

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณปี 2549

แนวทางการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปูทะเลสู่อุตสาหกรรม : การจำแนกระยะ
การเจริญของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*) เพื่อการจัดการเพาะฟักปูทะเล

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



นางสาวอนัญญา เจริญพรนิพัทธ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2549 จากเงินรายได้ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณปี 2549

แนวทางการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปูทะเลสู่อุตสาหกรรม : การจำแนกระยะ
การเจริญของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*) เพื่อการจัดการเพาะฟักปูทะเล

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



นางสาวอนัญญา เจริญพรนิพัทธ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2549 จากเงินรายได้ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีก

1149858X

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงปูทะเลในปัจจุบัน กำลังประสบปัญหาการขาดแคลนลูกพันธุ์ ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ทั้งนี้เนื่องจากเกษตรกรยังคงรวบรวมลูกพันธุ์จากธรรมชาติ ยังไม่สามารถเพาะพันธุ์ปูทะเลเชิงพาณิชย์ได้ แม้ว่ากรมประมงจะสามารถเพาะฟักลูกปูทะเลได้บ้างแล้วก็ตาม แต่แม่ปูส่วนใหญ่ที่นำมาเพาะฟักได้มาจากการรวบรวมจากธรรมชาติทั้งสิ้น ทำให้ผู้ประกอบการเพาะปูทะเลประสบปัญหาการขาดแคลนแม่พันธุ์ปูทะเลในบางฤดูกาลเป็นผลให้การผลิตลูกปูไม่สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี และแม่ปูที่รวบรวมมาได้ส่วนใหญ่ยังไม่สามารถจำแนกได้แน่ชัดว่าการเจริญของรังไข่อยู่ในระยะใด หากสามารถจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ ก็จะสามารถจัดการปริมาณและเวลาที่แน่นอนในการผลิตลูกพันธุ์ในระดับฟาร์มได้ตลอดทั้งปี ในช่วงที่ผ่านมา มีผู้เสนอให้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสีของเลือดเพื่อใช้ประเมินระยะของรังไข่ แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังไม่ได้มีการทดสอบถึงความแม่นยำหรืออาจมีความไม่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ แต่ค่าการหักเหแสงในเลือดของปูมีแนวโน้มที่จะใช้เป็นดัชนีวัดการเจริญของรังไข่ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องการยืนยันว่าค่าหักเหแสงในเลือดของปูทะเลเป็นค่าที่เหมาะสมและสะท้อนการเปลี่ยนแปลงทางสีวิทยาของปูได้ จึงทำการวัดค่าการหักเหแสงในเลือดของปูทะเลเพศเมียเปรียบเทียบกับเลือดในปูเพศผู้ และนำเลือดมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและวิเคราะห์หาองค์ประกอบของโปรตีนในเลือด ผลการศึกษาพบว่าในปูทะเล *Scylla paramamosain* ปริมาณโปรตีนในเลือดเพิ่มสูงขึ้นเป็นลำดับตามระยะการเจริญของรังไข่และมีความสอดคล้องกับค่าการหักเหแสงของเลือด เมื่อศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดพบว่าแถบโปรตีนที่พบเฉพาะในเพศเมียมีความเข้มข้นตามระยะการเจริญของรังไข่ และในเพศผู้มีรูปแบบของแถบโปรตีนในเลือดคล้ายกับปูเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะที่หนึ่ง ค่าหักเหแสงของเลือดเพิ่มสูงขึ้นเป็นลำดับตามระยะการเจริญของรังไข่ ผลการศึกษาปริมาณโปรตีนในเลือดปูทะเล *Scylla olivacea* พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดที่พบว่า สามารถพบแถบของโปรตีนที่มีความเข้มข้นของสีและความหนาเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ จึงเป็นผลให้ความเข้มข้นของสารละลายเลือดสูงขึ้น เมื่อนำไปวัดค่าหักเหแสงทำให้มีค่าสูงขึ้นตามลำดับ ดังนั้นจากผลการศึกษาจึงยืนยันได้ว่าค่าหักเหแสงของเลือดปูทะเล *Scylla olivacea* และ *Scylla paramamosain* เพศเมีย มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อประเมินระยะการเจริญของรังไข่ เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดและที่สำคัญยังเป็นวิธีที่สามารถจำแนกระยะของรังไข่ได้โดยที่แม่พันธุ์ปูทะเลสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ตามปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

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 heamolymh. 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 heamolymh 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 was compared with 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
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | 2 |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | 3 |
| สารบัญ | 4 |
| สารบัญตาราง | 5 |
| สารบัญรูป | 6 |
| บทที่ 1 บทนำ | 7 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม | 9 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย | 18 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ | 20 |
| บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ | 26 |
| เอกสารอ้างอิง | 28 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|------------|------|
| ตารางที่ 1 | 12 |
| ตารางที่ 2 | 17 |
| ตารางที่ 3 | 19 |
| ตารางที่ 4 | 22 |
| ตารางที่ 5 | 23 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| ภาพที่ 1 ลักษณะของจับปิ้งของปูทะเลเพศผู้ | 9 |
| ภาพที่ 2 ลักษณะของจับปิ้งของปูทะเลเพศเมีย | 10 |
| ภาพที่ 3 ปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆ | 13 |
| ภาพที่ 4 สีของเลือดตามระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล <i>Scylla spp.</i> ปูทะเล (<i>S. olivacea</i>) | 20 |
| ภาพที่ 5 ลักษณะของแถบ (band) ที่ได้จากการ run electrophoresis โดย PAGE ของเลือดของปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla spp.</i> | 24 |
| ภาพที่ 6 ลักษณะของแถบ (band) ที่ได้จากการ run electrophoresis โดย SDS - PAGE ของเลือดของปูทะเลเพศเมีย <i>Scylla spp.</i> | 25 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศและเพื่อเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ นำไปสู่การพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศต่อไป อีกทั้งยังช่วยลดการจับปลูจากธรรมชาติ เพื่อประโยชน์ในการจัดการพันธุ์ปลูทะเลในธรรมชาติให้คงอยู่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาค่าหักเหแสงของเลือดและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดปลูทะเลในช่วงการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่างๆ
- 2) เพื่อศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลูทะเล (Female Maturity Index: FMI) และ ดัชนีเจริญของรังไข่ (Gonad Somatic Index) ของปลูทะเล
- 3) เพื่อศึกษาหาระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนารังไข่ของปลูทะเลแต่ละระยะ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเล

1. ความแตกต่างระหว่างเพศของปูทะเล

1.1 ปูทะเลเพศผู้

ลักษณะของจับปิ้ง (abdomen) ปูทะเลเพศผู้มีจับปิ้งเรียวยาวเล็กเป็นรูปสามเหลี่ยม เมื่อเปิดจับปิ้งจะพบอวัยวะเพศเรียกว่า gonopod หรือ penis เปลี่ยนมาจากกรวยน้ำ (pleopod) โดยในเพศผู้อวัยวะส่วนนี้มีเพียง 2 คู่ รูปร่างยาวตรงปลายเรียวยาวเล็ก ทำหน้าที่เป็นอวัยวะนำถุงบรรจุตัวอสุจิ (spermatophore) ให้กับปูทะเลเพศเมีย ลักษณะของก้ามหนีบ (chela) มีขนาดใหญ่กว่าเพศเมียมีไว้เพื่อป้องกันตัว, จับเหยื่อและจับปูเพศเมียในขณะที่มีการผสมพันธุ์ (ชลธี, 2539)



ภาพที่ 1 ลักษณะของจับปิ้งของปูทะเลเพศผู้

1.2 ปูทะเลเพศเมีย

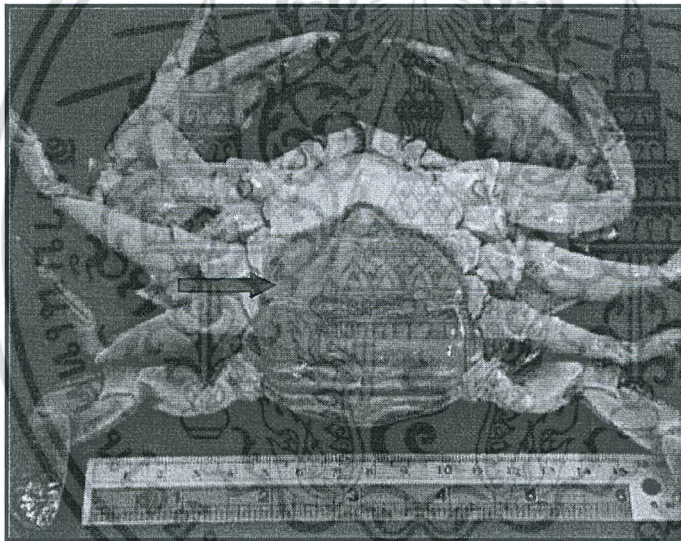
ลักษณะของจับปิ้ง (abdomen) ขยายกว้างออกจนเกือบเต็มปิดด้านท้องของทรงอก มีรยางค์ขาว่ายน้ำ 4 คู่ เปลี่ยนไปเป็นที่สำหรับไข่ยึดเกาะหลังจากไข่ได้ถูกปล่อยออกมาภายนอก เป็นระยะที่ไข่ได้รับการผสมเจริญเป็นเอมบริโอ ลักษณะของก้ามหนีบ (chela) ของเพศเมียจะมีขนาดเล็กกว่าเพศผู้ทำหน้าที่ป้องกันตัว และจับเหยื่อ (ชลธี, 2539) และจับปิ้งของเพศเมียจะเปลี่ยนแปลงลักษณะ ขนาด และสีทุกครั้งเมื่อปูลอกคราบ ดังนั้นลักษณะของขนาด และสีของจับปิ้งสามารถใช้เป็นตัวกำหนดความสมบูรณ์เพศของปูทะเลเพศเมียได้ ดังนี้ (บรรจงและบุญรัตน์, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.1 ความสมบูรณ์เพศขั้นที่ 1 ระยะนี้จิ้งมีรูปร่างแคบ เรียวยาว ในขั้นนี้ปูทะเลลอกคราบหลายครั้ง ทุกครั้งรูปร่างและลักษณะของจิ้งจะเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยส่วนกว้างขยายออก

1.2.2 ความสมบูรณ์เพศขั้นที่ 2 ระยะนี้ขนาดของจิ้งใหญ่ขึ้น แต่ยังไม่เต็มส่วนนอก ขอบของจิ้งมีลักษณะโค้งออก มีขนสั้นๆ สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ส่วนท้องมีสีคล้ำกว่าปูทะเลเพศเมียขั้นที่ 1 ชาวประมงเรียกปูระยะนี้ว่าปูกระเทย เพราะจิ้งมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างปูทะเลเพศผู้และปูทะเลเพศเมีย

1.2.3 ความสมบูรณ์เพศขั้นที่ 3 ระยะนี้ขอบของจิ้งจะโค้งออกคล้ายวงกลมคลุมเต็มส่วนนอก ที่ขอบมีขนยาวโดยรอบ เป็นระยะของปูทะเลที่รังไข่พัฒนาอยู่ระหว่างขั้นที่ 3 และขั้นที่ 4 เป็นระยะที่ปูทะเลเพศเมียเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ หากได้รับการผสมพันธุ์กับปูทะเลเพศผู้ ไข่จะเจริญอยู่ภายในรังไข่ เรียกว่า ปูไข่



ภาพที่ 2 ลักษณะของจิ้งของปูทะเลเพศเมีย

2. การจับคู่และการผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์ของปูทะเลเป็นการผสมพันธุ์ภายใน (internal fertilization) ปูทะเลเพศเมียพร้อมผสมพันธุ์ เมื่อมีความสมบูรณ์เพศในขั้นที่ 3 หรือปลายขั้นที่ 2 ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ปูทะเลเพศเมียจะมีพฤติกรรมก้าวร้าว และจะปล่อยฟีโรโมน (pheromone) เพื่อกระตุ้นปูทะเลเพศผู้ให้ไล่ตาม เมื่อได้จังหวะปูเพศผู้จะขึ้นคร่อมและใช้ปลายขาเดินคู่ที่ 2 - 4 พยุงปูทะเลเพศเมียไว้ข้างล่าง ช่วงนี้ในเวลากลางวันปูทะเลเพศผู้จะเกาะและพาปูทะเลเพศเมียไปด้วยตลอดเวลา และจะแยกจากกันในตอนเย็นใกล้ค่ำ จะเป็นอยู่ในลักษณะนี้นาน 3 - 4 วัน จนกระทั่งปูทะเลเพศเมียลอกคราบ ขณะที่กระดองยังนิ่มปูทะเลเพศผู้จะจับปูทะเลเพศเมียหางท้อง แล้วสอดอวัยวะเพศ (gonopod) เข้าไปในรูเปิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(gonopore) ของปูทะเลเพศเมีย เมื่อได้จิ้งหระปูทะเลเพศผู้จึงปล่อย spermatophore ไปเก็บไว้ใน sperm receptacle ของปูทะเลเพศเมีย ขั้นตอนการผสมพันธุ์ช่วงนี้ใช้เวลาประมาณ 12 – 15 ชั่วโมง น้ำเชื้อของปูทะเลเพศผู้สามารถมีชีวิตได้นานประมาณ 3 – 4 เดือน ส่วนปูทะเลเพศเมียเมื่อได้รับน้ำเชื้อแล้วจะกลับตัวอยู่ในท่าปกติ จากนั้นปูทะเลเพศผู้จะเกาะหลังปูทะเลเพศเมียอีก 2 – 3 วัน จึงแยกตัวออก ปูทะเลเพศเมียหลังจากได้รับน้ำเชื้อก็จะเริ่มสร้างไข่ (บรรจงและบุญรัตน์, 2545)

3. การเจริญของรังไข่

ในปูทะเลเพศเมียเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์และมีความสมบูรณ์ทางเพศ รังไข่จะเจริญและเปลี่ยนแปลงอย่างมาก รังไข่ของปูทะเลที่มีอายุยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์รังไข่จะมีลักษณะเป็นเส้นยาวและใสไม่มีสี แต่เมื่อถึงวัยที่พร้อมจะผสมพันธุ์รังไข่จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าจากการผ่าตัดเปิดกระดอง เนื่องจากรังไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสัณฐาน รวมทั้งสีและขนาดเมื่อเริ่มมีความสมบูรณ์ทางเพศ โดยเริ่มเปลี่ยนจากที่ไม่มีสี กลายเป็นสีขาวขุ่น สีเหลืองส้ม และสีส้มแดงตามลำดับ (ดวงใจ, 2543) จากการศึกษาของ Quinn and Kojis (1987) แบ่งการเจริญของรังไข่ของปูทะเลได้ 5 ระยะ ดังนี้

- | | |
|-----------|---|
| ระยะที่ 1 | รังไข่มีขนาดเล็ก ลักษณะเป็นเส้นบางใส |
| ระยะที่ 2 | รังไข่มีขนาดเล็ก สีขาวขุ่นหลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน |
| ระยะที่ 3 | รังไข่ขยายขนาด มีรอยหยัก และมีสีเหลืองอ่อน |
| ระยะที่ 4 | รังไข่ขยายใหญ่มากขึ้น มีรอยหยักมากขึ้น มีสีเหลืองส้มปกคลุมประมาณ 1/2 ถึง 3/4 ส่วนของ hepatopancreas |
| ระยะที่ 5 | รังไข่เจริญเต็มที่ ขยายขนาดเกือบเต็มกระดอง มีสีส้มหรือส้มแดงปกคลุมส่วนของ hepatopancreas เกือบหมด |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

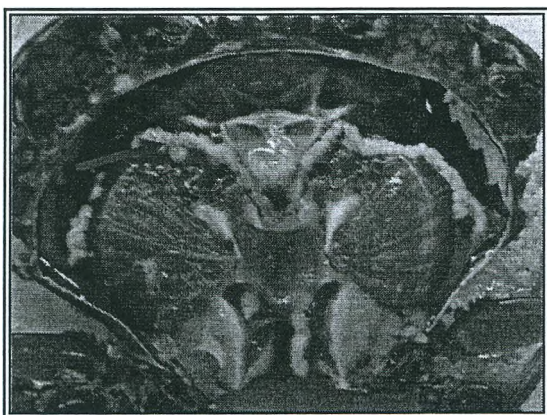
สุรชาติและสินธุ์วัฒน์ (2538) แบ่งระยะการเจริญของรังไข่เป็น 4 ระยะ ดังนี้

ตารางที่ 1 ลักษณะ ขนาด และสี ของไข่ปูทะเลในระยะต่าง ๆ

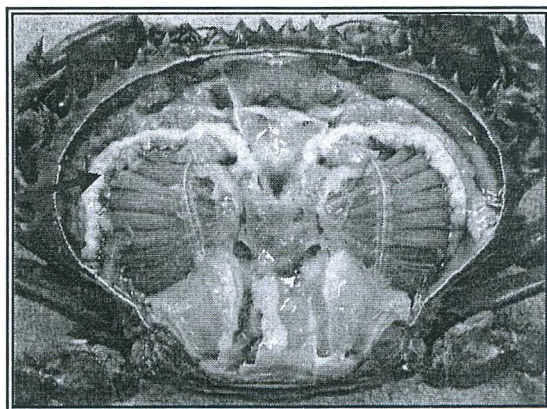
| ระยะ | ลักษณะ | ขนาดและสี |
|-----------|--|---|
| ระยะที่ 1 | เป็นเส้นยาวแบน 2 เส้นแทรกตัวอยู่ในช่องว่างภายในลำตัว ตามขอบกระดองด้านหน้า บน digestive gland | ขนาดเล็กมาก ประมาณ 1-2 % ของช่องว่างภายในลำตัว สีขาว โปร่งใส |
| ระยะที่ 2 | เส้นแบนขอบมีรอยหยักแทรกตัวติดอยู่กับ sterno carapace บน digestive gland | ขนาดขยายใหญ่ขึ้น ประมาณ 10-20% ของช่องว่างภายในลำตัว สีครีม สีขาวนม |
| ระยะที่ 3 | รังไข่เริ่มขยายตัว ขดไปตามลักษณะของช่องว่างภายในลำตัว ไข่ยังไม่แยกเป็นเม็ดเห็นชัดเจน | ขนาดขยายประมาณ 20-75% ของช่องว่างภายในลำตัว สีส้มเหลือง เหลืองอ่อน หรือ ส้ม |
| ระยะที่ 4 | ไข่สมบูรณ์เต็มที่ อัดแน่นในช่องว่างภายในลำตัว ผิวมันวาว มองจากด้านบนรูปร่างคล้ายสมอเรือ ไข่แยกเป็นเม็ด เห็นอย่างชัดเจน | ขยายเต็มช่องว่างภายในลำตัว ถ้าเป็นปูดำ <i>Scylla olivacea</i> ไข่ในระยะนี้จะมีสีส้มเหลืองถึงส้มแดง ถ้าเป็นปูขาว <i>Scylla paramamosain</i> รังไข่จะมีสีเหลืองอ่อน |

ที่มา :สุรชาติและสินธุ์วัฒน์,2538

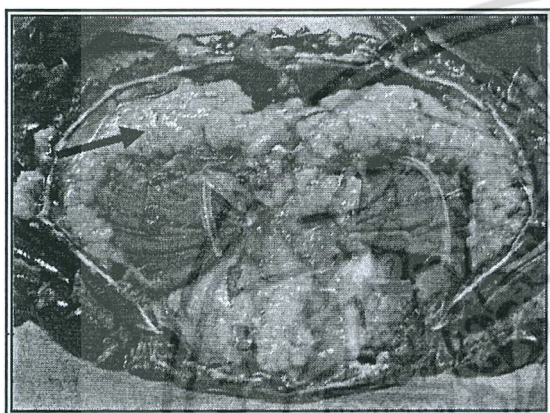
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



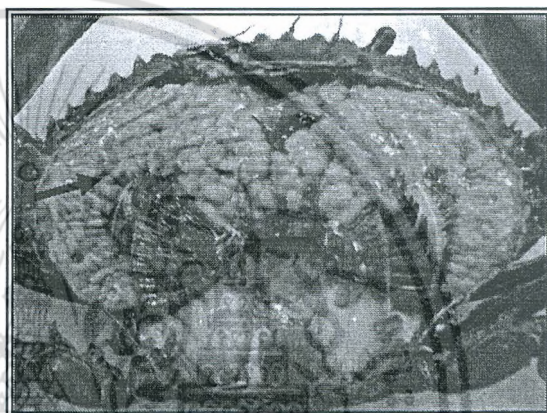
ปูทะเลที่รังไข่เจริญระยะที่ 1



ปูทะเลที่รังไข่เจริญระยะที่ 2



ปูทะเลที่รังไข่เจริญระยะที่ 3



ปูทะเลที่รังไข่เจริญระยะที่ 4

ภาพที่ 3 ปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะเวลาต่างๆ

บรรจงและบุญรัตน์ (2545) กล่าวว่า การเจริญรังไข่ของปูเพศเมียนั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมน 2 ชนิด คือ ฮอร์โมนควบคุมการเจริญของรังไข่ (Gonad inhibiting hormone :GIH) และฮอร์โมนกระตุ้นให้ไข่เจริญ (Gonad stimulating hormone:GSH) ฮอร์โมน GIH เป็นฮอร์โมนที่ประสาทส่วนกลาง (Neurosecretory cell) เป็นผู้ผลิตและส่งเข้าระบบเลือด ส่วนฮอร์โมน GSH นั้น Y-organ เป็นผู้ผลิตและจะเริ่มผลิตก็ต่อเมื่อระดับฮอร์โมน GIH ในเลือดต่ำกว่าฮอร์โมน GSH ซึ่งสัมพันธ์กับระยะการลอกคราบของปู โดยก่อนลอกคราบ (Proecdysis stage) หรือใน ระยะที่ปูเปลือกแข็งปลាយๆ ระดับของฮอร์โมน GIH ในเลือดจะเริ่มลดน้อยลง Y-organ จะถูกกระตุ้นให้ผลิต GSH เข้าในระบบเลือดเพื่อกระตุ้นการเจริญของรังไข่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hasegawa et al., (1993) ที่ทำการศึกษาฮอร์โมนที่ควบคุมการสืบพันธุ์ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย พบว่า แอมฟิพอด *Orchestia gammarella* ระบบสืบพันธุ์ทั้งของเพศผู้และเพศเมียถูกควบคุมด้วย Neurohormone ที่มาจากสมอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบในเลือด(haemolymph) ของสัตว์ในกลุ่ม crustacean

องค์ประกอบของเลือดแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ส่วนประกอบที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic components) และสารอินทรีย์ (organic components) (ประจวบ หล้าอุบล, 2537) ดังนี้

1. ส่วนประกอบที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic components)

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารอนินทรีย์ในเลือดของสัตว์ในกลุ่ม crustacea ที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดและน้ำเค็มในสารที่มีเหมือนกัน เช่น แคลเซียม จะพบว่า ในเลือดของ crustacea ที่อาศัยอยู่ในทะเลจะมีน้อยกว่ากลุ่มที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด แมกนีเซียมในเลือดของ crustacea ที่อาศัยอยู่ในทะเลจะมีมากกว่ากลุ่มที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด และโซเดียมในเลือดของ crustacea ที่อาศัยอยู่ในทะเลส่วนมากจะมีมากกว่ากลุ่มที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด (ประจวบ หล้าอุบล, 2537)

Chen and Chia (1997) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} ในเลือด กับขนาดและช่วงการลอกคราบ ของปูทะเล *Scylla serrata* เพศเมีย ที่มีขนาดกระดอง 101.1 ± 2.7 mm. และเพศผู้ที่มีขนาดกระดอง 109.7 ± 1.9 mm. จากการศึกษาพบว่า ระดับ Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} ในเลือด ของปูเพศผู้มีสูงกว่าในเพศเมีย และระดับ Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} ในเลือดจะสูงขึ้นเมื่อปูทะเลมีขนาดใหญ่ขึ้น และในช่วงก่อนการลอกคราบพบว่าระดับ Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} ในเลือดมีความเข้มข้นสูง และความเข้มข้นจะลดลงต่ำสุดหลังจากปูลอกคราบแล้ว

2. ส่วนประกอบที่เป็นสารอินทรีย์ (organic components)

สารอินทรีย์ที่ประกอบอยู่ในเลือดของสัตว์ในกลุ่ม crustacean ได้แก่ น้ำตาล ไขมัน และโปรตีน (ประจวบ หล้าอุบล, 2537)

2.1 องค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean

2.1.1 Haemocyanin

Haemocyanin เป็นสารที่ประกอบในระบบการหายใจ ซึ่งมีประมาณ 60-93% และ 64-84 % ของโปรตีนทั้งหมดใน haemolymph ในปูทะเล (Chen and Chia, 1997) Yoganandhan (2003) พบว่า ใน haemolymph ของ crustacean พบ hemocyanin ประมาณ 80-95% จากโปรตีนทั้งหมด

Roberto *et al.* (2002) พบว่า haemocyanin เป็นโปรตีนที่มี copper (Cu) เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นตัวที่ขนส่งออกซิเจนและเก็บออกซิเจนใน mollusca และ arthropod บางชนิด นอกจากนั้น Sellos *et al.* (1997) พบว่า haemocyanin ประกอบด้วยกรดอะมิโน 600-660 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 4.5×10^5 Da (Dalton) ซึ่งจะพบในกลุ่ม primitive crustacean เป็นส่วนใหญ่ เช่น *Penaeus setiferus* หรือ *Penaeus monodon* และนอกจากนั้นหน้าที่อันดับแรกของ haemocyanin คือ เป็นตัวขนส่งออกซิเจน และยังเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลายอย่างเกี่ยวกับกระบวนการทางสรีรวิทยา เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วย เช่น กระบวนการ osmoregulation และกิจกรรมของ enzyme Zhang *et al.* (2004) พบว่าใน haemolymph กุ้งจะพบโปรตีน 2 ตัว ตรวจสอบพบแถบที่มีมวลโมเลกุล 73 และ 75 kDa (Kilo Dalton) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

Alpuche *et al.* (2005) กล่าวว่า haemocyanin เป็นโปรตีนกลุ่มใหญ่ใน haemolymph ของ crustacean ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลายอย่าง หน้าที่หลักๆในการขนส่งออกซิเจน นอกจากนั้น haemocyanin ยังสามารถเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ phenoloxidase โดย reagent บางตัว ที่ประกอบด้วย perchlorate , trypsin และ sodium dodecyl sulfate (SDS) ทำหน้าที่ในการ กระตุ้น การแข็งตัวของเลือด และป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย haemocyanin ยังมีหน้าที่หลักในการทดแทน กลไกในการต้านทานจากความเครียด โดยการเพิ่มสารตัวกลางในกระบวนการหายใจ

Yoganandhan *et al.* (2003) พบว่าปริมาณของ haemocyanin ใน haemolymph หากมีความเข้มข้นของ haemocyanin มากพอก็จะลดการจำลองตัวเพิ่มจำนวนของไวรัส (Replication) ทำให้เชื้อไวรัสไม่เพิ่มจำนวนมากขึ้นจนส่งผลต่อสัตว์น้ำและทำให้เชื้อไวรัสหมด แต่ถ้ามีความเข้มข้นของ haemocyanin ไม่มากพอก็จะทำให้กุ้งที่ติดเชื้อตายได้ ถ้ามีความเข้มข้นของ haemocyanin อยู่ในระดับต่ำก็จะทำให้ปริมาณของออกซิเจนในเลือดลดลงตามลำดับ เนื่องจาก Cu ที่ประกอบอยู่ใน haemocyanin เป็นตัวจับและขนส่งออกซิเจนไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย ถ้ามีน้อย Cu ก็ส่งผลต่อสัตว์น้ำโดยทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ เครียด และมีภูมิคุ้มกันโรคต่ำ นอกจากนั้น haemocyanin ยังทำให้การเพิ่มจำนวนของไวรัส ใน cell line ของปลา ไม่เหมาะสมจึงทำให้ปริมาณของไวรัสลดลง

2.1.2 Vitellogenin

Vitellogenin เกิดขึ้นในระยะ vitellogenesis เป็นระยะที่มีการสร้างและสะสมไข่แดง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสารภายในนิวเคลียสออกสู่ไซโตพลาสซึม ระยะ vitellogenesis เป็นกระบวนการสำคัญซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเจริญของไข่ (Polylecithal egg) ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียซึ่งมีไข่ชนิดที่มีไข่แดงสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์จำนวนมาก (ดวงใจ ,2543)

กระบวนการสร้างและสะสมไข่แดง หรือ ไวเทลโลเจนีซิส (vitellogenesis) เป็นกระบวนการที่สำคัญซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเจริญของไข่ (oocyte) ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียซึ่งมีไข่ชนิดที่มีไข่แดงสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์จำนวนมาก (polylecithal egg) ไข่แดงประกอบด้วย น้ำ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารอาหารอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเอ็มบริโอ ส่วนประกอบของไข่แดงจะแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิดโปรตีนหลักที่สะสมในระหว่างกระบวนการสะสมไข่แดงของไข่ที่กำลังเจริญ คือ ไวเทลลิน (vitellin) หรือ ลิโปไวเทลลิน (Lipovitellin) ไวเทลลิน เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) จำนวน ตั้งแต่ 2 -11 หน่วยย่อย ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 40-200 kDa ขึ้นอยู่กับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนูญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของครัสตาเซีย จากรายงานการศึกษาในครัสตาเซียขณะที่รังไข่มีการเจริญจะตรวจพบโปรตีนในเลือดซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไวเทลโลเจนิน เรียกว่า ไวเทลโลเจนิน (vitellogenin) โดยจะพบเฉพาะในเลือดของเพศเมีย (female specific protein) ที่รังไข่กำลังมีการเจริญเท่านั้นไม่พบในเพศผู้และเพศเมียที่รังไข่ยังไม่มีการเจริญ และจากการศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของครัสตาเซียพบว่าทั้งชนิดที่สร้างภายในรังไข่เองและสร้างจากแหล่งอื่นนอกรังไข่ (heterosynthetic vitellogenesis) เช่น ตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง (subepidermal adipose tissue) จะมีการสร้างออกมาในรูปของไวเทลโลเจนิน หลังจากนั้นปล่อยออกสู่กระแสเลือดและถูกนำเข้าสู่ผสมในรังไข่ที่กำลังมีการเจริญในรูปของไวเทลโลเจนิน หรือ ไลโปไวเทลโลเจนิน

Tsutsui *et al.* (2000) ได้ติดตามแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินใน *Penaeus japonicus* โดยวิธี Northern blot และ *in situ* hybridization ด้วย mRNA ของไวเทลโลเจนินของกุ้งชนิดนี้ และได้แบ่งระยะการเจริญของรังไข่ตามค่าดัชนีรังไข่ (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) พบ mRNA ที่ code ไวเทลโลเจนินทั้งในเซลล์ฟอลลิเคิล และเซลล์ของตับ-ตับอ่อนของกุ้งเพศเมียที่อยู่ในระยะที่มีการสร้างและสะสมไวเทลโลเจนิน (vitellogenic female) และระดับของ mRNA ที่พบในรังไข่มีค่าสูงที่สุดในระยะที่ 2 และลดลงอย่างรวดเร็วในระยะที่ 3 และระยะที่ 4 ในขณะที่ในตับ-ตับอ่อนปริมาณ mRNA มีค่าเพิ่มสูงขึ้นในระยะที่ 2 จนกระทั่งถึงระยะที่ 3 และเริ่มลดลงในระยะที่ 4 แสดงว่ากุ้งชนิดนี้มีการสร้างไวเทลโลเจนินภายในรังไข่ก่อนที่จะมีการสร้างจากตับ-ตับอ่อน

2.1.3 Lipovitellin

lipovitellin หรือ vitellin เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (subunit) จำนวนตั้งแต่ 2 – 11 หน่วยย่อย เป็นโปรตีนที่สะสมในระหว่างกระบวนการสะสมไข่แดงของไข่ที่กำลังเจริญ โดยมีสารตั้งต้นเป็น vitellogenin ซึ่งจะพบในเลือดของเพศเมียที่รังไข่กำลังมีการเจริญเท่านั้น ไม่พบในเพศผู้และเพศเมียที่รังไข่ยังไม่เจริญ (Kerr, 1969) และนอกจากนี้ Kerr (1969) ยังพบว่าแหล่งแหล่งที่สร้าง vitellogenin ของครัสตาเซียมีทั้งที่สร้างภายในรังไข่ และสร้างจากแหล่งอื่นนอกรังไข่ เช่น ตับ ตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง จะมีการสร้างออกมาในรูปของ vitellogenin หลังจากนั้นปล่อยออกสู่กระแสเลือด และถูกนำเข้าสู่ผสมในรังไข่ที่กำลังเจริญในรูปของ vitellin หรือ lipovitellin

Rani and Subramonian (1997) ศึกษาแหล่งสร้างไวเทลโลเจนินของปูทะเล

Scylla serrata ซึ่งเป็นการศึกษาแบบ *in vivo* โดยใช้ ^{14}C phenylalanine เป็นตัวติดตามการสร้างไลเอกซารินเป็นเอกซารินที่ส่งนไวรัสสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปไวเทลลินในเนื้อเยื่อรังไข่ เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง เนื้อเยื่อตับ- ตับอ่อน และเลือด โดยเก็บเลือดและเนื้อเยื่อต่างๆมาตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ trichloroacetic acid จากนั้นนำโปรตีนไปแยกใน 3-MM Whatman chromatography paper disc (filter-paper disc method) และตรวจวัด isotope บนกระดาษโดย Liquid Scintillation Counter พบว่าเนื้อเยื่อรังไข่ เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และเนื้อเยื่อตับ- ตับอ่อน สามารถสร้างไวเทลโลเจินได้โดยขณะที่รังไข่มีการเจริญอยู่ในระยะที่ 1 พบว่าเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และ เนื้อเยื่อตับ- ตับอ่อน มีการสร้างไวเทลโลเจินในระดับที่สูงกว่าในรังไข่ ในการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 2 ระดับของ ^{14}C phenylalanine ในรังไข่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก ในขณะที่ในเลือดมีระดับ ^{14}C phenylalanine ลดลง ดังนั้นจึงสรุปว่า เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และ เนื้อเยื่อตับ- ตับอ่อน มีบทบาทในการสร้างและส่งมาตามกระแสเลือดเพื่อเข้าสู่ผสมเป็นไวเทลลินในรังไข่ Lee et al. (1996)

ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของรังไข่กับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ vitellogenin ใน haemolymph ของปูม้า พบว่า การเจริญของรังไข่ระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2 ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ vitellogenin ได้ แต่จะเริ่มวัดได้ในระยะที่รังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 3-6 ซึ่งปริมาณ vitellogenin ที่ตรวจวัดได้จะมีปริมาณต่ำ และจะค่อยๆเพิ่มขึ้น จากการศึกษาการเจริญของรังไข่โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีตรี แสดงให้เห็นว่าในช่วงการเจริญของรังไข่ในระยะที่ 1 และระยะที่ 2 จะไม่เกิดปฏิกิริยาทางอิมมูโนของ vitellin แต่จะพบในช่วงที่รังไข่เจริญในระยะที่ 3 - 6 และไม่พบปฏิกิริยาทางอิมมูโนของ vitellin ในส่วนของ hepatopancreas ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกันคือปูม้า *Callinectes sapidus* มีการสร้าง vitellin ภายใต้อวัยวะตัวเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็น

1 เพื่อศึกษาค่าหักเหแสงปูทะเลในช่วงการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่างๆ

1) สุ่มตัวอย่างปูทะเลเพศเมียจากพ่อค้าคนกลางในจังหวัดสตูล ตรัง กระบี่

นครศรีธรรมราช และ ชุมพร มาแหล่งละ 60 ตัว ทำการดูคัดเลือกปูทะเลที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 แล้วเก็บเลือดในหลอดเลือดที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวัดค่าหักเหแสงของเลือดในแต่ละระยะของการพัฒนารังไข่ด้วยเครื่อง salinometer บันทึกค่าการหักเหแสงของเลือดปูทะเลที่รังไข่เจริญในระยะเวลาต่างๆ

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

1) สุ่มตัวอย่างปูทะเลเพศเมียที่รังไข่พัฒนาครบ 4 ระยะ โดยแบ่งการพัฒนาของรังไข่ออกเป็น 4 ระยะตามวิธีของ Shanmugam and Bensam (1980) จากพ่อค้าคนกลางในจังหวัดสตูล ตรัง กระบี่ นครศรีธรรมราช และ ชุมพร มาแหล่งละ 80 ตัว ซึ่งนำหนักตัว และวัดขนาดความกระดอง(carapace width) ของปูทะเล วัดส่วนที่กว้างที่สุดของจับปีงปล้องที่ 5 กับความกว้างของฐานจับปีงระหว่างขาเดินคู่ที่ 5

$$FMI = \frac{\text{ที่กว้างที่สุดของจับปีงปล้องที่ 5}}{\text{ความกว้างของฐานจับปีงระหว่างขาเดินคู่ที่ 5}}$$

2) สุ่มตัวอย่างปูทะเลเพศเมียที่รังไข่พัฒนาครบ 4 ระยะ จากแต่ละแหล่งแล้วจำแนกการพัฒนาการของรังไข่ตามวิธีของ Shanmugam and Bensam (1980) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า บันทึกผลเพื่อนำค่าไปคำนวณหาค่าดัชนีการเจริญเติบโตของรังไข่ (Gonad Somatic Index)

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

3 เพื่อศึกษาหาระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนารังไข่ของปูทะเลแต่ละระยะ

- 1) สุ่มตัวอย่างปูทะเล(ดำ) *Scylla olivacea* จากระยะที่1 ถึงระยะที่4 มารยะละ 5 ตัว รวมทั้งหมด 20 ตัว คัดเลือกแม่ปูแต่ละระยะการพัฒนาของรังไข่โดยใช้ผลจากค่าดูกลืนแสงของเลือดและดัชนีความสมบูรณ์เพศในข้อ 12.1 ลงเลี้ยงถึงละ 1 ตัว ที่ระดับความเค็ม 30 ppt
- 2) สุ่มตัวอย่างปูทะเล(ขาว) *Scylla paramamosain* ระยะที่1 ถึงระยะที่4 มารยะละ 5 ตัว รวมทั้งหมด 20 ตัว คัดเลือกแม่ปูแต่ละระยะการพัฒนาของรังไข่โดยใช้ผลจากสีเลือดและดัชนีความสมบูรณ์เพศในข้อ 12.1 ลงเลี้ยงถึงละ 1 ตัว ที่ระดับความเค็ม 30 ppt

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3) บันที่ระยะเวลาที่แม่บู้ใช้ในการพัฒนารังไข่จากระยะที่ 1 ไปยังระยะที่ 2 ไปจนถึงระยะที่ไข่พัฒนาเต็มที่พร้อมปล่อยไข่ออกนอกกระดองของปูทะเลทั้งสองชนิด ซึ่งทำให้สามารถนำไปใช้จัดการในเพาะฟักลูกปูทะเลในโรงเพาะฟักได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการจัดการการเพาะฟักปูทะเลในเชิงพาณิชย์
- 4 **วิเคราะห์ผล และเขียนรายงานวิจัย**
- 5 **สถานที่ทำการทดลอง และหรือเก็บข้อมูล**
- 1) ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กทม.
 - 2) สถานที่ทำการศึกษาและวิจัยภาคสนามโดยเก็บตัวอย่างปูทะเลจากจังหวัดชายฝั่งอันดามัน ได้แก่ จังหวัดสตูล ตรัง กระบี่ จังหวัดฝั่งอ่าวไทย ได้แก่จังหวัดนครศรีธรรมราช และชุมพร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพที่ใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*)

จากการศึกษาระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเล (*Scylla spp.*) ที่จับจากธรรมชาติโดยทำการทดลองผ่าปูทะเลเพศเมียเพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วย สี , GSI (Gonad somatic index) , FMI (Female maturity index) , ค่าหักเหแสง และ ค่าดูดกลืนแสง ของเลือดปูทะเลเพศเมีย สีของเลือดปูทะเล (*Scylla spp.*) จากการทดลองพบว่าสีของเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะการเจริญของรังไข่ซึ่งในระยะที่ 1 เลือดจะมีสีน้ำตาลเทาๆ เนื่องมาจากว่าในเลือดของปูทะเลจะประกอบไปด้วย hemocyanin ซึ่งจะพบในปริมาณมากกว่าในระยะอื่นๆ และ vitellogenin ในเลือดมีปริมาณต่ำในขณะที่รังไข่เจริญอยู่ในระยะนี้จึงทำให้สีของเลือดในระยะที่ 1 จะมีสีน้ำตาลของ 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 จะมีสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากในระยะที่ 2 มีปริมาณของไวเทลโลเจนินเพิ่มมากขึ้นซึ่งไวเทลโลเจนินจะให้สารสีส้มออกมาจึงทำให้เห็นสีเลือดในระยะนี้เป็นสีน้ำตาลเข้ม ระยะที่ 3 เลือดของปูทะเลจะมีสีส้มอ่อนๆ เนื่องจากในระยะนี้ปริมาณของไวเทลโลเจนินจะเพิ่มสูงขึ้น และในระยะที่ 4 สีของเลือดปูทะเลจะมีสีส้มเข้มถึงส้มแดง เนื่องจากในระยะนี้จะมีปริมาณของไวเทลโลเจนินที่สูง ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สีของเลือดตามระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล *Scylla spp.*

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 , ค่าไม่ต่ำกว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.535±0.576 และ 10.642±0.696 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 2 และ 3) 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) ซึ่งได้ติดตามแหล่งสร้างไวเทลโลเจนิใน *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)

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 (ดังตารางที่ 1 และ 2) พบว่า ค่า FMI ของปูทะเลทั้งสองชนิดในระยะที่ 1, 2 , 3 และ 4 มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แสดงว่าค่า FMI ของทั้งสองชนิดในระยะที่ 1, 2 , 3 และ 4 ไม่มีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่

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 ค่าดูดกลืนแสงของปูทะเล (*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 ซึ่งจะพบว่าค่าหักเหแสงของปูทะเลทั้งสองชนิดจะมีค่าหักเหแสงเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ ปูทะเลและทั้งสองชนิดที่ระยะที่ 1, 2 , 3 และ 4 มีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แสดงว่าค่าดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล (ดังตารางที่ 1และ 2)

ค่าดูดกลืนแสงด้วยวิธี 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 ค่าดูดกลืนแสงของปูทะเล (*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 ซึ่งจะพบว่าค่าดูดกลืนแสงของปูทะเลทั้งสองชนิดจะมีค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ ปูทะเลและทั้งสองชนิดที่ระยะที่ 1, 2 , 3 และ 4 มีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ แสดงว่าค่าดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเล (*Scylla spp.*) (ดังตารางที่ 2 และ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพ กับ ระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย
(*Scylla olivacea*)

| ปัจจัย | ระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย | | | |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 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 |
| ค่าดูดกลืนแสง | 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)

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพ กับ ระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย
(*Scylla paramamosian*)

| ปัจจัย | ระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย | | | |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 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)

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ

การศึกษาหาปริมาณโปรตีนในเลือดของปูทะเลเพศเมียโดย Bradford technique ซึ่งก่อนการทำการหาปริมาณโปรตีนในเลือดปูทะเลจะต้องมีการทำ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 $p < 0.05$ แสดงว่าค่าดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาเจริญของรังไข่เช่นเดียวกันดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 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 ($P < 0.05$)

ตารางที่ 5 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 ($P < 0.05$)

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 5 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นอย่างชัดเจนว่าในหมายเลข 4 ของ PAGE ก็คือระยะที่ 4 มีแถบสีที่เข้มขึ้นก็หมายความว่า 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 ซึ่งก็สามารถที่จะจำแนกเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

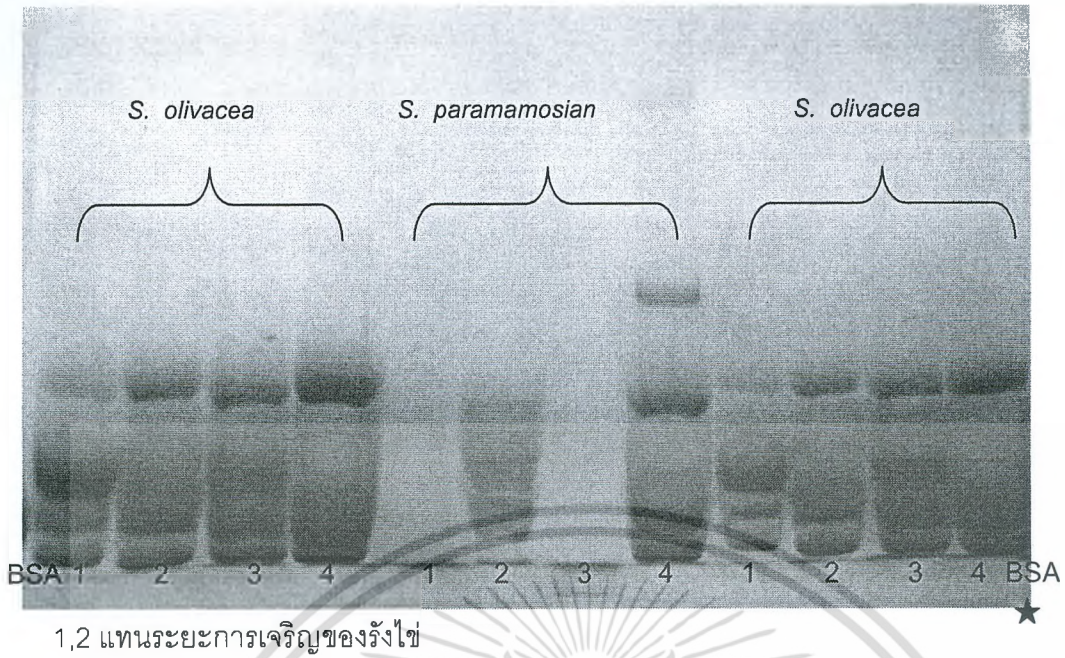
ชนิดได้และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกว่าสารที่แตกต่างกันนั้นเป็นสารตัวใด ซึ่งทำให้สามารถยืนยันได้ว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของปูทะเลมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของรังไข่ โดยที่เมื่อระยะการเจริญของรังไข่มากขึ้นก็จะพบปริมาณของโปรตีนมากขึ้นเช่นกันซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chang and Shih (1995) ได้ศึกษาปริมาณไวเทโลเจนนินในเลือดระหว่างการเจริญของรังไข่ของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* โดยเทคนิค ELISA ซึ่งได้แบ่งระยะการเจริญของรังไข่ออกเป็น 5 ระยะ พบว่าปริมาณไวเทโลเจนนินเริ่มวัดได้ตั้งแต่ระยะที่ 1 (1.82 mg/ml) และเพิ่มขึ้นใน ระยะที่ 2 (2.12 mg/ml) หลังจากนั้นมียกระดับคงที่อยู่ในระดับนี้จนถึงระยะที่ 4 (ระยะที่ 3 มีค่าเท่ากับ 2.05 mg/ml; ระยะที่ 4 มีค่าเท่ากับ 2.48 mg/ml) และมีระดับลดลงในระยะก่อนกุ้งวางไข่หรือกำลังวางไข่ (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 สีเลือดในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลได้



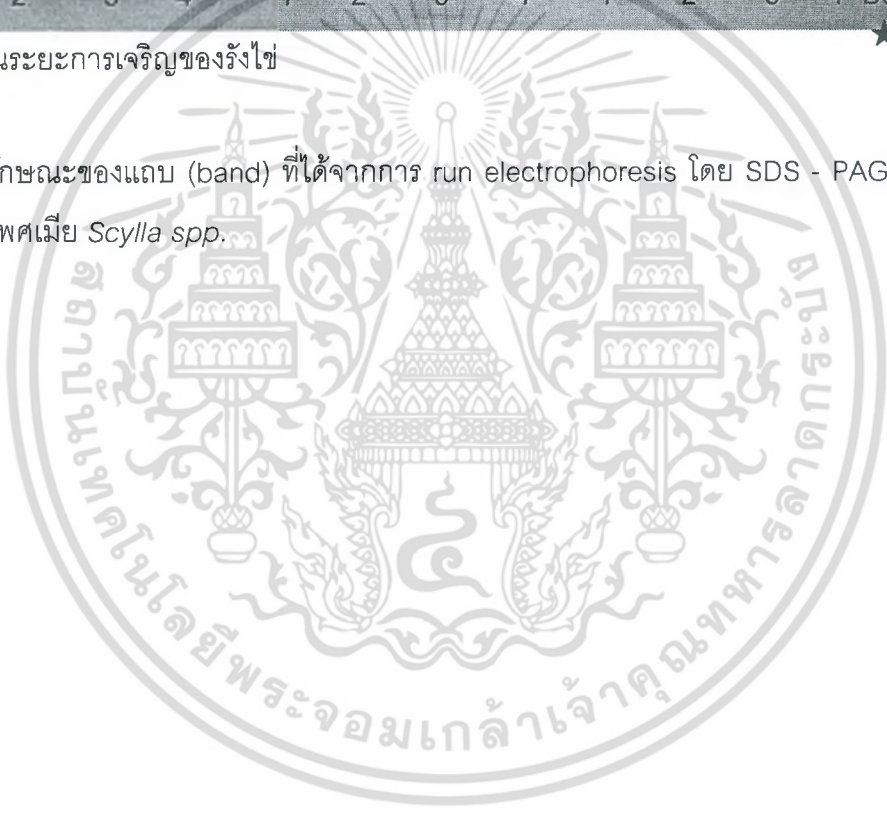
1,2 แถบระยะการเจริญของรังไข่

ภาพที่ 5 ลักษณะของแถบ (band) ที่ได้จากการ run electrophoresis โดย PAGE ของเลือดของปูทะเลเพศเมีย *Scylla spp.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 ลักษณะของแถบ (band) ที่ได้จากการ run electrophoresis โดย SDS - PAGE ของเลือดของปูทะเลเพศเมีย *Scylla* spp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford technique และนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโดย PAGE และ SDS-PAGE technique เพื่อยืนยันความเหมาะสมของดัชนีชี้วัดที่จะใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ปูทะเลเพศเมีย 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 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนพบว่าแถบของโปรตีนในแต่ละระยะมีความแตกต่างกันซึ่งความเข้มของแถบจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะการเจริญของรังไข่เพิ่มมากขึ้น จากการศึกษปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดจะพบว่าปริมาณของโปรตีนในเลือดจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะการเจริญของรังไข่เพิ่มมากขึ้น และองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดของปูทะเลมีการเปลี่ยนแปลงโดยพบว่าความเข้มของแถบจะเพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของโปรตีนในเลือดที่เพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของรังไข่ ค่าหักเหแสงและสีของเลือดของเลือดมีความสัมพันธ์กับปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนในเลือดตามระยะการเจริญของรังไข่ ดังนั้นค่าหักเหแสงของเลือดและสีของเลือดเป็นดัชนีที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่ของปูทะเลเพศเมีย เนื่องจากเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปูทะเลสามารถนำไปใช้ในการจัดการแม่พันธุ์ปูทะเลได้ แต่ในการใช้สีเลือดเกษตรกรต้องมีความชำนาญมากพอในการจำแนกระยะการเจริญของรังไข่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (References)

- ชลธี ชีวะเศรษฐกรรม. 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) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินที่เสถียรภาพ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ :หน้า11-22
- นวลมณี พงศ์ธนา, สุภาพ ไพโรพนาพงษ์, กฤตพล ยังวนิชเศรษฐ, เบญจพร สัมฤทธิ์เวช, เครือมาศ สมปอง และ อำนวย อุ่ณฤกษ์. 2546. โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตปูทะเลเชิงการค้า กรมประมง, กรุงเทพฯ. หน้า:2-3
- บุญช่วย เขียวทวี. 2515. การทดลองเลี้ยงปูทะเลในคอก และการเลี้ยงปูไซในกระชัง รายงานประจำปี 2515 สถานีประมงจังหวัดจันทบุรี กรมประมง, กรุงเทพฯ. 25 น.
- พีรพงษ์ เฉลิมวุฒิศักดิ์ 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
- อภิรดี ทิพย์เที่ยงแท้. 2548.การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ค่าหักเหแสงของเลือดเพื่อจำแนกการเจริญของรังไข่ปูทะเล (*Scylla olivacea*) ปัญหาพิเศษ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 19 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Derelle, E., Grosclaudet, 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., Umphey, 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
- 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