ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง การศึกษาองค์ประกอบของ granules secreation ที่พบใน spermatheca และ vagina ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla olivacea* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ โดยใช้เทคนิคทาง histochemistry และ histology

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

ชื่อนักศึกษา นางสาวกิตติยา สิงห์ทอง
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร. อนัญญา เจริญพรนิพัทธ
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.อรวรรณ สัตยาลัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....
(ดร. อนัญญา เจริญพรนิพัทธ)

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
(ผศ.ดร.อรวรรณ สัตยาลัย)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ 17 เดือน พ.ค. พ.ศ. 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

23014

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบของ granules secreation ที่พบใน spermatheca และ vagina ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla olivacea* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ โดยใช้เทคนิคทาง histology และ histochemistry

Histochemical and Histological study on chemical nature and chang in granule secretion found in spermatheca and vagina of female mud crab *Scylla olivacea* at different stages of ovarian development

T099283

โดย

นางสาวกิตติยา สิงห์ทอง

ว.ม.
ก670ก
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

b.11988265
i.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบของ granules secreation ที่พบใน spermatheca และ vagina ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla olivacea* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ โดยใช้เทคนิคทาง histology และ histochemistry

Histochemical and Histological study on chemical nature and chang in granule secretion found in spermatheca and vagina of female mud crab *Scylla olivacea* at different stages of ovarian development

การศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเลมักจะเป็นการศึกษาที่ให้ความสำคัญกับระยะการเจริญของรังไข่เป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ดี การศึกษาส่วนใหญ่มักอ้างว่าเมื่อมีการจับคู่ผสมพันธุ์ (copulation) ปูเพศผู้จะนำเสปิร์มที่บรรจุอยู่ในถุง spermatophore ผ่าน gonopod ของเพศผู้ เข้าไปใน gonopore ของเพศเมีย และเสปิร์มจะถูกเก็บไว้ที่ sperm receptacle หรือ spermatheca แต่จากการศึกษาของ ศรีวิไล ขนุนทอง (2549) ที่ได้ศึกษาลักษณะทางกายวิภาค และเนื้อเยื่อของ spermatheca และ vagina)กลับไม่พบเสปิร์มใน spermatheca แต่พบเสปิร์มใน vagina และยังพบว่าลักษณะทางกายวิภาคของ spermatheca และ vagina ของปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะที่ต่างกันมีลักษณะแตกต่างกัน เมื่อศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อพบว่า spermatheca เป็นถุงตันมีเพียงถุงเดียว ภายในถุง spermatheca มีท่อเล็กขดอยู่ภายใน ระหว่างท่อมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ(loose connective tissue) ท่อแต่ละท่อบุด้วย columna epithelium ซึ่งพบ granule ขนาดเล็ก ที่ติดสีชมพูเมื่อย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin และพบ granule ดังกล่าวใน มีการกระจายตัวอยู่ระหว่างท่อใน spermatheca และพบ granule ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใน spermatheca และพบ granule ดังกล่าวใน vagina จึงทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแกรนูลว่าประกอบด้วยชีวโมเลกุลพวกใดบาง โดยใช้เทคนิคทาง Histochemistry โดยใช้ Millon , Alcian Blue ที่ pH 2.5 และ Masson Trichrome Technique ผลการศึกษา Histochemistry พบว่า granule ให้ผลบวกกับ Millon's Technique สรุปได้ว่า granule มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ และยังให้ผลบวกกับ Alcian Blue Technique แสดงว่ามีองค์ประกอบของ acid mucopolyseccharide เป็นองค์ประกอบ นอกจากนั้นจากการย้อมด้วย Masson Trichrome Technique เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันก็ให้ผลเป็นบวก จากข้อมูลที่ค้นพบทำให้สันนิษฐานว่า spermatheca ของปูทะเลเพศเมีย *Scylla olivacea* ไม่น่าจะเป็นแหล่งเก็บเสปิร์ม แต่เป็นแหล่งผลิต secretion เพื่อช่วยให้เสปิร์มอยู่รอดใน vagina

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความอนุเคราะห์จากผู้ทรงคุณวุฒิหลายท่านที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงต่อผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ สัตยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอาจารย์ ดร. อนัญญา เจริญพรนิพัทธ ที่ให้ความสนับสนุนในทุกๆด้าน รวมทั้งช่วยแก้ไขข้อบกพร่องตั้งแต่เริ่มแรกของการทำปัญหาพิเศษจนกระทั่งสำเร็จเรียบร้อยทุกประการ

ขอขอบคุณ คุณสิทธิพล อินทรพัฒน์ คุณกฤษฎา คธาวุธผูนพันธ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์แนะนำเทคนิคในการทำสไลด์เนื้อเยื่อ การถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์รวมถึงการช่วยเหลือและคำแนะนำอื่นๆที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาครั้งนี้

ขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและสถานที่ที่ใช้ในการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ขอบคุณณีลนา คำโหลน ที่ให้ความช่วยเหลือเรื่องคอมพิวเตอร์และเพื่อนๆทุกคนในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดการทำการทดลอง

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และพี่ๆ ที่ให้ความรัก ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

นางสาว กิตติยา สิงห์ทอง

เมษายน 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลการทดลอง	16
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
ข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการทดสอบโปรตีนด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย Sylla *olivacea* ในแต่ละระยะรังไข่	18
2	ผลการทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย Sylla *olivacea* ในแต่ละระยะรังไข่	19
3	ผลการทดสอบโปรตีนด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี(Histochemistry) ของ oviduct ในปูทะเลเพศเมีย Sylla *olivacea* ในแต่ละระยะรังไข่	19
4	ผลการทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry)ของ oviduct ในปูทะเลเพศเมีย Sylla *olivacea* ในแต่ละระยะรังไข่	20

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1	40
2	ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 2	41
3	ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 3	42
4	ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 4	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปูทะเลเพศเมีย	3
2	ความแตกต่างระหว่างเพศของปูทะเล โดยอาศัยลักษณะของจับปิ้ง (abdomen) ของปูเพศเมียและเพศผู้ ที่แตกต่างกัน	4
3	ตำแหน่งของ spermatheca	6
4	ตำแหน่งของ oviduct	7
5	การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของ spermatheca ของปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ	23
6	การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของ oviduct ของปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ	24
7	ลักษณะทางเนื้อเยื่อ spermatheca ในปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆ ที่กำลังขยาย (10 X)	25
8	การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของ oviduct ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆที่กำลังขยาย (10X)	26
9	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ spermatheca ย้อมสีด้วยเทคนิค Millon	27
10	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ oviduct ย้อมด้วยเทคนิค Millon	28
11	ลักษณะเนื้อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ spermatheca ย้อมด้วยเทคนิค Masson trichrome	28
12	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ oviduct ย้อมด้วยเทคนิค Masson trichrome	29
13	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ spermatheca ย้อมด้วยเทคนิค Alcian blue	29
14	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ oviduct ย้อมด้วยเทคนิค Alcian blue	30
15	การอยู่ร่วมกันของ granule secretion , sperm และ secretion ใน	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	spermatheca (ภาพ ก) และ oviduct (ภาพ ข)	
16	ลักษณะของ collagen ที่อยู่รอบ sperm ใน oviduct ที่ย้อมด้วยเทคนิค Masson Trichrome	32
17	โครงสร้างการสืบพันธุ์ของปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea*	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปูทะเล(*Scylla* spp.) เป็นทรัพยากรประมงที่พบว่ามีแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในป่าชายเลนตั้งแต่ชายฝั่งทะเลทางด้านตะวันออกของอาฟริกา อินโด-แปซิฟิก มัลดีฟ ฟิจิ ศรีลังกา อินเดีย บังคลาเทศ เมียนม่า ไทย เขมร เวียดนาม มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย จนถึงหมู่เกาะ คาโรไลน์ มหาสมุทรแปซิฟิก จีน และ โอกินาวา และ ทะเลสาบ ฮามานา ในประเทศญี่ปุ่น สำหรับในประเทศไทย พบการแพร่กระจายและการอาศัยของปูทะเลกระจายอยู่ทั่วไปตลอดแนวชายฝั่ง ทั้งทะเลด้านอ่าวไทยและอันดามัน โดยจะพบปูทะเลชุกชุมบริเวณหาดโคลนหรือเลน ที่มีป่าแสมและโกงกางขึ้นอยู่ เป็นบริเวณที่เป็นแหล่งน้ำกร่อยและปากแม่น้ำที่มีน้ำทะเลท่วมถึง ปูทะเลเป็นทรัพยากรประมงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของการทำการประมง ซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงปูทะเลได้โดยตรง และถ้ายังมีการจับปูทะเลขึ้นมาบริโภคโดยตรงจากธรรมชาติและไม่มีการเพาะพันธุ์เพื่อทดแทนทำให้เสี่ยงต่อการสูญพันธ์ของปูทะเลเป็นอย่างมาก ปัญหาพิเศษฉบับนี้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเล การศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียน (Crustacean) ส่วนใหญ่ในการศึกษาจะทำการศึกษาเกี่ยวกับระยะการเจริญของรังไข่ โดยสรุปการเปลี่ยนแปลงของขนาด สี รูปร่างของรังไข่ ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของจับปิ้ง และพบว่าลักษณะดังกล่าวไม่สามารถใช้เป็นดัชนีในการกำหนดความสมบูรณ์เพศได้ชัดเจน จากการรายงานในปูทะเล (Marine crab) ชนิดต่างๆพบว่าการสร้างไข่และการเจริญของรังไข่ (Oogenesis and ovarian development) ในปูเพศเมียจะเกิดเมื่อปูเพศเมียมีการลอกคราบครั้งสุดท้ายเพื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ และได้รับการผสมพันธุ์จากเพศผู้ sperm จะบรรจุอยู่ในถุงบรรจุ sperm (spermatophore) ซึ่งปูเพศผู้จะนำไปไว้ในท่อของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย(Female reproductive duct) โดยผ่าน gonopod ของปูเพศผู้ซึ่งจะสอดเข้าไปใน gonopore ของปูเพศเมียซึ่งอยู่ทางด้านล่าง(ventral) ของช่วงหัวต่อออก (cephalothorax) โดยส่วนใหญ่ระบุเพศเมียจะเก็บ sperm ไว้ในถุงรับและเก็บ sperm (spermatheca) หรือ sperm receptacle ซึ่งมีเป็นคู่มักจะมีช่องเปิดสู่ท่อของระบบสืบพันธุ์เพศเมียอย่างไรก็ดี จากการศึกษาของศรีวิไล ขนุขทอง (2549) ซึ่งเป็นการศึกษาระบบสืบพันธ์ของปูทะเลโดยการศึกษาการเจริญของรังไข่ในระยะต่างโดยการศึกษาทาง historogy พบว่า spermatheca มีลักษณะเป็นถุงผนังบาง ภายในมีท่อขดไปมาอยู่สารนอกเซลล์ และพบเซลล์ของท่อใน spermatheca มี granule ย้อมติดสี Eosin เป็นสีชมพู และพบ granule สะสมอยู่ในพื้นที่ระหว่างท่อ (Extracellular space) ทั้งยังสามารถพบ granule ลักษณะเดียวกันใน vagina ด้วย จึงสนใจศึกษาว่า granule ดังกล่าวมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารพวกใด โดยจะใช้เทคนิคการย้อมสีด้วยวิธี Histochemistry การศึกษาโดยการผ่าตัดเปิดกระดองของทะเลเพศเมีย Scylla olivacea บันทึกระยะการเจริญของรังไข่ศึกษาลักษณะทางกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิภาคของ spermatheca และ vagina จากนั้นนำ spermatheca และ vagina มาทำให้คงสภาพใน Davidson's fixative นำเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการเพื่อทำ paraffin section ตัด section ที่ความหนา 6 µm section ของเนื้อเยื่อที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆส่วนหนึ่งนำมาย้อมสีด้วย Hematoxylin & Eosin และอีกส่วนหนึ่งนำมาย้อมเพื่อตรวจหาโปรตีนโดยใช้ Millon Technique และ Ninhydrin Technique ตรวจหาคาร์โบไฮเดรตโดยใช้ Periodic Acid Schiff's Technique และ Alcian Blue Technique ที่ pH 2.5 และ 3 เพื่อตรวจหา mucopolysaccharide และย้อมด้วย Masson Trichrome เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จากลักษณะทางเนื้อเยื่อของ spermatheca พบ sperm น้อยมาก แต่พบ granule ที่มีการรวมตัวเป็น platelet สะสมในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน Spermatheca ของตัวเมียที่มีรังไข่ระยะต่างกันมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ granule และ platelet ที่สะสมในเนื้อเยื่อเกียวพัน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนในเนื้อเยื่อของ vagina อย่างไรก็ดีพบทั้ง granule และ platelet อยู่ร่วมกับ sperm ที่อัดตัวแน่นอยู่ใน vagina การย้อมสีทาง Histochemistry เพื่อจะนำมาประเมินบทบาทของ granule ต่อ sperm ที่อยู่ภายในท่อของระบบสืบพันธุ์ของปูทะเลเพศเมีย Scylla olivacea

วัตถุประสงค์

1. เพื่อลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา (histology) ของ spermatheca และ vagina ในปูทะเลเพศเมีย *Scylla olivacea* ที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆ

2. เพื่อศึกษาว่า granules secretion ที่พบใน spermatheca และ vagina ในปูทะเล *Scylla olivacea* ประกอบด้วย biomolecular กลุ่มใด โดยใช้เทคนิคทาง histochemistry

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

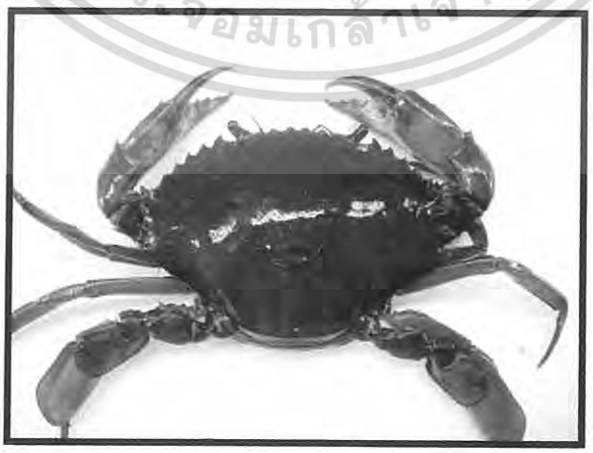
ตรวจเอกสาร

1.อนุกรมวิธานของปูทะเล Scylla *olivacea*

ปูทะเลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Scylla serrata* (Forskal,1775) มีชื่อสามัญเรียกทั่วไปว่า Mud crab หรือ Mangrove crab เพราะแหล่งที่สามารถพบปูทะเลได้เป็นจำนวนมากคือป่าชาย จึงเรียกชื่อตามแหล่งที่พบ Keenan *et al.*(1983) กล่าวว่าปูทะเลใน Genus *Scylla* สามารถจำแนก 4 ชนิดได้แก่ *S. serrata, S. tranguebarica, S. olivacea* และ *S. paramamosian*

Phylum	Arthropoda
Superclass	Crustacea
Class	Malacostaca
Subclass	Eumalacostraca
Superorder	Eucarida
Order	Decapoda
Suborder	Plecyemata
Infraorder	Brachyura
Section	Brachyrhyneha
Superfamiry	Portunoidea
Family	Portunidae
Genus	Scylla
Species	*serrata* , *tranqeubarica* *olivacea*, *paramamosian*

2.ลักษณะทางสัณฐานวิทยา



ภาพที่1 ปูทะเลเพศเมีย *S.olivacea*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 ลักษณะทั่วไปของปูทะเล

ปูทะเลมีส่วนประกอบของร่างกาย เป็นส่วนหัวรวมกับส่วนอกเรียกว่า cephalothorax ซึ่งส่วนของ cephalothorax จะมีกระดองหุ้มไว้ ส่วนทางด้านท้องของปูได้มีวิวัฒนาการโดยการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแผ่นๆบางๆเรียกว่า จับปิ้ง ซึ่งจับปิ้งสามารถใช้เป็นตัวแยกเพศของปูได้ โดยการดูจากลักษณะภายนอก โดยจับปิ้งจะพับอยู่ใต้กระดองซึ่งเป็นอวัยวะที่อุ้มพยุงไข่ของแม่ปู(ในระยะไข่นอกกระดอง) ปูดำ หรือ ปูแดง Scylla *olivacea* ในประเทศไทยพบได้ในจังหวัด ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา ปัตตานี นราธิวาส ระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง และ สตูล โดยปูดำมีลักษณะดังนี้ สี กระดองด้านบนสีน้ำตาลปนเขียวหรือน้ำตาลปนเทา มีจุดขาวหม่นเล็กน้อย บริเวณปากสีฟ้า-เขียว ครึ่งบนด้านหน้าของก้ามไม่มีจุดสี ครึ่งล่างด้านหน้าของก้ามสีน้ำตาล น้ำตาลแดงหรือแดง ขาว่ายน้ำสีน้ำตาลเขียว มีลายร่างแหไม่ชัดเจน หนามคู่กลางที่ขอบกระดองระหว่างช่องตามีลักษณะมนป้าน มีฐานกว้าง หรือครึ่งวงกลม หนามอันกลาง (middle carpus spine) บนด้านนอกของปล้องกลาง (carpus) ของก้ามไม่เด่นชัด หรือจะมีก็เพียงร่องรอยหรือแผล

2.2 ลักษณะแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย

ลักษณะความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียนั้นสามารถดูได้จากลักษณะภายนอกได้ โดยดูจากลักษณะของจับปิ้ง (abdomen) โดยปูทะเลเพศผู้มีส่วนจับปิ้งเรียวเล็กเป็นรูปสามเหลี่ยม แต่ในเพศเมียจับปิ้งจะขยายกว้างออก จนเกือบเต็มปิดด้านท้องของทรวงอก ลักษณะของก้ามหนีบ (chela) ของปูทะเลเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย โดยปูจะมีก้ามหนีบไว้เพื่อป้องกันตัว หาอาหร จับเหยื่อ และมีไว้สำหรับจับปูเพศเมียขณะที่มีการผสมพันธุ์ (ชลธี,2539) ดังภาพที่ 2

เพศเมีย **เพศผู้**

ภาพที่ 2 ความแตกต่างระหว่างเพศของปูทะเล โดยอาศัยลักษณะของจับปิ้ง (abdomen)ของปูเพศเมียและเพศผู้ ที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูทะเล (Reproductive biology of mudcrab)

3.1 พฤติกรรมการผสมพันธุ์ (Mating Behavior)

Lanteigne et al. (1996) กล่าวว่าพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของสัตว์ใน Infraorder Brachyura สามารถแยกได้ 2 แบบหลักๆคือ 1. สืบพันธุ์ในขณะที่ตัวเมียมีเปลือกหรือกระดองที่แข็ง ซึ่งการสืบพันธุ์แบบนี้จะไม่คำนึงถึงรอบของการลอกคราบของตัวเมีย 2. สืบพันธุ์ในขณะที่ตัวเมียมีเปลือกหรือกระดองที่อ่อนนุ่ม ซึ่งการสืบพันธุ์แบบนี้จะเกิดปัญหาที่ต้องคำนึงถึงคือระยะเวลาที่มีจำกัดในการผสมพันธุ์ ต้องมีการผสมพันธ์ก่อนที่เปลือกหรือกระดองจะแข็ง ส่วนความสมบูรณ์ทางเพศของปูทะเลเพศเมียดูได้จากลักษณะของส่วนท้อง (Abdomen) โดย ชูชาติ (2531) แบ่งลักษณะส่วนท้องออกเป็น 3 ระยะ คือ ปูทะเลเพศเมียขั้นที่ 1 (Female Crab Stage 1) ลักษณะของส่วนท้องเป็นรูปสามเหลี่ยม ส่วนปูทะเลเพศเมียขั้นที่ 2 (Female Crab Stage 2) ส่วนท้องมีขนาดใหญ่ขึ้นและขอบมีลักษณะโค้งออกคล้ายรูปห้าเหลี่ยม และปูทะเลเพศเมียขั้นที่ 3 (Female Crab Stage 3) ซึ่งสมบูรณ์ทางเพศแล้ว ขอบของส่วนท้องมีลักษณะโค้งออกคล้ายวงกลม และปูทะเลเพศเมียจะสามารถผสมพันธุ์ได้เมื่อลอกคราบแล้วเป็นเพศเมียขั้นที่ 3 (Jensen et al.) Leo และ Wei (1986) กล่าวว่าปูทะเลสามารถผสมพันธุ์ได้ภายในเวลา 1 ปี Diesel(1989) ได้ศึกษาการผสมพันธุ์ของ spider crab ว่ามีการผสมพันธุ์ถึง 7 ครั้งหรือมากกว่า ก่อนที่จะมีการผสมพันธุ์ปูทะเลเพศเมียจะมีการปล่อยสารเคมีจำพวกฟีโรเมน (pheromone) ออกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก เพื่อดึงดูดความสนใจต่อปูเพศผู้ให้มาเกี่ยวพาราสีและจับคู่ผสมพันธุ์กัน การผสมพันธุ์ของปูทะเลเป็นการปฏิสนธิภายใน (internal fertilization) ซึ่ง Jensen(1996) รายงานว่าสัตว์ที่มีการปฏิสนธิภายใน ตัวเมียจะมีโครงสร้างที่มีหน้าที่เก็บ sperm ของตัวผู้ Klepal *et al.*(1972) พบว่า spermatozoa ออกมาจาก penis ซึ่งสันนิษฐานว่ามาพร้อมกับ secretion ซึ่งคาดว่าจะปล่อยออกมาจาก penial gland cell หลังจากนั้น spermatozoa เคลื่อนที่ช้าๆเข้าสู่ oviduct ของเพศเมีย และ เมื่อปูทะเลผ่านการผสมพันธุ์เรียบร้อยแล้วปูทะเลเพศเมียยังคงนอนอยู่ใต้ลำตัวของปูทะเลเพศผู้อยู่หลายวัน เพื่อต้องการให้ปูทะเลเพศผู้ช่วยป้องกันภัยให้ระหว่างปูทะเลเพศเมียอ่อนแอและรอจนกว่ากระดองที่ผ่านการลอกคราบนั้นเริ่มแข็งแล้วจึงแยกออกจากกัน

3.2 ระดับการเจริญของรังไข่ของปูทะเล

Poovachiranon (1991) แบ่งระยะรังไข่เป็น 4 ระยะ คือ ระยะที่ 1 รังไข่ยังไม่พัฒนา มีลักษณะโปร่งใส ระยะที่ 2 รังไข่มีการพัฒนาขึ้น มีสีครีม หรือสีเหลือง กินเนื้อที่ 1/4 ของพื้นที่ digestive gland ส่วนระยะที่ 3 รังไข่มีสีเหลือง หรือสีส้ม มีขนาดใหญ่กินเนื้อที่ 1/2 ถึง 3/4 ของพื้นที่ digestive gland และ ระยะที่ 4 รังไข่มีสีส้ม-แดง ปรากฏ seminal receptacles เด่นชัดขึ้น แต่ในการศึกษาของ Lanteigne et al.(1996) แบ่งการเจริญของรังไข่เป็น 3 ระยะคือ immature, premature และ mature ซึ่งในระยะ immature มีรังไข่สีขาวปูยังไม่มีการลอกคราบ ระยะ

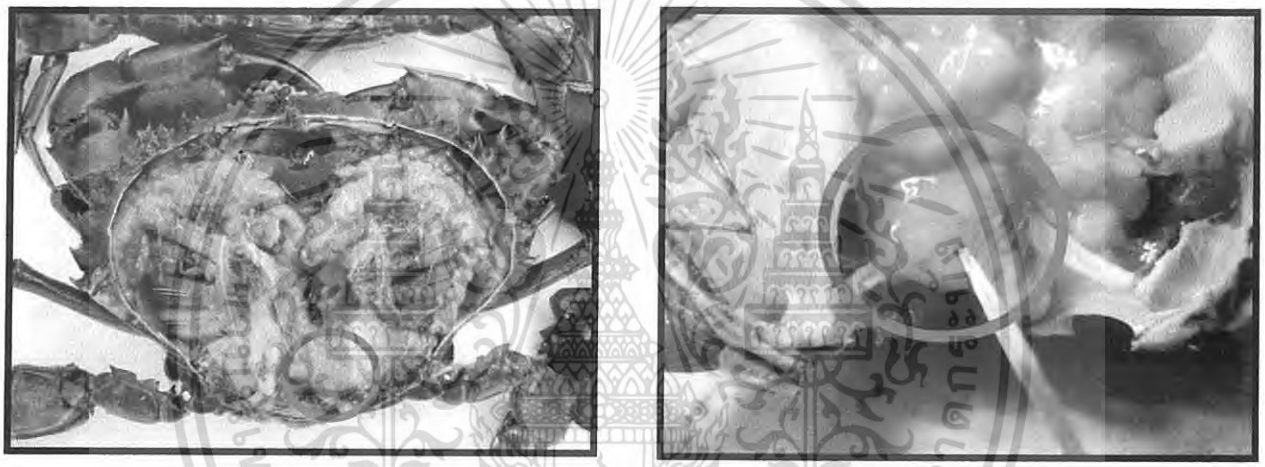
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

premature รังไข่มีสีส้ม ใกล้จะมีการลอกคราบ ระยะ mature หลังการลอกคราบ สีของรังไข่สีส้มแดงมาก สุรชาตและสินธุวัฒน์ (2539) กล่าวว่า ปูทะเลเพศเมียมีความสมบูรณ์พร้อมที่จะได้รับการผสมพันธุ์กับน้ำเชื้อจากปูทะเลเพศผู้มากที่สุด คือ มีความสมบูรณ์ในระยะที่ 4 ซึ่งพบมากในเดือนพฤษภาคม

3.2 อวัยวะที่สำคัญในการสืบพันธุ์ของปูทะเลเพศเมีย

Lee และ Yamazaki (1990) กล่าวว่าในระบบสืบพันธุ์เพศเมียประกอบด้วยลักษณะเป็นท่อแบ่งเป็น 4 ส่วนคือ oviduct,spermatheca,vagina และ ovary มีลักษณะต่อกันเป็นท่อยาวเชื่อมถึงกัน โดยในปัญหาพิเศษฉบับนี้จะกล่าวถึงอวัยวะที่สำคัญ 2 อวัยวะคือ spermatheca และ vagina

3.2.1 spermatheca



ภาพที่ 3 ตำแหน่งของ spermatheca

ลักษณะของ spermatheca ของปูทะลเพศเมีย Scylla olivacea มีลักษณะลักษณะเป็นถุงแบนกลมมองจากภายนอกเห็นมีแถบขุ่น ซึ่งปรากฏมากน้อยขึ้นกับระยะการเจริญของรังไข่ spermatheca มีความยาวประมาณ 19 มิลลิเมตร กว้าง 8 มิลลิเมตร (LeeและYamazaki,1990) Beninger et al(1993) กล่าวว่า spermatheca ของ brachyuran มีลักษณะเป็นต่อม แบ่งเป็น 2 โครงสร้าง คือ dorsal region และ ventral region ซึ่งต่อมา Jensen et. al.(1996) กล่าวว่าปูทะเลที่พบว่า spermatheca อยู่ทางด้าน dorsal คือ ปูทะเลในครอบครัว Portunidae และ Pilumnidae ซึ่งปูทะเล Scylla olivcea เป็นปูในครอบครัว Portunidae ก็จะมีspermatheca อยู่ทางด้าน dorsal เช่นกัน และมีการคาดเดาว่าปูทะเลในครอบครัว Cancridae น่าจะมี spermatheca อยู่ทางด้าน dorsal ส่วนปูที่พบว่ามี spermatheca อยู่ทางด้าน ventral คือปูในครอบครัว Calappidae ,Geryonidae ,Leucosiidae, Parthenopidae , Parathelphusidae , Corystidae ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ocypodidae , Majidae และ Menippidae Gurriaran *et al.* (1998) รายงานว่า ปูเพศเมีย spider crab *(Maja squinado)* จะเก็บสเปิร์มไว้ใน spermatheca พร้อมที่จะผสมก่อนการวางไข่ และยังพบอีกว่า ปูเพศเมียที่ยังไม่เข้าวัยเจริญพันธุ์จะไม่มีการพัฒนาของ spermatheca ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าไม่สามารถสืบพันธุ์ได้จนกว่าจะถึงวัยเจริญพันธุ์

3.2.2 Vagina

ภาพที่ 4 ตำแหน่งของ Vagina

(Lee และ Yamazaki,1990) ลักษณะของ oviduct มีลักษณะเป็นท่อสั้นๆ เป็นทางเชื่อมต่อระหว่าง ovary กับ spermatheca โดย oviduct มีความยาวประมาณ 4.1 มิลลิเมตร Beninger *et al.*(1988) กล่าวว่าภายใน oviduct พบว่ามีเสปิร์มเป็นจำนวนมากแต่พบว่ามีการตายไปบางส่วนเมื่อระยะเวลาผ่านไป

4.เนื้อเยื่อวิทยา (Histology)

การศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา เป็นการศึกษาที่สามารถใช้อธิบายลักษณะและโครงสร้างของอวัยวะได้ชัดเจนมากขึ้น เป็นการอธิบายลักษณะที่เราไม่สามารถมองเห็นได้โดยลักษณะภายนอก ในการทำการศึกษาทางด้านเนื้อใช้เป็นตัวอธิบายลักษณะต่างของอวัยวะที่เปลี่ยนแปลงได้

4.1 ลักษณะทางเนื้อวิทยาของ spermatheca

Lanteigne et al.(1996) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางเนื้อวิทยาของ spermatheca โดยแบ่งตามลักษณะการเจริญของรังไข่คือ immature,prematureและ mature โดยระยะ mature แบ่งเป็น ก่อนการผสมพันธุ์และหลังการผสมพันธุ์ โดยพบว่า ในระยะ immature พบว่ามี columnar epithelium ไม่พบ secretion ใน lumen ในระยะ premature มีการสร้างเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

columnar epithelium ขึ้นมาทดแทนเซลล์ที่ถูกปล่อยออกไป พบ secretion ใน lumen ที่ถูกผลิตจาก columnar epithelium ถุงspermatophore มีการเจริญที่ดี ในระยะ mature ก่อนที่จะมีการผสมพันธุ์ พบว่า columnar epithelium เกือบทั้งหมดหายไป มีการพัฒนาเซลล์ columnar epithelium ที่เป็นหลายๆชั้น ใน lumen ถุงมีการเจริญที่ดีขึ้น ระยะ mature หลังมีการผสมพันธ์แล้ว ผนังของ spermatheca บางลง ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ spermatheca Beninger et al(1993) กล่าวว่า spermatheca ของ brachyuran มีลักษณะเป็นต่อม แบ่งเป็น 2 โครงสร้าง คือ dorsal region และ ventral region โดยด้านของ dorsal ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2 ชั้น ชั้นนอกมีลักษณะเป็นท่อพับไปมา เป็นเนื้อเยื่อประสาน (connective tissue) และชั้นในเป็น glandular epithelium โดยชั้นนี้จะมีปริมาณของsecretion ในปริมาณมาก

4.2 ลักษณะทางเนื้อวิทยาของ Vagina

ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ Vagina มีลักษณะเป็นท่อแฟบ ประกอบด้วย chitinous ที่ค่อนข้างหนา chitinous ที่ผนังเซลล์จะมีลักษณะบางๆหยืดหยุ่นได้ และ Beninger et al(1993) กล่าวว่า Vagina ประกอบด้วย columnar epithelium ถูกล้อมรอบด้วยไฟเบอร์ที่มีลักษณะเป็นกล้ามเนื้อเรียบฝังอยู่อย่างหลวมๆใน เนื้อเยื่อประสาน (connective tissue) แล้วพบปริมาณของ secretion เช่นเดียวกับที่พบใน spermatheca ซึ่งเขากล่าวว่า เซลล์ columnar epithelium สามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่สามารถผลิตสาร secretionได้ คือเป็น secretory cell

5. ลักษณะเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry)

การศึกษาระบบสืบพันธุ์ของปูทะเลเพศเมีย มีการทำการศึกษาทางด้านกายวิภาค และทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา แต่จากผลทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาไม่สามารถบอกได้ว่า ลักษณะของสารที่สังเกตเห็นได้เป็นสารในกลุ่มใด การทำการทดสอบเนื้อเยื่อทางด้านเคมีจะมีบทบาทเข้ามาช่วยในการบ่งบอกได้ว่าสารที่สังเกตได้เป็นสารประกอบในกลุ่มใด เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน หรืออื่นๆ โดยการใช้คุณสมบัติทางเคมีเข้ามาเป็นตัวแยกสารที่ต้องการศึกษา การศึกษาของ Lanteigne et. Al.(1996) ใช้เทคนิคทาง Histochemistry เข้ามาในการตรวจสอบองค์ประกอบภายในเนื้อเยื่อ ของ spermatheca, ovary และ oviduct โดยใน spermatheca แบ่งเป็น dorsal region และ ventral region โดยศึกษา บริเวณ columnar epithelium และ lumen ว่าเป็นสารในกลุ่มใด โดยเขาใช้เทคนิค Sudan black ในการตรวจสอบสารในกลุ่มของ ไขมัน , ใช้เทคนิค Orange G ในการทดสอบสารในกลุ่มของ Amine, เทคนิค Periodic acid Schiff (PAS) ในการทดสอบสารในกลุ่ม Neutral mucopolysaccharide และใช้เทคนิค Alcian blue ในการทดสอบสารในกลุ่ม Acid mucopolysaccharide เช่นเดียวกับการศึกษาของ Beninger et al(1993) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า columnar epithelium ในบริเวณ spermatheca และ oviduct ให้ผลที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นบวกต่อ เทคนิค PAS , Alcian blue และ Orange G สามารถบอกได้ว่า columnar epithelium มีส่วนประกอบของสารทั้ง โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ส่วนใน ovary พบสารในกลุ่มของ ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต เพราะให้ผลบวกต่อ Sudan black, Orange G, Periodic acid Schiff (PAS) และ Alcian blue Diesel(1989) กล่าวว่าในปู *Chionoecetes opiloi* พบว่ามีองค์ประกอบของ คาร์โบไฮเดรตและโปรตีน ใน columnar epithelium บนพื้นฐานการย้อม PAS และใช้ Alloxan-Schiff ตามลำดับ ซึ่งการใช้เทคนิคทางเคมีเข้ามาช่วยแยกสาร ชีวโมเลกุลทำให้สามารถทราบองค์ประกอบในเนื้อเยื่อที่เราต้องการได้ว่ามีองค์ประกอบของสารกลุ่มใดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

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

สารเคมี

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. Sulfuric acid conc
15. Sodium nitrite
16. Acid fuchsin :HARTMAN
17.Glacial acetic acid :MERCK
18.Phosphomolybdic acid
19. Methyl blue
20.Periodic acid :BDH
21.Basic fuchsin :SERVA
22.Potassium metabisulfite
23.Activated charcoal :BDH
24.Ninhydrin
25.98 % formic acid
26. Alcian blue:BDH
27.Hydrogen peroxide

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ปูทะเลเพศเมีย *S.olivacea* (ภาพที่ 1) ที่มีการเจริญของรังไข่ระยะที่ 1 ถึง ระยะที่ 4

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยดังนี้

1.นำตัวอย่างปูทะเลเพศเมียที่รับซื้อมาจากชาวประมงเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ spermatheca และ vagina ในแต่ระยะของการเจริญของรังไข่ นำปูทะเลมาทำให้สลบโดยการแช่ในน้ำแข็ง

2.ผ่าตัดเปิดกระดองด้าน dorsal บันทึกระยะการเจริญของรังไข่ ลักษณะของ spermatheca และ vagina

3.ผ่าตัดนำ spermatheca และ vagina มาทำให้คงสภาพโดย Fix ใน Davidison's Fixative นานประมาณ 18-24 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และต้องเปลี่ยนแอลกอฮอล์ที่ใช้เก็บรักษาเนื้อเยื่อทุกๆ 2 สัปดาห์แล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histology) และ histochemistry ดังนี้

3.1การกำจัดน้ำ(dehydration) โดยนำเนื้อเยื่อแช่ใน ethyl alcohol 90เปอร์เซนต์ นาน 6 ชั่วโมง ethyl alcohol 95 เปอร์เซนต์ นาน 1 คืน และแช่ใน n-butyl alcohol นาน 1 ชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

3.4นำเนื้อเยื่อไปฝัง (embed) ใน paraplast ที่บริสุทธิ์โดยจัดวาง block ทิ้งไว้ในตู้อบ 10-15 นาทีเพื่อให้ blockเกาะกันดี วางเนื้อเยื่อแล้วเท paraplast ที่บริสุทธิ์ทิ้งไว้ให้แข็ง เมื่อแข็งแล้วให้เคาะออกจาก block ทำการตกแต่ง (Trimming) เนื้อเยื่อที่ embed และตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 6 ไมครอน ด้วยเครื่อง Microtome จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ตัดได้ไปติดสไลด์โดยใช้ egg albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ไข่ขาว 1 หยดผสมกับน้ำกลั่น 10 ml.) แล้วนำไปตั้งบน warm plate เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อยืดออก ทิ้งสไลด์ที่ติดเซคชั่นค้างคืนเพื่อให้แห้ง จากนั้นนำไปย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin

<u>3.5 การย้อม Hematoxylin และ Eosin โดยผ่านกระบวนการ</u>

1) การกำจัด Paraplast (deparafinzation) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 3 นาที

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

3) ย้อมสไลด์ด้วยสี Hematoxylin นาน 7 นาที

4) ล้าง Hematoxylin ออกด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 5 นาที เพื่อทำให้สี Hematoxylin เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

5) ในกรณีที่พบว่าเนื้อเยื่อติดสีน้ำเงินเข้มเกินไปให้นำสไลด์มาทำให้สีเจือจางลง (Differentiate) ใน 0.25 HCL alcohol 70 % solution ให้ดูใต้กล้องถ้าติดสีน้ำเงินที่เข้มเกินไปโดยสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ให้เห็นไซโตพลาสซึมใส ต่อจากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่น

6) นำสไลด์มาแช่ในสี Eosin นาน 30 วินาที แล้วนำไปตรวจสอบ ถ้าพบว่าติดสีแดงมากเกินไปให้นำมา Differentiate ออกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ สังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ให้เห็นสีที่เหมาะสม

7) นำสไลด์มาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้งๆละ 1 นาที

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Haematoxylin และ Eosin ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) โดยใช้ Permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.6 การย้อม Millon

1) การกำจัด Paraplast (deparafinzation) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 3 นาที

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

3) ย้อมด้วย millon ที่ผสม solution A + solution B สัดส่วน 1:10 นำสไลด์ใส่ลงใน plate ใส่สารที่ผสมแล้วลงไป เป็นการย้อมด้วยความร้อนโดยการเร่งความร้อนขึ้นเรื่อย รอให้เดือดแล้วจึงปรับความร้อนลงอุ่นประมาณ 2 นาที

4) ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5) นำสไลด์มาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้งๆละ 1 นาที

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

7) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Millon ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) โดยใช้ Permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.7 การย้อม Masson trichrome

1) การกำจัด Paraplast (deparafinzation) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 3 นาที

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

3) นำสไลด์แช่ใน celestinblue นาน 5 นาที

4) นำสไลด์ผ่านน้ำ

5) ย้อมสไลด์ด้วย Haematoxylin นาน 5 นาที

6) นำสไลด์ผ่านน้ำ

7) ย้อมด้วย acid fuchsin solution A 5 นาที

8) ล้างด้วยน้ำกลั่น

9) ย้อมด้วย phosphomolybdic acid solution B 5 นาที

10) ซับ solution B ออก

11)ย้อมด้วย methyl blue solution C 2-5 นาที

12)ล้างด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13) นำสไลด์มาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้งๆละ 1 นาที

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

15) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Masson trichrome ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) โดยใช้ Permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.8 การย้อม Alcian blue

1) การกำจัด Paraplast (deparafinzation) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 3 นาที

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

3) ล้างด้วย Solution A ใน pH ตามที่ต้องการ (pH2.5และ3.2)

4)ย้อมด้วย Alcian blue ที่ละลายใน pHที่ต้องการ นาน 5นาที หลังจากนั้นล้างน้ำ หรือซับออก

5) ย้อมด้วย 0.5 % neutral red 2-3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

6) แช่ใน Absolute Alcohol

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

8) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Alcian blue ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) โดยใช้ Permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.9 การย้อม Periodic acid Schiff

1) การกำจัด Paraplast (deparafinzation) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 3 นาที

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

3) จุ่มสไลด์ในสารละลายกรดเพอริโอดิก นาน 5 นาที

4) ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหล นาน 5 นาที

5) จุ่มสไลด์ในซีฟรีเอเจนต์ นาน 10 นาที

6) เปลี่ยนมาจุ่มในสารละลายซัลไฟต์ 3 ครั้งๆ1-2 นาที

7)) ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหล นาน 5 นาที

8) ย้อมสีด้วย hematoxylin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

10) นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี Alcian blue ปิดด้วยแผ่นปิดกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) โดยใช้ Permount นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.10 การย้อมสี Ninhydrian-Schiff for amino group

1) การกำจัด Paraplast (deparafinzation) ออกจากสไลด์โดยแช่ใน Xylene 2 ครั้งๆละ 3 นาที

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

3) จุ่มสไลด์ในสารละลาย Ninhydrian ที่ อุณหภูมิ 37 องศา ทิ้งไว้ทั้งคืน

4) ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหล

5) จุ่มสไลด์ใน Schiff reagent 45 นาที

6) ล้างน้ำประปาแบบน้ำไหล

7) ย้อมสีด้วย hematoxylin

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

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

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะเวลาในการทดลอง

พฤศจิกายน 2549 ถึง เมษายน 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1.ลักษณะภายนอกของ spermatheca และ Vagina ในแต่ละระยะรังไข่ ของปูทะเลเพศเมีย Sylla *olivacae*

-spermatheca (ภาพที่ 5) มีเยื่อหุ้มเป็นถุงลักษณะบาง(Thin membrane)

ระยะที่ 1 ลักษณะของ spermatheca เป็นก้อนคล้ายถุงสีขาวใสมีความยาวประมาณ1 เซนติเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม ผนังบางเพราะสามารถมองเห็นว่ามีท่อขดอยู่ภายในถุง ขนาดของ spermstheca ในระยะนี้จะมีขนาดใหญ่ ประมาณ 1 เซนติเมตร

ระยะที่ 2 ลักษณะของ spermatheca ยังคงคล้ายกับในระยะที่ 1 แต่จะมีขนาดที่เล็กลงกว่าระยะที่ 1

ระยะที่ 3 ลักษณะของ spermatheca ขนาดเล็กลงกว่าในระยะที่1 และ 2 ผนังของ spermatheca มีความหนาขึ้นเพราะมองไม่เห็นเส้นใยที่สามารถมองเห็นได้ในระยะที่ 1

ระยะที่ 4 ลักษณะของ spermatheca ขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับทั้ง 3 ระยะ

- vagina (ภาพที่ 6)

ระยะที่ 1 ลักษณะของ vagina สังเกตุได้ว่าในระยะนี้ จะมีสีขาวขุ่น ลักษณะแผ่กว้างมาก

ระยะที่ 2 ลักษณะของ vagina เริ่มไม่แผ่กว้างเท่ากับในระยะแรก มีสีขาว

ระยะที่ 3 ลักษณะของ vagina เริ่มมีขนาดเล็กลง กว่าในระยะที่ 1และ 2 สีเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนๆ

ระยะที่ 4 ลักษณะของ vagina มีขนาดเล็กลงกว่าทั้ง 3 ระยะ สีของ vagina เป็นสีเหลืองส้ม

2.ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histology) ของ spermatheca และ oviduct ในแต่ละระยะรังไข่ ของปูทะเลเพศเมีย Sylla *olivacae* ที่ย้อมโดยใช้เทคนิค Hematoxalin และ Eosin

-spermatheca (ภาพที่ 7)

ระยะที่ 1 ลักษณะที่สังเกตุได้จากการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin พบว่ามีท่อลักษณะเป็นวงกลม หลายๆวง โดยระหว่างท่อมีมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ (loose connective tissue) ท่อแต่ละท่อบุด้วยเซลล์ทรงสูง (columnar epithelium) ขนาดเฉลี่ย 3 µm ซึ่งภายใน ไซโตรพลาซึมพบ platelet ขนาดเฉลี่ย 4 µm ที่ติดสีชมพูเมื่อย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin และ granule ดังกล่าวใน columna epithelium มีการกระจายตัวอยู่ระหว่างท่อใน spermatheca และพบ granule ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกาะอยู่กับ fiberใน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันกระจายตัวอยู่หนาแน่น โดยในระยะนี้ปริมาณของแกรนูลขนาดเล็กกระจายอยู่ได้มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รวมตัวกลายเป็น platelet ขนาดใหญ่ มีจำนวนมากอยู่ระหว่างท่อ ในบริเวณของ columnar epithelium จะพบว่ามีการปล่อยแกรนูลออกไป นิวเคลียสจะอยู่บริเวณ basement membrane ภายใน columnar epithelium มีลักษณะเป็นช่องว่างมีการปล่อยแกนูลออกไป และพบแกรนูลบริเวณด้านปลายของ columnar epithelium ส่วนใน lumen พบเพียงเส้นใยอย่างเดียว

ระยะที่ 2 ลักษณะที่สังเกตุเห็นพบว่า ลักษณะโดยทั่วไปเหมือนกับในระยะที่ 1 แต่ในระยะที่ 2 จะมีปริมาณของ platelet น้อยกว่าในระยะแรกนิดหน่อยขนาดเฉลี่ย 3 μm และแกรนูลที่กระจายตัวอยู่ตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เกาะอยู่กับ fiber มีการรวมตัวเป็น platelet ทำให้แกรนูลที่กระจายตัวอยู่มีปริมาณน้อยกว่าในระยะที่ 1 ภายในของ columnar epithelium ขนาดเฉลี่ย 5 μm คล้ายกับระยะแรกแต่นิวเคลียสเริ่มออกจาก basement membrane บริเวณพบแกนูลบริเวณ basement membrane

ระยะที่ 3 ลักษณะของ spermatheca ในระยะนี้ก็มีลักษณะเป็นท่อเหมือนกับในระยะที่ 1 และ 2 แต่ปริมาณของ platelet มีจำนวนน้อยลงและมีขนาดฉลี่ย 2 μm และแกนูลที่กระจายตัวอยู่ตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เกาะกับ fiber มีปริมาณน้อยมาก แต่พบว่าปริมาณของเนื้อเยื่อเกียวพันมีปริมาณ ในบริเวณของ columnar epithelium ที่มีขนาดเฉลี่ย 4 μm จะพบแกนูลบริเวณ basement membrane มากด้วย

ระยะที่ 4 ลักษณะของ spermatheca ในระยะนี้ก็มีลักษณะเป็นท่อเหมือนกับในระยะที่ 1 และ 2 แต่ปริมาณของ platelet ในระยะนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นและมีขนาดเฉลี่ย 4 μm และแกรนูลที่อยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เกาะอยู่กับ fiber มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น พบแกรนูลบริเวณ อยู่ทางด้านฐานของ basement membrane บริเวณตรงกลางของเซลล์เป็นช่องว่าง เซลล์ columnar epithelium มีขนาดเฉลี่ย 3 μm

- vagina (ภาพที่ 8)

ระยะที่ 1 ลักษณะของ vagina ลักษณะเนื้อเยื่อ vagina การจัดเรียงตัวของ connective tissue ไม่เป็นระเบียบเหมือนใน spermatheca มีลักษณะเป็นแผ่นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นแผ่นหนาๆ พับไปมาเป็น cuticle มีความหนาเฉลี่ย 4 μm มาก ปริมาณของ secretion มาก การเรียงตัวกันของเนื้อเยื่ออยู่กันอย่างหลวมๆ และยังพบว่ามี ลักษณะของเส้นใยแทรกอยู่ตามเนื้อเยื่อที่เรียงตัวกันอย่างหลวมๆ และในระยะนี้ยังสังเกตว่ามีปริมาณของ pack sperm ที่มี sperm อยู่กันอย่างหนาแน่นมาก และยังสังเกตุได้ว่ามี sperm มีขนาดเฉลี่ย 0.1 μm ที่อิสระแทรกเข้าไปอยู่ตามเนื้อเยื่อที่เรียงตัวกันอย่างหลวมๆด้วย แล้วยังพบแกรนูลที่เหมือนกับที่พบใน spermatheca แต่พบในปริมาณที่น้อยกว่ามาก เซลล์ของ columnar epithelium มีขนาดเฉลี่ย 5 μm ลักษณะเหมือนเซลล์บางเซลล์เกิดการตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะที่ 2 ลักษณะของ vagina ไม่แตกต่างกับระยะที่ 1 pack sperm ยังคงพบการอัดแน่นของ sperm แต่พบว่ามี sperm ขนาดเฉลี่ย 0.1 µm เริ่มมีการแทรกตัวเข้าไปอยู่ตาม secretion มากขึ้น และแทรกตัวอยู่ตาม cuticle และ cuticle มีขนาดเฉลี่ย 5 µm พบว่ามีการอยู่รวมกันของ sperm และ secretion และยังพบ platelet แกรนูลด้วย เซลล์ของ columnar epithelium มีขนาดเฉลี่ย 4 µm

ระยะที่ 3 ลักษณะของ vagina คล้ายกันในระยะแรกๆ pack sperm ในระยะนี้มีขนาดที่ใหญ่อักแน่นด้วยจำนวน sperm ที่มีขนาดเฉลี่ย 0.1 µm แกนูลที่พบก็ยังคงสังเกตุเห็นได้ในปริมาณน้อย การแทรกตัวของ sperm มีการแทรกตัวเข้าไปอยู่ตาม cuticle ที่มีความหนาเฉลี่ย 13 µm เซลล์ columnar epithelium มีความสูงเฉลี่ย 8 µm

ระยะที่ 4 ลักษณะคล้ายในทั้ง 3 ระยะแรก ยังสังเกตุได้ว่า pack sperm ยังคงมีขนาดที่ใหญ่ ใกล้เคียงกับระยะอื่นๆ แกรนูลที่พบมีปริมาณน้อยเหมือนในระยะอื่นๆ ขนาดของ sperm มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับทั้ง 3 ระยะที่ผ่านมา ส่วนความหนาของ cuticle เฉลี่ย 7 µm เซลล์ columnar epithelium มีความสูงเฉลี่ย 4 µm

3.ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) **ของ spermatheca และ** vagina **ในแต่ละระยะรังไข่ ของปูทะเลเพศเมีย** Scylla *olivacae*

ในการทดสอบด้วยเทคนิคทาง Histochemistry ใช้ในการทดสอบสารในกลุ่ม โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต โดยเทคนิคที่ใช้ แบ่งเป็น

เทคนิคที่ใช้ทดสอบโปรตีน

1.Millon Technique

2.Ninhydrin Technique

3.Masson trichrome Technique

เทคนิคที่ใช้ทดสอบคาร์โบไฮเดรต

1.Alcian blue Technique

2.Periodic acid Schiff Technique (PAS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบโปรตีนด้วยเทคนิคทาง เนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry) ของ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea* ในแต่ละระยะรังไข่

ระยะ spermatheca	โปรตีน								
	Millon			Ninhydrin			Masson trichrome		
	Columna epithelium	Granule	lumen	Columna epithelium	Granule	lumen	Columna epithelium	secretion	lumen
1	+	+++	-	-	-	-	+	+	-
2	+	++	-	-	-	-	+	+	-
3	+	+	-	-	-	-	+	+	-
4	+	++	-	-	-	-	+	+	-

หมายเหตุ + น้อย
++ มาก
+++ มากที่สุด
- ไม่ติดสี

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคทาง เนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี(Histochemistry) ของ spermatheca ในปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea* ในแต่ละระยะรังไข่

ระยะ spermatheca	คาร์โบไฮเดรต					
	Alcian blue			PAS		
	Columnar epithelium	Granule	lumen	Columnar epithelium	Granule	lumen
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-

หมายเหตุ + น้อย
++ มาก
+++ มากที่สุด
- ไม่ติดสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบโปรตีนด้วยเทคนิคทาง เนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี(Histochemistry) ของ Vagina ในปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea* ในแต่ละระยะรังไข่

ระยะ Oviduct	โปรตีน								
	Millon			Ninhydrin			Masson trichrome		
	Columnar epithelium	Granule	lumen	Columnar epithelium	Granule	lumen	Columnar epithelium	secretion	lumen
1	+	+	-	-	-	-	+	++	-
2	+	+	-	-	-	-	+	++	-
3	+	+	-	-	-	-	+	++	-
4	+	+	-	-	-	-	+	++	-

หมายเหตุ + น้อย
++ มาก
+++ มากที่สุด
- ไม่ติดสี

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยเทคนิคทาง เนื้อเยื่อวิทยาทางเคมี (Histochemistry)ของ oviduct ในปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea* ในแต่ละระยะรังไข่

ระยะ Vagina	คาร์โบไฮเดรต					
	Alcian blue			PAS		
	Columna epithelium	Granule	lumen	Columna epithelium	Granule	lumen
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-

หมายเหตุ + น้อย
++ มาก
+++ มากที่สุด
- ไม่ติดสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Millon Technique

การย้อมสีพิเศษเพื่อพิสูจน์เม็ดแกรนูลที่เราพบเป็นสารชีวโมเลกุล (biomolecule)ประเภทใด โดยเทคนิคที่ใช้ทดสอบว่าเม็ดแกรนูลที่พบทั้งใน spermatheca และvagina นั้นเป็นสารประเภทโปรตีนหรือไม่

-spermatheca (ภาพที่ 9)

platelet ที่เกิดจากการรวมตัวของแกรนูลที่สังเกตุได้จากการย้อมสีมาตรฐาน เมื่อทำการทดสอบด้วย Millon Techique เพื่อทดสอบว่าเป็นสาร biomolecule กลุ่มโปรตีนหรือไม่ ผลการทดสอบใน spermatheca ในแต่ละระยะรังไข่ พบว่า platelet ย้อมติดสีส้มแดง คือให้ผลเป็นบวกต่อ Millon และติดสีบริเวณของ columnar epithelium เป็นสีส้มจางเพราะแกนูลมีการกระจายตัวไม่ได้รวมตัวกันเป็น platelet จึงสามารถบอกได้ว่าแกรนูลที่พบเป็นสารที่มีองค์ประกอบของโปรตีน โดยในระยะที่ 1 พบมากที่สุด และน้อยที่สุด ในระยะที่ 3 ส่วนในระยะที่ 2 และ 4 มีปริมาณที่ใกล้เคียงกันแต่มีปริมาณที่มากกว่าระยะที่ 3 แต่น้อยกว่าระยะที่ 1 ส่วนใน lumen ผลการย้อมด้วย Millon ให้ผลเป็นลบเพราะใน lumen พบเพียง fiber อย่างเดียว

- vagina (ภาพที่ 10)

platelet ที่สังเกตุได้จากการย้อมสีมาตรฐาน เมื่อทำการทดสอบด้วย Millon Techique เพื่อทดสอบว่าเป็นสารชีวโมเลกุล (biomolecule) กลุ่มโปรตีนหรือไม่ ผลการทดสอบของ vagina ในแต่ละระยะรังไข่ แกรนูลย้อมติดสีส้มแดง คือให้ผลเป็นบวกต่อ Millon แต่ใน vagina แกรนูลส่วนใหญ่อยู่กระจายตัวอยู่ทั่วไปไม่มีการรวมตัวเป็น platelet ขนาดใหญ่มากนัก จึงทำให้ใน vagina จึงติดสีของ millon ที่จางและเบาบางมาก จากผลที่ได้สามารถบอกได้ว่าแกรนูลที่พบเป็นสารที่มีองค์ประกอบของโปรตีน platelet ที่พบใน vagina มีปริมาณน้อยกว่า spermatheca มากส่วน ในเซลล์ columnar epithelium พบว่า ในแต่ระยะ ให้ผลที่ติดสีของ Millon แต่ในปริมาณที่น้อย ส่วนใน lumen ผลการย้อมด้วย millon ให้ผลเป็นลบ เพราะมีเพียงแค่ fiber

Ninhydrin Technique

ผลการทดสอบโปรตีน โดยใช้เทคนิค Ninhydrin ทั้งใน spermatheca และ vagina ให้ผลเป็นลบทั้งใน lumen, granule secretion และ columnar epithelium

Masson trichrome Technique (ภาพที่ 3และ4)

-spermatheca (ภาพที่ 11)

การทดสอบด้วยเทคนิค Masson trichrome เป็นการทดสอบเพื่อดูโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งถ้าให้ผลเป็นบวกต่อ เทคนิคนี้ซึ่ง ติดสี เขียวอมฟ้า จะเป็นพวก พวก collagen พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณ bastment membrane ซึ่งลักษณะจะเส้นๆยาวๆ ส่วนบริเวณที่ติดสีชมพูเป็นพวก สาร แกรนูลหรือ secretion ส่วนบริเวณที่ติดสีน้ำเงินเข้มเป็นนิวเคลียส ส่วนเซลล์ columnar epithelium ติดสีน้ำเงินเข้มให้ผลเป็นบวกต่อ Masson trichrome

- vagina (ภาพที่ 12)

การทดสอบด้วยเทคนิค Masson trichrome ใน vagina ให้ผลเป็นบวกทั้งใน granule secretion และ columnar epithelium ส่วนใน lumen ให้ผลเป็นลบเพราะพบเพียง fiber ภายใน lumen บริเวณที่ติดสีฟ้าลักษณะจะเป็นแผ่นเนื้อเยื่อที่มีความหนาพับไปมา ซึ่งเป็นสารพวก cuticle ซึ่งมีส่วนช่วยในการป้องกันการเสียดสีระหว่างที่เกิดการผสมพันธุ์กันระหว่างตัวผู้และตัวเมีย ใน vagina จะพบว่าความหนาของแผ่น cuticle จะมีความหนามาก ซึ่งบริเวณที่เป็น pack sperm จะย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม เพราะเป็นนิวเคลียส บริเวณที่ติดสีชมพูเป็นพวก สาร แกรนูลหรือ secretion ส่วนบริเวณที่ติดสีน้ำเงินเข้มเป็นนิวเคลียส ส่วนเซลล์ columnar epithelium ติดสีน้ำเงินเข้มให้ผลเป็นบวกต่อ Masson trichrome

Alcian blue Technique

-spermatheca (ภาพที่ 13)

การใช้เทคนิค Alcian blue ในการทดสอบ platelet ที่พบเป็นสารชีวโมเลกลุ่มในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตหรือไม่ ผลการสอบพบว่าplatelet ไม่ติดสีของ Alcian blue แต่ติดสีบริเวณเซลล์ columnar epithelium สีเข้มน้อยมาก จึงบอกได้ว่าเม็ดแกรนูลที่เราพบอาจไม่สารในกลุ่มโปรตีนเพียงอย่างเดียว อาจมีสารในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตอยู่ด้วย ส่วนใน secretion ให้ผลบวกต่อ Alcian blue ในปริมาณน้อยเช่นกัน

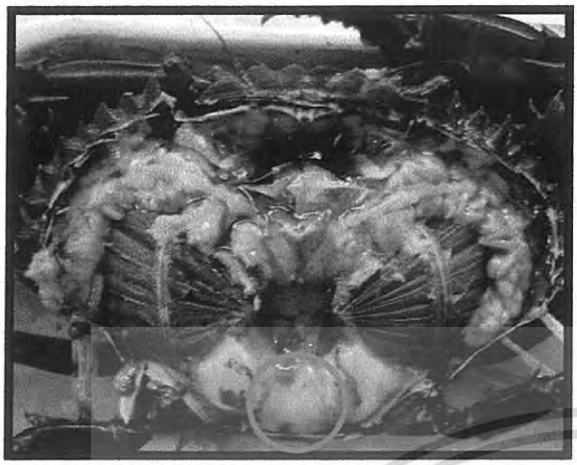
- vagina (ภาพที่ 14)

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Alcian blue ในการทดสอบว่าแกรนูลที่เราพบเป็นสารชีวโมเลกลุ่มในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตหรือไม่ ผลการสอบพบว่าไม่ติดสีของ Alcian blue แต่ติดสีใน secretion อาจบอกได้ว่า secretion ที่พบใน spermatheca อาจไม่ใช่ชนิดเดียวกันกับที่พบ vagina จึงอาจสันนิษฐานได้ว่า secretion ใน vagina มีองค์ประกอบของ acid mucopolysaccharide

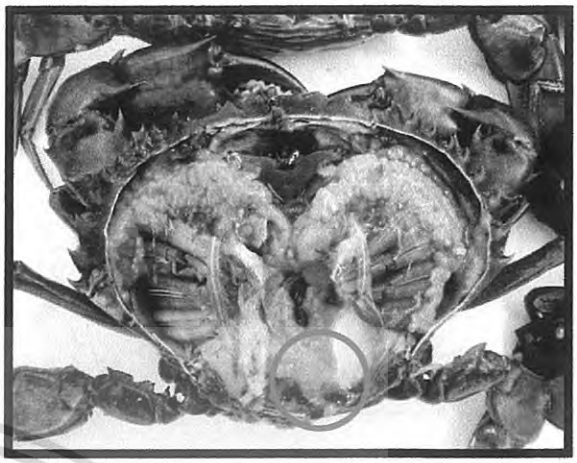
Periodic acid Schiff Technique

เทคนิคการย้อมสีพิเศษโดยใช้ เทคนิค Periodic acid Shiff เป็นเทคนิคที่ใช้ทดสอบสารในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งผลจากการทดสอบพบว่าทั้งใน spermatheca และ vagina ให้ผลเป็นลบต่อ Periodic acid Shiff Technique

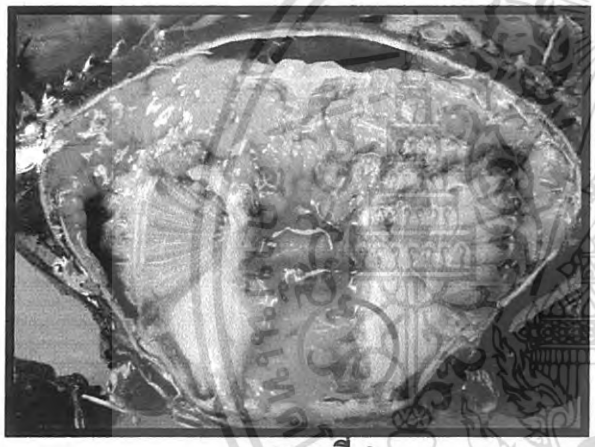
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



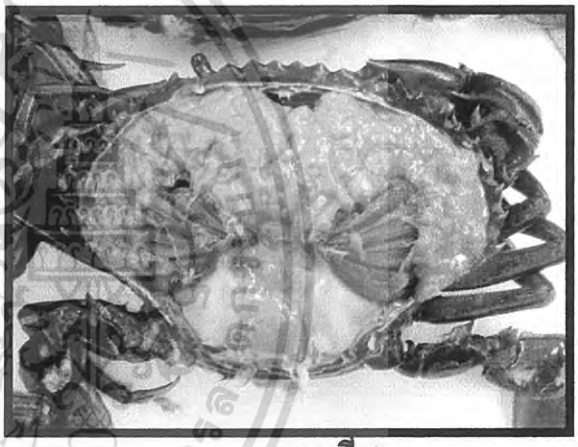
ระยะที่1



ระยะที่2



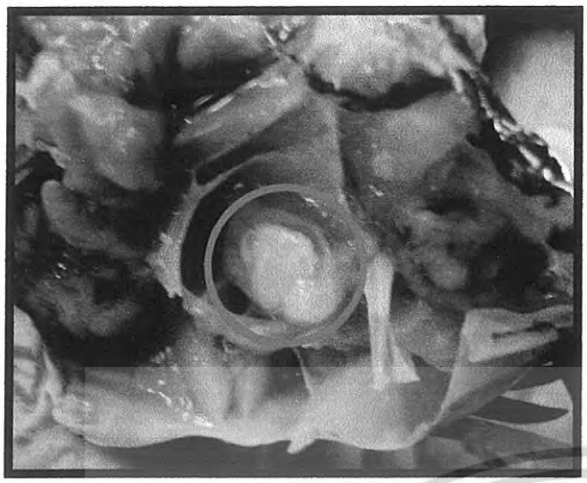
ระยะที่ 3



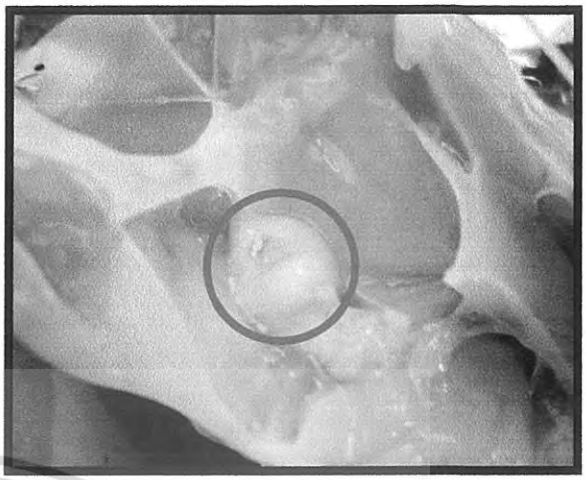
ระยะที่ 4

ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของ spermatheca ของปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

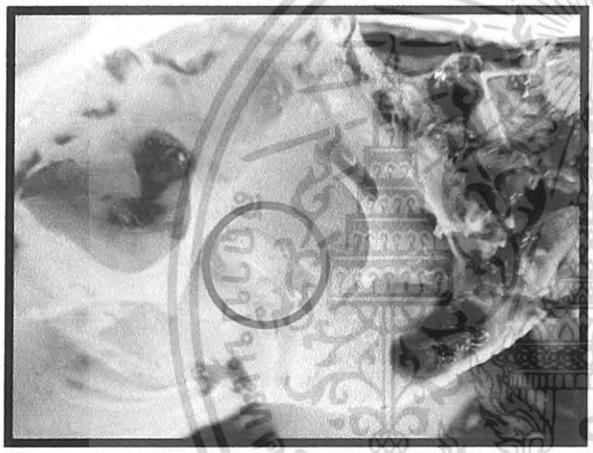
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



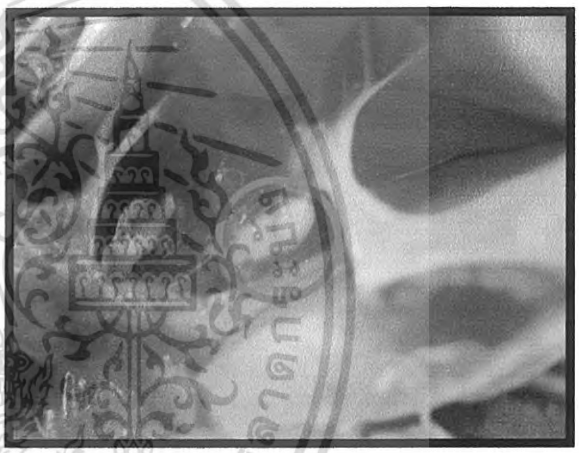
ระยะที่1



ระยะที่2



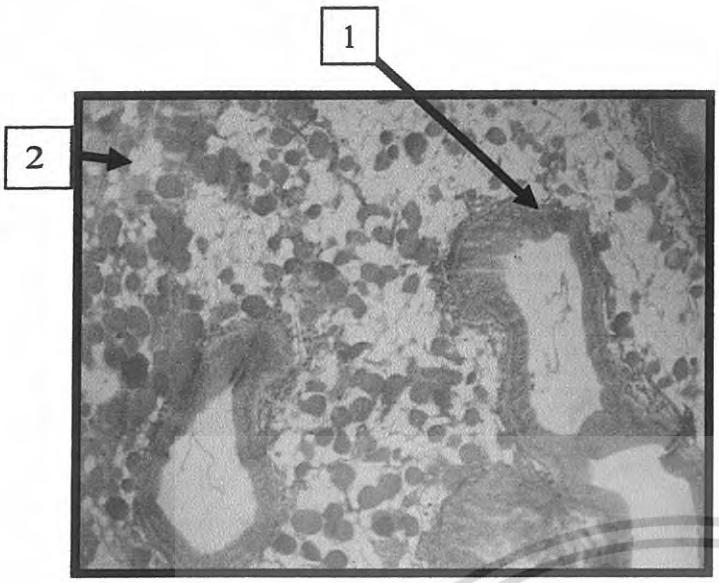
ระยะที่ 3



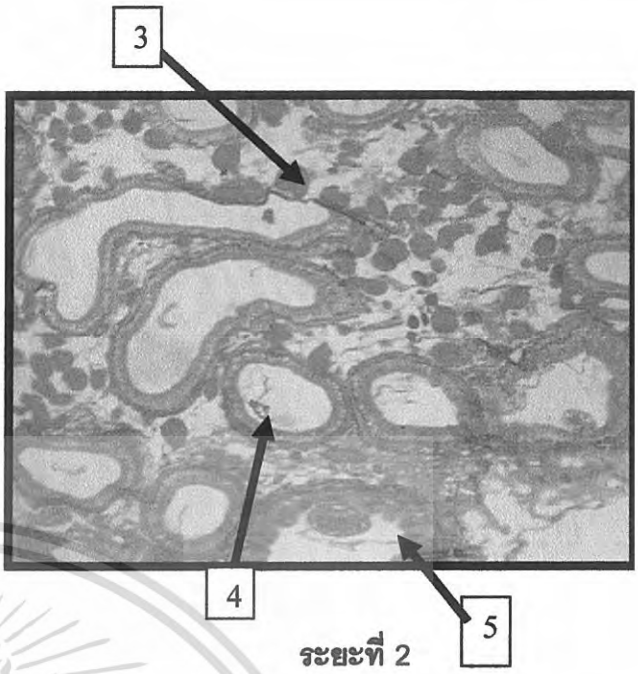
ระยะที่ 4

ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของ vagina ของปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ

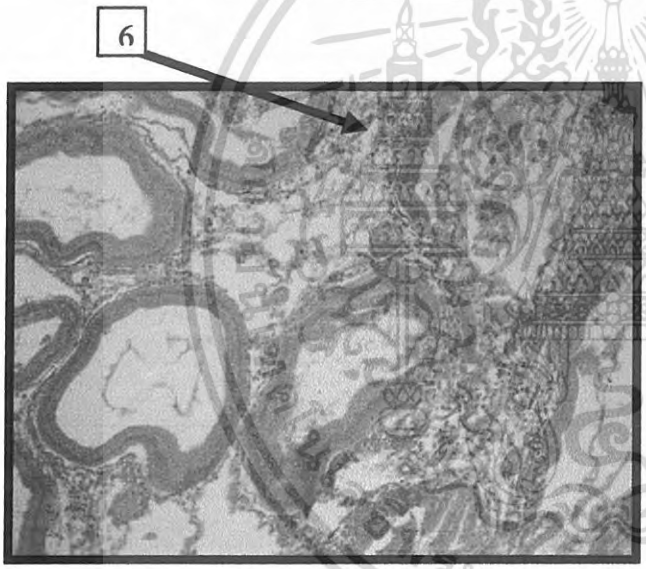
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



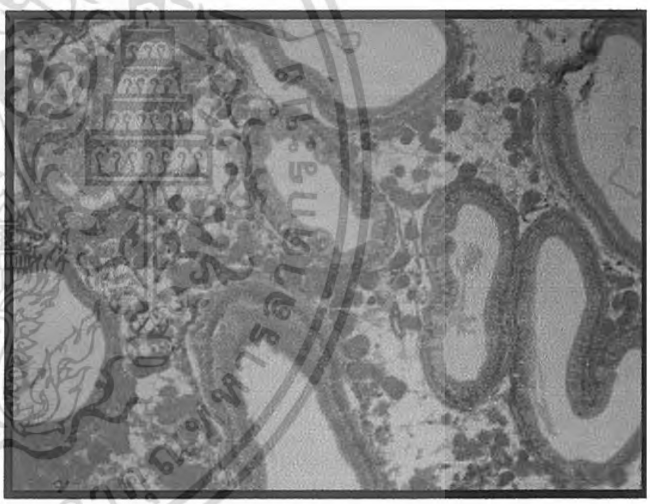
ระยะที่ 1



ระยะที่ 2



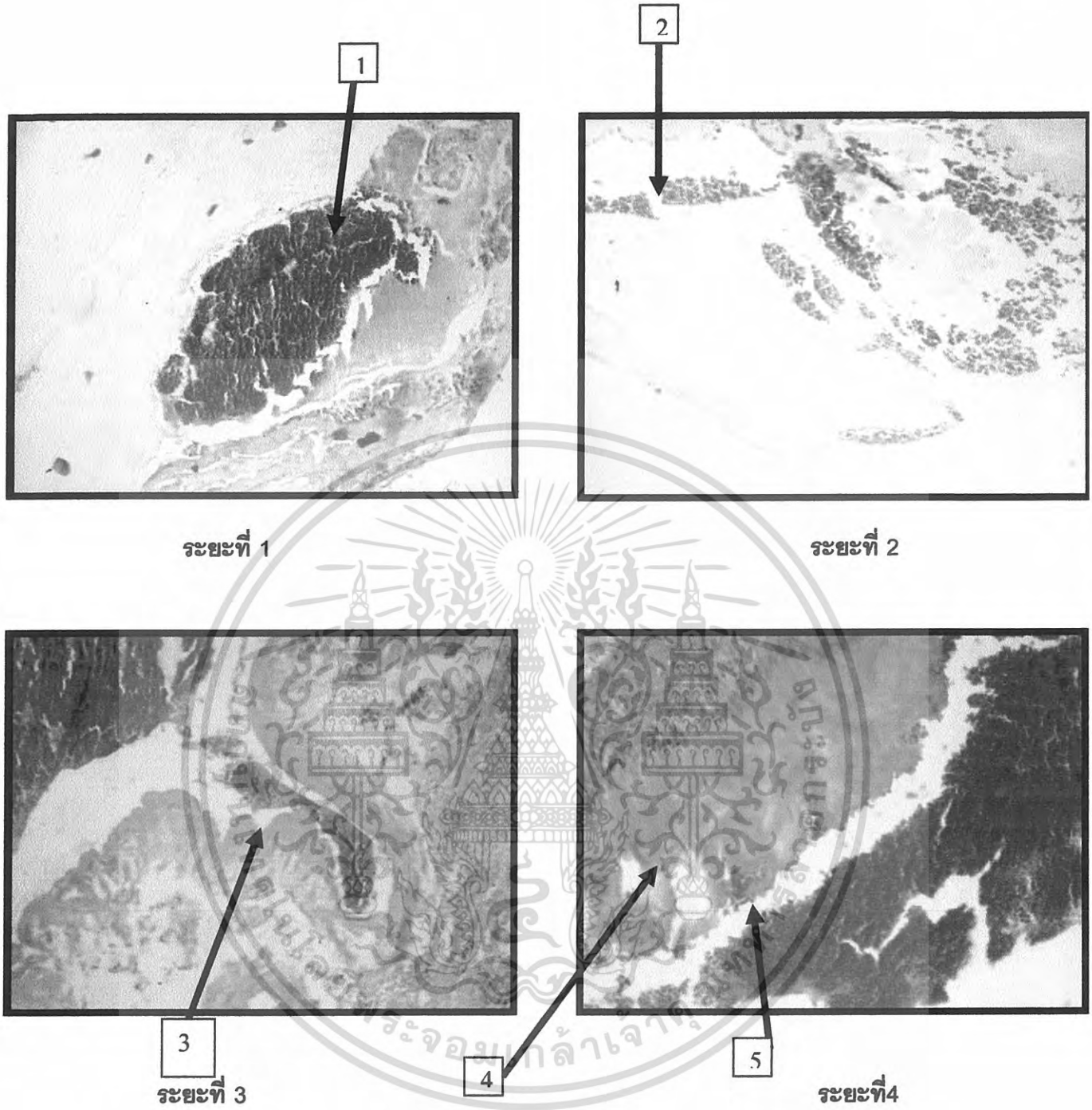
ระยะที่ 3



ระยะที่ 4

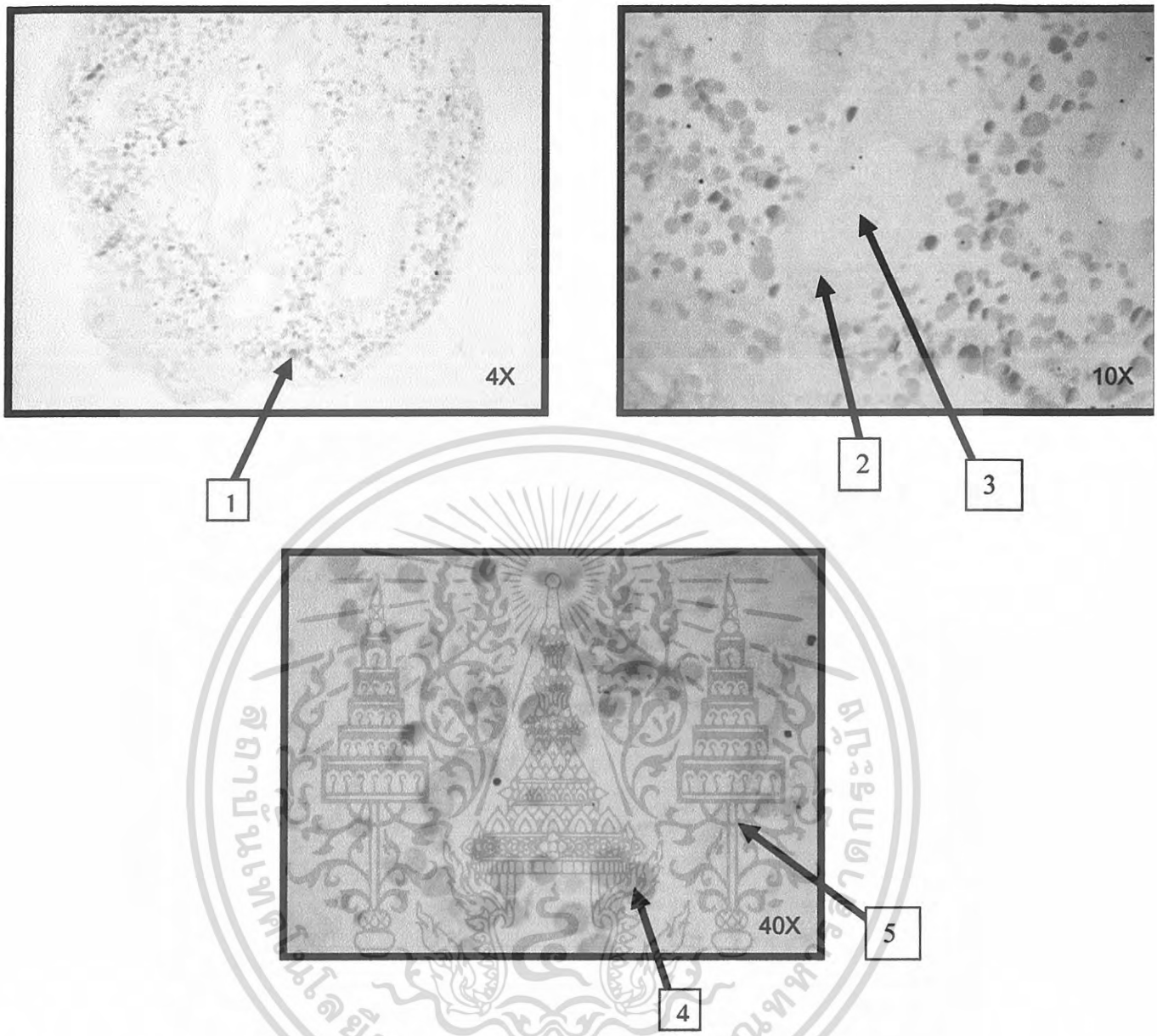
ภาพที่ 7 ลักษณะทางเนื้อเยื่อ spermatheca ในปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญในระยะต่างๆ ที่กำลังขยาย (10 X) หมายเลข 1= เซลล์ columnar epithelium, 2 = การกระจายตัวของแกรนูลที่อยู่ ตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน, 3 = ลักษณะ platlet ที่เกิดจากการรวมกันของแกรนูลที่กระจายตัวในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันม, 4 = fiber ใน lumen 5 = เซลล์ columnar epithelium ที่ เรียงตัวคล้าย villile, 6 = connective ที่มีการเรียงตัวหลวมๆเป็นลักษณะของ fiber

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



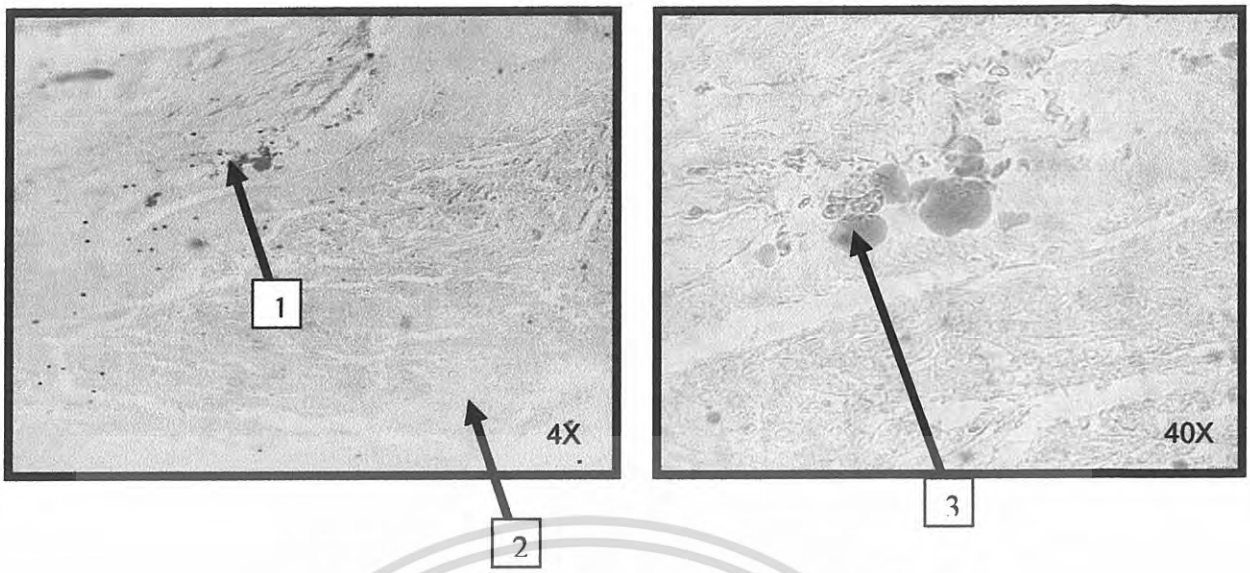
ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของ vagina ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆที่กำลังขยาย (10X) หมายเลข 1,2 = pack sperm, 3 = ลักษณะของ sperm ที่แทรกเข้าไปอยู่ตามร่องของ cuticle, 4 = secretion , 5 = ลักษณะของ cuticle ที่อยู่ใกล้กับ pack sperm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

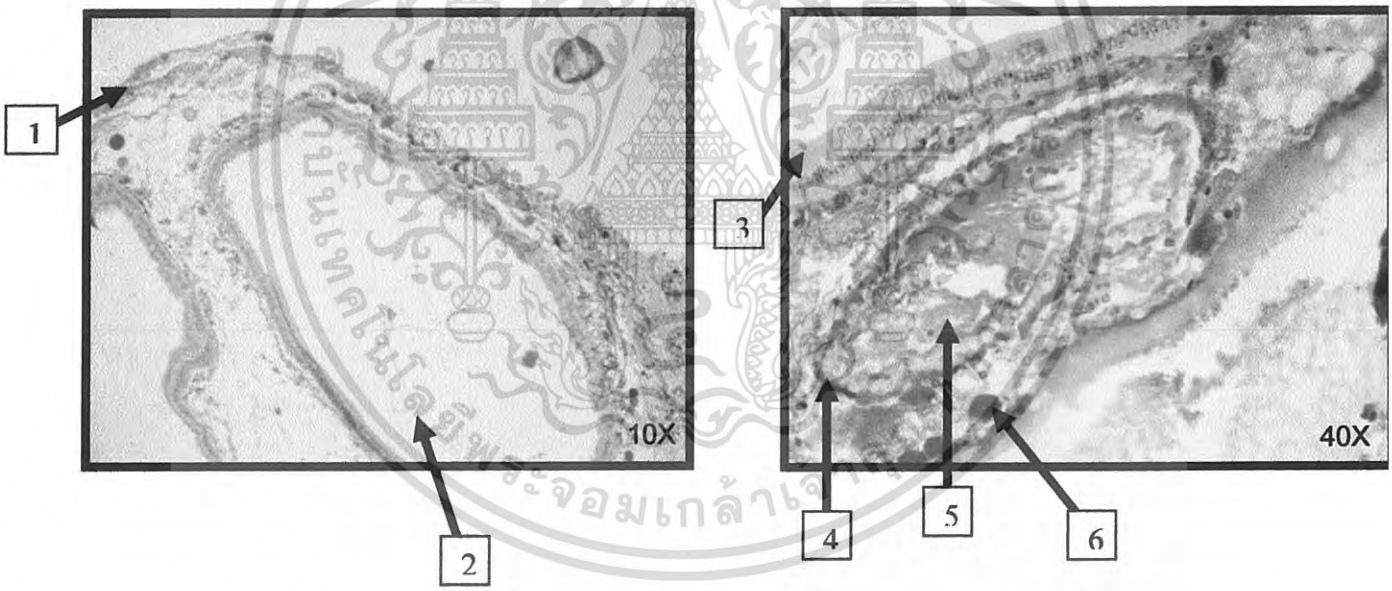


ภาพที่ 9 ลักษณะทางเนื้อเยื่อของ spermatheca ย้อมสีด้วย Millon Technique หมายเลข 1 = การอยู่รวมกันของ platelet , 2 = เซลล์ columnar epithelium, 3 = fiber ใน lumen , 4 = ลักษณะของ platelet , 5 = ลักษณะของ connective tissue ที่เรียงตัวกันอย่างหลวมๆ มีลักษณะเป็นเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

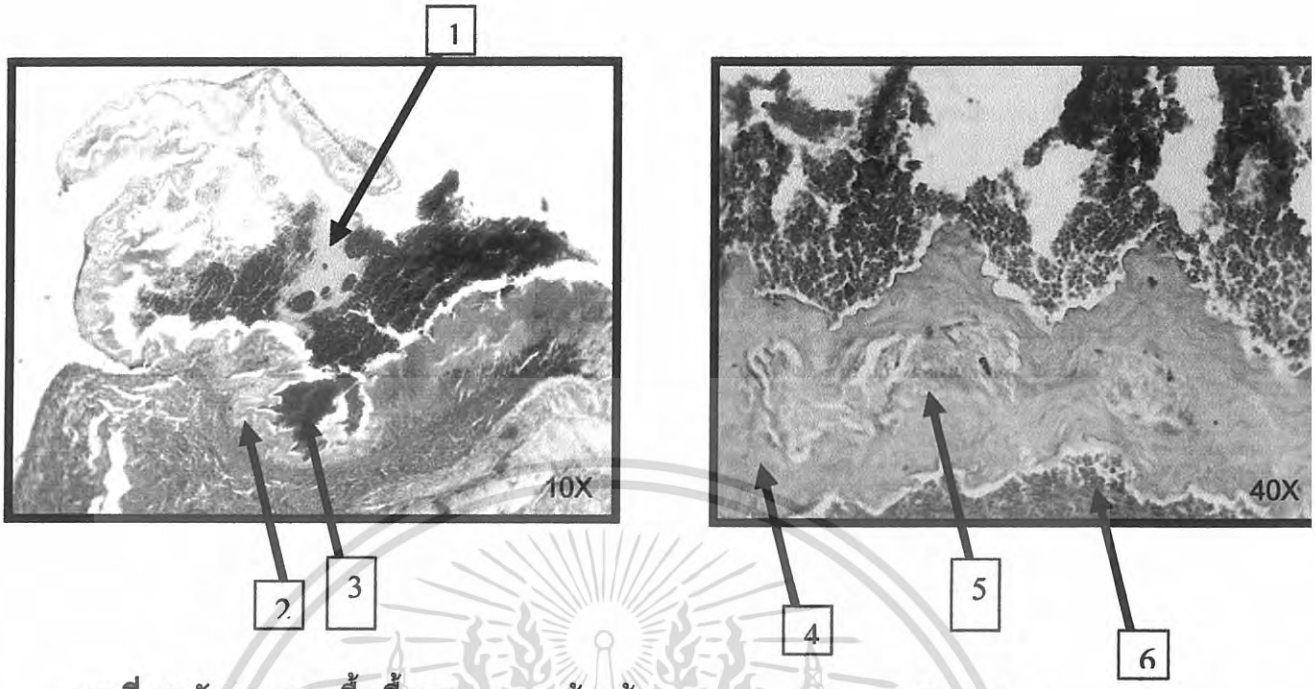


ภาพที่ 10 ลักษณะทางเนื้อเยื่อ ของ vagina ย้อมด้วย Millon Technique หมายเลข 1,3 = ลักษณะของ platelet ที่พบเช่นเดียวกับใน spermatheca , 2 = secretion

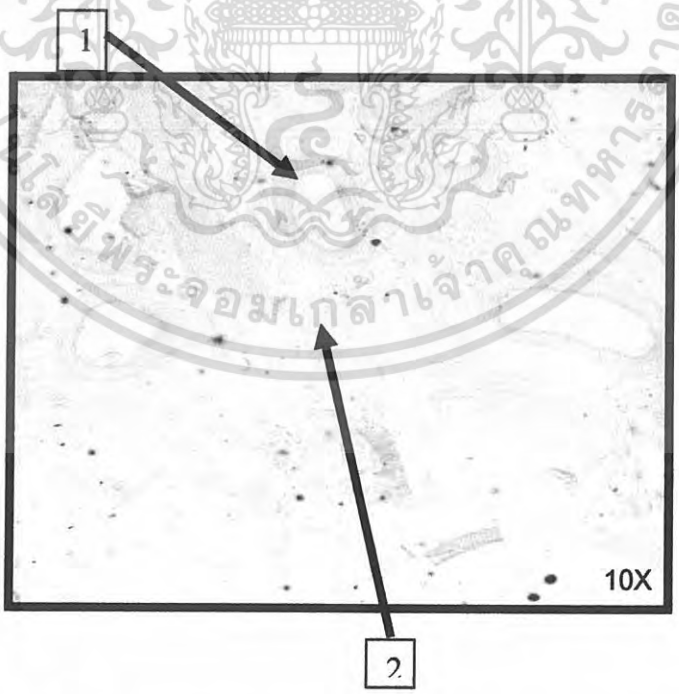


ภาพที่ 11 ลักษณะเนื้อเนื้อวิทยา ของ spermatheca ย้อมด้วย Masson trichrome Technique หมายเลข 1,4 = เส้นใย collagen , 2 = fiber ใน lumen , 3 = เซลล์columnar epithelium , 5 = แกรนูลที่กระจายตัว , 6 = แกรนูลที่รวมตัวเป็น platelet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

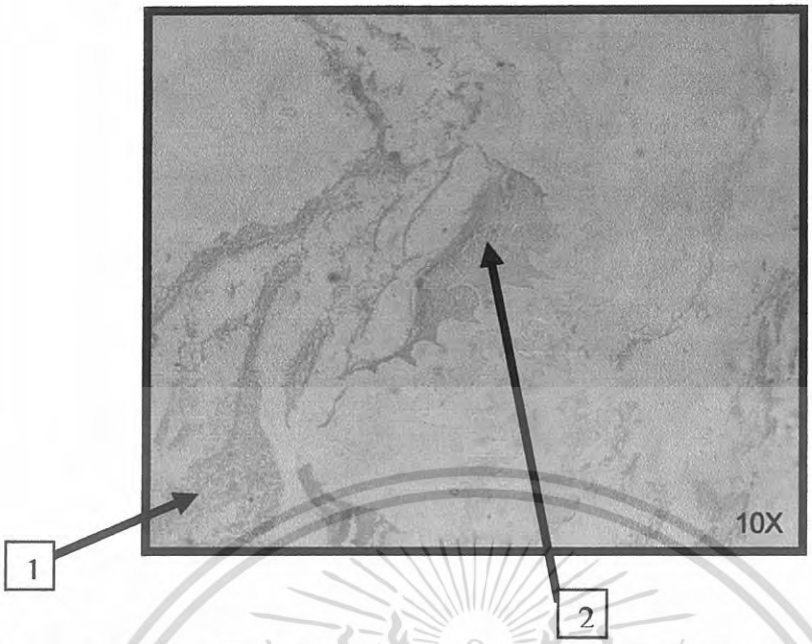


ภาพที่ 12 ลักษณะทางเนื้อเยื่อของ vagina ย้อมด้วย Masson trichrome Technique หมายเลข 1 = secretion , 2,4 = cuticle , 3,6 = sperm pack , 5 = secretion ที่ถูกล้อมรอบด้วย cuticle



ภาพที่ 13 ลักษณะทางเนื้อเยื่อ ของ spermatheca ย้อมด้วย Alcian blue Technique หมายเลข 1 = = เซลล์columnar epithelium , 2 = platelet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



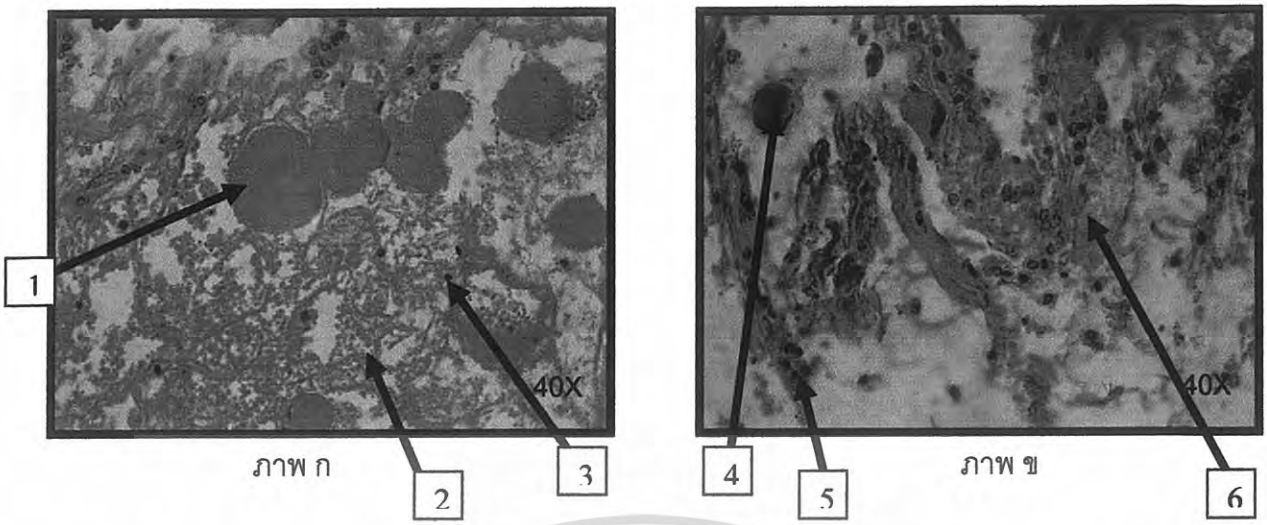
ภาพที่ 14 ลักษณะทางเนื้อเยื่อ ของ vagina ย้อมด้วย Alcian blue Technique หมายเลข 1 = secretion , 2 = pack sperm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

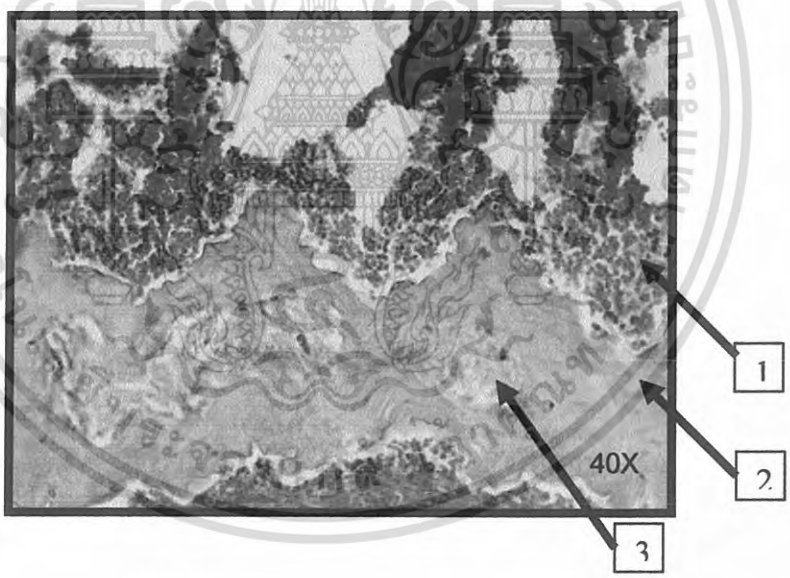
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าภายหลังการจับคู่ผสมพันธุ์ปูทะเลเพศผู้ปล่อย sperm เก็บใน vagina ของปูเพศเมีย ส่วน spermatecae อาจไม่ได้ทำหน้าที่เก็บsperm เช่นที่มีผู้เสนอไว้ แต่ทำหน้าที่ในการผลิต granule secretion ในเซลล์ epithelium ภายใน spermathecae และพบ granule ลักษณะเดียวกันอยู่ร่วมกับ sperm ใน vagina (ภาพที่ 15) และจากการทดสอบด้วยเทคนิคทาง Histochemistry ทั้งใน 4 ระยะของรังไข่ พบว่า แกรนูลที่สงสัยพบทั้งใน 4 ระยะว่าเป็น biomolecule กลุ่มใดนั้นให้ผลสรุปได้ว่า เป็นสารในกลุ่มของ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตเพราะบวกต่อเทคนิคที่ใช้ทดสอบ และยังพบ collagen ซึ่งเป็นสารที่ชอบน้ำจะช่วยดูดซับความชื้นซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการรายงานของ Beninger et al. (1993) และ Lanteigne et al. (1996) เขาพบว่าสารนอกเซลล์ granule secretion ที่พบภายใน spermatheca และ vagina มีองค์ประกอบโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในกลุ่ม mucopolysaccharide เช่นกัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแหล่งอาหารและให้ความชุ่มชื้นแก่ sperm เพราะพบว่าสารพวกนี้ พบอยู่ร่วมกับ sperm (ภาพที่ 17) และจากการรายงาน Beninger et al. (1993) และ Lanteigne et al. (1996) ให้ผลการศึกษา PAS technique, Alcian blue technique ชัดเจน เพราะในน้ำยา fixative ชนิด Bouin แต่การทดลองของเราใช้ Davison fixative อาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ผลการย้อมสีไม่ชัดเจน และจากการศึกษาเหตุผลที่ไม่พบ sperm ใน spermatheca เพราะจากการศึกษาโครงสร้างของระบบสืบพันธุ์ของปูทะเล โดยการฉีด Methylene blue สีผ่านทาง gonopore พบว่าสีที่ฉีดเข้าไปตามท่อของ oviduct ฉะนั้นการที่ตัวผู้ฉีดน้ำเชื้อเข้าไปก็จะอยู่ตามท่อของ vagina โดยท่อของ vagina เพราะพบ pack sperm ใน vagina รอการปฏิสนธิ ท่อของ spermatheca ขนานกับ vaginaและเปิดเข้าสู่ vagina บริเวณ vulva ส่วนก้อน spermatheca อยู่บริเวณตรงกลางส่วนท้ายของกระดองและมีท่อแยก 2 ข้างไปเชื่อมกับ vagina (ภาพที่ 18) สาเหตุนี้จึงไม่พบ sperm ใน spermatheca

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

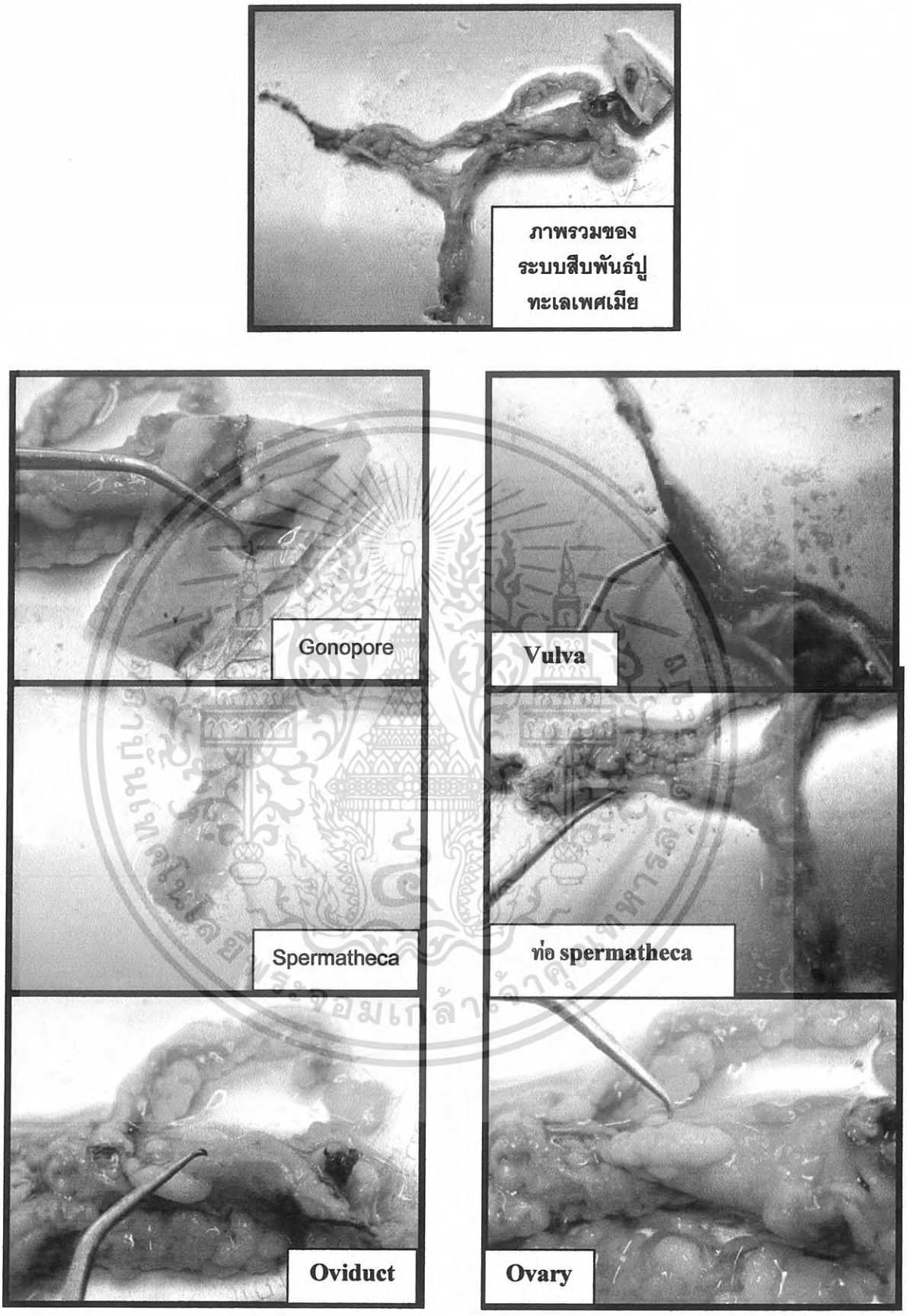


ภาพที่ 15 การอยู่ร่วมกันของ granule secretion , sperm และ secretion ใน spermatheca (ภาพ ก) และ oviduct (ภาพ ข) หมายเลข 1,4 = platelet ที่เกิดจากการรวมตัวของแกรนูล , 2,6 = แกรนูลที่กระจายตัวเกาะอยู่ตาม fiber , 3,5 = sperm



ภาพที่ 16 ลักษณะของ cuticle ที่อยู่รอบ sperm ใน vagina ที่ย้อมด้วยเทคนิค Masson Trichrome หมายเลข 1= sperm pack, 2 = cuticle , 3 = secretion ที่ถูกล้อมรอบด้วย cuticle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 18 โครงสร้างการสืบพันธุ์ของปูทะเลเพศเมีย Scylla *olivacea*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทำการศึกษาปัญหาพิเศษครั้งนี้มีการใช้ fixative เพียงชนิดเดียว ทำให้เทคนิคทาง Histochemistry บางเทคนิคให้ผลเป็นลบ เพราะเทคนิคบางเทคนิคจะให้ผลดีเมื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อใน fixative ที่เหมาะสม จึงควรมีการปรับเปลี่ยน fixative เป็นตัวอื่นๆ

2. ควรมีการตัด section ในแนวตามยาวเพื่อตรวจสอบ โครงสร้างของเนื้อเยื่อว่าแตกต่างกับการตัดตามขวาง หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชลธี ชีวะเศรษฐธรรม. 2539. การเลี้ยงปูทะเล(Scylla serrata Forskal). แผนกวิชาเทคโนโลยีประมง ภาควิชาเทคโนโลยีและอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัวสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี . 127หน้า.

สุรชาต ฉวีภักดิ์ , เจษฎา เจริญวัฒน์ และสินธุวัฒน์ สุทธิอาจ.2538. การเลี้ยงแม่พันธุ์ปูทะเล ให้มีไข่นอกกระดองในบ่อซีเมนต์ 4 วิธี. เอกสารวิชาการฉบับที่ 15/2538 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . 39 หน้า .

ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์. 2545. เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์(Animal tissue techniqoue) . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . 286 หน้า.

Beninger, P. G., Elner, R. W., Foyle, T. P. and Odense, P. H. 1988. Function anatomy of the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio (O. fabricius)* and a hypothesis for fertilization. 8(3): 322-332.

Beninger, P. G., Lanteigne, C. and Elner, R. 1993. Reproductive processes revealed by spermatophore dehiscence experiments and by histology,ultrastructure,and histochemistry of the female reproductive system in the Snow crab *Chionoecetes opilio* (O.fabricius). Journal of crustacean biology, 13(1): 1-6.

Bumin, Shangguan, Liu Zhengcong and Li Shaojing. 1991. Histological studies on ovarian development in *Scylla serrata.* Journal of Fisheries of China, 15(2): 99-102.

Forskal, P. 1755. Description animalium, avium, amphibiorum insectorum vermium quae in itenre orientli obsevavit Petrus Forskal,1-19-xxxiv-164 pp.Hauniae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jensen, P. C., Orensanz, J. M. and Armstrong, D. A. 1996. Structure of the female reproductive tract in the Dungeness crab (*Cancer magister*) and implications for the mating system.. 190:336-349.

John, P. B., and Marilyn, G. 2003. Theory and practice of histological techniques. 153, 232, 181, 175, 232.

Keenan, C., Clive, P., Peter,J., Davie, F. and Mann, D. L. 1998. A revision of the genus Scylla de Haan, 1833 (Crustacean: Decapoda: Brachura: Portunidae) The Raffles Bulletin of Zoology. 46(1):217-245.

Lanteigne, C., Beninger, P. G. and Gionet, C. 1996. Ontogeny of female primary sexual characters in the majid crabs *Chionoecetes opilio* and *Hyas coarctatus*. Journal of crustacean biology, 16(3): 501-514.

Lee, T. H. and Yamazaki, F. 1990. Structure and function of a special tissue in the female genital duct of the Chinese Freshwater crab *Eriocheir sinensis*. Biol. Bull. 178:94-100.

Poovachiranon, S. 1991. Biological studies of the mud crab *Scylla serrata* (Forskal) of the mangrove ecosystem in the Andaman Sea. *In* : C. A. Angell, The mud crab. A report on the seminar convened in Surat Thani, Thailand, November 5 - 8, 1991. Bay of Bengal Programme, Madras, India : pp. 49-58.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สารละลายที่ใช้ในการศึกษา

วิธีเตรียม Davidson solution

วิธีเตรียม Davidson solution

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

วิธีเตรียมสี Hematoxylin

การเตรียม Mayer's hematoxylin

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

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

วิธีเตรียมสี Eosin

วิธีเตรียมสี Eosin

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

ผสมเข้าด้วยกัน

วิธีเตรียมสี Millon

วิธีเตรียมสี Millon

Solution A

Mercuric sulfate	10 g.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Distilled water	190 ml
Sulfuric acid conc	10 ml

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

Solution B

Sodium nitrite	250 mg
Distilled water	10 ml

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

<u>วิธีเตรียมสี Masson trichrome</u>

วิธีเตรียมสี Masson trichrome

Solution A

Acid fuchsin	0.5 g
Glacial acetic acid	0.5 ml
Distilled water	100 ml

Solution B

Phosphomolybdic acid	1.0 g
Distilled water	100 ml

Solution C

Methyl blue	2.0 g
Glacial acetic acid	2.5 g
Distilled water	100 ml

<u>วิธีเตรียมสี Periodic acid Schiff (PAS)</u>

<u>วิธีเตรียมสี PAS</u>

Periodic acid solution

Periodic acid	0.6 g.
Distilled water	100 ml
Nitric acid conc	0.3 ml

Schiff's reagent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Basic fuchsin	0.5-1 g.
Distilled water	85 ml
Sodium metabisulfite	1.9 g.
Hydrochloric nomal	15 ml
Activated charcoal	200 mg

ผสมสารที่กล่าวมาในขวดที่มีที่ว่างเหนือสารละลายประมาณ 50-60 ml. คอยเขย่าขวดเป็นระยะใช้เวลาอย่างน้อย 2 ชม. หรือทิ้งไว้ค้างคืน แล้วเติม200 mg ของผงถ่านโดยเขย่าขวดทิ้งไว้ 1นาที จากนั้นจึงกรอง ถ้าสารละลายไม่เป็นน้ำใสๆแสดงว่าผงถ่านเก่าเกินไป ควรเปลี่ยนใหม่แล้วจึงกรองใหม่ หลังจากนั้นควรเก็บสารละลายที่ได้ในขวดที่มีเนื้อที่อากาศเหนือสารละลายน้อยที่สุด และเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อช่วยลดการสูญเสียของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไม่ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีเตรียมสี Ninhydrin-Schiff

วิธีเตรียมสี Ninhydrin-Schiff

Ninhydrin

Ninhydrin 0.5 % ใน absolute alcohol

Schiff's reagent จากการย้อม PAS

วิธีเตรียมสี Alcian Blue

วิธีเตรียมสี Alcian blue

Solution A

3 % Acitic acid จะได้ PH 2.5

0.5% Acitic acid จะได้ PH 3.2

Solution B

Alcian blue 1g.

ละลาย Alcian blue ใน solution A ทั้ง 2 PH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ข้อมูลดิบ

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 1

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(mm.)	Ab(mm.)	โคนขา(mm.)	ระยะ	สี/ต.น.sperm.	รูปร่าง/สี oviduct
1	136.50	89.1	31.0	459	1	ขาวขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
2	230	108.2	45.1	51.38	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
3	240	112.5	48.6	547	1	ขาวขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
4	230	103.7	44	52	1	ขาวขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
5	295	119.0	45	56.7	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
6	204	99.5	39.3	48.2	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
7	210	105.7	43.6	51.2	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
8	210	104.3	45.4	54	1	ขาวขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
9	215	105.2	47.4	53.4	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
10	185	100.8	43.2	52.9	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
11	195	98.3	39.9	49.3	1	ขาวขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
12	275	117	51.9	57.7	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
13	348.75	124	50.3	60.6	1	ขาวขุ่น/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
14	305.75	116.3	51	57.2	1	ขาวขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
15	195.69	101.3	42	49.4	1	ขาวขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
16	259.4	112.1	48.7	63.1	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
17	190.50	99.5	39	48.6	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้างมาก/ขาว
18	210.80	102.5	41.6	48.2	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาว
19	230.20	109.8	47.7	59.9	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
20	222.5	109.4	48.6	59.7	1	ขาวขุ่น/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
21	217.6	101.1	41.3	53.5	1	ขาวขุ่น/ขวา	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
22	209.4	106.8	48.8	59	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้างมาก/ขาวขุ่น
23	195.60	97.8	43.5	55	1	ขาวเหลือง/ขวา	แผ่กว้าง/ขาว
24	195.65	101.6	46.5	53.2	1	ขาวเหลือง/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 2

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(mm.)	Ab(mm.)	โคนขา(mm.)	ระยะ	สี/ต.น.sperm.	รูปร่าง/สี oviduct
1	175	95.2	40.8	46.7	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาว
2	220	105	44.4	51.1	2	ขุ่นเหลืองง/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
3	230	106	46.02	52.8	2	ใสขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
4	240	108.0	46.6	53.7	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/เหลืองขุ่น
5	340	120.9	53.2	61.0	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
6	432.30	132.3	57.8	72.2	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
7	379.85	132.6	57.4	64	2	เหลืองอ่อน/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
8	650.85	148.5	63.7	72.4	2	เหลืองใส/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
9	248.40	107.4	44.6	50.7	2	เหลืองใส/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
10	182.25	99.2	46.6	56.3	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
11	203.5	101	42	49.3	2	เหลืองอ่อน/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
12	295.30	113.5	53	64.6	2	เหลืองใส/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
13	257.75	106.8	43	51.7	2	เหลืองขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
14	292.6	116	46.9	56.3	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
15	163.45	94.3	42.4	52.6	2	เหลืองใส/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
16	265.15	115	45.7	59.8	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
17	267.4	115.7	53	60.4	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาว
18	221.55	102.5	46.4	59	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/ขาว
19	214.35	101.3	43	51.2	2	เหลืองใส/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
20	303.45	114.7	50	51.47	2	เหลืองขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
21	244.25	105	48.1	59.6	2	เหลืองขุ่น/ซ้าย	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
22	250.45	108	43.5	51.8	2	เหลืองใส/ขวา	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
23	282.55	103.8	52.5	64	2	เหลืองใส/ซ้าย	แผ่กว้าง/เหลืองขุ่น
24	174.80	95	42.5	47.6	2	เหลืองขุ่น/ขวา	แผ่กว้าง/เหลืองขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 3

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(mm.)	Ab(mm.)	โคนขา(mm.)	ระยะ	สี/ต.น.sperm.	รูปร่าง/สี oviduct
1	141.95	90.5	37.0	46.1	3	ขาวขุ่น/	แคบ/ใส
2	126.55	87.2	38.3	44.4	3	เหลืองขุ่น/	แคบบาง/ขาวขุ่น
3	148.75	93	38.8	46.6	3	เหลืองขุ่น	แคบ/ขาวใส
4	171.90	99.2	40	45.6	3	เหลืองใส	แคบ/ขาวใส
5	191.35	108.5	43.9	50.4	3	เหลืองใส	แคบบาง/ขาวขุ่น
6	215	102.9	46.2	52.1	3	เหลืองอ่อน	แคบ/ขาวขุ่น
7	217	102.7	42	50.7	3	เหลืองอ่อน	แคบบาง/ขาวใส
8	241.45	108	43	51.8	3	เหลืองใส	แคบบาง/ขาวใส
9	267	111.3	47.3	53.8	3	เหลืองใส	แคบ/ขาวขุ่น
10	255.6	102.3	42.3	58	3	เหลืองขุ่น	แผ่กว้าง/ขาวขุ่น
11	237.35	107.4	49	58.5	3	เหลืองขุ่น	แผ่กว้าง/ใส

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 ข้อมูลปูทะเลเพศเมียที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะที่ 4

ตัวที่	น.น(g)	c.w.(mm.)	Ab(mm.)	โคนขา(mm.)	ระยะ	สี/ต.น.sperm.	รูปร่าง/สี oviduct
1	180.20	100.1	41.6	55.5	4	ขาวขุ่น/ขวา	แคบบาง/ขาวใส
2	217.15	102.2	44.8	53.7	4	เหลืองขุ่น/ซ้าย	แคบบาง/เหลืองใส
3	193.15	97.7	42.2	52.7	4	ขาวขุ่น/ซ้าย	แคบบาง/เหลืองใส
4	225	101.1	42.6	50.9	4	ขาวขุ่น/ขวา	แคบบาง/ส้มใส
5	240	110.4	48.3	56.5	4	ขาวขุ่น/ขวา	แคบบาง/ส้มใส
6	225	105.5	42.8	51.9	4	เหลืองขุ่น/ขวา	แคบบางส้มใส
7	210	98.9	41.3	49.8	4	ขาวขุ่น/ขวา	แคบบาง/เหลืองใส
8	147.20	96.3	38.7	46	4	เหลืองขุ่น/ขวา	แคบบาง/ขาวใส
9	149.60	95.6	36.3	46.6	4	เหลืองขุ่น/ขวา	แคบบาง/ส้มใส
10	260	108.4	45.9	52.7	4	เหลืองขุ่น/ขวา	แคบบาง/ขาวใส
11	198	101.3	43.2	48.9	4	ขาวขุ่น/ซ้าย	แคบบาง/ขาวใส
12	190	98.4	41.5	48.5	4	ขาวขุ่น/ขวา	แคบบาง/ส้มใส
13	200	101.9	42.9	50.6	4	ขาวขุ่น/ขวา	แคบบาง/ส้มใส
14	215	103.2	43.1	50.3	4	เหลืองขุ่น/ขวา	แคบบาง/ส้มใส
15	214	111.4	46.5	54.1	4	เหลืองขุ่น/ขวา	แคบบาง/เหลืองใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้