

การระบุชนิดปูน้ำเค็มในบริเวณอ่าวยาง จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้ง

Species Identification of Marine Crabs in Ao Yang, Chanthaburi Province

Using DNA Barcoding

วิรังรอง กรินท์ธัญญกิจ^{1*} ชุตภา คุณสุข¹ และ อรอนงค์ บุญมี²

Wirangrong Karinthanyakit^{1*} Chutapa Kunsook¹ and Onanong Boonmee²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จันทบุรี 22000 ประเทศไทย

²สำนักบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จันทบุรี 22000 ประเทศไทย

¹Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000, Thailand

²University Academic Service Center, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000, Thailand

*E-mail: wirangrong.k@rbru.ac.th

Received: Sep 14, 2025

Revised: Nov 16, 2025

Accepted: Nov 20, 2025

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการระบุชนิดปูน้ำเค็มบริเวณอ่าวยาง จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้งจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม ซี ออกซิเดส วัน (Cytochrome c oxidase I gene; COI) ในไมโทคอนเดรียจากตัวอย่างปูน้ำเค็มทั้งหมด 57 ตัวอย่าง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน COI โดยเทคนิค PCR และได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูน้ำเค็มทุกตัวอย่าง โดยมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ประมาณ 700 คู่เบส เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมของตัวอย่างปูกับฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank พบว่า สามารถระบุชนิดของปูน้ำเค็ม ได้จำนวน 10 ชนิด จาก 5 วงศ์ โดยมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูงถึง 98.05%-100% โดยผลการระบุชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้ง พบว่า มีความสอดคล้องกับการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining พบว่าตัวอย่างปูทุกชนิดรวมกลุ่มกันในลักษณะ Monophyletic clade โดยสามารถแยกกลุ่มของปูแต่ละวงศ์ (Portunidae, Menippidae, Calappidea, Eriphiidae และ Xanthidae) และปูแต่ละชนิดตามสายวิวัฒนาการออกจากกันได้อย่างชัดเจน การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้งมีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการยืนยันชนิดปูน้ำเค็มในบริเวณอ่าวยาง จังหวัดจันทบุรี ซึ่งถือเป็นตัวแทนของพื้นที่ชายฝั่งตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งปูบางชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกันมาก หรือมีความแปรผันของลักษณะทางสัณฐานภายในชนิด ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงทางพันธุกรรมของปูน้ำเค็มในอนาคต สนับสนุนการศึกษาด้านอนุกรมวิธานเชิงโมเลกุล ใช้ตรวจสอบชนิดปูในงานอนุรักษ์ทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง รวมถึงการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล

คำสำคัญ: ปูน้ำเค็ม ดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้ง ยีนไซโตโครม ซี ออกซิเดส วัน อนุกรมวิธานเชิงโมเลกุล จังหวัดจันทบุรี

Abstract

This study aimed to study the species identification of marine crabs in Ao Yang, Chanthaburi Province, using DNA barcoding. Based on nucleotide sequence analysis of the cytochrome c oxidase I (COI) gene in mitochondria of 57 marine crab samples, the COI gene region was successfully amplified by PCR, and nucleotide sequence data were obtained from all samples with the lengths of approximately 700 base pairs. When comparing the genetic data of the crab samples with genetic code information in the GenBank database, ten species of marine crabs from five families were identified, with genetic similarity values ranging from 98.05% to 100%.

The species identification derived from DNA barcoding were consistent with morphological identification. The results of Neighbor-joining phylogenetic tree demonstrated that all crab samples were clustered into a monophyletic clade, with clear separation of each crab family (Portunidae, Menippidae, Calappidae, Eriphiidae, and Xanthidae) and each crab species along the phylogenetic lineage. This study suggests that the DNA barcoding is suitable and effective for verifying the species of marine crabs in Ao Yang, Chanthaburi Province, which is a representative of the eastern coast of Thailand, especially for some crab species with high morphological similarity or intraspecific morphological variation. The obtained data can be used as a future genetic reference database for marine crabs, supporting molecular taxonomic studies, identifying crab species for marine and coastal resource conservation, and verifying species accuracy in seafood products.

Keywords: Marine crabs, DNA barcoding, Cytochrome c oxidase I gene, Molecular taxonomy, Chanthaburi Province

1. บทนำ

อ่าวยาง ตั้งอยู่ในพื้นที่ตำบลบางกระบือ อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี เป็นบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทยที่มีระบบนิเวศสำคัญ ได้แก่ ระบบนิเวศหาดหินและแนวปะการัง ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและที่หลบซ่อนของสัตว์น้ำหลากหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มปูน้ำเค็ม (Marine crabs) ที่มีบทบาทสำคัญต่อการคงสมดุลของระบบนิเวศชายฝั่ง ทั้งในฐานะผู้ล่าและเหยื่อในห่วงโซ่อาหาร การหมุนเวียนธาตุอาหาร รวมถึงการช่วยรักษาเสถียรภาพของตะกอนดิน [1] นอกจากนี้คุณค่าทางนิเวศแล้ว ปูน้ำเค็มยังเป็นทรัพยากรเศรษฐกิจที่สำคัญ โดยเฉพาะต่อการประมงพื้นบ้านและอุตสาหกรรมอาหารทะเลของประเทศไทย

อ่าวยางตั้งอยู่ในแนวชายฝั่งภาคตะวันออกซึ่งมีลักษณะเป็นอ่าวกึ่งปิด (Semi-enclosed bay) ที่มีปากอ่าวแคบ ล้อมรอบด้วยแผ่นดินหลายด้าน ทำให้เกิดระบบนิเวศเฉพาะตัวที่มีการหมุนเวียนน้ำจำกัด [2] ลักษณะดังกล่าวเอื้อต่อการเป็นแหล่งอาศัย แหล่งหลบภัย และพื้นที่เลี้ยงตัวของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Nursery ground) โดยมีรายงานว่าพบสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายกลุ่มในพื้นที่นี้ รวมถึงปูน้ำเค็มในหลายวงศ์ เช่น Portunidae, Xanthidae, Menippidae, Calappidae และ Grapsidae เป็นต้น [3], [4] ซึ่งสะท้อนถึงความหลากหลายทางชีวภาพที่สำคัญของพื้นที่อ่าวยาง อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการระบุชนิดของปูน้ำเค็มในพื้นที่จากการศึกษาที่ผ่านมา ยังคงใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก ซึ่งในบางกรณีอาจเกิดความคลาดเคลื่อนในการระบุชนิดได้ โดยเฉพาะในกลุ่มปูที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน เช่น ปูหนูมานลายจุด (*Matuta victor*) และปูหนูมานหกตุ่ม (*Ashtoret lunaris*) ในวงศ์ Calappidae หรือปูใบหลายชนิดในวงศ์ Xanthidae [5]

ในปัจจุบัน ข้อมูลทางพันธุกรรมได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อยืนยันชนิดของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะเทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้ง (DNA barcoding) ซึ่งใช้รหัสพันธุกรรมจากยีนไซโตโครม ซี ออกซิเดส วัน (Cytochrome c oxidase I gene; COI) ในไมโทคอนเดรียมาเป็นเครื่องหมายมาตรฐานในการระบุชนิดสัตว์ [6] โดยเทคนิคนี้มีข้อดีคือสามารถระบุชนิดสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำ แม้ในกรณีที่ลักษณะทางสัณฐานมีความคล้ายคลึงกันมาก หรือเกิดความแปรผันของลักษณะทางสัณฐานภายในชนิด (Intraspecific variation) อีกทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมยังไม่มี ความผันแปรไปตามสิ่งแวดล้อมอีกด้วย [7] ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายชิ้นที่ยืนยันถึงศักยภาพของการใช้เทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้งในการระบุชนิดของปูในภูมิภาคต่าง ๆ เช่น อียิปต์ [8] อินโดนีเซีย [9] การศึกษาในอ่าวเปอร์เซีย [10] รวมถึงประเทศไทย [11] ซึ่งต่างก็พบว่าเทคนิคนี้สามารถใช้ระบุชนิดปูได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานข้อมูลทางพันธุกรรมของปูน้ำเค็มในพื้นที่อ่าวยาง จังหวัดจันทบุรี ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลสาธารณะ เช่น GenBank หรือ BOLD การศึกษานี้จึงมีความสำคัญในการสร้างฐานข้อมูลพันธุกรรมของปูน้ำเค็มในพื้นที่ เพื่อเติมเต็มช่องว่างของข้อมูลทางพันธุกรรมในกลุ่มปูชายฝั่งของประเทศไทย และสามารถใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานในกลุ่มปูที่มีความคล้ายคลึงกันสูง อีกทั้งข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงสำหรับการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ การติดตามชนิดรุกราน (Invasive species monitoring) และการตรวจสอบแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์อาหารทะเล (Seafood traceability) ได้ต่อไปในอนาคต [12]

ดังนั้น การศึกษาค้นคว้ามีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิค ดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้ง ในการระบุชนิดของปูน้ำเค็มในบริเวณ อ่าวอ่าง จังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ตัวแทนของระบบนิเวศ ชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย ผลที่ได้จะเป็นข้อมูล พื้นฐานทางพันธุกรรมของปูน้ำเค็มที่ช่วยสนับสนุนงานวิจัย ทางด้านอนุกรมวิธานเชิงโมเลกุล การอนุรักษ์ และการจัดการ ทรัพยากรทางทะเลในระยะยาว

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

เก็บรวบรวมตัวอย่างปูน้ำเค็ม บริเวณอ่าวอ่าง จังหวัด จันทบุรี จำนวน 4 ครั้ง ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์-เดือนมีนาคม พ.ศ. 2567 (ฤดูแล้ง) และเดือนมิถุนายน-เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2567 (ฤดูฝน) โดยในระบบนิเวศหาดหิน ทำการวางแนวเพื่อ เก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 สถานี โดยการใช้อีโคโน สวิง และพลั่วมือ [13] ส่วนในระบบนิเวศปะการัง ใช้ลอบปูแบบพับได้ จำนวน 30 ลูก วางทั้งหมด 3 สถานี ขนานกับชายฝั่งของอ่าว แนวละ 10 ลูก วางลอบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการกู้ลอบขึ้นมา แยกตัวอย่างใส่ถุงเก็บตัวอย่าง แช่ไว้ในน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพ และนำกลับมาศึกษาต่อยังคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ระบุชนิดปูน้ำเค็มจากลักษณะทางสัณฐาน โดยใช้ คู่มือของ Sangpaiboon et al. [3], Thamrongnawasawat and Wisetpongpan [14] และฐานข้อมูลปู (Crab database) [15]

2.2. การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปูน้ำเค็มที่รวบรวมได้จำนวน ทั้งสิ้น 57 ตัวอย่าง โดยใช้เนื้อเยื่อปู 0.07 กรัม สกัดด้วย ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen, Taiwan) และสกัดดีเอ็นเอตาม คำแนะนำของผู้ผลิต ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้โดย วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1% พบว่าสามารถสกัด ดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง แต่ปริมาณดีเอ็นเอค่อนข้างน้อยโดยปรากฏ แถบดีเอ็นเอบาง ๆ บนแผ่นเจล (ไม่แสดงผล) จากนั้นนำดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณในส่วนที่ยีน COI ด้วยเทคนิค PCR โดยปฏิกริยาดังกล่าวประกอบด้วยสารต่าง ๆ (PCR mixture)

ซึ่งมีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ดังนี้ 1x Taq buffer (1.5 มิลลิโมลาร์) MgCl₂ (0.5 ไมโครโมลาร์) Forward และ Reverse primers (0.2 มิลลิโมลาร์) dNTPs, Taq DNA Polymerase recombinant (Fermentas, Germany) และดีเอ็นเอที่สกัดได้ (4 ไมโครลิตร) ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกริยา PCR คือ คูไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198 [16] ซึ่งเป็น Universal primer ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส โดยมีสภาวะการทำงานทั้งหมด 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที [16] จากนั้นทำผลผลิตของ PCR ที่ได้ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR kit (Geneaid, Taiwan) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลผลิต PCR ด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (1% อะกาโรสเจล) แล้วส่งไป วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องลำดับนิวคลีโอไทด์ อัตโนมัตินำ (Automated sequencer, Macrogen, South Korea) โดยแต่ละตัวอย่างทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย Forward และ Reverse (2 ปฏิกริยา/ตัวอย่าง) ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ คือไพรเมอร์คู่เดียวกับที่ใช้ในปฏิกริยา PCR

2.3. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละ ตัวอย่าง โดยตรวจสอบลักษณะของกราฟโครมาโทแกรม (Chromatogram) ด้วยโปรแกรม MEGA v.11 [17] ระบุชนิด ปูโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ยีน COI ของแต่ละ ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) โดยเกณฑ์ของค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ที่ใช้ในการระบุชนิดต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 97% หากต่ำกว่านี้ สันนิษฐานได้ว่ายังไม่มีผู้ใดศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของชนิดนั้น มาก่อน [18]

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่าง ปูน้ำเค็ม โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ยีน COI ของทุก ตัวอย่าง ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจาก GenBank ที่ให้ผล Blast ใกล้เคียงกับตัวอย่างของงานวิจัยในครั้งนี้ (Accession number : MH425338, PQ536003, NC069011, KX060326, NC085415, NC053638, HM638034, KP976341, NC069014 และ MZ900932) และสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (Outgroup) จำนวน 2 ชนิด คือ ปูเสฉวนขาสาม (*Clibanarius infraspinitus*) และ

ปูเสฉวนยักษ์จุดขาว (*Dardanus megistos*) มาเปรียบเทียบกับ (Multiple sequence alignment) ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูจำนวน 9 ตัวอย่าง จากการศึกษารุ่นนี้ มีขนาดที่ค่อนข้างสั้นกว่าตัวอย่างอื่น ๆ ทั้งนี้เนื่องจากผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กลับมานั้นมีคุณภาพที่ไม่ค่อยดี จึงตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงที่ไม่ดี ซึ่งปรากฏอยู่บริเวณส่วนหัวและท้ายของลำดับในแต่ละตัวอย่างออกไปค่อนข้างมาก จากเหตุดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูทั้ง 9 ตัวอย่างนั้นออกจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และนำผลจากการทำ Multiple sequence alignment ของข้อมูลที่ทำการตัดหัว-ท้ายให้เท่ากันแล้วทุกตัวอย่าง ซึ่งมีความยาว 658 คู่เบส มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MEGA v. 11 และทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ที่ได้ด้วยการทดสอบ Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ [17]

วิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิด (Intraspecific genetic distance) และค่าระยะห่างทาง

พันธุกรรมระหว่างชนิด (Interspecific genetic distance) โดยใช้โปรแกรม MEGA v. 11 [17]

3. ผลการวิจัย

3.1. การระบุชนิดปูน้ำเค็มจากลักษณะทางสัณฐาน

จากการรวบรวมตัวอย่างปูน้ำเค็มบริเวณอ่าวอ่าง จังหวัดจันทบุรี จำนวนทั้งสิ้น 57 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบชนิดเบื้องต้นโดยใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าระบุชนิดปูได้จำนวน 10 ชนิด จาก 5 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ปูฤๅษี (Calappidae) 1 ชนิด คือ ปูหนุมานลายจุด (*Matuta victor*) วงศ์ปูใบ้ (Eriphiidae) 1 ชนิด คือ ปูใบ้ตาแดง (*Eriphia ferox*) วงศ์ปูใบ้ (Menippidae) 2 ชนิด คือปูใบ้ก้ามโต (*Myomenippe hardwickii*) และปูใบ้ (*Menippe rumphii*) วงศ์ปูม้า (Portunidae) 5 ชนิด คือปูม้า (*Portunus pelagicus*) ปูหินก้ามฟ้า (*Thalamita crenata*) ปูหินหนามฟ้า (*T. prymna*) ปูหินขาลาย (*Charybdis annulata*) และปูหินอินโดแปซิฟิก (*C. hellerii*) และวงศ์ปูใบ้ (Xanthidae) 1 ชนิด คือ ปูใบ้กระดองพัด (*Leptodius affinis*) โดยภาพตัวอย่างปูแต่ละชนิดแสดงดัง Figure 1

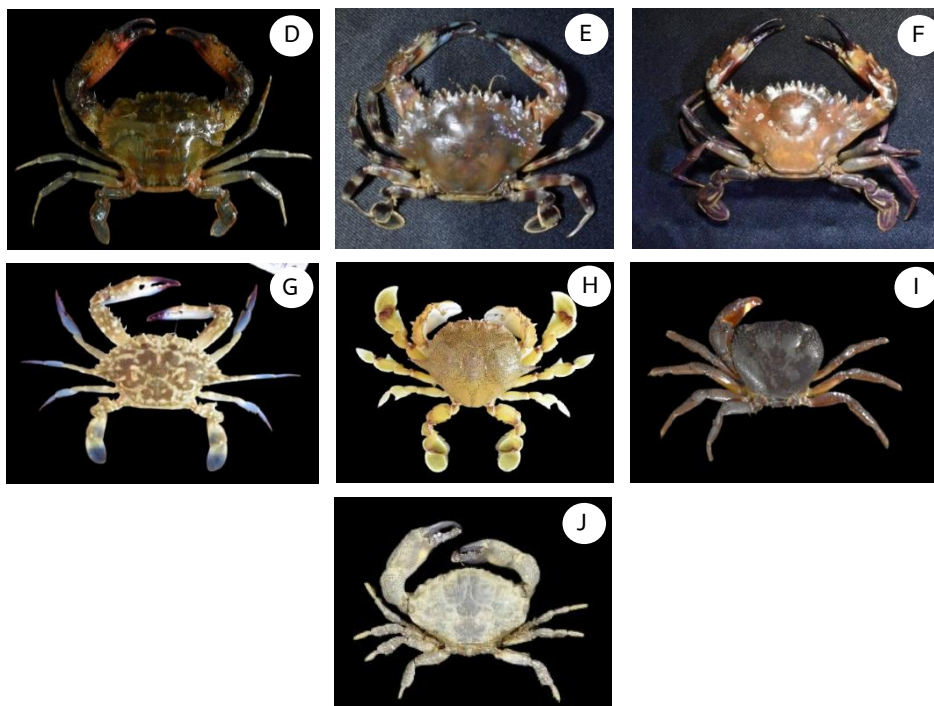


Figure 1 Ten species of crab samples from Ao Yang, Chanthaburi Province

(A) *M. hardwickii*, (B) *M. rumphii*, (C) *T. crenata*, (D) *T. prymna*, (E) *C. annulata*, (F) *C. hellerii*, (G) *P. pelagicus*, (H) *M. victor*, (I) *E. ferox*, and (J) *L. affinis*

3.2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ดีเอ็นเอของปูน้ำเค็ม 57 ตัวอย่างที่สกัดได้ นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน COI ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และใช้ 100 bp DNA ladder (Biotech rabbit GmbH, Germany) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ผลการทดลองพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส (base pairs; bp) ในทุกตัวอย่าง โดยตัวอย่างผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงใน Figure 2

3.3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำผลผลิต PCR ของปูน้ำเค็มจำนวน 57 ตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

ของยีน COI ทุกตัวอย่าง โดยมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 589-697 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูทุกตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ได้ฝากไว้ในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank โดยมี Accession number PX457433-PX457489 (Table 1) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูตัวอย่างกับฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank ใช้โปรแกรม Blastn พบว่าสามารถระบุชนิดปูได้ 10 ชนิด โดยมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมไม่ต่ำกว่า 97% (98.05%-100%) และมีความสอดคล้องกับการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ ปูหินก้ามฟ้า ปูใบก้ามโต ปูหินขาลาย ปูหินอินโดแปซิฟิก ปูใบปูหนุมานลายจุด ปูใบตาแดง ปูม้า ปูหินหนามฟ้า และปูใบกระดองพัด (Table 1)

Table 1 The similarity of the crab samples with the most similar species in GenBank

Sample ID	Highest similarity search in GenBank		GenBank accession numbers of nucleotide sequences from crab samples in this study
	Scientific name	Max similarity (%)	
AY-C02, AY-C04, AY-C05, AY-C07, AY-C14, AY-C23, AY-C24, AY-C25, AY-C32, AY-C34, AY-C59, AY-C60, AY-C61	<i>M. hardwickii</i>	98.64-100	PX457434, PX457436, PX457437, PX457439, PX457444, PX457450, PX457451, PX457451, PX457455, PX457457, PX457475, PX457476, PX457477
AY-C21, AY-C62	<i>M. rumphii</i>	99.85	PX457448, PX457478
AY-C01, AY-C20, AY-C22, AY-C27, AY-C33, AY-C35, AY-C36, AY-C37, AY-C38, AY-C41, AY-C42, AY-C51, AY-C64	<i>T. crenata</i>	98.05-99.85	PX457433, PX457447, PX457449, PX457453, PX457456, PX457458, PX457459, PX457460, PX457461, PX457463, PX457464, PX457467, PX457480
AY-C65, AY-C66	<i>T. prymna</i>	99.41-99.70	PX457481, PX457482
AY-C03, AY-C09, AY-C10, AY-C13, AY-C18, AY-C67	<i>C. annulata</i>	98.79-100	PX457435, PX457440, PX457441, PX457443, PX457446, PX457483
AY-C06, AY-C11, AY-C15, AY-C52, AY-C68, AY-C69, AY-C70, AY-C71	<i>C. hellerii</i>	99.13-100	PX457438, PX457442, PX457445, PX457468, PX457484, PX457485, PX457486, PX457487
AY-C63, AY-C73	<i>P. pelagicus</i>	99.85	PX457479, PX457489
AY-C31, AY-C40, AY-C43, AY-C48, AY-C53, AY-C54, AY-C55, AY-C56, AY-C57	<i>M. victor</i>	98.91-99.84	PX457454, PX457462, PX457465, PX457466, PX457469, PX457470, PX457471, PX457472, PX457473
AY-C58	<i>E. ferox</i>	99.83	PX457474
AY-C72	<i>L. affinis</i>	99.70	PX457488

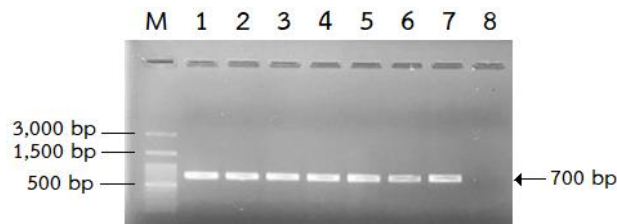


Figure 2 Agarose gel showing PCR amplicons (approximately 700 bp) of some crab samples (Lanes 1-7), Lane M: 100 bp DNA ladder, and Lane 8: negative control (PCR mix without DNA template)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างปูน้ำเค็มจากการศึกษาในครั้งนี้ โดยสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี NJ และใช้ปูไม้เท้าจริง (Anomuran crabs) 2 ชนิด คือ ปูเสฉวนขาสาม (*Clibanarius infraspinus*) และปูเสฉวนยักษ์จุดขาว (*Dardanus megistos*) เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (Outgroups) พบว่าตัวอย่างปูน้ำเค็มทุกชนิดรวมกลุ่มกันในลักษณะของ Monophyletic clade ด้วยค่าความเชื่อมั่น (Bootstrap value) 88% โดยปูทั้ง 10 ชนิด แยกสายวิวัฒนาการออกจากกันอย่างชัดเจน ด้วยค่าความเชื่อมั่น 100% ในทุกกลุ่ม สอดคล้องกับการระบุชนิดปูโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานที่ระบุชนิดได้ทั้งหมด 10 ชนิด โดย ประกอบด้วยปูในวงศ์ Portunidae 5 ชนิด วงศ์ Menippidae 2 ชนิด วงศ์ Calappidae 1 ชนิด วงศ์ Eriphiidae 1 ชนิด และวงศ์ Xanthidae 1 ชนิด (Figure 3)

ผลการวิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิด พบว่าปูไม้เท้าจริง ปูใบ และปูม้า มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดต่ำที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.001 ปูหินก้ามฟ้าและปูใบตาแดง มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเท่ากัน คือ 0.002 ปูหินหนามฟ้าและปูใบกระดองพัด มีค่าเท่ากัน คือ 0.003 ปูหินขาลายและปูหินอินโดแปซิฟิก มีค่าเท่ากัน คือ 0.005 และปูหนุมานลายจุด มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดมากที่สุด คือ 0.008 (Table 2) ส่วนค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด พบว่าปูหินก้ามฟ้าและปูหินหนามฟ้าที่อยู่ในสกุลเดียวกัน มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดน้อยที่สุด เท่ากับ 0.107 ในขณะที่ปูไม้เท้าจริงและปูหินขาลายมีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.217 (Table 2)

Table 2 Intraspecific and interspecific genetic distances among ten marine crab species collected from Ao Yang, Chanthaburi Province

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>T. crenata</i>	0.002									
2. <i>M. hardwickii</i>	0.156	0.001								
3. <i>C. annulata</i>	0.158	0.217	0.005							
4. <i>C. hellerii</i>	0.137	0.172	0.142	0.005						
5. <i>M. rumphii</i>	0.172	0.129	0.192	0.179	0.001					
6. <i>M. victor</i>	0.180	0.173	0.193	0.176	0.162	0.008				
7. <i>E. ferox</i>	0.167	0.162	0.187	0.179	0.168	0.173	0.002			
8. <i>P. pelagicus</i>	0.174	0.184	0.169	0.160	0.180	0.188	0.195	0.001		
9. <i>T. prymna</i>	0.107	0.182	0.173	0.162	0.182	0.189	0.174	0.187	0.003	
10. <i>L. affinis</i>	0.171	0.167	0.208	0.202	0.181	0.181	0.163	0.192	0.151	0.003

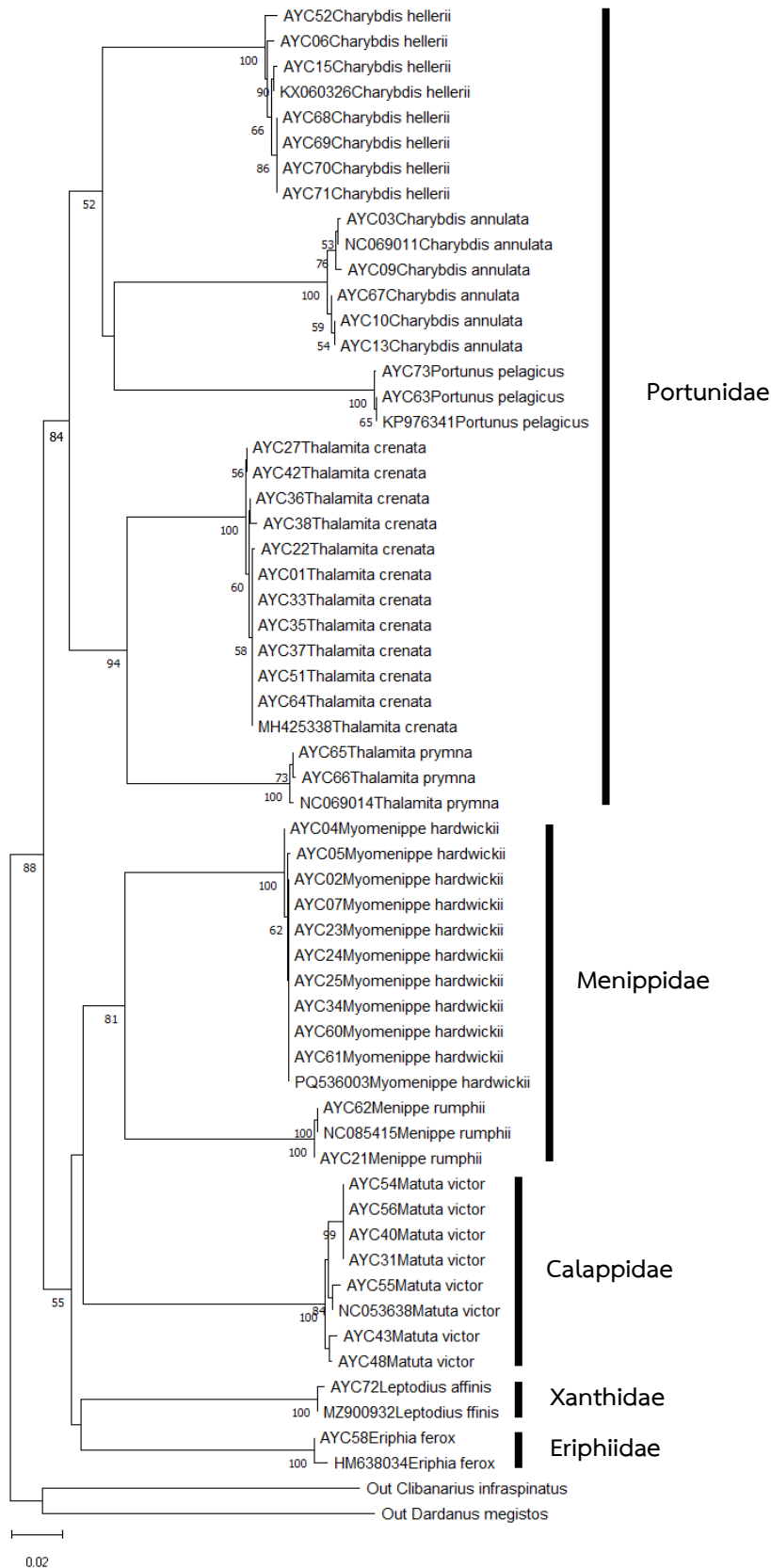


Figure 3 Phylogenetic tree based on COI gene sequences constructed with Neighbor-joining method; Two species of anomuran crabs, *C. infraspinatus* and *D. megistos*, were used as outgroups.

4. อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการใช้เทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดตั้งเพื่อระบุชนิดปูน้ำเค็มบริเวณอ่าวไทย จังหวัดจันทบุรี ร่วมกับการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลในส่วนที่ยีน COI ที่มีความยาวประมาณ 700 คู่เบส โดยยีนดังกล่าวได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความเสถียรและความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อระบุชนิด (Species-level marker) ในสัตว์ เนื่องจากมีความหลากหลายภายในชนิดต่ำ แต่มีความแตกต่างระหว่างชนิดสูง อีกทั้งยังไม่พบการกลายพันธุ์แบบแทรกเข้ามา (Insertion) หรือขาดหายไป (Deletion) ที่อาจก่อให้เกิดปัญหาในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ [6] และเนื่องจากในงานวิจัยมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน COI ด้วยเทคนิค PCR กับปูน้ำเค็มหลายชนิด จึงมีการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็น Universal primer โดยผู้วิจัยได้ใช้ไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198 ซึ่งพัฒนาโดย Folmer et al. [16] ในการนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน COI ในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จำนวน 11 ไฟลัม (phylum) ได้แก่ ไฟลัม Echinodermata, Mollusca, Annelida, Pogonophora, Nemertinea, Echiura, Sipuncula, Platyhelminthes, Tardigrada, Coelenterata และ Arthropoda โดยสัตว์ที่เป็นตัวแทนในไฟลัม Arthropoda อันดับ (Order) Decapoda เป็นกุ้งจำนวน 4 ชนิด และมีปูเพียงชนิดเดียว คือ *Bythograea thamydrion* ที่อยู่ในวงศ์ Bythograeidae ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็น Universal primer สำหรับปูน้ำเค็มได้เป็นอย่างดี เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน COI ในตัวอย่างปูน้ำเค็มทั้ง 57 ตัวอย่าง จาก 5 วงศ์ คือ วงศ์ Portunidae, Menippidae, Calappidae, Eriphiidae และ Xanthidae สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่มีการใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันนี้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกลุ่มปูในวงศ์ Portunidae สกุล *Charybdis* และ *Thalamita* [18]

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปูน้ำเค็มจำนวน 57 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างปูน้ำเค็มกับฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank สามารถระบุชนิดตัวอย่างปูน้ำเค็มได้ทั้งหมด 10 ชนิด จาก 5 วงศ์ ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยมีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 98.05%-100% ซึ่งค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่มีค่าตั้งแต่ 97% ขึ้นไป ถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ในการนำมาใช้ระบุชนิดของสัตว์ [19], [20]

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของตัวอย่างปูน้ำเค็มจากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงการแยกสายวิวัฒนาการที่ชัดเจนของปูทั้ง 5 วงศ์ ได้แก่ Portunidae, Menippidae, Calappidae, Eriphiidae และ Xanthidae โดยแต่ละวงศ์ มีการจัดกลุ่มในลักษณะ Monophyletic clade ที่มีความเชื่อมั่นของกิ่ง (Bootstrap values) สูงถึง 81%-100% สะท้อนถึงความถูกต้องและความมั่นคงของโครงสร้างสายวิวัฒนาการที่ได้ [21] ส่วนในระดับชนิด แผนภูมิต้นไม้ที่ได้ก็แสดงให้เห็นว่าปูทั้ง 10 ชนิด สามารถจำแนกออกจากกันได้ อย่างชัดเจน ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้สัณฐานวิทยา และยืนยันว่าการใช้ยีน COI สามารถสะท้อนลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานได้อย่างถูกต้องทั้งในระดับชนิดและวงศ์ [5], [10]

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของปูน้ำเค็มทั้ง 10 ชนิดในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.001-0.008 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 0.107-0.217 ซึ่งพบว่าสอดคล้องกับค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของปูที่มีรายงานในการศึกษาก่อนหน้า เช่น งานวิจัยของ Bravo et al. [22] ที่รายงานค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดปูจากบริเวณป่าชายเลนในฮ่องกง จำนวน 58 ชนิด มีค่าอยู่ในช่วง 0.000-0.015 และระหว่างชนิดมีค่าเท่ากับ 0.114-0.247 และงานวิจัยของ Hsu and Shih [23] ซึ่งได้รายงานค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของปูน้ำกร่อยในวงศ์ Varunidae มีค่าต่ำกว่า 0.015 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดมีค่าเท่ากับ 0.122-0.196 เมื่อเปรียบเทียบค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดและระหว่างชนิดที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงในรายงานวิจัยที่ได้กล่าวถึงก่อนหน้านี้ [22], [23] จะเห็นได้ว่ามีช่องว่างระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรม (DNA barcode gap) ที่ชัดเจนระหว่างค่าระยะห่างทางพันธุกรรมทั้งสองระดับ ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิดของ Hebert et al. [6] ที่ระบุว่ายีน COI สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเป็นยีนที่มีความแตกต่างภายในชนิดต่ำมาก โดยค่าความแตกต่างระหว่างชนิดจะสูงกว่าภายในชนิดอย่างน้อย 10 เท่า

ในจำนวนปูน้ำเค็ม 10 ชนิด ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ มีจำนวน 2 ชนิด คือ ปูหนุมนลายจุด และปูใบกระตองพัด ที่มีความสับสนในการระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกับปูชนิดอื่น

หรือมีความแปรผันของลักษณะทางสัณฐานภายในชนิดเดียวกัน โดยปูหนุมนลายจุด มีลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกันมากกับปูหนุมนหกตุ้ม (*Ashtoret lunaris*) ที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน คือ Calappidae โดยปูทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะกระดองที่โค้งกลม ก้ามปิดช่องปากสนิท รยางค์ขาเดินทุกคู่แบนเป็นใบพาย มีลวดลายหรือโครงสร้างของลายบนขาเช่นเดียวกัน และด้านข้างกระดองมีหนามแหลมยื่นออกมาด้านละ 1 อันเหมือนกัน แต่เมื่อพิจารณาโดยละเอียดแล้วลักษณะที่นำมาเป็นจุดในการระบุชนิดได้ คือ ตุ่มบนกระดองและหนามที่ก้าม โดยตุ่มบนกระดองในปูหนุมนหกตุ้ม มีลักษณะที่ชัดเจนกว่าปูหนุมนลายจุด ส่วนปลายก้ามของปูหนุมนหกตุ้มมีหนามยื่นออกมา 2 อัน แต่ก้ามของปูหนุมนลายจุด มีหนามยื่นออกมาเพียง 1 อัน (Figure 4) [15], [24] โดยในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ มีตัวอย่างปูน้ำเค็มจำนวน 9 ตัวอย่างที่ระบุชนิดจากลักษณะทางสัณฐานเป็นปูหนุมนลายจุด ตัวอย่างแสดงดัง Figure 4 ซึ่งผลจากการระบุชนิดด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมก็พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน

ส่วนปูใบกระดองพัด เป็นปูที่มีรายงานพบความแปรผันของลักษณะทางสัณฐานภายในชนิดสูง จึงทำให้เกิดความสับสนในการระบุชนิด [25] โดยจากรายงานของ Karinthanyakit et al. [26] ที่ทำการศึกษาการจำแนกชนิดปูน้ำเค็มในกลุ่มปูใบ บริเวณเกาะนมสาว จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้ง พบปูใบกระดองพัดมีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างกันถึง 3 รูปแบบ โดยทั้ง 3 รูปแบบมีลักษณะกระดองเป็นรูปคล้ายพัด ก้ามทั้งสองข้างมีขนาดใกล้เคียงกัน ขาเดินคู่สุดท้ายเป็นปลายแหลม แต่สีและลวดลายบนกระดองมีความแตกต่างกัน โดยรูปแบบที่ 1 กระดองไม่มีลวดลายและมีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ รูปแบบที่ 2 กระดองมีสีน้ำตาลปนดำ และมีลายสีขาวลักษณะคล้ายลูกศรชี้ลง และรูปแบบที่ 3 กระดองมีสีน้ำตาลอมเหลืองระหว่างตาทั้งสองข้างมีลายจุดสีดำ โดยความแปรผันของลักษณะภายนอกที่พบในปูใบกระดองพัด อาจได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม เช่น ความแตกต่างของแสง ความลึกของน้ำ ลักษณะของก้อนหินบริเวณหาดหินที่เป็นแหล่งอาศัย ที่อาจมีสีสันท่าง ๆ เช่น สีส้ม สีแดง สีชมพู สีขาว สีน้ำตาล และสีดำ ทำให้ปูใบชนิดนี้มีการเลียนแบบสีสันทองหิน เพื่อหลบเลี่ยงจากผู้ล่าทั้งปูที่มีขนาดใหญ่กว่า หอย และหมึกกระดอง เป็นต้น [25], [27] ซึ่งปูใบกระดองพัดที่พบในการศึกษาค้นคว้านี้มีลักษณะทางสัณฐานที่สอดคล้องกับรูปแบบที่ 1 ที่มีในรายงานก่อนหน้านี้ [26] (Figure 5) และผลการศึกษาทางพันธุกรรมโดยเทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้ง ก็ให้ผลการระบุชนิดที่สอดคล้องกันว่าเป็น

ปูใบกระดองพัด (*L. affinis*) จากผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้ง โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของยีน COI เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการสนับสนุนการระบุชนิดปูน้ำเค็มที่มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการใช้เทคนิคดังกล่าวในการระบุชนิดปูที่มีข้อจำกัดจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว เช่น Amer [8] ได้ใช้เทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดดิ้งเพื่อยืนยันว่าปูแมงมุม (*Menaethius monoceros*) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบนั้น เป็นชนิดเดียวกันจริง ในขณะที่ Amer et al. [28] พบว่า การใช้ยีน COI ช่วยจำแนกชนิดปูในวงศ์ Xanthidae จากทะเลแดง ซึ่งมีความสับสนในการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานได้อย่างแม่นยำ และจากรายงานการวิจัยของ Marco-Herrero et al. [29] แสดงให้เห็นว่าข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถนำมาใช้ระบุชนิดของปูวัยอ่อน (Megalopa) ที่ไม่สามารถจำแนกได้จากลักษณะทางสัณฐานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนในประเทศไทย Suthamrit and Thaewnot-Ngiw [11] รายงานผลการใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการระบุชนิดของปูวงศ์ Potamididae ที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน ซึ่งทั้งหมดสะท้อนให้เห็นว่า การผสานข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมกับลักษณะทางสัณฐานเป็นแนวทางที่จำเป็นสำหรับการนำมาใช้เพื่อระบุชนิดปูอย่างถูกต้องและเชื่อถือได้ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีความแปรผันของลักษณะภายนอกสูง

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนชนิดของปูที่พบในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ จำนวน 10 ชนิด คือ ปูใบก้ามโต ปูใบ ปูหินก้ามฟ้า ปูหินหนามฟ้า ปูหินขาลาย ปูหินอินโดแปซิฟิก ปูม้า ปูหนุมนลายจุด ปูใบตาแดง และปูใบกระดองพัด พบว่ามีความหลากหลายชนิดน้อยกว่าในรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sangpaiboon et al. [3] ที่พบปูน้ำเค็มบริเวณอ่าวไทย เป็นปูแท้จริง (Brachyura) จำนวน 20 ชนิด จาก 12 วงศ์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าในการศึกษานี้ ออกเก็บตัวอย่างจำนวน 4 ครั้ง และใช้ลอบในการเก็บตัวอย่างบริเวณระบบนิเวศปะการังจำนวน 30 ลูก ซึ่งน้อยกว่าในการศึกษาก่อนหน้า ซึ่งเก็บตัวอย่างจำนวน 6 ครั้ง และใช้ลอบจำนวน 100 ลูก ส่วนชนิดปูที่พบในการศึกษานี้ จำนวน 10 ชนิด เป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในการศึกษาของ Sangpaiboon et al. [3] จำนวน 9 ชนิด ยกเว้นปูม้าที่พบในการศึกษานี้ แต่ไม่พบในการศึกษาก่อนหน้า การที่พบปูม้าในช่วงปีหลังนี้อาจเป็นผลมาจากกิจกรรมพัฒนาและฟื้นฟูระบบนิเวศทรัพยากรชายทะเลภาคตะวันออก ที่มีการปล่อยลูกพันธุ์ปูม้ากลับสู่ทะเล ส่งผลให้ประชากรปูม้ามีจำนวนที่เพิ่มมากขึ้น

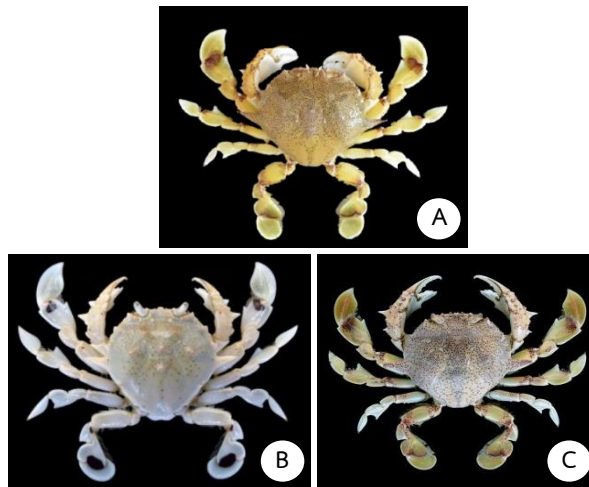


Figure 4 Morphological characteristics of crabs

(A) the crab sample in this study (AY-C31), (B) *Ashtoret lunaris* [15], and (C): *Matuta victor* [15] (C)



Figure 5 Morphological characteristics of crabs

(A) the crab sample in this study (AY-C72), and (B) *Leptodius affinis* exhibiting three morphological variations in carapace coloration and pattern [26]

5. บทสรุป

การศึกษานี้ได้ทำการจำแนกชนิดปูน้ำเค็มจากพื้นที่อ่าวอ่าง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 57 ตัวอย่าง โดยอาศัยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ร่วมกับการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการวิเคราะห์สามารถระบุชนิดปูน้ำเค็มได้ทั้งหมด 10 ชนิด ครอบคลุม 5 วงศ์ ได้แก่ Portunidae, Menippidae, Calappidae, Eriphiidae และ Xanthidae โดยทุกชนิดมีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมากกว่า 97% ซึ่งเป็นระดับที่ยอมรับได้สำหรับการระบุชนิดสัตว์ ผลการศึกษายังพบว่าการระบุชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ บาร์โค้ดตั้ง และลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความสอดคล้องกัน ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมกับสัณฐานวิทยา เพื่อเพิ่มความแม่นยำและความน่าเชื่อถือในการระบุชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มปูที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันมากหรือมีความแปรผันของลักษณะทางสัณฐานภายในชนิด

ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการทรัพยากรประมงพื้นบ้านและการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล โดยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปูน้ำเค็มสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิงในการติดตามประชากรปู การตรวจสอบความถูกต้องของชนิดในห่วงโซ่อาหารทะเล ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลประกอบการวางแผนอนุรักษ์พันธุกรรมของสัตว์น้ำชายฝั่งในระดับท้องถิ่นและระดับภูมิภาคต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษารังต่อไป ควรมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมทั้งในด้านจำนวนครั้ง ระยะเวลา และวิธีการเก็บตัวอย่างที่หลากหลายมากขึ้น เช่น การเพิ่มจำนวนลอบดักและการสุ่มเก็บตัวอย่างในระบบนิเวศที่หลากหลายมากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้สามารถสะท้อนความหลากหลายชนิดของปูน้ำเค็มในพื้นที่ได้อย่างครบถ้วนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ควรพิจารณาการใช้ยีนอื่นร่วมกับยีน COI เช่น ยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรีย หรือยีนจากนิวเคลียส เช่น 18S rRNA, 28S rRNA และ Histone H3 ซึ่งจะช่วยให้ยืนยันการจำแนกชนิดในกรณีที่เกิดความคลาดเคลื่อนจากการใช้ยีนเดียว รวมถึงช่วยเพิ่มความละเอียดและความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเชิงวิวัฒนาการ

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ประจำปีงบประมาณ 2567 ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณีทุกท่าน สำหรับการอำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัย และการให้คำแนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ด้วยดีเสมอมา

7. References

- [1] De Grave, S. and et al. 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. **Raffles Bulletin of Zoology**. Suppl. 21: 1-109.
- [2] UN Environmental Programme (UNEP). 2019. **Marine and Coastal Ecosystems: Definitions and Concepts**. <https://www.unep.org>. Accessed 15 October 2025.
- [3] Sangpaiboon, P., Kunsook, C. and Nakeiam, S. 2019. **Biological Diversity of Some Marine Animals in Rocky Shore and Coral Reef at Ao Yang Bay, Chanthaburi Province**. Chanthaburi: Rambhai Barni Rajabhat University. (in Thai)
- [4] Kunsook, C. and Karinthanyakit, W. 2021. Diversity, abundance and population structure of shore crabs (Decapoda: Brachyura; Menippidae, Eriphiidae, Xanthidae, Oziidae) at Nom Sao Island, Chanthaburi Province, the Eastern Gulf of Thailand. **ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports**. 23(3): 15-26.
- [5] Tan, S.H. and Ng, P.K.L. 2020. The Calappidae of Singapore: Taxonomy and DNA barcoding of box crabs. **Raffles Bulletin of Zoology**. 68: 1-32.
- [6] Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences**. 270: 313-321.

- [7] Radulovici, A.E., Archambault, P. and Dufresne, F. 2010. DNA barcodes for marine biodiversity: Moving fast forward? **Diversity**. 2(3): 450-472.
- [8] Amer, M.A. 2021. DNA barcoding of the spider crab *Menaethius monoceros* (Latreille, 1825) from the Red Sea, Egypt. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. 19(1): 42.
- [9] Joesidawati, M.I. and et al. 2023. Utilizing DNA barcoding approach to study the diversity of the blue swimming crab from Tuban District, East Java, Indonesia. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**. 24(9): 4731-4737.
- [10] Sharifian, S. and et al. 2023. Molecular barcoding of the Persian Gulf mangrove associated brachyuran crabs. **Arthropod Systematics & Phylogeny**. 81: 889-896.
- [11] Suthamrit, W. and Thaewnot-Ngiw, B. 2021. DNA barcoding of mountain crabs (Potamidae) from Phetchabun Mountains of Thailand. **Biochemistry & Molecular Biology Journal**. 7(6): 1-8.
- [12] Shetty, A.S. and Shingadia, H.U. 2023. Application of DNA barcoding in fisheries: A review. **Uttar Pradesh Journal of Zoology**. 44(23): 351-371.
- [13] Fatemi, S. and et al. 2012. Diversity and distribution of true crabs (Brachyura) from intertidal rocky shores of Qeshm Island, Persian Gulf. **International Journal of Marine Science and Engineering**. 2(1): 115-120.
- [14] Thamrongnawasawat, T. and Wisetpongpan, P. 2007. **Andaman Guide: Thai Marine Crabs**. Bangkok: Baan Phra Arthit. (in Thai)
- [15] Radosta, O. 2018. **Crab Database**. <https://www.crabdatabase.info/en/crabs>. Accessed 19 July 2025.
- [16] Folmer, O. and et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**. 3(5): 294-299.
- [17] Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**. 38(7): 3022-3027.
- [18] Abbas, M.E. and et al. 2016. Genetic and morphological identification of some crabs from the Gulf of Suez, Northern Red Sea, Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research**. 42(1): 319-329.
- [19] Panprommin, D. 2013. DNA barcoding of the fish and its application. **Health Science, Science and Technology Reviews**. 6(3): 174-181. (in Thai)
- [20] Wong, E.H.K. and Hanner, R.H. 2008. DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. **Food Research International**. 41: 828-837.
- [21] Hazerli, D., Hopel, C.G. and Richter, S. 2022. New insights into the evolution of portunoid swimming crabs (Portunoidea, Heterotremata, Brachyura) and the brachyuran axial skeleton. **Frontiers in Zoology**. 19(1): 24.
- [22] Bravo, H. and et al. 2021. A DNA barcode library for mangrove gastropods and crabs of Hong Kong and the Greater Bay Area reveals an unexpected faunal diversity associated with the intertidal forests of Southern China. **BMC Ecology and Evolution**. 21(1): 1-15.
- [23] Hsu, J.W. and Shih, H.T. 2020. Diversity of Taiwanese brackish crabs genus *Ptychognathus* Stimpson, 1858 (Crustacea: Brachyura: Varunidae) based on DNA barcodes, with descriptions of two new species. **Zoological Studies**. 59: e59.
- [24] Tungkrerk-olan, N. 2017. **Biodiversity and Seasonal Variation of Shrimps, Mantis Shrimps, and Crabs along the East Coast of Thailand for Conservation and Sustainable Uses of Community**. Chonburi: Burapha University. (in Thai)

- [25] Lee, S.K. and et al. 2013. On the identity of the Indo-west Pacific littoral xanthoid crab, *Leptodius exaratus* (H. Milne Edwards, 1834). **Raffles Bulletin of Zoology**. 61(1): 189-204.
- [26] Karinthanyakit, W., Kunsook, C. and Damrongrojwatthana, P. 2019. DNA barcoding for species identification in rock crab (Decapoda: Eriphiidae, Menippidae, Oziidae and Xanthidae) at Nomsao Island, Chanthaburi Province. In: **Proceedings of the 6th National and International Rajabhat Research Conference**, 17-18 August 2020. Bangkok, Thailand. (*in Thai*)
- [27] Kunsook, C. and Wongsomsri, R. 2016. Biodiversity of crab in rocky shore ecosystem at Nomsoa Island, Chanthaburi Province. In: **Proceedings of the 10th Rambhai Barni Rajabhat University Research Conference: Moving toward Research in the 21st Century**, 19-20 December 2016. Chanthaburi, Thailand. (*in Thai*)
- [28] Amer, M.A., Naruse, T. and Reimer, J.D. 2023. Morphological and molecular investigation of some xanthid crabs from the Egyptian coast of the Red Sea. **Thalassas: An International Journal of Marine Sciences**. 39: 273-286.
- [29] Marco-Herrero, E., Cuesta, J.A. and Gonzalez-Gordillo, J.I. 2021. DNA barcoding allows identification of undescribed crab megalopas from the open sea. **Scientific Reports**. 11: 20573.