm 3.28$	$34.41 \pm 5.32$	$32.59 \pm 4.97$	$34.92 \pm 3.99$	34.87±
	30.10 - 43.46	13.80 - 48.68	26.90 - 39.60	29.14 - 45.00	13.80 - 4
RDL <sup>a,b</sup>	$35.58 \pm 3.17$	$34.75\pm5.22$	$33.77 \pm 4.73$	$35.88 \pm 4.04$	$35.25 \pm$
	30.34 - 44.08	16.10 - 50.20	28.64 - 39.84	28.98 - 45.68	16.10 - 5
LML	$45.55 \pm 3.79$	$44.86 \pm 5.43$	$43.30\pm5.78$	$45.29 \pm 4.40$	45.12±
	38.74 - 55.28	37.14 - 61.22	35.78 - 51.42	38.56 - 54.78	35.78 - 6
RML	$46.21 \pm 3.80$	$45.90 \pm 6.61$	$43.78\pm5.85$	$46.37 \pm 6.48$	$46.00\pm$
	40.70 - 56.06	37.06 - 70.76	36.88 - 51.94	38.88 - 73.78	36.88 - 7
LMW	$25.33 \pm 2.13$	$24.17 \pm 2.69$	$24.03\pm2.87$	$24.47 \pm 2.19$	$24.66\pm$
	18.90 - 30.92	19.82 - 31.32	19.84 - 28.28	19.82 - 29.54	18.90 - 3
$RMW^{b}$	$25.95 \pm 2.13$	$24.42\pm2.76$	$24.46\pm3.01$	$24.73\pm2.14$	$25.05\pm$
	21.68 - 31.82	20.20 - 32.42	20.80 - 28.92	21.82 - 29.92	20.20 - 3
LPW	$32.67 \pm 4.50$	$33.37 \pm 5.83$	$29.15 \pm 4.82$	$32.79 \pm 5.56$	32.75±
	24.00 - 41.36	23.66 - 48.88	23.04 - 36.78	24.40 - 46.28	23.04 - 4

			Scylla groups		
	black	White	Green	Violet	Total
	Mean $\pm$ SD				
Morphometric	Range	Range	Range	Range	Range
characters	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)
RPW	$36.48\pm5.19$	$35.87\pm6.83$	$33.86 \pm 5.31$	$35.22\pm5.66$	$35.84 \pm 5.92$
	26.10 - 46.68	24.00 - 54.82	27.62 - 41.18	25.14 - 49.88	24.00 - 54.82
TLCL	$129.85 \pm 10.70$	$129.22 \pm 15.90$	$122.62 \pm 16.55$	$130.05 \pm 13.38$	$129.27 \pm 13.62$
	111.24 - 153.32	106.36 - 180.18	102.20 - 147.14	108.58 - 159.28	102.20 - 180.18
TRCL	$132.78\pm10.82$	$131.12 \pm 16.46$	$127.40 \pm 17.03$	$133.01 \pm 14.03$	$131.94 \pm 14.03$
	114.66 - 156.96	105.50 - 184.50	106.86 - 150.08	112.16 - 165.58	105.50 - 184.50
LPL	$71.62 \pm 7.17$	$72.17 \pm 10.10$	$66.36 \pm 10.14$	$71.03 \pm 8.67$	$71.39 \pm 8.81$
	57.94 - 86.60	57.00 - 100.40	54.00 - 80.58	57.38 - 91.44	54.00 - 100.40
RPL	$75.22 \pm 7.94$	$73.31 \pm 11.40$	$70.55 \pm 10.13$	$74.12\pm8.91$	$74.04\pm9.61$
	62.84 - 95.98	52.04 - 106.64	59.18 - 84.66	60.04 - 95.42	52.04 - 106.64
LoPL	$33.25 \pm 1.88$	$33.92 \pm 3.78$	$32.01 \pm 4.14$	$32.59 \pm 2.72$	$33.27\pm3.02$
	29.48 - 39.46	27.08 - 48.14	26.86 - 38.80	27.76 - 38.68	26.86 - 48.14
LoPW	$16.25 \pm 1.12$	$16.88 \pm 1.77$	$16.19 \pm 2.41$	$16.68 \pm 1.95$	$16.56 \pm 1.66$
	14.02 - 18.68	14.14 - 21.88	13.44 - 19.86	13.96 - 25.34	13.44 - 25.34
UpPL	$25.77 \pm 1.43$	$27.13 \pm 2.85$	$26.08 \pm 3.63$	$26.50 \pm 2.32$	$26.43 \pm 2.40$
	22.92 - 29.92	22.46 - 35.80	21.78 - 31.74	22.78 - 33.34	21.78 - 35.80
UpPW	$16.41 \pm 1.05$	$16.93 \pm 2.04$	$16.25 \pm 2.41$	$16.55 \pm 1.46$	$16.62 \pm 1.63$
	14.16 - 19.00	11.56 - 22.06	13.14 - 19.60	13.86 - 19.76	11.56 - 22.06
TPL	$84.61 \pm 4.72$	$86.80 \pm 8.90$	$83.70 \pm 11.56$	$84.84 \pm 6.97$	$85.39 \pm 7.36$
	73.10 - 95.60	73.50 - 118.48	69.78 - 103.00	72.84 - 100.28	69.78 - 118.48
3PML	$35.64 \pm 2.11$	$36.09 \pm 4.03$	$34.96\pm5.02$	$36.57 \pm 3.36$	$35.96 \pm 3.35$
	31.80 - 42.64	29.66 - 48.02	28.82 - 41.22	28.02 - 44.52	28.02 - 48.02
3PMW	$11.33\pm0.62$	$11.63 \pm 1.07$	$11.60 \pm 1.52$	$11.65\pm0.88$	$11.52\pm0.92$
	10.00 - 13.06	10.30 - 14.60	9.84 - 13.54	10.40 - 13.84	9.84 - 14.60

			Scylla groups		
	black	White	Green	Violet	Total
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Morphometric	Range	Range	Range	Range	Range
characters	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)	(Max-Min)
3PTL	$93.82 \pm 5.60$	$94.44 \pm 9.68$	$91.09 \pm 11.99$	$96.69 \pm 7.82$	$94.52 \pm 8.16$
	83.40 - 108.42	78.02 - 124.84	76.36 - 107.06	83.76 - 116.38	76.36 - 124.84

## <u>หมายเหตุ</u> \* คือลักษณะที่ให้ข้อมูลเพื่อการจำแนกกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกโดยไม่คำนึงถึงแหล่ง เก็บตัวอย่าง

้ คือลักษณะที่ให้ข้อมูลเพื่อการจำแนกกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง BD (Body depth), AL (Abdominal length), FMSH (Frontal median spine height), DFMS (Distance between frontal median spine), DLPFS (Distance between left-pair frontal spine), DRPFS (Distance between right-pair frontal spine), DLFSorb (Distance between left frontal spine to left orbit), DRFSorb (Distance between right frontal spine to right orbit), ICW (Internal carapace width), ECW (External carapace width), CW8 (Carapace width at spine 8), FW (Frontal width), ICL (Internal carapace length), LC (Left carapace length), RC (Right carapace length), FM (Frontal margin), CW1 (Carapace width at spine 1), DLRFS (Distance between Left and right frontal spine), CW2 (Carapace width at spine 2), LOW (Left orbit width), ROW (Right orbit width), LDW (Left dactyl length), LCL RDW (Right dactyl length), LPoL (Left pollex length), RPoL (Right pollex length), LPoW (Left pollex width), RPoW (Right pollex width), LCL (Left carpus length), RCL (Right carpus length), LCW (Left carpus width), RCW (Right carpus width), LDL (Left dactyl length), RDL (Right dactyl length), LML (Left merus length), RML (Right merus length), LMW (Left merus width), RMW (Right merus width), LPW (Left propodus width), RPW (Right propodus width), TLCL (Total left cheliped length), TRCL (Total right cheliped length), LPL (Left propodus length), RPL (Right propodus length), LoPL (Lower paddle length), LoPW (Lower paddle width), UpPL (Upper paddle length), UpPW (Upper paddle width), TPL (Total length of swimming leg), 3PML (Third periopod merus length), 3PMW (Third periopod merus width) une 3PTL (Third periopod total length)

Informative		Functions	
characters	1	2	3
FMSH	2.431	0.155	0.477
DFMS	0.912	0.354	0.312
DLPFS	-0.087	0.568	1.834
ECW	0.132	-0.273	0.215
RPoW	0.310	0.222	-0.513
RCL	-0.335	0.807	0.380
RCW	-0.333	-0.772	0.343
RDL	0.052	-0.411	0.012
LoPL	-0.199	0.339	0.050
UpPL	0.674	0.186	-0.941
BD	-0.136	0.693	-0.117
FM	-0.414	0.437	-0.405
CW1	-0.157	-0.681	-0.152
(Constant)	3.775	7.349	-1.498

<u>ตารางที่ 8</u> แสดงสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical เพื่อการจำแนกกลุ่มปูทะเลจำนวน 4 กลุ่ม (ปูดำ ปู เขียว ปูม่วง และปูขาว) ที่แบ่งตามลักษณะภายนอกโดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่างซึ่งมี ทั้งหมด 3 สมการ (function)

ทมายเหตุ FMSH (Frontal median spine height), DFMS (Distance between frontal median spine), DLPFS (Distance between left-pair frontal spine), ECW (External carapace width), RPoW (Right pollex width), RCL (Right carpus length), RCW (Right carpus width), RDL (Right dactyl length), LoPL (Lower paddle length), UpPL (Upper paddle length), BD (Body depth), FM (Frontal margin) และ CW1 (Carapace width at spine 1)

ผลการเขียนกราฟระหว่างตัวแปร CVA1 และตัวแปร CVA2 แสดงไว้ในภาพที่ 12 (ก.) ซึ่งตัว แปร CVA1 และ CVA2 อธิบายความแปรปรวนของข้อมูลได้ 61.7% และ 35.5% ตามลำดับ ผลที่ได้ แสดงให้เห็นว่า ปูดำ ปูม่วง และปูขาว ถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน เห็นได้จากตำแหน่งของกลุ่มปูแต่ ละกลุ่มดังกล่าวมีตำแหน่งที่แยกกันอย่างเด็ดขาด โดยไม่พบบริเวณที่เชื่อมต่อหรือเหลื่อมซ้อนกัน ระหว่างกลุ่ม สำหรับปูเขียวพบว่า ถึงแม้ CVA จะแสดงให้เห็นความแตกต่างกับปูดำอย่างชัดเจน แต่ กลุ่มปูเขียวมีตำแหน่งอยู่ระหว่างปูขาวกับปูม่วง โดยตำแหน่งใกล้กับตำแหน่งของกลุ่มปูม่วงมากกว่า และมีบริเวณที่เหลื่อมซ้อนกันระหว่างปูเขียวกับปูงาวและปูม่วง ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยงอง informative character ที่ให้ข้อมูลเพื่อการจำแนกกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกที่ไม่คำนึงถึงแหล่ง เก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 7) จะพบว่ามี 5 ลักษณะประกอบด้วย BD, DFMS, RpoW, RCL และ LoPL ที่ ความยาวของลักษณะที่วัดได้ดังกล่าวจากปูเขียวใกล้เคียงกับความยาวของลักษณะที่วัดได้จากปูม่วงมาก ที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากขอบเขตของกลุ่มที่เกิดขึ้นยังคงพบว่า ปูขาว ปูเขียว และปูม่วง มี ตำแหน่งของสมาชิกที่แสดงความเป็นกลุ่มของตัวเอง จากข้อมูลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า ปูแต่ละกลุ่มมี ลักษณะ morphometric ที่แตกต่างกัน

Informative					Function				
characters	1	2	3	4	5	6	7	8	9
FMSH	2.577	0.256	1.101	0.213	-1.873	0.868	2.274	0.211	-0.682
DFMS	0.835	0.249	0.919	0.794	1.930	1.078	-0.576	0.101	-0.227
ECW	0.161	-0.308	-0.316	-0.063	-0.016	0.045	-0.122	-0.016	0.061
RCL	-0.296	0.721	-0.292	0.445	-0.589	-0.263	0.573	-0.121	-0.347
RDL	0.109	-0.363	0.059	-0.037	0.212	-0.107	0.225	0.199	0.369
RMW	-0.156	-0.392	0.035	-0.268	0.820	0.869	-0.168	-0.214	-0.094
UpPL	0.420	0.543	0.560	0.028	0.425	-0.729	-0.568	-0.333	0.321
BD	-0.230	0.661	-0.077	-0.135	-0.172	0.065	-0.195	0.308	-0.359
FM	-0.464	0.487	0.292	0.100	-0.480	0.324	-0.129	0.102	1.448
CW1	-0.118	-0.597	0.189	0.145	-0.122	-0.192	0.085	0.019	-0.661
(Constant)	1.218	8.598	3.656	-10.182	1.673	-3.930	12.281	-4.935	-0.823

<u>ตารางที่ 9</u> แสดงสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical เพื่อการจำแนกกลุ่มปูทะเล 10 กลุ่มที่แบ่งตาม ลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่างซึ่งมีทั้งหมด 9 สมการ

<u>หมายเหตุ</u> FMSH (Frontal median spine height), DFMS (Distance between frontal median spine), ECW (External carapace width), RCL (Right carpus length), RDL (Right dactyl length), RMW (Right merus width), UpPL (Upper paddle length), BD (Body depth), FM (Frontal margin) และ CW1 (Carapace width at spine 1)

การวิเคราะห์ CVA จากข้อมูล morphometric จากปู 10 กลุ่มที่แบ่งตามความแตกต่างของ ลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มปู (Wilk's Lambda = 0.008; F<sub>(90, 1122.561)</sub> = 12.998; *P* < 0.001) โดยมี informative character ทั้งหมด 10 ลักษณะ ประกอบด้วยประกอบด้วยลักษณะที่วัดจากกระดอง 5 ลักษณะ (FMSH, DFMS, ECW, CW1 และ FM) ลักษณะที่วัดจากก้าม 3 ลักษณะ (RCL,RDL และRMW) ลักษณะที่วัดจากขาว่ายน้ำ 1 ลักษณะ (UpPL) และ ลักษณะความหนาของลำตัว (BD) ตารางที่ 9 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical ซึ่งประกอบด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ 9 สมการ โดยสมการที่ 1 และ 2 เขียนได้ดังนี้

$$CVA1 = (2.577)(FMSH) + (0.835)(DFMS) + (0.161)(ECW) + (-0.296)(RCL) + (0.109)(RDL) + (-0.156)(RMW) + (0.420)(UpPL) + (-0.230)(BD) + (-0.464)(FM) + (-0.118)(CW1) + 1.218$$
$$CVA2 = (0.256)(FMSH) + (0.249)(DFMS) + (-0.308)(ECW) + (0.721)(RCL) + (-0.363)(RDL) + (-0.392)(RMW) + (0.543)(UpPL) + (0.661)(BD) + (0.487)(FM) + (-0.597)(CW1) + 8.598$$

ผลการเขียนกราฟระหว่างตัวแปร CVA1 และตัวแปร CVA2 แสดงไว้ในภาพที่ 12 (ข.) ซึ่งตัว แปร CVA1 และ CVA2 อธิบายความแปรปรวนของข้อมูลได้ 60.1% และ 29.0% ตามลำดับ ผลที่ได้ แสดงให้เห็นกลุ่มหลัก 4 กลุ่มคือ กลุ่มปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว โดยในกลุ่มปูที่มีแหล่งเก็บตัวอย่าง มากกว่า 1 บริเวณนั้น พบว่ามีการรวมกลุ่มของปูที่มีลักษณะภายนอกเหมือนกันจากแหล่งเก็บตัวอย่าง ต่างกันเข้าเป็นกลุ่มอย่างชัดเจน โดยกลุ่มปูดำประกอบขึ้นจากกลุ่มปูดำที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดตราด ระนอง สุราษฎร์ธานี และประเทศพม่า กลุ่มปูขาวประกอบขึ้นจากกลุ่มปูขาวที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัด ตราด ระนอง และสุราษฎร์ธานี และกลุ่มปูม่วงประกอบขึ้นจากกลุ่มปูม่วงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัด ตราด และระนอง ข้อมูลที่ได้นี้ยืนยันผลการวิเคราะห์ CVA ในรูปแบบที่แบ่งกลุ่มปูตามลักษณะ ภายนอกโดยไม่กำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง โดยผลที่ได้ยังคงแสดงความแตกต่างระหว่างปูกลุ่มหลัก 4 กลุ่มเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเฉพาะปูดำจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งเคยถูกแสดงให้เห็นว่าอาจจะเป็น สายพันธุ์ (variant) หนึ่งของปูขาว เนื่องจากผลการวิเคราะห์ CVA ของลักษณะ meristic แสดงให้เห็นว่า ปูดำจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับปูขาวจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี และประเทศเวียต นาม ขณะที่การวิเคราะห์ CVA ของลักษณะ morphometric แยกปูดำออกจากปูตัวอย่างกลุ่มอื่นๆ ซึ่งจาก ผลดังกล่าวนี้ Overton *et al.* (1997) ได้ชี้แนะว่าควรจะมีการรวบรวมตัวอย่างปูที่รวบรวมจากบริเวณ ต่างๆ ของชายฝั่งทะเลฝั่งตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้ เห็นว่าเมื่อวิเคราะห์ CVA ลักษณะ morphometric ของปูดำจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีร่วมกับปูดำ และปู อื่นๆ จากแหล่งเก็บตัวอย่างทั้งฝั่งทะเลอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน พบว่าปูดำจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี มีตำแหน่งอยู่ในกลุ่มปูดำร่วมกับปูดำจากจังหวัดตราด ระนอง และประเทศพม่า และยังแยกกันอย่าง เด็ดขาดจากปูขาวที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดตราด ระนอง หรือแม้แต่ปูขาวจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีเอง

Informative character เพื่อการจำแนกกลุ่มของกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกเท่ากับ 13 ้ลักษณะ และ Informative character เพื่อการจำแนกกลุ่มของกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและ แหล่งเก็บตัวอย่างเท่ากับ 10 ลักษณะ แต่พบว่าเป็นลักษณะซ้ำกัน 9 ลักษณะคือ FMSH, DFMS, ECW, RCL, RDL, UpPL, BD, FM และ CW1 โดย DLPFS, RPoW, RCW และ LoPL เป็นลักษณะที่เกี่ยวข้อง เฉพาะกับการจำแนกกลุ่มปุที่แบ่งตามลักษณะภายนอก ส่วน RMW เกี่ยวข้องเฉพาะกับการจำแนกกลุ่ม ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง เมื่อพิจารณา Informative character ที่ ้วัดจากก้ามทั้งเพื่อการจำแนกกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอก หรือเพื่อการจำแนกกลุ่มปูที่แบ่งตาม ้ถักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง จะพบว่า Informative character จากลักษณะของก้ามทั้งหมด เป็นข้อมูลที่ได้จากก้ามขวา (RPoW, RCL, RCW, RDL และ RMW) นอกจากนี้ลักษณะที่วัดจากก้ามขวา ้เกือบทุกลักษณะจะยาวกว่าลักษณะเดียวกันที่วัดจากก้ามซ้ายเสมอ ยกเว้นเพียงลักษณะเดียวที่พบในปูดำ คือ right dactyl length (RDL) ยาวเฉลี่ยเท่ากับ 35.58 มิลลิเมตร ซึ่งสั้นกว่า left dactyl length (LDL) ที่ มิลลิเมตรอยู่เล็กน้อย จากข้อมูลที่ได้นี้ชี้ว่าปูทะเลมีร่างกายที่ไม่สมมาตร 35.62 ยาวเฉลี่ยเท่ากับ (bilateral asymmetry) ความแตกต่างของขนาดก้ามนี้อาจเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมความชอบในการใช้ก้าม ใดก้ามหนึ่งมากกว่าอีกก้ามหนึ่ง (handedness) (Palmer, 2004) ซึ่งจากการศึกษาของ Overton et al. (1997) ก็รายงานว่า ปขาว ("white" morph) มีร่างกายที่ไม่สมมาตร แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในปดำ



<u>ภาพที่ 12</u> ผลการวิเคราะห์ CVA จากข้อมูลลักษณะ morphometric (ก.) ผลการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มปูที่ แบ่งตามลักษณะภายนอก โดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง และ (ข.) ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่ง ตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง

CVA1

#### 3. <u>ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide divergence)</u>

3.1 ผลการหาลำดับนิวกลีโอไทค์ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>

ถ้าดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย *tRNA*<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> ของปูดำ ปู เขียว ปูม่วง ปูขาว และปูม้าแสดงในภาคผนวก โดยปูดำกับปูเขียวมีขนาดเท่ากันคือ 1,122 นิวคลีโอไทด์ ในปูม่วงมีขนาด 1,121 นิวคลีโอไทด์ ส่วนในปูขาวและปูม้า พบว่ามีความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอ ไทด์ในชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายของปูแต่ละกลุ่ม คือ ปูขาวมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 3 ขนาดคือ 1,122 , 1,123 และ 1,124 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์แบบ addition/deletion ในบริเวณ TŲC loop ของยืน *tRNA*<sup>ser(UCN)</sup> (ตารางที่ 11) ส่วนปูม้ามีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 2 ขนาดคือ 1,128 และ 1,129 นิวคลีโอไทด์ ความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ แบบ addition /deletion ในบริเวณ DHU loop ของยืน *tRNA*<sup>ser(UCN)</sup> (ตารางที่ 11) สำหรับความแตกต่าง ของขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายระหว่างปูทะเลกับปูม้าโดยเฉลี่ยประมาณ 5 นิวคลีโอไทด์นั้น เกิดจากการ กลายพันธุ์แบบ addition/deletion ใน 2 บริเวณคือ บริเวณยีน tRNA และ บริเวณ intergenic spacer ระหว่าง *tRNA*<sup>ser(UCN)</sup> กับยืน *ND1* (ตารางที่ 13)

3.2 คุณสมบัติของยืนเป้าหมาย  $tRNA^{Ser(UCN)}$ -ND1- $tRNA^{Leu(CUN)}$ 

3.2.1 การจัดเรียงตัวและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>

ปู่ตัวอย่างทั้ง 5 กลุ่มอันประกอบด้วยปูดำ ปูเขียว ปูม่วง ปูขาวและปูม้ำ มีการจัดเรียงตัวของยืน เป้าหมายเหมือนกันคือ *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* โดยยิน *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* กำหนดรหัสบนดีเอ็นเอสาย H-strand ส่วน *ND1* และ *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* กำหนดรหัสด้วย L-strand พบถำดับนิวกลีโอไทด์ที่ไม่ได้กำหนด รหัสพันธุกรรมที่แทรกอยู่ระหว่างยิน (intergenic spacer) 2 ตำแหน่ง คือ ระหว่างยิน *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* กับ ยิน *ND1* และระหว่างยิน *ND1* กับ ยิน *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* โดย intergenic spacer คำแหน่งแรกยาวกว่าคำแหน่งที่ สอง ซึ่งการจัดเรียงตัวของยินที่พบในกลุ่มปูตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวกลีโอไทด์ในบริเวณ เดียวกันของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในไฟลั่ม Arthropoda (ดังแสดงชื่อวิทยาศาสตร์ ซับไฟลั่มของสิ่งมีชีวิต ดัวอย่าง ชื่อสามัญ Accession number และเอกสารอ้างอิงไว้แล้วในตารางที่ 6) พบว่าการจัดเรียงตัวของ ยินที่มีลำดับดังกล่าวสามารถพบได้ในสมาชิกส่วนใหญ่ของซับไฟลั่ม Crustacea แต่ในกุ้ง *Panulirus japonicus* (Yamauchi *et al.*, 2002) นั้นพบลำดับของยิน *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* เช่นกัน แต่ยิน *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* กลับกำหนดรหัสด้วยสายดีเอ็นเอ H-strand อย่างไรก็ตาม ลำดับยิน *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1*- *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ดังกล่าวนี้ไม่พบในสมาชิก 2 ชนิดของซับไฟลั่ม Crustacea คือ ปู *Eriocheir japonica* sinensis (Sun et al., 2005) และปู Pagurus longicarpus (Hickerson and Cunningham, 2000) นอกจากนี้ ยังพบว่าในซับไฟลั่มอื่นๆ ของไฟลั่ม Arthropoda ก็พบลำดับยิน *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ได้ เช่นกัน โดยในซับไฟลั่ม Hexapoda พบใน Apis mellifera (Crozier and Crozier, 1993), Bombyx mori (NC\_002355) และ Drosophila melanogaster (AF200829) ในขณะที่ซับไฟลั่ม Chelicerata {Carios capensis (NC\_005291) และ Ixodes hexagonus (Black and Roehrdanz, 1998)} และซับไฟลั่ม Myriapoda {Lithobius forficatus (Hwang et al., 2001)} พบว่าในบริเวณยีน ND1 มีการจัดเรียงตัวของ ยืนเป็นดังนี้ *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* โดยในบริเวณ 3' ของยืน ND1 จะเป็นยืน *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* แทนที่ ยืน *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* (ภาพที่ 13)



<u>ภาพที่ 13</u> แสดงการจัดเรียงตัวของยีนในบริเวณเป้าหมาย *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* โดยการ จัดเรียงตัวรูปแบบ (ก.) พบในซับไฟลั่ม Crustacea (ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง ปูขาว ปูม้า *A. franciscana, C. sapidus, G. dehaani, P. monodon, P. trituberculatus* และ *P. gigas*) และ ซับไฟลั่ม Hexapoda (*A. mellifera, B. mori* และ *D. melanogaster*) การจัดเรียงตัวรูปแบบ (ข.) พบใน *P. japonicus* และการจัดเรียงตัวรูปแบบ (ค.) มีลำคับของยีนเป็นดังนี้ *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* พบในซับไฟลั่ม Chelicerata (*Carios capensis* และ *Ixodes hexagonus*) และ ซับไฟลั่ม Myriapoda (*L. forficatus*)

เมื่อพิจารณาตำแหน่งและขนาดของ intergenic spacer พบว่าในซับไฟลั่ม Crustacea และ Hexapoda จะมีลักษณะคล้ายคลึงกันคือ มี intergenic spacer ระหว่าง  $tRNA^{ser(UCN)}$  กับ ND1 ยาวกว่า intergenic spacer ระหว่าง ND1 กับ  $tRNA^{Leu(CUN)}$  โดย intergenic spacer ตำแหน่งแรกจะมีขนาดประมาณ 20 – 30 นิวคลีโอไทด์ ยกเว้นใน Artemia franciscana (Perez et al., 1994) และใน Geothelphusa dehaani (Segawa and Aotsuka, 2005) ที่มีขนาดต่างออกไปอย่างชัดเจนคือมีขนาด 7 และ 170 นิวคลีโอ ไทด์ตามลำดับ โดย intergenic spacer ระหว่าง  $tRNA^{ser(UCN)}$  กับ ND1 พบได้เฉพาะในซับไฟลั่ม Crustacea และ Hexapoda (Apis mellifera, B. mori และ D. melanogaster) แต่จะไม่พบในซับไฟลั่ม Chelicerata และ Myriapoda เนื่องจากซับไฟลั่มทั้งสองนี้จะมียืน  $tRNA^{ser(UCN)}$  เหลื่อมซ้อนกับยืน ND1 ส่วน intergenic spacer ตำแหน่งที่สองจะมีขนาดเล็กคือ โดยประมาณจะไม่เกิน 10 นิวคลีโอไทด์ ยกเว้น ใน Callinectes sapidus (Place et al., 2005) และ G. dehaani ที่มีขนาด 23 และ 27 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ

#### 3.2.2 องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ (base composition) ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย

้องค์ประกอบของนิวคลีโอไทค์ในบริเวณ *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* (ตารางที่ 10) ของปุคำคือ A = 43%, T = 29%, C = 18% และ G = 10% ปุเขียว A = 45%, T = 30%, C = 17% และ G = 8% ปูม่วง A = 45%, T = 30%, C = 17% และ G = 8% และของปูขาว A = 44%, T = 30%, C = 17% และ G = 9% แสดงให้เห็นว่าในบริเวณเป้าหมายของปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มมีลักษณะเป็น A+T bias คือจะพบ นิวคลีโอไทด์ A มากที่สุด ประมาณ 45% และพบนิวคลีโอไทด์ T ประมาณ 30%, นิวคลีโอไทด์ C ประมาณ 17% และ นิวคลีโอไทค์ G ประมาณ 9% พบว่าองค์ประกอบนิวคลีโอไทค์ในปูทะเลแต่ละ กลุ่มไม่แตกต่างกัน ( $\chi^2 = 0.432$ ; df = 9; P > 0.999) แต่พบว่าองค์ประกอบของนิวคลีโอไทค์ของปูทะเล ในบริเวณดังกล่าวมีการใช้นิวกลีโอไทด์แต่ละชนิด (A, T, C และ G) ไม่เท่ากัน โดยผลการทดสอบ  $\chi^2$ ระหว่างปริมาณนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดที่พบในบริเวณเป้าหมายกับปริมาณนิวคลีโอไทด์ ในกรณีที่มี การใช้เท่ากันซึ่งจะปรากฏนิวคลีโอไทค์แต่ละชนิคเท่ากับ 25% ปรากฏว่าผลทคสอบในปูทุกกลุ่มแสดง ้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏกับปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่ ้ควรจะเป็นในกรณีที่มีการใช้นิวคลีโอไทค์แต่ละชนิดเท่ากัน นอกจากในกลุ่มปูทะเลแล้วความลำเอียง ดังกล่าวนี้ยังพบในปูม้า (A = 42%, T = 27%, C = 20% และ G = 11%) รวมทั้งสมาชิกของไฟลั่ม Arthropoda อื่นๆ ทกชนิด (ดังแสดงชื่อวิทยาศาสตร์ ซับไฟลั่มของสิ่งมีชีวิตตัวอย่าง ชื่อสามัณ Accession number และเอกสารอ้างอิงไว้แล้วในตารางที่ 6) ผลการเปรียบเทียบองค์ประกอบนิวคลีโอ ใทด์ในบริเวณ *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ของปูทะเล 4 กลุ่มกับสมาชิกของซับไฟลั่ม Crustacea ชนิดอื่นๆ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $\chi^2$  = 13.593; df = 24; P = 0.955) จาก ข้อมูลที่ได้แสคงให้เห็นว่าการใช้นิวกลีโอไทค์แต่ละชนิด (A, C, G และ T) ในบริเวณ *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-* ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> ไม่เท่ากัน แต่เมื่อเปรียบองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตกับ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 10) ซึ่งการเกิด A+T bias ที่พบจากการวิเคราะห์องค์ประกอบ นิวคลีโอไทด์เฉพาะบริเวณยีน ND1 ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการเกิด A+T bias เมื่อวิเคราะห์จาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในไมโมโตคอนเดรียจีโนมซึ่งก็มีลักษณะเป็น A+T bias เช่นกัน (Wilson *et al.*, 2000)

		1	nucleotide o	composition	u (%)		nuo	cleotide bias
	А	С	G	Т	A+T	G+C	$X^{2}_{df=3}$	Р
Black	42.55	18.05	10.30	29.10	71.65	28.35	23.57	P < 0.001
Green	44.74	17.31	8.38	29.57	74.31	25.69	29.84	P < 0.001
Violet	44.67	17.14	8.22	29.97	74.64	25.36	30.20	P < 0.001
White	44.06	16.87	9.02	30.05	74.11	25.89	28.41	P < 0.001
P. pelagicus	42.20	19.96	11.10	26.74	68.94	31.06	20.70	P < 0.001
P. trituberculatus	42.67	18.73	10.16	28.45	71.11	28.89	23.35	$P \le 0.001$
C. sapidus	43.45	19.12	10.00	27.43	70.88	29.12	24.24	P < 0.001
G. dehaani	45.30	16.36	7.19	31.15	76.44	23.56	33.67	P < 0.001
P. gigas	44.65	18.54	9.09	27.72	72.37	27.63	27.54	P < 0.001
P. japonicus	39.51	21.42	13.64	25.44	64.95	35.05	14.10	0.001 < P < 0.01
P. monodon	41.49	15.85	14.58	28.08	69.57	30.43	18.95	P < 0.001
A. franciscana	36.30	18.68	19.54	25.48	61.78	38.22	7.91	0.01 < P < 0.05
A. mellifera	48.53	10.73	5.41	35.32	83.85	16.15	49.90	P < 0.001
B. mori	49.77	13.26	7.27	29.70	79.47	20.53	43.51	P < 0.001
D. melanogaster	49.32	14.04	8.02	28.62	77.94	22.06	40.52	P < 0.001

## <u>ตารางที่ 10</u> แสดงองก์ประกอบของนิวกลีโอไทด์แต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ในบริเวณ *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>*

#### 3.2 ยืน *ND1*

ยืน ND1 ของปู่ตัวอย่างทั้ง 5 กลุ่ม (ปูทะเล 4 กลุ่ม และปูม้า) ที่ศึกษาประกอบด้วย 957 นิวคลีโอไทด์ กำหนดรหัสบน L-strand เหมือนกันในทุกตัวอย่าง มีรหัสเริ่มต้น (start codon) คือ ATT รหัสหยุดคือ TAA แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 318 ตัว ซึ่งจำนวนกรดอะมิโนของยืน ND1 ดังกล่าวเท่ากับที่ พบใน Portunus trituberculatus และยังใกล้เคียงกับ Arthropod อื่นๆ ซึ่งจากรายงานพบว่า Narceus annularus (Lavrov et al., 2002) มีจำนวนกรดอะมิโนของ ND1 น้อยที่สุดคือ 296 ตัว และ C. capensis มี กรดอะมิโนมากที่สุดคือ 325 ตัว ถ้าพิจารณาเฉพาะซับไฟลั่ม Crustacea จะพบว่า A. franciscana มี จำนวนกรดอะมิโนของ ND1 น้อยที่สุดเท่ากับ 298 ตัว ขณะที่สมาชิกชนิดอื่นๆ จะมีกรดอะมิโนอยู่ ในช่วง 312 – 321 ตัว ขณะที่กลุ่มแมลงจะมีจำนวนกรดอะมิโนน้อยกว่าคือ A. mellifera, B. mori และ D. melanogaster มีกรดอะมิโน 305, 311 และ 312 ตามลำดับ

3.3 ยืน tRNA

3.3.1 ยืน *tRNA*<sup>Ser(UCN)</sup>

ยืน *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* ของปูดำมีขนาด 67 bp ปูเขียวมีขนาด 68 bp ปูม่วงมีขนาด 67 bp ปู ขาวมี 2 ขนาดคือ 67 และ 68 bp ในปูม้าก็มี 2 ขนาดเช่นกัน คือ 67 และ 68 bp จากผลการ alignment แสดงให้เห็นว่าขนาดที่แตกต่างกันเกิดจากการกลายพันธุ์แบบ addition/deletion ในบริเวณ DHU loop และ TWC loop โดยเฉพาะ TWC loop พบว่ามีบริเวณของการเปรียบเทียบทั้งหมดเพียง 9 ตำแหน่ง แต่ เป็น polymorphic site ถึง 7 ตำแหน่ง โดยใน 7 ตำแหน่งดังกล่าวนี้เป็นการกลายพันธุ์แบบ addition/deletion ถึง 2 ตำแหน่ง (ตารางที่ 11)

โครงสร้างทุติยภูมิของ *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>* (ภาพที่ 14) แสดงให้เห็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ anticodon คือ TGA ซึ่งจดจำรหัสพันธุกรรมที่กำหนดรหัสของกรดอะมิโน Serine คือ UCN

ยืน *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>* ของปูทะเลและปูม้าตัวอย่างประกอบด้วย 11 haplotype คือ AS01, AS02, BS03, BS04, CS05, DS06, DS07, DS08, DS09, ES10 และ ES11 โดย AS01 และ AS02 พบ เฉพาะในปูดำ BS03 และ BS04 พบเฉพาะในปูเขียว CS05 พบเฉพาะในปูม่วง DS06, DS07, DS08 และ DS09 พบเฉพาะในปูขาว ส่วน ES10 และ ES11 พบเฉพาะในปูม้า

Sample	Haplotype	Nucleotide :	sequer	nce													
						а	nti-				anti-						
		acceptor	DHU	DHU	DHU	С	codon	ā	anti-	-	codon	viable	ТψС	ТψС	ТψС	acceptor	
		stem	stem	loop	stem	5	stem	C	codor	ı	stem	loop	stem	loop	stem	stem	
	1					-											
MBOI	ASUI	GATCATT TA	GTTT	ATAAA-	AAAT	ΑG	GATAT	TT	TGA	AA	GTATC	AGAA	AAGA	AAGTTTC	TCTT	AATGATT G	
MB02	ASUI		• • • •		• • • •		• • • •	••	• • •	••		• • • •	• • • •				
MB03	AS01							••		••							
MB05	AL02													A			
MB14	AS01			–													
MB20	AS01																
RB65	AS01																
RB68	AS01																
RB69	AS01																
RB71	AS01																
RB80	AS01																
RB83	AS01					• •		•••		•••							
SB05	AS01		••••		••••	• •	• • • •	••	•••	•••	• • • • •	• • • •	• • • •		• • • •		
SB08	AS01	•••••	• • • •			• •		••	•••	••	• • • • •		••••				
SB11	AS01	•••••	• • • •	••••	• • • •	• •	• • • •	••	•••	••		• • • •	••••	•••••		•••••	
SB12	AS01	• • • • • • • • • •	• • • •	••••	• • • •	• •	• • • •	••	•••	••	• • • • •	• • • •	• • • •		• • • •	•••••	
CD12	7601	•••••	• • • •	••••-		• •	• • • •	••	•••	••	• • • • •	• • • •	• • • •		• • • •	• • • • • • • •	
	ASU1	• • • • • • • • •	• • • •	••••-	• • • •	• •	• • • •	••	•••	••	• • • • •	• • • •	••••		• • • •	•••••	
1835	ASU1		• • • •	••••-	• • • •	• •	• • • •	••	•••	••	• • • • •	• • • •	• • • •			• • • • • • •	
1B40 mp42	ASUL	• • • • • • • • •	• • • •	••••-	• • • •	• •	• • • •	••	•••	••	• • • • •	• • • •	• • • •		• • • •	•••••	
·TB43	ASUL	• • • • • • • • • •	• • • •	· · · · · -			• • • •	••	•••	••			• • • •				
'I'B44	ASUI		• • • •		• • • •		• • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • •				
TB47	AS01									••							
TB49	AS01									•••							
RG06	BS03	C		T							A			G.AAT	Α	C .	
RG07	BS03	C		T							A			G.AAT	Α	C .	
RG10	BS03	C		T							A			G.AAT	A	C .	
RG15	BS03	C		т							A			G.AAT	Α	C .	

#### <u>ตารางที่ 11</u> ผลการ alignment ลำคับนิวคลีโอไทค์ของยืน *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>* โดยอ้างอิงตำแหน่งของโครงสร้างทุติยภูมิจาก haplotype AS01

RG16

RG17

RG20

RG21

BS03

BS03

BS03

BS03

<u>ตารางที่ 11</u>	(ต่อ)
	· · /

Sample	Haplotype	Nucleotide	sequer	nce									
						anti-		anti-					
		acceptor	DHU	DHU	DHU	codon	anti-	codon	viable	ΤψC	TψC	ΤψC	acceptor
		stem	stem	loop	stem	stem	codon	stem	loop	stem	loop	stem	stem
RG22	BS03	C		T				A			G.AAT	Α	C .
RG23	BS03	C		T				A			G.AAT	Α	C .
RG24	BS03	C		T				A			G.AAT	Α	C .
RG25	BS03	C		T				A			G.AAT	Α	C .
RG33	BS03	C		т				A			G.AAT	A	C .
RG34	BS03	C		т				A			G.AAT	A	C .
RG37	BS03	C		т				A			G.AAT	A	C .
RG38	BS03	C		т				A			G.AAT	A	C .
RW07	BS04	C		T				A			A.AAT	Α	C .
RV01	CS05	C		T				A			A		C .
RV02	CS05	C		T				A			A		C .
RV11	CS05	C		T				A			A		C .
RV12	CS05	C		T				A			A		C .
RV13	CS05	C		T				A			A		C .
RV27	CS05	C		т				A			A		C .
RV28	CS05	C		т				A			A		C .
RV29	CS05	C		T				A			A		C .
RV31	CS05	C		T				A			A		C .
TV02	CS05	C		T				A			A		C .
TV03	CS05	C		т				A			A		C .
TV04	CS05	C		т				Α			A		C .
TV05	CS05	C		т				Α			A		C .
TV06	CS05	C		т				Α			A		C .
TV09	CS05	C		т				Α			A		C .
TV13	CS05	C		т				Α			A		C .
RW03	DS06	C						A		G	G-A.AT	A	C .
RW04	DS07	C						A		G	A.AT	A	C .
RW08	DS06	C						A		G	G-A.AT	A	C .
RW09	DS08	C						A		G	.AA.AT	A	C .
RW14	DS08							A		G	. AA. A T	Α	C
					••••	••••	•••••		• • • •		••••••		

Sample	Haplotype	Nucleotide	sequer	nce										
						anti-		anti-						
		acceptor	DHU	DHU	DHU	codon	anti-	codon	viable	ТψС	TψC	ТψС	acceptor	
		stem	stem	loop	stem	stem	codon	stem	loop	stem	loop	stem	stem	
RW18	DS07	C						A		G	A.AT	Α	C .	
SW02	DS06	C						Α		G	G-A.AT	Α	C .	
SW03	DS07	C						A		G	A.AT	Α	C .	
SW04	DS09	C						A		G	A.AT	Α	C .	
SW05	DS06	C						A		G	G-A.AT	Α	C .	
SW06	DS06	C						A		G	G-A.AT	Α	C .	
SW08	DS09	C						A		G	A.AT	Α	C .	
TW22	DS09	C						A		G	A.AT	Α	C .	
TW34	DS09	C						A		G	A.AT	Α	C .	
TW38	DS09	C						A		G	A.AT	Α	C .	
TW44	DS06	C						A		G	G-A.AT	Α	C .	
TW53	DS06	C						A		G	G-A.AT	Α	C .	
TW54	DS06	C						A		G	G-A.AT	Α	C .	
PP01	ES10	.G.T						T			GT.A		CC .	
PP02	ES10	.G.T						T			GT.A		CC .	
PP03	ES11	.G.T		A				T			GT.A		CC .	
PP04	ES10	.G.T						т			GT.A		CC .	
PP05	ES10	.G.T						т			GT.A		CC .	
PP06	ES11	.G.T		A				т			GT.A		CC .	
PP07	ES10	.G.T						T			GT.A		CC .	
PP08	ES11	.G.T		A				т			GT.A		CC .	
PP09	ES11	.G.T		A				т			GT.A		CC .	
PP10	ES11	.G.T		A				т			GT.A		CC .	



<u>ภาพที่ 14</u> แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>* จำนวน 11 haplotypes ลูกศร (→) แสดงตำแหน่ง ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ addition/deletion จากผลการ alignment ที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของปูดำพม่า MB01 ซึ่งเป็นตัวอย่างแรก (เรียงตามลำดับอักษร) ของ haplotype แรกของยืน *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>* คือ haplotype AS01 จากผลการวิเคราะห์ของโปรแกรม DnaSP (Rozas *et al.,* 2003) ดังตารางที่ 11 เป็นลำดับนิวกลีโอไทด์อ้างอิง

ยืน *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ของปูทะเลทั้งหมดพบว่ามีขนาด 68 bp และในปูม้ามี 69 bp ขนาดที่แตกต่างกัน 1 bp นี้ เกิดจากการกลายพันธุ์ในบริเวณ TŲC loop ซึ่งในบริเวณดังกล่าวนี้พบว่ามี การกลายพันธุ์มากที่สุด นั้นคือ มีการกลายพันธุ์แบบ addition/deletion 1 ตำแหน่ง และมีการกลายพันธุ์ แบบแทนที่เบส 1 ตำแหน่ง แต่มีเบสที่เกี่ยวข้องในการแทนที่เบสถึง 3 ชนิดคือ G, A และ T (ตารางที่ 12)

โครงสร้างทุติยภูมิของ ยีน *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* (ภาพที่ 15) แสดงให้เห็นลำดับนิวคลีโอ ไทด์ของ anticodon ของยีนยีน *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* คือ TAG ซึ่งจะจดจำ codon ที่มีลำดับนิวคลีโอไทค์เป็น CUN บน mRNA

ยืน *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ของปูทะเลและปูม้าตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ประกอบด้วย 7 haplotype คือ AL01, AL02, AL03, AL04, AL05, AL06 และ AL07 โดย AL01 พบทั้ง ในปูดำและปูเขียว ส่วน AL02 และ AL03 พบเฉพาะในปูดำ AL04 พบเฉพาะในปูม่วง DL05 และ DL06 พบเฉพาะในปูขาว และ EL07 พบเฉพาะในปูม้า

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้น tRNA ทั้ง 2 ขึ้น คือ *tRNA*<sup>ser(UCN)</sup> และ *tRNA*<sup>Leu(CUN)</sup> ของปูทะเลและปูม้าพบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน ความแตกต่างของขนาดเกิดจากการกลาย พันธุ์แบบ addition/deletion ในบริเวณ DHU loop หรือ TŲC loop นอกจากนี้ยังพบว่าในบริเวณ TŲC loop ของขึ้น tRNA ทั้ง 2 ขึ้น เป็นบริเวณที่มีการกลายพันธุ์สูงที่สุด โดยเกิดทั้งการกลายพันธุ์แบบแทนที่ เบสและการกลายพันธุ์แบบ addition/deletion อย่างไรก็ตาม ขึ้น tRNA ทั้ง 2 ขึ้นสามารถจัดโครงสร้าง ทุติยภูมิเป็น coverleaf structure ที่ประกอบด้วย amino acid acceptor arm, DHU arm, anticodon arm, variable arm และ TŲC arm ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวนี้พบได้ใน Arthropod ส่วนใหญ่ ยกเว้นในแมงมุม (*Habronattus oregonensis*) ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้น *tRNA*<sup>Leu(CUN)</sup> มีโครงสร้างทุติยภูมิที่มี รูปร่างคล้ายโครงสร้าง cloverleaf แต่ไม่มี TŲC arm (Masta, 2000) ซึ่งการหายไปของ TŲC arm ยัง สามารถพบได้ในหนอนตัวกลม Ascaris suum (Wolstenholme et al., 1987) และ หอย (Yamazaki et al, 1997) เมื่อพิจารณาความหลากหลายของขึ้น tRNA ทั้ง 2 ขึ้นโดยพิจารณาจากจำนวน haplotype จะพบว่า ปูขาวมีความหลากหลายสูงที่สุดคือ ประกอบด้วย 6 haplotype ส่วนปูดำ ปูม้า ปูเขียว และปูม่วงมีจำนวน haplotype เท่ากับ 5, 3, 3 และ 2 haplotype ตามลำดับ

ตารางที่ 12 แสดงผลการ alignment ลำดับเบิวคลีโคไทด์ของยืบ <i>tRNA<sup>Leu(CUN)</sup></i> โดยอ้างอิงตำแหบ่งของโครงสร้างทติยภมิจาก hanlotyne AL01			
ตารางที่ 12 แสดงผลการ alignment ล้าดีบนวคลิโค ไทดของยับ <i>tRNA<sup>minoon</sup> โดยค้างองตำแห</i> บงของ โครงสร้างที่ตับมีจาก hanlotyne AL01	d	ere as in d'a struccum	<pre>% % % % % % % % % % % % % % % % % % %</pre>
	ตารางที่ 12	แสดงผลการ alignment ลำดับนวคลิ โอไทด์ของยัน <i>tRNA</i>	โดยอ้างองตำแหน่งของโครงสร้างทศยุกมจาก haplotype AL01

Sample	Haplotype	Nucleotide se	equenc	е													
							anti-				anti-						
		acceptor	DHU	DHU	DHU		codon	ä	anti-	-	codon	viable	e TψC	ΤΨC	ТψС	acceptor	
		stem	stem	loop	stem		stem	(	codor	ı	stem	loop	stem	loop	stem	stem	
MB01	AL01	ACTATTT TGT	CAGA	TAA	TATG	TA	CTAGA	TT	TAG	GA	TCTAG	TTAA	ATAGAA	T-AAG	TTCTAT	AAATAGT	A
MB02	AL02													A			•
MB03	AL02													A			
MB05	AL01					••			• • •								
MB14	AL01					••			• • •								
MB20	AL02					••								A			•
RB65	AL02					••			• • •					A			
RB68	AL01					• •		••	• • •								•
RB69	AL01					••		••	• • •	••							•
RB71	AL02					••		••		••				A			•
RB80	AL01					••		••	• • •	••							•
RB83	AL02					••		••		••				A			•
SB05	AL01					••		••	• • •	••							•
SB08	AL03			• • •		• •	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	G	A			•
SB11	AL01			• • •		••		••	• • •	••	• • • • •	• • • •					•
SB12	AL01			• • •		••		••	• • •	••	• • • • •	• • • •					•
SB14	AL01			• • •		••		••	• • •	••	• • • • •	• • • •					•
TB35	ALUI			• • •	• • • •	••		••	• • •	••							•
'TB40	ALUI			• • •	• • • •	••		••	• • •	••							•
TB43	ALUI	• • • • • • • • • • •		• • •		••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•
TB44	ALUI NI O1	• • • • • • • • • • •	• • • •	• • •		••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•
TB4 /	ALUI	• • • • • • • • • • •		• • •		••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•
TB49	ALUI NI O1	• • • • • • • • • • •	• • • •	• • •		••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•
RGU6	ALUI ALUI	• • • • • • • • • • • •	• • • •	• • •	• • • •	••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•
RGU /	ALUI ALUI	• • • • • • • • • • •	• • • •	• • •	• • • •	••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•
RGIU DC1E	ALUI ALUI			• • •	• • • •	••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•
KGID DC16	ALUI ALUI		• • • •	• • •		••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•
RGI0 DC17			• • • •	• • •		••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•
RGI /		• • • • • • • • • • •	• • • •	• • •	• • • •	••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •		• • • • • •		• • • • • •		•
KGZU	ALUI		• • • •	• • •	• • • •	••	• • • • •	••	• • •	••	• • • • •	• • • •	• • • • • •		• • • • • •		•

acceptor stem     DHU but but but but stem     DHU codon stem     anti- codon stem     anti- stem     TWC boy stem     acceptor stem       RG21     AL01	Sample	Haplotype	Nucleotide s	equenc	e											
acceptor stem     DHU stem     DHU loop stem     Codon stem     codon stem     Joop stem     Twc loop stem     Twc stem     acceptor stem       RG21 RG22 AL01     AL01								anti-		anti-						
stem     stem     loop stem     stem     codon     stem     loop     stem     loop     stem     loop     stem     stem       RG21     AL01			acceptor	DHU	DHU	DHU		codon	anti-	codon	viable	ε ΤψΟ	ΤψC	ΤψC	acceptor	
RG21   AL01			stem	stem	loop	stem		stem	codon	stem	loop	stem	loop	stem	stem	
RG21   AL01																
R622   AL01	RG21	AL01														
R623   AL01	RG22	AL01														
R624   AL01	RG23	AL01														
RG25   AL01	RG24	AL01														
RG33   AL01	RG25	AL01														
RG34   AL01	RG33	AL01														
RG37   AL01	RG34	AL01														
RG38   AL01	RG37	AL01														
RW07   AL01	RG38	AL01														
RV01   CL04	RW07	AL01														
RV02   CL04	RV01	CL04					.G								G	
RV11   CL04	RV02	CL04					.G								G	
RV12   CL04	RV11	CL04					.G								G	
RV13   CL04	RV12	CL04					.G								G	
RV27   CL04	RV13	CL04					.G								G	
RV28   CL04	RV27	CL04					.G								G	
RV29   CL04	RV28	CL04					.G								G	
RV31   CL04	RV29	CL04					.G								G	
TV02   CL04	RV31	CL04					.G								G	
TV03   CL04	TV02	CL04					.G								G	
TV04   CL04	TV03	CL04					.G								G	
TV05   CL04	TV04	CL04					.G								G	
TV06   CL04	TV05	CL04					.G								G	
TV09   CL04	TV06	CL04					.G								G	
TV13   CL04	TV09	CL04					.G								G	
RW03   DL05     RW04   DL05     RW08   DL05     RW09   DL05	TV13	CL04					.G								G	
RW04   DL05     RW08   DL05     RW09   DL05	RW03	DL05									C		A			
RW08 DL05 C	RW04	DL05									C		A			
RW09 DL05	RW08	DL05									C		A			
	RW09	DL05									C		A			

Sample	Haplotype	Nucleotide se	equenc	e									
						anti-		anti-					
		acceptor stem	DHU stem	DHU loop	DHU stem	codon stem	anti- codon	codon stem	viable loop	e TψC stem	TψC loop	TψC stem	acceptor stem
RW14	DL05		<u> </u>		<u> </u>				С		A		
RW18	DL05								C		A		
SW02	DL05								С		A		
SW03	DL05								С		A		
SW04	DL05								С		A		
SW05	DL05								с		A		
SW06	DL05								с		A		
SW08	DL05								С		A		
TW22	DL05								С		A		
TW34	DL05								С		A		
TW38	DL05								С		A		
TW44	DL05								С		A		
TW53	DL06								С	G	A		
TW54	DL05								С		A		
PP01	EL07	G					C				.TT		
PP02	EL07	G		• • •			C				.TT		
PP03	EL07	G	• • • •	• • •	• • • • •	• • • • • •	C		• • • •		.TT		
PP04	EL07	G	• • • •	• • •	• • • • •	• • • • • •	C		• • • •		.TT		
PP05	EL07	G	• • • •	• • •		• • • • • •	C		• • • •		.TT		
PP06	EL07	G		• • •		• • • • • •	C				.TT		
PP07	EL07	G	• • • •	• • •	• • • • •	• • • • • •	C		• • • •	• • • • • •	.TT		
PP08	ELU/	G	• • • •	• • •	• • • • •	• • • • • •	C		• • • •	• • • • • •	.TT		
PP09	ELU7	G	• • • •				C				.TT		
<b>bbt</b> 0	ET0.1	G					C				.TT		



<u>ภาพที่ 15</u> แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* จำนวน 7 haplotypes ถูกศร (→) แสดงตำแหน่ง ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ addition/deletion จากผลการ alignment ที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของปูดำพม่า MB01ซึ่งเป็นตัวอย่างแรก (เรียงตามลำดับอักษร) ของ haplotype แรกของยืน *tRNA<sup>Leu</sup>* คือ haplotype AL01 จากผลการวิเคราะห์ของโปรแกรม DnaSP (Rozas *et al.*, 2003) (haplotype AL01) ดังตารางที่ 12 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง

		Nucleotide position	
		11111111 111111111 111111111 2222222222	
		113445 555555566 777777778 8800000111 1222333444 6667799999 0000111122 2233345555	
Sample	Haplotype	2346797190 1234568989 1234567892 6904679023 9248147589 1476901479 0369245813 4706974679	
MB01	A01	ATCTA-GCAA AGTTCTTT -ACTCT TTCTAGTTAT AAGTGTAAAT AACTTAACTA TAGTCAACCA TGATTTCAGA	
MB02	A02		
MB03	A03		
MB05	A04		
MB14	A05		
MB20	A06		
RB65	A03		
RB68	A07		
RB69	A07		
RB71	80A		
RB80	A05		
RB83	A09		
SB05	A07		
SB08	A10		
SB11	A05		
SB12	A11		
SB14	A05		
TB35	A07		
TB40	A05		
TB43	A05		
TB44	A05		
TB47	A05		
TB49	A12		
RG06	B13	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG07	B13	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG10	B14	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG15	B13	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG16	B14	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	

<u>ตารางที่ 13</u> แสดง haplotype ของปูแต่ละตัวและตำแหน่งที่มีนิวกลีโอไทด์แตกต่างกันของชิ้นดีเอ็นเอ *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* 

		Nucleotide position	
		$11111111 \ 111111111 \ 111111111 \ 22222222$	
		113445 555555566 777777778 8800000111 1222333444 6667799999 0000111122 2233345555	
Sample	Haplotype	2346797190 1234568989 1234567892 6904679023 9248147589 1476901479 0369245813 4706974679	
RG17	B15	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG20	B16	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG21	B15	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG22	B13	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG23	B13	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG24	B14	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG25	B13	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG33	B14	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG34	B17	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG37	B18	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RG38	B13	.CT-A GAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RW07g	B19	.CT-AAA-A.TA.CTCA.ATA GTACACT.CG.TACT.TAT. ATTT	
RV01	C20	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
RV02	C21	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
RV11	C21	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
RV12	C21	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
RV13	C22	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
RV27	C23	CT-AACT CCAA .TA.TC T.TA.T.CATG ACTCT.A.	
RV28	C24	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
RV29	C25	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG GCTCT.A.	
RV31	C21	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
TV02	C23	CT-AACT CCAA .TA.TC T.TA.T.CATG ACTCT.A.	
TV03	C26	CT-AACT CCAA .TA.TCT	
TV04	C21	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
TV05	C21	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
TV06	C21	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	
TV09	C21	CT-AACT CCAA .TA.TCT	
TV13	C21	CT-AACT CCAA .TA.TCTA.T.CATG ACTCT.A.	

		Nucleotide position	
		$11111111 \ 111111111 \ 111111111 \ 22222222$	
		113445 555555566 777777778 8800000111 1222333444 6667799999 0000111122 2233345555	
Sample	Haplotype	2346797190 1234568989 1234567892 6904679023 9248147589 1476901479 0369245813 4706974679	
RW03	D27	.CA.GG .AATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
RW04	D28	.CA.GAATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
RW08	D27	.CA.GG .AATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
RW09	D29	.CA.GAAATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
RW14	D29	.CA.GAAATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
RW18	D28	.CA.GAATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
SW02	D27	.CA.GG .AATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
SW03	D28	.CA.GAATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
SW04	D30	.CA.GATA.C -GTTCTACAGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
SW05	D27	.CA.GG .AATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
SW06	D27	.CA.GG .AATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
SW08	D31	.CA.GATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
TW22	D32	.CA.GATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCTG	
TW34	D31	.CA.GATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
TW38	D31	.CA.GATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
TW44	D27	.CA.GG .AATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
TW53	D33	.CA.GG .AATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
TW54	D34	.CA.GG .AATA.C -GTTCTA.AGA .TA.TCTACTA.T.CAT. AATCT	
PP01	E35	G.TT.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC TGTCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
PP02	E36	G.TT.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC T.TCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
PP03	E37	G.TA.T.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC TGTCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
PP04	E38	G.TT.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC TGTCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
PP05	E39	G.TT.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC TGTCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
PP06	E37	G.TA.T.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC TGTCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
PP07	E40	G.TT.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC TGTCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
PP08	E37	G.TA.T.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC TGTCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
PP09	E37	G.TA.T.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC TGTCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
PP10	E41	G.TA.T.G .TACC C.T.TTAT.CAGA.AGAT.TGTC T.TCG.AG CGACAG.TT. ACGCGCT.	
		Nucleotide position	
--------	-----------	---	--
		222222222 22222222 333333333 33333333 333333	
		6677778888 8889999990 0001112222 2344455555 6677888899 9001111222 4444556677 7888990000	
Sample	Haplotype	0615890123 4570346892 4583470236 9524702369 2747036925 8140369258 0369584703 6124470278	
MB01	A01	TTAATATTGG TTGATCCTTC GATCAGAGAC TATTGTTTTA AACTATGCAA ATTTCACACC GTTATAGAAG TTTATATAAT	
MB02	A02	T	
MB03	A03	T	
MB05	A04	T	
MB14	A05		
MB20	A06	T	
RB65	A03	T	
RB68	A07	T	
RB69	A07	T	
RB71	A08	T	
RB80	A05		
RB83	A09	T	
SB05	A07	T	
SB08	A10	T	
SB11	A05		
SB12	A11	T	
SB14	A05		
TB35	A07	T	
TB40	A05		
TB43	A05		
TB44	A05		
TB47	A05		
TB49	A12		
RG06	B13	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AA.A CC.C.G.	
RG07	B13	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AA.A CC.C.G.	
RG10	B14	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AA.A CC.C.G.	
RG15	B13	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.	
RG16	B14	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AA.A CC.C.G.	

		Nucleotide position
		222222222 22222222 333333333 33333333 333333
		6677778888 8889999990 0001112222 2344455555 6677888899 9001111222 4444556677 7888990000
Sample	Haplotype	0615890123 4570346892 4583470236 9524702369 2747036925 8140369258 0369584703 6124470278
RG17	B15	.CAA ACA.ATCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG20	B16	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG21	B15	.CAA ACA.ATCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG22	B13	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG23	B13	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG24	B14	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG25	B13	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG33	B14	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG34	B17	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG37	B18	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RG38	B13	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RW07g	B19	.CAA ACA.AT.CCT AT.AT C.CAA.CATCT.A.TCTTTT AAA CC.C.G.
RV01	C20	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
RV02	C21	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
RV11	C21	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
RV12	C21	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
RV13	C22	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CC.TTTT ACAA C
RV27	C23	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
RV28	C24	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
RV29	C25	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CC.TTTT ACAA C
RV31	C21	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
TV02	C23	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
TV03	C26	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CC.TTTT ACAA C
TV04	C21	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
TV05	C21	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
TV06	C21	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
TV09	C21	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C
TV13	C21	CCAA ACA.GTTC.T AGATCAA.C G.T.T.A.CTTTT ACAA C

		Nucleotide	position						
		2222222222	2222222223	33333333333	33333333333	33333333333	344444444	444444444	444445555
		6677778888	8889999990	0001112222	2344455555	6677888899	9001111222	4444556677	7888990000
Sample	Haplotype	0615890123	4570346892	4583470236	9524702369	2747036925	8140369258	0369584703	6124470278
RW03	D27	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
RW04	D28	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C	.GTCTCATT.	TT	ACAA	С
RW08	D27	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
RW09	D29	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	С
RW14	D29	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
RW18	D28	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
SW02	D27	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
SW03	D28	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
SW04	D30	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
SW05	D27	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
SW06	D27	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
SW08	D31	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
TW22	D32	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	T	ACAA	C
TW34	D31	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
TW38	D31	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
TW44	D27	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
TW53	D33	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
TW54	D34	GC.AA	ACA.ATT.CT	AGCAT	CGCAA.C.C.	.GTCTCATT.	TT	ACAA	C
PP01	E35	CC.GAGAGAT	.CACC.TT	A.CTCACACT	.TCAACCG	ATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CC.TCTCT.C
PP02	E36	CC.GAGAGAT	.C.CC.TT	A.CTCACACT	.CCAACCG	TATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CCCTCTCT.C
PP03	E37	CC.GAGAGAT	.C.CC.TT	A.CTCACACT	.CCAACCG	TATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CCCTCTCT.C
PP04	E38	CCAGAGAT	.C.CC.TT	A.CTCACACT	.CCAA.CG	ATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CCCTCTCT.C
PP05	E39	CC.GAGAGAT	.C.CC.TT	A.CTCACATT	.CCAACCG	TATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CCCTCTCT.C
PP06	E37	CC.GAGAGAT	.C.CC.TT	A.CTCACACT	.CCAACCG	TATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CCCTCTCT.C
PP07	E40	CC.GAGAGAT	.C.CC.TT	A.CTCACACT	.CCAACCG	TATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CCCTCTCT.C
PP08	E37	CC.GAGAGAT	.C.CC.TT	A.CTCACACT	.CCAACCG	TATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CCCTCTCT.C
PP09	E37	CC.GAGAGAT	.C.CC.TT	A.CTCACACT	.CCAACCG	TATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CCCTCTCT.C
PP10	E41	CC.GAGAGAT	.C.CC.TT	A.CTCACACT	.CCAACCG	TATGG	GC.C.T.T.A	ACA.CGAGGA	CCCTCTCT.C

		Nucleotide	position						
		5555555555	555555555555555555555555555555555555555	555555555555555555555555555555555555555	5555666666	6666666666	6666666666	6777777777	7777777777
		1111122223	3333444455	6666677888	8999001112	2223333445	5667788889	9000112223	344444556
Sample	Haplotype	2567823470	3459257847	0256858014	7369251470	3692458143	6581403692	5146094581	7035689271
MB01	A01	CAATATTCAT	TACCCTATCT	TGGTCTCATA	TTTACGAACC	TCGTATTTCT	ATCGACTCAG	CTTAAAAGCT	GCCCTACTCA
MB02	A02								T
MB03	A03			C					T
MB05	A04								
MB14	A05								
MB20	A06								T
RB65	A03			C					T
RB68	A07								
RB69	A07								
RB71	A08								T
RB80	A05								
RB83	A09								T
SB05	A07								
SB08	A10								T
SB11	A05								
SB12	A11						G		
SB14	A05								
TB35	A07								
TB40	A05								
TB43	A05								
TB44	A05								
TB47	A05								
TB49	A12								T
RG06	B13	TCTG.	ATTTTATC	.AAT.CG	AC.A.GTA	CTTACTC	TATTAT.A	TAT.	ΑΤ.
RG07	B13	TCTG.	ATTTTATC	.AAT.CG	AC.A.GTA	CTTACTC	TATTAT.A	TAT.	ΑΤ.
RG10	B14	TCTG.	ATTTTATC	.AAT.CG	AC.A.GTA	CTTACTC	TATTAT.A	TAT.	ΑΤ.
RG15	B13	TCTG.	ATTTTATC	.AAT.CG	AC.A.GTA	CTTACTC	TATTAT.A	TAT.	ΑΤ.
RG16	B14	TCTG.	ATTTTATC	.AAT.CG	AC.A.GTA	CTTACTC	TATTAT.A	TAT.	ΑΤ.

		Nucleotide position	
		555555555 555555555 555555555 5555666666	777
		1111122223 3333444455 6666677888 8999001112 2223333445 5667788889 9000112223 344444	1556
Sample	Haplotype	2567823470 3459257847 0256858014 7369251470 3692458143 6581403692 5146094581 7035689	271
RG17	B15	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RG20	B16	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RG21	B15	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RG22	B13	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RG23	B13	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RG24	B14	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RG25	B13	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RG33	B14	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RG34	B17	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RG37	B18	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A.T	.т.
RG38	B13	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.т.
RW07g	B19	TCTG. ATTTTATC .AAT.CGAC.A.GTA CTTACTCTATTAT.A TAT. A	.T.
RV01	C20	TT. ATTTTATA .AATATA	· • • •
RV02	C21	TT. ATTTTATA .AATATA	
RV11	C21	TT. ATTTTATA .AATATA	· · · ·
RV12	C21	TT. ATTTTATA .AATATA	
RV13	C22	TT. ATTTTATA .AATATA	
RV27	C23	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	
RV28	C24	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	•••
RV29	C25	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	
RV31	C21	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	•••
TV02	C23	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	•••
TV03	C26	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTAT.AA TAATC ATTAT	•••
TV04	C21	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	
TV05	C21	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	•••
TV06	C21	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	
TV09	C21	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	
TV13	C21	TT. ATTTTATA .AA TATA .TCCTTAT.AA TAATC ATTAT	•••

		Nucleotide position	
		555555555 55555555555555555555555555555	
		1111122223 $3333444455$ $6666677888$ $8999001112$ $2223333445$ $5667788889$ $9000112223$ $3444444556$	
Sample	Haplotype	2567823470 3459257847 0256858014 7369251470 3692458143 6581403692 5146094581 7035689271	
RW03	D27	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
RW04	D28	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGT	
RW08	D27	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
RW09	D29	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
RW14	D29	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
RW18	D28	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGT	
SW02	D27	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
SW03	D28	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGT	
SW04	D30	TGT.C ATTTTATAT.CCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
SW05	D27	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
SW06	D27	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
SW08	D31	TGT.C ATTTTATAT.CCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
TW22	D32	TGT.C ATTTTATAT.CCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
TW34	D31	TGT.C ATTTTATAT.CCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
TW38	D31	TGT.C ATTTTATAT.CCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
TW44	D27	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
TW53	D33	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
TW54	D34	TGT.C ATTTTATATGCCCT.ATG CTTCA.TCATTAA.A .AGATC ATTGTC	
PP01	E35	GA.C.TTAGAAA.TA C.C.TAGA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAGGG.AA. ATT.CG.A	
PP02	E36	GAGC.TGTAGAAACTA C.C.TAGA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAG.G.AA. ATT.CG.A	
PP03	E37	GAGC.TGTAGAAACTA C.C.TAGA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAG.G.AA. ATT.CG.A	
PP04	E38	GAGC.TTAGAAA.TA C.C.TAA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAGGG.AA. ATT.CG.A	
PP05	E39	GAGC.TGTAGAAACTA C.C.TAGA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAG.G.AA. ATT.CG.A	
PP06	E37	GAGC.TGTAGAAACTA C.C.TAGA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAG.G.AA. ATT.CG.A	
PP07	E40	GAGC.TGTAGAAACTA C.C.TAGA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAG.G.AA. ATT.CG.A	
PP08	E37	GAGC.TGTAGAAACTA C.C.TAGA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAG.G.AA. ATT.CG.A	
PP09	E37	GAGC.TGTAGAAACTA C.C.TAGA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAG.G.AA. ATT.CG.A	
PP10	E41	GAGC.TGTAGAAACTA C.C.TAG.TA AAACGC.C.C .A.AGTGA TAAG.G.AA. ATT.CG.A	

		Nucleotide position
		111 11111111
		777777777 7777888888 88888888888 8888888
		6667777888 8999000011 2223344445 5566666778 8899999001 1122245556 77888888001 1222333555
Sample	Haplotype	4670369125 8467035928 1363625781 4701689251 4703569281 4703943692 1703689140 3245149234
MB01	A01	CTAATACATC TCGTAACATA ACTGTATTAT TTTCAGTTAA ATCAGCTTAT TGAACTCTCC TACAACTACT AATTTTCTTC
MB02	A02	G
MB03	A03	GAA
MB05	A04	
MB14	A05	G
MB20	A06	GAA
RB65	A03	G
RB68	A07	
RB69	A07	
RB71	A08	
RB80	A05	G
RB83	A09	G
SB05	A07	
SB08	A10	GA
SB11	A05	G
SB12	A11	G
SB14	A05	G
TB35	A07	
TB40	A05	G
TB43	A05	G
TB44	A05	G
TB47	A05	G
TB49	A12	
RG06	B13	TC.TC.T
RG07	B13	TC.TC.T
RG10	B14	$TC_TC_T$ . TA GA. GT.T.C.C. CA CT.A AT AATCTT . TC TC T C C
RG15	B13	
RG16	B14	
1010		

		Nucleotide position
		111 11111111
		777777777 7777888888 88888888888 8888888
		6667777888 8999000011 2223344445 5566666778 8899999001 1122245556 77888888001 1222333555
Sample	Haplotype	4670369125 8467035928 1363625781 4701689251 4703569281 4703943692 1703689140 3245149234
RG17	B15	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCAT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RG20	B16	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCAT.AAT.AATCTTTC.TC.T. GC.C
RG21	B15	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCAT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RG22	B13	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCAT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RG23	B13	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCAT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RG24	B14	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCACT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RG25	B13	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCAT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RG33	B14	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCACT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RG34	B17	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCACCT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RG37	B18	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCACT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RG38	B13	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCAT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RW07g	B19	TC.TC.TTAGA. GT.T.C.CCAT.AAT.AATCTTTC.TC.TC.C
RV01	C20	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC CACGACT.TTTTTTCA.C
RV02	C21	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
RV11	C21	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
RV12	C21	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
RV13	C22	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
RV27	C23	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
RV28	C24	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCC.A.C
RV29	C25	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CATGACT.TTTTTTCA.C
RV31	C21	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
TV02	C23	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
TV03	C26	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CATGACT.TTTTTTCA.C
TV04	C21	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
TV05	C21	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
TV06	C21	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
TV09	C21	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C
TV13	C21	TA.CTT CTATGA. GT.T C.AGT.ATCC.C CACGACT.TTTTTTCA.C

		Nucleotide position
		111 11111111
		777777777 7777888888 8888888888 88888888
		6667777888 8999000011 2223344445 5566666778 8899999001 1122245556 77888888001 1222333555
Sample	Haplotype	4670369125 8467035928 1363625781 4701689251 4703569281 4703943692 1703689140 3245149234
RW03	D27	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
RW04	D28	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
RW08	D27	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
RW09	D29	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
RW14	D29	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
RW18	D28	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
SW02	D27	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
SW03	D28	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
SW04	D30	.A.TTT .TACT.AT.T.TCACTGACATGA.T.TTTTTTC
SW05	D27	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
SW06	D27	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
SW08	D31	.A.TTT .TACT.AT.T.TCACTGACATGA.T.TTTTTTC
TW22	D32	.A.TTT .TACT.AT.T.TCACTGACATGA.T.TT .GTTTTC
TW34	D31	.A.TTT .TACT.AT.T.TCACTGACATGA.T.TTTTTTC
TW38	D31	.A.TTT .TACT.AT.T.TCACTGACATGA.T.TTTTTTC
TW44	D27	.A.TTT .TACT.AT.T.TC .CACTGACATGA.T.TTTTTTC
TW53	D33	.A.TTT .TACT.AT.T.TCACTGACATGA.T.TTTTTTC
TW54	D34	.A.TTT .TACT.AT.T.TCACTGACATGA.T.TTTTTTC
PP01	E35	T.TTTGCA .TACCTG C.CTCTCAGTA.AGC .ATTA.CA CAC.GCTT C.TCGT.CCCT.AT
PP02	E36	T.TTTGCA .TACCTG C.CTC.C.TCAGTACAGC GATTA.CA CAC.ACTT C.TCGT.CCCT.AT
PP03	E37	T.TTTGCA .TACCTG C.CTC.C.TCAGTACAGC GATTA.CA CAC.ACTT C.TCGT.CCCT.AT
PP04	E38	T.TTTGCA .TACCTG C.CTCTCAGTA.AGC .ATTA.CA CAC.GCTT C.TCT.CCCT.AT
PP05	E39	T.TTTGCA .TACCTG C.CTC.C.TCAGTACAGC GATTA.CA CAC.ACTT C.TCGT.CCCT.AT
PP06	E37	T.TTTGCA .TACCTG C.CTC.C.TCAGTACAGC GATTA.CA CAC.ACTT C.TCGT.CCCT.AT
PP07	E40	T.TTTGCAACCTG C.CTC.C.TCAGTACAGC GATTA.CA CAC.ACTT C.TCGT.CCCT.AT
PP08	E37	T.TTTGCA .TACCTG C.CTC.C.TCAGTACAGC GATTA.CA CAC.ACTT C.TCGT.CCCT.AT
PP09	E37	T.TTTGCA .TACCTG C.CTC.C.TCAGTACAGC GATTA.CA CAC.ACTT C.TCGT.CCCT.AT
PP10	E41	T.TTTGCA .TACCTG C.CTC.C.TCAGTACAGC GATTA.CA CAC.ACTT C.TCGT.CCCT.AT

		Nucleotide position
		111111111 1
		000000011 1
		5666788900 3
Sample	Haplotype	9028712139 1
MB01	A01	GTTTC-TAAT T
MB02	A02	T
MB03	A03	T
MB05	A04	
MB14	A05	
MB20	A06	T
RB65	A03	T
RB68	A07	
RB69	A07	
RB71	A08	T
RB80	A05	
RB83	A09	T
SB05	A07	
SB08	A10	T-C
SB11	A05	
SB12	A11	
SB14	A05	
TB35	A07	
TB40	A05	
TB43	A05	
TB44	A05	
TB47	A05	
TB49	A12	
RG06	B13	AC
RG07	B13	AC
RG10	B14	AC
RG15	B13	AC
RG16	B14	AC

		Nucleotide position
		111111111 1
		000000011 1
		5666788900 3
Sample	Haplotype	9028712139 1
RG17	B15	AC
RG20	B16	AC
RG21	B15	AC
RG22	B13	AC
RG23	B13	AC
RG24	B14	AC
RG25	B13	AC
RG33	B14	AC
RG34	B17	AC
RG37	B18	AC
RG38	B13	AC
RW07g	B19	AC
RV01	C20	ACCCC .
RV02	C21	ACCCC .
RV11	C21	ACCCC .
RV12	C21	ACCCC .
RV13	C22	ACCCC .
RV27	C23	ACCCC .
RV28	C24	ACCCC .
RV29	C25	ACCCC .
RV31	C21	ACCCC .
TV02	C23	ACCCC .
TV03	C26	ACCCC .
TV04	C21	ACCCC .
TV05	C21	ACCCC .
TV06	C21	ACCCC .
TV09	C21	ACCCC .
TV13	C21	ACCCC .

		Nucleotide position
		111111111 1
		000000011 1
		5666788900 3
Sample	Haplotype	9028712139 1
RW03	D27	ACTG
RW04	D28	ACTG
RW08	D27	ACTG
RW09	D29	ACTG
RW14	D29	ACTG
RW18	D28	ACTG
SW02	D27	ACTG
SW03	D28	ACTG
SW04	D30	ACTG
SW05	D27	ACTG
SW06	D27	ACTG
SW08	D31	ACTG
TW22	D32	ACTG
TW34	D31	ACTG
TW38	D31	ACTG
TW44	D27	ACTG
TW53	D33	ACT-CG
TW54	D34	ACTG
PP01	E35	A.A.AAG. C
PP02	E36	A.A.AAG. C
PP03	E37	A.A.AAG. C
PP04	E38	A.A.AAG. C
PP05	E39	A.A.AAG. C
PP06	E37	A.A.AAG. C
PP07	E40	A.A.AAG. C
PP08	E37	A.A.AAG. C
PP09	E37	A.A.AAG. C
PP10	E41	A.A.AAG. C

3.4 ตำแหน่งที่มีความแตกต่างของลำคับนิวคลีโอไทด์ (polymorphic site) ในดีเอ็นเอเป้าหมาย

alignment แสดงให้เห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวกลีโอไทด์ของปู่ตัวอย่าง ผลการ ทั้งหมด (ปูทะเล 4 กลุ่ม และ ปูม้า 1 กลุ่ม) จะมีตำแหน่งของการเปรียบเทียบทั้งหมด 1,131 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่มีช่องว่าง (gap) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์แบบ addition/deletion ทั้งหมด 11 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์แบบแทนที่เบส 320 ตำแหน่ง ซึ่งแบ่งได้เป็น parsimony-informative site 313 ตำแหน่ง และ singleton variable site 7 ตำแหน่ง โดยเป็นตำแหน่งที่ไม่มีการกลายพันธุ์ 800 ์ ตำแหน่ง เมื่อพิจารณาตำแหน่งของการกลายพันธุ์ทั้งหมด {(addition/deletion) + substitution} ที่เกิดขึ้น ทั้ง 331 ตำแหน่ง (ตารางที่ 13) เปรียบเทียบกับตำแหน่งของยืนจะพบว่าเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณ ยืน tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> จำนวน 20 ตำแหน่ง เกิดในบริเวณ intergenic spacer ระหว่าง tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>กับยืน ND1 ้จำนวน 13 ตำแหน่ง เกิดในยืน ND1 จำนวน 287 ตำแหน่ง เกิดใน intergenic spacer ระหว่างยืน ND1 ้กับ *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* จำนวน 3 ตำแหน่ง และเกิดในยืน *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* 8 ตำแหน่ง โดยการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น ใน tRNA ทั้ง 2 ยืนจะอยู่ในบริเวณ TYC arm ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเข้มงวดของการคัดเลือกน้อยมาก ดังจะเห็นได้จากในสิ่งมีชีวิตบางชนิดยืน *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ไม่มีแขน TYC arm ส่วนในยืน ND1 พบว่าจาก ้นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 957 นิวคลีโอไทด์ซึ่งเท่ากันในปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มและปูม้า ซึ่งพบว่ามีตำแหน่งที่ นิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 287 ตำแหน่งนั้น แบ่งได้เป็น parsimony-informative site จำนวน 280 ตำแหน่ง และเป็น singleton variable site จำนวน 7 ตำแหน่ง เป็นการกลายพันธ์ที่รหัสพันธกรรม ้ตำแหน่งที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 53 11 และ 233 ตำแหน่ง ดังจะเห็นได้ว่า รหัสพันธกรรมตำแหน่งที่ 3 จะ ้เกิดเกิดการแทนที่เบสสูงที่สุด รองถงมาคือ รหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 1 และรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 2 เป็นตำแหน่งที่มีการอนุรักษ์สูงที่สุด ซึ่งคุณสมบัติของการกลายพันธ์ที่เกิดขึ้นในลักษณะดังกล่าวพบ ใด้เช่นกันในสัตว์เลี้ยงถูกด้วยนม (Xia, 1998; Nei and Kumar, 2000) เหตุที่เป็นเช่นนั้นเนื่องจากการ กลายพันธ์ของนิวคลีโอไทค์ในตำแหน่งที่ 2 ของรหัสพันธกรรม จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรด อะมิโน (non-sysnonymous substitution) มากกว่าการกลายพันธ์ที่เกิดในตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 3 นิวคลีโอไทด์ของรหัสพันธกรรมในตำแหน่งที่ 2 จึงอย่ภายใต้การคัดเลือกอย่างเข้มงวดกว่า ดังนั้น นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในรหัสพันฐกรรม ซึ่งผลที่เห็นได้คือ นิวคลีโอไทด์ของรหัส พันธกรรมตำแหน่งที่ 3 และ 1 จะมีอัตราการแทนที่เร็วกว่าตำแหน่งที่ 2 (Kimura. 1983)

3.5 การวิเคราะห์ Molecular phylogenetics ของถำดับนิวคลีโอไทด์ *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1tRNA*<sup>Leu(CUN)</sup>

#### 3.5.1 การทดสอบการอิ่มตัวของการแทนที่เบส

ผลการเปรียบเทียบจำนวนการแทนที่แบบ transition (TS) และการแทนที่แบบ Transversion (TV) และการแทนที่ทั้งหมดกับระยะห่างทางพันธุกรรมในรูปของแผนภูมิแสดงให้เห็นว่า การเพิ่มขึ้นของทั้ง TS และ TV สอดกล้องกับการเพิ่มขึ้นของระยะห่างทางพันธุกรรม นั้นคือ เมื่อ ระยะห่างทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้นการแทนที่ทั้ง 2 รูปแบบก็เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 16) ข้อมูลที่ได้นี้บ่งชี้ว่า ทั้งการ แทนที่เบสแบบ TS และ TV ยังไม่ถึงจุดอิ่มตัว และตำแหน่งที่มีการแทนที่ดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่ให้ ข้อมูลที่ดีสำหรับใช้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกลุ่มตัวอย่าง (Miya et al., 2002)

### 3.5.2 แบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสมของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย

ผลการทดสอบแบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสมสำหรับชิ้นดีเอ็นเอ  $tRNA^{ser(UCN)}$ -ND1- $tRNA^{Leu(CUN)}$  ด้วยโปรแกรม MODELTEST (Posada and Crandall, 1998) ผลปรากฏว่าแบบจำลอง ที่ดีที่สุดที่เลือกจากวิธี hLRTs (hierarchical Likelihood Ratio tests) คือ TIM+G (Transition Model + G) ซึ่ง Transition model มีข้อกำหนดคือ ความถี่เบสแต่ละชนิดไม่เท่ากัน (Variable base frequencies;  $\pi_{A} \neq \pi_{c} \neq \pi_{c} \neq \pi_{r}$ ) อัตราการแทนที่เบสแบบ Transition แต่ละรูปแบบมีความถี่ไม่เท่ากัน (variable transitions) แต่การแทนที่เบสแบบ Transversion เท่ากัน (transversions equal) ชิ้นดีเอ็นเอ  $tRNA^{Ser(UCN)}$ -ND1 $tRNA^{Leu(CUN)}$  มีความถี่เบสแต่ละชนิดคือ  $\pi_{A} = 0.44680$ ,  $\pi_{C} = 0.16580$ ,  $\pi_{G} = 0.08420$  และ  $\pi_{T} = 0.30320$  และกำหนด substitution rate matrix ดังต่อไปนี้

	A	C	G	Т
А	-	1.000000	45.630700	2.141700
С	1.000000	-	2.141700	53.930700
G	45.630700	2.141700	-	1.000000
Т	2.141700	53.930700	1.000000	-

และพบว่าเบสแต่ละดำแหน่งในสายนิวคลีโอไทด์มีอัตราการแทนที่เบสไม่เท่ากัน (Rate heterogeneity) โดยกำหนดค่า Shape parameter ( $\alpha$ ) = 0.1543 ซึ่งแบบจำลอง TIM+G มีการกำหนดค่าให้กับ รูปแบบการแทนที่เบส 6 แบบ ( $\Phi_{_{AC}}, \Phi_{_{AC}}, \Phi_{_{CT}}, \Phi_{_{CT}}, \Phi_{_{CT}}, nst = 6$ ) ซึ่งเท่ากับค่าที่กำหนดใน แบบจำลอง GTR (General Time Reversible) จึงกล่าวได้ว่าแบบจำลอง TIM คือรูปแบบเฉพาะของ GTR (Tavare, 1986) ที่มีความการแทนที่เบสแบบ Transversion เท่ากันนั้นเอง ซึ่งเมื่อใช้ข้อมูลจาก TIM ไปใช้คำนวณด้วย PAUP<sup>\*</sup> v.4.0b (Swofford, 1998) ก็จะได้รับรายงานว่าคำนวณด้วยแบบจำลอง GTR



Evolutionary distance



16 แสดงความสัมพันธ์ของจำนวนการแทนที่เบสแบบ ก.) Transition (TS), ข.) Tranversion (TV) และ ค.) การแทนที่เบสทั้งหมด (TS+TV) ที่พบเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ระหว่างปู่กู่ใดๆ (แกน Y) กับระยะห่างทางพันธุกรรมของปู่กู่นั้นๆ (แกน X) โดยจุด 1 จุด ที่ปรากฏแสดงผลการเปรียบ เทียบของปู่ตัวอย่าง 1 กู่

#### 3.5.3 nucleotide divergence และระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มปูตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์ nucleotide divergence ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (ตารางที่ 14) ด้วย ้โปรแกรม DnaSP ผลปรากฏว่า ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เนื่องจากการแทนที่เบสภายในปูทะเล แต่ละกลุ่ม (nucleotide diversity) มีค่าอยู่ในระดับต่ำคือ มีค่าอยู่ในช่วง 0.001 ถึง 0.003 และของปูม้ามีค่า เท่ากับ 0.006 ในขณะที่ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์สุทธิระหว่างกลุ่มปูทะเลเนื่องการแทนที่เบส (d,) ้มีค่าสูงกว่าอย่างชัดเจน คือ มีค่าอยู่ในช่วง 0.079 ถึง 0.141 และระหว่างปู่ม้ากับปูทะเลมีค่าอยู่ในช่วง 0.180 ถึง 0.195 โดยมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันในกลุ่มปูทะเลโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 77.6 ถึง 136.8 นิวคลีโอไทค์ ส่วนค่าเฉลี่ยของระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างปูดำ ปูเขียว ปูม่วง ปูขาว และปูม้า ซึ่งคำนวณด้วยแบบจำลองการแทนที่เบส GTR+G ตามผลการทดสอบของโปรแกรม MODELTEST (ตารางที่ 15) พบว่าก่าเฉลี่ยของระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างปูภายในกลุ่มเดียวกันของปูดำ ปูเขียว ปู ม่วง ปูขาว และปูม้า มีค่าเท่ากับ 0.003, 0.001, 0.001, 0.002 และ 0.005 ตามลำคับ และค่าเฉลี่ยระหว่างปู ้ต่างกลุ่มแต่อยู่ในสกุลเดียวกัน (*Scylla*) จะมีค่าระหว่าง 0.110 – 0.226 ในขณะที่ผลเปรียบเทียบระหว่าง ปต่างสกุล คือ Scylla กับ Portunus จะมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0.312 – 0.360 จากข้อมูลที่ ้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบระหว่างปกลุ่มเดียวกัน ได้แสดงให้เห็นว่า ในขณะที่ถ้าเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มปูแล้วจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สูงกว่าอย่างชัคเจน เมื่อ เปรียบเทียบผลการคำนวณที่ได้จากกล่มปตัวอย่างกับผลการศึกษาที่ใช้ข้อมลจากบริเวณยีน ND1 ที่เคยมี รายงานมาก่อนหน้านี้ บ่งชี้ในเบื้องต้นว่า ปูทะเลแต่ละกลุ่มควรถูกจัดให้มีสถานะเป็นชนิด ดังเห็นได้ จากรายงานของ Ruedi and Meyer (2001) ที่รายงานว่าในค้างคาว Myotis มีความแตกต่างของนิวคลีโอ ใทด์ภายในชนิดน้อยกว่า 1% และความแตกต่างระหว่างชนิคสุงกว่า 10% ซึ่งสอคคล้องกับรายงานของ Taglino et al. (2000) ที่รายงานว่าในถึงสกุล Callithrix มีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิค 0.00% ถึง 1.83% และความแตกต่างระหว่างชนิดจะมีอยู่ในช่วงประมาณ 10% ถึง 11% อย่างไรก็ตาม การจะประเมินว่าปแต่ละกลุ่มมีสถานะเป็นชนิคหรือไม่นั้นจะพิจารณาอย่างละเอียคอีกครั้ง โดยอาศัย การพิจารณาจาก species concept ในหัวข้อ "การประเมินสถานะความเป็นชนิดของปทะเลแต่ละกลุ่มที่ พบในประเทศไทย"

	ปูดำ	ปูเขียว	ปูม่วง	ปู่ขาว	ปูม้า
ปูดำ	0.003 (14)	0.141 (136.77)	0.132 (126.99)	0.142 (136.16)	0.199 (190.04)
ปูเขียว	0.141	0.001 (5)	0.086 (81.90)	0.086 (82.02)	0.198 (189.95)
ปูม่วง	0.130	0.084	0.001 (7)	0.081 (77.60)	0.184 (175.95)
ปูขาว	0.140	0.084	0.079	0.002 (9)	0.199 (190.03)
ปูม้า	0.194	0.195	0.180	0.195	0.006 (20)

<u>ตารางที่ 14</u> แสดงค่า nucleotide divergence ระหว่างภายในและระหว่างปูดำ ปูเขียว ปูม่วง ปูขาว และ ปูม้า

หมายเหตุ	ข้อมูลในแนวเส้นทแยงมุม	ตัวเลขนอกวงเล็บ คือ ค่า nucleotide diversity ของปูแต่ละ	
		កត្នុំរ	
		ตัวเลขในวงเล็บ คือ จำนวน polymorphic site ภายในกลุ่ม	
	ข้อมูลเหนือแนวเส้นทแยงมุม	ตัวเลขนอกวงเล็บ คือ ค่า d <sub>xy</sub> ระหว่างกลุ่มปูตัวอย่าง	
		ตัวเลขในวงเล็บ คือ จำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันโดย	
		เฉลี่ยระหว่างกลุ่ม	
	ข้อมูลใต้แนวเส้นทแยงมุม	คือ ค่า nucleotide divergence ระหว่างปูแต่ละกลุ่ม	

<u>ตารางที่ 15</u> แสดงค่าเฉลี่ยของระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ภายในและระหว่างปูดำ ปู เขียว ปูม่วง ปูขาว และปูม้า

	ปู่ดำ	ปูเขียว	ปูม่วง	ปูขาว	ปู่ม้ำ
ปูดำ	0.003				
ปูเขียว	0.222	0.001			
ปูม่วง	0.199	0.119	0.001		
ปูขาว	0.226	0.110	0.117	0.002	
ปูม้า	0.338	0.360	0.312	0.360	0.005

#### 3.6 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปูทะเล

#### 3.6.1 Phylogenetic tree ที่สร้างจากวิธี Neighbor-Joining (NJ)

ผลการสร้าง phylogenetic tree ของปูทะเล 4 กลุ่มโดยใช้ปูม้าเป็น outgroup ด้วยวิธี NJ (ภาพที่ 17) ที่ใช้ข้อมูลระยะห่างพันธุกรรมที่คำนวณแบบจำลองการแทนที่เบสแบบ GTR + G ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ สร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority-rule ผลที่ได้ phylogenetic tree ที่ประกอบด้วย 25 interior branch แต่ละ interior branch มีค่า bootstrap แตกต่างกัน ตั้งแต่ 50 – 100% โดยมี 6 interior branch ที่มีค่า bootstrap สูงถึง 100% คือ interior branch ที่เชื่อมไปยัง node ร่วมของกลุ่มปูแต่ละกลุ่มทั้ง 5 กลุ่ม (1.ปูดำ 2.ปูเขียว 3.ปูม่วง 4.ปูขาว และ 5.ปูม้า) ส่วนอีก 1 interior branch คือ branch ที่เชื่อมไปยัง node ร่วมของกลุ่มปูขาว-เขียว-ม่วง

#### 3.6.2 Phylogenetic tree ที่สร้างจากวิธี Maximum Parsimony (MP)

phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี MP (ภาพที่ 18) ทดสอบ bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ โดยมี parsimony-informative site จำนวน 314 ตำแหน่ง พบว่า phylogenetic tree ที่ได้ประกอบด้วย 23 interior branch โดยมีผลการการทดสอบ bootstrap อยู่ระหว่าง 51 – 100% โดยมี 6 interior branch ที่ มีค่า bootstrap สูงถึง 100% ซึ่ง interior branch ดังกล่าวนี้คือ interior branch เดียวกับที่พบว่ามีค่า bootstrap สูงถึง 100% ของ phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี NJ

### 3.6.3 Phylogenetic tree ที่สร้างจากวิธี Maximum likelihood (ML)

Phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี ML (ภาพที่ 19) ไม่สามารถทดสอบ bootstrap ได้ เนื่องจากความสามารถที่จำกัดของคอมพิวเตอร์ที่ใช้ทำให้ใช้เวลาในการคำนวณนานมาก โดยผลการ คำนวณ ML โดยใช้แบบจำลอง GTR + G พบว่า ได้ phylogenetic tree ที่มีค่า –Ln likelihood = 3465.2758 ใช้เวลาคำนวณ 9 ชั่วโมง 41 นาที phylogenetic ที่ได้มีสัณฐานสอดคล้องกับ phylogenetic tree ที่สร้างโดยวิธี NJ และ MP

ผลที่ได้จากการสร้าง phylogenetic tree ด้วย 3 วิธี คือ NJ MP และ ML แสดงให้เห็น tree ที่มีสัณฐานคล้ายคลึงกันมาก โดยความแตกต่างระหว่าง phylogenetic tree ที่สร้างจากแต่ละวิธีจะเป็น

้ความแตกต่างของความสัมพันธ์ภายในกลุ่มปูตัวอย่างแต่ละกลุ่ม โดยเห็นได้จากความแตกต่างที่เกิดขึ้น ทั้งหมดจะเกี่ยวเนื่องจากการเกิดขึ้นหรือหายไปของ peripheral node ทั้งสิ้น ในขณะที่ phylogenetic tree ที่สร้างจากทั้ง 3 วิธีดังกล่าวยืนยันว่าปูทะเลแต่ละกลุ่มรวมทั้งปูม้ามีสายวิวัฒนาการแยกกันชัดเจน ดังจะ เห็นได้จาก สมาชิกของปูกลุ่มหนึ่งๆ จะมีตำแหน่งใน phylogenetic tree เป็นกลุ่มก้อนชัดเจนไม่ปะปน กับสมาชิกของปูกลุ่มอื่นๆ และ interior branch ระหว่างปูแต่ละกลุ่มกับบรรพบุรุษร่วมของปูกลุ่มนั้นๆ ให้ค่าผลการทดสอบ bootstrap สูงที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ นั้นคือเท่ากับ 100% ซึ่งยืนยันการมีอยู่ของ กลุ่มปูแต่ละกลุ่มได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ phylogenetic tree ที่ได้แสดงให้เห็นว่าในสกุล Scylla มี ้วิวัฒนาการแบบ monophyletic group โดยสายวิวัฒนาการของปูดำวิวัฒนาการมายาวนานที่สุดเมื่อ เปรียบเทียบกับปูทะเลชนิดอื่นๆ ดังจะเห็นได้จากก่ากวามแตกต่างของลำดับนิวกลีโอไทด์เนื่องจากการ แทนที่เบสภายในกลุ่ม (nucleotide diversity) ซึ่งมีค่าสูงที่สุดคือเท่ากับ 0.003 ขณะที่ปูเขียว ปูม่วง และปู ขาวมีค่า nucleotide diversity เท่ากับ 0.001 0.001 และ 0.002 ตามลำคับ (ตารางที่ 13) เช่นเดียวกับ ้ค่าเฉลี่ยของระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของปูดำที่มีค่าสูงที่สุดด้วยเช่นกัน การที่มีค่า nucleotide หรือระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มสูงที่สุดแสดงว่าปูดำมีการกลายพันธุ์สะสมภายใน diversitv ึกลุ่มมากที่สุด ซึ่งสะท้อนถึงช่วงเวลาของวิวัฒนาการว่ามีช่วงเวลายาวนานที่สุดด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ ผลที่ได้จาก phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นจากทั้ง 3 วิธีคือ NJ MP และ ML แสดงผลตรงกันว่า node ซึ่ง เป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วมของปูดำเชื่อมต่อกับ node ซึ่งเป็นบรรพบุรุษร่วมของปูในสกุล Scylla โดยตรงและความยาวของ branch ที่เชื่อมต่อระหว่าง 2 node ดังกล่าวก็มีความยาวมากที่สด ซึ่งผลที่ได้ จากสัณฐานของ phylogenetic tree และความแตกต่างทางพันธุกรรมเคยถูกใช้ในการระบุจุดกำเนิดของ มนุษย์ (human origin) ว่ามีกำเนิดมาจากทวีฟแอฟริกา เนื่องจากมนุษย์ประชากรแอฟริกามีวิวัฒนาการ มายาวนานที่สุด ดังเห็นได้จาก phylogenetic tree และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรม ภายในแต่ละประชากรมนุษย์ที่วิเคราะห์ได้ (Cann et al., 1987)



<u>ภาพที่ 17</u> แสดง phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี NJ ระหว่างปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว โดยใช้ปูม้า เป็น outgroup จากข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณด้วยแบบจำลองการแทนที่เบส GTR+G ของชิ้น ดีเอ็นเอ *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ด้วยวิธี Neighbour-joining ทดสอบ bootstrap 1,000 รอบ สร้าง consensus tree ด้วย 50% majority-rule



<u>ภาพที่ 18</u> แสดง phylogenetic tree ของปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว โดยใช้ปูม้าเป็น outgroup จาก ข้อมูลการกลายพันธุ์แบบแทนที่เบสของชิ้นดีเอ็นเอ *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ด้วยวิธี Maximum Parsimony ซึ่งมี parsimony informative site ทั้งหมด 314 ตำแหน่ง ทดสอบ bootstrap 1,000 รอบ สร้าง consensus tree ด้วย 50% majority-rule



<u>ภาพที่ 19</u> แสดง phylogenetic tree ของปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว โดยใช้ปูม้าเป็น outgroup จาก ข้อมูลการกลายพันธุ์แบบแทนที่เบสของชิ้นดีเอ็นเอ *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ด้วยวิธี Maximum likelihood ใช้แบบจำลองการแทนที่เบส GTR+G ค่า –Ln likelihood = 3465.2758

้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปทะเลที่กล่าวไปแล้ว เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการ การศึกษาจากข้อมูลยืน 16S rRNA (483 bp) และ COI (599 bp) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี UPGMA (Keenan et al., 1998) พบว่า มีความสอดคล้องกันในประเด็นที่ว่า ความสัมพันธ์เชิง ้วิวัฒนาการของปุสกุล Scylla เป็นแบบ monophyletic group แต่มีความแตกต่างในเรื่องความสัมพันธ์ ของกลุ่มปูที่มีวิวัฒนาการมาภายหลัง โดยพบว่า ข้อมูลจาก 16S rRNA และ COI แสดงให้เห็นว่า S. paramamosain (ปูขาว) และ S. tranquebarica (ปูม่วง) มีความใกล้ชิดกันมากที่สุดในสกุล Scylla (หลักจานและเหตุผลในการการระบชื่อวิทยาศาสตร์ของปดำ เขียว ม่วงและขาว จะกล่าวถึงต่อไป) แต่ ้จากการศึกษาครั้งนี้กลับพบว่า ปูขาวและปูเขียวเป็นปูที่มีความใกล้ชิดกันที่สุด ซึ่งความสัมพันธ์ใน รูปแบบดังกล่าวนี้เคยมีรายงานจากผลของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่าง ชนิดของปูในสกุล Scylla โดยใช้ข้อมูลจาก Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดย ้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิด ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ปูขาวและปูเขียวเป็นปูที่มีความสัมพันธ์ ใกล้ชิดกันที่สุดในปูสกุล Scylla (Imai and Numachi, 2002) แต่เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของทั้งสกุล กับพบว่ามีความสัมพันธ์กับแบบ paraphyletic group ซึ่งแตกต่างไปจากผลการศึกษาครั้งนี้และ Keenan et al. (1998) นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูทะเลในสกุล Scylla ้ จำนวน 3 ชนิด ปูดำ, ปูม่วง และปูขาว โดยใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ allozyme พบว่าได้ข้อมูลที่แตกต่าง ออกไปอย่างสิ้นเชิงจากผลการศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมด นั้นคือแสดงให้เห็นว่า ปดำ กับปม่วงมี ้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกันที่สด ขณะที่ปเขียวแตกต่างออกไปอย่างชัดเจนจากป 2 ชนิด ้จากข้อมลที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าความร้เกี่ยวกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปสกล ดังกล่าว ยังคงไม่ชัคเจนในเรื่องรูปแบบของความสัมพันธ์ภายในสกุล แต่ทกผลการศึกษาก่อนหน้านี้ Scvlla ยืนยันตรงกันว่าปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว เป็นปูทะเลต่างชนิดกัน

#### 4. การประเมินสถานะความเป็นชนิดของปูทะเลแต่ละกลุ่มที่พบในประเทศไทย

งุคประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือ การพิจารณาความแตกต่างของนิวคลีโอไทค์ในไมโตคอน เครียดีเอ็นเอและความแตกต่างของลักษณะ morphometric เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการ จำแนกชนิดของปูทะเลในสกุล Scylla ของประเทศไทย โดยก่อนทำการศึกษาข้อมูลทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว ได้ทำการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของปูตัวอย่างแต่ละกลุ่มเป็นข้อมูลเบื้องต้นด้วย ดังนั้นข้อมูล ทั้งหมดในจำแนกชนิดปูทะเลจะประกอบด้วย 1. ความแตกต่างของลักษณะภายนอก 2. ความแตกต่าง ของลักษณะ morphometric และ 3. ความแตกต่างของลำคับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> ดังนั้นเพื่อประเมินสถานะความเป็นชนิดของปูแต่ละกลุ่มจากข้อมูลที่มี ทั้ง 3 ชนิคกับ species concept ที่เคยมีการเสนอไว้และสามารถใช้ข้อมูลที่มีอยู่ในการพิจารณาได้ ดังต่อไปนี้

The morphological species concept ("A species is a group of individuals or populations with the same or similar morphological characters.") เมื่อเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของปูแต่ละกลุ่ม พบว่า ปูแต่ละกลุ่มจะมีลักษณะภายนอกที่เป็นเอกลักษณ์ของกลุ่มและลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์เหล่านั้น จะแตกต่างจะลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของปูกลุ่มอื่น ดังนี้

ปูดำจะไม่มีลายร่างแหบนขาว่ายน้ำ บริเวณข้อมือมีหนามเพียง 1 อัน และหนามระหว่างตาสั้น และโค้งมน

ปูขาวมีลายร่างแหบนขาว่ายน้ำ โดยลายร่างแหจะมีช่องขนาดเล็ก หนามระหว่างตายาวแหลม คม และจะมีรูปร่างเป็นรูปสามเหลี่ยม

ปูม่วงมีสืบริเวณด้านนอกของก้ามเป็นสีม่วงอย่างเด่นชัด และบริเวณดังกล่าวนี้จะไม่มีลาย ร่างแหหรือจุด และจะพบลายร่างแหที่มีช่องขนาดใหญ่เฉพาะบนขาว่ายน้ำหรืออาจพบบนขาเดินคู่ที่ 3 ด้วย แต่จะไม่พบบนขาเดินคู่อื่นและไม่พบบริเวณก้าม

ปูเขียวจะมีลายร่างแหที่มีช่องขนาคใหญ่บนขาเดินทุกขารวมทั้งบนขาว่ายน้ำและก้าม หนาม ระหว่างตาของปูเขียวจะเรียวยาว

ลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ดังกล่าวของปูแต่ละกลุ่มอาจคล้ายกันเช่น ปูม่วงกับปูเขียวมีลายร่างแห ที่มีช่องขนาดใหญ่คล้ายกัน แต่เมื่อพิจารณาตำแหน่งที่ปรากฏของลายร่างแหจะพบว่ามีความแตกต่างกัน อย่างชัดเจน หรือปูเขียวกับปูขาวจะหนามระหว่างตายาวอย่างเห็นได้ชัดเหมือนกัน แต่หนามระหว่างตา ของปูทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวจะมีรูปร่างที่แตกต่างกัน โดยหนามระหว่างตาของปูขาวจะมีรูปร่างเป็น สามเหลี่ยม ในขณะที่ปูเขียวจะมีหนามระหว่างตาเรียวยาว ซึ่งลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของปูตัวอย่างแต่ ละกลุ่มในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งประกอบด้วยลายร่างแหบริเวณขาว่ายน้ำ รูปร่างของหนามระหว่างตาและ สืบริเวณด้านหน้าของก้ามได้เลยถูกกล่าวถึงไว้ในเกณฑ์การจำแนกของ Estampador (1949) และ Keenan *et al.* (1998) โดย Estampador (1949) ได้รายงานถึงการมีลายร่างแหบนขาเดิน ขาว่ายน้ำ และก้าม ในปูชนิด S. oceanica และการมีลายร่างแหเฉพาะขาว่ายน้ำในปูชนิด S. tranquebarica ส่วนปูอีก 2 กลุ่มที่มีการ จำแนกไว้คือ ชนิด S. serrata และสายพันธุ์ S. serrata var. paramamosain ไม่ได้มีการรายงานถึง ลักษณะของลายร่างแหไว้ ส่วนสีบริเวณด้านหน้าของก้ามนั้นมีรายงานไว้เพียง 2 ชนิดเช่นกัน คือ ในปู S. oceanica มีลายร่างแห และในปู S. tranquebarica มีแดงหรือม่วง ส่วน S. serrata และ S. serrata var. paramamosain ไม่ได้มีการกล่าวถึงไว้ และในปูทุกชนิดที่ Estampador (1949) จำแนกไว้ก็ไม่มีการ กล่าวถึงรูปร่างของหนามระหว่างตา มีเพียงการรายงานว่าหนามระหว่างตาคู่กลางของ S. serrata var. paramamosain ยาวกว่าหนาม 2 อันด้านข้าง อย่างไรก็ตามลักษณะร่องคล้ายตัว H (H-like) บนกระดอง ซึ่ง Estampador (1949) กล่าวว่ามีความแตกต่างระหว่างระหว่างกลุ่ม S. oceanica และ S. tranquebarica ที่มีร่องดังกล่าวก่อนข้างถึกกับกลุ่มปู S. serrata และ S. serrata var. paramamosain ที่มีร่องดื้นกว่า แต่ จากผลการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถจำแนกปูออกเป็นกลุ่มได้ด้วยลักษณะของร่องคล้ายตัว H ดังนั้นจาก ผลการศึกษาครั้งนี้ใน่สามารถจำแนกปูออกเป็นกลุ่มได้ด้วยลักษณะของร่องคล้ายตัว H ดังนั้นจาก ผลการศึกษาครั้งนี้ใน่สามารถงาแนกปูออกเป็นกลุ่มได้ด้วยลักษณะของร่องคล้ายตัว H ดังนั้นจาก ผลการศึกษาครั้งนี้ในสามารถงาแนกปูออกเป็นกลุ่มได้ด้วยลักษณะของไม่เป็นลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของปู กลุ่มใดเลย

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์จากตัวอย่างปูทะเลในการศึกษาครั้งนี้กับรายงานของ Keenan (1998) พบว่าได้มีการรายงานถึงลายร่างแหว่าปู S. serrata มีลายร่างแหบนขาเดินทุกขา ขาว่าย ้น้ำ และก้าม ปู S. tranquebarica พบอย่างชัดเจนเฉพาะขาว่ายน้ำกับขาเดินคู่ที่ 3 ปู S. paramamosain พบ ้ถายร่างแหจางๆ บนขาเดินและก้าม และป S. olivacea ไม่พบถายร่างแหอย่างชัดเจนบนก้ามและขา ส่วน ้ลักษณะของหนามระหว่างตา Keenan (1998) ใด้มีการเสนอสัดส่วนของความสูงของหนามระหว่างตาคู่ กลางต่อความกว้างของ frontal lobe ในปูทั้ง 4 ชนิดที่มีการจัดจำแนกไว้ แต่มีการกล่าวถึงรูปร่างของ หนามระหว่างตาไว้อย่างชัคเจนเพียง 1 ชนิคคือ S. paramamosain ที่พบว่ามีหนามระหว่างตามีรูปร่าง เป็นสามเหลี่ยม โดย Keenan (1989) ไม่ได้รายงานลักษณะของสีบริเวณหน้าก้ามของปแต่ละชนิดไว้ ้อย่างชัดเจนแต่ได้กล่าวถึงการมีหรือไม่มีลายร่างแหในบริเวณดังกล่าว ซึ่งมีเพียงป S. serrata เท่านั้นที่มี ิลายร่างแหปรากฏอย่างชัดเจน นอกจากนี้ในเกณฑ์การจำแนกของ Keenan (1998) ได้ให้ความสำคัญกับ การมีหนาม 1 อันหรือ 2 อันบริเวณขอบด้านนอกของก้ามปล้องกลาง โดยถ้าปุตัวอย่างมีหนามบริเวณ ้ดังกล่าว 2 อัน จะถูกจัดจำแนกเป็น S. serrata หรือ S. tranquebarica แต่ถ้ามีหนามบริเวณดังกล่าว 1 อัน ้จะถูกจัดจำแนกเป็น S. paramamosain หรือ S. olivacea แต่จากลักษณะของปูขาวที่ในบริเวณดังกล่าวมี ทั้งปรากฏหนาม 1 อัน หนาม 2 อัน หรือก้ามข้างหนึ่งมีหนาม 1 อันส่วนก้ามอีกข้างหนึ่งมีหนาม 2 อัน ้จึงทำให้มีความย่งยากในการจัดจำแนก และสรปได้ว่าหนามบริเวณก้ามปล้องกลางไม่ใช่ลักษณะที่เป็น เอกลักษณ์ของปขาว

นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric พบว่าสามารถจำแนก ้ปูทะเลออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มปูดำ กลุ่มปูเขียว กลุ่มปูขาว และกลุ่มปูม่วง ซึ่งสอดคล้องกับการจัด ้ จำแนกโดยใช้ลักษณะภายนอก ถึงแม้ว่ากลุ่มปูเขียวจะมีบริเวณเหลื่อมซ้อนกับกลุ่มปูม่วง แต่ปูทั้ง 2 กลุ่ม ก็ยังแสคงความเป็นกลุ่มของตัวอย่างอย่างชัดเจน ดังนั้นจะเห็นว่าปตัวอย่างแต่ละกลุ่มมีลักษณะ morphometric ที่แตกต่างจากปูกลุ่มอื่น ซึ่งความแตกต่างในลักษณะ morphometric เป็นข้อมูลชนิคหนึ่ง ที่ถูกใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ปลา 2 ชนิดคือ Atherina boyeri และ A. presbyter ซึ่งมีความเข้าใจกันว่าเป็นปลาชนิดเดียวกันและชื่อวิทยาศาสตร์ทั้ง 2 ชื่อเป็น ชื่อที่พ้องกัน (synonymous species) แต่จากการวิเคราะห์ CVA ของลักษณะ morphometric ของปลาทั้ง 2 ชนิคดังกล่าว และพบว่าปลาทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะ morphometric ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเห็นได้ จากผลการเขียนกราฟระหว่างตัวแปร CVA1 และ CVA2 ซึ่งแสดงให้เห็นการแยกกลุ่ม (grouping) ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างจาก A. boyeri และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างจาก A. presbyter โดยในแต่ละกลุ่มจะไม่มีการปะปนกันของตัวอย่างจากปลาต่างกลุ่ม ซึ่งเป็นการยืนยันว่า A. boyeri และ A. presbyter เป็นปลาต่างชนิดกัน (Creech, 1992) หรือแม้แต่ในปลาที่มีการวิวัฒนาการอย่าง รวดเร็วและหลากหลายรูปแบบเช่น ปลาหมอสีสกุล Amphilophus การวิเคราะห์ CVA ก็สามารถจำแนก ้ความแตกต่างระหว่างชนิดภายในสกุลดังกล่าวได้ (Klingenberg et al., 2003) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมก็สามารถจำแนกชนิดได้จากข้อมูลจากการวิเคราะห์ CVA ของลักษณะ morphometric โดยมีการจำแนกชนิดใหม่ของค้างคาวในสกุล Nyctophilus คือชนิด Nyctophilus nebulosus โดยอาศัยข้อมลการวิเคราะห์ CVA จากลักษณะ morphometic เพื่อแสดงความแตกต่างจาก ้ ค้างกาวในสกุลเดียวกันอีก 2 ชนิดคือ N. bifax และ N. gouldi (Parnaby, 2002) ดังนั้นผลจากการ ้วิเคราะห์ CVA ของปูทะเลจากข้อมูล morphometric ซึ่งแสดงให้เห็นการรวมกลุ่มของตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งสะท้อนให้เห็นความแตกต่างของลักษณะ morphometric ระหว่างกลุ่มปูดำ ปูเขียว ปูม่วง ปู ขาว

ดังนั้น ถ้าพิจารณาความเป็นชนิดของปูทะเลแต่ละกลุ่มทั้ง 4 กลุ่มจากลักษณะภายนอกทั้งจาก ข้อมูลที่ได้จาก external morphology และการวิเคราะห์ลักษณะ morphometric จะพบว่าปูทุกกลุ่มจะมี ลักษณะภายนอกที่เป็นเอกลักษณ์ของตัวเอง และลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ดังกล่าวก็แตกต่างจากลักษณะ ที่เป็นเอกลักษณ์ของปูกลุ่มอื่น ดังนั้นเมื่อประเมินสถานะความเป็นชนิดตาม morphological concept ของปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว พบว่า ปูแต่ละกลุ่มควรมีสถานะเป็นชนิด

The genetic species concept ("A species is a group of genetically identical individuals") ซึ่ง Bradley and Baker (2001) ได้เสนอว่าสามารถใช้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของยืน *Cytb* ในรูปของ ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมในการประเมินสถานะความเป็นชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ โดยแสดงให้เห็นว่า ความแตกต่างภายในชนิดจะน้อยกว่า 2% ความแตกต่างระหว่างประชากรภายในชนิดเดียวกันมีค่าอยู่ ระหว่าง 2% ถึง 11% และความแตกต่างระหว่างชนิดจะมีค่ามากกว่า 11% อย่างไรก็ตาม ถึงแม้การศึกษา ครั้งนี้จะใช้ข้อมูลของบริเวณยีน NDI เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ในขณะที่ Bradley and Baker (2001) ใช้ยืน Cytb เป็นข้อมูลพื้นฐาน แต่จากรายงานของ Ruedi and Mayer (2001) แสดงให้เห็นว่าการแทนที่ เบสที่เกิดขึ้นในยืน Cytb กับยืน NDI ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นผลความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอ

ใทด์ที่ได้จากการศึกษาครั่งนี้จึงสามารถเทียบเคียงการประเมินสถานะความเป็นชนิดได้จากของเสนอ ของ Bradley and Baker (2001) ซึ่งในการศึกษาครั้งทำการคำนวณความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง ปูแต่ละกลุ่มทั้งในรูปของค่า genetic divergence และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมซึ่งปรากฏว่า ค่า nucleotide divergence ระหว่างปูทะเลแต่ละกลุ่มอยู่ในช่วง 0.0841 (8.41%) ถึง 0.141 (14.1%) ซึ่ง สอดคล้องกับค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่มีค่าอยู่ในช่วง 0.110 (11%) ถึง 0.226 (22.6%) ในขณะที่ ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดจะมีค่าอยู่ในช่วง 0.001 (0.1%) ถึง 0.003 (0.3%) ดังนั้นจาก ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมที่พบระหว่างปูแต่ละกลุ่มแสดงให้เห็นว่าปูทั้ง 4 กลุ่มควรถูกจัดให้มี สถานะเป็นชนิดตามเกณฑ์การจำแนกชนิดบนพื้นฐานของ genetic species concept และภายในปูแต่ละ กลุ่มตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการแบ่งประชากรตามแหล่งเก็บตัวอย่าง ตามข้อกำหนดที่เสนอไว้ โดย Bradley and Baker (2001)

The biological species concept ("Species are groups of actually or potentially interbreeding natural populations, which are reproductively isolated from other such groups.") ในการประเมินความ เป็นชนิคตาม biological species concept จะพิจารณาจากการเกิด "interbreeding" ของสิ่งมีชีวิตชนิค เดียวกันและการเกิด "reproductive isolate" ของสิ่งมีชีวิตต่างชนิคกัน จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ เชิงวิวัฒนาการของปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มโดยใช้ข้อมูลจากชิ้นดีเอ็นเอ *tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* สามารถประเมินสถานะความเป็นชนิคของปูทะเลแต่ละกลุ่มได้ 2 แนวทางดังนี้ คือ

แนวทางที่ 1 พิจารณาจากระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) จะเห็นได้ว่า ความ แตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มปูทะเลแต่ละกลุ่มจะมีค่าอยู่ในช่วง 0.001 – 0.003 และความแตกต่าง ระหว่างกลุ่มจะมีค่าอยู่ในช่วง 0.110 – 0.226 ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมของยืน ND1 ขนาด 953 bp ของลิงใน subfamily Callitrichinae อันประกอบด้วยลิงจากสกุล Squinus, Leontopithecus, Callimica และ Callethria พบว่าโดยเฉลี่ยยืน ND1 ในลิงกลุ่มดังกล่าวมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยืน ND1 เมื่อเปรียบเทียบภายในชนิดประมาณ 1% และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดจะมีความแตกต่าง ประมาณ 10% แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า Callethria pygmaea มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ภายในชนิดสูงถึง 7.4% ซึ่งความแตกต่างในระดับดังกล่าวนี้ทำให้มีการเสนอว่า อย่างน้อยควรมีการแยก ลิงชนิดดังกล่าวออกเป็น 2 subspecies หรืออาจแยกออกเป็นลิง 2 ชนิด (Tagliaro *et al.*, 2000) ซึ่งผลใน ลักษณะเดียวกันยังพบในการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยืน *Cytb* (1,140 bp) และ *ND1* (800 bp) ในค้างค้าวสกุล *Myotis* พบว่าความแตกต่างภายในชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาต่ำ มาก คือ น้อยกว่า 1% แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดจะมีก่าความแตกต่างอยู่ที่ประมาณ 15% (Ruedi and Mayer, 2001)

ผลที่ได้จากการศึกษาโดยใช้ข้อมูลของยืน ND1 สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ใช้ข้อมูลจากยืน อื่นๆ ในไมโตคอนเครียดีเอ็นเอเพื่อการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ดังเช่นการวิเคราะห์ความแตกต่างทาง พันธุกรรมของยืน 16S rRNA ระหว่างกุ้ง F. subtilis กับ F. subtilis morphotype II ซึ่งผลที่ได้แสดงให้ เห็นว่ากุ้งทั้ง 2 กลุ่มเป็นกุ้งต่างชนิดกัน (Maggioni et al., 2001) และการจำแนกปลา coelacanth ที่มีถิ่น อยู่ในทวีปแอฟริกากับปลา coelacanth ที่มีถิ่นอาศัยในเขตประเทศอินโดนีเซียออกเป็น 2 ชนิดคือ Latimeria chalumnae เป็นชนิดที่อาศัยแอฟริกา และ L. menadoensis เป็นชนิดที่อาศัยในเขตน่านน้ำ ประเทศอินโดนีเซีย โดยอาศัยข้อมูลจากชิ้นดีเอ็นเอที่ครอบคลุมตั้งแต่ Cytb ถึง 16S rRNA ในไมโตคอน เครียจิโนม (Holder et al., 1999)

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยพิจารณาจาก ระยะห่างทางพันธุกรรมของยีน ND1 ภายในกลุ่มปูทะเลซึ่งมีค่าระหว่าง 0.001 – 0.003 (ไม่ถึง 1%) เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มซึ่งมีค่าระหว่าง 0.110 – 0.226 (11% - 22.6%) ซึ่ง ชี้ให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มปูทะเลกับความแตก ต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ไม่ต่อเนื่องดังกล่าวนี้ (ความแตกต่าง โดยประมาณมากกว่า 100 เท่า) แสดงให้เห็นว่าปูแต่ละกลุ่มเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ได้อยู่ใน reproductive community เดียวกัน หรือกล่าวได้ว่าปูแต่ละกลุ่มไม่มีการผสมพันธุ์กันระหว่างกลุ่มนั้นเอง และเมื่อ พิจารณาเฉพาะความแตกต่างระหว่างกลุ่มจะสามารถสรุปได้ว่า ความแตกต่างดังกล่าวเป็นความ แตกต่างในระดับของความแตกต่างระหว่างชนิด และไม่ใช่กวามแตกต่างระหว่างสกุลเพราะความ แตกต่างในระดับสกุลระหว่างสกุล *Scylla* และ *Portunus* จะมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมสูงขึ้นไปอีก คือ 0.312 – 0.360 ดังนั้นข้อมูลจากระยะห่างทางพันธุกรรมบ่งชี้ว่า ปูทะเลแต่ละกลุ่มอันประกอบด้วย ปู ดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาวเป็นปูต่างชนิดกัน

แนวทางที่ 2 ประเมินสถานะความเป็นชนิดจากการเกิด gene flow ระหว่างกลุ่มปูตัวอย่างโดย พิจารณาจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏ haplotypep ร่วมกัน ผลปรากฏว่า ปูทะเลทั้งหมด 74 ตัวพบว่าชิ้น ดีเอ็นเอ tRNA<sup>ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup> ประกอบด้วย haplotype ทั้งหมดเท่ากับ 34 haplotype โดยปูดำ ประกอบด้วย 12 haplotype (A01 – A12) ปูเขียวประกอบด้วย 7 haplotype (B13 – B19) ปูม่วง ประกอบด้วย 7 haplotype (C20 – C26) และ ปูขาวประกอบด้วย 8 haplotype (C20 – C26) โดย haplotype ที่ปรากฏในปูกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งแล้วจะไม่มีปรากฏในปูกลุ่มอื่นอีกเลยนอกจากจะปรากฏใน สมาชิกตัวอื่นของปูกลุ่มเดียวกันเท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปูแต่ละกลุ่มไม่มี gene flow ระหว่างกันและ บ่งชี้ต่อไปว่าไม่มีการผสมพันธุ์กันระหว่างปูต่างกลุ่ม

ดังนั้นถึงแม้วิธีการศึกษาและผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้ ไม่สามารถพิสูจน์ได้โดยตรงว่า สมาชิก ของปูทะเลแต่ละกลุ่มมีการผสมพันธุ์กันและสมาชิกของปูต่างกลุ่มไม่มีการผสมพันธุ์กัน รวมทั้งไม่ สามารถแสดงให้เห็นได้เช่นกันว่าถ้าไม่มีการผสมพันธุ์กันระหว่างกลุ่มแล้ว สิ่งใดทำหน้าที่ขัดขวาง ไม่ให้มีการผสมพันธุ์กัน (reproductive barriers) แต่ผลที่ได้จากความแตกต่างทางพันธุกรรมและการ แลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมทำให้สรุปได้ว่า ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว ควรถูกจัดเป็นสิ่งมีชีวิตต่าง ชนิดกันตาม biological species concept

The phylogenetic species concept (Cracraft, 1983 อ้างโดย Cracraft, 1992; Avise and Wollenberg, 1997) ("the smallest diagnosable cluster of individual organisms within which there is a parental pattern of ancestry and descent") การประเมินความเป็นชนิดของสิ่งมีชีวิตตามแนวคิดนี้จะ พิจารณาจากความสัมพันธ์ภายในกลุ่มตัวอย่าง โดยอาศัยข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* โดยกลุ่มที่ถูกจัดเป็นชนิดจะต้องเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม เป็นแบบ monophyletic group เท่านั้น จากผลการสร้าง phylogenetic tree ของปูทะเลตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม โดยใช้ปู่ม้าเป็น outgroup ด้วยวิธีการสร้าง 3 วิธีคือ neighbor-Joining (distance method), maximum Parsimony และ maximum likelihood แสดงให้เห็นว่า ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว มีสายวิวัฒนาการที่ แตกต่างกันอย่างชัดเจน และความสัมพันธ์ภายในปูทะเลแต่ละกลุ่มเป็นแบบ monophyletic group ซึ่ง interior branch ของบรรพบุรุษร่วมของปูแต่ละกลุ่มมีค่าความเชื่อมั่นจากการทดสอบ bootstrap เท่ากับ 100% จากความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปูทะเลดังกล่าวดังกล่าวทั้งภายในและระหว่างกลุ่มปูทะเล แสดงให้เห็นว่าปูทะเลแต่ละกลุ่มควรจัดเป็นสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน

ดังนั้นผลการประเมินความเป็นชนิดของปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มอันประกอบด้วย ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว ตามคำจำกัดความของคำว่าชนิดคือ 1. The morphological species concept 2. The genetic species concept 3. The biological species concept และ 4. The phylogenetic species concept ผลปรากฏ ว่าปูทั้ง 4 กลุ่ม คือ ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว ควรจัดจำแนกเป็นปูต่างชนิดกัน

### 5. การกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์ของปูทะเลที่พบในประเทศไทย

รายงานการจำแนกชนิดของปูทะเลที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางและถูกใช้อ้างอิงใน การศึกษาปูทะเลจากอดีตถึงปัจจุบันมีอยู่ 2 ชิ้นคือ Estampador (1949) และ Keenan et al. (1998) โดย จำแนกปุทะเลที่เก็บตัวอย่างจากประเทศฟิลิปปินส์ Estampador (1949) โดยอาศัยข้อมูลจาก gametogenesis และลักษณะภายนอก พบว่าสามารถจำแนกปูทะเลออกเป็น 3 ชนิดกับอีก 1 สายพันธุ์ คือ S. serrata, S. oceanica, S. tranquebarica line S. serrata var. paramamosain is Estampador (1949) เป็นรายงานที่ใช้อ้างอิงเพื่อการจำแนกชนิดปูทะเลในประเทศไทยจำนวนมาก (ชูชาติและบูรณ์, 2522; บรรจง และ บุญรัตน์, 2545; อนวัช บุญญภักดี, 2542; Klinbunga et al. 2000) ส่วน Keenan et al. (1998) ้ได้แก้ไขการจัดจำแนกชนิดปูทะเลสกุล Scylla โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะภายนอก ความแตกต่างของ ลักษณะ morphometric และ ความแตกต่างทางพันธุกรรมของยืน 16S rRNA และยืน COI โดยได้จัด ้งำแนกปุทะเลออกเป็น 4 ชนิดคือ S. serrata, S. olivacea, S. tranquebarica และ S. paramamosain อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีชื่อบางส่วนพ้องกันในการจัดจำแนกตาม Estampador (1949) และ Keenan et al. (1998) แต่ก็เป็นเพียงการพ้องของชื่อเท่านั้น เพราะชื่อที่กำหนดไว้เหล่านั้นจะหมายถึงปูทะเลต่างชนิด กัน

ดังนั้นเพื่อกำหนดชื่อทางวิทยาศาสตร์ให้แก่ปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มที่พบในการศึกษาครั้งนี้ตามเกณฑ์ การจำแนกที่เคยถูกเสนอไว้โดย Estampador (1949) และ Keenan *et al*. (1998) จึงได้ทำการเปรียบเทียบ ปูทะเลจากการศึกษาครั้งนี้เกณฑ์การจำแนกที่รายงานทั้งสองฉบับกำหนดไว้

### 5.1 การกำหนดชื่อตามเกณฑ์การจำแนก Estampador (1949)

Estampador (1949) ได้เสนอเกณฑ์การจำแนกชนิดปูทะเลโดยพิจารณาจากลักษณะ ภายนอกต่างๆ จากตัวร่างกายของปูทะเล โดยสรุปจะประกอบด้วย 1.) สีของกระดอง ก้าม และขา 2.) หนามบริเวณฐานของนิ้ว และ 3.) บริเวณที่ปรากฏลายร่างแห (polygonal pattern areas) เมื่อเปรียบเทียบ ลักษณะภายนอกของปูแต่ละกลุ่มตามที่กล่าวไว้ในผลการศึกษาลักษณะภายนอกกับลักษณะที่ใช้ในการ จำแนกของ Estampador (1949) จะพบว่า

ปูด้า	คือ	S. serrata
ปูเขียว	คือ	S. oceanica
ปูม่วง	คือ	S. tranquebarica
ปูขาว	คือ	S. serrata var. paramamosain

ซึ่งการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์ของปูดำและปูม่วงสอดกล้องกับชื่อวิทยาศาสตร์ของปูทั้ง 2 ชนิดนี้จากรายงานของ ชูชาติและบูรณ์ (2522) บรรจง และ บุญรัตน์ (2545) อนวัช บุญญภักดี (2542) และ Klinbunga *et al.* (2000)

แต่ในกรณีชื่อวิทยาศาสตร์ของปูขาวซึ่งชูชาติและบูรณ์ (2522) บรรจง และ บุญรัตน์ (2545) อนวัช บุญญภักดี (2542) และ Klinbunga et al. (2000) กำหนดให้เป็น S. oceanica จะแตกต่างจาก ข้อเสนอของการศึกษาครั้งนี้ซึ่งกำหนดให้ปูขาวเป็น S. serrata var. paramamosain โดยเหตุที่การศึกษา ครั้งนี้ไม่สามารถกำหนดให้ปูขาวเป็น S. oceanica ได้นั้น เนื่องจาก Estampador (1949) ได้กล่าวไว้ว่า S. oceanica มีลายร่างแหปรากฏบนขาเดินทุกขารวมทั้งก้าม ("...large polygonal pigment area present on all legs, including chelipeds,...") ซึ่งไม่พบลักษณะดังกล่าวนี้ในปูขาว ประกอบกับ S. serrata var. paramamosain มีลักษณะที่สอดคล้องกับลักษณะของปูขาวมากกว่าโดยเฉพาะเมื่อพิจารณาจากหนาม ระหว่างตาที่หนามคู่กลางยาวกว่าหนามด้านข้าง ดังนั้นจึงกำหนดให้ปูขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า S. serrata var. paramamosain โดยลักษณะของ S. oceanica นั้นสอดคล้องกับปูเขียวที่เห็นได้จากลักษณะ ของลายร่างแหที่ปรากฏบนขาเดินทุกขา ขาว่ายน้ำ และก้าม ตามที่ Estampador (1949) ได้กล่าวไว้ จึง กำหนดให้ปูเขียวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า S. oceanica

5.2 การกำหนดชื่อตามเกณฑ์การจำแนก Keenan et al. (1998)

Keenen *et al.* (1998) ได้เสนอเกณฑ์การจำแนกชนิดปูทะเลโดยใช้ลักษณะภายนอกและ สัดส่วนความยาวของลักษณะภายนอก โดยเกณฑ์การจำแนกด้วยลักษณะภายนอกของ Keenan *et al.* (1998) ได้มุ่งเน้นที่จะใช้การจำแนกจากอวัยวะที่มีโครงสร้างแข็ง โดยพิจารณาจากการปรากฎหรือไม่ ปรากฎของหนาม และรูปทรงของหนาม ซึ่งพบว่าทำให้เกิดปัญหาการจัดจำแนกในกรณีปูขาว ซึ่งอาจมี หนามหรือไม่มีหนามบริเวณข้อมือ (wrist หรือ carpus) ทำให้ยุ่งยากในการจัดจำแนก

อย่างไรก็ตาม Keenan *et al.* (1998) ยังได้เสนอเกณฑ์การจัดจำแนกปูทะเลโดยใช้สัดส่วนความ ยาวของอวัยวะคือ ICS/OCS (inner carpus spine/outer carpus spine), FMSH/FW (frontal median spine height/frontal width) และ FW/ICW (carpace frontal width/internal carapace width) ซึ่งผลจาก การศึกษาครั้งนี้มีข้อมูลเปรียบเทียบได้จำนวน 2 สัดส่วนคือ FMSH/FW และ FW/ICW เนื่องจาก ICS/OCS เป็นลักษณะที่วัดได้ยากมากเพราะปูบางกลุ่มไม่มีหนาม ICS หรือถึงแม้จะเป็นปูที่มีหนาม ICS ก็ยังยุ่งยากในการวัด เนื่องจากหนาม ICS และ OCS เป็นหนามสั้นและการกำหนดตำแหน่งโคน ของหนามก็ทำได้ยาก ดังนั้นผลที่ได้จาก ICS และ OCS น่าจะมีความคลาดเคลื่อนของข้อมูลสูง จึงทำ การเปรียบเทียบเพียง 2 สัดส่วนคือ FMSH/FW และ FW/ICW

อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกปูทะเลตัวอย่างตาม Keenan et al. (1998) นอกจากใช้ข้อมูลจาก สัดส่วนดังกล่าวแล้ว ยังพิจารณาร่วมกับลักษณะภายนอกอันประกอบด้วย 1.) หนามบริเวณด้านนอก ของก้ามปล้องกลางซึ่งให้ความชัดเจนมากในกรณีของปูดำ ปูเขียว และปูม่วง แต่ให้ผลไม่ชัดเจนใน กรณีปูขาว 2.) ตำแหน่งปรากฏของลายร่างแห 3.) การปรากฏของหนามบริเวณด้านบนของก้าม 4.) ลักษณะของหนามขอบกระดอง และ 5.) รูปร่างของหนามระหว่างตา โดยเฉพาะอย่างยิ่งหนามระหว่าง ตาซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถแสดงกวามแตกต่างระหว่างปูทะเลแต่ละชนิดได้ก่อนข้างชัดเจน ซึ่งรายละ เอียดได้บรรยายไว้แล้วในหัวข้อ "ผลการจำแนกชนิดปูทะเลโดยใช้ลักษณะภายนอก"

<u>ตารางที่ 1</u>6 แสดงผลการเปรียบเทียบสัดส่วน FMSH/FW และ FW/ICW จากของปูดำ ขาว ม่วง และ เขียว กับสัดส่วน FMSH/FW และ FW/ICW ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของ Keenan *et al.* (1998) โดยจำนวนปูตัวอย่างที่ใช้ทั้งในการศึกษาครั้งนี้และในการศึกษาของ Keenan *et al.* (1998) แทนด้วยอักษร *N* 

this study			Keenan et.al.(1998)		
	FMSH/FW	FW/ICW		FMSH/FW	FW/ICW
Black morph (N=60)	0.028±0.0043	0.420±0.014	S.olivacea	0.029±0.005 (N=64)	0.415±0.017 ( <i>N</i> =66)
White morph (N=58)	$0.053 \pm 0.0083$	0.391±0.0115	S.paramamosain	0.058±0.012 (N=9)	0.377±0.007 ( <i>N</i> =9)
Violet morph ( <i>N</i> =36)	$0.045 \pm 0.0048$	0.417±0.0082	S.tranquebarica	0.043±0.006 (N=23)	0.412±0.016 (N=25)
Green morph (N=9)	$0.058 \pm 0.0080$	0.394±0.0106	S.serrata	0.061±0.010 ( <i>N</i> =67)	0.371±0.016 ( <i>N</i> =68)

ผลการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกและสัคส่วนของความยาว FMSH/FW และ FW/ICW (ตารางที่ 15) และลักษณะภายนอกตามข้อเสนอของ Keenan *et al.* (1998) พบว่า

ปูดำ	คือ	S. olivacea
ปูเขียว	คือ	S. serrata
ปูม่วง	คือ	S. tranquebarica
ปูขาว	คือ	S. paramamosain

ซึ่งเกณฑ์การจำแนกของ Keenan *et al.* (1998) เคยถูกนำมาใช้ในประเทศไทยโดย นวลมณี และคณะ (2547) ซึ่งได้จำแนก ปูดำเป็น *S. olivacea* ปูขาว เป็น *S. paramamosain* ซึ่งสอดคล้องกันกับ ผลการจำแนกที่เสนอในการศึกษาครั้งนี้

<u>ตารางที่ 1</u>7 ชื่อพื้นเมือง (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545) และชื่อวิทยาศาสตร์ตามข้อเสนอแนะของ Estampador (1949) และ Keenan, *et al.* (1998)

ปูทะเล	ชื่อพื้นเมือง	Estampador (1949)	Keenan, et al. (1998)
ปูดำ	ปูดำหรือปูแดง	S. serrata	S. olivacea
ปูขาว	ปูทองหลาง	S. serrata var. paramamosain	S. paramamosain
ปูม่วง	ปูทองโหลง	S. tranquebarica	S. tranquebarica
ปูเขียว	-	S. oceanica	S. serrata

ชื่อวิทยาศาสตร์ของปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว ที่เสนอในการศึกษาครั้งนี้โดยใช้เกณฑ์ การจำแนกของ Estampador (1949) และ Keenan et al. (1998) ได้นำเสนอในตารางที่ 17 อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกดังกล่าวมีความแตกต่างจากรายงานการจำแนกชนิดปูทะเลฉบับอื่นๆ ที่รวบรวมได้ในบาง ประเด็น โดยพบว่า Joel and Raj (1980) ได้จำแนกชนิดปูทะเลจากทะเลสาบ Pulicat (Pulicat lake) ใน ประเทศอินเดีย พบว่าจำแนกปูได้ 2 ชนิด คือ *S. serrata* และ *S. tranquebarica* ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะ ภายนอกของปูตัวอย่างที่ Joel and Raj (1980) รายงานไว้พบว่าลักษณะของ *S. serrata* สอดคล้องกับ ลักษณะของปูดำ ดังนั้นการใช้ชื่อ *S. serrata* ก็สอดคล้องกับชื่อวิทยาศาสตร์ที่เสนอไว้โดย Estampador (1949) แต่เมื่อพิจารณาลักษณะของ *S. tranquebarica* ตามรายงานของ Joel and Raj (1980) กลับพบว่า สอดคล้องกับลักษณะของปูงาว โดยเห็นได้จากหนามระหว่างตาซึ่งมีลักษณะแหลมและหนามกู่กลาง ยาวกว่าหนามด้านข้าง และสีของบริเวณปลายก้าม ดังนั้นปู *S. tranquebarica* ตามรายงานดังกล่าวน่าจะ หมายถึงปูขาว ซึ่งควรจะเรียกว่า *S. serrata* var. *paramamosain* ตามเกณฑ์การจัดจำแนกของ Estampador (1949)  ปูทะเลที่รวบรวมจากจังหวัดตราด ระนอง และสุราษฎร์ชานี และประเทศพม่า สามารถ จำแนกด้วยลักษณะภายนอกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ ปูดำ ปูเขียว ปูม่วงและปูขาว โดยปูดำมีลักษณะสำคัญ ดังนี้ ไม่มีลายร่างแหที่ขาว่ายน้ำ หนามระหว่างตาสั้นโด้งมน บริเวณด้านหน้าของก้ามไม่มีลายร่างแหมีสี พื้นเป็นสีโทนแดง ปูเขียวมีลักษณะสำคัญดังนี้ มีลายร่างแหที่มีช่องขนาดใหญ่ที่ขาว่ายน้ำ ขาเดินทุกขา และก้าม หนามระหว่างตายาวเรียว บริเวณข้อมือ (wrist หรือ carpus) มีหนามยาวแหลมคม 2 อันชัดเจน ปูม่วงมีลักษณะสำคัญดังนี้ มีลายร่างแหที่มีช่องขนาดใหญ่ที่ขาว่ายน้ำและขาเดินคู่สุดท้าย หนามระหว่าง ตายาวโด้งมน บริเวณด้านหน้าของก้ามไม่มีลายร่างแหมีสีโทนม่วง บริเวณข้อมือ (wrist หรือ carpus) มี หนามยาวแหลมคม 2 อันชัดเจน และปูขาวมีลักษณะสำคัญดังนี้ มีลายร่างแหที่มีช่องขนาดเล็กที่ขาดว่าย น้ำและขาเดินคู่สุดท้าย หนามระหว่างตามีสัณฐานเป็นรูปสามเหลี่ยมยาวและแหลมคม อาจมีหรือไม่มี หนามบริเวณข้อมือ หรือมีเฉพาะก้ามใดก้ามหนึ่ง บริเวณด้านหน้าของก้ามมีสีเขียวอมเหลือง มีจุดหรือ เส้นสีเขียวเข้มหรือน้ำตาลกระจายไม่เป็นระเบียบแต่จะไม่มีลายร่างแห

 ปูดำสามารถพบได้ในทุกแหล่งเก็บตัวอย่างในประเทศไทย (ตราด ระนอง และสุราษฎร์ ธานี) และปูจากประเทศพม่าทั้งหมดที่รวบรวมได้ก็เป็นปูดำ ปูงาวพบได้ทุกแหล่งเก็บตัวอย่าง เช่นเดียวกับปูดำ แต่พบได้ยากในแหล่งระนอง โดยพบได้ชุกชุมกว่าในแหล่งเก็บตัวอย่างฝั่งอ่าวไทย ปู ม่วงพบได้จากแหล่งระนองและตราด ไม่พบตัวอย่างปูม่วงจากแหล่งสุราษฎร์ธานี ส่วนปูเขียวเพราะ เฉพาะแหล่งระนองเท่านั้น

 การวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric จำนวน 51 ลักษณะด้วยวิธี Canonical Variate Analysis (CVA) stance ให้ผลสอดคล้องกับผลการจำแนกกลุ่มโดยใช้ลักษณะ ภายนอก โดย CVA สามารถแบ่งกลุ่มปูแต่ละกลุ่มออกจากกันได้เป็น 4 กลุ่ม (cluster) คือ กลุ่มปูดำ ปู เขียว ปูม่วง และปูเขียว

4. ค่า nucleotide divergence ระหว่างภายในกลุ่มปูดำ ปูเขียว ปูม่วง ปูขาว และปูม้า มีค่า ระหว่าง 0.001 – 0.003 และระหว่างกลุ่มมีค่าระหว่าง 0.079 – 0.195 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของระยะห่างทาง พันธุกรรม (genetic distance) ภายในกลุ่มปูดำ ปูเขียว ปูม่วง ปูขาว และปูม้า มีค่าระหว่าง 0.001 – 0.005 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มมีค่า 0.110 – 0.226 แต่ถ้าเป็นการเปรียบเทียบระหว่างปูต่างสกุล คือ Scylla กับ Portunus จะมีค่าระหว่าง 0.312 – 0.360 แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนว่าระหว่าง ความแตกต่างภายในกลุ่มกับความแตกต่างระหว่างกลุ่มของปูตัวอย่าง ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการจำกัดการเกิด

gene flow ระหว่างกลุ่มปูทะเล และความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดังกล่าวเป็นความแตกต่างทาง พันธุกรรมในระดับชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

5. ผลที่ได้จากการสร้าง phylogenetic tree ด้วย 3 วิธี คือ NJ MP และ ML แสดงให้เห็น tree ที่มีสัณฐานคล้ายคลึงกันมาก โดยแสดงให้เห็นว่าปูทะเลแต่ละกลุ่มแยกสายวิวัฒนาการกันอย่างชัดเจน และแสดงให้เห็นว่ากวามสัมพันธ์ภายในสกุล *Scylla* เป็น แบบ monophylatic group

ข้อมูลที่ได้จากความแตกต่างของลักษณะภายนอก
ความแตกต่างของลักษณะ
morphometric และความแตกต่างของลำคับนิวคลีโอไทด์ ร่วมกับการพิจารณาสถานะความเป็นชนิด
ของปูทะเลแต่ละกลุ่มตามคำจำกัดความของคำว่า "ชนิด" หรือ species concept พบว่า ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง
และปูขาว ควรถูกจัดเป็นปูต่างชนิดกัน

7. การกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์ให้แก่ปูแต่ละกลุ่มโดยเปรียบเทียบลักษณะของปูแต่ละกลุ่มกับ ข้อมูลจากรายงานการจัดจำแนกปูของ Estampador (1949) ซึ่งพิจารณาจากลักษระภายนอกคือ สี ตำแหน่งลายร่างแห และหนามระหว่างตา และ Keenan et al. (1998) ซึ่งพิจารณาจากลักษณะภายนอก กือ หนามบริเวณข้อมือ หนามระหว่างตา และรูปทรงของหนาม ร่วมกับสัดส่วนของลักษณะ morphometric กือ FMSH/FW (frontal median spine height/frontal width) และ FW/ICW (carpace frontal width/internal carapace width) ผลปรากฏว่า เมื่อกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์ตาม Estampador (1949) จะได้ว่า ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว คือ S. serrata, S. oceanica, S. tranquebarica and S. serrata var. paramamosain ตามลำดับ และเมื่อกำหนดชื่อตาม Keenan et al. (1998) จะได้ว่า ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และ ปูขาว คือ S. olivacea, S. serrata, S. tranquebarica and S. paramamosain ตามลำดับ
# เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชลธี ชีวะเศรษฐธรรม. 2539. การเพาะเลี้ยงปูทะเล (*Scylla serrata* Forskal). แผนกวิชา เทคโนโลยีการ ประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. 129 น.
- ชชาติ ชัยรัตน์ และ บูรณ์ แก้วฤทธิ์. 2522. การแบ่งกลุ่มปูทะเล, น. 29-47. รายงานประจำปี สถานี ประมงจันทบุรี. กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- นวลมณี พงศ์ธนา, สุภาพ ไพรพนาพงษ์, กฤตพล ยังวนิชเศรษฐ, เบญจพร สัมฤทธิเวช, เครือมาส สมปอง และ อำนวย อุ่นฤกษ์. 2547. **โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตปูทะเลเชิงการค้า**. เอกสารประกอบการสัมมนา ณ. โรงแรมมารวยการ์เค้น, กรุงเทพฯ.
- บรรจง เทียนส่งรัศมี และ บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2545. **ปูทะเล ชีววิทยา การอนุรักษ์ทรัพยากร และ** การเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์แบบยั่งยืน. โรงพิมพ์คอกเบี้ย, กรุงเทพฯ. 264น.
- ไพบูลย์ นัยเนตร. 2516. ปูทะเล, น. 13. *ใน* ไพบูลย์ นัยเนตร, บรรณาธิการ. **บทคัดย่อ กุ้ง ปู กั้ง และ** แมงดาทะเล. กรุงสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2544. **ปริมาณและมูลค่าสัตว์น้ำเค็มที่จับได้ทั้งประเทศ จำแนกตาม** ชนิด ปี 2543-2545. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/statistic/yearbook47. 10 พฤษภาคม 2549.

สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2540. เรื**่องน่ารู้เกี่ยวกับสัตว์ทะเล.** สำนักพิมพ์แพร่วิทยา, กรุงเทพฯ.

- อนวัช บุญญภักดี. 2542. <mark>ลักษณะความแตกต่างทางพันธุกรรมของปูทะเลสกุล Scylla ในจังหวัด</mark> จันทบุรีและจังหวัดตราด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Avise, J.C. and K. Wollenberg. 1997. Phylogenetics and the origin of species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 7748-7755.

- Black, W.C. and R.L. Roehrdanz. 1998. Mitochondrial gene order is not comserved in Arthropods: prostriate and metastriate tick mitochondrial genomes. **Mol. Biol. Evol.** 15: 1772-1785.
- Boore, J.L. 1999. Survey and summary animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Res. 27: 1767-1780.
- Bradley, R.D. and R.J. Baker. 2001. A test of the genetic species concept: *Cytochrome-b* sequences and mammals. J. Mammalogy 82: 960-973.
- Cann, R.L., M. Stoneking and A.C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature 325: 31-36.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D.G. Higgins and D. Thompson. 2003.
  Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acies Res. 31: 3497-3500.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. Curr. Ornitol. 1: 159-187.
- Cracraft, J. 1992. The species of the birds-of-paradise (Paradisaeidae): applying the phylogenetic species concept to a complex pattern of diversification. **Cladistics** 8:1-43.
- Creech, S. 1992. A multivariate morphometric investigation of *Atherina boyeri* Risso, 1810 and *A. presbyter* Cuvier, 1829 (Teleostei: Atherinidae): morphometric evidence in support of the two species. J. Fish Biol. 41: 341-353.
- Crozier, R.H. and Y.C. Crozier. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics** 133: 97-117.
- Dowling, T.E., C. Moritz, J.D. Palmer and L.H. Rieseberg. 1996. Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites, pp.249-320. *In* D.M. Hillis, C. Moritz and B.K. Mable (2eds.).
   Molecular systematics. Sinauer Associeates, Inc., USA.

- Estampador, E.P. 1949. Studies on *Scylla* (Crustacea: Portunidae) I. Revision of the genus. Philipp.J. Sci. 78: 95-108.
- Ferris, S.D., A.C. Wilson and W.M. Brown. 1981. Evolutionary tree for apes and humans based on cleavage maps of mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 2432-2436.
- Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge university press, UK. p617.
- Fuseya, R. and S. Watanabe. 1996. Genetic variability in the mud crab genus *Scylla* (Brachyura: Portunidae). Fisheries Sci. 65: 705-709.
- Fushimi, H. 1999. Problems in species identification of the mud crab genus *Scylla* (Brachyura: Portunidae). UJNR Technical Report No. 28: 9-13.
- Hey, J. 2001. The mind of the species problem. Trends Eco. Evo. 16: 326-329.
- Hickerson, M.J. and C.W. Cunningham. 2000. Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus*. Mol. Biol. Evol. 17: 639-644.
- Hickman, C.P., L.S. Roberts and A. Larson. 1993. Integrated principles of zoology. Mosby, St. Louis. 983p.
- Holder, M.T., M.V. Erdmann, T.P. Wilcox, R.L. Caldwell and D.M. Hill. 1999. Two living species of coelacanths? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 12616-12620.
- Huang, X. and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res. 9: 868-877.

- Hwang, U.W., M. Friedrich, D. Tautz, C.J. Park and W. Kim. 2001. Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. Nature 413: 154-257.
- Imai, H. and K.I. Numachi. 2002. Intra- and interspecific genetic variability and relationships among mud crabs, *Scylla* spp. (Decapoda: Portunicae), demonstrated by RFLP analysis of mitochondrial DNA. J. Anim. Geneti. 28: 3-11.
- Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 314: 67-73.

Jobson, J.D. 1992. Applied Multivariate Data Analysis. Springer-Verlag Inc., New York. 731 p.

- Joel, D.R. and P.J.S. Raj. 1980. Taxonomic remarks on two species of the genus *Scylla* DE HAAN (Portunidae: Brachyura) from Pulicat Lake. J. Inland Fish Soc. India. 12: 39-50.
- Johannesen, J., A. Kiefer, M. Veith and J. Kral. 2004. Genetic cohesion of *Eresus walckenaeri* (Araneae, Eresidae) in the eastern Mediterranean. **Biol. J. Linn. Soc.** 86: 1-9.
- Keenan, C.P., P.J.F. Davie and D.L. Mann. 1998. A revision of the genus *Scylla* DE HAAN, 1833 (Crustacea:Decapoda:Brachyura:Portunidae). Raffles Bull. Zool. 46: 217-245.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. p.367.
- Klinbunga, S., A. Boonyapakdee and B. Pratoomchat. 2000. Genetic diversity and speciesdiagnostic markers of mud crabs (Genus *Scylla*) in eastern Thailand determined by RAPD analysis. Mar. Biotechnol. 2: 180-187.
- Klingenberg, C.P., M. Barluenga and A. Meyer. 2003. Body shape variation in chichlid fishes of the *Amphilophus citrinellus* species complex. **Biol. J. Linn. Soc.** 80: 397-408.

- Kossl, M., F. Mayer, G. Frank, M. Faulstich and I.J. Russell. 1999. Evolutionary adaptations of cochlear function in Jamaican mormoopid bats. J. Comp. Physiol. 185: 217-228.
- Kumar S, K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Bioinformatics** 5:150-163.
- Lavrov, D.V., J.L. Boore and W.M. Brown. 2002. Complete mtDNA sequence of two millipedes suggest a new model for mitochondrial gene rearrangements: duplication and nonrandom loss.
   Mol. Biol. Evol. 19: 163-169.
- Luthy, S.A., R.K. Cowen, J.E. Serafy and J.R. McDowell. 2004. Toward identification of larval sailfish (*Istiophours platypterus*), white marlin (*Tetrapturus albidus*), and the blue marlin (*Makaira nigricans*) in the western North Atlantic Ocean. Fish. Bull. 103: 588-600.
- Maggioni, R., A.D. Rogers, N. Maclean and F. D'Incao. 2001. Molecular phylogeny of western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* shrimp based on mitochondrial 16S partial sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 18: 66-73.
- Malhotra, A., R.S. Thorpe and B.L. Stuart. 2004. A morphometric analysis of *Trimeresurus vogeli* (David, Vidal and Pauwels, 2001), with new data on diagnostic characteristics, distribution and natural history. Herpetological J. 14: 65-77.
- Mallet, J. 1995. A species definition for the modern synthesis. Trends Ecol. Evol. 10: 294-299.
- Masta, S.E. 2000. Mitochondrial sequence evolution in spiders: intraspecific variationin tRNAs lacking the TWC arm. **Mol. Biol. Evol.** 17: 1091-1100.

Mayr, E. 1964. Systematics and the origin of species. Dover publications, Inc. New York. p.334.

- Miller, A.D., N.P. Murphy, C.P. Burridge and C.M. Austin. 2005. Complete mitochondrial DNA sequences of the decapod crustaceans *Pseudocarcinus gigas* (Menippidae) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae). Mar. Biotechnol 7. 339-379.
- Miya, M., H. Takeshima, H. Endo, N.B. Ishiguro, J.G. Inoue, T. Mukai, T.P. Satoh, M. Yamaguchi, A. Kawaguchi, K. Mabuchi, S.M. Shirai and M. Nishida. 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 26: 121-138.
- Naiyanetr, P. 1998. Checklist of Crustacean fauna in Thailand (decapoda and stomatopoda). Integrated Promotion Technology Co., Ltd., Bangkok.
- Nass, M.M.K. 1966. The circularity of mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 56: 1215-1222.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York. p333.
- Overton, J.L., D.J. Macintosh and R.S. Thorpe. 1997. Multivariate analysis of the mud crab Scylla serrata (Brachyura: Portunidae) from four locations in Southeast Asia. Marine Biol. 128: 55-62.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers.Comput. Appl. Biol. Sci. 12: 357-358.
- Parnaby, H.E. 2002. A new species of long-eared bat (*Nyctophilus:* Vespertilionidae) from New Caledonia. Australian Mammalogy 23: 115-124.
- Perez, M.L., J.R. Valverde, B. Batuecas, F. Amat, R. Marco and R. Garesse. 1994. Speciation in the *Artemia* genus: mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps. J. Mol. Evol. 38: 156-168.

- Place, A.R., X. Feng, C.R. Steven, H.M. Fourcade and J.L. Boore. 2005. Genetic markers in blue crabs (*Callinectes sapidus*) II. complete mitochondrial genome sequence and characterization of genetic variation. J. Exp. Marine Biol. Eco. 319: 15-27.
- Posada, D. and K.A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14: 817-818.
- Pritchard, A.E., J.J. Seilhamer, R. Mahalingan, S.E. Venuti and D.T. Cumminge. 1990. Nucleotide sequence of the mitochondrial genome of Paramecium. Nucleic Acids Res. 18: 173-180.
- Rozas, J J.C. Sanchez-Delbarrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** 19: 2496-2497.
- Ruedi, M. and F. Mayer. 2001. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. Mol. Phylogenet. Evol. 21: 436-448.
- Schliewen, U., H. Fricke, M. Schartl, J.T. Epplen and S. paabo. 1993. Which home for coelacanth? Nature 363: 405.
- Segawa, R.D. and T. Aotsuka. 2005. The mitochondrial genome of the Japanese freshwater crab, *Geothelphusa dehaani* (Crustacea: Brachyura): evidence for its evolution via gene duplication. Gene 355: 28-39.
- Serb, J.M., J.E. Buhay and C. Lydeard. 2003. Molecular systematics of the North American fresh water bivalve genus *Quadrula* (Unionidae: Ambleminae) based on mitochondrial *ND1* sequence. Mol. Phylogenet. Evol. 28: 1-11.
- Sun, H., K. Zhou and D. Song. 2005. Mitochondrial genome of the Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinenesis* (Brachyura: Thoracotremata: Grapsoidea) reveals a novel gene order and two target regions of gene rearrangements. Gene 349: 207-217.

Suvatti, C. 1950. Fauna of Thailand. Department of Fisheries, Bangkok.

- Swofford, D.L. 1998. **PAUP<sup>\*</sup>**. **Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods)**. **Version 4.** Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D.L., G.J. Olsen, P.J. Waddell and D.M. Hillis. 1996. Phylogenetic inference. pp.407-514. In D.M. Hillis, C. Moritz and B.K. Mable (2eds.). Molecular systematics. Sinauer Associeates, Inc., USA.
- Tagliaro, C.H., M.P.C. Schneider, H. Schneider, I. Sampaio and M. Stanhope. 2000. Molecular studies of *Callithrix pygmaea* (Primates, Platyrrhini) based on transferring intronic and *ND1* regions: implications from taxonomy and conservation. Genet. Mol. Biol. 23: 729-737.
- Tavare, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lec. Math. Life Sci. 17: 57-86.
- Wilson, K., V. Cahill, E. Ballment and J. Benzie. 2000. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: Are malacostracan crustaceans More closely to insects than to branchiopods? Mol. Biol. Evol. 17: 863-874.
- Wolstenholme, D.R., J.L. Macfarlane, R. Okimoto, D.O. Clary and J.A. Wahleithner. 1987. Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1324-1328.
- Xia, X. 1993. The rate heterogeneity of nonsysnonymous substitution in mammalian mitochondrial genes. Mol. Biol. Evol. 15: 336-344.
- Yamauchi, M.M., M.U. Miya and M. Nishida. 2002. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (Crustacea: Decapoda). Gene 295: 89-96.

- Yamauchi, M.M., M.U. Miya and M. Nishida. 2003. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). Gene 311: 129-135.
- Yamazaki, N., R. Ueshima, J.A. Terrett, S.-I. Yokobori, M. Kaifu, R. Segawa, T. Kobayashi, K.-I.
  Numachi, T. Ueda, K. Nishikawa, K. Watanabe and R.H. Thomas. 1997. Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene organizations of Euhadra, Cepaea and Albinaria and implication of unusual tRNA secondary structures. Genetics 145: 749-758.
- Yoko, S. and S.I. Chigusa. 1991. Mitochondrial DNA in *Drosophila*: the genetics and evolution.
   pp.117-137. *In* M. Kimura and N. Takahata (eds.). New aspects of the genetics of molecular evolution. Japan scientific societies press, Japan.

ภาคผนวก

ถำดับนิวกถีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-ND1-tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>* ของปูดำจากพม่า (MB) ระนอง (RB) สุราษฎร์ธานี (SB) และ ตราด (TB) ปูเขียวจากระนอง (RG และ RW07g) ปูม่วงจาก ระนอง (RV) และ ตราด (TV) และ ปูขาวจากระนอง (RW) สุราษฎร์ธานี (SW) และ ตราด (TW)

# >MB01

## >MB02

#### >MB03

# >MB05

# >MB14

## >MB20

#### >RB65

#### >RB68

## >RB69

# >RB71

#### >RB80

#### >RB83

## >SB05

## >SB08

# >SB11

#### >SB12

#### >SB14

#### >TB35

## >TB40

# >TB43

#### >TB44

#### >TB47

#### >TB49

## >RG06

# >RG07

#### >RG10

#### >RG15

#### >RG16

## >RG17

# >RG20

#### >RG21

#### >RG22

#### >RG23

## >RG24

# >RG25

#### >RG33

#### >RG34

#### >RG37

## >RG38

# >RW07g

#### >RV01

#### >RV02

#### >RV11

## >RV12

# >RV13

#### >RV27

#### >RV28

#### >RV29

#### >RV31

# >TV02

#### >TV03

#### >TV04

## >TV05

## >TV06

# >TV09

#### >TV13

#### >RW03

#### >RW04

## >RW08

# >RW09

## >RW14

#### >RW18

## >SW02

## >SW03

# >SW04

#### >SW05

#### >SW06

# >SW08

## >TW22

# >TW34

#### >TW38

#### >TW44

#### >TW53

## >TW54

# >PP01

# >PP02

#### >PP03

## >PP04

## >PP05

# >PP06

#### >PP07

#### >PP08

## >PP09

# >PP10