

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบของ granules secretion ที่พบใน spermatheca และ vagina ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ โดยใช้เทคนิคทาง histochemistry และ histology

Histochemical and histological study on chemical nature and changes in granule secretion found in spermatheca and vagina of female mud crab *Scylla paramamosain* at different stages of ovarian development



T099245

โดย

นางสาวฉัตรรัตน์ ถนอมกลาง

ปชท
55827
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วันเดือนปี.....

b. 11885531
i.

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบของ granules secretion ที่พบใน spermatheca และ vagina ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ โดยใช้เทคนิคทาง histochemistry และ histology

Histochemical and histological study on chemical nature and changes in granule secretion found in spermatheca and vagina of female mud crab *Scylla paramamosain* at different stages of ovarian development

การศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเล มักเป็นการศึกษาที่ให้ความสำคัญกับระยะการเจริญของรังไข่เป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาสเปิร์มไว้ภายในระบบสืบพันธุ์ของเพศเมียเป็นสิ่งที่มีความสำคัญในการสืบพันธุ์ของปูทะเลเช่นกัน การศึกษาส่วนใหญ่มักอ้างว่าเมื่อมีการจับคู่ผสมเพศผู้จะปล่อยสเปิร์มไปเก็บไว้ใน sperm receptacle หรือ spermatheca ของเพศเมีย จากการศึกษาของศรีวิไล ขนุนทอง (พ.ศ.2549) ที่ได้ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคและเนื้อเยื่อของ spermatheca และ vagina กลับไม่พบสเปิร์มใน spermatheca แต่พบใน vagina นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะทางกายวิภาคของ spermatheca และ vagina ในปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญต่างระยะกันมีลักษณะแตกต่างกัน เมื่อศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อ spermatheca และ vagina โดยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin พบแกรนูลและ platelet ติดสีชมพู ทำให้มีแนวคิดที่แกรนูลและ platelet ดังกล่าวน่าจะมีบทบาทต่อการอยู่รอดของสเปิร์มในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย จึงทำการศึกษาลักษณะทางเคมีของแกรนูลและ platelet ว่าประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลกลุ่มใดบ้าง โดยใช้เทคนิคทาง Histochemistry โดยผ่าตัดเปิดกระดองปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* บั้นที่ระยะการเจริญของรังไข่ ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของ spermatheca และ vagina และศึกษาเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิคทาง Histochemistry โดยการย้อมสีพิเศษโดยใช้ Millon Technique ตรวจสอบโปรตีน, Alcian Blue Technique ที่ pH 2.5 ตรวจสอบ acid mucopolysaccharide และ Masson Trichrome เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จากลักษณะทางเนื้อเยื่อของ spermatheca พบสเปิร์มน้อยมาก แต่พบแกรนูลขนาดเล็กและ platelet สะสมในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันปริมาณมากแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนของเนื้อเยื่อ vagina การย้อมสีด้วยเทคนิคทาง Histochemistry พบแกรนูลและ platelet ดังกล่าวให้ผลบวกต่อ Millon Technique, Alcian Blue Technique และ Masson Trichrome สรุปได้ว่าแกรนูลและ platelet มีโปรตีนและ mucopolysaccharide เป็นองค์ประกอบและยังพบเส้นใยสารนอกเซลล์ใน spermatheca มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบด้วย ทำให้สันนิษฐานได้ว่า spermatheca ไม่น่าจะเป็นแหล่งเก็บสเปิร์มแต่เป็นแหล่งผลิต granule secretion เพื่อให้สเปิร์มอยู่รอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความอนุเคราะห์จากผู้ทรงคุณวุฒิหลายท่านที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ผู้เขียนขอกราบพระคุณอย่างสูงต่อผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ สัตยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอาจารย์ ดร.อนัญญา เจริญพรนิพัทธ์ ที่ให้ความสนับสนุนในทุกด้าน รวมทั้งช่วยแก้ไขข้อบกพร่องตั้งแต่เริ่มแรกของการทำปัญหาพิเศษจนกระทั่งสำเร็จเรียบร้อยทุกประการ

ขอขอบคุณ คุณสิทธิพล อินทรวิวัฒน์ และ คุณกฤษฎา คราวุธิพนธ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์แนะนำเทคนิคในการทำสไลด์เนื้อเยื่อ รวมถึงการช่วยเหลือและคำแนะนำอื่นๆที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

ขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและสถานที่ที่ใช้ในการศึกษา

ขอบคุณนายปิยภัท งามส่อง และ นางสาวนิลดา คำโหลน ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านคอมพิวเตอร์และขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านและเพื่อนๆทุกคนในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างการทดลอง

นางสาว ธิดารัตน์ ถนนกลาง
เมษายน 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้


สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลการทดลอง	18
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	35
ข้อเสนอแนะ	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	41



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการทดสอบโปรตีนด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla paramamosain</i>	23
2	ตารางที่ 2 ผลการทดสอบโปรตีนด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ oviduct ในปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla paramamosain</i>	23
3	ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla paramamosain</i>	24
4	ตารางที่ 4 ผลการทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ oviduct ในปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla paramamosain</i>	24
		
ตารางผนวกที่		หน้า
1	ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1	43
2	ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 2	45
3	ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 3	47
4	ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 4	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ปูทะเลเพศเมีย	4
2 ความแตกต่างระหว่างเพศของปูทะเล โดยอาศัยลักษณะของจับปิ้ง (abdomen) ของปูเพศเมียและเพศผู้ ที่แตกต่างกัน	5
3 ตำแหน่งของ spermatheca	6
4 น้ำหนักเฉลี่ยของ spermatheca ของปูทะเล Blue crab ในระยะต่างๆ	8
5 ตำแหน่งของ oviduct	8
6 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของ spermatheca	25
7 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของ oviduct	26
8 ลักษณะเนื้อเยื่อ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla paramamosain</i> ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ	27
9 ลักษณะเนื้อเยื่อ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla paramamosain</i> ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ	28
10 แสดงแกรนูลที่เกาะกับเส้นใยจำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (C1), platelet บริเวณ basement membrane ของ columnar epithelium (C2), นิวเคลียสบริเวณ basement membrane (C3)	28
11 แสดงแกรนูลบริเวณ basement membrane (1) และ apical surface (2)	29
12 ลักษณะทางเนื้อเยื่อ vagina ในปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla paramamosain</i> ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ	29
13 ลักษณะทางเนื้อเยื่อ vagina ในปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla paramamosain</i> ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ	30
14 แกรนูลที่มีการรวมตัวกันเป็นแผ่นกลมใหญ่ (platelet) ซึ่งยัง pack ตัวกันไม่แน่น (F1), แกรนูลที่รวมกันเป็น platelet ที่ pack กันแน่นมาก (F2)	30
15 ตำแหน่ง platelet ที่พบล้อมรอบด้วย sperm และอยู่ปะปนกับแกรนูลบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน 15.1 vagina 15.2 spermatheca	31
16 แสดง sperm แทรกตามเนื้อเยื่อภายใน vagina	31
17 ลักษณะเม็ดแกรนูลและ platelet ใน spermatheca ที่ย้อมเทคนิค Millon	31
18 ลักษณะแกรนูลและ platelet ใน vagina ที่ย้อมแล้วเทคนิค Millon	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะเนื้อเยื่อใน spermatheca ที่ย้อมด้วยเทคนิค Masson Trichrome collagen fiber (1), แกรนูลที่รวมตัวกันบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (2)	32
20	แสดง collagen บริเวณ basement membrane (1), collagen อยู่ปนกับแกรนูล และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (2), แกรนูลเกาะกับเส้นใยบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (3)	33
21	ลักษณะเนื้อเยื่อใน vagina ที่ย้อมด้วยเทคนิค Masson trichrome 19.1 กำลังขยาย (4X) 19.2 กำลังขยาย (40X)	33
22	ลักษณะเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยเทคนิค Acian blue ที่ pH 2.5 21.1 spermatheca 21.2 vagina	34
23	แสดงการเชื่อมต่อกันของระบบสืบพันธุ์ปูทะเล <i>Scylla paramamosain</i> ประกอบด้วย gonopore, vagina, oviduct, ovary และ spermatheca	36



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปูทะเลสกุล *Scylla* มีชื่อสามัญเรียกทั่วไปว่า mud crab เป็นทรัพยากรประมงที่สำคัญ และแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณป่าชายเลนที่ได้รับอิทธิพลจากน้ำขึ้น-น้ำลงในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนในมหาสมุทรแปซิฟิกและมหาสมุทรอินเดีย จึงทำให้รู้จักปูทะเลในนาม ปูป่าชายเลน (Trino and Rodriguez, 2002) ปูทะเลจัดเป็นปูขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มครอบครัว Portunid เป็นสัตว์น้ำกร่อยที่มีการอพยพย้ายถิ่นเพื่อการแพร่พันธุ์ โดยปูเพศเมียจะย้ายถิ่นจากแหล่งหากินบริเวณชายฝั่งออกไปวางไข่ในทะเล การอพยพเพื่อการแพร่พันธุ์นี้มีขึ้นหลังจากได้ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์แล้ว สำหรับในประเทศไทย พบการแพร่กระจายและการอาศัยอยู่ร่วมกันของปูทะเลตลอดแนวชายฝั่งทั้งทะเลด้านอ่าวไทยและอันดามัน โดยจะพบปูทะเลชุกชุมบริเวณหาดโคลนหรือเลนที่มีป่าแสมและโกงกาง บริเวณที่เป็นแหล่งน้ำกร่อยและปากแม่น้ำที่มีน้ำทะเลท่วมถึง ปูทะเลเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการเพาะเลี้ยงทางด้านการประมงและเป็นเป้าหมายหลักที่จะทำการเพิ่มผลผลิตในเขตภูมิภาคเอเชีย เพราะปูทะเลมีคุณค่าทางโภชนาการสูง รสชาติดี เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศและสามารถส่งออกเป็นสินค้าสัตว์น้ำไปขายยังต่างประเทศได้ ความต้องการของตลาดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่ผลผลิตมีจำนวนลดลงเพราะปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปูทะเลโดยตรงยังไม่ประสบความสำเร็จ ส่วนใหญ่จะได้มาจากการจับตามธรรมชาติ ซึ่งถ้ายังมีการจับปูทะเลขึ้นมารับบริโภคโดยตรงจากธรรมชาติและไม่มีการเพาะพันธุ์เพื่อทดแทนทำให้ปูทะเลมีจำนวนลดน้อยลงและความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ จากการรายงานในปูทะเล (marine crab) ต่างๆพบว่า การสร้างไข่และการเจริญของรังไข่ในปูเพศเมียจะเกิดเมื่อปูเพศเมียมีการลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์และได้รับการผสมพันธุ์กับเพศผู้ สเปิร์มบรรจุอยู่ในถุงบรรจุสเปิร์ม (spermatophore) ซึ่งเพศผู้จะนำสเปิร์มไปไว้ในท่อของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (female reproductive duct) โดยผ่านทาง gonopod ของเพศผู้ซึ่งจะสอดเข้าไปใน gonopore ของปูเพศเมีย ซึ่งอยู่ทางด้านล่าง (ventral) ของช่วงหัวต้ออก (cephalothorax) โดยส่วนใหญ่ระบุว่าเพศเมียจะเก็บสเปิร์มไว้ในถุงรับและเก็บสเปิร์ม (spermatheca หรือ sperm receptacle) ซึ่งมีเป็นคู่มักมีช่องเปิดสู่ท่อของระบบสืบพันธุ์เพศเมียอย่างไรก็ดีเมื่อ ศรีวิไล ขนุนทอง ได้ทำการศึกษา spermatheca และท่อของระบบสืบพันธุ์เพศเมียบริเวณที่เปิดออกสู่ gonopore vagina และ vulva โดยศึกษาทั้งลักษณะทางกายวิภาคและเนื้อเยื่อของ spermatheca และ vagina พบลักษณะที่สังเกตได้ทางกายวิภาคเปลี่ยนแปลงตามระยะการเจริญของรังไข่ เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อด้วยการย้อมสีพื้นฐาน Hematoxylin และ Eosin พบว่าไม่พบสเปิร์มใน spermatheca แต่พบใน vagina และพบเซลล์ของท่อใน spermatheca มีแกรนูลย้อมติดสีชมพูและยังสามารถพบแกรนูลนี้ใน vagina ด้วย ปัญหาพิเศษฉบับนี้จึงสนใจจะศึกษาว่าแกรนูลดังกล่าวมีองค์ประกอบทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสารชีวโมเลกุลใด โดยใช้เทคนิค Histochemistry เพื่อจะนำมาประเมินบทบาทของแกรนูลต่อสเปิร์มที่อยู่ภายในท่อของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา (Histology) ของ spermatheca และ vagina ในหนูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* มีรังไข่เจริญในระยะเวลาที่แตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาว่า granules secretion และ platelet ที่พบใน spermatheca และ vagina ในหนูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ว่าประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลกลุ่มใด โดยใช้เทคนิคทาง Histochemistry



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของปูทะเล

1.1 อนุกรมวิธาน

ปูทะเลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Scylla serrata* (Forsk., 1775) มีชื่อสามัญเรียกทั่วไปว่า Mud crab หรือ Mangrove crab เพราะแหล่งที่สามารถพบปูทะเลได้เป็นจำนวนมากคือป่าชายเลน จึงเรียกชื่อตามแหล่งที่พบ ในประเทศไทยพบว่าการเรียกชื่อสามัญของปูทะเลหลายชื่อ เช่น ปูดำ, ปูขาว, ปูแดง, ปูเขียว ซึ่งต่อมา Keenan et al. (1983) ได้ศึกษาปูทะเลในสกุล *Scylla* แบ่งได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ *S. serrata*, *S. tranquebarica*, *S. olivacea* และ *S. paramamosian* โดยใช้ความแตกต่างของเอนไซม์ (allozyme) ซึ่งจะสามารถบ่งบอกถึงสภาพจีโนไทป์ (genotype) ของแอลลีล (allele) ที่ควบคุมเอนไซม์นั้นได้

Kingdom	Animalia
Phylum	Arthropoda
Superclass	Crustacea
Class	Malacostraca
Subclass	Eumalacostraca
Superorder	Eucarida
Order	Decapoda
Suborder	Pleocyemata
Infraorder	Brachyura
Section	Brachyrhyncha
Superfamily	Portunoidea
Family	Portunidae
Genus	<i>Scylla</i>
Species	<i>serrata</i> , <i>tranquebarica</i> <i>olivacea</i> , <i>paramamosian</i>

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1 ลักษณะทั่วไปของปูทะเล

ปูทะเลมีส่วนประกอบของร่างกาย เป็นส่วนหัวรวมกับส่วนอกเรียกว่า cephalothorax ซึ่งส่วนของ cephalothorax จะมีกระดองหุ้มไว้ ส่วนทางด้านท้องของปูได้มีการวิวัฒนาการโดยการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแผ่นบางๆ เรียกว่า จับปิ้ง ซึ่งจับปิ้งสามารถใช้เป็นตัวแยกเพศของปูได้ โดยการดูจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะภายนอก โดยจับบีงจะพบอยู่ใต้กระดองซึ่งเป็นอวัยวะที่อุ้มพุงไซของแม่ปู(ในระยะไข่นอกกระดอง)



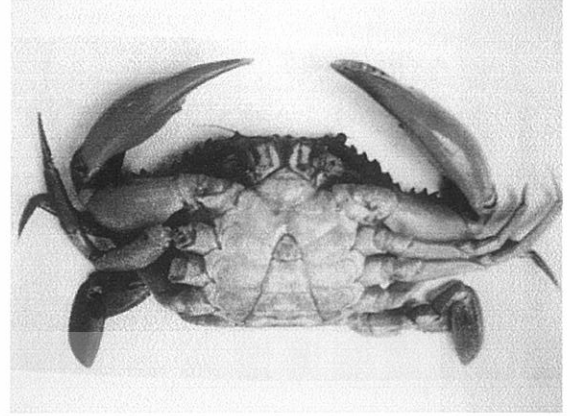
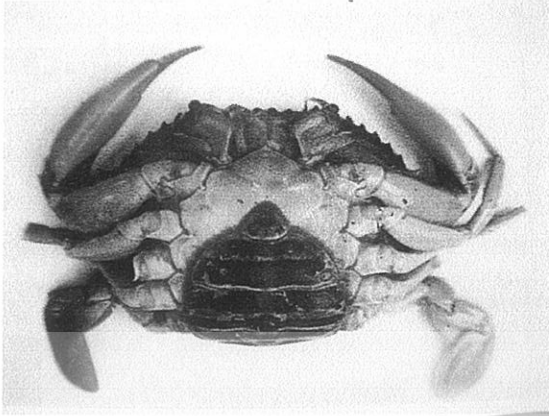
ภาพที่ 1 ปูทะเลเพศเมีย

ปูขาว (*Scylla paramamosain*) ในประเทศไทยพบได้ในจังหวัด ตราด ระยอง ฉะเชิงเทรา ชลบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี และสุราษฎร์ธานี โดยมีลักษณะดังนี้
 1. กระดองด้านบนสีเขียวอ่อน เขียว หรือเขียวอมเหลืองปนน้ำตาล มีจุดขาวหม่นเล็กน้อย บริเวณครึ่งบนด้านหน้าของก้ามมีสีเขียวอมน้ำตาล มีจุดสีเขียว เขียวเข้มอมเหลืองค่อนข้างใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป บริเวณครึ่งล่างด้านหน้าของก้ามมีสีเหลืองอ่อน หรือส้มเป็นพื้น บริเวณปากสีเหลือง-ส้ม เข้มเขียวอ่อน ขาวายน้ำสีเขียวอ่อน มีลายร่างแหสีเขียวเข้ม ช่องตาละเอียด สมบูรณ์
 2. หนามคู้กลางที่ขอบกระดองระหว่างช่องตามีลักษณะแหลมคม มีลักษณะแบบสามเหลี่ยม ด้านเท่า หนามอันกลาง (middle carpus spine) ที่อยู่ด้านนอกของปล้องกลาง (carpus) ของก้ามมีลักษณะนูนเด่นหรืออาจจะมีลักษณะเป็นหนามสั้น ๆ จัดว่ามีความเจริญในระดับปานกลางระหว่างปูแดงและปูเขียว

2.2 ลักษณะแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย

โดยดูจากลักษณะของจับบีง (abdomen) ปูทะเลเพศผู้มีส่วนจับบีงเรียวกเล็กเป็นรูปสามเหลี่ยม แต่ในเพศเมียจับบีงจะขยายกว้างออก จนเกือบเต็มปิดด้านท้องของทรงอก เมื่อเปิดจับบีงของปูทะเลเพศผู้จะพบอวัยวะเพศ เรียกว่า "gonopod" หรือ "penis" ซึ่งเปลี่ยนมาจากรยางค์ว่ายน้ำ (pleopod) โดยในเพศผู้อวัยวะส่วนนี้มีเพียง 2 คู่ รูปร่างยาวตอนปลายเรียวกเล็กทำหน้าที่เป็นอวัยวะนำถุงบรรจุสเปิร์ม (Spermatophore) ให้กับปูทะเลเพศเมีย โดยเก็บไว้ที่ถุงเก็บสเปิร์ม (sperm receptacular sac) ส่วนจับบีงของปูทะเลเพศเมียรยางค์ว่ายน้ำ (pleopod) 4 คู่ เปลี่ยนไปเป็นที่สำหรับให้ไข่ติดเกาะหลังจากไข่ได้ถูกปล่อยออกมาภายนอก ลักษณะของก้ามหนีบ (chela) ของปูเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย ก้ามหนีบของปูจะมีไว้เพื่อป้องกันตัว จับเหยื่อ และมีไว้สำหรับจับปูเพศเมียขณะที่มีการผสมพันธุ์ (ชลธิ์, 2539) ดังภาพที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เพศเมีย

เพศผู้

ภาพที่ 2 ความแตกต่างระหว่างเพศของปูทะเล โดยอาศัยลักษณะของจับปิ้ง (abdomen) ของปูเพศเมียและเพศผู้ ที่แตกต่างกัน

3. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเล (Reproductive biology of mudcrab)

3.1 พฤติกรรมการผสมพันธุ์ (Mating Behavior)

Jensen et al. (1996) กล่าวว่าพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของปูใน Brachyuran สามารถแบ่งได้ 2 แบบหลักๆ คือ 1. การจับคู่ผสมพันธุ์ในขณะที่เพศเมียมีเปลือกหรือกระดองที่แข็ง ซึ่งการสืบพันธุ์แบบนี้จะไม่คำนึงถึงวัฏจักรของการลอกคราบของเพศเมีย 2. การจับคู่ผสมพันธุ์ในขณะที่เพศเมียมีเปลือกหรือกระดองที่อ่อนนุ่ม ซึ่งการผสมพันธุ์แบบนี้จะเป็นไปได้สำหรับช่วงเวลาจำกัดหลังจากการลอกคราบของเพศเมียและก่อนที่เปลือกหรือกระดองของเพศเมียจะแข็งเท่านั้น ซึ่งการจับคู่ผสมพันธุ์แบบนี้จะใช้เวลาที่ยาวนานและอาจจะต้องรวมถึงการปล่อยของฟีโรโมน ปูในกลุ่ม brachyuran ส่วนใหญ่จะเป็น polygynous และลักษณะการจับคู่ผสมพันธุ์จะอยู่บนพื้นฐานของการแข่งขันกันของเพศผู้และค้นหาทางที่จะปกป้องเพศเมียก่อนที่จะมีการลอกคราบ สุรชาติ และคณะ (2538) กล่าวว่าเพศผู้จะจับคู่กับเพศเมียที่มีความสมบูรณ์ทางเพศพร้อมที่จะสืบพันธุ์โดยเพศผู้จะเกาะอยู่ด้านบนของเพศเมียและใช้ขาเดิน (preopod) คู่ที่ 2-4 กอดรัดเอาไว้ เพศผู้จะจับคู่อยู่รอจนกระทั่งเพศเมียลอกคราบ แล้วจึงทำการผสมพันธุ์ โดยจับเพศเมียที่อยู่ด้านล่างหงายเอาด้านท้องขึ้น และส่วนของจับปิ้ง (abdomen) ของปูทั้งคู่จะเปิดอ้าออกเพื่อผสมพันธุ์ เพศผู้จะผสมกับเพศเมียที่ผ่านการลอกคราบภายในระยะเวลาไม่เกิน 48 ชั่วโมง โดยจะสอดอวัยวะเพศ (pleopod) และปล่อยถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) ผ่านเข้าไปในแฉ่งเก็บน้ำเชื้อ (sperm receptacle) ของเพศเมีย sperm จะมีชีวิตอยู่ในเพศเมียได้หลายเดือน การผสมพันธุ์อาจใช้เวลามากกว่า 8 ชั่วโมง หลังจากการผสมพันธุ์ เพศเมียจะคว่ำตัวอยู่ในสภาพปกติ และอาจอยู่กับเพศผู้

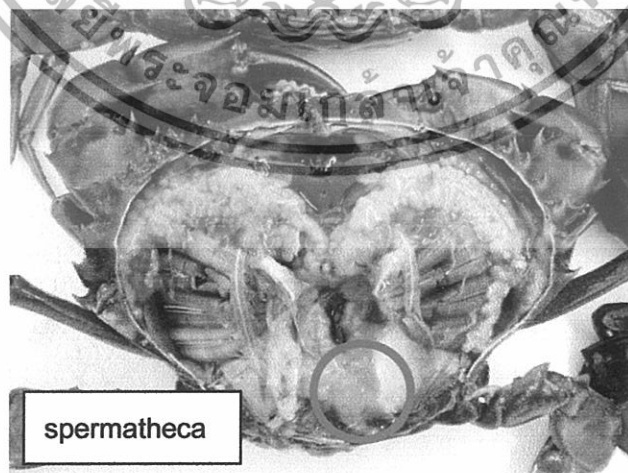
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2-3 วันจนกระทั่งกระดองแข็งแล้วจึงแยกออกมา Ariola (1940) พบว่าในประเทศฟิลิปปินส์อวัยวะการสืบพันธุ์ของปูทะเลได้รับการพัฒนาเต็มที่และพร้อมที่จะมีการผสมพันธุ์ได้เมื่อมีอายุ 1.5-2.5 ปี แต่การรายงานของ Leo และ Wei (1986) กล่าวว่าปูทะเลสามารถผสมพันธุ์ได้ภายในเวลา 1 ปีก่อนที่จะมีการผสมพันธุ์ปูทะเลเพศเมียจะมีการปล่อยสารเคมีจำพวกฟีโรโมน (pheromone) ออกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก เพื่อดึงดูดความสนใจต่อปูเพศผู้ให้มาเกี่ยวพาราสีและจับคู่ผสมพันธุ์กัน ในแอฟริกาใต้ปูทะเลเพศผู้มีความสมบูรณ์ทางเพศ พร้อมที่จะผสมพันธุ์กับเพศเมียได้จะมีขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 131-141 มิลลิเมตร (Du Plessis, 1971) ซึ่งความสมบูรณ์ทางเพศของปูทะเลเพศเมียดูได้จากลักษณะของส่วนท้อง (Abdomen) โดย Poovachiranon (1991) ตรวจสอบความสมบูรณ์เพศโดยใช้อัตราส่วนระหว่างความกว้างสุดของท้อง (Abdomen) ปลายที่ 5 กับความกว้างสุดของเปลือกส่วนอก (Thoracic sterna) ของขาเดิน (preopods) คู่ที่ 5 เรียกว่าดัชนีความสมบูรณ์ทางเพศ (Female Maturity Index, FMI) ซึ่งสัมพันธ์กับระยะของรังไข่และพบว่าปูทะเลเพศเมียในธรรมชาติที่นำมาตรวจสอบมีรังไข่ระยะที่ 1 ทุกตัว ซึ่งเป็นระยะที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (Immature) หากปูทะเลเพศเมียมีค่า FMI ระหว่าง 0.851 - 0.879 พบปูทะเลมีรังไข่ตั้งแต่ระยะที่ 2 ถึงระยะที่ 4 จำนวน 47.80 เปอร์เซ็นต์ แต่หากมีค่า FMI มากกว่า 0.880 ปูทะเลทุกตัวจะมีรังไข่ตั้งแต่ระยะที่ 2 ถึงระยะที่ 4 ซึ่งถือว่าสมบูรณ์ทางเพศ ซึ่ง Jensen (1996) พบว่าสัตว์ที่มีการปฏิสนธิภายในเพศเมียจะมีโครงสร้างที่เก็บ sperm ของเพศผู้

3.2 อวัยวะที่สำคัญในการสืบพันธุ์ของปูทะเลเพศเมีย

Lee และ Yamazaki. (1990) กล่าวว่าอวัยวะในการสืบพันธุ์ของปู *Eriocheir sinensis* เพศเมียประกอบด้วย 1. oviduct 2. spermatheca 3. vagina และ 4. vulva

3.2.1 spermatheca



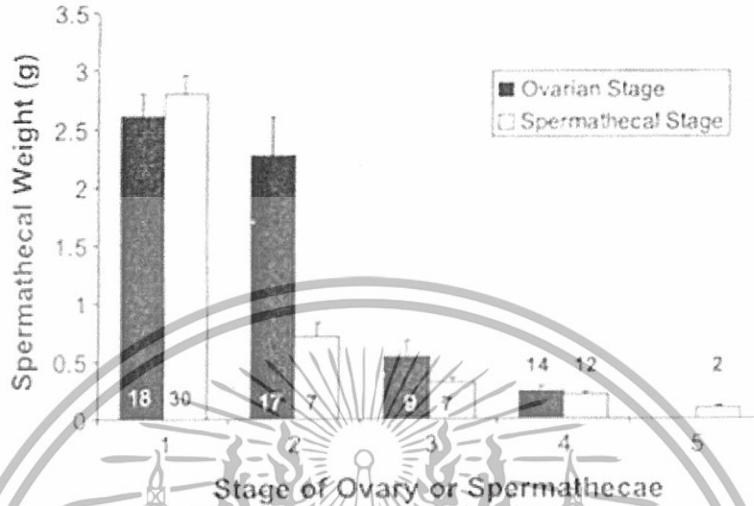
ภาพที่ 3 ตำแหน่งของ spermatheca

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spermatheca ของปู *Eriocheir sinensis* พบอยู่ด้านหลังตำแหน่งใต้จากหัวใจลงมา มีลักษณะเป็นถุงแบนกลมมอจากภายนอกเห็นมีแถบขุ่น ซึ่งปรากฏมากขึ้นกับระยะการเจริญของรังไข่ spermatheca มีความยาวประมาณ 19 มิลลิเมตร กว้าง 8 มิลลิเมตร ประกอบด้วยชั้น columnar epithelium (Lee และ Yamazaki, 1990) Greco et al. (1999) ได้ศึกษาในปู *Chasmagnathus granulata* พบว่า spermatheca ประกอบด้วย 4 ส่วน คือ 1. ส่วนที่ติดกับ ovary (oviduct) 2. ส่วนที่เก็บ sperm ซึ่งมีขนาดใหญ่ (spermatheca หรือ seminal receptacle) 3. ส่วนของท่อที่ติดกับ sternum (vagina) 4. ช่องเปิดไปสู่ vagina ซึ่งเรียกว่า vulva หรือ genital opening Wolcott et al. (2005) ศึกษาในปูทะเลเพศเมีย blue crab (*Callinectes sapidus*) พบว่ามีน้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม มีหน้าที่ในการเก็บ spermatozoa หรือ spermatophore และ seminal fluid สามารถแบ่งระยะการเจริญของเนื้อเยื่อและน้ำหนักของ spermatheca เป็น 5 ระยะ คือ ระยะที่ 1 spermatheca ผนัง spermatheca หนาและ seminal fluid มี sperm มาก ระยะที่ 2 มีการกระจายตัวของของเหลว ระยะที่ 3 ผนัง spermatheca เริ่มบาง seminal fluid หายไป เหลือเพียง spermatophore อยู่ภายใน spermatheca ระยะที่ 4 ผนัง spermatheca บางมาก และไม่แข็งแรง มี sperm ไม่หนาแน่น ระยะที่ 5 เป็นช่วงบวมโต ดังภาพที่ 4 ในงานวิจัยของ Beninger et al. (1988) พบว่า spermatheca ในปูหิมะเพศเมีย snow crab (*Chionoecetes opilio*) สามารถแบ่งชั้นเซลล์ออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอกเป็นเนื้อเยื่อ lacunar connective ชั้นในเป็นเนื้อเยื่อ squamous epithelium โดยสันนิษฐานว่า sperm ที่อยู่ใน spermatheca เป็น spermatophore ที่เสียหาย เนื่องจากความดันระหว่างภายในและภายนอกของสภาพแวดล้อมเกิดภาวะ hypertonic หรือ anhydrous ทำให้น้ำที่อยู่ใน spermatophore หายไปจึงทำให้รูปร่างของ spermatophore เปลี่ยนแปลงไป ในการศึกษาครั้งนี้ยังคงเป็นปริศนาที่ว่าเมื่อขยาย spermatheca แล้วไม่พบ spermatozoa หรือ spermatophore จึงจำเป็นต้องศึกษาองค์ประกอบภายใน spermatheca ต่อไป Gurriaran et al. (1998) ศึกษาว่า ปูเพศเมีย spider crab (*Maja squinado*) จะเก็บ sperm ไว้ใน spermatheca พร้อมทั้งจะผสมก่อนการวางไข่และยังพบอีกว่า ปูเพศเมียที่ยังไม่เข้าวัยเจริญพันธุ์จะไม่มี การเจริญของ spermatheca ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าไม่สามารถสืบพันธุ์ได้จนกว่าจะถึงวัยเจริญพันธุ์ Klepal et al. (1972) พบว่า spermatozoa ออกมาจาก penis สันนิษฐานว่ามาพร้อมกับ secretion ซึ่งคาดว่าจะปล่อยออกมาจาก penial gland cell หลังจากนั้น spermatozoa เคลื่อนที่เข้าไปเข้าสู่ oviduct ของเพศเมียและ spermatozoa ยังเจอกับ secretion ที่มาจาก oviducal gland การศึกษาของ Hinsch (1988) พบว่า spermatheca ของปู gold crab (*Geryon fenneri*) เพศเมียในเดือนกุมภาพันธ์-พฤษภาคม เดือนจะมีขนาด spermatheca เล็ก เนื่องจากเดือนกุมภาพันธ์วางไข่ ในเดือนต่อมา spermatheca จะมีการเปลี่ยนแปลงขนาดลักษณะที่บิ สี่ขาวรวมตัวกันแน่นตำแหน่งใกล้ฐาน ภายใน spermatheca มี

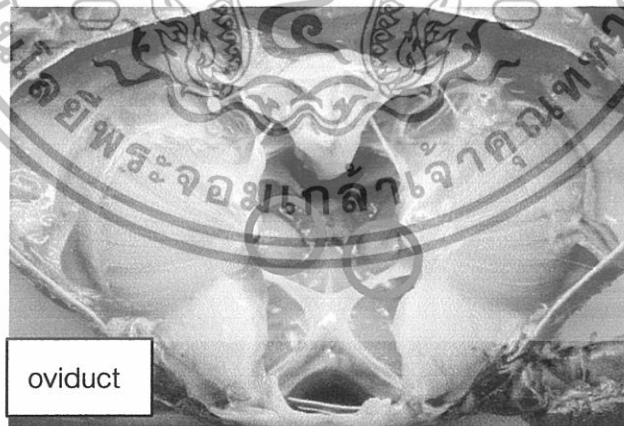
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

seminal fluids เป็นสีขาว บ่งบอกว่ามี sperm อยู่ข้างใน หลังจากเดือนเมษายน spermatheca จะลดขนาดลง อย่างไรก็ตามปริมาณ sperm สีขาวยังคงอยู่ภายใน spermatheca



ภาพที่ 4 น้ำหนักเฉลี่ยของ spermatheca ของปูทะเล Blue crab ในระยะต่างๆ
ที่มา : Wolcott et al. (2005)

3.2.2 oviduct



ภาพที่ 5 ตำแหน่งของ oviduct

Lee และ Yamazaki (1990) กล่าวว่า oviduct ของปู *Eriocheir sinensis* เพศเมีย มีลักษณะคล้ายท่อสั้นๆ เชื่อมต่อกับ ovary ได้ตำแหน่งที่ ovary ซ้ายและขวามาชิดกัน ดังภาพที่ 5 และยังเชื่อมต่อกับ spermatheca มีความยาวประมาณ 4.1 มิลลิเมตร ช่องเปิดของ oviduct ไปยัง spermatheca อยู่ที่ epithelium ของ spermatheca ซึ่งอยู่เหนือผนังชั้นนอกของ vagina ซึ่งผนังเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ของ oviduct จะประกอบไปด้วย columnar epithelium Suzuki and Ziegler (2005) พบว่า oviduct ประกอบด้วย ท่อ 2 ท่ออยู่เชื่อมกับ gonophore และ ovary อยู่ใกล้กับ spermatheca จากการตัด section oviduct มีรูปร่างของท่อเป็นรูปตัว U ภายใน oviduct มีเมือกที่หนาและมี sperm อยู่เป็นจำนวนมาก จากการศึกษาของ Beninger et al.(1988) พบว่าภายใน oviduct มี sperm เป็นจำนวนมากแต่มีการตายไปบางส่วนเมื่อระยะเวลาผ่านไป

3.3 ระดับการเจริญของรังไข่ปูทะเล

Bumin et al. (1991) แบ่งรังไข่ปูทะเลออกเป็น 6 ระยะ คือ 1. Undeveloped Stage รังไข่มีลักษณะเป็นเส้นแบนคล้ายริบบิ้น โปร่งใส 2. Early-Developing Stage ขอบของรังไข่มีรอยหยักโดยรอบ มีสีขาวนํ้านม 3. Developing Stage รังไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง 4. Nearly Ripe Stage รังไข่มีขนาดใหญ่มากขึ้นอีก และเปลี่ยนเป็นสีส้มอ่อน 5. Ripe Stage รังไข่ขยายจนเต็มกระดองมีสีส้มสด และ 6. Post-Spawning Stage เป็นระยะหลังจากปล่อยไข่แล้ว รังไข่มีขนาดเล็กสีเทาค่อนข้างโปร่งใส แต่ Poovachiranon (1991) แบ่งระยะรังไข่เป็น 4 ระยะ คือ ระยะที่ 1 รังไข่ยังไม่เจริญ มีลักษณะโปร่งใส ระยะที่ 2 รังไข่มีการเจริญขึ้น มีสีครีม หรือสีเหลือง กินเนื้อที่ 1/4 ของพื้นที่ digestive gland ส่วนระยะที่ 3 รังไข่มีสีเหลือง หรือสีส้ม มีขนาดใหญ่กินเนื้อที่ 1/2 ถึง 3/4 ของพื้นที่ digestive gland และ ระยะที่ 4 รังไข่มีสีส้ม-แดง ปรากฏถุงเก็บสเปิร์ม (seminal receptacles หรือ spermatheca) เต็มชัดขึ้น ส่วน ธรรมชาติ และคณะ (2538) แบ่งระยะรังไข่ตามแบบ Poovachiranon (1991) แต่เพิ่ม ระยะที่ 5 ซึ่งเป็นรังไข่หลังจากปล่อยไข่ออกหมดแล้ว

4. เนื้อเยื่อวิทยา (Histology)

การศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา (Histology) เป็นการศึกษาที่สามารถใช้อธิบายลักษณะและโครงสร้างของอวัยวะได้ชัดเจนมากขึ้น

4.1 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ spermatheca

Beninger et al. (1993) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ spermatheca พบว่า spermatheca ของ brachyuran มีลักษณะเป็นต่อม พบโครงสร้างเป็น 2 แบบชัดเจน คือ 1. ด้าน dorsal 2. ด้าน ventral ซึ่งด้าน dorsal ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2 ชั้น ชั้นนอกเป็นท่อพับไปมาเป็นเนื้อเยื่อประสาน (connective tissue) และชั้นในเป็น glandular epithelium แบ่งย่อยลงไปยังบริเวณ germinal zone (เป็นบริเวณที่มีการแบ่งเซลล์ขึ้นมาทดแทน) glandular layer และ squamous layer germinal zone มีเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสแบบ mitotic มากมายซึ่งเซลล์นี้จะแบ่งเป็นชั้นๆของ squamous epithelium ประกอบด้วย secretion ที่สมบูรณ์มากมาย เป็นต่อมเซลล์เข้าไปยัง lumen เซลล์ของต่อมจะเต็มไปด้วย globules electrondense secretion product จะติดกับเซลล์เมมเบรนและขยายออก เป็นการผลิตที่ซับซ้อน พบนิวเคลียสบรรจุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

heterochromatin หนาแน่นและมีการเพิ่มขึ้นที่ไม่แน่นอนในเซลล์ที่ใกล้กับชั้น squamous และ Diesel (1989) ศึกษาในปู spider crab (*Inachus phalangium*) พบชั้นในของ epithelium ถัดจาก lumen ประกอบด้วย halocrine gland cells ซึ่งมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ซึ่ง gland cells จะปรากฏเพิ่มขึ้น เลื่อมลงและสลายตัวใน receptacle lumen ด้าน ventral พบว่าไม่มี transverse membrane หรือ velum ที่สังเกตได้บริเวณทางเชื่อมของด้าน dorsal และ ventral (Beninger et al., 1993) พบว่ามีกล้ามเนื้อ, extracellular fiber รอบๆถุงและขยายเข้าไปในรอยพับชั้นใน epithelium และ cuticle สามารถช่วยในการเคลื่อนที่ เพิ่มโอกาสการแตกออกของ spermatophore และเพิ่มโอกาสการพบกันระหว่าง oocyte และ sperm ที่ไม่เคลื่อนที่ ลักษณะเนื้อเยื่อในด้าน ventral จะคล้ายกับเนื้อเยื่อของ vagina และ Lanteigne et al. (1996) ได้ศึกษาเนื้อเยื่อ spermatheca โดยแบ่งตามลักษณะการเจริญของรังไข่คือ immature, premature และ mature โดยระยะ mature แบ่งเป็น ก่อนการผสมพันธุ์และหลังการผสมพันธุ์ โดยในระยะ 1. immature พบว่ามีรังไข่สีขาวอยู่ในช่องปลายของกรวยของกรวย spermatheca มีลักษณะบาง มีการแบ่งแยกระหว่างด้าน dorsal และ ventral ไม่มีการแบ่งเป็นชั้นของ glandular epithelium มีเพียง columnar epithelium ไม่พบ secretion ใน lumen 2.ระยะ premature มีการสร้างเซลล์ columnar epithelium ขึ้นมาทดแทนเซลล์ที่ถูกปล่อยออกไป พบ secretion ใน lumen ที่ถูกผลิตจาก columnar epithelium ปล่อย sperm มีการเจริญที่ดี ในระยะ mature ก่อนที่จะมีการผสมพันธุ์ พบว่า columnar epithelium เกือบทั้งหมดหายไป มีการเจริญเซลล์ columnar epithelium ที่เป็นหลายๆชั้น ใน lumen ปล่อย sperm มีการเจริญที่ดีขึ้น 3. ระยะ mature หลังจากที่มีการผสมพันธุ์แล้ว ผนังของ spermatheca หายไป

4.2 ลักษณะทางเนื้อวิทยาของ oviduct

Beninger et al. (1993) กล่าวว่าลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ oviduct มีลักษณะเป็นท่อแพบ ประกอบด้วย columnar epithelium ถูกล้อมรอบด้วยไฟเบอร์ที่มีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อเรียบฝังอยู่อย่างหลวมๆใน เนื้อเยื่อประสาน (connective tissue) แล้วพบปริมาณของ secretion เช่นเดียวกับที่พบใน spermatheca ซึ่งเซลล์ columnar epithelium สามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่ผลิต secretion ได้ คือเป็น secretory cell และช่องว่างของ oviduct จะเต็มไปด้วยสารที่อยู่ในรูป คอลลอยด์ Lee และ Yamazaki (1900) พบว่าภายใน oviduct มีเมือกที่หนาและมี sperm อยู่เป็นจำนวนมากและไม่พบ spermatozoa ใน oviduct ในช่วงก่อน ระหว่างและหลังจากการวางไข่ ส่วน Beninger et al. (1988) พบว่าภายใน oviduct มี sperm เป็นจำนวนมากแต่มีการตายไปบางส่วนเมื่อระยะเวลาผ่านไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry)

การศึกษาระบบสืบพันธุ์ของปูทะเลเพศเมียมีการศึกษาทางด้านกายวิภาคและเนื้อเยื่อวิทยา แต่ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาไม่สามารถบอกได้ว่าลักษณะของสารที่สังเกตได้ภายในระบบสืบพันธุ์เป็นสารกลุ่มใดจึงต้องมีการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) จะทำให้สามารถบอกถึงโครงสร้างของสารนั้นได้ว่าเป็นสารประกอบประเภทใด เช่น สารประกอบโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน หรือสารอื่นๆ โดยมีผู้ได้ทำการศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมีแต่มีไม่มากนัก เช่น การศึกษาของ Beninger et al.(1993) โดยใช้เทคนิคทาง Histochemistry เข้ามาตรวจสอบองค์ประกอบภายในเนื้อเยื่อของ spermatheca ในปูหิมะ snow crab โดยศึกษาในบริเวณสารนอกเซลล์ (matrix) และบริเวณเนื้อเยื่อ ว่าเป็นสารกลุ่มใด โดยใช้เทคนิคการย้อมสีพิเศษ คือ เทคนิค Alloxan-schiff ใช้ในการทดสอบโปรตีน, Periodic acid Schiff (PAS) ใช้ทดสอบคาร์โบไฮเดรตและ neutral mucopolysaccharide, Alcian blue ใช้ทดสอบ acid mucopolysaccharide, Diastase digestion และ Sudan black ใช้ทดสอบไขมัน พบว่าบริเวณสารนอกเซลล์พบองค์ประกอบของโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, neutral mucopolysaccharide และ acid mucopolysaccharide แต่ไม่พบองค์ประกอบของไขมัน ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อของ spermatheca พบองค์ประกอบของโปรตีน, คาร์โบไฮเดรตและ neutral mucopolysaccharide แต่ไม่พบองค์ประกอบของ acid mucopolysaccharide และ ไขมัน และยังได้มีการศึกษาอีกโดย Lanteigne et al. (1996) ได้ใช้เทคนิคทาง Histochemistry เข้ามาในการตรวจสอบองค์ประกอบภายในเนื้อเยื่อปูหิมะ (snow crab) เช่นกันแต่จะศึกษาทั้ง spermatheca และ oviduct โดยบริเวณที่ทำการศึกษได้แก่ ด้าน dorsal ของ spermatheca ศึกษาเนื้อเยื่อบริเวณ columnar epithelium, lumen และ stratified epithelium ด้าน ventral, oviduct และ ovary โดยใช้เทคนิค Sudan black ในการตรวจสอบสารในกลุ่มของ ไขมัน, Orange G ในการทดสอบสารในกลุ่มของ amine, Periodic acid Schiff (PAS) ใช้ทดสอบสารในกลุ่ม neutral mucopolysaccharide และ Alcian blue ใช้ทดสอบสารในกลุ่ม Acid mucopolysaccharide จากผลการทดสอบ พบว่า columnar epithelium มีองค์ประกอบของสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต, acid mucopolysaccharide และ amine ส่วนใน ovary พบองค์ประกอบของสารในกลุ่มไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต และจากการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา (Histology) พบ secretion ภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมียทั้ง spermatheca และ oviduct Beninger et al. (1993) ได้ทำการทดสอบทางด้าน Histochemistry ว่า secretion ที่พบประกอบด้วยสารกลุ่มใด ผลคือ พบว่า secretion มีองค์ประกอบของ amine neutral polysaccharide (glycoprotein) และ mucopolysaccharide ซึ่งการใช้เทคนิคทางเคมีเข้ามาช่วยแยกสารชีวโมเลกุลทำให้สามารถทราบองค์ประกอบในเนื้อเยื่อที่เราต้องการทราบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. Block สำหรับการ Embed
3. จานเพาะเชื้อ
4. Vial
5. Warm plate
6. Cover slip
7. ตู้อบ(Oven) : Memmert
8. เครื่องตัดเนื้อเยื่อ(Microtome) : AO,USA
9. สไลด์
10. กล้องเก็บสไลด์
11. กล้องจุลทรรศน์พร้อม VDO attachment และ TV monitor : Olympus, Sony,Japan
12. กล้องจุลทรรศน์ประกอบกล้องถ่ายรูป : Olympus,Japan
13. Coupling jar

สารเคมี

- 1.Davison's Fixative
- 2.Paraplast
- 3.egg albumin
- 4.Xylene : MERCK,Germany
- 5.n-butyl alcohol : MERCK,Germany
- 6.Permount : FISHER SCIENTIFIC
- 7.Haematoxylin : MERCK,Germany
- 8.Eosin : MERCK,Germany
- 9.Ethanol : MERCK,Germany
10. น้ำกลั่น : MERCK,Germany
- 11.Hydrochloric acid หรือ HCL : MERCK,Germany
- 12.Formalin conc
- 13.Mercuric sulfete

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. Sulfuric acid conc	: MERCK,Germany
15. Sodium nitrite	
16. Acid fuchsin	: HARTMAN
17. Glacial acetic acid	: MERCK,Germany
18. Phosphomolybdic acid	
19. Methyl blue	
20. Periodic acid	: BDH
21. Basic fuchsin	: SERVA
22. Potassium metabisulfite	
23. Activated charcoal	: BDH
24. Ninhydrin	
25. 98 % formic acid	
26. Alcian blue	: BDH
27. Hydrogen peroxide	

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่นำมาจากธรรมชาติ (ภาพที่ 1) ที่มีการเจริญของรังไข่ระยะที่ 1 ถึง ระยะที่ 4

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยดังนี้

1. นำตัวอย่างปูทะเลเพศเมียที่รับซื้อมาจากชาวประมงเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ spermatheca และ vagina ในแต่ละระยะของการเจริญของรังไข่ นำปูทะเลมาทำให้สลบโดยการแช่ในน้ำแข็ง

2. ผ่าตัดเปิดกระดองด้าน dorsal บันทึกระยะการเจริญของรังไข่ ลักษณะของ spermatheca และ vagina

3. ผ่าตัดนำ spermatheca และ vagina มาทำให้คงสภาพด้วยน้ำยาส Davidson's Fixative นานประมาณ 18-24 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และต้องเปลี่ยนแอลกอฮอล์ที่ใช้เก็บรักษาเนื้อเยื่อทุกๆ 2 สัปดาห์แล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histology) และ Histochemistry ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 การกำจัดน้ำ(dehydration) โดยนำเนื้อเยื่อแช่ใน ethyl alcohol 90 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 ชั่วโมง, ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 ชั่วโมงครั้งที่ 1, ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 ชั่วโมงครั้งที่ 2 และแช่ใน n-butyl alcohol นาน 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.2 การ clearing นำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนการกำจัดน้ำ(dehydration) มาแช่ใน Xylene นาน 1 ชั่วโมง

3.3 การ impregnation นำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอน clearing มา impregnation ด้วย paraplast โดยแช่ในส่วนผสม Xylene กับ Molten wax (Melted paraplast) ในอัตราส่วน 1:1 นานประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วจึงนำเนื้อเยื่อมา impregnation (Melted paraplast) ครั้งที่ 2 ประมาณ 1 ชั่วโมง ซึ่งขั้นตอนการ impregnation จะทำในตู้อบ (Oven) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส

3.4 นำเนื้อเยื่อไปฝัง (embed) ใน paraplast ที่บริสุทธิ์โดยจัดวาง block ให้ขนาดพอที่ block จะเกาะกันได้ดี เท paraplast ที่บริสุทธิ์และนำเนื้อเยื่อวางลงไปทิ้งไว้ให้แข็ง พอแข็งแล้วให้เคาะออกจาก block ทำการตกแต่ง (Trimming) เนื้อเยื่อที่ embed และตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 ไมครอน ด้วยเครื่อง Microtome จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ตัดได้ไปติดสไลด์โดยใช้ egg albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ไซขาว 1 หยดผสมกับน้ำกลั่น 10 ml.) แล้วนำไปตั้งบน warm plate เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อยึดออก ทั้งสไลด์ที่ติด section ค้างคืนเพื่อให้แห้ง จากนั้นนำไปย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin

3.5 การย้อม Hematoxylin และ Eosin โดยผ่านกระบวนการ

- 1) การกำจัด paraplast (deparafinization) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 15 นาที
- 2) ล้าง Xylene ออกด้วย n-butyl alcohol นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์แช่ใน แอลกอฮอล์ 95,90 เปอร์เซ็นต์ ชงละ 1 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นอีก 1 นาที
- 3) ย้อมสไลด์ด้วยสี Hematoxylin นาน 7 นาที
- 4) ล้าง Hematoxylin ออกด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 5 นาที ทำการจุ่ม acid alcohol และจุ่มด้วย lithium carbonate เพื่อทำให้ Hematoxylin เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน
- 5) ในกรณีที่พบว่าเนื้อเยื่อติดสีน้ำเงินเข้มเกินไปให้นำสไลด์มาทำให้สีเจือจางลง (differentiate) ใน 0.25 HCL alcohol 70 % solution ให้ดูใต้กล้องถ้าติดสีน้ำเงินที่เข้มเกินไปโดยสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ให้เห็นไซโตพลาสซึมใส ต่อจากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่น
- 6) นำสไลด์มาแช่ในสี Eosin นาน 30 วินาที แล้วนำไปตรวจสอบ ถ้าพบว่าติดสีแดงมากเกินไปให้นำมา differentiate ออกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ สังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ให้เห็นสีที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7) นำสไลด์มาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เพื่อกำจัดน้ำ 2 ครั้งๆละ 1 นาที

8) แช่สไลด์ใน n-butyl alcohol นาน 1 นาที แล้วจึงนำไปทำให้ใส (clearing) โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้ง โดยแช่ครั้งแรก 10 นาที ครั้งที่ 2 แช่ 1 นาที

9) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (cover slip) โดยใช้ permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.6 การย้อม Millon Technique

1) การกำจัด paraffin (deparaffinization) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 15 นาที

2) ล้าง Xylene ออกด้วย n-butyl alcohol นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์แช่ในแอลกอฮอล์ 95,90, เปอร์เซ็นต์ ช่วงละ 1 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นอีก 1 นาที

3) ย้อมด้วย Millon ที่ผสม solution A + solution B สัดส่วน 1:10 นำสไลด์ใส่ลงใน plate ใส่สารที่ผสมแล้วลงไป เป็นการย้อมด้วยความร้อนโดยการเร่งความร้อนขึ้นตามลำดับอย่างช้าๆ รอให้ของเหลวเดือดแล้วจึงปรับความร้อนลงอุณหภูมิประมาณ 2 นาที

4) ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5) นำสไลด์มาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้งๆละ 1 นาที

6) แช่สไลด์ใน n-butyl alcohol นาน 1 นาที แล้วจึงนำไปทำให้ใส (clearing) โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้ง โดยแช่ครั้งแรก 10 นาที ครั้งที่ 2 แช่ 1 นาที

7) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Millon ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (cover slip) โดยใช้ permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.7 การย้อม Masson Trichrome Technique

1) การกำจัด paraffin (deparaffinization) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 15 นาที

2) ล้าง Xylene ออกด้วย n-butyl alcohol นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์แช่ในแอลกอฮอล์ 95,90,70 เปอร์เซ็นต์ ช่วงละ 1 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นอีก 1 นาที

3) นำสไลด์แช่ใน celestinblue นาน 5 นาที

4) นำสไลด์ผ่านน้ำ

5) ย้อมสไลด์ด้วย Hematoxylin นาน 5 นาที

6) นำสไลด์ผ่านน้ำ

7) ย้อมด้วย Acid Fuchsin (solution A) 5 นาที

8) ล้างด้วยน้ำกลั่น

9) ย้อมด้วย Phosphomolybdic acid (solution B) 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 10) ซึบ solution B ออก
- 11) ย้อมด้วย Methyl Blue (solution C) 2-5 นาที
- 12) ล้างด้วยน้ำกลั่น
- 13) นำสไลด์มาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้งๆละ 1 นาที
- 14) แช่สไลด์ใน n-butyl alcohol นาน 1 นาที แล้วจึงนำไปทำให้ใส (clearing) โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้ง โดยแช่ครั้งแรก 10 นาที ครั้งที่ 2 แช่ 1 นาที
- 15) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Masson trichrome ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) โดยใช้ Permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.8 การย้อม Alcian blue ที่ pH 2.5 Technique

- 1) การกำจัด paraffin (deparaffinization) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 15 นาที
- 2) ล้าง Xylene ออกด้วย n-butyl alcohol นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์แช่ในแอลกอฮอล์ 95,90,70 เปอร์เซ็นต์ ชงละ 1 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นอีก 1 นาที
- 3) ล้างด้วย Solution A ใน pH ตามที่ต้องการ (pH 2.5 และ 3.2)
- 4) ย้อมด้วย Alcian blue ที่ละลายใน pH ที่ต้องการ นาน 5 นาที หลังจากนั้นล้างน้ำ หรือซึบออก
- 5) ย้อมด้วย 0.5 % Neutral red 2-3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ
- 6) แช่ใน Absolute Alcohol
- 7) แช่สไลด์ใน n-butyl alcohol นาน 1 นาที แล้วจึงนำไปทำให้ใส (clearing) โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้ง โดยแช่ครั้งแรก 10 นาที ครั้งที่ 2 แช่ 1 นาที
- 8) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Alcian blue ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) โดยใช้ Permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.9 การย้อม Periodic acid Schiff technique

- 1) การกำจัด paraffin (deparaffinization) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 15 นาที
- 2) ล้าง Xylene ออกด้วย n-butyl alcohol นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์แช่ในแอลกอฮอล์ 95,90,70 เปอร์เซ็นต์ ชงละ 1 นาที ตามลำดับ แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นอีก 1 นาที
- 3) จุ่มสไลด์ในสารละลาย Periodic acid นาน 5 นาที
- 4) ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหล นาน 5 นาที
- 5) จุ่มสไลด์ใน Schiff's reagent นาน 10 นาที
- 6) เปลี่ยนมาจุ่มใน Bisulphite solution 3 ครั้งๆ1-2 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 7)) ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหล นาน 5 นาที
- 8) ย้อมสีด้วย Hematoxylin
- 9) แคลสไลด์ใน n-butyl alcohol นาน 1 นาที แล้วจึงนำไปทำให้ใส (clearing) โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้ง โดยแช่ครั้งแรก 10 นาที ครั้งที่ 2 แช่ 1 นาที
- 10) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Alcian Blue ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (cover slip) โดยใช้ permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.10 การย้อมสี Ninhydrin-Schiff for amino group technique

- 1) การกำจัด paraplant (deparafinzation) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 15 นาที

2) ล้าง Xylene ออกด้วย n-butyl alcohol นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์แช่ใน แอลกอฮอล์ 95,90,70 เปอร์เซ็นต์ ช่วงละ 1 นาที ตามลำดับ

3) จุ่มสไลด์ในสารละลาย Ninhydrin ที่ อุณหภูมิ 37 องศา ทั้งไว้ทั้งคืน

4) ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหล

5) จุ่มสไลด์ใน Schiff reagent 45 นาที

6) ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหล

7) ย้อมสีด้วย Hematoxylin

8) แคลสไลด์ใน n-butyl alcohol นาน 1 นาที แล้วจึงนำไปทำให้ใส (clearing) โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้ง โดยแช่ครั้งแรก 10 นาที ครั้งที่ 2 แช่ 1 นาที

9) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Alcian blue ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) โดยใช้ permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะเวลาในการทดลอง

พฤศจิกายน 2549 ถึง เมษายน 2550

ผลการทดลอง

1. ลักษณะทางกายวิภาค

1.1 ลักษณะของ spermatheca ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ spermatheca ของปูทะเล *Scylla paramamosain* พบเพียง 1 ถุง/ตัว มีลักษณะเป็นถุงแบนบางจากด้าน dorsal-ventral ลักษณะเป็นรูปไข่ พบในตำแหน่งส่วนท้าย (posterior) ของหัวใจ ขอบด้านหนึ่งของ spermatheca จะติดกับขอบส่วนหลัง (posterior edge) ของกระดอง ตำแหน่งของ spermatheca ในระยะต้นอยู่ตรงกลางของ cephalothorax แต่เมื่อรังไข่มีการเจริญมากขึ้นอาจถูกเบียดไปอยู่ทางซ้ายหรือขวา จากการผ่าตัดโดยการฉีดสีและหยด fixative ในระหว่างการผ่าตัดพบว่า มีท่อจาก spermatheca ที่แยกเป็น 2 ท่อไปเปิดแนวทางด้านข้างของ vulva ที่จะเปิดออกสู่ gonopore ทางซ้ายและขวา

ระยะที่ 1 spermatheca มีลักษณะกลมแบน เต่ง สีขาวขุ่น มีขนาดใหญ่มากกว่า spermatheca ของปูที่มีรังไข่ระยะอื่นๆ ผนังบาง สามารถมองเห็นท่อสีขาวเล็กๆ ขดอยู่

ระยะที่ 2 spermatheca มีขนาดเล็กและสีขาวใสกว่าในระยะที่ 1

ระยะที่ 3 spermatheca มีขนาดเล็กอีกและมีสีขาวใสมากขึ้น

ระยะที่ 4 spermatheca มีขนาดเล็กที่สุดและไม่สามารถสังเกตเห็นท่อที่ขดอยู่

ภายใน มีการยุบตัวลงตามลำดับ (ภาพที่ 6)

1.2 ลักษณะของ vagina ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

ระยะที่ 1 vagina มีสีขาวขุ่น ผนังบางออกทางด้านที่จะเปิดออกสู่ gonopore มีขนาดใหญ่ ผนังหนา

ระยะที่ 2 vagina มีสีขาวขุ่น ผนังหนาและผนังบางน้อยกว่า vagina ของปูที่มีรังไข่ในระยะที่ 1

ระยะที่ 3 vagina มีสีขาวขุ่น ผนังบางมากกว่าเดิม

ระยะที่ 4 vagina มีลักษณะแบน ผนังบางและแคบมากที่สุด (ภาพที่ 7)

2. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histology) ของเนื้อเยื่อภายใน spermatheca และ vagina เมื่อย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin

2.1 การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของ spermatheca ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

ระยะที่ 1 spermatheca เป็นถุงหุ้มด้วยเยื่อบาง (thin membrane) ภายในประกอบด้วยท่อที่ขดอยู่และท่อที่มีการเรียงตัวอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบร่างแหที่เรียงตัวกันอย่างหลวมๆ (loose connective tissue) ประกอบด้วยเส้นใย (fiber) ที่เรียงตัวเป็นตาข่ายหนาแน่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณขอบ (ภาพที่ 8:A1) ในส่วนบริเวณตรงกลางเส้นใยมีการเรียงตัวหลวมกว่า (ภาพที่ 8:A2) ท่อภายใน spermatheca บุด้วยเซลล์ทรงกระบอกที่เรียงตัวเพียง 1 ชั้น (simple columnar epithelium)ที่มีความสูงเฉลี่ย 4.15 μm พบนิวเคลียสอยู่ใกล้ฐานของเซลล์ (basement membrane) (ภาพที่ 10:C3) และพบแกรนูลขนาดเล็กซึ่งมีขนาดเฉลี่ยน้อยกว่า 1 μm ติดสีชมพู บริเวณที่ติดกับ basement membrane จำนวนมาก มากกว่าด้าน apical surface (ด้านที่ติดกับ lumen) (ภาพที่ 11) ในบางด้านของ spermatheca พบการโค้งพับของ epithelium ภายในท่อเป็น ลักษณะคล้าย villi ในลำไส้ (ภาพที่ 8:A3) ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันพบแกรนูลขนาดเล็กลักษณะเดียวกับที่พบใน epithelium เกาะอยู่กับเส้นใย (fiber) เป็นเส้นๆแผ่กระจายจำนวนมาก (ภาพที่ 10:C1) นอกจากนี้ยังพบว่าแกรนูลมีการรวมกันเป็นแผ่นกลมใหญ่ (platelet) (ภาพที่ 9B,14) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.6 μm จำนวนมาก พบกระจายอยู่ทั่วไประหว่างท่อภายใน spermatheca และยังพบ platelet บริเวณใกล้กับ basement membrane ด้วย(ภาพที่ 10:C2) ภายใน lumen ของท่อไม่พบแกรนูลและ platelet แต่พบเส้นใย(ภาพที่ 8:A4) ปริมาณแกรนูล, platelet และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่พบในระยะนี้มีจำนวนมาก แต่พบ sperm ในจำนวนที่น้อยมากซึ่งสังเกต sperm บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อยู่ร่วมกับ platelet ด้วย (ภาพที่ 15:2)

ระยะที่ 2 spermatheca มีลักษณะคล้ายกับ spermatheca ของปูที่มีรังไข่ในระยะที่ 1 แต่แตกต่างกันตรงที่ในระยะนี้พบแกรนูลที่แผ่กระจายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีการรวมตัวเป็น platelet มากขึ้นและแกรนูลที่พบใน epithelium cell ทั้งบริเวณ basement membrane และ apical surface จะมีจำนวนน้อยกว่าในระยะแรก ซึ่งแกรนูลที่พบมีขนาดเฉลี่ยน้อยกว่า 1 μm , platelet มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.65 μm และความสูงของ columnar epithelium cell เฉลี่ย 3.8 ในระยะนี้พบ sperm จำนวนน้อยมากเช่นกัน

ระยะที่ 3 spermatheca มีลักษณะคล้ายกับ spermatheca ของปูที่มีรังไข่ในระยะที่ 1 และ 2 แต่ต่างกันตรงที่ในระยะนี้พบปริมาณของแกรนูลขนาดเล็กน้อยกว่า 1 μm บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและ platelet ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.8 μm จำนวนน้อยกว่าในระยะที่ 1 และ 2 มากจะพบเพียง platelet ขนาดเล็กอยู่บ้างและพบแกรนูลใน epithelium cell บริเวณ basement membrane ส่วนด้าน apical surface พบเพียงเล็กน้อย เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีปริมาณน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด ในระยะนี้ epithelium cell มีความสูงมากกว่าในระยะที่ 1 และ 2 โดยมีความสูงเฉลี่ย 4.4 μm และพบ sperm จำนวนน้อยมากเช่นกัน

ระยะที่ 4 spermatheca มีลักษณะคล้ายกับ spermatheca ของปูที่มีรังไข่ทั้ง 3 ระยะที่ผ่านมา แต่ต่างกันตรงที่ในระยะนี้พบปริมาณแกรนูลขนาดเล็กน้อยกว่า 1 μm และ platelet ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.9 μm จำนวนมากอยู่กันอย่างหนาแน่นแผ่กระจายเต็มเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวพัน และลักษณะของ epithelium ในระยะนี้จะพบแบบที่เป็น villi มากกว่าในระยะอื่นๆ และพบแกรนูลใน epithelium cell ทั้งด้าน basement membrane และ apical surface แต่บางบริเวณเห็นด้าน apical surface มากกว่า ความสูงของ epithelium cell ขนาดเฉลี่ย 4.2 μm ในระยะนี้พบ sperm จำนวนน้อยมากเช่นกัน

2.2 การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของ vagina ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ (ภาพที่ 11 และ 12)

ระยะที่ 1 เนื้อเยื่อ vagina มีลักษณะเป็นหีบ โค้งพับไปมา บุด้วย simple columnar epithelium ขนาดเฉลี่ย 6.25 μm ด้านบนของ epithelium มีสารนอกเซลล์ (extracellular material) เป็นชั้นหนา สันนิษฐานว่าเป็น cuticle (ภาพที่ 12:D2) เฉลี่ย 10 μm ซึ่งช่วยให้เซลล์คงตัวอยู่ได้และป้องกันการเสียดสีเวลาที่มีการจับคู่ผสมพันธุ์กัน epithelium และสารนอกเซลล์เรียงตัวในลักษณะเป็นหีบ พบ pack ของ sperm (ภาพที่ 12:D1) อยู่ระหว่างชั้นของสารนอกเซลล์จำนวนมาก ขนาดเฉลี่ยของ sperm 0.25 μm ถัดจากชั้น epithelium เป็นชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกล้ามเนื้อ พบแกรนูลเกาะกับเส้นใยบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นจำนวนมากเหมือนกับที่พบใน spermatheca (ภาพที่ 13:E1) แกรนูลมีขนาดเฉลี่ยน้อยกว่า 1 μm พบ sperm ปะปนอยู่กับแกรนูลที่เกาะกับเส้นใยบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ภาพที่ 15:1) และ sperm บางส่วนแทรกไปอยู่ตามหีบของ cuticle (ภาพที่ 16) และพบ platelet (ภาพที่ 13:E2) ขนาดเฉลี่ย 1.5 μm มีลักษณะเหมือนกับที่พบใน spermatheca แต่มีขนาดเล็กกว่าและมีปริมาณที่น้อยกว่า

ระยะที่ 2 vagina มีลักษณะคล้ายกับ vagina ของปูที่มีรังไข่ในระยะแรก epithelium cell ขนาดเฉลี่ย 9.75 μm และมีชั้น cuticle หนาเฉลี่ย 5.25 μm ไม่พบ pack sperm แต่พบ sperm เกาะกลุ่มกันเป็นกระจุกเล็กๆ ขนาดเฉลี่ยของ sperm 0.5 μm และพบ sperm กระจายตัวปะปนอยู่กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและรวมอยู่กับแกรนูล บางส่วนแทรกไปอยู่ตามหีบ cuticle ในระยะนี้พบแกรนูลจำนวนมากมีขนาดเฉลี่ยน้อยกว่า 1 μm และพบ platelet ขนาดเฉลี่ย 1.75 μm มีลักษณะเหมือนกับที่พบใน spermatheca แต่มีขนาดเล็กกว่าและมีปริมาณที่น้อยกว่า

ระยะที่ 3 vagina มีลักษณะคล้ายกับ vagina ของปูที่มีรังไข่ในระยะที่ 1 และ 2 epithelium cell ขนาดเฉลี่ย 6.75 μm และมีชั้น cuticle หนาเฉลี่ย 11 μm ไม่พบ pack sperm แต่พบ sperm เกาะกลุ่มกันเป็นกระจุกเล็กๆ ขนาดเฉลี่ยของ sperm 0.25 μm และพบ sperm กระจายตัวปะปนอยู่กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและรวมอยู่กับแกรนูล บางส่วนแทรกไปอยู่ตามหีบ cuticle ในระยะนี้พบแกรนูลจำนวนมากมีขนาดเฉลี่ยน้อยกว่า 1 μm และพบ platelet ขนาดเฉลี่ย 1.5 μm มีลักษณะเหมือนกับที่พบใน spermatheca แต่มีขนาดเล็กกว่าและมีปริมาณที่น้อยกว่า

ระยะที่ 4 vagina มีลักษณะคล้ายกับ vagina ของปูที่มีรังไข่ใน 3 ระยะที่ผ่านมา epithelium cell ขนาดเฉลี่ย 7.5 μm และมีชั้น cuticle หนาเฉลี่ย 5 μm ไม่พบ pack sperm แต่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sperm เกาะกลุ่มกันเป็นกระจุกเล็กๆ ขนาดเฉลี่ยของ sperm $0.25 \mu\text{m}$ และพบ sperm กระจายตัวปะปนอยู่กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและรวมอยู่กับแกรนูล บางส่วนแทรกไปอยู่ตามหีบ cuticle ในระยะนี้พบแกรนูลยังคงมีจำนวนมากอยู่ ซึ่งมีขนาดเฉลี่ยน้อยกว่า $1 \mu\text{m}$ และพบ platelet ขนาดเฉลี่ย $1.5 \mu\text{m}$ มีลักษณะเหมือนกับที่พบใน spermatheca แต่มีขนาดเล็กกว่าและมีปริมาณที่น้อยกว่า

3. การทดสอบการย้อมสีโดยใช้เทคนิคทาง Histochemistry

การย้อมสีโดยใช้เทคนิคทาง histochemistry เป็นการตรวจสอบว่าแกรนูลและ platelet ที่พบทั้งใน spermatheca และ vagina เป็นสารชีวโมเลกุล (biomolecule) กลุ่มใด

3.1 การย้อมสีด้วยเทคนิค Millon เพื่อตรวจสอบโปรตีน (ภาพที่ 17-18)

spermatheca จากการที่สังเกตเห็นได้จากการย้อมสีมาตรฐาน Hematoxylin และ Eosin พบแกรนูลและ platelet ใน spermatheca ของปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่ในระยะต่างๆ เมื่อย้อมสีด้วยเทคนิค Millon แกรนูลและ platelet ที่สังเกตได้ติดสีส้มแดง ซึ่ง platelet จะเห็นติดสีส้มแดงที่ชัดเจนกว่าแกรนูลที่รวมอยู่กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แสดงผลบวกกับเทคนิค แสดงว่าแกรนูลและ platelet ที่พบนั้นเป็นสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดย spermatheca ที่มีรังไข่ระยะที่ 2 และ 4 จะพบแกรนูลและ platelet มากที่สุดตามระยะที่ 1 และ 3 พบในปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนแกรนูลบริเวณเซลล์ epithelium พบว่า ในแต่ละระยะ ติดสีของ Millon เช่นกันแต่จาง ส่วนใน lumen ผลการย้อมด้วย Millon ให้ผลเป็นลบ เพราะไม่พบสารใดๆใน lumen (ตารางที่ 1)

vagina จากการที่สังเกตเห็นได้จากการย้อมสีมาตรฐาน Hematoxylin และ Eosin พบแกรนูลและ platelet ใน vagina เหมือนกับที่พบใน spermatheca แต่ใน vagina พบ platelet ในปริมาณน้อยกว่า spermatheca มาก ผลการทดสอบในแต่ละระยะรังไข่เมื่อย้อมสีด้วยเทคนิค Millon พบว่าเม็ดแกรนูลติดและ platelet ติดสีส้มแดงเช่นเดียวกับใน spermatheca แต่ติดสีที่จางกว่า แสดงผลบวกกับเทคนิค แสดงว่าเม็ดแกรนูลที่พบนั้นเป็นสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ส่วนแกรนูลบริเวณเซลล์ epithelium พบว่า ในแต่ละระยะ ติดสีของ millon แต่จาง ส่วนช่องภายใน lumen ผลการย้อมด้วย Millon ให้ผลเป็นลบ (ตารางที่ 2)

3.2 การย้อมสีด้วยเทคนิค Ninhydrin ตรวจสอบโปรตีน

เมื่อทำการย้อมสีด้วยเทคนิค Ninhydrin เพื่อตรวจสอบว่าเม็ดแกรนูลที่พบทั้งใน spermatheca และ vagina มีองค์ประกอบของโปรตีนหรือไม่ ผลจากการย้อมทั้งใน spermatheca และ vagina ให้ผลลบกับเทคนิค คือ ย้อมแล้วไม่ติดสีอาจเป็นเพราะการใช้น้ำยาคงสภาพที่ไม่เหมาะสม (ตารางที่ 1 และ 2)

3.3 การย้อมสีด้วยเทคนิค Masson Trichrome เพื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) (ภาพที่ 19-21)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spermatheca เมื่อทำการย้อมสีด้วยเทคนิค Masson Trichrome พบว่าแกรนูลที่กระจายตัวอยู่ตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพันติดสีม่วงแดง ส่วนแกรนูลที่รวมกันเป็น platelet ติดสีแดง (ภาพที่ 20:3) พบ collagen fiber ซึ่งติดสีฟ้าอมเขียว อยู่บริเวณ basement membrane (ภาพที่ 20:1) และแทรกตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ภาพที่ 20:2) การใช้เทคนิค Masson Trichrome เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าเส้นใยต่างๆ มี collagen เป็นองค์ประกอบ (ตารางที่ 1)

vagina เมื่อทำการย้อมด้วยเทคนิค Masson Trichrome สังเกตได้ว่าบริเวณสารนอกเซลล์ที่เป็นชั้นหนาทึบติดสีฟ้าซึ่งสันนิษฐานว่าเป็น cuticle และคาดว่าน่าจะมี collagen และส่วนประกอบอื่นๆ ซึ่งต้องทำการย้อมสีเพื่อติดตามต่อไป และพบบริเวณที่ติดสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งเป็น pack ของ sperm ส่วนบริเวณที่ติดสีน้ำเงินอ่อน ซึ่งเป็นแกรนูลและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและแกรนูลที่พบใน vagina คาดว่าน่าจะเป็นคนละชนิดกับใน spermatheca เพราะแกรนูลย้อมติดสีคนละสีกับใน spermatheca โดยใน vagina จะติดสีน้ำเงินอ่อน ส่วนใน spermatheca จะติดสีม่วงอมชมพู (ตารางที่ 2)

3.4 การย้อมสีด้วยเทคนิค Periodic Acid Schiff (PAS) เพื่อตรวจสอบคาร์โบไฮเดรต

เมื่อทำการย้อมสีด้วยเทคนิค PAS เพื่อตรวจสอบว่าแกรนูลที่พบทั้งใน spermatheca และ vagina มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตหรือไม่ ผลจากการย้อมทั้งใน spermatheca และ vagina ให้ผลลบกับเทคนิคอาจเป็นเพราะน้ำยาคงสภาพเนื้อเยื่อไม่เหมาะสม (ตารางที่ 3 และ 4)

3.5 การย้อมสีด้วยเทคนิค Alcian Blue ที่ pH 2.5 เพื่อตรวจสอบ mucopolysaccharide (ภาพที่ 22)

spermatheca เมื่อทำการย้อมสีด้วยเทคนิคนี้ พบว่าบริเวณเซลล์ epithelium ติดสีฟ้าให้ผลบวกกับเทคนิคนี้ จึงบอกได้ว่าเซลล์ epithelium มีองค์ประกอบของ mucopolysaccharide ส่วนแกรนูลบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและ platelet ติดสีจาง (ตารางที่ 3)

vagina เมื่อทำการย้อมด้วยเทคนิคนี้ พบแกรนูลบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันติดสีฟ้าซึ่งให้ผลบวกกับเทคนิค จึงทำให้บอกได้ว่าแกรนูลและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีองค์ประกอบของ acid mucopolysaccharide (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบโปรตีนด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain*

spermatheca	โปรตีน							
	Millon			Ninhydrin			Masson trichrome	
	granule บริเวณ epithelium	lumen	granule, platelet	granule บริเวณ epithelium	lumen	granul, platelet	granule, platelet	conne ctive tissue
ระยะที่ 1	+	-	+	-	-	-	+	++
ระยะที่ 2	+	-	+++	-	-	-	+	++
ระยะที่ 3	+	-	+	-	-	-	+	++
ระยะที่ 4	+	-	+++	-	-	-	+	++

+ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยา

++ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยามาก

+++ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยามากที่สุด

- = ให้ผลเป็นลบกับปฏิกิริยา

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบโปรตีนด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (histochemistry) ของ vagina ในปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain*

Oviduct	โปรตีน							
	Millon			Ninhydrin			Masson trichrome	
	granule บริเวณ epithelium	lumen	granule, platelet	granule บริเวณ epithelium	lumen	granul, platelet	granule, platelet	connective tissue
รังไข่ระยะที่ 1	+	-	+	-	-	-	-	+
รังไข่ระยะที่ 2	+	-	++	-	-	-	-	+
รังไข่ระยะที่ 3	+	-	+	-	-	-	-	+
รังไข่ระยะที่ 4	+	-	+	-	-	-	-	+

+ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยา

++ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยามาก

+++ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยามากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- = ให้ผลเป็นลบกับปฏิกิริยา

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (histochemistry) ของ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain*

spermatheca	คาร์โบไฮเดรต					
	PAS			Alcian blue		
	epithelium	lumen	granule secretion	epithelium	lumen	granule secretion
รังไข่ระยะที่1	-	-	-	+	-	-
รังไข่ระยะที่2	-	-	-	+	-	-
รังไข่ระยะที่3	-	-	-	+	-	-
รังไข่ระยะที่4	-	-	-	+	-	-

+ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยา

++ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยามาก

+++ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยามากที่สุด

- = ให้ผลเป็นลบกับปฏิกิริยา

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ vagina ในปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain*

oviduct	คาร์โบไฮเดรต					
	PAS			Alcian blue		
	epithelium	lumen	granule secretion	epithelium	lumen	granule secretion
รังไข่ระยะที่1	-	-	-	+	-	++
รังไข่ระยะที่2	-	-	-	+	-	++
รังไข่ระยะที่3	-	-	-	+	-	++
รังไข่ระยะที่4	-	-	-	+	-	++

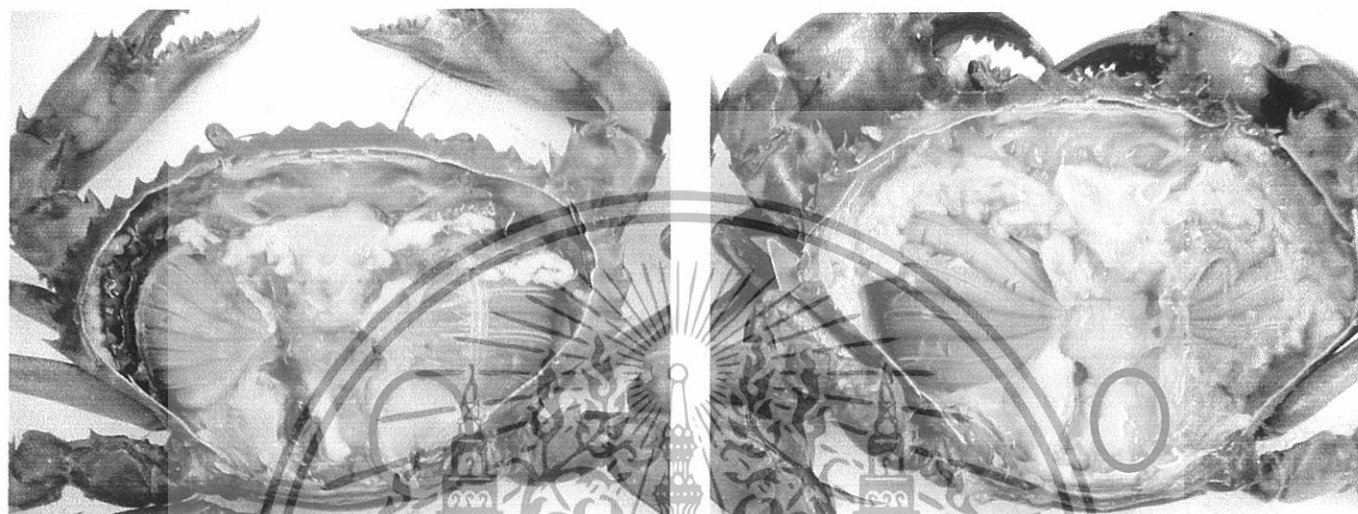
+ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยา

++ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยามาก

+++ = ให้ผลเป็นบวกกับปฏิกิริยามากที่สุด

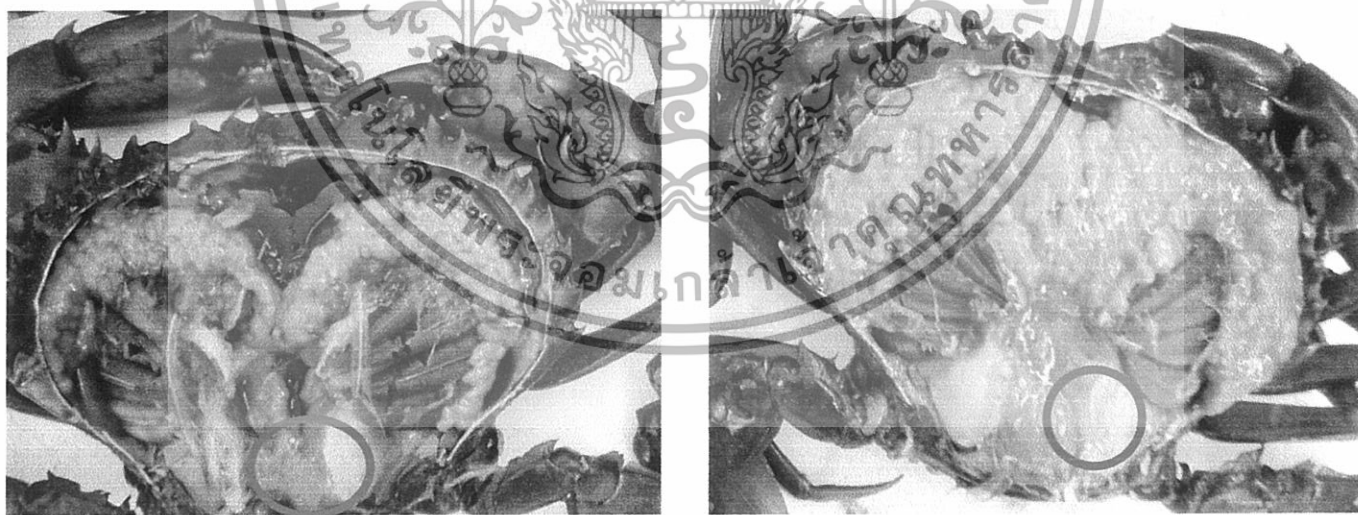
- = ให้ผลเป็นลบกับปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ระยะที่ 1

ระยะที่ 2

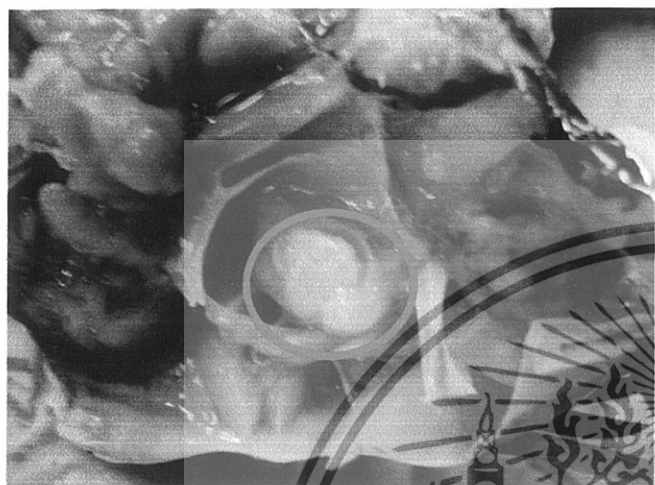


ระยะที่ 3

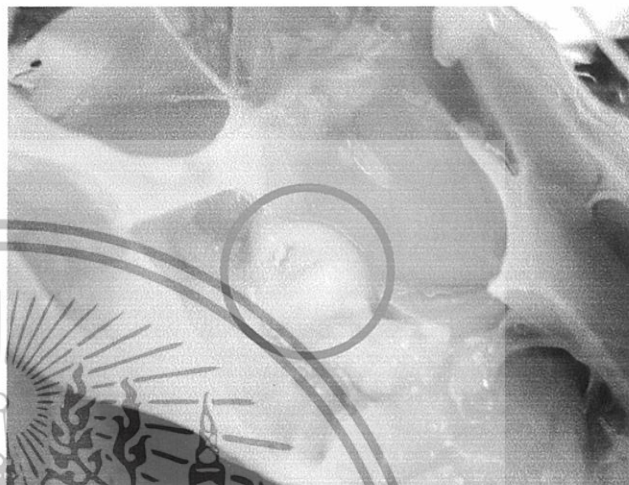
ระยะที่ 4

ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของ spermatheca

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ระยะที่ 1



ระยะที่ 2



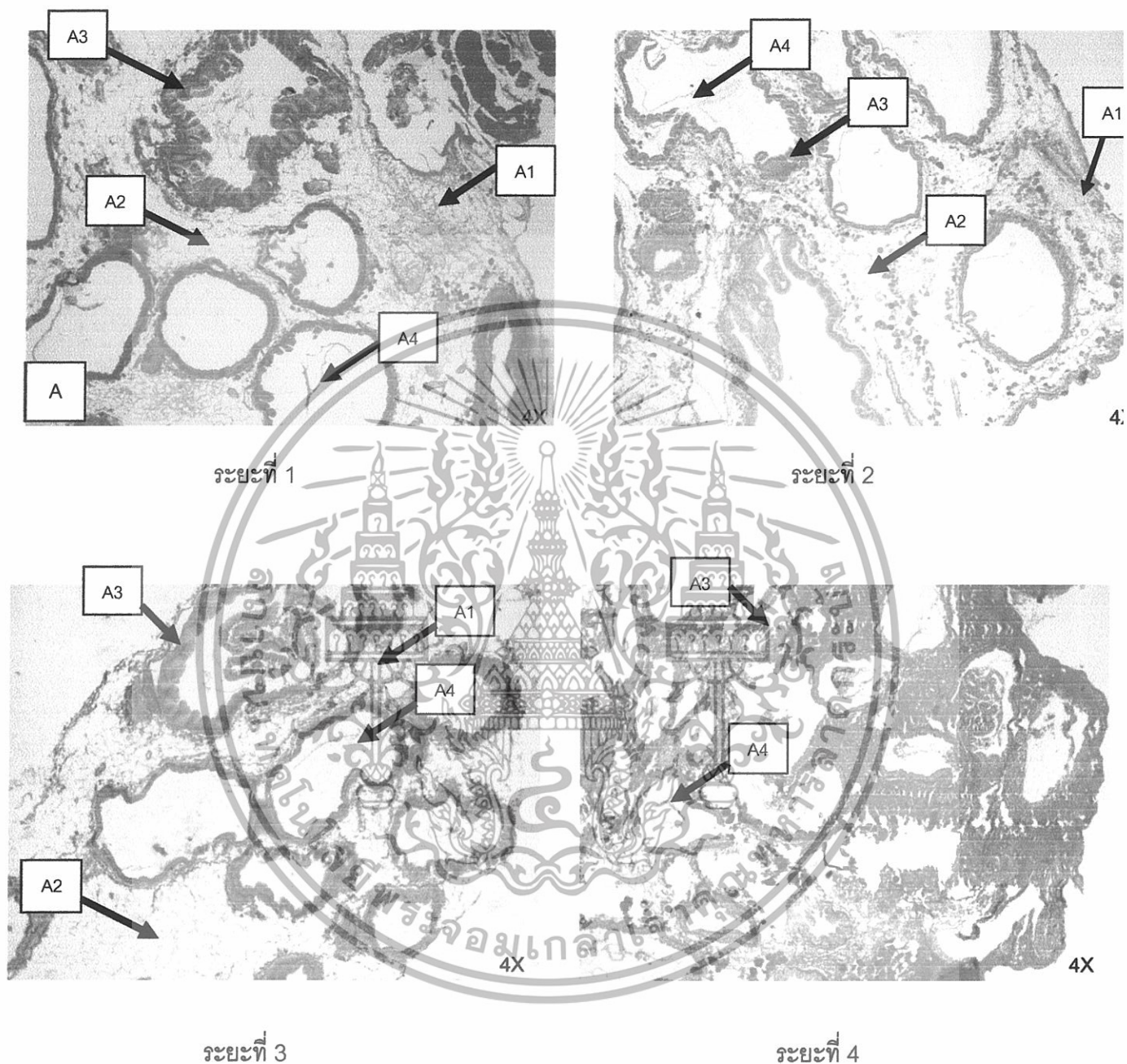
ระยะที่ 3



ระยะที่ 4

ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของ oviduct

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 ลักษณะเนื้อเยื่อ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

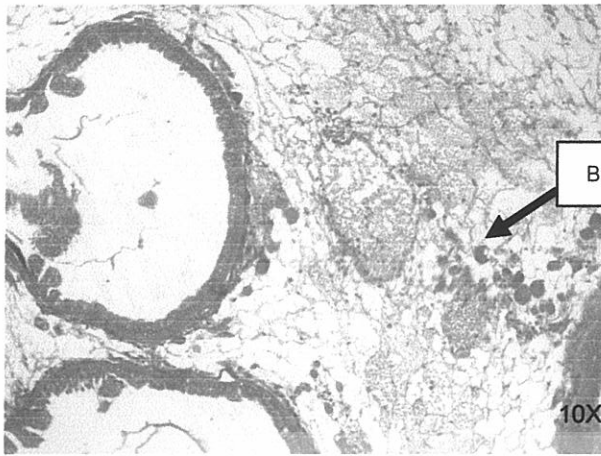
A1 = การเรียงตัวของเส้นใยที่มีลักษณะตาข่ายที่หนาแน่น

A2 = การเรียงตัวของเส้นใยในลักษณะหลวมๆ

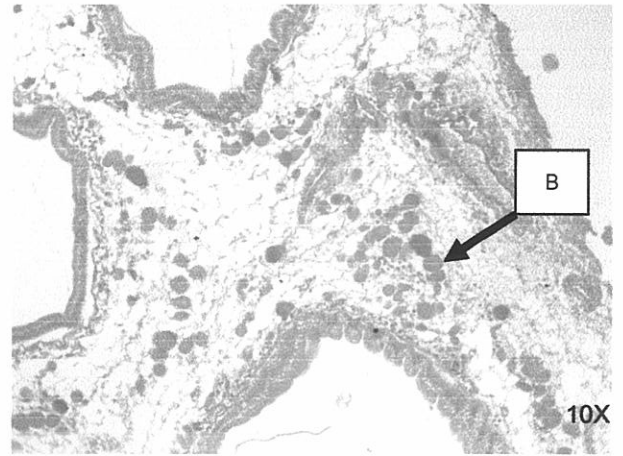
A3 = การโค้งพับของ epithelium ภายในท่อเป็นลักษณะคล้าย villi ในลำไส้

A4 = เส้นใย (fiber) ที่พบภายใน lumen

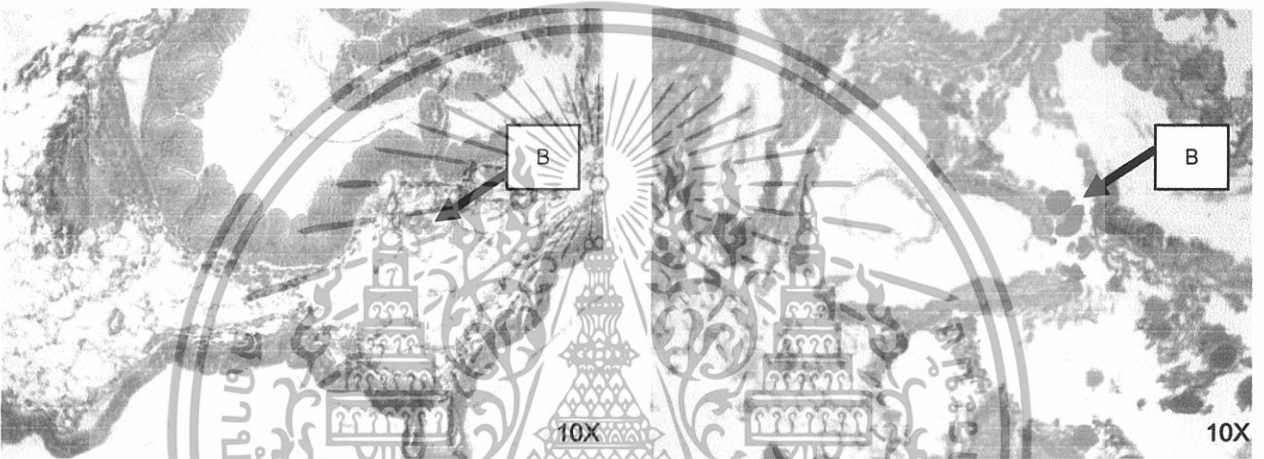
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ระยะที่ 1



ระยะที่ 2

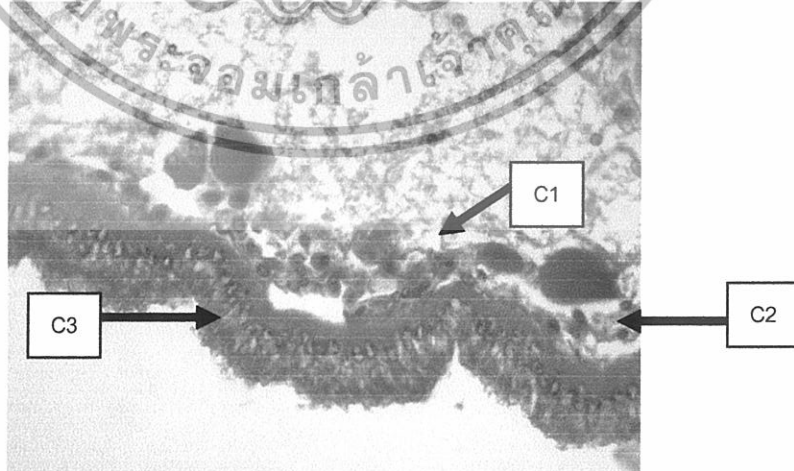


ระยะที่ 3

ระยะที่ 4

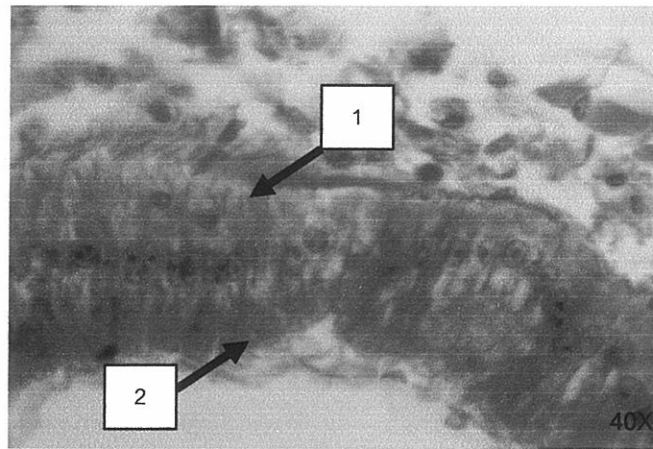
ภาพที่ 9 ลักษณะเนื้อเยื่อ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

B = แกรนูลที่รวมตัวกันเป็นแผ่นกลมใหญ่ (platelet)



ภาพที่ 10 แสดงแกรนูลที่เกาะกับเส้นใยจำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (C1), platelet บริเวณ basement membrane ของ columnar epithelium (C2), นิวเคลียสบริเวณ basement membrane (C3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 แสดงแถบรูปลบริเวณ basement membrane (1) และ apical surface (2)



ระยะที่ 3

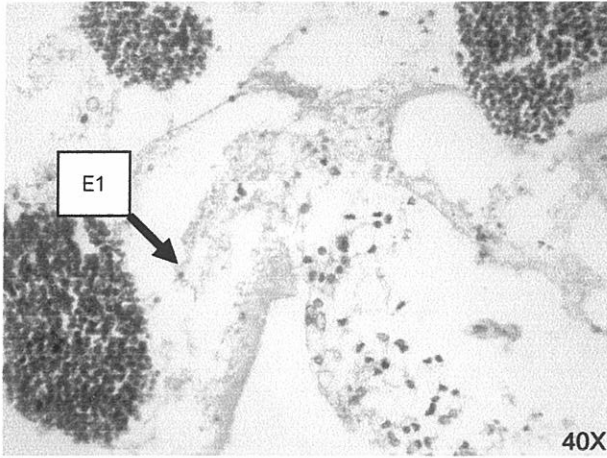
ระยะที่ 4

ภาพที่ 12 ลักษณะทางเนื้อเยื่อ vagina ในปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

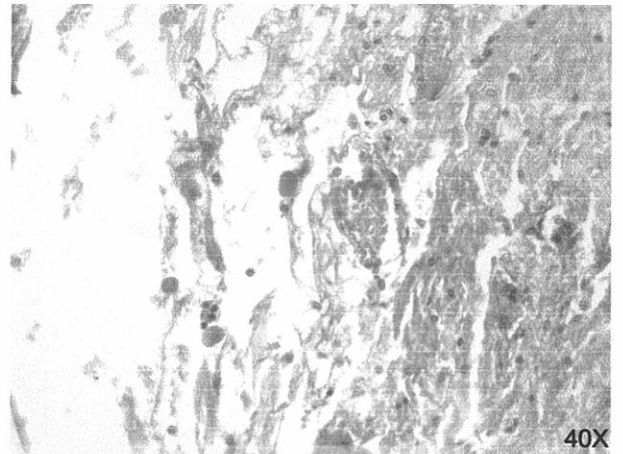
D1 = pack sperm

D2 = ชั้น cuticle

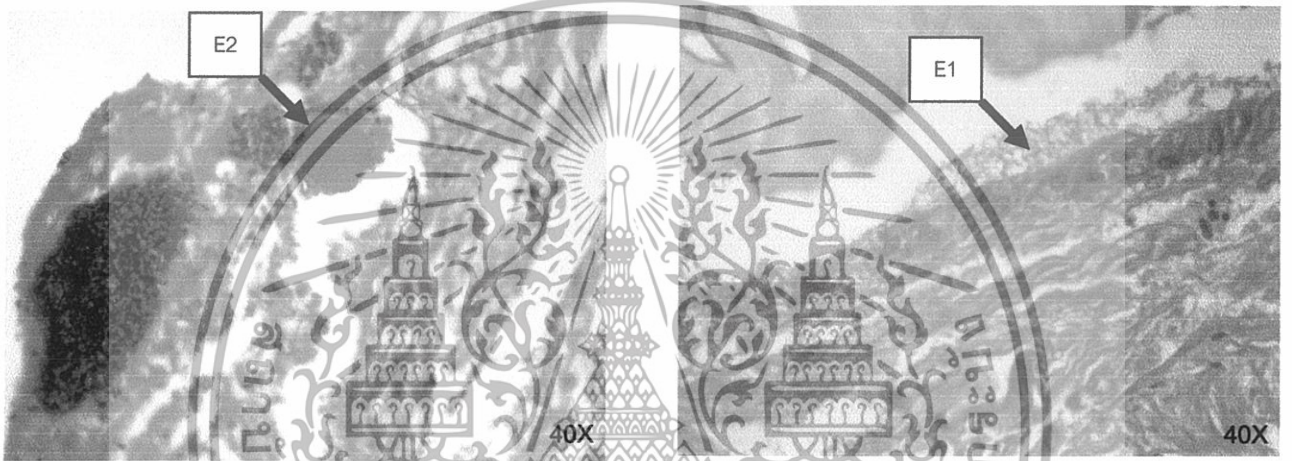
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ระยะที่ 1



ระยะที่ 2



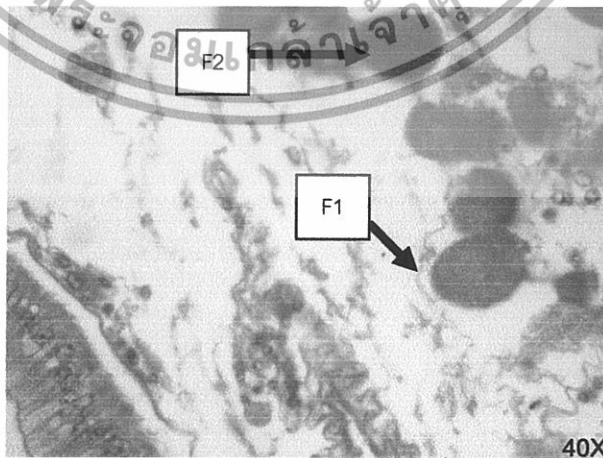
ระยะที่ 3

ระยะที่ 4

ภาพที่ 13 ลักษณะทางเนื้อเยื่อ vagina ในปูทะเลเพศเมีย *Scylla paramamosain* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

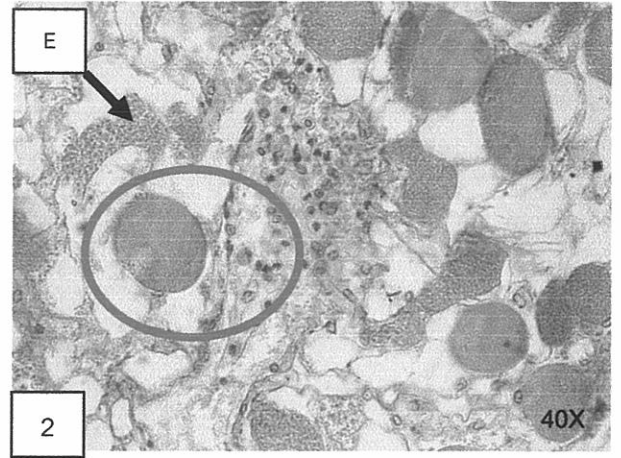
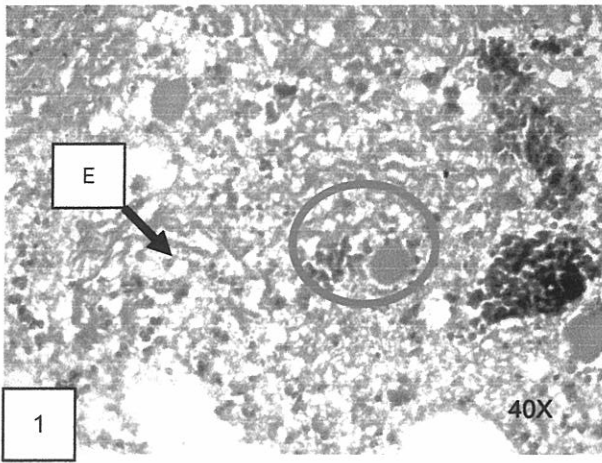
E1 = แกรนูลรวมตัวกันบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

E2 = platelet



ภาพที่ 14 แกรนูลที่มีการรวมตัวกันเป็นแผ่นกลมใหญ่ (platelet) ซึ่งยัง pack ตัวกันไม่แน่น (F1), แกรนูลที่รวมกันเป็น platelet ที่ pack กันแน่นมาก (F2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



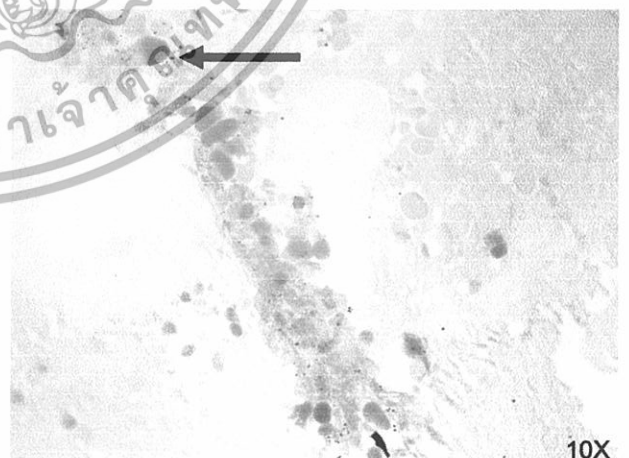
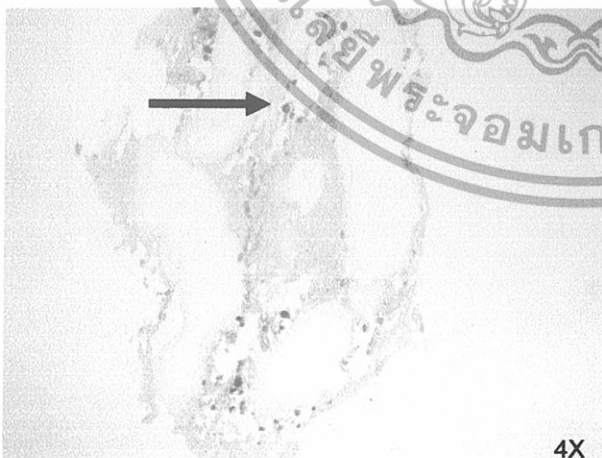
ภาพที่ 15 ตำแหน่ง platelet ที่พบล้อมรอบด้วย sperm และอยู่ปะปนกับแกรนูลบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

15.1 vagina 15.2 spermatheca

F = แกรนูลที่รวมตัวกันบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

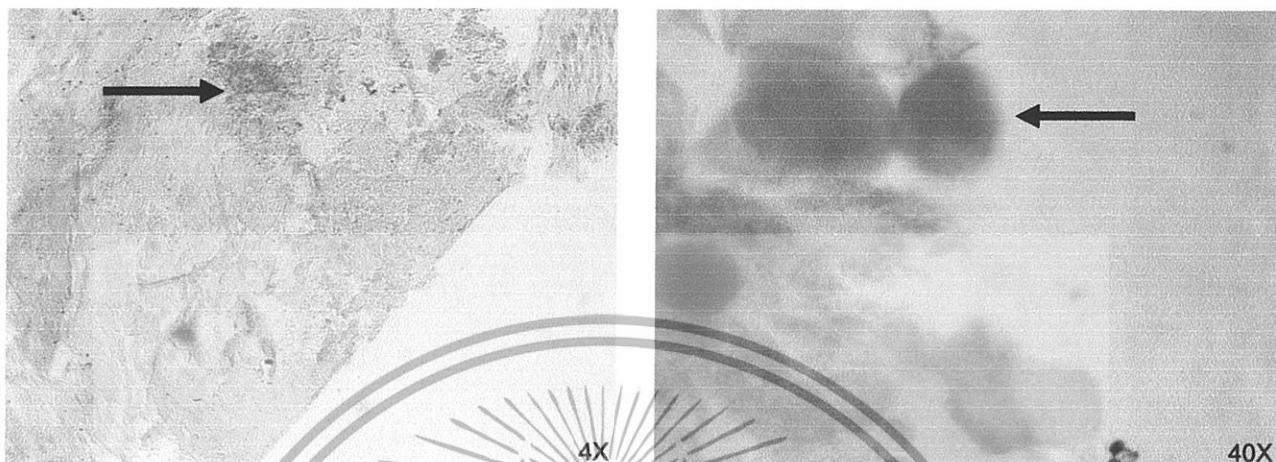


ภาพที่ 16 แสดง sperm แทรกตามเนื้อเยื่อภายใน vagina



ภาพที่ 17 ลักษณะเม็ดแกรนูลและ platelet ใน spermatheca ที่ย้อมเทคนิค Millon

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

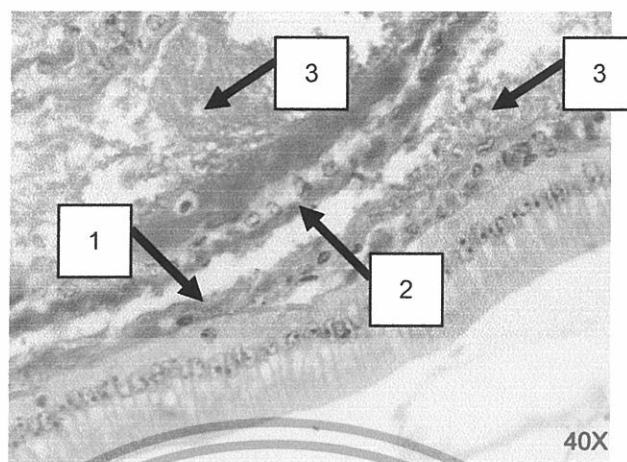


ภาพที่ 18 ลักษณะแกรนูลและ platelet ใน vagina ที่ย้อมแล้วให้ผลบวกกับเทคนิค Millon

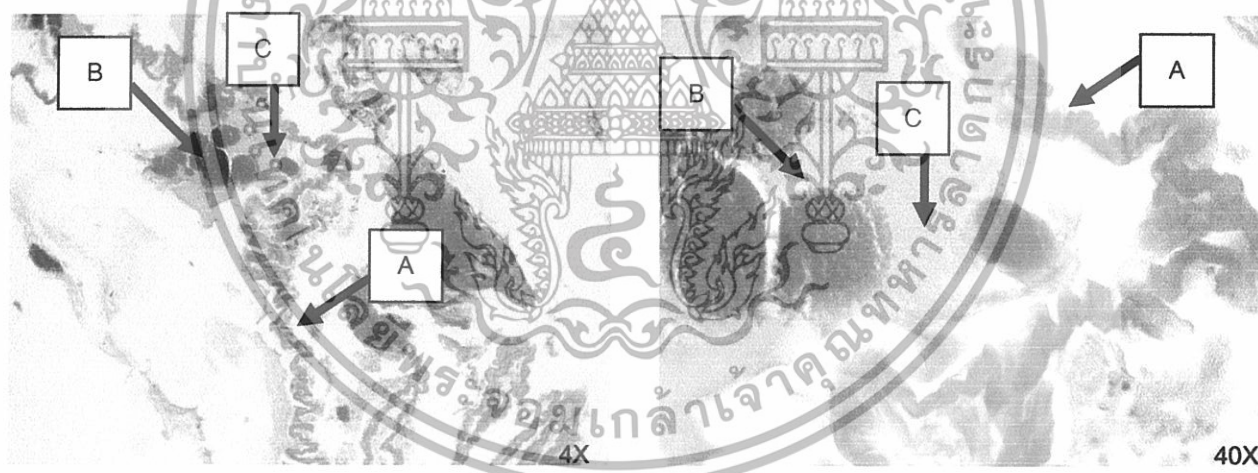


ภาพที่ 19 ลักษณะเนื้อเยื่อใน spermatheca ที่ย้อมด้วยเทคนิค Masson Trichrome collagen fiber (1), แกรนูลที่รวมตัวกันบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



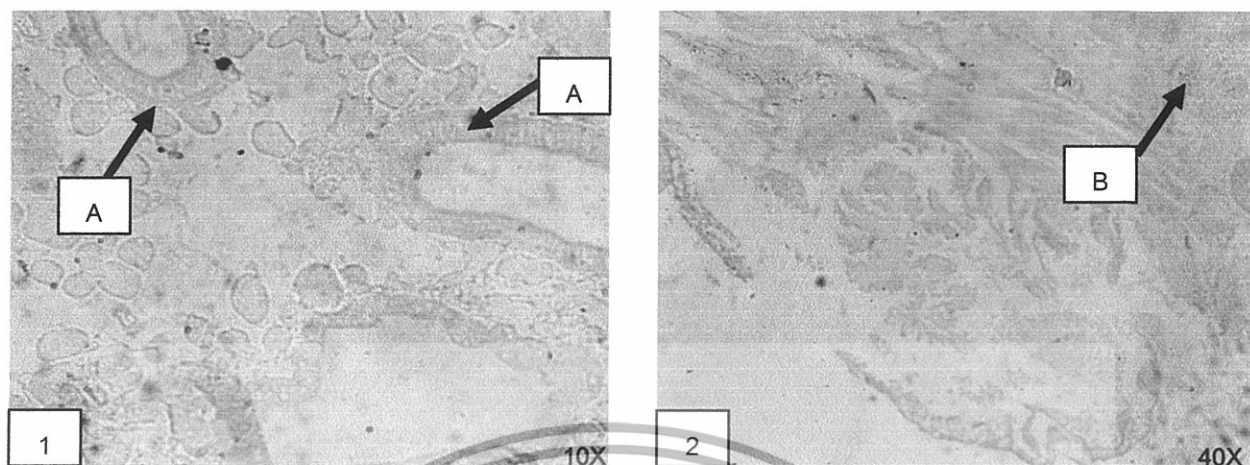
ภาพที่ 20 ลักษณะเนื้อเยื่อ spermatheca แสดง collagen บริเวณ basement membrane (1), collagen อยู่ปนกับแกรนูลและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (2), แกรนูลเกาะกับเส้นใยบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (3) ใน



ภาพที่ 21 ลักษณะเนื้อเยื่อใน vagina ที่ย้อมด้วยเทคนิค Masson trichrome

- A = ชั้นของ cuticle
- B = pack sperm
- C = granule secretion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 22 ลักษณะเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยเทคนิค Acian Blue ที่ pH 2.5 21.1 spermatheca 21.2 vagina

A = บริเวณ epithelium cell

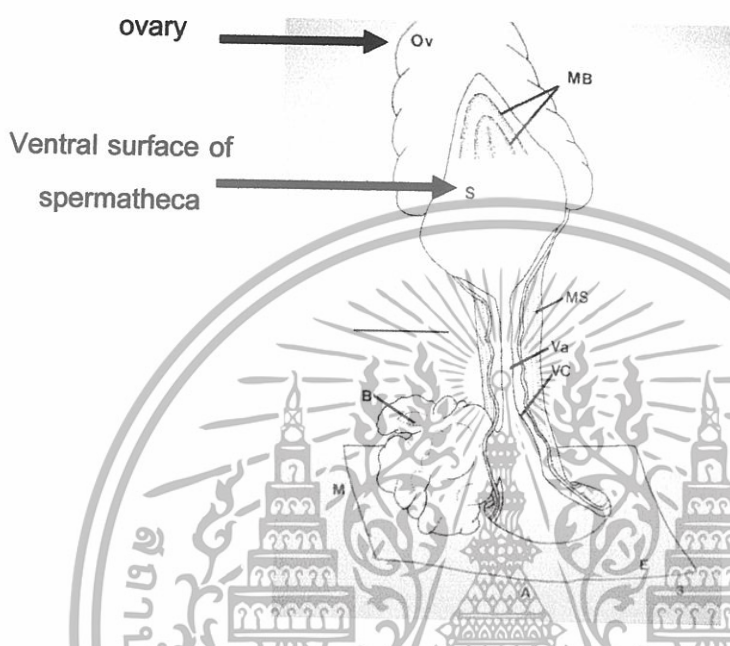
B = บริเวณ granule secretion



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปูทะเล *Scylla paramamosain* เพศเมีย 1 ตัว จะพบ spermatheca 1 อัน อาจจะอยู่ทางด้านซ้ายหรือขวาของตัว แต่มีงานวิจัยของ Jensen *et al.*(1996) พบว่าปู Dungeness crab (*Cancer magister*) เพศเมีย 1 ตัวจะมี spermatheca เป็นคู่ ดังภาพ

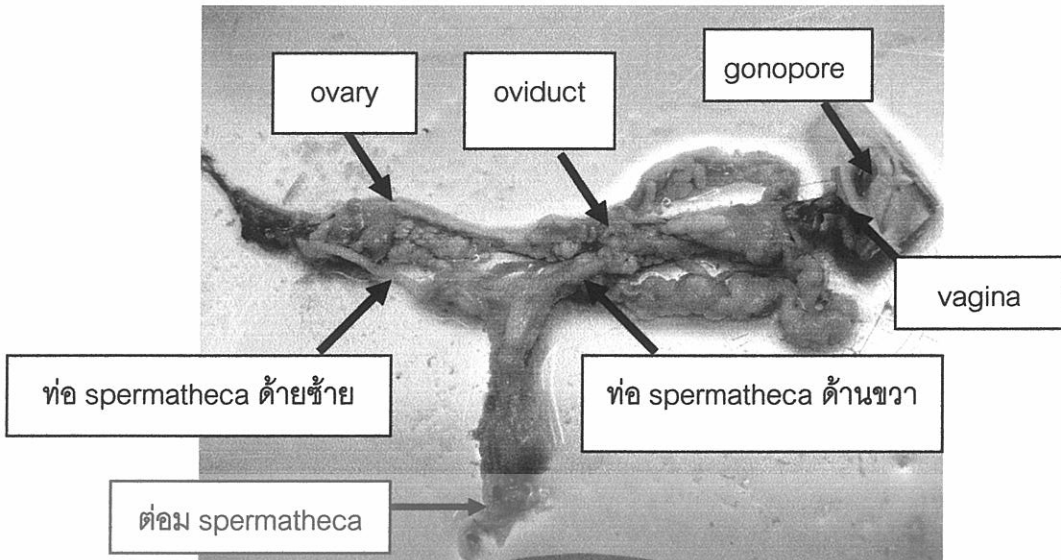


จากผลการทดลองพบว่าภายใน spermatheca พบ sperm ในจำนวนที่น้อย แต่พบมากภายใน vagina ทำให้สันนิษฐานได้ว่า spermatheca อาจจะไม่ได้นำหน้าที่ในการเก็บ sperm อย่างที่มีผู้ได้เสนอไว้แต่พบ granule และ platelet ภายใน spermatheca ในแต่ละระยะการเจริญของรังไข่จึงทำให้เชื่อว่า spermatheca อาจจะมีหน้าที่ในการผลิต granule และ platelet ใน cell epithelium และมีการปล่อยมาสะสมบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน granule และ platelet ที่พบใน spermatheca อยู่ร่วมกับ sperm เช่นเดียวกับที่พบใน vagina จากการทดลองนี้ยังสรุปความสัมพันธ์ทางด้านกายวิภาคและด้าน histology ได้ว่าเมื่อดูลักษณะทางกายวิภาคของ spermatheca ในแต่ละระยะการเจริญของรังไข่ พบว่า spermatheca จะมีขนาดเล็กลงซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะทางเนื้อเยื่อ ซึ่งเมื่อทำการ section เนื้อเยื่อของ spermatheca ในแต่ละระยะรังไข่พบว่าในระยะที่ 3 และ 4 จะพบการโค้งพับของท่อภายใน spermatheca มากขึ้น และพบพื้นที่ระหว่างท่อเป็นช่องว่างน้อยลง อาจสัมพันธ์กับขนาดที่เล็กลงของ spermatheca ในระยะที่ 3 และ 4 ได้ และจากการทดสอบด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) เป็นการใช้เทคนิคในการย้อมสีพิเศษเพื่อตรวจสอบว่าแกรนูล และ platelet ที่พบใน spermatheca และ vagina ในแต่ละระยะการเจริญของรังไข่มีสารในกลุ่มใดบ้าง ผลคือ แกรนูลและ platelet มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบของโปรตีน, คาร์โบไฮเดรตในกลุ่ม mucopolysaccharide ซึ่งอาจใช้เป็นแหล่งอาหารของ sperm และยังมี collagen ซึ่งรวมตัวกับน้ำได้ดีสามารถให้ความชุ่มชื้นแก่ sperm และใน vagina พบสารนอกเซลล์ที่เป็นชั้นหนาที่สันนิษฐานว่าเป็น cuticle ซึ่งมีหน้าที่ช่วยในการทำให้เซลล์คงตัวอยู่ได้และป้องกันการเสียดสีเวลาที่มีการจับคู่ผสมพันธุ์และอาจมีส่วนประกอบอื่น ๆ ร่วมด้วย ซึ่งต้องทำการย้อมสีเพิ่มเติมเพื่อติดตามต่อไป .ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Beninger et al. (1993) และ Lanteigne et al. (1996) ซึ่งทำการทดสอบทาง Histochemistry และพบว่า granule secretion ที่พบภายใน spermatheca และ vagina มีองค์ประกอบโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในกลุ่ม mucopolysaccharide เช่นกันและจากการทดลองนี้สันนิษฐานได้ว่า granule secretion ที่พบใน vagina ไม่ได้เป็น granule secretion เดียวกับที่พบใน spermatheca อาจมีบางส่วนเท่านั้นที่เป็น secretion เดียวกัน คือ platelet เนื่องจากเมื่อทำการย้อมสีด้วยเทคนิค Alcian Blue granule secretion ใน spermatheca ไม่ติดสีแต่ granule secretion ใน vagina ติดสี ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป จากการทดลองการย้อมสีบางเทคนิคที่ให้ผลไม่ชัดเจน เช่น Alcian Blue Technique อาจเป็นเพราะการใช้น้ำยาคงสภาพเนื้อเยื่อก่อนนำมาทำ paraffin section ไม่เหมาะสม ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ Davidson fixative ซึ่งต่างจากผู้อื่น เช่นการทดลองของ Beninger et al. (1993) และ Lanteigne et al. (1996) ใช้น้ำยาคงสภาพชนิด Bouin ทำให้ผลการทดลองที่ได้ชัดเจน จะพบการโค้งพับของท่อภายใน spermatheca มากขึ้น และพบพื้นที่ที่เป็นช่องว่างน้อยลง อาจสัมพันธ์กับขนาดที่เล็กลงของ spermatheca ในระยะที่ 3 และ 4 ได้ และจากการศึกษาเพิ่มเติมสาเหตุที่ไม่พบ sperm ใน spermatheca โดยการฉีดสารสี methylene blue ไปใน gonopore เพื่อดูลักษณะการเชื่อมต่อกันของท่อ spermatheca, oviduct, ovary, vagina และ vulva เพื่อดูการเคลื่อนที่ของ sperm หลังจากที่ถูกทะเลเพศผู้สอด gonopod เข้ามายัง gonopore พบว่าสีที่ฉีดเข้าไปใน gonopore จะไปอยู่รวมที่แ่ง vagina และ vagina และพบว่าท่อ oviduct ติดสีน้ำเงิน คือลักษณะ vagina จะเชื่อมต่อกับ oviduct ที่มีรังไข่ล้อมรอบ ส่วนท่อของ spermatheca ไม่ติดสี มีลักษณะเป็นต่อมและมีท่อ 2 ท่อเปิดแนบขนานไปกับ vagina ทั้งซ้ายและขวาและเปิดเข้าสู่ vagina ก่อนที่ vagina จะเปิดออกสู่ vulva ทางด้านข้างของ vulva ที่เปิดออกสู่ gonopore ทางซ้ายและขวา เท่านั้น .จึงสรุปได้ว่า หลังจากที่ถูกทะเลเพศผู้สอด gonopod เข้าไปยัง gonopore sperm จะถูกปล่อย เข้าไปเก็บยัง vagina และทำการปฏิสนธิกับไข่ ที่หลุดจาก ovary เข้ามาใน oviduct จนถึง vagina จึงน่าจะเป็นเหตุผลที่ว่าเหตุใดจึงไม่พบ sperm ใน spermatheca อย่างไรก็ตามก็ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบข้อมูลที่ชัดเจนเพื่อให้เข้าใจสรีรวิทยาการวิวัฒนาการของปูทะเลชนิดนี้ ดังภาพที่ 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 23 แสดงการเชื่อมต่อของระบบสืบพันธุ์ทะเล *Scylla paramamosain* ประกอบด้วย gonopore, vagina, oviduct, ovary และ spermatheca



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. น้ำยาที่ใช้คงสภาพเนื้อเยื่อก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อมา section จากการทดลองครั้งนี้ใช้ชนิด Davidson solution อาจเปลี่ยนมาลองใช้ Bouin solution แทน ผลที่ได้อาจมีความชัดเจนมากขึ้น
2. ควรมีการศึกษาองค์ประกอบของ granule secretion ในกลุ่มไขมันเพิ่มเติม เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทำการหาองค์ประกอบของไขมัน เพราะจะต้องทำการ frozen section
3. ควรมีการศึกษาในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ และศึกษาถึงองค์ประกอบน้ำเชื้อที่เพศผู้ปล่อยออกมาเวลาจับคู่ผสมพันธุ์ว่ามีองค์ประกอบใดบ้างแล้วนำมาเปรียบเทียบกับระบบสืบพันธุ์เพศเมีย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539. การเลี้ยงปูทะเล (*Scylla serrata* Forskal). แผนกวิชาเทคโนโลยี ประมง ภาควิชาเทคโนโลยีและอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ วิทยาเขตปัตตานี . 127หน้า.
- สุรชาติ จวีร์ภักดี , เจษฎา เจริญวัฒน์ และสินธุ์วัฒน์ สุทธิธำ.2538. การเลี้ยงแม่พันธุ์ปูทะเล ให้มีไข่นอกกระดองในบ่อซีเมนต์ 4 วิธี. เอกสารวิชาการฉบับที่ 15/2538 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . 39 หน้า .
- Arriola, F. J. 1940. A primary study of the life history of *Scylla serrata* (Forsk.). Philipp. J. sci. 73(4): 437-454.
- Beninger, P. G., Elner, R. W., Foyle, T. P. and Odense, P. H. 1988. Function anatomy of the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (*O. fabricius*) and a hypothesis for fertilization. 8(3): 322-332.
- Beninger, P. G., Lanteigne, C. and Elner, R. 1993. Reproductive processes revealed by spermatophore dehiscence experiments and by histology, ultrastructure, and histochemistry of the female reproductive system in the Snow crab *Chionoecetes opilio* (*O. fabricius*). Journal of crustacean biology, 13(1): 1-6.
- Bumin, S., Liu Z. and Li S. 1991. Histological studies on ovarian development in *Scylla serrata*. Journal of Fisheries of China, 15(2): 99-102.
- Du Plessis, A. 1971. A preliminary investigation into the morphological characteristics, feeding, Growth, reproduction and larval rearing of *Scylla serrata* (Forsk.) held in captivity. Fisheries Development Corporation of South Africa.
- Forsk., P. 1755. Description animalium, avium, amphibiorum insectorum vermium quae in itenre orientli obsevavit Petrus Forskal, 1-19-xxxiv-164 pp. Hauniaie
- Greco, L. S., Lopez, G. C., Rodriguez, E. M. 1999. Morphology of spermatheca in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. J. Zool., Lond. 249, 490-493
- Gurriaran, E. G. 1998. Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae). 220: 269-285.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hinsch, G. H. 1988. Ultrastructure of the sperm and spermatophores of the golden crab *Greyon fenneri* and a closely related species, the red crab *G. quinquedens*, from the eastern gulf of Mexico. 8(3): 340-345.
- Jensen, P. C., Orensanz, J. M. and Armstrong, D. A. 1996. Structure of the female reproductive tract in the Dungeness crab (*Cancer magister*) and implications for the mating system. Reference: *Biol. Bull.* , 190:336-349.
- Keenan, C., Clive, P., Peter, J., Davie, F. and Mann, D. L. 1998. A revision of the genus *Scylla* de Haan, 1833 (Crustacean: Decapoda: Brachura: Portunidae) The Raffles Bulletin of Zoology. 46(1):217-245.
- Lanteigne, C., Beninger, P. G. and Gionet, C. 1996. Ontogeny of female primary sexual characters in the majid crabs *Chionoecetes opilio* and *Hyas coarctatus*. Journal of crustacean biology, 16(3): 501-514.
- Lee, T. H. and Yamazaki, F. 1990. Structure and function of a special tissue in the female genital duct of the Chinese Freshwater crab *Eriocheir sinensis*. *Biol. Bull.* 178:94-100.
- Poovachiranon, S. 1991. Biological studies of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) of the mangrove ecosystem in the Andaman Sea. In: C. A. Angell, The mud crab. A report on the seminar convened in Surat Thani, Thailand, November 5 - 8, 1991. Bay of Bengal Programme, Madras, India : pp. 49-58.
- Suzuki, S. and Ziegler, A. 2005. Structural investigation of the female genitalia and sperm-storage sites in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). 34: 441-454.
- Wolcott, D. I., Hopkins, C. W. B., Wolcott, T. G. 2005. Early events in seminal fluid and storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun: Effects of male mating history, male size, and season. 319: 43-55.

ภาคผนวก ก.

สารละลายที่ใช้ในการศึกษา

วิธีเตรียม Davidson solution

วิธีเตรียม Davidson solution

95% alcohol	330 ml.
Acetic acid conc หรือ HCL	115 ml.
Formalin conc	220 ml.
น้ำกลั่น	335 ml.

วิธีเตรียมสี Hematoxylin

การเตรียม Mayer's hematoxylin

Hematoxylin crystals	4.0 g.
Distilled water	2000.0 ml.
Sodium Iodate	0.8 g.
Potassium	100.0 g.
Curic acid	4.0 m
Chloral Hydrate	200.0 g.

ละลาย alum ในน้ำกลั่นแล้วจึงใส่ hematoxylin ลงไปคนให้ละลาย จึงเติม Sodium Iodate ผสมให้เข้ากันเติม Curic acid และ Chloral Hydrate คนให้เข้ากัน เขย่าจนกว่าสารทั้งหมดจะเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ จึงนำมาใช้

วิธีเตรียมสี Eosin

วิธีเตรียมสี Eosin

Eosin Y I 45380	1.0 g.
70% ethyl alcohol	1000.0 ml.
Glacial acid	5.0 ml.
ผสมเข้าด้วยกัน	

วิธีเตรียมสี Millon

วิธีเตรียมสี Millon

Solution A

Mercuric sulfate	10 g.
Distilled water	190 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sulfuric acid conc 10 ml

ละลาย Mercuric sulfate ในน้ำกลั่น 90 ml หลังจากนั้นเติม Sulfuric acid conc ทำให้ละลายเข้าด้วยกันโดยใช้ความร้อน หลังจากละลายหมดแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่น 100 ml ลงไป

Solution B

Sodium nitrite 250 mg

Distilled water 10 ml

เวลาใช้สี Millon นำ Solution A 50 ml + Solution B 5 ml

วิธีเตรียมสี Masson trichrome

วิธีเตรียมสี Masson trichrome

Solution A

Acid fuchsin 0.5 g

Glacial acetic acid 0.5 ml

Distilled water 100 ml

Solution B

Phosphomolybdic acid 1.0 g

Distilled water 100 ml

Solution C

Methyl blue 2.0 g

Glacial acetic acid 2.5 g

Distilled water 100 ml

วิธีเตรียมสี Periodic acid Schiff (PAS)

วิธีเตรียมสี PAS

Periodic acid solution

Periodic acid 0.6 g.

Distilled water 100 ml

Nitric acid conc 0.3 ml

Schiff's reagent

Basic fuchsin 0.5-1 g.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Distilled water	85 ml
Sodium metabisulfite	1.9 g.
Hydrochloric nomal	15 ml
Activated charcoal	200 mg

ผสมสารที่กล่าวมาในขวดที่มีที่ว่างเหนือสารละลายประมาณ 50-60 ml. คอยเขย่าขวดเป็นระยะใช้เวลาอย่างน้อย 2 ชม. หรือทิ้งไว้ค้างคืน แล้วเติม 200 mg ของผงถ่านโดยเขย่าขวดทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นจึงกรอง ถ้าสารละลายไม่เป็นน้ำใสๆ แสดงว่าผงถ่านเก่าเกินไป ควรเปลี่ยนใหม่ แล้วจึงกรองใหม่ หลังจากนั้นควรเก็บสารละลายที่ได้ในขวดที่มีเนื้อที่อากาศเหนือสารละลายน้อยที่สุด และเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อช่วยลดการสูญเสียของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไม่ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีเตรียมสี Ninhydrin-Schiff

วิธีเตรียมสี Ninhydrin-Schiff

Ninhydrin

Ninhydrin 0.5 % ใน absolute alcohol

Schiff's reagent จากการย้อม PAS

วิธีเตรียมสี Alcian Blue

วิธีเตรียมสี Alcian blue

Solution A

3 % Acitic acid จะได้ PH 2.5

0.5% Acitic acid จะได้ PH 3.2

Solution B

Alcian blue

1g.

ละลาย Alcian blue ใน solution A ทั้ง 2 PH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ข้อมูลดิบ

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูลปลูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(cm.)	Ab(cm.)	โคนขา(cm.)	ระยะ	สี/ต.น.sperm.	รูปร่าง/สี oviduct
1	420.00	13.33	6.21	7.7	1	ขาวชุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
2	330.00	12.48	5.18	6.84	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
3	150.00	9.20	3.43	4.51	1	ขาวชุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
4	230.00	10.59	4.53	5.5	1	ขาวชุ่น/ซ้าย	แผ่กว้างมาก/ขาวชุ่น
5	260.00	10.14	4.48	5.76	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
6	275.00	11.66	5.32	6.32	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
7	270.00	11.41	4.86	5.85	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
8	290.00	11.77	5.3	6.3	1	ขาวชุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
9	235.00	11.18	4.13	5.71	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
10	210.00	10.15	4.43	5.32	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
11	232.00	11.26	4.9	5.6	1	ขาวชุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
12	272.00	11.58	4.87	5.9	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวชุ่น
13	280.00	11.29	4.74	5.8	1	ขาวชุ่น/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวชุ่น
14	300.00	11.79	5.12	6.1	1	ขาวชุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
15	250.00	11.04	4.8	5.57	1	ขาวชุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
16	260.00	10.71	4.55	5.58	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวชุ่น
17	270.00	11.58	4.93	5.76	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้างมาก/ขาว
18	220.00	10.89	4.88	5.78	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาว
19	285.00	11.58	5.07	5.71	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวชุ่น
20	360.00	13.00	6.07	6.63	1	ขาวชุ่น/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวชุ่น
21	340.00	12.41	5.19	6.4	1	ขาวชุ่น/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวชุ่น
22	320.00	12.27	5.16	6.48	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้างมาก/ขาวชุ่น
23	273.00	12.84	5.07	5.98	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้าง/ขาว
24	290.00	11.56	5.16	6.1	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(cm.)	Ab(cm.)	โคนขา(cm.)	ระยะ	สี/ต.น.sperm.	รูปร่าง/สี oviduct
25	325.00	11.74	5.18	6.45	1	ขาวขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
26	225.00	10.83	4.7	5.72	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
27	320.00	12.41	5.44	6.16	1	ขาวเหลือง/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
28	354.00	12.55	5.32	6.2	1	ขาวขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
29	255.00	12.54	5.19	6.23	1	ขาวเหลือง/ขาว	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
30	250.00	10.68	4.59	5.64	1	ขาวขุ่น/ขาว	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
31	280.00	11.70	4.97	5.72	1	ขาวขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
32	345.00	12.41	5.57	2.19	1	ขาวขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
33	204.00	10.40	4.5	5.27	1	ขาวเหลือง/ขาว	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
34	362.00	12.58	5.5	6.4	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้างมาก/ขาว
35	330.00	12.31	5.4	6.07	1	ขาวเหลือง/ขาว	แผ่กว้างมาก/ขาว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 2

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(mm.)	Ab(mm.)	โคนขา(mm.)	ระยะ	สี/ต.น.sperm.	รูปร่าง/สี oviduct
1	272.90	11.55	5.29	6.8	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาว
2	319.25	12.44	5.30	6.55	2	ขุ่นเหลือง/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
3	308.25	11.87	5.49	6.83	2	ใสขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
4	260.00	11.36	5.12	5.85	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/เหลืองขุ่น
5	310.00	12.50	5.33	6.17	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
6	350.00	12.41	5.16	6.39	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
7	280.00	11.57	5.17	6.3	2	เหลืองอ่อน/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
8	250.00	11.40	5.1	5.86	2	เหลืองใส/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
9	350.00	12.64	5.41	6.6	2	เหลืองใส/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
10	350.00	12.39	5.23	6.42	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
11	250.00	11.14	5.13	6.03	2	เหลืองอ่อน/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
12	240.00	10.85	4.86	5.56	2	เหลืองใส/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
13	280.00	11.34	5.16	6.00	2	เหลืองขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
14	275.00	11.24	5.03	5.91	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
15	275.00	11.24	5.58	6.47	2	เหลืองใส/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
16	225.00	11.16	4.8	5.74	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
17	280.00	11.44	4.83	6.12	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาว
18	431.90	14.13	5.85	6.69	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาว
19	283.00	11.98	5.13	6.14	2	เหลืองใส/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
20	440.00	12.25	5.98	6.79	2	เหลืองขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
21	338.88	11.47	5.38	6.32	2	เหลืองขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
22	230.00	11.56	5.59	2.54	2	เหลืองใส/ขาว	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
23	465.00	13.96	5.87	6.72	2	เหลืองใส/ซ้าย	แผ่กว้าง/เหลืองขุ่น
24	240.00	11.01	4.67	5.38	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/เหลืองขุ่น
25	275.00	11.42	4.9	5.7	2	เหลืองขุ่น/ขาว	แผ่กว้าง/ขาว
26	340.00	12.48	5.4	6.39	2	เหลืองใส/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
27	360.00	12.23	5.21	6.26	2	เหลืองขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(mm.)	Ab(mm.)	โคนขา(mm.)	ระยะ	เหลืองชุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
28	304.00	11.65	4.97	6.04	2	เหลืองใส/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวชุ่น
29	200.00	10.48	4.55	5.34	2	เหลืองชุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 3

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(mm.)	Ab(mm.)	โคนขา(mm.)	ระยะ	สี/ต.น.sperm.	รูปร่าง/สี oviduct
1	428.30	12.91	5.29	6.72	3	ขาวขุ่น/	แคบ/ใส
2	430.65	12.94	5.38	6.83	3	เหลืองขุ่น/	แคบบาง/ขาวขุ่น
3	279.70	11.20	4.81	5.76	3	เหลืองขุ่น	แคบ/ขาวใส
4	235.00	10.65	4.53	5.52	3	เหลืองใส	แคบ/ขาวใส
5	524.40	13.16	6.32	7.4	3	เหลืองใส	แคบบาง/ขาวขุ่น
6	270.00	11.61	5.01	5.8	3	เหลืองอ่อน	แคบ/ขาวขุ่น
7	410.00	13.3	5.73	6.75	3	เหลืองอ่อน	แคบบาง/ขาวใส
8	280.00	11.84	4.85	5.77	3	เหลืองใส	แคบบาง/ขาวใส
9	360.00	10.99	5.34	6.35	3	เหลืองใส	แคบ/ขาวขุ่น
10	405.00	11.04	5.53	6.44	3	เหลืองขุ่น	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
11	370.00	12.58	5.26	6.42	3	เหลืองขุ่น	แผ่กว้าง/ใส
12	240.00	10.94	4.84	5.53	3	เหลืองขุ่น	แคบ/ขาวใส
13	250.00	11.03	4.7	5.6	3	เหลืองใส	แคบ/ขาวใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 4

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(mm.)	Ab(mm.)	โคนขา(mm.)	ระยะ	สี/ต.น.sperm.	รูปร่าง/สี oviduct
1	320.00	11.32	5.2	6.2	4	ขาวขุ่น/ขาว	แคบบาง/ขาวใส
2	485.00	13.60	6.14	7	4	เหลืองขุ่น/ซีด	แคบบาง/เหลืองใส
3	420.00	12.64	5.69	6.61	4	ขาวขุ่น/ซีด	แคบบาง/เหลืองใส
4	240.00	11.32	4.9	5.92	4	ขาวขุ่น/ขาว	แคบบาง/ส้มใส
5	270.00	11.54	5.13	6.03	4	ขาวขุ่น/ขาว	แคบบาง/ส้มใส
6	320.00	10.49	5.06	6.33	4	เหลืองขุ่น/ขาว	แคบบาง/ส้มใส
7	300.00	12.09	5.01	5.83	4	ขาวขุ่น/ขาว	แคบบาง/เหลืองใส
8	260.00	12.63	4.78	5.63	4	เหลืองขุ่น/ขาว	แคบบาง/ขาวใส
9	270.00	11.16	4.77	5.66	4	เหลืองขุ่น/ขาว	แคบบาง/ส้มใส
10	300.00	10.73	5.02	5.88	4	เหลืองขุ่น/ขาว	แคบบาง/ขาวใส
11	228.00	10.12	4.44	5.22	4	ขาวขุ่น/ซีด	แคบบาง/ขาวใส
12	300.00	11.56	5.17	6.25	4	ขาวขุ่น/ขาว	แคบบาง/ส้มใส
13	370.00	12.27	5.22	6.19	4	ขาวขุ่น/ขาว	แคบบาง/ส้มใส
14	240.00	10.88	4.7	5.4	4	เหลืองขุ่น/ขาว	แคบบาง/ส้มใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้