รหัสโครงการ SUT3-303-41-24-08

รายงานการวิจัย

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของปูนากลุ่ม *Esanthelphusa* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทยโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

(A Study on Genetic Variation of Rice Field- Crab, *Esanthelphusa*, in the Lower North–Eastern Thailand Using Electrophoretic Technique)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์สมร ขวัญทอง

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2541-2542

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2545

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2541-2542 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่และอุปกรณ์สำหรับการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทุกท่าน และขอขอบพระคุณ ศ. ไพบูลย์ นัยเนตร ที่คอยให้คำปรึกษาจนทำให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2545

บทคัดย่อ

จากการศึกษาตัวอย่างปูนาที่เก็บในพื้นที่ 8 จังหวัด ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย พบปูสกุล *Esanthelphusa* จำนวน 6 species คือ *E.* sp.I, sp.II, sp.III, sp.VII, sp.XII และ sp.XIII ที่จัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือลักษณะร่องและลายเส้นบนกระดองและโกโนพอดของปูเพศผู้ เป็นหลัก ซึ่งลักษณะดังกล่าวค่อนข้างคล้ายกันมากและยากที่จะระบุชนิดให้แน่นอน การศึกษาทางพันธุกรรมจึงมีประโยชน์ และพบการกระจายของ *E.* sp.II ในพื้นที่ศึกษามากที่สุด พบปูที่โตเต็มวัยซึ่งเหมาะสำหรับศึกษาทางสัณฐานวิทยา (กระดองมีความกว้าง 3-5 เซนติเมตร) ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงธันวาคม เมื่อศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของปูนาโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส ซึ่งสรุปในรูปแบบแผนของ DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อก้ามหนีบของปูแต่ละตัวในแต่ละเพศ และวิเคราะห์ด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ได้ดังนี้ *Esanthelphusa* sp.I ซึ่งพบใน 3 พื้นที่ คือ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา และ อำเภอนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์ มีแบบแผน RAPD ที่แตกต่างกัน 6 แบบแผน *Esanthelphusa* sp.II ซึ่งพบใน 8 พื้นที่ คือ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ อำเภอเมืองและอำเภอขุขันธ์ จังหวัดศรีสะเกษ อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร อำเภอเมือง (ตลาดหนองบัวและตลาดริมมูล) และ อำเภอวารินชำราบ (ตลาดวาริน) จังหวัดอุบลราชธานี และ อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ นั้น ปูเพศเมียจากจังหวัดสุรินทร์มีแบบแผน RAPD เช่นเดียวกับปูเพศเมียจาก อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ และจากตลาดหนองบัวและตลาดวาริน ซึ่งพบแบบแผน RAPD ที่ต่างกัน 14 แบบแผน *Esanthelphusa* sp.III ซึ่งพบในพื้นที่เดียวกับ *E.* sp.II ยกเว้นที่ อำเภอขุขันธ์ นั้น มีแบบแผน RAPD ที่จำเพาะและแตกต่างกัน ซึ่งพบถึง 20 แบบแผน *Esanthelphusa* sp.VII ที่พบในพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ นั้นมีแบบแผน RAPD ที่ต่างกัน 4 แบบแผน *Esanthelphusa* sp.XII ซึ่งพบใน 4 พื้นที่ คือ อำเภอเมือง (ตลาดหนองบัวและตลาดริมมูล) และ อำเภอวารินชำราบ (ตลาดวาริน) จังหวัดอุบลราชธานี และ อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร นั้นมีแบบแผน RAPD ที่จำเพาะและแตกต่างกันถึง 11 แบบแผน และ *E.* sp.XIII ซึ่งพบใน อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ นั้น เพศผู้มีแบบแผน RAPD ที่ทั้งใกล้เคียงและเหมือนปูเพศเมียซึ่งทุกตัวมีแบบแผนเหมือนกัน และพบแบบแผนที่ต่างกัน 2 แบบแผน ปูนาที่พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงที่สุด คือ *E.* sp.III และเมื่อเปรียบเทียบแบบแผน RAPD ของปูนาต่าง species กัน พบว่า *E.* sp.I เพศผู้จากจังหวัดชัยภูมิมีแบบแผนเดียวกันกับ *E.* sp.II เพศเมียจาก จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดศรีสะเกษ (อำเภอเมือง) และ ตลาดหนองบัวและตลาดวาริน นอกจากนี้ *E.* sp.II เพศผู้จากจังหวัดอำนาจเจริญมีแบบแผน RAPD คล้ายกันมากกับ *E.* sp.XIII เพศผู้จากจังหวัดอำนาจเจริญ วิธี RAPD ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้วิเคราะห์สารพันธุกรรมของปูนาสกุล *Esanthelphusa* ในเบื้องต้นได้ทั้งปูเพศผู้และเพศเมีย และปูนาต่าง species กันตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต่างกันเพียงบางประการ สามารถให้ผลที่มีความเหมือนด้านแบบแผนของสารพันธุกรรมได้

ABSTRACT

From the investigation of rice-field crabs collected from 8 provinces in the lower North-Eastern Thailand, six species (sp.I, sp.II, sp.III, sp.VII, sp.XII, and sp.XIII) belonging to the genus *Esanthelphusa* were found. These species were classified by their morphological characteristics which mainly relied on the carapace and gonopods of male crabs. The morphological characteristics were very similar between species resulting in the difficulty of identification. The genetic study could be useful. *Esanthelphusa* sp.II had the highest distribution of its habitat in the study area. Adult crabs having the carapace width of 3-5 centimeters suitable for the reliable morphological identification were found between August and December. When the genetic variation of these crabs was determined using genomic DNA extracted from tissue of the chelae of each crab (both male and female), and the random amplified polymorphic DNA (RAPD) and electrophoresis techniques; results were concluded as follows: *E.* sp.I found in 3 sampling areas (Muang District, Chaiyaphum; Muang District, Nakhon Ratchasima; and Nang Rong District, Burirum Provinces) had 6 RAPD patterns. *Esanthelphusa* sp.II found in 8 sampling areas (Muang District, Surin; Muang and Khu Khan Districts, Sisaket; Muang District, Yasothon; Nong Bua and Rim Moon markets in Muang District, and Warin market in Warin Chamrab District in Ubon Ratchatani; and Muang District, Amnat Charoen Provinces) had 14 patterns which female crabs from Surin had the same pattern as female crabs from Sisaket (Muang District) and Ubon Ratchatani (Nong Bua and Warin markets) Provinces. *Esanthelphusa* sp.III found in the same sampling areas as *E.* sp.II except in Khu Khan District, had 20 patterns. *Esanthelphusa* sp.VII found only in Muang District, Amnat Charoen Province, had 4 patterns. *Esanthelphusa* sp.XII found in 4 sampling areas (Nong Bua and Rim Moon markets in Muang District, and Warin market in Warin Chamrab District in Ubon Ratchatani; and Muang District, Yasothon Provinces) had 11 patterns. And *E.* sp.XIII found in Muang District, Amnat Charoen Province, had 2 patterns. *Esanthelphusa* sp.III had the most genetic variation. When compared RAPD patterns between the rice-field crab species, all male *E.* sp.I found in Chaiyaphum had the same pattern as the female *E.* sp.II found in Surin, Sisaket (Muang District), and Ubon Ratchatani (Nong Bua and Warin markets). Moreover, the male *E.* sp.II found in Amnat Charoen had the very similar pattern to the male *E.* sp.XIII found in the same province. This RAPD method could be basically applied for the determination of genetic variation of both male and female rice-field crabs. The same genetic material pattern could be presented among crabs that had different morphological characteristics.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
• วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
• ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
• อุปกรณ์	3
• วิธีการศึกษา	5
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการวิจัย	
• การเก็บรวบรวมตัวอย่างปูนาในภาคสนามและการศึกษาชนิดของปูนาตามสัณฐานวิทยา	14
• การศึกษาความผันแปรของปูนาโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส	29
• สรุปแบบแผนของตัวอย่างปูนาที่วิเคราะห์โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส	42
• ข้อคิดเห็นและเสนอแนะ	45
บรรณานุกรม	46
ภาคผนวก	48
ประวัติผู้วิจัย	49

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 (A,B,C,D) แสดงภาพตลาดเช้าและตลาดเย็นที่เก็บตัวอย่างปูนา 14

รูปที่ 2 (A,B,C,D) แสดงการเก็บตัวอย่างปูนาในทุ่งนา 15

รูปที่ 3 (A) แสดงลักษณะลายเส้นบนกระดองปูนา 19
(B, B1,) แสดงส่วนท้องของปูนาเพศผู้ และ (B2) ปูนาเพศเมีย
(C) แสดงส่วนประกอบของโกโนพอดคู่ที่ 1 ของปูนา และ
(C1) โกโนพอดคู่ที่ 1, 2

รูปที่ 4 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp. I รูป (B) แสดงโกโนพอดส่วน ปลายเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้ายเครื่องหมายคำถาม รูป (C) ส่วนปลายสุดจะแหลม และบิดขึ้นบนเล็กน้อย 23

รูปที่ 5 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp. II รูป (B) แสดงโกโนพอดส่วน ปลายเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้าย *Esanthelphusa* sp. I แต่จะโค้งแคบกว่า รูป (C) ส่วน ปลายสุดแหลมและบิดขึ้นบนเล็กน้อย 24

รูปที่ 6 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp. III รูป (B) แสดงโกโนพอดส่วน ปลายเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้ายตะขอ รูป (C) ส่วนปลายสุดจะแหลมตั้งฉากกับแนวดิ่ง ทำมุมประมาณ 90 °C 25

รูปที่ 7 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp. VII รูป (B) ส่วนปลายเรียวมี ลักษณะโค้งงอ (C) ส่วนปลายสุดจะแหลมและขนานไปกับแนวราบโค้งเอียงเพียงเล็ก น้อยเท่านั้น ประมาณ 45 °C 26

รูปที่ 8 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp.XII รูป (B) แสดงส่วนปลายโกโน พอดเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้าย *Esanthelphusa* sp.I แต่ส่วนโค้งจะแคบกว่า (C) ส่วน ปลายสุดจะแหลมและดิ่งเข้าด้านใน 27

รูปที่ 9 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp.XIII รูป (B) แสดงส่วนปลายโกโนพ อดเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้าย *Esanthelphusa* sp.III (C) ส่วนปลายสุดจะแหลมและดิ่ง ลงทางด้านล่าง 28

รูปที่ 10 ลักษณะจากโครงสร้างของปูนาจากกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง (กำลังขยาย 2000 เท่า) 33
(ก) ส่วนอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องและ Hepatopancreas และ
(ข) เนื้อเยื่อจากก้ามหนีบย้อมด้วยสี Methylene blue

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11 ผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ของปูนาสกุล *Esanthelphusa* ตาม species ที่ได้จากการสกัด Genomic DNA จากเนื้อเยื่อรวมของปูนาหลายตัวใน species เดียวกัน โดยใช้ RAPD Analysis Primer 2 ด้วย Agarose gel electrophoresis 34

รูปที่ 12 แบบแผน RAPD จากการวิเคราะห์ด้วย Agarose gel electrophoresis ของปูนา *Esanthelphusa* sp.I ที่เก็บตัวอย่างจาก (ก) อ. เมือง จ. ชัยภูมิ (ข) อ. เมือง จ. นครราชสีมา และ (ค) อ. นางรอง จ. บุรีรัมย์ ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดงเป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว 35

รูปที่ 13 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.II ที่เก็บตัวอย่างจาก (ก) อ. เมือง จ. สุรินทร์ (ข) อ. เมือง จ. ศรีสะเกษ (ค) อ. บุขันธ์ จ. ศรีสะเกษ (ง) อ. เมือง จ. ยโสธร (จ) อ. เมือง และ อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี และ (ฉ) อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว 37

รูปที่ 14 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.III ที่เก็บตัวอย่างจาก (ก) อ. เมือง จ. สุรินทร์ (ข) อ. เมือง จ. ศรีสะเกษ (ค) อ. เมือง จ. ยโสธร (ง) อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ และ (จ) อ. เมือง และ อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว 39

รูปที่ 15 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.VII ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว 40

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 16 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.XII ที่เก็บตัวอย่างจาก (ก) อ. เมือง และ อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี และ (ข) อ. เมือง จ. ยโสธร ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว 41

รูปที่ 17 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.XIII ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว 42

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 RAPD Analysis Primers (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech, Sweden) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของปูนาด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 11

ตารางที่ 2 แสดงการกระจายของปูนา แต่ละชนิดที่พบในแต่ละจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง 8 จังหวัด 20

บทที่ 1
บทนำ

จากการศึกษาการกระจายของปูน้ำจืดตามสภาพภูมิศาสตร์ในประเทศไทย ร่วมกับการจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของปูน้ำจืดตามแหล่งที่อยู่อาศัยออกเป็น 4 กลุ่ม คือ ปูนาซึ่งพบตามนาข้าว ปูลำห้วยซึ่งพบตามลำห้วยและแม่น้ำ ปูน้ำตกซึ่งพบตามน้ำตกและลำธาร และปูป่าซึ่งพบตามเนินดินบริเวณชายป่า (ไพบูลย์ นัยเนตร, 2521)

ปูนาเป็นกลุ่มปูน้ำจืดชนิดหนึ่งอยู่ใน Phylum Arthropoda, Class Crustacea, Subclass Malacostraca, Superorder Eucarida, Order Decapoda. Suborder Reptantia, Section Brachyura, Family Parathelphusidae เป็นสัตว์คืบคลานที่มี 10 ขา มีเพศแยก และมีส่วนท้อง (abdomen) ลดรูปงอพับไปอยู่ใต้ส่วนทรวงอก (thorax) มีการผสมพันธุ์ภายใน ออกลูกเป็นไข่ ไม่มีระยะลาร์วา (larva) และมีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบเป็นระยะ ๆ

จากการศึกษาของ Naiyanetr (1994) พบปูนาในประเทศไทย 3 สกุล คือ *Sayamia, Esanthelphusa* และ *Chulathelphusa* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนก ต่อมา ถวิล ประมวล (2533) ได้ศึกษาอนุกรมวิธานของปูนาในประเทศไทยพบปูนาทั้งหมด 19 ชนิด โดยพบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง 1 สกุล คือ *Esanthelphusa* มี 4 ชนิด แต่จากการศึกษาของ สมร ขวัญทอง (2535) พบปูนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง 6 ชนิด โดยพบเพิ่มจากการศึกษาของ ถวิล ประมวล 2 ชนิด แต่อย่างไรก็ตามปูนาที่พบดังกล่าว ยังไม่สามารถระบุ specific epithet ได้ เพราะการจัดจำแนกอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ ทำให้ขาดข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งถือได้ว่าเป็นหลักฐานสนับสนุนที่สำคัญยิ่งอีกประการหนึ่ง

ดังนั้น การศึกษาถึงความผันแปรทางพันธุกรรมของปูนากลุ่ม *Esanthelphusa* โดยอาศัยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส เพื่อตรวจสอบแบบแผนของสารพันธุกรรมที่พบในปูนาแต่ละชนิด เพื่อที่จะหาข้อสรุปถึงความผันแปรของปูนา ซึ่งอาจสามารถนำมาจัดจำแนกสปีชีส์และ/หรือสายพันธุ์ของปูนาและเป็นหลักฐานสนับสนุน ร่วมกับการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาของปูนา ที่พบในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างว่าเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านอนุกรมวิธาน ตลอดจนเป็นความรู้พื้นฐานทางด้านชีววิทยาของปูน้ำจืดเพื่อเป็นประโยชน์ในการจัดการสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติและดำรงไว้ซึ่งระบบที่มีเสถียรภาพ ตลอดจนการนำทรัพยากรที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาชนิด (species composition) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษา ความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ของปูนาในสกุล *Esanthelphusa* โดยอาศัยแบบแผนของสารพันธุกรรมที่พบในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านอนุกรมวิธาน (Taxonomy) และข้อมูลด้านความหลากหลายทางชีววิทยา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ :

ทำให้ทราบชนิดและการกระจายของปูนาที่พบในแต่ละจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านอนุกรมวิธานและข้อมูลด้านความหลากหลายทางชีววิทยา ตลอดจนเป็นความรู้พื้นฐานทางด้านชีววิทยาของปูน้ำจืด ก่อให้เกิดประโยชน์ในการจัดการสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติและดำรงไว้ซึ่งระบบที่มีเสถียรภาพ

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของปูนากลุ่ม *Esanthelphusa* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสนี้ได้ดำเนินการวิจัยทั้งเก็บตัวอย่างปูนาในภาคสนามและการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ซึ่งใช้สถานที่ คือ ห้องปฏิบัติการชีววิทยา อาคารเครื่องมือ 2 และห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศอิเล็กตรอน อาคารเครื่องมือ 1 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และใช้วัสดุ-อุปกรณ์หลักพร้อมทั้งวิธีการศึกษา ดังนี้

1. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยประกอบด้วย

1.1 วัสดุและครุภัณฑ์

1) ถังพลาสติกขนาด 5 ลิตร และกระติกน้ำแข็งสำหรับใส่ตัวอย่างขณะทำการเก็บตัวอย่าง
2) ถุงพลาสติกขนาด 6×8 นิ้ว สำหรับใส่ตัวอย่างในขณะทำการเก็บตัวอย่างพร้อมที่เย็บกระดาษและกระดาษ label เพื่อบันทึกรายละเอียดต่าง ๆ
3) กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์มถ่ายรูป
4) ขวดแก้วมีฝาปิดขนาดต่าง ๆ สำหรับดองตัวอย่างปูนา
5) ปากคีบขนาดใหญ่ สำหรับจับตัวอย่างและปากคีบขนาดเล็กสำหรับจับหรือคีบโกโนพอดของปูนา
6) เวอร์เนีย (Vernier) สำหรับวัดขนาดตัวอย่างปูนา
7) ถาดสำหรับใส่ตัวอย่างเพื่อใช้แยกชนิด
8) ขวดขนาดเล็กใช้สำหรับใส่โกโนพอดของปูนา
9) ปีกเกอร์และกระบอกตวงสำหรับเตรียมสารเคมี
10) กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereomicroscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scaning Electron Microscope, SEM รุ่น JEOL JSM 6400) สำหรับศึกษาโกโนพอดของปูนา
11) กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง (Bright Field Micorscope)
12) เทปสองหน้าขนาดบางสำหรับติดตัวอย่างโกโนพอดบนสตับ (stub)
13) สตับ (stub)
14) เครื่องทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ (Critical Point Dryer, CPD) รุ่น Samdri- PvT-3B

15) เครื่องฉาบทอง (Ion sputter) รุ่น JFC-1100 E
16) ฟิล์มถ่ายรูปขาวดำ VP 120 ใช้กับ SEM
17) ถัง (กล่อง) เก็บความเย็น
18) ขวดฝาเกลียวขนาดบรรจุ 20 มิลลิลิตร
19) กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 3
20) เยื่อกรอง (Membrane filter ที่มีขนาดช่องกรอง 0.2 ไมโครเมตร)
21) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
22) ตู้บ่ม (Incubator)
23) ตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส)
24) ตู้แช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส)
25) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermocycle)
26) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
27) Electrophoresis apparatus
28) Microcentrifuge (ขนาดบรรจุ 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร)
29) Micropipette set
30) UV Transilluminator พร้อมกล้องถ่ายภาพ

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมี สำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

1) เอทานอล 70% สำหรับดองตัวอย่างปูนา และเอทานอล 30%, 50%, 70%, 90%, 95% และ 100% สำหรับดีไฮเดรทตัวอย่าง โกโนพอดของปูนา
2) กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 3% และออสเมียมเตตระออกไซด์ (osmiumtetraoxide) 1% สำหรับดองโกโนพอดปูนา
3) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution) สำหรับล้างตัวอย่าง
4) ทองสำหรับฉาบผิวตัวอย่าง

1.2.2 สารเคมีและสารชีวภาพที่ใช้ศึกษาความผันแปรของปูนา โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

ประกอบด้วย Acetic acid, Agarose, Boric acid, Bromophenol blue, EDTA, Ethanol, Ethidium bromide, DNA Molecular weight marker, Lysozyme, Methanol, Milli-Q water, Nucleoside triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Oligonucleotide primers, Potato starch, Ribonuclease, Sucrose, *Taq* DNA polymerase, Tris-HCl, สารที่ใช้สกัด Genomic DNA ตาม Wizard Genomic DNA

Purification Kit (Promega, Promega Corporation, U.S.A.) สารเคมีที่ใช้เตรียม Electrophoresis buffer และเตรียมสารละลายที่ใช้ในการย้อมเอนไซม์ตาม ปัทมพร ราชภักดี (2539)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเก็บและรวบรวมตัวอย่างปูนาในภาคสนาม

2.1.1 ทำการเก็บตัวอย่างปูนาในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างรวม 8 จังหวัดได้แก่ จังหวัดชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ยโสธรและอำนาจเจริญ โดยการเก็บตัวอย่างในตลาดเช้าเวลา 05.30 - 07.30 น. และตลาดเย็นเวลา 16.00-18.00 น. ของทุกจังหวัด ระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง เริ่มทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนธันวาคม 2540 ถึง ธันวาคม 2542

2.1.2 การเก็บรักษาตัวอย่างสัตว์

1) นำตัวอย่างที่เก็บมาล้างให้สะอาด
2) แยกเป็นพวกหรือชนิด แล้วนำมาถ่ายรูป
3) แบ่งตัวอย่างปูนาที่เก็บได้เป็น 2 ส่วน ในส่วนที่หนึ่งดองในเอทานอล 70% เพื่อศึกษาทางสัณฐานวิทยา และนำอีกส่วนของตัวอย่างปูนามาแยกเอาเฉพาะส่วนก้ามหนีบและ hepatopancreas โดยเก็บในตู้เย็นและตู้แช่แข็งเพื่อศึกษาด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

2.2 การศึกษาปูนาในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 นำตัวอย่างปูนาที่เก็บได้ทั้งหมดแยกเป็นกลุ่มตามสัณฐานวิทยา

นำตัวอย่างปูนาที่เก็บได้ทั้งหมดแยกเป็นกลุ่มตามสัณฐานวิทยาอย่างคร่าวๆ และเก็บที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา อาคารเครื่องมือ 2 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.2.2 ศึกษาสัณฐานวิทยาของปูนา

นำตัวอย่างปูนามาแยกชนิดโดยอาศัยลักษณะภายนอกซึ่งดูจากลักษณะของกระดอง ก้ามหนีบ ขาเดิน ส่วนท้อง และโกโนพอด (ซึ่งเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้อยู่ภายในทรวงอกเป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง) บันทึกผลการศึกษาของปูนาแต่ละชนิดพร้อมทั้งศึกษาการ

:จายโดยอาศัยเอกสารของ Bott (1970) Chuensri (1973) ถวิล ประมวล (2533) และ สมร ขวัญทอง 38) ตามขั้นตอน ดังต่อไปนี้

ก. การวิเคราะห์ตัวอย่างปูนาโดยอาศัยลักษณะภายนอก

ศึกษาและวิเคราะห์ชนิดตัวอย่างของปูนาตามแนวของ Bott (1970) และ Chuensri (1973) โดยใช้ตัวอย่างปูนาเพศผู้เป็นหลักในการแยกชนิด ซึ่งศึกษาจากลักษณะของกระดอง (carapace) ลักษณะของก้ามหนีบ (chelae) ลักษณะของขาเดิน (walking legs) ลักษณะของส่วนท้อง (abdomen) และลักษณะของโกโนพอด (gonopod) เป็นเกณฑ์ทั้งนี้เนื่องจากเพศผู้จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ของส่วนท้องและโกโนพอด โดยรูปร่างของโกโนพอด นั้นถือเป็นลักษณะทางกรรมพันธุ์ ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในปูนาแต่ละชนิด ซึ่งตรงข้ามกับปูนาเพศเมีย ที่ส่วนท้องจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปหลังจากที่มีการผสมพันธุ์กับเพศผู้ จะลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาดให้ใหญ่ขึ้นสำหรับรับไข่ และป้องกันไข่ที่จะมาติดที่หน้าท้องจึงทำให้มีปัญหาในการใช้รูปร่าง ของส่วนท้องปูนาเพศเมียแยกชนิดของปูนา

ลักษณะภายนอกที่ใช้ศึกษามีรายละเอียดดังนี้

1) กระดอง (carapace)

- ลักษณะโค้งกลมหรือเป็นรูปสี่เหลี่ยม ด้าน frontal มีลักษณะตรงหรือเว้า
- มีความกว้างมากกว่าความยาว หรือมีความยาวมากกว่าความกว้าง
- บริเวณส่วนต่าง ๆ ที่ปรากฏบนกระดอง เช่น Epigastric crest, H-groove, Post-orbital crest, Middle groove, Cervical groove และ Semicircular groove ชัดเจนหรือไม่
- ขนาดของก้ามทั้งสองข้างเท่ากันหรือไม่
- ผิวของก้ามเรียบหรือขรุขระมีลายบนก้ามหรือไม่ หนามแหลมหรือทู่

2) ก้ามหนีบ (Chelae)

- ขนาดของก้ามทั้งสองข้างเท่ากันหรือไม่
- ผิวของก้ามเรียบหรือขรุขระปลายก้ามแหลมหรือทู่
- สีของก้ามหนีบ

3) ขาเดิน (Walking legs)

- ขาเดินคู่ใดยาวที่สุด

4) ส่วนท้อง (Abdomen)

- มีรูปร่างเป็นรูปตัว T หรือไม่
- ปล้องที่ 5, 6 มีลักษณะอย่างไร

- ปล้องสุดท้ายมีลักษณะอย่างไร

5) โกโนพอด (Gonopod)

- ลักษณะฐานกว้างหรือแคบ
- ลักษณะปลายแหลมหรือไม่แหลม
- ลักษณะปลายตรงหรืองอ
- บริเวณใกล้ปลายสุดมีหนาม (spine) หรือไม่
- ตามร่องมีขนลักษณะแบบใด

นอกจากนี้ ยังมีการนำเอาโกโนพอดของปูนาแต่ละชนิดมาเตรียมตัวอย่าง เพื่อนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด โดยนำเอาเฉพาะโกโนพอดคู่ที่ 1 (first gonopod) ชนิดละ 3 ตัวอย่าง โดยศึกษาเฉพาะด้านล่าง (ventral)

ข. วิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

สำหรับตัวอย่างสดที่ไม่ได้ดองด้วยเอทานอล 70 % มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

1) นำตัวอย่างโกโนพอดของปูนามาล้างให้สะอาดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1M, pH 7.2
2) ดองตัวอย่างใน 2 % กลูตารัลดีไฮด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (เตรียมตัวอย่างในตู้ควัน)
3) ล้างตัวอย่างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1M, pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งติดต่อกัน
4) ดองตัวอย่างใน 1 % ออสเมียมเตตระออกไซด์ (osmiumtetraoxide, OsO_4 นาน 30 นาที โดยเตรียมในตู้ควัน
5) ล้างตัวอย่างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1M, pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งติดต่อกัน
6) ดีไฮเดรท (dehydrate) ด้วยเอทานอล 30%, 50%, 70%, 80%, 95% และ 100% ขั้นตอนละ 10 นาที ตามลำดับ
7) นำตัวอย่างเข้าเครื่องทำให้แห้งที่จุดวิกฤต (critical point dryer) ด้วยเครื่อง critical point dryer แบบ HCP-2 ใช้ CO_2 ประมาณ 90 นาที
8) นำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปติดบนสตับ (stub) โดยใช้เทป 2 หน้า แล้วทำเครื่องหมายไว้ที่ด้านล่างของสตับว่าเป็นตัวอย่างปูนามาจากไหน
9) นำตัวอย่างที่ติดบนสตับแล้วไปฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทองแบบ (Ion sputter model JFC-1100 E) โดยฉาบทอง 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 8-10 นาที เมื่อฉาบครั้งที่ 1 เสร็จต้องกลับด้านก่อนจึงฉาบครั้งที่ 2 ต่อไป
10) นำตัวอย่างที่ฉาบทองแล้วไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) รุ่น JEOL JSM 6400

11) ถ่ายภาพโกโนพอดของปูนาจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดด้วยฟิล์มขาว-ดำ VP-120 ตามกำลังขยายต่าง ๆ โดยถ่ายจาก โกโนพอดส่วนฐาน(basal segment)ส่วนปลาย (distal segment) และส่วนปลายสุดของโกโนพอด (distal part,tip)

สำหรับตัวอย่างปูนาที่ดองอยู่ในเอทานอล 70 % เป็นเวลานาน เตรียมได้โดยการนำเอาโกโนพอดของปูนามาทำความสะอาดโดยล้างด้วยเอทานอล 70 % โดยใช้พู่กันช่วยและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เมื่อตัวอย่างสะอาดทำการดีไฮเดรทด้วยเอทานอล 80 %, 95 % และ 100 % ขั้นตอนละ 10 นาที (หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนที่ 7-11 เรียงตามลำดับไปตามวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2.2.3 ศึกษาความผันแปรของปูนาโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

จากตัวอย่างปูนาที่เก็บในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย ภายหลังการแยกกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้นแล้ว นำตัวอย่างปูนาแช่ในน้ำแข็งผสมน้ำประมาณ 5 นาที แยกเพศ และแยกก้ามหนีบและลำตัวของปูนา เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส กรณีพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างปูนาอยู่ไกลจากห้องปฏิบัติการ เก็บตัวอย่างที่คัดเลือกในถุงพลาสติกใหม่และสะอาด และเก็บในถัง (กล่อง) เก็บความเย็นในระหว่างการเดินทาง การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบในแต่ละชนิดของปูนาโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส มีวิธีดำเนินการดังต่อไปนี้

1) การศึกษาแบบแผนของเอนไซม์

การวิเคราะห์ชนิดของปูนาโดยอาศัยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส ได้เริ่มใช้วิธีเปรียบเทียบแบบแผนของเอนไซม์ซึ่งสกัดจากตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) หรือที่เรียกว่า Midgut ซึ่งเป็น Digestive gland ขนาดใหญ่ (Dorit *et al.*, 1991) ของปูนา โดยนำตัวอย่างปูนามาแกะกระดองออก แยก Hepatopancreas ใส่ขวดปลอดเชื้อขนาดบรรจุ 20 มิลลิลิตร ด้วยปากคีบและเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นสกัดเอนไซม์ตามวิธีของ ปัทมพร ราชภักดี (2539) และ Stuart and Ballantyne (1996) และวิเคราะห์ด้วย Starch gel electrophoresis ซึ่งในระยะแรกของการดำเนินงานสามารถประเมินผลในเบื้องต้นได้ว่าแบบแผนของเอนไซม์ของปูนาแต่ละชนิดที่แสดงจากการวิเคราะห์ด้วย Starch gel electrophoresis นั้นไม่คงที่และไม่ชัดเจน ประกอบกับในช่วงเวลาดังกล่าวประสบปัญหากระแสไฟฟ้าดับบ่อยครั้งที่อาคารเครื่องมือ 2 ที่ใช้ในการปฏิบัติงาน และดับเป็นช่วงเวลานาน ซึ่งบางครั้งตลอดวันหยุดของสัปดาห์ ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของวัสดุชีวภาพ (ทั้งตัวอย่าง Hepatopancreas และวัสดุชีวภาพที่จำเป็นต้องใช้ในการวิเคราะห์แบบแผนของเอนไซม์) ที่เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4°ซ. และตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°ซ. จึงพัฒนาวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ขึ้นเพื่อการวิเคราะห์ชนิดของปูนาโดยอาศัยแบบแผนของสารพันธุกรรมที่เน้น Deoxyribonucleic acid (DNA) แทนวิธีเปรียบเทียบแบบแผนของเอนไซม์ เนื่องจาก

RAPD เป็นเทคนิคที่กำลังพัฒนาใช้เพื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ของจุลินทรีย์บางชนิดที่ดำเนินการโดยกลุ่มผู้วิจัยเดียวกันในช่วงเวลาดังกล่าวและมีความพร้อมด้านวัสดุและอุปกรณ์พอสมควร

2) การศึกษาแบบแผนของสารพันธุกรรม

การศึกษาแบบแผนของสารพันธุกรรมของปูนาใช้วิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) นี้อาศัยการเพิ่มปริมาณ Genomic DNA ของปูนาด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และวิเคราะห์ผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ขั้นตอนของวิธี RAPD ที่ดำเนินการมีดังนี้

2.1) การเตรียมตัวอย่างปูนาเพื่อสกัด Genomic DNA

ตัวอย่างที่นำมาสกัด DNA คือ ส่วนเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องของปูนารวมทั้ง Hepatopancreas และส่วนเนื้อเยื่อของก้ามหนีบของปูนา ที่แยกเพศและแยกกลุ่ม/species โดยเตรียมตัวอย่างเพื่อทดลองสกัด 3 ซ้ำ

2.1.1) ตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องและ Hepatopancreas

แกะกระดองปูออก แยกเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องและ Hepatopancreas ด้วยปากคีบและเทคนิคปลอดเชื้อ ประมาณ 1 กรัม ใส่หลอดปลอดเชื้อขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร แช่ส่วนของปูนาที่แยกได้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°ซ. และตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในส่วนของเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องและ Hepatopancreas นี้โดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง ซึ่งถ้ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เมื่อนำไปสกัด DNA อาจมีผลกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี RAPD

2.1.2) ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากก้ามหนีบ

ล้างก้ามหนีบของปูในแอลกอฮอล์ (70%) 3 ครั้ง และแอลกอฮอล์ (95%) อีก 1 ครั้ง เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวและให้ก้ามหนีบแห้งเร็ว ทุบด้วยสากถ้วยกระเบื้อง (Porcelain pastle) ให้มีรอยร้าวและแกะได้ แยกเนื้อเยื่อด้วยปากคีบและเทคนิคปลอดเชื้อ ประมาณ 1 กรัม ใส่หลอดปลอดเชื้อขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร แช่ส่วนของปูนาที่แยกได้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°ซ. ตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในส่วนของโครงสร้างของเนื้อเยื่อจากก้ามหนีบของปูนาโดยย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Methylene blue (ภาคผนวก 2) และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง

2.2) การสกัดหรือแยก Genomic DNA จากปูนา

การสกัดหรือแยก Genomic DNA จากปูนา โดยใช้วิธีที่ระบุตาม Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Promega Corporation, U.S.A.) ซึ่งตามรายละเอียดของวิธีดังกล่าวใช้ได้ผลดีกับสกัด Genomic DNA จากเนื้อเยื่อสัตว์ซึ่งรวมถึง Mouse liver, Mouse brain และ Mouse tail จึงนำมาทดลองใช้กับปูนา ซึ่งมีวิธีการดังนี้

(1) ตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องและ Hepatopancreas ของปูนา

(1.1) บรรจุ Nuclei lysis solution (Promega) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน Centrifuge tube ขนาดบรรจุ 15 มิลลิลิตร แช่บนน้ำแข็ง

(1.2) ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องและ Hepatopancreas ของปูนา 10-20 มิลลิกรัม (ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ) ใส่ลงใน Nuclei lysis solution แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenize) เป็นเวลา 10 วินาที

(1.3) ย้ายส่วนผสมที่ได้ลงใน Microcentrifuge tube ขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ. เป็นเวลา 15-30 นาที

(1.4) ดำเนินการต่อตามขั้นตอนที่ (3)

(2) ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากก้ามหนีบของปูนา

(2.1) เตรียม Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)/Nuclei lysis solution (Promega) โดยผสม สารละลาย 0.5M EDTA (pH 8.0) 120 ไมโครลิตร และ Nuclei lysis solution 500 ไมโครลิตร แช่บนน้ำแข็ง

(2.2) ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อจากก้ามหนีบของปูนา 10-20 มิลลิกรัม (ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ) ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร

(2.3) เติม EDTA/Nuclei lysis solution ปริมาณ 600 ไมโครลิตร

(2.4) เติม Proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, MERCK, Merck KgaA, Germany) ปริมาณ 17.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มใน Water bath shaker ที่อุณหภูมิ 55°ซ. ใช้ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยนำหลอดมาเข้าเครื่องผสมอย่างรวดเร็วทุกๆ 1 ชั่วโมง

(2.5) ดำเนินการต่อตามขั้นตอนที่ (3)

(3) เติม RNase (4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Promega) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดบรรจุขึ้นลง ประมาณ 25 ครั้ง

(4) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 15-30 นาที แล้วทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 5 นาที)

(5) เติม Protein precipitation solution (Promega) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมอย่างรวดเร็วด้วยเครื่องผสม (Vortex mixer) ที่ความเร็วสูง เป็นเวลา 20 วินาที

(6) วางหลอดที่มีส่วนผสม ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

(7) ปั่นแยกด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที

(8) ปิเปตส่วนใส (Supernatant) ซึ่งมี DNA ใส่ลงในหลอดบรรจุ Isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง

(9) ผสมเบาๆ โดยกลับหลอดบรรจุส่วนผสมขึ้นลง จนสังเกตเห็นเส้นหรือกลุ่มสีขาวของ DNA แขวนลอยในหลอด

(10) ปั่นแยกด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

(11) ล้างตะกอนด้วย Ethanol (70%) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นแยกด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส และทิ้งให้ตะกอน DNA ที่คงอยู่ในหลอดแห้ง (ประมาณ 10 –15 นาที)

(12) ละลายตะกอน DNA ใน DNA rehydration solution (Promega) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°ซ.

ตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ก่อนนำไปใช้ โดยเปรียบเทียบกับ DNA ที่ทราบความเข้มข้นแล้วด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis แทนการวัดด้วย Spectrophotometer เนื่องจากข้อจำกัดของครุภัณฑ์ที่มีอยู่แล้วในการปฏิบัติงานวิจัย

2.3) วิเคราะห์ Genomic DNA ของปูนาโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ Agarose gel electrophoresis

เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) สำหรับวิธี RAPD ที่พัฒนาเพื่อระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของปูนานี้ เริ่มศึกษาสภาวะของแต่ละขั้นตอนที่เหมาะสมตามวิธีการที่กำหนดขึ้นโดยอาศัยวิธีการของ Delidow *et al.* (1993) Newton and Graham (1997) และตาม RAPD Analysis Primers ที่เลือกจากผู้ผลิต (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech, Sweden) ซึ่งได้พิจารณาเลือกใช้ RAPD Analysis Primer 2 และ Primer 3 (ตารางที่ 1) จากที่ผู้ผลิตได้ผลิตจำหน่ายจำนวน 6 Primers Primers ทั้งสองข้างต้นเป็น Primer ที่ผู้ผลิตได้แสดงผลสำเร็จของการใช้ในการวิเคราะห์สิ่งมีชีวิตหลายชนิด ตามที่ระบุคือ หนู (Mouse และ Rat) แมว สุนัข ไก่ แมลงหวี่ และ ยีสต์

ตารางที่ 1 RAPD Analysis Primers (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech, Sweden) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของปูนาด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Primer	Sequence (5′–3′)
Primer 2	GTTTCGCTCC
Primer 3	GTAGACCCGT

สำหรับการเพิ่มปริมาณ Genomic DNA ของปูนาด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ด้วย Agarose gel electrophoresis ประกอบด้วยขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

2.3.1) การเพิ่มปริมาณ DNA ของปูนาด้วยกระบวนการ PCR

การเพิ่มปริมาณ DNA ของปูนา กระทำโดยเตรียม PCR reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอดที่มีฝาปิด ขนาดบรรจุ 200 ไมโครลิตร และมีส่วนประกอบต่อปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ดังนี้ 1X PCR buffer ที่มี 1.5 mM $MgCl_2$ (QIAGEN, QIAGEN GmbH, Germany) 100 ไมโครโมล (μM) ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) 20 พิโคโมล (pmole) ของ Primer 2 หรือ Primer 3 (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech) 1.6 หน่วย (Units) ของ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) และ 100 นาโนกรัม (ng) ของ Genomic DNA และใช้กระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ icCycler (Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) จำนวน 3 ขั้นตอน โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาตามลำดับ ดังนี้ (1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 2 นาที (2) รอบที่ 1-40 โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 29°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และ (3) Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

2.3.2) การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต DNA จากกระบวนการ PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต DNA จากของเหลวที่ผ่านกระบวนการ PCR โดยใช้ของเหลวปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading buffer (ภาคผนวก 1) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วบรรจุลงในหลุม (Well) ของ Agarose gel (1.5%; Low EEO Agarose, BIO 101, Inc., USA) ในสารละลาย TBE (ภาคผนวก 3) ใช้ EZ load 100bp molecular ruler (Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) และ/หรือ 100bp DNA ladder (GIBCOBRL, Life Technologies, U.S.A.) เป็น DNA Molecular weight markers แยกชิ้นของ DNA ตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 50 โวลท์ จากนั้นตรวจหาตำแหน่งของแถบ DNA (DNA band) โดยย้อม Agarose gel ด้วย Ethidium bromide (เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที และตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวช่วงคลื่น 295 นาโนเมตร ของ UV Transilluminator บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

3) สรุปแบบแผนของตัวอย่างปูนาที่วิเคราะห์โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

สรุปแบบแผนของตัวอย่างของปูนาที่รวบรวมจากแหล่งเก็บตัวอย่างภาคสนาม ที่วิเคราะห์ดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เปรียบเทียบกันในแต่ละ Species ของปูนาที่พบในแต่ละแหล่งเก็บตัวอย่าง และรียบเทียบกับผลการระบุชนิดของปูนาโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ข้อ 1)

2.2.4 การรายงานผลการศึกษา

ก. บรรยายถึงลักษณะเด่นของปูนาแต่ละชนิดในสกุล *Esanthelphusa* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ แบบแผนของสารพันธุกรรมจากวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส ควบคู่กัน

ข. ศึกษาการกระจายของปูนาแต่ละชนิดในสกุล *Esanthelphusa* ที่พบในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง 8 จังหวัด

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างปูนาในภาคสนามและการศึกษาชนิดของปูนาตามสัณฐานวิทยา

ได้เก็บตัวอย่างปูนาในตลาดเช้าและตลาดเย็น (รูปที่ 1) ใน 8 จังหวัดของภคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง และเก็บตัวอย่างจากทุ่งนา (รูปที่ 2)

A

B

C

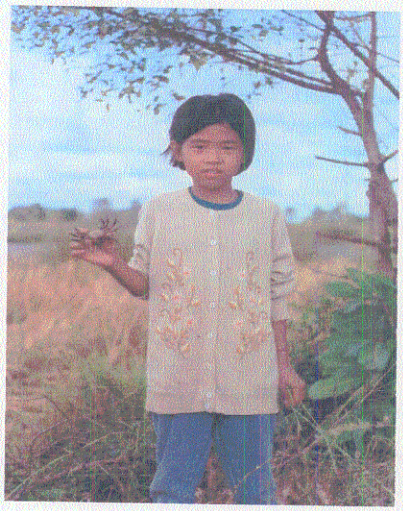
D

รูปที่ 1 (A, B, C, D) แสดงสภาพตลาดเช้าและตลาดเย็นที่เก็บตัวอย่างปูนา

A

B

C



D

รูปที่ 2 (A, B, C, D) แสดงการเก็บตัวอย่างปูนาในทุ่งนา

ลักษณะสัณฐานวิทยาของปูนา

ร่างกายของปูนาประกอบด้วยสามส่วนคือ ส่วนหัว (head) ส่วนอก (thorax) และส่วนท้อง (abdomen) ส่วนหัวและส่วนอกรวมกันเรียกว่า เซฟฟาโรธอแรกซ์ (Cephalothorax) มีกระดองหุ้มอยู่ตอนบน โครงร่างภายนอกของปูนาแต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะตัวแตกต่างกันออกไป จึงสามารถใช้ลักษณะภายนอกเหล่านี้ประกอบการแยกชนิดของปูนาได้

กระดอง คือ เปลือกแข็งที่หุ้มส่วนหัวและอกไว้ด้วยกัน หุ้มอวัยวะภายในไว้ทั้งหมดแบ่งเป็นบริเวณต่าง ๆ ตามตำแหน่งของอวัยวะภายใน และยังอาศัยลักษณะลายเส้นของกระดองประกอบในการแยกชนิดของปูนาด้วย ดังนี้

บริเวณ Frontal คือส่วนหน้าของกระดองอยู่ระหว่างเบ้าตาทั้ง 2 ข้าง

บริเวณ Gastric คือส่วนกระเพาะอยู่บริเวณส่วนหน้าของกระดองต่อจาก secondary front หรือ upper front ของกระดองขึ้นมาเล็กน้อย ซึ่งจะมีสัน epigastric (epigastric crest) อยู่โดยทั่วไปซึ่งเห็นได้ชัดเจน

บริเวณ Hepatic ได้แก่ บริเวณต่อจากฟันข้างกระดองทั้งสองข้างเข้ามาตรงส่วนกลาง ซึ่งส่วนมากจะมีร่องคอ (cervical groove) เป็นแนวแบ่งบริเวณ gastric กับ hepatic ออกจากกัน

บริเวณ Branchial คือส่วนที่อยู่ถัดจาก hepatic ลงมา ระหว่างฟันข้างกระดองซี่สุดท้ายถึงมุมข้างกระดองด้านหลัง

บริเวณ Cardiac คือส่วนตรงกลางกระดองด้านท้ายเหนือขอบหลังกระดองขึ้นมาเล็กน้อย

Antero-lateral teeth เป็นฟันข้างกระดองเฉียงไปทางด้านหน้ามีลักษณะเป็นหนามแหลมมีขนาดต่าง ๆ กัน มีจำนวนข้างละ 4 ซี่

นอกจากนี้ ยังอาศัยลักษณะลายเส้นของกระดองประกอบในการแยกชนิดของปูนา (ดังแสดงในรูปที่ 3, A)

ขา คือ ระยางค์ ที่ยื่นออกมาจากกระดองมีทั้งหมด 5 คู่ ด้วยกันดังนี้

1) ก้าม (Cheliped) เป็นขาคู่ที่ 1 ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปเป็นก้ามหนีบมีขนาดใหญ่ แบ่งออกเป็น 7 ปล้อง คือ

- coxa เป็นปล้องที่อยู่โคนสุดติดกับทรวงอกมีขนาดเล็ก
- basis เป็นปล้องที่ต่อจาก coxa มีขนาดเล็กปล้องสั้น
- ischium เป็นปล้องที่ติดจาก basis มีขนาดใหญ่กว่า coxa และ basis
- merus เป็นปล้องที่ต่อจาก ischium มีขนาดใหญ่และยาว เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า แขน (arm) จะมีลักษณะเป็นหนาม
- carpus เป็นปล้องที่ต่อจาก merus
- propodus เป็นปล้องต่อจาก carpus มีขนาดใหญ่แบนกว้างส่วนนี้เรียกอีกอย่างหนึ่งว่ามือ (hand) ส่วนปลายมีลักษณะเรียวยาวเป็นนิ้วที่เคลื่อนไหวไม่ได้
- dactylus เป็นปล้องต่อจาก propodus มีลักษณะเรียวยาวเป็นนิ้วที่เคลื่อนไหวได้

2) ขาเดิน (Walking legs หรือ ambulatory legs) มี 4 คู่คือ คู่ที่ 2-5 แต่ละขาประกอบด้วย 7 ปล้อง คือ

- coxa เป็นปล้องที่อยู่โคนสุดติดกับทรวงอกมีขนาดเล็ก
- basis เป็นปล้องที่ต่อจาก coxa มีขนาดเล็ก ปล้องสั้นมาก
- ischium เป็นปล้องขนาดเล็กต่อจาก basis
- merus เป็นปล้องต่อจาก ischium มีขนาดใหญ่เรียวยาว
- carpus เป็นปล้องต่อจาก merus มีลักษระเรียวยาวแต่เล็กและสั้นกว่า merus
- propodus เป็นปล้องต่อจาก carpus มีลักษณะเรียว
- dactylus เป็นปล้องที่ต่อจาก propodus มีลักษณะเรียวยาวปลายแหลม มีหนามขนาดเล็ก

ตา (eyes) เป็นตาประกอบ (compound eyes) มีก้านตายาวพับไว้ในเบ้าตา โครงสร้างของตาประกอบด้วย โอมมาติเดียม (ommatidium) มีจำนวนเป็นพันถึงหมื่นหน่วย โอมมาติเดียมประกอบด้วย คอร์เนีย (cornea) อยู่ด้านนอกใต้คอร์เนียจะมี crystalline cone ทำหน้าที่รวมแสงสว่างส่งไปยังเส้นประสาทรับความรู้สึกที่อยู่ภายในจำนวน 6-8 เส้น

หนวด ปูนา มีหนวด 2 คู่

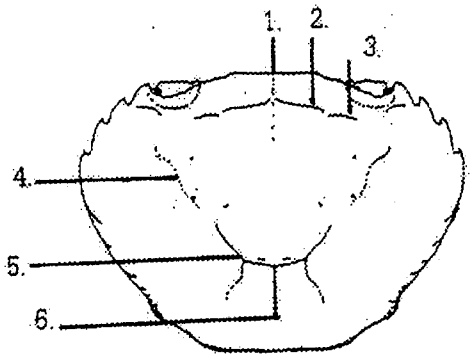
- หนวดคู่ที่ 1 (antennule) อยู่ด้านหน้าของกระดอง มีลักษณะเป็นเส้นขนาดเล็กและสั้นกว่าหนวดคู่ที่ 2 อยู่ติดกับโคนของก้านตา

- หนวดคู่ที่ 2 (antenna) อยู่ด้านหน้าของกระดองมีลักษณะเป็นเส้นยาวมีฐานของหนวดอยู่ใต้กระดองด้านหน้า เส้นหนวดจะยื่นยาวออกมานอกกระดองเห็นได้ชัดเจน

ท้อง (abdomen) ส่วนท้องของปูนาเพศผู้จะเป็นรูปตัว T งอพับอยู่ใต้ส่วนอกปล้องที่ 1 และ 2 มีความกว้างพอ ๆ กับปล้องที่ 3 แต่ปล้องที่ 1 และ 2 จะสั้นมาก อยู่ติดกับขอบกระดองปล้องที่ 3, 4, 5 และ 6 จะเห็นรอยแบ่งปล้องชัดเจนมาก ปล้องที่ 6 และ 7 จะมีความยาวใกล้เคียงกัน (ดังแสดงในรูปที่ 3 B, B1, B2) ด้านบนของส่วนท้องจะมีระยางค์ว่ายน้ำ (pleopod) ในเพศผู้จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่เป็นอวัยวะที่ช่วยในการสืบพันธุ์หรือที่เรียกว่า โกโนพอด (gonopod) มี 2 คู่ คู่ที่ 1 มีขนาดใหญ่ ซึ่งปูจะใช้คู่ที่ 1 ช่วยในการผสมพันธุ์ ส่วนคู่ที่ 2 จะมีขนาดเล็ก สำหรับในปูเพศเมียมี pleopod 4 คู่ เรียวยาว มีขนเล็ก ๆ คล้ายขนนก เพื่อให้ไข่ติดและรองรับตัวอ่อนด้วย ในปูนาเพศเมียจะมีลักษณะของส่วนท้องที่เหมือนกัน ในปูนาจะใช้ลักษณะของโกโนพอดคู่ที่ 1 เป็นหลักเกณฑ์ในการจำแนกชนิดของปูนาด้วย

- อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 (first gonopod) เป็นส่วนที่ใช้ในการสืบพันธุ์ของปูนาเพศผู้จะอยู่ใต้ส่วนท้องติดกับอกมี 1 คู่ซ้าย-ขวา มีขนาดใหญ่ ตรงปลายมีช่องเปิดมีลักษณะเป็นร่องตามความยาวของโกโนพอด ส่วนปลายมีหนาม (spine) แตกต่างออกไป (ดังแสดงในรูปที่ 3 C, C1) และปูนาแต่ละชนิด มีโกโนพอดที่มีรูปร่างแตกต่างกันออกไป จึงใช้รูปร่างของโกโนพอดเป็นหลักในการแยกชนิด

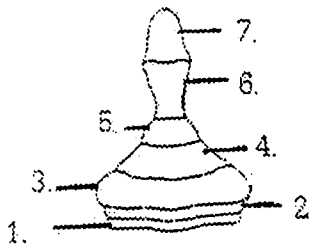
- อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 2 (secondary gonopod) มีขนาดเล็กกว่าคู่ที่ 1 มาก มีลักษณะไม่แตกต่างกันในปูนาแต่ละชนิด จึงไม่ใช้ลักษณะของโกโนพอดคู่ที่ 2 เป็นเกณฑ์ในการแยกชนิดของปูนา



1.=Middle groove
2.=Epigastric crest
3. =Post-orbital crest
4. =Cervical groove
5. =H-groove
6. =Semicircular groove

A. Dorsal view of carapace

A



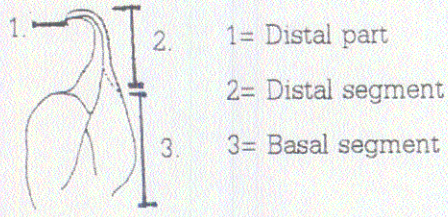
1= 1st Abdominal segment
2= 2nd Abdominal segment
3= 3rd Abdominal segment
4= 4th Abdominal segment
5= 5th Abdominal segment
6= 6th Abdominal segment
7= 7th Abdominal segment

B. Male abdomen

B

B1

B2

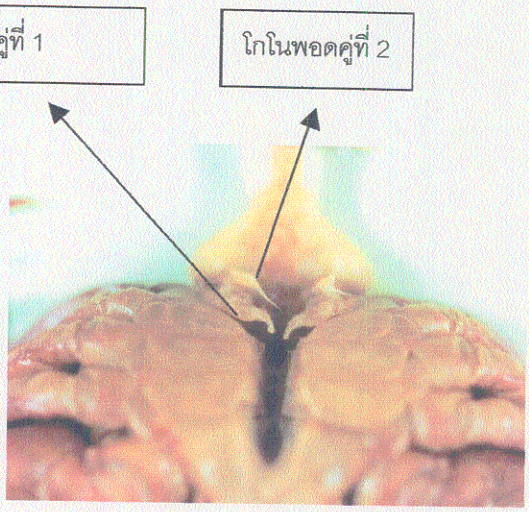


1= Distal part

2= Distal segment

3= Basal segment

C. Male first gonopod



C1

รูปที่ 3 (A) แสดงลักษณะลายเส้นบนกระดองปูนา

(B) แสดงปล้องท้องของปูนาเพศผู้ (B1) ท้องของปูนาเพศผู้ และ (B2) ปูนาเพศเมีย

(C) แสดงส่วนประกอบของโกโนพอดคูที่ 1 ของปูนา และ (C1) โกโนพอดคู่ที่ 1และ 2

จากการศึกษาชนิดของปูนาในสกุล *Esanthelphusa* โดยใช้ลักษณะภายนอก เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกคือ ลักษณะของกระดอง ก้ามหนีบ ขาเดิน ส่วนท้อง และโกโนพอดคู่ที่ 1 พบว่าลักษณะของก้ามหนีบ ขาเดิน และส่วนท้อง ไม่มีความแตกต่างกันมากนักในปูนาแต่ละชนิด การศึกษาในครั้งนี้จึงใช้ลักษณะลายเส้น ลักษณะร่องบนกระดอง และโกโนพอดคู่ที่ 1 เป็นหลักในการจัดจำแนก โดยในส่วนของโกโนพอดคู่ที่ 1 ได้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) เป็นเครื่องมือช่วยในการจัดจำแนก พบว่าส่วนฐานโกโนพอด (basal segment) ในปูนาทุกชนิดที่ศึกษามีลักษณะแผ่กว้าง แต่ส่วนปลายโกโนพอด (distal segment) จะแตกต่างกันในปูนาแต่ละชนิดที่ศึกษา ด้วยเหตุนี้การรายงานผลการทดลองในปูนาแต่ละชนิดที่ศึกษาจะบรรยายลักษณะของกระดอง และส่วนปลายโกโนพอดเป็นหลัก โดยในการศึกษาครั้งนี้พบปูนาในสกุล *Esanthelphusa* 6 ชนิด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างคือ *Esanthelphusa* sp.I, *E.* sp.II, *E.* sp. III, *E.*sp.VII, *E.* sp.XII และ *E.* sp.XIII (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงการกระจายของปูนาแต่ละชนิดที่พบในแต่ละจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง 8 จังหวัด

ชนิด	จังหวัดที่พบปูนาแต่ละชนิด							
	ชัยภูมิ	นครราชสีมา	บุรีรัมย์	สุรินทร์	ศรีสะเกษ	อุบลราชธานี	ยโสธร	อำนาจเจริญ
Esanthelphusa sp.I	+	+	+					
E. sp.II				+	+	+	+	+
E. sp.III				+	+	+	+	+
E. sp.VII								+
E. sp.XII						+	+	
E. sp.XIII								+

+ หมายถึง ชนิดของปูนาที่พบในแต่ละจังหวัดของอีสานตอนล่าง

ลักษณะสำคัญสกุล *Esanthelphusa*

ปูนาในสกุลนี้ ลักษณกระดองโค้งนูนหรือเรียบ ร่องคอ (cervical grooves) ตื้นไม่เด่นชัด ส่วนสันด้านหลังของเบ้าตา (postorbital crest) จะอยู่ต่ำและสั้นไปสิ้นสุดก่อนถึงร่องคอ ส่วนท้อง (abdomen) ของเพศผู้มีรูปร่างเป็นรูปตัว T (T-shaped) บริเวณปลายแหลมมีทั้งหมด 7 ปล้อง โดยปล้องที่ 6 จะแคบและเว้า

เข้าหากันทั้ง 2 ด้าน โกโนพอดคู่ที่ 1 ส่วนฐานจะแผ่กว้าง ส่วนปลายเรียวลักษณะโค้งงอคล้ายตะขอ อาศัยขุดรูอยู่ตามคันนาหรือทุ่งนา ลักษณะสำคัญของปูนาในแต่ละชนิดมีดังนี้

***Esanthelphusa* sp.I**

ลักษณะสำคัญ

กระดองโค้งนูนมาก ผิวมันเป็นเงา ขอบหน้าเว้าเล็กน้อย ส่วนขอบกระดองด้านข้างตอนหน้ามีหนามแหลมลักษณะคล้ายฟันข้างละ 4 อัน สันกระเพาะก่อนส่วนหน้า (epigastric crest เด่นชัดแต่สั้น ส่วนสันด้านหลังของเบ้าตา (postorbital crest) ไม่เด่นชัด นูนเพียงเล็กน้อย และจะไปสิ้นสุดก่อนถึงร่องคอ (cervical groove) ร่องรูปตัว H (H-groove) และร่องตรงกลางรูปตัว H (semicircular groore) เด่นชัด ร่องคอ ไม่เด่นชัด ร่องกึ่งกลางกระดอง (middle groove) สั้น แต่จะยาวกว่า Esanthelphusa sp.VII กระดองมีความกว้างประมาณ 40 มิลลิเมตร (รูปที่ 4, A)

โกโนพอดส่วนฐานจะกว้าง ส่วนปลายเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้ายเครื่องหมายคำถาม แต่ส่วนปลายสุดจะแหลมและบิดขึ้นบนเล็กน้อย (ดังแสดงในรูปที่ 4 B, C)

***Esanthelphusa* sp.II**

ลักษณะสำคัญ

กระดองโค้งนูน จะเรียบเป็นมัน ขอบหน้าเว้าเล็กน้อย ส่วนขอบกระดองด้านข้างตอนหน้ามีหนามแหลมคล้ายฟันข้างละ 4 อัน สันกระเพาะก่อนส่วนหน้าเด่นชัดแต่สั้นมาก สันด้านหลังของเบ้าตานูนขึ้นเล็กน้อย และไปสิ้นสุดก่อนถึงร่องคอ ร่องรูปตัว H ร่องตรงกลางรูปตัว H และร่องคอเป็นร่องลึกเด่นชัด ร่องกึ่งกลางกระดองยาว และเห็นร่องชัดเจน ความกว้างของกระดองประมาณ 34 มิลลิเมตร (รูปที่ 5, A)

โกโนพอดฐานจะกว้าง ส่วนปลายเรียวจะโค้งงอคล้าย *Esanthelphusa* sp.I แต่จะโค้งแคบกว่าส่วนปลายสุดแหลม และบิดขึ้นบนเล็กน้อย (ดังแสดงในรูปที่ 5 B, C)

***Esanthelphusa* sp.III**

ลักษณะสำคัญ

กระดองโค้งนูน ผิวเรียบเป็นมัน ส่วนขอบกระดองด้านข้างตอนหน้ามีหนามแหลมลักษณะคล้ายฟัน ข้างละ 4 อัน สันกระเพาะก่อนส่วนหน้าเด่นชัด สันด้านหลังของเบ้าตาไม่เด่นชัดและไปสิ้นสุดก่อนถึงร่องคอ ร่องรูปตัว H ร่องกึ่งกลางรูปตัว H และร่องคอเด่นชัด ร่องกึ่งกลางกระดองสั้น ความกว้างของกระดองประมาณ 40 มิลลิเมตร (รูปที่ 6, A)

โกโนพอด ส่วนฐานจะกว้าง ส่วนปลายเรียวโค้งงอคล้ายตะขอ โดยส่วนปลายสุด จะแหลมตั้งฉากกับแนวดิ่งทำมุมประมาณ 90 องศา (ดังแสดงในรูปที่ 6 B, C)

***Esanthelphusa* sp. VII**

ลักษณะสำคัญ

กระดองโค้งนูน ผิวเรียบเป็นมัน สีของกระดองเป็นสีน้ำตาล และมีปื้นสีน้ำตาลดำ 3 ปื้นเด่นชัดอยู่ค่อนมาทางด้านหลังของกระดอง บริเวณขอบด้านหน้าของกระดองมีสีน้ำตาลพาดตามความกว้างของกระดอง ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ จะไม่พบในปูชนิดอื่น ๆ ที่ศึกษา ขอบกระดองด้านข้างตอนหน้ามีหนามแหลมลักษณะคล้ายฟันข้างละ 4 อัน สันกระเพาะก่อนส่วนหน้าเด่นชัด สันด้านหลังของเบ้าตาไม่เด่นชัดและไปสิ้นสุดก่อนถึงร่องคอ ร่องรูปตัว H และร่องตรงกลางรูปตัว H เป็นร่องลึกเด่นชัด ความกว้างของกระดองประมาณ 34 มิลลิเมตร (รูปที่ 7, A)

โกโนพอด ส่วนฐานกว้าง ส่วนปลายมีลักษณะโค้งงอ ปลายสุดจะแหลมและขนานไปกับแนวราบโค้งเอียงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ประมาณ 45 องศา (ดังแสดงในรูปที่ 7 B, C)

***Esanthelphusa* sp. XII**

ลักษณะสำคัญ

กระดองโค้งนูน ผิวเรียบ ขอบหน้าเว้าเล็กน้อย ส่วนขอบกระดองด้านข้างตอนหน้ามีหนามแหลมลักษณะคล้ายฟันข้างละ 4 อัน สันกระเพาะก่อนส่วนหน้าเด่นชัดโค้งขึ้นเล็กน้อย สันด้านหลังของเบ้าตาลาดตรงและไปสิ้นสุดก่อนถึงร่องคอ ร่องรูปตัว H ร่องตรงกลางรูปตัว H และร่องคอเด่นชัด ร่องกึ่งกลางกระดองสั้นและไม่เด่นชัด ความกว้างของกระดองประมาณ 39 มิลลิเมตร นอกจากนี้ปูนาชนิดนี้ ตรงส่วนบนของก้ามหนีบจะมีจุดประสีน้ำตาล ซึ่งไม่พบในปูชนิดอื่น (รูปที่ 8, A)

โกโนพอดส่วนฐานกว้าง ส่วนปลายเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้าย *Esanthelphusa* sp.I แต่ส่วนโค้งจะแคบกว่า สำหรับส่วนปลายสุด จะแหลมและดิ่งเข้าด้านใน (ดังแสดงใน รูปที่ 8 B, C)

***Esanthelphusa* sp.XIII**

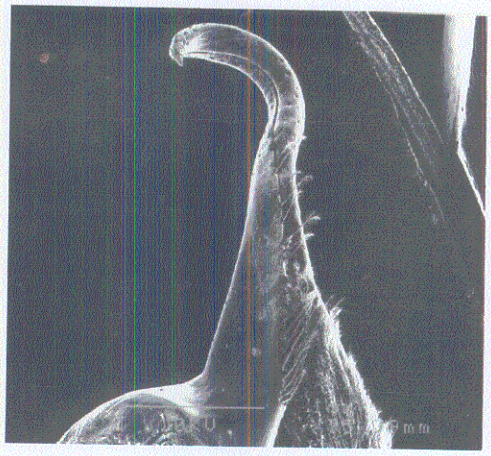
ลักษณะสำคัญ

กระดองโค้งนูน ผิวเรียบเป็นมัน ขอบหน้าเว้าเล็กน้อย ส่วนขอบกระดองด้านข้างตอนหน้ามีหนามแหลม ลักษณะคล้ายฟันข้างละ 4 อัน สันกระเพาะก่อนส่วนหน้าเด่นชัดและสั้นมาก สันด้านหลังของเบ้าตาลาดลงและไปสิ้นสุดก่อนถึงร่องคอ ร่องรูปตัว H และร่องกึ่งกลางรูปตัว H เด่นชัด ร่องคอไม่เด่นชัด ร่องกึ่งกลางกระดองสั้น ลักษณะร่องไม่เด่นชัด กระดองมีความกว้างประมาณ 38 มิลลิเมตร (รูปที่ 9, A)

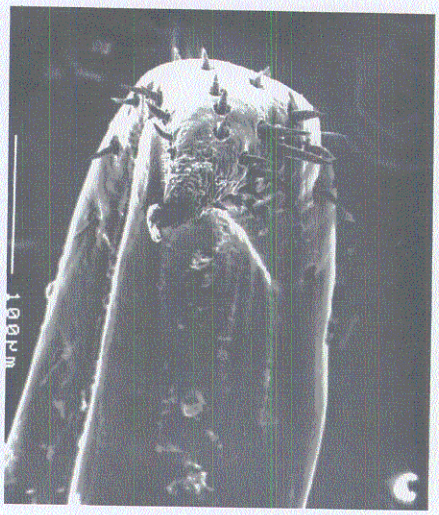
โกโนพอด ส่วนฐานกว้าง ส่วนปลายเรียวลักษณะโค้งงอคล้าย *Esanthelphusa* sp. III แต่บริเวณส่วนปลายสุดจะแหลม และดิ่งลงทางด้านล่าง (ดังแสดงในรูปที่ 9 B, C)

* Note : Reference สำหรับศึกษาโกโนโพด อาศัยเอกสารของ ถวิล ประมวล (2533) และ สมร ขวัญทอง (2538)

A



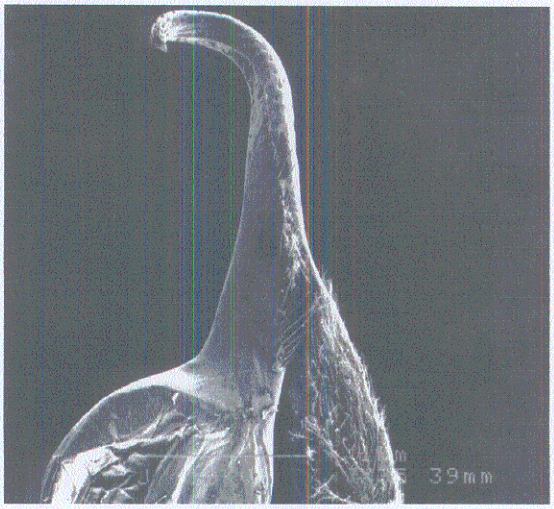
B



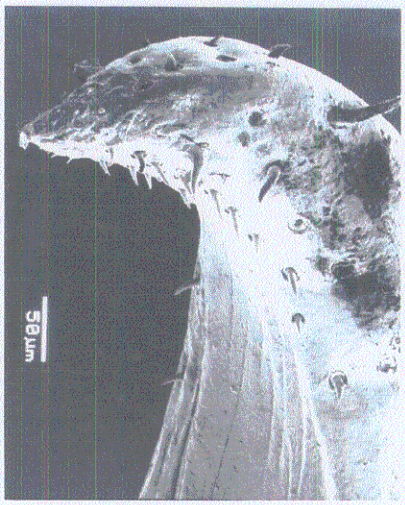
C

รูปที่ 4 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp. I รูป (B) แสดงโกโนพอดส่วนปลายเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้ายเครื่องหมายคำถาม รูป (C) ส่วนปลายสุดจะแหลมและบิดขึ้นบนเล็กน้อย

A



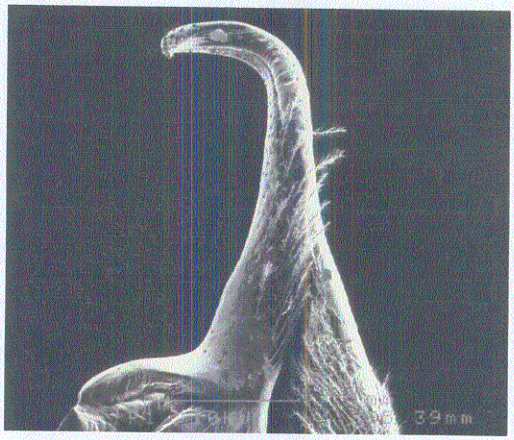
B

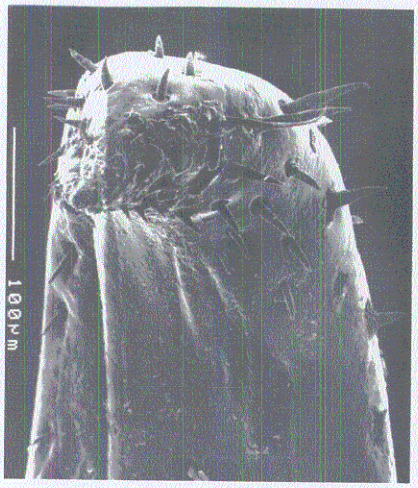


C

รูปที่ 5 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp. II รูป (B) แสดงโกโนพอดส่วนปลายเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้าย *Esanthelphusa* sp. I แต่จะโค้งแคบกว่า รูป (C) ส่วนปลายสุดแหลมและบิดขึ้นบนเล็กน้อย

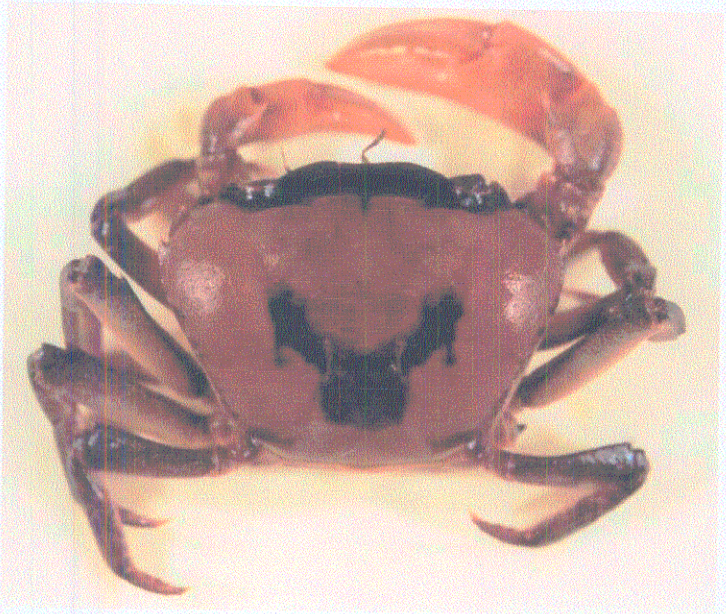
A





B C

รูปที่ 6 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp. III รูป (B) แสดงโกโนพอดส่วนปลายเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้ายตะขอ รูป (C) ส่วนปลายสุดจะแหลมตั้งฉากกับแนวดิ่งทำมุมประมาณ 90 $^{\circ}C$

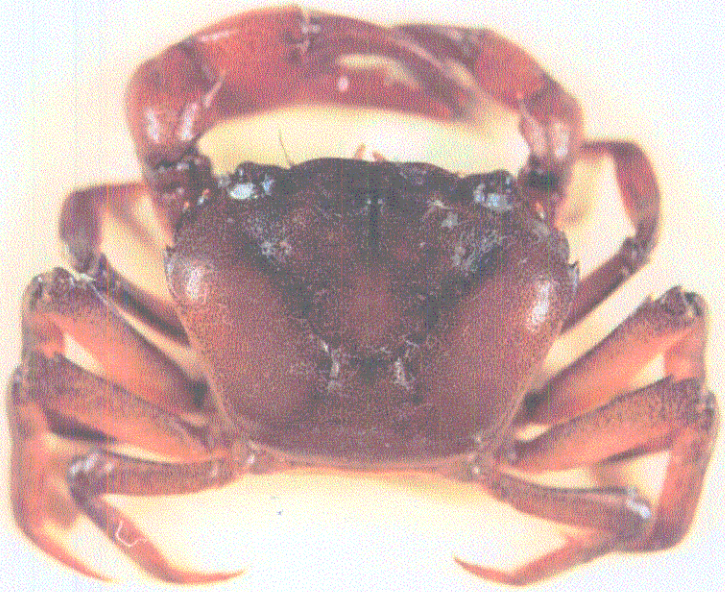


A

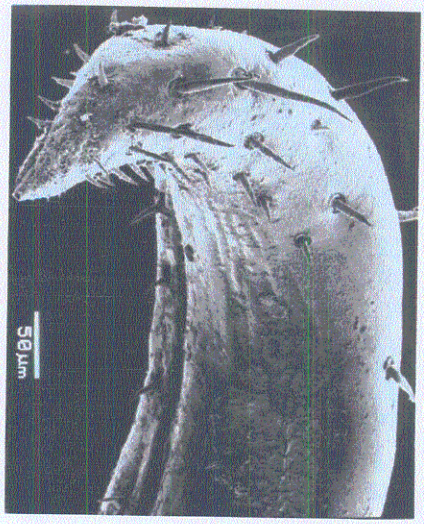
B

C

รูปที่ 7 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp. VII รูป (B) ส่วนปลายเรียวมีลักษณะโค้งงอ (C) ส่วนปลายสุดจะแหลมและขนานไปกับแนวราบโค้งเอียงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ประมาณ 45 °C

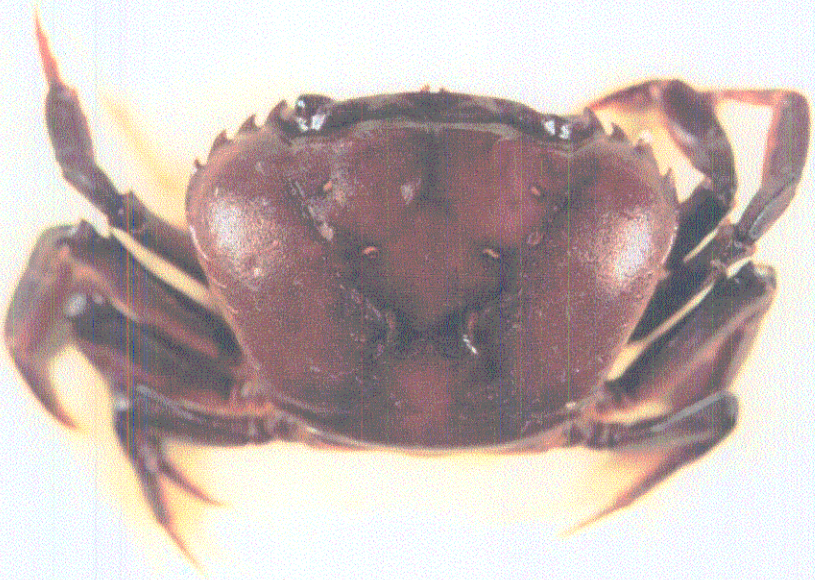


A

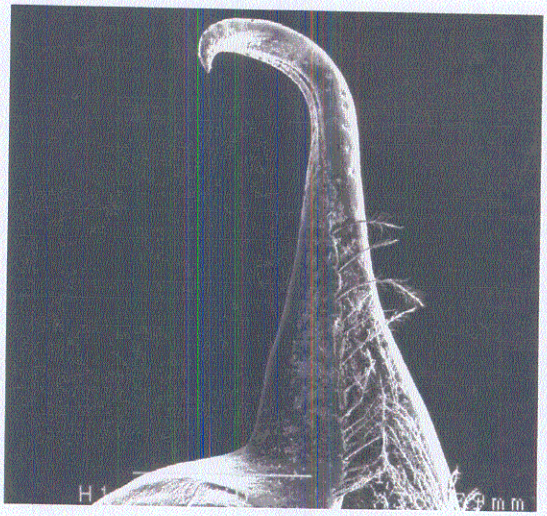


B C

รูปที่ 8 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp.XII รูป (B) แสดงส่วนปลายโกโนพอดเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้าย *Esanthelphusa* sp.I แต่ส่วนโค้งจะแคบกว่า (C) ส่วนปลายสุดจะแหลมและดิ่งเข้าด้านใน



A



B

C

รูปที่ 9 (A) แสดงลักษณะของปูนาชนิด *Esanthelphusa* sp.XIII รูป (B) แสดงส่วนปลายโกโนพอดเรียวมีลักษณะโค้งงอคล้าย *Esanthelphusa* sp.III (C) ส่วนปลายสุดจะแหลมและดิ่งลงทางด้านล่าง

2. การศึกษาความผันแปรของปูนาโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

ตัวอย่างของปูนาในสกุล *Esanthelphusa* ที่รวบรวมได้ มาจาก 8 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย ซึ่งเมื่อจัดกลุ่มและ species ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว มีตัวอย่างปูนาที่นำมาศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมจำนวน 6 species (ตารางที่ 2) ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่โดยสรุปดังนี้

1) *Esanthelphusa* sp.I มาจากพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา และอำเภอนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์

2) *Esanthelphusa* sp.II มาจากพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ อำเภอเมืองและอำเภอขุขันธ์ จังหวัดศรีสะเกษ อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร อำเภอเมือง (ตลาดหนองบัวและตลาดริมมูล) และ อำเภอวารินชำราบ (ตลาดวาริน) จังหวัดอุบลราชธานี และ อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ

3) *Esanthelphusa* sp.III มาจากพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ อำเภอเมือง (ตลาดหนองบัวและตลาดริมมูล) และ อำเภอวารินชำราบ (ตลาดวาริน) จังหวัดอุบลราชธานี

4) *Esanthelphusa* sp.VII มาจากพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ

5) *Esanthelphusa* sp.XII มาจากพื้นที่ อำเภอเมือง (ตลาดหนองบัวและตลาดริมมูล) และ อำเภอวารินชำราบ (ตลาดวาริน) จังหวัดอุบลราชธานี และ อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร

6) *Esanthelphusa* sp.XIII มาจากพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ

จากการศึกษาแบบแผนของเอนไซม์ที่สกัดจาก Hepatopancreas ของปูนาด้วยเทคนิค Starch gel electrophoresis ในระยะเริ่มแรกของการดำเนินการพบว่าผลที่แสดงแบบแผนของเอนไซม์ของปูนาแต่ละชนิดไม่ชัดเจนและไม่คงที่ ประกอบกับประสบปัญหาด้านห้องปฏิบัติการในช่วงเวลาดังกล่าว จึงใช้การวิเคราะห์สารพันธุกรรมชนิด Deoxyribonucleic acid (DNA) ด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นวิธีทางกรดนิวคลีอิกวิธีหนึ่งที่พัฒนาขึ้นแทน เพื่อผลที่ชัดเจนและคงที่ และยังเป็นงานวิจัยด้านการพัฒนาวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมโดยเน้น DNA ซึ่งมีความคงตัวมากกว่าเอนไซม์

ในการศึกษาแบบแผนของสารพันธุกรรมของปูนาวิธี RAPD ได้เริ่มด้วยการทดลองสกัดหรือแยก Genomic DNA จากปูนา โดยใช้ส่วนเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องของปูนาและ Hepatopancreas และเนื้อเยื่อของก้ามหนีบของปู และได้ตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างภายหลังจากการเตรียมเพื่อสกัด DNA โดยตรงด้วยกล้องจุลทรศน์ ซึ่งไม่พบการปนเปื้อนของเซลล์จุลินทรีย์ (ตัวอย่างในรูปที่ 10) ซึ่งเมื่อสกัด DNA โดยใช้วิธีที่ระบุตาม Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) และตรวจหาสารที่ได้จากการสกัดด้วย Agarose gel electrophoresis ผลที่ได้

คือไม่พบ DNA ในสารละลายที่สกัดโดยใช้ส่วนเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องของปูนา และ Hepatopancreas แต่พบ DNA ในสารละลายที่สกัดจากเนื้อเยื่อของก้ามหนีบ ในปริมาณ >50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยเฉลี่ย สรุปได้ว่าการสกัดหรือแยก Genomic DNA จากปูนา ตาม Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) ที่ได้ทดลองนี้ใช้ได้ผลกับเนื้อเยื่อของก้ามหนีบของปูนา แต่เมื่อคำนึงจำนวนตัวอย่างปูนาที่ต้องนำมาสกัด DNA ซึ่งถ้ามีตัวอย่างจำนวนมากและต้องการปริมาณ DNA ในความเข้มข้นต่ำ (Delidow *et al.*, 1993; Newton and Graham, 1997) สำหรับกระบวนการ Polymerase chain reaction (PCR) แล้ว ถือได้ว่าการใช้วิธีการนี้ยังคงสิ้นเปลืองสารละลายและวัสดุที่ใช้ในการสกัด DNA ดังนั้นเพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพและคุ้มค่ามากขึ้นจึงได้ดัดแปลงวิธีการจากที่ระบุตาม Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) ตั้งแต่ขั้นตอนแรก และอาศัยวิธีการพื้นฐานตาม Sambrook *et al.* (1989) ซึ่งวิธีการที่ได้ดัดแปลงแล้วนี้สามารถสกัด Genomic DNA ได้ในปริมาณ > 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยเฉลี่ย วิธีการดังกล่าวประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียม Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA)/Nuclei lysis solution (Promega) โดยผสม สารละลาย 0.5M EDTA (pH 8.0) 60 ไมโครลิตร และ Nuclei lysis solution 250 ไมโครลิตร แล้วแช่ไว้บนน้ำแข็ง

(2) ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อจากก้ามหนีบของปูนาที่ได้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°ซ. จนกระทั่งตัวอย่างแข็งตัวแล้วปริมาณ 50 มิลลิกรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ บรรจุลงใน Microcentrifuge tube ขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร

(3) บดเนื้อเยื่อที่กำลังแข็งตัวจากการแช่แข็งด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ

(4) เติม EDTA/Nuclei lysis solution ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

(5) เติม Proteinase K (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, MERCK) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มใน Water bath shaker ที่อุณหภูมิ 55°ซ. ใช้ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยนำหลอดมาเข้าเครื่องผสมอย่างรวดเร็วทุกๆ 1 ชั่วโมง

(6) เติม RNase (4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Promega) ปริมาณ 1.5 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดบรรจุขึ้นลง ประมาณ 25 ครั้ง

(7) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 30 นาที แล้วทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 5 นาที)

(8) เติม Protein precipitation solution (Promega) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมอย่างรวดเร็วด้วยเครื่องผสม (Vortex mixer) ที่ความเร็วสูง เป็นเวลา 20 วินาที

(9) วางหลอดที่มีส่วนผสม ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

(10) ปั่นแยกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

(11) ปิเปตส่วนใส (supernatant) ซึ่งมี DNA ใส่ในหลอดบรรจุ Isopropanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง

(12) ผสมเบาๆ โดยกลับหลอดบรรจุส่วนผสมขึ้นลง จนสังเกตเห็นเส้นหรือกลุ่มสีขาวของ DNA แขวนลอยในหลอด

(13) ปั่นแยกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 10 นาที

(14) ล้างตะกอนด้วย Ethanol (70%) ทิ้งให้ตะกอนแห้ง (ประมาณ 30 นาที) แล้วจึงละลายตะกอน DNA ใน Milli-Q water ปลอดเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เมื่อเพิ่มปริมาณ Genomic DNA ของปูนาที่สกัดหรือแยกได้ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ RAPD Analysis Primers 2 และ 3 (Pharmacia Biotech) และ PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 1X PCR buffer ที่มี 1.5 mM $MgCl_2$ (QIAGEN) 100 ไมโครโมล ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim) 20 พิโคโมล ของ Primer 2 หรือ Primer 3 1.6 หน่วย ของ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) และ 100 นาโนกรัม ของ Genomic DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ icCycler (Bio-Rad) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาตามลำดับ ดังนี้ (1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 2 นาที (2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 29°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที เป็นรอบสุดท้าย

จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตจากกระบวนการ PCR ด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถแยกชนิด/สายพันธุ์ของปูนาจากแบบแผน DNA (RAPD) ที่แสดง และเมื่อเปรียบเทียบผลสำเร็จในการใช้วิธีดังกล่าวกับปูนา โดยสรุปแล้ว RAPD Analysis Primers 2 (Pharmacia Biotech) สามารถใช้เพื่อเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมาย (Target DNA) ได้ปริมาณมากกว่า Primer 3 เมื่อใช้ Template DNA เริ่มต้นในความเข้มข้นเท่ากัน จึงเลือก Primer 2 ในการศึกษาแบบแผนของสารพันธุกรรมของปูนาเป็นหลัก และเพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าที่สุดสำหรับกระบวนการ PCR ที่ใช้วิเคราะห์แบบแผนของปูนาเป้าหมายอีกเช่นกัน จึงได้ศึกษาสภาวะ (Condition) ที่เหมาะสม ดังนี้

1) ส่วนประกอบที่เหมาะสมของ PCR reaction mixture

1.1) ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ใน PCR buffer โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ดังนี้ 0, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM

1.2) ปริมาณ *Taq* DNA polymerase โดยเปรียบเทียบปริมาณที่ใช้คือ 1, 1.6, 2.0 และ 2.5 หน่วย ใน 50 ไมโครลิตรของ PCR reaction mixture

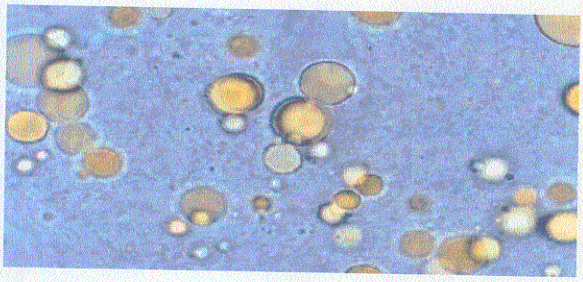
1.3) ความเข้มข้นของ RAPD Analysis Primer 2 โดยเปรียบเทียบที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 พิโคโมล

2) เวลาที่เหมาะสมสำหรับ Denaturation, Annealing และ Extension ในช่วงการเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 40 รอบ โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้เวลา 30 วินาที และ 1 นาที สำหรับ Denaturation และ 1 และ 1.5 นาที สำหรับ Annealing และเปรียบเทียบ 1 และ 1.5 นาที เช่นเดียวกันสำหรับ Extension

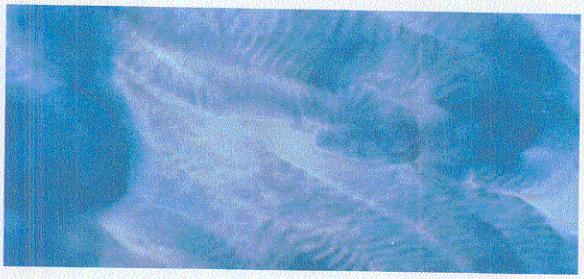
ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ PCR ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์แบบแผนของ DNA ของปูนา คือ PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 1X PCR buffer ที่มี 1.5 mM $MgCl_2$ (QIAGEN) 100 ไมโครโมล ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim) 20 พิโคโมล ของ RAPD Analysis Primer 2 (Pharmacia Biotech) 2 หน่วย ของ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) และ 100 นาโนกรัม ของ Genomic DNA ของปูนา และเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ icCycler (Bio-Rad) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาดังนี้ เริ่มที่ 94°ซ. เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA จำนวน 40 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่ 94°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 29°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และ Extension ที่ 72°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที

จากผลการศึกษาสารพันธุกรรมของปูนาที่วิเคราะห์ด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าแบบแผนของ RAPD จากตัวอย่างของปูนาที่นำมาสกัด DNA ที่ได้จากตัวอย่างปูนาซึ่งรวบรวมจากพื้นที่เป้าหมายบางพื้นที่ในระยะแรกของการดำเนินงานของโครงการนั้นมีความผันแปรมาก (ตัวอย่างในรูปที่ 11) อาจเนื่องมาจากการใช้เนื้อเยื่อของก้ามปูที่มาจากปูหลายตัวที่ได้วิเคราะห์ชนิดแล้วโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าจัดอยู่ใน species เดียวกัน หรืออาจเป็นความผันแปรทางพันธุกรรมของปูนาในแต่ละ species ก็ได้ เพื่อหาข้อสรุปที่ชัดเจน จึงได้เก็บตัวอย่างปูนาอีกครั้งในพื้นที่เดิมและพื้นที่เป้าหมายที่เหลือ โดยแยกเพศและแยกเนื้อเยื่อจากก้ามหนีบของปูแต่ละตัวในแต่ละ species เพื่อวิเคราะห์ DNA ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้ แสดงในรูปแบบแผน RAPD ของ ปูนา *Esantheiphusa* sp.I (รูปที่ 12) *E.* sp.II (รูปที่ 13) *E.* sp.III (รูปที่ 14) *E.* sp.VII (รูปที่ 15) *E.* sp.XII (รูปที่ 16) และ *E.* sp.XIII (รูปที่ 17)

ปัญหาหนึ่งที่ประสบคือความไม่สม่ำเสมอของปริมาณผลผลิต DNA ที่มีผลกับความคมชัดของแบบแผน RAPD อาจเนื่องการประมาณความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับ DNA ที่ทราบความเข้มข้นแล้วด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ซึ่งเกิดการคลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อยได้ง่ายขณะปฏิบัติ ประกอบกับกระบวนการ PCR ในครั้งนี้ต้องการใช้ Template DNA ที่ความเข้มข้นต่ำมาก (100 นาโนกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร ของ PCR reaction mixture)

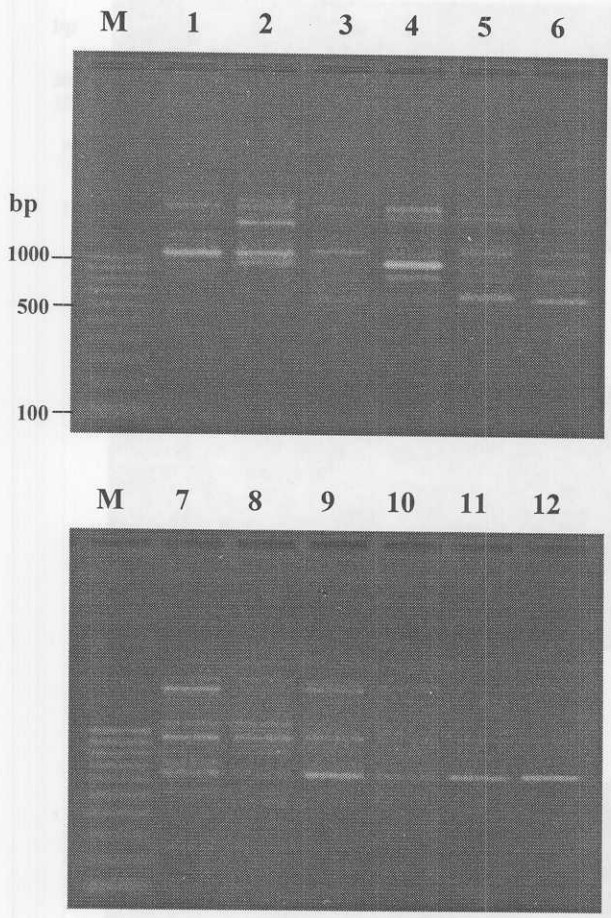


(ก)



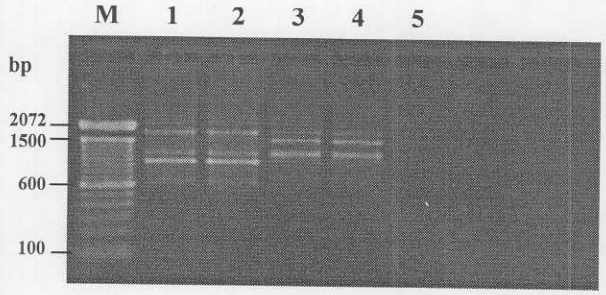
(ข)

รูปที่ 10 ลักษณะจากโครงสร้างของปูนาจากกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง (กำลังขยาย 2000 เท่า)
(ก) ส่วนอ่อนนุ่มบริเวณส่วนท้องและ Hepatopancreas และ
(ข) เนื้อเยื่อจากก้ามหนีบย้อมด้วยสี Methylene blue

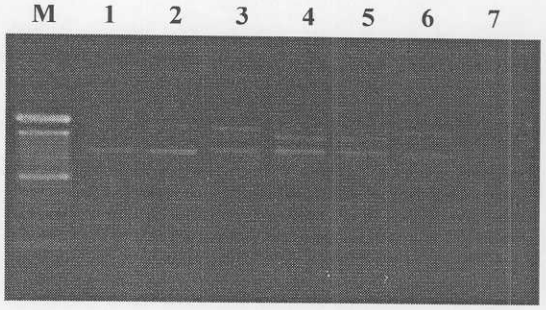


รูปที่ 11 ผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ของปูนาสกุล *Esanthelphusa* ตาม species ที่ได้จากการสกัด Genomic DNA จากเนื้อเยื่อรวมของปูนาหลายตัวใน species เดียวกัน โดยใช้ RAPD Analysis Primer 2 ด้วย Agarose gel electrophoresis

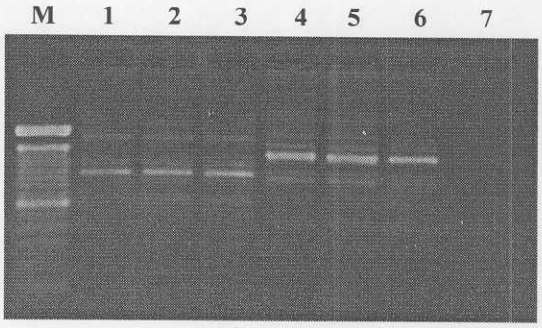
ช่อง (lane) ที่: M, DNA Molecular weight markers (EZ load 100bp molecular ruler, Bio-Rad); ช่องเลขคู่และเลขคี่แสดงแบบแผน RAPD ของปูนาเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ; 1 และ 2, *E.* sp.I จาก อ. เมือง จ. นครราชสีมา; 3 และ 4, *E.* sp.II จาก อ. เมือง (ตลาดหนองบัว) จ. อุบลราชธานี; 5 และ 6, *E.* sp.III จาก อ. เมือง (ตลาดหนองบัว) จ. อุบลราชธานี; 7 และ 8, *E.* sp.III จาก อ. เมือง จ. สุรินทร์; 9 และ 10, *E.* sp.VII จาก อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ; 11 และ 12, *E.* sp.XII จาก อ. เมือง จ. ยโสธร



(ก)



(ข)



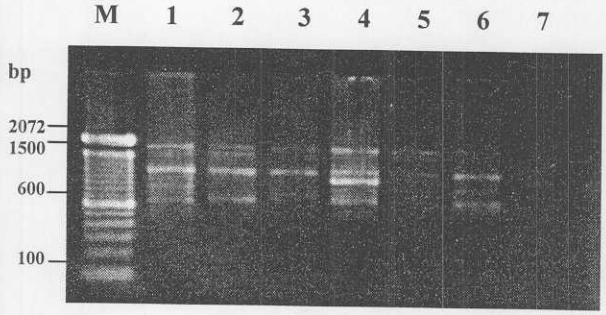
(ค)

รูปที่ 12 แบบแผน RAPD จากการวิเคราะห์ด้วย Agarose gel electrophoresis ของปูนา *Esanthelphusa* sp.I ที่เก็บตัวอย่างจาก (ก) อ. เมือง จ. ชัยภูมิ (ข) อ. เมือง จ. นครราชสีมา และ (ค) อ. นางรอง จ. บุรีรัมย์ ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว

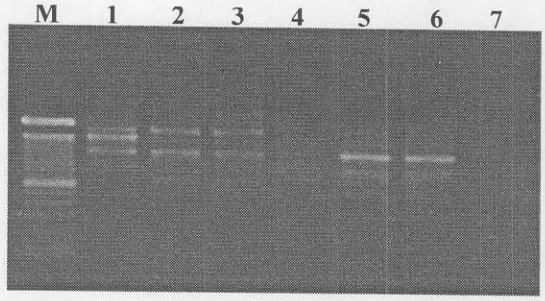
ช่องที่ M, DNA Molecular weight markers (100bp DNA ladder, GIBCOBRL)

(ก) ช่องที่: 1 และ 2, ปูนาเพศผู้; 3 และ 4, ปูนาเพศเมีย; 5, Negative control

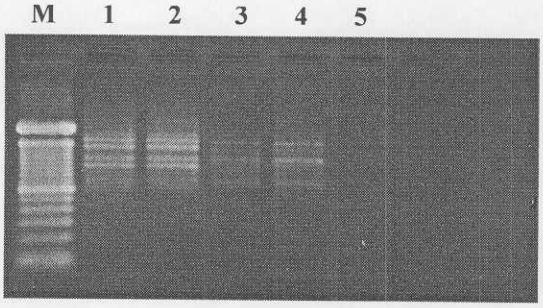
(ข) และ (ค) ช่องที่: 1 ถึง 3, ปูนาเพศผู้; 4 ถึง 6, ปูนาเพศเมีย; 7, Negative control



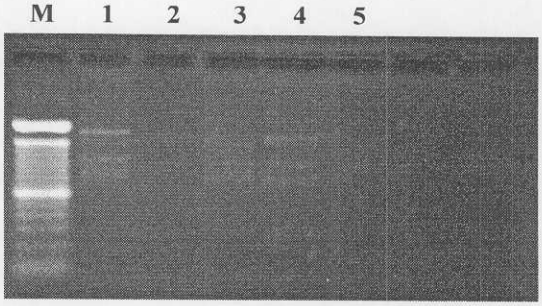
(ก)



(ข)

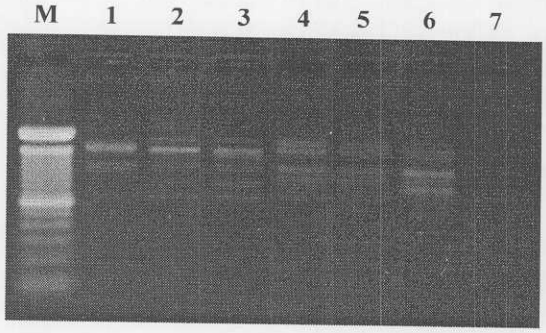


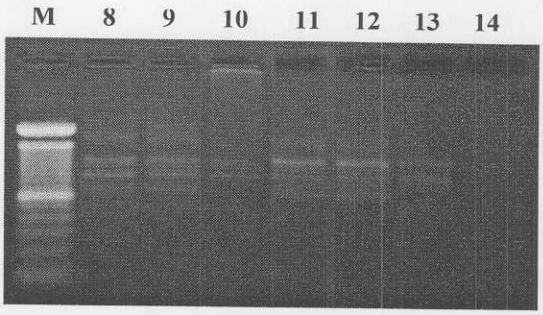
(ค)



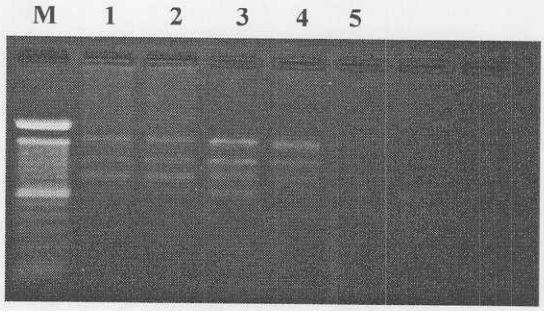
(ง)

(รูปที่ 13)





(จ)



(ฉ)

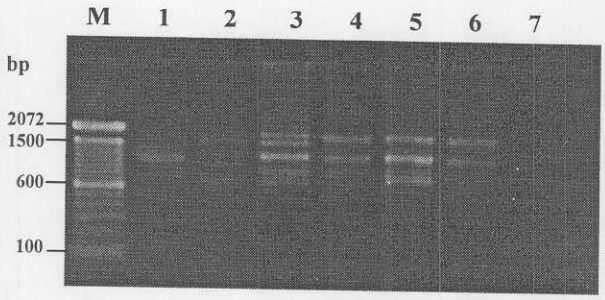
รูปที่ 13 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.II ที่เก็บตัวอย่างจาก (ก) อ. เมือง จ. สุรินทร์ (ข) อ. เมือง จ. ศรีสะเกษ (ค) อ. ขุขันธ์ จ. ศรีสะเกษ (ง) อ. เมือง จ. ยโสธร (จ) อ. เมือง และ อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี และ (ฉ) อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว

ช่องที่ M, DNA Molecular weight markers (100bp DNA ladder, GIBCOBRL)

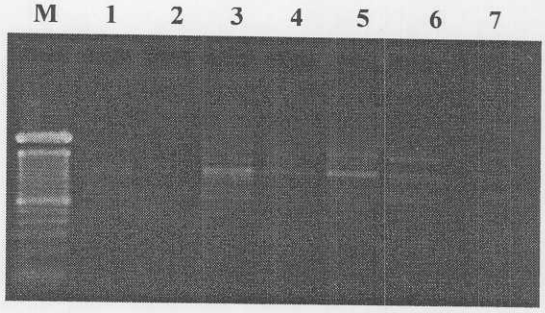
(ก) และ (ข) ช่องที่: 1 ถึง 3, ปูนาเพศผู้; 4 ถึง 6, ปูนาเพศเมีย; 7, Negative control

(ค) (ง) และ (ฉ) ช่องที่: 1 และ 2, ปูนาเพศผู้; 3 และ 4, ปูนาเพศเมีย; 5, Negative control

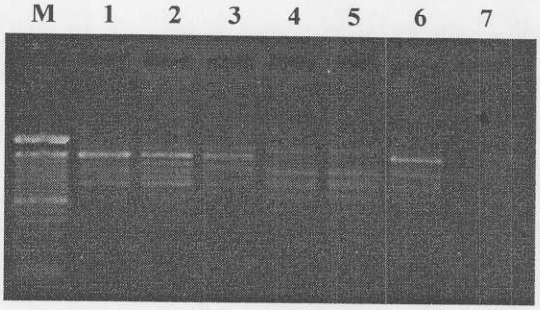
(จ) ช่องที่: 1 ถึง 6 และ 8 ถึง 10, ปูนาเพศผู้ ซึ่ง 1 ถึง 3 มาจากตลาดหนองบัว อ. เมือง, 4 ถึง 6 มาจากตลาดริมมูล อ. เมือง, 8 ถึง 10 มาจากตลาดวาริน อ. วารินชำราบ; 11 ถึง 13, ปูนาเพศเมีย มาจากตลาดหนองบัว ริมมูล และวาริน ตามลำดับ; 7 และ 14, Negative control



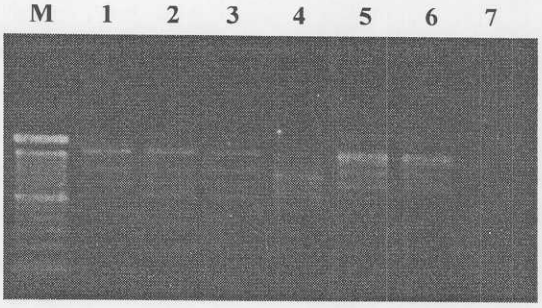
(ก)



(ข)

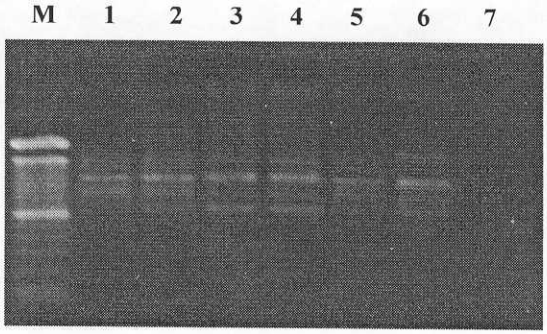


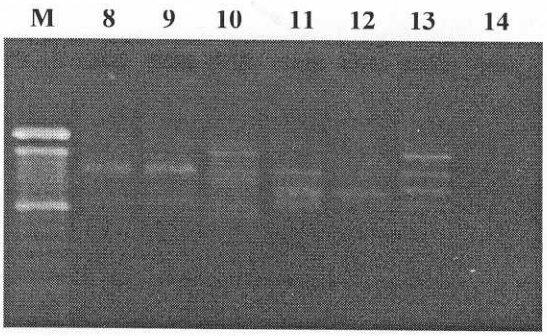
(ค)



(ง)

(รูปที่ 14)





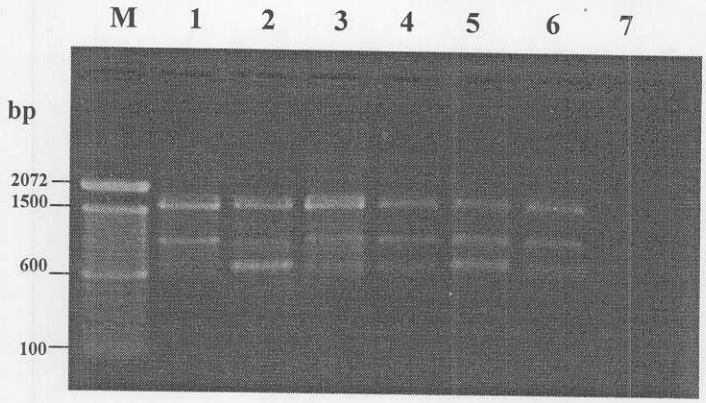
(จ)

รูปที่ 14 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.III ที่เก็บตัวอย่างจาก (ก) อ. เมือง จ. สุรินทร์ (ข) อ. เมือง จ. ศรีสะเกษ (ค) อ. เมือง จ. ยโสธร (ง) อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ และ (จ) อ. เมือง และ อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว

ช่องที่ M, DNA Molecular weight markers (100bp DNA ladder, GIBCOBRL)

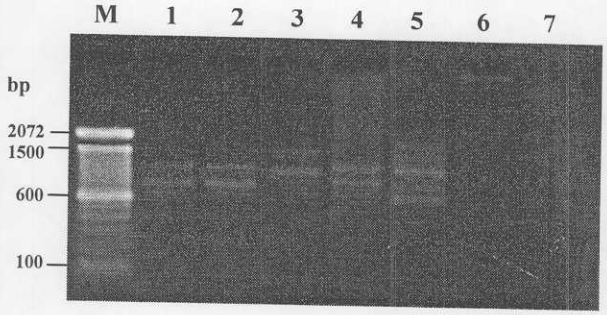
(ก) (ข) (ค) และ (ง) ช่องที่: 1 ถึง 3, ปูนาเพศผู้; 4 ถึง 6, ปูนาเพศเมีย; 7, Negative control

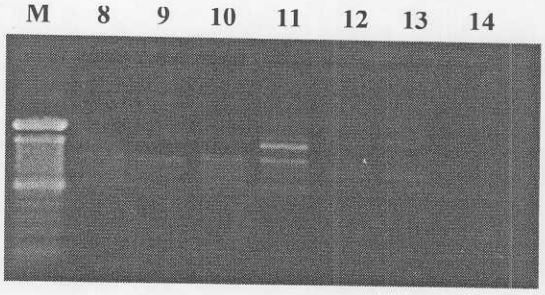
(จ) ช่องที่: 1 ถึง 6, ปูนาเพศผู้ ซึ่ง 1 และ 2 มาจากตลาดหนองบัว อ. เมือง, 3 และ 4 มาจากตลาดริมมูล อ. เมือง, 5 และ 6 มาจากตลาดวาริน อ. วารินชำราบ; 8 ถึง 13, ปูนาเพศเมีย ซึ่ง 8 และ 9 มาจากตลาดหนองบัว อ. เมือง, 10 และ 11 มาจากตลาดริมมูล อ. เมือง, 12 และ 13 มาจากตลาดวาริน อ. วารินชำราบ; 7 และ 14, Negative control



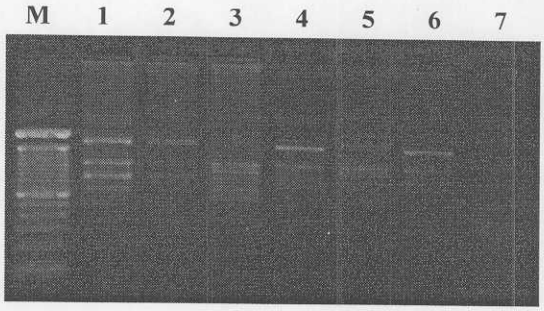
รูปที่ 15 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.VII ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เมือง จ.อำนาจเจริญ ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว

ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (100bp DNA ladder, GIBCOBRL); 1 ถึง 3, ปูนาเพศผู้; 4 ถึง 6, ปูนาเพศเมีย; 7, Negative control





(ก)



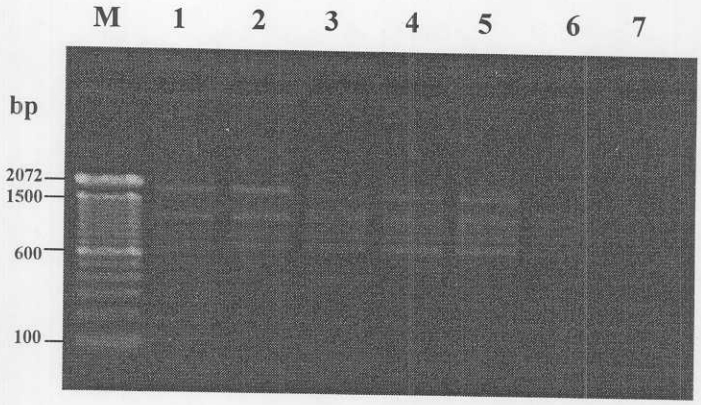
(ข)

รูปที่ 16 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.XII ที่เก็บตัวอย่างจาก **(ก)** อ. เมือง และ อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี และ **(ข)** อ. เมือง จ. ยโสธร ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว

ช่องที่ M, DNA Molecular weight markers (100bp DNA ladder, GIBCOBRL)

(ก) ช่องที่: 1 ถึง 6, ปูนาเพศผู้ ซึ่ง 1 และ 2 มาจากตลาดหนองบัว อ. เมือง, 3 และ 4 มาจากตลาดริมมูล อ. เมือง, 5 และ 6 มาจากตลาดวาริน อ. วารินชำราบ; 8 ถึง 13, ปูนาเพศเมีย ซึ่ง 8 และ 9 มาจากตลาดหนองบัว อ. เมือง, 10 และ 11 มาจากตลาดริมมูล อ. เมือง, 12 และ 13 มาจากตลาดวาริน อ. วารินชำราบ; 7 และ 14, Negative control

(ข) ช่องที่: 1 ถึง 3, ปูนาเพศผู้; 4 ถึง 6, ปูนาเพศเมีย; 7, Negative control



รูปที่ 17 แบบแผน RAPD ของปูนา *Esanthelphusa* sp.XIII ที่เก็บตัวอย่างจาก อ. เมือง จ. อำนาจเจริญ ซึ่ง Genomic DNA ที่ใช้วิเคราะห์ สกัดได้จากเนื้อเยื่อของปูนาแต่ละตัวในแต่ละ species และแต่ละช่อง (lane) ที่แสดง เป็นแบบแผน RAPD ของปูนาแต่ละตัว
ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (100bp DNA ladder, GIBCOBRL); 1 ถึง 3, ปูนาเพศผู้; 4 ถึง 6, ปูนาเพศเมีย; 7, Negative control

3. สรุปแบบแผนของตัวอย่างปูนาที่วิเคราะห์โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

แบบแผนของตัวอย่างปูนาที่รวบรวมจากแหล่งเก็บใน 8 จังหวัด ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย ที่วิเคราะห์โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส สามารถสรุปในรูปของแบบแผนของ DNA จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี RAPD โดยสกัดหรือแยก Genomic DNA จากเนื้อเยื่อก้ามหนีบของปูแต่ละตัวในแต่ละเพศ และเปรียบเทียบกันในปูนา species เดียวกันและต่าง species ซึ่งได้จำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งผลสรุปมีดังนี้

1) *Esanthelphusa* sp.I จากตัวอย่างที่เก็บจาก 3 พื้นที่ คือ อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา และ อำเภอนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์ พบว่าปูนาจาก อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ ที่สุ่มมาวิเคราะห์ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีแบบแผน RAPD ที่เฉพาะและเหมือนกันในเพศเดียวกัน (รูปที่ 12 ก) ซึ่งในปูทุกเพศและทุกตัว มี DNA 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 1300 และ 1700 คู่เบส (base pair, bp) ในแบบแผน RAPD (รูปที่ 12) ร่วมกัน แต่มีจำนวน Copy number ของชิ้น DNA บน Genomic DNA แตกต่างกันในแต่ละเพศ โดยสังเกตจากความเข้มของแถบ DNA ที่ได้ สำหรับปูนาจาก อำเภอนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์ ก็ให้ผลทำนองเดียวกัน (รูปที่ 12ค) ทั้งปูเพศผู้และเพศเมียที่พบใน อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ มีแบบแผน RAPD เหมือนปูทั้งเพศผู้และเพศเมียที่พบใน อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา (รูปที่ 12ข ช่อง

ที่ 1, 2, 4 และ 5) และปูที่พบใน อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา มีความแตกต่างของแบนแผน RAPD ภายในเพศเดียวกัน (รูปที่ 12ข ช่องที่ 3) และต่างเพศกัน (รูปที่ 12ข ช่องที่ 6) จากการศึกษาครั้งนี้ พบแบบแผน RAPD ของปูนา *E.* sp.I ที่ต่างกันทั้งสิ้น 6 แบบแผน (ปูเพศผู้และเพศเมียจำนวน 3 และ 3 แบบแผน ตามลำดับ)

2) *Esanthelphusa* sp.II จากตัวอย่างที่เก็บจาก 8 พื้นที่ คือ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ อำเภอเมือง และอำเภอขุขันธ์ จังหวัดศรีสะเกษ อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร อำเภอเมือง (ตลาดหนองบัวและตลาดริมมูล) และ อำเภอวารินชำราบ (ตลาดวาริน) จังหวัดอุบลราชธานี และ อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ พบว่าปูนาเพศเมียที่ได้จาก อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ (รูปที่ 13ก ช่องที่ 4 ถึง 6) มีแบบแผน RAPD เช่นเดียวกับปูเพศเมียที่ได้จาก อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ (รูปที่ 13ข ช่องที่ 4 ถึง 6) และปูเพศเมียที่ได้จากตลาดหนองบัว และตลาดวาริน จังหวัดอุบลราชธานี (รูปที่ 13จ ช่องที่ 11 และ 12) ปูจากอำเภอเมือง จังหวัดยโสธร ทั้งเพศผู้และเพศเมียทุกตัวที่ศึกษามีแบบแผน RAPD เดียวกัน (รูปที่ 13ง) ตัวอย่างปูที่เหลือของ species เดียวกันในต่างพื้นที่เก็บ มีแบบแผน RAPD แตกต่างกัน (รูปที่ 13) และพบแบบแผน RAPD ที่ต่างกันทั้งสิ้น 14 แบบแผน (ปูเพศผู้และเพศเมียจำนวน 9 และ 5 แบบแผน ตามลำดับ)

3) *Esanthelphusa* sp.III จากตัวอย่างที่เก็บจาก 7 พื้นที่ คือ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ อำเภอเมือง (ตลาดหนองบัวและตลาดริมมูล) และ อำเภอวารินชำราบ (ตลาดวาริน) จังหวัดอุบลราชธานี พบว่าปูนาจากแต่ละพื้นที่ มีแบบแผน RAPD ที่จำเพาะและแตกต่างกัน (รูปที่ 14) ตัวอย่างปูเพศผู้จากทั้ง อำเภอเมือง (ตลาดหนองบัวและตลาดริมมูล) และ อำเภอวารินชำราบ (ตลาดวาริน) จังหวัดอุบลราชธานี มีแบบแผนเหมือนกัน เพียงแต่มีความเข้มของแถบ DNA ของปูแต่ละตัวที่ต่างกันเล็กน้อย (รูปที่ 14จ ช่องที่ 1 ถึง 6) และพบแบบแผน RAPD ของ *E.* sp.III ที่ต่างกันทั้งสิ้น 20 แบบแผน (ปูเพศผู้และเพศเมียจำนวน 8 และ 12 แบบแผน ตามลำดับ)

4) *Esanthelphusa* sp.VII จากตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ พบว่าปูเพศผู้แต่ละตัวมีแบบแผน RAPD ที่ค่อนข้างแตกต่างกัน (รูปที่ 15 ช่องที่ 1 ถึง 3) ปูเพศเมียทุกตัวที่ศึกษามีแบบแผน RAPD เดียวกัน แต่มีจำนวน Copy number ของชิ้น DNA บน Genomic DNA แตกต่างกันบ้าง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (รูปที่ 15 ช่องที่ 4 ถึง 6) และปูทั้งเพศผู้และเพศเมียมี DNA 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 1000 และ 1600 คู่เบส ในแบบแผน RAPD ร่วมกัน (รูปที่ 15) และพบแบบแผน RAPD ที่ต่างกันทั้งสิ้น 4 แบบแผน (ปูเพศผู้และเพศเมียจำนวน 3 และ 1 แบบแผน ตามลำดับ)

5) *Esanthelphusa* sp.XII จากตัวอย่างที่เก็บจาก 4 พื้นที่ คือ อำเภอเมือง (ตลาดหนองบัวและตลาดริมมูล) และ อำเภอวารินชำราบ (ตลาดวาริน) จังหวัดอุบลราชธานี และ อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร พบว่าปูนาที่ศึกษามีแบบแผน RAPD ที่จำเพาะและแตกต่างกันทั้งในพื้นที่เดียวกันและต่างพื้นที่ (รูปที่ 16) ปู

เพศผู้ทุกตัวจาก อำเภอเมืองและอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี มีแถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 800 และ 1000 คู่เบส ในแบบแผน RAPD ร่วมกัน (รูปที่ 16ก ช่องที่ 1 ถึง 6) และพบแบบแผน RAPD ของ *E.* sp.XII ที่ต่างกันทั้งสิ้น 11 แบบแผน (ปูเพศผู้และเพศเมียจำนวน 5 และ 6 แบบแผน ตามลำดับ)

6) *Esanthelphusa* sp.XIII จากตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ พบว่าปูเพศผู้และเพศเมียมีแบบแผน RAPD ที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 17) ปูเพศผู้มีความผันแปรในลำดับเบสของ DNA จากแถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 1700 คู่เบส ในแบบแผน RAPD (รูปที่ 17 ช่องที่ 1 ถึง 3) และปูเพศผู้บางตัวมีแบบแผนเหมือนปูเพศเมีย (รูปที่ 17 ช่องที่ 3 ถึง 6) พบแถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 700, 900 และ 1300 คู่เบส ในปูนาทุกตัวและทุกเพศที่นำมาศึกษา ปูเพศเมียทุกตัวมีแบบแผน RAPD เหมือนกัน (รูปที่ 17 ช่องที่ 4 ถึง 6) และพบแบบแผน RAPD ของปูนา *E.* sp.XIII ที่ต่างกันทั้งสิ้น 2 แบบแผน

ปูนา *Esanthelphusa* ที่พบกระจายในพื้นที่ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างมากที่สุดจากการศึกษาครั้งนี้ คือ *E.* sp.II สำหรับปูนาที่พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงหรือมีความแตกต่างของแบบแผน RAPD มากที่สุด คือ *Esanthelphusa* sp.III และเมื่อเปรียบเทียบแบบแผน RAPD ของปูนาต่าง species กันตามที่จำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเก็บตัวอย่างจากต่างพื้นที่ศึกษา พบว่า *E.* sp.I เพศผู้ที่ได้จาก อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ มีแบบแผน RAPD (รูปที่ 12ก ช่องที่ 1 และ 2) คล้ายกันมากกับ *E.* sp.II เพศผู้ที่ได้จาก อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ (รูปที่ 13ก ช่องที่ 1 ถึง 3) และเหมือน (แบบแผนเดียวกัน) กับ *E.* sp.II เพศเมียที่ได้จาก อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ (รูปที่ 13ก ช่องที่ 4 ถึง 6) อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ (รูปที่ 13ข ช่องที่ 4 ถึง 6) และ ตลาดหนองบัว และตลาดวาริน จังหวัดอุบลราชธานี (รูปที่ 13จ ช่องที่ 11 และ 12) นอกจากนี้ *E.* sp.II เพศผู้ที่ได้จาก อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ มีแบบแผน RAPD (รูปที่ 13ฉ ช่องที่ 1 และ 2) คล้ายกันมากกับ *E.* sp.XIII เพศผู้ที่ได้จาก อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ (รูปที่ 17 ช่องที่ 1 และ 2)

4. ข้อคิดเห็นและเสนอแนะ

คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่า วิธี RAPD ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้วิเคราะห์สารพันธุกรรมของปูนา สกุล *Esanthelphusa* ในเบื้องต้นได้ทั้งปูเพศผู้และเพศเมีย และปูนาต่าง species กันตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต่างกันเพียงบางประการ สามารถให้ผลที่มีความเหมือนด้านแบบแผนของสารพันธุกรรม (DNA) ได้ ดังเช่น *Esanthelphusa* sp.I และ *E.* sp.II ตามผลการวิจัยที่แสดงข้างต้น เป็นต้น

บรรณานุกรม

ถวิล ประมวล. 2533. อนุกรมวิธานของปูนา และลักษณะของโกโนพอด, โอมมาติเดีย โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปัทมพร ราชภักดี. 2539. ความผันแปรทางพันธุกรรมของปูนา *Sayamia bangkokensis* ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ลพบุรี สุพรรณบุรีและอ่างทอง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

ไพบูลย์ นัยเนตร. (2521). การกระจายทางภูมิศาสตร์ของปูน้ำจืดในประเทศไทย. วารสารภูมิศาสตร์ 3(3) : 24-43.

ไพบูลย์ นัยเนตร. (2542) บทความพิเศษ การกระจายทางภูมิศาสตร์ของปูน้ำจืดในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ พฤษภาคม-มิถุนายน 168-168.

สมร ขวัญทอง. 2538. การกระจายของสัตว์ท้องถิ่นบางชนิดที่ใช้เป็นอาหารในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Alexander, R. McNeill. (1979). The invertebrates. Cambridge University: Cambridge. pp. 431-465.

Delidow, B.C.; Lynch, J.P.; Peluso, J.J.; and White, B.A. 1993. Polymerase chain reaction: Basic protocols. *In* B.A. White. (ed.). PCR Protocols: Current Methods and Applications, pp. 1-29. Humana Press Inc.: Totowa.

Dorit, R.L.; Walker, W.F. Jr. and Barnes, R.D. (1991). Zoology. Philadelphia: Saunders College Publishing.

Eisenthal, R. and Danson, M. J. (1993). Enzyme assays a Practical approach. Oxford University: New York.

Lewontin, R. C. (1991). Twenty-five years ago in genetics: electrophoresis in the development of evolutionary genetic: milestone or millstone. Genetic. 128: 657-662.

Naiyanetr, P. (1994). On three new genera of Thai rice-field crab allied to *Somanniathelphusa* Bott, 1968 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Parathelphusidae). Raffles Bull. Zool. 42(3): 695-700.

Nei, M. (1975). Molecular population genetics and evolution. North-Holland: New York.

Newton, C.R. and Graham, A. 1997. PCR, 2nd Edition. BIOS Scientific Publishers Limited: New York.

Ng, P. K. L. and Naiyanetr, P. (1993). New and recently described freshwater crabs (Crustacea : Decapoda : Brachyura : Potamidae, Gecarcinucidae and Parathelphusidae) from Thailand. Zool. Verh. 284 : Leiden 117 p.

Richardson, B. J.; Baverstock, P. R. and Adams, M. (1986). Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies. Academic press. 401 pp.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory: New York

Stuart, J.A. and Ballantyne, J.S. (1996). Subcellular organization of intermediary metabolism in the hepatopancreas of the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*: a cytosolic β–hydroxybutyrate dehydrogenase. J. Exp. Zool. 274: 291-299.

ภาคผนวก

1. Loading buffer

Sucrose	4.0	กรัม
Bromophenol blue	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เก็บที่ 4°ซ.

2. Methylene blue (Loeffler's)

Potassium hydroxide (1% aqueous solution)	1.0	มิลลิลิตร
Methylene blue (saturated in 95% ethanol)	30.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง

3. TBE buffer (pH 8.0)

89 mM Tris-HCl

89 mM Boric acid

2 mM EDTA

ประวัตินักวิจัย

1. ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ : (ภาษาไทย) นางสาวสมร ขวัญทอง

(ภาษาอังกฤษ) Miss Samorn Kwantong

2. รหัสประจำตัว : -

3. ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. ประวัติการศึกษา :

ปีที่จบ	ปริญญา	อักษรย่อ	วิชาเอก	สถาบัน	ประเทศ
2535	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตรบัณฑิต)	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ไทย
2538	ปริญญาโท	วท.บ. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	สัตววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
ปัจจุบันกำลังศึกษาต่อ	ปริญญาเอก		Aquaculture	Asian Institute of Technology (AIT)	ไทย

5. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) :

- อนุกรมวิธานของโปรโตซัว
- อนุกรมวิธานของหอยน้ำจืด กุ้งน้ำจืด ปูน้ำจืด แมลง ปลาน้ำจืด และ กบ - เขียด ที่เป็นอาหารของประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย

6. ประสบการณ์วิจัย :

6.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

สมร ขวัญทอง. 2535. *การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่พบบริเวณสระน้ำรอบ ๆ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี*. ปัญหาพิเศษ 62 หน้า.

สมร ขวัญทอง. 2538. *การกระจายของสัตว์ท้องถิ่นบางชนิดที่ใช้เป็นอาหารในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 288 หน้า.

สมร ขวัญทอง. (2540). การกกระจายของแมลงกินได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย. *วารสารเทคโนโลยีสุรนารี* ปีที่ 4 ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม หน้า 211-217.

6.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm)

Rodtong, S., S. Dobbinson, S. Thode-Andersen, M. A. McConnell, and G. W. Tannock. 1993. Derivation of DNA probes for the enumeration of a specific strain of *Lactobacillus acidophilus* in piglet digestive tract samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(11): 3871-3877.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Direct polymerase chain reaction detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in raw milk. *Abstracts of The 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 187.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Polymerase chain reaction detection of coagulase gene of mastitic *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. *Abstracts of The 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 186.

Rodtong, S., N. Teaumroong, and P. Chooklay. 1998. A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-rawieng Plant Genetics Forest. *Proceedings of The Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, 6-9 July 1998, Hua Hin, Thailand*: 281-284.

Rodtong, S., C. Burom, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 1999. Glycerol and mannitol production from yeasts for *Rhizobium* inoculum cultivation. *Abstracts of The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 208.

Rodtong, S., S. Thienhirun, and A.J.S. Whalley. 2000. New and interesting *Xylariaceae* from Tup Lan National Park. *Abstracts of The Tropical Mycology 2000, 25-29 April 2000, Liverpool, U.K.*: 30.

Rodtong, S., and N. Teaumroong. 2000. Edible mushrooms in dry dipterocarp forest of Tup Lan National Park in Thailand. *Abstracts of The Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 105.

Rodtong, S., P. Krubphachaya, and N. Teaumroong. 2000. *Lactobacillus* strains in natural Thai silage for applying as silage inoculants and probiotics. *Abstracts of The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 1-3 November 2000, Kanchanaburi, Thailand*: 77 (P-AB-13).

Rodtong, S., C. Wanapu, and A. Ishizaki. 2000. Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. *Abstracts of The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 1-3 November 2000, Kanchanaburi, Thailand*: 52 (O-IB-1).

Rodtong, S., and A. Ishizaki. 2000. Microbial conversion of cassava starch to L-lactic acid without carbon dioxide accumulation. *The first Regional Conference on Energy Technology Towards a Clean Environment, 1-2 December 2000, Chiang Mai, Thailand*: P14-EN039.

Rodtong, S. 2001. Bacterial strains for the direct production of L-lactic acid from cassava and sago starch. *Proceedings of The International Symposium on "Diversity and*

Optimum Utilization of Biological Resources in the Torrid and Subtropical Zones", 2 June 2001, Kyushu, Japan: 4-8.

Rodtong, S. 2001. Detection and sequence analysis of the gene encoding L-lactate dehydrogenase from starch-utilizing bacteria. *Abstracts of The BioThailand 2001: From Research to Market, 7-10 November 2001, Bangkok, Thailand*: 227 (P-Micro-Genetic-13).

Rodtong, S., J. Sansit, P. Chimsoongnern, K. Vechklang, and A. Ishizaki. 2001. Strain improvement of starch-utilizing bacteria by mutagenesis to enhance L-lactic acid production. *Abstracts of The BioThailand 2001: From Research to Market, 7-10 November 2001, Bangkok, Thailand*: 226 (P-Micro-Genetic-12).

Chookietwattana, K., and S. Rodtong. 2002. Density of halophilic bacteria in saline soil at Nong Bo Reservoir, Mahasarakham Province. *Extended Abstracts of The 3rd National Symposium on Graduate Research, 18-19 July 2002, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 541-542.

Chumkhunthod, P., S. Rodtong, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 2001. Bioconversion of cassava roots to high protein product for animal feed. *Thai Journal of Biotechnology*. 3(1): 17-25.

Chumkhunthod, P., S. Rodtong, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 2002. High protein feed production from cassava roots using mixed cultures of *Chlamydomucor* sp. SUT1 and *Candida utilis* TISTR 5001. *Extended Abstracts of The 3rd National Symposium on Graduate Research, 18-19 July 2002, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 547-548.

Green, D. H., G. D. Lewis, S. Rodtong, and M. W. Loutit. 1991. Detection of faecal pollution in water by an *Escherichia coli uidA* gene probe. *Journal of Microbiological Methods*. **13**: 207-214.

Reynolds, C., M. Donovan, S. Rodtong, and A.J.S. Whalley. 2000. Characterisation of fungal and other lectins: an overview. *Abstracts of The Tropical Mycology 2000, 25-29 April 2000, Liverpool, U.K.*: 8.

Tannock, G. W., A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, J. Ng, K. Munro, and T. Alatossava. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(9): 4264-4267.

Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd, and S. Rodtong. 2000. ITS-RFLP analyses of edible mushrooms in genera *Russula* and *Boletus* collected from North Eastern part of Thailand. *Abstracts of The Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 115.

Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D. M. Loach, and K. Munro. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(1): 297-303.