

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น และมีสภาพทางภูมิศาสตร์ที่เอื้อให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ซึ่งรวมถึงทรัพยากรทางทะเล ประเทศไทยน่าจะมีสิ่งมีชีวิตอยู่ประมาณ 124,003 ชนิด หรือร้อยละ 8.9 ของสิ่งมีชีวิตอยู่ในโลกทั้งหมด ซึ่งรวมถึงชนิดพันธุ์ที่ทราบชื่อแล้ว และที่ยังไม่พบ (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2548) อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของมนุษย์กำลังคุกคามความหลากหลายทางชีวภาพดังกล่าว ซึ่งเปรียบเสมือนต้นทุนทางทรัพยากรของประเทศ ดังนั้นด้วยสายพระเนตรกว้างและยาวไกล พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเห็นถึงความสำคัญของการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช โดยทรงเริ่มดำเนินงานพัฒนาและอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ และความหลากหลายทางชีวภาพ ตั้งแต่ปี 2503 เป็นต้นมา โดยมีพระราชดำริให้ดำเนินการสำรวจรวบรวมปลูกดูแลรักษาพรรณพืชต่างๆ ที่หายากและกำลังจะหมด ต่อมาในปี พ.ศ. 2535 สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้ทรงประสานพระราชปณิธานต่อโดยมีพระราชดำริ กับนายแก้วขวัญ วัชโรทัย เลขาธิการพระราชวัง ให้ดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศโดยพระราชทานให้โครงการสวนพระองค์ฯ สวนจิตรลดา เป็นผู้ดำเนินการจัดสร้างธนาคารพืชพรรณขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 เป็นต้นมา

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

จากการศึกษาในปีที่ผ่านมา พบข้อมูลที่น่าสนใจหลายประเด็น ซึ่งรวมถึงความยุ่งยากของการแยกปูและกิ้งบางชนิด เนื่องจากสัณฐานมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (เช่นปูม้าหิน หรือกิ้งดิดชัน) หรือปูที่มีความแปรปรวนของลักษณะรูปแบบสีลำตัว ที่จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน (เช่นปูใบ) หรือความแปรปรวนของลักษณะสัณฐานอันเนื่องมาจากวัยของสัตว์น้ำ ดังนั้นการศึกษาในปีที่ 3 นี้จึงจะเน้นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของปูและกิ้งกลุ่มที่มีประเด็นปัญหาทางอนุกรมวิธานที่เด่นชัด และการวิเคราะห์ทางสัณฐานควบคู่กันไป โดยจะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนของทั้งบนไมโทคอนเดรีย และจากในนิวเคลียส เนื่องจากยีนแต่ละประเภทมีระดับความแปรปรวนที่เหมาะสมต่อการ

ตรวจสอบชนิด ทั้งนี้อยู่บนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ มักมีอัตราการเกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์สูงกว่า ดีเอ็นเอในนิวเคลียส (ประมาณ 5-10 เท่า) ไม่มีการรวมยีนหรือการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (Recombination) และมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมจากแม่สู่ลูก (Avisé, 2004) ซึ่งต่างจากยีนใน นิวเคลียสที่มี recombination และ ถ่ายทอดสู่รุ่นลูกจากทั้งทางพ่อและแม่

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยปีที่ 3

1. พัฒนาเครื่องมือทางชีวโมเลกุลในการแยกชนิดกิ้ง ปู และกั้ง ที่พบบริเวณเกาะเสมสาร เกาะแรด เกาะฉางเกลือ และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
2. พัฒนารฐานข้อมูลพันธุกรรมระดับชนิดของ กิ้ง ปู และกั้งที่พบบริเวณเกาะเสมสาร เกาะแรด เกาะฉางเกลือ และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบางกลุ่มอนุกรมวิธานของกิ้ง ปู และกั้งที่พบ บริเวณเกาะเสมสาร เกาะแรด เกาะฉางเกลือ และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนบนไมโทคอนเดรีย และยีนในนิวเคลียส

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่าง กิ้ง ปู และ กั้งจาก บริเวณเกาะเสมสาร เกาะแรด เกาะฉางเกลือ และ เกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยจะประสานงานกับการเก็บ และจำแนกชนิดตัวอย่างกับ โครงการย่อย ความหลากหลายทางชีวภาพของกิ้ง ปู และ กั้ง บริเวณเกาะเสมสาร เกาะแรด เกาะ ฉางเกลือ และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

จำนวนตัวอย่าง

สำหรับการแยกชนิดโดยสัณฐาน และเครื่องหมายพันธุกรรม จะใช้ตัวอย่าง สปีชีส์ละ ประมาณ 4 ตัวอย่าง โดยในปีงบประมาณ 2556 ตั้งเป้าหมายจะวิเคราะห์ความหลากหลายทาง พันธุกรรมของ ปูที่มีประเด็นทางอนุกรมวิธาน ได้แก่กลุ่มปูใบ้ ปูม้าหิน ปูลมและกั้งติดชัน

ประเภทของเครื่องหมายพันธุกรรม

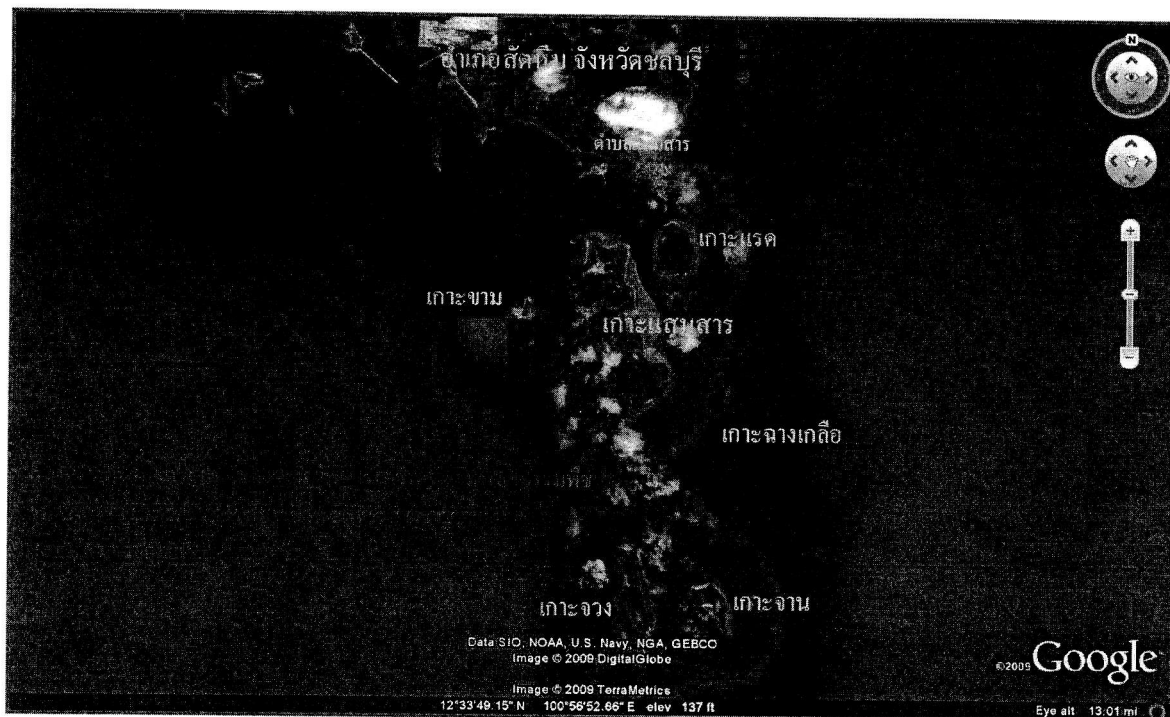
เครื่องหมายพันธุกรรมคือ สารพันธุกรรมที่ใช้บ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับต่างๆ เช่น ระหว่าง จินัส สปีชีส์ ประชากร และ ครอบครัว การศึกษานี้จะใช้เครื่องหมายพันธุกรรม 2 ประเภทคือ ยีนบนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ 2 ยีน ได้แก่ ยีน 16S rRNA และ Cytochrome Oxidase subunit I (COI) และยีนที่อยู่ในนิวเคลียส 1 ยีน เช่นยีน Histone H3 เนื่องจากยีน เหล่านี้มีระดับของการกลายพันธุ์เหมาะสมสำหรับการแยกจินัส และสปีชีส์สำหรับสัตว์กลุ่มกิ้ง ปู และกั้ง ทั้งนี้จะใช้ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มดีเอ็นเอของปูที่มีการตีพิมพ์แล้ว

โจทย์วิจัย

1. ปูใบ้ที่บ่งชี้ว่าเป็น *Leptodius exaratus* ที่มีสีสันและลวดลายลำตัวต่างกัน เป็นต่างสปีชีส์กันหรือไม่
2. ปูม้าหิน *Thalamita* ที่คาดว่า เป็น *T. danae* และ *T. pryma* ที่บ่งชี้ลักษณะจากสัณฐาน ภายนอก (ซึ่งใกล้เคียงกันมาก) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างไร
3. ปูลม *Ocypode* ที่พบที่หมู่เกาะเสมสารมีมากกว่า 1 ชนิดหรือไม่
4. กั้งติดชัน *Alpheus* ที่ยังไม่สามารถแยกชนิดได้ เป็นสปีชีส์เดียวกับกั้งติดชันสปีชีส์อื่นๆ ที่รวบรวมได้จากที่ต่างๆ ในจังหวัดชลบุรีหรือไม่

การรวบรวมตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างกุ้ง ปู และกั้งจากบริเวณเกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะนางเกλιο และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยจะใช้ตัวอย่างที่จัดจำแนกชนิดด้วยสำนัฐาน จากโครงการย่อยความหลากหลายทางชีวภาพของกุ้ง ปู และ กั้ง บริเวณเกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะนางเกλιο และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เก็บรักษาตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95%



ภาพที่ 1 แผนที่ พื้นที่ที่ปกปักพันธุ์กรรมพืชทางทะเล เกาะแสมสารและเกาะใกล้เคียง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (จากแผนการวิจัย ทรัพยากรชีวภาพทางทะเลในพื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี : องค์ความรู้พื้นฐานสู่วิถึไทยและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน)

ตัวอย่างที่สร้างข้อมูลสายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับแผนการในปีที่ 3 ได้แก่ปู และกุ้งน้ำเค็มที่มีประเด็นด้านอนุกรมวิธาน (ภาพที่ 2) ซึ่งรวมถึงปูใบ (*Leptodius exaratus*) ปูม้าหินสกุล *Thalamita* (*T. prymna* และ *T. danae*) ปูลม (*Ocypode* spp.) และกั้งติดชัน (*Alpheus* spp.) (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่พบที่แสมสาร และพบที่ทำเรืออ่างศิลา (สำหรับปูลม) โดยตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์มีจำนวนกลุ่มละ 8-10 ตัวอย่าง (ถ้าสามารถแยกสปีชีส์เบื้องต้นได้ จะใช้ตัวอย่างอย่างน้อยสปีชีส์ละ 4 ตัวอย่าง)

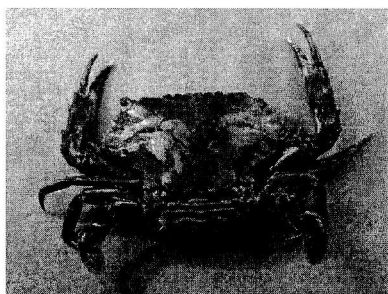
นอกเหนือจากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากหมู่เกาะแสมสารแล้ว การศึกษานี้ยังได้วิเคราะห์ตัวอย่าง นิเวศวิทยาของปูน้ำเค็มและกั้งติดชันจากฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 1) ข้อมูลนิเวศวิทยาจากฐานข้อมูล GenBank ประกอบไปด้วย ปูในสกุล *Thalamita*, *Charybdis*, *Scylla*, *Ocypode* และปูจากวงศ์ Varunidae 1 ชนิดคือ *Gaetice depressus* (HM180588.1) นอกจากนี้ยังได้รวมกั้งติดชันสกุล *Alpheus* อีกหลายชนิด

ตารางที่ 1 รหัสและชื่อตัวอย่างปูน้ำเค็มที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสารที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ และตัวอย่างนิวคลีโอไทด์ของยีน COI, 16S rRNA และยีน Histone H3 ของปูใบ้ ปูม้าหิน ปูลม กุ้ง ตัดชั้น และปูชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank โดยชื่อวิทยาศาสตร์ที่ปรากฏสำหรับตัวอย่างที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสารที่มีการระบุชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐาน

รหัสตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์ (ที่แยกเบื้องต้นจากสัณฐาน)	GenBank Accession No.	ยีน
ปูใบ้			
Leex	<i>Leptodius exaratus</i>		COI, 16S, H3
ปูม้าหิน			
Thsp	<i>Thalamita prymna</i>	-	COI, 16S, H3
Thda	<i>Thalamita danae</i>	-	COI, 16S, H3
	<i>Thalamita sima</i> <i>Thalamita crenata</i> <i>Thalamita admete</i> <i>Thalamita prymna</i> <i>Charybdis hellerii</i> <i>Charybdis variegata</i> <i>Charybdis japonica</i> <i>Charybdis feriatus</i> <i>Scylla serrata</i> <i>Gaetice depressus</i>	JX502946.1 JX398104.1 JQ180240.1 JX398103.1 JX123454.1 EU284142.1 EU586120.1 EU284140.1 KF612462.1 HM180588.1	COI
	<i>Thalamita danae</i> <i>Thalamita crenata</i> <i>Charybdis japonica</i> <i>Charybdis feriata</i> <i>Thalamita sima</i>	FJ152165.1 LK391945.1 FJ460517.1 546355162 FJ152166.1	16S
ปูลม			
Occe	<i>Ocypode ceratophthalmus</i>		COI, 16S, H3
	<i>Ocypode ceratophthalmus</i> <i>Ocypode platytarsis</i> <i>Ocypode stimpsoni</i> <i>Ocypode mortoni</i> <i>Ocypode sinensis</i>	AB751382.1 KF633178.1 JX502934.1 AB751388.1 AB751392.1	COI
	<i>Ocypode ryderii</i> <i>Ocypode quadrata</i> <i>Ocypode ceratophthalmus</i> <i>Ucides cordatus</i> <i>Uca rapax</i>	AM180689.1 FN539018.1 LN611669.1 FN539019.1 B813665.1	16S

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์ (ที่แยกเบื้องต้นจากหลักฐาน)	GenBank Accession No.	ยีน
กุ้งตืดชั้น			
Alse	<i>Alpheus serenite</i>		16S
Alra	<i>A. rapacida</i>		16S
Alsp	<i>Alpheus sp.</i>		16S
	<i>Alpheus distinguendus</i>	GQ892049.1	16S
	<i>Alpheus buckupi</i>	JX286604.1	
	<i>Alpheus chacei</i>	JX286606.1	
	<i>Alpheus petronioi</i>	KF667545.1	
	<i>Alpheus pontederiae</i>	KF667547.1	
	<i>Alpheus microrhynchus</i>	JX286612.1	
	<i>Alpheus aff. euprosyne</i>	JX286609.1	
	<i>Alpheus heterochaelis</i>	AF501647.1,	
		JX286610.1	
	<i>Alpheus estuariensis</i>	JX286608.1	
	<i>Alpheus scopulus</i>	FJ528446.1	
	<i>Alpheus hyeyoungae</i>	FJ528479.1	
	<i>Alpheus lobidens</i>	JX286611.1	
	<i>Alpheus armillatus</i>	FJ528475.1	
	<i>Alpheus tenuis</i>	AF501648.1	
	<i>Alpheus cf. armillatus</i>	DQ682861.1	



ปูม้าหิน

Thalamita danae Stimpson, 1858

(ก)

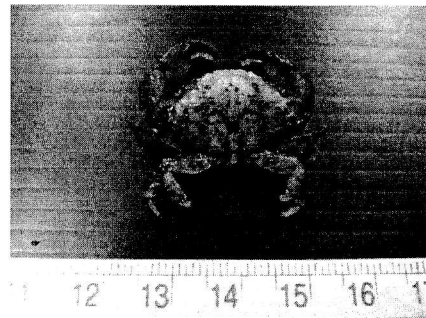
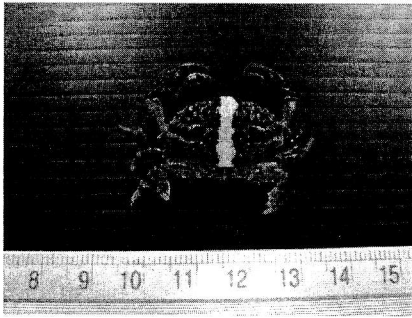


ปูม้าหิน

Thalamita prymna (Herbst, 1794)

(ข)

ภาพที่ 2 ลักษณะภายนอกของปู และกุ้งน้ำเค็มเต็มวัยบางชนิด ที่จะรวมในการศึกษาในครั้งนี้ (ก) – (ข) เป็นกลุ่มปูม้าหิน (ค) – (ง) เป็นปูใบหิน (ข) – (ช) เป็นปูลม (ฉ) – (ญ) เป็นกุ้งตืดชั้น (ภาพถ่ายจาก ผศ. ดร. นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร)

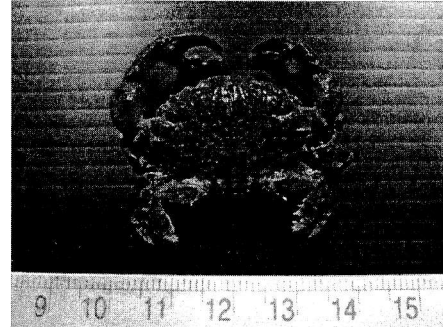
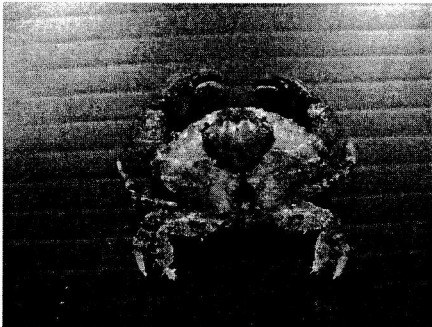


ปูใบ้

Leptodius exaratus (H. Milne Edwards, 1834)

(ค)

(ง)

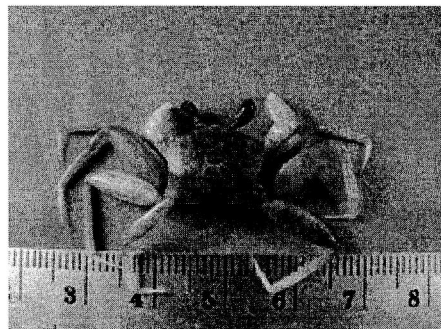
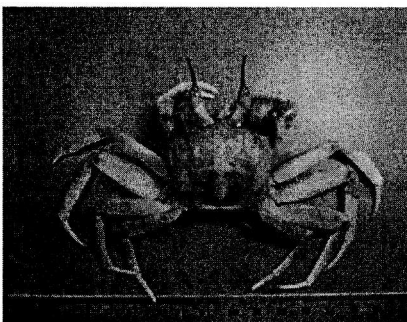


ปูใบ้

Leptodius exaratus (H. Milne Edwards, 1834)

(จ)

(ฉ)

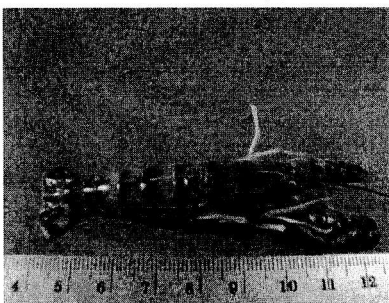


(ช)

(ซ)

ปูลมตาวาว ปูผี

Ocypode ceratophthalmus (Pallas, 1772)



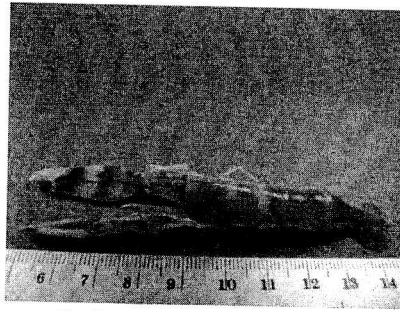
กุ้งติดขัน

Alpheus serenei Tiwari, 1963

Alpheus rapacida de Man, 1908

(ณ)

(ญ)



กิ้งกัสดัก Alpheus sp. (ภ)

ภาพที่ 2 (ต่อ)

การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

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

สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% ด้วยวิธีการสกัดมาตรฐาน Salt extraction (อธิบายไว้ใน Aljanabi and Martinez 1997) หรือใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (RBC BioScience Corp, Taiwan) ตามวิธีการที่แนะนำของผู้ผลิตและ เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดแล้วด้วยสารละลาย TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 8.0) หรือน้ำปราศจากไอออน

ดีเอ็นเอด้วยวิธี Salt extraction ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Aljanabi & Martinez (1997) วิธีการโดยสังเขปดังนี้คือ นำเนื้อเยื่อของปูมาหั่นมาตัดและบดละเอียดให้มีขนาดเล็กประมาณ 2 มิลลิเมตร ใส่ลงในหลอดทดลอง Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มี Lysis buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0, 2% SDS, 0.4 M NaCl) และ Proteinase K (20 mg/ml) เพื่อทำการย่อยโปรตีนออกจากเนื้อเยื่อและบ่มสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นตกตะกอนโดยเติม 6 M NaCl และตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม Isopropanol 100% ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70%

เพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ปฏิกิริยาลูกโซ่; PCR) ใน 1 ปฏิกิริยา (50 μ l) จะใช้ส่วนผสมดังนี้ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบประมาณ 10-100 ng บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า (เจือจางจากสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า) นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTPs) ความเข้มข้นทั้ง 4 เบส 1 mM แมกนีเซียมคลอไรด์(MgCl₂) ความเข้มข้น 1.5 mM ไพโรเมอร์แต่ละสาย ที่ความเข้มข้น 0.2 μ M และ Taq DNA polymerase 2 unit โดยไพโรเมอร์ (ชิ้นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอ) ที่ใช้จะเป็นไพรเมอร์ ที่พัฒนาแล้วสำหรับบูชนิดอื่น (ตารางที่ 1) โดยรวมถึงยีน 16S rRNA และ Cytochrome oxidase subunit I (COI) บนไมโทคอนเดรีย และยีน Histone H3 ในนิวเคลียส (Schubart et al. 2006; Schubart and Reuschel 2009)

การเพิ่มดีเอ็นเอในสารละลายปฏิกิริยาจะผ่านการเพิ่มลดอุณหภูมิในเครื่อง thermocycler (MJ mini, Biorads, USA) โดยวัฏจักรการเพิ่มลดอุณหภูมิประกอบไปด้วย 3 ชุด (ตารางที่ 2) คือ (1) วัฏจักร 1 รอบของการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็น 2 เส้น (denaturing temperature, 94°C) เป็นเวลา 3 นาที (2) วัฏจักร 35 รอบของ denaturing temperature นาน 1 นาที การลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์เกาะกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature, 45 °C, ตารางที่ 2) เป็นเวลา 1 นาที และการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เอนไซม์ DNA polymerase ซ่อมสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ให้สมบูรณ์ (extension temperature, 72 °C) เป็นเวลา 1.5 นาที และ (3) วัฏจักร 1 รอบ ของ extension temperature นาน 10 นาที (ดัดแปลงจาก Schubart et al. 2006)

ตารางที่ 2 รายละเอียดของไพรเมอร์ พร้อมรายละเอียดของอุณหภูมิที่ไพรเมอร์ เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่ทดสอบในการศึกษาในครั้งนี้

ยีน	รายละเอียดไพรเมอร์	Annealing temperature	อ้างอิง
16S rRNA (ไมโทคอนเดรีย)	16S-1472: 5’AGA TAG AAA CCA ACC TGG3’	45 C	Schubart et al. (2006)
	16S-L2: 5’TGC CTG TTT ATC AAA AAC AT3’		
Cytochrome oxidase subunit I (COI; ไมโทคอนเดรีย)	COI HCO2198: 5’ TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3’ COI LCO1490: 5’ GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3’	45 C	Hebert et al. (2003)
H3 (นิวเคลียส)	H3af:5’-ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACC GC-3’ H3ar:5’-ATA TCC TTG GGC ATG ATG GTG AC-3’	45 C	Schubart and Reuschel (2009)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยชุดทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ สำเร็จรูป (HiYield Gel/PCR DNA Fragment extraction kit, RBC Bioscience) เพื่อกำจัดนิวคลีโอไทด์อิสระ และชิ้นไพรเมอร์ส่วนเกิน ตรวจสอบความเข้มข้น และปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ที่ทำความสะอาดแล้วด้วย agarose gel (Winfrey et al. 1994) ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ สารดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จะเรืองแสง ภายใต้แสง UV เทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 คู่เบส (M23 100 bp) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI 3100 (บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวใช้ระบบวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซิสอัตโนมัติ (automated sequencer) ซึ่งอาศัย

หลักการตรวจสอบคลื่นแสงที่ปลดปล่อยจากฉลากเรืองแสงบนเครื่องหมายพันธุกรรม เมื่อกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ ข้อมูลจะเป็น electropherogram ที่แสดง peak ของเบสต่างๆ ด้วยสีที่แตกต่างกัน

การวิเคราะห์ข้อมูล

จัดและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์

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

เปรียบเทียบระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายนิวคลีโอไทด์ ของปู ชนิดต่างๆ และกุ้ง ตีตชัน โดยใช้ข้อมูลดังต่อไปนี้ คือ (1) ค่าเฉลี่ยจำนวนเบสองค์ประกอบของแต่ละเบส (Bases Composition) (2) จำนวนตำแหน่งที่มีความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ (Variable sites) และที่สามารถนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Parsimony informative sites) (3) ความแตกต่างทางวิวัฒนาการระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ ที่แสดงเป็นจำนวนการแทนที่เบสต่อตำแหน่ง (ได้แนวเส้นทะแยงมุม) และค่า standard error (เหนือแนวเส้นทะแยงมุม) โดยใช้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณจากรูปแบบการแทนที่นิวคลีโอไทด์ตามโมเดลที่เหมาะสมกับข้อมูล ซึ่งค่าดัชนีเหล่านี้สามารถคำนวณได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA version 6.0 (Tamura et al. 2013)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

สร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic trees) โดยวิธี Maximum Likelihood และ Minimum Evolution (Rzhetsky and Nei 1992) โดยใช้โมเดลที่อธิบายอัตราการกลายที่เหมาะสมกับข้อมูลมากที่สุด (คำนวณด้วยโปรแกรม MEGA version 6.0) ทดสอบความสม่ำเสมอของการจัดกลุ่มด้วยวิธี Bootstrapping ที่ 1000 ซ้ำ สร้างแผนภูมิฯ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA version 6.0

ผลการศึกษา

สายนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่วิเคราะห์ (หลังจากการจัดเรียงนิวคลีโอไทด์) ในการศึกษาครั้งนี้ มีความยาวทั้งสิ้น 623 (ปูลม) - 686 (ปูใบ) คู่เบส และสายนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA มีความยาวทั้งสิ้น 516 (กุ้งตืดชั้น) - 542 (ปูม้าหิน) คู่เบส ในขณะที่ยีน Histone H3 ที่วิเคราะห์มีความยาว 297 (ปูลม) - 349 (ปูใบ) ในตัวอย่างกุ้งปูทุกชนิด ยีน COI มีระดับความแปรปรวนมากที่สุด และยีน Histone H3 มีความแปรปรวนต่ำสุด

เมื่อเปรียบเทียบยีนตำแหน่งเดียวกันระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างกลุ่ม พบว่าองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ (Thyamine, Cytosine, Aginine และ Guanine) มีค่าใกล้เคียงกัน

ความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ และความแตกต่างทางพันธุกรรมของปูใบ

ทั้งสามยีนบ่งชี้ว่ากลุ่มปูใบที่คาดว่าเป็นชนิด *Leptodius exaratus* ที่มีสีและลวดลายบนลำตัวแตกต่างกัน (ตารางที่ 3) ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ยีน COI แสดงระดับความแปรปรวนระหว่างตัวอย่างเท่ากับร้อยละ 3.21 (สัดส่วนของตำแหน่งที่มีความแปรปรวนเทียบกับจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์) ในขณะที่ยีน 16S แสดงสัดส่วนตำแหน่งที่มีความแปรปรวนเพียงร้อยละ 0.02 เมื่อเทียบกับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย และยีน Histone H3 ไม่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างเลย

ตารางที่ 3 ความหลากหลายทางพันธุกรรม และข้อมูลสถิติของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างปูใบ *Leptodius exaratus* ที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสาร

	COI	16S	Histone H3
Total number of nucleotides (bp)	686	534	349
Number of sequence	8	6	7
Variable sites	22 (3.21%)	1 (0.02%)	0
Parsimony informative sites	7 (1.02%)	0	0
Mean T content	34.8	33.4	18.9
Mean C content	20.7	11.3	29.2
Mean A content	26.8	36.0	15.8
Mean G content	17.6	19.3	36.1

ความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ และความแตกต่างทางพันธุกรรมของปูม้าหินสกุล *Thalamita*

ปูม้าหินที่คาดว่าจะจะเป็น *Thalamita danae* และ *T. prymna* (ลักษณะของพื้นผิวของฐานหนวด basal antenna ต่างกัน) ที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสาร ไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม เมื่อสรุปจากผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสามยีน (ตารางที่ 4) โดยยีน Histone H3 แสดงระดับความ

แปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับร้อยละ 1.5 ในขณะที่ยีน COI และ 16S rRNA มีความแปรปรวนเพียงร้อยละ 0.003 และ 0.07 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ความหลากหลายทางพันธุกรรม และข้อมูลสถิติของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง ปูม้า หิน *Thalamita* spp. ที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสาร

	COI	16S	Histone H3
Total number of nucleotides (bp)	527	542	328
Number of sequence	14	8	9
Variable sites	2 (0.003%)	4 (0.07%)	5 (1.5%)
Parsimony informative sites	0	0	1 (0.03%)
Mean T content	28.6	37.4	20.2
Mean C content	17.2	11.2	31.7
Mean A content	34.7	33.7	19.7
Mean G content	19.4	17.7	28.5

ชนิดพันธุ์ *Thalamita* ของหมู่เกาะแสมสารที่วิเคราะห์ ในครั้งนี้ น่าจะเป็นชนิดที่แตกต่างจาก *T. prymna* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 5 และ 6) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI บ่งชี้ว่าสายนิวคลีโอไทด์ของปูจากหมู่เกาะแสมสารแตกต่างจากตัวอย่าง *T. prymna* ที่อยู่ฐานข้อมูลฯ ค่อนข้างมาก (ระดับความเหมือนเท่ากับร้อยละ 89 และมีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.18) แต่จะคล้ายกับ *T. danae* ที่อยู่ในฐานข้อมูลฯ เมื่ออ้างอิงจากยีน 16S rRNA เนื่องจากพบระดับความคล้ายกันถึงร้อยละ 99 อย่างไรก็ตาม ยีน Histone H3 ไม่แสดงข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการระบุชนิดมากนัก เพราะไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างปู *Thalamita* ของแสมสารกับ *T. crenata* และ *T. danae* ได้

ตารางที่ 5 ระดับความเหมือน (% identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูม้าหินสกุล *Thalamita* ที่รวบรวมจากเกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี เมื่อเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ที่ดีเอ็นเอบริเวณ (a) ยีน COI (b) ยีน 16S rRNA และ (c) ยีน Histone H3

(a) ยีน COI

ตัวอย่างปูม้าหินสกุล <i>Thalamita</i>	ข้อมูล GenBank ของยีน COI		
	รายละเอียดข้อมูล	จำนวนเบสที่ เทียบเคียง (และ % Identities)	% Coverage
Thsp01, Thsp02, Thsp04, Thsp08, Thsp12, Thda01F, Thda03, Thda04F, Thda6, Thpr01, Thpr02M และ Thpr04F	<i>Thalamita sima</i> (JX502946.1)	791 (89%)	95%
	<i>T. admete</i> (JQ180240.1)	680 (86%)	94%
	<i>T. prymna</i> (JX398103.1)	641 (89%)	76%
	<i>T. crenata</i> (JX398104.1)	708 (91%)	76%

(b) ยีน 16S rRNA

ตัวอย่างปูม้าหินสกุล <i>Thalamita</i>	ข้อมูล GenBank ของยีน 16S rRNA		
	รายละเอียดข้อมูล	จำนวนเบสที่เทียบเคียง (และ % Identities)	% Coverage
Thpr1 - Thpr 4, Thda 2, Thda3, Thda4, และ Thda 6	<i>T. danae</i> (FJ152165.1)	517 (99)	92
	<i>T. crenata</i> (LK391945.1)	562 (96)	100
	<i>T. sima</i> (FJ152166.1)	521 (92)	92

(c) ยีน Histone H3

ตัวอย่างปูม้าหินสกุล <i>Thalamita</i>	ข้อมูล GenBank ของยีน Histone H3		
	รายละเอียดข้อมูล	จำนวนเบสที่เทียบเคียง (และ % Identities)	% Coverage
Thpr1, Thpr2, Thpr 4, Thda3 – Thda8	<i>T. crenata</i> (FM208800.1)	328 (99)	87
	<i>T. prymna</i> (JX398114.1)	327 (99)	87
	<i>T. sima</i> (JX398122.1)	327 (94)	87

นอกจากนี้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI (ตารางที่ 6) และแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างจากข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีนตำแหน่งเดียวกัน (ภาพที่ 3 และ 4) ยังแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่คาดว่าจะ เป็น 2 ชนิด (*Thalamita danae* และ *T. pryma*) ของหมู่เกาะเสมสาร น่าจะเป็นกลุ่มชนิดพันธุ์เพียงชนิดเดียว เนื่องจากไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ระยะห่างทางพันธุกรรมระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0-0.002 และ 0-0.01 สำหรับยีน COI และ 16S ตามลำดับ) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้จัดกลุ่มให้ตัวอย่าง

ทั้งหมด ให้เป็นกลุ่มเดียวกัน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีน โดยค่าสนับสนุนการจัดกลุ่มมีค่าระหว่างร้อยละ 99 ถึง 100 ของการสุ่มแผนภูมิฯ ทั้งหมด

ตัวอย่างที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสารน่าจะเป็นปูชนิด *Thalamita danae* เพราะเมื่อพิจารณาแผนภูมิฯ ที่สร้างจากยีน 16S rRNA แล้วพบว่า ตัวอย่างทั้งหมดถูกจัดรวมกับสายนิวคลีโอไทด์ของ *T. danae* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งตัวอย่างในกลุ่มนี้แตกต่างจากชนิดอื่นที่อยู่ในสกุลเดียวกัน คือ *T. crenata* และ *T. sima* อย่างชัดเจน

ตารางที่ 6 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างปูม้าหิน *Thalamita* (แนวล่างเส้นทแยงมุม) โดยคำนวณจากจำนวนการแทนที่นิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งเฉลี่ยระหว่างทุกคู่สายนิวคลีโอไทด์ที่ (a) ยีน COI (24 สาย ที่ความยาว 527 คู่เบส) ด้วยโมเดล Tamura-Nei ที่รวมความแปรปรวนของอัตราการเปลี่ยนทางวิวัฒนาการระหว่างตำแหน่ง (G) และ (b) ยีน 16S rRNA (14 สาย ที่ความยาว 517 คู่เบส) ด้วยโมเดล Tamura-3-parameter (T92+I) ที่มีสัดส่วนของสายนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนค่า Standard error แสดงเหนือเส้นทแยงมุม

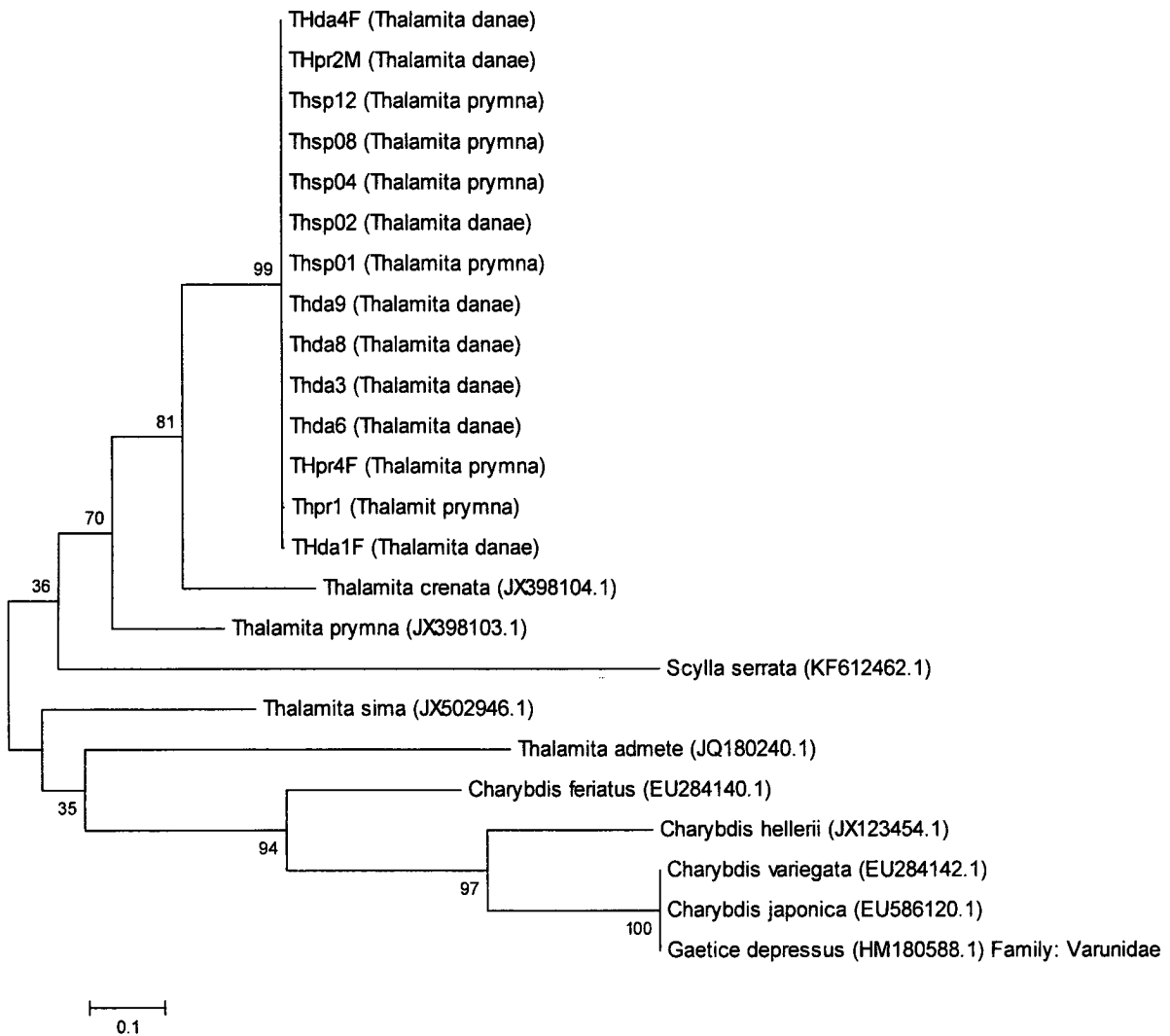
(a) ยีน COI (TN93+G)

Thda3 (<i>Thalamita danae</i>)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
Thda6 (<i>Thalamita danae</i>)	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
Thda8 (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
Thda9 (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
Thpr1 (<i>Thalamit prymna</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
Thsp01 (<i>Thalamita prymna</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
Thsp02 (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
Thsp04 (<i>Thalamita prymna</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
Thsp08 (<i>Thalamita prymna</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
Thsp12 (<i>Thalamita prymna</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
THda1F (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02
THda4F (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
THpr2M (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
THpr4F (<i>Thalamita prymna</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
<i>Thalamita crenata</i> (JX398104.1)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.11	0.10	0.10	0.10		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
<i>Thalamita sima</i> (JX502946.1)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.15		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
<i>Thalamita prymna</i> (JX398103.1)	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	0.14		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
<i>Thalamita admete</i> (JQ180240.1)	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17	0.19	0.19		0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03
<i>Charybdis hellerii</i> (JX123454.1)	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17	0.19	0.23		0.02	0.02	0.02	0.03	0.02
<i>Charybdis variegata</i> (EU284142.1)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.21	0.20	0.20	0.20	0.19	0.17	0.19	0.22	0.11		0.00	0.02	0.03	0.00
<i>Charybdis japonica</i> (EU586120.1)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.21	0.20	0.20	0.20	0.19	0.17	0.19	0.22	0.11	0.00		0.02	0.03	0.00
<i>Charybdis feriatus</i> (EU284140.1)	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.19	0.18	0.18	0.18	0.17	0.14	0.17	0.19	0.16	0.15	0.15		0.03	0.02
<i>Scylla serrata</i> (KF612462.1)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.21	0.19	0.20	0.21	0.22	0.22	0.22		0.03
<i>Gaeteia depressus</i> (HM180588.1) Family: Varunidae	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.21	0.20	0.20	0.20	0.19	0.17	0.19	0.22	0.11	0.00	0.00	0.15	0.22	

ตารางที่ 6 (ต่อ)

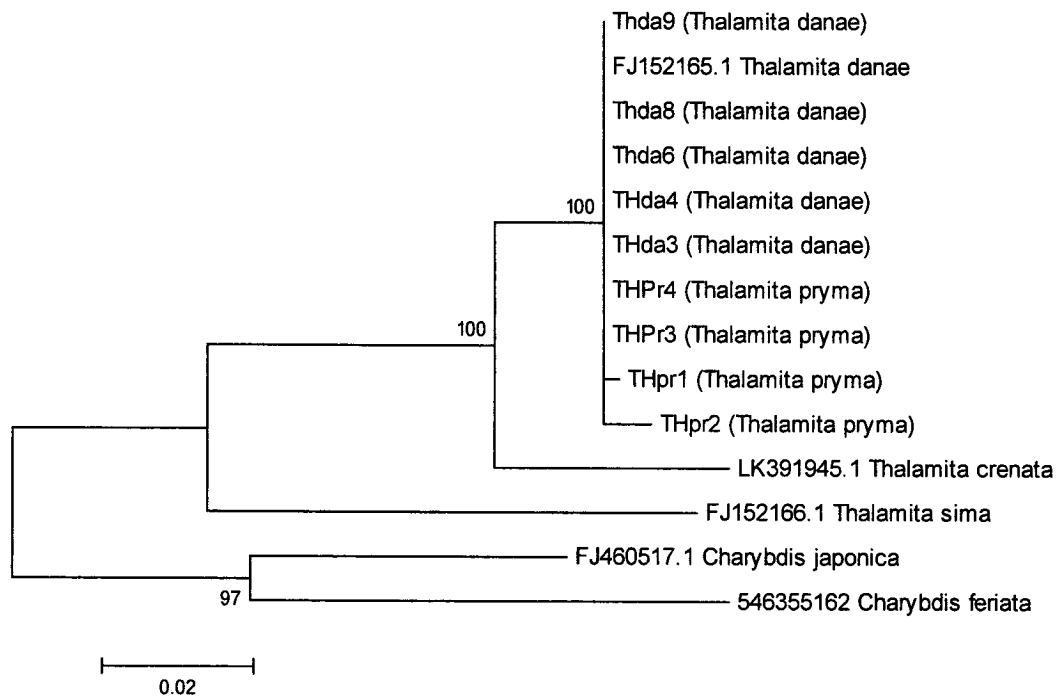
(b) ยีน 16S (T92+I)

THpr1 (<i>Thalamita pryma</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
THpr2 (<i>Thalamita pryma</i>)	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.01
THpr3 (<i>Thalamita pryma</i>)	0.00	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
THpr4 (<i>Thalamita pryma</i>)	0.00	0.01	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
THda3 (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.01	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
THda4 (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
THda6 (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
THda8 (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
THda9 (<i>Thalamita danae</i>)	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
FJ152165.1 <i>Thalamita danae</i>	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.01	0.01	0.02	0.01
LK391945.1 <i>Thalamita crenata</i>	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04		0.01	0.02	0.01
FJ460517.1 <i>Charybdis japonica</i>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.11		0.01	0.02
546355162 <i>Charybdis feriata</i>	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13	0.09		0.02
FJ152166.1 <i>Thalamita sima</i>	0.09	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.12	0.12	



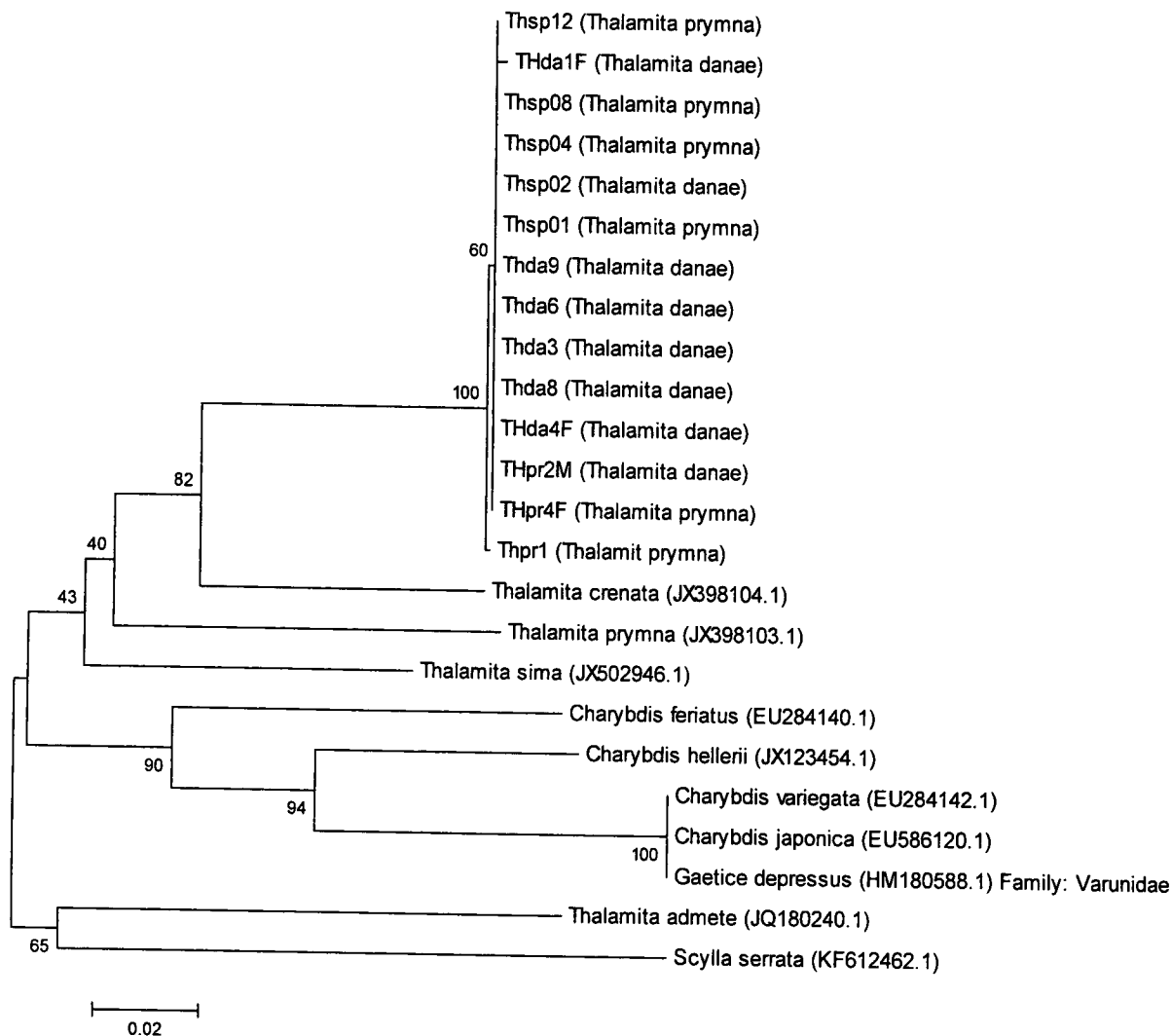
(a) ยีน COI

ภาพที่ 3 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปูม้าหิน *Thalamita* ที่สร้างด้วยใช้วิธีการ Maximum Likelihood จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (a) ยีน COI บนไมโทคอนเดรีย ที่อยู่บนฐานของโมเดล Tamura-Nei (TN93+G) ซึ่งแผนภูมิที่แสดงมีค่า log likelihood มากที่สุด (-2253.0454) ใช้ข้อมูลทั้งสิ้น 527 ตำแหน่งและ (b) ยีน 16S rRNA ที่อยู่บนฐานของโมเดล Tamura-3-parameter (T92+I, Tamura 1992) ซึ่งยอมให้มีการกำหนดบริเวณที่ไม่มีความแปรปรวน ซึ่งแผนภูมิที่แสดงมีค่า log likelihood มากที่สุด (-1281.6149) ใช้ข้อมูลทั้งสิ้น 517 ตำแหน่ง เปอร์เซ็นต์สนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง ความยาวแขนระหว่างกลุ่มอนุกรมวิธานบนแผนภูมิฯ คือจำนวนการแทนที่เบสต่อตำแหน่ง แผนภูมิเริ่มต้นสำหรับการหาแผนภูมิที่ดีที่สุดหาโดยใช้แนวทาง heuristic search และสร้างโดยวิธีการ Neighbor-Join หรือ BIONJ ที่ใช้ข้อมูลระยะทางทางพันธุกรรมของคู่ตัวอย่าง คำนวณโดย Maximum Composit matrix



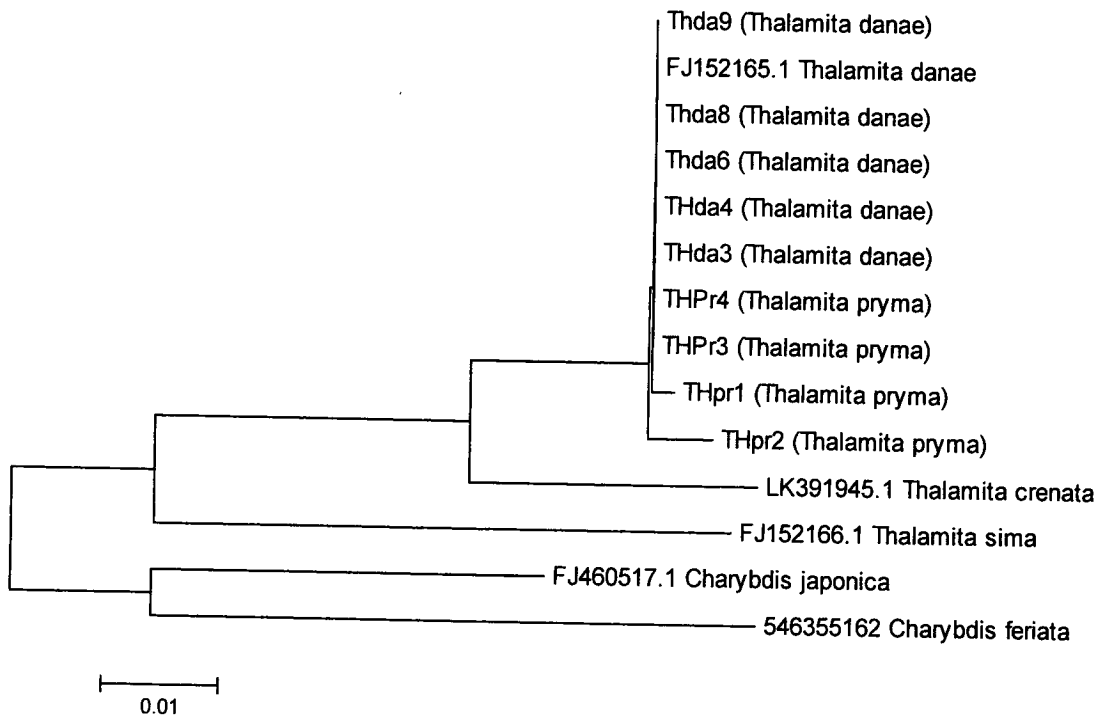
(b) ยีน 16S rRNA

ภาพที่ 3 (ต่อ)



(a) ยีน COI

ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปูม้าหิน *Thalamita* ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ (a) ยีน COI และ (b) ยีน 16S rRNA บนไมโทคอนเดรีย โดยใช้วิธีการ Minimum Evolution โมเดลที่ใช้คือ Tamura-Nei (TN93+G, Tamura and Nei 1993) โดยใช้ข้อมูล จำนวนทั้งสิ้น 527 ตำแหน่ง และ Tamura-3-parameter (T92+I, Tamura 1992) โดยใช้ข้อมูลทั้งสิ้นจำนวน 517 ตำแหน่ง สำหรับยีน COI และ 16S ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์สนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง สร้างแผนภูมิเริ่มต้นโดยวิธี Neighbor-Joining การหาแผนภูมิฯ ใช้วิธี Close-Neighbor-Interchange (CNI) algorithm



(b) ยีน 16S rRNA

ภาพที่ 4 (ต่อ)

ความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ และความแตกต่างทางพันธุกรรมของปูลม

ปูลมที่พบที่หมู่เกาะแสมสารน่าจะประกอบไปด้วยปูลมเพียงชนิดเดียวคือ *Ocypode ceratophthalmus* เมื่อพิจารณาระดับความแปรปรวนของสายนิวคลีโอไทด์ของยีนสามตำแหน่ง โดยยีนที่มีความแปรปรวนสูงสุดคือยีน COI (สัดส่วนตำแหน่งที่มีความแปรปรวนเท่ากับร้อยละ 0.01) และยีนที่มีความแปรปรวนต่ำที่สุดคือยีน Histone H3

ตารางที่ 7 ความหลากหลายทางพันธุกรรม และข้อมูลสถิติของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง ปูลม คือ *Ocypode ceratophthalmus* ที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสาร

	COI	16S	Histone H3
Total number of nucleotides (bp)	623	523	297
Number of sequence	8	6	8
Variable sites	8 (0.01%)	4 (0.007%)	0
Parsimony informative sites	2 (0.003%)	0	0
Mean T content	34.2	35.0	20.1
Mean C content	21.0	10.6	31.0
Mean A content	27.5	34.8	22.1
Mean G content	17.4	19.6	26.9

ชนิดพันธุ์ปลมของหมู่เกาะแสมสารที่วิเคราะห์ในครั้งนี้ น่าจะตรงกับ *Ocypode ceratophthalmus* เนื่องจากมีระดับความคล้ายกับนิวคลีโอไทด์ของ *Ocypode ceratophthalmus* ในฐานข้อมูล GenBank ถึงร้อยละ 98-99 (ตารางที่ 8) ยีน COI และ 16S rRNA มีความสามารถในการบ่งชี้ความแตกต่างของสปีชีส์ในสกุลเดียวกันได้กว่า Histone H3 โดยต่างสปีชีส์ในสกุลเดียวกันมีระดับความคล้ายกันของนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 87-92 สำหรับยีน COI และ 16S rRNA ในขณะที่ยีน Histone H3 แสดงระดับความคล้ายกันที่ร้อยละ 97-98

ตารางที่ 8 ระดับความเหมือน (% identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลมตาวาว *Ocypode ceratophthalmus* ที่รวบรวมจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี เมื่อเทียบกับสายนิวคลีโอไทด์ที่ยีนตำแหน่งเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ที่ตีเอนเอบริเวณ (a) ยีน COI (b) ยีน 16S rRNA และ (c) ยีน Histone H3

(a) ยีน COI

ตัวอย่างปลม	ข้อมูล GenBank ของยีน COI		
	รายละเอียดข้อมูล	จำนวนเบสที่เทียบเคียง (และ % Identities)	% Coverage
Occe1 – Occe8	<i>Ocypode ceratophthalmus</i> (LN611669.1)	682 (99)	100%
	<i>O. platytarsis</i> (KF633174.1)	638 (92)	93%
	<i>O. stimpsoni</i> (JX502934.1)	657 (89)	96%
	<i>O. mortoni</i> (AB751388.1)	635 (89)	92%
	<i>O. sinensis</i> (AB751392.1)	637 (87)	92%
	<i>Hemigrapsus penicillatus</i> (HM180611.1)	682 (85)	99%

(b) ยีน 16S rRNA

ตัวอย่างปลม	ข้อมูล GenBank ของยีน 16S rRNA		
	รายละเอียดข้อมูล	จำนวนเบสที่เทียบเคียง (และ % Identities)	% Coverage
Occe1, Occe2, Occe4, Occe5, Occe7, Occe8	<i>Ocypode ceratophthalmus</i> (LN611669.1)	552 (99)	100
	<i>O. ryderii</i> (AM180689.1)	537 (89)	96
	<i>O. quadrata</i> (FN539018.1)	522(89)	94
	<i>Ucides cordatus</i> (FN539019.1)	543 (83)	96
	<i>Uca rapax</i> (AB813665.1)	541 (84)	96

ตารางที่ 8 (ต่อ)

(c) ยีน Histone H3

ตัวอย่างปูลม	ข้อมูล GenBank ของยีน Histone H3		
	รายละเอียดข้อมูล	จำนวนเบสที่เทียบเคียง (และ % Identities)	% Coverage
Occe1 – Occe8	<i>Ocypode quadrata</i> (FN434069.1)	328 (98)	88
	<i>Ocypode ceratophthalmus</i> (KJ133152.1)	294 (99)	79
	<i>Ocypode sinensis</i> (KJ133153.1)	294 (97)	79
	<i>Ucides cordatus</i> (FN434070.1)	327 (94)	88

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ 16S rRNA (ตารางที่ 9) และแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างจากข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีนตำแหน่งเดียวกัน (ภาพที่ 5 และ 6) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างปูลมจากหมีเกาะแสมสารประกอบไปด้วยปูเพียง 1 ชนิดคือ *Ocypode ceratophthalmus* เนื่องจากไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างจากแสมสารด้วยกันเอง และระหว่างตัวอย่างจากแสมสารกับสายนิวคลีโอไทด์ของ *O. ceratophthalmus* ในฐานข้อมูล GenBank (ระยะห่างทางพันธุกรรมระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0-0.01 และ 0-0.004 สำหรับยีน COI และ 16S ตามลำดับ) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้จัดกลุ่มให้ตัวอย่างทั้งหมด ให้เป็นกลุ่มเดียวกัน และเป็นกลุ่มเดียวกับตัวอย่าง *O. ceratophthalmus* จากฐานข้อมูล GenBank เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีน โดยค่าสนับสนุนการจัดกลุ่มมีค่าระหว่างร้อยละ 96 ถึง 100 ของการสุ่มแผนภูมิฯ ทั้งหมด

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนทั้งสองตำแหน่งแสดงการจัดหมวดหมู่ของปูลมในสกุล *Ocypode* ในลักษณะ monophyletic โดยจัดกลุ่มปูลมจีนนี้ไว้ในหมวดหมู่เดียวกัน ซึ่งต่างจากปูลมอื่นที่อยู่ในแฟมิลีเดียวกัน

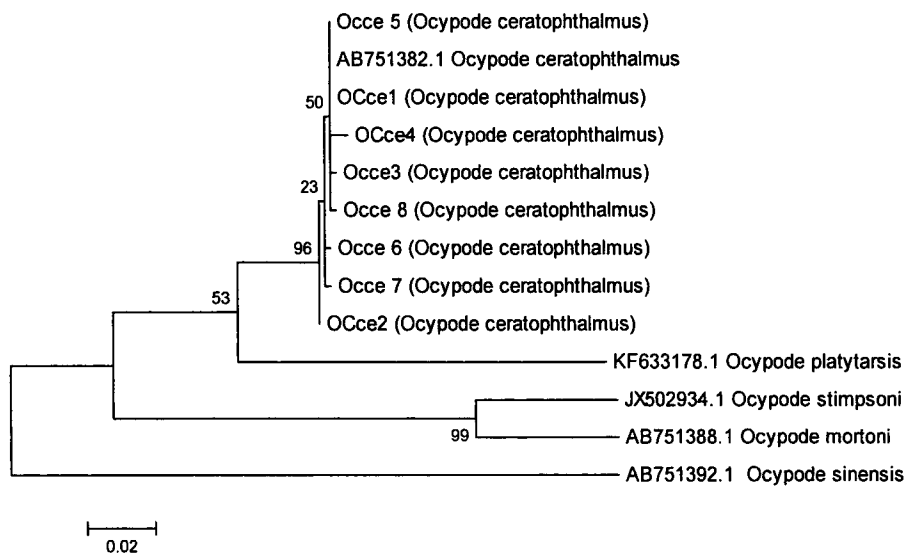
ตารางที่ 9 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างปลุม (แนวล่างเส้นทแยงมุม) โดยคำนวณจากจำนวนการแทนที่นิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง เฉลี่ยระหว่างคู่สายนิวคลีโอไทด์ที่ (a) ยีน COI (13 สาย ที่ความยาว 527 คู่เบส) ด้วยโมเดล Tamura-Nei ที่รวมความแปรปรวนของอัตราการเปลี่ยนทางวิวัฒนาการระหว่างตำแหน่ง (G) และ (b) ยีน 16S rRNA (11 สาย ที่ความยาว 508 คู่เบส) ด้วยโมเดล Maximum Composit likelihood ที่มีสัดส่วนของสายนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนค่า Standard error แสดงเหนือเส้นทแยงมุม

(a) ยีน COI (TN93+G)

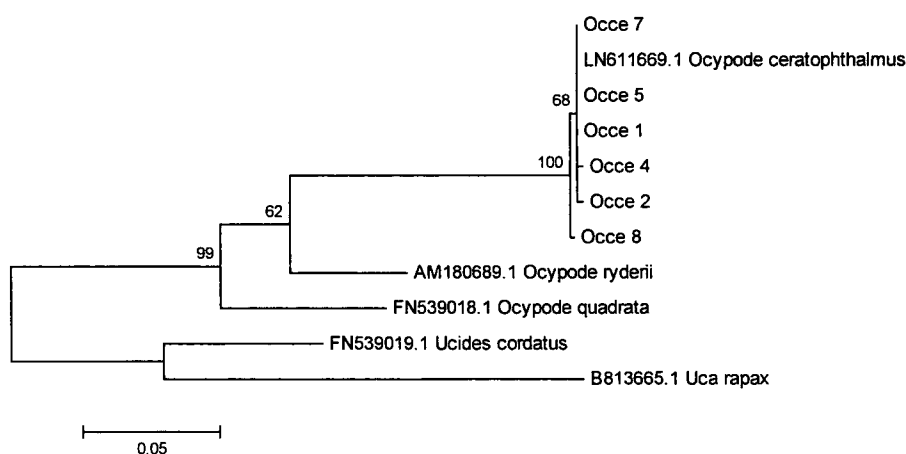
Occe1 (<i>Ocypode ceratophthalmus</i>)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02
Occe2 (<i>Ocypode ceratophthalmus</i>)	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02
Occe3 (<i>Ocypode ceratophthalmus</i>)	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02
Occe4 (<i>Ocypode ceratophthalmus</i>)	0.00	0.01	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02
Occe5 (<i>Ocypode ceratophthalmus</i>)	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02
Occe6 (<i>Ocypode ceratophthalmus</i>)	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00		0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02
Occe7 (<i>Ocypode ceratophthalmus</i>)	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00		0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02
Occe8 (<i>Ocypode ceratophthalmus</i>)	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00		0.00	0.01	0.02	0.02	0.02
AB751382.1 <i>Ocypode ceratophthalmus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.01	0.02	0.02	0.02
KF633178.1 <i>Ocypode platytarsis</i>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09		0.02	0.02	0.02
JX502934.1 <i>Ocypode stimpsoni</i>	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12	0.13	0.13	0.12	0.12	0.15		0.01	0.02
AB751388.1 <i>Ocypode mortoni</i>	0.13	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.13	0.13	0.15	0.07		0.02
AB751392.1 <i>Ocypode sinensis</i>	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.19	0.19	0.16	

(b) ยีน 16S rRNA (Maximum Compoit Likelihood+I)

Occe 1		0.002	0.002	0.000	0.000	0.003	0.067	0.096	0.000	0.236	0.555
Occe 2	0.002		0.003	0.002	0.002	0.004	0.070	0.100	0.002	0.231	0.551
Occe 4	0.002	0.004		0.002	0.002	0.004	0.067	0.096	0.002	0.235	0.554
Occe 5	0.000	0.002	0.002		0.000	0.003	0.067	0.096	0.000	0.236	0.555
Occe 7	0.000	0.002	0.002	0.000		0.003	0.067	0.096	0.000	0.236	0.555
Occe 8	0.004	0.006	0.006	0.004	0.004		0.067	0.096	0.003	0.237	0.555
AM180689.1 Ocypode ryderii	0.112	0.114	0.115	0.112	0.112	0.112		0.050	0.067	0.185	0.509
FN539018.1 Ocypode quadrata	0.132	0.134	0.135	0.132	0.132	0.132	0.098		0.096	0.188	0.423
LN611669.1 Ocypode ceratophthalmus	0.000	0.002	0.002	0.000	0.000	0.004	0.112	0.132		0.236	0.555
FN539019.1 Ucides cordatus	0.168	0.165	0.171	0.168	0.168	0.168	0.157	0.146	0.168		0.093
B813665.1 Uca rapax	0.196	0.193	0.199	0.196	0.196	0.196	0.195	0.174	0.196	0.120	



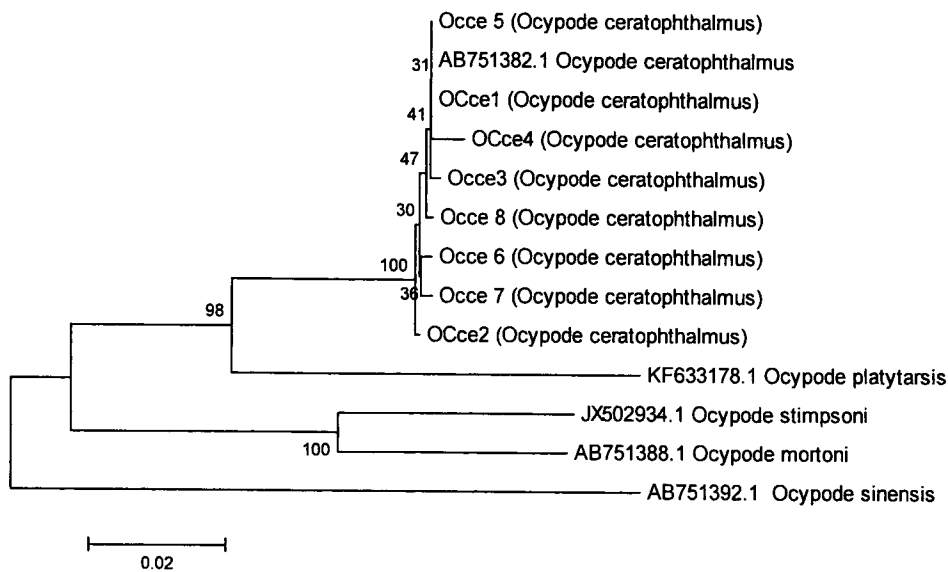
(a) ยีน COI (TN93+G)



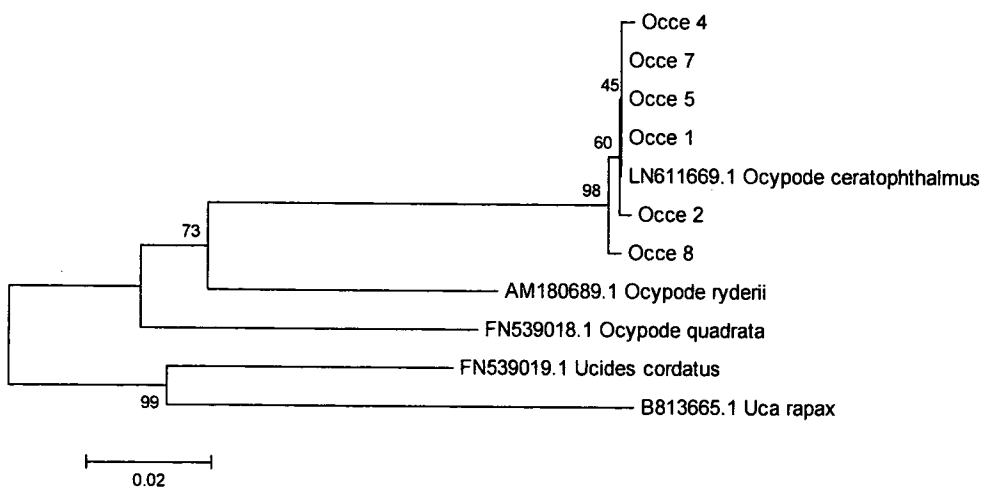
(b) 16S rRNA (HKY+I)

ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปูลม ที่สร้างด้วยใช้วิธีการ Maximum likelihood จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ (a) ยีน COI บนไมโทคอนเดรีย ที่อยู่บนฐานของโมเดล Tamura-Nei (TN93+G) ซึ่งแผนภูมิที่แสดงมีค่า log likelihood มากที่สุด (-1749.9872) ใช้ข้อมูลทั้งสิ้น 623 ตำแหน่งและ (b) ยีน 16S rRNA ที่อยู่บนฐานของโมเดล Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+I, Hasegawa et al. 1985) ซึ่งยอมให้มีการกำหนดบริเวณที่ไม่มีมีความแปรปรวน ซึ่งแผนภูมิที่แสดงมีค่า log likelihood มากที่สุด (-1405.1147) ใช้ข้อมูลทั้งสิ้น 508 ตำแหน่ง

เปอร์เซ็นต์สนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง ความยาวแขนระหว่างกลุ่มอนุกรมวิธานบนแผนภูมิฯ คือจำนวนการแทนที่เบสต่อตำแหน่ง แผนภูมิเริ่มต้นสำหรับการหาแผนภูมิที่ดีที่สุดหาโดยใช้แนวทาง heuristic search และสร้างโดยวิธีการ Neighbor-Join หรือ BIONJ ที่ใช้ข้อมูลระยะทางทางพันธุกรรมของคู่ตัวอย่าง คำนวณโดย Maximum Composite matrix



(a) COI (TN93+G)



(b) 16S rRNA (Maximum composite likelihood+G)

ภาพที่ 6 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปูลม ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ (a) ยีน COI และ (b) ยีน 16S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Minimum Evolution (Rzhetsky and Nei 1992) โมเดลที่ใช้คือ Tamura-Nei (TN93+G, Timura and Nei 1993) โดยใช้ข้อมูล จำนวน ทั้งสิ้น 623 ตำแหน่ง สำหรับยีน COI และ โมเดล Maximum composite likelihood โดยใช้ข้อมูลทั้งสิ้น จำนวน 508 ตำแหน่ง สำหรับ 16S เปอร์เซ็นสนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง สร้างแผนภูมิเริ่มต้นโดยวิธี Neighbor-Joining การหาแผนภูมิฯ ใช้วิธี Close-Neighbor-Interchange (CNI) algorithm

ความแปรปรวนของของลำดับนิวคลีโอไทด์ และความแตกต่างทางพันธุกรรมของกุ้งติดชั้นที่พบในจังหวัดชลบุรี

ยีน 16S rRNA มีความแปรปรวนเพียงพอที่จะบ่งชี้สปีชีส์ ภายในจีโนมของกุ้งติดชั้นสกุล *Alpheus* ที่พบในจังหวัดชลบุรี ได้ โดยมีสัดส่วนตำแหน่งที่มีความแปรปรวนเท่ากับร้อยละ 17 องค์ประกอบของสายนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งนี้ของกุ้งติดชั้น มีค่าใกล้เคียงกันกับกุ้งและปูชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 3, 4 และ 7) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่บริเวณใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 10 ความหลากหลายทางพันธุกรรม และข้อมูลสถิติของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของตัวอย่างกุ้งติดชั้นสกุล *Alpheus* ที่รวบรวมจากจังหวัดชลบุรี

	ยีน 16S
Total number of nucleotides (bp)	11
Number of sequence	516
Variable sites	90 (17%)
Parsimony informative sites	88 (17%)
Mean T content	31.8
Mean C content	13.0
Mean A content	29.9
Mean G content	25.3

ชนิดพันธุ์ของกุ้งติดชั้น *Alpheus* ที่พบในจังหวัดชลบุรี ค่อนข้างจะแตกต่างจากชนิดพันธุ์อื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 11) โดยระดับความเหมือน (% identity) ที่ยีน 16S rRNA ที่มากที่สุดคือร้อยละ 88-91 ซึ่งเป็นระดับที่แสดงความแตกต่างระดับสปีชีส์ ระดับความคล้ายที่ปรากฏยังยืนยันว่าการศึกษานี้ได้เพิ่มยีน 16S rRNA

ตารางที่ 11 ระดับความเหมือน (% identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของกุ้งติดชั้น *Alpheus spp.* ที่รวบรวมจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี เมื่อเทียบกับสายนิวคลีโอไทด์ที่ยีนตำแหน่งเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

ตัวอย่างกุ้งติดชั้น	ข้อมูล GenBank ของยีน 16S rRNA		
	รายละเอียดข้อมูล	จำนวนเบสที่เทียบเคียง (และ % Identity)	% Coverage
<i>Alpheus rapacida</i> (Alra 1-Alra4)	<i>Alpheus distinguendus</i> (GQ892049.1)	510 (91)	100
	<i>Alpheus cf. armillatus</i> (FJ528445.1)	510 (89)	99

	<i>A. scopulus</i> (FJ528446.1X)	510 (88)	99
	<i>A. buckupi</i> (JX286604.1)	520 (87)	100
	<i>A. petronioi</i> (KF667545.1)	511 (86)	99
	<i>A. pontederiae</i> (KC525923.1)	511 (85)	99
	<i>A. chacei</i> (JX286606.1)	511 (85)	99
	<i>A. estuariensis</i> (JX286607.1)	516 (84)	99
	<i>A. angulosus</i> (AF501637.1)	516 (84)	99
<i>A. serenei</i> (Alse1-Alse4)	<i>Alpheus pontederiae</i> (KC525923.1)	512 (88)	100
	<i>A. microrhynchus</i> (JX286612.1)	518 (88)	100
	<i>Alpheus</i> aff. <i>euphrosyne</i> (JX286609.1)	516 (88)	100
	<i>A. petronioi</i> (KF667545.1)	513 (88)	99
	<i>A. heterochaelis</i> (JX286610.1)	513 (88)	99
	<i>A. chacei</i> (JX286606.1)	512 (88)	99
	<i>A. estuariensis</i> (JX286607.1)	512 (86)	99
	<i>A. buckupi</i> (JX286603.1)	518 (86)	100
	<i>A. lobidens</i> (JX286611.1)	520 (85)	99
<i>Alpheus</i> sp.	<i>Alpheus distinguendus</i> (GQ892049.1)	512 (91)	100
	<i>Alpheus scopulus</i> (FJ528446.1)	510 (88)	99
	<i>A. buckupi</i> (JX286604.1)	519 (87)	100
	<i>A. hyeyoungae</i> (FJ528479.1)	513 (86)	99
	<i>A. armillatus</i> (FJ528468.1)	511 (86)	100
	<i>A. petronioi</i> (KF667544.1)	509 (85)	99
	<i>A. heterochaelis</i> (JX286610.1)	513 (85)	100
	<i>A. estuariensis</i> (JX286607.1)	513 (85)	99

ระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่าง (ตารางที่ 12) แสดงค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของกุ้งชนิดเดียวกันมีค่าเท่ากับ 0 ในขณะที่ความต่างระหว่างสปีชีส์ในสกุล *Alpheus* (ไม่รวม *Alpheus* sp.) มีค่าระหว่าง 0.09 (*A. rapacida* กับ *A. distinguendus*) ถึง 0.245 (*A. rapacida* กับ *Alpheus* aff. *euphrosyne*)

Alpheus sp. น่าจะเป็นชนิดพันธุ์ที่แตกต่างจากสปีชีส์อื่นๆ ที่พบในชลบุรี (ตารางที่ 12) แม้ว่ากุ้งชนิดนี้จะมีลักษณะสัณฐานค่อนข้างใกล้เคียงกับ *Alpheus rapacida* ซึ่งจะมีจุดต่างคือ ขนาดของจุดสีน้ำตาลบนปล้องที่สี่ของลำตัวซึ่งจุดของ *A. rapacida* จะใหญ่กว่าของ *Alpheus* sp. โดยระดับความแตกต่างของสายนิวคลีโอไทด์ *Alpheus* sp. กับ *A. rapacida* มีค่าเท่ากับ 0.03 ถึง 0.04 (ร้อยละ 3 ถึง 4) และแตกต่างจาก *A. serenie* ถึง 0.20 (ร้อยละ 20)

นอกจากนี้ แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่สร้างจากทั้งแบบ Maximum Likelihood (ภาพที่ 7) และ Minimum Evolution (ภาพที่ 8) ยังแสดงให้เห็นว่า *Alpheus* sp. มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมใกล้กับ *A. rapacida* มากกว่า *A. serenie* (ค่า bootstrap = 100%)

การจัดกลุ่มด้วยวิธีที่แตกต่างกัน (Maximum Likelihood และ Minimum Evolution) ให้ผลคล้ายกันโดยมีการแบ่งกลุ่มกึ่งตติชน สกุล *Alpheus* ได้ 2-3 กลุ่ม (ภาพที่ 7 และ 8) โดยตัวอย่างที่สปีชีส์เดียวกันจะเกาะกลุ่มเดียวกัน (ค่า bootstrap = 99-100%) อย่างไรก็ตามตำแหน่งของการจัดกลุ่มของบางชนิด (โดยเฉพาะกลุ่มของ *Alpheus* sp. กับ *A. rapacida*) ผันแปรตามวิธีการสร้างแผนภูมิ

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่สร้างจากโดยใช้วิธี Maximum Likelihood สามารถจัดกลุ่มในสกุล *Alpheus* ได้ 2 กลุ่มใหญ่คือ

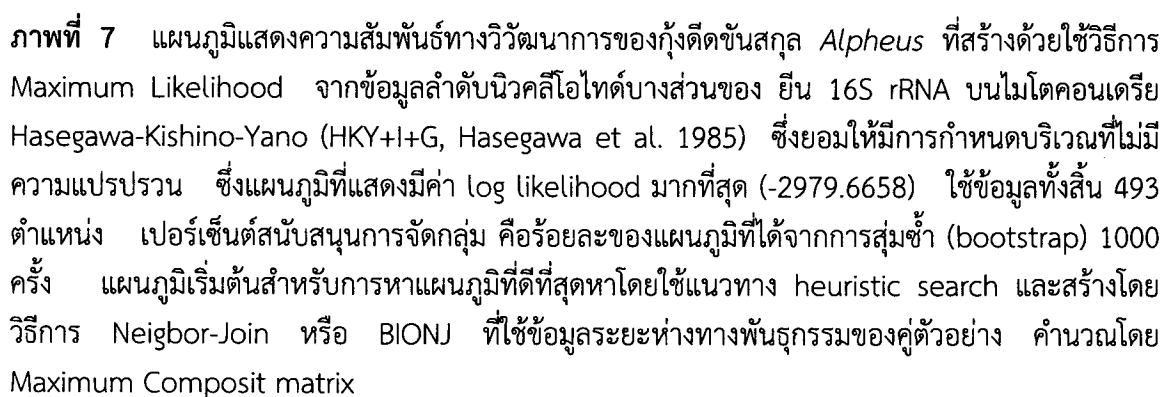
กลุ่มที่ (1) ประกอบด้วยกึ่งตติชนจากชลบุรีทั้งสามชนิด *A. serenie*, *A. rapacida* และ *Alpheus* sp. อยู่กลุ่มร่วมกับกึ่งตติชนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank คือ *A. microrhynchus*, *A. aff. euphrosyne*, *A. lobidens* และ *A. distingendus* ทั้งนี้ *Alpheus* sp. มีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกับ *A. rapacida* และ *A. distingendus* มากกว่ากึ่งตติชนอื่นๆ ในกลุ่ม

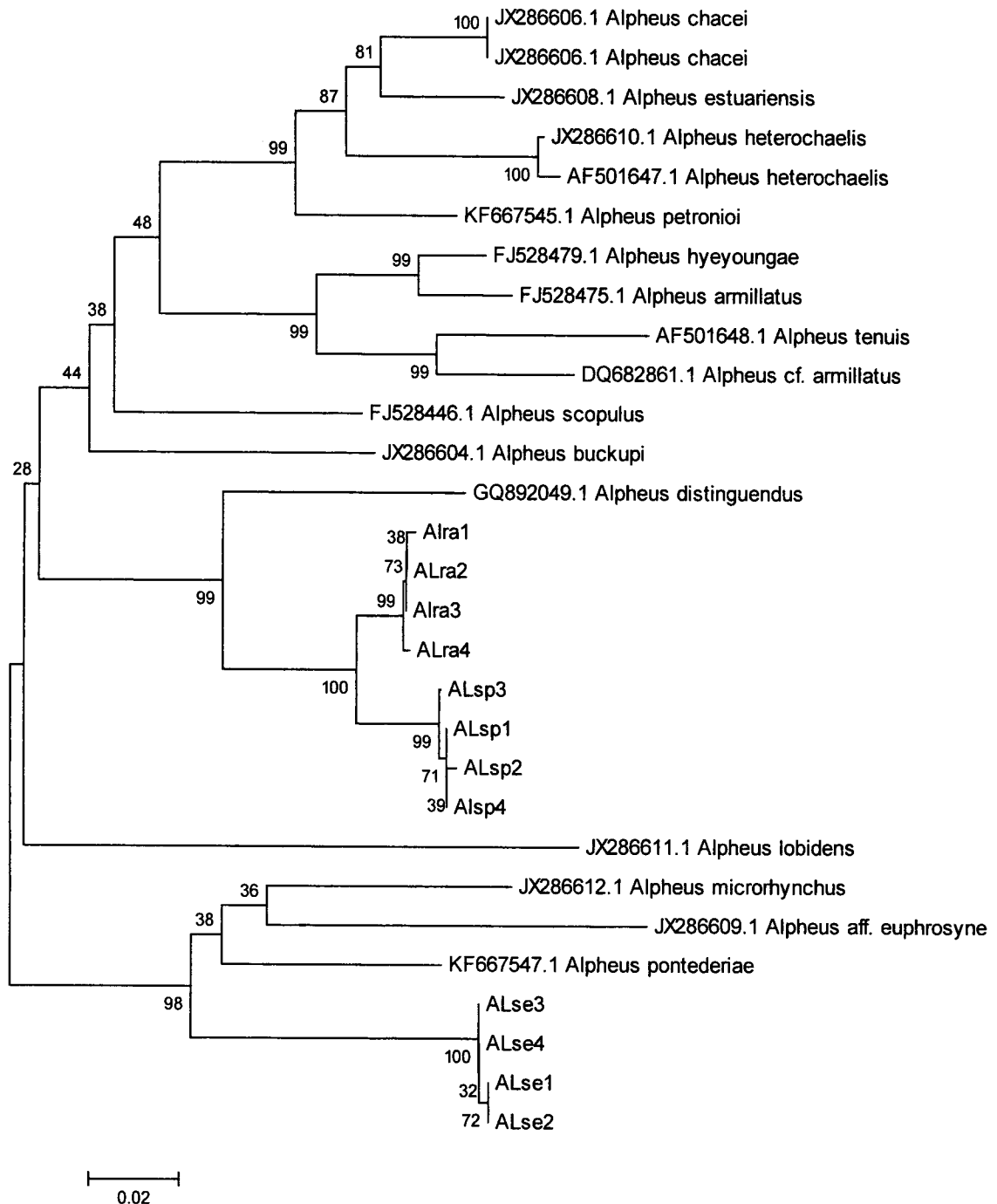
กลุ่มที่ (2) ประกอบด้วย *Alpheus chacei*, *A. estuariensis*, *A. heterochaelis*, และ *A. petronioi* (Bootstrap ของกลุ่มมีค่า 99 %) ร่วมกับ *Alpheus* cf. *armillatus*, *A. tenuis*, *A. amillatus*, *A. hyeyoungae*, *Alpheus scopulus* และ *A. bukupi* ค่า bootstrap ที่ไม่สูงมากนักในกลุ่มนี้ (โดยเฉพาะ *A. scopulus* และ *A. bukupi*) น่าจะสะท้อนความคล้ายกันภายในกลุ่ม

ในขณะที่ แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่สร้างด้วยวิธี Minimum Evolution สามารถจัดกลุ่มในสกุล *Alpheus* ได้ 2 กลุ่มใหญ่เช่นกัน แต่ว่ากลุ่ม *Alpheus* sp., *A. rapacida* และ *A. distingendus* กลับคล้ายกับกลุ่มที่ 2 มากกว่ากลุ่มที่ 1 แต่ค่า bootstrap มีค่าต่ำมาก (28) ซึ่งแสดงถึงความไม่เสถียรของการจัดกลุ่มแบบนี้

ตารางที่ 12 ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างกุ้งติดชั้น *Alpheus* (แนวล่างเส้นทแยงมุม) โดยคำนวณจากจำนวนการแทนที่นิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง เฉลี่ยระหว่างทุกคู่สาย นิวคลีโอไทด์ที่ ยีน 16S rRNA (29 สาย ที่ความยาว 493 คู่เบส) ด้วยโมเดล Maximum Composit likelihood ที่มีสัดส่วนของสายนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนค่า Standard error แสดงเหนือเส้นทแยงมุม

Alra1 (<i>Alpheus rapacida</i>)		0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
ALra2 (<i>Alpheus rapacida</i>)	0.00		0.00	0.00	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
Alra3 (<i>Alpheus rapacida</i>)	0.00	0.00		0.00	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
ALra4 (<i>Alpheus rapacida</i>)	0.00	0.00	0.00		0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
ALse1 (<i>Alpheus serenie</i>)	0.20	0.20	0.20	0.20		0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05
ALse2 (<i>Alpheus serenie</i>)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.00		0.00	0.00	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05
ALse3 (<i>Alpheus serenie</i>)	0.20	0.19	0.19	0.19	0.00	0.00		0.00	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04
ALse4 (<i>Alpheus serenie</i>)	0.20	0.19	0.19	0.19	0.00	0.00	0.00		0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04
ALsp1 (<i>Alpheus</i> sp.)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.20	0.20	0.20	0.20		0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04
ALsp2 (<i>Alpheus</i> sp.)	0.04	0.03	0.03	0.03	0.20	0.20	0.20	0.20	0.00		0.00	0.00	0.02	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
ALsp3 (<i>Alpheus</i> sp.)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.20	0.20	0.20	0.20	0.00	0.00		0.00	0.02	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
ALsp4 (<i>Alpheus</i> sp.)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.20	0.20	0.20	0.20	0.00	0.00	0.00		0.02	0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04
GQ892049.1 <i>Alpheus distinguendus</i>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.21	0.21	0.21	0.21	0.10	0.11	0.11	0.10		0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04
JX286604.1 <i>Alpheus buckupi</i>	0.16	0.16	0.16	0.16	0.18	0.18	0.18	0.18	0.16	0.16	0.16	0.16	0.18		0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
JX286606.1 <i>Alpheus chacei</i>	0.20	0.19	0.19	0.20	0.19	0.19	0.19	0.19	0.20	0.19	0.19	0.19	0.17	0.14		0.02	0.04	0.03	0.04	0.02	0.00	0.02	0.01	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03
KF667545.1 <i>Alpheus petronioi</i>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.19	0.19	0.18	0.17	0.16	0.08		0.03	0.03	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03
KF667547.1 <i>Alpheus pontederiae</i>	0.18	0.18	0.18	0.18	0.13	0.13	0.13	0.13	0.19	0.19	0.19	0.19	0.18	0.20	0.19	0.18		0.03	0.02	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05
JX286612.1 <i>Alpheus microrhynchus</i>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.15	0.15	0.15	0.15	0.21	0.21	0.21	0.21	0.19	0.19	0.17	0.17	0.13		0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04
JX286609.1 <i>Alpheus</i> aff. <i>euphrosyne</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.14	0.14	0.14	0.14	0.26	0.26	0.26	0.26	0.24	0.21	0.21	0.21	0.13	0.14		0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05
JX286610.1 <i>Alpheus heterochaelis</i>	0.22	0.21	0.21	0.21	0.18	0.18	0.18	0.18	0.21	0.22	0.22	0.21	0.19	0.15	0.07	0.09	0.18	0.20	0.21		0.02	0.00	0.02	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04
JX286606.1 <i>Alpheus chacei</i>	0.20	0.19	0.19	0.20	0.19	0.19	0.19	0.19	0.20	0.19	0.19	0.19	0.17	0.14	0.00	0.08	0.19	0.17	0.21	0.07		0.02	0.01	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03
AF501647.1 <i>Alpheus heterochaelis</i>	0.22	0.22	0.22	0.22	0.18	0.18	0.18	0.18	0.22	0.22	0.22	0.22	0.20	0.15	0.08	0.10	0.18	0.20	0.20	0.01	0.08		0.02	0.03	0.03	0.05	0.03	0.04
JX286608.1 <i>Alpheus estuariensis</i>	0.18	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19	0.16	0.05	0.08	0.19	0.19	0.19	0.08	0.05	0.08		0.03	0.03	0.04	0.03	0.03
FJ528446.1 <i>Alpheus scopulus</i>	0.15	0.15	0.15	0.15	0.18	0.18	0.18	0.18	0.15	0.15	0.15	0.15	0.17	0.13	0.12	0.15	0.19	0.20	0.25	0.14	0.12	0.15	0.14		0.03	0.05	0.02	0.03
FJ528479.1 <i>Alpheus hyeyoungae</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23	0.18	0.18	0.18	0.18	0.19	0.15	0.14	0.15	0.20	0.22	0.22	0.13	0.14	0.13	0.14	0.14		0.04	0.01	0.03
JX286611.1 <i>Alpheus lobidens</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.23	0.23	0.24	0.24	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.19	0.22	0.22	0.24	0.23	0.22	0.23	0.22	0.24	0.22	0.23	0.23		0.05	0.05
FJ528475.1 <i>Alpheus armillatus</i>	0.19	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.23	0.23	0.18	0.18	0.18	0.18	0.20	0.15	0.15	0.16	0.21	0.23	0.24	0.15	0.15	0.16	0.15	0.13	0.04	0.24		0.02
AF501648.1 <i>Alpheus tenuis</i>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.22	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.17	0.18	0.19	0.25	0.25	0.24	0.19	0.18	0.19	0.17	0.17	0.13	0.26	0.11	
DQ682861.1 <i>Alpheus</i> cf. <i>armillatus</i>	0.21	0.21	0.21	0.21	0.25	0.25	0.25	0.25	0.22	0.22	0.22	0.22	0.20	0.14	0.16	0.16	0.22	0.21	0.24	0.17	0.16	0.17	0.17	0.16	0.09	0.23	0.09	0.08





ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกุ้งดีดขันสกุล *Alpheus* ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA บนไมโทคอนเดรีย ด้วยใช้วิธีการ Minimum Evolution โมเดลที่ใช้คือ Maximum Composite likelihood โดยใช้ข้อมูล 493 ตำแหน่ง ค่าสนับสนุนการจัดกลุ่ม คือร้อยละของแผนภูมิที่ได้จากการสุ่มซ้ำ (bootstrap) 1000 ครั้ง สร้างแผนภูมิเริ่มต้นโดยวิธี Neighbor-Joining การหาแผนภูมิฯ ใช้วิธี Close-Neighbor-Interchange (CNI) algorithm

อภิปรายผลการศึกษา

เครื่องหมายพันธุกรรมที่เลือกใช้ในการศึกษานี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณบางส่วนของยีน COI และ 16S rRNA บนไมโทคอนเดรีย มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้ความแตกต่างระดับชนิดได้ดี และสามารถนำมาใช้ในการตอบโจทย์ทางอนุกรมวิธานที่ค่อนข้างหลากหลาย ความยาวของซีเอ็นดีเอ็นเอ COI และ 16S rRNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ในการศึกษาในครั้งนี้ (ประมาณ 500-620 คู่เบส) เมื่อมีการตัดสายนิวคลีโอไทด์ให้เท่ากับสายที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank) เพียงพอต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับดีเอ็นเอตำแหน่งเดียวกันที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ในขณะที่ยีน Histone H3 ที่ใช้มีขนาดค่อนข้างสั้น (ประมาณ 297-328 คู่เบส) จึงทำให้ไม่สามารถอธิบายความแปรปรวนระดับสปีชีส์ได้ดีเท่าที่ควร

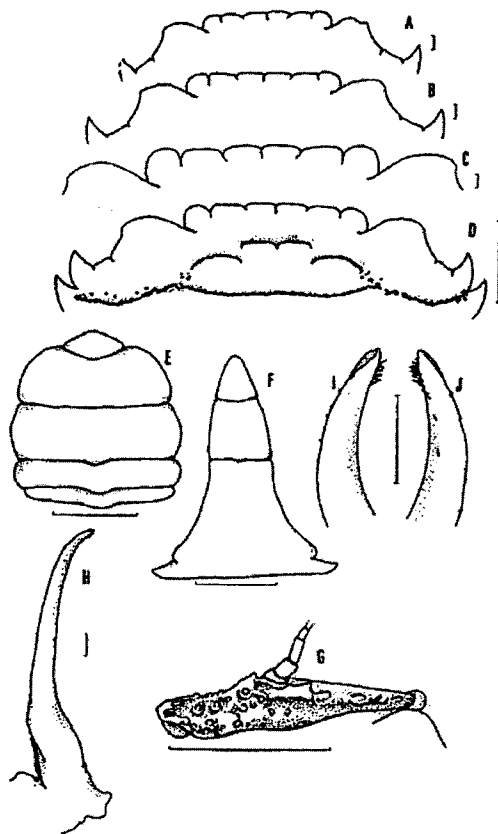
ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปูม้าหิน

ปูม้าหิน *Thalamita prymna* และ *T. danae* ที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในพื้นที่แถบชายฝั่งทั้งในอ่าวไทย อันดามัน และมหาสมุทรอินเดีย (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2532) นั้น ยังมีปัญหาด้านอนุกรมวิธานที่อาศัยหลักฐานอยู่มาก เนื่องจากเกณฑ์ในการแยกความแตกต่างจากลักษณะฐานที่กำหนดไว้ใน Wee and Ng (1995) ค่อนข้างมีความคลุมเครือ และบางลักษณะจะพบเฉพาะในเพศผู้เท่านั้น (เช่น ลักษณะปลายของ Gonopod, ตารางที่ 12) นอกจากนี้ฐานที่ปรากฏอาจมีความแปรปรวนอันเนื่องมาจากต่างสถานที่เก็บตัวอย่างและวิธีการศึกษาของ Wee and Ng (1995) โดย Wee and Ng (1995) เก็บตัวอย่างจากประเทศมาเลเซียและสิงคโปร์เท่านั้น และไม่ได้ใช้การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอร่วมด้วยในการยืนยัน สปีชีส์

ตารางที่ 12 รูปร่างลักษณะภายนอกที่ต่างกันระหว่างปูม้าหิน *T. prymna* และ *T. danae* (อิงอร เสงพัฒนาพงศ์, 2556)

ลักษณะภายนอก	<i>Thalamita prymna</i> (ภาพที่ 9)	<i>Thalamita danae</i> (ภาพที่ 10)
1. Basal antennal segment (ส่วนฐานหนวด)	ส่วนของฐานหนวดมีลักษณะเป็นหนามที่แหลมหลายอัน (เป็นลักษณะร่วมกับ <i>Thalamita carasma</i>) ส่วนของฐานหนวดมีหนาม 2 อันเชื่อมติดกัน	ส่วนของฐานหนวดมีลักษณะเรียบหรือเป็นสันแนวขรุขระ
2. Submedian lobe (ส่วนของ Frontal border)	-	ความกว้างของ Submedian lobe ไม่แตกต่างจากความกว้างของ Median lobe อย่างชัดเจน
3. Frontal lobe	Frontal lobe ชิดกันมาก	-
4. Lateral lobe	Lateral lobe ห่างไม่มากจาก Submedian	-

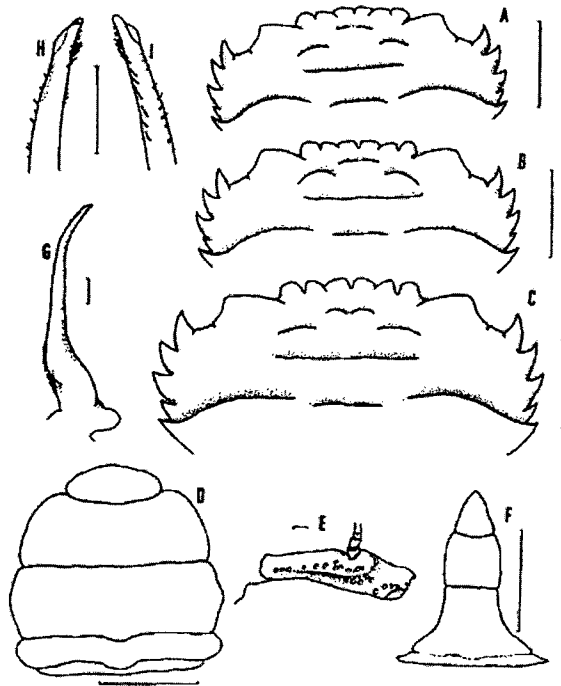
5. Mesogastric ridge	-	Mesogastric ridge ไม่แยกกัน
6. Carapace ridge	มี Carapace ridge นูนชัดเจนและมีเม็ดเล็กๆ สากๆ	-
7. Epistomal ridge	พบด้านล่างของ Epistomal ridge มีลักษณะโค้ง	-
8. G ₁ Distal tip	G ₁ Distal tip โค้งอย่างชัดเจน	G ₁ Distal tip มีลักษณะเรียวเล็ก โค้งอเล็กน้อย
9. G ₁ basal lobe	แนวด้านข้างของ G ₁ basal lobe มีลักษณะเว้า	แนวด้านข้างของ G ₁ basal lobe มีลักษณะกลมมน
10. Manus ของก้ามหนีบ	ผิวของ Manus ด้านในถึงล่างมีลักษณะเรียบ	-



(ที่มา: Wee and Ng, 1995)

ภาพที่ 9 รูปร่างลักษณะภายนอกที่สังเกตได้ของปูม้าหิน *Thalamita prymna*

A, B, C และ D = front dorsal surface; E = female abdomen; F = male abdomen;
G = left basal antennal segment; H = left G₁ abdominal surface; I = apex of left G₁
abdominal surface; J = apex of left G₁ sternal surface



(ที่มา: Wee and Ng, 1995)

ภาพที่ 10 รูปร่างลักษณะภายนอกที่สังเกตได้ของปูม้าหิน *Thalamita danae*

A, B และ C = front dorsal surface; D = female abdomen; E = right basal antennal segment; F = male abdomen; G = left G₁ abdominal surface; H = apex of left G₁ abdominal surface; I = apex of left G₁ sternal surface

ผลการศึกษาจากยีน COI, 16SrRNA และ Histone H3 บ่งชี้ว่าปูม้าหินที่คาดว่าจะจะเป็นสองสปีชีส์ นั้นไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาความแตกต่างโดยฐานของ อิงอร เสงพัฒนาพงศ์ (2556) ที่วิเคราะห์ความแตกต่างของสัดส่วนระยางค์ อาศัยวิธีการบางส่วนของ อำนวย จรด้วง และประดิษฐ์ แสงทอง (2550) และไม่พบความแตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่างปูม้าหินทั้งสองกลุ่ม จึงเป็นไปได้ว่าปูม้าหิน (*T. pryma/danae*) ที่หมู่เกาะแสมสารประกอบไปด้วยปูเพียงสปีชีส์เดียว และน่าจะเป็น *T. danae* (ประมวลจากผลที่เทียบกับฐานข้อมูล GenBank) อาจจำเป็นต้องมีการตรวจสอบระหว่างสถานที่ในประเทศไทย และในต่างประเทศ รวมถึงตรวจสอบความถูกต้องของการเรียกชื่อของตัวอย่างในฐานข้อมูล GenBank

สายนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI และ 16S rRNA ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้มีประสิทธิภาพในการแยกชนิดปูในสกุล *Thalamita* ได้หลายชนิด ซึ่งระดับความแตกต่างของยีน COI ระหว่างสปีชีส์ในสกุลนี้มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.10-0.19 (10-19%) ซึ่งเป็นระดับที่พบในการศึกษาของ Silva et al. (2011) Chu, Tong & Chan (1998) และ Yamindago, Senanan & Tangkrock-Olan (2013) ที่มีการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูหลายสกุล (ตารางที่ 13) ส่วนยีน 16S rRNA มีความแปรปรวนของสายนิวคลีโอไทด์น้อยกว่ายีน COI โดยระยะห่างทางพันธุกรรม ระหว่างสปีชีส์ในสกุล *Thalamita* เท่ากับ 0.04-0.09 (4-9%)

ตารางที่ 13 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม K2P ภายในชนิดเดียวกัน ระหว่างสปีชีส์ในจีนัสเดียวกัน และระหว่างสกุลในแฟมิลีเดียวกันของยีน COI ในการศึกษาครั้งนี้ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม K2P ภายในสปีชีส์เดียวกัน			
การศึกษาครั้งนี้ (ปูม้าหินสกุล <i>Thalamita</i>)	Silva et al. (2011) (กลุ่มสัตว์ decapoda)	Chu et al. (1998) (ปูสกุล <i>Charybdis</i>)	Yamindago et al. (2013) (ปูสกุล <i>Metopograpsus</i>)
0	0.0285-0.01375	0.02	0.0-0.019
ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม K2P ระหว่างสปีชีส์ในจีนัสเดียวกัน			
0.10-0.19	0.064%-0.21%	0.049%-0.13	0.087-0.12
ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม K2P ระหว่างจีนัสภายในแฟมิลีเดียวกัน			
0.14-0.21%	0.114-0.25%	0.146%	

ตารางที่ 14 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ภายในสปีชีส์เดียวกัน ระหว่างสปีชีส์ในจีนัสเดียวกัน และระหว่างสกุลในแฟมิลีเดียวกันของยีน 16S rRNA ในการศึกษาครั้งนี้ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกัน					
การศึกษานี้ ปูม้าหิน <i>Thalamita</i>	การศึกษานี้ กุ้งตืดชัน <i>Alpheus</i>	การศึกษานี้ ปูลม <i>Ocypode</i>	Yamindago et al. (2013) (ปูสกุล <i>Metopograpsus</i>)	Shih et al. (2007) (กุ้งน้ำจืดกลุ่ม <i>Neocaridina</i>)	Mathews et al. (2006) (กุ้งตืดชันสกุล <i>Alpheus</i>)
0-0.01	0.003-0.025	0-0.01	0-0.019	0-0.012	0.005-0.062
ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ในจีนัสเดียวกัน					
0.11-0.19	0.09-0.16	0.09-0.19	0.058-0.079	0.024-0.076	0.048

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกุ้งตืดชัน

เครื่องหมายทางพันธุกรรมของยีน 16S rRNA มีความสามารถในการบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของครอบครัว Alpheidae สกุล *Alpheus* ได้โดยที่สายนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA นี้มีความยาวของสาย นิวคลีโอไทด์ที่ใช้มีขนาด 477 คู่เบส และ 482 คู่เบส จากสายนิวคลีโอไทด์ 1,488 คู่เบส (National Center for Biotechnology Information, 2013) ซึ่งมีขนาดที่ใกล้เคียงกับที่ใช้ในการวิจัยกุ้งตืดชันของ Methews (2002) ซึ่งมีขนาด 492 คู่เบส

การศึกษาของ Zardoya and Meyer (1996) พบว่ารูปแบบความแปรปรวนของยีนทั้งหมดบนไมโทคอนเดรียมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับความแตกต่างทางวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มอนุกรมวิธานที่แยกจากกันน้อยกว่า 100 ล้านปี ยีนบางกลุ่ม เช่น ND 2, ND 4, ND 5 (NADH Subunit 2, 4, 5 ตามลำดับ), COI และ 16S rRNA มีความสม่ำเสมอมากกว่ายีนอื่นๆบนไมโทคอนเดรีย (Zardoya and Meyer, 1996) จึงเหมาะสำหรับการศึกษาเพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกุ้งตืดชันภายในสกุล *Alpheus* ได้

การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจสอบความแตกต่างของสปีชีส์ของกุ้งติดชั้น สกุล *Alpheus* ได้ โดย *Alpheus* sp. น่าจะต่างจาก *A. rapacida* ซึ่งค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณได้ของทุกหน่วยอนุกรมวิธานที่สูงกว่าระดับชนิดมีค่าร้อยละ 3 ซึ่งเป็นระดับ 13 เท่าของความแตกต่างภายในชนิดโดยระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดมีค่าอยู่ที่ 0.0-0.02 (ตารางที่ 12) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในกลุ่มครัสเตเชียนอื่นหลายชนิด (ตารางที่ 14)

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสกุล *Alpheus*

การจัดเรียงของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA ของกุ้งติดชั้นแต่ละชนิดโดยลำดับคู่เบสมีลำดับตั้งแต่ 172-222 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างกันชัดเจนที่สุดในการใช้จำแนกความแตกต่างของชนิด

ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic Tree ทั้งสามวิธีคือ Maximum Likelihood, Neighbor-Joining Maximum และ Maximum Parsimony โดย *A. rapacida* กับ *Alpheus* sp. ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และ *A. serenie* ถูกแยกออกมาทั้งสองสปีชีส์ แต่วิธีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่แตกต่างกันอาจให้รูปแบบ Phylogenetic Tree ที่แตกต่างกันของ Maximum Parsimony มีการจัดกลุ่มที่แตกต่างจาก Maximum Likelihood และ Neighbor-Joining เนื่องจาก

Phylogenetic Tree ที่ใช้นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยวิธีการสร้างทุกแบบสนับสนุนความใกล้เคียงกับทางวิวัฒนาการของ *A. rapacida* และ *Alpheus* sp. ซึ่งสอดคล้องลักษณะพื้นฐานของกุ้งทั้งสองสปีชีส์ที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เป็นไปได้ว่าชนิดทั้งสองเพิ่งแยกจากกันได้ไม่นาน (อาจมีปัจจัยชีววิทยาของที่ทำให้กุ้งสองชนิดนี้ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้) นอกจากนี้ *A. rapacida* - *Alpheus* sp. ยังมีความแตกต่างจาก *A. serenie* อีกด้วยซึ่งเมื่อพิจารณาปัจจัยทางชีววิทยาบางประการ เช่น แหล่งที่อยู่อาศัยพบว่ากุ้ง *A. rapacida*, *A. serenie* และ *Alpheus* sp. พบบริเวณที่ดินโคลนเหมือนกันและเมื่อเปรียบเทียบความลึกและความเค็มของบริเวณที่กุ้งติดชั้นอาศัย *A. rapacida* และ *Alpheus* sp. พบที่ระดับความลึก 56 เมตรมีความเค็มต่ำ แต่ *A. serenie* พบที่ระดับความลึก 62 เมตรซึ่งมีความเค็มสูงกว่า

กุ้งติดชั้นจากต่างประเทศที่นำมาเปรียบเทียบ *A. distinguendus*, *A. scopulus* จากที่มีความใกล้เคียงกับ *A. rapacida* โดยจากข้อมูลที่พบในพื้นที่เทียบอินโดแปซิฟิก ทะเลแดง และ *A. serenie* มีความใกล้ชิด *A. microrhynchus* และ *A. aff. euphrosyne* พบในพื้นที่ อินโดนีเซีย และ สิงคโปร์ก็มีปัจจัยในลักษณะของแหล่งที่อยู่ใกล้เคียงกันมากกับกุ้งที่พบในจังหวัดชลบุรี (Dora et al., 1982) ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าความแตกต่างของแหล่งที่อยู่ ระดับความลึก มีผลต่อการแพร่กระจายของกุ้งติดชั้นแต่ละชนิดร่วมกับลักษณะพื้นท้องทะเล ความเค็ม แหล่งอาหารมีบทบาทร่วมด้วย ทำให้แต่ละบริเวณมีชนิดของกุ้งติดชั้นที่อาศัยอยู่แตกต่างกัน ซึ่ง *A. rapacida* กับ *Alpheus* sp. มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับ *A. buckupi*, *A. distinguendus* และ *A. scopulus* จากอินโดแปซิฟิก และ *A. serenie* มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการกับ *A. microrhynchus* และ *A. aff. euphrosyne* ที่อยู่บริเวณอินโดนีเซีย และ สิงคโปร์เช่นกัน (Dora et al., 1982) ซึ่งส่วนมากกุ้งติดชั้นจะไม่ชอบบริเวณน้ำจืดเมื่อฝนตกหนักจะเริ่มอพยพไปบริเวณที่มีความลึกเพิ่มขึ้นซึ่งอาจเป็นปัจจัยสำคัญในการแพร่กระจายในรุ่นลูกออกสู่ทะเลแล้วถูกกระแสน้ำพัดไปแพร่กระจายยังทวีปต่างๆ (Dora et al., 1982) ทำให้ลักษณะภายนอกมีความแตกต่างกัน

เพื่อปรับตัวในการดำรงชีวิต เช่น มีลาย ไม่มีลาย สีเข้มตามพื้นผิวดิน เป็นต้น พฤติกรรมการผสมพันธุ์และช่วงเวลาของการสืบพันธุ์ที่แตกต่างกันซึ่งข้อมูลทางชีววิทยาในประเทศไทยยังคงมีข้อมูลที่น้อย ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดลำดับอนุกรมวิธาน เชิงวิวัฒนาการ เชิงนิเวศวิทยา และประกอบการวางแผนการจัดการทรัพยากรกึ่งดัดชั้นสกุล *Alpheus* ในระยะยาว ซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไป

ความแตกต่างทางพื้นที่ทางภูมิศาสตร์มีผลต่อการแพร่กระจายของกึ่งสกุล *Alpheus* ดังเช่นงานวิจัยที่ ศึกษาการกึ่งสกุล *Alpheus* ในพื้นที่ทะเลคาริเบียน, อ่าวเม็กซิโก, ฟลอริดา, บราซิล, และแปซิฟิกตะวันออก ในบริเวณดังกล่าวที่มีความเหมือนและต่างกันมาก (Methews et. al., 2009) ซึ่งเกิดจากสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ (Geographic Barrier) หรือ ปัจจัยทางชีววิทยา (Biological Barrier) ที่ลดการผสมพันธุ์ระหว่างชนิด (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543)

สรุปผล

1. บางส่วนของนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ 16S rRNA บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ มีประสิทธิภาพในการแบ่งแยกสปีชีส์ภายในสกุลของสัตว์กลุ่มกุ้งปู ได้ดีกว่ายีน Histone H3 ที่อยู่ในนิวเคลียส
2. ระดับความแปรปรวนของภายในกลุ่มปูใบที่มีรูปแบบสีแตกต่างกัน และปูม้าหิน ของทุกยีนมีค่าต่ำ (ไม่เกิน 3%) น่าจะสะท้อนให้เห็นถึงว่าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์น่าจะจัดเป็นสปีชีส์เดียวกันได้
3. ผลการยืนยันจากดีเอ็นเอทั้งสามตำแหน่ง พบว่าปูม้าหิน *Thalamita danae* และ *T. prymna* ที่รวบรวมจากหมู่เกาะแสมสารที่มีการแยกโดยสันฐานเบื้องต้นว่าเป็นสองชนิด (ซึ่งมีความแตกต่างที่ความเรียบของฐานหนวด และที่ gonopod ของตัวผู้เท่านั้น) น่าจะเป็นปูม้าเพียงชนิดเดียว และน่าจะเป็น *T. danae*
4. ปูลมที่ปรากฏที่หมู่เกาะแสมสารน่าจะมีเพียงชนิดเดียว คือ *Ocypode ceratophthalmus*
5. สำหรับกึ่งดัดชั้น *Alpheus* spp. ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA สามารถแบ่งชนิดได้อย่างชัดเจนโดย *Alpheus* sp. เป็นชนิดที่แตกต่างจาก *A. rapacida* และ *A. serenie*
6. แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่แสดงว่า *Alpheus rapacida* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Alpheus* sp. มากกว่า *Alpheus serenie*