

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณปี 2550

การจัดการเพาะเลี้ยงปูทะเลอย่างยั่งยืน: ตัวชี้วัดในการจำแนกระยะ
การเจริญของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*) เพื่อการเพาะฟัก

Sustainable mud crab aquaculture management: Indicators of
classification of ovarian developmental stages in mud crab (*Scylla spp.*)
for hatcheries

นางสาวอัญญา เจริญพรนิพัทธ์
นายสมชาย หวังวิบูลย์กิจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณปี 2550

การจัดการเพาะเลี้ยงปูทะเลอย่างยั่งยืน: ตัวชี้วัดในการจำแนกระยะการเจริญ
ของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*) เพื่อการเพาะฟัก

Sustainable mud crab aquaculture management: Indicators of classification of
ovarian developmental stages in mud crab (*Scylla spp.*) for hatcheries



นางสาวอนัญญา เจริญพรนิพัทธ์

นายสมชาย หวังวิบูลย์กิจ

11992967

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

แนวทางการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปูทะเลสู่อุตสาหกรรม : การจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*) เพื่อการจัดการเพาะฟักปูทะเล

เนื่องจากปริมาณปูทะเลในธรรมชาติที่มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงมีการให้ความสำคัญในการจัดการแม่พันธุ์ปูทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของแม่พันธุ์ปูทะเล การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้โดยนำปูทะเลเพศเมีย *Scylla olivacea* และ *Scylla paramamosian* จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ตรัง สตูล นครศรีธรรมราช ชุมพร มาศึกษาลักษณะของรังไข่ที่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ คำนวณค่า GSI และ FMI จากนั้นเก็บเลือดปูทะเล สังเกตสี และ วัดค่าการหักเหแสงของเลือด โดยใช้ Salinometer แล้วหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford technique และนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโดย PAGE และ SDS-PAGE technique เพื่อยืนยันความเหมาะสมของดัชนีที่วัดที่จะใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเลเพศเมีย จากการศึกษาหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมีย (*Scylla paramamosian*) ตามระยะการเจริญของรังไข่ที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 40.50 ± 12.86 mg/ml, 101.32 ± 6.57 mg/ml, 129.24 ± 3.54 mg/ml และ 166.26 ± 5.55 mg/ml ตามลำดับ และ ปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมีย *Scylla olivacea* ตามระยะการเจริญของรังไข่ที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 32.97 ± 7.08 mg/ml, 99.65 ± 5.81 mg/ml, 134.42 ± 10.83 mg/ml และ 172.27 ± 4.34 mg/ml ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนพบว่าแถบของโปรตีนในแต่ละระยะมีความแตกต่างกันซึ่งความเข้มของบางแถบจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะการเจริญของรังไข่เพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดจะพบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย ซึ่งค่าหักเหแสงของเลือดและสีของเลือดมีความสัมพันธ์กับปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดตามระยะการเจริญของรังไข่ ดังนั้นค่าหักเหแสงของเลือดและสีของเลือดเป็นดัชนีที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย เนื่องจากเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปูทะเลสามารถนำไปใช้ในการจัดการแม่พันธุ์ปูทะเลได้ แต่ในการใช้สีเลือดเกษตรกรต้องมีความชำนาญมากพอในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คาดว่าน่าจะเป็นประโยชน์ในการจัดการด้านโภชนาการสำหรับแม่พันธุ์ปูทะเล และการจัดการแม่พันธุ์เพื่อการเพาะฟักในฟาร์มเพาะฟักปูทะเลแบบครบวงจรหากได้มีการศึกษาถึงปริมาณองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดปูทะเลที่รังไข่เจริญในระยะต่างๆ เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ให้มากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Classification of ovarian developmental stages in mud crab (*Scylla* spp.) for sustainable aquaculture management

Though mud crab aquaculture has been practiced in Thailand for decades, but it never become as successful as shrimp farming. There are many factors that hindering the progress. Despite attempts of researchers in this field, but the progress is still slow. Inadequate seed supply is a major constraint for further development of mud crab farming. A major bottleneck to expansion of mud crab (*Scylla* spp.) aquaculture is a lack of hatchery produced seed. Since brood stock and seed are commonly recruited from the wild. This is one of the factors among many others such as over-exploitation, environmental pollution and mangrove destruction have led to the declining wild populations. This study was conducted by taking mud crab ; *Scylla olivacea* and *S.paramamosain* from several sources i.e Trang , Satun, Nakhon Si Thammarat and Chumphon to assess stages of ovarian development in the two species of mud crab (*Scylla* spp) by the determination of refractive index of heamolymph. The results were confirmed by the determination of protein content and protein component during ovarian maturation. Vitellogenesis in crab which found that vitellogenin (female specific protein) in heamolymph increase during ovarian maturation. The results found that protein content in heamolymph of *Scylla paramamosian* during ovarian maturation stages 1st,2nd,3rd and 4th are 40.50 ± 12.86 mg/ml, 101.32 ± 6.57 mg/ml , 129.24 ± 3.54 mg/ml และ 166.26 ± 5.55 mg/ml consequently, protein content in heamolymph of *Scylla olivacea* during ovarian maturation stages 1st,2nd,3rd and 4th are 32.97 ± 7.08 mg/ml , 99.65 ± 5.81 mg/ml , 134.42 ± 10.83 mg/ml และ 172.27 ± 4.34 mg/ml consequently. The suitability of this technique will be compare to other indicators. Ability to differentiate stages of ovarian maturation were of great help to brood stock management for the commercial mud crab aquaculture and also help to reduce problem of natural population decline.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญรูป	6
บทที่ 1 บทนำ	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	13
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	16
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	24
เอกสารอ้างอิง	27



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าดูดกลืนแสงของเลือดในปูทะเล <i>S. paramamosian</i> และ <i>S. olivacea</i>	17
ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล <i>Scylla spp.</i>	19
ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพ กับ ระยะเวลาเจริญของรังไข่ของปูทะเลเทศเมีย (<i>Scylla olivacea</i>)	22
ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพ กับ ระยะเวลาเจริญของรังไข่ของปูทะเลเทศเมีย (<i>Scylla paramamosian</i>)	23



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 สีของเลือดตามระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล <i>Scylla spp.</i>	17
ภาพที่ 2 standard curve ของ BSA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล (<i>S. paramamosian</i>)	18
ภาพที่ 3 standard curve ของ BSA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล (<i>S. olivacea</i>)	18
ภาพที่ 4 ลักษณะของแถบ (band) ที่ได้จากการ run electrophoresis โดย PAGE ของเลือดของปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla spp.</i>	20
ภาพที่ 5 ลักษณะของแถบ (band) ที่ได้จากการ run electrophoresis โดย SDS - PAGE ของเลือดของปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla spp.</i>	21



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

การเพาะเลี้ยงปูทะเลในปัจจุบัน กำลังประสบปัญหาการขาดแคลนลูกพันธุ์ ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ทั้งนี้เนื่องจากเกษตรกรยังคงรวบรวมลูกพันธุ์จากธรรมชาติ ยังไม่สามารถเพาะพันธุ์ปูทะเลเชิงพาณิชย์ได้ แม้ว่ากรมประมงจะสามารถเพาะฟักลูกปูทะเลได้บ้างแล้วก็ตาม แต่แม่ปูส่วนใหญ่ที่นำมาเพาะฟักได้มาจากการรวบรวมจากธรรมชาติทั้งสิ้น ทำให้ผู้ประกอบการเพาะปูทะเลประสบปัญหาการขาดแคลนแม่พันธุ์ปูทะเลในบางฤดูกาลเป็นผลให้การผลิตลูกปูไม่สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี และแม่ปูที่รวบรวมมาได้ส่วนใหญ่ยังไม่สามารถจำแนกได้แน่ชัดว่าการเจริญของรังไข่อยู่ในระยะใด หากสามารถจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ ก็จะสามารถจัดการปริมาณและเวลาที่แน่นอนในการผลิตลูกพันธุ์ในระดับฟาร์มได้ตลอดทั้งปี ซึ่งก่อนหน้านี้ พีรพงษ์ (2541) ได้ติดตามการเจริญพันธุ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปูทะเลในรอบปีแต่ในการศึกษาต้องทำการเปิดกระดองปูเพื่อศึกษาลักษณะภายในโดยใช้วิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา ดังนั้นการติดตามการเจริญพันธุ์ของปูทะเลโดยเปรียบเทียบระดับไวเทลโลเจนนินในเลือดของปูทะเลที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ โดยใช้ monoclonal antibody ที่ผลิตต่อไวเทลลินของปูทะเล จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่า เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้สามารถติดตาม การเจริญพันธุ์ของปูทะเลโดยไม่ต้องเปิดกระดอง การใช้วิธีการดังกล่าวน่าจะติดตามการเจริญพันธุ์ของปูทะเลเพศเมียได้ดีกว่าการสังเกตสีและขนาดของรังไข่ และยังทำให้สามารถรู้ว่าปูทะเลเจริญพันธุ์ถึงระยะใด เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการจัดการเพาะเลี้ยง เช่น การให้อาหารปูทะเลในแต่ละระยะการเจริญพันธุ์ เพื่อให้ได้แม่พันธุ์ปูทะเลที่มีคุณภาพ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวยังยุ่งยากสำหรับเกษตรกรอยู่ ดังนั้นอภิรดี ทิพย์เที่ยงแท้ (2548) ได้การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ค่าหักเหแสงของเลือดเพื่อจำแนกการเจริญของรังไข่ปูทะเล (*Scylla olivacea*) ซึ่งผลการศึกษาทำให้ทราบแนวโน้มของค่าเฉลี่ยของเลือดปูทะเลพอจะแยกระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเลได้ แต่ยัง ใช้จำนวนตัวปูทะเลที่น้อยทำให้ค่าที่ได้ยังไม่น่าเชื่อถือเท่าที่ควร ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ มุ่งเน้นที่จะศึกษาตัวชี้วัดที่ใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล และระยะเวลาที่แน่นอนของการพัฒนารังไข่ของปูทะเลแต่ละระยะ การที่สามารถทราบความสมบูรณ์เพศโดยเฉพาะอย่างยิ่งทราบระยะต่างๆของรังไข่ของปูทะเลโดยการเจาะเลือดมาทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่าการดูดกลืนแสงของเลือดที่เปลี่ยนไปตามการพัฒนาของรังไข่ระยะต่างๆก่อนปล่อยไข่ออกนอกระดอง เพื่อพัฒนาไปเป็น test kit เพื่อใช้คัดแยกแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟักต่อไป ทำให้สามารถนำไปวางแผนจัดการการเพาะฟักลูกปูทะเลในโรงเพาะฟักได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวางแผนจัดการการเพาะเลี้ยงปูทะเลในเชิงพาณิชย์ เพื่อพัฒนาการผลิตปู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทะเลให้มีปริมาณเพียงพอของความต้องการของตลาดในประเทศและเพื่อเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญนำไปสู่การพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศต่อไป อีกทั้งยังช่วยลดการจับปลูจากธรรมชาติ เพื่อประโยชน์ในการจัดการพันธุ์ปลูทะเลในธรรมชาติให้คงอยู่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาค่าหักเหแสงและค่าการดูดกลืนแสงการของเลือดปลูทะเลในช่วงการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่างๆ
- 2) เพื่อศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดปลูทะเลในช่วงการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่างๆ
- 3) เพื่อศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลูทะเล (Female Maturity Index: FMI) และ ดัชนีการเจริญของรังไข่ (Gonad Somatic Index) ของปลูทะเล
- 4) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลูทะเล, ดัชนีการเจริญของรังไข่, ค่าหักเหแสงของเลือดปลูในแต่ละช่วงการเจริญของรังไข่และระดับไคเทอลโลเจนนในเลือดปลูในช่วงการเจริญระยะต่างๆของรังไข่
- 5) เพื่อศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนารังไข่ของปลูทะเลแต่ละระยะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

ปูทะเล นับเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งคุณภาพของปูที่ได้เป็นที่นิยมบริโภคทั้งในและต่างประเทศ สามารถที่จะส่งออกเป็นสินค้าไปขายต่างประเทศได้ โดยปูทะเลจัดเป็นปูขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มครอบครัวปู (Family Portunidae) พบกระจายทั่วไปตั้งแต่เขตร้อนและเขตอบอุ่น ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำกร่อยที่การอพยพย้ายถิ่นเพื่อการแพร่พันธุ์ ซึ่งปูเพศเมียจะย้ายถิ่นจากแหล่งหากินบริเวณชายฝั่ง ออกไปวางไข่ในทะเล (Heasman, 1980) สำหรับประเทศไทยพบปูทะเลอาศัยชุกชุมตามบริเวณป่าชายเลนและบริเวณปากแม่น้ำ ทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน โดยผลผลิตปูทะเลที่นำมาบริโภคนั้น ต้องอาศัยการจับจากธรรมชาติเกือบทั้งสิ้น (สมบัติ, 2530)

ปูทะเลเพศเมียที่ถูกจับคู่และพร้อมจะรับการสืบพันธุ์นี้สังเกตได้จากลักษณะและขนาดของส่วนท้อง (abdomen) หรือที่เรียกว่าจับปิ้ง (ชูชาติ, 2531 อ้างโดยสุรชาติและคณะ, 2538) ได้แบ่งชั้นของปูทะเลเพศเมียชั้นที่ 1 จะมีลักษณะของจับปิ้งเป็นรูปสามเหลี่ยม ส่วนปูทะเลเพศเมียชั้นที่ 2 จับปิ้งจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและส่วนขอบของจับปิ้งจะมีลักษณะโค้งออก และปูทะเลเพศเมียชั้นที่ 3 ขอบของจับปิ้งจะมีลักษณะโค้งออกคล้ายวงกลม (สุรชาติ และคณะ, 2538) สำหรับการเจริญของรังไข่นั้น Quinn และ Kojis (1987) ได้แบ่งการเจริญของรังไข่ตามสีและขนาดได้เป็น 5 ระยะดังนี้

- ชั้นที่ 1 รังไข่จะมีขนาดเล็กเป็นเส้นบางใส
- ชั้นที่ 2 รังไข่จะมีขนาดเล็ก สีขาวขุ่น หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีแทน
- ชั้นที่ 3 รังไข่ขยายขนาด มีรอยหยักและจะมีสีเหลืองอ่อน
- ชั้นที่ 4 รังไข่ขยายขนาดมากขึ้นมีรอยหยักเพิ่ม มีสีเหลืองส้ม
- ชั้นที่ 5 รังไข่เจริญเต็มที่ ขยายขนาดเกือบเต็มกระดอง สีส้มหรือส้มแดง

ในขณะที่ สมบัติ(2530) และ Shanmugam and Bensam (1980) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างของส่วนท้องหรือจับปิ้งของปูทะเลเพศผู้และเพศเมีย พบว่าใช้สัดส่วนระหว่างส่วนกว้างที่สุดของจับปิ้งปล้องที่ 5 ตามความกว้างระหว่างฐานคู่ที่ 5 เป็นดัชนีบ่งบอกความสมบูรณ์เพศของปูทะเลเพศเมียได้ สังเกตจากลักษณะภายในของรังไข่ (internal morphology) สามารถแบ่งการเจริญของรังไข่ตามสี ขนาด และลักษณะของรังไข่ได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้

- ชั้นที่ 1 รังไข่ที่ปรากฏเห็นยังไม่ชัดเจน ลักษณะรังไข่เป็นเส้นบางใสมากขนาดเล็กยังเจริญไม่ดี โดยที่รังไข่จะเป็นเส้นทอดตัวอยู่บนส่วนของอวัยวะน้ำย่อยสร้างน้ำย่อย (digestive gland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่ 2 สภาพรังไข่เริ่มปรากฏเห็นเป็นท่อน ลักษณะมีรอยหยัก สีครีมถึงสีเหลืองอ่อน อยู่บน ส่วนของอวัยวะที่สร้างน้ำย่อย (digestive gland)

ขั้นที่ 3 สภาพรังไข่ขนาดใหญ่สีเหลือง ปกคลุมประมาณ 1/3 – 3/4 ส่วนของอวัยวะสร้างน้ำย่อย

ขั้นที่ 4 สภาพรังไข่มีขนาดใหญ่เต็มที่ มีสีส้มแดง ปกคลุมส่วนของอวัยวะสร้างน้ำย่อย การเจริญของไข่ (oocyte development) แบ่งออกเป็น 2 ระยะใหญ่ ๆ (Harrison และ Humes, 1992) ได้แก่

1.) ระยะ Previtellogenesis เป็นระยะที่มีการสะสมโมเลกุลหลายชนิดในเซลล์ไข่เกิดกิจกรรมหลายอย่างของออร์แกเนลในไซโตพลาสซึม อัตราการสร้างไรโบโซม และ rough Endoplasmic Reticulum (RER) สูงมาก

2.) Vitellogenesis เป็นระยะที่มีการสร้างและสะสมไข่แดง (yolk) และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าใน decapods บางชนิด มีการเคลื่อนที่ของสารภายในนิวเคลียสออกสู่ไซโตพลาสซึม ซึ่งปรากฏการณ์นี้อาจจะเป็นการส่งผ่าน RNA หรือ mRNA จากนิวเคลียสสู่ไซโตพลาสซึม และยังมีลักษณะบางอย่างที่สามารถนำมาใช้บ่งบอกว่าไข่อยู่ในระยะที่มีการสร้างและสะสมไข่แดง (Vitellogenic oocyte) เช่น microvilli ที่ยื่นออกมาจากเซลล์ไข่จำนวนมาก

กระบวนการสร้างและสะสมไข่แดง หรือไวเทลโลเจเนซิส (vitellogenesis) เป็นกระบวนการที่สำคัญซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเจริญของไข่ (oocyte) ในสัตว์กลุ่มครัสตาเซียที่มีไขชนิดที่มีไข่แดงสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์จำนวนมาก (polylecithal egg) ไข่แดงประกอบด้วยน้ำ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารอาหารอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเอ็มบริโอ ส่วนประกอบของไข่แดงจะแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิดโปรตีนหลักที่สะสมในระหว่างกระบวนการสะสมไข่แดงของไข่ที่กำลังเจริญ คือ ไวเทลลิน (vitellin) หรือไลโปไวเทลลิน (lipovitellin) ไวเทลลินเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) จำนวนตั้งแต่ 2-11 หน่วยย่อย ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 40-200 กิโลดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของครัสตาเซีย (Eastman-Reks and Fingerman, 1985) จากรายงานการศึกษาในครัสตาเซียขณะที่รังไข่มีการเจริญจะตรวจพบโปรตีนในเลือดซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไวเทลลิน เรียกว่า ไวเทลโลเจนิน (vitellogenin) โดยจะพบเฉพาะในเลือดของเพศเมีย (female specific protein) ที่รังไข่กำลังมีการเจริญเท่านั้น ไม่พบในเพศผู้และเพศเมียที่รังไข่ยังไม่มีการเจริญ (Kerr, 1969; Tom, Goren and Ovadia, 1987) และจากการศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของครัสตาเซียพบว่า มีทั้งชนิดที่สร้างภายในรังไข่เองและ/หรือสร้างจากแหล่งอื่นนอกรังไข่ (heterosynthetic vitellogenesis) เช่น ตับ-ตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง (subepidermal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

adipose tissue) จะมีการสร้างออกมาในรูปของไวเทลโลเจนิน หลังจากนั้นปล่อยออกสู่กระแสเลือดและถูกนำเข้าสู่ผสมในรังไข่ที่กำลังมีการเจริญในรูปของไวเทลลินหรือไลโปไวเทลลิน (Kerr, 1969) ในขณะที่ Derelle *at al.* (1988) สามารถแยก lipoprotein ในเลือดของปู *Callinectes sapidus* ได้ เป็น 2 รูปแบบคือ lipoprotein I และ II ซึ่ง lipoprotein II พบเฉพาะในปูเพศเมียและประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อยได้แก่ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 109, 107 และ 78 กิโลดาลตัน จากนั้นวัดปริมาณ lipoprotein II หลังจากแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว ด้วยวิธีของ Lowry (Lowry's method) พบว่าปริมาณ lipoprotein II ของการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 1-8 เป็นดังนี้ ระยะที่ 1 และ 8 เท่ากับ 0 mg/ml ระยะที่ 2 เท่ากับ 0.1 ± 0.1 mg/ml ระยะที่ 3 เท่ากับ 0.2 ± 0.1 mg/ml ระยะที่ 4 เท่ากับ 0.3 ± 0.2 mg/ml ระยะที่ 5 เท่ากับ 1.1 ± 0.8 mg/ml ระยะที่ 6 เท่ากับ 4.1 ± 2.1 mg/ml ระยะที่ 7 เท่ากับ 0.2 ± 0.1 mg/ml Lee และ Watson (1994) ได้นำไวเทลลินที่สกัดได้จากรังไข่ของปู *Callinectes sapidus* ไปผลิตแอนติบอดีต่อไวเทลลินเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดปูเพศเมียโดยวิธี ELISA ได้ช่วงกราฟ standard vitellin ที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 62.5-1,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหาค่าความไวในการตรวจวัดได้ในปริมาณ 148 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมาในปี ค.ศ.1996 Lee และคณะได้นำวิธี ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นในปี 1994 มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของรังไข่กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดของปู *Callinectes sapidus* พบว่าการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 1 และ 2 ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณไวเทลโลเจนินได้ แต่เริ่มวัดได้ในระยะที่ 3-6 (0.02 ± 0.07 ถึง 0.14 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งปริมาณไวเทลโลเจนินที่ตรวจวัดได้มีปริมาณต่ำกว่าค่าไวเทลโลเจนินที่ตรวจวัดได้ในครัสตาเซียนชนิดอื่น ๆ ที่มีการรายงานผลมาก่อนหน้านี้ โดยผู้ทำการศึกษาอธิบายว่าปูชนิดนี้ไวเทลโลเจนินถูกสร้างภายในรังไข่ ไวเทลโลเจนินที่ตรวจวัดได้ในเลือดในปริมาณต่ำ และมีปริมาณเพิ่มสูงสุดหลังจากการวางไข่เป็นผลมาจากไวเทลโลเจนินในรังไข่ถูกปล่อยออกมาในเลือด และจากการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ซึ่งใช้แอนติบอดีต่อไวเทลลินเพื่อระบุแหล่งที่สร้างและสะสมไวเทลลิน และ/หรือไวเทลโลเจนิน ทำให้ทราบว่ารังไข่ที่มีการเจริญอยู่ในระยะที่ 1 และ 2 ไม่มีไวเทลลินสะสมอยู่แต่จะพบว่ามีไวเทลลินสะสมอยู่ในรังไข่ที่เจริญอยู่ในระยะที่ 3-6 และไม่พบปฏิกิริยาทางอิมมูโนในส่วนของเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อน ซึ่งแสดงว่าภายในเนื้อเยื่อตับ-ตับอ่อนไม่มีการสร้างและสะสมไวเทลโลเจนิน ฟิรพงษ์ (2541) ได้ติดตามการเจริญพันธุ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปูทะเลในรอบปีแต่ในการศึกษาต้องทำการเปิดกระดองปูเพื่อศึกษาลักษณะภายในโดยใช้วิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา ดังนั้นการติดตามการเจริญพันธุ์ของปูทะเลโดยเปรียบเทียบระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของปูทะเลที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ โดยใช้ monoclonal antibody ที่ผลิตต่อไวเทลลินของปูทะเล จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่า เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้สามารถติดตาม การเจริญพันธุ์ของปูทะเลโดยไม่ต้องเปิดกระดอง กวกรใช้วิธีการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าวน่าจะติดตามการเจริญพันธุ์ของปูทะเลเพศเมียได้ดีกว่าการสังเกตสีและขนาดของรังไข่ และยังทำให้สามารถรู้ว่าปูทะเลเจริญพันธุ์ถึงระยะใด เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการจัดการเพาะเลี้ยง เช่น การให้อาหารปูทะเลในแต่ละระยะการเจริญพันธุ์ เพื่อให้ได้แม่พันธุ์ปูทะเลที่มีคุณภาพ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวยังยุ่งยากสำหรับเกษตรกรและไม่สะดวกในการใช้งาน ล่าสุด อภिरดี ทิพย์เที่ยงแท้ (2548) ได้การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ค่าหักเหแสงของเลือดเพื่อจำแนกการเจริญของรังไข่ปูทะเล (*Scylla olivacea*) ซึ่งผลการศึกษาทำให้ทราบแนวโน้มของค่าเฉลี่ยของเลือดปูทะเลพอจะแยกระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเลได้ แต่ยังไม่ชัดเจนว่าจำนวนตัวปูทะเลที่น้อยทำให้ค่าที่ได้ยังไม่น่าเชื่อถือเท่าที่ควร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็น

3.1 เพื่อศึกษาค่าหักเหแสงปฐะเลในช่วงการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่างๆ

- 1) สุ่มตัวอย่างปฐะเลเพศเมียชนิด *Scylla olivacea* และ *Scylla paramamosain* จากพ่อค้าคนกลางของฝั่งอันดามันในจังหวัดสตูล ตรัง กระบี่ และฝั่งอ่าวไทยในจังหวัด นครศรีธรรมราช และ ชุมพร มาแหล่งละ 60 ตัว ทำการคัดเลือกปฐะเลที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 แล้วเก็บเลือดในหลอดเลือดที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวัดค่าหักเหแสงของเลือดในแต่ละระยะของการพัฒนารังไข่ด้วยเครื่อง salinometer บันทึกค่าการหักเหแสงของเลือดปฐะเลที่รังไข่เจริญในระยะต่างๆ

3.2 ศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดปฐะเลในช่วงการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่างๆ

- 1) วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Total protein content) ในเลือดปฐะเลโดยใช้ Bradford technique (Bradford,1976)
- 2) ใช้ Bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml เพื่อทำ standard curve
- 3) วัดค่าดูดกลืนแสง (Optical density , OD) ที่มีความยาวคลื่น 595 nm
- 4) นำค่าดูดกลืนแสงในเลือดของปฐะเลที่วัดได้มาเทียบกับ standard curve เพื่อหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเลือดที่ทำการทดลอง คำนวณหา Total protein content ในเลือดตัวอย่างหน่วยเป็น mg/ml

3.2.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในเลือด

- 1) ใช้เทคนิค Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และ Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)
- 2) ภายหลังการ run electrophoresis และย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 และ Destain เพื่อล้างสีในเจลส่วนที่ไม่มีโปรตีนออกแล้ว นำแผ่นเจลมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงแถบโปรตีนที่เกิดในเลือดที่มีรังไข่ระยะต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศของปูทะเล (Female Maturity Index: FMI) และ ดัชนีการเจริญเติบโตของรังไข่ (Gonad Somatic Index) ของปูทะเล โดย

1) สุ่มตัวอย่างปูทะเลเพศเมียที่รังไข่พัฒนาครบ 4 ระยะ โดยแบ่งการพัฒนาของรังไข่ ออกเป็น 4 ระยะตามวิธีของ Shanmugam and Bensam (1980) จากพ่อค้าคนกลางใน จังหวัดสตูล ตรัง กระบี่ นครศรีธรรมราช และ ชุมพร มาแหล่งละ 80 ตัว ซึ่งน้ำหนักตัว และ วัดขนาดความกระดอง(carapace width) ของปูทะเล วัดส่วนที่กว้างที่สุดของจับปิ้งปล้องที่ 5 กับความกว้างของฐานจับปิ้งระหว่างขาเดินคู่ที่ 5

$$FMI = \frac{\text{ที่กว้างที่สุดของจับปิ้งปล้องที่ 5}}{\text{ความกว้างของฐานจับปิ้งระหว่างขาเดินคู่ที่ 5}}$$

2) สุ่มตัวอย่างปูทะเลเพศเมียที่รังไข่พัฒนาครบ 4 ระยะ จากแต่ละแหล่งแล้วจำแนกการ พัฒนาการของรังไข่ตามวิธีของ Shanmugam and Bensam (1980) นำมาชั่งน้ำหนักด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้า บันทึกผลเพื่อนำค่าไปคำนวณหาค่าดัชนีการเจริญเติบโตของรังไข่ (Gonad Somatic Index)

$$\text{Gonad Somatic Index ของปูทะเล} = \left(\frac{\text{น้ำหนักรังไข่ของปูทะเล}}{\text{น้ำหนักตัวของปูทะเล}} \right) \times 100$$

3.4 เพื่อศึกษาหาระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนารังไข่ของปูทะเลแต่ละระยะ

- 1) สุ่มตัวอย่างปูทะเล(ดำ) *Scylla olivacea* จากระยะที่1 ถึงระยะที่4 มาระยะละ 5 ตัว รวม ทั้งหมด 20 ตัว คัดเลือกแม่ปูแต่ละระยะการพัฒนาของรังไข่โดยใช้ผลจากค่าดูดกลิ่นแสง ของเลือดและดัชนีความสมบูรณ์เพศในข้อ 12.1 ลงเลี้ยงถึงละ 1 ตัว ที่ระดับความเค็ม 30 ppt
- 2) สุ่มตัวอย่างปูทะเล(ขาว) *Scylla paramamosain* ระยะที่1 ถึงระยะที่4 มาระยะละ 5 ตัว รวมทั้งหมด 20 ตัว คัดเลือกแม่ปูแต่ละระยะการพัฒนาของรังไข่โดยใช้ผลจากสีเลือดและ ดัชนีความสมบูรณ์เพศในข้อ 12.1 ลงเลี้ยงถึงละ 1 ตัว ที่ระดับความเค็ม 30 ppt
- 3) บันทึกระยะเวลาที่แม่ปูใช้ในการพัฒนารังไข่จากระยะที่ 1 ไปยังระยะที่ 2 ไปจนถึงระยะที่ไข่ พัฒนาเต็มที่พร้อมปล่อยไข่ออกนอกกระดองของปูทะเลทั้งสองชนิด ซึ่งทำให้สามารถ นำไปใช้จัดการในเพาะฟักลูกปูทะเลในโรงเพาะฟักได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการจัดการการเพาะฟักปูทะเลในเชิงพาณิชย์

3.5 วิเคราะห์ผล และเขียนรายงานวิจัย

3.6 สถานที่ทำการทดลอง และหรือเก็บข้อมูล

- 1) ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กทม.
- 2) สถานที่ทำการศึกษาระยะวิจัยภาคสนามโดยเก็บตัวอย่างปูทะเลจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จังหวัดชายฝั่งอันดามัน ได้แก่ จังหวัดสตูล ตรัง กระบี่
จังหวัดฝั่งอ่าวไทย ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช และชุมพร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพที่ใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*)

จากการศึกษาระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเล (*Scylla spp.*) ที่จับจากธรรมชาติโดยทำการทดลองผ่านปูทะเลเพศเมียเพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วย สี , GSI (Gonad somatic index) , FMI (Female maturity index) , ค่าหักเหแสง และ ค่าดูดกลืนแสง ของเลือดปูทะเลเพศเมีย สีของเลือดปูทะเล (*Scylla spp.*) จากการทดลองพบว่าสีของเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะการเจริญของรังไข่ซึ่งในระยะที่ 1 เลือดจะมีสีน้ำเงินเทาๆ เนื่องมาจากว่าในเลือดของปูทะเลจะประกอบไปด้วย hemocyanin ซึ่งจะพบในปริมาณมากกว่าในระยะอื่นๆ และ vitellogenin ในเลือดมีปริมาณต่ำในขณะที่รังไข่เจริญอยู่ในระยะนี้จึงทำให้สีของเลือดในระยะที่ 1 จะมีสีน้ำเงินของ hemocyanin ปรากฏอยู่มากซึ่งสอดคล้องกับ Lee and Chang (1997) กล่าวว่า ไวเทลโลเจนินในเลือดของ *M. rosenbergii* มีปริมาณต่ำในขณะที่รังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1 ($0.05 \pm 0.01 \text{ mg/ml}$) และระยะที่ 2 ($1.19 \pm 0.16 \text{ mg/ml}$) จากนั้นระดับของไวเทลโลเจนินจะเพิ่มสูงขึ้นในระยะที่ 3 (2.89 ± 0.32) และยังคงมีปริมาณสูงในระยะที่ 4 ($2.67 \pm 0.31 \text{ mg/ml}$) หลังจากนั้นพบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินลดลงจนเกือบจะตรวจวัดไม่ได้เมื่อใกล้ถึงเวลาที่กึ่งวางไข่ และสีเลือดของปูทะเลในระยะที่ 2 จะมีสีน้ำเงินแกมส้ม เนื่องจากในระยะที่ 2 มีปริมาณของไวเทลโลเจนินเพิ่มมากขึ้นซึ่งไวเทลโลเจนินจะให้สารสีส้มออกมาจึงทำให้เห็นสีเลือดในระยะนี้เป็นสีน้ำเงินแกมส้ม ระยะที่ 3 เลือดของปูทะเลจะมีสีส้มอ่อนๆ เนื่องจากในระยะนี้ปริมาณของไวเทลโลเจนินจะเพิ่มสูงขึ้น และในระยะที่ 4 สีของเลือดปูทะเลจะมีสีส้มเข้มถึงส้มแดง เนื่องจากในระยะนี้จะมีปริมาณของไวเทลโลเจนินที่สูง ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สีของเลือดตามระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล *Scylla spp.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมียที่รังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

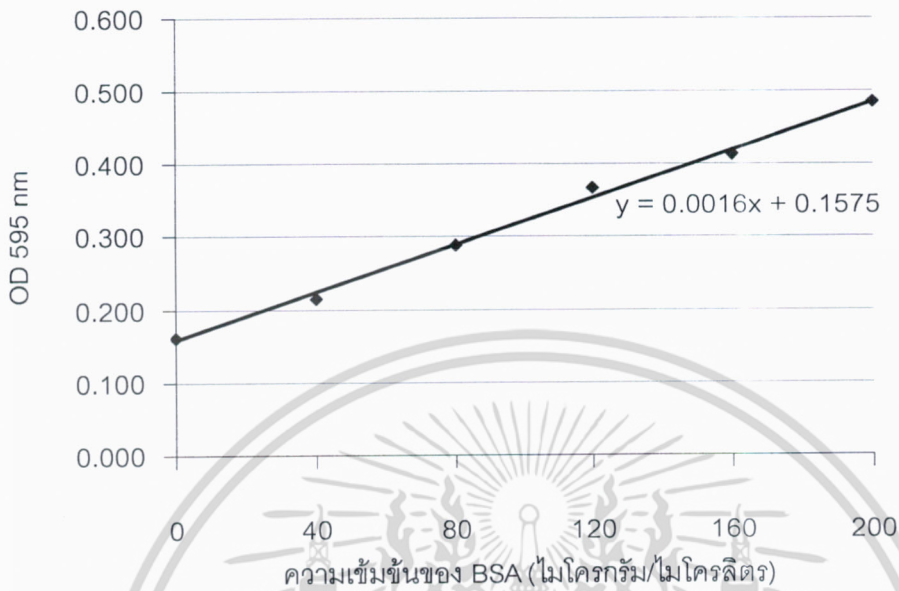
การศึกษาหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมียโดย Bradford technique ซึ่งก่อนทำการหาปริมาณโปรตีนในเลือดปูทะเลจะต้องมีการทำ standard curve ด้วย BSA ทุกครั้ง ซึ่งค่าดูดกลืนแสงของเลือดในปูทะเล (*S. paramamosian*) ที่ 595 nm ในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 0.232 ± 0.001 , 0.325 ± 0.008 , 0.374 ± 0.015 และ 0.427 ± 0.006 ตามลำดับ ซึ่งค่าดูดกลืนแสงของเลือดจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ และ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แสดงว่า ค่าดูดกลืนแสงของเลือดมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่ และ ค่าดูดกลืนแสงของเลือดในปูทะเล (*S. olivacea*) ที่ 595 nm ในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 0.222 ± 0.021 , 0.320 ± 0.011 , 0.364 ± 0.006 และ 0.424 ± 0.009 ตามลำดับ ซึ่งค่าดูดกลืนแสงของเลือดใน *S. olivacea* เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับค่าดูดกลืนแสงของ *S. paramamosian* และมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แสดงว่าค่าดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่เช่นเดียวกันดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าดูดกลืนแสงของเลือดในปูทะเล *S. paramamosian* และ *S. olivacea* ที่ 595 nm

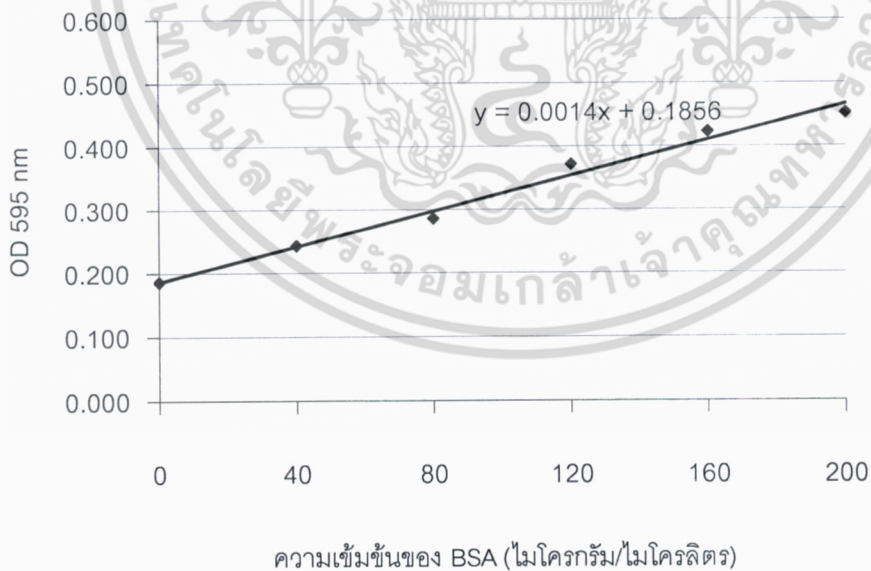
	ค่าดูดกลืนแสงของเลือดในปูทะเลที่ 595 nm			
	ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3	ระยะที่ 4
<i>S. paramamosian</i>	0.232 ± 0.001^a	0.325 ± 0.008^b	0.374 ± 0.015^c	0.427 ± 0.006^d
<i>S. olivacea</i>	0.222 ± 0.021^a	0.320 ± 0.011^b	0.364 ± 0.006^c	0.424 ± 0.009^d

a,b อักษรเดียวกันอยู่ในแถวเดียวกันหมายความว่ามีความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ ($P < 0.05$)

ในการหาปริมาณโปรตีนโดยนำค่าดูดกลืนแสงในเลือดของปูทะเลที่วัดได้เทียบกับ standard curve เพื่อหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเลือดที่ทำการทดลอง แล้วคำนวณหา Total protein content ในเลือดตัวอย่างหน่วยเป็น mg/ml ซึ่ง standard curve ของ *S. paramamosian* ดังภาพที่ 2 และ standard curve ของ *S. olivacea* ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 standard curve ของ BSA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล (*S. paramamosian*)



ภาพที่ 3 standard curve ของ BSA สำหรับการหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล (*S. olivacea*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากที่ทำ Standard curve แล้วก็คำนวณหา Total protein content ในเลือดตัวอย่าง หน่วยเป็น mg/ml ได้ผลดังนี้ ปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล (*S. paramamosian*) ในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 ดังนี้ 40.50 ± 12.86 mg/ml, 101.32 ± 6.57 mg/ml, 129.24 ± 3.54 mg/ml และ 166.26 ± 5.55 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณโปรตีนในเลือดปูทะเลมีปริมาณที่สูงขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ และมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แสดงว่าปริมาณโปรตีนมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่ และ ปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล (*S. Olivacea*) มีค่า 32.97 ± 7.08 mg/ml ในระยะที่ 1, 99.65 ± 5.81 mg/ml ในระยะที่ 2, 134.42 ± 10.83 mg/ml ในระยะที่ 3 และ 172.27 ± 4.34 mg/ml ในระยะที่ 4 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล *Scylla spp.*

	ปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล <i>Scylla spp.</i> (mg/ml)			
	ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3	ระยะที่ 4
<i>S. paramamosian</i>	40.50 ± 12.86^a	101.32 ± 6.57^b	129.24 ± 3.54^c	166.26 ± 5.55^d
<i>S. olivacea</i>	32.97 ± 7.08^a	99.65 ± 5.81^b	134.42 ± 10.83^c	172.27 ± 4.34^d

a,b อักษรเดียวกันอยู่ในแถวเดียวกันหมายความว่ามีความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ ($P < 0.05$)

4.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในเลือด

จากการใช้เทคนิค Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และ Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ภายหลังจาก run electrophoresis และย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 และ Destain แล้ว จะเห็นลักษณะของแถบสีปรากฏขึ้นดังภาพที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นอย่างชัดเจนว่าในหมายเลข 4 ของ PAGE ก็คือระยะที่ 4 มีแถบสีที่เข้มนั้นก็หมายความว่า ในระยะที่ 4 มีปริมาณของโปรตีนในเลือดสูงกว่าในระยะอื่นๆ และจะลดลงตามลำดับ และทั้งสี่แถบจะมีโปรตีนพื้นฐานที่เหมือนกันดูจากเครื่องหมายรูปดาว ซึ่งจะมีแถบในแนวเดียวกัน ซึ่งคาดว่าเป็น ฮีโมไซยานิน ซึ่งจากการ run electrophoresis ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่าง 2 สายพันธุ์ ก็คือ *S. olivacea* และ *S. paramamosian* จะมีแถบที่แตกต่างกันโดยที่แถบของ *S. paramamosian* ในระยะที่ 4 จะพบว่ามี 3 แถบ ในขณะที่ *S. olivacea* ในระยะที่ 4 ปรากฏขึ้นเพียง 2 แถบ ซึ่งก็สามารถที่จะจำแนกชนิดได้และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกว่าสารที่แตกต่างกันนั้นเป็นสารตัวใด ซึ่งทำให้สามารถยืนยันได้ว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของปูทะเลมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่ โดยที่เมื่อระยะการเจริญของรังไข่มากขึ้นก็จะพบปริมาณของโปรตีนมากขึ้นเช่นกันซึ่ง

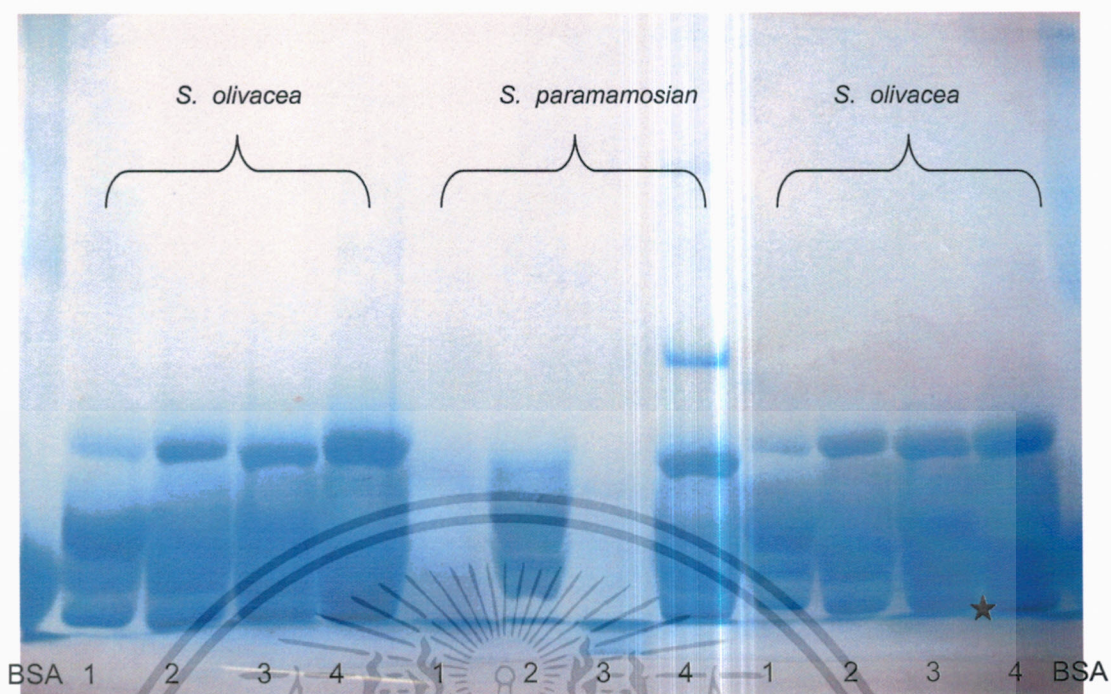
สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chang and Shih (1995) ได้ศึกษาปริมาณไนโตรเจนในเลือด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างการเจริญของรังไข่ของกิ้งก่ามกราม *M. rosenbergii* โดยเทคนิค ELISA ซึ่งได้แบ่งระยะการเจริญของรังไข่ออกเป็น 5 ระยะ พบว่าปริมาณไวเทลโลเจนินเม็มวัดได้ตั้งแต่ระยะที่ 1 (1.82 mg/ml) และเพิ่มขึ้นในระยะที่ 2 (2.12 mg/ml) หลังจากนั้นมียระดับคงที่อยู่ในระดับนี้จนถึงระยะที่ 4 (ระยะที่ 3 มีค่าเท่ากับ 2.05 mg/ml; ระยะที่ 4 มีค่าเท่ากับ 2.48 mg/ml) และมีระดับลดลงในระยะก่อนกึ่งวางไข่หรือกำลังวางไข่ (ระยะที่ 5 มีค่าเท่ากับ 1.42 mg/ml) และในส่วนของ SDS-PAGE จะสามารถเห็นได้ชัดเจนว่าในแต่ละระยะจะมี subunit ของโปรตีนเป็นเท่าไร และเป็นชนิดใดบ้างซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมากในส่วนของ *S. olivacea* จะเห็นแถบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนที่ชัดเจน ซึ่งในแต่ละระยะจะมีองค์ประกอบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกัน และจำนวนแถบจะลดลงแต่ความเข้มของแถบมีมากขึ้นซึ่งแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเล และ *S. paramamosian* จะเห็นได้ชัดเจนว่าแถบในระยะที่ 4 มีความแตกต่างกับ *S. olivacea* ในระยะที่ 4 ซึ่ง *S. paramamosian* จะมีแถบที่มากกว่าเป็น 5 แถบ ทำให้สามารถแยก 2 สายพันธุ์ได้ ซึ่งจากการใช้เทคนิค PAGE และ SDS-PAGE ทำให้พบว่า ปริมาณของโปรตีนในเลือดจะสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล และสามารถยืนยันความเหมาะสมในการใช้ refractive index และ สีเลือด ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลได้



ภาพที่ 4 ลักษณะของแถบ (band) ที่ได้จากการ run electrophoresis โดย PAGE ของเลือดของปูทะเลเทศเมีย *Scylla spp.* (1,2,3,4 แทนระยะการเจริญของรังไข่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 ลักษณะของแถบ (band) ที่ได้จากการ run electrophoresis โดย SDS - PAGE ของเลือดของปูทะเลเพศเมีย *Scylla spp.* (1,2,3,4 แทนระยะการเจริญของรังไข่)

4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีความสมบูรณ์เพศของปูทะเล (Female Maturity Index: FMI) และ ดัชนีการเจริญเติบโตของรังไข่ (Gonad Somatic Index) ค่าหักเหแสงและค่าดูดกลืนแสงของเลือดปูทะเลที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

ค่า GSI ของปูทะเล (*Scylla olivacea*) ในระยะที่ 1 , 2 , 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 0.674 ± 0.035 , 1.156 ± 0.137 , 3.083 ± 0.342 และ 8.820 ± 0.764 ตามลำดับ และค่า GSI ของปูทะเล (*Scylla paramamosian*) ในระยะที่ 1, 2 , 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 0.511 ± 0.081 , 1.776 ± 0.240 , 4.535 ± 0.576 และ 10.642 ± 0.696 ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ 6) ซึ่งจะพบว่าค่า GSI จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*) และ ในระยะที่ 1 และ 2 ของปูทะเลทั้งสองชนิดมีค่า GSI ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แต่ในระยะที่ 3 และ ระยะที่ 4 ของปูทะเลทั้งสองชนิดมีค่า GSI แตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ ซึ่งการทดลองที่ได้จะสอดคล้องกับ Tsutsui *et al.*(2000) ซึ่งได้ติดตามแหล่งสร้างไวเทลโลเจนนินใน *Penaeus japonicus* ได้แบ่งระยะการเจริญของรังไข่ตามค่าดัชนีรังไข่ (GSI) ดังนี้ GSI เท่ากับ 0.2-0.5 % เป็นระยะ previtellogenesis (ระยะที่ 1) , GSI เท่ากับ 1.2-3.7% เป็นระยะ early exogenous vitellogenesis (ระยะที่ 2) , GSI เท่ากับ 4.4-7.2 % เป็นระยะ late exogenous vitellogenesis (ระยะที่ 3) และ GSI เท่ากับ 7.7-8.9 % เป็นระยะ late exogenous vitellogenesis (ระยะที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า FMI (Female maturity index) ของปูทะเล (*Scylla olivacea*) ในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่า 0.926 ± 0.014 , 0.924 ± 0.014 , 1.030 ± 0.065 และ 0.966 ± 0.018 ตามลำดับ และ ค่า FMI ของปูทะเล (*Scylla paramamosian*) ในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 0.862 ± 0.021 , 0.893 ± 0.012 , 0.888 ± 0.014 และ 0.871 ± 0.009 ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ 2) พบว่า ค่า FMI ของปูทะเลทั้งสองชนิดในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แสดงว่าค่า FMI ของทั้งสองชนิดในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 ไม่มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาเจริญของรังไข่

ค่าหักเหแสงของปูทะเล (*Scylla olivacea*) ในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 68.75 ± 3.27 , 80.19 ± 2.11 , 96.44 ± 2.06 , 113.36 ± 2.85 ตามลำดับ ค่าดุดกลิ้นแสงของปูทะเล (*Scylla paramamosian*) ในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 71.53 ± 2.23 , 84.06 ± 2.65 , 91.47 ± 2.56 , 107.52 ± 1.71 ตามลำดับ ซึ่งจะพบว่าค่าหักเหแสงของเลือดปูทะเลทั้งสองชนิดจะมีค่าหักเหแสงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเจริญของรังไข่ ปูทะเลและทั้งสองชนิดที่ระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แสดงว่าค่าดุดกลิ้นแสงมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาเจริญของรังไข่ของปูทะเล (ตารางที่ 3 และ 4)

ค่าดุดกลิ้นแสงด้วยวิธี Bradford technique ของปูทะเล (*Scylla olivacea*) ในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 0.222 ± 0.021 , 0.320 ± 0.011 , 0.364 ± 0.006 , 0.424 ± 0.009 ตามลำดับ ค่าดุดกลิ้นแสงของปูทะเล (*Scylla paramamosian*) ในระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 0.232 ± 0.001 , 0.325 ± 0.008 , 0.374 ± 0.015 , 0.427 ± 0.006 ตามลำดับ ซึ่งจะพบว่าค่าดุดกลิ้นแสงของเลือดปูทะเลทั้งสองชนิดจะมีค่าดุดกลิ้นแสงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเจริญของรังไข่ ปูทะเลและทั้งสองชนิดที่ระยะที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แสดงว่าค่าดุดกลิ้นแสงมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาเจริญของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*) (ตารางที่ 3 และ 4)

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพ กับ ระยะเวลาเจริญของรังไข่ของปูทะเลเทศเมีย (*Scylla olivacea*)

ปัจจัย	ระยะเวลาเจริญของรังไข่ของปูทะเลเทศเมีย			
	1	2	3	4
GSI	0.674 ± 0.035^a	1.156 ± 0.137^a	3.083 ± 0.342^b	8.820 ± 0.764^c
FMI	0.926 ± 0.014^a	0.924 ± 0.014^a	1.030 ± 0.065^a	0.966 ± 0.018^a
ค่าดุดกลิ้นแสง	0.222 ± 0.021^a	0.320 ± 0.011^b	0.364 ± 0.006^c	0.424 ± 0.009^d
ค่าหักเหแสง	68.75 ± 3.27^a	80.19 ± 2.11^b	96.44 ± 2.06^c	113.36 ± 2.85^d

a,b อักษรเดียวกันอยู่ในแถวเดียวกันหมายความว่ามีความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ ($P < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีการเจริญของรังไข่(GSI) กับ ค่าการหักเหแสงของเลือดปูทะเล *Scylla olivacea* ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างดัชนีการเจริญของรังไข่ กับ ค่าการหักเหแสงของเลือด มีความสัมพันธ์เชิงบวก($r=0.681$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น <0.01 แสดงให้เห็นว่า ค่าการหักเหแสงของเลือดเพิ่มขึ้นตามค่าดัชนีการเจริญของรังไข่ และ ผลการวิเคราะห์ค่า R^2 ด้วยความสัมพันธ์แบบเชิงเส้น พบว่า $R^2 = 0.4632$

ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีการเจริญของรังไข่ (FMI) กับ ค่าการหักเหแสงของเลือดผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างดัชนีความสมบูรณ์เพศ กับ ค่าการหักเหแสงของเลือด มีความสัมพันธ์เชิงบวก($r=0.07$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น <0.01 แสดงให้เห็นว่า ค่าการหักเหแสงของเลือดเพิ่มขึ้นตามค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (FMI) และ ผลการวิเคราะห์ค่า R^2 ด้วยความสัมพันธ์แบบเชิงเส้น พบว่า $R^2 = 0.0049$

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพ กับ ระยะเวลาเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย (*Scylla paramamosian*)

ปัจจัย	ระยะเวลาเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย			
	1	2	3	4
GSI	0.511±0.081 ^a	1.776±0.240 ^a	4.535±0.576 ^b	10.642±0.696 ^c
FMI	0.862±0.021 ^a	0.893±0.012 ^a	0.888±0.014 ^a	0.871±0.009 ^a
ค่าดูดกลืนแสง	0.232±0.001 ^a	0.325±0.008 ^b	0.374±0.015 ^c	0.427±0.006 ^d
ค่าหักเหแสง	71.53±2.23 ^a	84.06±2.65 ^b	91.47±2.56 ^c	107.52±1.71 ^d

a,b อักษรเดียวกันอยู่ในแถวเดียวกันหมายความว่ามีความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ ($P<0.05$)

4.5 ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนารังไข่ของปูทะเลแต่ละระยะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่า ค่าการหักเหแสงของเลือด เป็นดัชนีตัวชี้วัดระยะการเจริญของรังไข่ของแม่พันธุ์ปูทะเลที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด ($r=0.81$) เมื่อเปรียบเทียบกับ ค่า GSI ($r=0.718$) อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักรังไข่ต่อน้ำหนัก hepatopancreas ($r=0.715$) และค่า FMI เป็นดัชนีตัวชี้วัดที่มีความน่าเชื่อถือน้อยที่สุด ($r=0.032$) โดยค่าการหักเหแสงของเลือดในแต่ละระยะของการเจริญของรังไข่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ค่า GSI ในแต่ละระยะของการเจริญของรังไข่ ในระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ค่า FMI ในแต่ละระยะของการเจริญของรังไข่ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักรังไข่ต่อน้ำหนัก hepatopancreas ในแต่ละระยะของการเจริญของรังไข่ ในระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

การศึกษาตัวชี้วัดเพื่อจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเล (*Scylla* spp.) ครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ ความแตกต่างของดัชนีตัวชี้วัดต่างระหว่างปูทะเลสายพันธุ์ *Scylla olivacea* ในบริเวณจังหวัดตรัง จังหวัดสตูล และปูทะเลสายพันธุ์ *Scylla paramanosian* ในบริเวณจังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่า ปูทะเลสายพันธุ์ *Scylla olivacea* ในบริเวณจังหวัดตรัง และปูทะเลสายพันธุ์ *Scylla paramanosian* ในบริเวณจังหวัดนครศรีธรรมราช ข้อมูลที่ได้จากการศึกษามีความสัมพันธ์กัน โดยลำดับความน่าเชื่อถือของตัวชี้วัดในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเลมีลำดับที่เหมือนกัน คือ ค่าการหักเหแสงของเลือด เป็นดัชนีตัวชี้วัดระยะการเจริญของรังไข่ของแม่พันธุ์ปูทะเลที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด รองลงมา คือ ค่า GSI ,ค่าอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักรังไข่ต่อน้ำหนัก hepatopancreas และค่า FMI เป็นดัชนีตัวชี้วัดที่มีความน่าเชื่อถือน้อยที่สุด แต่ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาตัวชี้วัดเพื่อจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเล *Scylla olivacea* ในบริเวณจังหวัดสตูล ได้ผลการศึกษาที่แตกต่างจากปูทะเลสายพันธุ์ *Scylla olivacea* ในบริเวณจังหวัดตรัง และปูทะเลสายพันธุ์ *Scylla paramanosian* ในบริเวณจังหวัดนครศรีธรรมราช โดยความน่าเชื่อถือของตัวชี้วัดในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเล มีลำดับที่แตกต่าง คือ ค่า FMI เป็นค่าที่ความน่าเชื่อถือมากกว่า ค่าอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักรังไข่ต่อน้ำหนัก hepatopancreas อาจเนื่องมาจากระยะเวลาการเก็บรวบรวมปูทะเลและการขนส่งก่อนนำมาทำการศึกษาใช้ระยะเวลาที่นานเกินไป ทำให้ปูทะเลไม่ได้กินอาหารตามปกติ และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งปูทะเลต้องนำอาหารที่สะสมอยู่ในร่างกายมาใช้ ทำให้น้ำหนักตัวของปูทะเลลดลง และปูทะเลเกิดความเครียด จึงส่งผลกระทบต่อข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป ควรเก็บรวบรวมปูทะเลและทำการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองโดยทันที โดยไม่ให้อุณหภูมิตกอยู่ในสภาวะที่เกิดความเครียด ซึ่งอาจส่งผลต่อความผิดพลาดของข้อมูลได้

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford technique และนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโดย PAGE และ SDS-PAGE technique เพื่อยืนยันความเหมาะสมของดัชนีชี้วัดที่จะใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเลเพศเมีย จากการศึกษหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมีย (*Scylla paramamosian*) ตามระยะการเจริญของรังไข่ที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 40.50 ± 12.86 mg/ml, 101.32 ± 6.57 mg/ml, 129.24 ± 3.54 mg/ml และ 166.26 ± 5.55 mg/ml ตามลำดับ และ ปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมีย *Scylla olivacea* ตามระยะการเจริญของรังไข่ที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 32.97 ± 7.08 mg/ml, 99.65 ± 5.81 mg/ml, 134.42 ± 10.83 mg/ml และ 172.27 ± 4.34 mg/ml ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนพบว่าแถบของโปรตีนในแต่ละระยะมีความแตกต่างกันซึ่งความเข้มของแถบจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะการเจริญของรังไข่เพิ่มมากขึ้น จากการศึกษปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดจะพบว่าปริมาณของโปรตีนในเลือดจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะการเจริญของรังไข่เพิ่มมากขึ้น และองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของปูทะเลมีการเปลี่ยนแปลงโดยพบว่าความเข้มของแถบจะเพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของโปรตีนในเลือดที่เพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ ค่าหักเหแสงและดีเอ็นเอของเลือดของเลือดมีความสัมพันธ์กับปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดตามระยะการเจริญของรังไข่ ดังนั้นค่าหักเหแสงของเลือดและดีเอ็นเอของเลือดเป็นดัชนีที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย เนื่องจากเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปูทะเลสามารถนำไปใช้ในการจัดการแม่พันธุ์ปูทะเลได้ แต่ในการใช้ดีเอ็นเอเกษตรกรต้องมีความชำนาญมากพอในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทำการทดลองหาปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของปูทะเลที่มีการเจริญของรังไข่ในระยะต่างๆ ตัวอย่างเลือดที่เก็บจะต้องมีการเก็บรักษาที่ดี และการเก็บไม่ควรนานจนเกินไป เนื่องจากทำให้องค์ประกอบของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลง หรือในการทำการทดลองให้กระทำหลังจากทำการผ่าตัด ซึ่งจะทำให้ได้ผลที่แน่นอนกว่า
2. ควรทำการทดลองตามสถานที่ปฏิบัติงานภาคสนามเพื่อลดความแปรปรวนที่จะเกิดจากความเครียดที่มีสาเหตุจากการขนส่งที่มีระยะไกล
3. จากการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนซึ่งทำให้พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบโปรตีนในเลือดของปูทะเลในระยะการเจริญของรังไข่ มีความแตกต่างกัน แต่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมหาชนิดของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละระยะการเจริญของรังไข่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรธรรม. 2539. การเลี้ยงปูทะเล *Scylla serrata*(Forsk., 1775). คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. 127 หน้า
- เชียง เกิดแก้ว 2542. ผลของ 20-ไฮดรอกซีเอคโดไซโนต่อการลอกคราบของปูทะเล *Scylla serrata* (Forsk., 1775) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน, กรุงเทพฯ. หน้า:6-9
- ดวงใจ งามสม 2543. ความสัมพันธ์ของปริมาณไวเทลโลเจนินในเลือดกับการเจริญของรังไข่ของปูทะเล *Scylla serrata*(Forsk., 1775) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่เสียสภาพ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ :หน้า11-22
- ศิวาพร ลงยันต์ และคณะ. 2537. ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ของกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis*. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 10(2) : 27-39
- นวลมณี พงศ์ธนา, สุภาพ ไพโรพนาพงษ์, กฤตพล ยังวณิชเศรษฐ์, เบญจพร สัมฤทธิ์เวช, เครือมาล สมปอง และ อำนวย อุ่นถกซ์. 2546. โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตปูทะเลเชิงการค้า กรมประมง, กรุงเทพฯ. หน้า:2-3
- บุญช่วย เชาว์ทวี. 2515. การทดลองเลี้ยงปูทะเลในคอก และการเลี้ยงปูไซ้ในกระชัง รายงานประจำปี 2515 สถานีประมงจังหวัดจันทบุรี กรมประมง, กรุงเทพฯ. 25 น.
- พีรพงษ์ เฉลิมวุฒิสักดิ์ 2541. การติดตามการเจริญพันธุ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปูทะเล (*Scylla serrata* ,Forsk.) ในรอบปี. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 14 น.
- วรรณพร อุดมชาติ. 2548. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ค่าหักเหแสงของเลือดเพื่อจำแนกการเจริญของรังไข่ปูทะเล (*Scylla paramamosain*) ปัญหาพิเศษ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 19 น.
- สมบัติ ภูวชิรานนท์. 2530. การประมงปูทะเล *Scylla serrata* (Forsk.) บริเวณป่าชายเลนบางลา จังหวัดภูเก็ตและศึกษาชีววิทยาบางประการ. ในรายงานการประชุมสัมมนาวิชาการ กรมประมง ปี 2530 : หน้า 1-19
- อนัญญา เจริญพรนิพัทธ์, อรวรรณ สัตยาลัย และ สมชาย หวังวิบูลย์กิจ. 2542. การศึกษาความเป็นไปได้ของการเพาะเลี้ยงปูทะเล *Scylla serrata* (Forsk.): การกระตุ้นให้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวางไข่นอกกระดองในบ่อเลี้ยง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ปี2542
งานวิจัยประเภททั่วไป ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัย
แห่งชาติ

อภิรดี ทิพย์เที่ยงแท้. 2548.การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ค่าหักเหแสงของเลือดเพื่อ
จำแนกการเจริญของรังไข่ปูทะเล (*Scylla olivacea*) ปัญหาพิเศษ ภาควิชา
วิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,
กรุงเทพฯ. 19 น.

Chen, J.C., Peng-Gek Chia. 1997. Oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte
levels in the hemolymph of *Scylla serrata* in relation to size in and molt
cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 217:93-105.

Derelle, E., Grosclaude, J. and Meusy, J.J. 1986. ELISA titration of vitellogenin and
vitellin in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, with monoclonal
antibody. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B (1): 1-4.

Eastman-Reks, S.B. and Fingerman, M. 1985. *In vitro* synthesis of vitellin by the ovary
of the fiddler crab, *Uca pugilator*, *J. Exp. Zool.* 233:111-116

Heasman, M.P. 1980. Aspects of general biology and fishery of mud crab *Scylla
serrata* (Forsk.) in Morton Bay, Queensland (Ph.D. Thesis. University of
Queensland.)

Hill, B.J. 1976. Natural food foregut clearance rate and activity of the *Scylla serrata*
(Forsk.). *Mar. Biol.* 34 : 109-112

Keenan, C.P., P.J.F. Davie and D.L. Mann. 1998. A revision of the genus *Scylla* de
Haan, 1883 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae). *The Raffles
Bulletin of Zoology* 46(1) : 217-245

Kerr, M.S. 1969. The hemolymph protein of the blue crab *Callinectes sapidus* a
lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitellin. *Dev. Biol.* 20: 1-17

Lee, C.Y., Umphrey, H.R., and Watson, R.D. 1996. Developmental changes in the
level of vitellin-immunoreactive protein in hemolymph and tissues of the blue
crab, *Callinectes sapidus*: relation to vitellinogenesis. *J. Crust.* 16(1): 1-9.

Lee, C.Y. and Watson, R.D. 1994. Development of a quantitative enzyme-linked
immunosorbent assay for vitellin and vitellogenin of the blue crab, *Callinectes
sapidus*. *J. Crust.* 14(4): 617-626

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Quinn, N.J. and B.L. Kojis, 1987. Reproduction Biology of *Scylla* spp. (Crustacea:Portunidae) from the Labu Estuary in Papua New Guinea. *Bulletin of Marine Science* 41(2): 234-241
- Shanmugam, S. and Bensam, P. 1980. On the fishery for the crab *Scylla serrata* (Forsk.) at Tuticorin during 1984-75. *Ind.J. Fish.* 27(1,2): 102-110
- Quinitio.E.T.,Hara,A.,Yamauchi,K. and Nakao,S.1994. Change in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gamatogenic cycle of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*.*Comp.Biochem.Physiol.*109C (1):21-26.
- Quinn.N.J. and Kojis,B.L.1987. Reproductive Biology of *Scylla* sp. (Crustacea:Portunidae) from the Labu Estuary in Papua New Guinea.*Bull Mar.Sci.*41(2):234-241.
- Tsutsui ,N., Kawazoe ,I. ,Ohira ,T. , Jasmani , S. , Yang , W.J. , Wilder , M.N.and Aida ,K.2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*.*Zool .Sci.* 17 :651-660.
- Vay, L. L. 2001. Ecology and management of mud crab *Scylla* spp. .*Asian Fisheries Science*.14: 101-111.
- Williams.M.J. and Primavera.J.H. 2001 . Choosing tropical portunid species for culture, domestication and stock enhancement in the Indo-Pacific . *Asian Fisheries Science*.14: 121-142.
- Yoganandhan K.,S.Thirupathi., A.S. Sahul Hameed.,2003. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus - infected shrimp, *Penaeus indicus* . *Aquaculture*. 221 :1 – 11.