



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การจำแนกชนิดของปูทะเลในสกุล *Scylla* ด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอเพื่อการ
เพาะเลี้ยงและการจัดการทรัพยากรที่ยั่งยืน”

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. อำนวย จรด้วง และ คณะ

ธันวาคม 2550

สัญญาเลขที่ RDG4720004



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“ การจำแนกชนิดของปูทะเลในสกุล *Scylla* ด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอเพื่อการ
เพาะเลี้ยงและการจัดการทรัพยากรที่ยั่งยืน ”

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. อำนวย จรด้วง

นายประดิษฐ์ แสงทอง

สำนักประสานงานวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตร พืชและสัตว์น้ำ

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ กองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.)ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการนี้ และใคร่ขอขอบคุณ ผศ.ดร. บรรจง เทียนสงฆ์ศรี ที่ได้ให้คำแนะนำการจำแนกชนิดปู รศ.ดร.เผด็จศักดิ์ จารยะพันธ์ ดร.สุภัทรา อุไรวรรณ และเจ้าหน้าที่ในสำนักงานประสานงานวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรม เกษตร พืชและสัตว์น้ำ ในการให้ความสะดวกต่างๆในการติดต่อประสานงาน และสุดท้ายคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณท่านผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้ให้คำวิจารณ์และข้อชี้แนะต่าง ๆ ต่อรายงานผลการวิจัยฉบับนี้

บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

1. A total 195 of mud or mungrove crabs were collected from 3 locations; Chantaburi and Trat, Ranong and Surat Thani Provinces. According to their body colours, they have been classified into 4 different morphs; black, white, green and violet. The black and white morphs found in all locations, but the violet found only in Chantaburi-Trat and Ranong Provinces. The green ones was found only in Ranong Province and was vary rare morph compared to the others. Comparative studies of all morphological characters revealed that they have no unique character for their own identification. Different characters such as polygonal pattern on walking legs and paddle, shape of frontal spines and colour spot on outer cheliped should be combined for classifying as a distinct species.

2. Mophometric studies were performed by using Canonical Variant Analysis (CVA) and Mahalanobis' Distance. The CVA results revealed 4 groups of mud crabs. Each crab morph was grouped into its center and separated clearly from the others. The Mahalanobis' Distance showed less values within each morph(5.703 to15.447) than those between morphs (25.722 to110.711). All results revealed that each morph should be classified as a distinct species.

3. Muscle tissues in walking legs of 74 mud crabs(*Scylla spp.*) and 10 swimming crabs(*Portunus pelagicus*) as outgroup were used to isolate total DNA for using as template in PCR reaction. The *Cytb* fragment in mitochondrial DNA was amplified with a couple of primers (SS1 and SS11) by polymerase chain reaction. PCR products obtained was about 1,700 bp in length. The PCR products were purified and sent to servicing unit (MACROGEN Inc., Korea) for DNA sequencing. After determination of start and end points of the gene, it was found that the *Cytb* was 1,135 bp in length . Nucleotide sequences of all samples and of swimming crab (*Portunus pelagicus*) as outgroup were performed nucleotide divergence and phylogenetic relationship analyses(ML, MP and NJ tree).The nucleotide divergence within morphs ranged from 0.001 to 0.008, while the divergence between morphs ranged from 0.125 to0.187 . Both nucleotide divergence and phylogentic analyses confirmed that each crab morph should be a reproductively isolated species.

4. The *16S rRNA* fragment in mitochondrial DNA were also amplified by using primers SS19 and SS20.The PCR products obtained the reaction was about 1,700 bp in length. The PCR products were purified and sent to servicing unit (MACROGEN Inc., Korea) for DNA sequencing. After determination, *16S rRNA* was 1,446 bp in length. Nucleotide sequences of both mud and swimming crabs were analyzed for nucleotide divergence and phylogenetic relationship(ML, MP, and NJ Tree).The nucleotide divergence within morphs ranged from 0.002 to 0.089 and between morphs from

0.068 to 0.251. Both nucleotide divergence and phylogenetic trees confirmed consistently that each crab morph should be a reproductively isolated species. The phylogenetic analyses also revealed that both *Cytb* and *16S rRNA* could be used as DNA barcode to identify crab species.

5. The species-specific markers for each crab species were also developed by using *Cytb* sequences. The RFLP-markers for each crab species were obtained by digestion the PCR product of *Cytb* fragment with *RsaI*. These markers will be used to identify each crab species.

6. The scientific names of each crab morphs has been also discussed. The black morph has been named as *Scylla serrata* , green morph as *S. oceanica* , violet morph as *S. tranquebarica* and white morph as *S. paramamosain*.

บทคัดย่อ

ปูทะเลตัวอย่างเก็บรวบรวมจาก 3 แหล่งคือ จังหวัดจันทบุรี-ตราด จังหวัดระนอง และจังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 195 ตัว พบว่า ปูที่รวบรวมได้สามารถจำแนกตามลักษณะสีภายนอกได้เป็น 4 กลุ่มคือ ปูดำ ปูขาว ปูเขียว และ ปูม่วง โดยปูดำและ ปูขาว เป็นปูที่สามารถพบได้จากทุกแหล่งเก็บตัวอย่าง ปูม่วงสามารถรวบรวมได้จาก 2 แหล่งเก็บตัวอย่าง คือ จันทบุรี-ตราด และระนอง ส่วนปูเขียวนั้นสามารถพบได้จากแหล่งเก็บตัวอย่างเดียว คือ จังหวัดระนอง เป็นปูที่หายากที่สุดในบรรดาปูตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของปูทะเล 4 กลุ่ม พบว่า ไม่มีลักษณะเด่นใดของปูทะเลที่สามารถจำแนกปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่จำเป็นต้องใช้ลักษณะมากกว่า 1 ลักษณะในการจำแนก โดยเฉพาะลักษณะลายร่างแห (polygonal pattern) บนขาว่ายน้ำและขาเดิน รูปร่างของหนามระหว่างตา และ สัณฐานด้านนอกของก้าม ซึ่งลักษณะเหล่านี้ สามารถใช้จำแนกกลุ่มปูได้อย่างแม่นยำ

การวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric โดยวิธี Canonical Variant Analysis (CVA) และ Mahalanobis' Distance ผลของ CVA แสดงให้เห็นว่าลักษณะ morphometric สามารถแบ่งปูออกเป็น 4 กลุ่มหลัก โดยแต่ละกลุ่มมีขอบเขตและแยกตัวออกจากปูกลุ่มอื่นๆอย่างชัดเจน ในขณะที่ Mahalanobis' Distance แสดงให้เห็นความแตกต่างของลักษณะ morphometric ภายในกลุ่ม (5.703 ถึง 15.447) ซึ่งต่ำกว่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม (25.722 ถึง 110.711) อย่างชัดเจน ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าปูแต่ละกลุ่มควรถูกจัดให้มีสถานะภาพเป็นชนิด (species)

ปูดำ ปูขาว ปูเขียว และปูม่วงที่รวบรวมจากแหล่งปู 3 จังหวัดจำนวน 74 ตัว และปูม้า จำนวน 10 ตัว เพื่อใช้เป็น outgroup ถูกนำมาสกัด total DNA เพื่อใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนยีน *Cytb* และยีน *16S rRNA* ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอโดยอาศัยวิธี PCR (polymerase chain reaction) ผลคือได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,700 bp ภายหลังการทำบริสุทธิ์แล้ว PCR product ถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยให้บริการ เมื่อกำหนดตำแหน่งแล้ว พบว่ายีน *Cytb* มีขนาด 1,135 นิวคลีโอไทด์และ ยีน *16S rRNA* มีขนาด 1,446 นิวคลีโอไทด์ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ nucleotide divergence และ phylogenetic relationship (ML, MP และ NJ Tree) ซึ่ง nucleotide divergence จากการใช้ยีน *Cytb* ภายในชนิดมีค่า ตั้งแต่ 0.001 ถึง 0.008 และระหว่างชนิดมีค่า ตั้งแต่ 0.125 ถึง 0.187 แต่จากการใช้ยีน *16S rRNA* nucleotide divergence ภายในชนิดมีค่าตั้งแต่ 0.002 ถึง 0.089 และระหว่างชนิดมีค่าตั้งแต่ 0.068 ถึง 0.251 ผลทั้งส่วนของ nucleotide divergence และ phylogenetic relationship ยืนยันตรงกันว่า ปูดำ ปูขาว ปูเขียว และปูม่วง มีสถานะที่เป็นชนิด หรือ reproductively isolated species สำหรับชื่อวิทยาศาสตร์ของปูทั้ง 4 ชนิด ได้วิเคราะห์วิจารณ์ไว้แล้วและได้เสนอให้เรียกชื่อปูดำ (*Scylla serrat*), ปูขาว (*S. paramamosain*), ปูเขียว (*S. oceanica*) และ ปูม่วง (*S. tranquebarica*)

Abstract

A total of 195 mud or mangrove crabs were collected from 3 Chantaburi and Trat, Ranong and Surat Thani Provinces. According to their color body, they were classified into 4 different morphs, black, white, green and violet. The black and white morphs found in all locations, but the violet found only in Chantaburi-Trat and Ranong Provinces. The green ones could be found only in Ranong Province and was very rare morph compared to the others. Comparative studies of all morphological characters revealed that they have no unique character for their specific morph identification. One has to combine different characters; polygonal pattern on walking legs and paddle, shape of frontal spines and colour spot on outer cheliped, for classifying each morph.

Morphometric studies were performed by using Canonical Variant Analysis (CVA) and Mahalanobis' Distance. The CVA results revealed 4 groups of mud crabs. Each crab morph was combined into its center and separated clearly from the others. The Mahalanobis' Distance showed less values (5.703 to 15.447) within each morph than those (25.722 to 110.711) between morphs. All results revealed that each morph should be classified as a distinct species.

Muscle tissues in walking legs of 74 crabs were used to isolate total DNA for using as template in PCR reaction. The *Cytb* and *16S rRNA* fragments in mitochondrial DNA were amplified by polymerase chain reaction. PCR products obtained from both reactions were about 1,700 bp in length. The PCR products were purified and sent to servicing unit (MACROGEN Inc., Korea) for DNA sequencing. After determination of start and end points of the genes (*Cytb* and *16S rRNA*), it was found that *Cytb* and *16S rRNA* genes are 1,135 and 1,446 bp in length, respectively. Nucleotide sequences of both genes of mud crabs and swimming (*Portunus pelagicus*) as outgroup were performed nucleotide divergence and phylogenetic relationship (ML, MP and NJTrees) analyses. From *Cytb* gene, nucleotide divergence within morphs ranged 0.001 to 0.008 and between morphs ranged from 0.125 to 0.187. The divergence obtained from *16S rRNA* ranging from 0.002 to 0.089 for within morphs and 0.068 to 0.251 for between morphs. Both nucleotide divergence and phylogenetic relationship confirmed consistently that each crab morph should be a reproductively isolated species. The scientific name of each crab morph has been also discussed. This research project would like to name the black morph as *Scylla serrata*, the green as *S. oceanica*, the violet as *S. tranquebarica* and the white ones as *S. paramamosain*.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1
การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วิธีการวิจัย	4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	13
ข้อสรุป	75
ข้อเสนอแนะ	77
บรรณานุกรม	78
ภาคผนวก	81

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 ลักษณะ morphometric เพื่อการวิเคราะห์ CVA และ Mahalanobis' Distance	6
ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต่างๆเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ยีน <i>Cytb</i> และ <i>16S rRNA</i>	8
ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูม้า	8
ตารางที่ 4 แสดงอนุกรมวิธานและ accession number ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อการออกแบบไพรเมอร์	9
ตารางที่ 5 แสดงจำนวนปูตัวอย่างกลุ่มต่างๆ จากแหล่งเก็บตัวอย่างแต่ละแหล่งที่ใช้ในการศึกษา	14
ตารางที่ 6 แสดงลักษณะต่างๆที่ Estampador(1949a) ใช้ในการจำแนกชนิดปูทะเล	20
ตารางที่ 7 แสดงลักษณะต่างๆที่ Keenan <i>et al.</i> (1989) ใช้ในการจำแนกชนิดปูทะเล	21
ตารางที่ 8 แสดงจำนวนปูแต่ละกลุ่มและแต่ละแหล่งเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ลักษณะ morphometric	26
ตารางที่ 9 แสดงสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical เพื่อการจำแนกกลุ่มปูทะเลที่แบ่งตามลักษณะภายนอกโดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง	28
ตารางที่ 10 แสดงสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical เพื่อการจำแนกกลุ่มปูทะเล 10 กลุ่มที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง	30
ตารางที่ 11 แสดงค่า Mahalanobis' Distance ระหว่างปู 4 กลุ่มที่แบ่งตามลักษณะภายนอก คือ ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว	32
ตารางที่ 12 แสดงค่า Mahalanobis' Distance ระหว่างปู 10 กลุ่มที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง	33
ตารางที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยของ base composition ของยีน <i>Cytb</i> จากตัวอย่างปู 5 กลุ่ม	37
ตารางที่ 14 แสดงตำแหน่ง polymorphic site ของยีน <i>Cytb</i>	38
ตารางที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ยของ nucleotide divergence ของยีน <i>Cytb</i> เมื่อเปรียบเทียบภายในและระหว่างปูกลุ่มต่าง ๆ	43
ตารางที่ 16 แสดง base composition ของยีน <i>16S rRNA</i> ของปู 5 กลุ่ม	43
ตารางที่ 17 แสดง nucleotide divergence ของยีน <i>16S rRNA</i> ของปูตัวอย่าง 5 กลุ่ม	44
ตารางที่ 18 แสดงตำแหน่ง polymorphic site ของยีน <i>Cytb</i>	45

รายการตารางประกอบ (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 19 แสดงผลการจำลองการตัดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้ ไพรเมอร์ SS1-SS11 ด้วยเอนไซม์ <i>RsaI</i> ของปูทะเล 4 ชนิด โดยใช้โปรแกรม คอมพิวเตอร์	67
ตารางที่ 20 แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากตัด PCR product ของปูทะเล 4 ชนิด คือ ปูดำ (RB65 และ TB49) ปูเขียว (RG07 และ RG33) ปูม่วง (TV04 และ RV11) และปูขาว (TW38 และ RW08) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>RsaI</i>	68

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของยีนเป้าหมายในสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกับปูทะเล	7
รูปที่ 2 แสดงบริเวณเก็บตัวอย่างจากจังหวัดตราด-จันทบุรี (a) จังหวัดระนอง (b) และ จังหวัดสุราษฎร์ธานี (c)	14
รูปที่ 3 ปูดำ	15
รูปที่ 4 ปูขาว	16
รูปที่ 5 ปูเขียว	17
รูปที่ 6 ปูม่วง หรือ ปูทองโหลง	18
รูปที่ 7 แสดงรูปแบบของลายร่างแหบนขาว่ายน้ำและขาเดินของ (ก) ปูดำ (ข) ปูขาว (ค) ปูเขียว และ (ง) ปูม่วง	23
รูปที่ 8 แสดงหนามระหว่างช่องตาของ (ก) ปูดำ หนามสั้นโค้งมน (ข) ปูขาว หนามยาวแหลม มีสันฐานเป็นสามเหลี่ยม (ค) ปูเขียว หนามยาวเรียว หนามคู่กลางยาวกว่าคู่ริม และ (ง) ปูม่วง หนามยาวโค้งมน ความสูงใกล้เคียงกัน	24
รูปที่ 9 แสดงก้ามของ (ก) ปูดำ (ข) ปูขาว (ค) ปูเขียว และ (ง) ปูม่วง	25
รูปที่ 10 ผลการเขียนกราฟจากการวิเคราะห์ CVA จากข้อมูลลักษณะ morphometric (ก.) ผลการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกโดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง และ (ข.) ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง	31
รูปที่ 11 Phenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี UPGMA จากข้อมูล Mahalanobis' Distance (ภาพบน)ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกโดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง และ (ภาพล่าง) ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง; ตัวเลขกำกับเส้นแนวนอนแสดง Mahalanobis' Distance	34
รูปที่ 12 แผนผังแสดงการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SS1 และ SS11 ซึ่งเป็นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Cytb</i> สำหรับ SS1F1 และ SSF2 sequencing primer	35
รูปที่ 13 แสดง PCR product ของยีน <i>Cytb</i> (ก) ที่เพิ่มปริมาณด้วย SS1-SS11 และ <i>16S rRNA</i> (ข) ที่เพิ่มปริมาณด้วย SS20-SS19	35
รูปที่ 14 แสดง PCR product โดยใช้ไพรเมอร์ SS1 และ SS10 ของปูม้า	36

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 15 แสดง phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี NJ ของยีน <i>Cytb</i> โดยตัวเลขที่กำกับบนแต่ละเส้นแสดงผลการทดสอบ bootstrap ของเส้น (branch) นั้นๆ	60
รูปที่ 16 แสดง phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี MP ของยีน <i>Cytb</i> โดยตัวเลขที่กำกับบนแต่ละเส้นแสดงผลการทดสอบ bootstrap ของเส้น (branch) นั้นๆ	61
รูปที่ 17 แสดง phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี ML ของยีน <i>Cytb</i>	62
รูปที่ 18 แสดง phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี NJ ของยีน <i>16S rRNA</i> โดยตัวเลขที่กำกับบนแต่ละเส้นแสดงผลการทดสอบ bootstrap ของเส้น (branch) นั้นๆ	64
รูปที่ 19 แสดง phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี MP ของยีน <i>16S rRNA</i> โดยตัวเลขที่กำกับบนแต่ละเส้นแสดงผลการทดสอบ bootstrap ของเส้น (branch) นั้นๆ	65
รูปที่ 20 แสดง phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี ML ของยีน <i>16S rRNA</i>	66
รูปที่ 21 แสดงผลการทำ gel electrophoresis ของผลการตัด PCR product ของปูทะเล 4 ชนิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>RsaI</i> โดยช่อง M แทนดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ช่อง 1 และ 2 แสดงผลที่ได้จากการตัด PCR product ของปูดำ ช่อง 3 และ 4 แสดงผลที่ได้จากการตัด PCR product ของ ปูเขียว ช่อง 5 และ 6 แสดงผลที่ได้จากการตัด PCR product ของปูม่วง ช่อง 7 และ 8 แสดงผลที่ได้จากการตัด PCR product ของปูขาว ช่อง 9 10 11 และ 12 แสดงขนาดของ PCR product ของ ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และ ปูขาว ตามลำดับ	69
รูปที่ 22 แสดงภาพจำลองของโมเลกุลเครื่องหมายของปูทะเล 4 ชนิด คือ (1) ปูดำ (2) ปูเขียว (3) ปูม่วง (4) ปูขาว และโมเลกุลเครื่องหมาย (M)	72
รูปที่ 23 แสดง phylogenetic tree ของปูทะเลจากข้อมูล ก.) ลักษณะ morphometric ข.) ยีน <i>cytb</i> และ ค.) ยีน <i>16S rRNA</i>	72

1. บทนำ

ปูทะเล (mud crabs) เป็นทรัพยากรประมงที่มีความสำคัญของจังหวัดชายทะเลต่าง ๆ และของประเทศ ปัจจุบันทรัพยากรปูทะเลที่จับได้จากธรรมชาติปริมาณลดลงมาก ปูทะเลในประเทศไทยมีหลายชนิด แต่ Suvati (1950) ได้รายงานว่ามีอยู่ 1 ชนิด คือ *Scylla serrata* ซึ่งตั้งแต่บัดนั้นเป็นต้นมา ยังไม่มีใครเคยรายงานไว้เลยว่าปูทะเลในประเทศไทยมีมากกว่า 1 ชนิด จนกระทั่ง ชูชาติและบุรณ์ (2522) ได้แบ่งปูทะเลเป็น 3 กลุ่มคือ ปูแดงหรือดำ ปูเขียว และปูขาว แล้วทำการวิเคราะห์ลักษณะทาง morphometric ทางสถิติและสรุปว่า เมื่อเทียบลักษณะปูเหล่านี้กับวิธีการแบ่งแยกตาม Estampador (1949a, 1949b) เสนอแนะว่า ปูดำหรือแดงน่าจะเทียบเคียงได้กับปู *Scylla serrata* (Forsk. 1775) และ *S. serrata* var. *paramamosain* กลุ่มปูเขียว น่าจะได้แก่ *S. tranquebarica* และ กลุ่มปูขาวได้แก่ *S. oceanica* ซึ่งการให้ข้อเสนอเช่นว่านี้ไม่เป็นที่สนใจของนักอนุกรมวิธานปูทะเลมากนัก จนกระทั่ง Keenan et al. (1998) ได้ปรับปรุงการจำแนกชนิดปูในสกุล *Scylla* ใหม่โดยอาศัยข้อมูล allozyme electrophoresis และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) แล้วจำแนกปูทะเลสกุล *Scylla* เป็น 4 ชนิด คือ *S. olivacea*, *S. serrata*, *S. paramamosain* และ *S. tranquebarica* โดยอ้างว่าได้รวบรวมปู *S. olivacea* 1 ตัว จากภูเก็ตและกรุงเทพฯ ซึ่งผลงานชิ้นนี้ได้สร้างความสับสนในเรื่องชนิดของปูทะเลในประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้ เพราะไม่เคยมีใครรายงานว่ามีปูทะเลชนิด *S. olivacea* มีการค้นพบในประเทศไทยมาก่อน เมื่อพิจารณาจากรายงานที่กล่าวถึงแล้วพอจะประเมินได้ว่าในประเทศไทยพบปูทะเลทั้งหมด 5 ชนิด คือ *S. serrata*, *S. paramamosain*, *S. oceanica*, *S. tranquebarica*, และ *S. olivacea* ซึ่งสร้างความสับสนอย่างมาก จึงจำเป็นต้องที่จะต้องศึกษาปูทะเลในประเทศไทยทั้งทางด้านลักษณะภายนอก (morphology) และลักษณะทาง morphometric และรวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อจำแนกปูทะเลในประเทศไทยให้แน่ชัด เพื่อจะได้ นำข้อมูลเกี่ยวกับชนิดมาใช้ในการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ปูทะเลในอนาคตข้างหน้าอย่างยั่งยืน โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนกชนิดของปูทะเลในสกุล *Scylla* ในประเทศไทย โดยการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะภายนอก ลักษณะ morphometric และปริมาณ nucleotide divergence ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) ดังนั้นจึงได้ดำเนินการรวบรวมปูทะเลตามแหล่งปูทะเลสำคัญของประเทศไทย 3 แหล่งคือ จังหวัดจันทบุรี-ตราด, สุราษฎร์ธานี และจังหวัดระนอง มาศึกษาลักษณะภายนอก (morphology), morphometric characters และวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในส่วนของยีน *Cytb* และ 16S rRNA ในส่วนของ mtDNA มาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เพื่อการจำแนกชนิดของปูทะเลในประเทศไทย ผลการศึกษาทั้ง 3 ลักษณะปรากฏว่าสามารถจำแนกปูทะเลได้ทั้ง 4 ชนิด สำหรับชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ของปูทะเลแต่ละชนิดได้เสนอแนะไว้ด้วยแล้ว

2. การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2493 Suvati (1950) ได้รายงานว่ามีปูทะเลชนิดเดียวอยู่ 1 ชนิด คือ *Scylla serrata* ซึ่งตั้งแต่บัดนั้นเป็นต้นมาจึงไม่มีใครเคยรายงานไว้เลยว่าปูทะเลในประเทศไทยมีมากกว่า 1 ชนิด จนกระทั่ง ชูชาติและบุรณ (2522) ได้แบ่งปูทะเลเป็น 3 กลุ่มคือ ปูแดงหรือดำ ปูเขียว และปูขาว แล้วทำการวิเคราะห์ลักษณะทาง morphometric ทางสถิติและสรุปว่า เมื่อเทียบลักษณะปูเหล่านี้กับวิธีการแบ่งแยกตาม Estampador (1949a, 1949b) เสนอแนะว่า ปูดำหรือแดงน่าจะเทียบเคียงได้กับปู *Scylla serrata* (Forsk. 1775) และ *S. serrata* var. *paramamosain* กลุ่มปูเขียว น่าจะได้แก่ *S. tranquebarica* และ กลุ่มปูขาวได้แก่ *S. oceanica* ซึ่งการให้ข้อเสนอเช่นนี้ไม่เป็นที่สนใจของนักอนุกรมวิธานปูทะเลมากนัก Fuseya and Watanabe (1996) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปูทะเล 3 ชนิดคือ *S. serrata*, *S. tranquebarica* และ *S. oceanica* โดยอาศัย allozyme electrophoresis ซึ่งรายงานว่าได้รวบรวมปูทะเล 2 ชนิด จากจันทบุรีและสุราษฎร์ธานี คือชนิด *S. serrata* และ *S. tranquebarica* จนกระทั่ง Keenan et al. (1998) ได้ปรับปรุงการจำแนกชนิดปูในสกุล *Scylla* ใหม่โดยอาศัยข้อมูล allozyme electrophoresis และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) แล้วจำแนกปูทะเลสกุล *Scylla* เป็น 4 ชนิด คือ *S. olivacea*, *S. serrata*, *S. paramamosain* และ *S. tranquebarica* โดยอ้างว่าได้รวบรวมปู *S. olivacea* 1 ตัว จากภูเก็ตและกรุงเทพฯ ซึ่งผลงานชิ้นนี้ได้สร้างความสับสนในเรื่องชนิดของปูทะเลในประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพราะไม่เคยมีใครรายงานว่ามีปูทะเลชนิด *S. olivacea* มีการค้นพบในประเทศไทยมาก่อน แต่เมื่อพิจารณาจากรายงานในช่วงหลังเช่น Klinbunga et al. (2000) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูทะเลในภาคตะวันออกของประเทศไทย คณะผู้วิจัยได้อ้างว่าได้ศึกษาปูทะเล 3 ชนิดคือ *S. serrata*, *S. oceanica* และ *S. tranquebarica* โดยอาศัยการจำแนกชนิดของ Estampador (1949a) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากรายงานที่กล่าวถึงแล้วพอจะประเมินได้ว่าในประเทศไทยพบปูทะเลทั้งหมด 5 ชนิด คือ *S. serrata*, *S. paramamosain*, *S. oceanica*, *S. tranquebarica*, และ *S. olivacea* ซึ่งสร้างความสับสนอย่างมาก จึงจำเป็นต้องศึกษาปูทะเลในประเทศไทยทั้งทางด้านลักษณะภายนอก (morphology) และลักษณะทาง morphometric และรวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อจำแนกปูทะเลในประเทศไทยให้แน่ชัดเพื่อจะได้นำข้อมูลเกี่ยวกับชนิดมาใช้ในการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ปูทะเลในอนาคตข้างหน้าอย่างยั่งยืน

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA-mtDNA) เป็นดีเอ็นเอวงกลมขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 16 kb ประกอบด้วย 37 ยีน คือ 13 protein coding genes, 2 ribosomal genes และ 22 tRNA genes (Boore, 1999) ด้วยเหตุที่ mtDNA มีการวิวัฒนาการได้เร็วกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของบางส่วนของยีน mtDNA มีการใช้เป็น DNA barcode โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน COI (Hebert et al., 2004) เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) และ

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) ของสัตว์ชั้นสูง (Avise, 1994) ปัจจุบันนี้มีการประยุกต์ใช้ mtDNA เพื่อการจำแนกบุคคลหรือชนิด (individual or species identification) และ ใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์ กรณีการพิสูจน์ความสัมพันธ์แม่ลูกและเพื่อพิสูจน์ทางอาชญากรรม (Uametsu and Yuasa, 2005) ด้วยเหตุเพราะว่า mtDNA ถ่ายทอดผ่านทางแม่ จำนวนชุดต่อเซลล์มีอยู่จำนวนมากและไม่มี การรวมกันใหม่ จึงมีลักษณะเป็น non-recombining genealogical unit ที่มียีนหลายๆ ยีน (multiple alleles) โดยปกติแล้วในการใช้ mtDNA ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจะใช้การศึกษาลำดับของยีน บางส่วนด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR (polymorase chain reaction) และนำไปวิเคราะห์ลำดับ โดยตรง (direct sequencing) ในส่วน protein-coding gene ที่ให้ผลที่ดีในการอธิบายการวิวัฒนาการคือ *ND4*, *ND5*, *ND2*, *Cytb* และ *COI* (Zardoya and Meyer, 1996) มีการใช้ยีน *COI*, *Cytb* และ *16S rRNA* มาใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปูในกลุ่ม Brachyura และปูน้ำจืดหลายชนิด (Chu *et al.*, 1999; Harrison and Crespi, 1999; Daniels *et al.*, 2002; Fratini and Vannini, 2002; Tang *et al.*, 2003; Pfeiler *et al.*, 2005 และ Reuschel and Schubart, 2005)

3. วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างปูทะเล

ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างปูทะเลใน 4 จังหวัด คือ จันทบุรี ตราด ระนอง และสุราษฎร์ธานี โดยไปซื้อปูจากพ่อค้าคนกลางที่ทำหน้าที่รวบรวมปูในหมู่บ้านหรือหมู่บ้านใกล้เคียง เพื่อให้แน่ใจว่าปูที่ได้เป็นปูในจังหวัดเป้าหมายอย่างแน่นอน

ปูตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ ปูในสกุล *Scylla* ทุกชนิดที่พบในประเทศไทยและใช้ปูตัวอย่างเฉพาะปูตัวผู้ขนาดประมาณ 200 กรัม โดยจะนำไปศึกษาลักษณะภายนอก ลักษณะ morphometric และปูบางส่วนจะนำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อการจำแนกชนิด จากการเก็บตัวอย่างพบว่าปูทะเลเมื่อจำแนกตามสีมีอยู่ 4 กลุ่มคือ ปูดำ ปูขาวหรือปูทองเหลือง ปูเขียว และ ปูม่วงหรือปูทองโหลง

3.2 การจำแนกชนิดปูทะเลเบื้องต้นโดยใช้ลักษณะภายนอก

ปูทะเลแต่ละกลุ่มสีจะถูกนำมาศึกษาลักษณะภายนอกทั่วไปและจำแนกชนิดตามวิธีการของ Estampador(1949a) และ Keenan *et al.*(1998) ลักษณะภายนอก (morphology) ที่แตกต่างกันทั้งในเรื่องของสีกระดอง จำนวนหนามที่บริเวณก้ามปล้องกลาง รูปทรงของหนามระหว่างช่องตา (frontal spine) และการปรากฏของลายร่างแห ได้มีการบันทึกไว้และอธิบายลักษณะโดยสรุปไว้

3.3 การศึกษาความแตกต่างของลักษณะ morphometric ของปูทะเล

ปูตัวอย่างจากปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มที่แบ่งตามลักษณะภายนอกแล้วจะนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric โดยใช้เฉพาะปูตัวอย่างเพศผู้เพื่อป้องกันปัญหาความคลาดเคลื่อนอันเนื่องมาจากความแตกต่างของลักษณะระหว่างเพศผู้กับเพศเมีย (diphopism) และมีน้ำหนักโดยเฉลี่ยประมาณ 200 กรัม หรือมีขนาดความกว้างกระดองประมาณ 90 มิลลิเมตรขึ้นไป ซึ่งเป็นปูที่โตเต็มวัยแล้ว ปูตัวอย่างแต่ละตัวจะถูกวัดลักษณะต่างๆ ด้วย vernier caliper ความละเอียด 0.02 มิลลิเมตร โดยมีลักษณะต่าง ๆ ที่วัด 51 ลักษณะ (ตารางที่ 1) ประกอบด้วยลักษณะของกระดอง 19 ลักษณะ ลักษณะของก้าม 22 ลักษณะ ลักษณะของขาเดินคู่ที่ 3 ข้างขวา 3 ลักษณะ ลักษณะของขาว่ายน้ำ 5 ลักษณะ ความยาวของท้อง (abdominal length) และ ความหนาของลำตัว (body depth) ข้อมูลที่ได้จากการวัดจะถูกใช้ในการวิเคราะห์ Canonical Variant Analysis(CVA) และ Mahalanobis' Distance ซึ่งวิธีการทั้งสองนี้ใช้เพื่อการจำแนกและแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มของตัวอย่าง (Jobson, 1992; Afifi and Clark, 1996)

การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อการจำแนกกลุ่ม (discriminant analysis) ด้วยการวิเคราะห์ CVA การวิเคราะห์ CVA เป็นการวิเคราะห์เพื่อการจำแนกกลุ่มของตัวอย่างด้วยข้อมูลจากตัวแปรหลายหลายตัวแปร โดยตัวแปรที่ใช้อาจเป็นข้อมูลที่ได้จากการนับจำนวนหรือการวัดความยาวจากตัวอย่างที่ศึกษา โดย CVA จะทำการสร้างตัวแปรใหม่ซึ่งเรียกว่า canonical variable โดยใช้ canonical discriminant function

ซึ่งจะทำการรวบเอาข้อมูลจากตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกกลุ่มเข้าด้วยกัน จำนวน canonical variable จะขึ้นกับจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา สมการ canonical discriminant function คือ

$$Z = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_px_p \quad (1)$$

โดย Z คือตัวแปรใหม่ที่ถูกสร้างขึ้น (canonical variable); $a_1, a_2, a_3, \dots, a_p$ คือ สัมประสิทธิ์ของสมการการจำแนกกลุ่ม; $x_1, x_2, x_3, \dots, x_p$ คือ ตัวแปรจำแนกกลุ่ม จำนวน canonical discriminant function เท่ากับ $k-1$ เมื่อ k คือ จำนวนกลุ่มของตัวแปรที่ศึกษา ตัวแปร canonical variable ที่ถูกสร้างขึ้นจากสมการที่ 1 (CVA1) และสมการที่ 2 (CVA2) จะถูกนำไปเขียนกราฟเพื่อแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง การวิเคราะห์ CVA ดำเนินการโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for windows version 12.0 (SPSS Inc., Chicago)

การวิเคราะห์ CVA จะทำใน 2 รูปแบบคือ รูปแบบแรกเป็นการวิเคราะห์เพื่อการจำแนกกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกโดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง ซึ่งการวิเคราะห์รูปแบบนี้จะมีปูที่วิเคราะห์ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว การวิเคราะห์รูปแบบที่ 2 เป็นการวิเคราะห์เพื่อการจำแนกกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง ดังนั้นจะมีกลุ่มปูสำหรับการวิเคราะห์ในรูปแบบนี้ทั้งหมด 10 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มปูดำ กลุ่มปูม่วง และกลุ่มปูขาวจากจังหวัดตราด กลุ่มปูดำ กลุ่มปูเขียว กลุ่มปูม่วง และกลุ่มปูขาวจากจังหวัดระนอง กลุ่มปูดำและกลุ่มปูขาวจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี และกลุ่มปูดำจากประเทศพม่า

การวิเคราะห์ Mahalanobis' Distance เป็นการแสดงระยะห่างระหว่างจุด centroid ของกลุ่มตัวอย่างดำเนินการวิเคราะห์ใน 2 รูปแบบ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ CVA โดยทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ STATISTICA for windows version 6.0 (StatSoft Inc., USA) ผล Mahalanobis' Distance ที่คำนวณได้จะถูกใช้เป็นข้อมูลในการสร้าง phenetic tree โดยเตรียมให้อยู่ในรูป pairwise distance matrix แล้วสร้าง tree ด้วยวิธี Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average (UPGMA) ด้วยโปรแกรม NEIGHBOR ใน PHYLIP package version 3.63 (Felsenstein, 2004)

ตารางที่ 1 ลักษณะ morphometric เพื่อการวิเคราะห์ CVA และ Mahalanobis' Distance

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	DLSorb	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	LPL	49	Left orbit width	LOW
24	Right pollex length	RPL	50	Right orbit width	ROW
25	Left pollex width	LPLW	51	Carapace width at spine 2	CW2
26	Right pollex width	RPLW			

3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *Cytb* และ *16S rRNA*

3.4.1 การแยกสกัด Total genomic DNA

ปูทะเลตัวอย่างที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ ภายหลังการวัดลักษณะ morphometric เรียบร้อยแล้ว ถูกนำมาแช่แข็งไว้ที่ -20°C เนื้อเยื่อปูทะเลจำนวน 74 ตัว จากขาเดิน (walking leg) ประมาณ 50 – 70 mg ถูกนำมาใช้ในการสกัด total genomic DNA โดยใช้ชุดสกัด QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

3.4.2 การออกแบบไพรเมอร์

ยีนเป้าหมายของการศึกษาคือยีน *Cyt b* และ *16S rRNA (LrRNA)* ซึ่งมีตำแหน่งดังรูปที่ 1

Penaeus monodon



Portunus trituberculatus



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของยีนเป้าหมายในสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกับปูทะเล

เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายจึงทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งอยู่ในยีน *ND6* *ND1* และ *12S rRNA (SrRNA)* เนื่องจากยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ND6* และ *12s rRNA* ของปูในสกุล *Scylla* ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์จึงต้องใช้ข้อมูลจากบริเวณอนุรักษ์สูง (highly conserved region) ของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกับปูทะเลสกุล *Scylla* ซึ่งในฐานข้อมูลพบว่า *Portunus trituberculatus*, *Callinectes sapidus*, *Pseudocarcinus gigas*, *Penaeus monodon* และ *Pagurus longicarpus* สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งสิ่งมีชีวิตทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวมีอนุกรมวิธานเปรียบเทียบกับของปูทะเล *Scylla* แสดงในตารางที่ 4

ผลการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Oligo V9.11 ทำให้ได้ไพรเมอร์ SS1 อยู่ในบริเวณยีน *ND6* และ SS11 อยู่ในบริเวณยีน *ND1* ก่อนไปทางปลาย 5' และออกแบบไพรเมอร์ SS20 อยู่ในบริเวณยีน *ND1* ก่อนไปทางปลาย 3' และไพรเมอร์ SS19 อยู่ในยีน *12S rRNA* สำหรับลำดับของ PCR primer ทั้งหมดแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต่างๆเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ยีน *Cytb* และ *16S rRNA*

Primer's name	Type of primer	Nucleotide sequence	Final products(bp)
SS1	PCR & SEQ	ACGTTACATCTTTAGCCTCTAATG	1700
SS11	PCR	GAAACTAACCGAACACCTTTTCGA	1700
BSS1F1	SEQ	AAAGGACCTTTACGTCTTTCCC	800
BSS1F2	SEQ	CCTTTATTATTGCCGCAATAAC	800
SS20	SEQ	AAATCATGTACATATCGCCCGTC	1700
SS19	SEQ	AAGCATGTACATATCGCCCGTC	1700
BS20F1	SEQ	GCTCCAATAAAGTTACAAAAGCC	800
BS20F2	SEQ	TAGGGTCTTATCGTCCCTCTA	800
BS520F3	SEQ	TTTTGTGTGTGAGCAGGCTAGA	800

PCR = PCR primer, SEQ = sequencing primer, B=black morph

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูม้า

Primer's name	Type of primer	Nucleotide sequence	Final products(bp)
SS1	PCR, SEQ	ACGTTACATCTTTAGCCTCTAATG	4,000 ,800
SS10	PCR,SEQ	AAATATATTAGATCAAGGTGCAGC	4,000.,800
PSS1F1	SEQ	CGTGCTTCCATGAGGTCAAATG	800
PSS10R1	SEQ	GCTGAATAAAGTACAGCGTCTCAC	800
PSS2F2	SEQ	CCTGCTCACATTCAACCGGAA	800
PSS10R2	SEQ	AAAGTGTTCTAATTTAGGTTAAGC	800
PSS1F3	SEQ	CATAAGCTTGTACATACCGAAGACG	800
PSS10R3	SEQ	GCTGTCTCTTTCATTAAAATTGA	800

PCR=PCR primer, SEQ= sequencing primer, P= *Porutnus pelagicus*

ตารางที่ 4 แสดงอนุกรมวิธานและ accession number ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อการออกแบบไพรเมอร์

อนุกรมวิธาน	<i>Scylla</i>	<i>Portunus trituberculatus</i>	<i>Callinectes sapidus</i>	<i>Pseudocarcinus gigas</i>	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Pagurus longicarpus</i>
Superkingdom	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota
Kingdom	Metazoa	Metazoa	Metazoa	Metazoa	Metazoa	Metazoa
Phylum	Arthropoda	Arthropoda	Arthropoda	Arthropoda	Arthropoda	Arthropoda
Subphylum	Crustacea	Crustacea	Crustacea	Crustacea	Crustacea	Crustacea
Class	Malacostraca	Malacostraca	Malacostraca	Malacostraca	Malacostraca	Malacostraca
Subclass	Eumalacostraca	Eumalacostraca	Eumalacostraca	Eumalacostraca	Eumalacostraca	Eumalacostraca
Superorder	Eucarida	Eucarida	Eucarida	Eucarida	Eucarida	Eucarida
Order	Decapoda	Decapoda	Decapoda	Decapoda	Decapoda	Decapoda
Suborder	Pleocyemata	Pleocyemata	Pleocyemata	Pleocyemata	Dendrobranchiata	Pleocyemata
Infraorder	Brachyura	Brachyura	Brachyura	Brachyura		Anomura
	Eubrachyura	Eubrachyura	Eubrachyura	Eubrachyura		
Superfamily	Portunoidea	Portunoidea	Portunoidea	Xanthoidea	Penaeoidea	Paguroidea
Family	Portunidae	Portunidae	Portunidae	Eriphiidae	Penaeidae	Paguridae
genus	<i>Scylla</i>	<i>Portunus</i>	<i>Callinectes</i>	<i>Pseudocarcinus</i>	<i>Penaeus</i>	<i>Pagurus</i>
Accession						
Number	-	NC_005037	AY363392	AY562127	AF217843	NC_003058

3.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *Cytb* และ *16S rRNA*

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *Cytb* ด้วย polymerase chain reaction ซึ่งภายในหลอดปฏิกิริยา 50 μ l ประกอบด้วย 10xHigh Fidelity PCR buffer 5 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 5 μ l, 2.5 mM dNTP mix 4 μ l, primer(SS1,SS11) 2 μ l , High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentus Life Sciences, USA) 0.5 μ l, Total DNA 4 μ l และ H_2O 27.5 μ l โดยมี thermal cycling condition ดังต่อไปนี้คือ

Initial denaturation	94°C	1 min	} 35 cycles
Denaturation	94°C	20 sec	
Annealing	52°C	30 sec	
Elongation	68°C	2 min	
และ Final elongation	68°C	10 min	

ผลปรากฏว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 1,700 bp (รูปที่ 1) ดังนั้นจึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *Cytb* จากปฏิตัวอย่างทั้งหมด (ปูขาว ปูเขียว ปูดำ และปูม่วง) เมื่อได้ PCR product แล้วจึงนำไปทำบริสุทธิ์ (purification) โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Mannheim, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต PCR product ที่ทำบริสุทธิ์แล้วจะส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทให้บริการคือ MACROGEN Inc. (Korea) โดยครั้งแรกใช้ SS1 เป็น sequencing primer เมื่อได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนแรกแล้ว จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของปูแต่ละชนิดมาใช้ออกแบบ sequencing primer ลำดับต่อไป คือ SS1F1 และทำเช่นนี้นับจนจบสิ้นชิ้น PCR product ซึ่งในส่วนชิ้น *Cytb* ต้องออกแบบไพรเมอร์ 2 ชิ้นคือ SS1F1 และ SS1F2 (ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในตารางที่ 2)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *16S rRNA* ใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาเหมือนกรณี *Cytb* แต่ไพรเมอร์ที่ใช้คือ SS20 และ SS19 ซึ่งมี thermal cycling condition ดังต่อไปนี้

Initial denaturation	94°C	1 min	} 35 cycles
Denaturation	94°C	20 sec	
Annealing	50°C	30 sec	
Elongation	68°C	1.45 min	
และ Final elongation	68°C	10 min	

ผลปรากฏว่าได้ PCR product ขนาดประมาณ 1,800 bp (ดังรูปที่ 13) ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์คู่นี้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *16S rRNA* จากปฏิตัวอย่างทั้งหมด และนำ PCR product ไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทให้บริการ (MACROGEN Inc., Korea) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสาย PCR product โดยใช้ walking primer (BS20F1, BS20F2 และ BS20F3) เหมือนกรณียีน *Cytb*

3.4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *Cytb* และ *16S rRNA* ของปูม้า

เนื่องด้วยโครงการวิจัยตั้งใจว่าจะใช้ปูม้าเป็น outgroup ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) ดังนั้นจึงต้องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *Cytb* และ *16S rRNA* ของปูม้าจำนวน 10 ตัว ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปูม้าได้ใช้ไพรเมอร์ SS1 และ SS10 ซึ่งออกแบบจากข้อมูลดีเอ็นเอปูม้าญี่ปุ่น (*Portunus trituberculatus*) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปูม้า ในหลอดปฏิกิริยา 50 μ l มีองค์ประกอบ เช่นเดียวกับกรณีของปูทะเล แต่มี thermal cycling condition ต่อไปนี้คือ

Initial denaturation	94°C	1 min	} 35 cycles
Denaturation	94°C	20 sec	
Annealing	50°C	30 sec	
Elongation	68°C	4 min	
และ Final elongation	68°C	10 min	

ผลปรากฏได้ PCR product มีขนาดประมาณ 4 kb (ดังรูปที่ 14) PCR product นำไปทำบริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit และส่ง purified PCR product ของปูม้าจำนวน 10 ตัวไปวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่บริษัทให้บริการ (MACROGEN Inc., Korea) โดยใช้ SS1 และ SS10 เป็น sequencing primer ในขั้นแรกและหลังจากนั้นจึงออกแบบ walking primer ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้งหมดแสดงไว้ในตารางที่ 3 จากทั้งสองปลายและวิเคราะห์ลำดับไปจนกระทั่งได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตอนกลางของ PCR product เป็น contig sequence กัน ผลลำดับนิวคลีโอไทด์จึงนำไปวิเคราะห์ขั้นต่อไป

3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb* และ *16S rRNA* ของปูทะเลและปูม้า

ครั้งแรกเมื่อได้รับผลจากบริษัทให้บริการ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์จะต้องถูกตรวจสอบโดยละเอียดว่าลำดับที่ได้ น่าเชื่อถือหรือไม่ โดยพิจารณา electrophoretogram ว่า peak ของแต่ละเบสชัดเจนมากน้อยแค่ไหน ถ้าไม่น่าเชื่อถือก็จะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใหม่จนได้ผลเป็นที่น่าพอใจ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละครั้งต่อกันเพื่อสร้าง contig sequence ด้วยโปรแกรม CAP3 ที่ <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php> หลังจากนั้นจึงนำเอา contig sequence ของปูทุกตัวมาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW version 1.8 (Thompson *et al.*, 1997) ผลที่ได้จากการทำ alignment จะใช้ในการสร้าง phylogenetic tree ของปูทะเล 74 ตัวและปูม้า 10 ตัว ด้วยวิธี neighbors joining (NJ), maximum parsimony (MP) และ maximum likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) เพื่อสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี MP จะคำนวณค่าอัตราส่วนการกลายพันธุ์แบบ transition ต่อการกลายพันธุ์แบบ transversion (TS/TV ratio) ด้วยโปรแกรม MEGA v3.1 (Kumar, *et al.*, 2004) ค่า TS/TV ที่ได้ จะใช้ในการถ่วงน้ำหนัก (weight) การกลายพันธุ์แต่ละรูปแบบ การหา parsimony tree ใช้วิธี heuristic

search กำหนดให้การนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเข้าสู่การวิเคราะห์เป็นไปโดยสุ่ม การ rearrangement ใช้วิธี TBR search การทดสอบความเชื่อมั่นของ parsimony tree ใช้การทดสอบ bootstrap โดยกำหนดให้มีการทดสอบ 100 ซ้ำ แล้วสร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority-rule คือกำหนดให้แต่ละ branch ที่ปรากฏใน consensus tree ต้องปรากฏอย่างน้อย 50% ใน phylogenetic tree ทั้งหมดที่ได้จากการทดสอบ bootstrap

แบบจำลองการกลายพันธุ์แบบการแทนที่เบส (base substitution model) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดถูกทดสอบด้วยวิธี Likelihood Ratio Test (LRT) โดยโปรแกรม Modeltest V3.7 (Posada and Crandall, 1998) เพื่อใช้ในการสร้าง phylogenetic tree แบบ NJ และ ML การสร้าง phylogenetic tree แบบ NJ จะใช้ผลการเลือกแบบจำลองการแทนที่เบสที่ได้มาใช้ในการคำนวณ genetic distance แล้วสร้าง phylogenetic tree จาก genetic distance ที่ได้ด้วยวิธี NJ ทดสอบความเชื่อมั่นของ phylogenetic tree ที่ได้ด้วยการทดสอบ bootstrap จำนวน 100 ซ้ำ และสร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority-rule การสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี ML ใช้แบบจำลองการแทนที่เบสรวมทั้งค่าทางสถิติประกอบด้วย base frequency, gamma shape และ proportion of invariable site ที่คำนวณโดยโปรแกรม Modeltest V3.7 เป็นข้อมูลในการสร้าง ML phylogenetic tree ที่มีค่า $-\ln$ likelihood ต่ำที่สุด ซึ่งหมายถึงว่ามีความน่าจะเป็นสูงที่สุด

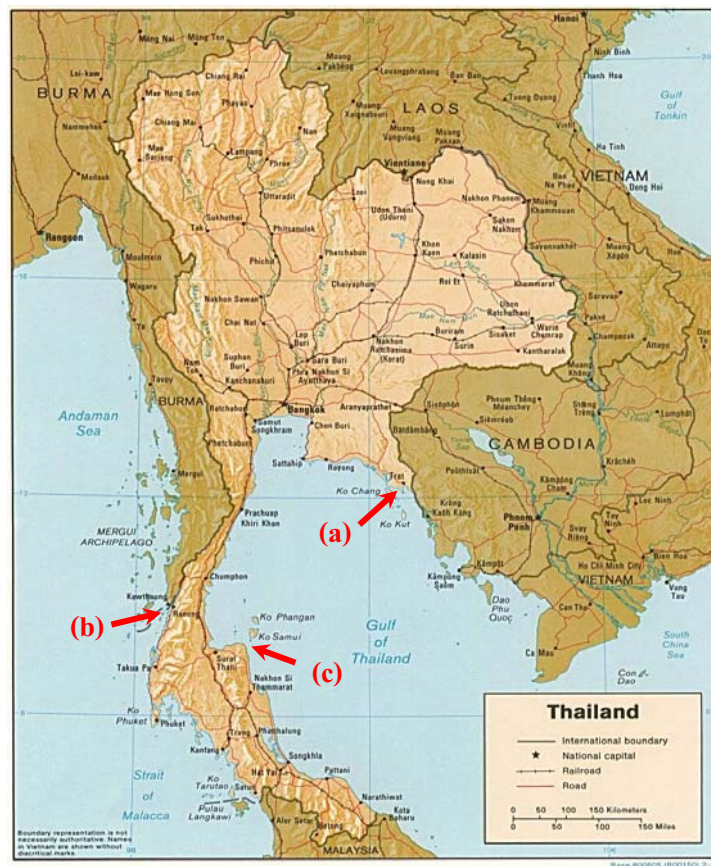
4. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างปูทะเล

การเก็บตัวอย่างปูในโครงการฯ มีบริเวณเป้าหมายในการรวบรวมปูตัวอย่างจาก 3 แหล่ง คือ แหล่งที่ 1 จากบริเวณจังหวัดจันทบุรี-จังหวัดตราด แหล่งที่ 2 จากบริเวณจังหวัดสุราษฎร์ธานี และแหล่งที่ 3 จากบริเวณจังหวัดระนอง (รูปที่ 2) และจากการเดินทางเก็บตัวอย่างจากจังหวัดระนอง โครงการฯ สามารถรวบรวมปูจากประเทศมาเพิ่มเติมได้อีกจำนวนหนึ่ง โดยจำนวนปูตัวอย่างจากแต่ละแหล่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 5 ผลการรวบรวมตัวอย่างปูทะเลได้ทั้งหมด 195 ตัวและปูม้า 10 ตัว สรุปได้ว่าสามารถรวบรวมปูทะเลที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างกัน (ตามสี) ได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว อย่างไรก็ตาม ในแต่ละแหล่งเก็บตัวอย่างจะมีกลุ่มปูตัวอย่างที่พบไม่เหมือนกัน โดยจังหวัดระนองสามารถพบปูได้ทั้ง 4 กลุ่ม แต่ปูที่พบมากที่สุดคือ ปูดำ ส่วนปูเขียว ปูม่วงและปูขาวเป็นปูที่หายาก โดยเฉพาะปูเขียว จังหวัดตราดพบปู 3 กลุ่มคือ ปูดำ ปูม่วงและปูขาว โดยปูขาวเป็นปูที่พบมากที่สุดและพบตลอดทั้งปี ส่วนจังหวัดสุราษฎร์ธานีพบปูทะเลเพียง 2 กลุ่มคือ ปูดำและปูขาว โดยพบปูขาวมากกว่าปูดำ จากข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างสามารถสรุปได้ว่า จังหวัดระนองเป็นจังหวัดที่มีความหลากหลายของปูทะเลมากที่สุด และปูทะเลแต่ละกลุ่มมีการแพร่กระจายในเขตน่านน้ำประเทศไทยแตกต่างกัน ผู้วิจัยยังได้เดินทางไปเก็บรวบรวมตัวอย่างปูทะเลจากจังหวัดเพชรบุรีและนครศรีธรรมราชพบว่าปูทะเลทางฝั่งทะเลตะวันตกของอ่าวไทย(รวมถึงสุราษฎร์ธานีด้วย)นั้นมีเพียง 2 ชนิด คือ ปูดำและปูขาว (ข้อมูลยังไม่ได้ดีพิมพ์) ปูทะเลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาเป็นปูที่ซื้อจากชาวประมงโดยตรง หรือจากพ่อค้าคนกลางที่รวบรวมปูในบริเวณหมู่บ้านประมง เพื่อให้แน่ใจว่าปูที่ได้เป็นปูทะเลจากพื้นที่เป้าหมายอย่างแท้จริง เนื่องจากปูทะเลที่รวบรวมได้จะถูกใช้ทั้งเพื่อการวิเคราะห์ดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจะไม่มีข้อจำกัดของปูตัวอย่างทั้งในเรื่องขนาด เพศ และความสมบูรณ์ของอวัยวะของปูตัวอย่าง แต่ 3 ปีที่แล้วดังกล่าวนี้อาจมีอุปสรรคต่อการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric ดังนั้นปูที่รวบรวมจึงเป็นปูเพศผู้เพื่อป้องกันความแตกต่างของลักษณะ morphometric ระหว่างเพศผู้กับเพศเมียและมีน้ำหนักประมาณ 200 กรัม ซึ่งเป็นปูที่โตเต็มวัยแล้วและต้องเป็นปูที่มีอวัยวะครบ เพื่อไม่ให้มีข้อมูลสูญหายของลักษณะ morphometric ที่วัดได้ ยกเว้นในกรณีปูเขียวซึ่งเป็นปูที่พบเฉพาะแหล่งเก็บตัวอย่างจังหวัดระนอง และเป็นปูที่ชาวประมงจับได้น้อยมาก ดังนั้นจึงทำการรวบรวมปูทั้ง 2 เพศทุกขนาดและมีปูบางตัวพิการ แล้วจึงเลือกปูที่มีลักษณะเหมาะสมวัดขนาดสำหรับใช้วิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric ซึ่งปูเหล่านี้จะถูกใช้วิเคราะห์ดีเอ็นเอร่วมกับปูเขียวที่มีลักษณะไม่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric (พิการ เพศเมียหรือมีขนาดตัวใหญ่หรือเล็กเกินไป) ดังนั้น ทำให้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอมีตัวอย่างปูเขียว (17 ตัว) ใกล้เคียงกับปูกลุ่มอื่น ๆ (15-20 ตัว) นอกจากปูทะเล 4 กลุ่มดังกล่าวแล้วโครงการฯ ได้ซื้อปูม้าจำนวน 10 ตัวจากจังหวัดตราดเพื่อใช้เป็น outgroup ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนปูตัวอย่างกลุ่มต่างๆ จากแหล่งเก็บตัวอย่างแต่ละแหล่งที่ใช้ในศึกษา

	ปูดำ	ปูเขียว	ปูม่วง	ปูขาว	ปูม้า
จังหวัดตราด - จันทบุรี	20	-	20	20	10
จังหวัดระนอง	20	21	16	18	-
จังหวัดสุราษฎร์ธานี	20	-	-	20	-
ประเทศพม่า	20	-	-	-	-



รูปที่ 2 แสดงบริเวณเก็บตัวอย่างจากจังหวัดตราด-จันทบุรี (a) จังหวัดระนอง (b) และ จังหวัดสุราษฎร์ธานี (c)

4.2 ผลการจำแนกชนิดปูทะเลเบื้องต้นโดยใช้ลักษณะภายนอก

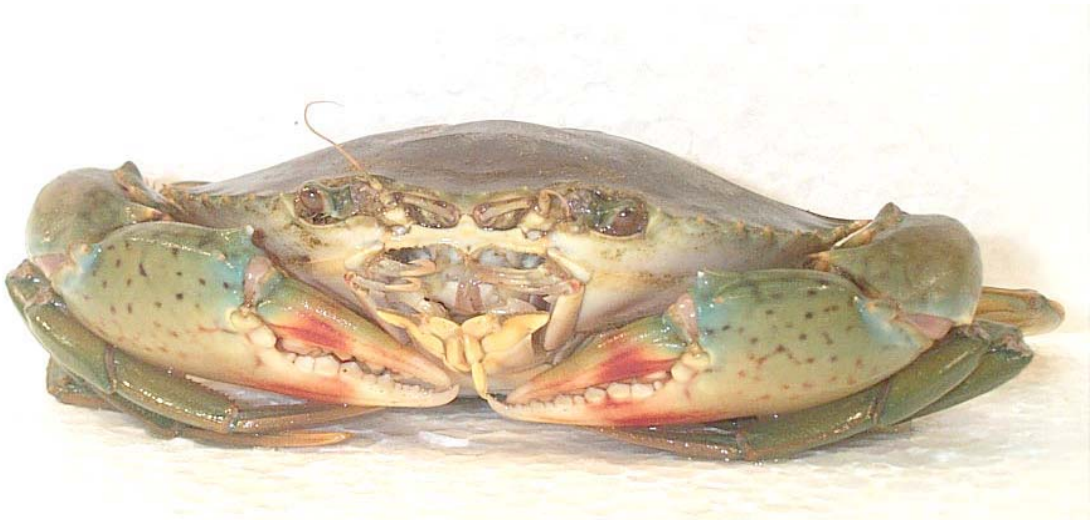
ปูทะเลแต่ละกลุ่มสีจะถูกนำมาจำแนกชนิดตามวิธีการของ Estampador(1949a) และ Keenan *et al.* (1998) ลักษณะภายนอก (morphology) ที่แตกต่างกันทั้งในเรื่องของสีกระดอง จำนวนหนามที่บริเวณก้ามปล้องกลาง รูปทรงของหนามระหว่างช่องตา (frontal spine) และการปรากฏของลายร่างแห โดยปูแต่ละกลุ่มมีลักษณะดังต่อไปนี้

ปูดำ (รูปที่ 3) หนามระหว่างช่องตาปานมน สัน ความสูงอยู่ในระดับเสมอกันหรือเกือบเสมอกันทุกอัน; กระดองสีโทนดำหรือน้ำตาลเข้ม; ขอบนอก (margin) ของก้ามปล้องกลาง (carpus) มีหนามแหลม 1 อัน บริเวณที่เหลื่อเรียบ ทั้ง 2 ก้าม; บริเวณด้านบนของก้าม (ฝ่ามือ: palm) หลังตำแหน่งที่นิ้ว (dactyl) สอดเข้าไปในฝ่ามือมีหนามแหลม 1 อันอยู่ด้านใน ส่วนด้านนอกหนามอาจลดรูปจนเรียบ อาจมีปุ่มปลายปานมน หรือปุ่มปลายแหลม 1 อัน โดยหนามอันในขนาดใหญ่กว่าอันนอก; หนามขอบกระดอง (anterolateral carapace spine) มีขนาดใหญ่ ขอบนอก (margin) ของหนามขอบกระดองโค้งชัดเจน; ระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 9 สั้นกว่าระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 8; ขาว่ายน้ำและขาเดิน ไม่มีลายร่างแห; ก้ามไม่มีลายร่างแห ด้านนอกสีโทนแดง โดยเฉพาะบริเวณปลายนิ้ว (pollex และ dactyl);



รูปที่ 3 ปูดำ

ปูขาว (รูปที่ 4) หนามระหว่างช่องตาแหลมคม หนาม 2 อันกลางยาวกว่าหนาม 2 อันด้านข้าง; กระจกโทนสีเขียว; ขอบนอก (margin) ของก้ามปล้องกลาง (carpus) มีหนามแหลมคม 2 อัน หรือ หนามแหลม 1 อันกับปุ่มหรือรอยนูนอีก 1 อัน ก้ามซ้ายและขวาอาจจะมีรูปทรงหนามของก้ามปล้องกลาง ต่างกัน; บริเวณด้านบนของก้าม (ฝ่ามือ: palm) หลังตำแหน่งที่นิ้ว (dactyl) สอดเข้าไปในฝ่ามือมีหนามแหลม คม 2 อัน อันในใหญ่กว่าอันนอก; หนามขอบกระดูก (anterolateral carapace spine) มีขนาดใหญ่ ขอบ นอก (margin) ของหนามขอบกระดูกเกือบทุกอันเป็นเส้นตรง; ระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 9 ยาว กว่าหรือเท่ากับระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 8; ขาวว่ายน้ำมีลายร่างแหที่มีช่องขนาดเล็ก; ก้ามด้านนอก สีพื้นสีเขียว มีจุดหรือเส้นสีเขียวเข้มหรือน้ำตาลกระจายไม่เป็นระเบียบ



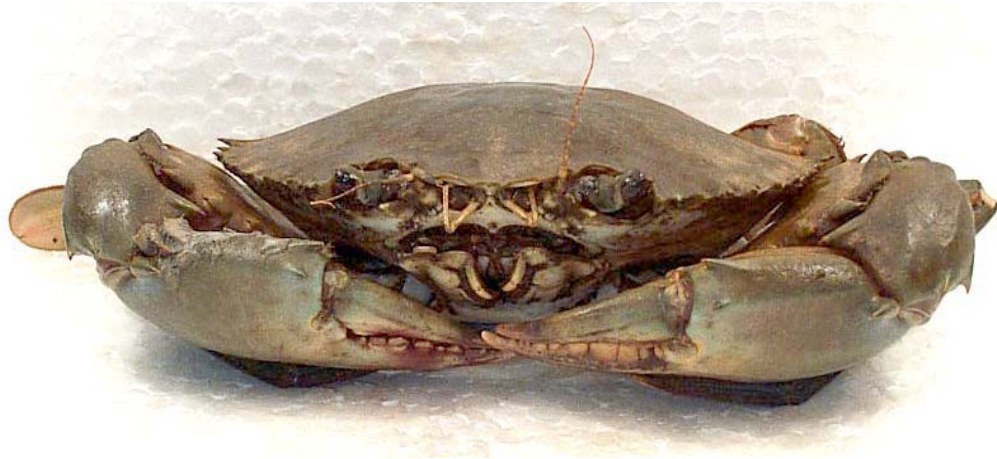
รูปที่ 4 ปูขาว

ปูเขียว (รูปที่ 5) หนามระหว่างช่องตายาวเรียว หนาม 2 อันกลางยาวกว่าหนาม 2 อันด้านข้าง; กระดูกโทนสีเขียว ส่วนใหญ่สีเขียวมะกอก; ขอบนอก (margin) ของก้ามปล้องกลาง (carpus) มีหนามยาวแหลมคม 2 อัน ทั้ง 2 ก้าม; บริเวณด้านบนของก้าม (ฝ่ามือ: palm) หลังตำแหน่งที่นิ้ว (dactyl) สอดเข้าไปในฝ่ามือมีหนามยาวแหลมคม 2 อัน อันในใหญ่กว่าอันนอก; หนามขอบกระดูก (anterolateral carapace spine) มีขนาดเล็กเรียว ขอบนอก (margin) ของหนามขอบกระดูกเป็นเส้นตรงหรือโค้งเล็กน้อย; ระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 9 ยาวกว่าหรือเท่ากับระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 8; ขาว่ายน้ำและขาเดินมีลายร่างแหที่มีช่องขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน; ก้ามมีสีพื้นเป็นสีเขียวมีลายร่างแหที่มีช่องขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน



รูปที่ 5 ปูเขียว

ปูม่วง หรือ ปูทองโหลง (รูปที่ 6) หนามระหว่างช่องตาปานมน ยาว ความสูงอยู่ในระดับเสมอกัน หรือเกือบเสมอกันทุกอัน; กระดูกโทนสีเขียว; ขอบนอก (margin) ของก้ามปล้องกลาง (carpus) มีหนามยาวแหลมคม 2 อัน ทั้ง 2 ก้าม; บริเวณด้านบนของก้าม (ฝ่ามือ: palm) หลังตำแหน่งที่นิ้ว (dactyl) สอดเข้าไปในฝ่ามือมีหนามยาวแหลมคม 2 อัน อันในใหญ่กว่าอันนอก; ขอบนอก (margin) ของหนามขอบกระดูก (anterolateral carapace spine) โค้ง; ระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 9 ยาวกว่าหรือเท่ากับระยะทางระหว่างปลายหนามคู่ที่ 8; ขาวายน้ำมีลายร่างแหที่มีช่องขนาดใหญ่; ก้ามไม่มีลายร่างแห ด้านนอกสีโทนแดงหรือม่วง



รูปที่ 6 ปูม่วง หรือ ปูทองโหลง

นอกเหนือจากลักษณะทั่วไปของปูทะเลแล้ว ปูทะเลแต่ละชนิดมีลักษณะเด่นไม่เหมือนกัน และลักษณะเด่นเหล่านั้นถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดปูทะเล กล่าวคือ Estampador (1949a) ใช้ลักษณะเหล่านี้ในการจำแนก คือ สีกระดอง ขาเดิน และสีก้าม, polygonal pigmented area, ความยาวของก้ามเมื่อเปรียบเทียบกับกระดอง หนามด้านนอก บนฐานของนิ้ว (outer spine on base of finger), frontal teeth, contour of body และ H-like figure บนกระดอง (ตารางที่ 6) ลักษณะที่นำมาใช้จำแนกชนิดปูทะเลของ Estampador (1949a) คือ ลักษณะสีกระดอง ขาเดิน และก้าม ซึ่งเป็นลักษณะเอกลักษณ์ที่สามารถใช้จำแนกชนิดปูทะเลออกจากกันได้ ส่วนลักษณะอื่นที่เหลือซึ่งเป็นลักษณะที่แปรปรวนได้ตามสภาวะแวดล้อม (Stephenson and Campbell, 1960) Estampador (1949a) จะใช้เป็นลักษณะประกอบเพื่อการจำแนกที่ชัดเจน ทั้งนี้เพราะลักษณะที่เหลือเกือบทั้งหมดจะจำแนกปูทะเลออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ปูเขียว-ปูม่วง และปูดำ-ปูขาว นอกจากนั้น Estampador (1949a) ยังใช้ลักษณะ morphometric คือ ความยาวก้ามเปรียบเทียบกับความกว้างของกระดอง แต่ลักษณะเหล่านี้ใช้ได้เพียงแบ่งกลุ่มปูทะเล

ส่วน Keenan *et al.* (1998) ใช้ลักษณะภายนอกหลัก คือ frontal lobe spine ลักษณะก้ามโดยเน้นที่ carpus และ propodus spine และลักษณะทาง morphometric อีก 3 ลักษณะ คือ ICS/OCS, FMSH/FW และ FW/ICW (ตารางที่ 7) ลักษณะเอกลักษณ์ที่ใช้จำแนกชนิดได้โดยชัดเจนคือ frontal lobe spine ซึ่งควรเป็นหลักในการจำแนกชนิดได้ดี ส่วนลักษณะอีก 2 ประเภทที่เหลือเป็นลักษณะที่ใช้จำแนกปูทะเลเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ ปูเขียว-ปูม่วง และปูดำ-ปูขาว เช่นเดียวกับกรณีของ Estampador (1949a) ส่วนลักษณะ morphometric 3 ลักษณะที่ใช้อาจก่อให้เกิดความยุ่งยากในการวัดพอสมควร โดยเฉพาะลักษณะที่ 2 คือ FMSH/FW ซึ่งย่อมขึ้นอยู่กับนักวิจัยแต่ละคนว่าจะมีความละเอียดมากน้อยอย่างไร

สำหรับผลการวิจัยนี้จากการศึกษาลักษณะภายนอกจากปูตัวอย่างทั้งหมดเสนอให้ใช้ลายร่างแห (polygonal pigmented area) บนขาว่ายน้ำ (ใบพาย) และขาเดิน ในการจำแนกปูดำออกจากปูชนิดอื่น ๆ (ปูขาว, ปูเขียว และปูม่วง) และรูปร่างของหนามระหว่างตา (frontal lobe spines) ซึ่งสอดคล้องกับกรณีของ Keenan *et al.* (1998) แต่ Keenan *et al.* (1998) ไม่ได้สนใจ polygonal pigmented area ซึ่งก็ควรเป็นเช่นนั้น เพราะว่าการศึกษาวินิจฉัยกำหนดตัวอย่างไว้ที่ขนาดปูหนักกว่า 200 กรัม ซึ่งเป็นปูใหญ่ สำหรับปูดำใหญ่จะไม่มีลายร่างแหบนขาว่ายน้ำ แต่สำหรับปูเล็กซึ่งมีความกว้างกระดองไม่เกิน 9 ซม. ปูเล็กเหล่านี้จะมีลายร่างแหบนขาว่ายน้ำ ซึ่งเป็นผลจากผู้วิจัยไปรวบรวมปูตัวอย่างขนาดเล็กในบริเวณจังหวัดนครศรีธรรมราช (ข้อมูลยังไม่มีการตีพิมพ์)

โดยสรุปจากเอกสารและผลการวิจัยนี้ การจำแนกชนิดปูทะเลในภาคสนาม ลักษณะที่ควรใช้ประกอบในการจำแนกคือ สีกระดอง สีก้าม และ frontal lobe spines แต่ผู้ปฏิบัติต้องมีประสบการณ์พอสมควรแล้วจึงจะจำแนกปูทะเลได้ และต้องเป็นปูใหญ่เท่านั้น ส่วนปูเล็กยังเป็นปัญหาอยู่ ส่วนลักษณะอื่น ควรใช้ประกอบในการจำแนกทางห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะต่างๆที่ Estampador (1949a) ใช้ในการจำแนกชนิดปูทะเล

Characters	<i>S. oceanica</i>	<i>S. transquebarica</i>	<i>S. serrata</i>	<i>S. serrata</i> var. <i>paramamosain</i>
1. สีกระดอง ขาเดิน ก้าม	สีเขียว หรือ เขียวปนเทา	สีเขียวโอลีฟ หรือ ม่วงปนเขียว	สีน้ำตาลสนิมถึงสีม่วงน้ำตาล	สีน้ำตาล-เทา และมีสีเขียว น้ำเงิน ตรงข้อต่อของขาเดิน และก้าม
2. polygonal pigmented area	บนขาเดิน ก้าม และกระจับปิ้ง	เห็นชัดเจนบนขา สูดท้ายและกระจับปิ้งตัวเมีย		
3. ก้าม (cheliped)	ตัวผู้ยาวไม่เกิน 2 เท่าของกระดอง	สีแดง หรือสีม่วง ความยาวมากกว่า 2 เท่าของกระดอง		
4. outer spine on base of finger			obsolescent ไม่ชัดเจน เลื่อมสลาย ปู่ตัวใหญ่จะมีลักษณะกุด	จะไม่เท่ากันและไม่ลดรูป
5. frontal teeth			อยู่ในระดับเดียวกัน	คู่กลาง ยื่นไปข้างหน้า
6. contour ของลำตัว	ไม่โค้งนูนอย่างเด่นชัด	ไม่โค้งนูนอย่างเด่นชัด	โค้งนูนกว่าอย่างเด่นชัด	โค้งนูนกว่าอย่างเด่นชัด
7. H-like mark on carapace	ค่อนข้างเล็ก	ค่อนข้างเล็ก	เล็กน้อยกว่า	เล็กน้อยกว่า

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะต่างๆที่ Keenan *et al.*(1989) ใช้ในการจำแนกชนิดปูทะเล

	<i>S. serrata</i>	<i>S. transquebarica</i>	<i>S. paramamosain</i>	<i>S. olivacea</i>
1. Frontal lobe spines				
- shape				
- height	blunt point high	blunted moderate	Triangular Moderate Cy high	Rounded low
2. Cheliped				
- carpus spines	both obvious	both obvious	inner absent outer reduced	inner absent outer reduced
- propodus spine	obvious เค้นชัด	obvious เค้นชัด	obvious เค้นชัด	Reduced ถัดรูป
3. Morphometric หรือ morphological ratio				
(1) ICS/OCS	0.94	0.98	0.35	0.006
(2) FMSH/FW	0.061	0.43	0.058	0.029
(3) FW/ICW	0.371	0.412	0.377	0.415

FMSH = Frontal median spine height FW = Frontal width ICS = Inner carpus spine
ICW = Inner carapace width OCS = Outer carpus spine

จากการศึกษาลักษณะภายนอกของปูทั้ง 4 กลุ่มและประกอบด้วยแนวทางการจำแนกชนิดของ Estampador (1949a) และ Keenan *et al.* (1998) พบว่าไม่มีลักษณะหนึ่งลักษณะใดที่สามารถจำแนกปูทั้ง 4 กลุ่มออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่ต้องลักษณะภายนอกหลาย ๆ ลักษณะร่วมกัน จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มที่รวบรวมได้พบว่ามีลักษณะสำคัญที่สามารถใช้จำแนกปูแต่ละกลุ่มออกจากกันได้ดังนี้

ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก

- ลายร่างแห (polygonal pattern) บนขาว่ายน้ำและขาเดิน (รูปที่ 7)
- รูปร่างของหนามระหว่างตา (รูปที่ 8)
- สปีบริเวณด้านนอกของก้าม (รูปที่ 9)

4.2.1 ข้อเสนอแนะวิธีการจำแนกชนิดปูทะเล

1. ไม่มีลายร่างแหบนขาว่ายน้ำ

- 1.1 กระดองสีโทนดำหรือน้ำตาลเข้ม หนามระหว่างตาสั้นและโค้งมน บริเวณด้านนอกก้ามมีสีโทนแดงและไม่ปรากฏลายร่างแห ขอบนอกของก้ามปล้องกลางมีหนามแหลม 1 อัน..ปูดำ

2. มีลายร่างแหบนขาว่ายน้ำ

2.1 หนามระหว่างตาวาว แหลมคม มีรูปร่างสามเหลี่ยม

กระดองสีเขียวอ่อน บริเวณด้านนอกก้ามมีสีพื้นเป็นสีเหลืองอมเขียว และมีจุดสีเขียวเข้ม หรือน้ำตาลปรากฏกระจาย ขอบนอกของก้ามปล้องกลางมีหนามแหลม 2 อัน หรือ หนามแหลม 1 อัน รอยขน 1 อัน.....ปูขาว

2.2 หนามระหว่างตาโค้งมนหรือเรียวยาว

2.2.1 สีบริเวณด้านนอกของก้ามเป็นสีโทนม่วง ไม่มีลายร่างแห

กระดองสีเขียวมะกอก หนามระหว่างตาวาว โค้งมน บริเวณด้านนอกก้ามมีสีออกโทนม่วงไม่ปรากฏลายร่างแห อาจปรากฏลายร่างแหบนขาเดินคู่ที่ 3 ขอบนอกของก้ามปล้องกลางมีหนาม 2 อัน.....ปูม่วง

2.2.2 สีบริเวณด้านนอกของก้ามมีสีพื้นเป็นสีเขียว มีลายร่างแหชัดเจน

กระดองสีเขียวมะกอก หนามระหว่างตาเรียวยาว บริเวณด้านนอกก้ามมีสีพื้นสีเขียวมีลายร่างแหเห็นได้ชัดเจน และปรากฏลายร่างแหบนขาเดินทุกขา ขอบนอกของก้ามปล้องกลางมีหนาม 2 อัน.....ปูเขียว

(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



รูปที่ 7 แสดงรูปแบบของลายร่างแหบนขาว่ายน้ำและขาเดินของ (ก) ปูดำ (ข) ปูขาว (ค) ปูเขียว และ (ง) ปูม่วง

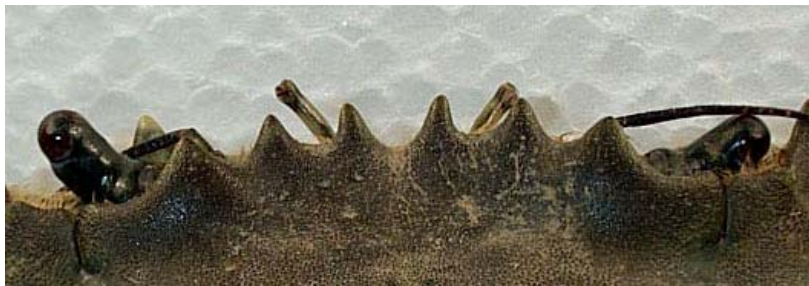
(ก)



(ข)



(ค)

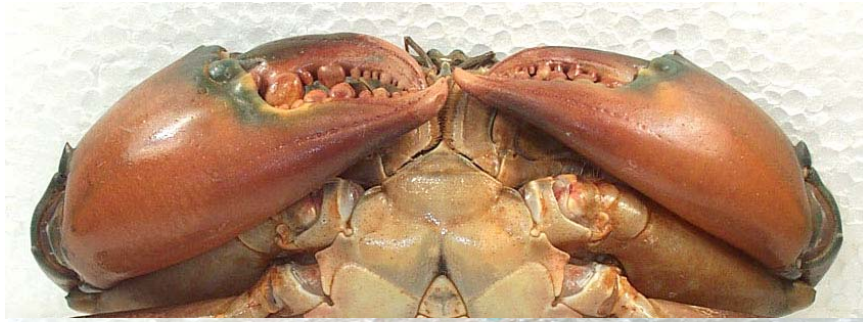


(ง)



รูปที่ 8 แสดงหนามระหว่างช่องตาของ (ก) ปูดำ หนามสั้นโค้งมน (ข) ปูขาว หนามยาวแหลม มีลักษณะเป็นสามเหลี่ยม (ค) ปูเขียว หนามยาวเรียว หนามคู่กลางยาวกว่าคู่ริม และ (ง) ปูม่วง หนามยาวโค้งมน ความสูงใกล้เคียงกัน

(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



รูปที่ ๑ แสดงก้ามของ (ก) ปูดำ (ข) ปูขาว (ค) ปูเขียว และ (ง) ปูม่วง

4.3 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะ morphometric

ปูตัวอย่างจากปูทะเลทั้ง 4 กลุ่มที่แบ่งตามลักษณะภายนอกจำนวน 183 ตัว ประกอบด้วย ปูดำ 80 ตัว ปูเขียว 9 ตัว ปูม่วง 36 ตัว และปูขาว 58 ตัว จากแหล่งเก็บตัวอย่าง 5 แหล่ง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 8 ปูตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้วิเคราะห์เป็นปูเพศผู้เพื่อป้องกันปัญหาความคลาดเคลื่อนอันเนื่องมาจากความแตกต่างของลักษณะระหว่างเพศผู้กับเพศเมีย (dimorphism) และปูที่ใช้จะมีน้ำหนักโดยเฉลี่ยประมาณ 200 กรัม หรือมีขนาดความกว้างกระดองประมาณ 90 มิลลิเมตรขึ้นไป ซึ่งเป็นขนาดปูที่โตเต็มวัยแล้ว จากข้อกำหนดดังกล่าวนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้มีปูเขียวในการวิเคราะห์น้อยกว่าปูชนิดอื่น เนื่องจากปูเขียวเป็นปูที่พบได้ยากมาก และพบเฉพาะจากแหล่งเก็บตัวอย่างจังหวัดระนอง นอกจากนี้ส่วนหนึ่งของปูที่พบเป็นปูเพศเมีย ส่วนปูเพศผู้ที่พบส่วนใหญ่จะมีขนาดใหญ่ มีน้ำหนักมาก อาจมีน้ำหนักตั้งแต่ 500 กรัม ไปจนถึงมากกว่า 1 กิโลกรัมทำให้ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ร่วมกับปูกลุ่มอื่นๆ ได้

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนปูแต่ละกลุ่ม และแหล่งเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาลักษณะ morphometric

กลุ่ม	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (จากแต่ละแหล่ง)
ปูดำ	60 ตัว	ตราด	20 ตัว
		ระนอง	20 ตัว
		สุราษฎร์ธานี	20 ตัว
		ประเทสพม่า	20 ตัว
ปูเขียว	9 ตัว	ระนอง	9 ตัว
ปูขาว	58 ตัว	ตราด	20 ตัว
		ระนอง	18 ตัว
		สุราษฎร์ธานี	20 ตัว
ปูม่วง	36 ตัว	ตราด	20 ตัว
		ระนอง	16 ตัว

CVA แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของลักษณะ morphometric ระหว่างปูดำ ปูเขียว ปูม่วงและปูขาว (Wilk's Lambda = 0.016; $F_{(39, 495.271)} = 38.143$; $P < 0.001$) ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าจากลักษณะที่วัดทั้งหมด 51 ลักษณะ มีลักษณะที่ให้ข้อมูลเพื่อการจำแนกกลุ่ม (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 ลักษณะความหนาของลำตัว (BD) โดยไม่พบว่าลักษณะที่วัดจากขาเดินคู่ที่ 3 ข้างขวาเกี่ยวข้องกับการจำแนกกลุ่ม ตารางที่ 9

แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical ซึ่งประกอบด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ 3 สมการ โดยสมการที่ 1 และ 2 เขียนได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{CVA1} = & (2.431)(\text{FMSH}) + (0.912)(\text{DFMS}) + (-0.087)(\text{DLPFS}) + (0.132)(\text{ECW}) + (0.310)(\text{RPoW}) + \\ & (-0.335)(\text{RCL}) + (-0.333)(\text{RCW}) + (0.052)(\text{RDL}) + (-0.199)(\text{LoPL}) + (0.674)(\text{UpPL}) + (- \\ & 0.136)(\text{BD}) + (-0.414)(\text{FM}) + (-0.157)(\text{CW1}) + 3.775 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CVA2} = & (0.155)(\text{FMSH}) + (0.354)(\text{DFMS}) + (0.568)(\text{DLPFS}) + (-0.273)(\text{ECW}) + (0.222)(\text{RPoW}) + \\ & (0.807)(\text{RCL}) + (-0.772)(\text{RCW}) + (-0.411)(\text{RDL}) + (0.339)(\text{LoPL}) + (0.186)(\text{UpPL}) + \\ & (0.693)(\text{BD}) + (0.437)(\text{FM}) + (-0.681)(\text{ICW}) + 7.349 \end{aligned}$$

ผลการเขียนกราฟระหว่างตัวแปร CVA1 และตัวแปร CVA2 แสดงไว้ในรูปที่ 10 (ก.) ซึ่งตัวแปร CVA1 และ CVA2 อธิบายความแปรปรวนของข้อมูลได้ 61.7% และ 35.5% ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ปูดำ ปูม่วง และปูขาว ถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน เห็นได้จากตำแหน่งของกลุ่มปูแต่ละกลุ่ม ดังกล่าวมีตำแหน่งที่แยกกันอย่างเด็ดขาดโดยไม่พบบริเวณที่เชื่อมต่อหรือเหลื่อมซ้อนกันระหว่างกลุ่ม สำหรับปูเขียวพบว่า ถึงแม้ CVA จะแสดงให้เห็นความแตกต่างกับปูดำอย่างชัดเจน แต่กลุ่มปูเขียวมีตำแหน่งอยู่ระหว่างปูขาวกับปูม่วง โดยตำแหน่งใกล้กับตำแหน่งของกลุ่มปูขาวมากกว่าและมีบริเวณที่เหลื่อมซ้อนกันระหว่างปูเขียวกับปูขาว อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากขอบเขตของกลุ่มที่เกิดขึ้นยังคงพบว่า ปูขาว ปูเขียว และปูม่วง มีตำแหน่งของสมาชิกที่แสดงความเป็นกลุ่มของตัวเอง จากข้อมูลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า ปูแต่ละกลุ่มมีลักษณะ morphometric ที่แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างในลักษณะ morphometric เป็นข้อมูลชนิดหนึ่งที่ถูกใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ปลา 2 ชนิดคือ *Atherina boyeri* และ *A. presbyter* ซึ่งมีความเข้าใจกันว่าเป็นปลาชนิดเดียวกันและชื่อวิทยาศาสตร์ทั้ง 2 ชื่อเป็นชื่อที่พ้องกัน (synonymous species) แต่จากการวิเคราะห์ CVA ของลักษณะ morphometric ของปลาจากทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว พบว่ามีความแตกต่างกัน ซึ่งเป็นการยืนยันว่า *A. boyeri* และ *A. presbyter* เป็นปลาต่างชนิดกัน (Creech, 1992) หรือแม้แต่ในปลาที่มีการปรับตัววิวัฒนาการอย่างรวดเร็ว และหลากหลายรูปแบบอย่างเช่น ปลาหมอสี (cichlid fish) ในสกุล *Amphilophus* การวิเคราะห์ CVA ก็สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดภายในสกุลดังกล่าวได้ (Klingenberg *et al.*, 2003) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าในสัตว์เลื้อยคลานก็ยังสามารถจำแนกชนิดได้จากข้อมูลจากการวิเคราะห์ CVA ของลักษณะ morphometric โดยมีการจำแนกชนิดใหม่ของค้างคาวในสกุล *Nyctophilus* (long-eared bat) คือชนิด *Nyctophilus nebulosus* โดยอาศัยข้อมูลการวิเคราะห์ CVA จากลักษณะ morphometric จำนวน 12 ลักษณะที่วัดจากกระดูกและฟัน ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างตัวอย่างของ *N. nebulosus* กับตัวอย่างค้างคาวชนิดอื่นอีก 2 ชนิดในสกุลเดียวกันคือ *N. bifax* และ *N. gouldi* (Parnaby, 2002) ดังนั้นผลจากการวิเคราะห์ CVA ของปูทะเลจากข้อมูล

morphometric ซึ่งแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว ซึ่งว่าปูทั้ง 4 กลุ่ม ควรถูกจัดจำแนกเป็นปูต่างชนิดกัน

ตารางที่ 9 แสดงสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical เพื่อการจำแนกกลุ่มปูทะเลที่แบ่งตามลักษณะภายนอก โดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง

	Function		
	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

การวิเคราะห์ CVA จากข้อมูล morphometric จากปู 10 กลุ่มที่แบ่งตามความแตกต่างของลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มปู (Wilk's Lambda = 0.008; $F_{(90, 1122.561)} = 12.998$; $P < 0.001$) โดยมี informative character ทั้งหมด 10 ลักษณะ ประกอบด้วยลักษณะที่วัดจากกระดอง 5 ลักษณะ (FMSH, DFMS, ECW, CW1 และ FM) ลักษณะที่วัดจากก้าม 3 ลักษณะ (RCL, RDL และ RMW) ลักษณะที่วัดจากขาว่ายน้ำ 1 ลักษณะ (UpPL) และ ลักษณะความหนาของลำตัว (BD) ตารางที่ 10 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical ซึ่งประกอบด้วยค่าสัมประสิทธิ์ของ 9 สมการ โดยสมการที่ 1 และ 2 เขียนได้ดังนี้

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

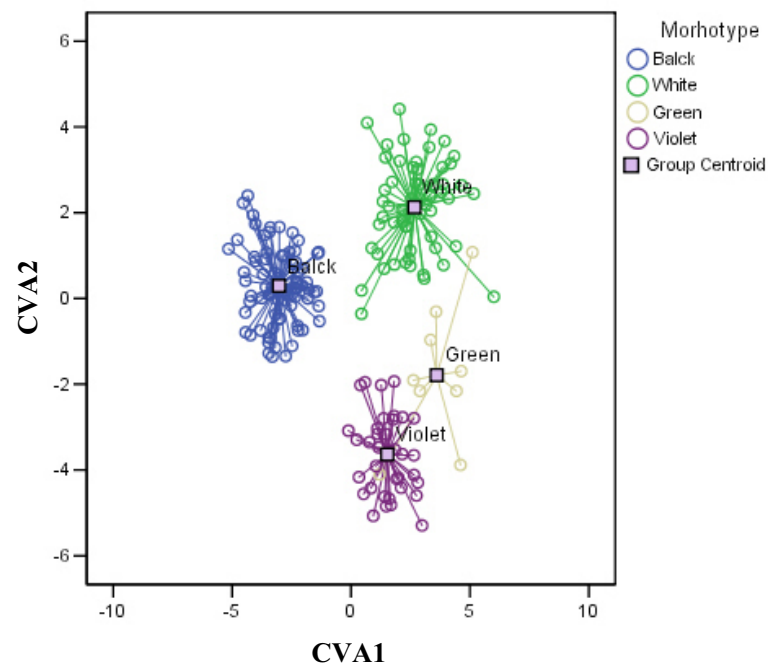
ผลการเขียนกราฟระหว่างตัวแปร CVA1 และตัวแปร CVA2 แสดงไว้ในรูปที่ 10 (ข.) ซึ่งตัวแปร CVA1 และ CVA2 อธิบายความแปรปรวนของข้อมูลได้ 60.1% และ 29.0% ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงให้เห็นกลุ่มหลัก 4 กลุ่ม คือ กลุ่มปูด้า ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว โดยในกลุ่มปูที่มีแหล่งเก็บตัวอย่างมากกว่า 1 บริเวณนั้น พบว่ามีการรวมกลุ่มกันของปูที่มีลักษณะภายนอกเหมือนกันจากแหล่งเก็บตัวอย่างต่างกันเข้าเป็นกลุ่มตามลักษณะภายนอกอย่างชัดเจน โดยกลุ่มปูด้าประกอบขึ้นจากกลุ่มปูด้าที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดตราด ระนอง สุราษฎร์ธานี และประเทศพม่า กลุ่มปูขาวประกอบขึ้นจากกลุ่มปูขาวที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดตราด ระนอง และสุราษฎร์ธานี และกลุ่มปูม่วงประกอบขึ้นจากกลุ่มปูม่วงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดตราด และระนอง ข้อมูลที่ได้ยืนยันข้อมูลการวิเคราะห์ CVA ในรูปแบบที่แบ่งกลุ่มปูตามลักษณะภายนอกโดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง ผลที่ได้ยังคงแสดงความแตกต่างระหว่างปูกลุ่มหลัก 4 กลุ่มเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าปูตัวอย่างที่มีลักษณะภายนอกเหมือนกันแต่เก็บตัวอย่างจากต่างบริเวณกันจะมีลักษณะ morphometric เหมือนกัน อันเห็นได้จากการเหลื่อมซ้อนกันของกลุ่มปูจากแหล่งเก็บตัวอย่างต่างบริเวณกันภายในกลุ่มปูด้า ปูขาว และปูม่วง ซึ่งอาจตีความได้ใน 2 นัยคือ ไม่มีความแตกต่างของสิ่งแวดล้อมระหว่างแหล่งเก็บตัวอย่างแต่ละแหล่ง หรืออิทธิพลของสิ่งแวดล้อมไม่ได้มีแรงกดดันหรือมีแรงกดดันไม่มากพอที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของลักษณะ morphometric อย่างเห็นได้ชัดภายในกลุ่มปูด้า ปูม่วง หรือปูขาว นอกจากนี้ถ้าพิจารณาเฉพาะปูด้าจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ซึ่งเคยถูกแสดงให้เห็นว่าอาจจะเป็นตัวแปรพันธุ์ (variant) ของปูขาว (Overton *et al.*, 1997) แต่จากผลการวิเคราะห์ดังที่กล่าวแล้วแสดงให้เห็นว่าปูด้าจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีถูกจัดอยู่ในกลุ่มปูด้าร่วมกับปูด้าจากจังหวัดตราด ระนอง และประเทศพม่า และยังแยกจากกันอย่างเด็ดขาดจากปูขาวที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดตราด ระนอง หรือแม้แต่ปูขาวจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีเอง

ตารางที่ 10 แสดงสัมประสิทธิ์ของตัวแปร canonical เพื่อการจำแนกกลุ่มปูทะเล 10 กลุ่มที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง

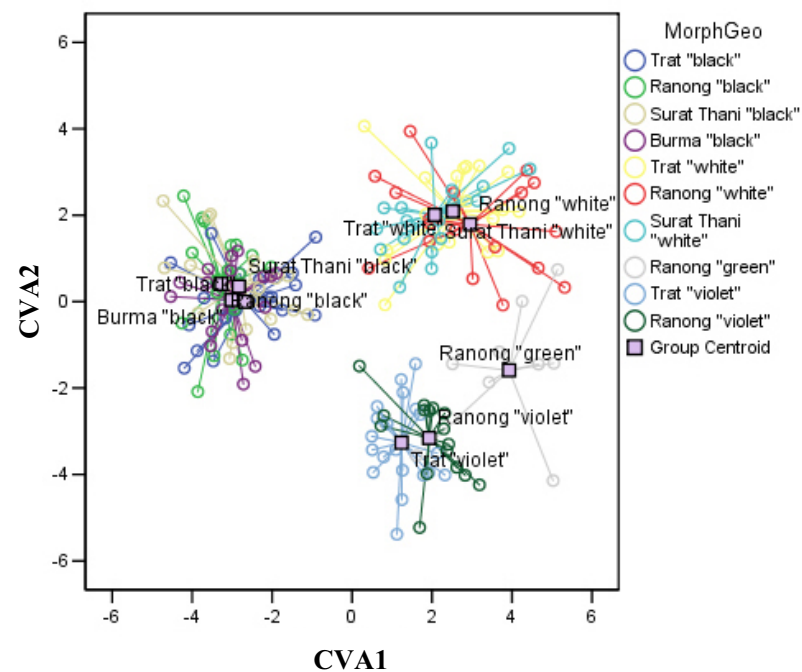
	Function								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
FMSH	2.577	0.256	1.101	0.213	-1.873	0.868	2.274	0.211	-0.682
DFMS	0.835	0.249	0.919	0.794	1.930	1.078	-0.576	0.101	-0.227
ECW	0.161	-0.308	-0.316	-0.063	-0.016	0.045	-0.122	-0.016	0.061
RCL	-0.296	0.721	-0.292	0.445	-0.589	-0.263	0.573	-0.121	-0.347
RDL	0.109	-0.363	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

Informative character เพื่อการจำแนกกลุ่มของปูทะเลที่แบ่งตามลักษณะภายนอกเท่ากับ 13 ลักษณะ และ Informative character เพื่อการจำแนกกลุ่มของปูทะเลที่แบ่งตามลักษณะภายนอก และแหล่งเก็บตัวอย่างเท่ากับ 10 ลักษณะ แต่พบว่าเป็นลักษณะซ้ำกัน 9 ลักษณะคือ FMSH, DFMS, ECW, RCL, RDL, UpPL, BD, FM และ CW1 โดย DLPFS, RPoW, RCW และ LoPL เป็นลักษณะที่เกี่ยวข้องเฉพาะกับการจำแนกปูทะเลที่แบ่งตามลักษณะภายนอก ดังนั้นการศึกษาลักษณะ morphometric เพื่อการจำแนกชนิด ถ้าใช้ให้ครบ 9 ลักษณะที่เสนอไว้นี้ ก็จะสามารถจำแนกชนิดปูทะเลได้ ส่วน RMW เกี่ยวข้องเฉพาะกับการจำแนกปูทะเลระหว่างปูทะเลที่แบ่งตามลักษณะภายนอก และแหล่งเก็บตัวอย่าง

(ก.) Canonical Discriminant Functions



(ข.) Canonical Discriminant Functions



รูปที่ 10 ผลการเขียนกราฟจากการวิเคราะห์ CVA จากข้อมูลลักษณะ morphometric (ก.) ผลการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกโดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง และ (ข.) ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง

ผลการคำนวณ Mahalanobis' Distance ระหว่างปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว (ตารางที่ 11) พบว่า ระยะห่างระหว่าง ปูดำกับปูเขียว ปูดำกับปูม่วง ปูดำกับปูขาว ปูเขียวกับปูม่วง ปูเขียวกับปูขาว และปูม่วงกับปูขาว เท่ากับ 88.907, 65.280, 56.559, 29.299, 47.699 และ 54.213 ตามลำดับ Phenetic tree ที่สร้างจากระยะห่างระหว่างกลุ่มปูที่คำนวณได้แสดงให้เห็นว่า ปูเขียวกับปูม่วงเป็นกลุ่มที่ความคล้ายคลึงกันมากที่สุด โดยมีปูขาวคล้ายคลึงกับกลุ่มปูเขียว-ม่วงมากกว่าปูดำ ซึ่ง phenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลของลักษณะ morphometric สอดคล้องกับลักษณะภายนอกของปูเขียวและปูม่วงที่มีลักษณะภายนอกหลายลักษณะปรากฏร่วมกัน เช่น การมีหนาม 2 อันบริเวณขอบนอกของข้อมือ (wrist หรือ carpus) การมีลายร่างแหที่มีช่องขนาดใหญ่ รวมทั้งสีของกระดองที่เป็นสีเขียวมะกอกคล้ายคลึงกัน แต่ลักษณะเหล่านี้แตกต่างจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏในปูดำและปูขาว

ตารางที่ 11 แสดงค่า Mahalanobis' Distance ระหว่างปู 4 กลุ่มที่แบ่งตามลักษณะภายนอก คือ ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว

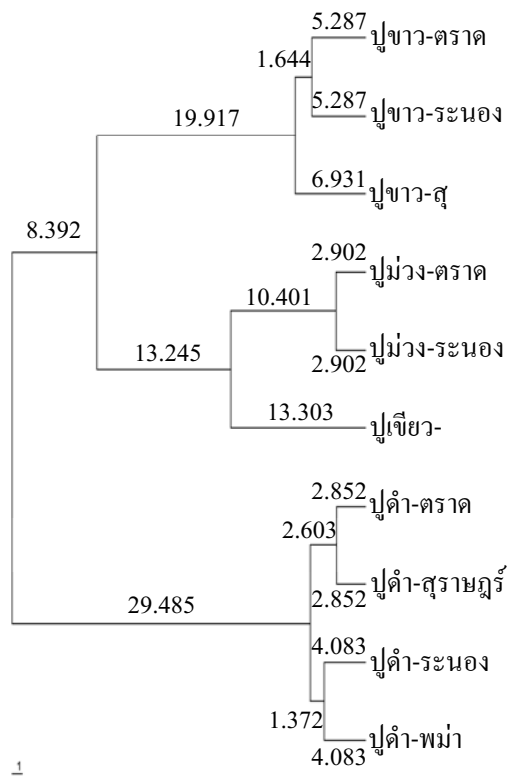
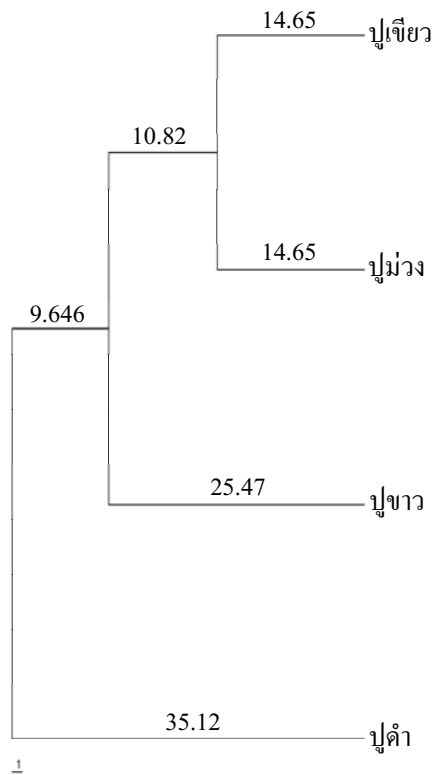
	ปูดำ	ปูเขียว	ปูม่วง	ปูขาว
ปูดำ	-			
ปูเขียว	88.907	-		
ปูม่วง	65.280	29.299	-	
ปูขาว	56.559	47.699	54.213	-

ผลการวิเคราะห์ Mahalanobis' Distance ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 12) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 5.703 ถึง 110.711 กลุ่มที่ระยะห่างน้อยที่สุดคือ ปูดำจากจังหวัดตราดกับสุราษฎร์ธานี (5.703) และกลุ่มที่มีระยะห่างมากที่สุดคือ ปูดำกับปูเขียวจากจังหวัดระนอง (110.711) ค่า Mahalanobis' Distance ภายในกลุ่มปูแต่ละกลุ่มมีค่าระหว่าง 5.703 ถึง 15.447 และระหว่างกลุ่มมีค่าระหว่าง 25.722 ถึง 110.711 นอกจากนี้ Phenetic tree ที่สร้างจาก Mahalanobis' Distance แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มปูหลัก 4 กลุ่ม (ปูดำ ปูเขียว ปูม่วง และปูขาว) มีพื้นฐานเหมือนกับ Phenetic tree ที่สร้างจาก Mahalanobis' Distance ระหว่างกลุ่มปูที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง (รูปที่ 11) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายในกลุ่มปูแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่มปูดำมีการแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วยปูจากจังหวัดตราดและสุราษฎร์ธานี และกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยปูจากจังหวัดระนองและจากประเทศพม่า ซึ่งการแยกกลุ่มจากข้อมูลของลักษณะ morphometric ของปูดำสอดคล้องกับการแบ่งแยกทางภูมิศาสตร์ โดยปูดำจากตราดและสุราษฎร์ธานีเป็นปูจากฝั่งทะเลอ่าวไทย ส่วนปูจากจังหวัดระนองและพม่าเป็นปูจากฝั่งทะเลอันดามัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของนวลมณี และคณะ (2547) ในประเด็นที่ว่า ปูดำจากพม่าและปูดำจากระนองมีความคล้ายคลึงกันของลักษณะ morphometric มากที่สุด แต่มีประเด็นที่แตกต่างคือ เมื่อพิจารณาร่วมกับปูดำอีก

2 กลุ่มที่เหลือ พบว่าผลการศึกษาของนวลณี และคณะ (2547) แสดงให้เห็นว่า ปูดำจากตราดมีความคล้ายคลึงของลักษณะ morphometric กับกลุ่มปูดำระนอง-พม่ามากกว่าความคล้ายคลึงที่มีต่อกลุ่มปูดำจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี เป็นที่น่าสังเกตว่าปูดำตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้กับปูดำตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาของ นวลณี และคณะ (2547) เป็นตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันทั้งหมด ดังนั้นความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเกี่ยวข้องกับแหล่งของตัวอย่างในแต่ละจังหวัด เพศและขนาดของปูที่ใช้ศึกษา ส่วนในกรณีปูขาวนั้นพบว่า ปูขาวจากจังหวัดตราดมีความคล้ายคลึงของลักษณะ morphometric กับปูขาวจากจังหวัดระนองมากกว่าปูขาวจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ความคล้ายคลึงระหว่างปูขาวตราดกับปูขาวระนองเป็นการยากที่จะอธิบายได้ แต่จากข้อมูลที่ได้จากการสัมมนาปูทะเลที่โรงแรมมารวยเมื่อปี 2547 ที่ผ่านมาที่ประชุมมีการอภิปรายถึงกรณีการเคลื่อนย้ายปูทะเลขนาดเล็กจากฝั่งทะเลอันดามันมาทำการเพาะเลี้ยงเป็นปูขุนที่บริเวณจันทบุรี-ตราด ซึ่งอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของปูจากระนอง แต่ผลความคล้ายคลึงในกรณีปูขาวพบว่าไม่ชัดเจนเท่ากับกรณีของปูดำ นั่นคือ Mahalanobis' Distance ระหว่างปูดำ-ตราดกับปูดำระนอง และระหว่างปูดำ-ตราดกับปูดำ-สุราษฎร์ฯ เท่ากับ 10.661 และ 5.703 ตามลำดับ ซึ่งค่าทั้งสองนี้ต่างกันประมาณ 2 เท่า แต่ในกรณีปูขาว พบว่า Mahalanobis' Distance ระหว่างปูขาว-ตราดกับปูขาวระนอง และระหว่างปูขาว-ตราดกับปูขาว-สุราษฎร์ฯ เท่ากับ 10.573 และ 12.276 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกันมากกว่ากรณีปูดำ

ตารางที่ 12 แสดงค่า Mahalanobis' Distance ระหว่างปู 10 กลุ่มที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง

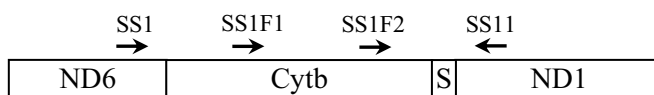
	ปูดำ ตราด	ปูดำ ระนอง	ปูดำ สุราษฎร์ฯ	ปูดำ พม่า	ปูขาว ตราด	ปูขาว ระนอง	ปูขาว สุราษฎร์ฯ	ปูเขียว ระนอง	ปูม่วง ตราด	ปูม่วง ระนอง
ปูดำ ตราด	-									
ปูดำ ระนอง	10.661	-								
ปูดำ สุราษฎร์ฯ	5.703	12.367	-							
ปูดำ พม่า	10.075	8.166	10.534	-						
ปูขาว ตราด	52.395	66.900	58.755	68.048	-					
ปูขาว ระนอง	61.850	74.902	65.782	78.457	10.573	-				
ปูขาว สุราษฎร์ฯ	49.419	56.951	50.579	59.373	12.276	15.447	-			
ปูเขียว ระนอง	81.780	110.711	91.255	98.508	46.334	46.714	50.621	-		
ปูม่วง ตราด	54.069	75.133	61.873	67.967	56.923	58.140	51.918	27.491	-	
ปูม่วง ระนอง	63.697	81.929	72.503	74.262	58.877	57.000	51.332	25.721	5.803	-



รูปที่ 11 Phenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี UPGMA จากข้อมูล Mahalanobis' Distance (ภาพบน)ระหว่างกลุ่มปู่ที่แบ่งตามลักษณะภายนอกโดยไม่คำนึงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง และ (ภาพล่าง) ระหว่างกลุ่มปู่ที่แบ่งตามลักษณะภายนอกและแหล่งเก็บตัวอย่าง; ตัวเลขกำกับเส้นแนวนอนแสดง Mahalanobis' Distance

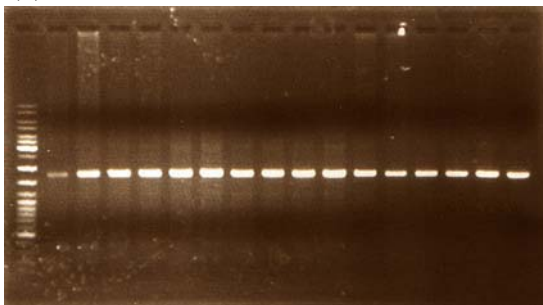
4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณยีน *Cytb* และ *16S rRNA* ของปูทะเลและปูม้า

เมื่อใช้ไพรเมอร์ SS1 และ SS11 ผลปรากฏว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *Cytb* ของปูตัวอย่างได้สำเร็จ โดยได้ PCR product ขนาดประมาณ 1,700 bp ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *16S rRNA* ได้ใช้ไพรเมอร์ SS20 และ SS19 ผลปรากฏว่าได้ PCR product มีขนาดประมาณ 1,900 bp ตำแหน่ง primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *Cytb* และ *16S rRNA* แสดงในรูปที่ 12 และ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ SS1-SS11 และ SS19-SS20 แสดงไว้ในรูปที่ 13

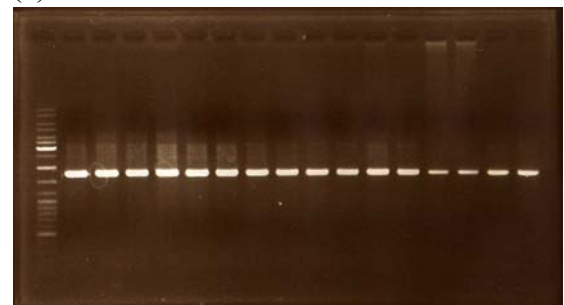


รูปที่ 12 แผนผังแสดงการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SS1 และ SS11 ซึ่งเป็นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cytb* สำหรับ SS1F1 และ SS1F2 sequencing primer

(ก)

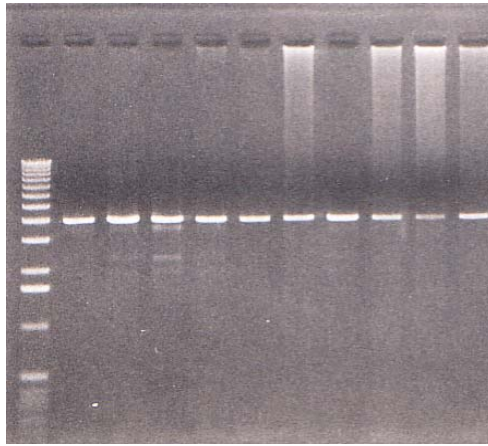


(ข)



รูปที่ 13 แสดง PCR product ของยีน *Cytb* (ก) ที่เพิ่มปริมาณด้วย SS1-SS11 และ *16S rRNA* (ข) ที่เพิ่มปริมาณด้วย SS20-SS19

ส่วนกรณีของปูม้า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ SS1 และ SS10 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ PCR product ขนาดประมาณ 4.0 kb และไม่มี unspecific band ปรากฏขึ้นแต่ประการใด และสามารถใช้ SS1 และ SS10 เป็น sequencing primer ได้ทั้งสองข้าง จึงดำเนินการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ PCR product ทั้ง H- และ L-strand ด้วยการออกแบบ walking primer จนกระทั่งทั้งสองสายมาบรรจบอยู่ตรงกลางชิ้น PCR product ผลของ PCR product แสดงไว้ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดง PCR product โดยใช้ไพรเมอร์ SS1 และ SS10 ของปูม้า

4.4.1 ยีน *Cytb*

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งสาม (SS1, SS1F1 และ SS1F2) ของปูทะเลและปูม้าแต่ละตัว (ปูทะเล 74 ตัว และปูม้า 10 ตัว) มาสร้างเป็น contig sequence ด้วยโปรแกรม CAP3 หลังจากนั้นจึงกำหนดตำแหน่งของยีน *Cytb* โดยการเปรียบเทียบกับตำแหน่งของยีนในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของปูม้าญี่ปุ่น (*Portunus trituberculatus*) และของปู *Pseudocarcinus gigas* หลังจากนั้นจึงกำหนดขนาดของยีน *Cytb* ของทั้งปูทะเลและปูม้า และพบว่ามีความยาว เท่ากับ 1,135 นิวคลีโอไทด์

ยีน *Cytb* ของปูดำ ปูขาว ปูเขียว ปูม่วง และปูม้า มีความยาว 1,135 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมี variable site 344 ตำแหน่ง และ parsimony informative site 332 ตำแหน่ง (ตารางที่ 14) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบเบส (base composition) (ตารางที่ 13) แสดงให้เห็นว่ามีลักษณะ composition biases ของ G คือเปอร์เซ็นต์ G ในปูดำ = 14.27 % ในปูเขียว = 13.77 %, ปูม่วง = 12.69 % ปูขาว = 12.88 % และ ปูม้า = 14.27% โดยเฉลี่ยแล้วในปูทะเลจะมี A+T content (66.83%) มากกว่า G+C content (33.18%) ซึ่งลักษณะ composition biases ในยีน *Cytb* ของปูว่ายน้ำ (blue swimming crab- *Calinectes bellicosus*) (Pfeiler *et al.*, 2005) และปลาในกลุ่ม bitoidea (Tang *et al.*, 2005) ซึ่งทั้งสองรายงานนี้พบว่าส่วนใหญ่แล้วต่อต้าน G ในตำแหน่งที่ 3 (third position) ของรหัสพันธุกรรม

ตารางที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยของ base composition ของยีน *Cytb* จากตัวอย่างปู 5 กลุ่ม

	Base composition				Nucleotide bias	
	A	C	G	T	χ^2 ; df = 3	P
Black	25.55	22.95	14.27	37.24	10.777	0.01 < P < 0.05
Green	27.90	18.84	13.77	39.49	15.294	0.001 < P < 0.01
Violet	27.93	18.25	12.69	41.13	18.633	P < 0.001
White	28.01	19.06	12.88	40.06	16.724	P < 0.001
<i>P. pelagicus</i>	26.03	21.31	14.27	38.39	12.358	0.001 < P < 0.01

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของปูทะเล 74 ตัวและปูม้า 10 ตัว เพื่อใช้เป็น outgroup ไปวิเคราะห์ nucleotide divergence (ตารางที่ 15) ผลปรากฏว่า average nucleotide divergence ภายในชนิดของปูทะเล 4 ชนิดและปูม้าอยู่ระหว่าง 0.0012 ถึง 0.0080 แต่ระหว่างชนิดมีค่าระหว่าง 0.1099 ถึง 0.1981 ซึ่งชี้ให้เห็น genetic divergence ระหว่างปูแต่ละชนิด นั่นก็หมายความว่า ปูดำ ปูขาว ปูเขียว และปูม่วง มีสถานะความเป็นชนิด (species) ซึ่งกรณีเช่นนี้จะเปรียบเทียบกับกรณีของ Western Atlantic shrimp (*Farfantepenaeus spp.*) (morphotype II) ซึ่งเคยจัดว่าเป็น *F. subtilis* แต่เมื่อประมาณค่า genetic divergence โดยอาศัยข้อมูลจาก *16S rRNA* อยู่ระหว่าง 0.04-0.06 เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดใกล้เคียงคือ *F. subtilis*, *F. paulensis* และ *F. notialis* ซึ่งมากกว่า genetic divergence ภายใน morphotype II ถึง 11 – 55 เท่า ดังนั้น Maggione *et al.* (2001) จึงเสนอว่า morphotype II น่าจะเป็น reproductively isolated species แต่มีความคล้ายคลึงกับ *F. subtilis* มากกว่าชนิดใกล้เคียงอื่นๆ หรือในกรณีของปู *Charybdis* ซึ่งเป็นสมาชิกกลุ่มหนึ่งในวงศ์ Portunidae Chu *et al.* (1999) ได้รายงานว่ามีปู Chinese charybdis 4 ชนิด คือ *Charybdis affinis* และ *C. japonica* มีค่า genetic divergence ห่างจาก *C. acuta* และ *C. firriatus* ระหว่าง 11.5-14.4 % เมื่อคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 465 bp ภายในยีน *COI* ค่าประมาณนี้ชี้ให้เห็นว่าค่า genetic divergence ระหว่างชนิดจะมีค่าสูงระหว่างชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับค่าประมาณการภายในชนิด ดังนั้น ปูดำ ปูขาว ปูเขียว และปูม่วง ควรจะมีสถานะเป็น reproductively isolated species ซึ่งมีลักษณะเป็น conspecific species

ตารางที่ 14 แสดงตำแหน่ง polymorphic site ของยีน *Cytb*

	11112222	3344444555	6667777888	9990001111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111222	2222222222
	4823581237	0623458158	0390258147	0395891247	8037925891	2478049258	1473428147	0392581470	
BB01_Cytb	ACCAAAACTC	CCTGTTCTTA	TTTCTCACTT	TTCATCGCAG	TATGTTACGC	AAACACTACC	TTTTTCAATT	TCTATCCATT	
BB02_Cytb		T.....	C.G...			G..	T....		
BB03_Cytb		T.....	G....	T.ATA..		G..	T....		
BB05_Cytb									
BB14_Cytb									
BB20_Cytb		T.....	G....			G..	T....		
RB65_Cytb		T.....	G....	A....			T....		
RB68_Cytb				T.ATA..					
RB69_Cytb									
RB71_Cytb		T.....	G....			G..	T....		
RB80_Cytb						G..			
RB83_Cytb		T.....	G....			G..	T....		
SB05_Cytb									
SB08_Cytb		T.....	G....	A....		G..	...C.T....		
SB11_Cytb						G..			
SB12_Cytb						G..			
SB14_Cytb						G..			
TB35_Cytb									
TB40_Cytb						G..	G....		
TB43_Cytb						G..			
TB44_Cytb						G..			
TB47_Cytb						G..			
TB49_Cytb						G..			
RG06_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG07_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG10_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.TAT	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG15_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG16_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG17_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG20_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG21_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG22_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG23_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG24_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG25_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG33_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG34_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG37_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RG38_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RW07_Cytb	GTT....A.T	TT....TTC.	.CC.AT.TC.	.T.ATA..T	C.T.T	TTT..TG.TT	G...C.GTCC	CTA.AC	
RV01_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
RV02_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
RV11_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
RV12_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
RV13_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
TV02_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
TV03_Cytb	.TTCT..AC	TT....TTC.	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
TV04_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
TV05_Cytb	.TTCT..AC	TT..G.TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
TV06_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
RV27_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
RV28_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
RV29_Cytb	.TTCT..AC	TT....TTC.	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
RV31_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
TV09_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
TV13_Cytb	.TTCT..AC	TT....TT..	.C..T.T..	CCT..TA..T	...GC.T.T	TCT.TA..T	...C.T.T..	TA..C	
RW03_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
RW04_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
RW08_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
RW09_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	C..A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
SW02_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
SW03_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
SW04_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
SW05_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
SW06_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
SW08_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
TW22_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
TW34_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...TT.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TGGC.	
TW38_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
TW44_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
TW53_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
RW14_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	C..A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
RW18_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
TW54_Cytb	.TTCT..G.T	T.C..ATT.	T.T..	.CT...T.T	...A.....	.T.GTAG.T	.C.C....A	CTC..TG.C.	
PP01_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	A.ATAA.T.A	.CTT..TTGT	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TCGC.A..C	
PP02_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	A.GTAG.T.A	.CTT..TTGT	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TCGC.A..C	
PP03_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	A.GTAG.T.A	.CTT..TTGT	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TC.C.A..C	
PP04_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	A.ATAA.T.A	.CTT..TTGT	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TC.C.A..C	
PP05_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	G.GTAG.T.A	.CTTC.TT.T	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TC.C.A..C	
PP06_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	A.GTAG.T.A	.CTT..TTGT	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TC.C.A..C	
PP07_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	A.GTAG.T.A	.CTT..TTGT	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TCGC.A..C	
PP08_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	A.GTAG.T.A	.CTTC.TTGT	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TC.C.A..C	
PP09_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	A.GTAG.T.A	.CTT..TTGT	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TC.C.A..C	
PP10_Cytb	..T..TGTC.	T.CA..T..G	A.GTAG.T.A	.CTT..TTGT	CTC...GT..	..CT.T..T.	..CCC..T..	.TCGC.A..C	