

การสำรวจรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) ในธรรมชาติ โดย
ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์



นางสาวอภิญญา เฟื่องนาค

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Investigation on mating patterns of wild swimming crab *Portunus pelagicus*
(Linnaeus, 1758) using microsatellite markers



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Marine Science

Department of Marine Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

อภิญา เพ็ญนาค : การสำรวจรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus,1758) ในธรรมชาติ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Investigation on mating patterns of wild swimming crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) using microsatellite markers) อ.ที่ปริภษาวิทยาลัยพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร, 50 หน้า.

การศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ในปูม้า *Portunus pelagicus* ทั้งหมด 5 ครอบครัว จากบริเวณตำบลคลองเคียน อำเภอดะกั่วทุ่ง จังหวัดพังงา ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง คือ DOFBSC3 DOFBSC23 DOFBSC27 DOFBSC25 DOFBSC26 และ DOFBSC29 พบว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มีความเหมาะสมในการศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าได้ ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ 1) สำรวจแอลลีลของไซท์ที่ถูกผสมโดยรวมว่าไซท์บริเวณจับปิ้งได้รับการปฏิสนธิอย่างทั่วถึง โดยสำรวจแอลลีลของแม่ปูทั้ง 5 ตัว และไซท์นอกกระดอกทั้งหมด 9 จุดบนจับปิ้งของแม่ปูแต่ละตัว เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 6 ตำแหน่ง แสดงทั้งจำนวนและขนาดของแอลลีลที่เหมือนกันของตัวอย่างไซท์จากทั้ง 9 จุด ของแม่ปูแต่ละตัว แสดงให้เห็นว่าการเข้าผสมระหว่างไซท์กับเสปิร์มเป็นไปอย่างทั่วถึงทั้งจับปิ้ง ส่วนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์รูปแบบพันธุกรรมระหว่างแม่ปูและลูก โดยเลือกใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 3 ตำแหน่ง คือ DOFBSC3 DOFBSC23 และ DOFBSC27 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง เพื่อหาจีโนไทป์ที่เป็นไปได้ของพ่อปูที่เข้ามาผสมกับแม่ปูแต่ละตัว ผลที่ได้สามารถบ่งบอกรูปแบบการสืบพันธุ์ได้ โดยรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าที่พบ คือ การเข้าผสมพันธุ์ของปูเพศเมียหนึ่งตัวกับปูเพศผู้หนึ่งตัวเท่านั้น โดยไม่พบการเข้าผสมของปูเพศผู้หลายตัวในปูเพศเมียหนึ่งตัว ซึ่งสอดคล้องกับพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของปูม้าคือ หลังการผสมพันธุ์ปูเพศผู้จะเกาะหลังปูเพศเมียจนกว่ากระดองของปูเพศเมียที่ลอกคราบจะแข็งแล้วจึงจะปล่อยปูเพศเมียไปเพื่อป้องกันการเข้าผสมพันธุ์ของปูเพศผู้ตัวอื่น รูปแบบการสืบพันธุ์ดังกล่าวในปูม้าเป็นหนึ่งในข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาที่สำคัญต่อรูปแบบการทดแทนประชากรของปูม้า ซึ่งสามารถนำไปใช้ประกอบการวางแผนอนุรักษ์ประชากรของปูม้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริภษาหลัก

5572214723 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEYWORDS: SWIMMING CRAB SINGLE FERTILIZATION MICROSATELLITE MARKERS

APINYA PHENGNAG: Investigation on mating patterns of wild swimming crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) using microsatellite markers. ADVISOR: ASST. PROF. SANIT PIYAPATTANAKORN, D.Sc, 50 pp.

Mating patterns of five ovigerous females of wild swimming crabs, *Portunus pelagicus*, were investigated using six microsatellite markers, namely DOFBSC3, DOFBSC23, DOFBSC27, DOFBSC25, DOFBSC26 and DOFBSC29. The samples were collected from Klongkian Sub-district, Takuathung District, Phangnga Province were assessed by. The results proved that microsatellite markers were suitable for the study on mating patterns of wild swimming crabs, *P. pelagicus*. This study was divided into two parts: (1) the numbers and sizes of alleles from the pool of eggs were examined to prove that eggs in the abdomen were fertilized thoroughly in abdomen. The investigation was carried out using 9 pools of eggs from the abdomen of each ovigerous females. Six microsatellite loci show no difference in the numbers and sizes of alleles from the eggs in each female. This result suggested that the fertilization of egg and sperm was homogenous in the abdomen. (2) The genotypes of the ovigerous females and their individual egg were investigated using three microsatellite loci, namely DOFBSC3 DOFBSC23 and DOFBSC27. The genotyping of the females and their fertilized eggs can determine the putative genotypes of the fathers. The results can then be used to determine mating patterns. In this study, the result showed that the mating patterns of the species are single fertilization and multiple fertilizations was not detected. This result is correspondent to mating behavior of crabs that the male mate with the molting female and attach to the female until the molting process of the female is complete. The knowledge of the mating pattern in *P. pelagicus* is one of the major information that can be utilized to enhance the efficiency of conservative planning for this crab species in this area.

Department: Marine Science

Student's Signature

Field of Study: Marine Science

Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำในการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ครบถ้วนสมบูรณ์ อีกทั้งยังจัดหาแหล่งเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วรณพ วิทยาญจน์ ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง และดร. วารินทร์ ธนาสมหวัง กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณพรรณทิภา บุรีรัตน์ สำหรับคำแนะนำในเรื่องเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่าน ในการให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในขณะทำวิทยานิพนธ์ ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณเดชธนา เฟื่องนาคและหมู่บ้านชาวประมงบริเวณตำบลคลองเคียน อำเภอดงตาล จังหวัดพังงาในการสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ ตลอดจนช่วยให้การดำเนินในภาคสนามสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอบคุณ คุณจิรวรรณ ช่วยพัฒน คุณทิพวิมล รัตนะวงวาล คุณเผชญิสุข ธีระนุกูล คุณธนวิทย์ ตั้งสูงศักดิ์ คุณปิยรัฐ สิทธิยศ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้รับเงินทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ปีงบประมาณ 2558 จากบัณฑิตวิทยาลัย เพื่อนำมาใช้เป็นค่าใช้จ่ายในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ มารดา บิดา และญาติพี่น้องทุกคนที่คอยให้กำลังใจและเป็นแรงผลักดันสำคัญทำให้งานทุกอย่างสำเร็จเป็นไปตามเป้าหมายที่วางไว้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	1
สารบัญตาราง.....	1
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
2.1 ลักษณะทั่วไปและการกระจายตัว.....	1
2.2 การสืบพันธุ์ของปูม้า และพัฒนาการของคัพภะ.....	3
2.3 พฤติกรรมการผสมพันธุ์.....	5
2.3.1 พฤติกรรมการจับคู่.....	5
2.3.2 การลอกคราบ.....	6
2.3.3 พฤติกรรมการผสมพันธุ์ในปูม้า.....	6
2.4 การศึกษาพันธุกรรมของปูม้า.....	8
2.5 การอนุรักษ์ปูม้า.....	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	13
3.1 พื้นที่ศึกษา.....	13
3.2 ขั้นตอนการศึกษา.....	14
3.2.1 การเก็บตัวอย่าง.....	14
3.2.2 การประเมินจำนวนไข่ปู.....	15
3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ.....	15

3.2.5 การทดสอบอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (gradient polymerase chain reaction; gradient PCR)	18
3.2.6 การทดสอบเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสม	20
3.2.7 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณผลผลิตพีซีอาร์	20
3.2.8 การตรวจสอบจีโนไทป์และการวิเคราะห์ผล	20
3.2.9 การคำนวณและวิเคราะห์ตัวอย่าง	21
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	22
4.1 ตัวอย่างปฐมาและจำนวนไข่นอกกระดองของแต่ละครอบครัว	22
4.2 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์.....	23
4.3 ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์.....	24
4.4 รูปแบบการผสมพันธุ์ของปฐมา	27
4.5 จีโนไทป์ของพ่อปู	29
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ	35
5.1 อภิปรายผลการศึกษา	35
5.2 ข้อเสนอแนะ	38
รายการอ้างอิง	39
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	50

สารบัญรูปร่างภาพ

รูปที่ 1 โครงสร้างของ abdomen ในปูม้าเพศผู้ (ชาย) และปูม้าเพศเมีย (ขวา) (Chan et al., 2009).....	2
รูปที่ 2 ช่วงหนึ่งของพฤติกรรมกรรมการผสมพันธุ์ของปูม้า (Nadiyah et al., 2012)	7
รูปที่ 3 รูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ (Brooker, 2009).....	9
รูปที่ 4 ประโยชน์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ (ก) ความหลากหลายของจำนวนซ้ำของยีน (ข) การแสดงออกของเฮเทอโรไซโกต และ co-dominant markers (Snusted and Simmons, 2010)	10
รูปที่ 5 พื้นที่เก็บตัวอย่าง บริเวณตำบลคลองเคียน อำเภอดงตาล จังหวัดพังงา	13
รูปที่ 6 ปูม้าไขนอกระดอง <i>P. pelagicus</i> ระยะไข่แก่ (ก) และระยะไข่อ่อน (ข).....	15
รูปที่ 7 ไขนอกระดองที่ถูกแบ่งเป็น 9 จุดบนจับปิ้ง	17
รูปที่ 8 แสดง Chromatogram ของแอลลีลแม่ปูที่เป็นโฮโมไซโกต (ก) และเฮเทอโรไซโกต (ข).....	24
รูปที่ 9 แสดง Chromatogram ของแอลลีลแม่ปู (ก) และไข่ปู (ข) ในตำแหน่ง DOFBSC26	27

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส) อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส) และจำนวนของแอลลีลที่รายงานไว้ (Na) (Sodsuk et al., 2009; Yap et al., 2002) ...	19
ตารางที่ 2	จำนวนตัวอย่างแม่ปูไข่นอกกระดอง และจำนวนไข่นอกกระดองจากการสกัดดีเอ็นเอรวมและเดี่ยว.....	22
ตารางที่ 3	เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส) และอุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส).....	23
ตารางที่ 4	เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ จำนวนของแอลลีลที่พบ (Na) แอลลีลที่พบ (คู่เบส) จีโนไทป์ที่พบ (คู่เบส) จำนวนของแม่ปู (ตัว).....	25
ตารางที่ 5	แอลลีลของแม่ปูและไข่นอกกระดองในแต่ละตำแหน่งของไมโครแซตเทลไลต์.....	28
ตารางที่ 6	แอลลีลของตัวอ่อนที่แตกต่างจากแอลลีลของแม่ซึ่งได้รับการถ่ายทอดจากพ่อ	28
ตารางที่ 7	จีโนไทป์ของแม่ จีโนไทป์ของตัวอ่อนแยกแต่ละตัว จีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ ของแต่ละครอบครัว.....	29

บทที่ 1

บทนำ

การสืบพันธุ์เป็นปัจจัยหลักที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยการสืบพันธุ์จะช่วยเพิ่มจำนวนประชากรจากรุ่นหนึ่งสู่รุ่นหนึ่ง เพื่อเป็นการทดแทนประชากรที่ตายไป เพื่อรักษาเผ่าพันธุ์ของตัวเองไว้ให้คงอยู่ต่อไป ไม่ให้เกิดการสูญพันธุ์ โดยการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตทั่วไปสามารถแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งทั้งสองรูปแบบนี้มีการถ่ายทอดยีนที่แตกต่างกัน ถ้าเกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ลูกจะได้รับการถ่ายทอดยีนที่เหมือนกันทุกประการจากพ่อหรือแม่ แต่สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ลูกจะได้รับยีนที่ถ่ายทอดลักษณะต่างๆที่หลากหลายกว่า เนื่องจากได้รับยีนจากทั้งพ่อและแม่ ซึ่งลักษณะต่างๆที่ได้รับสืบทอดกันต่อมาเป็นลักษณะทางพันธุกรรม (Cupps, 1991) โดยความรู้เกี่ยวกับการสืบพันธุ์นี้ยังมีความสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการในการจัดลำดับของสิ่งมีชีวิตและบอกพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆได้ ซึ่งการสืบพันธุ์มีรูปแบบที่แตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต

การศึกษาการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มเตคาพอด ครัสเตเชียน สัตว์ในกลุ่มนี้ถือเป็นกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่ พบการกระจายอย่างกว้างขวางในพื้นที่เขตร้อนและเขตอบอุ่น มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางนิเวศวิทยาและทางเศรษฐกิจ (Martin et al., 2016) โดยเฉพาะกลุ่มของกุ้งและปู ซึ่งสัตว์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีการสืบพันธุ์แบบแยกเพศ โดยเพศผู้จะฝากน้ำเชื้อไว้ที่เพศเมียก่อน เมื่อไข่สุก เพศเมียจะปล่อยไข่และน้ำเชื้อออกมาผสมกันเอง และนำไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว มาเก็บไว้ในกระเปาะที่หน้าท้อง เพื่อพัฒนาเป็นตัวอ่อนในระยะต่อไป แต่การสืบพันธุ์ของสัตว์ในกลุ่มนี้ก็อาจมีลักษณะที่แตกต่างกันได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายด้าน เช่น อัตราส่วนระหว่างเพศ พัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ ขนาดที่สมบูรณ์เพศ ความตกไข่ และฤดูกาลวางไข่ เป็นต้น

ปูม้า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) เป็นทรัพยากรประมงที่จัดได้ว่ามีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยชนิดหนึ่ง เป็นที่นิยมบริโภคทั้งในและต่างประเทศ มีการส่งออกปูม้าสร้างรายได้ให้ประเทศเป็นอย่างมาก แต่ผลผลิตปูม้าส่วนใหญ่มาจากการจับในธรรมชาติ ส่งผลให้ปริมาณปูม้าที่จับได้ลดน้อยลง ทั้งยังมีการจับปูม้าขนาดเล็กขึ้นมาใช้ประโยชน์ โดยที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ยังไม่ถึงปูม้าที่มีไข่นอกกระดองด้วย เป็นสาเหตุที่ทำให้ทรัพยากรปูม้าลดลง

มาก เกินกว่าที่ธรรมชาติจะทดแทนได้ทัน ในปัจจุบันจึงมีการทดลองเพาะขยายพันธุ์ปูม้า เพื่อทดแทนประชากรในธรรมชาติ แต่การเพาะเลี้ยงให้ประสบความสำเร็จนั้นต้องอาศัยความรู้และความเข้าใจในชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเฉพาะรูปแบบการทดแทนประชากรที่เป็นไปตามธรรมชาติของมัน

ปูม้าโดยทั่วไปสามารถผสมพันธุ์ได้เมื่อมีอายุประมาณ 3 เดือน โดยในช่วงฤดูผสมพันธุ์เพศผู้จะลอกคราบก่อน เมื่อกระดองมีความแข็งแรงเต็มที่ จะเริ่มหาปูเพศเมียที่โตเต็มวัย จากนั้นปูเพศผู้จะเกาะหลังปูเพศเมียที่พบประมาณ 3-4 วัน จนกระทั่งปูเพศเมียลอกคราบ ลำตัวอ่อนนุ่ม ปูเพศผู้จะแทรกลำตัวเข้าไประหว่างจับปิ้งของปูเพศเมีย วิธีนี้จะเป็นการรับประกันอย่างดีว่า เชื้อสปีพันธุ์เพศผู้จะมีโอกาสผสมพันธุ์กับไข่ นอกจากนี้ยังเป็นการให้โอกาสในการเลือกคู่อีกด้วย หลังจากผสมพันธุ์แล้วปูเพศเมียจะกลับตัวอยู่ในท่าปกติ ปูเพศผู้ยังคงเกาะหลังปูเพศเมียต่อไปประมาณ 1-2 วัน จนกระทั่งปูเพศเมียกระดองแข็งจึงแยกตัวออก โดยพฤติกรรมดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่า ปูเพศผู้มีพฤติกรรมป้องกันปูเพศผู้ตัวอื่นมาผสมพันธุ์ของมัน แต่อย่างไรก็ตาม ได้พบรายงานเกี่ยวกับพฤติกรรมที่แตกต่างออกไปในกลุ่มของปูและกุ้งบางชนิด (Toonen, 2004; Walker et al., 2002) ได้เกิดการผสมพันธุ์ของเพศผู้หลายตัวกับเพศเมียตัวเดียว หรือเพศผู้ตัวเดียวกับเพศเมียหลายตัวก็เป็นได้

การใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ เป็นวิธีการที่มีความเหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างระหว่างประชากร ไมโครแซทเทลไลต์ คือบริเวณหนึ่งของจีโนมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน 2-6 เบส ความยาวประมาณ 100-500 คู่เบส ซึ่งในแต่ละตำแหน่งจะมีจำนวนลำดับที่ซ้ำกันที่มีความแตกต่างกัน โดยเครื่องหมายทางพันธุกรรมนี้มีการวิวัฒนาการรวดเร็วพอที่จะใช้ตรวจสอบโครงสร้างของประชากรและรูปแบบการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้ นอกจากนี้ยังเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างสูง และแสดงให้เห็นสภาพข่มร่วมกันของยีน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้า *P. pelagicus* บริเวณพื้นที่ตำบลคลองเคียน อำเภอดงทับทิม จังหวัดพังงา โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ จะช่วยให้ข้อมูลแทนการสังเกตพฤติกรรมผสมพันธุ์ในธรรมชาติได้ โดยใช้หลักการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของพ่อแม่ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่เรียนรู้ภายใต้เงื่อนไขการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยข้อมูลทางพันธุกรรมสามารถใช้เป็นหลักฐานทางอ้อมเพื่อใช้ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับรูปแบบการสืบพันธุ์ได้ เช่น ในบางกรณีที่กุ้งเพศเมียได้รับการผสมพันธุ์โดยกุ้งเพศผู้หลายตัว จะพบว่าลูกได้รับยีนที่ถ่ายทอดจากพ่อและแม่ที่แตกต่างกันหลายแอลลีล แสดงให้เห็นว่าเกิดการผสมพันธุ์โดยเพศผู้หลายตัวเป็นแบบ multiple fertilization หรืออาจเกิดการผสมพันธุ์แบบหนึ่งต่อหนึ่งก็ได้ เรียกว่า single fertilization ซึ่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์สามารถช่วยตรวจสอบรูปแบบการสืบพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยงานวิจัยนี้จะทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาการ

สีบพันธุ์ของปทุมมา ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเพื่อการอนุรักษ์ และการทดแทน
ประชากรให้คงอยู่ต่อไปอย่างยั่งยืน

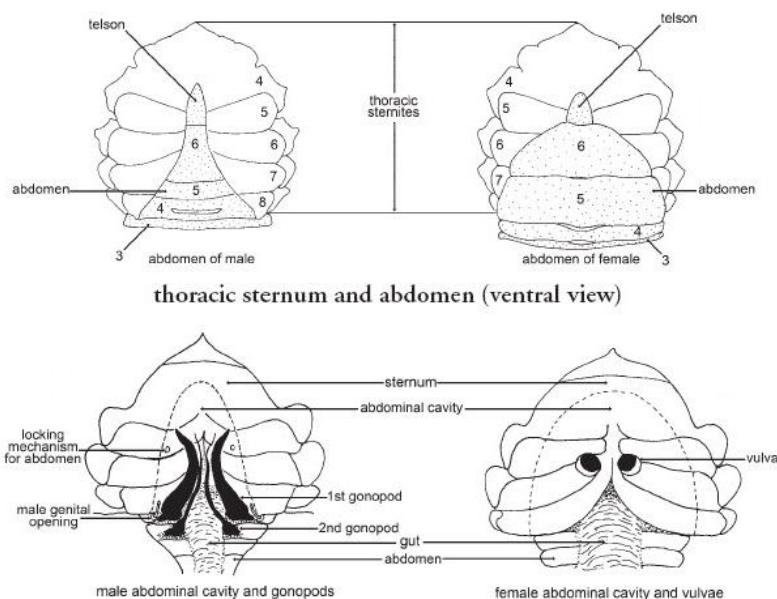


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปและการกระจายตัว

ปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) ได้ถูกจัดอยู่ใน Phylum Arthropoda, Subphylum Crustacea, Class Malacostraca, Order Decapoda, Infraorder Brachyura, Family Portunidae, Genus Portunus, Species *pelagicus* ลักษณะโดยทั่วไป คือ มีกระดองกว้าง ระหว่างขอบตามีหยักประมาณ 4 หยัก ขาสั้นกว่าก้าม ขาคู่สุดท้ายมีลักษณะแบนแบบใบพายใช้สำหรับว่ายน้ำ (สุเมธ ตันติกุล, 2527) จึงมีชื่อภาษาอังกฤษว่า Swimming crab (Nadiyah et al., 2012) สำหรับตัวผู้ลำตัวจะมีสีฟ้าอ่อน มีจุดสีขาวกระจายไปทั่วตามกระดองและก้าม พื้นท้องเป็นสีขาว ตัวผู้มักมีขนาดใหญ่กว่าตัวเมีย (Kangas, 2000; เขียน สีนอนวงศ์, 2520) ส่วนตัวเมียลักษณะโดยทั่วไปเหมือนตัวผู้ แต่ต่างกันที่กระดองจะแบนกว่าและมีก้ามสั้นกว่าตัวผู้ ลำตัวเป็นสีน้ำตาลอ่อนทั้งบริเวณก้ามและขาว่ายน้ำ ปลายขาที่มีสีม่วงแดง (Hartnoll, 1969; Ryan, 1967) นอกจากนี้ยังสังเกตได้จากรูปร่างของ abdomen หรือชื่อที่เรียกตามท้องถื่นว่า จับปิ้งหรือตะปิ้ง (สุเมธ ตันติกุล, 2527) โดยเพศผู้จะมี abdomen เป็นรูปสามเหลี่ยม แคบ และมี pleopod คู่แรกดัดแปลงเป็นอวัยวะที่ช่วยในการสืบพันธุ์ เรียกว่า gonopod หรือ penis ที่ช่วยในการถ่ายส่งเชื้อเพศผู้ไปยังเพศเมีย ส่วนเพศเมียมี abdomen เป็นรูปครึ่งวงกลม หรือสามเหลี่ยมกว้าง และมี pleopod 5 คู่ เป็นที่ยึดเกาะของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ ดังรูปที่ 1 (Fielder and Eales, 1972; Sukumaran, 1996)



รูปที่ 1 โครงสร้างของ abdomen ในปูม้าเพศผู้ (ชาย) และปูม้าเพศเมีย (ขวา) (Chan et al., 2009)

ปูในครอบครัว Portunidae มีการกระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนเป็นบริเวณกว้างในเขตชายฝั่งทะเลรอบมหาสมุทรในแถบอินโดแปซิฟิก ตั้งแต่ชายฝั่งตะวันออกของประเทศแอฟริกาจนถึงชายฝั่งด้านเหนือของประเทศนิวซีแลนด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบมหาสมุทรอินเดียทั้งฝั่งตะวันออก และฝั่งตะวันตก แถบประเทศญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ แทนซาเนีย ออสเตรเลีย จีน คาบสมุทรมลายู และประเทศไทย เป็นต้น (Edgar, 1990; Kailola et al., 1993) สำหรับประเทศไทยพบปูม้ากระจายตัวอยู่ในแนวชายฝั่งทั้งสองด้าน ได้แก่ ด้านตะวันตกคือบริเวณทะเลอันดามันและด้านตะวันออกคืออ่าวไทย ในทุกจังหวัด (Klinbunga et al., 2007; Klinbunga et al., 2010a; Klinbunga et al., 2010b) บริเวณพื้นที่ท้องทะเลที่เป็นโคลน ทราย และโคลนปนทราย ตลอดจนบริเวณหาดหิน อย่างไรก็ตามปูม้ามักชอบอาศัยอยู่บริเวณพื้นทราย หรือทรายนปนโคลนมากกว่า โดยทั่วไปจะพบปูม้ามากที่สุดที่ระดับความลึก 7-20 เมตร ถ้าความลึกมากขึ้นจะพบปูม้าน้อยลง และไม่พบปูม้าเลยที่ระดับความลึก 50 เมตรขึ้นไป (วุฒิ คุปตะวาทีน, 2543; สุเมธ ตันติกุล, 2527) ปูม้ามีพฤติกรรมการสร้างอาณาเขต โดยบริเวณความกว้างของอาณาเขตขึ้นอยู่กับขนาดของตัวปูม้า คือ ปูม้าที่ตัวใหญ่จะมีอาณาเขตกว้างขวางกว่าปูม้าที่มีขนาดเล็ก และจะต่อสู้ป้องกันอาณาเขตเมื่อถูกบุกรุกจากปูตัวอื่น ซึ่งปูม้าที่แข็งแรงจะเป็นผู้ครอบครองอาณาเขต (Alonzo and Warner, 2000; Bryars and Adams, 1999; Naiyanetr, 1998) ที่อุณหภูมิตั้งที่ 30-32 องศาเซลเซียส พบปูม้าในปริมาณมากกว่าบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 29 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ปูม้าชอบอาศัยอยู่ในน้ำทะเลความเค็มระหว่าง 28-29 PSU และถ้าความ

เค็มของน้ำสูงขึ้นกว่านี้ ปริมาณของปูม้าจะลดลง ส่วนแม่ปูม้าไข่นอกกระดองพบร้อยละ 6.46, 6.53, 9.40 และ 11.11 ที่ระดับความลึก 5-10, 10-15, 15-20 และมากกว่า 20 เมตร ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความลึก 3-5 เมตร จะไม่พบปูม้าไข่นอกกระดองเลย (จินตนา และคณะ, 2551; Klinbunga et al., 2010b)

ปูม้านับว่าเป็นสัตว์ที่อยู่ในกลุ่มเดคาพอด ครัสเตเชียน ซึ่งสัตว์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสัตว์ทะเล มีบางชนิดที่พบในน้ำจืด และพบบนบก สัตว์ในกลุ่มนี้ที่รู้จักกันดี ได้แก่ พวกกุ้ง กั้ง และปู เป็นต้น ล้วนเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จึงถูกนำมาศึกษาในหลายด้าน เช่น นิเวศวิทยา สรีระวิทยา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พฤติกรรม และชีววิทยาการสืบพันธุ์ เป็นต้น (Stillman et al., 2015; Zairion et al., 2015a; Zairion et al., 2015b) โดยเฉพาะการศึกษาด้านการสืบพันธุ์ จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาเพื่อนำไปสู่การอนุรักษ์อย่างยั่งยืน ซึ่งการศึกษาด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์เป็นวิธีการที่ช่วยให้ข้อมูลได้ชัดเจนขึ้น (Jensen and Bentzen, 2012)

2.2 การสืบพันธุ์ของปูม้า และพัฒนาการของคัพภะ

ปูม้าในธรรมชาติมีไข่นอกกระดองได้ตลอดทั้งปี โดยมีปริมาณมากที่สุด 2 ช่วง คือ ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม และเดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคม โดยขนาดของปูเพศเมียมีความกว้างกระดองแรกเริ่มสืบพันธุ์ที่ร้อยละ 50 เท่ากับ 9.47 เซนติเมตร หรือมีอายุประมาณ 144 วัน (กรรณา สัตยมาศ และ สุชาติ ยิ่งทรัพย์, 2532; จินตนา และคณะ, 2551) ปูม้ามีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งแยกเพศอย่างชัดเจน (gonochoric) และเกิดการผสมพันธุ์ภายนอก (External fertilization) (Sukumaran and Neelakantan, 1998) การผสมพันธุ์ของปูม้า จะเกิดขึ้นขณะที่ปูเพศเมียกำลังจะลอกคราบก่อนผสมพันธุ์ ปูเพศผู้จะลอกคราบก่อนประมาณ 7-10 วัน (สุเมธ ตันติกุล, 2527) เมื่อกระดองแข็งมีความสมบูรณ์เต็มที่ก็จะเริ่มหาปูเพศเมียที่โตเต็มวัย และมีความพร้อมที่จะผสมพันธุ์ คือ ช่วงที่ใกล้ลอกคราบ เมื่อพบแล้วปูเพศผู้จะเกาะหลังปูเพศเมีย โดยใช้ขาเดินคู่ที่ 2-4 พยุงปูเพศเมียไว้ประมาณ 3-4 วัน (วาสนา และคณะ, 2554) จนกระทั่งปูเพศเมียลอกคราบ ลำตัวนิ่มเพศผู้จะพลิกตัวเอาด้านท้องขึ้นมาประกบกัน และสอดจับปั้งเข้าไปในจับปั้งของปูเพศเมีย ช่วงนี้ปูเพศผู้จะใช้ขาพุงตัวเองไว้เพื่อไม่ให้ปูเพศเมียที่นิ่มเป็นอันตราย ปูเพศผู้จะปล่อยน้ำเชื้อไปไว้ในถุงเก็บน้ำเชื้อภายในปูเพศเมีย รอระยะเวลาผสมกับไข่ที่ส่งมาตามท่อเข้าไปในภายหลัง (Fielder and Eales, 1972) ขั้นตอนการผสมพันธุ์นี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง (วุฒิชัย อ่อนเอี่ยม และ วรารห์ เทพาหุดี

, 2553) หลังจากผสมพันธุ์แล้ว ปูเพศเมียก็จะกลับตัวอยู่ในท่าปกติ ปูเพศผู้จะเกาะหลังปูเพศเมียอีก 1-2 วัน (สุเมธ ตันติกุล, 2527) จนกระทั่งเพศเมียกระดองแข็งจึงแยกตัวออก จากนั้นประมาณ 20-30 วัน (บรรจง เทียนสงรัสมิ์, 2547; วุฒิ คุปตะวาทีน, 2543) ไข่จะถูกส่งมาตามท่อหน้าไข่เพื่อผสมกับน้ำเชื้อ โดยในระยะแรกไข่จะอยู่ภายในกระดอง (Arshad et al., 2006) ต่อมากระดองทางด้านท้องเปิดออกทำให้สามารถเห็นไข่ปูม้าได้ชัดเจน จึงมักเรียกปูม้าในระยะนี้ว่า “ปูม้าไข่นอกกระดอง” ไข่นอกกระดองนี้จะติดอยู่ที่จับปิ้ง (abdomen) ขณะที่เจริญแบ่งเซลล์อยู่ในเปลือกไข่ (Zairion, 2015b; Zairion, 2015a) สีของไข่จะค่อยๆเปลี่ยนจากสีเหลือง เป็นสีเหลืองอมส้ม สีนํ้าตาล สีนํ้าตาลอมเทา และสีเทาอมดำ ตามลำดับ จากนั้นปูม้าที่มีไข่สีเทาอมดำจะวางไข่ภายใน 1-2 วัน (วารินทร์ ธนาสมหวัง, 2548)

การศึกษาพัฒนาการของคัพภะที่อยู่ในไข่นั้น สามารถแบ่งระยะการพัฒนาได้เป็น 4 ระยะ คือ (นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร และ ศุภางค์ ชำปฏี, 2550; วาสนา และคณะ, 2554)

1. ระยะคลีเวจ-บลาสตูลา (Cleavage-Blastula stages) ไข่มีสีเหลืองนวล ภายในไข่มีไข่แดง (yolk) บรรจุอยู่เต็ม และมีการแบ่งเซลล์ ในตอนท้ายระยะนี้ จะเห็นการแบ่งเซลล์จำนวนมาก
2. ระยะแกสตรูลา (Gastrula stage) ไข่มีสีเหลืองส้ม ภายในไข่มีการคอดเว้าของเซลล์ไข่แดง ทำให้เกิดช่องว่าง (blastocoel) ภายใน บริเวณช่องว่างจะสังเกตเห็นเป็นเนื้อเยื่อใสๆ เป็นก้อน
3. ระยะเกิดจุดตาและเม็ดสี (Eyespots-Pigmentation stages) ไข่มีสีนํ้าตาลดำ ภายในไข่มองเห็นเป็นเนื้อเยื่อของคัพภะ และมีจุดสีแดงเล็กๆ รูปร่างเป็นเสี้ยว 2 จุด เป็นจุดสีตา (eye pigment) ของคัพภะ ระยะนี้เป็นระยะที่เกิดเนื้อเยื่อของคัพภะ ในตอนท้ายของระยะนี้จะมีปริมาณของเม็ดสี (pigment) เพิ่มมากขึ้น
4. ระยะหัวใจเต้น (Heart-beating stage) ไข่มีสีเทาดำ และขนาดใหญ่ขึ้นมากเมื่อเทียบกับระยะคลีเวจ ส่วนของตาจะมีขนาดใหญ่เห็นเป็นสีดำชัดเจน และสามารถมองเห็นเป็นโครงร่างของคัพภะที่อยู่ภายในไข่ได้ชัดเจน พบการเต้นของหัวใจของคัพภะที่อยู่ในไข่ ในช่วงแรกจะมีการเต้นอย่างช้าๆ และช่วงท้ายจะเห็นการเต้นของหัวใจชัดเจน และเร็วขึ้น

โดยปริมาณไข่ของแม่ปูม้าขึ้นอยู่กับขนาดของแม่ปู และพื้นที่ที่ปูม้าอาศัยอยู่ (Arshad et al., 2006; วารินทร์ ธนาสมหวัง, 2548; วุฒิชัย อ่อนเอี่ยม และ วราร์ เทพาหุดี, 2553)

2.3 พฤติกรรมการผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์ของปูที่อยู่ในกลุ่มปูแท้จริง (Brachyuran crab หรือ True crab) มักมีพฤติกรรมต่างๆ เช่น การจับคู่ การลอกคราบของเพศเมีย และการแก่งแย่งกัน เป็นต้น โดยปูม้า *P. pelagicus* ก็มีพฤติกรรมในลักษณะเช่นเดียวกันเพื่อให้ประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์ (Asakura, 1999; Emlen and Oring, 1977; Hartnoll, 1969)

2.3.1 พฤติกรรมการจับคู่

ก่อนการผสมพันธุ์ สัตว์ต่างๆจะมีพฤติกรรมในการจับคู่ (Thompson and McLay, 2005) รวมทั้งสัตว์ในกลุ่มเดคาพอด ครัสเตเชียนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับปูม้า ก็จะมีการแสดงออกในเรื่องนี้ ซึ่งพฤติกรรมในการจับคู่ผสมพันธุ์ที่พบหลักๆ จะแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ 1) Monogamy เป็นพฤติกรรมที่เพศผู้หนึ่งตัวจับคู่กับเพศเมียหนึ่งตัวมาผสมพันธุ์กันและอยู่ด้วยกันตลอดฤดูผสมพันธุ์ ปูกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะพบพฤติกรรมแบบนี้ เช่น ปูในครอบครัว Cancridae (Mckeown and Shaw, 2008a) และครอบครัว Portunidae (Fielder and Eales, 1972; Nehring and van der Meer, 2010) ซึ่งปูม้า *P. pelagicus* จัดว่าอยู่ในครอบครัวนี้ด้วย โดยพบว่าสัตว์ที่มีการจับคู่แบบนี้มีโอกาสผสมพันธุ์แบบ single fertilization ซึ่งเพศผู้จะคอยเฝ้าเพศเมียเป็นอย่างดีจนกว่าจะผสมพันธุ์สำเร็จ 2) Polygamy คือ พฤติกรรมที่มีเพศผู้และเพศเมียมากกว่าหนึ่งตัวมาผสมพันธุ์กัน และสามารถแบ่งย่อยได้อีก 2 แบบ คือ polygyny เป็นการจับคู่ของเพศผู้หนึ่งตัวกับเพศเมียสองตัวขึ้นไป แต่มักไม่ค่อยพบพฤติกรรมนี้ในสัตว์กลุ่มเดียวกับปูม้า เนื่องจากเพศเมียมีการป้องกันตัวเองเป็นอย่างดี (Emlen and Oring, 1977) และ polyandry จะตรงข้ามกับแบบแรก คือ เพศเมียหนึ่งตัวจับคู่ผสมพันธุ์กับเพศผู้หลายตัว พฤติกรรมแบบนี้เคยพบในสัตว์กลุ่มเดคาพอด ครัสเตเชียน เนื่องจากสัดส่วนของเพศไม่สมดุล มีเพศผู้มากกว่าเพศเมีย จึงทำให้เกิดการผสมพันธุ์แบบ multiple fertilization (Baggio et al., 2011; Jossart et al., 2014) การเลือกคู่เป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่ทำให้ประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตาม พฤติกรรมการจับคู่ก็อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามความสนใจด้วย อย่างเช่น เพศเมียที่เคยจับคู่แบบ Monogamy แต่ถ้ามีลักษณะภายนอกที่โดดเด่น ก็จะต้องดูเพศผู้ตัวอื่นให้เข้ามาได้ มีผลทำให้ผู้ล่าในธรรมชาติลดน้อยลง (Koga et al., 1998)

2.3.2 การลอกคราบ

สำหรับกลุ่มปูนั้นยังมีปัจจัยที่มีผลต่อพฤติกรรมการผสมพันธุ์ ขึ้นอยู่กับกระบวนการลอกคราบของเพศเมียในช่วงที่มีการผสมพันธุ์ด้วย (Christy, 1987; Hartnoll, 2000) ซึ่งจะมี 2 แบบ คือ 1) Hard-female mating จะเกิดการผสมพันธุ์ขึ้นในขณะที่เพศเมียอยู่ในช่วงกำลังจะลอกคราบ ซึ่งกระดองเพศเมียยังแข็งอยู่ จึงทำให้การเข้าหากันไม่แน่นอน และเมื่อเพศผู้เข้าผสมแล้ว จะออกจากเพศเมียทันที จึงทำให้มีโอกาสที่เพศผู้ตัวอื่นจะเข้าผสมพันธุ์ซ้ำได้ ซึ่งพบการกระทำแบบนี้ในปูครอบครัว Corystidae, Grapsidae และ Ocypodidae 2) Soft-female mating คือ เพศผู้จะเข้าผสมทันทีหลังเพศเมียลอกคราบเสร็จ โดยจะเฝ้าเพศเมียไว้ตลอดช่วงการลอกคราบ และรองนกว่าเพศเมียจะกระดองแข็งอีกครั้ง ซึ่งเป็นการป้องกันเพศผู้ตัวอื่นไว้ได้เป็นอย่างดี ตัวอย่างเช่น ปูในครอบครัว Cheiragonidae, Cancridae และ Portunidae (Hartnoll, 1969) และจากการศึกษาในปูม้าพบว่า เพศผู้จะเข้าผสมพันธุ์เมื่อเพศเมียมีลำตัวนิ่ม หลังลอกคราบเสร็จทันที (Jivoff, 1997a; 1997b; Jivoff and Hines, 1998; Kendall et al., 2002) แต่มีปูในครอบครัว Xanthidae ที่สามารถผสมพันธุ์ได้ทั้งตอนที่เพศเมียกระดองแข็งและนิ่ม รวมทั้งยังมีพฤติกรรมในการเฝ้าคู่อีกด้วย อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ใช้ในการลอกคราบของปูในแต่ละครั้งนั้นขึ้นอยู่กับขนาด อายุ ความสมบูรณ์ของปู อาหาร และสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็มของน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเข้มแสง และข้างขึ้นข้างแรม เป็นต้น (Marshall et al., 2005; Thompson and McLay, 2005; บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2550)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.3.3 พฤติกรรมการผสมพันธุ์ในปูม้า

ปูม้าโดยทั่วไปสามารถผสมพันธุ์ได้เมื่อมีอายุประมาณ 3 เดือน (วุฒิ ศุปตะวาทีน, 2543) ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ปูเพศผู้จะลอกคราบก่อน เมื่อกระดองมีความแข็งแรงเต็มที่ จะเริ่มหาปูเพศเมียที่โตเต็มวัย ซึ่งปูเพศเมียอาจมีการปล่อยสารเคมีบางอย่างออกมาที่บวมลน้ำเป็นการล่อปูเพศผู้ด้วย (Christofferson, 1978; Kamio et al., 2002; Ridley, 1983) หลังจากนั้นเมื่อจับคู่กันได้แล้ว ปูเพศผู้จะเกาะหลังปูเพศเมียที่พบประมาณ 3-4 วัน จนกระทั่งปูเพศเมียลอกคราบ ลำตัวอ่อนนุ่ม ปูเพศผู้จะแทรกลำตัวเข้าไประหว่างจับปิ้งของปูเพศเมีย โดยใช้อวัยวะที่อยู่ตรงจับปิ้ง เรียกว่า gonopods ทำหน้าที่ถ่ายเชื้อสปีพันธุ์เพศผู้เข้าไปผสมพันธุ์ในปูเพศเมีย (Bauer and Abdalla, 2001; Dinakaran and Soundarapandian, 2009; Nadiyah et al., 2012) วิธีนี้เป็นการประกันอย่างดีว่า เชื้อสปีพันธุ์

เพศผู้จะมีโอกาสผสมพันธุ์กับไข่ นอกจากนี้ยังเป็นการเปิดโอกาสในการเลือกคู่ของมันอีกด้วย ซึ่งกลยุทธ์นี้พบมากในกลุ่มเตคาพอด ครัสเตเชียน เช่น พวกกุ้งและปู จึงทำให้สัตว์กลุ่มนี้ประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์สูง (Goldstein and Dupré, 2010; Guinot et al., 2013; Padate et al., 2010; Vallina et al., 2014) หลังจากผสมพันธุ์แล้วปูเพศเมียจะกลับตัวอยู่ในท่าปกติ ปูเพศผู้ยังคงเกาะหลังปูเพศเมียต่อไปประมาณ 1-2 วัน จนกระทั่งปูเพศเมียกระดองแข็งจึงแยกตัวออก (รูปที่ 2) โดยพฤติกรรมดังกล่าวนี้ แสดงให้เห็นว่า ปูเพศผู้มีพฤติกรรมป้องกันปูเพศผู้ตัวอื่นมาผสมพันธุ์ของมันอีก (Alcock, 1994; Poole, 1989) แต่อย่างไรก็ตาม การปกป้องคู่ผสมพันธุ์นี้เกิดโอกาสผิดพลาดได้เช่นกัน ในหลายกรณีที่เพศผู้ไม่สามารถป้องกันได้ เนื่องจากเพศผู้ตัวอื่นมีการใช้กลยุทธ์ต่างๆ เพื่อเข้าไปแทนที่จนได้ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาด เพศผู้ที่มีขนาดใหญ่กว่ามักจะได้เปรียบและจะพยายามเข้าผสมพันธุ์ซ้ำหรือแทนที่ได้สำเร็จ (Alonzo and Warner, 2000; Simmons et al., 1999) ซึ่งเคยมีรายงานพฤติกรรมแบบนี้ในปูและกุ้งบางชนิด กลุ่มปูที่เคยพบพฤติกรรมดังกล่าว ได้แก่ กลุ่มของปูก้ามดาบ *Uca mjoebergi* ซึ่งจะมีการต่อสู้เพื่อแย่งชิงเพศเมียกัน (Reaney et al., 2012)



รูปที่ 2 ช่วงหนึ่งของพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของปูม้า (Nadiah et al., 2012)

2.4 การศึกษาพันธุกรรมของปทุมมา

เริ่มแรกในการศึกษาการสืบพันธุ์ของปทุมมา จะใช้วิธีการศึกษาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายใน โดยใช้วิธีการศึกษาเนื้อเยื่อ (Histology) (Soundarapandian, 2013; Vallina et al., 2014) และยังมีการศึกษาโดยการสำรวจพฤติกรรมผสมพันธุ์โดยตรง จากการสังเกตในห้องทดลอง (Dinakaran and Soundarapandian, 2009; Fielder and Eales, 1972; Thompson and McLay, 2005) แต่พบว่าการศึกษาด้วยวิธีดังกล่าว ไม่สามารถตรวจสอบการเข้าสู่ของยีน เพื่อวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน ดังนั้น การศึกษาพันธุกรรมของปทุมมาจึงต้องใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ในการวิเคราะห์ครั้งนี้

เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ (Molecular genetics) เป็นที่นิยมอย่างมากในการใช้ศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งเกี่ยวเนื่องกับการสำรวจโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรของสิ่งมีชีวิตที่สนใจ ด้วยการสำรวจความแปรผันทางพันธุกรรมของแต่ละประชากร ข้อมูลโครงสร้างพันธุกรรมที่ได้ เป็นหนึ่งในข้อมูลที่สำคัญที่นำไปประกอบในการพิจารณาวางแผนอนุรักษ์ นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าว ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสำรวจรูปแบบการผสมพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งจะช่วยให้ข้อมูลแทน การสังเกตพฤติกรรมผสมพันธุ์ในธรรมชาติ ซึ่งทำได้ค่อนข้างลำบากโดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่อาศัย อยู่ในทะเล (Soundarapandian, 2013; Watson, 1972) เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ที่นำมาใช้ในการ วิเคราะห์จะใช้ในการระบุลักษณะพันธุกรรม (genotype) ของพ่อแม่และลูก โดยข้อมูลทาง พันธุกรรมสามารถใช้เป็นหลักฐานทางอ้อมเพื่อใช้ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับรูปแบบการสืบพันธุ์ได้

สำหรับเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics) นั้นมีวิธีการที่หลากหลายที่สามารถแสดงข้อมูลทางพันธุกรรมได้ อย่างเช่น มีการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมอัลโลไซม์ (Bryars and Adams, 1999) เครื่องหมาย AFLP (Klinbunga et al., 2007) และเครื่องหมายทางพันธุกรรม RAPD (Klinbunga et al., 2010a) เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรปทุมมาในขอบเขตพื้นที่ที่ต่างกันคือ ฝั่ง อ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน พบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนระหว่างประชากรปทุมมาที่อยู่คนละฝั่งทะเลกัน (Klinbunga et al., 2007; Klinbunga et al., 2010a) นอกจากนี้ยังใช้ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างปทุมมากับปูทะเลได้ พบว่า ปทุมามีความหลากหลายทาง พันธุกรรม (genetic diversity) สูงกว่าปูทะเล ในขณะที่ปูทะเลมีความหลากหลายของชนิด (species diversity) มากกว่าปทุมมา ซึ่งก็เป็นผลเนื่องมาจากจำนวนชนิดของปูทะเลที่มีถึง 4 ชนิด จำนวนยีน/อัล ลีลที่หลากหลาย (variable alleles) จึงกระจายตัวกันออกไปอยู่ในปูแต่ละชนิด แทนที่จะกระจุกตัว

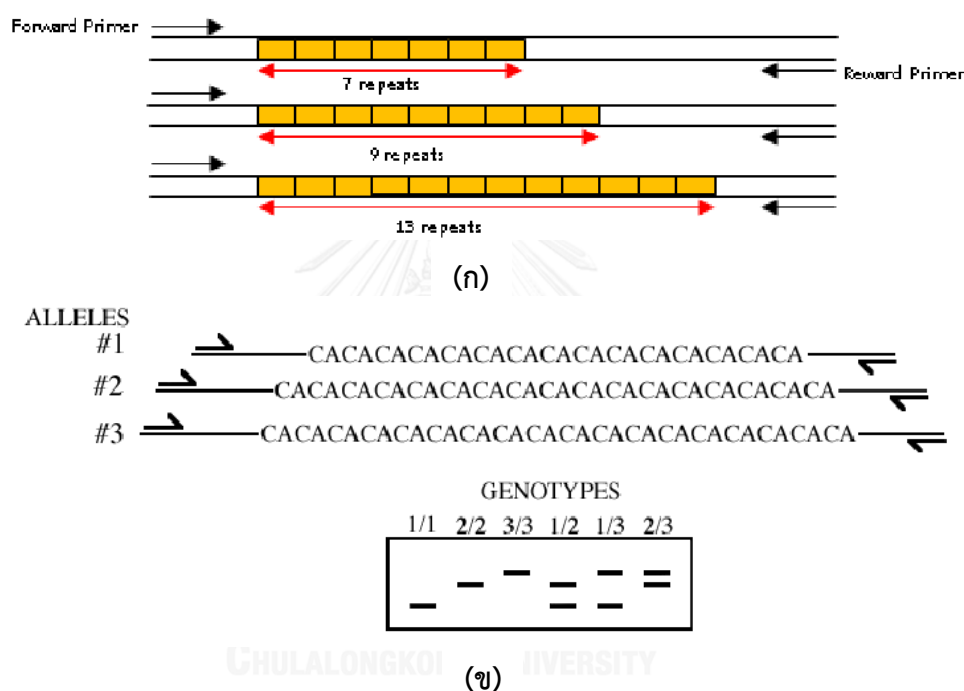
อยู่ในชนิดเดียวเหมือนปูม้ (Klinbunga et al., 2010b; Lai et al., 2010; Yushinta, 2016) แต่สำหรับการศึกษารูปแบบการผสมพันธุ์นั้นมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคหรือเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความแปรผันสูง และสามารถระบุรูปแบบพันธุกรรมเฉพาะตัวได้ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาทางเทคนิคในวิธีการที่สามารถใช้ได้สะดวกและมีประสิทธิภาพในการทำการสำรวจรูปแบบการสืบพันธุ์ดังกล่าว (Jossart et al., 2014; Mckeown and Shaw, 2008a; Sodsuk, 2010) คือ ไมโครแซตเทลไลท์ (microsatellite) หรือ Short tandem repeats (STR) โดยไมโครแซตเทลไลท์นั้นเป็นบริเวณหนึ่งของจีโนมที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ซ้ำกัน 2-6 เบส ความยาวประมาณ 100-500 คู่เบส (Brooker, 2009; Snusted and Simmons, 2010) เป็นยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน (non-coding gene) ซึ่งในแต่ละตำแหน่ง (microsatellite locus) จะมีจำนวนลำดับที่ซ้ำนี้แตกต่างกัน ดังรูปที่ 3 จึงนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างเฉพาะตัว และศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ รวมทั้งปูม้

ATCGTCGATGGCCATTAGCCTATGGAGTCC	(AT)(AT)(AT)	Dinucleotide
GTAGTCGATC ACGACGACGACGACGACGAC	(GAC)(GAC)(GAC)	Trinucleotide
GACGACGAOGACGACGCGTACGGTACACCT	(TACC)(TACC)	Tetanucleotide
AATGGGTACGATCGTAAGTCGATCCTAGGA	(CAGGT)(CAGGT)	Pentanucleotide
(ACG)₁₂ = ACG 12 repeats		

รูปที่ 3 รูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอ (Brooker, 2009)

การศึกษารูปแบบการผสมพันธุ์ของปูม้โดยใช้ไมโครแซตเทลไลท์ไพเรเมอร์ มีความเหมาะสมเนื่องจาก 1) เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตเป็นอย่างมาก 2) มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง ซึ่งจำเป็นต่อการค้นหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปูม้ในแต่ละครอบครัว 3) มีลักษณะเป็น co-dominant markers ที่สามารถใช้ตรวจสอบเฮเทอโรไซโกต (Mckeown and Shaw, 2008a) ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการสำรวจว่าปูม้มีการสืบพันธุ์แบบ single fertilization หรือ multiple fertilization โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของจีโนไทป์ระหว่างพ่อแม่และลูก จากการวิเคราะห์การแยกตัวของแอลลิล และการเข้าคู่กันของยีน (gene recombination) โดยหากตัวอ่อนมีจีโนไทป์เหมือนแม่ทุกประการ แสดงว่าอาจเกิดการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis เนื่องจากได้รับพันธุกรรมจากแม่ทั้งหมด ไม่ได้เกิดการเข้าคู่กันของยีนจากพ่อ และหากตัวอ่อนมีแอลลิลที่แตกต่างจากแม่ แสดงว่าตัวอ่อนเกิดการผสมพันธุ์โดยเกิดจากการเข้าคู่

กันของยีน ซึ่งจะได้รับจากพ่อและแม่อย่างละครึ่งคือ เกิดจากปูเพศผู้หนึ่งตัวผสมกับปูเพศเมียหนึ่งตัว เป็นการผสมพันธุ์แบบ single fertilization (Mckeown and Shaw, 2008a) แต่ถ้าตัวอ่อนที่สำรวจทั้งหมดพบว่ามีแอลลีลที่แตกต่างจากแม่มากกว่า 3 แอลลีลขึ้นไป นั้นแสดงว่าเกิดจากการที่มีปูเพศผู้มากกว่าหนึ่งตัวเข้าผสมพันธุ์กับปูเพศเมีย เรียกการผสมพันธุ์แบบนี้ว่า multiple fertilization ซึ่งรูปแบบการสืบพันธุ์ดังกล่าวนี้จะช่วยเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ (Ellis et al., 2015; Hernandez et al., 2014; Jossart et al., 2014)



รูปที่ 4 ประโยชน์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ (ก) ความหลากหลายของจำนวนซ้ำของยีน (ข) การแสดงออกของเฮเทอโรไซโกต และ co-dominant markers (Snusted and Simmons, 2010)

เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์สำหรับปูม้า *P. pelagicus* ได้ถูกพัฒนาขึ้นมา 8 ตำแหน่ง เพื่อนำมาตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของปูชนิดนี้ในประเทศออสเตรเลีย และ นิวซีแลนด์ (Yap et al., 2002) และอีก 11 ตำแหน่ง ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใช้สำหรับปูม้าในประเทศไทย โดยเฉพาะ (Sodsuk et al., 2009) จากทั้งหมด 19 ตำแหน่ง พบว่ามีเครื่องหมายทางพันธุกรรม

ไมโครแซตทาลไลท์ 10 ตำแหน่งที่มีจำนวนแอลลีลต่อโลคัสสูง (high polymorphic markers) ซึ่งน่าจะนำมาใช้ในการศึกษารูปแบบทางพันธุกรรมระหว่างตัวอ่อนและพ่อแม่พันธุ์ โดยจากการศึกษารูปแบบการผสมพันธุ์ในสัตว์กลุ่มเตคาพอด ครัสเตเซียนที่ผ่านมามีพบว่า สัตว์ในกลุ่มนี้สามารถเกิดการผสมพันธุ์แบบ multiple fertilization แต่พบในเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต ลักษณะทางภูมิศาสตร์และสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ที่จะส่งผลต่อการปรับรูปแบบการสืบพันธุ์ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่อยู่ทางธรรมชาติได้ เพราะต้องการให้รุ่นลูกมีอัตราการรอดสูงสุด ซึ่งพบว่า รุ่นลูกที่ออกมา เกิดจากแม่ที่ถูกผสมได้ทั้งสองแบบ แต่จะพบการเกิด multiple fertilization ในพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมแปรปรวนที่สุด เช่น พายุ ลมมรสุม เป็นต้น (Dennenmoser and Thiel, 2015; Gosselin et al., 2005) สำหรับประชากรปูม้าของประเทศไทยพบแพร่กระจายตามชายฝั่งทะเลเกือบทุกจังหวัด แต่รูปแบบการสืบพันธุ์นั้นยังไม่ชัดเจนว่าเป็นได้ทั้ง 2 แบบหรือไม่

ข้อมูลรูปแบบการสืบพันธุ์เป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาที่สำคัญ ในเรื่อง การทดแทนประชากร วิวัฒนาการ และการเจริญเติบโต และมีประโยชน์อย่างมากในการใช้ประกอบการวางแผนอนุรักษ์และใช้ทรัพยากรสัตว์น้ำให้ยั่งยืน และข้อมูลรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าในทะเลไทยยังไม่มี การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นสำรวจรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตทาลไลท์

2.5 การอนุรักษ์ปูม้า

ปูม้า *P. pelagicus* เป็นสัตว์น้ำชายฝั่งเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างมาก นอกจากเป็นสัตว์น้ำที่นิยมบริโภคโดยทั่วไปแล้ว ปูมายังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ ทำให้มีความต้องการปูม้าสูงขึ้น เป็นผลให้มีการจับปูม้าจากทะเลขึ้นมาใช้ประโยชน์มากจนเกินไป จนปูในธรรมชาติเกิดทดแทนประชากรไม่ทัน ส่งผลให้ผลผลิตปูม้าในท้องทะเลไทยลดลง ด้วยเหตุนี้การเพาะเลี้ยงปูม้าจึงจำเป็นต้องเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เพื่อให้ผลผลิตของปูม้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเข้ามารองรับความต้องการของตลาด ถึงแม้การเพาะพันธุ์ปูม้าประสบความสำเร็จระดับหนึ่ง แต่การเพาะเลี้ยงยังไม่ได้ผลผลิตดีเท่าที่ควร เพราะมีอัตราการรอดน้อย (Marshall et al., 2005; กอบศักดิ์ เกตุเหมือน, 2547; วารินทร์ ธนาสมหวัง, 2548) ดังนั้นการอนุรักษ์จึงมีบทบาทสำคัญในการช่วยรักษา และจัดการทรัพยากรปูม้าให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืน

การจัดการที่ดีควรมีการศึกษาให้ครบวงจรชีวิต โดยเฉพาะอัตราการรอด การเติบโต และรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้า ที่สำคัญควรศึกษาข้อมูลโครงสร้างทางพันธุกรรมประกอบด้วย ซึ่งการสืบพันธุ์เป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิตเป็นอย่างมาก เพราะการสืบพันธุ์เป็นกระบวนการที่ช่วยเพิ่มจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ สำหรับปูม้ามีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จึงพบว่าประชากรมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่อย่างไรก็ตาม ความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจลดลงได้ เนื่องจากสาเหตุต่างๆ เช่น พฤติกรรมการกินกันเอง (Cannibalism) (Maheswarudu et al., 2008) เกิดการผสมกับสายพันธุ์เดียวกัน (inbreeding) ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการผสมพันธุ์แบบ single fertilization สิ่งเหล่านี้ อาจเป็นการลดประสิทธิภาพของการทดแทนและการปรับตัวของประชากรปูม้าในพื้นที่ได้ การอนุรักษ์ให้ได้ประสิทธิผลที่ดีและยั่งยืน ควรเน้นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมไปพร้อมๆ กับการจัดการทรัพยากรให้เพียงพอ ดังนั้นการนำเครื่องหมายพันธุกรรมนี้มาใช้ตรวจสอบรูปแบบความสัมพันธ์ของพ่อแม่และลูก โครงสร้างทางพันธุกรรม การไหลของยีน ความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูม้า จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้ประกอบการวางแผนอนุรักษ์และจัดการทรัพยากรปูม้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงการนำไปใช้ในการติดตามประเมินผลการปล่อยพันธุ์ปูม้าในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งจะสามารถให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ อีกทั้งเราสามารถตรวจสอบได้ว่าระยะใดของพันธุ์ปูม้าจะมีอัตราการรอด และให้ผลตอบแทนดีที่สุด ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเพิ่มผลผลิตทางการประมงในแหล่งน้ำธรรมชาติต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พื้นที่ศึกษา

พื้นที่ตำบลคลองเคียน อำเภอดงทับทิม จังหวัดพังงา (รูปที่ 5) เป็นชุมชนชาวประมงที่ยังคงวิถีของธรรมชาติ ช่วยกันอนุรักษ์ ไม่จับสัตว์น้ำมากเกินไป และไม่ใช้เครื่องมือผิดกฎหมาย จึงทำให้สัตว์น้ำมีความอุดมสมบูรณ์ พื้นที่นี้พบปูม้า *P. pelagicus* (รูปที่ 7) กระจายตัวอยู่ตั้งแต่ในแนวชายฝั่งจนถึงบริเวณน้ำลึกห่างจากฝั่งออกไป จะพบมากที่สุดที่ระดับความลึก 7-20 เมตร โดยมีอุณหภูมิน้ำสูงสุดประมาณ 32 องศาเซลเซียส และความเค็มประมาณ 28 psu สำหรับปูม้าบริเวณนี้พบว่าสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี (Nitiratsuwan et al., 2010)

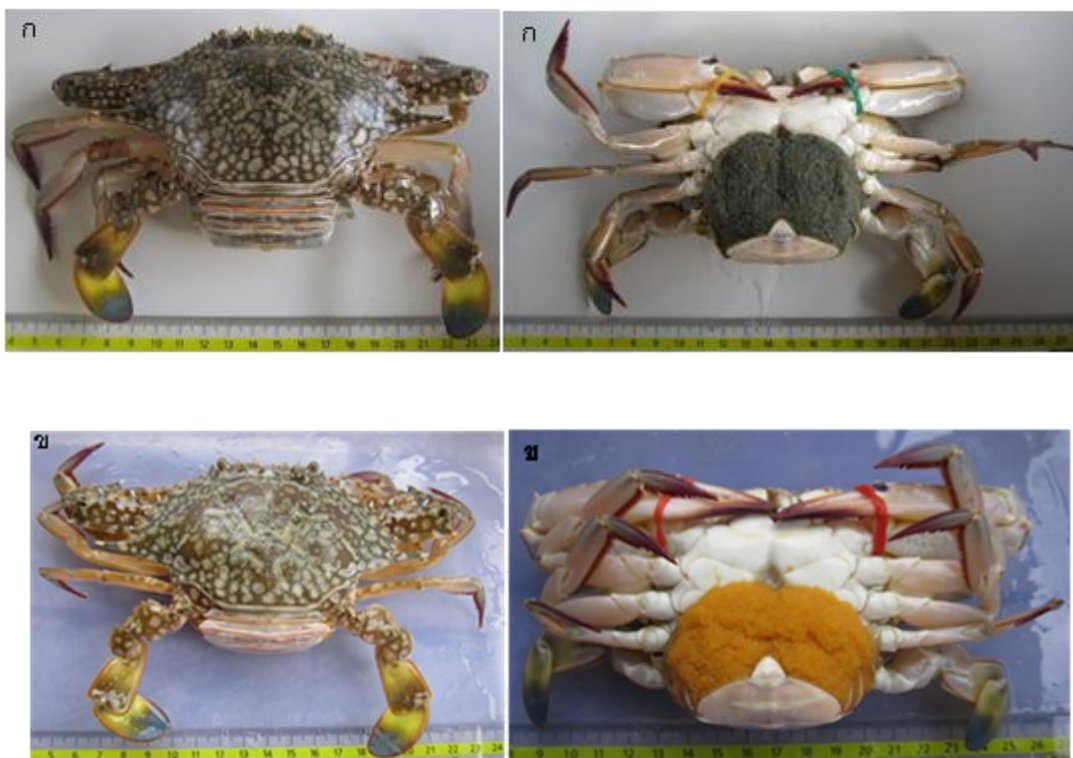


รูปที่ 5 พื้นที่เก็บตัวอย่าง บริเวณตำบลคลองเคียน อำเภอดงทับทิม จังหวัดพังงา

3.2 ขั้นตอนการศึกษา

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างแม่ปูที่มีไข่นอกกระดองได้จากการซื้อจากชาวประมงพื้นบ้าน ซึ่งชาวประมงใช้อวนจมปูที่มีตาอวนขนาดประมาณ 4 นิ้วจับปู ในบริเวณตำบลคลองเคียน อำเภอตะกั่วทุ่ง จังหวัดพังงา จำนวน 5 ตัว ที่มีขนาดความกว้างของกระดองมากกว่า 14 เซนติเมตร และมีไข่นอกกระดอง 2 ระยะ คือ ระยะไข่อ่อนที่มีสีเหลืองกับระยะไข่อ่อนที่มีสีเทาดำ ดังรูปที่ 6 (ก) และ (ข) โดยแม่ปูจะถูกล้างในน้ำเกลือในกล่องโฟมที่มีน้ำทะเลสะอาด และให้อากาศตลอดเวลา แล้วนำมาพักไว้ที่บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของชาวประมงในท้องถิ่น เพื่อให้แม่ปูปรับตัวได้กับสภาวะดังกล่าว ต่อไปจึงทำการวัดความกว้างของกระดองแม่ปู จดบันทึกข้อมูลไว้ จากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของแม่ปูจากบริเวณขาว่ายน้ำ โดยตัดปลายขาว่ายน้ำออกแล้วแกะเอาส่วนเนื้อมาเก็บรักษาไว้ในหลอดที่บรรจุไว้ด้วย 95% เอทิลแอลกอฮอล์ และเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง สำหรับไข่นอกกระดองที่ได้รับการผสมแล้ว โดยเก็บรวบรวมจาก 9 บริเวณบนจับปิ้ง (รูปที่ 7) โดยเก็บบริเวณละประมาณ 1 กรัม โดยเก็บแยกแต่ละจุดแล้วเก็บรักษาไว้ใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์เช่นกัน เพื่อนำมาใช้ในการสกัดสารพันธุกรรมและตรวจสอบจีโนมต่อไป



รูปที่ 6 ปูม้าไข่นอกกระดอง *P. pelagicus* ระยะไข่แก่ (ก) และระยะไข่อ่อน (ข)

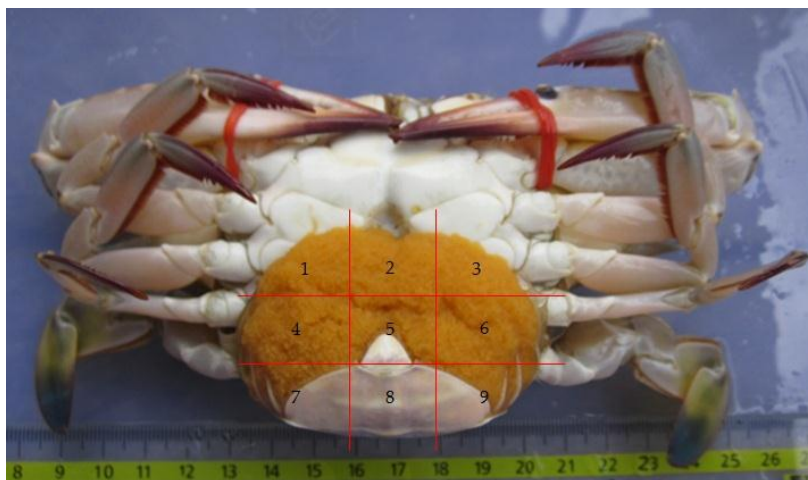
3.2.2 การประเมินจำนวนไข่ปู

เนื่องจากการสกัดดีเอ็นเอจากไข่นอกกระดองของปูม้ามีการแบ่งชั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเป็น 2 แบบคือ สกัดจากไข่วางและไข่เดี่ยวแยกแต่ละฟอง แต่การสกัดไข่วาง ต้องทำการชั่งน้ำหนักของไข่ก่อน โดยใช้ไข่จุดละ 0.05 กรัม แล้วทำการประเมิน โดยนับจำนวนไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยนับทั้งหมด 5 ซ้ำ แล้วจดบันทึกข้อมูลไว้ ก่อนที่จะนำไข่นั้นไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ

เนื้อเยื่อของแม่ปูและไข่นอกกระดองจาก 9 จุดบนจับปิ้งตามตำแหน่งที่แสดงในรูปที่ 7 ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคการกำจัดเกลือ (Salting out technique) (Miller et al., 1988) โดยใส่เนื้อเยื่อหรือไข่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TNE buffer (pH 8.0) กับ 1% SDS 335 ไมโครลิตร และเติม proteinase K (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 15 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายให้

เข้ากันก่อนนำตัวอย่างเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างออกมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติม 6M NaCl 150 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 8 นาที นำสารละลายใส่ด้านบนใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม 95% เอทิลแอลกอฮอล์ 1,000 ไมโครลิตร พลิกหลอดทดลองไปมาเพื่อให้สารพันธุกรรมตกตะกอน นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ดูดเอา 95% เอทิลแอลกอฮอล์ออกจากหลอดทดลองให้หมด แล้วเติม 70% เอทิลแอลกอฮอล์ 1,000 ไมโครลิตร พลิกหลอดทดลองไปมา นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ดูดเอา 70% เอทิลแอลกอฮอล์ออกจากหลอดทดลอง ตากสารพันธุกรรมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติม TE buffer (pH 8.0) (0.01M Tris-HCl และ 1mM EDTA) 30 ไมโครลิตร เขย่าหลอดทดลอง เพื่อให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 วินาที สารพันธุกรรมที่สกัดได้จะถูกเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอโดยการแยกขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) แต่สำหรับการสกัดดีเอ็นเอของตัวอ่อนแต่ละตัว (ไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว) จะใส่ตัวอ่อนแต่ละตัวลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แต่จะมีการปรับเปลี่ยนปริมาตรของสารให้น้อยลงในทุกขั้นตอน ดังนี้ เติม TNE buffer (pH 8.0) กับ 1% SDS 140 ไมโครลิตร และเติม proteinase K (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร นำตัวอย่างเข้าตู้อบที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างออกมาที่อุณหภูมิห้อง เติม 6M NaCl 80 ไมโครลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 8 นาที นำสารละลายใส่ด้านบนใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม 95% เอทิลแอลกอฮอล์ 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดทดลองไปมาเพื่อให้สารพันธุกรรมตกตะกอน นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที เท 95% เอทิลแอลกอฮอล์ออกจากหลอดทดลองให้หมด แล้วเติม 70% เอทิลแอลกอฮอล์ 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดทดลองไปมา นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที ดูด 70% เอทิลแอลกอฮอล์ออกจากหลอดทดลอง ตากสารพันธุกรรมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติม TE buffer (pH 8.0) (0.01M Tris-HCl และ 1mM EDTA) 15 ไมโครลิตร เขย่าหลอดทดลองเพื่อให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอโดยการแยกขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการทำ PCR ต่อไป



รูปที่ 7 ไขนอกกระดองที่ถูกแบ่งเป็น 9 จุดบนจับปิ้ง

3.2.4 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำสารพันธุกรรมที่สกัดได้ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ถูกนำมาผสมกับน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตร และ loading buffer 10X Ultra Power (ประกอบด้วยสารเรืองแสงภายใต้ UV 10,000X Ultra Power และ loading dye (สารละลายกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ และ Orange G ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100) 3 ไมโครลิตร แล้วนำมาไหลลงใน 1.0% (w/v) Agarose gel พร้อมกับ DNA มาตรฐานที่รู้ปริมาณ ทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ความต่างศักย์คงที่ 80 โวลต์ เป็นระยะเวลา 40 นาที หลังจากนั้นนำมาถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยเครื่อง Gel Documentation (Bio Rad) ภายใต้แสง UV จากนั้นประเมินปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมที่สกัดได้

3.2.5 การทดสอบอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (gradient polymerase chain reaction; gradient PCR)

ในการศึกษานี้ได้เลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ซึ่งอยู่ในนิวเคลียสดีเอ็นเอ อีกทั้งยังมีความเหมาะสมในการศึกษาเปรียบเทียบพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่และลูกปูม้าในครั้งนี้ ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่เลือกใช้นี้ถูกพัฒนาสำหรับ *Portunus pelagicus* จำนวน 4 ตำแหน่ง คือ pPp02 pPp04 pPp05 และ pPp18 (Yap et al., 2002) และอีกจำนวน 8 ตำแหน่ง คือ DOFBSC3 DOFBSC19 DOFBSC23 DOFBSC25 DOFBSC26 DOFBSC27 DOFBSC29 และ DOFMC8 (Sodsuk et al., 2009) ดังตารางที่ 1 ขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมที่สุดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์แต่ละตำแหน่ง โดยอุณหภูมิ annealing ที่ทดสอบอยู่ในช่วง 50-65 องศาเซลเซียส ส่วนประกอบพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร 1x PCR mixture ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบประมาณ 10-20 นาโนกรัม KAPA Taq Readymix PCR Kit ของ Kapa Biosystems (KAPA Taq polymerase, Kapa Taq Buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs) forward primer และ reverse primer อย่างละ 20 พิโคโมล ลำดับขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ annealing ช่วง 50-65 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที สุดท้ายจบด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 1 เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส) อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส) และจำนวนของแอลลีลที่รายงานไว้ (Na) (Sodsuk et al., 2009; Yap et al., 2002)

ตำแหน่ง	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	รูปแบบเบสซ้ำ (STR motif)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)	จำนวนแอลลีลที่พบ (Na)
pPp02	GTGACCAGTAGGCGACCGAG ACGACTGCTTGTACGACCTTCA	(CA) ₁₆	63	69-141	35
pPp04	GCCACTATCTTGCTGAGGTTGA GCCATAGCACGAACACTTTTGA	(TG) ₂₈	58	222-306	34
pPp05	GCTACGACAGTCCAATAACAACGT GATAGACCGACCTCACCTCAAAA	(AG) ₃₅	58	87-151	26
pPp18	AGTAAGGGACCGTGGTGAAT CGTTGTCTAAAGCACATGAGATT	(TG) ₁₇	58	79-157	31
DOFBSC3	TAGGGAAC TAATTGGCAA CTGTG CTCCACAACAATACCTCACCTTC	(AG) ₂₅	65	180-238	11
DOFBSC19	CGGCATGCACTTCTTCAGG TCTAAGGGTACGACGAACTCAC	(AG) ₈ AA (AG) ₃₈	65	315-429	17
DOFBSC23	ATGTCAGCTGCTTTGAGTGG ACCGGCATCGTAACACAGTT	(AC) ₂₇	52	366-396	7
DOFBSC25	CACCTGAGCTGTGCATTGAC TCTATGCTGACGACCACGAC	(AC) ₃₂	57	232-292	11
DOFBSC26	CTTTTCTCCCCTGCCTCTTC CTTCTGGGTTCTGGTGATG	(AG) ₇ AA (AG) ₁₄	55	335-399	10
DOFBSC27	TCGTTTTAGTTGCCCTCAG GGCAAACTCTCTCCCCTTG	(AC) ₂₀	55	239-297	12
DOFBSC29	TGCTTGGGATGAGTTAGATGC GCTTCCCCATACAGCAGTTC	(TG) ₃₈ TC (TG) ₆	61	208-290	9
DOFMC8*	TGAGCGTAAAATGTCACAACCA ACACACACATACACGCGGACAC	(ACTC) ₈	58	163-191	7

(* ตำแหน่ง DOFMC8 (Sodsuk et al., 2009) ถูกพบว่าใช้กับปูทะเลด้วย)

3.2.6 การทดสอบเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสม

เมื่อได้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์และอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมที่สุดจากหัวข้อ 3.2.4 ทำการเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ fluorescent primers ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ติด fluorescent dyes ที่ตำแหน่ง 5' ของไพรเมอร์ มี 3 สี ดังนี้ สีฟ้า (FAM) สีเขียว (HEX) หรือ สีเหลือง (TAMRA) ส่วนประกอบพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร 1x PCR mixture ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบประมาณ 10-20 นาโนกรัม KAPA Taq Readymix PCR Kit ของ Kapa Biosystems (KAPA Taq polymerase, Kapa Taq Buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs) forward primer (fluorescent) และ reverse primer อย่างละ 20 พิโคโมล ลำดับขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ annealing x* องศาเซลเซียส (x* ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่ใช้) 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที สุดท้ายจบด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.2.7 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณผลผลิตพีซีอาร์

ผลผลิตพีซีอาร์ 7 ไมโครลิตร ถูกผสมกับ loading buffer 10X Ultra Power ประกอบด้วย สารเรืองแสงภายใต้ UV 10,000X Ultra Power และ loading dye (สารละลายกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ และ Orange G ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100) 3 ไมโครลิตร นำมาโหลดลงใน 1.5% (w/v) Agarose gel พร้อมกับ KAPA Universal DNA Ladder (Kapa Biosystems) แล้วทำการแยกขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์คงที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยเครื่อง Gel Documentation (BIO-RAD) ภายใต้แสง UV

3.2.8 การตรวจสอบจีโนไทป์และการวิเคราะห์ผล

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ตรวจสอบแล้วของทั้งแม่ปูและตัวอ่อนถูกส่งไปตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่อง automated genotyping (ABI3730XL) ที่ MacroGen Inc. โดยส่งตัวอย่างที่เคยวิเคราะห์ผลแล้วไปเปรียบเทียบกับทุกครั้ง เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนในการระบุจีโนไทป์ในแต่ละครั้ง ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneMarker 2.2.0 ซึ่งโปรแกรมจะแสดงโครมาโตแกรมของแอลลิลแม่ปูและตัวอ่อน เพื่อนำมาใช้ระบุจีโนไทป์ของตัวแม่ปูและตัวอ่อนในแต่ละตำแหน่ง จีโนไทป์ของแม่และตัว

อ่อนของแต่ละครอบครัวจะถูกนำมาเปรียบเทียบกันในไมโครแซทเทลไลต์ของแต่ละตำแหน่ง เพื่อระบุรูปแบบการสืบพันธุ์ที่เป็นไปได้ของปู่ย่า และกำหนดจีโนไทป์ที่น่าจะเป็นไปได้ของพ่อปู่ได้

3.2.9 การคำนวณและวิเคราะห์ตัวอย่าง

เพื่อให้มั่นใจว่าการวิเคราะห์และตรวจสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่และลูกปู่ย่า โดยการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ในครั้งนี้ ถูกต้องตามกฎหมายของเมนเดลที่เรียกว่า Principle of segregation หรือ Mendel's first law (Weaver and Hedrick, 1989) ซึ่งตามทฤษฎีลูกจะได้ยีนจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง จึงทำการตรวจสอบความถูกต้องของสัดส่วนการถ่ายทอดยีนตามกฎหมายของเมนเดล โดยวิธีคำนวณไคสแควร์ (chi-square goodness-of-fit test) (Smouse et al., 1983) แล้วทดสอบโดยการวิเคราะห์ค่า P ในทุกจีโนไทป์ของการตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญของค่า $P < 0.05$ และ $df = n-1$ (Fu, 1997; Toonen, 2004) ตามสูตรการคำนวณดังนี้

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

χ^2 = ค่าไคสแควร์

O = ค่าความถี่ของยีนที่ตรวจพบ (observed genotype frequencies)

E = ค่าความถี่ของยีนที่ควรจะเป็น (expected genotype frequencies)

โดยมี degree of freedom (df) เท่ากับ n-1

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ตัวอย่างปูม้าและจำนวนไข่นอกกระดองของแต่ละครอบครัว

ตัวอย่างปูม้า *P. pelagicus* ที่นำมาศึกษามีขนาดความกว้างของกระดองมากกว่า 14 เซนติเมตร และเป็นปูม้าตัวเมียที่มีไข่นอกกระดอง 2 ระยะ คือ ระยะไข่อ่อนที่มีสีเหลืองกับระยะไขแก่ที่มีสีเทาดำ เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอพบว่า ไข่อ่อนให้ปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมดีกว่าไขแก่ ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เฉพาะไข่อ่อน โดยทำการแบ่งเป็น 9 จุดบนจับปิ้ง และทำการสกัดดีเอ็นเอ 2 แบบ คือ แบบที่ 1 ทำการรวบรวมไข่อ่อน 0.05 กรัม ซึ่งมีจำนวนไข่เฉลี่ย $1,004 \pm 14.45$ ฟอง แล้วสกัดดีเอ็นเอรวม ส่วนแบบที่ 2 ทำการสกัดสารพันธุกรรมจากไข่อ่อนแต่ละฟอง จำนวนครอบครัวละ 27-33 ฟอง โดยเฉลี่ยครอบครัวละ 30 ± 2.77 ฟอง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างแม่ปูไข่นอกกระดอง และจำนวนไข่นอกกระดองจากการสกัดดีเอ็นเอรวม และเดี่ยว

ครอบครัว	A	B	C	D	E
แม่ปู	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5
ความกว้างกระดอง (ซม.)	14.0	14.5	14.6	14.2	14.6
จำนวนไข่จากสกัดรวม (ฟอง)	9,027	9,135	8,883	8,946	9,198
จำนวนไข่จากสกัดเดี่ยว (ฟอง)	27	30	27	32	33

4.2 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์

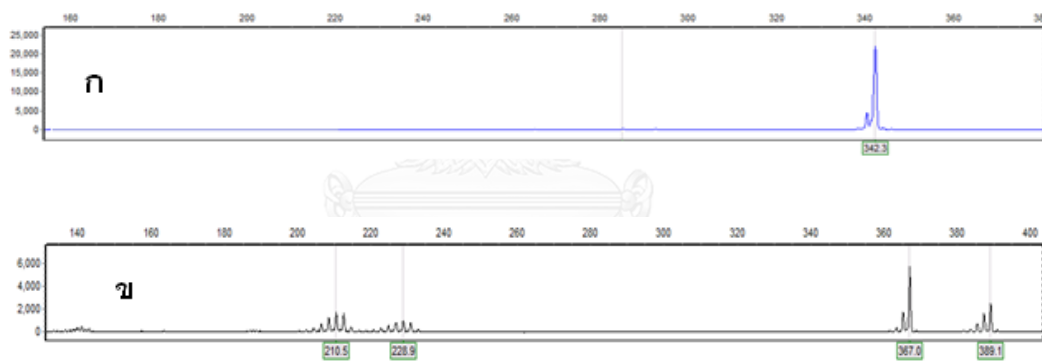
จากการทดสอบเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง (ดูที่หัวข้อ 3.2.5) พบว่ามีเพียง 6 ตำแหน่งที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์สม่ำเสมอ ด้วยอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละตำแหน่ง โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับช่วงความยาวคู่เบสที่รายงานไว้ (Sodsuk et al., 2009; Yap et al., 2002) เมื่อทราบขั้นตอนการทำพีซีอาร์ที่เหมาะสมแล้ว ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ทั้ง 6 ตำแหน่ง ที่ติดฟลูออเรสเซนส์ไว้ที่ปลาย 5' ของ forward primer ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่พบว่าใน 3 ตำแหน่ง คือ DOFBSC3 DOFBSC23 และ DOFBSC27 มี polymorphism สูงกว่าอีก 3 ตำแหน่งที่เหลือ จึงเลือกใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวในการนำมาตรวจสอบแอลลีลของตัวอย่างแต่ละตัว เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้น (Mckeown and Shaw, 2008a)

ตารางที่ 3 เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ โดยแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif) ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส) และอุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)

ตำแหน่ง	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	รูปแบบของเบสซ้ำ (STR motif)	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)	อุณหภูมิ Annealing (°C)
DOFBSC3	TAGGGAAC TAATTGGCAACTGTG-TAMRA CTCCACAACAATACCTCCACTTC	(AG) ₂₅	178-244	59
DOFBSC23	ATGTCAGCTGCTTTGAGTGG-TAMRA ACCGGCATCGTAACACAGTT	(AC) ₂₇	368-394	53
DOFBSC27	TCGTTTTAGTTGCCCTCAG-6FAM GGCAAACTCTCTCCCCTTG	(AC) ₂₀	262-280	53
DOFBSC25	CACCTGAGCTGTGCATTGAC-6FAM TCTATGCTGACGACCACGAC	(AC) ₃₂	192-208	59
DOFBSC26	CTTTTCTCCCCTGCCTCTTC-6FAM CTTCTGGGTTCTGGGTGATG	(AG) ₇ ;AA(AG) ₁₄	342-346	55
DOFBSC29	TGCTTGGGATGAGTTAGATGC-HEX GCTTCCCCATACAGCAGTTC	(TG) ₃₈ TC(TG) ₆	182-214	51

4.3 ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์

จากการสำรวจและวิเคราะห์จีโนไทป์ของแม่ปูทั้ง 5 ตัว จากตัวอย่างของไขนอกกระดองรวมที่ถูกแบ่งเป็น 9 จุดบนจับปิ้งของแม่ปู และไข่แต่ละฟอง ครอบครัวยุค 27-33 ฟอง ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ 6 ตำแหน่ง พบว่า DOFBSC26 มีแอลลีลเพียงสองขนาด คือ 342 และ 346 คู่เบส แสดงผลเป็นโฮโมไซโกตทั้งในแม่ปูและตัวอ่อนทุกครอบครัว ยกเว้นในครอบครัวที่ 2 พบแอลลีล 346 ด้วย แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งนี้มีความหลากหลายของแอลลีลต่ำ และข้อมูลที่ได้จากไมโครแซตเทลไลต์ตำแหน่งนี้ไม่สามารถนำมาช่วยวิเคราะห์ผลในการศึกษาครั้งนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนไมโครแซตเทลไลต์ตำแหน่งอื่นแสดงผลเป็นทั้งโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกต และมีความหลากหลายของแอลลีล ดังแสดงในรูปที่ 8 (ก) และ (ข) ทั้งนี้พบความหลากหลายของแอลลีลและจีโนไทป์มากที่สุดที่ตำแหน่ง DOFBSC3 โดยพบทั้งหมด 9 แอลลีล และ 5 จีโนไทป์ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 8 แสดง Chromatogram ของแอลลีลแม่ปูที่เป็นโฮโมไซโกต (ก) และเฮเทอโรไซโกต (ข)

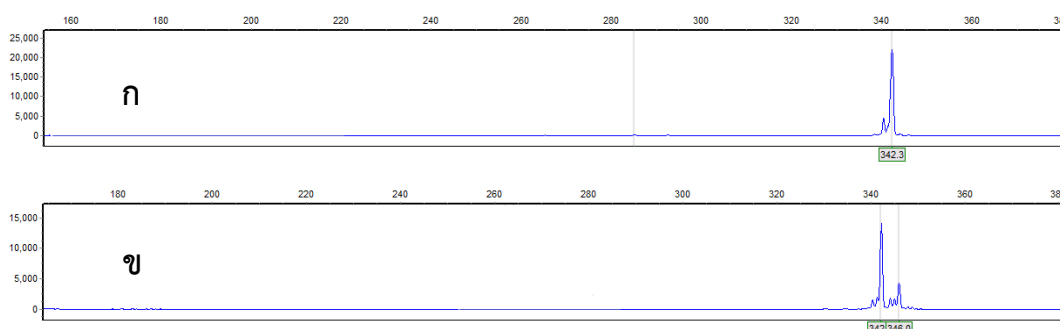
ตารางที่ 4 เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์ จำนวนของแอลลีลที่พบ (Na) แอลลีลที่พบ (คู่เบส) จีโนไทป์ที่พบ (คู่เบส) จำนวนของแม่ปู (ตัว)

ตำแหน่ง	จำนวนของแอลลีลที่พบ (Na)	แอลลีลที่พบ (คู่เบส)	จีโนไทป์ของแม่ปูที่พบ (คู่เบส)	จำนวนของแม่ปู (ตัว)
DOFBSC3	9	178	212/230	1
		190	218/218	1
		200	178/218	1
		208	200/218	2
		212		
		218		
		222		
		230		
		244		
DOFBSC23	6	368	368/390	1
		372	372/376	1
		376	376/390	1
		380	380/394	1
		390	390/390	1
		394		
DOFBSC27	6	244	262/266	2
		256	262/274	1
		262	266/266	2
		266		
		274		
		280		

ตำแหน่ง	จำนวนของแอลลีล ที่พบ (Na)	แอลลีลที่พบ (คู่เบส)	จีโนไทป์ของแม่ปู ที่พบ (คู่เบส)	จำนวนของแม่ปู (ตัว)
DOFBSC25	5	192	200/208	2
		196	192/200	1
		200	192/208	1
		204	192/204	1
		208		
DOFBSC26	2	342	342/342	5
		346		
DOFBSC29	5	182	208/208	1
		188	188/208	2
		202	182/202	1
		208	202/208	1
		214		

4.4 รูปแบบการผสมพันธุ์ของปุม้า

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ทั้ง 6 ตำแหน่ง ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแม่ปูและไข่นอกกระดองได้ โดยตำแหน่ง DOFBSC26 อาจมีความแปรปรวนค่อนข้างน้อย จึงทำให้ไม่สามารถแสดงแอลลีลของไข่ที่แตกต่างจากแม่ปูได้ในบางตัวอย่าง ดังรูปที่ 9 (ก) และ (ข) แต่ใน 5 ตำแหน่งที่เหลือ ได้แก่ DOFBSC3 DOFBSC23 DOFBSC27 DOFBSC25 และ DOFBSC29 มีความแปรปรวนมาก และแสดงแอลลีลของไข่ที่แตกต่างจากแม่ปู โดยเฉพาะตำแหน่ง DOFBSC3 DOFBSC23 และ DOFBSC27 พบความแปรปรวนมากที่สุด จะเห็นได้ว่า ตัวอ่อนพบแอลลีลที่แตกต่างจากแม่ในทุกครอบครัว (ตารางที่ 5) จึงเลือกใช้ 3 ตำแหน่งนี้ในการนำไปวิเคราะห์แอลลีลของตัวอ่อนแต่ละตัวต่อไป ซึ่งจากการสำรวจและวิเคราะห์จำนวนและขนาดแอลลีลของแม่ปูทั้ง 5 ตัว และตัวอย่างไข่นอกกระดองทั้ง 9 จุด ในแม่ปูแต่ละตัว ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่งนี้ พบว่าจำนวนและขนาดของแอลลีลที่พบในไข่ทั้ง 9 จุด ของแม่ปูแต่ละตัวไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่าไข่ที่ถูกผสมแล้วกระจายตัวอยู่อย่างสม่ำเสมอ (Homogeneous) ส่วนผลการเปรียบเทียบจีโนไทป์ระหว่างแม่ปูทั้ง 5 ตัวและตัวอ่อนจากการสกัดแบบรวมของแต่ละครอบครัว พบว่า ตัวอ่อนมีแอลลีลที่เหมือนแม่และแตกต่างจากแม่ด้วย (ตารางที่ 6) นั้นหมายความว่า ปุม้ามีการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศ แต่เป็นรูปแบบเพศผู้ หนึ่งตัวผสมกับเพศเมียหนึ่งตัว (single fertilization) หรืออาจเกิดการผสมพันธุ์โดยเพศผู้หลายตัวก็เป็นไปได้ (multiple fertilization) เนื่องจากพบแอลลีลของตัวอ่อนที่ต่างจากแม่ 2 ขนาดด้วย อาจเป็นไปได้ถ้าพ่อมีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซโกตสองตัว ทั้งนี้จึงต้องทำการวิเคราะห์แยกแอลลีลของตัวอ่อนแต่ละตัว เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 9 แสดง Chromatogram ของแอลลีลแม่ปู (ก) และไข่นอกกระดอง (ข) ในตำแหน่ง DOFBSC26

ตารางที่ 5 แอลลีลของแม่ปูและไข่ปูรวมในแต่ละตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์

	แอลลีลแต่ละตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์						จำนวน ของ ตัวอ่อน
	DOFBSC3	DOFBSC23	DOFBSC27	DOFBSC26	DOFBSC25	DOFBSC29	
แม่ปู A	212,230	368,390	262,266	342,342	200,208	208,208	
ตัวอ่อน	212,230,	368,390,	262,266,	342	200,208,	208, <u>182</u>	9,027
A รวม	<u>190</u>	<u>394</u>	<u>244,256</u>		<u>192,204</u>	<u>188</u>	
แม่ปู B	218,218	372,376	262,274	342,342	192,200	188,208	
ตัวอ่อน	218, <u>212</u>	372,376,	262,274,	342, <u>346</u>	192,200	188,208,	9,135
B รวม	<u>222</u>	<u>394</u>	<u>280</u>			<u>182</u>	
แม่ปู C	178,218	376,390	266,266	342,342	200,208	188,208	
ตัวอ่อน	178,218,	376,390,	266, <u>262</u>	342	200,208	188,208	8,883
C รวม	<u>208,244</u>	<u>394</u>					
แม่ปู D	200,218	380,394	266,266	342,342	192,208	182,202	
ตัวอ่อน	200,218,	380,394,	266, <u>274</u>	342	192,208	182,202,	8,946
D รวม	<u>190</u>	<u>376</u>				<u>208</u>	
แม่ปู E	200,218	390,390	262,266	342,342	192,204	202,208	
ตัวอ่อน	200,218,	390, <u>376</u>	262,266,	342	192,204,	202,208,	9,198
E รวม	<u>230</u>		<u>274</u>		<u>196</u>	<u>182,214</u>	

ตัวเอียงและขีดเส้นใต้ คือ แอลลีลที่คาดว่าได้รับจากพ่อ

ตารางที่ 6 แอลลีลของตัวอ่อนที่แตกต่างจากแอลลีลของแม่ซึ่งได้รับการถ่ายทอดจากพ่อ

ครอบครัว	แอลลีลของตัวอ่อนที่แตกต่างจากแอลลีลของแม่					
	DOFBSC3	DOFBSC23	DOFBSC27	DOFBSC26	DOFBSC25	DOFBSC29
ครอบครัว A	190	394	244,256	-	192,204	182,188
ครอบครัว B	212,222	394	280	346	-	182
ครอบครัว C	208,244	394	262	-	-	-
ครอบครัว D	190	376	274	-	-	208
ครอบครัว E	230	376	274	-	196	184,214

- คือ ไม่พบแอลลีลที่แตกต่างจากแม่

4.5 จีโนไทป์ของพ่อปู

จากการวิเคราะห์จีโนไทป์ของแม่และตัวอ่อนทั้งหมด เพื่อคาดคะเนจีโนไทป์ของพ่อและรูปแบบการผสมพันธุ์ที่เป็นไปได้ของปูม้า *P. pelagicus* ในพื้นที่ศึกษานี้ จะพบว่าตัวอ่อนมีจีโนไทป์ที่ได้รับแอลลีลที่เหมือนแม่และต่างจากแม่ด้วย นั่นหมายความว่า อีกแอลลีลที่พบว่าแตกต่างจากแม่ ต้องได้รับการถ่ายทอดจากพ่อ โดยจีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ของแต่ละครอบครัวในแต่ละตำแหน่ง แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จีโนไทป์ของแม่ จีโนไทป์ของตัวอ่อนแยกแต่ละตัว จีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ ของแต่ละครอบครัว

ครอบครัว	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของแม่ (คู่เบส)	จีโนไทป์ของ ตัวอ่อนที่พบ (คู่เบส)	จำนวนของ ตัวอ่อน (ตัว)	จีโนไทป์ของ พ่อที่เป็นไปได้ (คู่เบส)	χ^2
ครอบครัว A	DOFBSC3	212/230	190/212	10	190/212	3.95 ($P>0.05$; df=3)
			190/230	6		
			212/230	8		
			212/212	3		
	DOFBSC23	368/390	368/394	9	390/394	8.99* ($P<0.05$; df=3)
			368/390	12		
			390/394	3		
			390/390	3		
	DOFBSC27	262/266	244/266	9	244/256	3.66 ($P>0.05$; df=3)
			256/262	9		
			244/262	6		
			256/266	3		

ครอบครัว	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของแม่ (คู่เบส)	จีโนไทป์ของ ตัวอ่อนที่พบ (คู่เบส)	จำนวนของ ตัวอ่อน (ตัว)	จีโนไทป์ของ พ่อที่เป็นไปได้ (คู่เบส)	χ^2
ครอบครัว B	DOFBSC3	218/218	<u>212/218</u>	16	<u>212/222</u>	0.14
			218/ <u>222</u>	14		(P>0.05; df=1)
	DOFBSC23	372/376	376/ <u>394</u>	9	<u>376/394</u>	10.26*
			372/ <u>394</u>	11		(P<0.05;
376/ <u>376</u>			10	df=3)		
		372/ <u>376</u>	-			
ครอบครัว C	DOFBSC3	178/218	<u>208/218</u>	9	<u>208/244</u>	8.99*
			178/ <u>244</u>	3		(P<0.05;
	DOFBSC23	376/390	178/ <u>208</u>	12	<u>390/394</u>	df=3)
			218/ <u>244</u>	3		
376/ <u>390</u>			9	3.66		
		390/ <u>394</u>	3		(P>0.05;	
		390/ <u>390</u>	9		df=3)	
		390/ <u>390</u>	6			
	DOFBSC27	266/266	<u>262/266</u>	27	<u>262/262</u>	-

ครอบครัว	ตำแหน่ง	จีโนไทป์ของแม่ (คู่เบส)	จีโนไทป์ของ ตัวอ่อนที่พบ (คู่เบส)	จำนวนของ ตัวอ่อน (ตัว)	จีโนไทป์ของ พ่อที่เป็นไปได้ (คู่เบส)	χ^2
ครอบครัว D	DOFBSC3	200/218	<u>190</u> /218	10	<u>190/218</u>	0.75
			<u>190</u> /200	7		(P>0.05;
			<u>218</u> /218	8		df=3)
			200/ <u>218</u>	7		
ครอบครัว D	DOFBSC23	380/394	<u>376</u> /380	5	<u>376/394</u>	9.25*
			394/ <u>394</u>	4		(P<0.05;
			<u>376</u> /394	8		df=3)
			380/ <u>394</u>	15		
ครอบครัว D	DOFBSC27	266/266	<u>266</u> / <u>266</u>	15	<u>266/274</u>	0.13
			266/ <u>274</u>	17		(P>0.05;
						df=1)
ครอบครัว E	DOFBSC3	200/218	<u>200</u> /200	8	<u>200/230</u>	0.09
			218/ <u>230</u>	8		(P>0.05;
			<u>200</u> /218	9		df=3)
			200/ <u>230</u>	8		
ครอบครัว E	DOFBSC23	390/390	<u>376</u> /390	18	<u>376/390</u>	0.28
			<u>390</u> /390	15		(P>0.05;
						df=1)
ครอบครัว E	DOFBSC27	262/266	<u>262</u> / <u>274</u>	12	<u>262/274</u>	2.99
			262/ <u>262</u>	9		(P>0.05;
			<u>262</u> /266	6		df=3)
			266/ <u>274</u>	6		

ตัวเอียงและขีดเส้นใต้ คือ แอลลีลที่ได้รับจากพ่อ / * คือ ค่าไคสแควร์ที่ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล

เมื่อพิจารณาจีโนไทป์ของแม่ปูกับตัวอ่อนแต่ละตัวของทั้ง 5 ครอบครัว เพื่อคาดคะเนจีโนไทป์ของพ่อแล้ววิเคราะห์รูปแบบการผสมพันธุ์ พบว่า ไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 3 ตำแหน่งที่เลือกใช้สามารถนำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของพ่อได้ โดยผลการศึกษา มีดังนี้

การสำรวจจีโนไทป์ของครอบครัว A ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง DOFBSC3 พบว่า แม่ปูมีจีโนไทป์เป็น 212/230 และตัวอ่อนพบจีโนไทป์ 4 รูปแบบ คือ 190/212, 190/230, 212/230 และ 212/212 จากจีโนไทป์ และความถี่จีโนไทป์ของแม่และตัวอ่อนที่พบสามารถนำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของพ่อที่ควรจะเป็นได้คือ 190/212 และเพื่อความถูกต้องจึงตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.95 ($P > 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 190/212 ตำแหน่ง DOFBSC23 จะได้แม่ปูมีจีโนไทป์ 368/390 และพบว่าตัวอ่อนมีจีโนไทป์ 4 รูปแบบ คือ 368/394, 368/390, 390/394 และ 390/390 จีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ คือ 390/394 และได้ค่าไคสแควร์เท่ากับ 8.99 ($P < 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้แตกต่างไปจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสุ่มตัวอย่างไขที่น้อยเกินไป ส่วนตำแหน่ง DOFBSC27 นั้นแม่ปูพบจีโนไทป์ 262/266 และตัวอ่อนได้จีโนไทป์ 4 รูปแบบเช่นกัน คือ 244/266, 256/262, 244/262 และ 256/266 ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อที่ได้ คือ 244/256 เมื่อคำนวณค่าไคสแควร์ ได้เท่ากับ 3.66 ($P > 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 244/256 จากข้อมูลที่ได้สามารถสรุปได้ว่า โดยตัวอ่อนที่เกิดจากแม่ในครอบครัว A นี้เกิดจากการผสมของพ่อปูหนึ่งตัว (single fertilization) (ตารางที่ 4-6)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสำรวจจีโนไทป์ของครอบครัว B ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่ง DOFBSC3 พบว่า แม่ปูมีจีโนไทป์เป็น 218/218 และพบตัวอ่อนมีจีโนไทป์ 2 รูปแบบ คือ 212/218 และ 218/222 ในอัตราส่วนที่เท่าๆกัน จึงนำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ คือ 212/222 และเมื่อตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ มีค่าเท่ากับ 0.14 ($P > 0.05$; $df = 1$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 212/222 และตำแหน่ง DOFBSC23 จะได้แม่ปูมีจีโนไทป์ 372/376 และพบว่าตัวอ่อนมีจีโนไทป์ถึง 3 รูปแบบ คือ 376/394, 372/394 และ 376/376 เพราะฉะนั้นจีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้มากที่สุด คือ 376/394 แต่ไม่พบจีโนไทป์ 372/376 ในตัวอย่างที่สุ่มมาสำรวจ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการสุ่มตัวอย่างไขที่น้อยเกินไป และมีค่าไคสแควร์เท่ากับ 10.26 ($P < 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้แตกต่างไปจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล และตำแหน่ง DOFBSC27 นั้นแม่ปูพบจีโนไทป์ 262/274 ส่วนตัวอ่อนได้จีโนไทป์ 4 รูปแบบ คือ 274/280, 262/274, 262/280 และ 262/262 ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อที่ควรจะเป็นคือ 262/280 และเมื่อตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ ได้เท่ากับ 2.26

($P > 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 262/280 จากข้อมูลที่ได้ แม้ว่าในตำแหน่ง DOFBSC23 จะแสดงว่าความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้แตกต่างไปจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดลก็ตาม แต่ข้อมูลจากตำแหน่ง DOFBSC3 และ DOFBSC27 สามารถระบุได้ว่า ตัวอ่อนในครอบครัว B เกิดจากการผสมของพ่อปูหนึ่งตัว (single fertilization) (ตารางที่ 4-6)

การสำรวจจีโนไทป์ของครอบครัว C ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DOFBSC3 พบว่าแม่ปูมีจีโนไทป์เป็น 178/218 และตัวอ่อนพบจีโนไทป์ 4 รูปแบบ คือ 208/218, 178/244, 178/208 และ 218/244 จากจีโนไทป์ของแม่และตัวอ่อนที่พบจึงสามารถนำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของพ่อได้ คือ 208/244 แต่เมื่อตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ ได้ค่าเท่ากับ 8.99 ($P < 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่าความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้แตกต่างไปจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการใช้ตัวอย่างไข่น้อยเกินไปในการสำรวจ สำหรับตำแหน่ง DOFBSC23 แม่ปูจะมีจีโนไทป์ 376/390 และพบว่าตัวอ่อนมีจีโนไทป์ 4 รูปแบบเช่นกัน คือ 376/394, 376/390, 390/394 และ 390/390 เพราะฉะนั้นจีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ คือ 390/394 และเมื่อตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ได้เท่ากับ 3.66 ($P > 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 390/394 และที่ตำแหน่ง DOFBSC27 โดยแม่ปูพบจีโนไทป์ 266/266 ตัวอ่อนทั้งหมดพบจีโนไทป์เพียงรูปแบบเดียว คือ 262/266 จึงได้จีโนไทป์ของพ่อเป็น 262/262 และไม่จำเป็นต้องมีการตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ แม้ว่าในตำแหน่ง DOFBSC3 จะแสดงว่าความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้แตกต่างไปจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล และตำแหน่ง DOFBSC27 เป็น monomorphic ก็ตาม แต่ข้อมูลจากตำแหน่ง DOFBSC23 สามารถระบุได้ว่า ตัวอ่อนในครอบครัว B เกิดจากการผสมของพ่อปูหนึ่งตัว (single fertilization) (ตารางที่ 4-6)

การสำรวจจีโนไทป์ของครอบครัว D ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DOFBSC3 พบว่า แม่ปูมีจีโนไทป์เป็น 200/218 และตรวจพบจีโนไทป์ของตัวอ่อนได้ 4 รูปแบบ คือ 190/218, 190/200, 218/218 และ 200/218 จึงนำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ คือ 190/218 และเพื่อความถูกต้องจึงตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ ได้เท่ากับ 0.75 ($P > 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 190/218 สำหรับ DOFBSC23 จะได้แม่ปูมีจีโนไทป์ 380/394 และพบว่าตัวอ่อนมีจีโนไทป์ 4 รูปแบบ คือ 376/380, 394/394, 376/394 และ 380/394 เพราะฉะนั้นจีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ คือ 376/394 แต่เมื่อตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ ได้ค่าเท่ากับ 9.25 ($P < 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่า

ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้แตกต่างไปจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการใช้ตัวอย่างไข่ที่น้อยเกินไปในการสำรวจ และตำแหน่งสุดท้าย DOFBSC27 พบจีโน-ไทป์ของแม่ปูคือ 266/266 และตัวอ่อนมีจีโนไทป์ 2 รูปแบบ คือ 266/266 และ 266/274 ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อที่ได้ คือ 266/274 เมื่อตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ ได้เท่ากับ 0.13 ($P > 0.05$; $df = 1$) แสดงให้เห็นว่าความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 266/274 แม้ว่าในตำแหน่ง DOFBSC23 จะแสดงว่าความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้แตกต่างไปจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดลก็ตาม แต่ข้อมูลจากตำแหน่ง DOFBSC3 และ DOFBSC27 สามารถระบุได้ว่า ตัวอ่อนในครอบครัว B เกิดจากการผสมของพ่อปูหนึ่งตัว (single fertilization) (ตารางที่ 4-6)

การสำรวจจีโนไทป์ของครอบครัว E ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง DOFBSC3 แม่ปูมีจีโนไทป์เป็น 200/218 และตัวอ่อนพบจีโนไทป์ 4 รูปแบบ คือ 200/200, 218/230, 200/218 และ 200/230 จากจีโนไทป์ของแม่และตัวอ่อนที่พบ สามารถนำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของพ่อได้ คือ 200/230 และเมื่อตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ ได้เท่ากับ 0.09 ($P > 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่าความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 200/230 ตำแหน่ง DOFBSC23 จะได้แม่ปูมีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซโกตคือ 390/390 และพบว่าตัวอ่อนมีจีโนไทป์ 2 รูปแบบ คือ 376/390 และ 390/390 ในอัตราส่วนที่เท่าๆกัน ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อที่เป็นไปได้ คือ 376/390 เมื่อตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ ได้เท่ากับ 0.28 ($P > 0.05$; $df = 1$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 376/390 และตำแหน่งสุดท้าย DOFBSC27 นั้นพบจีโนไทป์ของแม่ปูคือ 262/266 และตัวอ่อนได้จีโนไทป์ 4 รูปแบบ คือ 262/274, 262/262, 262/266 และ 266/274 เพราะฉะนั้นจีโนไทป์ของพ่อที่ได้ คือ 262/274 และเมื่อตรวจสอบด้วยไคสแควร์ ได้เท่ากับ 2.99 ($P > 0.05$; $df = 3$) แสดงให้เห็นว่า ความถี่ของจีโนไทป์ที่สำรวจได้ไม่แตกต่างจากค่าคาดหวังตามกฎของเมนเดล ดังนั้นจีโนไทป์ของพ่อคือ 262/274 จากข้อมูลทั้ง 3 ตำแหน่ง แสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนที่เกิดจากแม่ในครอบครัว E นี้เกิดจากการผสมของพ่อปูเพียงหนึ่งตัว (single fertilization) (ตารางที่ 4-6)

จากการสำรวจรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าทั้งหมด 5 ครอบครัว ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการศึกษาคั้งนี้ พบว่ามีความเป็นไปได้สูงมากที่ปูม้าในบริเวณตำบลคลองเคียน อำเภอบึงสามพัน จังหวัดพิจิตร มีการสืบพันธุ์แบบเพศเมียหนึ่งตัวผสมกับเพศผู้หนึ่งตัว (single fertilization)

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้า *P. pelagicus* ในบริเวณพื้นที่ตำบลคลองเคียน อำเภอดงตาล จังหวัดพังงา โดยใช้แม่ปูที่มีไข่นอกกระดองจำนวน 5 ตัว โดยทำการวิเคราะห์ตัวอ่อน 2 แบบคือ 1) วิเคราะห์การกระจายตัวของแอลลีลจากไข่นอกกระดองว่าถูกผสมอย่างทั่วถึง โดยใช้สารพันธุกรรมจากการสกัดไข่วรรณที่เก็บจากไข่นอกกระดองทั้งหมด 9 จุด โดยจำนวนไข่ที่ใช้สกัดเฉลี่ยต่อจุด $1,004 \pm 14.45$ ฟองต่อจุด และ 2) วิเคราะห์รูปแบบจีโนไทป์ของตัวอ่อนที่ได้รับจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง โดยใช้สารพันธุกรรมที่สกัดจากไข่แต่ละฟอง ทั้งหมด 5 ครอบครัว จากการสกัดสารพันธุกรรมจากไข่ทั้งหมดจำนวน 100-120 ฟองต่อครอบครัวพบว่า ได้สารพันธุกรรมที่มีคุณภาพเพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ค่อนข้างยาก อาจเกิดจากไข่ที่มีขนาดเล็กมาก จึงทำให้ได้จำนวนไข่ที่สกัดสารพันธุกรรมแล้วสามารถนำมาตรวจสอบรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าในแต่ละครอบครัวอย่างมีประสิทธิภาพได้ในจำนวนดังนี้ ครอบครัว A, B, C, D และ E ได้ 27, 30, 27, 32 และ 33 ฟอง ตามลำดับ จำนวนไข่วรรณทุกครอบครัวทั้งหมด 149 ฟอง โดยเฉลี่ยครอบครัวละ 30 ± 2.77 ฟอง โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 6 ตำแหน่ง แต่พบว่าตำแหน่ง DOFBSC26 แสดงผลของแอลลีลเพียงสองขนาด ซึ่งมีความแปรผันน้อย จึงไม่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าในครั้งนี้ได้ แต่สำหรับอีก 5 ตำแหน่งที่เหลือ เมื่อนำมาตรวจสอบความแตกต่างของแอลลีลที่พบ มีเพียง 3 ตำแหน่งที่มีความแปรผันสูง (Polymorphism) คือ DOFBSC3 DOFBSC23 และ DOFBSC27 ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์รูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าในการศึกษาครั้งนี้ จากการวิเคราะห์จีโนไทป์ของแม่และตัวอ่อนจากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ 3 ตำแหน่ง เพื่อคาดการณ์จีโนไทป์ของพ่อและรูปแบบการสืบพันธุ์ พบว่า ปูม้าทั้ง 5 ครอบครัวมีการสืบพันธุ์แบบพิวเทสผู้หนึ่งตัวเข้าผสมกับพิวเทสเมียที่ศึกษา แต่สำหรับบางครอบครัวที่เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์บางตำแหน่งที่ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดลจากการตรวจสอบด้วยค่าไคสแควร์ แต่รูปแบบการสืบพันธุ์ยังสามารถตรวจสอบได้ โดยใช้ข้อมูลจากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์อีกสองตำแหน่งที่เหลือวิเคราะห์ร่วมได้ (Hernandez et al., 2014; Toonen, 2004)

รูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปูเพศเมียถูกเข้าผสมจากปูเพศผู้เพียงตัวเดียว single fertilization แสดงว่าปูม้ามามีพฤติกรรมการจับคู่แบบเพศผู้หนึ่งตัวกับเพศเมียหนึ่งตัว (monogamy) อย่างไรก็ตามในสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีการสืบพันธุ์แบบที่เพศเมียถูกเข้าผสมจากเพศผู้หลายตัว multiple fertilization ซึ่งความถี่ของการเกิดรูปแบบการผสมพันธุ์ดังกล่าวจะแปรผันตามระยะเวลาการเข้าผสมพันธุ์ จำนวนของเพศผู้และเพศเมียในประชากร หรือฤดูกาลการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Sainte-Marie et al., 2002; Roy, 2003; Gosselin et al., 2005) มีรายงานการสืบพันธุ์ในรูปแบบดังกล่าวไว้ในสิ่งมีชีวิตจำพวกครัสเตเชียน โดยเฉพาะกุ้งและปู ตัวอย่างเช่น ในกุ้ง crayfish *Orconectes placidus* พบถึง 60 เปอร์เซ็นต์ จาก 15 ครอบครัว (Walker et al., 2002) ในกุ้งมังกร Norway lobster *Nephrops norvegicus* พบ 54.6 เปอร์เซ็นต์ จาก 11 ครอบครัว (Streiff et al., 2004) และ American lobster *Homarus americanus* พบ 13 เปอร์เซ็นต์ จาก 108 ครอบครัว (Gosselin et al., 2005) ปูตัวแบน (porcelain crab) *Petrolisthes cinctipes* ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ จากการสำรวจ 10 ครอบครัว (Toonen, 2004) และปู *Ucides cordatus* สำรวจพบ 40 เปอร์เซ็นต์ จาก 10 ครอบครัว (Rafael et al., 2011) เช่นเดียวกับปู *Metacarcinus magister* พบ 40 เปอร์เซ็นต์ จาก 10 ครอบครัว (Hernandez et al., 2014) แต่สำหรับในปูหิมะ (snow crab) *Chionoecetes opilio* ไม่พบการสืบพันธุ์แบบ multiple fertilization เลย จากการสำรวจพบ 0 เปอร์เซ็นต์ทั้ง 2 ครั้ง โดยครั้งแรกสำรวจจาก 7 ครอบครัว และอีก 5 ครอบครัวในครั้งที่สอง (Urbani et al., 1998; Sainte-Marie et al., 1999) แต่ Roy (2003) รายงานว่ามีการเกิด multiple fertilization ในปูหิมะโดยเพิ่มกลุ่มสำรวจมากขึ้น แต่ก็พบในอัตราส่วนที่ต่ำมากเพียง 3.8 เปอร์เซ็นต์ จาก 79 ครอบครัว แสดงให้เห็นว่าโอกาสจะเกิด multiple fertilization ในปูหิมะอยู่ในระดับที่ต่ำมาก เนื่องจากไม่ได้พบในทุกครอบครัวที่สำรวจ จากการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการเกิดพฤติกรรมที่ปูตัวผู้หลายตัวผสมกับตัวเมียเพียงตัวเดียว สามารถพบได้ในปูหลายชนิด ซึ่งการสืบพันธุ์รูปแบบนี้มีข้อได้เปรียบหลายด้าน คือ 1) ลดโอกาสที่จะผสมพันธุ์ผิดพลาดเนื่องจากเพศผู้ไม่สมดุล หรือเกิดการผสมกันในเครือญาติ (inbreeding) (Zeh and Zeh, 2003) 2) สามารถผลิตลูกที่มีพันธุกรรมหลากหลายออกมาได้ในรุ่นเดียวกัน จึงทำให้ความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ต่ำลง ลดปัญหาการผสมพันธุ์ระหว่างพี่น้องที่มีพ่อแม่เดียวกันได้ (Yasui, 1998) และ 3) เพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของรุ่นลูกที่ในสิ่งมีชีวิตที่ผลิตลูกได้เป็นจำนวนมากในแต่ละรุ่นแต่อัตราการรอดต่ำ เช่น แมลง และสัตว์ทะเล เป็นต้น (Jennions and Petrie, 2000) และในสิ่งมีชีวิตบางชนิดสามารถเปลี่ยนรูปแบบการสืบพันธุ์ได้ โดยเฉพาะถ้าตกอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แปรปรวน จะเปลี่ยนเป็นกลยุทธ์การสืบพันธุ์เป็นแบบนี้ทันที เพื่อให้สามารถผลิตลูกได้ที่หลากหลาย และมีอัตราการรอดสูงขึ้น (Yasui, 1998)

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ปูสีน้ำตาล (*brown crab*) *Cancer pagurus* พบเฉพาะการสืบพันธุ์แบบ single fertilization จากการสำรวจทั้งหมด 18 ครอบครั้ว สำหรับปูม้า *P. pelagicus* ในบริเวณพื้นที่ตำบลคลองเคียน อำเภอตะกั่วทุ่ง จังหวัดพังงา จำนวน 5 ครอบครั้ว ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการสืบพันธุ์แบบ single fertilization ซึ่งสอดคล้องกับผลที่พบในปูสีน้ำตาล (McKeown and Shaw, 2008) โดยปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการเข้าผสมของเพศผู้เพียงตัวเดียวในปูคือ วงจรการลอกคราบของเพศเมีย ซึ่งเป็นช่วงเวลาจำกัดที่เพศเมียมีการตอบสนองต่อเพศผู้ ตลอดจนเคยพบรายงานว่าเพศผู้มีการป้องกันคู่ของมันโดยจะใส่ gonopods ที่ใช้ถ่ายสเปิร์มเข้าไปในเพศเมีย และสเปิร์มจะเกาะอยู่อย่างหนาแน่น เพื่อปิดกั้นสเปิร์มจากเพศผู้ตัวอื่น อีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญคือ สัตว์ส่วนของเพศผู้และเพศเมียที่สมบูรณ์เพศในประชากรก็มีผลต่อรูปแบบการผสมพันธุ์ โดยหากจำนวนของเพศเมียน้อยกว่าเพศผู้ จะส่งผลให้เกิดการแก่งแย่งตัวเมียเพื่อการผสมพันธุ์ และรูปแบบการสืบพันธุ์ที่เพศเมียถูกผสมโดยเพศผู้หลายตัวก็จะเพิ่มขึ้น (Hosken, 1999; Birkhead, 2000; Jennions and Petrie, 2000) สำหรับปูม้านั้นมีรายงานว่า มีสัดส่วนจำนวนของเพศเมียมากกว่าเพศผู้เล็กน้อย (สุเมธ, 2527; Songrak et al., 2013; Zairion et al., 2005) จึงเป็นเหตุผลอีกประการหนึ่งที่สนับสนุนผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้คือปูม้ามีการสืบพันธุ์แบบ single fertilization โดยปูเพศเมียมีจำนวนที่มากพอและเพศผู้ไม่จำเป็นต้องแก่งแย่งเพื่อเข้าผสมตัวเมียตัวเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การสืบพันธุ์แบบ single fertilization ในปูนั้นมิใช่ประโยชน์ต่อปูเพศเมียคือ เมื่อถึงช่วงผสมพันธุ์ ปูเพศเมียจะเริ่มการลอกคราบ ลำตัวอ่อนนุ่ม เป็นช่วงที่เพศเมียมกำลังอ่อนแอ การที่ปูเพศผู้เกาะหลังปูเพศเมียต่อไปจนกว่าเพศเมียจะลอกคราบสมบูรณ์ จะทำให้ศักยภาพที่เชื้อสืบพันธุ์เพศผู้เข้าผสมกับไข่ของเพศเมียมีโอกาสประสบความสำเร็จสูง และยังช่วยป้องกันอันตรายที่อาจจะได้รับจากเพศผู้ตัวอื่นที่เข้ามาแย่งเพศเมียเพื่อผสมพันธุ์ (Diesel, 1991) หรือจากผู้ล่าและเพศเมียตัวอื่นก็ได้ แต่การสืบพันธุ์แบบเพศผู้หนึ่งตัวกับตัวเมียหนึ่งตัว (single fertilization) อาจเป็นสาเหตุทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงและเพิ่มโอกาสการผสมกันเองในเครือญาติ แต่เนื่องจากตามกระบวนการตามธรรมชาติที่ปูม้ามีระยะตัวอ่อนที่มีการกระจายไปได้อย่างกว้างขวางในมวลน้ำ และลงเกาะเพื่อเติบโตเป็นสมาชิกใหม่ของประชากรอื่นที่ไกลออกไปได้ เหตุการณ์นี้จะช่วยลดปัญหาเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรม และการผสมพันธุ์ในเครือญาติได้ โดยมีรายงานความหลากหลายทางพันธุกรรมของปูม้าในอ่าวไทยและทะเลอันดามันพบว่า มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และยิ่งสูงกว่าปูทะเล ซึ่งเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกันแต่อยู่นอกกลุ่ม (Sodsuk et al., 1993, 2009)

แม้ว่าการสำรวจครั้งนี้พบว่าปูม้ามีการสืบพันธุ์แบบเพศผู้หนึ่งตัวกับตัวเมียหนึ่งตัว (single fertilization) แต่เป็นเพียงการสำรวจในพื้นที่เดียว และจำนวนครอบครั้วที่ใช้ในการสำรวจก็มีเพียง 5

ครอบครัว แต่สังคมประชากรปูม้า *P. pelagicus* นั้นมีขนาดใหญ่ และพบแพร่กระจายในหลายพื้นที่ (Nitratsuwan et al., 2010) จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่หากมีการสำรวจรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าหลากหลายบริเวณและเพิ่มจำนวนตัวอย่างมากขึ้น ก็มีความเป็นไปได้ที่จะพบรูปแบบการสืบพันธุ์แบบเพศผู้หลายตัวกับตัวเมียหนึ่งตัว (multiple fertilization) อย่างที่ได้มีรายงานไว้ในในปูหิมะ (snow crab) *C. opilio* เมื่อเพิ่มจำนวนครอบครัวในการสำรวจ แม้ว่าจะพบในปริมาณที่น้อยก็ตาม (Roy, 2003) และการรายงานในกุ้ง American lobster *Homarus americanus* ที่มีการสำรวจจาก 3 บริเวณ คือ Magdalen Islands Anticosti Island และ Grand Manan Island พบว่า ในบริเวณ Anticosti Island ไม่พบการสืบพันธุ์แบบเพศผู้หลายตัวกับตัวเมียหนึ่งตัวเลย แต่อีกสองบริเวณที่เหลือพบในสัดส่วนที่ต่างกันไป (Gosselin et al., 2005)

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษารูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้าด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ในครั้งนี้ พบว่า อัตราส่วนของจีโนไทป์ในบางครอบครัวไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล เนื่องจาก จีโนไทป์ของไซต์ที่คาดหวังในบางครอบครัวนั้นไม่พบในการสำรวจจริง ซึ่งอาจมีสาเหตุจาก null alleles คือ แอลลีลที่ควรพบกลับไม่ปรากฏในจีโนไทป์ของไซต์ที่สำรวจ (Hernandez et al., 2014) หรือจำนวนตัวอย่างของไซต์ที่ใช้ในการสำรวจน้อยเกินไป ทั้งนี้หากศึกษาในจำนวนที่มากขึ้นอาจทำให้แอลลีลที่ไม่พบนั้นปรากฏขึ้น

การศึกษาครั้งนี้พบการสืบพันธุ์เป็นแบบตัวผู้หนึ่งตัวผสมกับตัวเมียหนึ่งตัวเพียงรูปแบบเดียว แต่เป็นการสำรวจเพียงพื้นที่เดียว และจำนวนแม่ปูที่ใช้สำรวจก็มีเพียง 5 ตัวเท่านั้น หากมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น และสำรวจในหลายพื้นที่ อาจทำให้ข้อมูลรูปแบบการสืบพันธุ์ของปูม้ามีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยข้อมูลดังกล่าวถือว่าเป็นหนึ่งในข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาที่สำคัญต่อรูปแบบการทดแทนประชากรของปูม้า ซึ่งสามารถนำไปใช้ประกอบการวางแผนอนุรักษ์ประชากรของปูม้าได้ นอกจากนี้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ยังสามารถนำไปใช้ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม การไหลของยีน ความแปรปรวน และความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถช่วยในการจัดการและการอนุรักษ์ทรัพยากรปูม้าให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

รายการอ้างอิง

- Alcock, J. 1994. Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Annual review of entomology*, 39(1), 1-21.
- Alonzo, S.H. and Warner, R.R. 2000. Allocation to mate guarding or increased sperm production in a Mediterranean wrasse. *The American Naturalist*, 156(3), 266-275.
- Arshad, A., Efrizal, K.M. and Saad, C. 2006. Study on fecundity, embryology and larval development of blue swimming crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) under laboratory conditions. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, 1(1), 35-44.
- Asakura, A. 1999. Preliminary notes on classification of mating systems in decapod crustaceans. *AQUABIOLOGY*, 21(6 ISSU 125), 516-521.
- Baggio, R.A., Pil, M.W., Boeger, W.A., Patella, L.A., Ostrensky, A. and Pie, M.R. 2011. Genetic evidence for multiple paternity in the mangrove land crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). *Marine Biology Research*, 7(5), 520-524.
- Bauer, R.T. and Abdalla, J.H. 2001. Male mating tactics in the shrimp *Palaemonetes pugio* (Decapoda, Caridea): precopulatory mate guarding vs. pure searching. *Ethology*, 107(3), 185-199.
- Birkhead, T. 2000. *Promiscuity: an evolutionary history of sperm competition*: Harvard University Press.
- Brooker, R. 2009. Ch. chapter 6: Linkage and Genetic Mapping in Eukaryotes, *Genetics: Analysis & Principles*. University of Minnesota.
- Bryars, S.R. and Adams, M. 1999. An allozyme study of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* (Crustacea: Portunidae), in Australia: stock delineation in southern Australia and evidence for a cryptic species in northern waters. *Marine and freshwater research*, 50(1), 15-26.
- Chan, T.Y., Ng, P.K.L., Ahyong, S.T. and Tan, S.H. 2009. *Crustacean Fauna of Taiwan: Brachyuran crabs Carcinology in Taiwan and Dromiacea, Raninoida, Cyclodorippoida*. (Vol. 1). National Taiwan Ocean University, Keelung.

- Christofferson, J.P. 1978. Evidence for the controlled release of a crustacean sex pheromone. *Journal of Chemical Ecology*, 4(6), 633-639.
- Christy, J.H. 1987. Competitive mating, mate choice and mating associations of brachyuran crabs. *Bulletin of Marine Science*, 41(2), 177-191.
- Cupps, P.T. 1991. *Reproduction in domestic animals*: Elsevier.
- Dennenmoser, S. and Thiel, M. 2015. Cryptic female choice in crustaceans *Cryptic Female Choice in Arthropods* (pp. 203-237): Springer.
- Diesel, R. 1991. Sperm competition and the evolution of mating behavior in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae). *Crustacean sexual biology*. Columbia University Press, New York, 145-163.
- Dinakaran, G. and Soundarapandian, P. 2009. Mating behaviour and broodstock development of commercially important blue swimming crab, *Portunus sanguinolentus* (Herbst). *Indian Journal of Science and Technology*, 2(4), 71-75.
- Edgar, G.J. 1990. Predator-prey interactions in seagrass beds. II. Distribution and diet of the blue manna crab *Portunus pelagicus* Linnaeus at Cliff Head, Western Australia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 139(1-2), 23-32.
- Ellis, C.D., Hodgson, D.J., Andre, C., Sjørdalen, T.K., Knutsen, H. and Griffiths, A.G. 2015. Genotype Reconstruction of Paternity in European Lobsters (*Homarus gammarus*). *PloS one*, 10(11), e0139585.
- Emlen, S.T. and Oring, L.W. 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, 197(4300), 215-223.
- Fielder, D. and Eales, A. 1972. Observations on courtship, mating and sexual maturity in *Portunus pelagicus* (L., 1766)(Crustacea, Portunidae). *Journal of Natural History*, 6(3), 273-277.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Goldstein, M. and Dupré, E. 2010. Sistema reproductivo de hembras y machos en *Cancer setosus* (Molina, 1782)(Decapoda, Brachyura). *Latin american journal of aquatic research*, 38(2), 274-280.

- Gosselin, T., SAINTE-MARIE, B. and Bernatchez, L. 2005. Geographic variation of multiple paternity in the American lobster, *Homarus americanus*. *Molecular Ecology*, 14(5), 1517-1525.
- Guinot, D., Tavares, M. and Castro, P. 2013. Significance of the sexual openings and supplementary structures on the phylogeny of brachyuran crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura), with new nomina for higher-ranked podotreme taxa. *Zootaxa*, 3665(1), 1-414.
- Hartnoll, R. 2000. Evolution of brachyuran mating behavior: relation to the female molting pattern. *Crustacean Issues*, 12, 519-526.
- Hartnoll, R.G. 1969. Mating in the Brachyura. *Crustaceana*, 16, 161-181.
- Hernandez, N.R., Véliz, D. and Pardo, L.M. 2014. Use of novel microsatellite markers for population and paternity analysis in the commercially important crab *Metacarcinus edwardsii* (Brachyura: Cancridae). *Marine Biology Research*, 10(8), 839-844.
- Hosken, D. 1999. Sperm displacement in yellow dung flies: a role for females. *Trends in ecology & evolution*, 14(7), 251-252.
- Jennions, M.D. and Petrie, M. 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 75, 21-64.
- Jensen, P.C. and Bentzen, P. 2012. A molecular dissection of the mating system of the Dungeness crab, *Metacarcinus magister* (Brachyura: Cancridae). *Journal of Crustacean Biology*, 32(3), 443-456.
- Jivoff, P. 1997a. The relative roles of predation and sperm competition on the duration of the post-copulatory association between the sexes in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 40(3), 175-185.
- Jivoff, P. 1997b. Sexual competition among male blue crab, *Callinectes sapidus*. *The Biological Bulletin*, 193(3), 368-380.
- Jivoff, P. and Hines, A. 1998. Effect of female molt stage and sex ratio on courtship behavior of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Marine Biology*, 131(3), 533-542.

- Jossart, Q., Wattier, R.A., Kastally, C., Aron, S., David, B., De Ridder, C. and Rigaud, T. 2014. Genetic evidence confirms polygamous mating system in a crustacean parasite with multiple hosts. *PloS one*, 9(3), e90680.
- Kailola, P., Williams, M., Stewart, P., Reichelt, R., McNee, A. and Grieve, C. 1993. Australian fisheries resources. Bureau of Resource Sciences, Department of Primary Industries and Energy. Fisheries Research and Development Corporation, Canberra, Australia.
- Kamio, M., Matsunaga, S. and Fusetani, N. 2002. Copulation pheromone in the crab *Telmessus cheiragonus* (Brachyura: Decapoda). *Marine Ecology Progress Series*, 234, 183-190.
- Kangas, M.I. (2000). Synopsis of the biology and exploitation of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* Linnaeus, in Western Australia. (Vol. 121, pp. 1-22): Fisheries Research Report Western Australian.
- Kendall, M., Wolcott, D., Wolcott, T.G. and Hines, A.H. 2002. Influence of male size and mating history on sperm content of ejaculates of the blue crab, *Callinectes sapidus* (Rathbun).
- Klinbunga, S., Khetpu, K., Khamnamtong, B. and Menasveta, P. 2007. Genetic heterogeneity of the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) in Thailand determined by AFLP analysis. *Biochemical genetics*, 45(9-10), 725-736.
- Klinbunga, S., Thamniemdee, N., Yuvanatemiya, V., Khetpu, K., Khamnamtong, B. and Menasveta, P. 2010b. Species identification of the blue swimming crab *Portunus pelagicus* in Thai waters using mtDNA and RAPD-derived SCAR markers. *Aquaculture*, 308, S39-S46.
- Klinbunga, S., Yuvanatemiya, V., Wongphayak, S., Khetpu, K., Menasveta, P. and Khamnamtong, B. 2010a. Genetic population differentiation of the blue swimming crab *Portunus pelagicus* (Portunidae) in Thai waters revealed by RAPD analysis. *Genetic and Molecular Research*, 9(3), 1615-1624.
- Koga, T., Backwell, P., Jennions, M. and Christy, J. 1998. The effect of predation risk on mating behaviour in the fiddler crab. Paper presented at the Proceedings of the Royal Society of London B: Biological.

- Lai, J.C., Ng, P.K. and Davie, P.J. 2010. A revision of the *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) species complex (Crustacea: Brachyura: Portunidae), with the recognition of four species. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 58(2), 199-237.
- Maheswarudu, G., Josileen, J., Nair, K. and Arputharaj, M. 2008. Evaluation of the seed production and grow out culture of blue swimming crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) in India. *Indian Journal of Marine Sciences*, 37(3), 313-321.
- Marshall, S., Warburton, K., Paterson, B. and Mann, D. 2005. Cannibalism in juvenile blue-swimmer crabs *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1766): effects of body size, moult stage and refuge availability. *Applied Animal Behaviour Science*, 90(1), 65-82.
- Martin, J.W., Crandall, K.A. and Felder, D.L. 2016. Decapod crustacean phylogenetics: CRC press.
- McKeown, N.J. and Shaw, P.W. 2008a. Polymorphic nuclear microsatellite loci for studies of brown crab, *Cancer pagurus* L. *Molecular ecology resources*, 8(3), 653-655.
- McKeown, N.J. and Shaw, P.W. 2008b. Single paternity within broods of the brown crab *Cancer pagurus*: a highly fecund species with long-term sperm storage. *Marine Ecology Progress Series*, 368, 209-215.
- Miller, S., Dykes, D. and Polesky, H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3), 1215.
- Nadiah, W., Ikhwanuddin, M. and Abol-Munafi, A. 2012. Remarks on the Mating Behavior and Success of Blue Swimming Crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1766) Through the Induction of Limb Autotomy Technique. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(8), 1149-1157.
- Naiyanetr, P. 1998. Checklist of crustacean fauna in Thailand. Bangkok: Office of Environmental Policy and Planning Biodiversity. Series 5, 161, Bangkok.
- Nehring, S. and van der Meer, U. 2010. First record of a fertilized female blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Crustacea: Decapoda: Brachyura), from the German Wadden Sea and subsequent secondary prevention measures. *Aquatic Invasions*, 5(2), 215-218.

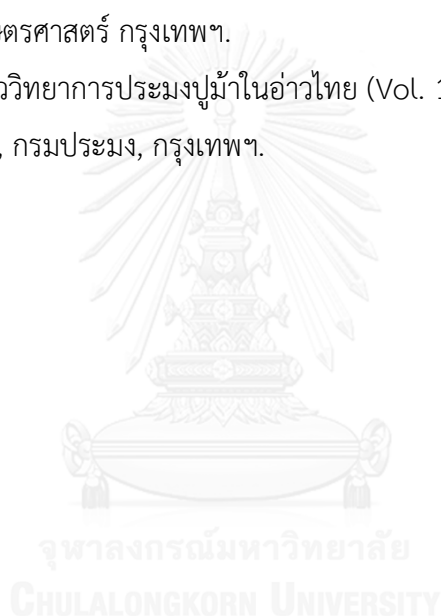
- Nitiratsuwan, T., Nitithamyong, C., Chiayvareesajja, S. and Somboonsuke, B. 2010. Distribution of blue swimming crab (*Portunus pelagicus* Linnaeus, 1758) in Trang province. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 32, 207-212.
- Padate, V.P., Rivonker, C.U., Anil, A.C., Sawant, S.S. and Krishnamurthy, V. 2010. A new species of portunid crab of the genus *Charybdis* (De Haan, 1833)(Crustacea: Decapoda: Brachyura) from Goa, India. *Marine Biology Research*, 6(6), 579-590.
- Poole, J.H. 1989. Mate guarding, reproductive success and female choice in African elephants. *Animal Behaviour*, 37, 842-849.
- Reaney, L.T., Maurer, G., Backwell, P.R. and Linde, C.C. 2012. Paternity analysis of two male mating tactics in the fiddler crab, *Uca mjoebergi*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(7), 1017-1024.
- Ridley, M. (1983). *The Explanation of Organic Diversity* Clarendon Press: Oxford.
- Roy, N. 2003. Incidence de la polyandrie chez le crabe des neiges, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). MSc Thesis, Université du Québec à Rimouski, Rimouski.
- Ryan, E.P. 1967. The morphometry of sexually mature instars in the crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). *Marine Biology Association of India*, 2, 715-723.
- Sainte-Marie, B., Sévigny, J.-M. and Carpentier, M. 2002. Interannual variability of sperm reserves and fecundity of primiparous females of the snow crab (*Chionoecetes opilio*) in relation to sex ratio. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(12), 1932-1940.
- Sainte-Marie, B., Urbani, N., Sévigny, J.-M., Hazel, F. and Kuhnlein, U. 1999. Multiple choice criteria and the dynamics of assortative mating during the first breeding season of female snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Marine Ecology Progress Series*, 181, 141-153.
- Simmons, L., Tomkins, J. and Hunt, J. 1999. Sperm competition games played by dimorphic male beetles. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 266(1415), 145-150.

- Smouse, P.E., Neel, J.V. and Liu, W. 1983. Multiple-locus departures from panmictic equilibrium within and between village gene pools of *Amerindian tribes* at different stages of agglomeration. *Genetics*, 104(1), 133-153.
- Snusted, D.P. and Simmons, M.J. 2010. *Principles of genetics*, 5 edn. . John Willey and Sons (Asia) Pte Ltd. .
- Sodsuk, P.K. 1993. Molecular genetics and systematics of tilapiine cichlids using allozymes and morphological characters. University of Stirling.
- Sodsuk, P.K., Sodsuk, S. and Pewanane, P. 2009. Genetic diversity in the blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) and mud crab (*Scylla* spp.) populations of Thailand: conclusion of the study results, benefits and utilizations. *Thai Journal of Genetics*, 2(1), 44-65.
- Sodsuk, P.K.S., S. and Pewanane, P. and Uraiwan, S. . 2010. Microsatellite markers development and the confirmation test based on parentage analysis in *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879). *Thai Journal of Genetics*, 3(2), 137-148.
- Songrak, A., Bodhisuwan, W. and Thapanand-Chaidee, T. 2013. Selectivity of traps for blue swimming crab in Trang province. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 7, 36.
- Soundarapandian, P.V., D. and Anand, T. (2013). Mating Behaviour of Sand Crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus). (Vol. 2(3), pp. 1-5): Open Access Scientific Reports.
- Stillman, R.A., Wood, K., Gilkerson, W., Elkinton, E., Black, J., Ward, D.H. and Petrie, M. 2015. Predicting effects of environmental change on a migratory herbivore. *Ecosphere*, 6(7), 1-19.
- Streiff, R., Mira, S., Castro, M. and Cancela, M. 2004. Multiple paternity in Norway lobster (*Nephrops norvegicus* L.) assessed with microsatellite markers. *Marine Biotechnology*, 6(1), 60-66.
- Sukumaran, K. and Neelakantan, B. 1998. Maturation process and reproductive cycle in two marine crabs, *Portunus (Portunus) sanguinolentus* (Herbst) and *Portunus (Portunus) pelagicus* (Linnaeus) along the Karnataka coast. *Indian Journal of Fisheries*, 45(3), 257-264.

- Sukumaran, K.K.a.N., B. 1996. Relative growth and sexual maturity in the marine crabs, *Portunus (Portunus) sanguinolentus* (Herbst) and *Portunus (Portunus) pelagicus* (Linnaeus) along the south-west coast of India. *Indian Journal of Fisheries*, 43, 215-223.
- Thompson, G.A. and McLay, C.L. 2005. Mating behaviour of *Heterozius rotundifrons* (Crustacea: Brachyura: Belliidae): is it a hard or soft shell mater? *Marine and freshwater research*, 56(8), 1107-1116.
- Toonen, R.J. 2004. Genetic evidence of multiple paternity of broods in the intertidal crab *Petrolisthes cinctipes*. *Marine Ecology Progress Series*, 270, 259-263.
- Urbani, N., Sainte-Marie, B., Sévigny, J.-M., Zadworny, D. and Kuhnlein, U. 1998. Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*)(Brachyura: Majidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(5), 1104-1113.
- Vallina, M., Moyano, M.P.S., Cuartas, E.I. and Gavio, M.A. 2014. Reproductive system and size maturity of the paddle crab *Ovalipes trimaculatus* (Brachyura: Portunidae) along the Argentine coast. *Journal of Crustacean Biology*, 34(3), 357-366.
- Walker, D., Porter, B. and Avise, J. 2002. Genetic parentage assessment in the crayfish *Orconectes placidus*, a high fecundity invertebrate with extended maternal brood care. *Molecular Ecology*, 11(10), 2115-2122.
- Watson, J. 1972. Mating behavior in the spider crab, *Chionoecetes opilio*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 29(4), 447-449.
- Weaver, R. and Hedrick, P. 1989. *Mendelian Genetics*. Genetics, WC Brown Publishers.
- Yap, E., Sezmis, E., Chaplin, J., Potter, I. and Spencer, P. 2002. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Portunus pelagicus* (Crustacea: Portunidae). *Molecular Ecology Notes*, 2(1), 30-32.
- Yasui, Y. 1998. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. *Trends in ecology & evolution*, 13(6), 246-250.
- Yushinta, F.A., I.A. Andi, A.H. Andi, P. and Andi, T. 2016. Genetic variation of *Portunus pelagicus* from Makassar Straits revealed by RAPD markers and mitochondrial 16S rRNA sequences. *African Journal of Biotechnology*, 15(7), 180-190.

- Zairion, Y.W.a.A., F. 2015b. Sexual Maturity, Reproductive Pattern and Spawning Female Population of the Blue Swimming Crab, *Portunus pelagicus* (Brachyura: Portunidae) in East Lampung Coastal Waters, Indonesia. Indian. Journal of Science and Technology, 8(7), 596-607.
- Zairion, Y.W.M., B. and Achmad, F. 2015a. Reproductive Biology of the Blue Swimming Crab *Portunus pelagicus* (Brachyura: Portunidae) in East Lampung Waters, Indonesia: Fecundity and Reproductive Potential. Tropical Life Sciences Research, 26(1), 67-85.
- Zeh, J.A.Z., D.W. 2003. Toward a new sexual selection paradigm: polyandry, conflict, and incompatibility. Ethology, 109, 929-950.
- กรุณา สัตย์มาศ และ สุชาติ ยังกทรัพย์. (2532). การเลี้ยงปูม้าโดยใช้พื้นที่และที่กำบังชนิดต่างๆ (Vol. 1, pp. 18 หน้า): กลุ่มพัฒนาแหล่งประมง ศูนย์พัฒนาประมงทะเลฝั่งอันดามัน กองประมงทะเล กรมประมง.
- กอบศักดิ์ เกตุเหมือน, ก่อเกียรติ กุลแก้ว, และสุภาวดี จิตต์หมั่น. (2547). การเลี้ยงปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) ในบ่อดิน (Vol. 38): ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง สงขลา, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- เจียน ลินอวูวศ์. (2520). การศึกษาชีววิทยาของปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus) ในอ่าวไทย (Vol. 14): งานสัตว์น้ำอื่นๆ, กองประมงทะเล, กรมประมง.
- จินตนา จินดาลิขิต, จักรพันธ์ ปิ่นพุทธศิลป์, ขนิษฐา เสรีรักษ์ และ สุวรรักษ์ วงษ์โท. (2551). ชีววิทยาและการประเมินทรัพยากรปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) บริเวณอ่าวไทยตอนบน (Vol. 3): ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยตอนบน (สมุทรปราการ), สถาบันวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีประมงทะเล, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงทะเล, กรมประมง.
- นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร และ ศุภางค์ ชำปฏี. (2550). พัฒนาการของคัพภะและระยะเวลาของการฟักไข่ในปูม้าเทศเมียที่มีไข่นอกกระดอง (Vol. 12(2), pp. 55-62): วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา.
- บรรจง เทียนสงรัสมิ. 2547. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปูม้า. สตาร์ทีม แมนเนจ กรุ๊ป, กรุงเทพฯ.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ. (2550). การผลิตปูทะเลและปูม้าน้ำ (pp. 51-65): สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) กรุงเทพฯ.
- วารินทร์ ธนาสมหวัง. (2548). การเพาะเลี้ยงปูม้าเชิงพาณิชย์. เอกสารเผยแพร่ โครงการการผลิตพันธุ์และการเลี้ยงปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) เชิงพาณิชย์: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง สมุทรสาคร, กรมประมง, กรุงเทพฯ.

- วาสนา อากรรัตน์, ลิขิต ชูชิต และวุฒิชัย อ่อนเอี่ยม. (2554). การพัฒนาการของไข่นอกกระดอง และ อัตราการฟักไข่ของแม่ปูม้า (*Portunus pelagicus* Linnaeus, 1758) ที่เลี้ยงขุนด้วยอาหารแตกต่างกัน 3 ชนิด (Vol. 5(1), pp. 56-65): วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง.
- วุฒิ คุปตะวาทีน. (2543). การเพาะและอนุบาลลูกปูม้าเพื่อปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อเป็นการเพิ่มทรัพยากรสัตว์น้ำ (Vol. 1, pp. 36 หน้า): สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งระยอง กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง.
- วุฒิชัย อ่อนเอี่ยม และ วรার্থ เทพาหุติ. 2553. ความสัมพันธ์ทางกายภาพต่อปริมาณไข่ และอัตราการฟักไข่ของแม่ปูม้า (*Portunus pelagicus* Linnaeus, 1758) ที่ได้จากการเลี้ยงในบ่อดิน. Paper presented at the เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 48 สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- สุเมธ ตันติกุล. (2527). ชีววิทยาการประมงปูม้าในอ่าวไทย (Vol. 1, pp. 62 หน้า): ฝ่ายสัตว์น้ำอื่นๆ, กองประมงทะเล, กรมประมง, กรุงเทพฯ.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอภิญญา เฟื่องนาค เกิดเมื่อวันที่ 3 กันยายน พ.ศ. 2532 จังหวัดภูเก็ต สำเร็จ การศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เมื่อปี การศึกษา 2555 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทาง ทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 และได้รับทุนอุดหนุน วิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557 ปีงบประมาณ 2558

การศึกษานี้ได้รับการเผยแพร่ทางวิชาการโดยการนำเสนอโปสเตอร์ในงานประชุม วิชาการ มีรายละเอียด ดังนี้

อภิญญา เฟื่องนาค และศานิต ปิยพัฒนากร. 2559. การศึกษาเบื้องต้นรูปแบบการ สืบพันธุ์ของปูม้าในธรรมชาติโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์. งานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 26, วันที่ 26-27 พฤษภาคม 2559, มหาวิทยาลัยทักษิณ. 8 หน้า.