



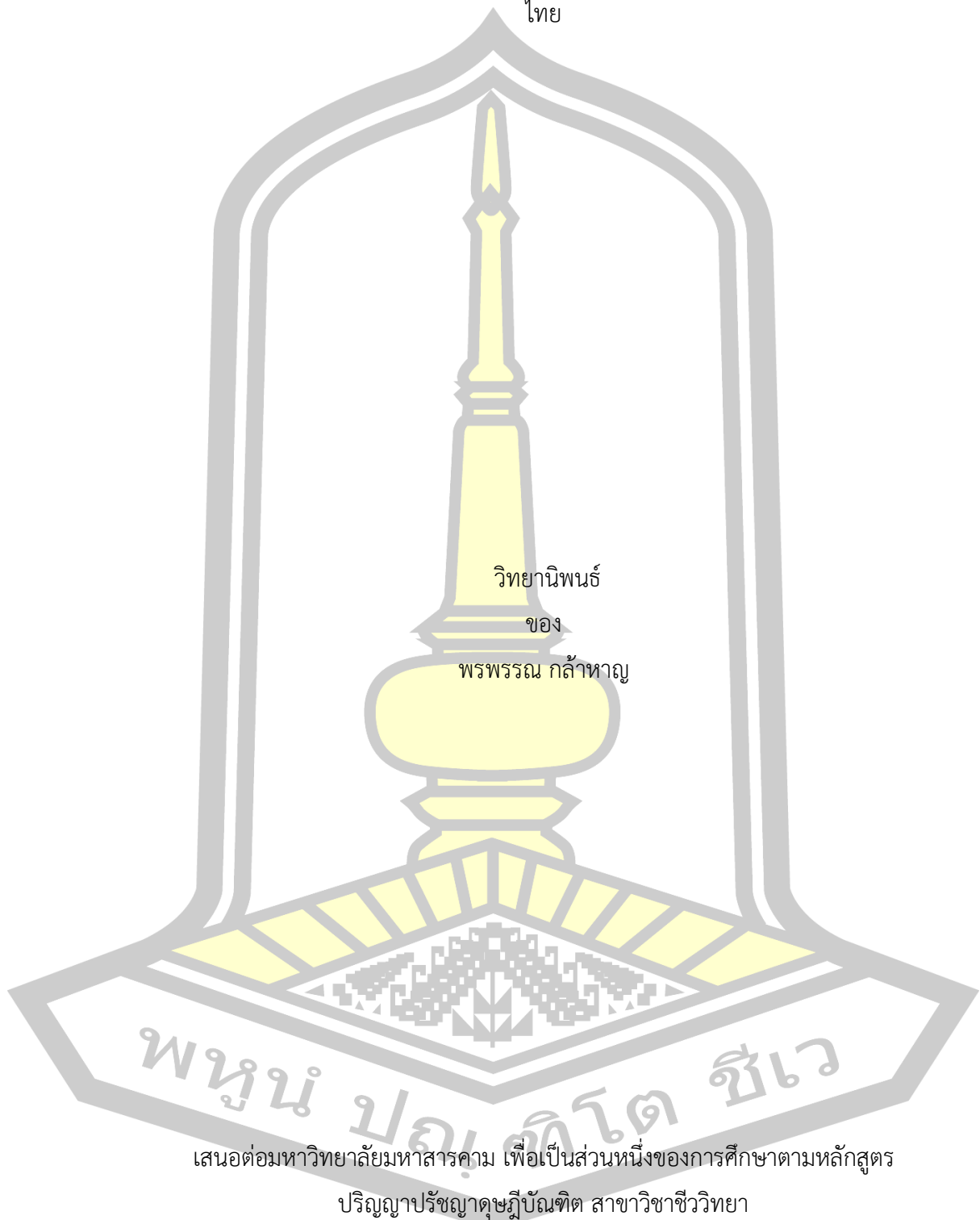
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขา (Potamidae) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

วิทยานิพนธ์
ของ
พรพรรณ กล้าหาญ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มีนาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขา (Potamidae) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย



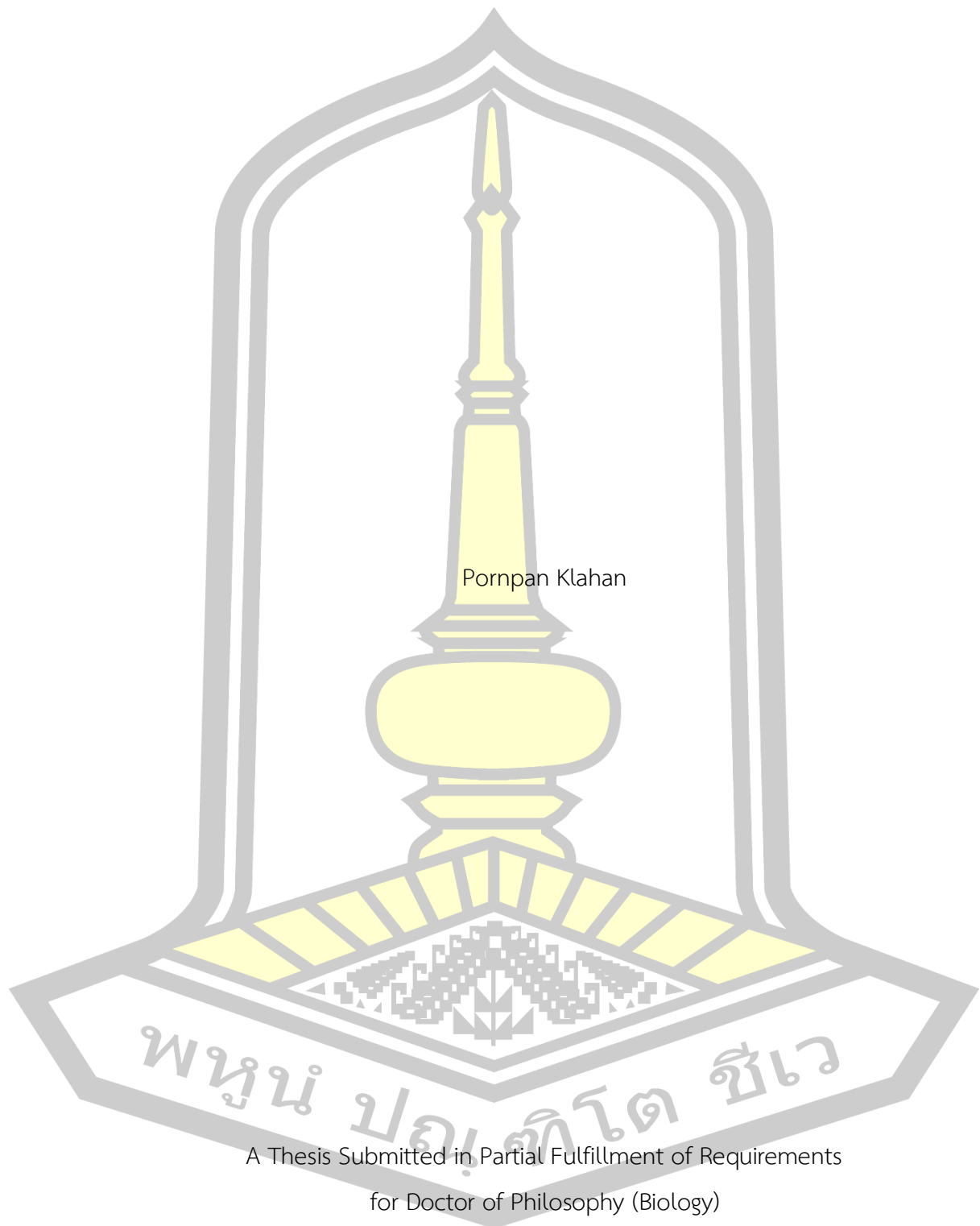
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มีนาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Genetic Diversity of Mountain Crabs (Potamidae) in Northeastern Thailand



Pornpan Klahan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Doctor of Philosophy (Biology)

March 2024

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวพรพรรณ กล้าหาญ
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชา
ชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. จันทิมา ปิยะพงษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. บังอร แถวโนนจั่ว)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รศ. ดร. บังอร กองอิม)

.....กรรมการ

(ดร. ญาณวุฒิ อุทรักษ์)

.....กรรมการ

(ผศ. ดร. สุรศักดิ์ ชื่นคำ)

.....กรรมการ

(รศ. ดร. ปิยมาศ นานอก โสภาลดาวัลย์)

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขา (Potamidae) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ผู้วิจัย พรพรรณ กล้าหาญ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บังอร แฉวโนนจิว

รองศาสตราจารย์ ดร. บังอร กองอิม

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** ชีววิทยา

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2567

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการจัดจำแนกชนิดปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปูภูเขา โดยเก็บตัวอย่างจาก 11 พื้นที่ 9 จังหวัด ได้ทั้งหมด 101 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกโดยใช้วิธีวัดสัณฐานผู้คู้ที่ 1 สามารถจัดจำแนกได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *S. somchai*, *S. ubon*, *S. sakon*, *E. yotdomense*, *Potamon* sp. และ *In. bhumibol* การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน 16S rDNA และ COI จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) พบว่ายีน 16S rDNA สามารถแบ่งได้ 4 เคลด (clade) ได้แก่ เคลด A ประกอบด้วย *S. ubon*, *S. Somchai* และ *S. sakon* เคลด B คือ *Potamon* sp. เคลด C คือ *E. yotdomense* และ เคลด D คือ *In. bhumibol* การศึกษานี้เป็นรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูภูเขาทั้ง 5 ชนิด คือ *S. ubon*, *S. Somchai*, *S. sakon*, *In. bhumibol* และ *Potamon* sp.

คำสำคัญ : ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ปูภูเขาวงศ์ Potamidae, ยีน 16s

TITLE Genetic Diversity of Mountain Crabs (Potamidae) in Northeastern Thailand

AUTHOR Pornpan Klahan

ADVISORS Assistant Professor Bung-on Thaewnongiw , Ph.D.
Associate Professor Bang-on Kong-im , Ph.D.

DEGREE Doctor of Philosophy **MAJOR** Biology

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2024

ABSTRACT

The aims of this study were to identify mountain crabs in family Potamidae using external morphology and genetic analysis. One hundred and one crabs were collected from 11 locations of 9 provinces in Northeastern, Thailand. According to external morphology study using first gonopod analysis found 6 species including *S. somchaii*, *S. ubon*, *S. sakon*, *E. yotdomense*, *Potamon* sp. and *In. bhumibol*. For the genetic study, DNA of each crab was extracted from chelae tissue and then amplified by the PCR technique using 16S rDNA and COI genes. The PCR products were analyzed for the nucleotide sequences and constructed phylogenetic tree using Maximum Likelihood (ML). Genetic analysis showed 4 clades, clade A: *S. ubon*, *S. somchaii* and *S. sakon*, clade B: *Potamon* sp., clade C: *E. yotdomense* and clade D: *In. bhumibol*. Nucleotide sequences of 5 mountain crabs are *S. ubon*, *S. Somchaii*, *S. sakon*, *In. bhumibol* and *Potamon* sp. were the new reported.

Keyword : Genetic Diversity, Potamidae, 16s

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บังอร แฉวโนนจิว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.บังอร กองอิม อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ และคอยช่วยเหลือ คอยแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดมา ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิมา ปิยะพงษ์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยมาศ นานอก โสภณดาวัลย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ชันคำ และ อ.ดร.ญาณวุฒิ อุทริกษ์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ซึ่งกรุณาสละเวลาอันมีค่าในการเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ชันคำ นายวันนวัติ สุธรรมฤทธิ์ นายชวณัฐ เจริญชัยวัฒนโชติ นางสาวมณีนีศิลา โพธิ์วัฒนางค์กูร และนายศุภณัฐ บุตรราช ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม และคอยช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ขอขอบคุณ นายวีระพงษ์ แก้วโร และกัลยณมิตร์ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในระหว่างการออกเก็บตัวอย่างและช่วยเก็บตัวอย่างมาให้ ขอขอบคุณ พี่ชูเทพ พี่ชายแดน และพี่วรรณ ที่ให้ความสะดวกในการเบิกวัสดุเพื่อใช้ระหว่างการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา นายทองวัน กล้าหาญ และมารดา นางเตียงทอง กล้าหาญ รวมทั้งครอบครัวที่คอยช่วยสนับสนุนและคอยให้กำลังใจในทุก ๆ เรื่อง ระหว่างที่ทำการศึกษา และทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าการวิจัยในครั้งนี้ จะมีประโยชน์ต่อผู้วิจัยท่านอื่น ๆ ที่ต้องการศึกษา และวิจัยปฏิกิริยาในในประเทศไทย

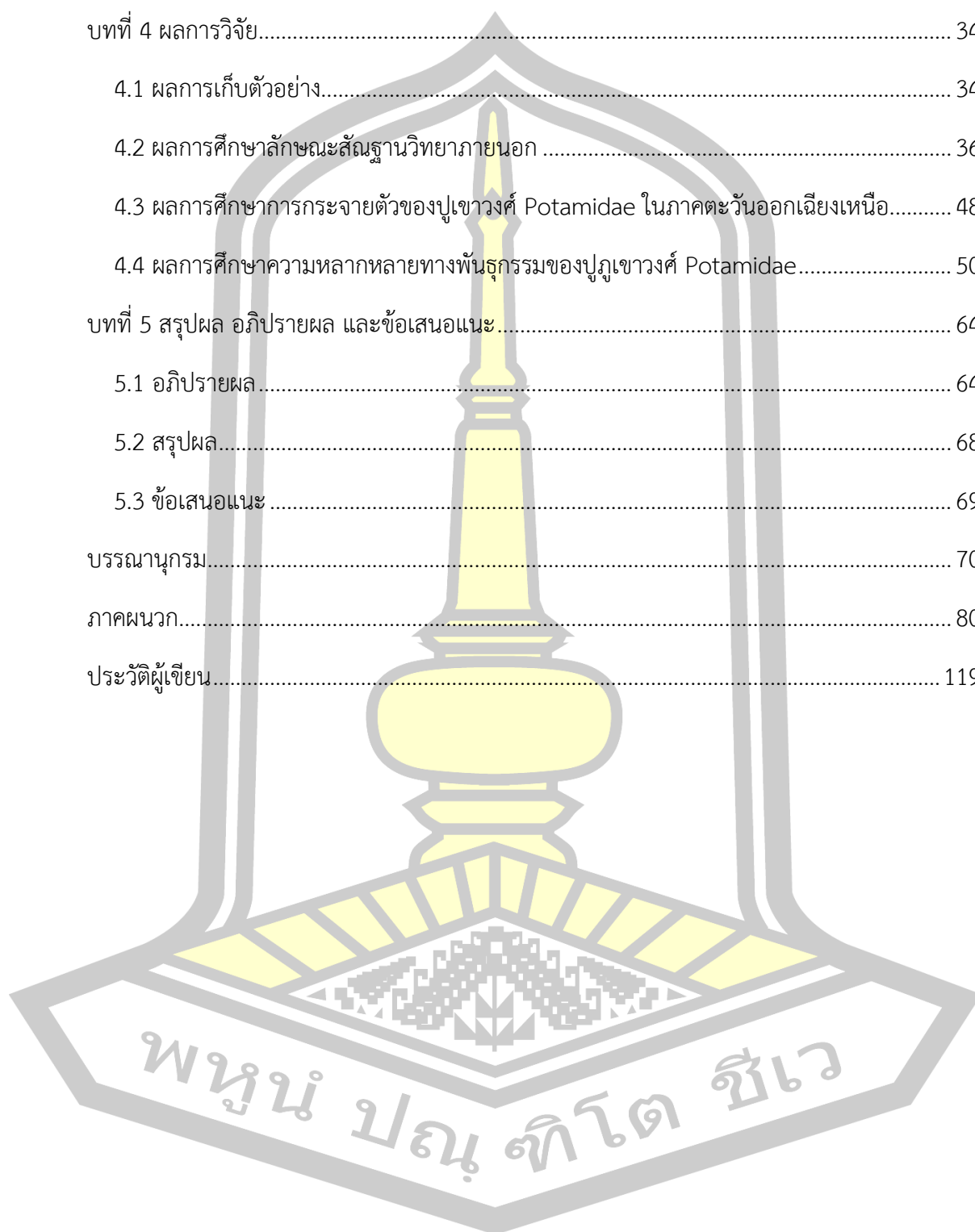
พรพรรณ กล้าหาญ

พณฺณ ปณฺ จิตฺ ชีเว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของการศึกษา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
แผนการดำเนินการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ปรีทัศน์เอกสารข้อมูล.....	4
2.1 ลักษณะทั่วไปของปู.....	5
2.2 ปูภูเขาวงศ์ Potamidae.....	14
2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขาวงศ์ Potamidae.....	19
2.4 เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	29
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	29
3.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก (External morphology).....	30
3.3 การศึกษาการกระจายตัวของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	31

3.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	34
4.1 ผลการเก็บตัวอย่าง.....	34
4.2 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก	36
4.3 ผลการศึกษาการกระจายตัวของปูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	48
4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูเขาวงศ์ Potamidae.....	50
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	64
5.1 อภิปรายผล	64
5.2 สรุปผล.....	68
5.3 ข้อเสนอแนะ	69
บรรณานุกรม.....	70
ภาคผนวก.....	80
ประวัติผู้เขียน.....	119



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปูภูเขาวงศ์ Potamidae ..	32
ตารางที่ 2 สถานที่เก็บตัวอย่าง พิกัด จำนวน และความสูงจากระดับน้ำทะเล	35
ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดกระดองปูภูเขาแต่ละพื้นที่	48
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการศึกษากับรายงานการกระจายของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.....	50
ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16SrDNA ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	53
ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ COI ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	54
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ E. yotdomense กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN	55
ตารางที่ 8 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ P. somchaii กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN	55
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ P. somchaii กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN (ต่อ).....	56
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ In. bhumibol กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN	56
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Potamon sp. กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN	57
ตารางที่ 12 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ของยีน COI กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank.....	57
ตารางที่ 13 ระยะห่างทางพันธุกรรมของปูภูเขาโดยใช้ไพรเมอร์ 16S rDNA วงศ์ Potamidae จากลำดับนิวคลีโอไทด์	58

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของปูวงศ์ Potamidae (วันนิวัติ สุธรรมฤทธิ์, 2563).....	7
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae (Brandis, 2000).....	9
ภาพประกอบ 3 (ก) ระบบหมุนเวียนเลือดของปูโดยเทคนิคการกัดเนื้อเยื่อ (ข) ช่องโพรงจมูกของปู 11	
ภาพประกอบ 4 ลักษณะที่สำคัญของปูภูเขา (Indochinamon bhumibol) (Yeo & Naiyanetr, 2000).....	16
ภาพประกอบ 5 ปูหินที่ถูกวางขายในตลาดอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย (วันนิวัติ สุธรรมฤทธิ์, 2563)....	19
ภาพประกอบ 6 แผนที่การเก็บตัวอย่าง.....	29
ภาพประกอบ 7 การเก็บตัวอย่างในฤดูฝนที่เขื่อนมรุ้ง จังหวัดบุรีรัมย์ (A) การเก็บตัวอย่างในฤดูแล้ง ภูผาขาว จังหวัดยโสธร (B)	30
ภาพประกอบ 8 วิธีการวัดขนาดของกระดองปูภูเขา (Fadlaoui et al., 2019) ความกว้างของ กระดอง (CW) ความยาวของกระดอง (CL)	30
ภาพประกอบ 9 แผนที่เก็บตัวอย่าง 11 จุด ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย.....	34
ภาพประกอบ 10 สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ <i>In. bhumipol</i>	37
ภาพประกอบ 11 สัณฐานวิทยาเพศเมียของ <i>In. bhumipol</i>	38
ภาพประกอบ 12 สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ <i>Potamon</i> sp.....	39
ภาพประกอบ 13 สัณฐานวิทยาเพศเมียของ <i>Potamon</i> sp.	40
ภาพประกอบ 14 สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ <i>S. somchai</i>	41
ภาพประกอบ 15 สัณฐานวิทยาเพศเมียของ <i>S. somchai</i>	42
ภาพประกอบ 16 ลักษณะกระดองของ A = <i>S. somchai</i> , B= <i>S. ubon</i> , C= <i>S. sakon</i>	42
ภาพประกอบ 17 อวัยวะสืบพันธุ์คู่อื่นที่ 1 ของ A = <i>S. somchai</i> , B= <i>S. ubon</i> , C= <i>S. sakon</i>	43
ภาพประกอบ 18 สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ <i>E. yotdomense</i>	44

ภาพประกอบ 19	สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ Pudaengon thatphanom.....	45
ภาพประกอบ 20	สัณฐานวิทยาเพศเมียของ Pudaengon thatphanom.....	46
ภาพประกอบ 21	ภาพเปรียบเทียบกระดูกของปูวงศ์ Potamidae และอวัยวะสืบพันธุ์.....	47
ภาพประกอบ 22	แผนที่การกระจายของปูเขาวงศ์ Potamidae ที่ทำการศึกษา.....	49
ภาพประกอบ 23	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของปูเขาวงศ์ Potamidae โดยใช้ไพรเมอร์ 16SrDNA.....	51
ภาพประกอบ 24	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของปูเขาวงศ์ Potamidae โดยใช้ไพรเมอร์ COI.....	52
ภาพประกอบ 25	เปรียบเทียบขนาดของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของปูเขาวงศ์ Potamidae โดยใช้ไพรเมอร์ 16SrDNA และ COI.....	52
ภาพประกอบ 26	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rDNA ของปูเขาวงศ์ Potamidae ทั้ง 4 ชนิด สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap 1000 ซ้ำ.....	60
ภาพประกอบ 27	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rDNA ของปูเขาวงศ์ Potamidae ทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ซ้ำ.....	61
ภาพประกอบ 28	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน COI ของปูเขาวงศ์ Potamidae ทั้ง 3 ชนิด สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap 1000 ซ้ำ.....	62
ภาพประกอบ 29	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน COI ของปูเขาวงศ์ Potamidae ทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap 1000 ซ้ำ.....	63

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของการศึกษา

ปูน้ำจืด (Freshwater crabs) เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ แต่ก็ยังเป็นศัตรูสำคัญในนาข้าว บางชนิดเป็นพาหะของพยาธิใบไม้ในปอดคน ปูน้ำจืดมีความสำคัญในห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศที่มีบทบาท เป็นทั้งผู้ล่า ผู้ถูกล่า และผู้ย่อยสลายโดยเป็นผู้กำจัดซากเน่าเปื่อยบริเวณพื้นที่ท้องน้ำ กิจกรรมการกินและการขุดรูเพื่ออยู่อาศัยของปูน้ำจืดช่วยให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารและก๊าซภายในดิน พร้อมทั้งยังเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพและมลพิษของแหล่งน้ำอีกด้วย (วชิระ ใจงาม และคณะ, 2550; Buatip *et al.*, 2017) ปูน้ำจืดพบได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ในบริเวณน้ำตก ลำธาร ห้วย หนอง คลอง แม่น้ำ พรุ นาข้าว หรือแม้แต่บนบกในป่าและภูเขา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีลักษณะภูมิประเทศแตกต่างกันหลายแบบไปตามลักษณะธรณีสัณฐาน ทำให้ปูน้ำจืดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีลักษณะแตกต่างกันตามไปด้วย โดยสามารถแบ่งปูออกเป็น 4 กลุ่ม คือ ปูนา ปูลำห้วย ปูป่า และปูน้ำตก ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ 2 วงศ์ (families) ได้แก่ Paratpheusidae คือ กลุ่มของปูนา และปูลำห้วย ส่วนวงศ์ Potamidae คือ กลุ่มของปูน้ำตกและปูป่า ปูนามีการกระจายอย่างกว้างขวาง ส่วนปูน้ำตก ปูป่า และปูลำห้วย การกระจายของกลุ่มนี้มีขอบเขตจำกัดตามลักษณะนิเวศวิทยาของถิ่นอาศัยของแต่ละชนิดเป็นหลัก ประชาชนชาวชนบทนิยมบริโภคปูอย่างแพร่หลาย ถือว่าปูเป็นแหล่งโปรตีนธรรมชาติที่หาง่ายโดยเฉพาะปูนา ชาวบ้านนิยมจับปูมาเพื่อบริโภคในครัวเรือน และนำไปขายเพื่อสร้างรายได้ให้กับครอบครัว จะพบเห็นตามท้องถนนที่นำปูนามาวางขายตามตลาดสด ซึ่งจะพบได้มากในท้ายฤดูฝน ราว ๆ เดือนตุลาคม (สัญญา ศุภจันทร์, 2545)

ปูภูเขา (mountain crab) เป็นปูน้ำจืดที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Potamidae เป็นกลุ่มปูที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในป่า และบนภูเขาที่มีแหล่งน้ำสะอาดและความอุดมสมบูรณ์ในทรัพยากรธรรมชาติ ปูภูเขามีการกระจายพันธุ์อยู่ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ในประเทศไทยมีรายงานการพบปูภูเขาวงศ์ Potamidae ทั้งหมด 95 ชนิด (species) ใน 25 สกุล (genus) (วันวิติ สุธรรมฤทธิ์, 2563; Ng and Mar, 2018) ปูภูเขาถือเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของคนในท้องถิ่น นิยมจับมาบริโภคในช่วงเดือนพฤศจิกายน - เดือนมกราคม มีราคาสูงกว่าปูนาทำให้คนในท้องถิ่นจับมาขายตามตลาดเพื่อสร้างรายได้ บางชนิดนิยมบริโภคมากซึ่งเป็นการบริโภคอย่างไร้ข้อจำกัดจึงทำให้จำนวนลดลง เพราะยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ได้ ปูภูเขามีการกระจายพันธุ์ที่ค่อนข้างจำกัดเนื่องจากถิ่นอาศัยที่ขึ้นอยู่กับลักษณะภูมิประเทศที่เป็นภูเขาสูง ซึ่งเป็นสิ่งขวางกั้นการแพร่กระจาย หากถิ่นที่อยู่อาศัยถูกรบกวนหรือถูกเปลี่ยนแปลงสภาพไป ปูภูเขาอาจลดจำนวนลงและสูญหายไปจากพื้นที่นั้นได้ ปัจจุบันมีปูเพียง 3 ชนิดที่ถูกขึ้นทะเบียนคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า ปี พ.ศ. 2562

ได้แก่ ปูเจ้าฟ้า (*Phricotelphusa sirindhorn*) ปูทุลกระหม่อม (*Thaipotamon chulabhorn*) ปูราชินี (*Demanietta sirikit*) จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาสัณฐานวิทยา และความหลากหลายทางพันธุกรรมร่วมด้วย เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการอนุรักษ์พันธุ์ปูให้อยู่คู่กับแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และป้องกันการเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของปูภูเขาต่อไป

ในปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในประเทศไทยค่อนข้างมีน้อย การจัดจำแนกชนิดของปูภูเขาใช้การศึกษาอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้คู่ที่ 1 (G1) และศึกษาสัณฐานวิทยาส่วนอื่น ๆ ประกอบกัน ซึ่งรูปร่างและอวัยวะต่าง ๆ ของปูอาจเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยได้ ปูภูเขาหลายชนิดมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันอย่างมากในสัณฐานวิทยาภายนอก G1 และ G2 หากใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกเพียงอย่างเดียว อาจทำให้เกิดการผิดพลาดในการระบุชนิดได้ (สัญญา ศุภจันทร์, 2545) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการจัดจำแนกชนิดของปูภูเขาโดยใช้สัณฐานวิทยาภายนอก รวมทั้งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปูภูเขาวงศ์ Potamidae เพื่อความถูกต้องแม่นยำในการระบุชนิด และเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมในการระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างถูกต้อง ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันการสูญพันธุ์จึงควรศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมแล้วนำมาประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์และการเพาะเลี้ยงต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาและจัดจำแนกชนิดปูภูเขาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

1.2.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างปูภูเขาในพื้นที่เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เป็นพื้นที่เขตป่าชุมชน ตามแนวเทือกเขาภูพาน พนมดงรัก และเทือกเขาเพชรบูรณ์ จากนั้นนำตัวอย่างมาศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอก และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

แผนการดำเนินการวิจัย

แผนการดำเนินงาน	ระยะเวลา
รวบรวมและตรวจเอกสาร	พฤศจิกายน 2562 - เมษายน 2563
สำรวจเก็บข้อมูลภาคสนาม	พฤษภาคม 2563 - กุมภาพันธ์ 2566
วิเคราะห์ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ	มีนาคม 2566 - กันยายน 2566
เขียนรายงานวิจัย	กันยายน 2566 - ตุลาคม 2566
เขียนบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร	พฤศจิกายน 2567

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบจำนวนชนิดของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

1.5.2 สามารถระบุชนิดของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ได้ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการอนุรักษ์ เพื่อคัดเลือกพันธุ์ปูภูเขาวงศ์ Potamidae และเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปูภูเขาในด้านต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต



บทที่ 2

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

ปูเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจัดอยู่ในไฟลัมอาร์โทรพอดา (Arthropoda) ซุปเปอร์คลาสครัสเตเชีย (Crustacea) อันดับเดคาปอด (Decapod) ทั่วโลกมีปูมากกว่า 6,793 ชนิด (Ng *et al.*, 2008) ปูเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจัดอยู่ในไฟลัมอาร์โทรพอดา (Arthropoda) ซุปเปอร์คลาสครัสเตเชีย (Crustacea) อันดับเดคาปอด (Decapod) ทั่วโลกมีปูมากกว่า 6,793 ชนิด (Ng *et al.*, 2008) ประเทศไทยตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อน (tropical regions) ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก สามารถพบปูทั้งหมด 715 ชนิด 269 สกุล 42 วงศ์ ชื่อเรียกจะแตกต่างกันออกไปตามท้องถิ่นและแหล่งที่อยู่อาศัย เช่น ปูทะเล ปูนา ปูน้ําดก ปูหิน ปูลําห้วย ปูแม่น้ำ และปูป่า โดยเป็นปูที่อาศัยอยู่ในทะเลถึง 613 ชนิดส่วนที่เหลือเป็นปูน้ำจืด ปูบก ปูป่า รายงานในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530-2559 มีทั้งหมด 104 ชนิด วงศ์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงสุด คือ วงศ์ Xanthidae รองลงมา คือ Portunidae, Grapsidae, Potamidae, Leucosiidae และ Ocypodidae (ชุตานุกา คุณสุข และรังสิณี วงศ์สมศรี, 2559; Buatip *et al.*, 2017) ปูมีการกระจายพันธุ์ไปทั่วทุกภูมิภาคของโลก สามารถแบ่งปูออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่ ปูนํ้าเค็ม (saltwater crabs) ปูนํ้ากร่อย (brackish water crabs) ปูนํ้าจืด (freshwater crabs) ปูบก (terrestrial crabs) ปัจจุบันปูนํ้าจืดในธรรมชาติทั่วโลกที่ถูกค้นพบแล้วทั้งหมด 1,475 ชนิด 14 วงศ์ ปูนํ้าจืดที่มีความสำคัญจัดจำแนกได้ 8 วงศ์ และแพร่กระจายพันธุ์อยู่ในทั่วทุกทวีปดังนี้ (Yeo *et al.*, 2008)

Family Pseudothelphusidae พบที่ Mexico, Central และSouth America

Family Trichodactylidae พบที่ Mexico, Central และSouth America

Family Potamonautidae พบที่ Africa และMadagascar

Family Deckeniidae and พบที่ East Africa

Family Platythelphusidae พบที่ East Africa

Family Potamidae พบที่ North Africa, southern Europe และAsia

Family Gecarcinucidae พบที่ Seychelles และAsia

Family Parathelphusidae พบที่ Asia และAustralasia

ปูภูเขา (mountain crab, waterfall crab) มีชื่อเรียกอื่น ๆ ว่า ปูนํ้าตก ปูหิน ปูชน ปูแบ่ง และปูคาย สามารถจัดจำแนกปูภูเขาตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (สัณญา ศุภจันทรา, 2545)

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

SubClass: Crustacea

Class: Malacostraca

Superorder: Eucarida

Order: Decapoda

Superfamily: Potamoidae

Family: Potamidae

2.1 ลักษณะทั่วไปของปู

ร่างกายของปูประกอบด้วยสามส่วน คือ ส่วนหัว (head) ส่วนอก (thorax) และส่วนท้อง (abdomen) ส่วนหัวและส่วนอกรวมกัน เรียกว่า เซฟาโลธอแร็กซ์ (cephalothorax) มีกระดองหุ้มอยู่ตอนบน โครงร่างภายนอกของปูแต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะตัวแตกต่างกันออกไป จึงสามารถใช้ลักษณะภายนอกจำแนกชนิดของปูได้อย่างชัดเจน

2.1.1 กระดอง (carapace) คือ เปลือกแข็งที่รวมส่วนหัวและอกไว้ด้วยกัน อวัยวะภายในไว้ทั้งหมดแบ่งเป็นบริเวณต่าง ๆ ตามตำแหน่งของอวัยวะภายใน บริเวณส่วนหน้า (frontal) คือส่วนของกระดองอยู่ระหว่างเบ้าตาทั้ง 2 ข้าง บริเวณสันแกสตริก (gastric) คือ ส่วนกระเพาะอยู่บริเวณส่วนหน้าของกระดองต่อจาก ด้านบนของแกสตริก (upper front) ของกระดองขึ้นมาเล็กน้อย ซึ่งจะมีสัน epigastric crest บริเวณส่วน hepatic ได้แก่ บริเวณต่อจากฟันข้างกระดองทั้งสองข้างเข้ามาตรงส่วนกลาง ซึ่งจะมีร่องคอ (cervical groove) เป็นแนวแบ่งบริเวณแกสตริก กับ hepatic ออกจากกัน บริเวณ Branchial ส่วนที่อยู่ถัดจาก hepatic ลงมาระหว่างฟันข้างกระดองซึ่งสุดท้ายถึงข้างกระดองด้านหลัง บริเวณ cardiac คือ ส่วนตรงกลางกระดองด้านท้ายเหนือขอบหลังกระดองขึ้นมาเล็กน้อย บริเวณ antero-lateral teeth ด้านข้างกระดองเฉียงไปทางด้านหน้ามีลักษณะเป็นหนามแหลมมีขนาดต่าง ๆ

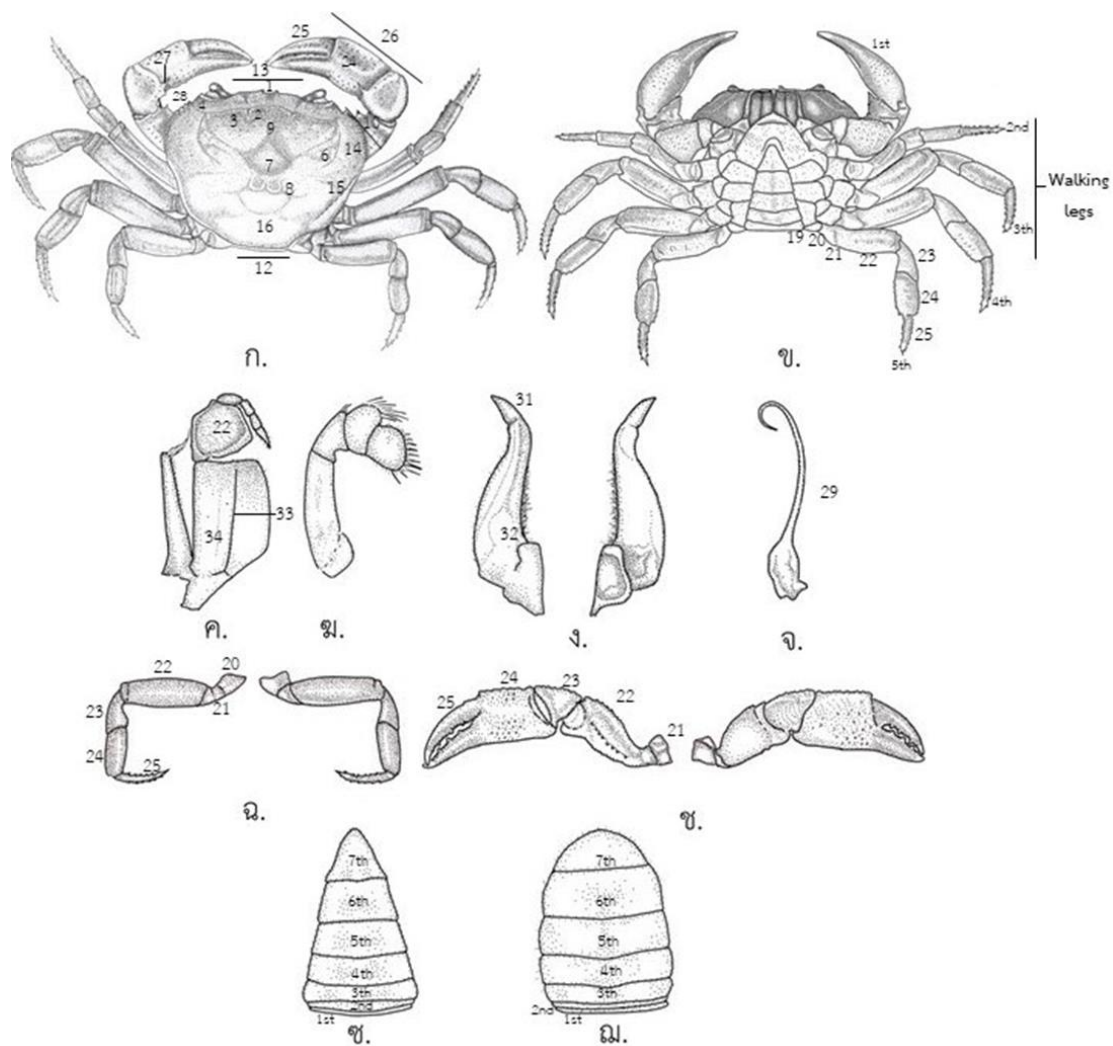
2.1.2 ขา คือ รางค์ที่ยื่นออกมาจากกระดองมีทั้งหมด 5 คู่ ด้วยกัน คือ 1. ก้ามหนีบ (cheliped) เป็นขาคู่ที่ 1 ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปเป็นก้ามหนีบขนาดใหญ่ที่มีขนาดเท่ากันทั้งสองข้างแบ่งออกเป็น 7 ปล้อง คือ coxa เป็นปล้องที่อยู่โคนสุดติดกับทรวงอกมีขนาดเล็ก basis เป็นปล้องที่ต่อจาก coxa มีขนาดเล็กปล้องสั้น ischium เป็นปล้องที่ติดจาก basis ขนาดใหญ่ coxa และ basis merus เป็นปล้องที่ต่อจาก basis มีขนาดใหญ่และยาวเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า แขน (arm) จะมีหนามอยู่ด้วย propodus เป็นปล้องต่อจาก carpus มีขนาดใหญ่แบนกว้างส่วนนี้เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า มือ (hand) ส่วนปลายมีลักษณะเรียวยาว เป็นนิ้วที่เคลื่อนไหวไม่ได้ (immovable finger) dactylus เป็นปล้องต่อจาก propodus มีลักษณะเรียวยาวเป็นนิ้วที่เคลื่อนไหวได้ 2.ขาเดิน (walking legs) หรือ

ambulatory legs มี 4 คู่คือ คู่ที่ 2-5 แต่ละขาประกอบด้วย 7 ปล้อง คือ coxa, basis, ischium, basis, carpus, merus, propodus, carpus และ dactylus

2.1.3 ตาเป็นตาประกอบ (compound eyes) มีก้านตายาวพับไว้ในเบ้าตา โครงสร้างของตาประกอบด้วย โอมมาติเดียม (ommatidium) มีจำนวนเป็นพันถึงหมื่นหน่วย โอมมาติเดียมประกอบด้วยคอร์เนีย (cornea) ด้านใต้คอร์เนียจะมี crystalline cone ทำหน้าที่เป็นแอ่งรวมเส้นประสาทรับความรู้สึกจำนวน 6-8 เส้น โอมมาติเดียมแต่ละหน่วยจะรับภาพได้น้อย ดังนั้นการเกิดภาพจึงเกิดได้ 1 ภาพ จะเกิดจากการรวมภาพหลายๆจุดมารวมกันเกิดเป็นภาพเพียง 1 ภาพ โอมมาติเดียมแต่ละหน่วยรับความเข้มของแสงแตกต่างกันออกไป ระยะในการมองเห็นของปูแต่ละชนิดก็แตกต่างกันออกไป ก้านตาของปูแต่ละชนิดก็มีความยาวแตกต่างกัน ซึ่งก็ขึ้นกับแหล่งที่อยู่อาศัย จำนวนของโอมมาติเดียมของปูแต่ละชนิด นอกจากนี้ปูแต่ละชนิดยังมีการปรับตัวของโอมมาติเดียมเพื่อให้เห็นภาพในที่มืดได้ ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับพฤติกรรมในการหากินของปูแต่ละชนิด เพราะบางชนิดหากินในเวลากลางวัน ส่วนบางชนิดหากินในเวลากลางคืน

2.1.4 ท้อง (abdomen) หรือ ตะปิ้งหรือจับปิ้ง จะมีลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างปูเพศผู้และปูเพศเมีย ปูเพศผู้จะมีจับปิ้งเป็นสามเหลี่ยมปลายแหลมฐานกว้าง ปูเพศเมียจะมีลักษณะครึ่งวงรี จับปิ้งลักษณะคล้ายแผ่นกระเบื้องเรียงต่อกันอยู่ 7 แผ่น อวัยวะภายในหัวใจ กระเพาะอาหาร ระบบประสาท และระบบสืบพันธุ์ มีกระดองปกคลุมอยู่ ปูรับออกซิเจนโดยผ่านทางเหงือก ซึ่งเรียกว่า นมปู (สัญญา ศุภจันทร์, 2545)

2.1.5 อวัยวะสืบพันธุ์ หรือ โคโนพอด (gonopod) มี 2 คู่ คู่ที่ 1 (first gonopod: G1) มีขนาดใหญ่ ซึ่งปูจะใช้คู่ที่ 1 ช่วยในการผสมพันธุ์ ส่วนโคโนพอดคู่ที่ 2 (first gonopod: G2) จะมีขนาดเล็ก สำหรับในปูเพศเมียจะมี pleopod 4 คู่ เรียววาวมีขนาดเล็ก ๆ คล้ายขนนก เพื่อให้ไข่ติดรองรับตัวอ่อนด้วย ในปูเพศเมียจะมีลักษณะของส่วนท้องที่เหมือนกัน ในปูจะใช้ลักษณะ G1 เป็นหลักเกณฑ์ในการจำแนกชนิดของปูอีกด้วย 1.อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 (G1) เป็นส่วนที่ช่วยในการสืบพันธุ์ของปูเพศผู้ และ G1 จะอยู่ใต้ส่วนท้อง เมื่อเปิดจับปิ้งออกจะเห็นชัดเจน G1 มีลักษณะแตกต่างกัน จึงใช้ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 เป็นเกณฑ์ในการแยกชนิดของปู 2.อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 2 (G2) มีขนาดเล็กกว่าคู่ที่ 1 มาก และมีลักษณะไม่ค่อยแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนนัก จึงไม่ใช่ลักษณะของอวัยวะคู่ที่ 2 เป็นเกณฑ์ในการแยกชนิดของปู (Pramual, 1990)



ภาพประกอบ 1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของปูวงศ์ Potamidae (วันนิวัติ สุธรรมฤทธิ์, 2563)



ก=dorsal body ข=ventral body ค= third maxilliped ขล=mandibular pals

ง=first gonopod จ=second gonopod ฉ=walking legs ช=chela

ช=male abdomen ฉ=female abdomen

1= upper front

2=epigastric creast

3=post-orbital crest

4=exobital tooth (first teeth)

5=epibranchial teeth (last teeth)

6=cervical groove

7=semi-circular groove

8=H-groove

9=middle groove

10=antero-lateral border

11=postero-lateral border

12=posterior border

13=front border

14=hepatic region

15=branchial region

16=cardiac region

17=gastric region

18=eye

19=coxa

20=basis

21=ischium

22=merus

23=carpus

24=propodus

25=dactylus

26=chela

27=inner spine

28=predistal spine

29=ventral first right gonopod

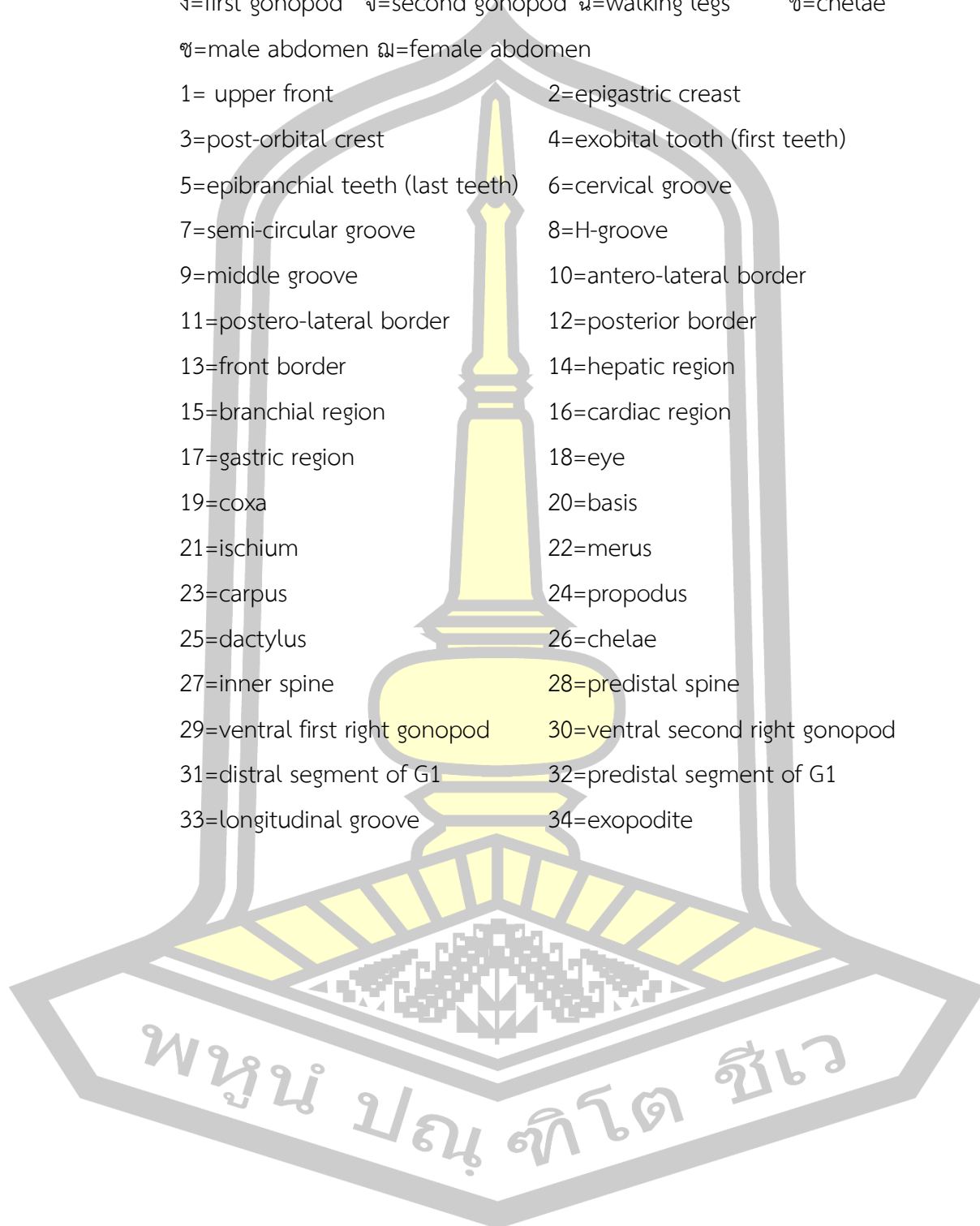
30=ventral second right gonopod

31=distal segment of G1

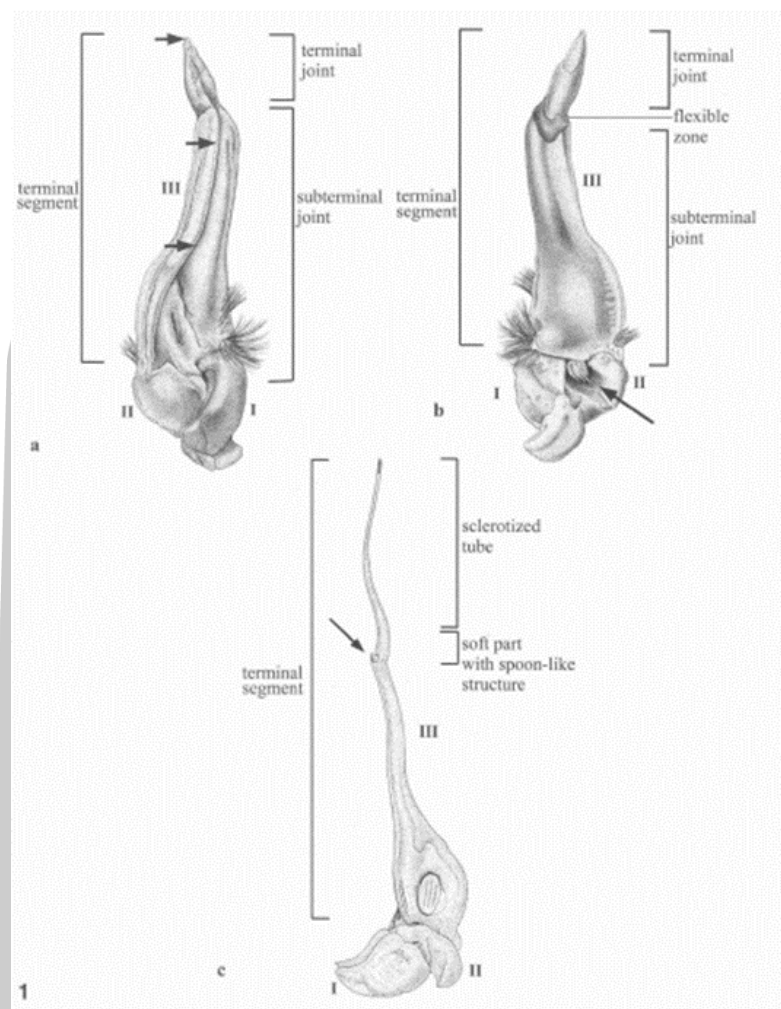
32=predistal segment of G1

33=longitudinal groove

34=exopodite



พหุ ประทีป ชีวะ



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของปูภูเขวงศ์ Potamidae (Brandis, 2000)

a คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ขาคู่ที่ 1 ด้านหน้า (G1)

b คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ขาคู่ที่ 1 ด้านหลัง (G1)

c คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ขาคู่ที่ 2 (G2)

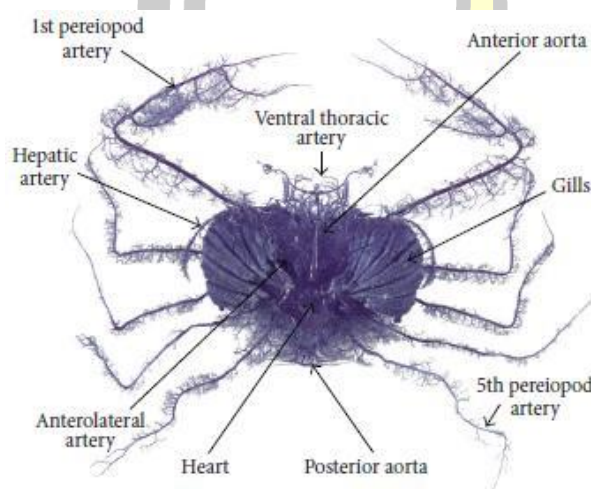
2.1.6 ระบบทางเดินอาหาร (digestive system) โครงสร้างของระบบย่อยอาหารของปูมีส่วนประกอบหลัก 3 อย่าง คือ ปาก (mouth) มีกรงเล็บที่เรียกว่า (chelicera) ที่ช่วยนำอาหารเข้าไปยังบริเวณปาก ภายในปากมีขากรรไกร (jaws) 3 อัน ขากรรไกรอันที่ 1 ทำหน้าที่จับอาหารแล้วส่งต่ออาหารไปยังขากรรไกรอันที่ 2 และ 3 เพื่อฉีกให้เป็นชิ้นเล็กก่อนส่งไปที่หลอดอาหาร (esophagus) ที่สั้นมาก กระเพาะอาหาร (stomach) กระเพาะอาหารของปูมีอวัยวะพิเศษ (appendages) ที่ช่วยบดอาหารโดยใช้แผ่นแข็ง (hard plates) และการบดกระแทกอาหารที่แข็งให้ละเอียดโดยซี่ดี่ (setae) หรือตัวกรอง (filters) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของกระเพาะอาหาร ทำหน้าที่แยกของ

อนุภาคชิ้นอาหารกับของเหลว แล้วอาหารเหล่านั้นไหลผ่านตัวกรองเข้ามายังลำไส้ บริเวณลำไส้จะมีต่อมหลังน้ำย่อย (digestive gland tubules) หรือ ต่อมกลางลำไส้ บริเวณนี้มีเซลล์หลายชนิดที่ทำหน้าที่พิเศษแตกต่างกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น การดูดซึม การหลั่งเอนไซม์ สะสมสาร ที่สามารถที่จะดูดซึมเข้าสู่เส้นเลือดก่อนเข้าสู่ตับหรือตับอ่อน (hepatopancreas) ลำไส้ (intestines) จะทำหน้าที่เพื่อย่อยอาหารต่อย่อยด้วยเอนไซม์ และของเหลวที่ช่วยย่อย เอนไซม์ในการย่อยอาหาร (digestive enzymes) ของครัสตาซี (crustacea) มีความหลากหลาย ตัวอย่างเช่น โปรตีเอส (proteases) ทริปซิน (trypsin) คาร์บอกซิเพปทิเดส (carboxypeptidase) อมิโนเพปทิเดส (aminopeptidases) และโปรเตส (protease) ที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ จากการตรวจสอบข้อมูลพบว่า เอนไซม์ที่มีความสัมพันธ์กับการย่อยไขมัน คือ ไลเปส (lipases) และ เอสเทอเรส (esterases) และมีอะไมเลส (amylases) มอลเทส (maltases) ไคตินเนส (chitinases) เป็นตัวช่วยในการย่อยได้ดีขึ้น เอนไซม์ที่ถูกหลั่งออกมาอาจเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยของสิ่งแวดล้อมภายนอก ดังนั้นกระบวนการหลั่งเอนไซม์ในการย่อยอาหารอยู่ภายใต้การควบคุมด้วยฮอร์โมน (hormones) และสารเคมีอื่น ๆ อาหารที่ไม่ได้ย่อยจะถูกส่งไปยังทวารหนัก (rectum) เพื่อขับถ่าย (Ceccaldi, 1989)

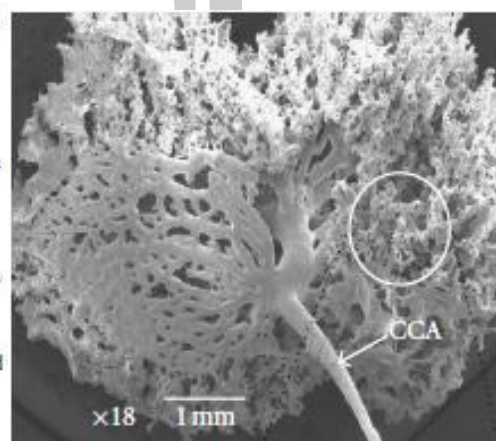
2.1.7 ระบบหมุนเวียนเลือด และแลกเปลี่ยนแก๊ส (circulatory system and gas exchange) ตั้งแต่อดีตนักชีววิทยาได้จัดจำแนกให้มีระบบหมุนเวียนเลือดแบบเปิด (open circulatory system) ซึ่งประกอบด้วยหัวใจห้องกลางห้องเดียว (single-chambered ventricle) มีเลือดเรียกว่า hemolymph โดยเลือดจะถูกสูบฉีดออกจากหัวใจผ่านทางเส้นเลือดอาร์เทอร์รี่ (arteries) ทั้ง 7 เส้น ระบบเลือดอาร์เทอร์รี่ของปูมีทั้งหมด 5 ระบบ (five arterial systems) ระบบการไหลเวียนและหน้าที่ลำเลียงเลือดดังต่อไปนี้ ส่วนเส้นเลือดเอออตาด้านหน้า (anterior aorta) ลำเลียงเลือดไปเลี้ยงตาปู (eyestalks) หนวด (antennae) และปมประสาท (supraesophageal ganglion) ของตัวปู

เส้นเลือดอาร์เทอร์รี่ด้านข้าง (paired anterolateral arteries) 2 เส้น จะทำหน้าที่ลำเลียงเลือดไปเลี้ยงอวัยวะเพศ (gonads) ต่อมขับถ่าย (antennal glands) และด้านหน้าของระบบทางเดินอาหาร (digestive system) เส้นเลือดที่ส่งไปยังตับ (hepatic arteries) แตกแขนงเป็น 2 เส้นเข้าไปยังตับหรือตับอ่อน (hepatopancreas) เส้นเลือดเอออตาด้านหลัง (posterior aorta) เส้นเลือดอาร์เทอร์รี่ที่มีขนาดเล็ก ลำเลียงเลือดไปเลี้ยงช่องท้อง (abdomen) และ ลำไส้ส่วนท้าย (hindgut) เส้นเลือดอาร์เทอร์รี่ส่วนนอก (sternal artery) เป็นเส้นเลือดที่ใหญ่ที่สุด ลำเลียงเลือดออกทางด้านท้อง แล้วแยกออกเป็นสองเส้นเพื่อไปเลี้ยงขา (limbs) ทั้ง 10 ขา และปาก (mouthparts) ในเส้นเลือดอาร์เทอร์รี่มีวาล์ว (valve) ทำหน้าที่เปิดปิดเพื่อควบคุมการไหลเวียนของเลือด เส้นเลือดอาร์เทอร์รี่แต่ละเส้นจะมีเส้นเลือดฝอย (capillary) แตกแขนงให้เล็กลงไปตามเนื้อเยื่ออวัยวะส่วนต่าง ๆ โดยมีแก๊สออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านเนื้อเยื่อโดยตรง ขนส่งสารอาหาร

ไปกับเลือด พร้อมกับรับเอาของเสียจากเซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อขับถ่ายออกนอกร่างกาย ระบบเลือดแบบนี้ทำงานได้ไม่ค่อยดี เนื่องจากแอ่งเลือด (hemolymph bath) เป็นช่องว่างขนาดเล็ก ระหว่างเนื้อเยื่อที่เก็บเลือดที่ไหลมาจากอวัยวะต่าง ๆ เลือดจากโพรงหลังกระดอง (sinuses) จะถูกเก็บไว้ที่ช่องท้อง (ventral thoracic) ได้หัวใจและจะแตกแขนงออกเป็น 5 ช่องทางไปจนสามารถนำเลือดไปฟอกที่บริเวณเหงือก (gill) เพื่อรับแก๊สออกซิเจน เลือด (hemolymph) จะไหลออกทางหลอดเลือดเวน (veins) แล้วไหลย้อนกลับไปท่อน้ำหัวใจ (pericardial sinus via) อีกครั้งหนึ่ง



(ก)



(ข)

ภาพประกอบ 3 (ก) ระบบหมุนเวียนเลือดของปูโดยเทคนิคการกัดเนื้อเยื่อ (ข) ช่องโพรงจุมูกของปู

จากความซับซ้อนของระบบหมุนเวียนเลือดของปู ทำให้มีการศึกษามากขึ้นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าช่องโพรงจุมูกหลังกระดอง (sinus) ไม่ได้เป็นช่องว่างเปิดโล่งเหมือนข้อมูลในอดีต แต่เป็นโครงสร้างที่มีความเป็นระเบียบ และแยกออกจากโพรงร่างกาย (body cavity) อย่างชัดเจน การค้นพบนี้ทำให้นักวิจัยสรุปได้ว่าปูมีระบบหมุนเวียนเลือดแบบผสมซึ่งถูกเรียกว่าระบบหมุนเวียนเลือดแบบเปิดไม่สมบูรณ์ (incompletely opened circulatory system) (Reiber and McGaw, 2009) (ภาพประกอบ 3)

2.1.8 ระบบขับถ่าย (Excretory system) เนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ของปู มีส่วนช่วยในการขับถ่ายของเสียที่เกิดจากการเผาผลาญ และปูยังมีอวัยวะหลักในการขับถ่ายเรียกว่า ต่อมแอนเทนนัล (antennal gland) อยู่บริเวณช่องว่างกลางลำตัว (coelom) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อชั้นกลางบริเวณท้อง (mesodermal coelomic sacculus) และ มีท่อไตขนาดเล็กที่ติดกับเนื้อเยื่อชั้นนอก (ectodermal nephridial canaliculus) ท่อไตส่วนต้นจะแตกแขนงเล็กลงเรียกว่า เนโฟสโตม (nephrostome) ซึ่งก็จะทำหน้าที่รับและกรองของเสียจากเลือด ส่วนท่อไตส่วนท้ายมีลักษณะเป็นท่อ

กว้างทำหน้าที่เป็นถุงเก็บของเสีย (collector bladder) ที่ผ่านการกรอง ของเสียเหล่านี้จะถูกส่งออกไปยังช่องเปิดที่ใช้ในการขับถ่าย (nephropore) ที่อยู่บริเวณฐานของหนวด (antenna)

2.1.9 ระบบประสาท (Nervous System) ระบบประสาทของปูไม่มีสี เป็นเรื่องยากที่จะมองเห็นด้วยตาเปล่า การศึกษาระบบประสาทในปูจึงต้องแช่เอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้บริเวณเส้นประสาทซึ่งจะกลายเป็นสีขาวขุ่น ระบบประสาทของปูประกอบด้วยสมอง (brain) และปมประสาท (ganglion) สมองจะอยู่บริเวณด้านหลังส่วนท้าย (dorsal posterior) ของกระดองไปจนถึงบริเวณปาก และอยู่ระหว่างด้วยตาทั้งสองข้าง (eyestalks) บริเวณนั้นจะมีเส้นประสาทตา (optic nerves) ซึ่งเป็นตาประกอบ (compound eye) และเส้นประสาทนี้ยังเชื่อมต่อไปยังหนวดทั้งสองข้างอีกด้วย ปมประสาทวงกลม (circum-esophageal) ขนาดใหญ่ 2 เส้นเชื่อมต่อกับสมอง วงรอบหลอดอาหาร (esophagus) แล้วต่อไปรวมกับปมประสาทส่วนอก (thoracic ganglion) และส่วนท้อง เส้นประสาททั้งสองเส้นแตกแขนงออกเป็นเส้นประสาทย่อยมากมายไปยังร่างกายต่างแต่ละขาของร่างกาย ปมประสาทส่วนอกยังเชื่อมต่อกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และกล้ามเนื้อ และยังเชื่อมต่อไปยังส่วนกระดอง (carapace) ทั้งสองข้างส่วนอก และส่วนท้อง จะเห็นว่าเส้นประสาทตาที่เชื่อมต่อกันทำให้ตาทั้งสองข้างของปูทำงานและเคลื่อนไหวอย่างพร้อมเพรียงกันเพื่อการตอบสนองต่อสิ่งเร้าในการมองเห็น

2.1.10 การสืบพันธุ์และวงจรชีวิต ปูมีเพศแยกและมีการผสมแบบภายใน สามารถดูได้จากลักษณะภายนอกที่แสดงออกแตกต่างกันในแต่ละเพศ (sexual dimorphism) ท้องของปูเพศผู้ (male abdomen) จะมีลักษณะที่แคบต่างจากส่วนท้องของตัวเมียที่จะกว้างกว่า (Davey, 2000) ปูเพศผู้จะมีอวัยวะเป็นอวัยวะคู่ อยู่ใต้กระดองและอยู่เหนือตับ อวัยวะทั้งคู่จะถูกยึดไว้ด้วยกัน ท่อนำน้ำอสุจิเป็นท่อสีขาวบาง ๆ ขดอยู่ 1 คู่ใต้หัวใจ ส่วนที่สะสม sperm จะพองออกเป็นท่อใหญ่ โกลโนพอดอันแรกเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ถ่าย sperm เข้าสู่ตัวเมีย ปูเพศเมียจะมีรังไข่ 2 พูยึดกับกระดองด้านใน และอยู่เหนือตับภายในรังไข่มีไข่อ่อนสีเหลืองเข้มจำนวนมาก นอกจากนี้จะมีถุงเก็บ sperm ส่วนช่องอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียอยู่ที่ขอบบนด้านในของท้องปล้องที่ 3 ส่วนท้องมีลักษณะโป่งออกมาเล็กน้อย มีอยู่ 1 คู่ ในฤดูผสมพันธุ์ ปูเพศผู้และปูเพศเมียจะจับคู่กัน ปูเพศเมียสามารถเก็บเซลล์สืบพันธุ์ของปูเพศผู้ (sperm) ไว้จนกว่าไข่ (eggs) จะพัฒนาเต็มที่ เมื่อไข่พัฒนาเต็มที่แล้ว เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เก็บไว้จะถูกปล่อยออกมาแล้วปฏิสนธิ (fertilization) กับไข่ ปูเพศเมียจะอุ้มไข่ที่ถูกปฏิสนธิแล้วไว้ตรงบริเวณหน้าท้อง (abdominal flap) ประมาณ 3 - 5 สัปดาห์ และตัวปู เมื่อเอ็มบริโอ (embryo) ค่อย ๆ เจริญและพัฒนาตัวอ่อน (zoea larvae) ประมาณ 2 - 3 สัปดาห์ ปูจะใช้ก้ามเขี่ยตัวอ่อนให้หลุดออกจากตัว ตัวอ่อนจะถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำและหาอาหารกินเองตามธรรมชาติ ในกรณีที่สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมการนำตัวอ่อนออกจากตัวปู ปูอาจเลื่อนเวลาออกไปนานถึง 2 เดือน รูปร่างของตัวอ่อนปูจะค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงเป็นระยะเมกาลอพ (megalops) ปูวัยรุ่น

(juvenile) และตัวเต็มวัย (mature) ตามลำดับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระหว่างการเจริญเติบโต เรียกว่า metamorphosis ธรรมชาติของปูทุกชนิด จำเป็นต้องอาศัยแหล่งน้ำในการขยายพันธุ์โดยการวางไข่ในน้ำหรือใกล้แหล่งน้ำ เพราะตัวอ่อนของปูต้องอาศัยน้ำในการเจริญเติบโต (สมพร ภูริพงศ์ และสมโภชน์ อัคระทวีวัฒน์, 2540)

ปูน้ำจืดมีการเจริญเติบโตแบบเปลี่ยนแปลงช้า ๆ (gradual metamorphosis) โดยการลอกคราบกระดองเก่าออก จะทำให้โครงสร้างภายนอกมีลักษณะนิ่ม (soft shell crab) กระดองของปูจะนิ่มโปร่งใส และนุ่มกว่ากระดองปูปกติ หลังจากการลอกคราบจะมีของเหลวภายในไหลอย่างอิสระในลำตัวปริมาณมาก (free body fluid) ลำดับขั้นตอนการลอกคราบสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้ คือ 1. ก่อนลอกคราบ (pre-molt) 2. ระยะลอกคราบ (molting) 3. ระยะหลังลอกคราบ (post-molt) ระยะเวลาที่ปูลอกคราบจนกระทั่งสร้างกระดองใหม่จะใช้เวลาประมาณ 3 - 4 ชั่วโมง กระดองจะเริ่มแข็งตัวขึ้น และจะแข็งแรงสมบูรณ์เต็มที่ภายในระยะเวลาประมาณ 7 วัน เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการลอกคราบของปู ปูจะเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ภายในกระดองใหม่ และเมื่อถึงระยะที่ปูมีการเจริญเติบโตเต็มที่ภายใต้กระดองใหม่ที่ถูกรังใหม่ ปูจะเริ่มเข้าสู่วงจรการลอกคราบอีกครั้ง โดยปกติปูที่โตเต็มวัยจะลอกคราบประมาณเดือนละ 1 ครั้ง เมื่อปูลอกคราบแล้วจะดูดซึมแร่ธาตุต่าง ๆ เข้าไปเพื่อช่วยให้กระดองแข็งตัว โดยกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในน้ำ แล้วใช้ระยะเวลา 2 - 4 วัน เพื่อให้กระดองแข็งเต็มที่ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2554) กระดองของปูประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ ชั้นนอกสุดเป็นชั้น epicuticle ซึ่งเป็นชั้นบางที่ยึดหยุ่นได้ เพราะประกอบด้วยสารซีลิ่ง และ cuticulin นอกจากนี้ยังมีสารพวก lipoprotein รวมอยู่ด้วย ส่วนชั้นกลางเป็นชั้นของไคติน ชั้นนอก ซึ่งประกอบด้วยสารพวก chitin, cuticulin ชั้นในสุดเป็นชั้นไคตินชั้นใน ซึ่งประกอบด้วยสารไคติน และโปรตีนส่วนชั้นผิวอยู่ข้างใต้กระดองเป็นชั้นที่มีเซลล์แถวเดียว และมีขนจำนวนมากยื่นเข้าไปในชั้นไคติน

พฤติกรรมการกินอาหารของปู ปูใช้ระยางค์คู่แรกซึ่งมีลักษณะเป็นก้ามหนีบ จับอาหารเข้าปาก และใช้แมกซิลลิเพดซึ่งเป็นระยางค์ที่ช่วยในการกินอาหารที่อยู่เหนือปากอีก 3 คู่ช่วยส่งอาหารเข้าปากและยึดอาหารไว้ นอกจากนี้ยังมีแมกซิลล่า (maxillae) ซึ่งเป็นระยางค์ที่อยู่รอบปากอีก 2 คู่ ช่วยผลักอาหารเข้าปาก ด้านในสุดมีแมนดิเบิล (mandibles) ซึ่งเป็นระยางค์ปากคู่ที่สาม 1 คู่ใช้กัดอาหารให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ (วิยะดา สีหบุตร, 2526) ปูกินอาหารได้หลายอย่าง ตั้งแต่สารอินทรีย์ในดินจนกระทั่งสัตว์และพืชที่ตายแล้วหรือพืชและสัตว์ชนิดต่าง ๆ ที่มีขนาดเล็ก ได้แก่ ไรน้ำ ลูกน้ำ กุ้ง และลูกปลาขนาดเล็ก เป็นต้น นอกจากนั้นปูเป็นสัตว์ที่กินพวกเดียวกัน (cannibalism) โดยปูจะกินตัวที่มีขนาดเล็กกว่า หรือขณะกำลังลอกคราบ หรือเพิ่งลอกคราบใหม่ ๆ ซึ่งกระดองยังนิ่มอยู่และมีการเคลื่อนไหวช้า สำหรับพืชที่เป็นอาหารของปูได้แก่ ต้นหญ้าต่าง ๆ และต้นข้าวที่ยังมีอายุน้อย โดยก่อกินเฉพาะลำต้นที่อ่อนและอวบน้ำ (ชาคริต จุลกะเสวี, 2533)

การสลัดขาทั้ง การสลัดขาทั้งของปู เมื่อขาเดินของปูได้รับบาดเจ็บเนื่องจากกล้ามเนื้อขาถูกดึงขึ้นอย่างแรง มันจะสลัดขาทั้งไปทันทีและขาหักหลุดออกตรงบริเวณรอยต่อระหว่างข้อ basis และ ischium ของขา บริเวณที่ขาหลุดออกมีลักษณะเป็นวงและมีแผ่นหินปูนบาง ๆ ปิดอยู่ และในการสลัดขานี้ไม่มีการเสียเลือดเกิดขึ้น เมื่อมีการลอกคราบขาที่หลุดไปจะถูกสร้างขึ้นใหม่ แต่มีขนาดสั้นกว่าเดิม ต่อมาเมื่อมีการลอกคราบเกิดขึ้นอีกหลายครั้งจะทำให้ขานั้นมีขนาดยาวเท่าเดิม บทบาทของปูน้ำจืดในระบบนิเวศ

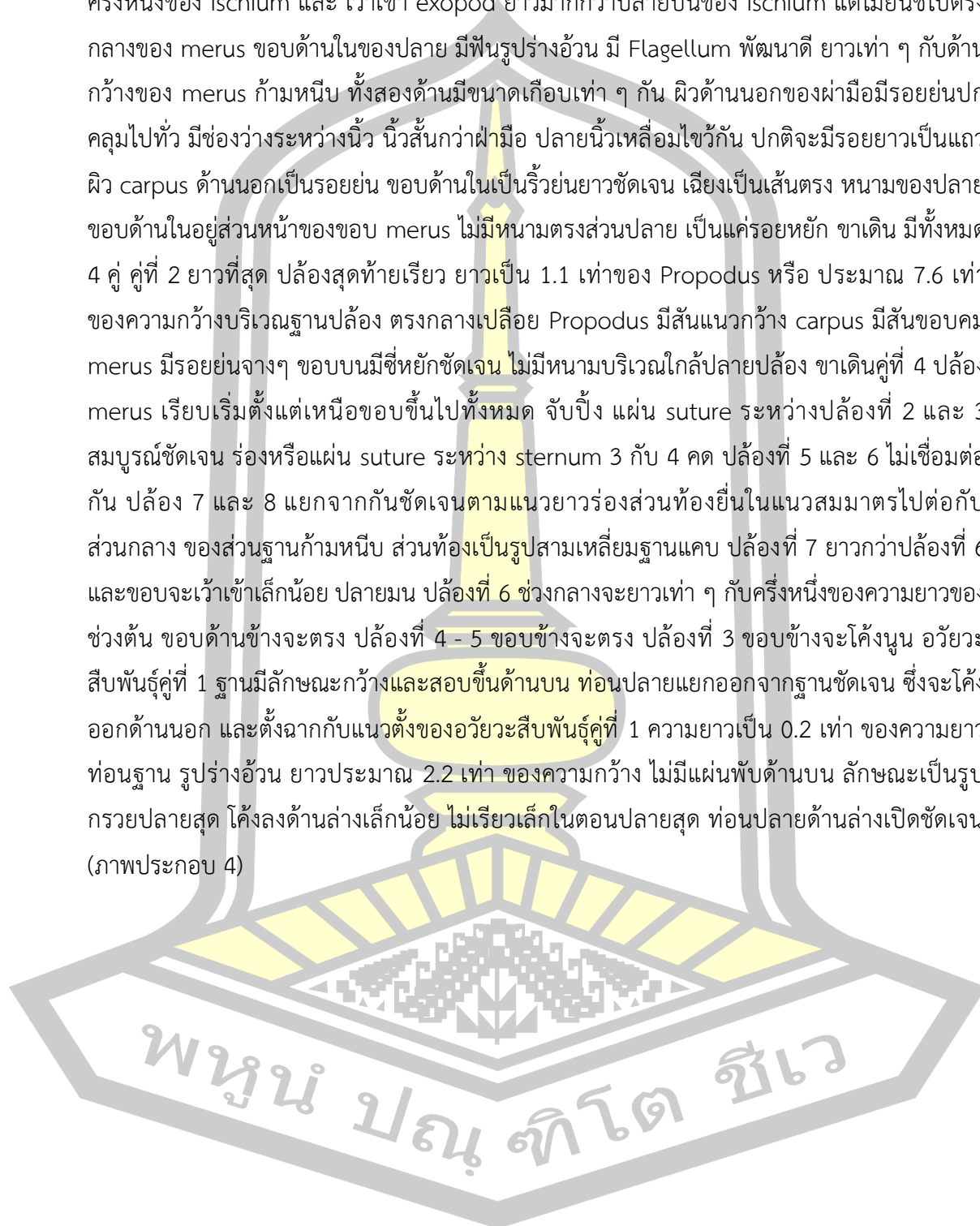
ปูน้ำจืดมีพฤติกรรมอาศัยอยู่ตามพื้นดินบริเวณชายฝั่งป่า หรือตามป่าโปร่งที่มีแหล่งน้ำอยู่ไม่ห่างไกลมากนัก เนื่องจากน้ำเป็นปัจจัยหลักในการดำรงชีวิตของปูน้ำจืด เพราะปูจะอาศัยน้ำในการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ในการดำรงชีวิตไม่ว่าจะเป็นการหายใจ การลอกคราบ หรือการจับคู่ผสมพันธุ์ ในรอบปีหนึ่งๆ ปูจะออกมาใช้ชีวิตภายนอกโดยเฉพาะในช่วงฤดูฝน ส่วนในฤดูแล้งจะอาศัยอยู่ในรูโดยจะใช้เพียงอาหารที่เก็บสะสมอยู่ในรูปของไขมันร่างกายเท่านั้น ด้วยพฤติกรรมต่าง ๆ เหล่านี้ ทำให้บทบาทของปูน้ำจืดในระบบนิเวศมีผลดีอย่างมากมายทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น รูของปูที่มีขนาดลึกจะเป็นช่องทางในการเก็บกักน้ำไว้ให้ต้นไม้เป็นการชะลอกระแสน้ำไม่ให้ไหลเร็วเกินไป รูของปูยังช่วยเพิ่มอากาศและออกซิเจนให้บริเวณรอบ ๆ นอกจากนี้การขุดรูและการขบถ่ายรวมทั้งการนำอาหารเข้าไปในรูยังช่วยเพิ่มและหมุนเวียนธาตุอินทรีย์ให้กับดินบริเวณนั้นอีกด้วย และปูยังช่วยกำจัดปริมาณของซากใบไม้และเร่งการย่อยสลายของซากเหล่านั้นให้รวดเร็วขึ้นอีกด้วย ขณะเดียวกันก็ควบคุมจำนวนของสัตว์หน้าดิน เช่น แมลงสาบป่า สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกขนาดเล็ก เป็นต้น (สัญญา ศุภจันทร์, 2545)

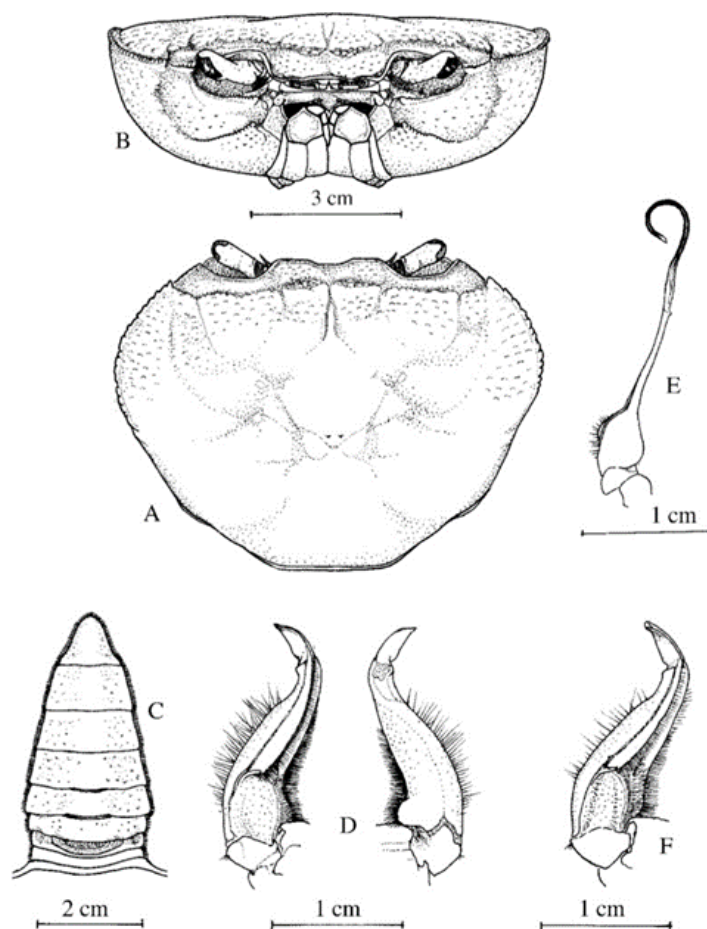
2.2 ปูภูเขา *Potamidae*

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของปูภูเขา

กระดอง มีความกว้างมากกว่าความยาว ผิวด้านหลังเรียบ มี cervical grooves เด่นชัด และขยายตัวก่อนถึงปลายด้านข้างของ post orbital cristae H-groove เป็นแอ่งชัดเจน epigastric crest พัฒนาดีไม่คม เป็นริ้วยื่น มีร่องรูปตัว V หรือ middle groove แบ่งชัดเจน antero-lateral แยกออกจาก post-orbital cristae อย่างชัดเจน post-orbital cristae พัฒนาได้ดี มีลักษณะตรงมีคมและรอยย่นเล็กน้อย และไม่รวมกันกับฟัน epibranchial tooth ผิวมีเม็ดนูนเล็ก ๆ และรอยย่นไปจนถึงฟัน epibranchial tooth ด้านหลังของ epigastric and postorbital cristae มีรอยย่นชัดเจน ขอบด้านหน้าตรงมีเหลี่ยมเล็กน้อย ผิวด้านหลังมีเม็ดนูนเล็ก ๆ ฟันข้างเข้าตาแต่เป็นรูปสามเหลี่ยมเด่นชัด และมีรอยบาก แยกออกจากมุมเข้าตาภายนอกอย่างชัดเจน ขอบ antero-lateral โค้งเป็นรอยหยักฟันปลาและเป็นขอบสันเด่นชัด ขอบ posterior lateral ตรง และบรรจบที่ขอบ posterior อย่างไม่ชัดเจน อวัยวะช่วยกิน ส่วน ischium ของอวัยวะช่วยกินอาหารเป็นรูป

สามเหลี่ยมมุมฉากยาว 1.6 เท่า ของด้านกว้าง พัฒนาติ merus เป็นรูปจัตุรัสยาวเท่า ๆ กันกับ ครึ่งหนึ่งของ ischium และ เวก้าเข้า exopod ยาวมากกว่าปลายบนของ ischium แต่ไม่ยื่นขึ้นไปตรง กลางของ merus ขอบด้านในของปลาย มีฟันรูปร่างอ้วน มี Flagellum พัฒนาติ ยาวเท่า ๆ กับด้าน กว้างของ merus ก้ามหนีบ ทั้งสองด้านมีขนาดเกือบเท่า ๆ กัน ผิวด้านนอกของฝ่ามือมีรอยย่นปก คลุมไปทั่ว มีช่องว่างระหว่างนิ้ว นิ้วสั้นกว่าฝ่ามือ ปลายนิ้วแหลมไขว้กัน ปกติจะมีรอยยาวเป็นแถว ผิว carpus ด้านนอกเป็นรอยย่น ขอบด้านในเป็นริ้วย่นยาวชัดเจน เฉียงเป็นเส้นตรง หนามของปลาย ขอบด้านในอยู่ส่วนหน้าของขอบ merus ไม่มีหนามตรงส่วนปลาย เป็นแค່รอยหยัก ขาเดิน มีทั้งหมด 4 คู่ คู่ที่ 2 ยาวที่สุด ปล้องสุดท้ายเรียว ยาวเป็น 1.1 เท่าของ Propodus หรือ ประมาณ 7.6 เท่า ของความกว้างบริเวณฐานปล้อง ตรงกลางเปลือก Propodus มีสันแนวกว้าง carpus มีสันขอบคม merus มีรอยย่นจางๆ ขอบบนมีซี่หยักชัดเจน ไม่มีหนามบริเวณใกล้ปลายปล้อง ขาเดินคู่ที่ 4 ปล้อง merus เรียบเริ่มตั้งแต่เหนือขอบขึ้นไปทั้งหมด จับปิ้ง แผ่น suture ระหว่างปล้องที่ 2 และ 3 สมบูรณ์ชัดเจน ร่องหรือแผ่น suture ระหว่าง sternum 3 กับ 4 คด ปล้องที่ 5 และ 6 ไม่เชื่อมต่อกัน ปล้อง 7 และ 8 แยกจากกันชัดเจนตามแนวยาวร่องส่วนท้องยื่นในแนวสมมาตรไปต่อกับ ส่วนกลาง ของส่วนฐานก้ามหนีบ ส่วนท้องเป็นรูปสามเหลี่ยมฐานแคบ ปล้องที่ 7 ยาวกว่าปล้องที่ 6 และขอบจะเว้าเข้าเล็กน้อย ปลายมน ปล้องที่ 6 ช่วงกลางจะยาวเท่า ๆ กับครึ่งหนึ่งของความยาวของ ช่วงต้น ขอบด้านข้างจะตรง ปล้องที่ 4 - 5 ขอบข้างจะตรง ปล้องที่ 3 ขอบข้างจะโค้งนูน อวัยวะ สืบพันธุ์คู่ที่ 1 ฐานมีลักษณะกว้างและสอบขึ้นด้านบน ท่อนปลายแยกออกจากฐานชัดเจน ซึ่งจะโค้ง ออกด้านนอก และตั้งฉากกับแนวตั้งของอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ความยาวเป็น 0.2 เท่า ของความยาว ท่อนฐาน รูปร่างอ้วน ยาวประมาณ 2.2 เท่า ของความกว้าง ไม่มีแผ่นพับด้านบน ลักษณะเป็นรูป กรวยปลายสุด โค้งลงด้านล่างเล็กน้อย ไม่เรียวเล็กในตอนปลายสุด ท่อนปลายด้านล่างเปิดชัดเจน (ภาพประกอบ 4)





ภาพประกอบ 4 ลักษณะที่สำคัญของปูภูเขา (*Indochinamon bhumibol*) (Yeo & Naiyanetr, 2000)

A= dorsal carapace B= frontal carapace
C= male abdomen D= G1
E= G2 F= G1

2.2.2 บทบาทสำคัญในระบบนิเวศของปูภูเขา

ปูภูเขาเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ ช่วยในการกำจัดและเร่งการย่อยสลายของซากพืชซากสัตว์ และยังมีส่วนช่วยควบคุมจำนวนของสัตว์หน้าดิน เช่น แมลงสาบป่า สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกขนาดเล็กได้อีกด้วย (สัญญา ศุภจันทร์, 2545) หากปูภูเขาถูกคุกคามจนหายไปจากระบบนิเวศ จะทำให้โครงสร้างของสายใยอาหารและสังคมสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงไป ปูภูเขาเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถบ่งชี้ (indicator species) ความสะอาดของแหล่งน้ำ เนื่องจากต้องการน้ำสะอาดในการดำรงชีวิต เช่น การหายใจผ่านเหงือกโดยได้รับออกซิเจนจากน้ำ

การลอกคราบของปูเพื่อเพิ่มขนาดตัวใหญ่ขึ้น ปูภูเขาอาศัยหลบซ่อนตามซอกหรือใต้ก้อนหิน ตามลำธารหรือน้ำตกบริเวณที่เงียบสงบ บริเวณลำห้วยหรือริมฝั่งลำธารที่มีกระแสน้ำไหลไม่แรง หรือขุดรูอยู่สองฝั่งลำธารความลึกประมาณ 0.5 - 1 เมตรพบว่าบริเวณต้นน้ำที่สะอาดบนภูเขา เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของปูภูเขาและพบปูภูเขาขนาดใหญ่กว่าบริเวณลำธารที่อยู่ระดับต่ำลงมา หรือลำธารที่ติดกับพื้นที่เกษตรกรรมและชุมชน โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นน้ำตกซึ่งมีน้ำไหลตลอดเวลาในฤดูกาลที่มีน้ำมาก การไหลของน้ำตามระดับความสูงต่ำของแหล่งน้ำบนภูเขาที่มีความสูงต่างระดับกัน ทำให้ปริมาณออกซิเจนในแหล่งน้ำสูงกว่าแหล่งน้ำนิ่ง ช่วงกลางวันปูภูเขา มักอาศัยหลบซ่อนตามซอกหิน หรือขุดรูอยู่ในดิน ช่วงกลางคืนเป็นช่วงที่ปลอดภัยในการออกมาหากินจึงพบปูภูเขาออกมาหากินในเวลากลางคืนเป็นจำนวนมาก ปูภูเขาสามารถกินเศษซากพืช และซากสัตว์ที่ตายแล้ว หรือสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่แต่เป็นสัตว์ขนาดเล็กที่อาศัยในแหล่งน้ำธรรมชาติ อาหารของปูภูเขาตามห่วงโซ่อาหารในธรรมชาติ เช่น ตัวอ่อนของปลา ไรน้ำ หอย กุ้ง เป็นต้น (ศิริภรณ์ ศรีโพธิ์, 2562) คุณสมบัติทางเคมีของแหล่งน้ำธรรมชาติที่พบปูภูเขาอาศัยอยู่ ได้แก่ ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO 6-7 ppm.) ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH 7.13-7.94) และค่าทางเคมีของแหล่งน้ำธรรมชาติ

2.2.3 ประโยชน์ของปูภูเขา

ปูภูเขามีความสำคัญกับการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม ปูภูเขาเป็นส่วนหนึ่งของห่วงโซ่อาหารที่สำคัญของสัตว์ป่า เป็นผู้ย่อยสลายซากพืชและสัตว์ และยังช่วยสร้างความสมดุลให้กับระบบนิเวศป่าอีกด้วย ปูภูเขาเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของคนชนบท นิยมนำมาบริโภคซึ่งสามารถประกอบอาหารได้หลากหลาย เช่น ปูดอง ปูนึ่ง แกงอ่อมปู ปูย่าง อื่น ๆ อีกหลายเมนู และยังเป็นแหล่งรายได้ที่สำคัญของคนในท้องถิ่นอีกด้วย เปลือกหรือกระดองของปูมีสารไคติน หรือ ไคโตซาน ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลาย ไคติน หรือ poly (β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine) คือสารสำคัญที่พบในโครงร่างแข็งภายนอก (exoskeleton) ของสัตว์ข้อปล้อง (arthropods) ผนังเซลล์ของเห็ดรา (fungi) และยีสต์ (yeasts) สามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ไม่เป็นพิษ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างรวดเร็ว ไคโตซานได้รับความสนใจอย่างมากในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านอาหารและยานักวิจัยหลายคนกล่าวว่าไคโตซานเป็นแหล่งวัสดุทางชีวภาพที่มีศักยภาพสูง (Ramya *et al.*, 2012) แหล่งของสารไคตินที่ถูกนำมาใช้ในด้านเชิงพาณิชย์ได้มาจากการใช้เปลือกกุ้ง และปู ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ ได้แก่ ด้านอาหาร ไคโตซานมีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิดโดยมีกลไก คือ ไคโตซานมีประจุบวกสามารถจับกับเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบได้ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนและสารอื่นของเซลล์ ในหลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคตินและไคโตซานให้เป็นสารที่ใช้เติมในอาหารได้ โดยนำไปใช้เป็นสารกันบูด สารช่วยรักษากลิ่น รส และสารให้ความชื้น

ใช้เป็นสารเคลือบอาหาร ผัก และผลไม้ เพื่อรักษาความสดหรือผลิตในรูปของฟิล์มที่รับประทานได้ (edible film) สำหรับบรรจุอาหาร

ด้านอาหารเสริมโคโตซานช่วยลดคอเลสเตอรอล และไขมันในเส้นเลือดโดยโคโตซานไปจับกับคอเลสเตอรอล ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมไปใช้หรือดูดซึมได้น้อยลง จึงมีการโฆษณาเป็นผลิตภัณฑ์ลดน้ำหนัก ทั้งนี้ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากโคโตซานสามารถจับกับวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน (วิตามิน A D E K) อาจทำให้ขาดวิตามินเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ทางการแพทย์ มีรายงานการนำ N-acetyl-D-glucosamine ไปใช้ในการรักษาไขข้อเสื่อม โดยอธิบายว่า ไขข้อเสื่อมเกิดเนื่องจากการสึกกร่อนของเนื้อเยื่ออ่อนที่เคลือบอยู่ระหว่างข้อกระดูก ซึ่ง glucosamine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ proteoglycan และ matrix ของกระดูกอ่อน จึงช่วยให้เยื่อหุ้มกระดูกอ่อนหนาขึ้นได้ ด้านการเกษตร โคโตซานถูกผลิตเพื่อเป็นส่วนผสมของปุ๋ยเร่งการเจริญเติบโตของพืช การควบคุมเชื้อรา และการยับยั้งโรคในพืชหลายชนิด (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2551) และทำเป็นสารเคลือบหรือฟิล์มเคลือบอาหาร และผักผลไม้ให้เก็บไว้ได้นาน (วรรณรัตน์ อุ่นสนธิ และคณะ, 2547) ด้านอุตสาหกรรม และวัสดุ เช่น วัสดุบรรจุหีบห่อ (Younes and Rinaudo, 2015) ผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) ที่สามารถย่อยสลายได้ (Fernandez and Ingber, 2014) การบำบัดน้ำเสียและการดูดซับโลหะหนักประเภททองแดงและแคดเมียม (ทิพย์วิมล เกิดอิม และ สวบทิพย์ พงศ์สถานบติ, 2547) โคโตซานสามารถดูดซับสีแอสิด (acid dyes) สีรีแอคทีฟ (reactive dyes) และสีไดเร็ค (direct dyes) (รัตนา รุจิรวนิช, 2543) ด้านการแพทย์ โคโตซานถูกเตรียมไฮโดเจน (hydrogens) ฟิล์ม (films) ไฟเบอร์ (fibers) แล้วถูกนำไปใช้ในการผลิตยา และวัสดุทางการแพทย์อื่น ๆ เช่น วัสดุห่อยา ฟิล์มชีวภาพ (biofilm) ที่ช่วยรักษาแผลและต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย สารยึดเกาะไขมัน สารห้ามการไหลของเลือด ยาที่มีฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอล (Ramya *et al.*, 2012) ด้านผลิตภัณฑ์กระดาษและสิ่งทอ สามารถนำไปใช้ผลิตไส้กรอง สำหรับกรองน้ำและกรองอากาศหรือใช้ทำบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพใช้เป็นส่วนผสมในสิ่งทอเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลิ่นและเชื้อราที่ทำให้เกิดอาการผื่นคัน เป็นต้น

2.2.4 ปัจจัยคุกคามต่อประชากรปูภูเขา

จากการประเมินสถานภาพสิ่งมีชีวิตทั่วโลกโดยองค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature) หรือ IUCN ปี พ.ศ. 2551 ระบุว่า ปูภูเขาหลายชนิดมีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ (endangered) เนื่องจากมีขอบเขตการกระจายพันธุ์ที่จำกัดทรัพยากรป่าไม้ที่ลดลง และขาดข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนประชากร (Esser *et al.*, 2015) ป่าไม้ คือทรัพยากรที่สำคัญต่อการเกิดแหล่งน้ำที่เป็นแหล่งที่ของสัตว์ป่า ซึ่งปูภูเขาอาศัยอยู่ในน้ำสะอาดบนพื้นที่สูง โดยปูได้รับออกซิเจนจากน้ำเพื่อหายใจผ่านทางเหงือก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศทั้งในเชิงคุณภาพ และปริมาณอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของปูได้

(Silpsoonthom and Wattanatongchai, 2016) ปัจจุบันชาวบ้านมีการตัดไม้และถากปาเพื่อใช้เป็นพื้นที่เกษตรกรรมส่งผลให้พื้นที่ป่าซึ่งเป็นแหล่งต้นน้ำลดลง และกระทบต่อแหล่งที่อยู่อาศัยของปู ทำให้จำนวนประชากรของปูลดลงไปด้วย ประกอบกับการทำเกษตรกรรมโดยรอบพื้นที่อนุรักษ์แบบมีการใช้สารเคมี โดยสารเคมีมีโอกาสสะสมในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งสภาพดังกล่าวไม่เป็นผลดีต่อการอยู่อาศัยและขยายพันธุ์ของปู ปูภูเขาเป็นสัตว์ชนิดหนึ่งที่คนในท้องถิ่นนิยมนำมาประกอบอาหารและบริโภค โดยเฉพาะฤดูการวางไข่ช่วงเดือน พฤศจิกายน - มกราคม ประกอบกับการนำปูมาวางขายในตลาดท้องถิ่นเพื่อสร้างรายได้ (ภาพประกอบ 5) เทคนิคการจับปูของชาวบ้านจะใช้อุปกรณ์ดักจับปู ซึ่งมีชื่อท้องถิ่นที่เรียกว่า อีจู้ ใช้ในการดักจับปูหิน ซึ่งจะใช้น้ำไก่ ซีโครงไก่สด หรือปลาเป็นเหยื่อล่อ แล้วตั้งทิ้งไว้บริเวณลำห้วย หรือน้ำตก และบริเวณน้ำไหลผ่านที่ปูอยู่อาศัย



ภาพประกอบ 5 ปูหินที่ถูกวางขายในตลาดอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย (วันวิภา ธรรมฤทธิ์, 2563)

2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขาวงศ์ *Potamidae*

สิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ บนโลกมีลักษณะที่แตกต่างกันของแต่ละชนิด ซึ่งลูกจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับพ่อแม่ นักวิทยาศาสตร์ได้มีการหาคำตอบของปรากฏการณ์นี้เป็นระยะเวลายาวนาน ซึ่งลักษณะที่ถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูกหลานถูกเรียกว่า ลักษณะทางพันธุกรรม (heredity) ซึ่งเกิดจากการถ่ายทอด สารพันธุกรรม (genetic material) ที่อยู่ในเซลล์สืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โครงสร้างของสารพันธุกรรมเกิดจากกรดนิวคลีอิกต่อกันเป็นพอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) สายยาว แต่

ละนิวคลีโอไทด์มี 3 องค์ประกอบ คือ น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 โมเลกุล (pentose sugar) กลุ่มฟอสเฟส (phosphate group) และเบสที่มีไนโตรเจน (nitrogenous base) กรดนิวคลีอิกมี 2 ชนิด คือ กรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) หรือ อาร์เอ็นเอ (RNA) และ กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid) หรือดีเอ็นเอ (DNA) (दारुंग กังวานพงศ์ และคณะ, 2546)

ดีเอ็นเอ (DNA) คือ สารพันธุกรรมที่ถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมมาจากบรรพบุรุษ ดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) โดยดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่งเพิ่มจำนวนตัวเองเป็นสอง เพื่อแบ่งไปยังเซลล์ลูกที่เกิดใหม่ กระบวนการนี้จะดำเนินไปด้วยความแม่นยำ หากเกิดข้อผิดพลาดขึ้นก็จะมีโอกาสแก้ไข โดยการตรวจสอบภายในเซลล์ก่อนที่จะมีการส่งถ่ายไปยังลูก นอกจากนี้ข้อมูลทางพันธุกรรมต้องมีการแสดงออกเพื่อให้เกิดเป็นฟีโนไทป์ (phenotype) โดยอาศัยกระบวนการถอดรหัสจากดีเอ็นเอกลายเป็นอาร์เอ็นเอ (transcription) แล้วจึงแปลรหัสจาก อาร์เอ็นเอเป็นโปรตีน (translation) นอกจากการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอแล้วยังมีกระบวนการซ่อมแซม (DNA repair) และการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) (จุนทร ปิยะโชคณากุล, 2539) ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่บรรจุข้อมูลและรหัสทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเพื่อสร้างองค์ประกอบต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต และเป็นตัวควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ ดีเอ็นเอเป็นรหัสเฉพาะตัว จะมีความแตกต่างกันออกไปมากบ้างน้อยบ้างแล้วแต่สายพันธุ์ สามารถถ่ายทอดข้อมูลจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งหรือรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้ การถ่ายทอดข้อมูลเกิดจากการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอจาก 1 โมเลกุลเป็น 2 โมเลกุลที่มีลำดับเบสเหมือนกันในขณะที่มีการแบ่งเซลล์ เรียกว่าการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) แล้วจึงมีการเปลี่ยนรหัสจากอาร์เอ็นเอเป็นกรดอะมิโน ในที่สุดจะได้สารโพลีเปปไทด์ซึ่งอาจจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้างเป็นเอนไซม์ หรืออื่น ๆ ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์และสิ่งมีชีวิตมีลักษณะต่าง ๆ ปรากฏขึ้น (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541) และส่งผลให้เกิดลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ไม่มีสิ่งมีชีวิตใดที่มีชุดดีเอ็นเอที่เหมือนกันทั้งหมด ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกันเท่านั้น ความเฉพาะของดีเอ็นเอนี้ เรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ความจำเพาะที่อยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแต่ละคนนั้น ในทางนิติเวชศาสตร์สามารถนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุยืนยันตัวบุคคลในทางคดี และใช้พิสูจน์บุคคลในครอบครัวเดียวกันได้ (จินตนา ประดุกาญจนา, 2552)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หมายถึง ความผันแปรของยีน หรือหน่วยของพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง ทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน (recombination) และการรวมตัวกันใหม่ (rearrangement) ของยีน หรือโครโมโซมในระหว่างการแบ่งตัวแบบไมโอซิส รวมทั้งการกลายพันธุ์ (mutation) ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดขึ้นเมื่อ สมาชิกในประชากรมีการแยกตัวออกจากประชากรเดิมเริ่ม

แยกกลุ่มผสมพันธุ์ ลดการถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างประชากร ทำให้ความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งถ้ามีการถ่ายเทของยีนมาก ประชากรก็มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ถ้ามีการถ่ายเทของยีนน้อย หรือไม่มีเลยประชากรจะแตกต่างกันมากจนในระยะเวลาหนึ่งประชากรที่แยกจากกันจะมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างประชากร

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ คือ ดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งไมโทคอนเดรียทำหน้าที่เสมือนเป็นโรงงานผลิตพลังงานสำหรับใช้ภายในเซลล์จากกระบวนการการหายใจระดับเซลล์ (cellular respiration) ไมโทคอนเดรียมีดีเอ็นเอเป็นของตัวเอง ทำให้ไมโทคอนเดรียเพิ่มจำนวนได้ และสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียได้ ในแต่ละไมโทคอนเดรียจะมีหนึ่งดีเอ็นเอหรือมากกว่าก็ได้ ขึ้นอยู่กับขนาดของไมโทคอนเดรีย ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยทั่วไปจะมีดีเอ็นเอที่ไมโทคอนเดรียยาว 5.4 ไมโครเมตร (วรกุล ณนอดร, 2554) ยีนของเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียบางชนิดถูกควบคุมโดยยีนในไมโทคอนเดรียเอง แต่บางชนิดจะถูกควบคุมโดยยีนในนิวเคลียส ยีนในไมโทคอนเดรียจะควบคุมการสังเคราะห์อาร์อาร์เอ็นเอ ทีอาร์เอ็นเอ และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มชั้นใน (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์, 2547) ไมโทคอนเดรียแต่ละอันมีดีเอ็นเอประมาณ 2 - 10 ชุด หรือประมาณ 1,000 - 10,000 ชุดต่อเซลล์ โดยขนาดจีโนมของไมโทคอนเดรียในคน และสัตว์ส่วนมากมีขนาดประมาณ 16 kb ซึ่งไมโทคอนเดรียจีโนมขนาดใหญ่สามารถพบได้ใน ยีสต์ ประมาณ 80 kb และพืชมากกว่า 200 kb (Cooper, 2000) ในสัตว์ชั้นสูงการถ่ายทอดไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่งนั้นจะเป็นแบบ uniparental คือลักษณะพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอนั้นได้รับการถ่ายทอดมาจากมารดาเท่านั้น (สุทัศน์ ดวงจิตร, 2554) ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในสัตว์จะมีขนาดประมาณ 16 kb ประกอบด้วย 2 อาร์อาร์เอ็นเอยีน (12SrRNA และ 16S rRNA), 22 ทีอาร์เอ็นเอ, 13 รหัสโปรตีน และส่วนของตำแหน่งควบคุม (ภาพประกอบ 2.4) ซึ่งโปรตีนทั้ง 13 ชนิดจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport) และ ออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชัน (oxidative phosphorylation) ทั้งนี้บริเวณ displacement loop (D-loop) และ cytochrome b เป็นส่วนที่ใช้ศึกษาความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เนื่องจากสามารถเปรียบเทียบลำดับเบสได้สะดวก เพราะยีนในส่วนนี้จะแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะและความหลากหลายสูง (อุมาพร ใหม่แก้ว, 2550)

ยีน COI คือ mt-DNA ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนชนิด COI และสามารถพบได้ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryotes) ชนิดอื่น ๆ ยีนชนิดนี้ถูกเรียกได้หลายชื่อ COXI, COI และ CO เป็นยีนที่เหมาะสมในการศึกษาในสัตว์เพาะ จะมีความจำเพาะน้อยในสัตว์ชนิดเดียวกัน และมีความจำเพาะมากในสัตว์ต่างชนิด (Kaur, 2013) ซึ่งหมายถึงแปรผันของยีน COI สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดทำให้เกิดความแตกต่างกันของพันธุกรรม mt-DNA ปี ค.ศ.2003 Heber et al. ได้มีการนำยีน COI มาใช้ใน

การศึกษา DNA barcode ในสัตว์เป็นครั้งแรก (NCBI, 2019) และถูกนำมาใช้ระบุชนิดในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น 1. การระบุชนิดของสัตว์ เช่น หอยทาก แมลง นก ผีเสื้อ แมงมุม ปลา กุ้ง ปู มด สัตว์ทะเล และมนุษย์ 2. การระบุชนิดของไดอะตอม 3. การระบุชนิดเชื้อรา (fungi) 4. การระบุชนิดของสัตว์ในตัวอย่างฟอร์มาลิน เอทานอล และตัวอย่างแห้ง 5. การตรวจสอบเชื้อโรค *clonorchis sinensis* 6. การตรวจสอบและระบุชนิดของอาหารทะเล 7. ระบุชนิดของฟอสซิลของนก Moa ซึ่งสูญพันธุ์ไปแล้ว (พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉวีราช, 2554) (Purty and Chatterjee, 2016)

2.4 เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

การศึกษาความหลากหลายของชนิดพันธุ์ที่ผ่านมาส่วนใหญ่ มักจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวงจรชีวิตในการจำแนกความแตกต่าง การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวทำให้ยากและอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ และข้อมูลที่ได้ยังมีข้อจำกัดมากมาย จึงได้นำเอาเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและการจัดจำแนกชนิด ซึ่งเทคนิคต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในปัจจุบันนี้มีทั้งเทคนิคในระดับโปรตีนและดีเอ็นเอ แต่ละเทคนิคมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันไป (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2539) จึงมีการพัฒนาการตรวจสอบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นเทคนิคด้านอณูพันธุศาสตร์ และเป็นเทคนิคที่ทำให้เห็นความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งช่วยในการบ่งชี้และการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ได้ (พรณราย ชันธรักษา, 2541)

2.4.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือเรียกอีกชื่อว่า in vitro enzymatic gene amplification เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีปริมาณสูงกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยทำในหลอดทดลอง เทคนิคนี้ถูกค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ.1983 ใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติ โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นคู่เบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (template) หลักการการทำพีซีอาร์ คือ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ซึ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์ต้องมีองค์ประกอบเหล่านี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ, นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด, โพรเมอร์, เอนไซม์ Taq DNA polymerase และบัฟเฟอร์ (buffer) แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใส่เครื่อง Thermal Cycle ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาไม่นาน สร้างดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 โมเลกุลจะเพิ่มขึ้นเป็นล้านโมเลกุลในเวลาเพียง 3 - 4 ชั่วโมงเท่านั้นซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอัตราทวีคูณ (exponential rate) จะได้ DNA เท่ากับ 2^n โดย n คือจำนวนรอบของ PCR (อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์, 2534) เทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene

cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์อื่น ๆ โดยมี 3 ขั้นตอนดังนี้ 1. Denaturing คือ เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอ (DNA) ที่เป็นเกลียวคู่ หรือ double strand DNA (native DNA) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้า ๆ จนกลายเป็นดีเอ็นเอ (DNA) สายเดี่ยว หรือ single strand DNA (denatured DNA) อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 90-95 องศาเซลเซียส 2. Annealing คือ เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ และใส่ไพรเมอร์ (primer, short DNA) ลงไปในระบบเพื่อให้เกิดการเกาะแบบเข้าคู่กันของเบส (complementary base pair) ระหว่างไพรเมอร์ กับ template DNA โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 37 - 60 องศาเซลเซียส 3. Extension คือ เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยมี DNA สายเดี่ยวเป็นต้นแบบ โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 72 - 75 องศาเซลเซียส การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) สายใหม่ถูกสร้างต่อจากไพรเมอร์ (primer) โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีเอนไซม์ taq DNA polymerase ที่ทนความร้อนได้ดีที่สามารถนำนิวคลีโอไทด์ (Deoxynucleotide triphosphate หรือ dNTP) ซึ่งประกอบด้วย dGTP, dCTP, dATP และ dTTP มาสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ จากทิศทาง 5' ไป 3' เทคนิค PCR ถูกนำมาพัฒนาให้สามารถนำมาใช้ได้กับงานได้อย่างหลากหลาย

2.4.2 เทคนิค Random amplified polymorphic DNA, RAPD เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นโดย Williams et al. (1990) เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้นๆ ความยาวประมาณ 10 เบส ที่มีลำดับเบสเป็นแบบสุ่มไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนและแสดงผลในรูปของการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งหนึ่ง ๆ ชิ้นส่วนที่ได้รับการเพิ่มขยายปริมาณแล้วนั้นจะถูกนำไปแยกขนาดโดยใช้อาร์กาโรสเจล ซึ่งความแตกต่างในประชากรนั้นเกิดจากการเพิ่มเข้า (addition), การหายไป (deletion) หรือ การกลายพันธุ์ (mutation) ในตำแหน่งที่นั้น ๆ คุณสมบัติที่สำคัญของการใช้เทคนิคนี้คือสะดวก รวดเร็ว ง่ายและประหยัดต้นทุนในการดำเนินการ เนื่องจากการสร้างไพรเมอร์นั้นเป็นแบบสุ่มจึงไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของดีเอ็นเอ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อยมาก โมเลกุลชนิดนี้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ dominant marker คือ อาจสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้เฉพาะบางอัลลีลเท่านั้น ดังนั้น จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลที่เป็นโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ อีกทั้งยังไม่ทราบตำแหน่งที่แน่นอนในจีโนมอีกด้วย (อัญชลี ดันสมบูรณ์, 2555)

2.4.3 เทคนิค Simple sequence repeat, SSR หรือ Microsatellite คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่มีจำนวนซ้ำแตกต่างกัน ตั้งแต่ 1 - 4 bp เช่น A, CA, GAG หรือ CCGG เป็นต้น และมีจำนวนซ้ำกันประมาณ 10 - 50 ครั้ง ซึ่งกระจายตัวอยู่ทั่วทั้งจีโนม โดยจำนวนซ้ำของ microsatellite ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด มีจำนวนซ้ำไม่เท่ากันทำให้เกิดความแปรผันในประชากร ลักษณะที่สำคัญของเบสซ้ำนี้ คือ การมีลำดับเบสจำเพาะอยู่บริเวณหัวท้ายของเบสซ้ำ ซึ่งเบสจำเพาะ

เหล่านี้สามารถนำมาใช้สร้างเป็นไพรเมอร์ขนาดประมาณ 20 เบส เพื่อใช้ขยายปริมาณเบสซ้ำ ในตำแหน่งที่ต้องการ โดยใช้หลักการของพีซีอาร์ จากนั้น นำไปแยกความแตกต่างโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำ ในแต่ละสิ่งมีชีวิต คุณสมบัติที่สำคัญของเทคนิคนี้ คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนม จำนวนของรูปแบบของอัลลีลที่สามารถตรวจสอบได้ และเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ codominant marker เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดนี้มีการนำไปใช้สร้างแผนที่จีโนมกันอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ในการค้นหาตำแหน่งที่ตั้งของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญที่ต้องการศึกษา (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

2.4.4 เทคนิค Amplified fragment length polymorphism, AFLP เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่รวบรวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าไว้ด้วยกันวิธีการก็คือตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 2 ชนิด จากนั้นนำ adapter ของเอนไซม์ทั้งสองมาเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้ ligase สำหรับการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นใช้หลักการของพีซีอาร์ โดยจะใช้ oligonucleotide primer ซึ่งมีลำดับเบสที่ตรงกันข้ามกับ adapter ซึ่งทำให้สามารถจับกับ adapter ได้กระชับ โดยเพิ่มเบสจำเพาะ (selective base) ในส่วนท้ายของไพรเมอร์ ผลผลิตของการทำพีซีอาร์ นั้นจะนำไปแยกขนาดโดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งความแตกต่างในประชากร นั้นเกิดจาก addition, deletion หรือ mutation ในตำแหน่งของ restriction site หรือ ในตำแหน่งระหว่างไพรเมอร์นั้น ๆ การเกิด polymorphism เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ทำให้ตำแหน่งตัดจำเพาะเปลี่ยนไป เกิดการหายไปหรือเพิ่มขึ้น ของตำแหน่งตัดจำเพาะ หรือเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ ทำให้ขนาดของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป ข้อดีของเทคนิค AFLP คือ ไม่ต้องทราบข้อมูลของลำดับเบส สามารถทำได้รวดเร็วเกิดรูปแบบ (polymorphism) จำนวนมาก ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย และใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตชนิดใดก็ได้ ที่มีส่วนของลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ adapter คุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือ จำนวนของความแตกต่างรูปแบบ (polymorphism) ที่สามารถตรวจสอบได้สูง 10 - 20 รูปแบบ ต่อการทำแต่ละครั้ง (อัญชลี ต้นสมบูรณ์, 2555) ส่วนข้อจำกัดของเทคนิคนี้ คือค่าใช้จ่ายสูง ต้องการดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง อัลลีลส่วนใหญ่เป็นแบบข่ม ทำให้วิเคราะห์ผลยาก มีความยุ่งยากในการเก็บข้อมูล และจำนวนขั้นตอนที่ซับซ้อน อีกทั้งการไม่รู้ตำแหน่งที่แน่นอนในจีโนม

2.4.5 SNPs (Single nucleotide polymorphisms DNA fragments) คือ นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่เกิดการกลายพันธุ์ หรือเปลี่ยนไป 1 ตำแหน่ง โดยทั่วไป ลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมที่มีความยาวทุก ๆ 1 กิโลเบส จะมีนิวคลีโอไทด์ผันแปรไป 1 ตำแหน่ง ปัจจุบันนิยมเรียกนิวคลีโอไทด์ที่ผันแปรนี้ว่า single nucleotide polymorphisms (SNPs) มากกว่าจุดกลายพันธุ์ (point mutation) และ สามารถตรวจสอบได้โดย RFLPs หรือ PCR-RFLPs หรือใช้การตรวจสอบจาก

conformation ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว ในขณะที่อยู่ในสนามไฟฟ้าของอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยความเร็วแตกต่างกัน เรียกวิธีการตรวจสอบนี้ว่า single stranded conformation polymorphism (SSCP) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบได้โดยตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ เป็นต้น (รวิกันต์ ขนานไพร, 2558)

2.4.6 เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้ระบุตำแหน่งชนิด dominant marker เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของความหลากหลายของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่เกิดหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เอนไซม์นี้สามารถเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า restriction endonuclease ซึ่งลำดับเบสที่เฉพาะเจาะจงสำหรับเอนไซม์แต่ละตัวเรียกว่า “รหัสเบสจำเพาะ” จะมีความเฉพาะเจาะจงในการตัดตามลำดับเบสบนเส้นดีเอ็นเอในจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว ทำการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ ออกจากกันด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) เมื่อทำ hybridization ด้วยดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) ที่เหมาะสม จะได้แถบ RFLP มีความแตกต่างของแต่ละตัว (individual) เกิดได้จากการเพิ่มเข้า (addition), การหายไป (deletion) หรือ การกลายพันธุ์ (mutation) ที่ตำแหน่งจำเพาะ (restriction site) (อัญชลี ต้นสมบูรณ์, 2555) เอนไซม์ตัดจำเพาะมีอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดก็จะตัดที่ตำแหน่งเบสที่ต่างกัน จึงสามารถตัดดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งขึ้นอยู่กับว่าจะใช้เอนไซม์ชนิดใด เทคนิค PCR-RFLP เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลายเท่าในระยะเวลาอันสั้น ทั้งนี้ต้องทราบลำดับเบสดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นทั้งหมด หรือส่วนปลายของดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อใช้สังเคราะห์ไพรเมอร์ 2 ชนิด เพื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น เมื่อทราบลำดับดีเอ็นเอของยีนใดหรือลำดับเบสที่ปลาย 2 ด้านของชิ้นดีเอ็นเอใด ๆ แล้ว (sequence tagged site) ก็สามารถนำมาสร้างไพรเมอร์ได้ ผลผลิตของพีซีอาร์จะสามารถตรวจสอบได้ถึงความแตกต่างของลำดับเบสภายในโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อาจพบรูปแบบความแตกต่าง (polymorphism) เทคนิค PCR-RFLP จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากสะดวก รวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี สามารถที่จะแยกสิ่งมีชีวิตที่เป็น homozygote และ heterozygote และปริมาณตัวอย่างที่ใช้สกัดดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยก็เพียงพอที่จะศึกษาได้และข้อมูลก็น่าเชื่อถือมากกว่าเทคนิค PCR-RAPD (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2539)

2.4.7 เทคนิค Electrophoresis เป็นวิธีการแยกสารที่ผสมกันอยู่ให้ออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้าหลักการของ electrophoresis คือ เมื่อวางโมเลกุลที่มีประจุลงในสนามไฟฟ้าที่เกิดจากขั้วไฟฟ้า 2 ขั้วที่อยู่ใต้สารละลาย โมเลกุลของสารนั้นเคลื่อนย้ายจากขั้วหนึ่งไปสู่ขั้วหนึ่ง โดยที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วบวก ในขณะที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นบวกจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วลบ การเคลื่อนที่ในลักษณะนี้เรียกว่า electrophoresis ความเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือ แรงผลักดันซึ่งเกิดโดยสนามไฟฟ้ากระทำต่อโมเลกุลนั้น ๆ ปัจจัยอีก

ประการหนึ่งคือ แรงต้านทานการเคลื่อนที่ ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่โมเลกุลนั้นเคลื่อนย้ายเข้าไปในตัวกลาง เมื่อเริ่มเปิดสนามไฟฟ้า โมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่ด้วยความเร่ง จนกระทั่งถึง ความเร็วที่สมดุลกับแรงต้านทาน จากนั้นโมเลกุลจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่ และเนื่องจากโมเลกุลของสารต่าง ๆ จะมีความแตกต่างกันทั้งขนาด รูปร่าง และประจุไฟฟ้า ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน จึงสามารถแยกออกจากกันได้ การแยกสารโดยวิธี electrophoresis นี้จึงเป็นประโยชน์และเป็นที่นิยมอย่างมากในทางอณูชีววิทยานิยมนำเทคนิคนี้มาใช้ในการแยกขนาดของดีเอ็นเอ และโปรตีน

2.4.8 Paper electrophoresis ถึงแม้ว่า electrophoresis จะสามารถกระทำได้ในสารละลาย แต่จะเป็นการสะดวกกว่าเป็นอย่างมากถ้าให้โมเลกุลเหล่านี้เคลื่อนที่ในตัวกลางที่กำหนดให้ แทนที่จะเคลื่อนในสารละลาย Paper electrophoresis ซึ่งนิยมใช้ในการแยกสารที่เป็นส่วนผสมของโมเลกุลที่มีประจุและมีขนาดเล็กโดยใช้กระดาษ (ส่วนมากเป็นกระดาษกรอง) และนำมาทำให้เปียกด้วยสารละลายที่มีการควบคุม pH และนำมาวางไว้ระหว่างขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว จากนั้นนำสารที่ต้องการจะแยกโมเลกุลต่าง ๆ ออกจากกัน ไปหยดที่ตำแหน่งที่กำหนดบนกระดาษนั้น เมื่อเปิดสนามไฟฟ้า และปล่อยให้เคลื่อนที่เป็นเวลาพอเหมาะจึงนำเอากระดาษนั้นมาทำให้แห้ง ย้อมสี และเปรียบเทียบกับผลการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานที่ทราบ ทำให้สามารถศึกษาโมเลกุลต่าง ๆ เหล่านั้นได้ หรือถ้าใช้สารกัมมันตรังสี ทำให้สามารถศึกษาโมเลกุลต่าง ๆ เหล่านั้นได้หรือถ้าใช้สารกัมมันตรังสีก็จะเอาไปประกบกับ film x-ray เป็นต้น (Schram *et al.* 2012)

2.4.9 Gel electrophoresis คือ การใช้วุ้นเป็นตัวกลาง ซึ่งเป็นที่นิยมเป็นอย่างมากในการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนและกรดนิวคลีอิก วุ้นประกอบไปด้วยเนื้อวุ้นและสารละลายที่เหมาะสม และจะถูกหล่อเป็นแบบอย่างระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่น เนื้อวุ้นที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ polyacrylamide ซึ่งเป็น cross-linked polymer ที่ละลายน้ำได้ และ agarose ซึ่งเป็น polysaccharide ในเนื้อวุ้นที่หล่อเป็นแบบมีคุณสมบัติเป็นรูพรุนอยู่ภายใน จากนั้นเนื้อวุ้นจะถูกนำไปตั้งไว้ระหว่างขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว สารละลายที่ต้องการศึกษาจะถูกหยดลงไปบนเนื้อวุ้นและเมื่อเปิดกระแสไฟฟ้า โมเลกุลในสารละลายนั้นก็จะมีการเคลื่อนที่ ถ้าปัจจัยอื่น ๆ เหมือนกัน โมเลกุลใหญ่กว่าก็จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วน้อยกว่ายิ่งใช้เวลานานขึ้นก็จะเคลื่อนที่แยกกันได้ชัดเจนขึ้น เมื่อได้เวลาพอเหมาะก็จะปิดกระแสไฟฟ้าและ นำวุ้นออกมาจากแผ่นกระจก แล้วนำไปย้อมสีหรือ ประกบกับ film x-ray ต่อไป (Westermeyer *et al.*, 2005)

2.4.10 เทคนิคหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เทคนิคการตรวจหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ (nucleotide bases) ภายในดีเอ็นเอ(DNA) ได้แก่ อะดีนีน (adenine) กัวนีน (guanine) ไซโตซีน (cytosine) และ ไทมีน (thymine) โดยใช้เครื่องมือและเทคโนโลยีสมัยใหม่ที่ใช้ในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล (genetics molecular) ได้ง่ายขึ้น เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่าง

กว้างขวาง ยกตัวอย่างเช่น การวินิจฉัยทางการแพทย์ (medical diagnosis) เทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) ชีววิทยานิติวิทยาศาสตร์ (forensic biology) ไวรัสวิทยา (virology) และระบบข้อมูลทางชีววิทยา (biological systematics) เทคนิคหาลำดับเบสดีเอ็นเอ มี 3 ขั้นตอน 1) DNA extraction คือ การสกัดการแยกดีเอ็นเอที่เป็นหัวใจของเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด 2) PCR amplification การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณที่พอเหมาะในการหาลำดับดีเอ็นเอได้ 3) DNA sequencing and analysis คือ การหาลำดับดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต เป็นการรับรองว่าทั้งสามขั้นตอนประสบผลสำเร็จในการหาลำดับดีเอ็นเอ และนำข้อมูลการวิเคราะห์ปัจจุบันมีอยู่ 2 วิธี คือ

2.4.10.1 Maxam-Gilbert DNA Sequencing เป็นวิธีการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีที่จะตัดสาย DNA ที่ตำแหน่งเฉพาะ โดยที่สำคัญ DNA ที่จะนำมาทำการหาลำดับเบสนั้นจะต้องเป็น DNA ชนิดเดียวกัน และมีขนาดประมาณ 200-1000 bp มี 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 ตัดฉลากสาย DNA ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (P^{32}) โดยแต่ละ strand ของ double-stranded DNA จะถูกติดฉลากที่ปลาย 5' หรือ 3' จากนั้นจะถูกนำมา denature ให้เป็น single strand โดยที่ในแต่ละ strand จะถูกติดฉลากที่ปลายข้างหนึ่งข้างใดเท่านั้น ขั้นที่ 2 การตัดสาย DNA ซึ่ง DNA จะถูกแบ่งเป็น 4 ส่วน แต่ละส่วนจะถูกนำมาทำปฏิกิริยาเคมีที่ต่างกัน โดยจะทำการตัดสาย DNA นั้นที่ตำแหน่ง Base 1 ใน 4 นั้น ๆ เช่น ในส่วนที่ 1 จะถูกนำไปทำปฏิกิริยาทางเคมี โดยจะตัดที่ตำแหน่งที่มี base เป็น T หรือ C เท่านั้น สำหรับส่วนที่กำหนดให้ตัดที่ตำแหน่ง G นั้นจะจัดที่ตำแหน่ง A แต่จะตัดที่ตำแหน่งที่เป็น G มากกว่า ในทำนองเดียวกัน ส่วนที่ถูกกำหนดให้ตัดที่ตำแหน่ง A ตัดที่ G แต่จะตัดที่ตำแหน่ง A มากกว่า ขั้นที่ 3 เป็นการแยกขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทางเคมีตามขั้นตอนที่ 2 DNA ที่ได้จะถูกนำมาแยกขนาดตามความยาวของเบสโดยใช้วิธี polyacrylamide gel electrophoresis

2.4.10.2 Dideoxy sequencing การหาลำดับเบสวิธีนี้ต้องการ DNA ที่เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งเป็น DNA สายคู่จะถูก denature ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อนและ oligonucleotide สายสั้นๆ ซึ่ง complementary กับ DNA ส่วนที่ใกล้เคียงกับลำดับเบสที่ต้องการทราบ (sequencing primer) โดยที่จะ anneal กับสาย DNA สายเดี่ยวเท่านั้น oligonucleotide primer จะถูกออกแบบให้ 3' อยู่ใกล้กับส่วนของ DNA ทราบลำดับเบสโดย oligonucleotide นี้จะทำหน้าที่เป็น primer เพื่อให้มีการสังเคราะห์ DNA สายที่ complementary กับ DNA template ต่อไป

2.4.11 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcoding) คือ ระบบที่มีความเร็วในการระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศโดยใช้ ดีเอ็นเอสายสั้น (short DNA sequencing) แทนการใช้ข้อมูลพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอสายสั้นเป็นตำแหน่งที่ได้รับการยอมรับเป็นมาตรฐานเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ซึ่งจะมีความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ คือ COI ใช้ระบุสายพันธุ์ใน

สัตว์ ใช้ระบุสายพันธุ์ในพืช และ Internal Transcribed Spacer (ITS) ใช้ระบุสายพันธุ์ในเชื้อรา (Keele et al., 2014) จุดประสงค์ของการตีเอ็นเอบาร์โค้ด คือ การสร้างแหล่งข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ ที่สามารถใช้สำหรับการจัดจำแนกอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิต หรือแม้แต่สายพันธุ์เดียวกันก็จะมี ความแตกต่างกันในระดับโมเลกุล (Phylogeny) ซึ่งสามารถระบุตัวอย่างที่ไม่รู้จักจากตัวอย่างที่จำแนกไว้ ก่อนหน้านี้แล้ว โดยใช้ยีนในไมโทคอนเดรียไซโตโครม (mitochondrial gene) ชนิด COI (Bandyopadhyaya et al., 2013) ซึ่งสามารถนำความรู้มาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน ยกตัวอย่างเช่น การควบคุมวัชพืชทางการเกษตร การระบุชนิดของเชื้อโรค เป็นข้อมูลสนับสนุนทรัพยากรธรรมชาติ ปกป้องสิ่งมีชีวิตที่ใกล้สูญพันธุ์ การตรวจสอบคุณภาพน้ำ รับรองความถูกต้องตามปกติของผลิตภัณฑ์ สุขภาพจากธรรมชาติ การระบุใบพืชเพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์กระบวนการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมี ขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ 1.การเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ต้องการทำบาร์โค้ด นำมาตรวจสอบยืนยันชนิด สิ่งมีชีวิต 2.กระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนบาร์โค้ดด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบส ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในห้องทดลอง 3.การเตรียมฐานข้อมูลสำหรับจัดเก็บและเชื่อมโยงระหว่างชื่อชนิด กับดีเอ็นเอบาร์โค้ด 4.การวิเคราะห์ลำดับเบสของตัวอย่างที่ต้องการศึกษา แล้วนำไปเปรียบเทียบกับ บาร์โค้ดในฐานข้อมูลเพื่อหาสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงที่สุด

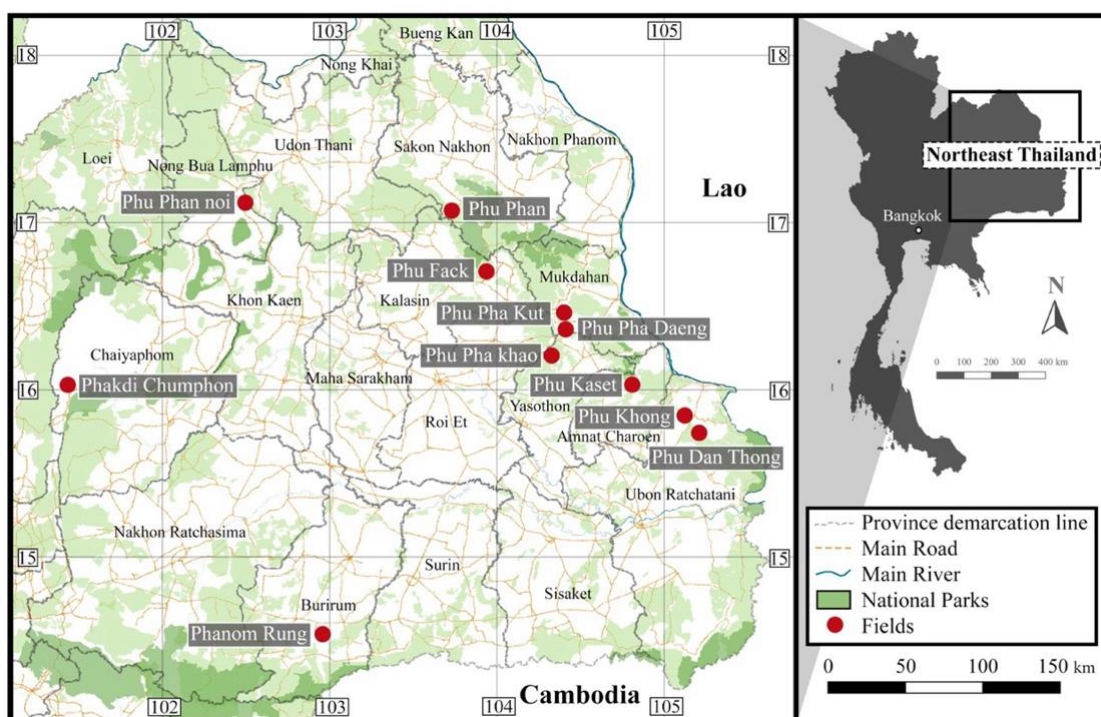


บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 การเก็บตัวอย่าง

สำรวจพื้นที่ที่จะทำการเก็บตัวอย่างปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในเขตพื้นที่ภูเขาภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเลือกเก็บตัวอย่างในพื้นที่เขตป่าชุมชน ตามแนวเทือกเขาภูพาน พนมดงรัก และเทือกเขาเพชรบูรณ์ (ภาพประกอบ 6) จากนั้นดำเนินการเก็บตัวอย่างปูเขาและพิกัดสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างปูเขา ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ.2563 - จนถึงเดือนตุลาคม พ.ศ.2565 การเก็บตัวอย่างมี 2 วิธี คือ ช่วงฤดูฝนใช้อุปกรณ์ดักจับสัตว์น้ำ ภาษาท้องถิ่นเรียกว่า ไช นำไชที่จะใช้ดักจับมาใส่เนื้อไก่หรือโครงกระดูกไก่ลงในไช นำไปวางไว้บริเวณธารน้ำบนภูเขาในเวลากลางคืน จากนั้นตอนเช้าทำการเก็บตัวอย่างในไช (ภาพประกอบ 7 A) ส่วนในช่วงฤดูหนาวหรือฤดูแล้ง สามารถเก็บตัวอย่างปูเขาด้วยการขุด (ภาพประกอบ 7 B) ซึ่งในฤดูนี้จะเก็บตัวอย่างค่อนข้างยากเพราะปูเขาจะขุดรูอาศัยอยู่ใต้โขดหินลึก นำตัวอย่างใส่ในถุงตาข่ายแล้วทำให้สลบด้วยความเย็นประมาณ 6 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำตัวอย่างออกมาล้างทำความสะอาด ถ่ายรูป และกำหนดรหัส



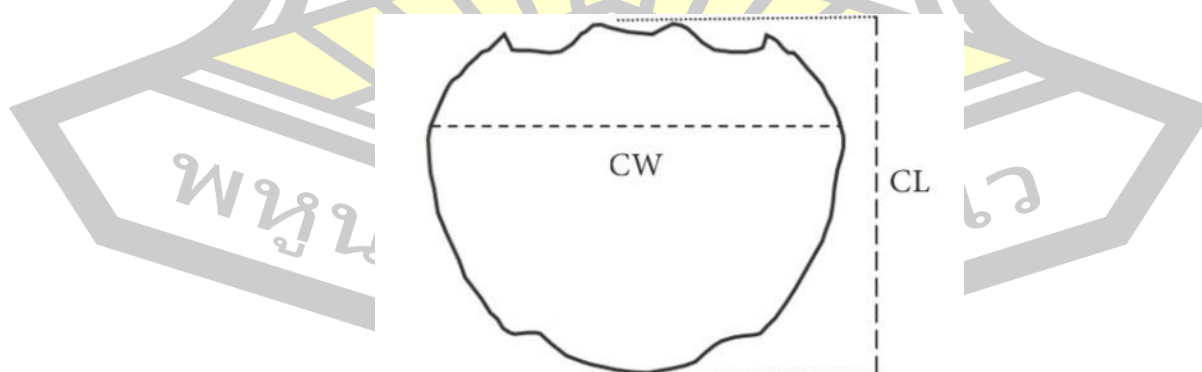
ภาพประกอบ 6 แผนที่การเก็บตัวอย่าง



ภาพประกอบ 7 การเก็บตัวอย่างในฤดูฝนที่เขื่อนมรุ้ง จังหวัดบุรีรัมย์ (A) การเก็บตัวอย่างในฤดูแล้ง
ภูผาขาว จังหวัดยโสธร (B)

3.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก (*External morphology*)

จัดจำแนกชนิดปูภูเขาวงศ์ Potamidae ตามแนวการศึกษาของ Brandis (2000), Chuensri (1973), Yeo and Ng (2008), Naiyanetr (1993), Ng and Naiyanetr (1995, 2003) Pramual (1990) และ สัญญา ศุภจันทร (2545) นำตัวอย่างที่ได้ มาทำการศึกษาลักษณะของ carapace, cheliped, walking legs, abdomen, third maxilliped, gonopod 1 และ 2 (ดังรายละเอียดในภาคผนวก) วัดความกว้างของกระดอง (CW) และความยาวของกระดอง (CL) (ภาพประกอบ 3.3) ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่าง ๆ การจัดจำแนกปูภูเขาด้วยอวัยวะสืบพันธุ์ และส่วนท้องจะใช้ตัวอย่างปูเพศผู้เท่านั้น เนื่องจากปูเพศเมียนั้น ส่วนท้องจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปภายหลังจากที่มีการผสมพันธุ์ และลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาดให้ใหญ่ขึ้นไว้รองรับไข่ จึงอาจทำให้เกิดปัญหาถ้าหากใช้ปูเพศเมียในการวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิด



ภาพประกอบ 8 วิธีการวัดขนาดของกระดองปูภูเขา (Fadlaoui *et al.*, 2019) ความกว้างของ
กระดอง (CW) ความยาวของกระดอง (CL)

3.3 การศึกษาการกระจายตัวของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

นำข้อมูลการจัดจำแนกชนิดตัวอย่างปูภูเขาที่เก็บได้จากภูเขาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทั้งหมด 11 พื้นที่ 9 จังหวัด คือ ชัยภูมิ หนองบัวลำภู สกลนคร ภาพลินธุ์ มุกดาหาร ยโสธร อำนาจเจริญ อุบลราชธานี และบุรีรัมย์ มาเปรียบเทียบกับรายงานของ Niyanetr (1998) และสัญญา ศุภจันทรา (2545)

3.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) สกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด TIANamp Genomic DNA Kit (ประเทศจีน) โดยตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของปูภูเขาใส่ในหลอด microcentrifuge แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ของเหลวออกจากเนื้อเยื่อ จากนั้นเติมด้วยบัฟเฟอร์ GA 200 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด แล้วเติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.30 - 3 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก ๆ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำตัวอย่างมาเติมบัฟเฟอร์ GB 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ต่ออีก 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว นำตัวอย่างออกมาเติม absolute ethanol 200 ไมโครลิตร ผสมกันให้ทั่ว 15 วินาที เมื่อเติม absolute ethanol จะเกิดตะกอนสีขาว ให้นำไปปั่นเหวี่ยง 15 วินาที แล้วดูดเอาของเหลว 650 ไมโครลิตร ย้ายลงไปใน mini column ที่มีตัวกรอง (filter) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 30 วินาที แล้วเทของเหลวที่ผ่านตัวกรองทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ GD 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 30 วินาที แล้วเทของเหลวที่ผ่านตัวกรองทิ้งไป เติม PW 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 12,000 rpm 30 วินาที แล้วเทของเหลวที่ผ่านตัวกรองทิ้ง ขั้นตอนนี้ทำซ้ำ 2 รอบ ทำการกำจัด PW ออกให้หมดโดยการ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้ายตัวกรองของ mini column ไปยังหลอด microcentrifuge อันใหม่ เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาณ 50 - 200 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 - 5 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที นำตัวกรองทิ้ง แล้วนำสารละลายที่ได้ในหลอด microcentrifuge อันใหม่เขียนรหัสให้เรียบร้อย แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

ทำการคัดเลือกหาไพรเมอร์ทั้งหมด 4 ไพรเมอร์ เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปูเงาวงศ์ Potamidae

Primer	Sequence	Reference
LSU-2-4	F: 5'-GGGTTGTTT GGAATGCAGC-3' R: 5'-GTTAGACTCCTTGGTCCGTG-3'	Wad and Mordan (2000)
16SrDNA*	F: 5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3' R: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGT-3'	Palumbi <i>et al.</i> (1991)
18SrDNA	F: 5'-TGGATCCCGGGCAAGCTCTGGTGC-3' R: 5'-TGAAGTCAAGGGCATCACAGACC-3'	Siludjai (2000)
COI*	F: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATATTTGG-3' R: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3'	Folmer <i>et al.</i> (1994)

หมายเหตุ: (*) คือ ไพรเมอร์ที่ถูกเลือกเพื่อการศึกษา

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ COI ใน 1 ปฏิกริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O, 1X buffer, 25 mM MgCl₂, 1mM dNTP, 0.5 U/μl Taq DNA polymerase, 10 μM, primer และ 50 ng/μl DNA template ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง thermocycler ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 40 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1.10 นาที ทั้งหมดจำนวน 10 รอบ ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 40 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1.10 นาที ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ และขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 16S ใน 1 ปฏิกริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O, 1X buffer, 25 mM MgCl₂, 1mM dNTP, 0.5 U/μl Taq DNA polymerase, 10 μM, primer และ 50 ng/μl DNA template ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง thermocycler ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 40 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1.10 นาที ทั้งหมดจำนวน 10 รอบ

ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 40 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1.10 นาที ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ และขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และบัฟเฟอร์ TBE 1x ใช้กระแสไฟฟ้า 100 mA เป็นเวลา 35 นาที

3.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

นำตัวอย่างผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ COI และ 16S ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท ATGC จำกัด (ประเทศไทย) เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ 16S แล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ 16S มาวิเคราะห์โดยตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7 (Hall, 1999) และประเมินคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเรียงเทียบ (multiple alignment) ด้วยวิธี ClustalW ในโปรแกรม MEGA version X (Kumar *et al.*, 2018) และตัดบริเวณ Indel (insertion/deletion) ก่อนนำมาคำนวณหาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) โดยใช้ Kimura 2-parameter model และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationships) โดยวิธี Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA version X ทำการวิเคราะห์ bootstrap 1,000 ครั้ง จากนั้นนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank มาสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยวิธี Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA version X ทำการวิเคราะห์ bootstrap 1,000 ครั้ง กับลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ทั้งหมด

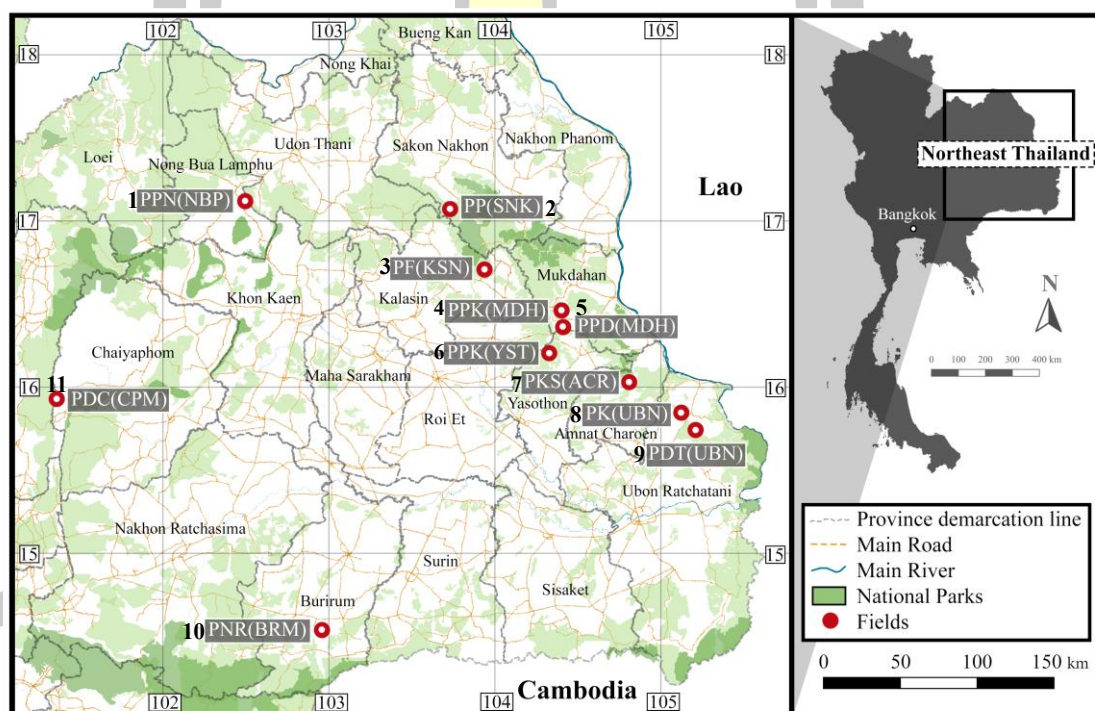
พูน ปณ จิต ชเว

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในบริเวณเขตเทือกเขาภูพานจำนวน 9 จุด ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมด 7 จังหวัด บริเวณเขตเทือกเขาพนมดงรักจำนวน 1 จุด และบริเวณเขตเทือกเขาเพชรบูรณ์จำนวน 1 จุด โดยมีความสูงจากน้ำทะเลปานกลางประมาณ 260 - 450 เมตร รวมทั้งหมด 11 จุด ได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู จังหวัดสกลนคร จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดอำนาจเจริญ จังหวัดยโสธร จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดบุรีรัมย์ และจังหวัดชัยภูมิ ดังแผนที่ (ภาพประกอบ 9) ปูภูเขาจะอาศัยอยู่ตามซอกหินในลำธาร น้ำตก บริเวณที่มีน้ำไหลผ่านบนภูเขา และชุดรูอยู่ตามใต้โขดหินริมลำธาร



ภาพประกอบ 9 แผนที่เก็บตัวอย่าง 11 จุด ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ทำการเก็บตัวอย่างปูภูเขาทั้งหมดจำนวน 101 ตัวอย่าง จากภูพานน้อยจำนวน 7 ตัว เป็นเพศผู้ 4 ตัว เพศเมีย 3 ตัว ภูพานจำนวน 8 ตัว เพศผู้ 8 ตัว ภูแฝกจำนวน 10 ตัว เพศผู้ 4 ตัว เพศเมีย 6 ตัว ภูผากุดจำนวน 10 ตัว เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว ภูผาแดงจำนวน 2 ตัว เพศผู้ 2 ตัว ภูผา

ขาวจำนวน 11 ตัว เพศผู้ 7 ตัว เพศเมีย 4 ตัว ภูเขาธรจำนวน 9 ตัว เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 4 ตัว ภู
 ฆ้องจำนวน 14 ตัว เพศผู้ 6 ตัว เพศเมีย 8 ตัว ภูด่านทองจำนวน 11 ตัว เพศผู้ 9 ตัว เพศเมีย 2 ตัว เขา
 พนมรุ้งจำนวน 10 ตัว เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว และเทือกเขาเพชรบูรณ์จำนวน 9 ตัว เพศผู้ 7 ตัว
 เพศเมีย 2 ตัว (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 สถานที่เก็บตัวอย่าง พิกัด จำนวน และความสูงจากระดับน้ำทะเล

สถานที่เก็บ	พิกัด	ความสูงจาก ระดับน้ำทะเล (m)	จำนวน (ตัว) M=เพศผู้ F=เพศเมีย	อักษรย่อ
1. ภูพานน้อย จ. หนองบัวลำภู	17°10'56.6"N 102°29'23.5"E	437	7 ตัว M=4, F=3	PPN(NPB) *PPN(NPB)2,4,7
2. ภูพาน จ.สกลนคร	17°01'42.9"N 103°43'01.3"E	449	8 ตัว M=8	PP(SNK) *PP(SNK)5,7,8
3. ภูแฝก จ.กาฬสินธุ์	16°43'45.1"N 103°57'10.9"E	439	10 ตัว M=4, F=6	PF(KSN) *PF(KSN)4,8,10
4. ภูผากุด จ. มุกดาหาร	16°21'55.2"N 104°25'06.5"E	377	10 ตัว M=5, F=5	PPK(MDH) *PPK(MDH)1,2
5. ภูผาแดง จ. มุกดาหาร	16°29'46.6"N 104°24'09.4"E	407	2 ตัว M=2	PPD(MDH) *PPD(MDH)1,6,10
6. ภูผาขาว จ.ยโสธร	16°12'06.8"N 104°17'20.1"E	310	11 ตัว M=7, F=4	PPK(YST) *PPK(YST)2,5,11
7. ภูเขาธร จ. อำนาจเจริญ	16°03'06.6"N 104°47'10.8"E	320	9 ตัว M=5, F=4	PKS(ACR) *PKS(ACR)3,7,9
8. ภูฆ้อง จ. อุบลราชธานี	15°46'17.3"N 105°10'00.9"E	262	14 ตัว M=6, F=8	PK(UBN) *PK(UBN)6,10,11
9. ภูด่านทอง จ. อุบลราชธานี	15°43'26.0"N 105°14'07.4"E	325	11 ตัว M=9, F=2	PDT(UBN) *PDT(UBN)2,4,8
10. เขาพนมรุ้ง จ. บุรีรัมย์	14°32'02.1"N 102°57'10.0"E	336	10 ตัว M=10	PNR(BRM) *PNR(BRM)3,5,9
11. เทือกเขา เพชรบูรณ์ จ.ชัยภูมิ	15°59'55.7"N 101°24'17.5"E	450	9 ตัว M=7, F=2	PDC(CPM) *PDC(CPM)1,2

หมายเหตุ: (*) คือ ตัวอย่างที่ถูกเลือกเพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม

4.2 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

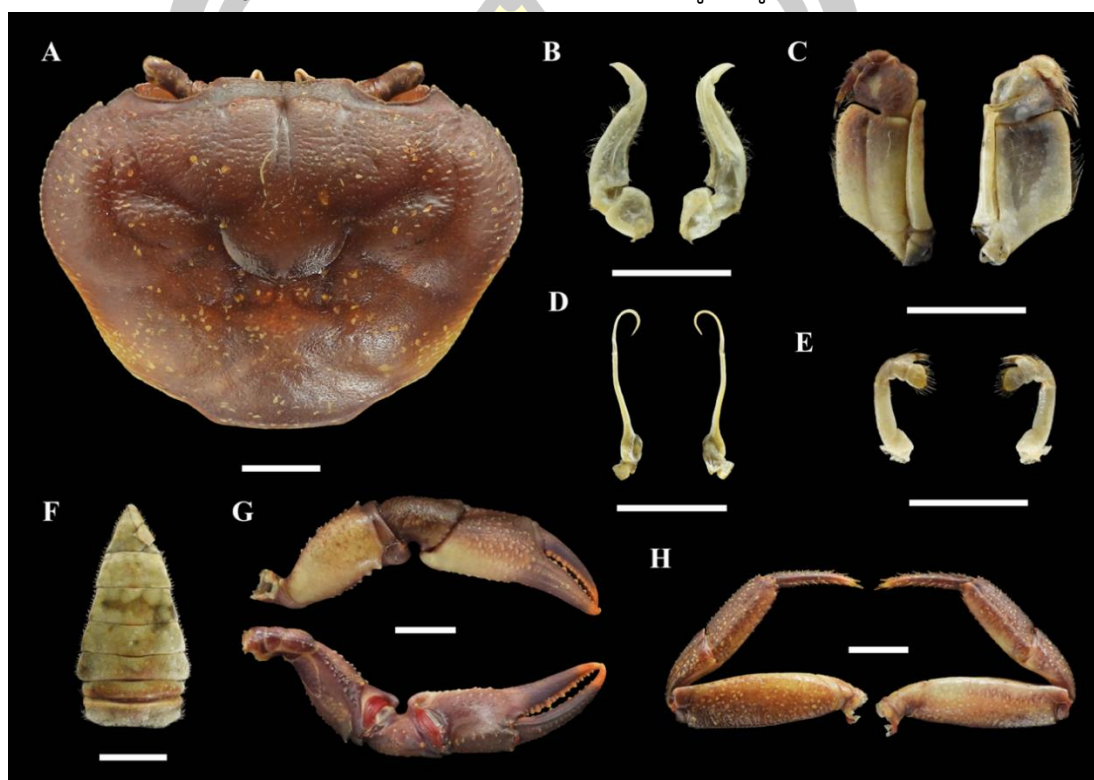
จากการศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกเพื่อจัดจำแนกชนิดของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้คู่อื่น ๆ ได้แก่ กระดอง ก้ามหนีบ ขาเดิน ส่วนท้อง และอวัยวะช่วยกิน จากตัวอย่างทั้งหมด 101 ตัวอย่าง พบว่าปูภูเขาวงศ์ Potamidae ที่ทำการศึกษามีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถจัดจำแนกได้โดยการตรวจสอบเพียงลักษณะภายนอกเท่านั้น ต้องตรวจสอบอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้คู่อื่น ๆ เป็นหลัก เพศเมียไม่สามารถจัดจำแนกโดยใช้อวัยวะสืบพันธุ์ได้ จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกอย่างละเอียดสามารถจัดจำแนกปูภูเขาวงศ์ Potamidae ได้ทั้งหมด 6 ชนิด คือ *Indochinamon bhumibol*, *Potamon* sp. , *Eosamon yotdomense*, *Setosamon ubon*, *Setosamon somchai* และ *Setosamon sakon* โดยการจัดจำแนกปูภูเขาวงศ์ Potamidae ทั้ง 6 ชนิด สามารถใช้สัณฐานวิทยาภายนอกและอวัยวะสืบพันธุ์ของปูเพศผู้แยกได้ชัดเจน

In. bhumibol ลักษณะเด่นของกระดอง มีความกว้างมากกว่าความยาว กระดองค่อนข้างแบนและราบต่ำ เป็นรูปสี่เหลี่ยมสอบเข้าด้านท้าย บริเวณผิวกระดองค่อนข้างขรุขระ post-orbital crest และ H-groove เป็นแอ่งชัดเจน epigastric crest ไม่คมและมีริ้วขี้ผึ้ง มีร่องรูปตัว Y หรือ middle groove แบ่งชัดเจน ฟันข้างเข้าตาไม่สูงมากเป็นรูปสามเหลี่ยมเด่นชัด และมีรอยบากแยกออกจากมุมเข้าตาด้านนอกอย่างชัดเจน ขอบ anterolateral โค้งเป็นรอยหยักและเป็นขอบสันเด่นชัด (ภาพประกอบ 10: A)

ก้ามหนีบทั้งสองข้างมีขนาดไม่เท่ากัน แต่ไม่แตกต่างกันมากนัก ผิวด้านนอกของก้ามมีลักษณะขรุขระ เป็นตุ่มเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วบริเวณ ปลายก้ามหนีบแหลมและมีสีส้มที่บริเวณปลายก้ามสุดอย่างเด่นชัด ข้อพับของก้ามหนีบมีสีแดง สีของก้ามนี้จะขึ้นอยู่กับสีของตัวปู ก้ามหนีบไม่มีหนามและไม่มีขน ฟันของก้ามหนีบเมื่อประกบกันไม่แนบสนิท ฟันเรียงกันแต่มีขนาดไม่เท่ากัน (ภาพประกอบ 10 : G) ขาเดินและอวัยวะช่วยในการกินไม่มีขน ขาเดินปล้องสุดท้าย dactylus เรียวและมีหนาม ยาวเป็น 1.1 เท่าของ propodus และสีของขาเดินขึ้นอยู่กับสีของลำตัว (ภาพประกอบ 10: H) ส่วนท้องของตัวผู้มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมฐานแคบ มีทั้งหมด 7 ปล้อง ปล้องที่ 1 และ 2 มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม ปล้องที่ 3 ขอบด้านข้างโค้งนูน ปล้องที่ 4 ถึง ปล้องที่ 7 ขอบด้านข้างเฉียงขึ้นด้านบนไปเรื่อย ๆ เป็นลักษณะสามเหลี่ยม ปล้องที่ 6 มีขนาดกว้างที่สุด ปล้องที่ 7 เป็น 3 เหลี่ยมปลายมน ขอบด้านข้างตั้งแต่ปล้องที่ 1 ถึง ปล้องที่ 7 มีขนเล็ก ๆ เรียงกันตลอดแนว (ภาพประกอบ 10: F)

อวัยวะสืบพันธุ์คู่อื่น ๆ มีฐานแคบ ด้านในเว้าเข้า ด้านนอกโค้งออกเล็กน้อย ท่อนปลายแยกออกจากท่อนฐานชัดเจน โค้งออกด้านนอก ปลายแหลมและตรงปลายสุดจุ่มลงเล็กน้อย และตั้งฉาก

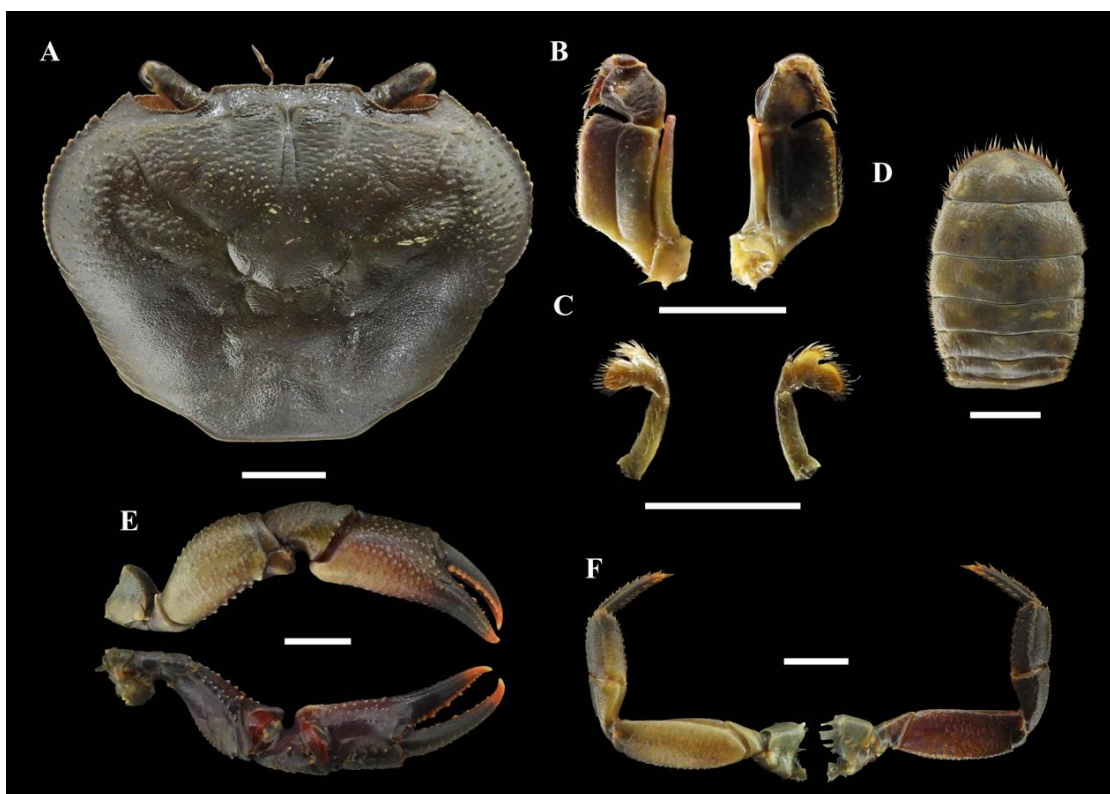
กับแนวตั้งของ อวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ความยาวเป็น 0.2 เท่า ของความยาวท่อนฐานรูปร่างเรียวยาว ยาวประมาณ 2.2 เท่า ของความกว้าง ไม่มีแผ่นพับด้านบน บริเวณ subterminal joint มีขนตามร่องเป็นแนว แต่บริเวณ terminal joint ส่วนปลายไม่มีขน (ภาพประกอบ 10: B) อวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 2 ฐานมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยม ส่วนที่ต่อจากฐานตรง ส่วนปลายบริเวณ sclerotized tube ม้วนงอ บริเวณฐานไม่มีขน (ภาพประกอบ 10: D) ปู่เพศเมียมีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายกับปูเพศผู้ แต่มีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่กว่าและส่วนหน้าท้องมีลักษณะต่างจากปูเพศผู้ (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 10 สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ *In. bhumipol*

A=carapace, B=first gonopod, C=third maxilliped, D=second gonopod, E=mandibular palp, F=abdomen, G=chelae, H=walking leg (scale bar = 1 cm)

พหุณ ปณ จิตโต ชีเว



ภาพประกอบ 11 ลักษณะนิเวศวิทยาของ *In. bhumipol*

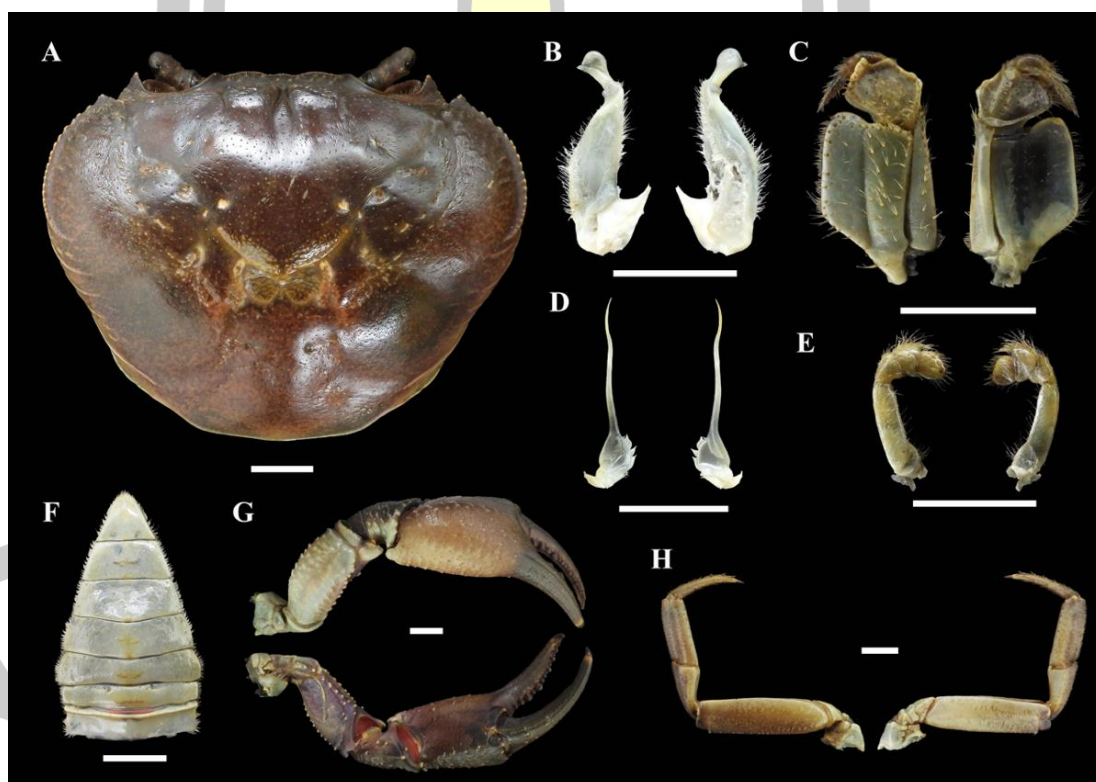
A=carapace, B=third maxilliped, C= mandibular palp, D=abdomen,
E= chelae, F=walking leg (scale bar = 1 cm)

Potamon sp. ลักษณะเด่นของกระดองมีสีเทาดำหรือสีเขียวขี้ม้า สันข้างกระดองและขอบเข้าตาเป็นสีเหลืองกระดองเป็นรูปสี่เหลี่ยมด้านหน้ามน ด้านท้ายสอบเข้า ผิวเรียบ ขอบหน้าเว้า กระดองมีความนูนเล็กน้อย บริเวณ anterolateral และ posterolateral เป็นรอยย่นและมีจุดไข่วางเรียงกัน และยกขึ้นเป็นขอบสันเล็กน้อย epigastric crest และ post-orbital crest เป็นสันเด่นชัด epigastric crest ถูกแบ่งออกจากกัน ด้วย middle groove ร่อง cervical groove และ H-groove ไม่เด่นชัด ปรากฏเป็นเพียงรอยจาง ๆ ด้านนอกของ cervical groove มีรอยปุ่มข้างละ 1 จุด และด้านใน ตรงปลาย cervical groove มีรอยปุ่มอีก ข้างละ 1 จุด และ semicircular groove เด่นชัด (ภาพประกอบ 12: A)

ก้ามหนีบ 2 ข้าง มีขนาดไม่เท่ากัน ผิวก้ามหนีบขรุขระเป็นตุ่มเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วบริเวณ ก้ามหนีบไม่มีขนและไม่มีหนาม ปลายก้ามหนีบแหลม ก้ามหนีบมีพื้นที่ขนาดไม่แตกต่างกันมากนัก ก้ามหนีบมีสีเทาดำด้านบน ส่วนด้านล่างสีเหลือง ปลายก้ามสีเหลือง เนื้อเยื่อตรงข้อพับด้านในมีสีส้มแดง (ภาพประกอบ 12: G) ขาเดิน บริเวณ dactylus เรียวยาวและแหลมมีหนามเล็ก ๆ เรียงกันเป็นแถวอยู่ทั่วปล้อง ขาเดินสีเหลืองเทา ปล้องสุดท้ายและส่วนปลายของแต่ละปล้องเป็นเหลืองส้ม ขาเดินปล้องที่ 5 กับ 6 มีขนมาก (ภาพประกอบ 12: H) ส่วนท้องของปูเพศผู้มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม

ฐานกว้าง มีทั้งหมด 7 ปล้อง ปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 ขอบด้านข้างมีลักษณะตรง ปล้องที่ 3 ขอบด้านข้างมีลักษณะโค้งนูน ปล้องที่ 4, 5 และ 6 ขอบด้านข้างมีลักษณะตรงเฉียงขึ้นด้านบน ปล้องที่ 7 มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายไม่แหลมมาก ตั้งแต่ปล้องที่ 1 จนถึงปล้องที่ 7 ขอบด้านข้างมีขนาดเล็ก ๆ เรียงกันอยู่ตลอดแนว สีของส่วนท้องมีสีที่อ่อนกว่าด้านกระดอง เป็นสีเหลืองดำ (ภาพประกอบ 12 : F)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้คู่ที่ 1 ส่วนฐานกว้างและสอบขึ้นไปด้านบนเล็กน้อย ด้านในโค้งงอมาก ด้านนอกเว้าเล็กน้อยปลายฐานคอด บริเวณส่วนปลายงอออกด้านนอก ประมาณ 45 องศา ส่วนคอเป็นปลอกแยกออกเป็นปล้องชัดเจน ด้านบนค่อนไปทางปลายสุดโป่งนูนมาก มีลักษณะเป็นรูปครึ่งวงกลม รอยพับด้านบนกว้างและเป็นปล้องชัดเจน ตรงปลายสุดแหลมคล้ายปากนก ตามร่องมีขนบิดไปตามแนว (ภาพประกอบ 12: B) อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้คู่ที่ 2 ส่วนฐานเป็นรูปหยดน้ำ และยื่นเป็นท่อนขึ้นด้านบน ท่อนปลายยาวเป็น 2 ใน 3 ของท่อนฐาน และเรียวแหลมตรง และส่วน sclerotized tube โค้งงอเล็กน้อย บริเวณฐานมีขน (ภาพประกอบ 12: D) ลักษณะสัณฐานวิทยาของปูเทศเมีย (ภาพประกอบ 13)

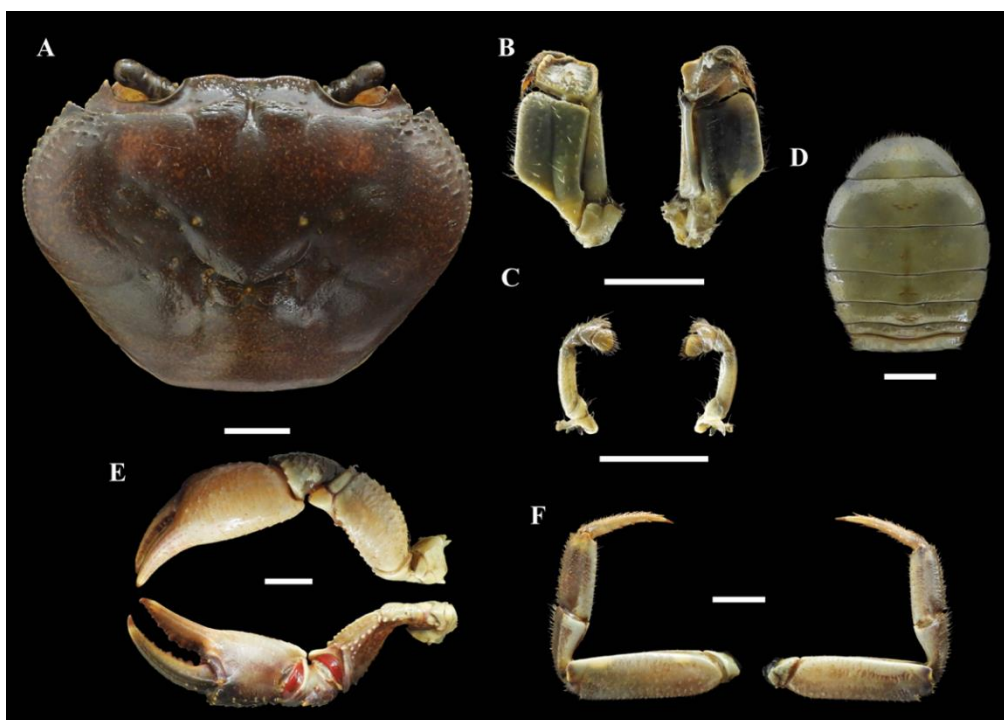


ภาพประกอบ 12 สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ *Potamon* sp.

A=carapace, B=first gonopod, C=third maxilliped,

D=second gonopod, E=mandibular palp, F=abdomen, G=chelae,

H=walking leg (scale bar = 1 cm)



ภาพประกอบ 13 สัณฐานวิทยาเพศเมียของ *Potamon* sp.

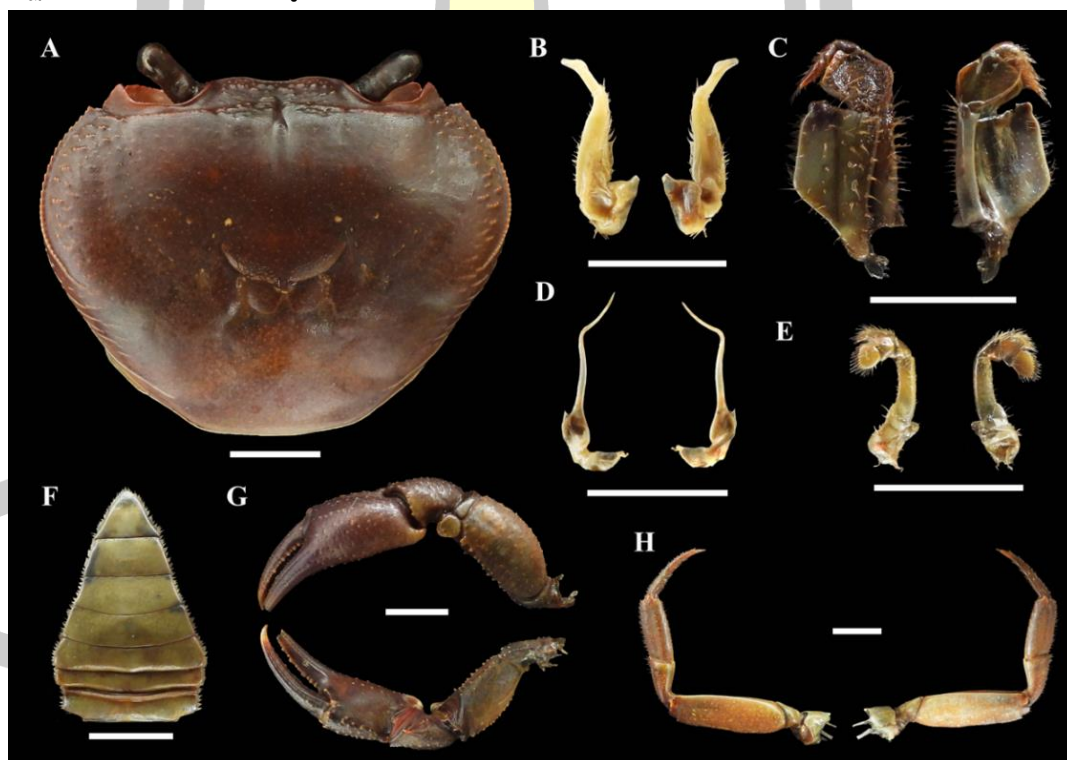
A=carapace, B=third maxilliped, C= mandibular palp, D=abdomen,
E= chelae, F=walking leg (scale bar = 1 cm)

S. somchai ลักษณะเด่น กระดองเป็นรูปสี่เหลี่ยมด้านบนมน ส่วนด้านท้ายสอบเข้า ผิวกระดองค่อนข้างเรียบ กระดองมีสีม่วงอมดำ น้ำตาลดำ สันข้างกระดองและขอบเข้าตาเป็นสีส้มเหลือง และสีส้มแดง ขอบกระดองมีฟันไม่แหลมมากเล็ก ๆ เรียงกันอยู่ posterolateral เป็นรอยย่น ขอบหน้าเว้า บริเวณ anterolateral border เป็นจุดไข่ปลาเรียงกันและยกขึ้นเป็นขอบสันชัดเจน epigastric crest และ post orbital crest เป็นสันเด่นชัด epigastric crest เป็นรอยย่นไม่คม แต่ไม่เชื่อมติดกันกับ post orbital crest สัน epigastric crest ถูกแบ่งออกจากกันด้วยร่องทแยงอย่างชัดเจน ร่อง middle groove กว้างแต่ตื้น gastric region นูนเล็กน้อย ขอบเข้าตาเป็นรูปสามเหลี่ยม ไม่แหลมมาก บริเวณส่วนหน้า front border มีปุ่มเล็ก ๆ กระจายอยู่ cervical groove และ H groove ไม่เด่นชัด ปรากฏเป็นเพียงรอยจาง ๆ บริเวณด้านในของ cervical groove มีรอยปุ่มอยู่ข้างละจุด 1 จุด ส่วน semicircular groove เด่นชัด และบริเวณปลายด้านในบริเวณ semicircular groove มีรอยปุ่มข้างละ 1 จุด เช่นกัน (ภาพประกอบ 14: A)

ก้ามหนีบสองข้างไม่เท่ากัน ผิวของก้ามหนีบมีความขรุขระเล็กน้อย ปลายก้ามหนีบแหลม ไม่มีหนามและไม่มีขน ก้ามหนีบมีฟันที่ขนาดไม่เท่ากันแต่ไม่แตกต่างกันมากนัก ก้ามหนีบมีสีม่วงเหลืองและอมส้มจาง ๆ ปลายสุดของก้ามหนีบสีเหลือง เนื้อเยื่อตรงข้อพับด้านในมีสีแดง

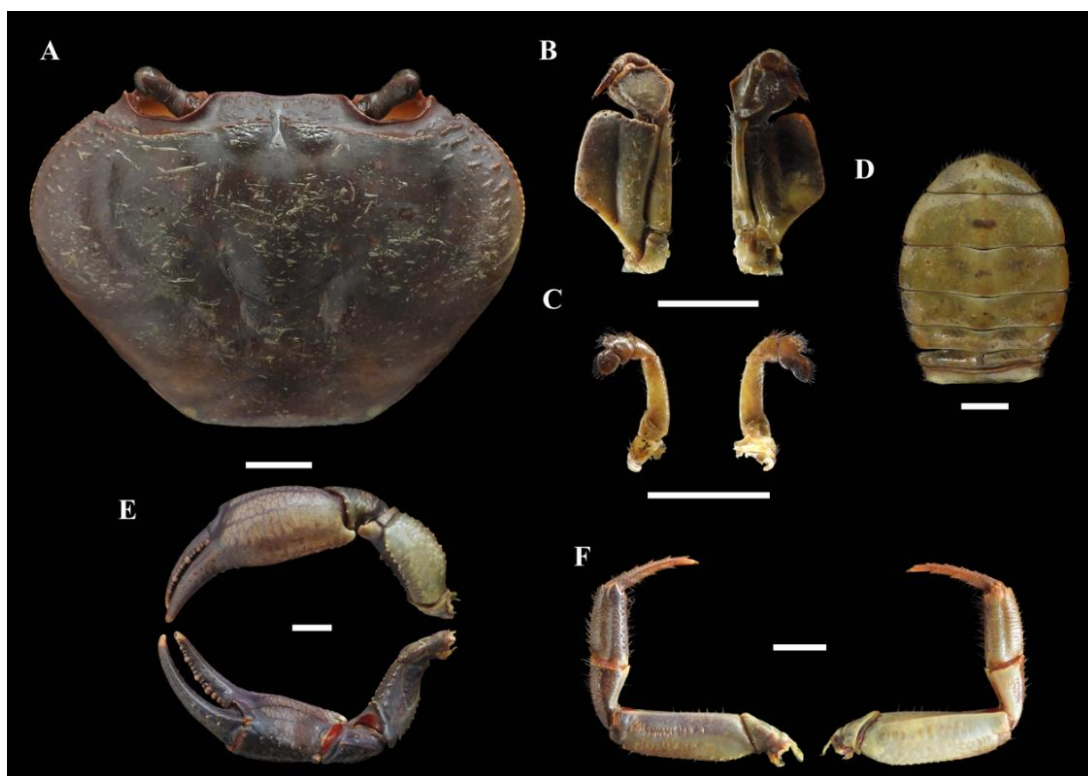
(ภาพประกอบ 14: G) ขาเดินมีลักษณะเรียวยาว ขาเดินคู่ที่ 3 ยาวกว่าคู่ที่ 2, 4 และ 5 บริเวณ propodus ไม่มีหนามแหลม ส่วนบริเวณ dactylus สุดท้ายเรียวยาวเล็กปลายแหลมมีหนามเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวอยู่ทั่วปล้อง ขาเดินสี่เหลี่ยมสั้น ปล้องสุดท้ายและส่วนปลายของแต่ละปล้องเป็นสี่เหลี่ยม ขาเดินและอวัยวะช่วยกินอาหารมีขนจำนวนมาก (ภาพประกอบ 14: H) ส่วนท้องของปูเพศผู้มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมฐานค่อนข้างกว้าง มีทั้งหมด 7 ปล้อง ขอบนอกของปล้องที่ 5 เฉียงลงด้านฐานไม่โค้งนูน ปล้องที่ 7 เป็นสามเหลี่ยมปลายมน เข้าเว้าเข้าส่วนปลายเล็กน้อย และด้านข้างตั้งแต่ปล้องที่ 1 ถึง ปล้องที่ 7 มีลักษณะคล้ายขนสั้น ๆ เรียงตัวกันอยู่ ส่วนท้องมีสีเหลือง (ภาพประกอบ 14: F)

อวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ส่วนฐานแคบและสอบขึ้นไปด้านบน ด้านในโค้งด้านนอกเว้าเล็กน้อยเกือบตรง ส่วนปลายเรียวยาวมีรอยพับด้านบนกว้างและยาวเป็นแนวขนานกัน แยกกันชัดเจน ปลายสุดทู่ ปีกข้อต่อแยกเป็นปล้องชัดเจน ปลายสุดโป่งนูนเล็กน้อย และโค้งงอเข้าด้านในประมาณ 70 องศา ตามร่องมีขนและบิดไปตามยาว (ภาพประกอบ 14: B) อวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 2 ส่วนฐานเป็นรูปสามเหลี่ยม และยื่นเป็นท่อขึ้นด้านบน ท่อนปลายยาวเป็น 1 ใน 3 ของท่อนฐาน มีรูปร่างเรียวยาวแหลมและโค้งงอปลายเขิดออกเล็กน้อย บริเวณฐานมีขน (ภาพประกอบ 14 : D) ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปูเพศเมีย (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 14 สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ *S. somchai*

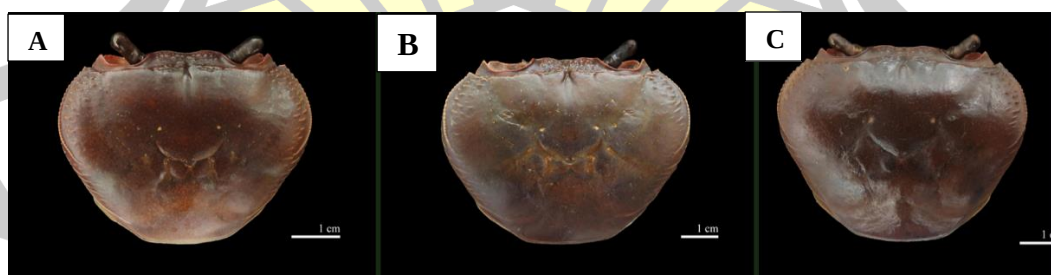
A=carapace, B=first gonopod, C=third maxilliped,
D=second gonopod, E=mandibular palp, F=abdomen,
G=chelae, H=walking leg (scale bar = 1 cm)



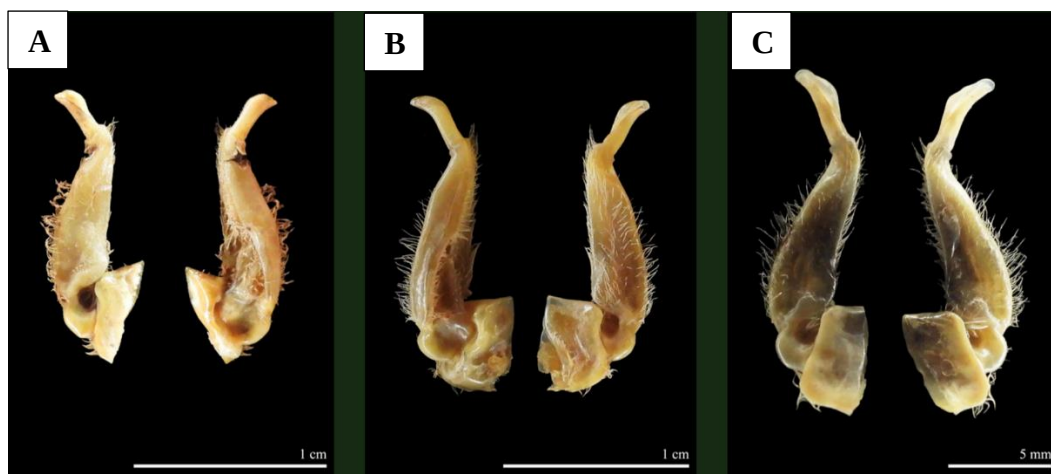
ภาพประกอบ 15 ลักษณะสัณฐานวิทยาเพศเมียของ *S. somchaii*

A=carapace, B=third maxilliped, C= mandibular palp,
D=abdomen, E= chelae, F=walking leg (scale bar = 1 cm)

ลักษณะสัณฐานวิทยากายนอกของปูภูเขาสกุล *Setosamon* ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดโดยใช้เพียงลักษณะของกระดอง ก้ามหนีบ ขาเดิน ส่วนท้อง และอวัยวะช่วยกินได้ (ภาพประกอบ 16) ต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้เป็นหลักในการจัดจำแนกชนิด ลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ของ *S. ubon*, *S. somchaii* และ *S. sakon* (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 16 ลักษณะกระดองของ A = *S. somchaii*, B= *S. ubon*, C= *S. sakon*



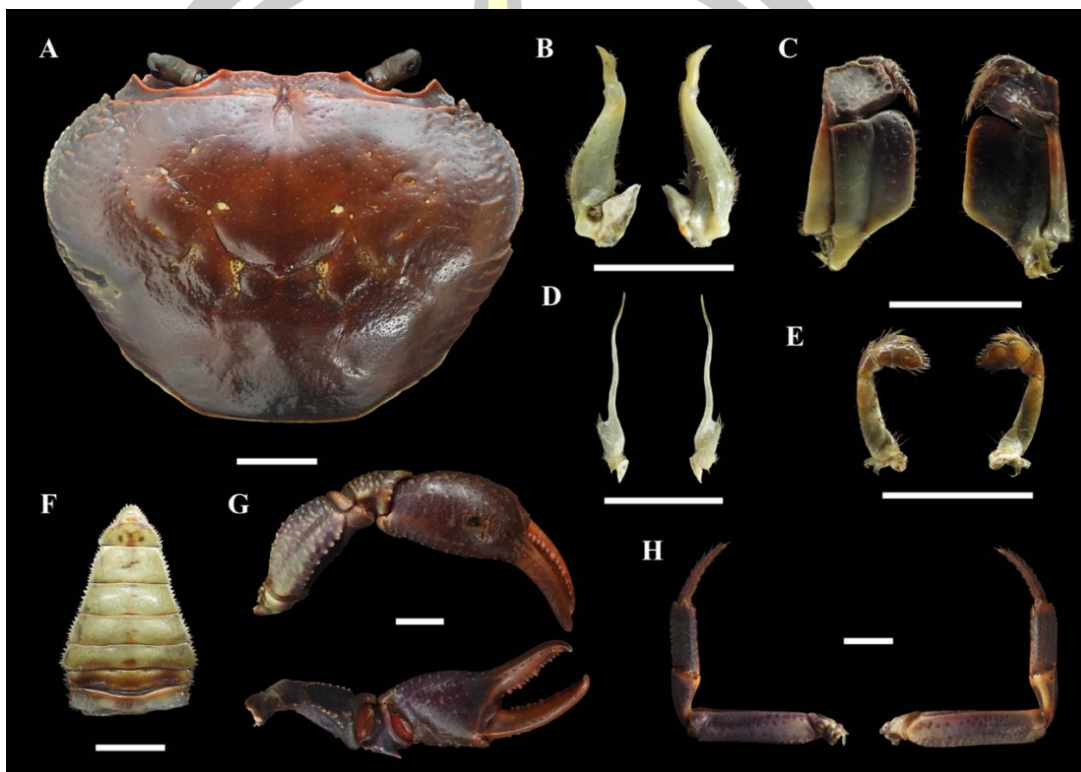
ภาพประกอบ 17 อวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ของ A = *S. somchai*, B = *S. ubon*, C = *S. sakon*

E. yotdomense กระจกเป็นรูปสี่เหลี่ยมด้านหน้าเว้า และสอบเข้าด้านท้าย กระจกมีสีน้ำตาลดอมแดง สันข้างกระจกและขอบเข้าตาเป็นสีแดงส้มชัดเจน กระจกมีลักษณะค่อนข้างแบน บริเวณ gastric region หนุนขึ้นเล็กน้อย ผิวกระจกค่อนข้างเรียบ บริเวณ antero-lateral เป็นจุดไข่ปลาเรียงกันและยกขึ้นเป็นขอบสันชัดเจน บริเวณ antero-lateral มีรอยย่นเป็นขีด ๆ epigastric crest และ post-orbital crest เป็นสันเด่นชัดเชื่อมติดกัน epigastric crest ถูกแบ่งออกจากกันด้วย middle groove ร่อง middle groove แคบแต่ลึก ร่อง cervical groove และ H-groove ไม่เด่นชัด ปรากฏเป็นเพียงรอยจาง ๆ semicircular groove เด่นชัดและบริเวณด้านใกล้ปลายมีรอยบวมอยู่ข้างละ 1 จุด (ภาพประกอบ 18: A)

ก้ามหนีบสองข้างมีขนาดไม่เท่ากัน ผิวของก้ามหนีบขรุขระเล็กน้อย ก้ามหนีบมีฟันที่ขนาดไม่แตกต่างกันมากนัก ก้ามหนีบเวลาหนีบเกือบแนบสนิทกัน ปลายก้ามหนีบแหลมและงอเข้าเล็กน้อย ก้ามหนีบมีสีม่วงแดงอมส้ม ปลายก้ามมีสีน้ำตาลส้ม เนื้อเยื่อตรงข้อพับด้านในมีแดงส้ม ก้ามหนีบไม่มีขนและไม่มีหนาม (ภาพประกอบ 18: G) ขาเดินมีลักษณะเรียวยาว ขาเดินคู่ที่ 3 ยาวกว่าคู่ที่ 2, 4 และ 5 ปล้องที่ 4 propodus ไม่มีหนามปลายปล้อง ส่วนปล้องสุดท้าย dactylus จะเรียวยาวเล็กปลายแหลม มีหนามเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวอยู่ทั่วปล้อง ขาเดินมีสีม่วงอมสีเหลืองส้ม ปล้องสุดท้ายและส่วนปลายของแต่ละปล้องเป็นสีส้ม (ภาพประกอบ 18: H) ส่วนท้องของปูเพศผู้มีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมฐานกว้าง มีทั้งหมด 7 ปล้อง ปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 มีขนาดแคบกว่าปล้องที่ 3 และปล้องที่ 3 ขอบปล้องมีลักษณะโค้งนูน และมีขนาดยาวที่สุด ปล้องที่ 7 เป็นสามเหลี่ยมใกล้บริเวณส่วนปลายโค้งเข้าเล็กน้อย ปลายสุดของปล้องที่ 7 มน ตั้งแต่ปล้องที่ 1 จนถึง ปล้องที่ 7 ด้านขอบข้างปล้องมีขนเรียงยาวตลอดแนว (ภาพประกอบ 18: F)

อวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ส่วนฐานกว้างแต่ไม่มากและสอบขึ้นไปด้านบน ด้านในโค้งเล็กน้อย ด้านนอกตรงฐานนูนและถัดขึ้นมาเว้า ส่วนปลายมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยวด้านหลังโป่งออก

เล็กน้อยและมีขนเล็ก ๆ เรียงกันอยู่ด้านบน รอยพับด้านบนไม่กว้างมากแต่เป็นปล้องชัดเจน ปลายสุดมีลักษณะแหลม ส่วนคอเป็นปลอกแยกออกเป็นปล้องเด่นชัด ตรงกลางไปถึงปลายสุดโค้งเข้าด้านในตามร่องมีขนและบิดไปตามยาว (ภาพประกอบ 18: B) อวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 2 ส่วนฐานเป็นรูปสี่เหลี่ยมด้านหนึ่งเว้า และด้านหนึ่งนูน ยื่นเป็นท่อขึ้น ด้านบน ท่อนปลายยาวเป็น 1 ใน 3 ของท่อนฐาน และเรียวยาวขึ้นด้านบน โค้งงอเล็กน้อย มีขนที่บริเวณฐาน (ภาพประกอบ 18: D)



ภาพประกอบ 18 สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ *E. yotdomense*

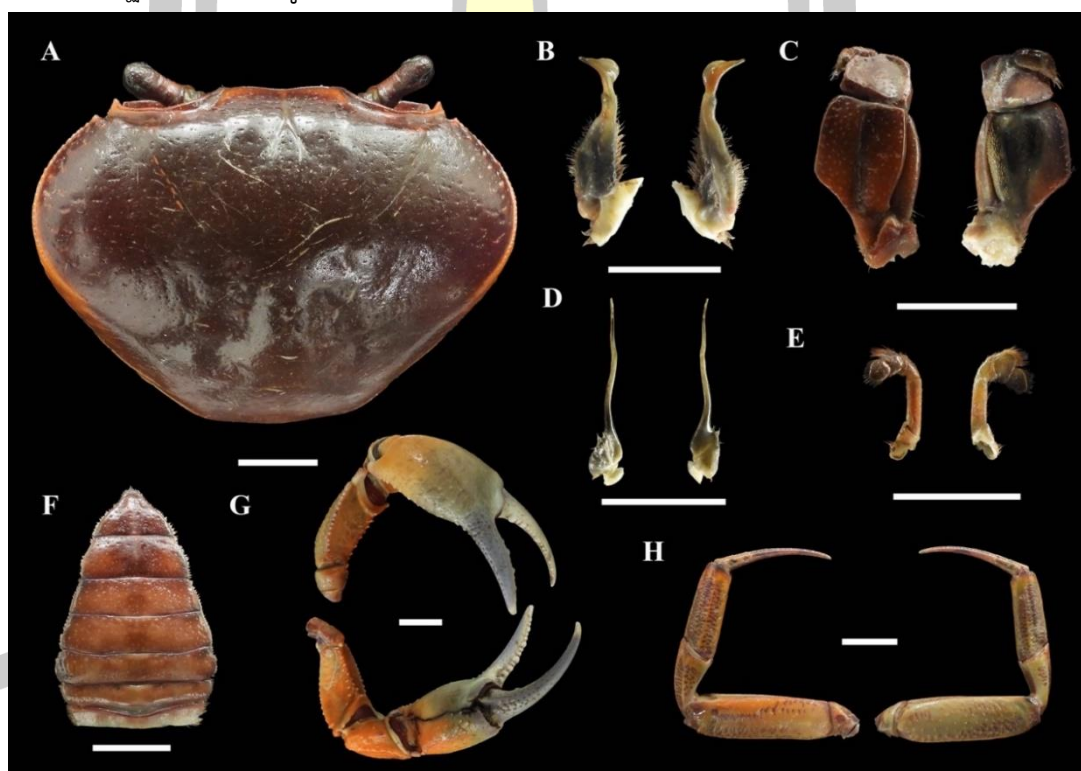
A=carapace, B=first gonopod, C=third maxilliped,
D=second gonopod, E=mandibular palp, F=abdomen,
G=chela, H=walking leg (scale bar = 1 cm)

Pudaengon thatphanom กระดองเป็นรูปไข่ โค้งนูน ผิวเรียบเป็นมัน ขอบหน้าตรง บริเวณ antero-lateral border เป็นจุดไข่ปลาเรียงกันและยกขึ้นเป็นขอบสันชัดเจน epigastric crest ไม่เด่นชัด ส่วน post-orbital crest เด่นชัด epigastric crest ถูกแบ่งออกจากกันด้วย middle groove ร่อง cervical groove และ semicircular groove เด่นชัด ร่อง H-groove ไม่เด่นชัดปรากฏเป็นเพียงรอยจาง ๆ กระดองมีสีน้ำตาลปนส้ม สันข้างกระดองและขอบเข้าตา เป็นสีส้ม กระดองกว้างประมาณ 40 - 60 มิลลิเมตร (ภาพประกอบ 19: A)

ก้ามหนีบผิวเรียบ ขรุขระเฉพาะด้านบน นิ้วสั้นกว่าฝ่ามือ ด้านในของปล้องที่ 5 มีหนาม ด้านใน 1 อัน ก้ามหนีบมีฟันที่ขนาดไม่แตกต่างกันมากนัก ก้ามหนีบมีสีเหลืองส้มจาง ๆ ปลายก้ามสีขาว

เนื้อเยื่อตรงข้อพับด้านในมีสีส้มแดง (ภาพประกอบ 19: G) ขาเดินจะมีลักษณะเรียวยาว ขาเดินคู่ที่ 3 ยาวกว่าคู่ที่ 2, 4 และ 5 ปล้องที่ 4 ยาว ไม่มีหนามที่ตรงปลายปล้อง ส่วนปล้องสุดท้ายจะเรียวเล็ก ปลายแหลม ไม่มีหนาม ขาเดินสีเหลืองส้มปล้องสุดท้ายสีครีม และส่วนปลายของแต่ละปล้องเป็นสีส้ม (ภาพประกอบ 19: G) ส่วนท้องของปูเพศผู้มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ขอบนอกของปล้องที่ 6 โค้งเข้าเล็กน้อย (ภาพประกอบ 19: H)

อวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ส่วนฐานไม่กว้างและสอบขึ้นไปด้านบนด้านในโค้งมีรอยหยัก 1 ที่ ด้านนอกเว้าเล็กน้อย ส่วนปลายโป่งนูนออก รอยต่อระหว่างส่วนฐานกับส่วนปลายด้านในมีหยักนูนเป็นรูปสี่เหลี่ยม ปลายสุดเรียวแหลมโค้งงอจากส่วนฐานและเขี้ยวขึ้นข้างบน (ภาพประกอบ 19: B) อวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 2 ส่วนฐานเป็นรูปหยดน้ำและนูนออกเท่า ๆ กัน ทั้ง 2 ข้าง และยื่นเป็นท่อเกือบตรงขึ้น ด้านบน ท่อนปลายยาวเป็น 1 ใน 2 ของท่อนฐาน และเรียวแหลมชี้ขึ้นด้านบน (ภาพประกอบ 19: D) ลักษณะสัณฐานวิทยาของปูแดงเพศเมีย (ภาพประกอบ 20)

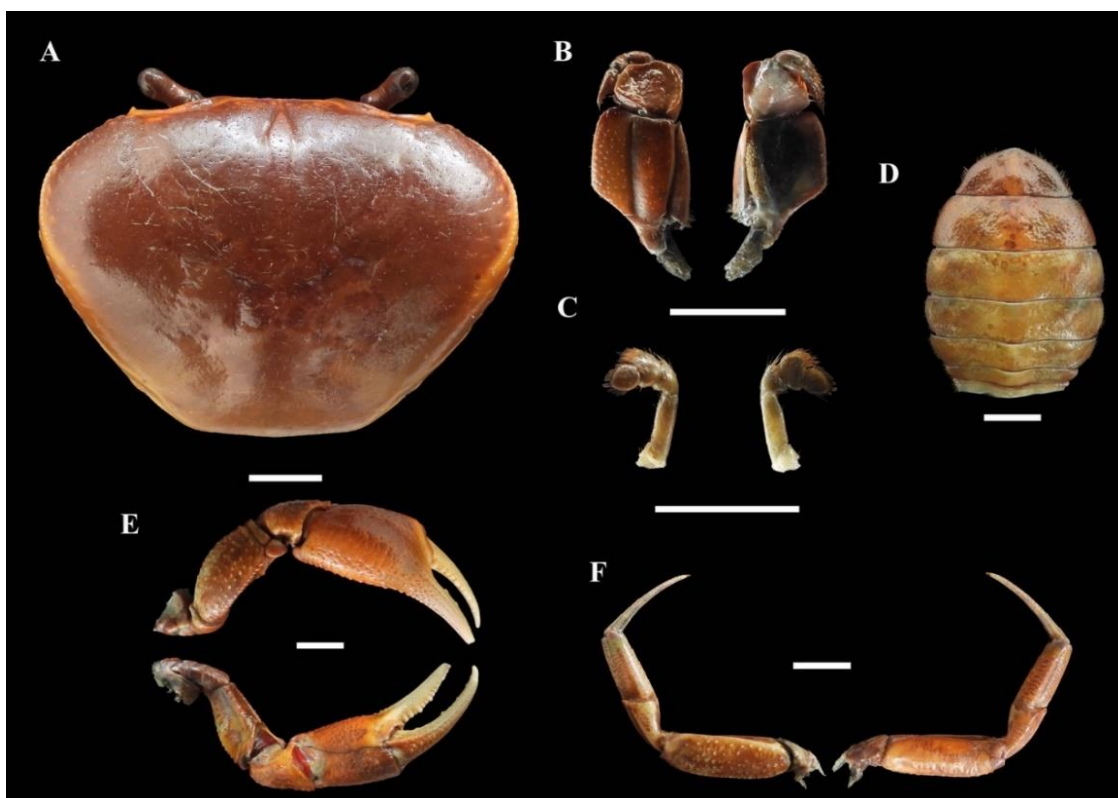


ภาพประกอบ 19 สัณฐานวิทยาเพศผู้ของ *Pudaengon thatphanom*

A=carapace, B=first gonopod, C=third maxilliped,

D=second gonopod, E=mandibular palp, F=abdomen,

G=chelae, H=walking leg (scale bar = 1 cm)

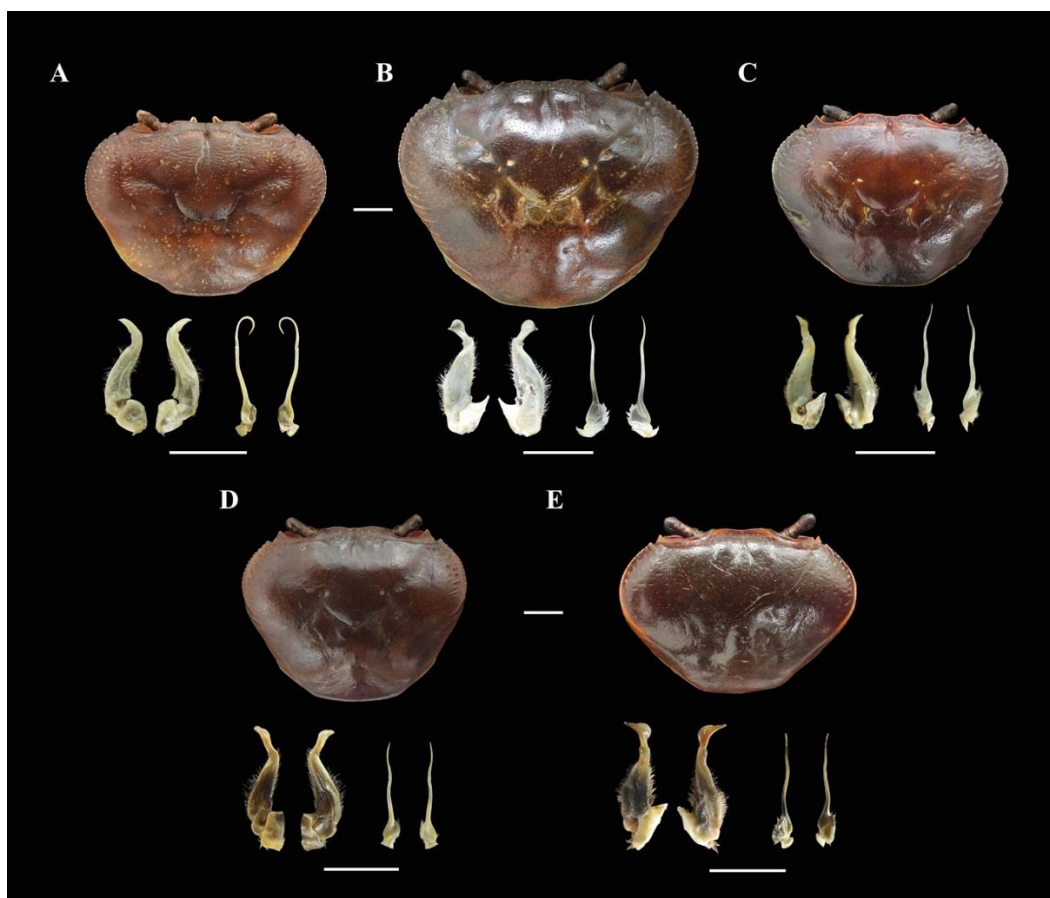


ภาพประกอบ 20 สัณฐานวิทยาเพศเมียของ *Pudaengon thatphanom*

A= carapace, B= third maxilliped, C= mandibular palp,

D= abdomen, E= chelae, F= walking leg (scale bar = 1 cm)

กระดองของปูภูเขา *In. bhumibol* (ภาพประกอบ 21: A) สามารถจัดจำแนกออกจาก *Potamon* sp., *E. yotdomense*, *S. somchai* และ *Pudaengon thatphanom* ได้อย่างชัดเจน ผิวกระดอง *In. bhumibol* มีลักษณะขรุขระ และกระดองค่อนข้างราบต่ำ ส่วน *Potamon* sp., *E. yotdomense*, *S. somchai* และ *P. thatphanom* มีผิวกระดองที่เรียบและมัน และสามารถแยก *P. thatphanom* (ภาพประกอบ 21: E) ซึ่งเป็นปูแดงได้ด้วยลักษณะกระดองที่สอบเข้าด้านท้ายมาก ขอบกระดองค่อนข้างเรียบไม่มีรอยหยักฟันปลา และไม่มีร่องบริเวณหลัง ส่วน *Potamon* sp., *E. yotdomense* และ *S. somchai* มีลักษณะกระดองคล้ายกันมากที่สุด แต่สามารถแยกได้ด้วยสีของกระดอง และสีบริเวณขอบตา *E. yotdomense* (ภาพประกอบ 21: C) มีกระดองสีดำแดง และมีขอบตาสีแดงส้มชัดเจน ต่างจาก *Potamon* sp. (ภาพประกอบ 21: B) ที่มีกระดองสีเขียวขี้ม้าอมดำ เหลือง และขอบตามีสีเหลือง *S. somchai* (ภาพประกอบ 21: D) มีสีกระดองค่อนข้างหลากหลาย และมีขอบตาส้มเหลือง เหลืองอ่อน ไม่เป็นเอกลักษณ์ที่เด่นชัด แต่สามารถจัดจำแนกได้โดยใช้วิธีวาระ สืบพันธุ์คู่ที่ 1



ภาพประกอบ 21 ภาพเปรียบเทียบกระดองของปูวงศ์ Potamidae และอวัยวะสืบพันธุ์

A= *In. bhumibol*, B= *Potamon* sp., C= *E. yotdomense*,
D= *S. somchai*, และ E= *P. mukdahan* (scale bar = 1 cm)

ขนาดของกระดองของปูเขาทั้ง 5 ชนิด มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน ชนิดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ *Potamon* sp. เก็บจากภูมิจังหวัดอุบลราชธานี มีค่าเฉลี่ยความกว้างของกระดอง 6.08 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยความยาวของกระดอง 4.93 เซนติเมตร ปูที่มีขนาดเล็กที่สุดที่พบ คือ *In. bhumibol* เก็บตัวอย่างจากภาคอีสานจังหวัดชัยภูมิ ค่าเฉลี่ยความกว้างของกระดอง 4.69 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยความยาวของกระดอง 3.65 เซนติเมตร ส่วน *S. somchai* มีค่าเฉลี่ยของขนาดกระดองที่ใกล้เคียงกัน และค่าเฉลี่ยของขนาดกระดองที่มากที่สุดพบใน *S. somchai* ที่ทำการเก็บตัวอย่างที่ภูพานจังหวัดสกลนคร มีค่าเฉลี่ยความกว้างของกระดอง 5.49 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยความยาวของกระดอง 4.33 เซนติเมตร และ *S. somchai* ที่มีค่าเฉลี่ยของขนาดกระดองน้อยที่สุด คือ ตัวอย่างที่เก็บจากภูผาแดงจังหวัดมุกดาหาร มีค่าเฉลี่ยความกว้างของกระดอง 4.57 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยความยาวของกระดอง 3.56 เซนติเมตร *E. yotdomense* เก็บตัวอย่างจากเขาพนมรุ้ง มีค่าเฉลี่ย

ความกว้างของกระดอง 4.94 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยความยาวของกระดอง 3.82 เซนติเมตร มีขนาดค่าเฉลี่ยของกระดองใกล้เคียงกับ *S. somchai* ดังตารางที่ 3

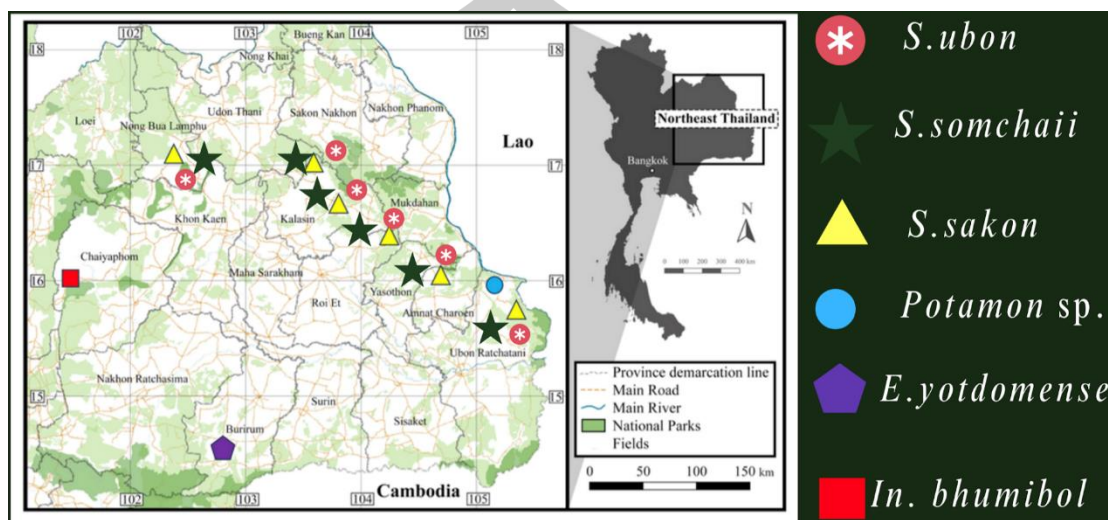
ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดกระดองปูภูเขาแต่ละพื้นที่

ชนิด	พื้นที่	สีของกระดอง	ค่าเฉลี่ยของกระดอง $\pm$ SD.	
			CW (cm)	CL (cm)
<i>S. somchai</i>	PF(KSN)	ดำม่วง, น้ำตาลอมม่วง	5.19 $\pm$ 0.56	4.17 $\pm$ 0.36
<i>S. somchai</i>	PPK(YST)	น้ำตาลอมม่วง, น้ำตาลเหลือง	4.91 $\pm$ 0.63	3.92 $\pm$ 0.48
<i>S. somchai</i>	PPD(MDH)	น้ำตาลเหลือง, น้ำตาลอมม่วง	4.57 $\pm$ 0.79	3.56 $\pm$ 0.82
<i>S. somchai</i>	PPK(MDH)	น้ำตาลดำอมม่วง	4.70 $\pm$ 0.28	3.83 $\pm$ 0.32
<i>S. somchai</i>	PPN(NBP)	น้ำตาลดำอมม่วง	5.16 $\pm$ 0.57	4.09 $\pm$ 0.44
<i>S. somchai</i>	PP(SKN)	น้ำตาลดำอมเหลือง, ดำม่วง	5.49 $\pm$ 0.28	4.33 $\pm$ 0.27
<i>S. somchai</i>	PDT(UBN)	น้ำตาลอมเหลือง, น้ำตาลม่วง	4.86 $\pm$ 0.28	3.91 $\pm$ 0.23
<i>S. somchai</i>	PKS(ACR)	ดำอมม่วง	4.88 $\pm$ 0.54	3.91 $\pm$ 0.31
<i>In. bhumibol</i>	PDC(CPM)	ดำอมม่วง, น้ำตาลดำ	4.69 $\pm$ 0.41	3.65 $\pm$ 0.28
<i>E. yotdomense</i>	PNR(BRM)	ดำอมแดง	4.94 $\pm$ 0.23	3.82 $\pm$ 0.15
<i>Potamon</i> sp.	PK(UBN)	เขียวขี้ม้าอมเหลือง	6.08 $\pm$ 0.41	4.93 $\pm$ 0.37

4.3 ผลการศึกษาการกระจายตัวของปูเขาวงศ์ *Potamidae* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จากการเก็บปูเขาวงศ์ *Potamidae* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ในเขตบริเวณ 3 เทือกเขา ได้แก่ เทือกเขาภูพานครอบคลุมพื้นที่ 7 จังหวัด เทือกเขาพนมดงรัก จังหวัดและเทือกเขาเพชรบูรณ์ 1 จังหวัด ทั้งหมด 9 จังหวัด 11 พื้นที่ ตัวอย่างทั้งหมด 101 ตัว พบปูเขาวงศ์ *Potamidae* ทั้งหมด 6 ชนิด คือ *In. bhumibol*, *Potamon* sp., *E. yotdomense*, *S. somchai*, *S. ubon* และ *S. sakon* ปูภูเขาชนิด *In. bhumibol* พบที่ภักดีชุมพล จังหวัดชัยภูมิ เขตเทือกเขาเพชรบูรณ์ ปูภูเขาชนิด *E. yotdomense* พบที่เขาคันทรง จังหวัดบุรีรัมย์ เขตเทือกเขาพนมดงรัก ปูภูเขาชนิด *Potamon* sp.พบที่ภูผามิ่ง จังหวัดอุบลราชธานี และปูภูเขาชนิด *S. somchai* พบว่ากระจายตัวทั้งหมด 7 จังหวัด 8 พื้นที่ ได้แก่ ภูพานน้อย จังหวัดหนองบัวลำภู ภูพาน จังหวัดสกลนคร ภูแฝก จังหวัดกาฬสินธุ์ ภูผากุด ภูผาแดง จังหวัดมุกดาหาร ภูผาขาว จังหวัดยโสธร ภูเกษตร จังหวัดอำนาจเจริญ และภูด่านทอง จังหวัดอุบลราชธานี พบปูชนิด *S. somchai* กระจายตัวอยู่ในเขตเทือกเขาภูพานทั้งหมด *E. yotdomense* พบในเขตเทือกเขาพนมดงรัก และปูภูเขาชนิด *In.*

bhumibol พบในเขตเทือกเขาเพชรบูรณ์ ที่เป็นรอยต่อระหว่างจังหวัดเพชรบูรณ์ กับจังหวัดชัยภูมิ ส่วนปูภูเขาชนิด *Potamon* sp. พบในเขตเทือกเขาภูพาน พบเพียงจุดเดียว (ภาพประกอบที่ 22)



ภาพประกอบ 22 แผนที่การกระจายของปูภูเขวงศ์ Potamidae ที่ทำการศึกษา

เมื่อได้ข้อมูลการกระจายตัวของตัวอย่างที่เก็บได้แล้ว นำผลของข้อมูลมาเปรียบเทียบกับรายงานของ Niyanetr (1998) และสัญญา ศุภจินตรา (2545) พบว่า *S. somchai* ถูกพบครั้งแรกที่จังหวัดนครพนม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และมีรายงานการกระจายตัวที่ จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดสกลนคร จังหวัดอุดรธานี และจังหวัดมุกดาหาร จากการศึกษาพบว่า มีการกระจายตัวเพิ่มอีก 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู ยโสธร อำนาจเจริญ และอุบลราชธานี ปูภูเขาชนิด *E. yotdomense* ถูกพบครั้งแรกที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฮาดิโดม จังหวัดอุบลราชธานี และมีการกระจายตัวอยู่ที่จังหวัดศรีสะเกษ การศึกษาครั้งนี้พบ *E. yotdomense* ที่เขาพนมรุ้ง จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นการกระจายตัวเพิ่ม 1 จังหวัด *Potamon* sp. ถูกพบที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฮาดิโดม จังหวัดอุบลราชธานี และตัวอย่าง *Potamon* sp. ถูกเก็บที่ภูซ้อง จังหวัดอุบลราชธานีเช่นกัน ส่วน *In. bhumibol* เป็นสัตว์ประจำถิ่นที่จังหวัดเลย ถูกพบครั้งแรกที่จังหวัดเลย มีการกระจายตัวที่จังหวัดขอนแก่น และอุดรธานี การศึกษาครั้งนี้พบ *In. bhumibol* ที่อำเภอภักดีชุมพล จังหวัดชัยภูมิ (ดังตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการศึกษาเกี่ยวกับรายงานการกระจายของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ชนิด	รายงานของ Niyanetr (1998) และสัญญา ศุภจันทร์ (2545)	ผลการศึกษา
<i>S. somchai</i>	นครพนม กาฬสินธุ์ สกลนคร อุดรธานี มุกดาหาร	หนองบัวลำภู สกลนคร กาฬสินธุ์ มุกดาหาร ยโสธร อำนาจเจริญ อุบลราชธานี
<i>S. ubon</i>	ไม่มีรายงาน	หนองบัวลำภู สกลนคร กาฬสินธุ์ มุกดาหาร ยโสธร อำนาจเจริญ อุบลราชธานี
<i>S. sakon</i>	ไม่มีรายงาน	หนองบัวลำภู สกลนคร กาฬสินธุ์ มุกดาหาร ยโสธร อำนาจเจริญ อุบลราชธานี
<i>E. yotdomense</i>	อุบลราชธานี ศรีสะเกษ	บุรีรัมย์
<i>Potamon sp.</i>	อุบลราชธานี	อุบลราชธานี
<i>In. bhumibol</i>	เลย ขอนแก่น อุดรธานี	ชัยภูมิ

4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขาวงศ์ Potamidae

4.4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

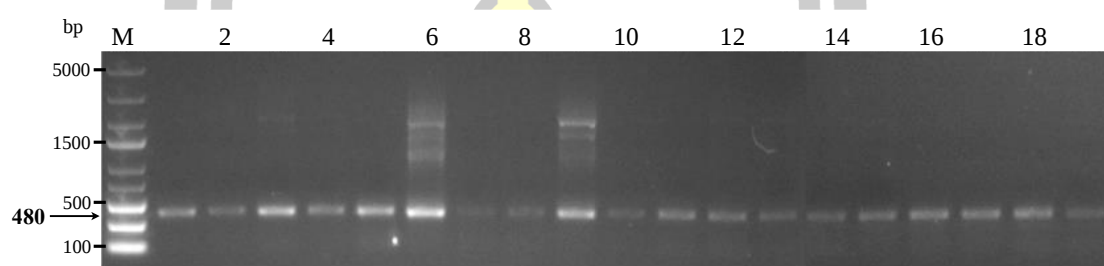
สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อโดยใช้ TIANamp Genomic DNA Kit (ประเทศจีน) สามารถสกัดได้ เมื่อนำผลการสกัดดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์โดย Nano drop โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หรือค่า Optical density ที่ 260 nm (OD260) และ 280 nm (OD280) ทดสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เพื่อดูการปนเปื้อนของโปรตีน แล้วคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 260/280 nm ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเออยู่ช่วงประมาณ 1.8 ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และมีบางตัวอย่างมีดีเอ็นเอน้อยกว่า 1.6 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน

4.4.2 การเพิ่มปริมาณ Genomic DNA โดยเทคนิค PCR

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขาวงศ์ Potamidae พบว่า 16SrDNA เป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพราะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างได้ทุกพื้นที่ที่ทำการศึกษา รองลงมา คือ COI สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงบาง

พื้นที่เท่านั้น ดังนั้น 16SrDNA จึงเป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปูภูเขาวงศ์ Potamidae

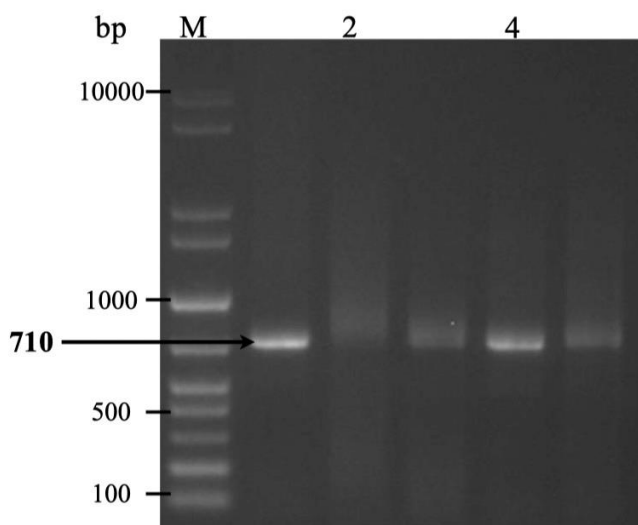
ตรวจสอบคุณภาพผลผลิต PCR ด้วย 1% gel electrophoresis พบว่าขนาดของผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ 16SrDNA ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae มีขนาดเท่ากันทุกชนิด คือ 480 bp (ภาพประกอบ 23) และขนาดของ ด้วยไพรเมอร์ COI มีขนาด 710 bp (ภาพประกอบ 24) ขนาดของผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ 16SrDNA มีขนาดสั้นกว่าขนาดของผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ COI (ภาพประกอบ 25) สังเกตจากการเรืองแสงของตัวอย่างผลผลิต PCR ผ่านแสง Ultraviolet พบว่าตัวอย่างผลผลิต PCR ที่ได้มีคุณภาพเพียงพอต่อการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพประกอบ 23 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae โดยใช้ไพรเมอร์ 16SrDNA

- Lane M = 100 bp DNA ladder
- Lane 1 - 9 = *S. somchai*
- Lane 10 - 12 = *Potamon* sp.
- Lane 13 - 16 = *E. yotdomense*
- Lane 17 - 18 = *In. bhumibol*
- Lane 19 = *P. thatphanom*

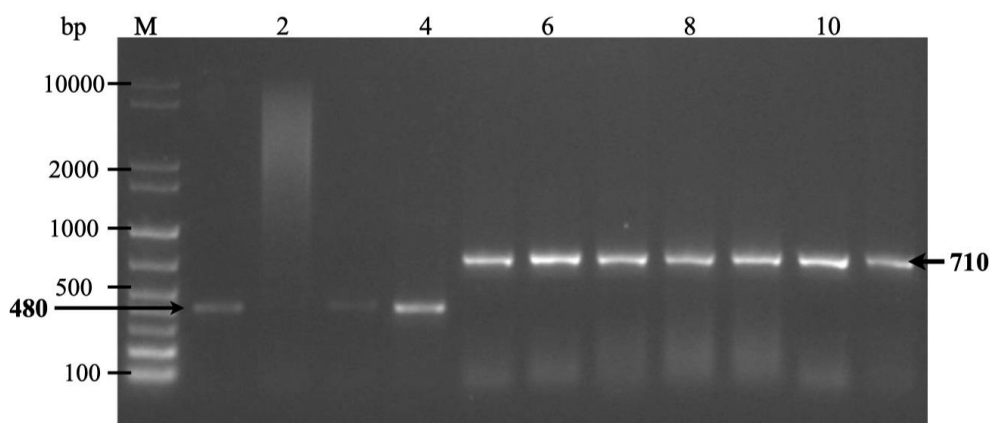
พูน ปณ จิต ชีเว



ภาพประกอบ 24 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของปูภูเขางศ์ Potamididae โดยใช้ไพรเมอร์ COI

Lane M = 100 bp DNA ladder

Lane 1 - 5 = *S. somchai*



ภาพประกอบ 25 เปรียบเทียบขนาดของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของปูภูเขางศ์ Potamididae โดยใช้ไพรเมอร์ 16SrDNA และ COI

Lane M = 100 bp DNA ladder

Lane 1 - 4 = ไพรเมอร์ 16S ขนาด 480 bp

Lane 5 - 7 = *S. somchai* (COI)

Lane 8 - 9 = *E. yotdomense* (COI)

Lane 10 - 11 = *Potamon* sp. (COI)

4.4.3 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการนำผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16S rDNA และ COI ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ผลดังตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16SrDNA ของปูภูเขา วงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (F)
<i>S. somchai</i> PPN(NBP)7	ATGCCTTACTGGATCTTGATGATGGTTGGACAAAAGAAAACCTCTCTTTAAATTAATTTTG AATTTAACTTTTAAAGTGAAGGCTTAAATATTCTAAAGGGACGATAAGACCCTATAAAAC TTTATATTGTAATTATATTTAATTGATTTTACATAATAAAAAATTAATTTAATGATTTATTA TGTTGGGGAGACATGAGTAAAAATAATTTTTAACTGCTTATAAAATATACAATTATAATTG GATGAATAATAGATCCTTTTAAAGATTAAAAGATCAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTA ATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGACAAAGAAGATTGCGACCTCAATTGGTTTGGCATGA
<i>E. yotdomense</i> PNR(BRM)3	TTTTATTGAATCTTGATGATGGTTGGACAAAAGAAAACCTCTCTTTAAATTAATTTTGAAT TTAACTTTTAAAGTGAAGGCTTAAATATTCTAAAGGGACGATAAGACCCTATAAACTTT ATATTGTAATTATATATAATTAATTTTATTAATAAAAAATTTAATTTAATTATTATTATGTT GGGGAGACATAAGTAAATAGTATTTTAACTGCTTATAAAAGTATACAATTATAAATGAAT ATTAAAAGATCCTTTATTAAGATTAAAAGATTAAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATTT CTTTTGAGAGTTCTTATCGAAAGAGAAGGTTGCGACCTCGATTGTTGGCTAATA
<i>Potamon</i> sp. PK(UBN)10	GATGGGTGGACAAAGAAAACCTCTCTTTAAATTAATTTTGAATTTAACTTTTAAAGTGA GGCTTAAATATTCTAAAGGGACGATAAGACCCTATAAACTTTATATTGTAATTATATTTA ATTGATTTTGTAATATAAAAAATTTAATTTTGTATTATTATGTTGGGGGACATGAGTAAA AATAGTTTTAACTGCTTATAAAATATACAGTAATAATTGAATGATAAGAGATCCTTTATTAA GATTAAGATTAAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATTTCTTTTGAGAGTTCTTATCGA AAAAGAAGGTTGCGACCTCGATGTTGGCATAA
<i>In. bhumibol</i> PDC(CPM)1	TGGATTTATTAGATCTCGTATGATGGTTGGACAAAAGAAATCTTTCTTTGTAATAATTTT GAATTTAACTTTTAAAGTGAAGGCTTAAATGTCCCAGGGGACGATAAGACCCTATAAAA CTTTACATTGTAGTTTAAATTTAATTTAATTTATTTGATAAAAGTTAATTAGATTATATGT TATGTTGGGGAGACAAAGGTAAATTTATTTAACTGCTTTAGGAGTTTAAACAGTCATTGT TGGATGTAATAGATCCTTTTAAAGATTATTAAGTTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTA ATTTCTTTTAAAGATTCTTATCGAAAAGGAAGATTGCGACCTCAAGGGTTGGT
<i>P. thatphanom</i>	TTGAATCTTGATGATGGTTGGACAAAAGAAAACCTCTCTTTAAATTAATTTTGAATTTAAC TTTTAAGTGAAGGCTTAAATTTTTTAAAGACGATAAGACCCTATAAACTTTATATT GTAGTTAAATTCATTAAGTTTATAAATTAAGAATTTAATTTAATTATTATTATGTTGGGG AGACATAGGTAAAATAATTTTAACTGCTTAAAAATATACATTTATAATTGAATGAGTAA GAGATCCTTTTTAAAGATTAGAAGATTAAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATTTCTTT GAGAGTTCTTATCGAAAAGTAGATTGCGACCTCAAGGGTTTGGC

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ COI ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (F)
<i>S.somchai</i> PPD(MDH)1	TAACTTGGATCTCCAGGTGCATGAGCTGGAATAGTAGGAACATCATTAAAGTTTAATTATTCGTAC TGAATTAAGACAACCAGGAAGTTTAAATGGTAATGACCAAATCTATAACGTAGTAGTAACATGCACA TGCTTTTGAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGACTTATT CCTTTAATATTAGGTGCGCCAGATATAGCATTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGACTGCTT CCACCTTCTTTAACATTACTTTTAATAAGAGGAATAGTAGAAAGAGGAATTGGAACAGGATGAAC GTATATCCTCCTCTTGCTGCTGCTATTGCCATGCAGGAGCTTCAGTCGATATAGGTATTTTTCT TTACATTTAGCTGGTGTATCCTCAATTCTAGGAGCAGTTAATTTTATAACAACAGTAATCAATATAC GATCATATGGGATAACCATAGACCAAATACCTTTATTTGTATGAGCAACTTTTATTACAGTAATTTT ACTTCTTCTTTCTTCCAGTTTATAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACAGACCGTAATTTAAAT ACATCTTTTTTGTACCTGCTGGAGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTG GTCACCTGGAAGTTATACAAA
<i>Potamon</i> sp. PK(UBN)11	ATTTTGGTCCCTGAGTTTATGGTCAACAAATCATAAAGATATTGGTGATTTTTTGGTCACCTGAA GTTTACAGGTCAGAAGTCTAATTGGTAATGACCAAATCTATAATGTAGTAGTAACGCTCATGCTT TTGTAATAATTTTTTTATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGACTTATCCCTTT AATATTAGGTGCTCCAGATATAGCATTCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGACTTCTTCCCTCT TCCTTAACACTACTTTTAATAAGAGGTATAGTAGAAAGAGGAATTGGAACAGGATGAACCGTTTAT CCTCCTCTTGAGCTGCTATCGCTCATGCAGGAGCTTCAGTTGATATAGGTATTTTTCTTTACAC TTAGCTGGTGTATCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATAACAACAGTAATTAACATACGATCT TATGGTATAACCATAGATCAAATACCTTTATTTGTATGGGCAACTTTTATTACAGTAATTTTACTTT TACTTTCTTCCAGTTTATAGCTGGTGCAATTACTATATTATTAACAGACCGTAATTTAAATACATC TTTTTTGTACCTGCTGGAGGTGGAGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCAC CCCTGGAAGTATAAAA
<i>E. yotdomense</i> PNR(BRM)9	CTAGATTCTGTAGCCCAACATATTAGGAACATCTTTAATGGTTTAATTATTCGTGCTGAGTTAAGA CAACCAGGAAATTTGATTGGTAATGATCAAATTTATAATGTAGTAGTAACGCTCATGCTTTTGTA ATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGACTAATTCCTTTAATAT TAGGTGCTCCTGATATAGCATTCCCACGAATAAATAACATAAGATTTTGATTACTTCCACCTTCTTT AACATTACTTTTAATAAGAGGTATAGTAGAAAGGGGAATTGGAACAGGATGAACGTTTACCCTCC ACTTGAGCTGCTATTGCTCAGCAGGAGCCTCAGTTGATATAGGTATTTTTCTTTACATTTAGC TGGTGTATCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTATAACTACAGTAATTAATATACGATCCTATGGT ATAACCATAGATCAAATACCTTTATTCGTATGAGCAACTTTTATTACAGTAATTTTACTTCTTCTTT CTCTTCCAGTTTATAGCTGGTGCTATTACTATATTATGACAGACCGTAATTTAAATACATCTTTTTT TGACCCTGCTGGAGGTGGGGACCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCCGG GAAGTTATAAAGGT

4.4.4 ผลการตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ด้วยยีน 16S และ COI มาตรวจสอบความคล้ายคลึงชนิด โดยโปรแกรม BlastN ในฐานข้อมูล Genbank NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *E. yotdomense* มีความคล้ายคลึงกับนิวคลีโอไทด์ของ *E. yotdomense* มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 99.36 (ตารางที่ 7) *S. somchai* คล้ายคลึงกับ *Larnaudia beusekomae* มากที่สุดร้อยละ 95.28 (ตารางที่ 8 และตารางที่ 9) *In. bhumibol* คล้ายคลึงกับ *In. bhumibol* มากที่สุดร้อยละ 93.61 (ตารางที่ 10) และ *Potamon* sp. คล้ายคลึงกับ *Parapotamon spinescens* มากที่สุดร้อยละ 90.71 (ตารางที่ 11) และเมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ของยีน COI กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank พบว่า *Potamon* sp.V คล้ายคลึงกับ *Parapotamon spinescens* ทั้งยีน 16S และ COI เท่ากับร้อยละ 90.71 *E. yotdomense* คล้ายคลึงกับ *Apotamonautes hainanensis* และ *S. somchai* คล้ายคลึงกับ *Sinolapotamon* sp. ร้อยละ 89.32 และร้อยละ 89.76 ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *E. yotdomense* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์	ผลจากการเปรียบเทียบชนิดที่คล้ายคลึง (Identity)	ร้อยละความคล้ายคลึง	accession number
PNR(BRM)3	<i>E. yotdomense</i>	99.36	AB428485.1
PNR(BRM)5	<i>E. yotdomense</i>	98.88	AB428485.1
PNR(BRM)9	<i>E. yotdomense</i>	99.13	AB428485.1

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. somchai* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์	ผลจากการเปรียบเทียบชนิดที่คล้ายคลึง (Identity)	ร้อยละความคล้ายคลึง	accession number
PPN(NBP)2	<i>L. beusekomae</i>	94.38	FN543460.1
PPN(NBP)4	<i>L. beusekomae</i>	94.38	FN543460.1
PPN(NBP)7	<i>L. beusekomae</i>	94.61	FN543460.1
PP(KSN)5	<i>L. beusekomae</i>	94.27	FN543460.1

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. somchai* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN (ต่อ)

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์	ผลจากการเปรียบเทียบชนิดที่คล้ายคลึง (Identity)	ร้อยละความคล้ายคลึง	accession number
PP(SKN)7	<i>L. beusekoma</i>	94.38	FN543460.1
PP(SKN)8	<i>L. beusekoma</i>	94.61	FN543460.1
PF(KSN)4	<i>L. beusekoma</i>	94.38	FN543460.1
PF(KSN)8	<i>L. beusekoma</i>	94.07	FN543460.1
PF(KSN)10	<i>L. beusekoma</i>	94.80	FN543460.1
PPD(MDH)1	<i>L. beusekoma</i>	94.19	FN543460.1
PPD(MDH)6	<i>L. beusekoma</i>	94.12	FN543460.1
PPD(MDH)10	<i>L. beusekoma</i>	95.28	FN543460.1
PPK(MDH)1	<i>L. beusekoma</i>	94.54	FN543460.1
PPK(MDH)2	<i>L. beusekoma</i>	93.50	FN543460.1
PPK(YST)2	<i>L. beusekoma</i>	93.80	FN543460.1
PPK(YST)5	<i>L. beusekoma</i>	93.46	FN543460.1
PPK(YST)11	<i>L. beusekoma</i>	94.52	FN543460.1
PKS(ACR)3	<i>L. beusekoma</i>	94.40	FN543460.1
PKS(ACR)5	<i>L. beusekoma</i>	93.77	FN543460.1
PKS(ACR)9	<i>L. beusekoma</i>	92.8	FN543460.1
PDT(UBN)2	<i>L. beusekoma</i>	93.80	FN543460.1
PDT(UBN)4	<i>L. beusekoma</i>	94.54	FN543460.1
PDT(UBN)28	<i>L. beusekoma</i>	94.52	FN543460.1

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *In. bhumibol* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์	ผลจากการเปรียบเทียบชนิดที่คล้ายคลึง (Identity)	ร้อยละความคล้ายคลึง	accession number
PDC(CPM)1	<i>In. bhumibol</i>	93.14	NC_050694.1
PDC(CPM)2	<i>In. bhumibol</i>	93.61	NC_050694.1

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Potamon* sp. กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank NCBI โดยโปรแกรม BlastN

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์	ผลจากการเปรียบเทียบชนิดที่คล้ายคลึง	ร้อยละความคล้ายคลึง	accession number
PK(UBN) 6	<i>Parapotamon spinescens</i>	90.57	AB428485.1
PK(UBN) 8	<i>Parapotamon spinescens</i>	90.71	AB428485.1
PK(UBN) 11	<i>Sinolapotamon</i> sp.	90.00	AB428485.1

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ของยีน COI กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์	ผลจากการเปรียบเทียบชนิดที่คล้ายคลึง	ร้อยละความคล้ายคลึง	accession number
<i>Potamon</i> sp.	<i>Parapotamon spinescens</i>	90.71	MN737144.1
<i>E. yotdomense</i>	<i>Apotamonautes hainanensis</i>	89.32	MN737137.1
<i>S. somchai</i>	<i>Sinolapotamon</i> sp.	89.76	OP425672.1

4.4.6 ผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของปูภูเขาวงศ์ Potamidae

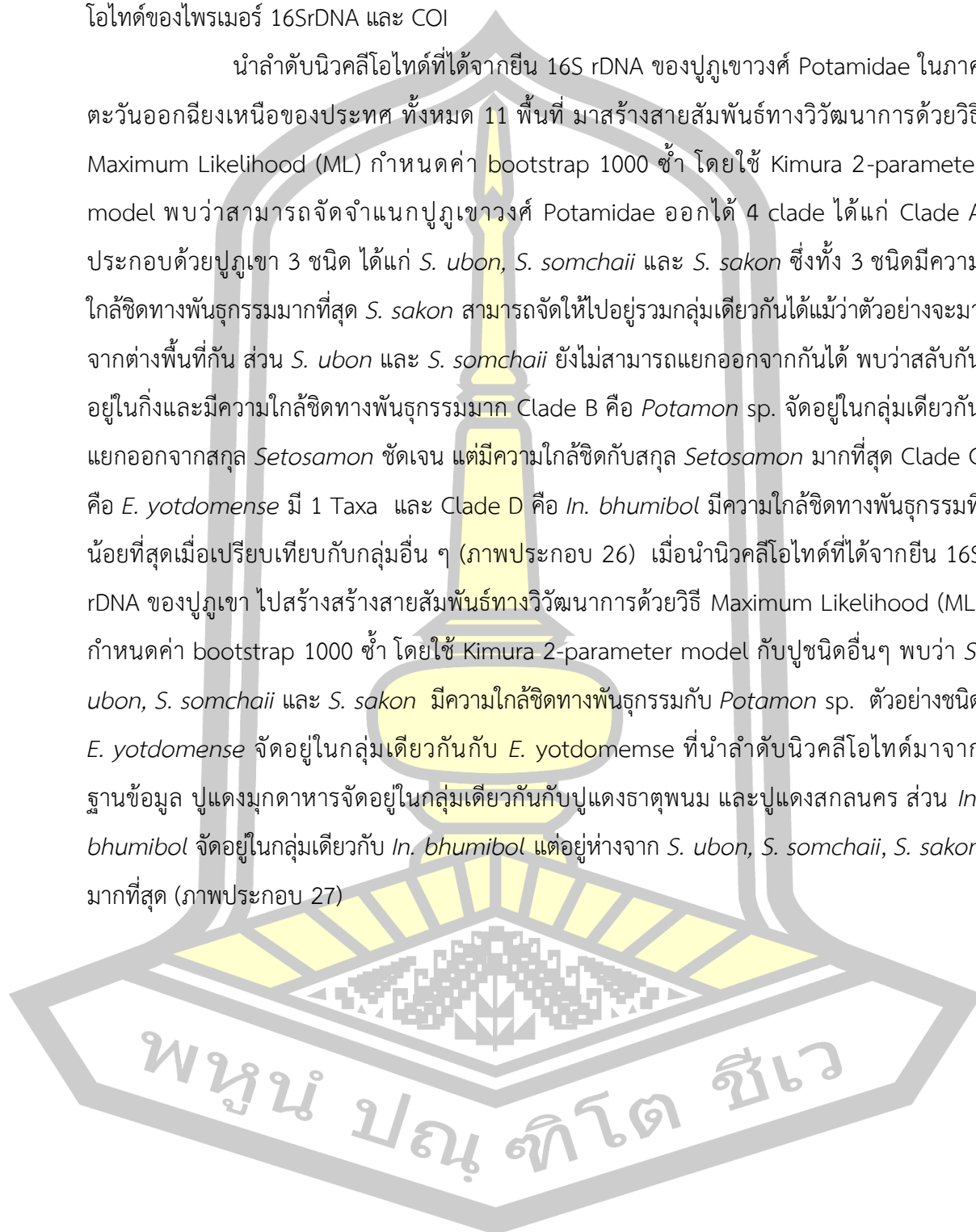
ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยทั้งหมด 11 พื้นที่ เมื่อทำการเปรียบเทียบระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเดียวกัน (Intraspecies) พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของ *S. somchai* มีค่าระหว่าง 0.000 - 0.0133 ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของ *Potamon* sp. มีค่าระหว่าง 0.000 - 0.0660 ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของ *E. yotdomense* มีค่าระหว่าง 0.000 - 0.0066 และระยะห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของ *In. bhumibol* คือ 0.0000 และเมื่อเปรียบเทียบระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดต่างกัน (Interspecies) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด *S. somchai* กับชนิด *E. yotdomense* มีค่าระหว่าง 0.0620 - 0.0513 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด *S. somchai* กับชนิด *Potamon* sp. มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0694 - 0.0585 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด *S. somchai* กับชนิด *In. bhumibol* มีค่าระหว่าง 0.1853 - 0.1765 พบว่า *In. bhumibol* มีระยะห่างทางพันธุกรรมต่างจากทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด (ตารางที่ 13)

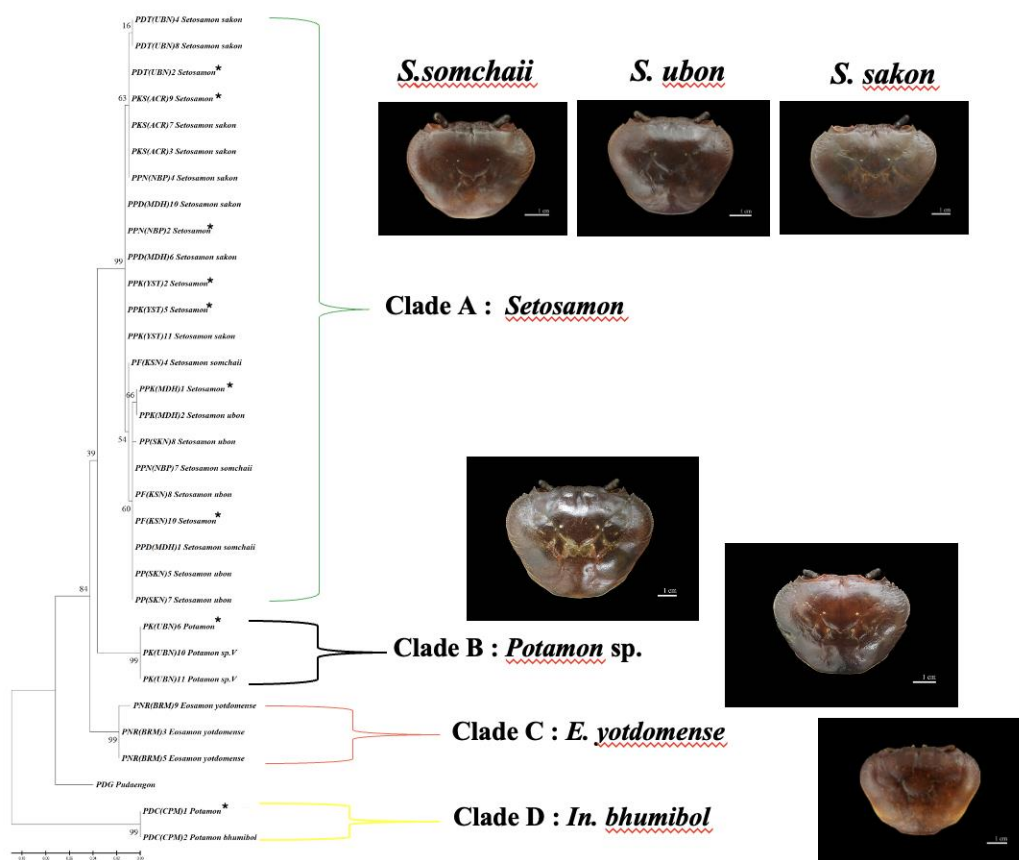
ตารางที่ 13 ระยะห่างทางพันธุกรรมของปูเขาโดยใช้ไพรเมอร์ 16S rDNA วงศ์ Potamidae จากลำดับนิวคลีโอไทด์

	PPN2	PPN4	PPN7	PKS3	PKS7	PKS9	PF4	PF8	PF10	PPD1	PPD6	PPD10	PPK11	PPK42	PP5	PP7	PP8	PD72	PD74	PD78	PPK2	PPK5	PPK11	PNR3	PNR5	PNR9	PK6	PK10	PK11	PD11	PD12	PDG
PPN2																																
PPN4	0.0033																															
PPN7	0.0066	0.0100																														
PKS3	0.0033	0.0000	0.0100																													
PKS7	0.0033	0.0000	0.0100	0.0000																												
PKS9	0.0033	0.0000	0.0100	0.0000	0.0000																											
PF4	0.0033	0.0066	0.0033	0.0066	0.0066																											
PF8	0.0066	0.0100	0.0000	0.0100	0.0100	0.0000	0.0033																									
PF10	0.0066	0.0100	0.0000	0.0100	0.0100	0.0000	0.0033	0.0000																								
PPD1	0.0066	0.0100	0.0000	0.0100	0.0100	0.0000	0.0033	0.0000	0.0000																							
PPD6	0.0000	0.0033	0.0066	0.0033	0.0033	0.0033	0.0033	0.0066	0.0066																							
PPD10	0.0000	0.0033	0.0066	0.0033	0.0033	0.0033	0.0033	0.0066	0.0066	0.0000																						
PPK11	0.0100	0.0133	0.0033	0.0133	0.0133	0.0033	0.0066	0.0033	0.0033	0.0033	0.0100	0.0100																				
PPK42	0.0100	0.0133	0.0033	0.0133	0.0133	0.0033	0.0066	0.0033	0.0033	0.0033	0.0100	0.0100	0.0000																			
PP5	0.0066	0.0100	0.0000	0.0100	0.0100	0.0000	0.0033	0.0000	0.0000	0.0000	0.0066	0.0066	0.0033	0.0033																		
PP7	0.0066	0.0100	0.0000	0.0100	0.0100	0.0000	0.0033	0.0000	0.0000	0.0000	0.0066	0.0066	0.0033	0.0033	0.0000																	
PP8	0.0100	0.0133	0.0033	0.0133	0.0133	0.0033	0.0066	0.0033	0.0033	0.0033	0.0100	0.0100	0.0066	0.0066	0.0033	0.0033																
PD72	0.0033	0.0000	0.0100	0.0000	0.0000	0.0000	0.0066	0.0100	0.0100	0.0100	0.0033	0.0033	0.0033	0.0033	0.0133	0.0133	0.0133															
PD74	0.0066	0.0033	0.0133	0.0033	0.0033	0.0033	0.0100	0.0133	0.0133	0.0133	0.0066	0.0066	0.0167	0.0167	0.0133	0.0133	0.0167	0.0033														
PD78	0.0066	0.0033	0.0133	0.0033	0.0033	0.0033	0.0100	0.0133	0.0133	0.0133	0.0066	0.0066	0.0167	0.0167	0.0133	0.0133	0.0167	0.0033	0.0000													
PPK2	0.0000	0.0033	0.0066	0.0033	0.0033	0.0033	0.0066	0.0000	0.0066	0.0066	0.0000	0.0000	0.0000	0.0100	0.0066	0.0066	0.0100	0.0033	0.0066	0.0066												
PPK5	0.0000	0.0033	0.0066	0.0033	0.0033	0.0033	0.0066	0.0000	0.0066	0.0066	0.0000	0.0000	0.0000	0.0100	0.0066	0.0066	0.0100	0.0033	0.0066	0.0066	0.0000											
PPK11	0.0000	0.0033	0.0066	0.0033	0.0033	0.0033	0.0066	0.0000	0.0066	0.0066	0.0000	0.0000	0.0000	0.0100	0.0066	0.0066	0.0100	0.0033	0.0066	0.0066	0.0000	0.0000										
PNR3	0.0513	0.0548	0.0513	0.0548	0.0548	0.0548	0.0548	0.0513	0.0513	0.0513	0.0513	0.0513	0.0513	0.0548	0.0513	0.0513	0.0548	0.0548	0.0548	0.0548	0.0513	0.0513	0.0513									
PNR5	0.0513	0.0548	0.0513	0.0548	0.0548	0.0548	0.0548	0.0513	0.0513	0.0513	0.0513	0.0513	0.0513	0.0548	0.0513	0.0513	0.0548	0.0548	0.0548	0.0548	0.0513	0.0513	0.0513	0.0000								
PNR9	0.0584	0.0620	0.0584	0.0620	0.0620	0.0620	0.0584	0.0584	0.0584	0.0584	0.0584	0.0584	0.0584	0.0620	0.0584	0.0584	0.0620	0.0620	0.0620	0.0620	0.0584	0.0584	0.0066	0.0066								
PK6	0.0585	0.0621	0.0585	0.0621	0.0621	0.0621	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0621	0.0585	0.0585	0.0621	0.0621	0.0621	0.0621	0.0585	0.0585	0.0588	0.0588	0.0660							
PK10	0.0585	0.0621	0.0585	0.0621	0.0621	0.0621	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0621	0.0585	0.0585	0.0621	0.0621	0.0621	0.0621	0.0585	0.0585	0.0588	0.0588	0.0660	0.0000						
PK11	0.0585	0.0621	0.0585	0.0621	0.0621	0.0621	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0585	0.0621	0.0585	0.0585	0.0621	0.0621	0.0621	0.0621	0.0585	0.0585	0.0588	0.0588	0.0660	0.0000	0.0000					
PD11	0.1765	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1765	0.1765	0.1853	0.1853	0.1809	0.1809	0.1853	0.1809	0.1853	0.1853	0.1765	0.1765	0.1765	0.1857	0.1857	0.1855	0.1839	0.1839	0.1839	0.1839	0.1839	0.0000
PD12	0.1765	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1809	0.1765	0.1765	0.1853	0.1853	0.1809	0.1809	0.1853	0.1809	0.1853	0.1853	0.1765	0.1765	0.1765	0.1857	0.1857	0.1855	0.1839	0.1839	0.1839	0.1839	0.1839	0.0000
PDG	0.0875	0.0913	0.0875	0.0913	0.0913	0.0875	0.0875	0.0875	0.0875	0.0875	0.0875	0.0875	0.0875	0.0913	0.0875	0.0875	0.0913	0.0913	0.0913	0.0913	0.0875	0.0875	0.0875	0.0841	0.0841	0.0841	0.0895	0.0895	0.0895	0.0895	0.0895	0.1774

4.4.7 การสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรีย 16S rDNA และ COI

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน 16S rDNA ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทั้งหมด 11 พื้นที่ มาสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap 1000 ซ้ำ โดยใช้ Kimura 2-parameter model พบว่าสามารถจัดจำแนกปูภูเขาวงศ์ Potamidae ออกได้ 4 clade ได้แก่ Clade A ประกอบด้วยปูภูเขา 3 ชนิด ได้แก่ *S. ubon*, *S. somchai* และ *S. sakon* ซึ่งทั้ง 3 ชนิดมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด *S. sakon* สามารถจัดให้ไปอยู่รวมกลุ่มเดียวกันได้แม้ว่าตัวอย่างจะมาจากต่างพื้นที่กัน ส่วน *S. ubon* และ *S. somchai* ยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้ พบว่าสลับกันอยู่ในกิ่งและมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก Clade B คือ *Potamon* sp. จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันแยกออกจากสกุล *Setosamon* ชัดเจน แต่มีความใกล้ชิดกับสกุล *Setosamon* มากที่สุด Clade C คือ *E. yotdomense* มี 1 Taxa และ Clade D คือ *In. bhumibol* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (ภาพประกอบ 26) เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน 16S rDNA ของปูภูเขา ไปสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap 1000 ซ้ำ โดยใช้ Kimura 2-parameter model กับปูชนิดอื่นๆ พบว่า *S. ubon*, *S. somchai* และ *S. sakon* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *Potamon* sp. ตัวอย่างชนิด *E. yotdomense* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *E. yotdomense* ที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากฐานข้อมูล ปูแดงมุกดาหารจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับปูแดงธาตุพนม และปูแดงสกลนคร ส่วน *In. bhumibol* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *In. bhumibol* แต่อยู่ห่างจาก *S. ubon*, *S. somchai*, *S. sakon* มากที่สุด (ภาพประกอบ 27)

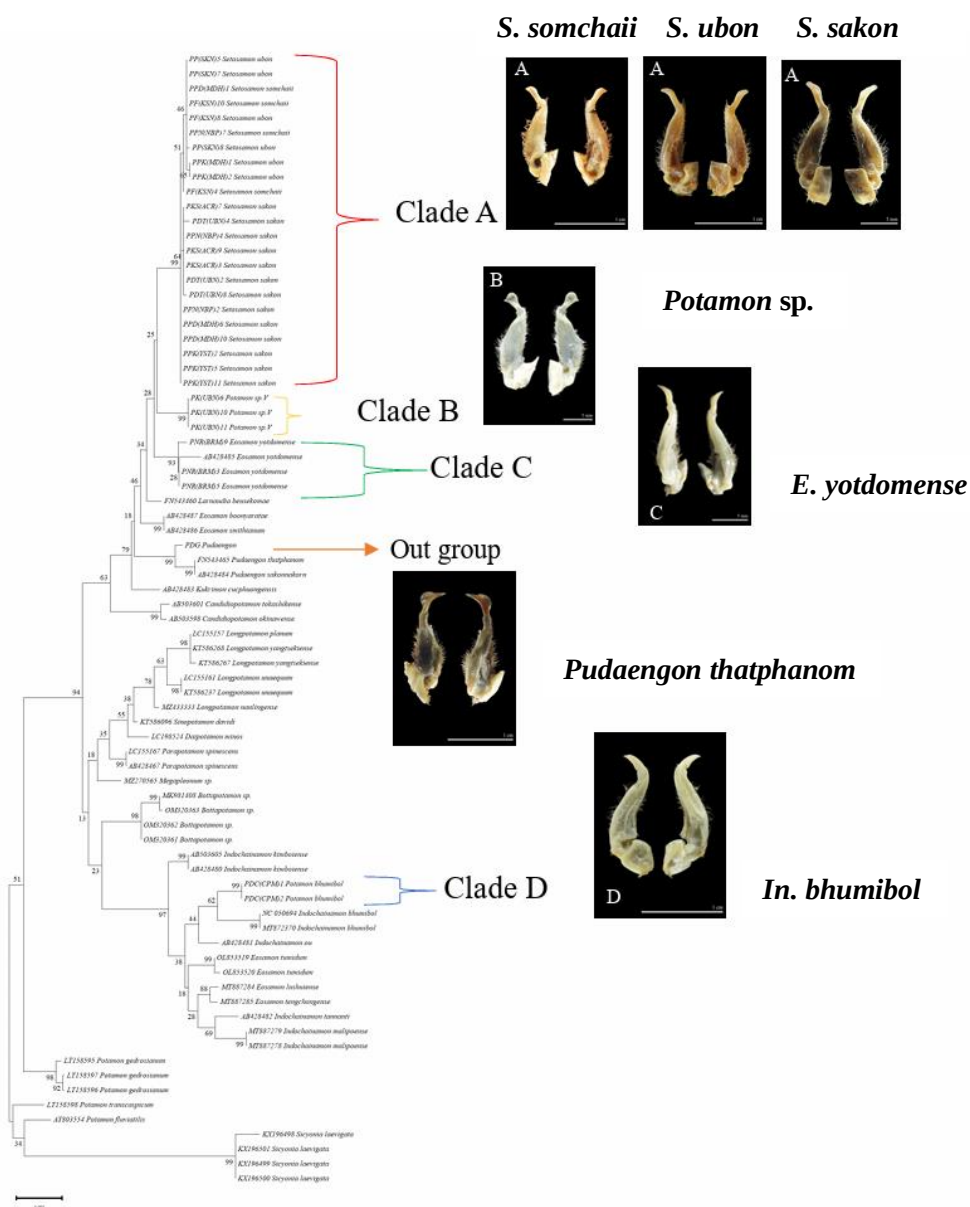




ภาพประกอบ 26 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rDNA ของปูเขาวงศ์ Potamidae ทั้ง 4 ชนิด สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap 1000

ซ้ำ

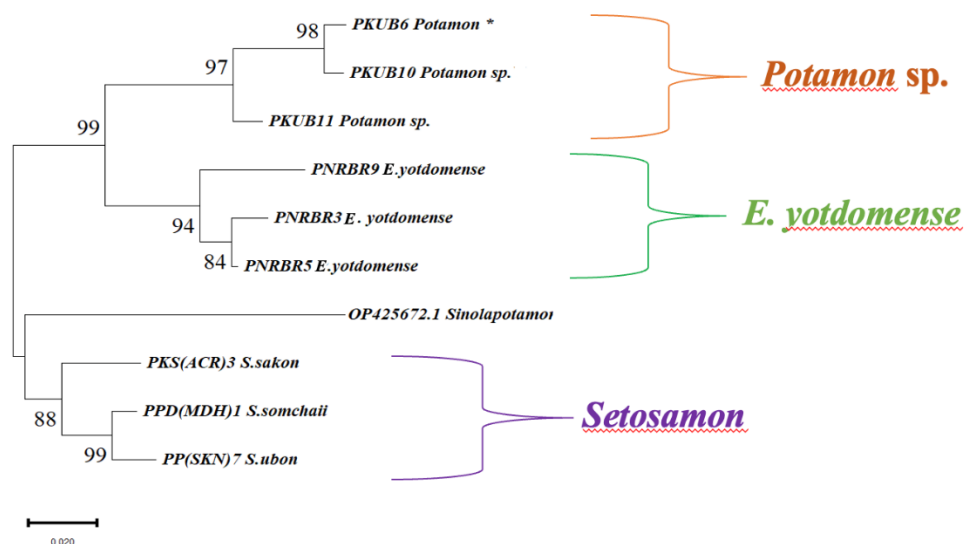




ภาพประกอบ 27 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน 16S rDNA ของปูภูเขางศ์ Potamididae ทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ซ้ำ

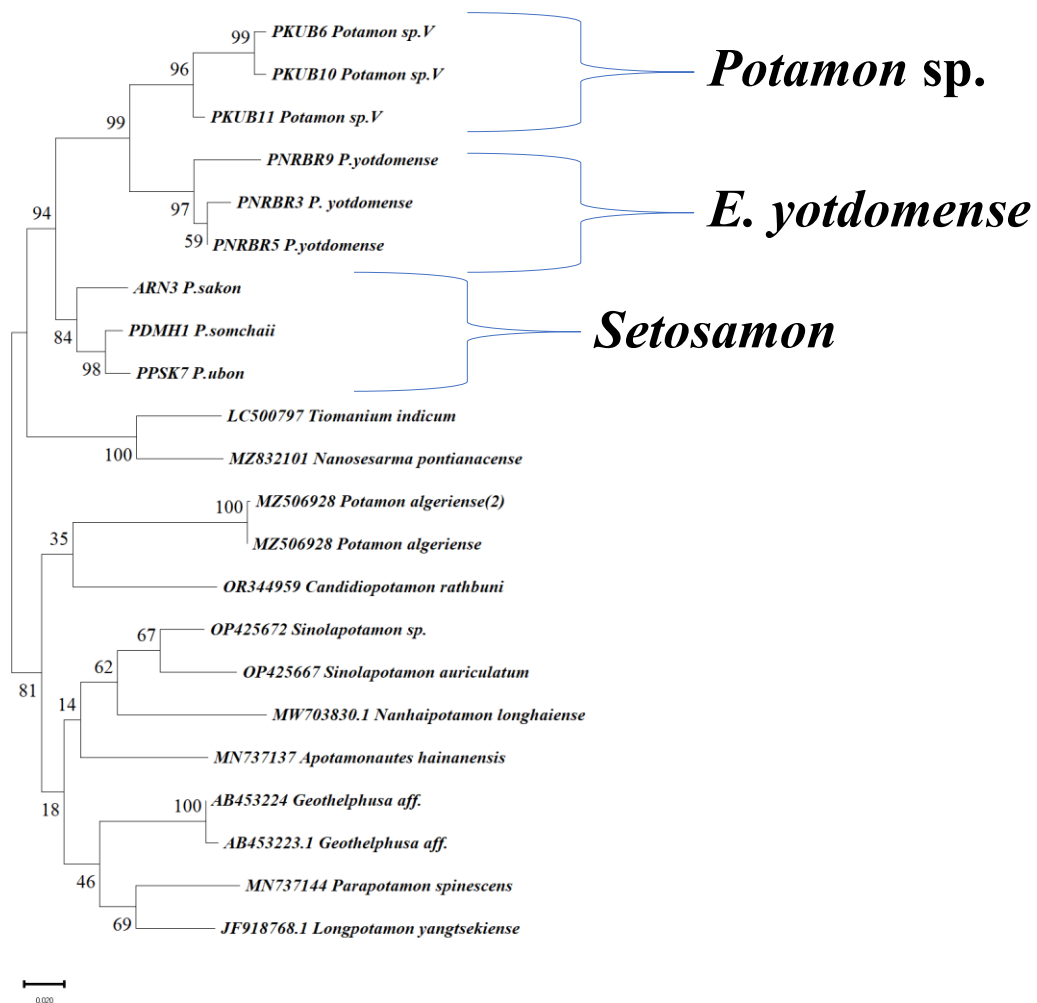
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน COI ของปูภูเขางศ์ Potamididae มาสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap 1000 ซ้ำ โดยใช้ Kimura 2-parameter model พบว่ายีน COI สามารถจัดจำแนกปูภูเขางศ์ Potamididae ออกได้ 3 clade (ภาพประกอบ 28) และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของปูภูเขางศ์

Potamidae มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าตัวอย่างสามารถแยกออกจากชนิดอื่นได้อย่างชัดเจน และทั้ง 3 clade มีความใกล้เคียงกัน (ภาพประกอบ 29)

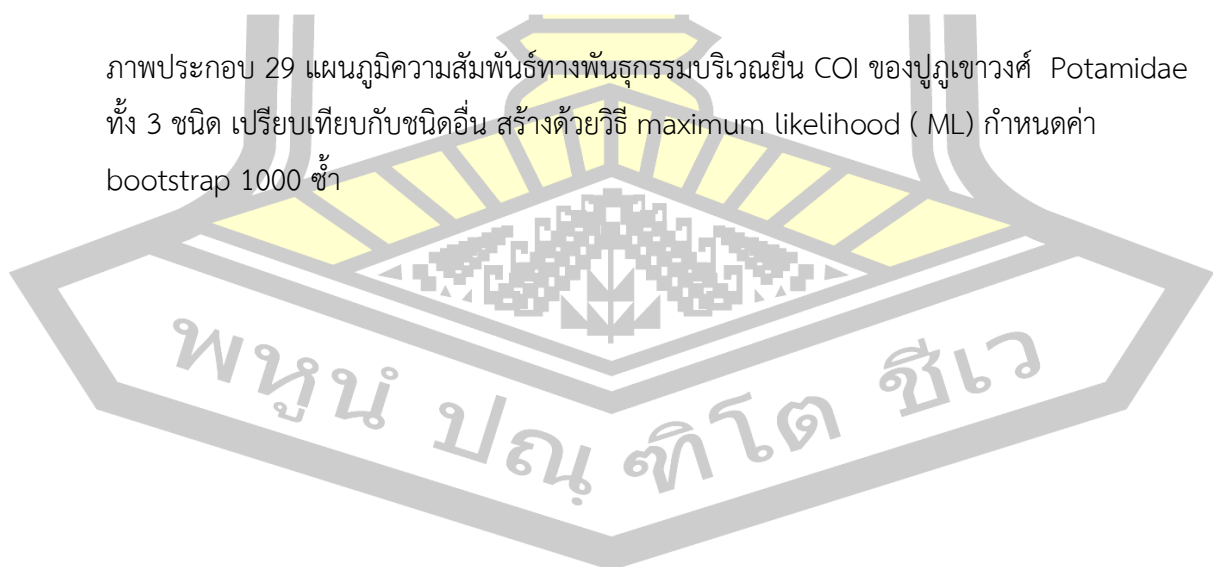


ภาพประกอบ 28 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน COI ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ทั้ง 3 ชนิด สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap 1000 ซ้ำ





ภาพประกอบ 29 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน COI ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับชนิดอื่น สร้างด้วยวิธี maximum likelihood (ML) กำหนดค่า bootstrap 1000 ซ้ำ



บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

5.1.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากการเก็บตัวอย่างและศึกษาสัณฐานวิทยาพบปูภูเขาทั้งหมด 4 สกุล ได้แก่ *Setosamon*, *Eosamon*, *Potamon* และ *Indochinamon* ตัวอย่างปูภูเขาในสกุล *Setosamon* (ชื่อสกุลเดิม *Potamon*) มีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *S. ubon* (พบที่จังหวัดอุบลราชธานี), *S. somchai* (พบที่จังหวัดนครพนม) และ *S. sakon* (พบที่จังหวัดสกลนคร) (Tan, Mendoza and Yeo, 2022) สกุล *Eosamon* พบ 1 ชนิดที่เขาคันทรง จังหวัดบุรีรัมย์ คือ *E. yotdomense* สกุล *Potamon* พบชนิดที่ยังระบุไม่ได้ คือ *Potamon* sp. เป็นตัวอย่างที่เก็บจากภูซ้อง จังหวัดอุบลราชธานี และสกุล *Indochinamon* พบ 1 ชนิด คือ *In. bhumibol* เป็นตัวอย่างที่พบที่ภักดีชุมพล จังหวัดชัยภูมิ ทั้ง 4 สกุลนี้สามารถจัดจำแนกชนิดได้ด้วยลักษณะของกระดอง สีของกระดอง สีของขอบตา และอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ได้อย่างชัดเจน *In. bhumibol* มีลักษณะของกระดองที่แตกต่างจากทั้ง 3 สกุล คือ กระดองค่อนข้างแบนราบต่ำ ผิวกระดองขรุขระ H groove ชัดเจน และบริเวณปลายสุดมีสัน ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ชัดเจนที่สามารถแยกออกได้ ส่วนปูภูเขา *E. yotdomense* มีลักษณะที่คล้ายสกุล *Setosamon* มากที่สุดในทั้งหมด 4 สกุล แต่สีของกระดองและสีขอบตาต่างกันชัดเจน โดย *E. yotdomense* มีกระดองสีดำแดง ขอบตาสีแดง *Potamon* sp. เป็นปูภูเขาที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ สีของกระดองเป็นสีเขียวขี้ม้าออกดำ ขอบตามีสีเหลือง ไม่มีส่วนไหนเด่นชัดมาก แต่มีอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 แตกต่างอย่างชัดเจน และสกุล *Setosamon* มีความคลุมเครือในหลายลักษณะ ทำให้ยากต่อการจัดจำแนกชนิด เพราะมีความหลากหลายค่อนข้างสูง (Cumberland et al., 2009, 2012) ลักษณะสัณฐานวิทยานอกของปูภูเขาสกุล *Setosamon* ค่อนข้างมีความหลากหลายสูง จึงไม่สามารถจัดจำแนกชนิดโดยใช้เพียงลักษณะของกระดอง ก้ามหนีบ ขาเดิน ส่วนท้อง และอวัยวะช่วยกินได้ ต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้เป็นหลักในการจัดจำแนกชนิด ดังนั้นเราจึงไม่สามารถใช้เพศเมียศึกษาเพื่อระบุชนิดที่แม่นยำได้ ลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ของ *S. ubon*, *S. somchai* และ *S. sakon* มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากไม่สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่า ต้องอาศัยกล้องสเตรียโอในการส่องดูบริเวณต่าง ๆ เพื่อให้เห็นรายละเอียดที่ชัดเจน จากวิธีการจัดจำแนกสกุล *Setosamon* ของ (Tan et al., 2022) ระบุไว้ว่า หากอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 บริเวณปลายสุดไม่มีช่องเปิด ระบุชนิดได้ว่าเป็น *S. somchai* หากบริเวณปลายสุดของอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 มีช่องเปิดสามารถระบุได้ว่าอาจเป็น *S. ubon* และ *S. sakon* ในการใช้ลักษณะนี้ผู้ที่ไม่มีความเชี่ยวชาญอาจจะระบุชนิดของปูภูเขาผิดได้

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปูภูเขาวงศ์ Potamidae พบปูภูเขาทั้งหมด 4 สกุล จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *S. somchaii*, *S. ubon*, *S. sakon*, *E. yotdomense*, *Potamon* sp. และ *In. bhumibol*

การศึกษานี้พบความแตกต่างอย่างชัดเจนของลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ของปูภูเขาวงศ์ Potamidae เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับระหว่างชนิด ดังนั้นจึงสามารถจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Matondo and Demayo (2015) ที่พบว่าปู *Ranina ranina* มีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างมากระหว่างตัวเมียแต่ละตัว ตัวอย่างเช่น สีของกระดอง ลายจุดบนร่างกาย รูปร่างของหนวด อวัยวะช่วยกินอาหาร แต่ในทางกลับกันบางการศึกษา ยังพบว่าการนำลักษณะที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยนี้มาใช้ในการแบ่งกลุ่มชนิดของปูภูเขา ยกตัวอย่างเช่น วงศ์ Potamonautidae เคยใช้ลักษณะ mandibular palps และ third maxilliped ในการระบุชนิด (Daniels et al, 2001) ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้ในกลุ่มปูภูเขาวงศ์ Potamidae ได้ จากการวิเคราะห์สัณฐานวิทยายังพบว่าปูภูเขาที่มีความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยาสูง หรือมีความคล้ายคลึงกันสูงจะมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าปูภูเขาที่มีความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยาต่ำ ความแตกต่างเรื่องสีบนร่างกายของสัตว์ชนิดต่าง ๆ เป็นลักษณะที่สามารถเชื่อมโยงไปยังวิวัฒนาการของสัตว์ชนิดนั้น ๆ ได้ ซึ่งในความเป็นจริงแล้วสีบนร่างกายของสัตว์ชนิดต่าง ๆ ถูกควบคุมด้วยยีน (genes) สีบนร่างกายสัตว์อาจได้รับอิทธิพลโดยตรงจาก สิ่งแวดล้อม หรือแปรเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยได้ การศึกษานี้พบความแตกต่างของสีกระดองของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ทั้ง 6 ชนิด จะเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจนในชนิด *E. yotdomense*, *In. bhumibol* และ *Potamon* sp. ซึ่งมีความแปรผันของสีบนร่างกายชัดเจน อาจเป็นสาเหตุเนื่องจากตัวอย่างถูกเก็บมาจากแหล่งที่อยู่ที่มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ซึ่งในกระบวนการสร้างกระดอง หลังจากการลอกคราบ (molting) ของปูภูเขาต้องใช้แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) สูง ผ่านการดูดซับจากสิ่งแวดล้อม (Nagasawa, 2015) ซึ่งแร่ธาตุที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ของภูเขาที่ปูภูเขาอาศัยอยู่อาจส่งผลต่อการสร้างเม็ดสีที่แตกต่างกันได้

5.1.2 การศึกษาการกระจายของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ประเทศไทยตั้งอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นพื้นที่เขตร้อน (Tropical Southeast Asia) ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงสุดแห่งหนึ่งของโลก (Ruyn et al., 2014) ซึ่งมีสัตว์ประจำถิ่นที่มีความน่าสนใจกระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาค หลายพื้นที่ในประเทศไทยมีความน่าสนใจในการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของพืชและสายพันธุ์ของสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งปูภูเขา ปัจจุบันการศึกษานี้พบปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในประเทศไทยนั้นมีการศึกษาค่อนข้างน้อย และส่วนใหญ่เป็นเพียงการศึกษาทางสัณฐานวิทยาเท่านั้น ข้อมูลปูภูเขาวงศ์ Potamidae ที่การกระจายอยู่ทางตะวันออกเฉียงเหนือของเอเชีย ประเทศจีน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ตอนบน มีชนิดพันธุ์ของปูที่ใกล้เคียงกับปู

ภูเขาในประเทศไทยมาก ซึ่งเพราะอยู่ในเขตภูมิศาสตร์เดียวกัน (Oriental region) (Shih และ Ng, 2011) (Rueda, Rodríguez, และ Hawkins, 2013) การศึกษาครั้งนี้ศึกษาตัวอย่างปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในพื้นที่บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในบริเวณเขตเทือกเขาภูพาน ซึ่งลักษณะทางธรณีสัณฐาน เรียกว่าที่ราบสูงโคราช ลักษณะทั่วไปเป็นแอ่งดินตื้น เอียงไปทาง ตะวันออกเฉียงใต้เล็กน้อย ทางด้านตะวันออกเฉียงเหนือเป็นชุดของภูเขาโค้งตัว ที่เรียกว่าทิวเขาภูพาน มีความสูงไม่เกิน 700 เมตร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือประกอบด้วยเทือกเขาที่สำคัญ ได้แก่ เทือกเขาเพชรบูรณ์ เทือกเขาสันกำแพง เทือกเขาพนมดงรัก เทือกเขาตองพญาเย็น และเทือกเขาภูพาน เทือกเขาภูพานเป็นทิวเขาเดี่ยว ๆ แยกจากกันเป็นตอน ๆ ไม่ต่อเนื่องกัน เทือกเขาภูพานเริ่มจาก อำเภอนากลาง จังหวัดอุดรธานีทอดเป็นแนวโค้งทิศตะวันออกเฉียงใต้ ผ่านเขตจังหวัดสกลนคร กาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด นครพนม มุกดาหาร และสิ้นสุดทิวเขาที่ริมแม่น้ำโขง ในเขตอำเภอโขงเจียม จังหวัด อุบลราชธานี (สัญญา ศุภจันทร์, 2545) ปูภูเขานั้นจะอาศัยที่อยู่ในแหล่งน้ำสะอาดบนภูเขา เช่น ลำธารหิน ลำธารดิน และน้ำตก ที่มีความอุดมสมบูรณ์ ในด้านทรัพยากรป่า และอาหาร (Farhadi and Harlioglu, 2018)

การเก็บตัวอย่างครั้งนี้ปูภูเขาวงศ์ Potamidae ทั้งหมด 4 สกุล 6 ชนิด ได้แก่ *S. somchaii*, *S. ubon*, *S. sakon*, *E. yotdomense*, *Potamon* sp. และ *In. Bhumibol* ซึ่งทั้ง 6 ชนิด พบในภูเขาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย *S. ubon* (พบที่จังหวัดอุบลราชธานี), *S. somchaii* (พบที่จังหวัดนครพนม) และ *S. sakon* (พบที่จังหวัดสกลนคร) กระจายอยู่ในเขต เทือกเขาภูพานทั้งหมด 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู จังหวัดสกลนคร จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดยโสธร จังหวัดอำนาจเจริญ และจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นการรายงานการ พบที่เพิ่มขึ้นอีก 4 จังหวัดเป็นครั้งแรก ตัวอย่างปูภูเขาชนิด *E. yotdomense* ถูกพบที่เขตรักษาพันธุ์ สัตว์ป่าอดโดม ซึ่งเป็นพื้นที่ส่วนหนึ่งของเทือกเขาพนมดงรัก ปูภูเขาชนิดนี้ได้แยกจากชื่อสกุลเก่า *Potamon* มาตั้งเป็นสกุลใหม่ชื่อว่า *Eosamon* (Yeo and Ng, 2007) ในปัจจุบันสกุล *Eosamon* มี ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ *E. boonyaratae* (Naiyanetr, 1987) (จังหวัดตราด ภาคตะวันออกของ ประเทศไทย), *E. brousmichei* (Rathbun, 1904) (ภาคใต้ของประเทศไทย), *E. hafniense* (Bott, 1966) (เกาะช้าง ภาคตะวันออกของประเทศไทย), *E. nominathuis* (Yeo, 2010) (ภาคใต้ ของประเทศไทย), *E. paludosum* (Rathbun, 1904) (ประเทศลาว), *E. phuphanense* (Naiyanetr, 1992) (จังหวัดสกลนคร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย), *E. smithianum* (Kemp, 1923) (จังหวัดจันทบุรี ภาคตะวันออกของประเทศไทย), และ *E. yotdomense* (Naiyanetr, 1984) (จังหวัดอุบลราชธานี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย) และมีการ ค้นพบชนิดใหม่ที่ประเทศกัมพูชา *E. cambodiense* (Ng and Clark, 2022) การศึกษาครั้งนี้ได้ทำ การเก็บตัวอย่างปูภูเขาชนิด *E. yotdomense* ที่เขาพนมรุ้ง และเป็นครั้งแรกที่มีรายงานการพบชนิด

นี้ที่เขอพนมรุ้ง ตัวอย่างปูภูเขาสกุล *Indochinamon* ที่ถูกแบ่งสกุลตามแหล่งที่อยู่แถบประเทศคาบสมุทรมอินโดจีน (จีน อินเดีย เวียดนาม พม่า ลาว และ ไทย) เดิมใช้สกุล *Potamon* ในประเทศไทยพบเพียง 5 ชนิด ได้แก่ *In. bhumibol*, *In. lipkei*, *In. prolatum* (Peter K.L. Ng and Mar, 2018), *In. mieni* (Brandis 2000) และ *In. ahkense* ซึ่งถูกพบที่อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ (วันนิวัติ สุธรรมฤทธิ์, 2563) ปัจจุบันปูสกุล *Indochinamon* พบทั้งหมด 41 ชนิด *In. bhumibol* หรือปูเจ้าพ่อหลวง ถือว่าเป็นปูน้ำจืดที่ขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย ซึ่งถือได้ว่าเป็นสัตว์ประจำถิ่น (endemic species) ของจังหวัดเลย (Esser, 2015) (Naiyanetr, 1993) การเก็บตัวอย่างปูภูเขา *In. bhumibol* เก็บที่อำเภอภักดีชุมพล จังหวัดชัยภูมิ ซึ่งพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างเป็นต้นกำเนิดของแม่น้ำชี ซึ่งยังไม่พบรายงานการกระจายตัวของ *In. bhumibol* ที่จังหวัดชัยภูมิ ตัวอย่างปูภูเขา *Potamon* sp. (สัญญา ศุภจันทรา, 2545) ถูกพบที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่ายอดโดม และตัวอย่างในการศึกษานี้ถูกเก็บจากภูผ่อง จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งมีวัชวะสืบพันธุ์คู่ที่ 1 คล้าย กับ *Pilosamon* sp. (Takeda, 2019) ที่ถูกพบที่จังหวัดจำปาสัก ประเทศลาว สกุล *Pilosamon* เป็นสกุลที่แยกมาจากสกุล *Potamon* ในปัจจุบันมีสกุล *Pilosamon* ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *Pilosamon guinotae* (Yeo and Niyanetr, 2010), *Pilosamon laosense* (Rathbun, 1904) และ *Pilosamon palustre* (Rathbun, 1904) จากการเก็บตัวอย่างและพบ *Potamon* sp. ที่ภูผ่อง จังหวัดอุบลราชธานี เพียงจุดเดียว อาจเป็นไปได้ว่าปูภูเขาชนิดนี้มีจำนวนลดน้อยลง เพราะสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยถูกทำลายมากยิ่งขึ้น พร้อมทั้งการที่ชาวบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นิยมบริโภคปูชนิดนี้กันอย่างแพร่หลาย

5.1.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขาวงศ์ Potamidae โดยใช้ยีน 16S rDNA และ COI สามารถจัดจำแนกปูภูเขาได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *S. ubon*, *S. somchaii*, *S. sakon*, *E. yotdomense*, *Potamon* sp. และ *In. bhumibol* จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank พบว่า *E. yotdomense* มีร้อยละความคล้ายคลึงที่สุด คือ ร้อยละ 99.36 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเป็นชนิดเดียวกัน แต่ไม่พบรายละเอียดข้อมูลเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างในฐานข้อมูล GenBank ส่วน *S. ubon*, *S. somchaii*, *S. sakon* และ *Potamon* sp. พบข้อมูลคล้ายคลึงจากฐานข้อมูล Genbank NCBI เพียงร้อยละ 90 - 96 แต่เป็นคนละสกุลและลักษณะสัณฐานวิทยาต่างกันชัดเจน ซึ่งแสดงว่ายังไม่มีผู้ศึกษาข้อมูลพันธุกรรมของปูภูเขาสกุลที่เก็บตัวอย่างได้ และยังขาดแคลนข้อมูลในการศึกษาปูภูเขาอีกมาก สามารถแยก *S. sakon* ออกจาก *S. ubon* และ *S. somchaii* ได้ *S. ubon*, *S. somchaii*, *S. sakon*, *E. yotdomense* และ *Potamon* sp. มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก โดยทั้ง 5 ชนิด มีกระดูกที่คล้ายคลึงกันมากจนไม่อาจแยกได้ด้วยการใช้ลักษณะกระดูกเพียงอย่างเดียว จากข้อมูลความแตกต่างระหว่างพันธุกรรม ในกลุ่มสกุล *Setosamon* ที่ทำการเก็บได้ในพื้นที่ 7 จังหวัด มี

ระยะห่างทางพันธุกรรมน้อย และบางตัวอย่างมีระยะห่างทางพันธุกรรมเป็น 0.000 แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ปูภูเขาจะอยู่ต่างพื้นที่กันอาจเป็นชนิดเดียวกัน หรืออาจเป็นเพียงชนิดย่อยได้ และ *In. bhumibol* จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกตามอนุกรมวิธานของปูน้ำจืดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (สัญญา ศุภจินตรา, 2545) พบว่าสอดคล้องกันทำให้ระบุชนิดได้ แต่เมื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank กลับไม่สามารถระบุว่าเป็นชนิด *In. bhumibol* ได้ เนื่องจากมีร้อยละความคล้ายคลึงกับชนิด *In. bhumibol* เพียงร้อยละ 93.61 อาจเป็นเพราะพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างต่างกัน อาจเป็นชนิดเดียวกันหรือชนิดใหม่ได้ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าความสัมพันธ์ของพันธุกรรมของปูภูเขาสัมพันธ์กับทฤษฎีกำแพงกันทางภูมิศาสตร์ ที่เป็นข้อจำกัดในเรื่องของการกระจายพันธุ์ การที่ปูภูเขาที่มีพื้นที่อาศัยอยู่ต่างภูเขากัน ทำให้ไม่สามารถอพยพข้ามไปยังภูเขาลูกอื่น ๆ ได้ ซึ่งถูกเรียกว่า กำแพงทางภูมิศาสตร์แบ่งแยกประชากร ทำให้ไม่สามารถเกิดกระบวนการไหลของยีน (gene flow) (Santorelli *et al.*, 2018) สอดคล้องกับการศึกษาของ Butlin *et al.* (2008) พบว่าแรงขับที่สำคัญของกระบวนการเกิดชนิดพันธุ์ใหม่ของหอย *Littorina saxatilis* คือ การแบ่งแยกที่อยู่อาศัยจนไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ ดังนั้นเงื่อนไขที่มีบทบาทสำคัญในการกำหนดโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต จะมีความสอดคล้องกับระบบนิเวศ (Pramual *et al.*, 2005)

5.2 สรุปผล

5.2.1 ผลการเก็บตัวอย่างปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทั้งหมด 9 จังหวัด 11 พื้นที่ ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดหนองบัวลำภู จังหวัดสกลนคร จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดยโสธร จังหวัดอำนาจเจริญ จังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดบุรีรัมย์ จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกสามารถจัดจำแนกได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *S. somchai*, *S. ubon*, *S. sakon*, *E. yotdomense*, *Potamon* sp. และ *In. bhumibol*

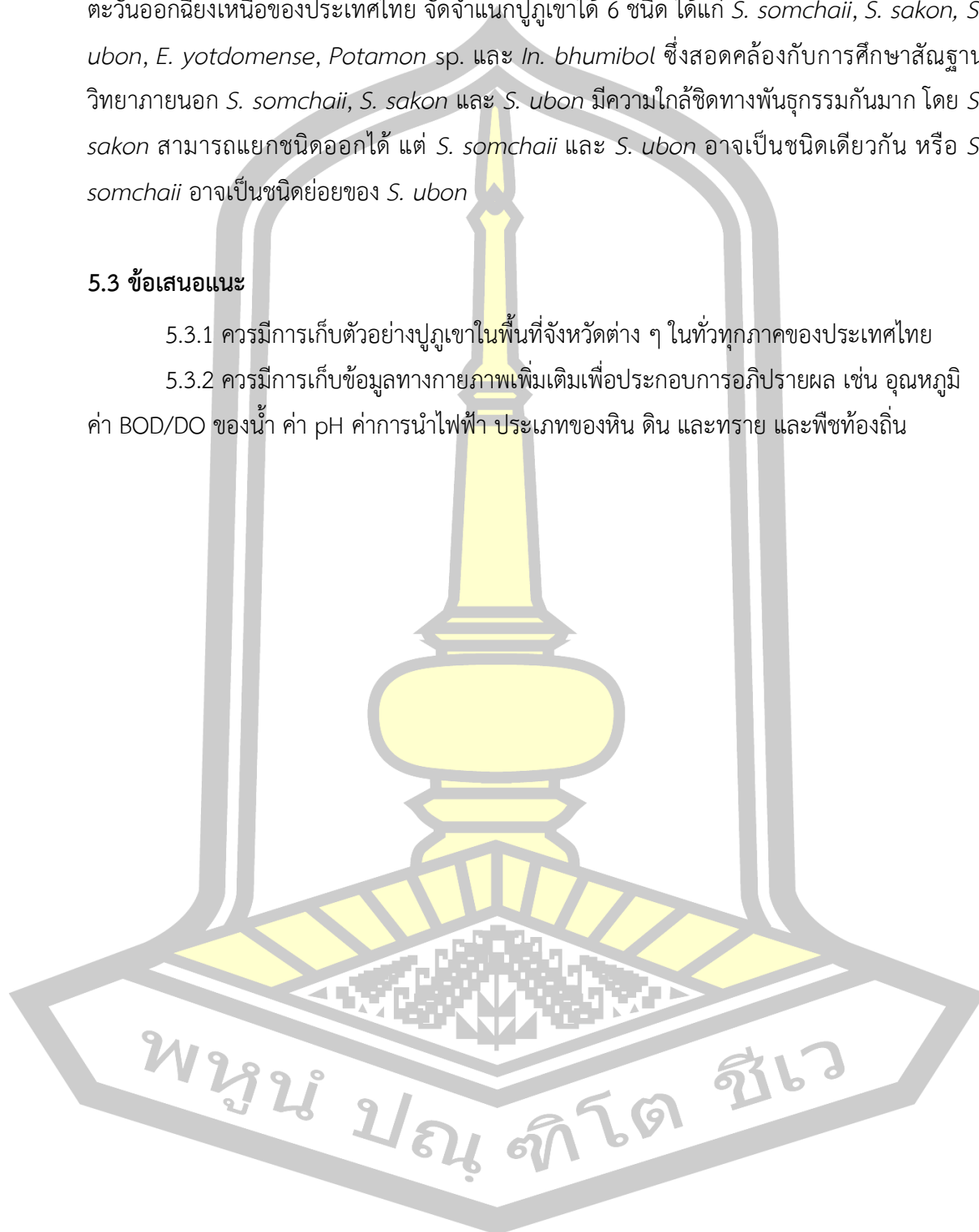
5.2.2 การศึกษาการกระจายตัวของปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่า *S. ubon*, *S. somchai* และ *S. sakon* กระจายอยู่ในเขตเทือกเขาภูพานทั้งหมด ครอบคลุมพื้นที่ 7 จังหวัดได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู จังหวัดสกลนคร จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดยโสธร จังหวัดอำนาจเจริญ และจังหวัดอุบลราชธานี โดยเป็นรายงานใหม่ ที่พบ *S. ubon*, *S. somchai* และ *S. sakon* อีก 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู จังหวัดยโสธร จังหวัดอำนาจเจริญ และจังหวัดอุบลราชธานี พบ *E. yotdomense* กระจายตัวที่จังหวัดบุรีรัมย์ครั้งแรก และยังไม่มีรายงานว่าพบ *In. bhumibol* ที่จังหวัดชัยภูมิ การศึกษารังนี้ทำให้ทราบการกระจายตัวของปูภูเขาเพิ่ม 3 ชนิด

5.2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมปูภูเขาวงศ์ Potamidae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จัดจำแนกปูภูเขาได้ 6 ชนิด ได้แก่ *S. somchai*, *S. sakon*, *S. ubon*, *E. yotdomense*, *Potamon* sp. และ *In. bhumibol* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสัญญาณวิธานภายนอก *S. somchai*, *S. sakon* และ *S. ubon* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก โดย *S. sakon* สามารถแยกชนิดออกได้ แต่ *S. somchai* และ *S. ubon* อาจเป็นชนิดเดียวกัน หรือ *S. somchai* อาจเป็นชนิดย่อยของ *S. ubon*

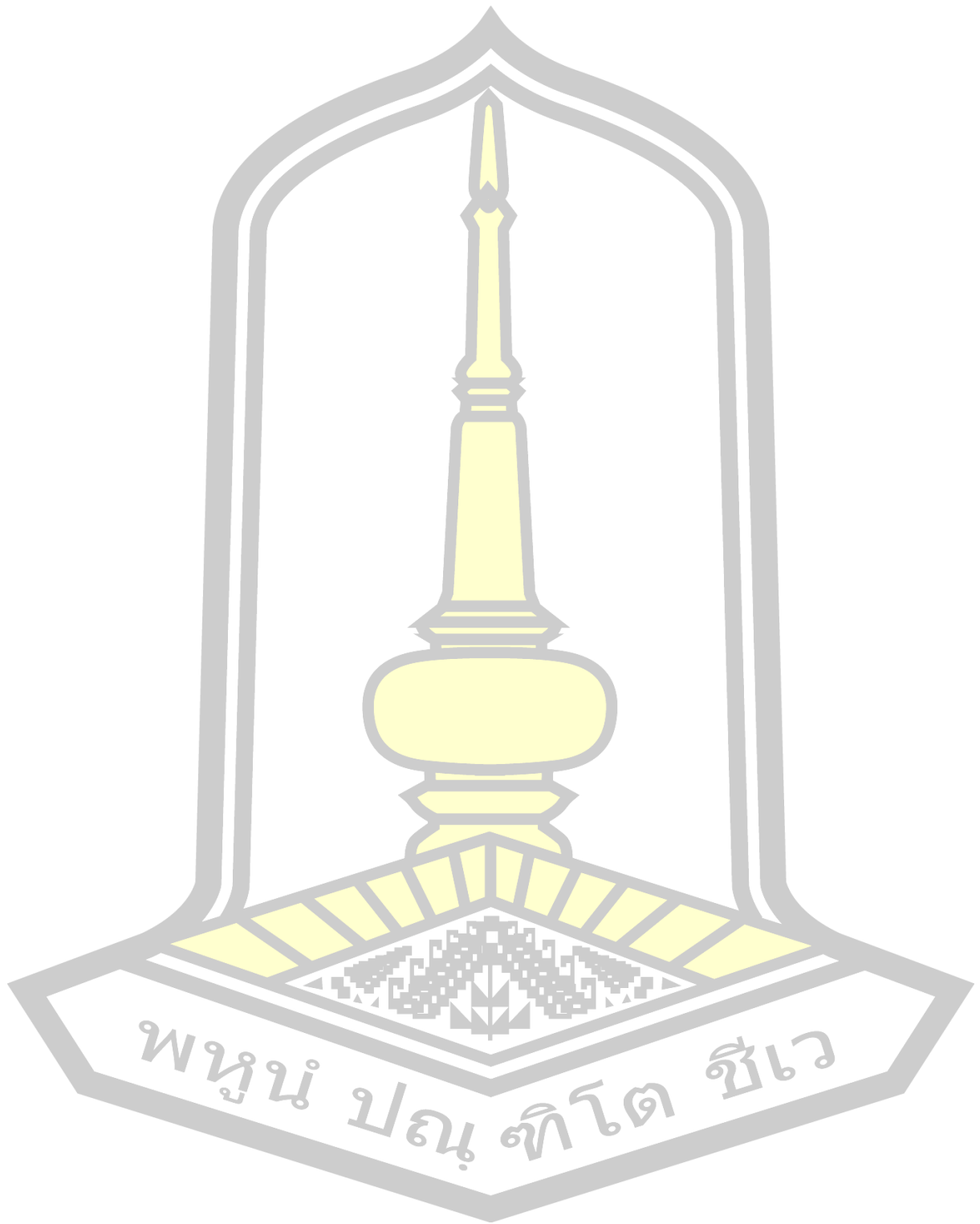
5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรมีการเก็บตัวอย่างปูภูเขาในพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ ในทั่วทุกภาคของประเทศไทย

5.3.2 ควรมีการเก็บข้อมูลทางกายภาพเพิ่มเติมเพื่อประกอบการอธิบายผล เช่น อุณหภูมิ ค่า BOD/DO ของน้ำ ค่า pH ค่าการนำไฟฟ้า ประเภทของหิน ดิน และพืชท้องถิ่น



บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- จินตนา ประจุกาญจนาน. (2552). DNA กับงานนิติเวชศาสตร์. ใน: *โครงการอบรมวิชาการ การปฏิบัติงาน ด้านนิติเวชศาสตร์ สำหรับแพทย์จังหวัดชายแดนภาคใต้ ครั้งที่ 1 หน่วยนิติเวชศาสตร์ และ พืชวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ร่วมกับ มูลนิธิ เอเชีย. 25 - 26 มิถุนายน 2552, โรงแรมลีการ์เดินส์ พลาซ่า อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา. หน้า 130-117.*
- ชาคริต จุลกะเสวี. (2533). *ปูนา-ศัตรูร้ายทำลายต้นข้าว. วารสารไทย. (ต.ค.-ธ.ค.)10 : 65- 74 , 90-91.*
- ชุตานา คุณสุข และรังสิณี วงศ์สมศรี. (2559). ความหลากหลายของปูในระบบนิเวศหาดหิน บริเวณเกาะ นมสาว จังหวัดจันทบุรี. ใน: *การประชุมวิชาการวิจัยรำไพพรรณี ครั้งที่ 10 “ก้าวสู่งานวิจัยใน ศตวรรษที่ 21”. 19 - 20 ธันวาคม 2559. หน้า 262-268.*
- ดาวรุ่ง กังวานพงศ์, ทิพย์มณี ภาระตะศิลป์, ปรีดา จริยานุพัฒนา, ศรีสุลักษณ์ อีรานุพัฒนา และหทัยา กาวี วงศ์. (2546). *พันธุ์ศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดบุญไชยการ พิมพ์.*
- ทิพย์วิมล เกิดอิม, สงบทิพย์ พงศ์สถานบติ และสมศักดิ์ ดำรงเลิศ. (2547). *การจัดไอออนทองแดง และ แคลเมียมจากน้ำเสียโดยการดูดซับบนไคโตซานรูปแบบต่าง ๆ. ปรญญาวิทยา ศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.*
- บังอร แถวโนนจิว. (2552). Species Diversity and Molecular Markers of *Pudaengon Spp.* in Northeastern Thailand. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- ประภัสสร สุรวฒ นาวรรณ. (2544). *เรื่องน่ารู้ ไคติน-ไคโตซาน. กลุ่มวิจัยอุตสาหกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.*
- พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉวีราช. (2554). ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต กรณีศึกษา: จิน Cytochrome c Oxidase I (COI) ในสัตว์. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม 5 (8):205-10.*
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. (2551). *ผลของไคตินและไคโตซานต่อคุณภาพของดินกับกิจกรรมจุลินทรีย์ดิน และการ ลดระดับความรุนแรงของโรคเหี่ยวเหี่ยวในมะเขือเทศ. ปรญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.*

- พรรณราย ชันธรักษา. (2541). *ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระหว่างกลุ่มของข้าวเหนียวเมื่อวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัตนา รุจิรวนิช. (2543). *การดูดซับของสีย้อมประเภทละลายน้ำได้บนไคตินและไคโตซาน*. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. (2447). *ชีววิทยาของเซลล์*. กรุงเทพฯ: โอเอสพริ้นติ้งเฮาส์. วชิระ ใจงาม, พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์ และธรรณ อารังนาวาสวัสดิ์. (2550). การศึกษาความหลากหลายชนิดของปูที่ได้จากการทำประมงอวนลอยปูในประเทศไทย. ใน: *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45*. 30 ม.ค. - 2 ก.พ. 2550, กรุงเทพฯ. หน้า 603-612.
- วรกมล เน้นอุดร. (2554). *ความแปรผันของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ตำแหน่ง 8271 - 8873 ในการถ่ายทอดพันธุกรรมฝ่ายแม่*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- วรรณรัตน์ อุ่นสนธิ, อรสา วงศ์คำจันทร์ และสุนันท์ บุตรศาสตร์. (2547). *การศึกษาผลของไคโตซานที่มีผลต่อการคงสภาพของมะเขือเทศ*. สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.
- วันนิวัติ สุธรรมฤทธิ. (2563). *ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูภูเขาวงศ์ Potamidae จากเทือกเขาเพชรบูรณ์ของประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- วันศุกร์ เสนานาญ และนงนุช ตั้งเกริกโอฬาร. (2556). *ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูบางชนิดที่พบบริเวณพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี*. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทศนาจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรุ สิริดิถีรัตน์ และสกล พันธุ์ยิ้ม. (2541). *ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ: จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล*. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- วิยะดา สิบบุตร. (2526). *การศึกษาผลของสารฆ่าแมลงบางชนิดที่มีต่อปูนา Somannaihelphusa germini (Rathban)*. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ศิริกรณ ศรีโพธิ์. (2562). *ถิ่นที่อยู่อาศัยและประชากรปูเจ้าพ่อหลวงในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวงและอุทยานแห่งชาติภูเรือ จังหวัดเลย*. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย.

- สมพร ภูริพงศ์ และสมโภชน์ อัครกะทิววัฒน์ (2540) ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. องค์การค้า ของคุรุสภา. กรุงเทพฯ: กรมประมงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สัญญา ศุภจินตรา. (2545). อนุกรมวิธานของปูน้ำจืดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล. (2554). เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตน.
- สุทัศน์ ดวงจิตร. (2554). ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์. ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. วารสาร นิติเวชศาสตร์, 4(1), 1 - 13, กันยายน - ธันวาคม.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. (2539). พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุวิทย์ วรรณศรี. (2553). การมีส่วนร่วมของชุมชนในการใช้ประโยชน์และอนุรักษ์ทรัพยากร และสิ่งแวดล้อมในเขตลุ่มน้ำป่าสักตอนบน. มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.
- อัญชลี ต้นสมบูรณ์. (2555). เอกสารประกอบการสอนวิชา *Technique in Parasitology เรื่อง Molecular for parasitic infection* สำหรับนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรังสิต.
- อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และฉันทชัย สุระ. (2534). ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์. วารสารहितวิทยา และเวชศาสตร์บริการโลหิต 1(4):1.
- อุมาพร ใหม่แก้ว. (2550). การศึกษาการจัดเรียงตัวของลำดับเบสและความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ไมโตคอนเดรีย - ดีเอ็นเอในช้างไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Bandyopadhyaya S, Ramakrishnan M, Kulkarni s and Rajanna L. (2013). DNA Barcoding and Its Applications-A Critical Review. *Cmrims J. Res. and Dev*, 1(1):77-81.
- Brandao MC, Freire AS, and Burton RS. (2016). Estimating Diversity of Crabs (Decapoda: Brachyura) in a No-Take Marine Protected Area of the SW Atlantic Coast through DNA Barcoding of Larvae. *Systematics and Biodiversity*, 14(3):288-302.

- Brandis D. (2000). The Taxonomical Status of the Freshwater Crab Genus *Potamiscus* Alcock 1909 (Decapoda, Brachyura, Potamidae). *Senckenbergiana Biologica*, 57- 100.
- Buatip S, Yeesin P and Samaae S. (2017). Some Aspects of the Biology of 5 Freshwater Crabs in Lower Southern Part of Thailand. *Burapha Science Journal*, 23(1), 431 - 447.
- Bandyopachyaya, Shruti, Ramakrishna Vankayalapati, L. Rajanna, and Shruti Kulkarni. (2013). DNA Barcoding and Its Applications-A Critical Review. *Crims J. Res. and Dev* 1(1):77-81.
- Benthotage Chamara Jayasankha De Silva, Dona Hemali Nandana Munasinghe .(2016). Determination of Taxonomic Status and Phylogenetic Affinities of Common Edible Crab Species in Southern Coast of Sri Lanka Using DNA Barcoding Gene Region. *Advances in Zoology and Botany* 4(1):6-15.
- Benjamin G. Miner, Sonia E. Sultan, Steven G. Morgan, Dianna K. Padilla, and Rick A. Relyea. (2005). Ecological Consequences of Phenotypic Plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 2012:685-92.
- Bird Peter .(2003). An Updated Digital Model of Plate Boundaries. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 4(3).
- Brandao, Manoela C., Andrea S. Freire, and Ronald S. Burton.(2016). Estimating Diversity of Crabs (Decapoda: Brachyura) in a No-Take Marine Protected Area of the SW Atlantic Coast through DNA Barcoding of Larvae. *Systematics and Biodiversity* 14(3):288-302.
- Biscoe, Adriana D., and Lars Chittka. (2000). The Evolution of Color Vision in Insects. *Annual Review of Entomology* 46(1):471-510.
- Call Reiber and Iain 1. McGaw. (2009). A Review of the Open and Closed Circulatory Systems: New Terminology for Complex Invertebrate Circulatory Systems considering Current Findings. *International Journal of Zoology* (January):6.
- Cumberlidge N, Ng PKL & Yeo DCJ. (2012). Freshwater crabs of the Indo-Burma hotspot: diversity, distribution, and conservation. In: Allen DJ & Darwall WRT (eds.) *The Status and Distribution of Freshwater Biodiversity in the Indo-Burma Region of Asia*. Gland, Switzerland and Cambridge, UK, IUCN, pp. 102–113.

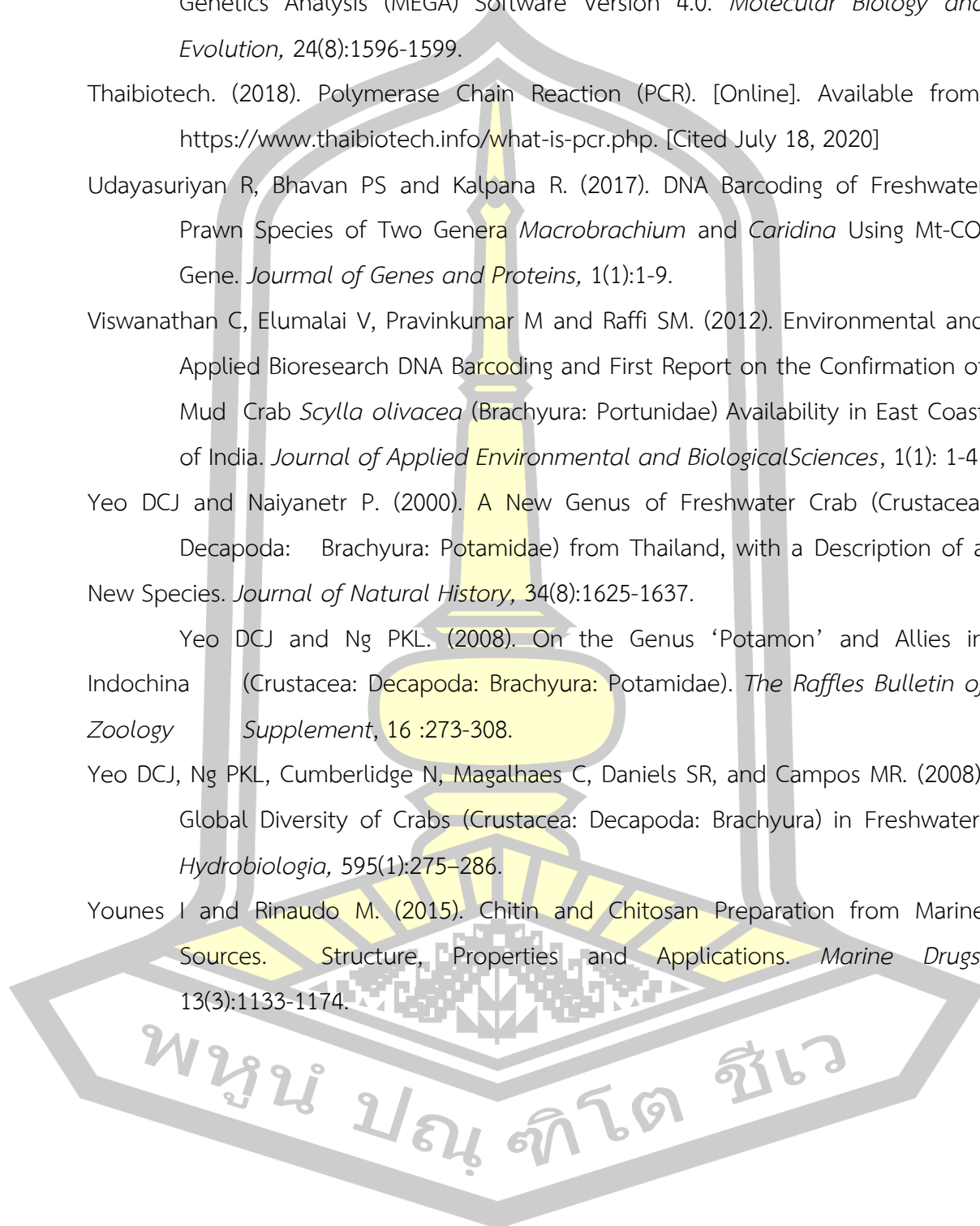
- Cumberlidge N, Ng PKL, Yeo DCJ, Magalhães C, Campos MR, Alvarez F, Naruse T, Daniels SR, Esser LJ, Attipoe FY & Clotilde-Ba FL. (2009). Freshwater crabs and the biodiversity crisis: importance, threats, status, and conservation challenges. *Biological Conservation*, 142: 1665–1673.
- Chatchai Silpsoonthom, Benchanaporn Wattanatongchai. (2016). Pu Chao Por Luang (Indochinamon Bhumibol) : Biological Resource That Local Community Are Involved for Conservation and Utilization. *Nature and Environment* 5(1):44-51.
- Chaloemwilai Chuensri. (1973). Freshwater Crabs of Thailand. *Freshwater Crabs of Thailand* 18-20.
- Chutapa Kunsook .(2017). Biodiversity of Crab in Rocky Shore Ecosystem at Nomsao Island, Chanthaburi Province. P. 1 in ResearchGate, edited by Rambhai Barni Rajabhat University
- C. Prasanna Kumar, B. Akbar John, s. Ajmal Khan, P.S. Lyla, and K.C.A. Jalal .(2012). Limit of DNA Barcode in Delineating *Penaeus monodon* and in Its Developing Stages. *Sains Malaysiana* 41(12):1527-33.
- Cyrus Rumisha, Filip Hughe, Diary Rapanoel, Nemo Mascaux, and Marc Kochzius. (2017). Genetic Diversity and Connectivity in the East African Giant Mud Crab *Scylla serrata*: Implications for Fisheries Management. *PLOS ONE* 12(10):1-18.
- C.D.Schubart, J. Reimer, R.Diesel, M.Türkay. (1997). Taxonomy and Ecology of Two Endemic Freshwater Crabs from Western Jamaica with the Description of a New *Sesarma* Species (Brachyura: Grapsidae: Sesarminae). *Journal of Natural History* 31(3):403-19.
- Christoph D. Schubart, and Perter Koller. (2005). Genetic Diversity of Freshwater Crabs (Brachyura: Sesarmidae) from Central Jamaica with Description of a New Species. *Journal of Natural History* 39(6):469-81.
- Darren C. J. Yeo and Peter K. L. Ng. (1998). Freshwater Crabs of the Potamon Tannanti
- Ceccaldi HJ. (1989). Anatomy and Physiology of Digestive Tract of Crustaceans Decapods Reared in Aquaculture. *Aquaculture*, 9:243-259.
- Chuensri C. (1974). Freshwater Crabs of Thailand. *Fisheries and Environment*, 13–40.

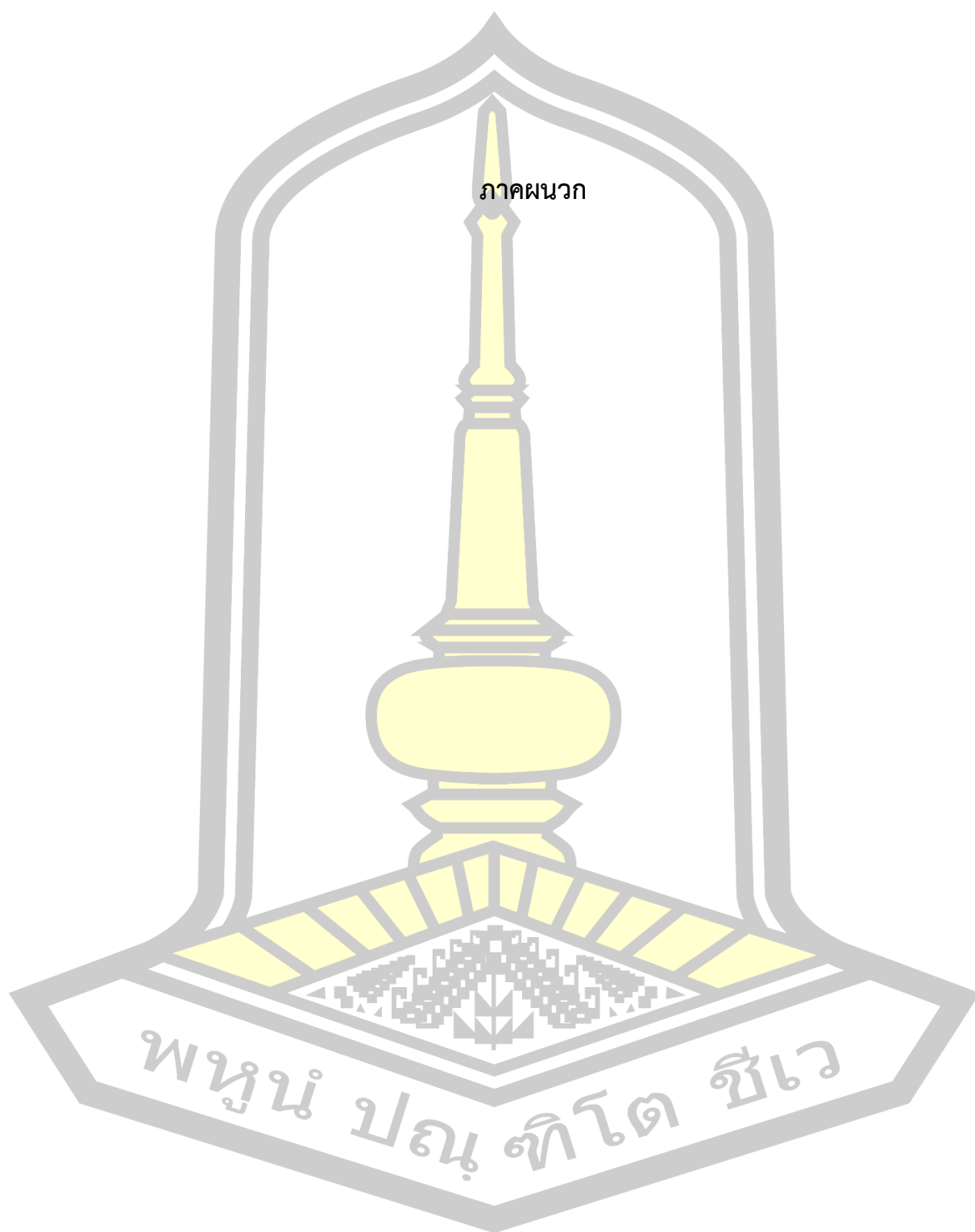
- Cooper GM. (2000). Bioenergetics and metabolism mitochondria, Chloroplasts, and peroxisomes, In the cell: A molecular approach. *ACM Press*, 2, 387-395.
- Daniels SR, Stewart BA, and Burmeister L. (2001). Geographic Patterns of Genetic and Morphological Divergence amongst Populations of a River Crab (Decapoda, Potamonautidae) with the Description of a New Species from Mountain Streams in the Western Cape, South Africa. *Zoologica Scripta*, 30(3):181-197.
- Davey K. (2000). *Decapod Crabs Reproduction and Development*. [Online] Available from: http://www.mesa.edu.au/friends/seashores/crab_reprod.html. [Cited July 30, 2020]
- Esser L and Cumberlidge N. (2015). *Indochinamon bhumibol*. [Online] Available from: <https://www.iucnredlist.org/>. [Cited August 13, 2020]
- Esser L and Cumberlidge N. (2015). *Iomon nan* [Online] Available from: <https://www.iucnredlist.org/>. [Cited August 13, 2020]
- Esser L and Cumberlidge N. (2015). *Vietopotamon phuluangense*. [Online] Available from: <https://www.iucnredlist.org/>. [Cited August 13, 2020]
- Fadlaoui S, Mahjoub M, Asri OE and Melhaoui M. (2019). Allometric Growth of the Freshwater Crab *Potamon Algeriense* (Bott, 1967) (Decapoda, Brachyura, Potamidae) in Oued Zegzel, a Mountain Stream, in the Northeast of Morocco. *International Journal of Zoology*, 2019(1):1-8.
- Fernandez JG and Ingber DE. (2014). Manufacturing of Large-Scale Functional Objects Using Biodegradable Chitosan Bioplastic. *Macromolecular Materials and Engineering*, 299(8):932-38
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Geuther R. (1977). 260/280 and 260/230 Ratios Introduction. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 17(1):86-87.

- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95-98.
- Keele J, Carmon J, Pucherelli SF and Hosler D. (2014). Identification of Unknown Organisms by DNA Barcoding: A Molecular Method for Species Classification. *Trends in Genetics*, 23(4):167-172.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol*, 16, 111-120.
- Lheknim V and Leelawathanagoon P. (2013). New Record of a Freshwater Crab *Phricotelphusa Callianira* (De Man, 1887) (Decapoda: Brachyura: Gecarcinucidae) from Thailand. *Journal of Threatened Taxa*, 1(9):461-465.
- Naiyanetr P. (1993). Potamon *Bhumiboln. Sp.*, A New Giant Freshwater Crab from Thailand (Decapoda, Brachyura, Potamidae). *Crustaceana* 65(1):1-7.
- Naiyanetr P. (2007). *Checklist of crustacean fauna in Thailand (Decapoda, Stomatopoda, Anostraca, Myodocopa and Isopoda)*. 2nd ed. Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning. ONEP Biodiversity Series, 19.
- Ng PKL and Mar W. (2018). On a New Species of Freshwater Crab, *Indochinamon Khinpyae*, from Northern Myanmar (Crustacea, Brachyura, Potamidae). *ZooKeys*, 811, 47-63.
- Ng PKL and Naiyanetr P. (1995). *Pudaengon*, a New Genus of Terrestrial Crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Potamidae) from Thailand and Laos, with Descriptions of Seven New Species. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 43(2):355-376.
- Ng PKL and Naiyanetr P. (2003). *Zoologische Verhandelingen: New and Recently Described Freshwater Crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Potamidae, Gecarcinucidae and Parathelphusidae) from Thailand*.

- Ng PKL, Guinot D and Davie PJF. (2008). Systema brachyurorum: part I an annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. *Raffles Bulletin of Zoology*, 17, 1- 286.
- Pramual P, Kuvangkadilok C, Baimai V and Walton C. (2005). Phylogeography of the Black Fly *Simulium Tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as Inferred from Mt-DNA Sequences. *Molecular Ecology*, 14(13):3989-4001.
- Pramual T. (1990). *Taxonomy of Rice-Field Crabs and Charaters of Gonopod Ommatidia by Scanning Electron Microscopy*. Chulalongkorn university.
- Purty RS and Chatterjee S. (2016). Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. *Austin J Biotechnol Bioeng*, 3(1).
- Radulovici AE, Sainte-Marie B and Dufresne F. (2009). DNA Barcoding of Marine Crustaceans from the Estuary and Gulf of St Lawrence: A Regional-Scale Approach. *Molecular Ecology Resources*, 9(1):181-187.
- Ramya R, Venkatesan J, Kim SK, and Sudha PN. (2012). Biomedical Applications of Chitosan:An Overview. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2(2):100-111
- Reiber CL and McGaw IJ. (2009). A Review of the Open and Closed Circulatory Systems: New Terminology for Complex Invertebrate Circulatory Systems in Light of Current Findings. *International Journal of Zoology*, (January):6.
- Saitou N and Nei M. (1987). The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4):406-425.
- Schubart CD and Koller P. (2007). Genetic Diversity of Freshwater Crabs (Brachyura: Sesarmidae) from Central Jamaica with Description of a New Species. *Journal of Natural History* 39(6):469–81.
- Silpsoonthom C and Wattanatongchai B. (2016). Pu Chao Por Luang (*Indochinamon Bhumibol*): Biological Resource That Local Community Are Involved for Conservation and Utilization. *Nature and Environment*, 5(1):44–51.
- Somerton DA. (1980). A Computer Technique for Estimating the Size of Sexual Maturity in Crabs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(10):1488-1494.

- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8):1596-1599.
- Thaibiotech. (2018). Polymerase Chain Reaction (PCR). [Online]. Available from: <https://www.thaibiotech.info/what-is-pcr.php>. [Cited July 18, 2020]
- Udayasuriyan R, Bhavan PS and Kalpana R. (2017). DNA Barcoding of Freshwater Prawn Species of Two Genera *Macrobrachium* and *Caridina* Using Mt-COI Gene. *Journal of Genes and Proteins*, 1(1):1-9.
- Viswanathan C, Elumalai V, Pravinkumar M and Raffi SM. (2012). Environmental and Applied Bioresearch DNA Barcoding and First Report on the Confirmation of Mud Crab *Scylla olivacea* (Brachyura: Portunidae) Availability in East Coast of India. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 1(1): 1-4
- Yeo DCJ and Naiyanetr P. (2000). A New Genus of Freshwater Crab (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Potamidae) from Thailand, with a Description of a New Species. *Journal of Natural History*, 34(8):1625-1637.
- Yeo DCJ and Ng PKL. (2008). On the Genus 'Potamon' and Allies in Indochina (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Potamidae). *The Raffles Bulletin of Zoology Supplement*, 16 :273-308.
- Yeo DCJ, Ng PKL, Cumberlidge N, Magalhaes C, Daniels SR, and Campos MR. (2008). Global Diversity of Crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in Freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1):275-286.
- Younes I and Rinaudo M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13(3):1133-1174.





ภาคผนวก

วิธีการศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของปู

การวิเคราะห์ตัวอย่างปูน้ำจืดที่ใช้ศึกษา พิจารณาลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

กระดอง (carapace)

- มีลักษณะโค้งกลม หรือเป็นรูปเหลี่ยม ส่วนหน้า (front) มีลักษณะตรงหรือเว้า
- มีความกว้างมากกว่าความยาว หรือมีความยาวมากกว่าความกว้าง
- บริเวณส่วนใดของกระดองที่ชัดเจนหรือไม่ชัดเจน
- สีของกระดอง
- กระดองมีหนามหรือไม่

ก้ามหนีบ (chela)

- ขนาดของก้ามหนีบทั้งสองข้างเท่ากันหรือไม่เท่ากัน
- ผิวของก้ามเรียบหรือขรุขระ
- ปลายก้ามแหลมหรือทู่
- สีของก้ามหนีบ ก้ามหนีบมีหนามหรือไม่

ขาเดิน (walking legs)

- ขาเดินคู่ใดยาวที่สุด
- ขาเดินมีขนหรือไม่มีขน
- สีของขาเดิน ขาเดินมีหนามหรือไม่

ส่วนท้อง (abdomen) ของปูเพศผู้

- มีรูปร่างเป็นตัวที่ (T) หรือ รูปสามเหลี่ยม (Δ)
- ปล้องที่ 5 (carpus) และปล้องที่ 6 (propodus) มีลักษณะอย่างไร
- ปล้องสุดท้าย (dactylus) มีลักษณะอย่างไร
- สีของส่วนท้อง

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้คู่ที่ 1 (first gonopod, G1)

- ลักษณะฐาน (pre-distal) กว้างหรือแคบ
- ลักษณะปลายเป็นแบบใด (แหลม, เป็นรู, โค้งงอ)
- ลักษณะปลายตรง งอ หรือโป่งเป็นครึ่งวงกลม
- บริเวณใกล้ปลายสุด (apex) มีหนาม (spine) หรือไม่
- ตามร่องมีขนลักษณะแบบใด

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้คู่ที่ 2 (second gonopod, G2)

- ลักษณะฐาน เป็นแบบใด (วงรี, สามเหลี่ยม, สี่เหลี่ยม)
- ลักษณะท่อนปลาย ตรง งอ หรือม้วนเข้า

ตารางแสดงขนาดของกระดองปูภูเขา

สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูเก็ต อำเภอห้วยผึ้ง จังหวัดกาฬสินธุ์

วันที่เก็บ: 10 กันยายน 2563

ตัวอย่าง	เพศ	CW	CL
PF(KSN)1	M	4.86	3.94
PF(KSN)2	F	5.14	4.06
PF(KSN)3	F	5.10	4.01
PF(KSN)4	M	5.66	4.50
PF(KSN)5	F	4.54	4.04
PF(KSN)6	M	4.73	3.75
PF(KSN)7	F	5.53	4.37
PF(KSN)8	M	5.50	4.35
PF(KSN)9	F	6.30	4.90
PF(KSN)10	F	4.55	3.77

สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูผาขาว อำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร

วันที่เก็บ: 17 กันยายน 2563

รหัส	เพศ	CW	CL
PPK(YST)1	M	5.41	4.30
PPK(YST)2	F	4.85	3.85
PPK(YST)3	M	5.36	4.35
PPK(YST)4	F	4.86	3.83
PPK(YST)5	F	4.00	3.22
PPK(YST)6	M	5.44	4.31
PPK(YST)7	F	4.73	3.70
PPK(YST)8	M	4.64	3.75
PPK(YST)9	M	3.92	3.24
PPK(YST)10	M	5.86	4.66
PPK(YST)11	M	5.63	4.44

สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูเขษตร อำเภอนานุมาน จังหวัดอำนาจเจริญ

วันที่เก็บ: 30 กันยายน 2563

รหัส	เพศ	CW	CL
PK(ACR)1	M	4.00	3.25
PK(ACR)2	F	4.44	3.66
PK(ACR)3	M	4.66	3.72
PK(ACR)4	F	4.85	3.90
PK(ACR)5	M	5.08	4.00
PK(ACR)6	M	5.22	4.22
PK(ACR)7	M	5.20	4.30
PK(ACR)8	F	5.88	4.50
PK(ACR)9	F	4.60	3.64

สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูผาแดง อำเภอนิคมน้ำสร้อย จังหวัดมุกดาหาร

วันที่เก็บ: 16 ตุลาคม 2563

รหัส	เพศ	CW	CL
PPD(MDH)1	F	3.31	2.15
PPD(MDH)2	F	3.46	2.16
PPD(MDH)3	F	4.68	3.60
PPD(MDH)4	F	4.88	3.87
PPD(MDH)5	F	4.50	3.70
PPD(MDH)6	M	4.50	3.70
PPD(MDH)7	M	4.27	3.50
PPD(MDH)8	M	4.67	3.93
PPD(MDH)9	M	5.63	4.50
PPD(MDH)10	M	5.75	4.50

สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูผากุด อำเภอคำชะอี จังหวัดมุกดาหาร

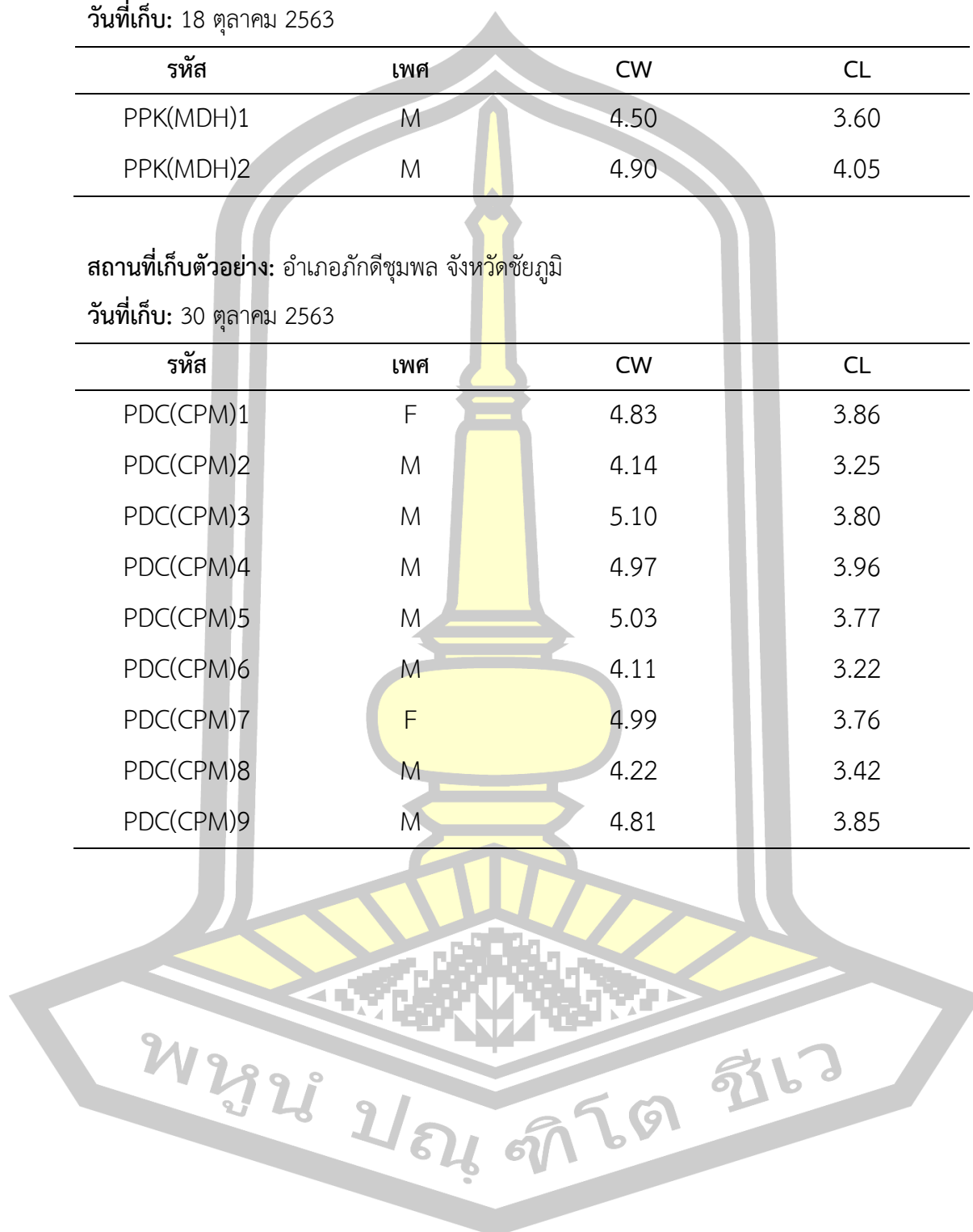
วันที่เก็บ: 18 ตุลาคม 2563

รหัส	เพศ	CW	CL
PPK(MDH)1	M	4.50	3.60
PPK(MDH)2	M	4.90	4.05

สถานที่เก็บตัวอย่าง: อำเภอภักดีชุมพล จังหวัดชัยภูมิ

วันที่เก็บ: 30 ตุลาคม 2563

รหัส	เพศ	CW	CL
PDC(CPM)1	F	4.83	3.86
PDC(CPM)2	M	4.14	3.25
PDC(CPM)3	M	5.10	3.80
PDC(CPM)4	M	4.97	3.96
PDC(CPM)5	M	5.03	3.77
PDC(CPM)6	M	4.11	3.22
PDC(CPM)7	F	4.99	3.76
PDC(CPM)8	M	4.22	3.42
PDC(CPM)9	M	4.81	3.85



สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูพานน้อย อำเภอเมือง จังหวัดหนองบัวลำภู

วันที่เก็บ: 1 ธันวาคม 2563

รหัส	เพศ	CW	CL
PPN(NBP)1	F	4.10	3.32
PPN(NBP)2	F	5.50	4.54
PPN(NBP)3	F	5.20	4.05
PPN(NBP)4	M	4.90	3.80
PPN(NBP)5	M	5.05	4.00
PPN(NBP)6	M	5.80	4.50
PPN(NBP)7	M	5.60	4.42

สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูพาน อำเภอวาริชภูมิ จังหวัดสกลนคร

วันที่เก็บ: 4 ธันวาคม 2563

รหัส	เพศ	CW	CL
PP(SKN)1	M	5.16	3.91
PP(SKN)2	M	5.27	4.05
PP(SKN)3	M	5.12	4.06
PP(SKN)4	M	5.60	4.51
PP(SKN)5	M	5.56	4.51
PP(SKN)6	M	5.60	4.50
PP(SKN)7	M	5.90	4.60
PP(SKN)8	M	5.70	4.50

พูน ปณ ทิโต ชีเว

สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูด่านทอง อำเภอโพธิ์ไทร จังหวัดอุบลราชธานี

วันที่เก็บ: 19 ธันวาคม 2563

รหัส	เพศ	CW	CL
PDT(UBN)1	F	4.31	3.54
PDT(UBN)2	F	4.74	3.73
PDT(UBN)3	M	4.50	3.61
PDT(UBN)4	M	4.91	4.00
PDT(UBN)5	M	4.83	3.90
PDT(UBN)6	M	4.83	3.81
PDT(UBN)7	M	5.00	4.00
PDT(UBN)8	M	5.00	4.05
PDT(UBN)9	M	5.23	4.27
PDT(UBN)10	M	5.27	4.20
PDT(UBN)11	M	5.74	4.68

สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูซ้อง อำเภอภูซำบอน จังหวัดอุบลราชธานี

วันที่เก็บ: 3 ตุลาคม 2565

รหัส	เพศ	CW	CL
PK(UBN)1	F	6.66	5.44
PK(UBN)2	F	6.64	5.43
PK(UBN)3	F	6.15	5.02
PK(UBN)4	F	6.11	4.95
PK(UBN)5	F	5.61	4.60
PK(UBN)6	F	5.78	4.80
PK(UBN)7	M	6.60	5.40
PK(UBN)8	M	6.00	4.70
PK(UBN)9	M	5.73	4.50
PK(UBN)10	M	5.50	4.40

PK(UBN)11	M	5.64	4.42
PK(UBN)12	M	5.50	4.65
PK(UBN)13	M	5.45	4.42
PK(UBN)14	M	5.56	4.40

สถานที่เก็บตัวอย่าง: ภูเขาพนมรุ้ง อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดบุรีรัมย์
วันที่เก็บ: 17 ตุลาคม 2565

รหัส	เพศ	CW	CL
PNR(BRM)1	M	5.33	4.05
PNR(BRM)2	M	5.10	3.98
PNR(BRM)3	M	5.07	3.93
PNR(BRM)4	M	4.80	3.76
PNR(BRM)5	M	5.05	3.88
PNR(BRM)6	M	5.05	3.94
PNR(BRM)7	M	4.62	3.61
PNR(BRM)8	M	4.73	3.72
PNR(BRM)9	M	4.78	3.70
PNR(BRM)10	M	4.83	3.66

พูน ปณ จิต ชีเว



ภาพผนวกที่ 1 PKS(ACR) 3 = *S. sakon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)



ภาพผนวกที่ 2 PKS(ACR) 7 = *S. sakon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านข้าง (scale bar = 1 cm)



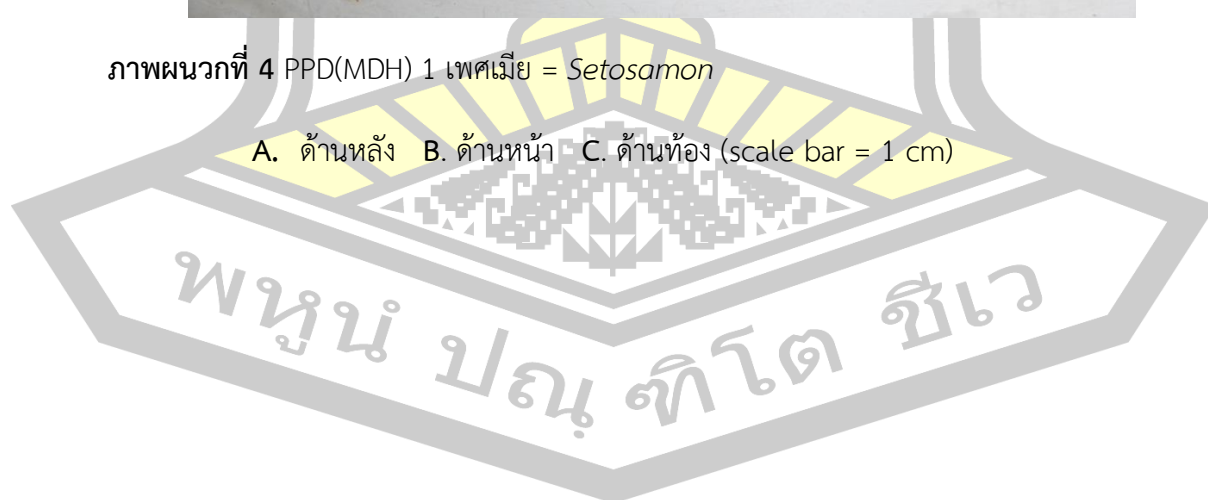
ภาพผนวกที่ 3 PKS(ACR) 9 เพศเมีย = *Setosamon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)



ภาพผนวกที่ 4 PPD(MDH) 1 เพศเมีย = *Setosamon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)





ภาพผนวกที่ 5 PPD(MDH) 6 = *S. sakon*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)



ภาพผนวกที่ 6 PPD(MDH) 10 = *S. sakon*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พญัน ปณ จิตโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 7 PPK(MDH) 1 = *S. ubon*

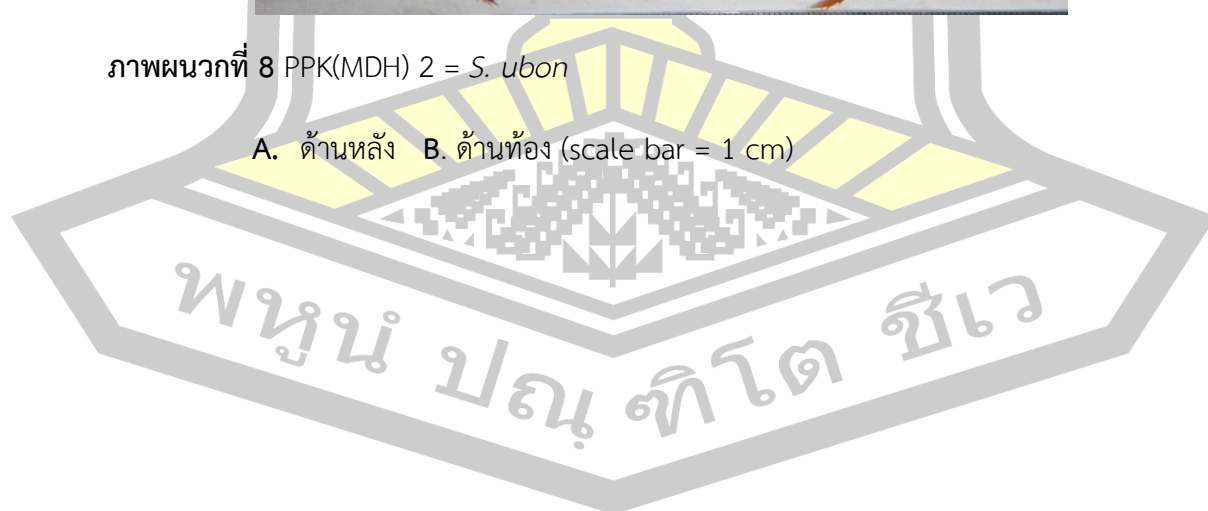
A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พูน ปณ ทิโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 8 PPK(MDH) 2 = *S. ubon*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)





ภาพผนวกที่ 9 PPN(NBP)2 เพศเมีย = *Setosamon*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พูน ปณ ทิโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 10 PPN(NBP) 4 = *S. sakon*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พูน ปณ ทิโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 11 PPN(NBP) 7 = *S. somchai*

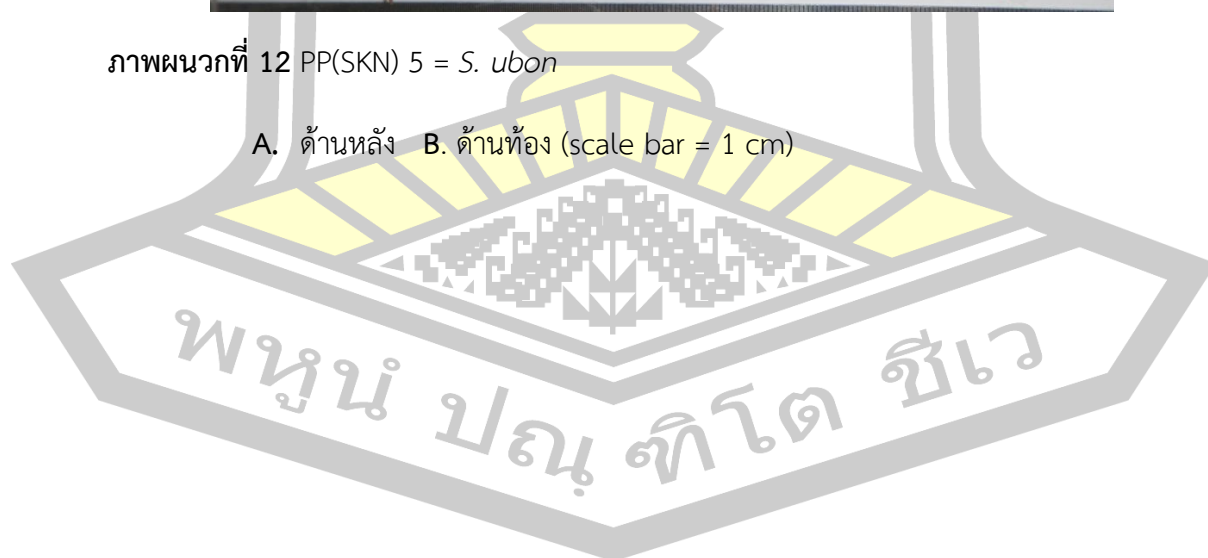
A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พูน ปณ ทิโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 12 PP(SKN) 5 = *S. ubon*

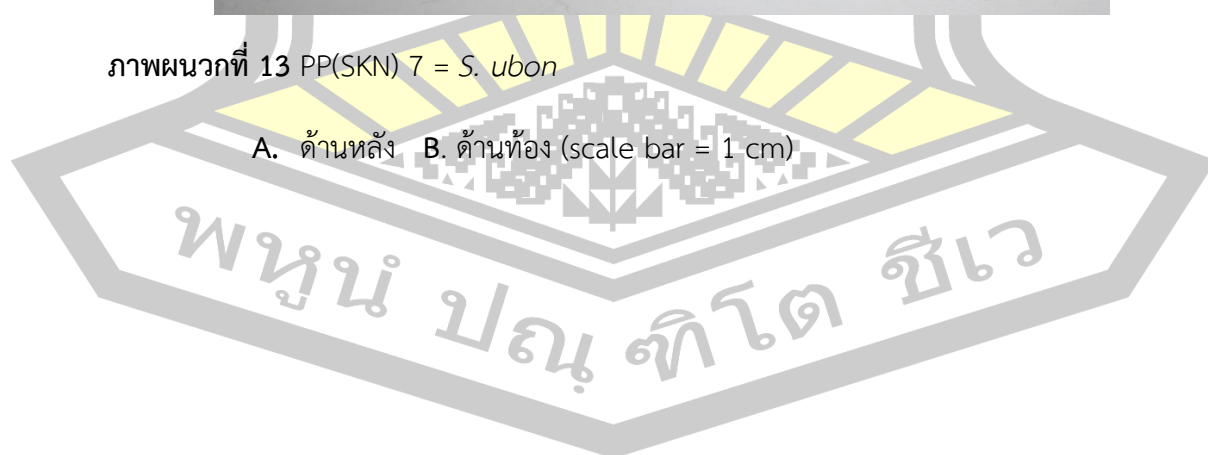
A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)





ภาพผนวกที่ 13 PP(SKN) 7 = *S. ubon*

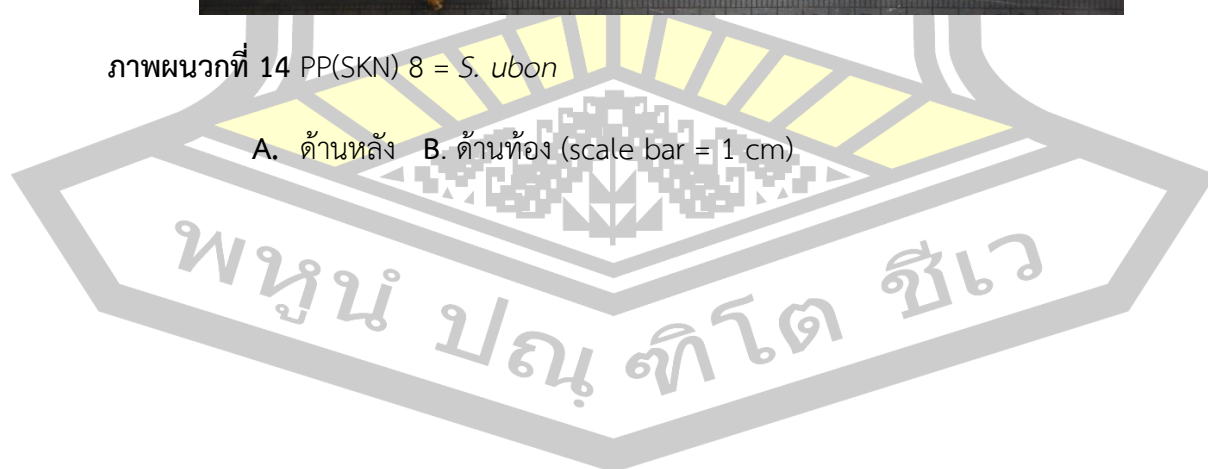
A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)





ภาพผนวกที่ 14 PP(SKN) 8 = *S. ubon*

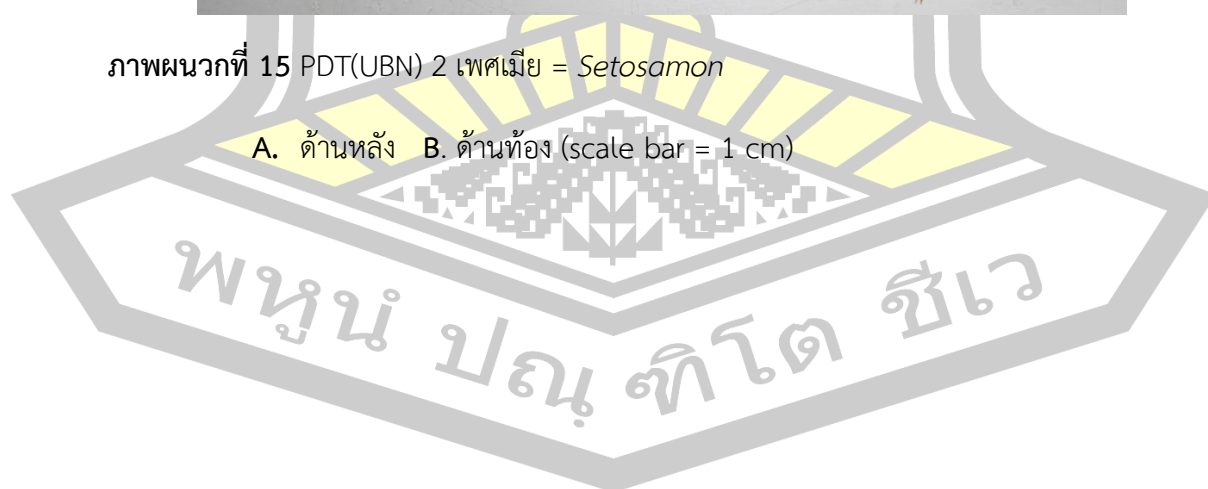
A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)





ภาพผนวกที่ 15 PDT(UBN) 2 เพศเมีย = *Setosamon*

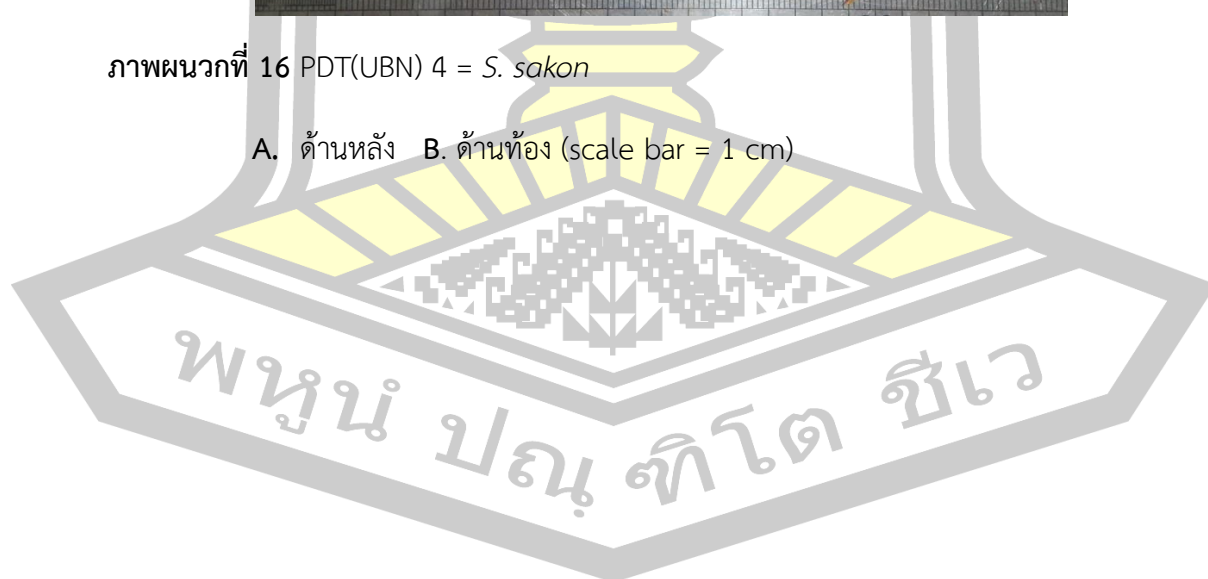
A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)





ภาพผนวกที่ 16 PDT(UBN) 4 = *S. sakon*

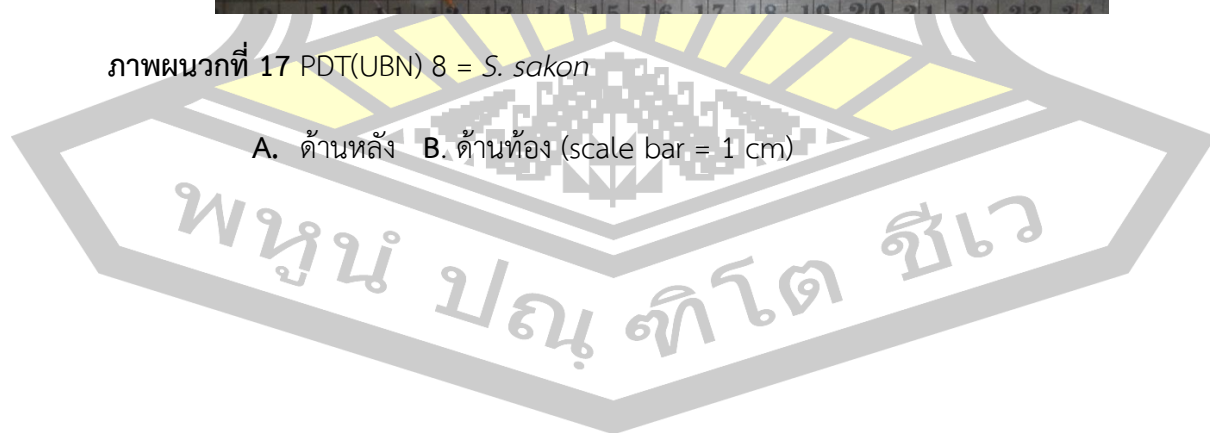
A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)





ภาพผนวกที่ 17 PDT(UBN) 8 = *S. sakon*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

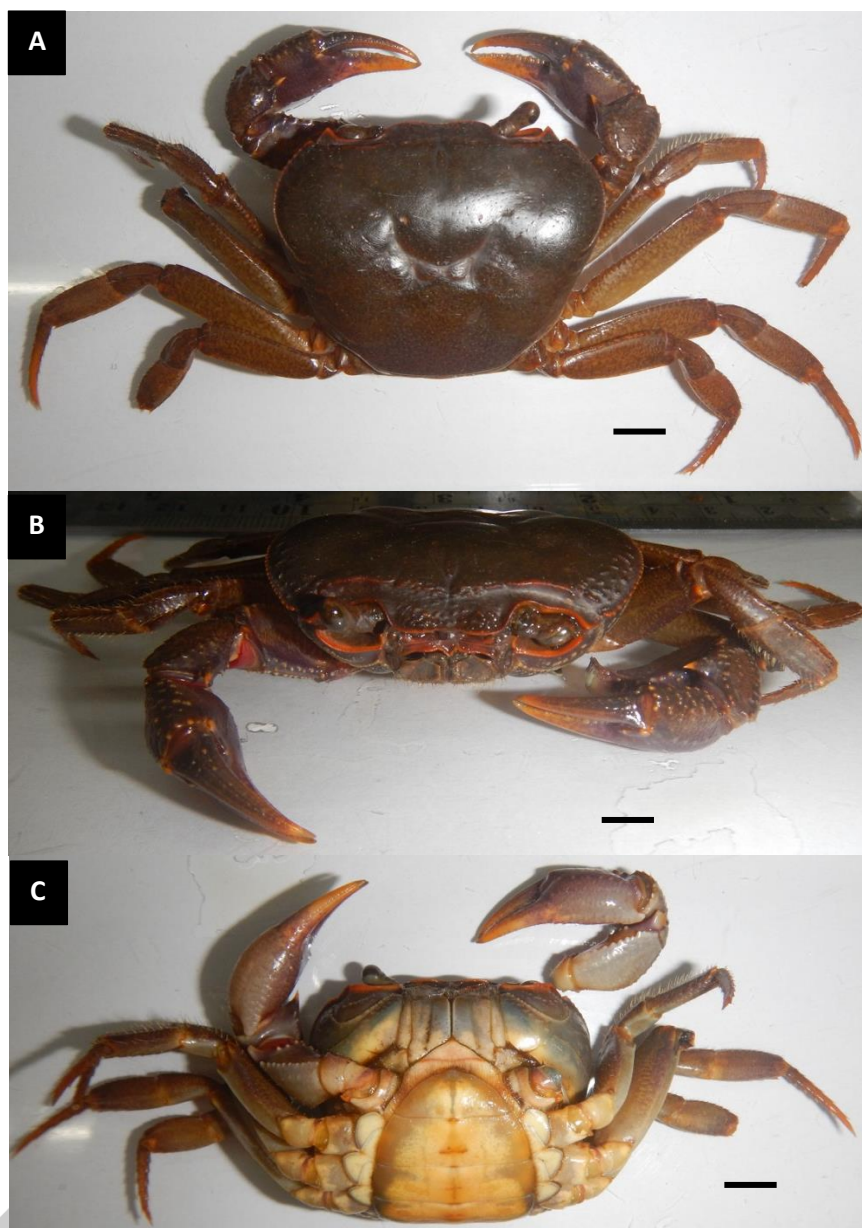




ภาพผนวกที่ 18 PPK(YST) 2 เพศเมีย = *Setosamon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พญัน ปณ จิตโต ขเว



ภาพผนวกที่ 19 PPK(YST) 5 เพศเมีย = *Setosamon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พญัน ปณ จิตโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 20 PPK(YST) 11 = *S. sakon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)



ภาพผนวกที่ 21 PF(KSN) 4 เพศเมีย = *Setosamon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พูน ปณ ภัโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 22 PF(KSN) 8 = *S. ubon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านข้าง (scale bar = 1 cm)



ภาพผนวกที่ 23 PF(KSN) 9 เพศเมีย = *Setosamon*

A. ด้านหลัง B. ด้านหน้า C. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)



ภาพผนวกที่ 24 PNR(BRM) 3 = *E. yotdomense*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พญ. ปณ. จิต ชีวะ



ภาพผนวกที่ 25 PNR(BRM) 5 = *E. yotdomense*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พันธุ์ ปณ. ทิโด ชีเว



ภาพผนวกที่ 26 PNR(BRM) 9 – *E. yotdomense*

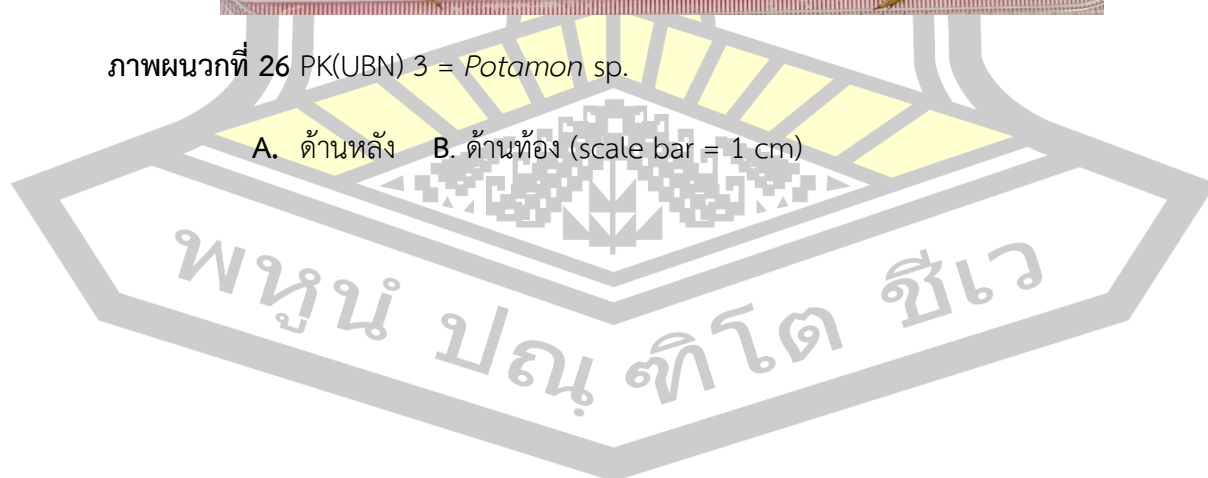
A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พูน ปณ ทิโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 26 PK(UBN) 3 = *Potamon* sp.

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)





ภาพผนวกที่ 27 PK(UBN) 5 = *Potamon* sp.

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

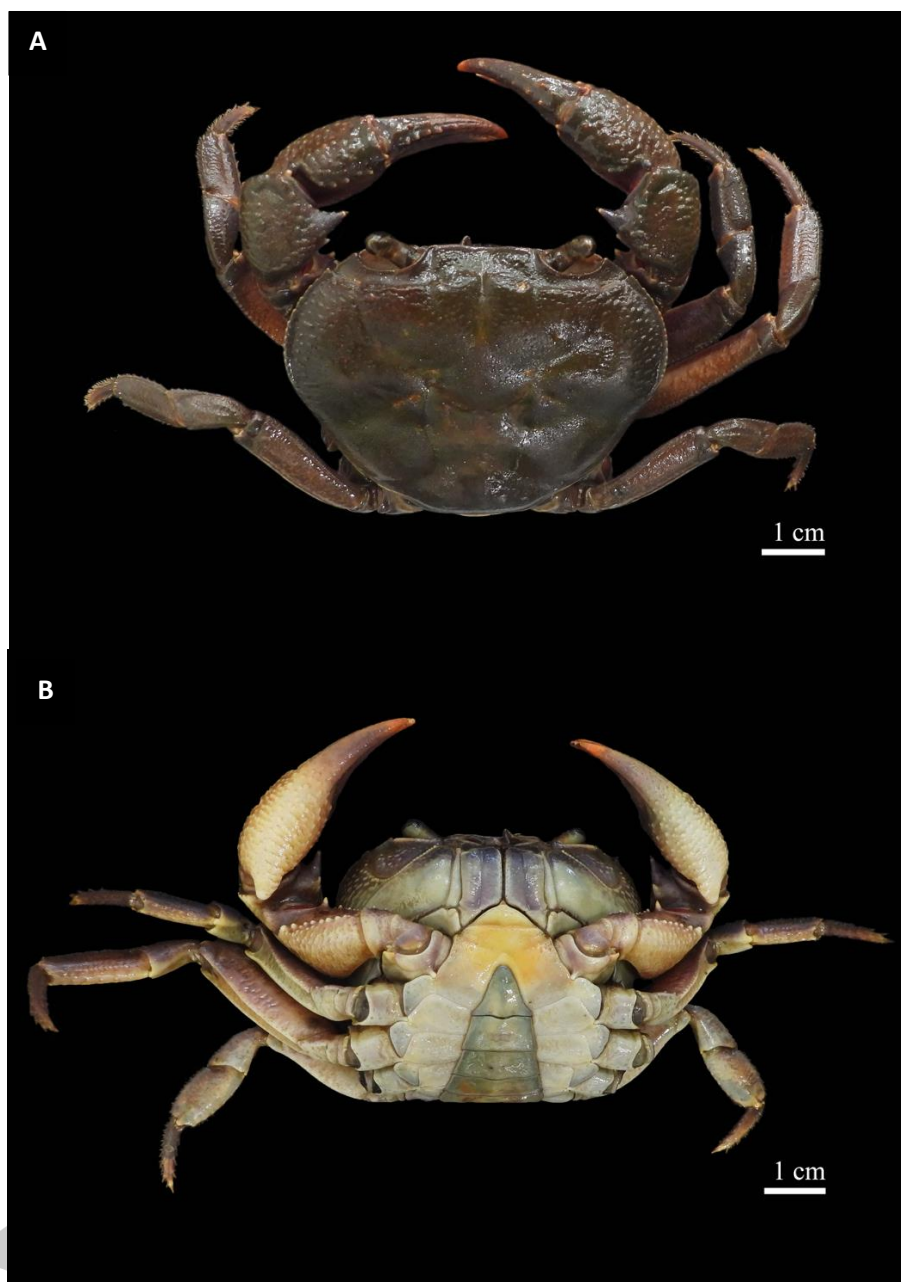
พูน ปณ ทิโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 26 PK(UBN) 11 เพศเมีย = *Potamon* sp.

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พหุบัน ปณ จิโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 27 *Indochainamon bhumibol*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

พญ. ปณ. ทิโต ชีเว



ภาพผนวกที่ 28 ปูแดง ชาติพนม จังหวัดนครพนม = *Pudaengon thatphanom*

A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (scale bar = 1 cm)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	พรพรรณ กล้าหาญ
วันเกิด	22 พฤษภาคม 2532
สถานที่เกิด	ยโสธร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	13 หมู่5 บ้านม่วง ต.โพนงาม อ.กุดชุม จ.ยโสธร
ประวัติการศึกษา	2555 วท.บ. ชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 2560 วท.ม. ชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 2567 ประ.ด. ชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนประเภทส่งเสริมการตีพิมพ์สำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2565 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ผลงานวิจัย	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบหนอง (Fejervarya limnocharis) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

พูน ปณ จิโต ชีเว