วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.3) September – December 2022

ลักษณะสัณฐานวิทยาและความผันแปรทางพันธุกรรมของแมงกะพรุนกล่อง *Chiropsoides buitendijki* จากจังหวัดสงขลา ตรัง และพังงา

Morphology and Molecular Analyses of Box Jellyfish *Chiropsoides buitendijki* from Songkla, Trang and Phang-Nga Provinces

สุพัตรา ตะเหลบ[1,*], ขวัญเรือน ศรีนุ้ย[1], ทรรศิน ปณิธานะรักษ์[1] และ วันศุกร์ เสนานาญ[2]

Supattra Taleb[1*], Khwanruan Srinui[1], Thadsin Panithanarak[1] and Wansuk Senanan[2]

[1]*สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2]*ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[1]*Institute of Marine Science, Burapha Unversity*

[2] *Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University*

Received : 3 September 2021

Revised : 3 December 2021

Accepted : 24 December 2021

บทคัดย่อ

แมงกะพรุนกล่อง *Chiropsoides buitendijki* พบแพร่กระจายทั้งฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน เป็นแมงกะพรุนกล่องที่มีพิษรุนแรง สามารถทำให้บาดเจ็บจนถึงเสียชีวิตได้ อย่างไรก็ตาม การอธิบายลักษณะสัณฐานของกระพรุนกล่องชนิดนี้ในประเทศไทย มาจากตัวอย่างจากทะเลอันดามันเท่านั้น และมีข้อสังเกตเบื้องต้นว่าขนาดของตัวอย่างที่พบจากทะเลอันดามันแตกต่างจากที่พบในอ่าวไทย การศึกษาครั้งนี้จึงได้ตรวจสอบลักษณะสัณฐานของ *C. buitendijki* ร่วมกับลักษณะทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของยีนไซโทโครมออกซิเดส จากไมโทคอนเดรีย (Cytochrome oxidase subunit I) ความยาว 790 คู่เบส ในตัวอย่างจากอ่าวไทย (จังหวัดสงขลา, N=5) และ ทะเลอันดามัน (จังหวัดพังงา, N=30; จังหวัดตรัง, N=40) ที่รวบรวมในปี พ.ศ. 2560-2561 ผลการศึกษาพบความแตกต่างของขนาดลำตัว และรูปร่าง Rhopaliar niche ostia ระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทย และทะเลอันดามัน โดยตัวอย่างจากอ่าวไทยมีขนาดใหญ่กว่า (ค่าเฉลี่ยความกว้างและความสูงของหมวกร่ม = 48.4±0.46 และ 68.0±0.90 มิลลิเมตร) ตัวอย่างทะเลอันดามัน (30.5 ±0.55 และ 31.9 ±0.58 มิลลิเมตร) ตัวอย่างอ่าวไทยมีรูปร่างของ rhopaliar niche ostia เป็นแบบ u -shape ซึ่งแตกต่างจากแบบ dome shape ตัวอย่างจากทะเลอันดามัน นอกจากนี้ ยังพบความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างอ่าวไทย และทะเลอันดามัน โดยระยะห่างทางพันธุกรรม และ แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทย และ ทะเลอันดามันอย่างชัดเจน (ระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 8.6-9.2%) อย่างไรก็ตาม ระดับความแตกต่างดังกล่าวอาจยังไม่เพียงพอที่จะยืนยันความแตกต่างระดับชนิดได้ ผลการศึกษาชี้ประเด็นความคลุมเครือของชนิด และสายวิวัฒนาการของแมงกะพรุนกล่องชนิดนี้ในน่านน้ำไทย ดังนั้นจึงที่ควรมีการศึกษาจำนวนตัวอย่างแมงกะพรุนกล่องเพิ่มเติม ให้ครอบคลุมชายฝั่งของอ่าวไทย และ ทะเลอันดามัน

คำสำคัญ : แมงกะพรุนกล่อง ; *Chiropsoides buitendijki* ; ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ; อ่าวไทย ; อันดามัน

Abstract

A highly poisonous box jellyfish, *Chiropsoides buitendijki*, is distributed throughout Thai waters, the Gulf of Thailand (GoT), and the Andaman Sea. However, its descriptions to date have been inferred only from the Andaman samples. Anecdotal observations suggest size differences between the Gulf of Thailand and the Andaman samples. This study, therefore, examined the morphology, and genetic variation, based 790 base pairs of nucleotide sequences of mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I gene (COI), specimens from the Gulf of Thailand (Songkhla Province, N=5) and the Andaman Sea (Phang Nga Province, N=30; Trang Province, N=40) collected in 2017-2018. We detected notable differences in bell size and shapes of rhopaliar niche ostia between the Gulf of Thailand and the Andaman samples. Samples from the Gulf of Thailand were larger (mean bell width and height = 48.4±0.46 และ 68.0±0.90 mm) than those from the Andaman Sea (mean bell width and height = 30.5 ±5.5 and 31.9 ±0.58 mm). rhopaliar niche ostia shapes were U-shape (GoT) and Dome shape (Andaman Sea). In addition, genetic distances and ML phylogenetic analyses revealed a genetic distinction between the two regions (genetic distance = 8.6-9.2%). However, the observed differences are within the intraspecific variation. Results suggested that distinct genetic lineages might exist in Thai waters. The confirmation of the taxonomic status of this species may require additional specimens covering the entire distribution range in Thai waters.

Keywords : box jellyfish ; *Chiropsoides buitendijki* ; mitochondrial DNA ; Gulf of Thailand ; Andaman

***Corresponding author. E-mail :** taleb@buu.ac.th

บทนำ

แมงกะพรุนกล่องจัดอยู่ในไฟลัมไนดาเรีย (Phylum Cnidaria) เป็นสัตว์ทะเลกลุ่มที่มีพิษร้ายแรง และสามารถก่อให้เกิดอาการบาดเจ็บของมนุษย์จากการสัมผัสกับเข็มพิษที่บริเวณหนวดและหมวกร่ม (Fenner, 2005) พบทั่วโลก มีประมาณ 50 ชนิด จาก 8 วงศ์ 2 อันดับ ส่วนใหญ่สามารถพบได้ในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (Kingsford & Mooney, 2014) ในมหาสมุทรฝั่ง Indo- West-Pacific มีรายงานพบในประเทศ ญี่ปุ่น จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และอ่าวไทย (Horst, 1907) ในมหาสมุทรอินเดีย ได้แก่ประเทศพม่า อินเดีย ศรีลังกา ปากีสถาน และทะเลอันดามัน (Haeckel, 1880; Menon, 1936; Fernando, 1992; Tahera & Kazmi, 2006) ถิ่นที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจายอยู่ใกล้บริเวณแนวชายฝั่ง และป่าชายเลน (Kingsford & Mooney, 2014) วงจรชีวิตแมงกะพรุนกล่อง จะคล้ายกับแมงกะพรุนในชั้น Scyphozoa คือ ตัวเต็มวัยเมื่อถึงระยะที่พร้อมจะสืบพันธุ์ก็จะปล่อยสเปิร์มและไข่สู่มวลน้ำ เกิดการปฏิสนธิเป็นพลานูล่า (planula) ล่องลอยในมวลน้ำแล้วหาที่ยึดเกาะกับวัตถุใต้น้ำเพื่อพัฒนาไปสู่ระยะโพลิป (polyp) ช่วงระยะนี้จะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยโพลิปจะเพิ่มจำนวนโดยแตกหน่อ (budding) เมื่อสิ้นสุดการแตกหน่อและโพลิปพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างแล้ว จะปล่อย young medusa ออกมาจากโพลิป ล่องลอยในมวลน้ำ (Kingsford & Mooney, 2014) แล้วเติบโตเป็นระยะตัวเต็มวัย

ปัจจุบันประเทศไทยพบแมงกะพรุนกล่องทั้งสิ้น 13 ชนิด (Williamson, 1985; Suntrarachun *et al.*, 2001; Aungtonya & Chanachon, 2012; Toshino *et al.*, 2016; Sucharitakul *et al.,* 2017) แมงกะพรุนกล่องที่พบในไทยมีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่พบการแพร่กระจายในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะแมงกะพรุนกล่องชนิด *Chiropsoides buitendijki* ที่พบจากบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออกและอ่าวไทยตอนล่างมีการแพร่กระจายหลายแหล่งได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และยะลา (Sucharitakul *et al.*, 2019) ส่วนชายฝั่งทะเลอันดามันพบในหลายจังหวัดได้แก่ ภูเก็ต ระนอง พังงา กระบี่ ตรัง สตูล (Sucharitakul *et al.,* 2016; Aungtonya *et al.*, 2018)

แมงกะพรุนกล่องชนิด *Chiropsoides buitendijki* เดิมชื่อ *Chiropsalmus buitendijki* ตั้งชื่อสกุลครั้งแรกตาม สกุล *Chiropsalmus* ประกอบไปด้วย 2 ชนิดในช่วงเวลานั้น ได้แก่ *C. quadrumanus* และ *C. quadrigatus* และตั้งชื่อชนิดตาม Mr. P.J. Buitendijki ผู้ให้การสนับสนุนทุนในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเข้าสู่พิพิธภัณฑ์ โดยการบรรยายลักษณะสัณฐานวิทยาครั้งแรกจากตัวอย่างที่พบบริเวณท่าเรือบัตตาเวีย (จากาตาร์) เกาะชวาประเทศอินโดนีเซีย โดย Horst ในปี 1907 (Horst, 1907)ต่อมาในปี 1925 T. Krumbach ได้จัดตั้งวงศ์ใหม่เป็น Drepanochiridae และเปลี่ยนชื่อสกุลใหม่เป็น *Drepanochirus buitendijki* เนื่องจากมีหนวด (tentacles) ยื่นต่อออกมาจาก pedalia และมีการแตกแขนงออกด้านเดียว (unilaterally branching) ซึ่งแตกต่างกับสกุล *Chiropsalmus* ที่หนวดแตกแขนงออกมาทั้งสองข้างจาก pedalia (bilaterally branching) (Krumbach, 1925) และปี 1956 R.V. Southcott ได้จัดตั้งวงศ์ใหม่ ชื่อ Chiropsoididae และเปลี่ยนชื่อสกุลใหม่เป็น *Chiropsoides* แทนที่ *Drepanochirus* แต่ชื่อวงศ์ไม่ได้รับการยอมรับจากนักอนุกรมวิธานรุ่นต่อมา การจัดตั้งชื่อสกุลใหม่โดยการใช้การแตกแขนงของหนวดออกด้านเดียวจาก pedalia ยังไม่ได้การยอมรับจาก kramp (1961) และ Werner (1984) ต่อมา Gershwin (2006) ได้ศึกษาลักษณะสัณฐานเพิ่มเติมจากรูปร่างของถุงกระเพาะอาหาร pedalia canal และการแตกแขนงของ

pedalia ใหม่ รวมถึงรูปร่างของเข็มพิษ เพื่อสนับสนุนการเปลี่ยนชื่อสกุลใหม่ และจัดจำแนกสกุล *Chiropsoides* และ *Chiropsalmus* อยู่ในวงศ์ *Chiropsalmidae* ซึ่งใช้มาถึงปัจจุบัน

ในประเทศไทย มีรายงานพบแมงกะพรุนชนิด *C. buitendijki* ครั้งแรกในปี พศ. 2555 ในชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนล่าง เกาะท่าไร่ จังหวัดนครศรีธรรมราช (Aongsara , 2012) ต่อมามีรายงานพบในชายฝั่งทะเลอันดามัน เกาะภูเก็ต (Sucharitakul *et al*., 2016) และจังหวัดชายฝั่งทะเลอันดามัน ได้แก่ ระนอง พังงา กระบี่ ตรัง สตูล (Aungtonya *et al*., 2018) และยังพบในจังหวัดฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออกและตอนล่าง ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา ปัตตานี (Sucharitakul *et al*., 2019) ถูกบรรยายลักษณะครั้งแรก โดย Sucharitakul (2016) จากตัวอย่างจากทะเลอันดามัน จังหวัดภูเก็ต ประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะที่ Gershwin (2006) เคยบรรยายไว้ก่อนหน้านี้ แต่ยังไม่มีการบรรยายลักษณะตัวอย่างจากอ่าวไทย ซึ่งตัวอย่างในตัวเต็มวัยจากอ่าวไทย มักมีขนาดที่แตกต่างจากตัวอย่างจากทะเลอันดามัน

นอกจากนี้ รูปแบบของการบลูมของแมงกะพรุนกล่อง *C. buitendijki* ในสองฝั่งทะเลจะเหลื่อมเวลากัน โดยในอ่าวไทยจะพบการบลูมจะอย่างกว้างขวาง ในช่วงฤดูลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (เดือน พ.ย.-เม.ย.) ซึ่งจะพบการบลูมได้ตั้งแต่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (เดือน ธ.ค.) สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และปัตตานี (ตลอดช่วงมรสุม) แต่ในช่วงฤดูลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (พ.ค.-ต.ค.) พบการบลูมที่จังหวัดสุราษฎร์ธานีเท่านั้น ในขณะที่บริเวณทะเลอันดามัน จะพบการบลูมอย่างกว้างขวางทั้งสองฤดู (Marine and Coastal Resources Research and Development Institute, 2015) การมีแผ่นดินเป็นสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ ระหว่างอ่าวไทย และทะเลอันดามัน อาจเอื้อให้เกิดความแตกต่างระหว่างประชากร

การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ประเมินความผันแปรของสัณฐานวิทยาภายนอก และพันธุกรรมในแมงกะพรุนกล่อง *C. buitendijki* ระหว่างกลุ่มตัวอย่างจากสงขลา พังงา และตรัง โดยความผันแปรทางพันธุกรรมจะอนุมานจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ในไมโทคอนเดรีย เนื่องจากปัจจุบันนี้ การศึกษาในระดับโมเลกุลสามารถเปิดเผยชนิดที่มีความคลุมเครือ (cryptic species) หรือสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดเป็นพี่น้องกัน (sibling species) ในหลายกลุ่มของสัตว์ทะเลหลายสายพันธุ์ (Knowlton, 2000) แสดงให้เห็นว่าสัตว์ทะเลมีความหลากหลายทางชีวภาพค่อนข้างสูง นำไปสู่การเปิดโอกาสให้มีการเกิดสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ใหม่ (speciation) มากขึ้น (Dawson & Jacobs, 2001) องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งอาจนำไปสู่การตรวจสอบความคลุมเครือของแมงกะพรุนชนิดนี้ในชายฝั่งทะเลของไทย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างแมงกะพรุนกล่อง

การศึกษาครั้งนี้รวบรวมตัวอย่างแมงกะพรุนกล่องตัวเต็มวัยระหว่างปี พศ. 2560-2561 ชนิด *C. buitendijki* เพื่อใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ด้วยอวนลอยกุ้ง 3 ชั้น ขนาดตาประมาณ 4 เซนติเมตร จำนวน 75 ตัวอย่าง จาก 2 แหล่ง คือ ฝั่งทะเลอันดามัน จากจังหวัดตรัง เก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เก็บในเดือนมิถุนายน 2560 (n= 30) และครั้งที่ 2 ในเดือนกรกฎาคม 2561 (n= 10) พิกัดทางภูมิศาสตร์ (7°33´11"N, 99°16´56"E) พร้อมกับ

ตัวอย่างที่รวบรวมได้ในเดือนกรกฎาคม 2561 (n=30) จากจังหวัดพังงา พิกัดทางภูมิศาสตร์ (9°18´18'' N, 98°22´2''E) ส่วนอ่าวไทยรวบรวมตัวอย่างจาก 1 แหล่ง (จังหวัดสงขลา n=5) พิกัดทางภูมิศาสตร์ 6°57´16''N, 100°49´26''E (ภาพที่ 1) เมื่อรวบรวมตัวอย่างแล้วจะทำการตัดชิ้นส่วนบริเวณหนวดและโคนหนวด รักษาสภาพในแอลกอฮอล์ 95-99 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส และรักษาสภาพตัวอย่างที่เหลือจากการตัดเนื้อเยื่อในฟอร์มัลดีไฮด์ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

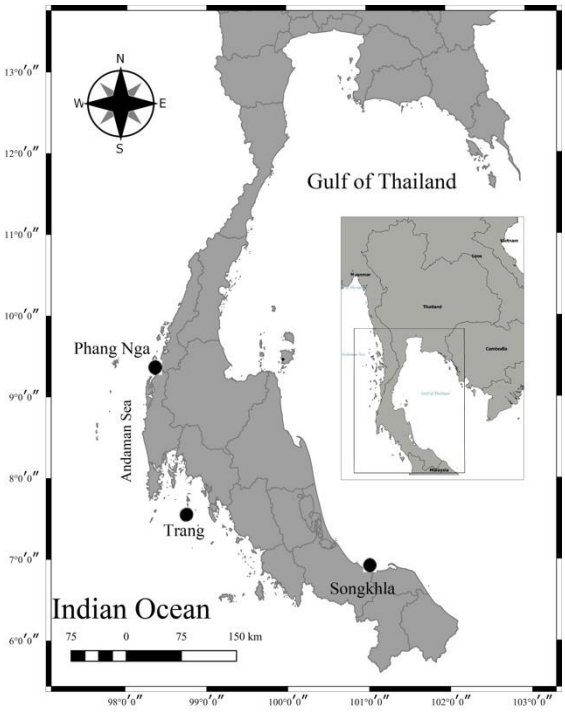
2.การยืนยันชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Olympus (รุ่น SZX16) ประเทศญี่ปุ่น โดยการวัดสัดส่วนความกว้างและความสูงของหมวกร่ม ลักษณะรูปร่างและการแตกแขนงของหนวด pedalial canal, velarial canals, rhophalia, rhopaliar niche ostia, finger-shape gastric saccules และ gastric cirri โดยใช้คู่มือการจำแนกชนิดของ Gershwin (2006), Sucharitakul *et al*. (2016) และ Aungtonya *et al*. (2018) เป็นหลัก ซึ่งดำเนินการศึกษาตามขั้นตอนดังต่อไปนี้คือ วัดสัดส่วนความสูงและความกว้างของหมวกร่มได้แก่ ความสูงของหมวกร่ม (bell height: BH) วัดจากด้านบนสุด (apex) ของหมวกร่มไปยังขอบร่ม (verarial turnover) และความกว้างของหมวกร่ม (diagonal bell width: DBW) วัดผ่านไปยัง pedalia ตำแหน่งส่วนที่สูงของ pedalia รวมถึงลักษณะของการแตกแขนงหนวด ลักษณะของรูปร่าง pedalial canal ที่ตำแหน่งส่วนปลายสุด ลักษณะการแตกแขนงของ velarial canals อยู่บน velarium รูปร่างของ rhophalia /rhophaliar niche ostia และ ลักษณะของถุงกระเพาะอาหาร (finger-shape gastric saccules) เป็นต้น

3. การใช้เทคนิค PCR ในการสกัด และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนหนวด โคนหนวด และขอบร่มของแมงกะพรุนกล่องที่รักษาสภาพด้วยแอลกอฮอล์ 95-99 เปอร์เซ็นต์ มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex extraction (ดัดแปลงจาก Casquet *et al.,* 2012) หรือชุดสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและเนื้อเยื่อสัตว์ DNeasy Blood &Tissue Kit (QIAGEN, Germany) ปริมาตร 25 ไมโครกรัม เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นในหลอดทดลอง (ปฏิกิริยาลูกโซ่ พีซีอาร์) ของดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ไซโทโครม ซี ออกซิเดส (cytochrome c oxidase subunit I, COI) ในไมโทคอนเดรีย ขนาด 790 คู่เบส โดยใช้ ไพรเมอร์จาก MED-COXL-F: (5'ACNAAYCAYAAAGATATHGG3') และ MED-COXL-R (3' TGGTGNGCYCANACNATRAANCC5') (Lawley *et al.,* 2016) โดยมีส่วนผสมของแต่ละปฏิกิริยา (50 ไมโครลิตร) ดังนี้คือ ต้นแบบ 3 ไมโครลิตร (>5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร สารละลาย dNTPs (10 mM) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร MgCl2 (50 mM) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 uM) สายละ 1 ไมโครลิตร Taq DNA Polymerase (5U ต่อไมโครลิตร) 0.4 ไมโครลิตร สารละลาย BSA (1mg/ml) 0.5 ไมโครลิตร น้ำปลอดเชื้อ 34.1 ไมโครลิตร (ดัดแปลงจาก Pontin & Cruickshank, 2012) และใช้การเพิ่มลดอุณหภูมิ ในเครื่อง Thermocycler (BIO-RAD MJ MiniTM Gradient Thermal Cycler) ที่สภาวะเริ่มต้นอุณภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3นาที จากนั้นใช้อุณหภูมิเป็นวัฏจักร ที่ประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่อุณภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นตอน annealing 48 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที ขั้นตอน extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 36 รอบ และระยะ final extension 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยวิธีการ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลที่

ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกำจัดส่วนผสมที่เหลือจากปฏิกิริยาลูกโซ่ ของผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มได้ โดยใช้ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Vivantis DNA Amplification Product, Malaysia) จากนั้นจะวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากด้าน 3' ไป 5' และ ด้าน 5' ไป 3' ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ โดยบริษัทที่ให้บริการทางอนูพันธุศาสตร์ (First Base, Inc., Malaysia)



ภาพที่ 1 พิกัดเก็บตัวอย่างแมงกะพรุนกล่อง *Chiropsoides buitendijki* บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันตก และทะเลอันดามัน

4.การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่าง และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ และแก้ไขนิวคลีโอไทด์ โดยตัดส่วนที่เป็นไพรเมอร์ออกด้วยโปรแกรม Sequence Scanner version 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) จากนั้นเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นของบริเวณเดียวกัน 2 สาย ด้วยโปรแกรม CAP3 Sequence Assembly (Huang & Madan, 1999)

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้ดัชนีดังนี้ คือ nucleotide diversity (π; Nei, 1987) ซึ่งวัดค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งในสาย

นิวคลีโอไทด์ที่สุ่มมาจากประชากร และค่า haplotype diversity (h; Nei, 1987) ที่ประเมินสัดส่วนแฮพโพลไทป์ที่ต่างรูปแบบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม DnaSP version 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009)

คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่างและระหว่างกลุ่มตัวอย่าง เพื่อประมาณค่าความแตกต่างของวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ใช้ Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980) โดยโปรแกรม MEGA 7.0.26 (Kumar *et al*., 2016)

สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากบางส่วนของยีน COI ด้วยวิธี Maximum likelihood และใช้แบบจำลองวิวัฒนาการของ Hasegawa-Kishino-Yano ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0.26 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2015) ทั้งนี้ในการสร้างแผนภูมิมีการใช้สายนิวคลีโอไดท์ในฐานข้อมูล NCBI มาร่วมเป็น outgroup (KT 223648; *Chironex indrasaksajiae*.และ GQ120103 : *Chiropsalmus quadrumanus*) ประเมินความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

ผลการวิจัย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การวัดลักษณะสัณฐานของแมงกะพรุนกล่อง (*C. butendijki*) ทั้งสองแหล่ง พบความแตกต่างของขนาดหมวกร่มและลักษณะรูปร่างของ rhopaliar niche ostia (ภาพที่ 2) ของตัวอย่างจากอ่าวไทย และทะเลอันดามัน ในขณะที่ มีลักษณะหลักอื่น ๆ ตรงตามชนิด *C. butendijki* ที่ระบุใน Gershwin (2006) Sucharitakul *et al*. *(*2016) และ Aungtonya *et al*. (2018) (ตารางที่ 1)

ตัวอย่างจากอ่าวไทยมีขนาดความกว้างของหมวกร่มเฉลี่ย 49.4±0.46 และ ความสูงของหมวกร่มเฉลี่ยเท่ากับ 68.0±0.9 มิลลิเมตร ในขณะที่ตัวอย่างจากทะเลอันดามันมีความกว้างหมวกร่ม เท่ากับ 30.5±0.55 มิลลิเมตร และ ความสูงของหมวกร่มเฉลี่ย เท่ากับ 31.9±0.58 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2-A) ซึ่งตัวอย่างจากอ่าวไทยมีขนาดความกว้างคิดเป็นสัดส่วนประมาณ 1.6 เท่า และความสูงของหมวกร่มใหญ่เป็น 2 เท่า ของตัวอย่างจากทะเลอันดามัน

ส่วนของ rhopaliar niche ตัวอย่างจากอ่าวไทยมีลักษณะรูปร่างของขอบบนจะเว้าลง มองไม่เห็น flap ขณะที่ตัวอย่างจากทะเลอันดามัน มีลักษณะรูปร่างของ rhopaliar niche ostia ที่โค้งเว้าค่อนข้างกลมมองเห็น Flap ได้ชัดเจน (ภาพที่ 2-E) ลักษณะของหนวดแตกแขนงจากโคนหนวดด้านเดียวมีจำนวนหนวด 6 เส้น ในแมงกะพรุนกล่องจากอ่าวไทย และ 4-5 เส้น ในตัวอย่างจากอันดามัน (ภาพที่ 2-B) นอกจากนี้ยังพบลักษณะของรยางค์ส่วนอื่นที่คล้ายคลึงกันจากทั้ง 2 แหล่ง ได้แก่ ส่วนปลายสุดของ pedalial canal จะมีรูปร่างคล้ายเขาแหลม ทอดยาวไปกับ velarium ไปถึง subumbrella (ภาพที่ 2-C) velarial canals อยู่บน velarium แตกแขนงคล้ายกิ่งก้านของต้นไม้จากด้านข้างจำนวนมาก (ภาพที่ 2- D) ถุงกระเพาะอาหารรูปร่างเรียวยาวคล้ายนิ้วมือ (finger-shape gastric saccules) (ภาพที่ 2-F) และมีเส้นใยในกระเพาะอาหารจำนวนมาก (gastric cirri) (ภาพที่2-G)

การตรวจสอบชนิดแมงกะพรุนกล่อง ด้วยลำดับคลีโอไทด์และระยะห่างทางพันธุกรรม

สายลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI ของ *C. buitendijki* จากสงขลา พังงา และตรัง มีตำแหน่งที่มีความผันแปรจำนวน 91 ตำแหน่ง จากความยาวทั้งสาย 790 คู่เบส (คิดเป็น 11.51 เปอร์เซ็นต์) ของความยาวสายนิวคลีโอไทด์ ทำให้มีแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกัน จำนวน 32 รูปแบบ ซึ่งมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของรูปแบบมีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะสถานที่ (private haplotypes) และตัวอย่างจากทะเลอันดามันมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (hd = 0.998±0.008, π= 0.010) มากกว่าตัวอย่างจากอ่าวไทย (hd = 0; π = 0) นอกจากนี้ ความผันแปรทางพันธุกรรมของแฮพโพลไทป์ส่วนใหญ่เกิดจากความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทย (สงขลา) และทะเลอันดามัน (พังงาและตรัง)

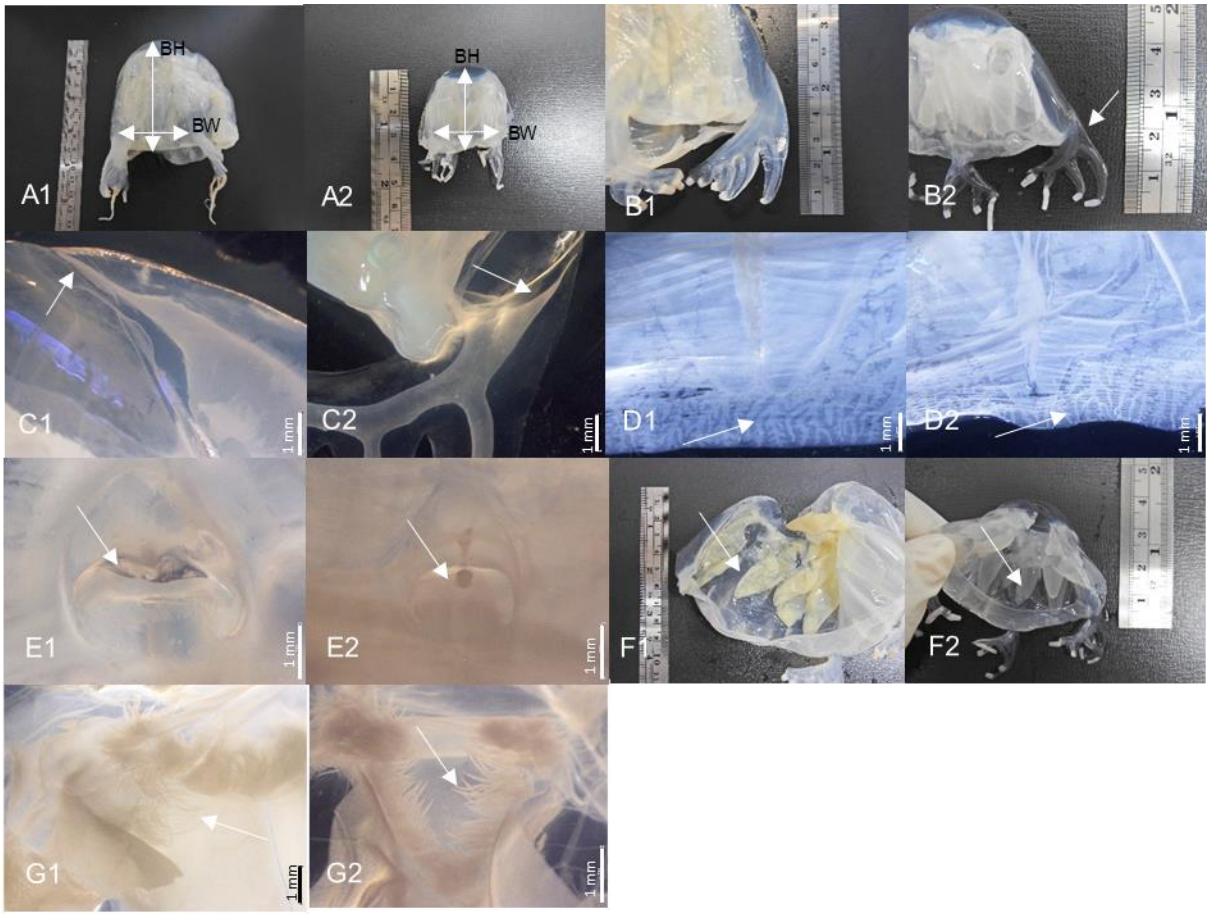
ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (ตารางที่ 2) และแผนภูมิความสัมพันธ์ของแฮพโพลไทป์ (ภาพที่ 3) แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทย (สงขลา) และทะเลอันดามัน (พังงาและตรัง) โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.0956-0.0970 ทั้งนี้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มอันอันดามัน (ตรังและพังงา) โดยอยู่ในช่วง 0.0023-0.0038 (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแฮพโพลไทป์ของยีน COI ที่สร้างด้วยวิธี Maximum likelihood สามารถแบ่งกลุ่มตามภูมิศาสตร์ระหว่างประชากรฝั่งอ่าวไทยและอันดามันได้ชัดเจน (ค่า bootstrap =36 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม ระดับความแปรปรวนของยีน COI ไม่สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ภายในทะเลอันดามันได้ (ภาพที่ 3)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ความผันแปรทางสัณฐานและพันธุกรรมของกะพรุนกล่อง *C. buitendijki* ในอ่าวไทยและอันดามัน มีลักษณะสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่ของตัวอย่างแมงกระพรุนกล่องตรงตามลักษณะของ *C. buitendijki* ที่อธิบายไว้ใน Gershwin (2006), Sucharitakul *et al*. (2016) และ Aungtonya *et al*. (2018) แต่การศึกษาในครั้งนี้พบความแตกต่างของขนาดหมวกร่ม จำนวนหนวด และลักษณะรูปร่าง rhopaliar niche ostia ระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทย และทะเลอันดามัน โดยตัวอย่างจากอ่าวไทย (สงขลา) มีขนาดความกว้างเฉลี่ย 1.6 เท่า และความสูงเฉลี่ยคิดเป็น 2 เท่าของตัวอย่างจากทะเลอันดามัน และมีรูปร่างของ rhopaliar niche ostia โค้งและเว้าตรงกึ่งกลาง มีผนังปิดลงมาป้องกัน rhopalium บางส่วน ทำให้ไม่สามารถมองเห็น rhopalium ได้ชัดเจน ซึ่งเป็นลักษณะสัณฐานที่แตกต่างจากลักษณะของ *C. buitendijki* ที่ได้มีการอธิบายไว้ ความแตกต่างดังกล่าวเป็นประเด็นที่น่าสนใจ เนื่องจาก C. buitendijki เป็นเพียงสมาชิกชนิดเดียวในสกุลนี้ และลักษณะนี้ไม่ปรากฏในชนิดอื่นในอันดับเดียวกัน รูปร่าง rhopaliar niche เป็นลักษณะสัณฐานหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกชนิดแมงกะพรุนกล่องชนิดอื่นๆ สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างชนิดในสกุล *Chiropsalmus* (วงศ์เดียวกับ *Chiropsoides*) แต่เป็นรูปร่างแบบอื่นจากที่พบใน *C. buitendijki*

ตารางที่ 1 ลักษณะสัณฐานของแมงกะพรุน *C. buitendijki* ที่มีการรายงานในปัจจุบัน (*ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างจาก อ่าวไทยและทะเลอันดามัน)

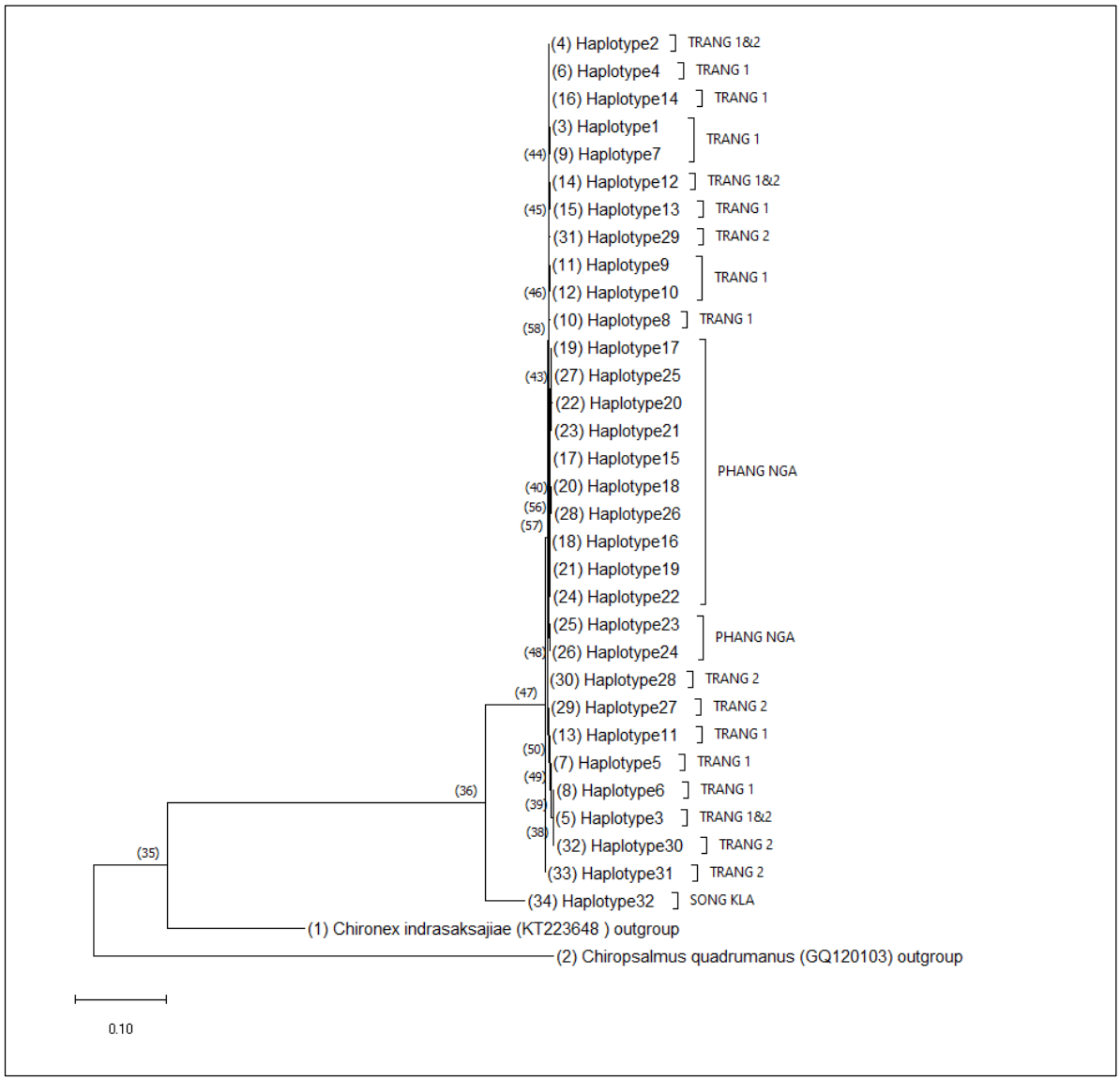
	ความสูงหมวกร่ม (,มิลลิเมตร)	ความกว้างหมวกร่ม (มิลลิเมตร)	bell texture	gastric sacules	pedalia branching	pedalia canal	tentacle; cross section	rhophalia shape, rhopaliar niche ostia	distribution	หมายเหตุ
C. buitendijki (Horst, 1907) (*Chiropsalmus buitendijki*)	70	65	เรียบ ไม่มีเข็มพิษ	รูปร่างคล้ายนิ้วมือ ห้อยลงมา ยาวเท่าความสูงของหมวกร่ม	ทิศทางเดียว เป็นแนวยาวไปกับ pedalium	ไม่แบ่งแยก แตกแขนงในทิศทางเดียว ส่วนปลายสุดรูปร่างคล้ายเขาแหลม	5-6 เส้น: แบนคล้ายริบบิ้น	ทรงรี	จาการ์ตา อินโดนีเซีย (ปัตตาเวีย)	Holotype
C.buitendijki (Gershwin,2006) revised	64.21	86.60	เรียบ ไม่มีเข็มพิษ	รูปร่างคล้ายนิ้วมือ ห้อยลงมา	ทิศทางเดียว เป็นแนวยาวไปกับ pedalium	-	5-9เส้น: แบนคล้ายริบบิ้น	ทรงรี	จาการ์ตา อินโดนีเซีย (ปัตตาเวีย	Holotype
C.buitendijki (Rizman-Idid,2016)	-	เส้นผ่าศูนย์กลาง 100 mm	เรียบ ไม่มีเข็มพิษ	รูปร่างคล้ายนิ้วมือ ยาวใกล้เคียงกับช่องว่างภายในของหมวกร่ม	ทิศทางเดียว	ปลายแหลม	5-6 เส้น	-	Teluk Bahang. , ปีนัง มาเลเซีย	Paratype
C. buitendijki (Sucharitakul et al., 2016)	46.8	57.6	เรียบ ไม่มีเข็มพิษ	รูปร่างคล้ายนิ้วมือ ห้อยลงมา ยาวเท่าความสูงของหมวกร่ม	ทิศทางเดียว เป็นแนวยาวไปกับ pedalium	ไม่แบ่งแยก แตกแขนงในทิศทางเดียว ส่วนปลายสุดรูปร่างคล้ายเขาแหลม	5 เส้น: แบน ขอบขรุขระ แบบคลื่น	ทรงโดม: โค้งเว้า	อันดามัน (ภูเก็ต)	Paratype
C. buitendijki (Aungtonya et al. , 2018)	34.7	-	เรียบ ไม่มีเข็มพิษ	รูปร่างคล้ายนิ้วมือ ห้อยลงมา ยาว 2/3 ของความสูงของหมวกร่ม	ทิศทางเดียว เป็นแนวยาวไปกับ pedalium	ไม่แบ่งแยก แตกแขนงในทิศทางเดียว ส่วนปลายสุดรูปร่างคล้ายเขาแหลม	3-6 เส้น: แบนคล้ายริบบิ้น	ทรงรีตื้นๆ	อันดามัน	Paratype
C. buitendijki (การศึกษาในครั้งนี้)	31.9 ± 0.58	30.5 ± 0.55	เรียบ ไม่มีเข็มพิษ	รูปร่างคล้ายนิ้วมือ ห้อยลงมา ยาวเท่าความสูงของหมวกร่ม	ทิศทางเดียว เป็นแนวยาวไปกับ pedalium	ไม่แบ่งแยก แตกแขนงในทิศทางเดียว ส่วนปลายสุดรูปร่างคล้ายเขาแหลม	*4-5 เส้น : แบนคล้ายริบบิ้น	* ค่อนข้างกลมรี; โดมโค้งมน ไม่มีเขา มองเห็น Flap ชัดเจน	อันดามัน (ตรัง ,พังงา	Paratype
C. buitendijki (การศึกษาในครั้งนี้)	68.0 ± 0.90	49.4 ± 0.46	เรียบ ไม่มีเข็มพิษ	รูปร่างคล้ายนิ้วมือ ห้อยลงมา ยาวเท่าความสูงของหมวกร่ม	ทิศทางเดียว เป็นแนวยาวไปกับ pedalium	ไม่แบ่งแยก แตกแขนงในทิศทางเดียว ส่วนปลายสุดรูปร่างคล้ายเขาแหลม	*6 เส้น: แบนคล้ายริบบิ้น	* ทรงพีระมิด: u-shpae/ดัมเบล ไม่มีเขา มองไม่เห็น flap	อ่าวไทย (สงขลา)	Paratype



ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานของตัวอย่าง *C. buitendijki* ตัวเต็มวัยที่รวบรวมจากน่านน้ำไทย (1: อ่าวไทย, 2: ทะเลอันดามัน) A: ความกว้าง (BW) และความสูงของหมวกร่ม (BH) * B:unilateral branching pedalia C: spike pedalial canal D: verarial canals E: rhopaliar niche ostia *F: finger-shape gastric saccules G: numerous gastric cirri * ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

ตารางที่ 2 ระยะห่างทางพันธุกรรมภายใน และระหว่างกลุ่มประชากร คำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI โดยวิธี Kimura 2-parameter model ค่าในวงเล็บ () คือค่า standard error ที่ได้จากการสุ่ม bootstrap 1,000 ครั้ง (ตัวหนา = ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากร)

	สงขลา	พังงา	ตรัง
สงขลา	**0.00**		
พังงา	0.0956 (0.0115)	**0.0023 (0.0009)**	
ตรัง	0.0970 (0.0116)	0.0046 (0.0015)	**0.0038 (0.0012)**



ภาพที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI (790 คู่เบส วิเคราะห์ ด้วยวิธี maximum likelihood ใช้แบบจำลองการกลายของ Hasegawa-Kishino-Yano และใช้สายนิวคลีโอไทด์ของ *Chironex indrasaksajiae* (KT223648) และ *Chiropsalmus quadrumanus* (GQ120103) เป็น outgroup ประเมินผลความเชื่อมั่นของแผนภูมิด้วยการสุ่มด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

อย่างไรก็ตามระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน COI ระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทยและอันดามัน เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทย และอันดามันเท่ากับ 9.6-9.7 เปอร์เซ็นต์ :ซึ่งมีค่าที่สูงสำหรับความแตกต่างภายในชนิดทั่วไป (intra-specific divergence) ของสัตว์ในกลุ่มแมงกะพรุนกล่อง แต่ไม่ได้มีค่าสูงอย่างชัดเจนจนสามารถสรุปได้ว่าเป็นต่างชนิด โดยช่วงค่าที่สูงสุดที่พบในระดับภายในชนิดจากการศึกษาของ Huang (2008) และ Ortman *et al*. (2010) ที่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับชนิด (intra specific) ของสายนิวคลีโอไทด์ยีน COI ใน ในกลุ่มสัตว์ Meduzoa (ประกอบไปด้วยชั้น Hydrozoa ชั้น Scyphozoa และชั้น Cubozoa) และ ชั้น Scyphozoa ในระดับ 0-5.7 และ 4.27 (±0.46) ตามลำดับ ในขณะที่ค่าความแตกต่างระหว่างชนิด (inter-specific) ของแมงกะพรุน มักมีค่ามากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยีน COI (Acevedo et al., 2019; Holst & Laakmann, 2014; Sucharitakul *et al.,* 2017) เช่นเดียวกันกับสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น พบความแตกต่างระหว่างชนิดจากยีน COI พบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เช่น 18 เปอร์เซ็นต์ ในโคพีพอด (Bucklin *et al*., 1998) 4-19 เปอร์เซ็นต์ ในกุ้งสกุล *Alpheus* (Knowlton & Weight, 1998) 7.5 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มหอยจากทะเลลึก (Vesicomyidae) (Peek *et al*., 1997)

นอกจากนี้ความแตกต่างลักษณะสัณฐานที่ต่างกันบางลักษณะและความแตกต่างทางพันธุกรรมของแมงกะพรุนกล่อง *C. butendijki* ระหว่างอันดามันและอ่าวไทยอาจเป็นผลมาจากการกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์ ของแมงกะพรุนกล่อง *C. butendijki* ในบริเวณอินโด-แปซิฟิก และการเปลี่ยนแปลงทางธรณีในอดีต ซึ่งบริเวณอ่าวไทยเป็นส่วนหนึ่งของแผ่นเปลือกโลก Sunda Shelf ที่กำเนิดในยุคไพลสโตซีน (Pleistocene) (Voris, 2000) โดยในบริเวณนี้น้ำทะเลของสองฝั่งท่วมถึงกันในช่วงยุคน้ำแข็งยุคสุดท้ายประมาณ 46,000-30,000 ปีก่อน (Sinsakul, 1992) จากนั้นน้ำทะเลจึงค่อยลดลง จนแยกเป็นมหาสมุทรอินเดียและแปซิฟิก เมื่อประมาณ 8,500-4,000 ปีก่อน (McManus, 1985; Benzie, 1998) มีความเป็นไปได้ว่าแมงกะพรุนกล่องที่พบในอ่าวไทยมีสายสัมพันธ์ (lineage) ที่แตกต่างจากทะเลอันดามัน แต่การที่ระดับน้ำทะเลสูงในยุคน้ำแข็งครั้งสุดท้ายอาจเอื้อให้มีการแลกเปลี่ยนยีนกันระหว่างอ่าวไทย และทะเลอันดามัน ซึ่งเป็นเหตุที่ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมตัวอย่าง *C. butendijki* จากทั้งสองมหาสมุทร ยังคงเป็นชนิดเดียวกัน ทั้งนี้การแบ่งแยกทางภูมิศาสตร์อาจนำมาสู่การเกิดสายพันธุ์ชนิดใหม่ได้ เช่น การศึกษาประชากรแมงกะพรุน ชนิด *Pelagia noctiluca* บริเวณตอนเหนือของแอตแลนติกและทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ microsatellite และ COI (Glynn *et al.,*2016) โดยมีแผ่นดินของทวีปยุโรปบริเวณประเทศสเปนและฝรั่งเศสเป็นสิ่งกีดขวางระหว่างมหาสมุทร ที่ทำให้ประชากรที่อาศัยในสองมหาสมุทรมีพันธุกรรมที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และกรณีการนำไปสู่การเกิดสายพันธุ์ใหม่ของเม่นทะเล (*Diadema*) *D. mexicanum D. antillarum* ที่มาจากเชื้อสายเดียวกัน (lineage) ระหว่าง มหาสมุทรแปซิฟิตะวันออกและมหาสมุทรแอตแลนติก โดยมีคอคอดกระปานามาเป็นสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ (Lessios ,1998; Lessios *et al*., 2001)

การศึกษาแมงกะพรุนชนิด *C. butendijki* ในน่านน้ำไทยในอนาคตจึงควรที่จะทำการศึกษาในด้านพันธุศาสตร์ประชากรและลักษณะสัณฐานของแมงกะพรุนชนิดนี้จากแหล่งอื่นให้ครอบคลุมในพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายของน่านน้ำไทย รวมทั้งศึกษายีนในตำแหน่งอื่น เช่น 16S rRNA :ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสามารถในการสะท้อนความแตกต่างระหว่างชนิดได้ โดยมีการศึกษาใช้ยีน 16S rRNA ร่วมกับ ยีน COI และใช้ไพร์เมอร์ที่ความเฉพาะเจาะจงต่อชนิดสิ่งมีชีวิต ตรวจ

พบความแตกต่างทางพันธุกรรม ของแมงกะพรุนกล่องชนิด *Chironex* spp.ในน่านน้ำไทย ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน จำแนกออกเป็นออกเป็น 3 ชนิดได้ (Sathirapongsasuti *et al*.,2021)

สรุปผลการวิจัย

ลักษณะสัณฐานส่วนใหญ่ของตัวอย่างแมงกระพรุนกล่อง ตรงตามลักษณะของ *C. buitendijki* ที่อธิบายไว้ใน Gershwin (2006), Sucharitakul *et al*. (2016) และ Aungtonya *et al*. (2018) แต่การศึกษาในครั้งนี้พบความแตกต่างของขนาดหมวกร่ม จำนวนหนวด และลักษณะรูปร่าง rhopaliar niche ostia ระหว่างตัวอย่างจากทะเลอันดามัน และอ่าวไทย และระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน COI ระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทยและอันดามัน มีค่าที่สูงสำหรับความแตกต่างภายในชนิดทั่วไป (intra-specific divergence) พบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจากอ่าวไทยและอันดามัน เท่ากับ 9.6-9.7 แต่ยังไม่สูงมากถึงระดับความแตกต่างระหว่างชนิด (inter-specific divergence) ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของแมงกะพรุนกล่อง *C. buitendijki* ร่วมกับความผันแปรทางด้านสัณฐานวิทยาบางลักษณะ จึงยังไม่สามารถยืนยันการเป็นชนิดที่แตกต่างกันได้ การทบทวนอนุกรมวิธานของแมงกะพรุนกล่องในสกุลนี้ จำเป็นต้องมีจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างจากตลอดแนวชายฝั่งในอ่าวไทย เพื่อที่จะประเมินลักษณะสัณฐาน ร่วมกับศึกษาทางพันธุกรรมที่ครอบคลุมยีนหลายตำแหน่ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล และภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องของเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ Dr. Sho Toshino อย่างสุดซึ้งที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจสอบความถูกต้องในการยืนยันชนิด คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

Acevedo, M. J., Straehler-Pohl, I., Morandini, A. C., Stampar, S. N., Bentlage, B., Matsumoto, G. I., Yanagihara, A., Toshino, S., Fuentes, V. L. (2019). Revision of the genus Carybdea (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeidae): clarifying the identity of its type species Carybdea marsupialis. *Zootaxa, 4543*(4), 515-548.

Aongsara, S., Buabanjong, T., & Thaiklang. T. (2012). *Diversity and Distribution of jellyfish along the coast of Nakhon Si Thammrat, Songkhla and Pattani Province*. Marine and Coastal Resources Research and Development Institute. Techical paper no. 2/2012. (in Thai).

Aungtonya, C., & Chanachon, K. (2012). *Species and distribution of venomous jellyfish in coastal ares of Phuket Province* 1/2012, 38

Aungtonya, C., Xiao, J., Zhang, X., & Wutthituntisil, N. (2018). The genus Chiropsoides (Chirodropida: Chiropsalmidae) from the Andaman Sea, Thai waters. *Acta Oceanologica Sinica, 37*(10), 119-125.

Bucklin, A., Bentley, A. M., & Franzen S. P. (1998). Distribution and relative abundance of Pseudocalanus moultoni and P. newmani (Copepoda: Calanoida) on Georges Bank using molecular identification of sibling species. *Mar. Biol. ,132*, 97–106.

Benzie, J. (1998). Genetic structure of marine organisms and SE Asian biogeography. *Biogeography and geological evolution of SE Asia, 30*, 197-209.

Casquet, J., Thebaud, C., & Gillespie, R. G. (2012). Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol‐stored spiders. *Molecular ecology resources*, *12*(1), 136-141.

Dawson, M. N. (2005). Incipient speciation of Catostylus mosaicus (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *Journal of Biogeography, 32*(3), 515-533. doi:10.1111/j.1365-2699.2004.01193.x.

Fenner, P. J. (2005). Venomous jellyfish of the world. *SPUMS JOURNAL*, *35(*3), 131.

Fernando, M. (1992) Some hazards of diving. *Ceylon Med J* ,37,72–80.

Gershwin, L. (2006). Comments on Chiropsalmus (Cnidaria: Cubozoa: Chirodropida): a preliminary revision of the Chiropsalmidae, with descriptions of two new genera and two new species. *Zootaxa, 1231*(1), 1-42.

Haeckel, E. (1880) System der Acraspeden. Zweite Halfte des System der Medusen. *G. Fischer, Jena*, *20*, 361–672.

Holst, S., & Laakmann, S. (2014). Morphological and molecular discrimination of two closely related jellyfish species, Cyanea capillata and C. lamarckii (Cnidaria, Scyphozoa), from the northeast Atlantic. *Journal of Plankton Research, 36*, 48-63.

Horst, R. (1907) *On a new cubomedusa from the Java-Sea: Chiropsalmus buitendijki*. Notes from the Leyden Museum, 29, 101–106.

Huang, X., & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research, 9*(9), 868-877.

Huang, D., Meier, R. & Todd, P.A. (2008) Slow Mitochondrial COI Sequence Evolution at the Base of the Metazoan Tree and Its Implications for DNA Barcoding. *J Mol Evol 66*:167–174. DOI 10.1007/s00239-008-9069-5.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J*ournal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.

Kingsford, M. J., & Mooney, C. J. (2014). *The Ecology of Box Jellyfishes (Cubozoa)*. In Jellyfish Blooms (267-302).

Knowlton, N., & Weigt, L. A. (1998). New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: *Biological Sciences, 265*(1412), 2257-2263.

Knowlton, N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* ,*420*, 73–90.

Kramp, P.L. (1961) Synopsis of the medusae of the world. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 40*, 1–469.

Krumbach, T. (1925) *Scyphozoa*. In: Kükenthal, W. & Krumbach, T. (Ed.), Handbuch der Zoologie. W. de Gruyer, Berlin, 522–686.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and *evolution, 33*(7), 1870-1874.

Lawley, J. W., Ames, C. L., Bentlage, B., Yanagihara, A., Goodwill, R., Kayal, E., & Collins, A. G. (2016). Box Jellyfish Alatina alata Has a Circumtropical Distribution. *Biol Bul*l, *231*(2), 152-169. doi:10.1086/690095

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, *25*(11), 1451-1452.

Lessios, H. A. (1998). The first stage of speciation as seen in organisms separated by the Isthmus of Panama. Endless forms: *species and speciation*, 186-201.

Lessios, H. A., Kessing, B. D., & Pearse, J. S. (2001). Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin Diadema. *Evolution, 55*(5), 955-975.

Marine and Coastal Resources Research & Development Institute.(2015). *Diversity Study Guide of jellyfish in Thai waters.* 133 . (in Thai)

McManus, J. (1985). *Marine speciation tectonic and sea level changes in Southeast Asia.* Paper presented at the Proc 5th Intl Coral Reef Symposium (Tahiti), 1985.

Menon, M.G.K. (1936) Scyphomedusae of Krusadai Island. Bull Madras Gov Mus. *Nat Sci Nat* Hist *Sect, 1*,1–9

Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia university press.

Ortman, B.D., Bucklin, A., Pages, F. & Youngbluth, M. (2010). DNA Barcoding the Medusozoa using mtCOI. *Deep Sea Research II, 57*, 2148-2156. doi:10.1016/j.dsr2.2010.09.017.

Peek, A. S., Gustafson, R. G., Lutz, R. A., & Vrijenhoek, R. C. (1997). Evolutionary relationships of deep-sea hydrothermal vent and cold-water seep clams (Bivalvia: Vesicomyidae): results from mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Mar. Biol.* ,*130*, 151–161.

Pontin, D. R., & Cruickshank, R. H. (2012). Molecular phylogenetics of the genus Physalia (Cnidaria: Siphonophora) in New Zealand coastal waters reveals cryptic diversity. *Hydrobiologia*, *686*(1), 91-105.

Sinsakul, S. (1992). Evidence of quarternary sea level changes in the coastal areas of Thailand: a review. *Journal of Southeast Asian Earth Sciences, 7*(1), 23-37.

Srinui, K., Ohtsuka, S., Metillo, E. B., & Nishibori, M. (2019). A new species of Acartia (Copepoda, Calanoida) from the Philippines, based on morphological and molecular analyses. *ZooKeys*, *(814*), 71.

Sucharitakul, P., Aungtonya, C., & Chomdej, S. (2016). DNA sequencing complements morphological identification of Chiropsoides from Nam Bor Bay, Phuket, Thailand. *Phuket Marine Biological Center Research Bulletin*, *73*, 7-14.

Sucharitakul, P., Chomdej, S., Achalawitkun, T., & Arsiranant, I. (2017). Description of Chironex indrasaksajiae Sucharitakul sp. nov.(Cnidaria, Cubozoa, Chirodropida): A new species of box jellyfish from the Gulf of Thailand. *Phuket Mar. Biol. Cent. Res. Bull, 74*, 33-44.

Sucharitakul, P., Chomdej, S., Achalawitkun, T., Aongsara, S., Arsiranant, I., Paiphongpheaw, P., & Chanachon, K. (2019). Chirodropid box jellyfish in the Gulf of Thailand. *Marine Biodiversity, 49*(3), 1247-1252.

Suntrarachun, S., Roselieb, M., Wilde, H., & Sitprija, V. (2001). A fatal jellyfish encounter in the Gulf of Siam. *Journal of travel medicine, 8*(3), 150-151.

Tahera, Q., & Kazmi, Q. B., (2006) New records of two jellyfish medusae (Cnidaria: Scyphozoa: Catostylidae: Cubozoa: Chirodropidae) from Pakistani waters. *J Mar Biol Assoc UK*, *86*, 1482.

Toshino, S., Miyake, H., Srinui, K., Luangoon, N., Muthuwan, V., Sawatpeera, S., Honda, S., & Shibata, H. (2016). Development of *Tripedalia binata* Moore, 1988 (Cubozoa: Carybdeida: Tripedaliidae) collected from the eastern Gulf of Thailand with implications for the phylogeny of the Cubozoa. *Hydrobiologia, 792*(1), 37-51.

Voris, H. K. (2000). Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *Journal of biogeography, 27*(5), 1153-1167.

Werner, B. (1984) Klasse Cubozoa. In: Gruner, H.E. (Ed.), *Lehrbuch der Speziellen Zoologie.Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,* 106–133.

Williamson, J. (1985). Report of an investigative journey to South East Asia for the purpose of learning about the varietyand incidence of jellyfish stings in Singapore, Malaysia, and Thailand August 23- September 6, 1985. *Townsville, 9.*