ศักยภาพในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae

ปริญญานิพนธ์

ของ

สุณีรัตน์ ศรัทธามั่น

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

กันยายน 2547

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ศักยภาพในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae

บทคัดย่อ

ของ

สุณีรัตน์ ศรัทธามั่น

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
กันยายน 2547

สุณีรัตน์ ศรัทธามั่น. (2547). *ศักยภาพในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). .กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล, รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล.

จากการทดลองถึงศักยภาพในการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV) ในปูวงศ์ต่างๆ ได้แก่ กลุ่มปูแสม วงศ์ Grapsidae 6 ชนิด กลุ่มปูม้า วงศ์ Portunidae 4 ชนิด กลุ่มปูกระดุม วงศ์ Leucosiidae 1 ชนิด กลุ่มปูเสฉวน วงศ์ Pagaridae 1 ชนิด กลุ่มปูก้ามดาบ วงศ์ Ocypodidae 3 ชนิด และ กลุ่มปูน้ำจืด วงศ์ Parathelphusidae 1 ชนิด จากบริเวณที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในจังหวัดสมุทรปราการโดยการฉีดด้วย haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV พบว่าไม่มีอาการของการติดเชื้อในปูเหล่านี้ จากการตรวจสอบโดยวิธี immunohistochemistry ไม่พบการติดเชื้อ YHV ในเนื้อเยื่อใดๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง ซึ่งทำการทดลองยืนยันโดยวิธี RT-PCR แต่พบการติดเชื้อตามธรรมชาติโดยไวรัสอื่นๆ หลายชนิดในตับและตับอ่อน ซึ่งพบในปูแสม 2 ชนิด คือ *Sesarma mederi* และ *S. moeschii* และยังพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ในปูวงศ์ Portunidae 2 ชนิด และปูในวงศ์ Leucosiidae 1 ชนิด ดังนั้นปูในวงศ์ดังกล่าวน่าจะสามารถทนทานต่อการติดเชื้อ YHV ได้ดีแต่อาจเป็นพาหะของไวรัส WSSV และไวรัสอื่นๆ หลายชนิดที่อาจสามารถถ่ายทอดไปยังกุ้งได้

POTENTIAL CARRIERS OF YELLOW HEAD VIRUS IN CRABS : GRAPSIDAE PORTUNIDAE LEUCOSIIDAE PAGURIDAE OCYPODIDAE AND PARATHELPHUSIDAE

AN ABSTRACT

BY

SUNEERAT SATTAMAN

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree in Biology

at Srinakharinwirot University

September 2004

Suneerat Sattaman. (2004). *Potential carriers of yellow head virus in crabs : Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae and Parathelphusidae.* Master thesis, M. Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assoc. Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul, Assoc. Prof. Dr. Weerawan Sithigorngul.

Crabs : 6 species of Grapsidae, 4 species of Portunidae, 1 species of Leucosiidae, 1 species of Paguridae, 3 species of Ocypodidae and 1 species of Parathelphusidae were collected near *Penaeus monodon* farming areas in Samutprakan province and used for experimental infection of Yellow Head Virus (YHV). Injections of haemolymph from *Penaeus monodon* infected with YHV were performed in these crabs. After 3-30 days, no sign of infection was observed and most of the crabs survived well. Immunohistochemical study showed no sign of YHV infection in all tissues examined and the RT-PCR analysis confirmed the same results. Infections of other kinds of viruses in hepatopancreas were observed in *Sesarma mederi* and *S. moeschii*. Immunohistochemical study demonstrated infection of white spot syndrome virus (WSSV) in 2 species of Portunidae and 1 species of Leucosiidae. It is certained that all determined crab species are resistant to YHV infection; however, some of these crabs can be the carriers for WSSV and other kinds of viruses that may be able to transmit to the shrimp.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

และ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ศักยภาพในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae

ของ

นางสาวสุณีรัตน์ ศรัทธามั่น

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล ดร. ศิวาพร ลงยันต์ และ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร.

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุรินทร์ มัจฉาชีพ จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาตรวจสอบลักษณะอนุกรมวิธานของปูวงศ์ Grapsidae

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับการให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับการให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวรรนิภา เพี้ยนภักตร์ คุณสมบัติ รักประทานพร คุณพอจิต วิโนทพรรษ์ และคุณนันทิกา ปานจันทร์ ที่ช่วยสอนด้านเทคนิคต่าง ๆ ของงานวิจัยและให้คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ คุณวิลาวัลย์ รักษาธรรม คุณภิรมย์ศักดิ์ พัฒนไพจิตต์กุล คุณจรัสพร ตั้งขบวนบุตร และ คุณธนวรรณ เตชางกูร ที่ให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ จนทำให้วันนี้เกิดขึ้นได้

สุดท้ายนี้ใคร่ขอกราบขอบคุณพระคุณบิดา มารดา และน้องๆ ที่สนับสนุนในด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด จนทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี และขอขอบคุณผู้ที่มีพระคุณที่ช่วยเหลือทุกท่านที่มิได้กล่าวนามไว้ในที่นี้

สุณีรัตน์ ศรัทธามั่น

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
	ความสำคัญของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
	สมมติฐานในการวิจัย	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	โรคหัวเหลือง	5
	สัณฐานวิทยาของไวรัสหัวเหลือง	6
	ชนิดและลักษณะของปูในวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae	6
	ลักษณะของปูในวงศ์ Grapsidae	6
	ลักษณะของปูในวงศ์ Portunidae	7
	ลักษณะของปูในวงศ์ Leucosiidae	7
	ลักษณะของปูในวงศ์ Paguridae	7
	ลักษณะของปูในวงศ์ Ocypodidae	8
	ลักษณะของปูในวงศ์ Parathelphusidae	8
	การศึกษาและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไวรัสหัวเหลือง	8
	การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับพาหะของโรคไวรัสหัวเหลือง	12
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	17
	สัตว์ทดลอง	17
	อุปกรณ์และสารเคมี	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	วิธีดำเนินการทดลอง	20
	การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงปู	20
	การพิสูจน์ทราบชนิด	20
	การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง	21
	การวางแผนการทดลอง	21
	การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ	21
	การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล	29
4	**ผลการวิเคราะห์ข้อมูล**	31
	การพิสูจน์ทราบชนิดของปู	31
	การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry	51
	การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี RT- PCR	51
5	**สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**	60
	บรรณานุกรม	63
	ภาคผนวก	68
	ประวัติย่อผู้วิจัย	102

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1 แสดง อุณหภูมิ ระยะเวลาและจำนวนรอบ ในแต่ละขั้นตอนการทำงาน RT-PCR..... 26

2 แสดง อุณหภูมิ ระยะเวลาและจำนวนรอบ ในแต่ละขั้นตอนการทำงาน PCR..... 28

3 แสดงชนิดปูที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ และนำมาชักนำให้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดย
การฉีดและเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ..... 52

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แสดงการหยดแอนติบอดีตัวแรก ในการตรวจหาเชื้อไวรัส	23
2	แสดงตำแหน่งการแสดงผลของ gel electrophoresis (RT-PCR)	27
3	แสดงตำแหน่งการแสดงผลของ gel electrophoresis (PCR)	29
4	แสดงลักษณะของ *Metopograpsus latifrons*	35
5	แสดงลักษณะของ *Sesarma mederi*	36
6	แสดงลักษณะของ *Sesarma polita*	37
7	แสดงลักษณะของ *Sesarma bocourti*	38
8	แสดงลักษณะของ *Sesarma moeschii*	39
9	แสดงลักษณะของ *Varuna literata*	40
10	แสดงลักษณะของ *Charybdis affinis*	41
11	แสดงลักษณะของ *Charybdis feriatus*	42
12	แสดงลักษณะของ *Scylla serrata*	43
13	แสดงลักษณะของ *Portunus pelagicus*	44
14	แสดงลักษณะของ *Philyra olivacea*	45
15	แสดงลักษณะของ *Clibanarius longitarsus*	46
16	แสดงลักษณะของ *Uca forcipata*	47
17	แสดงลักษณะของ *Uca vocans*	48
18	แสดงลักษณะของ *Uca lactea*	49
19	แสดงลักษณะของ *Somanniathelphusa germaini*	50
20	แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ของปูที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19	54
21	แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ของกุ้งกุลาดำที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19	55

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
22	RT-PCR ของ *Uca forcipata*	56
23	ตับและตับอ่อน ของ *Sesarma mederi* ที่ติดเชื้อไวรัสไม่ทราบชนิด ซึ่งเกิด occlusion bodies ในนิวเคลียสของเซลล์	57
24	แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ของ *Charybdis affinis* และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29	58
25	PCR สำหรับตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาวในปู 1. ***Charybdis affinis*** , 2. *Philyra olivacea* และ 3. *Portunus pelagicus*.....	59

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง ปัจจุบันกลายเป็นอุตสาหกรรมหลักในหลายๆ ประเทศ ทำให้ผลผลิตของกุ้งมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี โดยพบว่าผลผลิตกุ้งทั่วโลกโดยรวมมีปริมาณถึง 810,000 เมตริกตัน และกุ้งที่นิยมเลี้ยงกันทั่วโลกคือ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (จันทสิงห์ ดวงบ้านเช่า; และ ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. 2545 : 222) ซึ่งประเทศไทยเป็นผู้นำในด้านการผลิตและส่งออกกุ้งกุลาดำ ตั้งแต่ ปี 2534 จนถึงปัจจุบัน มีมูลค่าการส่งออกในแต่ละปีหลายหมื่นล้านบาท (ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543 : 202) ในปี 2546 ระหว่างเดือน มกราคม-พฤศจิกายน มีการส่งออกกุ้ง 213,684 ตัน มีมูลค่า 66,599 ล้านบาท ถึงแม้ว่าการส่งออกของกุ้งจะสามารถทำเงินเข้าประเทศได้มากมาย แต่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำก็มักจะประสบปัญหาเรื่องโรคในการเลี้ยงตลอดมา ซึ่งพบว่าจากการเลี้ยงในปัจจุบันเป็นแบบพัฒนา ทำให้เกิดปัญหาขึ้น (วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล; สุรพล วิเศษสรรค์ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2547: 22) เนื่องจากสภาพแวดล้อมในบางพื้นที่เริ่มเสื่อมโทรม มีการเลี้ยงที่หนาแน่น และการจัดการที่ไม่ดีพอ ทำให้ปัญหาของโรคกุ้งเกิดมากขึ้น ซึ่งโรคติดเชื้อที่พบในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มีทั้งที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Vibrio. parahaemolyticus V. harveyi* การติดเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสเอ็มบีวี (Monodon Baculovirus : MBV) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus : WSSV) ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus : YHV) จากเชื้อรา และปรสิตอื่นๆ (จันทนา นิธิเมธาโชค. 2539: 1)

ไวรัสที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่ผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำตั้งแต่ปี 2533 คือ ไวรัสหัวเหลือง โดยมีการระบาดของโรคหัวเหลืองในแถบพื้นที่ภาคกลาง 3 จังหวัดคือ สมุทรปราการ สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม (จิราพร เกษรจันทร์; และ สิทธิ บุณยรัตผลิน. 2538 : 2) ต่อมาในปี 2534 ทำความเสียหายอย่างรุนแรงในจังหวัดฉะเชิงเทรา จันทบุรี ตราด และบางจังหวัดในเขตภาคใต้ (ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543 : 177) ในที่สุดราวต้นปี 2535 ได้เกิดการระบาดของโรคหัวเหลืองทางภาคใต้ ในเขตพื้นที่การเลี้ยงแถบชายฝั่งทะเลตะวันออกของภาคใต้ตอนล่าง ที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช เป็นพื้นที่แรกที่พบว่ามีการระบาดของโรคหัวเหลือง ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น คิดเป็นมูลค่าความเสียหายไม่น้อยกว่า 80 ล้านบาท ในระยะเวลาไล่เลี่ยกันก็เกิดการระบาดของโรคหัวเหลืองขึ้นในพื้นที่รอบทะเลสาบสงขลา จังหวัดสงขลา และระบาดเข้าสู่จังหวัดใกล้เคียง และกระจายไปสู่พื้นที่การเลี้ยงของจังหวัดตรัง กระบี่ และสตูล ซึ่งเป็นจังหวัดที่ตั้งอยู่ชายทะเลอันดามัน จากการแพร่ระบาดของโรคหัวเหลืองเฉพาะในปี 2535 ได้สร้างความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในภาคใต้คิดเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 500 ล้านบาท (จิราพร เกษรจันทร์; และ สิทธิ บุณยรัตผลิน.

2538 : 2) จนกระทั่งปี 2536 ทุกจังหวัดที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบการระบาดของโรคหัวเหลืองชื่อโรคชนิดนี้เรียกตามลักษณะของกุ้งที่ป่วย ซึ่งกุ้งมักจะอยู่ตามริมขอบบ่อ ลำตัวมีสีซีด มองเห็นส่วนหัวมีสีเหลือง เนื่องจากตับและตับอ่อน (hepatopancreas) มีสีซีดเหลือง กุ้งที่เป็นโรคหัวเหลืองจะมีขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กอายุ 25 วันขึ้นไปจนถึงประมาณ 70 วัน โดยโรคหัวเหลืองที่เกิดกับกุ้งอายุ 25-35 วัน พบว่ากุ้งตายอย่างรวดเร็วโดยใช้เวลา 2-3 วัน กุ้งจะตายหมดบ่อสำหรับโรคหัวเหลืองที่เกิดกับกุ้งอายุประมาณ 50-70 วัน ก่อนที่จะเริ่มมีกุ้งตาย การกินอาหารจะเพิ่มขึ้นมากติดต่อกันหลายวัน หลังจากเริ่มพบว่ามีกุ้งตายอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายใน 2-3 วันกุ้งจะตายหมดบ่อ เมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกชนิด พบว่าโรคหัวเหลืองทำให้กุ้งตายรวดเร็วและรุนแรงมากที่สุด และการแพร่กระจายในพื้นที่การเลี้ยงแต่ละแหล่งจะรวดเร็วมาก (ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543 : 177-178)

โรคหัวเหลืองยังไม่มีสารเคมีหรือยาใดๆ รักษาได้ ดังนั้นวิธีป้องกันจึงจำเป็นที่นักวิชาการหลายกลุ่มทำการศึกษา เพื่อเสนอแนะวิธีการป้องกันที่ดีที่สุดแก่ผู้เลี้ยงกุ้ง ได้แก่ การจัดการสิ่งแวดล้อมในบ่อเพาะเลี้ยง หยุดการให้อาหารสด รวมทั้งไม่ใช้อุปกรณ์ปะปนกันระหว่างบ่อ นอกจากนี้การกำจัดสัตว์ต่างๆ เช่น กุ้ง ปู และอาร์โทรปอด ที่เชื่อว่าอาจเป็นพาหะของไวรัสหัวเหลืองก่อนปล่อยลูกกุ้งลงบ่อเลี้ยงก็จะเป็นการป้องกันการระบาดของไวรัสหัวเหลืองได้ ดังนั้นการวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสต่างๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อเป็นแนวทางการป้องกันสัตว์เหล่านั้นเข้ามาสู่ระบบการเลี้ยงกุ้ง (ยัยนับ แวและ. 2545 : 3)

วิธีในการตรวจวินิจฉัยโรคหัวเหลืองโดยการดูจากลักษณะอาการนั้นเป็นวิธีที่ไม่มีความจำเพาะและไม่สามารถใช้ได้ในการตรวจพบระยะแรกๆ ของการติดเชื้อ (Tang; & Lightner.1999 : 166) ต่อมา มีการพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำโดยวิธี one-step nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ที่ให้ผลที่มีความจำเพาะและมีความไวสูงในการตรวจสอบ และได้มีการทดสอบต่อใน ปูม้า ปูทะเล ปูแสม และปูก้ามดาบ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าปูเป็นพาหะของโรคหัวเหลืองและสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำปกติได้โดยผ่านทางน้ำ (รัชนี กลิ่นพุฒซ้อน. 2543 : 164)

จากความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนของไวรัสหัวเหลือง คือ V3-2B ที่จำเพาะต่อโปรตีน gp116 (แต่เดิมเรียก p135) (Sithigorngul; et al. 2000 : 27) Y19 ที่จำเพาะต่อโปรตีน p20 (แต่เดิมเรียก p22) Y18-2D ที่จำเพาะต่อโปรตีน gp64 (แต่เดิมเรียก p67) และ Y3-8H ที่จำเพาะต่อโปรตีน gp116 ซึ่งแอนติบอดีดังกล่าวนี้มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองสูงมาก สามารถจับกับโปรตีนของไวรัสหัวเหลืองที่อยู่ในสภาพปกติและถูกทำให้เสียสภาพด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ทำให้สามารถใช้แอนติบอดีนี้ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี

immunohistochemistry ได้อย่างสะดวกและเสียค่าใช้จ่ายน้อยมาก ดังนั้นทำให้สามารถศึกษาการติดเชื้อในสัตว์ที่คาดว่าอาจจะเป็นพาหะได้อย่างกว้างขวาง (Sithigorngul; et al. 2002 : 71-73)

ในการวิจัยจึงได้เลือกใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองร่วมกับวิธี immunohistochemistry ในการตรวจก่อนในขั้นแรกและยืนยันผลการทดลองด้วยการใช้วิธี RT-PCR มาเป็นเครื่องมือตรวจสอบการติดเชื้อในปูบางชนิดที่มักพบบ่อยๆ ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากคาดว่าปูดังกล่าวนั้นอาจจะเป็นพาหะนำโรคได้

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อสำรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติของปูชนิดต่างๆ จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและการติดเชื้อจากการทดลองโดยฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้กับปูชนิดต่างๆ

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของปูที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสหัวเหลือง
2. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการวางแนวทางการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสหัวเหลืองต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. สำรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของปูชนิดต่างๆ ในวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae ในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอเมืองและอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ โดยจำนวนปูแต่ละชนิดประมาณ 15-20 ตัว

2. เหนี่ยวนำการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูชนิดต่างๆ ในวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae โดยจำนวนปูในแต่ละชนิดประมาณ 15-20 ตัว

3. ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติ และการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของปูชนิดต่างๆ ในวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae โดยวิธี indirect peroxidase immunohistochemistry

4. ยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูชนิดต่างๆ ในวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae ที่เหนี่ยวนำการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธีการฉีด โดยใช้วิธี RT-PCR ในการตรวจสอบ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. **ศัพท์ที่** 1 Yellow head virus (YHV) หมายถึง ไวรัสหัวเหลือง มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) ขนาด 150-170 x 40-50 นาโนเมตร ภายในเป็นนิวคลีโอแคปซิด

(nucleocapsid) ล้อมรอบด้วยเปลือกหุ้ม (envelope) ที่เป็นปุ่มปมหรือหนาม มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA) ประกอบด้วยโครงสร้างของโปรตีนทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ gp116 gp64 และ p20

2. **ศัพท์ที่** 2 Indirect peroxidase immunohistochemistry หมายถึง เทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน (antigen) ในเนื้อเยื่อโดยอาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อกัน เทคนิคนี้จะใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยสารบางชนิด เช่น เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ horseradish peroxidase นำมาติดกับแอนติบอดีตัวที่สอง จากนั้นตรวจสอบการมีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยตรวจดูการเปลี่ยนของซับสเตรต คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ สารที่ทำให้เกิดสี (chromogen) คือ 3,3'–diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ปฏิกิริยาที่ได้เกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase กลายเป็นผลิตผล (product) ได้แก่ ออกซิเจนและน้ำ ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะไปทำปฏิกิริยากับ DAB ทำให้สารละลายเปลี่ยนสภาพเป็นตะกอนสีน้ำตาลอยู่บริเวณที่แอนติบอดีจับกับแอนติเจน ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งที่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา

3. **ศัพท์ที่** 3 Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) หมายถึง การนำเทคนิค PCR มาใช้ตรวจวิเคราะห์ RNA โดยขั้นตอนสำคัญ เริ่มต้นด้วยการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของตัวอย่าง แล้วใช้ RNA นี้เป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับปฏิกิริยา reverse transcription ให้สังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) จากนั้นจะใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer สองสาย ที่สังเคราะห์มาเพื่อขยายตำแหน่งที่สนใจบน cDNA นั้น ผลิตผล PCR ที่ขยายจำนวน cDNA สามารถตรวจวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

สมมติฐานในการวิจัย

ปูในวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae ที่อาศัยอยู่ในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอาจจะมีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและมีศักยภาพในการเป็นพาหะเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคไวรัสในกุ้งกุลาดำที่พบว่ามีการระบาดในประเทศไทย ได้แก่ ไวรัสเอ็มบีวี (monodon baculovirus : MBV) ไวรัสเอชพีวี (hepatopancreatic parvo-like virus : HPV) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus : WSSV) และ ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus : YHV) (Supamattaya; et al. 1998 : 80) แต่โรคติดเชื้อไวรัสที่เกิดการระบาดและทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำมาอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมา และยังคงทำความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งอยู่ในปัจจุบันคือ โรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งเกิดจาก ไวรัสตัวแดงดวงขาว และ โรคหัวเหลืองที่เกิดจาก ไวรัสหัวเหลือง โดยพบว่าในช่วงปี 2535-2538 พบการระบาดของโรคหัวเหลืองในแถบชายฝั่งทะเลของภาคใต้ ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งคิดเป็นจำนวนเงินถึง 500 ล้านบาท (กรีสัลย์ พรรคทองสุข. 2545 : 1-2)

โรคหัวเหลือง

โรคหัวเหลืองเป็นโรคที่เรียกตามกลุ่มอาการของกุ้งที่มีลักษณะเป็นโรคบริเวณส่วนหัว หรือ ตับ และตับอ่อนจะพบว่ามีสีเหลือง ซึ่งเกิดจากไวรัสหัวเหลือง เป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างหนักในการเลี้ยงกุ้งของไทยตั้งแต่ปี 2533 เป็นต้นมาและเป็นโรคที่เฉพาะเจาะจงกับประเทศไทยเพราะสภาพทั่วไปเหมาะสมและมีการระบาดอย่างหนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณชายฝั่งที่มีการเลี้ยงกุ้งบริเวณที่มีความเค็มสูง (บริษัท สยาม ซิตโต้ จำกัด. 2545 : 3) อาการที่เด่นชัดคือบริเวณหัวจะบวมโตมีสีเหลืองชัด ซึ่งหากมีการติดเชื้อถึงขั้นนี้ก็ไม่มีทางที่จะสามารถรักษาได้และจะมีอัตราการตายอย่างรวดเร็วและหมดบ่อภายใน 3 วัน (Sittidilokratna; et al. 2002 : 87) กุ้งที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลืองพบว่า จะมีการกินอาหารมากกว่าปกติในช่วงที่เริ่มติดเชื้อติดต่อกันหลายวันหลังจากนั้นจะกินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหารเลย จะมีกุ้งว่ายมาเกยขอบบ่อและมีการตายอย่างต่อเนื่อง บริเวณตับและตับอ่อนบวมโตและมีสีเหลืองชัดเจนในอดีตมีการระบาดตั้งแต่กุ้งอายุ 1 เดือน จนถึงช่วงของการเลี้ยง กุ้งที่กินอาหารปกติก็สามารถเป็นโรคได้เช่นกัน สามารถตรวจดูลักษณะการติดเชื้อทาง histology โดยการย้อมเม็ดเลือดกุ้งด้วยสีย้อมเม็ดเลือดเพื่อดูความผิดปกติของนิวเคลียส การทำลายของไวรัสจะทำให้นิวเคลียสหดเล็กลง (pyknotic nucleai) และต่อมาจะเกิดการแตกของนิวเคลียส (karyorrhexis) และสุดท้ายเกิดการเสื่อมสลาย (karyolysis) หรือดูจากปริมาณการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดโดยกุ้งปกติจะมีเม็ดเลือดประมาณ 20,000-40,000 เซลล์/มิลลิลิตร ส่วนกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเม็ดเลือดจะมีปริมาณลดลงเหลือน้อยกว่า 1,000 เซลล์/มิลลิลิตร หรือไม่สามารถตรวจพบเม็ดเลือดได้เลยแต่กุ้งยังมีชีวิตอยู่ การระบาดของโรคหัวเหลืองนี้จะพบมากในช่วงรอยต่อระหว่างฤดูแต่ที่มีการระบาดอย่างหนักเป็นช่วงฤดู

หนาวซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากพฤติกรรมของกุ้งที่เมื่ออากาศเย็นลงกุ้งจะชอบหมกในกองเลน ซึ่งเป็นแหล่งสะสมของเสียและเชื้อโรคต่างๆ มากมาย ดังนั้นโอกาสที่กุ้งจะติดเชื้อโปรโตซัว หรือแบคทีเรียมีสูง ทำให้ไวรัสสร้างความเสียหายตามมาได้ แต่ปัจจุบันแม้แต่หน้าร้อนก็ยังพบว่ามีการระบาดของไวรัสหัวเหลืองได้เหมือนกัน (บริษัท สยาม ซิตโต้ จำกัด. 2545 : 3-4)

สัณฐานวิทยาของไวรัสหัวเหลือง

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและย้อมด้วยวิธี negative stain พบว่าไวรัสหัวเหลืองมีขนาด 150-170 x 40-50 นาโนเมตร ลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) ภายในเป็นนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ล้อมรอบด้วยเปลือกหุ้ม (envelope) ที่เป็นปุ่มปมหรือหนาม (Khanobdee; et al. 2002 : 80) มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA) (Wongteerasupaya; et al. 1995 : 45) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ Western blot พบว่าประกอบด้วยโครงสร้างของโปรตีนทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ gp116 gp64 และ p20 นอกจากนั้นยังพบว่าโปรตีน gp116 และ gp64 เท่านั้นที่เป็น glycosylated protein (Jitrapakdee; et al. 2003: 836)

ชนิดและลักษณะของปูในวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae

ชนิดของปูในวงศ์ Grapsidae เช่น *Metopograpsus latifrons Sesarma mederi S. polita S. bocourti S. moeschii* และ *Varuna literata*

ชนิดของปูในวงศ์ Portunidae เช่น *Charybdis affinis C. feriatus Scylla serrata* และ *Portunus pelagicus*

ชนิดของปูในวงศ์ Leucosiidae เช่น *Philyra olivacea*

ชนิดของปูในวงศ์ Paguridae เช่น *Clibanarius longitarsus*

ชนิดของปูในวงศ์ Ocypodidae เช่น *Uca forcipata U. vocans* และ *U. lactea*

ชนิดของปูในวงศ์ Parathelphusidae เช่น *Somanniathelphusa germaini*

ลักษณะของปูในวงศ์ Grapsidae

กระดองมีลักษณะกลมโค้งหรือคล้ายรูปสามเหลี่ยม front กว้าง เบ้าตาอยู่ตรงขอบด้านหน้าของมุมกระดองด้านนอก แผ่นกั้นระหว่างหนวดคู่ที่ 1 มีลักษณะกว้าง maxilliped คู่ที่ 3 มี palp อยู่ตรงกลางหรือตรงขอบด้านนอกของ merus ส่วนของ exognath มีลักษณะกว้างหรือยาวเรียว ช่องว่างระหว่าง maxilliped คู่ที่ 3 เป็นรูปสามเหลี่ยมขนมเปียกปูน ก้ามหนีบและขาเดินแข็งแรง ส่วน

ท้องของตัวผู้อาจแผ่ขยายเต็มหรือไม่เต็มช่องว่างระหว่างขาเดินคู่สุดท้าย ช่องเปิดเพศผู้อยู่บนปล้องอก ในประเทศไทยพบประมาณ 37 species (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2516 : 10 ; 2544 : 6)

ลักษณะของปูในวงศ์ Portunidae

กระดองแบนหรือโค้งนูนเล็กน้อย อาจมีบางชนิดโค้งนูนมากและมีความกว้างมากกว่าความยาว กระดองส่วนหน้ามักมีลักษณะเป็นแง่ยื่นหรือหนามหรือพู ซึ่งมีลักษณะรูปร่างแตกต่างกันบริเวณต่างๆ บนกระดองไม่ชัดเจน ขอบด้านข้างกระดองส่วนหน้ามีแง่ยื่นแหลมจำนวน 2 ถึง 9 อัน หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางหรือแนวเฉียงอยู่ใต้กระดองส่วนหน้า เส้นหนวดคู่ที่ 2 มีลักษณะเรียวยาว ช่องปากมีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมและมีความกว้างมากกว่าความยาว ขาเดินคู่สุดท้ายแผ่แบนแบบใบพายเพื่อช่วยในการว่ายน้ำในประเทศไทยพบประมาณ 42 species (ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ. 2532 : 23-24)

ลักษณะของปูในวงศ์ Leucosiidae

กระดองหนานูนโค้ง เป็นรูปไข่ กลม หรือมีหลายเหลี่ยม เบ้าตาและตามีขนาดเล็กมาก front แต่กว้างกว่าเบ้าตาหลายเท่า หนวดคู่ที่ 1 พับในแนวเฉียง หนวดคู่ที่ 2 มีขนาดเล็ก หรือไม่มี maxilliped คู่ที่ 3 คลุมช่องปากมิด palp พับอยู่ขอบด้านในเมื่อ maxilliped คู่ที่ 3 ปิดจะมองไม่เห็นจากภายนอก exognath กว้าง ก้ามหนีบปกติ มีขนาดเท่ากันทั้งสองข้าง ส่วนท้องปล้องที่ 3 ถึง 6 เชื่อมต่อกัน บางชนิดเชื่อมต่อกันเฉพาะส่วนท้องปล้องที่ 3 ถึง 5 เชื่อมต่อกัน บางชนิดเชื่อมต่อกันเฉพาะส่วนท้องปล้องที่ 3 ถึง 5 เท่านั้น ช่องเปิดของทั้งเพศผู้และเพศเมียอยู่ตรงส่วนฐานปล้อง coxa ของขาเดินคู่ที่ 5 ในประเทศไทยพบประมาณ 1 species (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 160-161)

ลักษณะของปูในวงศ์ Paguridae

กระดองค่อนข้างยาว ส่วนหลังกระดองค่อนข้างอ่อนและมีความกว้างมากกว่าส่วนหน้ากระดอง กรีเจริญไม่เต็มที่ มีขนาดสั้นมาก หรือบางพวกอาจไม่มีกรีเลย แผ่นบนก้านตามีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็กหรือเป็นแผ่นคล้ายพัดหรือคล้ายใบโพธิ์ ก้านหนวดคู่ที่ 1 สั้นกว่าความยาวของกระดองปล้องแรกของก้านหนวดมีขนาดใหญ่ ปล้องที่ 2 และ 3 มีลักษณะแบนทางด้านข้าง ส่วนปลาย flagellum คู่ที่ 1 มีลักษณะเรียวสั้น แผ่นกำบังหนวดมีขนาดใหญ่ ฐานของ maxilliped คู่ที่ 3 อยู่ชิดกันหรืออยู่แยกห่างออกจากกัน ขาเดินคู่ที่ 1 เป็นก้ามหนีบมีขนาดเท่ากัน หรือก้ามข้างซ้ายมีขนาดใหญ่กว่าก้ามข้างขวา บางพวกมีก้ามข้างขวาใหญ่กว่าก้ามข้างซ้าย ขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 เรียวยาว ขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ลดรูปลงลักษณะคล้ายก้ามหนีบ ส่วนท้องอ่อนนิ่มและบิดงอไปทางด้านขวา ส่วนมากมีระยางค์ว่ายน้ำที่เจริญแล้วอยู่ทางด้านซ้ายของส่วนท้อง ส่วนท้องปล้องที่ 6 มีแพนหางด้านซ้ายขนาดใหญ่และแข็งแรงกว่าด้านขวา ในประเทศไทยพบประมาณ 3 species (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 124-125)

ลักษณะของปูในวงศ์ Ocypodidae

กระบอกตายาวเกือบตลอดด้านหน้าของกระดอง ขอบนอกของกระบอกตามักจะไม่สมบูรณ์ ก้านตาเรียวยาว front แคบและงุ้มลงเล็กน้อย ระยางค์ปล้องที่ 5 ของ maxilliped คู่ที่ 3 อยู่บริเวณมุมนอกด้านหน้าของ merus โดยทั่วไป exognath เรียวยาวและจะถูกบังไว้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับแต่ละชนิด maxilliped คู่ที่ 3 ปกคลุมช่องปากไว้จนมองไม่เห็นช่องปาก ตัวผู้ก้ามข้างหนึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าอีกข้างหนึ่ง ในประเทศไทยพบประมาณ 11 species (เสรี บรรพวิจิตร. 2522 : 22-23)

ลักษณะของปูในวงศ์ Parathelphusidae

กระดองนูน ขอบด้านหน้าของกระดองยื่นคลุมส่วนของ epistome ทำให้ส่วนหน้าเป็นรูปสามเหลี่ยม ส่วนของ antero-lateral border จะมีหนามแหลมคล้ายฟันเลื่อย 4 อัน ส่วนใหญ่ epigastric crest และ post-orbital crest จะเชื่อมเป็นสันเดียวกันอย่างเด่นชัด ส่วนท้องมีลักษณะคล้ายรูปตัว T ตอนปลายเรียวและขอบด้านข้างจะเว้าทั้งสองข้าง gonopod คู่แรกมี 4 ปล้อง โดยสองปล้องสุดท้ายจะเชื่อมเข้าด้วยกันเป็นปล้องเดียวกัน โดยบิดเอาด้านนอกเข้าใน ซึ่งส่วนปลายจะตรงหรือบิดเล็กน้อย ปล้องปลายสุดของ mandibular palp มีลักษณะเป็น 2 พู (กัลยาณี ยงจินดารัตน์. 2531 : 55)

การศึกษาและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไวรัสหัวเหลือง

Chantanachookin; et al (1993 : 145) ศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีอาการของโรคหัวเหลืองโดยการนำเนื้อเยื่อของกุ้งที่ใกล้ตายมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา พบว่าเนื้อเยื่อของอวัยวะน้ำเหลือง มีลักษณะที่ผิดปกติที่เห็นได้ชัดเจนมีการตาย (necrosis) ของเซลล์ พบว่าเซลล์ที่มีแวคิวโอลนั้นนิวเคลียสเกิดอาการบวม ส่วนในไซโตพลาสมพบ inclusion ที่ติดสีเบสอยู่ใกล้กับนิวเคลียสที่บวม นอกจากนี้ยังพบ inclusion ในเนื้อเยื่ออื่นๆ อีก นั้นคือ เนื้อเยื่อระหว่างเซลล์ตับ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ทางเดินอาหาร กล้ามเนื้อหัวใจ เนื้อเยื่อเหงือก และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวนี้ไม่เหมือนกับโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือพวกปรสิต และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าไวรัสหัวเหลืองมีรูปร่างเป็นแท่งและมีเปลือกหุ้ม พบในส่วนไซโตพลาสมที่ติดกับนิวเคลียสของเซลล์จากเนื้อเยื่อหลายชนิด ยังพบไวรัสที่อยู่เป็นอิสระในที่ว่างระหว่างเซลล์ นอกจากนี้ไวรัสหัวเหลืองยังคล้ายคลึงกับ granulosis virus (Baculoviridae) ที่พบในแมลง

พรเทพ ปลอดภัย (2538 : บทคัดย่อ) ศึกษาช่วงระยะเวลาการมีชีวิตของเชื้อไวรัสหัวเหลืองในน้ำทะเลและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่าไวรัสหัวเหลืองสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในน้ำทะเลมากกว่า 12 ชั่วโมงแต่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง และสามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็มระดับต่างๆ กันคือ 10 20 และ 30 ส่วนในพันส่วน

ตามลำดับ สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากการทดลองในห้องปฏิบัติการและจากกุ้งที่ป่วยด้วยโรคหัวเหลืองจากบ่อเลี้ยง พบว่ามีการตายของเซลล์อย่างรุนแรง มีลักษณะเด่นมากคือ เกิด nuclear pyknosis, karyorrhexis และ inclusion body ย้อมติดสีน้ำเงินในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย ได้แก่ อวัยวะน้ำเหลือง เม็ดเลือด เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หัวใจ ผนังกระเพาะอาหาร และเหงือก ส่วนพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งป่วยด้วยโรคหัวเหลืองจากบ่อเลี้ยงเหมือนกับกุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในการทดลอง และพบว่าเกิดการรวมตัวของเม็ดเลือด encapsulation และเกิด nodule formation ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมอยู่ด้วย และได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดโดยการย้อมสี Wright-Giemsa พบลักษณะ nuclear pyknosis, karyorrhexis และ inclusion body ย้อมติดสีน้ำเงินภายในระยะเวลา 24-42 ชั่วโมง หลังจากฉีดเชื้อไวรัสในขณะที่กุ้งยังมีอาการปกติ

Lu; et al (1995 : 67) ได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อและอวัยวะของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ได้แก่ เหงือก เส้นประสาท อวัยวะน้ำเหลือง (Oka) ตับและตับอ่อน head soft tissue หัวใจ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ทางเดินอาหารส่วนกลาง กล้ามเนื้อส่วนท้อง และก้านตา โดยการตรวจด้วย bioassay โดยใช้กุ้ง penaeid เป็นตัวเปรียบเทียบและจากการทำ quantal assay 50% Tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) ใน primary Oka cell culture ของกุ้ง พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในทุกเนื้อเยื่อและทุกอวัยวะที่ทำการศึกษาและเมื่อมีการฉีดของเหลวที่ได้จากเนื้อเยื่อและอวัยวะเหล่านี้ให้กับกุ้ง พบว่ากุ้งมีอัตราการตาย 100% ภายใน 6-9 วัน จากการทดสอบด้วย $TCID_{50}$ assay กับ primary Oka cell culture พบว่า Oka เหงือก และ head soft tissue พบว่ามีปริมาณของไวรัสหัวเหลืองมากกว่าในเนื้อเยื่อและอวัยวะอื่นๆ 10-800 เท่า ดังนั้นอวัยวะและเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วนดังกล่าวนี้ น่าจะเป็นบริเวณที่สะสมของไวรัสมากที่สุดทำให้เราควรที่จะใช้อวัยวะและเนื้อเยื่อทั้ง 3 ส่วนนี้มาใช้ในการตรวจสอบหาไวรัสหัวเหลืองได้

อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์; และ สิทธิ บุณยรัตผลิน (2540 : 1-5) ได้ทดสอบผลของคลอรีนต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยเติมคลอรีนผงความเข้มข้น 20 30 50 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยมีระยะเวลาการสัมผัสของเชื้อไวรัสกับคลอรีน 1 3 6 และ 24 ชั่วโมง ของทุกความเข้มข้น และที่ระดับความเข้มข้น 300 และ 500 มิลลิกรัม/ลิตร โดยทุกความเข้มข้นของคลอรีนมีระยะเวลาสัมผัสกับเชื้อไวรัส 1 5 10 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาทดสอบความสามารถในการติดเชื้อของไวรัส เพื่อดูประสิทธิภาพของการกำจัดเชื้อไวรัสของคลอรีน พบว่าคลอรีนสามารถลดปริมาณและกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ โดยที่ความเข้มข้นของคลอรีน 20 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อสัมผัสเชื้อไวรัส นาน 24 ชั่วโมง ไม่สามารถจะกำจัดเชื้อไวรัสได้หมด แต่สามารถลดความรุนแรงของเชื้อได้ ส่วนในความเข้มข้นของคลอรีน 30 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อสัมผัสเชื้อไวรัสนาน 6 ชั่วโมง

นั้น สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้และเมื่อใช้คลอรีนความเข้มข้นมากขึ้นเวลาที่เชื้อสัมผัสกับคลอรีนก็จะลดลงด้วย ถึงแม้ว่าระดับความเข้มข้นของคลอรีนตั้งแต่ 30 มิลลิกรัม/ลิตร จะสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ แต่เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มข้นของคลอรีนจะลดลง รวมทั้งประสิทธิภาพของคลอรีนที่ใช้ในการกำจัดเชื้อไวรัสอาจจะลดลงเนื่องจากสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำ นอกจากนี้จากค่าระดับความเป็นพิษของคลอรีนที่จะทำให้กุ้งกุลาดำ ขนาด 10-13 เซนติเมตร ตาย 50% ภายใน 96 ชั่วโมง มีค่า 56.82 มิลลิกรัม/ลิตร ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะนำคลอรีนมาใช้ในการรักษาโรคไวรัสหัวเหลืองโดยตรงในกุ้งกุลาดำได้

Wongteerasupaya; et al (1997 : 181) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเทคนิค RT-PCR เพื่อให้มีความแม่นยำ รวดเร็วและสะดวกมากยิ่งขึ้น โดยเตรียมตัวตรวจสอบกรดนิวคลีอิคที่ได้จาก cDNA ซึ่งสกัดจาก ssRNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง ตัวตรวจสอบที่มีความจำเพาะนี้สร้างขึ้นจากการใช้เทคนิค dot–blot hybridization กับกรดนิวคลีอิคที่ได้จากเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง, แบคทีเรีย หรือไวรัสอื่น จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ให้ใช้กับปฏิกิริยา RT-PCR ที่ขนาด 135 เบส เพื่อใช้ในการตรวจสอบ RNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง เมื่อนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR กับตัวต้นแบบของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสและเชื้อไวรัสที่บริสุทธิ์ หรือกรดนิวคลีอิคของเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาด 135 เบสตามที่คาดหมาย ในทางตรงข้าม การทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิคของกุ้งปกติหรือกุ้งที่มีเชื้อโรคอื่นๆนั้นไม่ให้ผลผลิตใดๆ ซึ่งผลที่ออกมาชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนถึงความแม่นยำในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ RNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง นอกจากนี้ เทคนิค RT-PCR นั้นมีความไวสูง เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ใน RNA ที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยแค่ 0.01 พิโคกรัม และในแง่ของความรวดเร็วนั้นเทคนิคนี้สามารถตรวจเจอเชื้อไวรัสได้ในเวลาเพียง 6 ถึง 12 ชั่วโมง แต่ในขณะที่เทคนิคของ histopathology จะเห็นผลได้นั้นต้องใช้เวลาตรวจสอบหลังการติดเชื้อ 42 ถึง 48 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นเทคนิค RT-PCR อาจมีประโยชน์ในการตรวจสอบการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองได้ในระยะแรกที่กุ้งได้รับเชื้อก่อนที่จะเกิดอาการป่วย

Tang; & Lightner (1999 : 165) ได้ศึกษาโคลนของ cDNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองเพื่อจะนำไปเป็นตัวตรวจสอบ (probe) สำหรับเทคนิค *in situ* hybridization โดยชิ้นส่วน cDNA นั้นมีขนาด 1161 คู่เบส ให้ชื่อโคลนว่า 3–27 ติดฉลากด้วย digoxigenin แล้วนำไปใช้ในเทคนิค *in situ* hybridization ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อของกุ้ง *Penaeus vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่าเกิดปฏิกิริยาผลบวกใน เนื้อเยื่อของอวัยวะน้ำเหลือง ชั้นผิวหนังชั้นนอก (cuticular epithelium) และเหงือก นอกจากนั้นยังมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับและตับอ่อน หัวใจ อวัยวะขับถ่าย (antennal gland) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic organ) เส้นประสาท (nerve tracts) ลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง

(midgut cecum) และ กล้ามเนื้อ ที่เกิดปฏิกิริยากับตัวตรวจสอบ ตัวตรวจสอบนี้นับว่ามีความจำเพาะสูงกับเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากไม่ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อกุ้งที่ไม่มีไวรัส หรือกุ้งที่มีเชื้อไวรัสชนิดอื่นเช่นไวรัสตัวแดงดวงขาว IHHNV (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus) หรือ TSV (taura syndrome virus) เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA และใช้ข้อมูลนั้นมาทำการออกแบบไพรเมอร์ จะสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากตัวอย่างเลือดได้จากเทคนิค RT-PCR

Sithigorngul; et al (2000 : 27) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองได้สำเร็จจากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดจากเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว คือ V3-2B ซึ่งเป็นโคลนที่สามารถจับกับโปรตีนของไวรัสหัวเหลืองที่อยู่ในสภาพปกติและถูกทำให้เสียสภาพด้วย SDS เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิคทาง immunohistochemistry กับตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถจับทำปฏิกิริยาในส่วนไซโตพลาสมของเนื้อเยื่อเหงือกและในส่วนของเม็ดเลือด โดยไม่มีการทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อเหงือกจากกุ้งปกติ นอกจากนั้นเมื่อนำเทคนิคนี้มาทดสอบกับเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองก็ให้ผลเป็นบวก ในขณะที่เนื้อเยื่อกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง หรือกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้นไม่เกิดปฏิกิริยา และนอกจากนี้ยังได้นำไปวิเคราะห์ผลใน Western blot พบว่า แอนติบอดีนี้สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน gp116 ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจะพบได้ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเท่านั้น และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dot-blot indirect immunoperoxidase assay พบว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถตรวจสอบแอนติเจนของไวรัสหัวเหลืองจากการเจือจางเลือดกุ้งได้มากถึง 1:50 และในเลือดที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้ถึง 1:1000 ผลสรุปของการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องมือตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ในกุ้งที่ติดเชื้อตั้งแต่ระยะแรกจนถึงติดเชื้ออย่างรุนแรงได้

กรีสัลย์ พรรคทองสุข (2545 : บทคัดย่อ) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสารสกัดจากเลือดกุ้งปกติหรือไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อทำการทดสอบด้วย Western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนของไวรัสหัวเหลืองขนาด 22 กิโลดาลตัน และจากการหา isotype พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นชนิด IgM ที่มี light chain เป็นชนิด kappa โดยมี antibody titer ในรูป supernatant และ ascitic fluid เท่ากับ 1:512 และ 1:640,000 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ELISA และจากการตรวจสอบด้วยวิธี dot-ELISA และ indirect-ELISA พบว่าทั้ง 2 วิธีมีความไวในการตรวจหาเท่ากับ 9.4 ng โดยสามารถตรวจหาไวรัสหัวเหลืองจากตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อจำนวน 40 ตัวอย่าง และตัวอย่างกุ้งปกติจำนวน 20 ตัวอย่างให้ผลถูกต้อง 100%

Sithigorngul; et al (2002 : 71) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ capsid protein ของไวรัสหัวเหลือง ได้แก่ p20 gp64 และ gp116 (แต่เดิมเรียก p22 p64 และ p135 ตามลำดับ) จากการปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาวด้วยไวรัสหัวเหลืองที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากการทดลองแยกกลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมดสี่กลุ่ม โดยแอนติบอดีกลุ่มแรกสามารถจับกับโปรตีนที่อยู่ในสภาพปกติได้เท่านั้น ขณะที่อีก 3 กลุ่มที่เหลือสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน p20 gp64 และ gp116 ทั้งสภาพปกติและที่ถูกทำให้เสียสภาพ แอนติบอดีทั้งหมดสามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยวิธี dot blot และ immunohistochemistry จากผลการทดลองพบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน p20 นั้นให้ผลของการทำ immunohistochemistry ได้ดีที่สุดในแง่ของความเข้มและความคมชัดจากการย้อมสี

Kiatpathomchai; et al (2004 : 1) ศึกษาการเก็บรักษา RNA ของไวรัสหัวเหลืองให้ไว้ได้นานมากขึ้น โดยเริ่มจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้กับกุ้งกุลาดำแล้วดูดเอาเลือดออกมาเก็บด้วยวิธีใหม่ โดยทดลองป้ายบนกระดาษกรอง ISOCODE^{R} เปรียบเทียบกับวิธีเดิมคือ การผสมเลือดกุ้งกับสารละลาย 10% โซเดียมซิเตรต จากนั้นนำเลือดที่ถูกเก็บบนกระดาษกรอง ISOCODE^{R} ไปสกัด RNA ด้วยสารละลาย TRI Reagent^{R} และเปรียบเทียบกับวิธี rapid boiling method ส่วนเลือดที่ผสมอยู่ในสารละลายโซเดียมซิเตรตจะถูกนำไปสกัด RNA ด้วยสารละลาย TRI Reagent^{R} เท่านั้น RNA ที่สกัดได้แต่ละแบบจะถูกนำไปใช้เป็นต้นแบบในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค RT-PCR และ non-stop, semi-nested RT-PCR ผลการทดลองพบว่า RNA ที่สกัดจากกระดาษกรอง ISOCODE^{R} โดยใช้ TRI Reagent^{R} ให้ผลการตรวจ RT-PCR และ non-stop, semi-nested RT-PCR ที่น่าเชื่อถือและแน่นอนที่สุด และยังพบว่าการเก็บเลือดกุ้งบนกระดาษกรอง ISOCODE^{R} ยังสามารถรักษาสภาพของ RNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง ในอุณหภูมิห้องไว้ได้นานกว่าการเก็บเลือดกุ้งในสารละลาย 10% โซเดียมซิเตรต

การศึกษาที่เกี่ยวกับพาหะของโรคไวรัสหัวเหลือง

พาหะนำโรคไวรัสเป็นสาเหตุสำคัญในการแพร่ระบาดของไวรัส ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกการถ่ายทอดเชื้อไวรัสและวินิจฉัยพิสูจน์ว่าสัตว์ชนิดใดที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสได้จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นจะต้องศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัส ซึ่งจากการศึกษาบางส่วนเป็นการศึกษาถึงความเป็นพาหะของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เกี่ยวข้องปู

Kanchanaphum; et al (1998 : 1) ศึกษาการเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวในปู 3 ชนิด คือ ปูแสม (*Sesarma* sp.) ปูทะเล (*Scylla serrata*) และปูก้ามดาบ (*Uca pugilator*) โดยฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าไปในปูทั้ง 3 ชนิด ซึ่งพบว่า ตลอดระยะเวลา 45 วัน ไม่มีปูชนิดใดเลยที่ตายหรือมีการแสดงอาการของโรค เมื่อตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อด้วยวิธี *in situ* hybridization และ PCR

amplification พบว่ามีไวรัสแฝงตัวอยู่ ปูทุกชนิดที่เป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวนี้สามารถถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งกุลาดำได้ โดยผ่านทางน้ำที่อยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงหรือที่กักขังสัตว์น้ำ ซึ่งมีการเลี้ยงกุ้งและปูร่วมกัน การถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งตรวจพบได้ด้วยวิธี *in situ* hybridization และ PCR amplification หลังจากให้ปูกับกุ้งอยู่ร่วมกันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สำหรับปูก้ามดาบ ที่อยู่ร่วมกันกับกุ้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยใช้ PCR amplification และหลังจากการอยู่ร่วมกัน 60 ชั่วโมงจะพบไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยใช้วิธี *in situ* hybridization ส่วนในปูทะเล เมื่ออยู่ร่วมกับกุ้งพบว่าจะมีการถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งหลังจากที่อยู่ร่วมกันเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อตรวจโดยใช้ PCR amplification และพบที่ 60 ชั่วโมงจะพบไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยใช้วิธี *in situ* hybridization ส่วนปูแสม เมื่อเลี้ยงรวมกับกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยใช้ PCR amplification และหลังจากการอยู่ร่วมกัน 72 ชั่วโมงจะพบไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยใช้วิธี *in situ* hybridization จากผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าปูสามารถเป็นพาหะไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

Supamattaya; et al (1998 : 79) ได้ศึกษาการเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวในครัสตาเซียน 3 ชนิด ที่มักพบบ่อยในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ปูม้า (*Portunus pelagicus*) ปูทะเล (*Scylla serrata*) และเคย (*Acetes* sp.) โดยให้เคยได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด จุ่มและการกินเนื้อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ส่วนปูทั้ง 2 ชนิด ทำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดและการกินเท่านั้น หลังจากการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธีทาง histology ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และ *in situ* hybridization จากการทดลองข้างต้นพบว่าเคยในกลุ่มที่ได้รับเชื้อโดยการฉีดมีอัตราการตาย 100% ภายใน 3 วัน ส่วนการจุ่มมีอัตราการตาย 100% ภายใน 5 วัน และการกินมีอัตราการตาย 20% ภายใน 9 วัน ส่วนปูนั้นผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการฉีดจะให้ผลดีกว่าการกินกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยปูม้าที่ได้รับเชื้อโดยการฉีดมีอัตราการตาย 100% ภายใน 8 วัน ในขณะที่ปูทะเลมีอัตราการตายเพียง 20% ภายใน 9 วัน ส่วนการติดเชื้อโดยการกินนั้นพบว่าปูทั้ง 2 ชนิด ยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้มากกว่า 9 วัน ผลจากการศึกษาทาง histology ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า เซลล์เม็ดเลือด เซลล์เหงือก และเซลล์เยื่อบุผิวของกุ้งเคยที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ลักษณะเช่นนี้ก็พบในปูทั้ง 2 ชนิด ที่ได้รับเชื้อไวรัสเช่นเดียวกัน เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าอนุภาคของไวรัสชนิดนี้มีรูปร่างเป็นท่อนเช่นเดียวกับที่พบในกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคและมีขนาดใกล้เคียงกัน

รัชนี กลิ่นพุฒซ้อน (2543 : บทคัดย่อ) ได้พัฒนาการตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี one–step nested RT–PCR ที่ให้ผลที่มีความจำเพาะและมีความไวสูงในการตรวจสอบ อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว สามารถป้องกันการปนเปื้อนระหว่างหลอดทดลองจาก PCR product รอบแรกได้

นอกจากนี้วิธีการ one–step nested RT–PCR ยังสามารถบอกระดับความรุนแรงของการติดเชื้อได้ เทคนิค one–step nested RT–PCR ที่พัฒนาขึ้นประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด โดยชุดที่ 1 ประกอบด้วย forward primer (10F) 1 ตัว และ reverse primer (144R กับ 209R) อีก 2 ตัว กรณีที่การตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้ผลบวกจะเกิดแถบขนาด 135 คู่เบส และ 200 คู่เบส ส่วนในชุดที่ 2 ประกอบด้วย forward primer (9F) 1 ตัว และ reverse primer (144R กับ 196R) อีก 2 ตัว กรณีที่การตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้ผลบวกจะเกิดแถบขนาด 136 คู่เบส และ 188 คู่เบส จากการตรวจด้วยเทคนิค one–step nested RT-PCR สามารถตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์ได้ถึง 0.01 เฟมโตกรัม (femtogram) และไม่มีการปนเปื้อนจาก PCR product รอบแรก จากการทดลองไพรเมอร์มีความจำเพาะกับไวรัสหัวเหลืองเท่านั้นโดยพบว่าไม่มีผลผลิตจากต้นแบบจากนิวคลีอิกของไวรัสและแบคทีเรียชนิดอื่นรวมถึงของกุ้งกุลาดำเองด้วย นอกจากนี้ได้พัฒนาวิธี *in situ* hybridization เพื่อเปรียบเทียบกับวิธี H&E staining ทั้งในน้ำเลือดและเนื้อเยื่อ ซึ่งช่วยในการตรวจสอบพยาธิสภาพและตำแหน่งของการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

การศึกษาการกระจายตัวของไวรัสหัวเหลืองในเหงือก ต่อมน้ำเหลือง ขาว่ายน้ำ ก้านชูตา และในน้ำเลือดจากกุ้งที่ติดเชื้อ ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลือง คือ น้ำเลือด เนื่องจาก 6 ชั่วโมงหลังจากกุ้งติดเชื้อจะเกิดผลบวก 2 แถบ (200 คู่เบส และ 135 คู่เบส) เมื่อใช้น้ำเลือดเป็นตัวต้นแบบในการตรวจด้วยวิธี one–step nested RT–PCR ในขณะที่ตัวอย่างชนิดอื่นเกิดผลบวกเพียง 1 แถบ (135คู่เบส) นอกจากนี้น้ำเลือดยังเป็นตัวอย่างที่เก็บทำการทดลองได้สะดวกและไม่ทำให้กุ้งตายระหว่างการทดลอง จากนั้นทำการทดสอบต่อว่า ปูทั้ง 4 ชนิดคือ ปูม้า ปูทะเล ปูแสม และปูก้ามดาบเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองและสามารถทำการถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งได้หรือไม่ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าปูเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองและสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำปกติได้โดยผ่านทางน้ำ

Chen; et al (2000 : 157) ศึกษาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวใน benthic larvae ของปูทะเล (*Scylla serrata*) และตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี PCR และ *in situ* hybridization พบว่าตัวอ่อนของปูทะเลประมาณ 60% มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่ ถึงแม้ว่าจะมีการย้ายตัวอ่อนเหล่านี้ไปเลี้ยงในบ่อเลี้ยงที่มีการให้อากาศในห้องปฏิบัติการยังตรวจพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอีกเช่นเดิม จากการนำตัวอ่อนของปูทะเลที่ฟักออกจากไข่ซึ่งปราศจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปแช่ในน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวปนอยู่ พบว่าตัวอ่อนของปูทะเลที่แช่ในน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือปนอยู่จะมีอัตราการตายสะสมสูงถึง 43% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการตายสะสมเพียง 20% เท่านั้น จากการตรวจวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค PCR ทั้งในปูที่ใกล้จะตายและปูที่ยังมีชีวิตอยู่ ชี้ให้เห็นว่าปูชนิดนี้เป็นสาเหตุของการตายของตัวอ่อนของปูทะเลมากที่สุด ส่วนวิธีทาง

histology และ *in situ* hybridization พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวที่พบในตัวอ่อนของปูทะเลนั้นจะพบที่เนื้อเยื่อของอวัยวะเหมือนกับที่พบในกุ้งทั่วๆ ไป

ศิวาพร ลงยันต์ และคนอื่นๆ (2544 : 121) ได้ศึกษาความทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งตะกาดโอคัก (*Metapenaeus affinis*) และกุ้งตะกาดหัวมัน (*M. brevicornis*) โดยตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อองค์ประกอบต่างๆ ของไวรัส ได้แก่ โปรตีน p20 gp64 และ gp116 พบว่าในกุ้งที่จับจากธรรมชาติไม่พบการติดเชื้อ ส่วนกุ้งที่ให้เชื้อโดยการกินพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเล็กน้อยในกุ้ง *M. affinis* แต่ไม่พบการติดเชื้อในกุ้ง *M. brevicornis* และการทดลองให้เชื้อโดยการฉีด พบว่ากุ้งทั้งสองชนิด สามารถตรวจพบการติดเชื้อหลังจากการฉีดเชื้อ 3 วัน โดย *M. affinis* มีระดับการติดเชื้อสูงกว่า *M. brevicornis* มาก ในวันที่ 10 สัดส่วนของกุ้ง *M. affinis* ที่มีชีวิตรอดจากการลอกคราบน้อยมาก และการติดเชื้อจะพบในกุ้งบางตัว แต่ในกรณีของ *M. brevicornis* ไม่แสดงอาการของการติดเชื้อ และมีชีวิตรอดทั้งหมด และจากการสุ่มตัวอย่างพบว่ามีการติดเชื้อเล็กน้อยในกุ้งบางส่วนบริเวณเหงือกและกล้ามเนื้อ และในวันที่ 30 พบกุ้งรอดชีวิตจากการถูกกินขณะลอกคราบและแสดงการติดเชื้อน้อยมาก จากการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองใน *M. brevicornis* โดย RT-PCR พบว่าระดับการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งที่ได้รับเชื้อมาแล้ว 10 และ 30 วัน จะลดลงมากเมื่อเทียบกับกุ้งที่ได้รับเชื้อมาแล้ว 3 วัน ดังนั้น กุ้ง *M. brevicornis* สามารถทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ดี ดังนั้นจึงอาจใช้กุ้งชนิดนี้เป็นกุ้งต้นแบบสำหรับศึกษาบทบาทของระบบภูมิคุ้มกันในการต้านทานเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Penaeidae และอาจใช้เป็นกุ้งที่เลี้ยงทดแทนในบริเวณที่มีการระบาดของไวรัสหัวเหลืองได้

ยัยนับ แวและ (2545 : 111-113) ทำการทดลองตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) เก็บตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี กุ้งกะเปาะ (*Palaemon styliferus*) กุ้งกะต่อม (*Macrobrachium sintangense*) กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium* rosenbergii) และกุ้งในวงศ์ Penaeidae ได้แก่ กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) กุ้งหัวมันหรือกุ้งหัวเหลือง (*Metapenaeus brevicornis*) และกุ้งวงศ์ Atyidae ได้แก่กุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) เก็บตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรปราการ นำมาตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อโดยการฉีดหรือการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสอย่างรุนแรงในเวลา 3 วัน และจับจากธรรมชาติ โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่าง ๆ (p20 gp64 และ gp116) ของไวรัสหัวเหลือง คือ Y19, Y18-2D และ V3-2B ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งที่จับจากธรรมชาติทั้ง 3 วงศ์ สำหรับกุ้งในวงศ์ Penaeidae คือ *Metapenaeus affinis* เท่านั้นที่พบการติดเชื้อจากการกิน ส่วนใหญ่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงเมื่อได้รับการฉีด ส่วนกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ทุกชนิดไม่มีการติดเชื้อจากการกินแต่การให้เชื้อ

โดยการฉีดพบว่า *Macrobrachium rosenbergii* และ *Macrobrachium lanchesteri* ส่วนน้อยเท่านั้นที่แสดงการติดเชื้อ แต่ *Macrobrachium sintangense* และ *Palaemon styliferus* ส่วนใหญ่มีการติดเชื้อแต่ไม่รุนแรง ในขณะที่ *Palaemon serrifer* และ *Caridina* sp. ไม่พบการติดเชื้อเมื่อได้รับเชื้อโดยการกิน แต่ไม่ได้ทดลองโดยการฉีดเนื่องจากมีขนาดเล็ก จากการทดลองพบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน gp116 แสดงการติดสีปริมาณน้อยแตกต่างชัดเจนจากแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด p20 และ gp64 ซึ่งอาจสัมพันธ์กับความสามารถในการทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกลุ่มนี้บางชนิด

ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำนอกจากจะพบกุ้งชนิดต่างๆ แล้วยังพบว่ามีปูทะเลอาศัยอยู่เป็นจำนวนมากในช่วงที่มีการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลือง ถึงแม้ว่าจะมีการกำจัดปูในบ่อเลี้ยงกุ้งแต่ก็ยังคงพบปูในระหว่างการเลี้ยงอยู่เสมอๆ ที่พบบ่อยๆ ได้แก่ ปูแสม ปูเสฉวน ปูทะเล ปูม้า ปูก้ามดาบ และปูนา แต่ยังไม่มีการทดลองว่าปูเหล่านี้เป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองหรือไม่ จึงสมควรที่จะมีการศึกษาศักยภาพการเป็นพาหะของไวรัสในปูเหล่านี้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ปูในวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมืองและอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์สำหรับ immunohistochemistry

1. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยา
2. อ่างเลี้ยงปูพร้อมอุปกรณ์การเลี้ยง
3. เครื่องมือผ่าตัด
4. ถุงมือยาง
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. ขวดแก้วปากตรง (vial)
7. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
8. ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)
9. โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (coplin jar)
10. ตะกร้าสำหรับย้อมสไลด์ (slide basket)
11. สไลด์ (slide) พร้อมกระจกปิดสไลด์ (cover slide)
12. เครื่องปั๊มดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
13. ไมโครปิเปตพร้อมทิป (micropipette and tip)
14. ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง (freezer)
15. ตู้ดูดควัน (chemical fume hood)
16. ตู้อบ (hot air oven)
17. แท่นอุ่นสไลด์ (slide warmer)
18. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome)
19. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope)
20. กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

อุปกรณ์สำหรับ RT-PCR

1. โกร่งเคลือบสำหรับบดเนื้อเยื่อผ่านการฆ่าเชื้อ
2. หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. หลอด thin wall สำหรับ PCR
4. เครื่อง elctrophoresis apparatus และ อุปกรณ์
5. เครื่อง ultraviolet transillumitor (Spectroline)
6. เครื่อง microwave oven (Turbora)
7. เครื่องเขย่าผสมสาร (shaker)
8. เครื่อง thermal cycler (eppendorf)
9. กล้อง polaroid (Gelcam) พร้อมฟิล์ม
10. เครื่องชั่งสาร
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

1. เอทิลแอลกอฮอลล์ (ethyl alcohol) 70%, 80%, 90% และ 95%
2. นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ (n-butyl alcohol)
3. ไซลีน (xylene)
4. Phosphate buffer saline (PBS) 0.15 M pH 7.2
5. สารละลาย P_1^+ (calf bovine serum:PBS (1:1) dilution 1:10)
6. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (diaminobenzidine tetrahydrochloride ,DAB)
7. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide ,H_2O_2) 30 %
8. สีอิโอซิน 0.02% ใน เอทิลแอลกอฮออล์ 95 %
9. สีฮีมาทอกไซลีน (hematoxylin)
10. พาราพลาสต์ (paraplast)
11. สารละลายเคลือบสไลด์ (gelatin coat slide solution)
12. น้ำยาคงสภาพ (davidson's fixative)
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide , NaOH)
14. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid , HCl)
15. ตัวกลางผนึก (permount)
16. น้ำกลั่น

17. แอนติบอดีสำหรับตรวจไวรัสหัวเหลือง

แอนติบอดีตัวแรก (first antibody) ได้แก่

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ซึ่งจำเพาะต่อ capsid protein p20 ของไวรัสหัวเหลือง

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein gp64 ของไวรัสหัวเหลือง

โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein gp116 ของไวรัสหัวเหลือง

โมโนโคลนอลแอนติบอดี W28 ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสเอชพีวี

แอนติบอดีตัวที่สอง (second antibody) ได้แก่

Goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)

สารเคมีสำหรับวิธี RT-PCR

รายการที่ 1 – 5 นำมาจากชุดทดลอง high pure viral nucleic acid kit Cat no.1858874 ของบริษัท Roche Molecular Biochemicals

1. Working solution
2. Proteinase K
3. Inhibitor removal buffer
4. Washing buffer
5. Elution buffer

รายการที่ 6 – 7 นำมาจากชุดทดลอง บริษัท Invitrogen

6. 2 x RT – buffer
7. เอนไซม์ RT/*Taq* polymerase
8. Primer 10F และ primer 144R
9. Lysis buffer
10. TBE buffer
11. เจล Agarose (Gibco)

12. Blue/Orange 6x Loading dye (Promega)
13. DNA marker
14. Ethidium bromide (Bio – Rad)
15. Isopropanol

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงปู
2. การพิสูจน์ทราบชนิด
3. การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง
4. การวางแผนการทดลอง
5. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงปู

เก็บตัวอย่างปูชนิดต่างๆ จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมืองและอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการแยกเป็นกลุ่มๆ ละ 10-20 ตัว ขึ้นอยู่กับจำนวนที่จับได้ ทำการแยกชนิด และนำมาเลี้ยงไว้ในอ่าง ทั้งหมดเลี้ยงที่อุณหภูมิและแสงธรรมชาติ

2. การพิสูจน์ทราบชนิด

นำปูชนิดต่างๆ ชนิดละ 3 ตัว ดองด้วยสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 % และนำมาถ่ายรูปด้วยฟิล์มสี เพื่อที่จะได้บันทึกสีตามธรรมชาติของปูแต่ละชนิด เขียนรายละเอียดสถานที่และวันที่เก็บ เพื่อนำไปเปรียบเทียบลักษณะตามอนุกรมวิธานจากวิทยานิพนธ์เรื่องการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา ของกัลยาณี ยงจินดารัตน์ (2531) วิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานปูนาและลักษณะของโกโนพอด โอมมาติเดีย ของถวิล ประมวล (2533) วิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของปูปอร์ทูนิดในประเทศไทย ของศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ (2532) วิทยานิพนธ์เรื่องเดคาพอดครัสเตเซียนและสโตมาโตพอดครัสเตเซียนในป่าชายเลนจังหวัดชุมพรและจังหวัดระนอง ของสุพจน์ แสงมณี (2530) วิทยานิพนธ์เรื่องปูแสมในอ่าวไทย ของสุรินทร์ มัจฉาชีพ (2516) และวิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของปูก้ามดาบในประเทศไทย ของ เสรี บรรพวิจิตร (2522)

3. การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง

เชื้อไวรัสหัวเหลืองเตรียมได้จากการนำ haemolymph ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองอย่างรุนแรง ผ่านการปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของ haemocyte ออก นำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm จากนั้นเจือจางด้วย PBS 1:500 แล้วจึงนำไปใช้

4. การวางแผนทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง

4.1 การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติ

สุ่มตัวอย่างปูชนิดต่างๆ ชนิดละ 15-20 ตัว ในวันเดียวกับที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง เพื่อทำการตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ติดมาตามธรรมชาติ

4.2 การตรวจการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

สุ่มตัวอย่างปูชนิดต่างๆ ชนิดละ 15-20 ตัว ในวันเดียวกับที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่เจือจางใน 2x PBS 1:500 จำนวน 50 ไมโครลิตร บริเวณโคนขาปู จากนั้นทำการเลี้ยงแยกชนิดโดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปของบริษัท ป. เจริญพันธุ์ วันละ 2 เวลา เช้า-เย็น เป็นเวลา 3-10 วัน แล้วจึงเก็บมาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

5. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

นำปูมาสลบในน้ำเย็นจัด ตัดส่วนของขาและกระดองออก ผ่าครึ่งตามความยาวส่วนที่เป็นเนื้อและส่วนที่มีอวัยวะครึ่งหนึ่งแช่ในน้ำยาคงสภาพ 24 ชั่วโมง ดำเนินการตามข้อ 5.1 อีกครึ่งหนึ่งใส่ใน lysis buffer ดำเนินการตามข้อ 5.2 หรือ ข้อ 5.3

5.1 การตรวจเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ด้วยวิธี immunohistochemistry

5.1.1 การเตรียมเนื้อเยื่อทางมิญชวิทยา

5.1.1.1 นำเนื้อเยื่อ (ตัวอย่างที่ได้จากข้อ 5) มาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.1.1.2 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆกัน และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltrate) ด้วยพาราพลาสต์ ดังนี้

- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 70%, 90% ครั้งละ 3 ชั่วโมง
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95% 2 ครั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีน ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- แช่ในไซลีน 1 ชั่วโมง

- แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1:1 เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- แช่ในพาราพลาสต์หลอมเหลว จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 30 นาที

5.1.1.3 นำเนื้อเยื่อของปูที่อินฟิลเตรทด้วยพาราพลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราพลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสี่เหลี่ยม

5.1.1.4 ตัดเนื้อเยื่อปูที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องไมโครโตมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 8 ไมครอน เรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบิน (ribbon)

5.1.1.5 นำเซคชัน (section) มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซคชั่นไปวางบนหยดน้ำ 1 แถว มี 3 เซคชั่น ทำ 1 แถวต่อ 1 สไลด์ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยืดไม่มีการซ้อนทับกันของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกซับให้แห้ง จะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงบนสไลด์ แล้วนำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.2 กระบวนการย้อมโดยวิธี indirect peroxidase immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีคือ Y19 Y18-2D V3-2B W28 W29 และ HPV16-9C เพื่อการตรวจหาเชื้อไวรัส

5.1.2.1 นำสไลด์ที่มีเซคชันมาละลายเอาพาราพลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffination) โดยวางสไลด์ลงในตะกร้า (slide basket) แล้วจุ่มลงในโถแก้วย้อมเนื้อเยื่อปูใน

- ไซลีนที่ 1 เป็นเวลา 10 นาที

- ไซลีนที่ 2, 3 เป็นเวลา 5 นาที

5.1.2.2 เติมน้ำ (hydration) เข้าสู่เนื้อเยื่อปูด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กันโดยแช่ใน

- นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 5 นาที

- แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95% 90% 80% และ 70 % ครั้งละ 5 นาที

5.1.2.3 ล้างเซคชันด้วยน้ำกลั่นตามด้วย PBS โดย

- ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที

- แช่ในสารละลายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที

- ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที

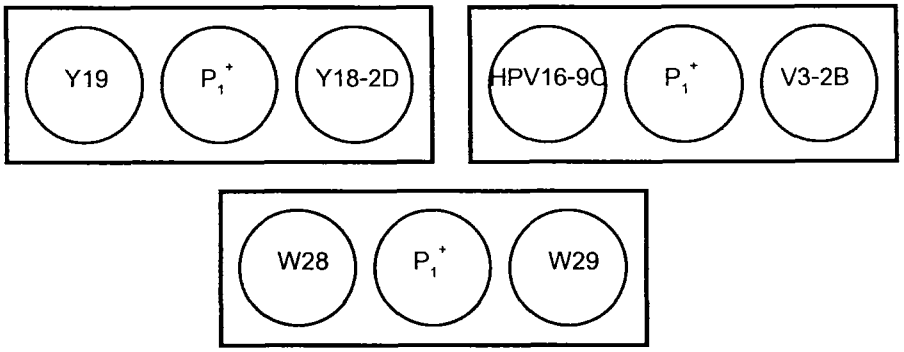
- ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

5.1.2.4 การใส่แอนติบอดีตัวแรก

- นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump) แล้วหยดสารละลาย P_1^+ คลุมแต่ละเซคชั่นด้วยไมโครปิเปต บ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปเก็บไว้ในที่ชื้น

- ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่เซคชันละออก ยกเว้นเซคชันที่ 2

- หยดแอนติบอดีตัวแรก ให้คลุมเซคชันที่ 1 และ 3 โดยแอนติบอดีที่ใช้ คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 หรือ HPV16-9C หรือ W28 ที่เซคชันที่ 1 และ Y18-2D หรือ V3-2B หรือ W29 ที่เซคชันที่ 3 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดเจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ปริมาณ 1:5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 แสดงการหยดแอนติบอดีตัวแรกในการตรวจหาเชื้อไวรัส

5.1.2.5 การใส่แอนติบอดีตัวที่ 2

- ล้างแอนติบอดีตัวแรก ออกจากเซคชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วแช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที จากนั้นนำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ

- หยดแอนติบอดีที่ 2 ได้แก่ goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางในสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:1000 ในทุกเซคชัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- ล้างแอนติบอดีตัวที่ 2 ออกจากเซคชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วแช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

5.1.2.6 นำเซคชันมาทำปฏิกริยากับ 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (DAB) 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

- ล้างเซคชั่นด้วยน้ำ 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที

5.1.2.7 ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีน

5.1.2.8 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 70% 80% 90% และ 95% ครั้งละ 5 นาที

5.1.2.9 ย้อมทับด้วยสีอิโอซิน 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95% ล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 %

5.1.2.10 นำเซคชันมาดึงน้ำออกโดยผ่าน

- นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 5 นาที
- นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์กับไซลีน ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 5 นาที
- ไซลีน จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

5.1.2.11 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการผนึกสไลด์ (mount) ด้วยตัวกลางผนึก (permount) จากนั้นจึงนำสไลด์ที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยกล้องจุลทรรศน์

5.2 การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี RT–PCR

5.2.1 ขั้นตอนการสกัด RNA จากตัวอย่าง

5.2.1.1 นำเนื้อเยื่อปูแต่ละชนิดมาบดใน lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 100 mM EDTA, 50mM NaCl, 2% SDS) ประมาณ 40 มิลลิลิตร ในโกร่งเคลือบที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยแยกตัวอย่างแต่ละกลุ่มตามเวลาที่เก็บตัวอย่างรวมกันเป็นชุดๆ นำมาใส่หลอด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงดูด supernatant มาแต่ละหลอดปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ผสมกับ working solution ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ proteinase K ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.2.1.2 เติม isopropanol ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

5.2.1.3 ประกอบหลอด high pure spin filter และ หลอด high pure collection เข้าด้วยกัน จากนั้นเติมตัวอย่างทั้งหมดที่บ่มแล้วแยกลงในหลอดด้านบน ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงเทส่วนของเหลวจากหลอด high pure collection ทิ้ง

5.2.1.4 ประกอบหลอด high pure collection ชิ้นใหม่กับหลอด high pure spin filter เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม inhibitor removal buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร บนส่วนผสม นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงเทส่วนของเหลวจากหลอด high pure collection ทิ้ง

5.2.1.5 ล้างส่วนผสมในหลอด high pure spin filter โดยเติม wash buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงเทส่วนของเหลวจากหลอด high pure collection ทิ้ง จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกหนึ่งครั้ง

5.2.1.6 นำหลอด high pure spin filter ที่ได้จากการล้าง 2 ครั้งด้วยสารละลาย wash buffer ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที แล้วจึงเทส่วนของเหลวจากหลอด high pure collection ทิ้ง

5.2.1.7 ประกอบหลอด high pure spin filter กับหลอด microcentrifuge เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

5.2.1.8 เก็บกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

<u>หมายเหตุ</u> การทดลอง ได้ทำควบคู่กับตัวควบคุมผลบวก โดยใช้ส่วนของ haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทำในทุกขั้นตอนของการทำ RT–PCR ส่วนในตัวควบคุมผลลบใช้น้ำกลั่นทำตั้งแต่ขั้นตอน one step RT–PCR

5.2.2 ขั้นตอนการทำ RT–PCR สำหรับตรวจหาไวรัสหัวเหลือง

5.2.2.1 ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT–PCR รวมทั้งตัวอย่างปูแยกชนิดในแต่ละหลอดของหลอด thin wall ที่มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

2x RT-PCR buffer	25	ไมโครลิตร
Primer 10F	1	ไมโครลิตร (15 pmol)
Primer 144R	1	ไมโครลิตร (15 pmol)
เอนไซม์ RT/*Taq* Polymerase	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	17	ไมโครลิตร
RNA Template (ตัวอย่างปู)	5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

Primer 10F : 5'-CCGCTAATTTCAAAAATACG-3'

Primer 144R : 5'-AAGGTGTTATGTCGAGGAAG-3'

5.2.2.2 นำหลอดเข้าเครื่อง thermal cycler ปรับอุณหภูมิและเวลา ได้ดังตาราง 1

5.2.3. แสดงผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis

5.2.3.1 เตรียมเจลที่จะใช้แสดงผลโดย ชั่งผงเจล agarose ปริมาณ 0.6 กรัม ละลายด้วย TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องไมโครเวฟปรับความร้อนปานกลางนาน

ประมาณ 2 นาที จนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอให้เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 50–60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงไปในบล๊อคเจลพร้อมเสียบแผ่นหวีพลาสติก (comb) ให้เจลเกิดเป็นร่อง ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

5.2.3.2 เตรียมสี Blue/Orange (6x Loading dye) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เติมในหลอด microcentrifuge ไว้ให้ครบจำนวนตัวอย่างที่จะหยอดแสดงผลในเจล

5.2.3.3 ดูดตัวอย่างที่ได้หลังจากการทำ one step RT – PCR ได้แก่ ตัวอย่าง ปูแต่ละชนิด ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก และตัวควบคุมผลลบ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด Blue/Orange (6x Loading dye) ที่เตรียมไว้

ตาราง 1 แสดง อุณหภูมิ ระยะเวลาและจำนวนรอบ ในแต่ละขั้นตอนการทำงาน RT-PCR

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที : วินาที)	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที : วินาที)	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที : วินาที)	จำนวนรอบ
1	42	15:00					1
2	95	5:00					1
3	4	5:00					1
4	94	00:30	58	00:30	72	00:30	35
5	72	10:00					1
6	4	-					1

จากตาราง 1

ขั้นตอนที่ 1 – 3 มีผลทำให้ RNA เปลี่ยนไปเป็น complementary DNA

ขั้นตอนที่ 4 เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา

ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่ DNA ถูกทำให้แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว 2 สาย (denaturation step)

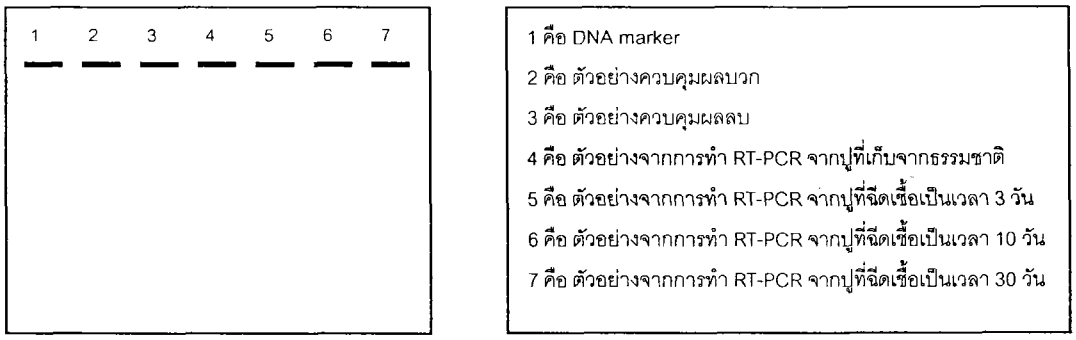
ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่ primer ทั้ง 2 สามารถเข้าจับที่ตำแหน่งเฉพาะของ DNA สายเดี่ยวทั้ง 2 สาย (annealing step)

ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่ *Taq* polymerase ทำงานโดยเร่งปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3 ของ primer ทำให้ DNA เป็นสายยาว เกิดการจำลองที่สมบูรณ์ (elongation step)

ขั้นตอนที่ 5 final extension

ขั้นตอนที่ 6 เป็นการเก็บรักษา DNA

5.2.3.4 นำเจลที่แข็งตัวแล้วใส่ลงไปในเครื่อง eletrophoresis ที่มีสารละลาย TBE buffer อยู่ท่วมเจล หยอดตัวอย่างลงในไปร่องเจล ซึ่งได้แก่ DNA marker ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก ตัวควบคุมที่ให้ผลลบ และตัวอย่างปูแต่ละชนิด ดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 แสดงตำแหน่งการแสดงผลของ gel electrophoresis RT-PCR

เมื่อหยอดตัวอย่างครบแล้ว เปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง หลังจากนั้น ปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้า นำเจลขึ้นมาย้อมด้วยสี ethidium bromide เป็นเวลา 10-20 นาที และล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น นาน 20 นาที แล้วจึงนำไปวางบนเครื่อง ultraviolet transillumitor เพื่อดูผลที่ได้ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นจึงถ่ายรูปด้วยกล้อง polaroid

5.3 การตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี PCR

5.3.1 ขั้นตอนการสกัด DNA จากตัวอย่าง

ขั้นตอนการสกัด เหมือนกับการสกัด RNA จากตัวอย่าง ในข้อ 5.2.1

<u>หมายเหตุ</u> การทดลอง ได้ทำควบคู่กับตัวควบคุมผลบวก โดยใช้ส่วนของ haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวทำในทุกขั้นตอนของการทำ PCR ส่วนในตัวควบคุมผลลบใช้น้ำกลั่นทำตั้งแต่ขั้นตอน PCR

5.3.2 ขั้นตอนการทำ PCR

5.3.2.1 ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR รวมทั้งตัวอย่างปูแยกชนิด ในแต่ละหลอดของหลอด thin wall ที่มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

10x PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	2	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	2	ไมโครลิตร

Primer VP 28F	1	ไมโครลิตร
Primer VP 28R	1	ไมโครลิตร
Taq Polymerase	0.25	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	13.75	ไมโครลิตร
DNA Template (ตัวอย่างปู)	2.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

Primer V28F : 5'-CGGGATCCATGGATGGGATCTTTCTTTCACTCTTTCG-3'

Primer V28R : 5'-TGCACTGCAGTTACTCGGTCTCAGTGCCAG-3'

5.3.2.2 นำหลอดเข้าเครื่อง thermal cycler ปรับอุณหภูมิและเวลา ได้ดังตาราง 2

ตาราง 2 แสดง อุณหภูมิ ระยะเวลาและจำนวนรอบ ในแต่ละขั้นตอนการทำงาน PCR

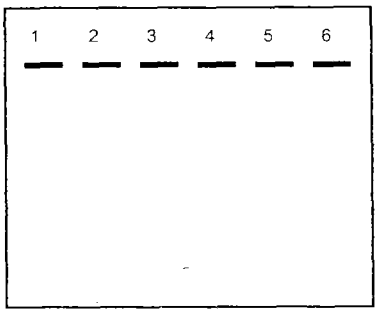
ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที : วินาที)	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที : วินาที)	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที : วินาที)	จำนวนรอบ
1	94	4:00					1
2	94	00:15	55	00:30	72	00:45	35
3	72	10:00					1
4	4	-					1

จากตาราง 2

5.3.3. แสดงผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis

ขั้นตอนการแสดงผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis เหมือนในข้อ 5.2.3 ต่างกันที่ตัวอย่างในการหยอดลงในร่องเจล ดังภาพประกอบ 3

เมื่อหยอดตัวอย่างครบแล้ว เปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง หลังจากนั้น ปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้า นำเจลขึ้นมาย้อมด้วยสี ethidium bromide เป็นเวลา 10-20 นาที และล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น นาน 20 นาที แล้วจึงนำไปวางบนเครื่อง ultraviolet transillumitor เพื่อดูผลที่ได้ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นจึงถ่ายรูปด้วยกล้อง polaroid



1 คือ DNA marker
2 คือ ตัวอย่างควบคุมผลบวก
3 คือ ตัวอย่างควบคุมผลลบ
4 คือ ตัวอย่างจากการทำ PCR จากปู *Charybdis affinis*
5 คือ ตัวอย่างจากการทำ PCR จากปู *Philyra olivacea*
6 คือ ตัวอย่างจากการทำPCR จากปู *Portunus pelagicus*

ภาพประกอบ 3 แสดงตำแหน่งการแสดงผลของ gel electrophoresis PCR

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. พิสูจน์ชนิดตัวอย่างปูที่เก็บได้และถ่ายภาพ
2. ตรวจดูและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 Y18-2D และ V3-2B ในเนื้อเยื่อของปู และใช้เนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำเป็นกลุ่มควบคุม
3. ตรวจดูและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W28 และ W29
4. ตรวจดูและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C
5. ตรวจดูการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสเอชพีวีในอวัยวะต่างๆ ของปูชนิดต่างๆ ในแต่ละวงศ์
6. ถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อปูและเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ
7. ถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสเอชพีวีในเนื้อเยื่อปู
8. ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติ และการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของปูชนิดต่างๆ โดยวิธี RT-PCR
9. ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติของปูชนิดต่างๆ โดยวิธี PCR
10. นำเสนอข้อมูลด้วยภาพและตาราง

หมายเหตุ - สำหรับปู *Charybdis feriatus* ได้ทำการเก็บตัวอย่างเป็นน้ำเลือดจึงตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยใช้วิธี dot-blot

- สำหรับปู *Scylla serrata* จากตัวอย่างที่ได้จากธรรมชาติ ได้ทำการเก็บตัวอย่างเป็นน้ำเลือดจึงตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยใช้วิธี haemocyte smear

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การพิสูจน์ทราบชนิดของปู

จากเก็บรวบรวมปูในวงศ์ต่างๆ จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมืองและอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ โดยนำปูมาศึกษาลักษณะต่างๆ เช่น กระดอง ก้าม ขาเดิน ส่วนท้อง อวัยวะเพศผู้ และสี (กระดอง กล้ามและขาเดิน) โดยนำมาเทียบกับวิทยานิพนธ์เรื่องการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา ของกัลยาณี ยงจินดารัตน์ (2531) วิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานปูนาและลักษณะของโกโนพอต โอมมาติเดีย ของถวิล ประมวล (2533) วิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของปูปอร์ทูนิตในประเทศไทย ของศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ (2532) วิทยานิพนธ์เรื่องเดคาพอดครัสเตเซียนและสโตมาโตพอดครัสเตเซียนในป่าชายเลนจังหวัดชุมพรและจังหวัดระนอง ของสุพจน์ แสงมณี (2530) วิทยานิพนธ์เรื่องปูแสมในอ่าวไทย ของสุรินทร์ มัจฉาชีพ (2516) และวิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของปูก้ามดาบในประเทศไทย ของ เสรี บรรพวิจิตร (2522) ในการพิสูจน์ทราบชนิดของปู ซึ่งสามารถพิสูจน์ทราบปูชนิดต่างๆ ได้ดังนี้

1.1 วงศ์ Grapsidae

สามารถจำแนกปูในวงศ์ Grapsidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 3 สกุล (genus) 6 ชนิด (species) คือ

Metopograpsus latifrons กระดองมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู พื้นผิวเรียบ มีก้ามที่แข็งแรงและมีขนาดไม่เท่ากัน ขาเดินทั้ง 4 คู่ แข็งแรงและค่อนข้างเรียวยาว กระดองมีสีน้ำตาลอ่อนสลับลวดลายสีเปลือกมังคุด ก้ามหนีบมีสีม่วง (ภาพประกอบ 4) (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2516 : 18-20)

Sesarma mederi กระดองมีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส ผิวด้านบนมีกลุ่มขนกระจายอยู่ทั่วไป ก้ามแข็งแรง ขาเดินทุกคู่มีขนปกคลุมหนาแน่น กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลอมม่วง ก้ามหนีบมีสีม่วงอมแดง ก้านตามีสีม่วง (ภาพประกอบ 5) (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 362-365)

Sesarma polita กระดองลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า พื้นผิวเรียบ ก้ามแข็งแรง ขาเดินทั้ง 4 คู่ ค่อนข้างเรียว กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลอมม่วง ก้ามหนีบมีสีแดงเข้มตามขอบมีสีค่อนข้างดำ (ภาพประกอบ 6) (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 384-386)

Sesarma bocourti กระดองมีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส ก้ามแข็งแรง ขาเดินทั้ง 4 คู่ ค่อนข้างแบนและกว้าง กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลเข้ม ก้ามหนีบมีสีแดงเลือดหมู (ภาพประกอบ 7) (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2516 : 61-63)

Sesarma moeschii กระดองมีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส โค้งนูนเล็กน้อยตามความยาว พื้นผิวเรียบ ก้ามหนีบมีลักษณะแข็งแรงมากกว่าขาเดิน กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาล อมดำมัน ก้ามหนีบมีสีแดงอมส้ม ก้านตาและตามีสีเทาอมดำ (ภาพประกอบ 8) (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 378-380)

Varuna literata กระดองมีลักษณะเป็นรูปโค้งกลมค่อนข้างแบน มีพื้นผิวเรียบยาว ขาเดินคู่แรกมีขนาดสั้นที่สุด กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลปนเหลืองอ่อน ก้ามหนีบมีสีเหลืองอ่อน (ภาพประกอบ 9) (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 355-356)

1.2 วงศ์ Portunidae

สามารถจำแนกปูในวงศ์ Portunidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 3 สกุล (genus) 4 ชนิด (species)

Charybdis affinis กระดองมีขนอ่อนปกคลุมทั่วไป ก้ามมีขนาดใกล้เคียงกันทั้งสองข้าง ขาเดินคู่ที่ 1 2 และ 3 มีลักษณะเรียวยาว ส่วนขาเดินคู่ที่ 4 แผ่แบนแบบใบพาย กระดอง ก้ามและขาเดินมีสีเขียวอมน้ำตาลอ่อน ส่วนปลายก้ามหนีบมีสีน้ำตาลอ่อน (ภาพประกอบ 10) (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 173-176)

Charybdis feriatus กระดองมีผิวเกลี้ยงมาก ก้ามยาวและมีขนาดเท่ากันทั้งสองข้างผิวเรียบเป็นมัน บนกระดองมีสีส้มปนชมพูในพื้นสีน้ำตาลทำให้เห็นเป็นรูปกางเขนอยู่ตรงกลางกระดองและรูปตัว Y คว่ำ 2 ข้างของกระดอง ก้ามและรยางค์ขามีรอยปะสีส้ม ขาว และน้ำตาลทั่วไป (ภาพประกอบ 11) (ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ. 2532 : 113-117)

Scylla serrata กระดองมีลักษณะกว้างเรียบนูน ไม่มีขนอ่อนปกคลุม ก้ามมีขนาดใกล้เคียงกันทั้งสองข้างและมีลักษณะสั้นป้อม แข็งแรง เรียบไม่มีสัน ขาเดินคู่ที่ 1 2 และ 3 มีลักษณะเรียวยาว ผิวเรียบ ขาเดินคู่ที่ 4 แผ่แบนแบบใบพาย กระดอง ก้าม และขาเดินมีสีเขียวหรือสีเขียวขี้ม้า ปลายก้ามหนีบมีสีขาวปนเหลืองอ่อน (ภาพประกอบ 12) (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 199-201)

Portunus pelagicus กระดองมีลักษณะแบนกว้าง มีตุ่มเล็กๆ กระจายทั่วไป ก้ามมีขนาดใกล้เคียงกันทั้งสองข้าง มีลักษณะเรียวยาว ผิวด้านบนและด้านล่างเรียบ ขาเดินคู่ที่ 1 2 และ 3 มีลักษณะเรียวยาวผิวเรียบ ขาเดินคู่ที่ 4 แผ่แบนแบบใบพาย กระดองและก้ามมีสีน้ำเงินอมเขียวขี้ม้า มีแต้มสีขาวกระจายอยู่ทั่วไป ขาเดินมีสีฟ้าสด ปลายสุดของก้ามหนีบมีสีน้ำเงินเข้ม (ภาพประกอบ 13) (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 186-189)

1.3 วงศ์ Leucosiidae

สามารถจำแนกปูในวงศ์ Leucosiidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 1 สกุล (genus) 1 ชนิด (species)

Philyra olivacea กระดองมีลักษณะหนานูน กลมรี ก้ามแข็งแรงมีขนาดเท่ากันทั้งสองข้าง ขาเดินเรียวเล็ก ผิวเรียบ กระดองมีสีน้ำตาลเข้ม มีลายสีม่วงอมดำเป็นแถบตามยาวและกระจายเป็นหย่อมๆ ก้ามและขาเดินมีสีน้ำตาล ตาและก้านตามีสีดำ (ภาพประกอบ 14) (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 161-163)

1.4 **วงศ์** Paguridae

สามารถจำแนกปูในวงศ์ Paguridae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 1 สกุล (genus) 1 ชนิด (species)

Clibanarius longitarsus กระดองมีลักษณะนูนเล็กน้อยตรงส่วนหน้า ผิวมีตุ่มกระจายอยู่ทั่วไป ก้านตาเป็นรูปทรงกระบอก ก้ามข้างขวามีขนาดใหญ่กว่าก้ามข้างซ้ายเล็กน้อย ขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 มีลักษณะเรียวยาว ค่อนข้างแบน ขอบบนและขอบล่างมีกลุ่มขนสั้นและยาวกระจายอยู่ทั่วไป กระดองมีสีน้ำตาลและลวดลายสีน้ำเงินแทรกอยู่เล็กน้อยผิวด้านนอกของขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 มีแถบสีน้ำเงินตามความยาว ก้านตามีสีเหลืองปนส้ม (ภาพประกอบ 15) (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 133-135)

1.5 **วงศ์** Ocypodidae

สามารถจำแนกปูในวงศ์ Ocypodidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 1 สกุล (genus) 3 ชนิด (species)

Uca forcipata ด้านข้างของกระดองสอบเข้าสู่ส่วนหลังของกระดอง กระดองของตัวผู้และตัวเมีย ปกติแล้วจะมีสีดำ และมักจะเป็นจุดสีเหลืองครีม หรือเทาอ่อน กระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะบริเวณครึ่งตอนหน้าบนกระดองของปูบางตัว ปกติแล้วก้านตามีสีดำ ตามีสีแดง แต่ปูบางตัวตาและก้านตามีสีแดง (ภาพประกอบ 16) (เสรี บรรพวิจิตร. 2522 : 27-32)

Uca vocans สี กระดอง ขา และก้ามของตัวเมียและตัวผู้ (ยกเว้นก้ามข้างใหญ่ของตัวผู้) จะมีสีเทาหรือสีเขียวขี้ม้า และอาจจะมีจุดสีขาวกระจายอยู่ทั่วไป ก้ามข้างใหญ่ของตัวผู้จะมีสีส้มหรือเทาอ่อน บางครั้งพบว่าปูตัวผู้มีกระดองขาและก้ามข้างเล็กเป็นสีขาว และอาจจะมีจุดขนาดใหญ่สีฟ้าอยู่บริเวณกลางกระดอง ส่วนตัวเมีย นอกจากจะมีสีขาวทั้งตัวแล้ว บนกระดองอาจจะมีสีฟ้า ชมพู หรือเทาอยู่ด้วย (ภาพประกอบ 17) (เสรี บรรพวิจิตร. 2522 : 65-70)

Uca lactea ตัวผู้ กระดองสีเทาหรือดำ และมักสลับด้วยลวดลายคาดขวางสีขาวหรือเทา บางครั้งพบว่ากระดองมีสีเทา ฟ้าอ่อน หรือขาว ซึ่งมักจะสลับด้วยสีดำเป็นลายหินอ่อนงดงาม ก้านตาสีเทา ขาและก้ามข้างเล็กมีสีเทาและมักจะมีจุดเล็กๆ สีขาวอยู่ทั่วไป บริเวณโคนขาและโคนก้ามข้างเล็กอาจมีสีส้ม ก้ามข้างใหญ่มีสีชมพูหรือส้ม ตัวเมีย กระดองมีสีเทา เหลือง หรือขาว บางตัวกระดองมีสีดำและสลับด้วยลวดลายสีขาว บริเวณขอบหลังของกระดอง บางตัวกระดองมีสีน้ำตาลอ่อน และส่วนหลังของกระดองเป็นสีขาว ขาสีดำ น้ำตาล น้ำตาลแดง หรือขาวทุกขา บางตัวขาบางคู่มีสีไม่เหมือนกับขาคู่อื่น

หรือขาข้างเดียวกันมี 2 สี เช่น โคน merus มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนที่เหลือมีสีขาวเป็นต้น ก้านตามีสีเทา (ภาพประกอบ 18) (เสรี บรรพวิจิตร. 2522 : 84-90)

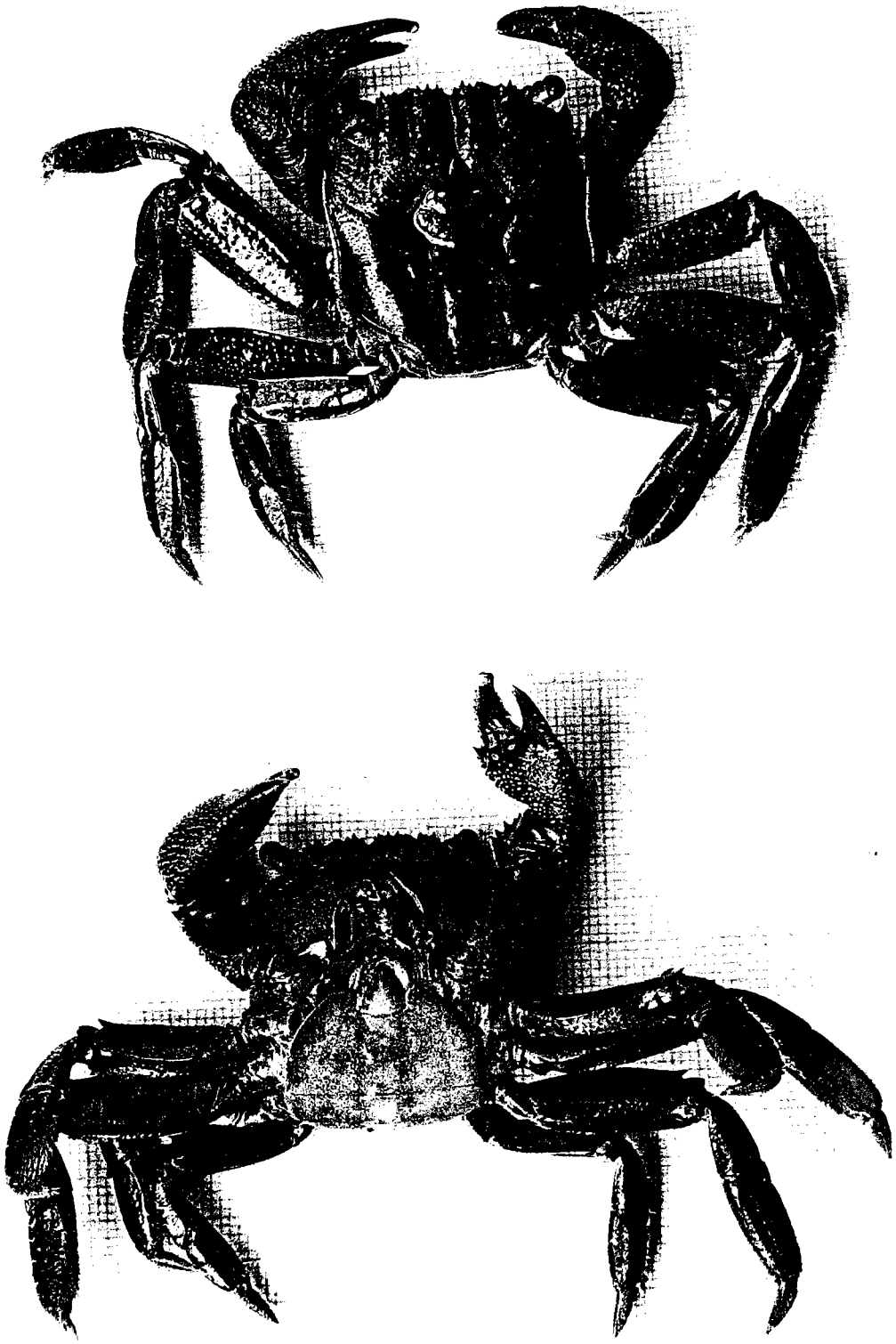
1.6 วงศ์ Parathelphusidae

สามารถจำแนกปูในวงศ์ Parathelphusidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 1 สกุล (genus) 1 ชนิด (species)

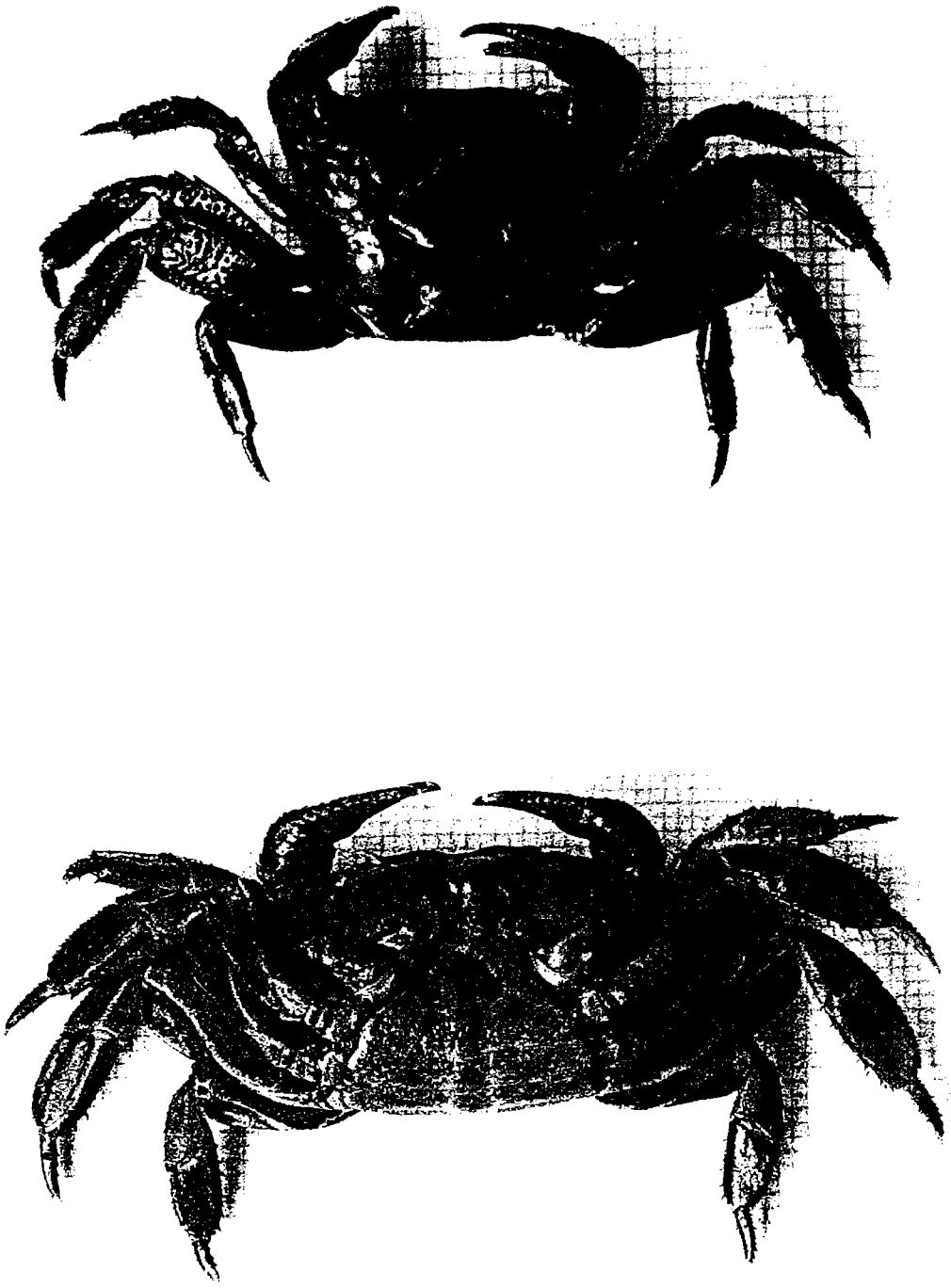
Somanniathelphusa germaini กระดองมีลักษณะโค้งนูนและค่อนข้างเรียบ ก้ามหนีบมีผิวเรียบ ขนาดของกระดองมีความกว้างตั้งแต่ 40-60 มิลลิเมตร สีของกระดองมีตั้งแต่สีดำ ม่วงดำ เทา เหลือง หรือผสมกัน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม (ภาพประกอบ 19) (ถวิล ประมวล. 2533 : 31-33)

ภาพประกอบ 4 แสดงลักษณะของ *Metopograpsus latifrons*

ภาพประกอบ 5 แสดงลักษณะของปูแสม *Sesarma mederi*

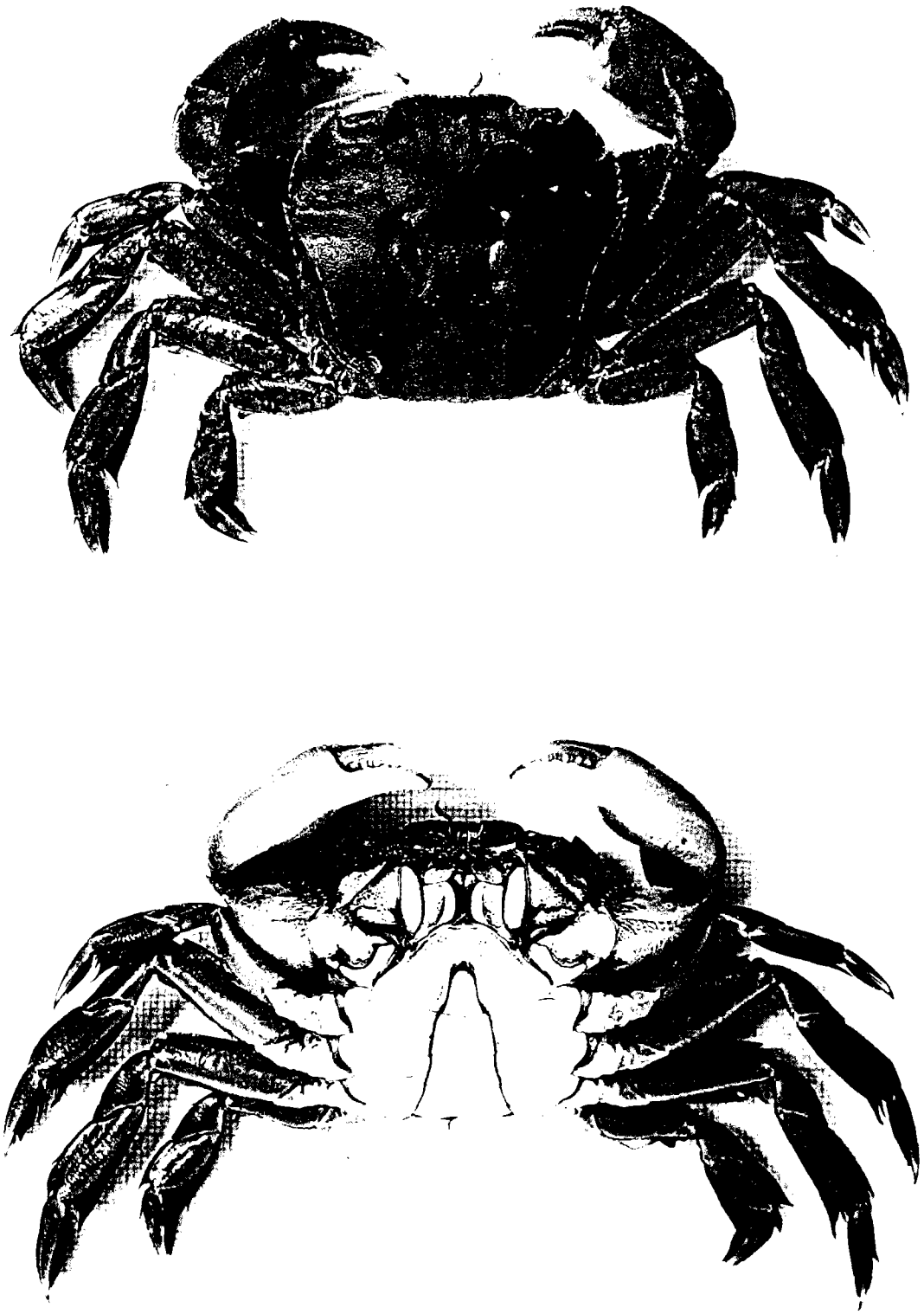


ภาพประกอบ 6 แสดงลักษณะของปูซองจาก *Sesarma polita*



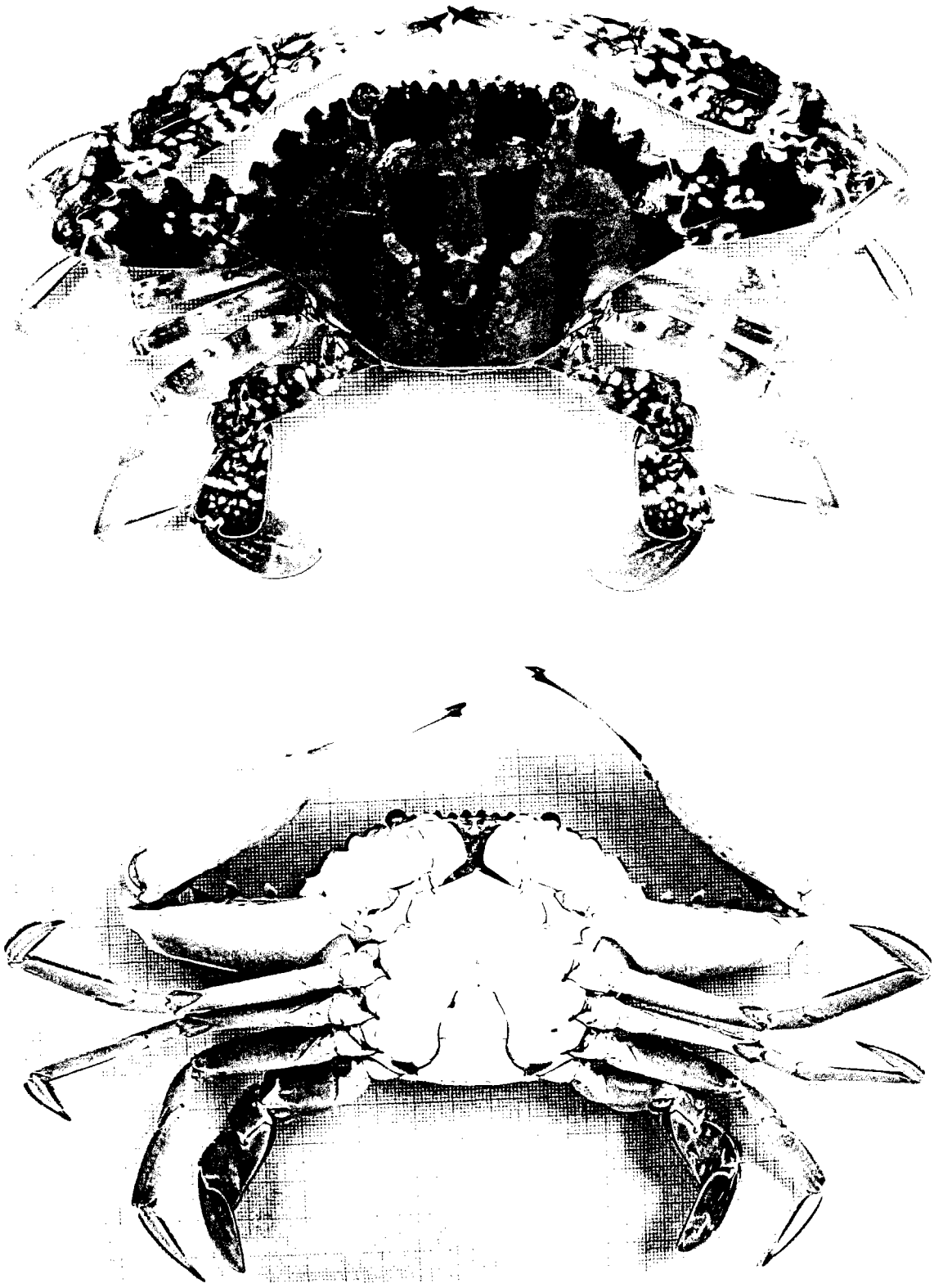
ภาพประกอบ 7 แสดงลักษณะของ *Sesarma bocourti*

ภาพประกอบ 8 แสดงลักษณะของปูแสม *Sesarma moeschii*

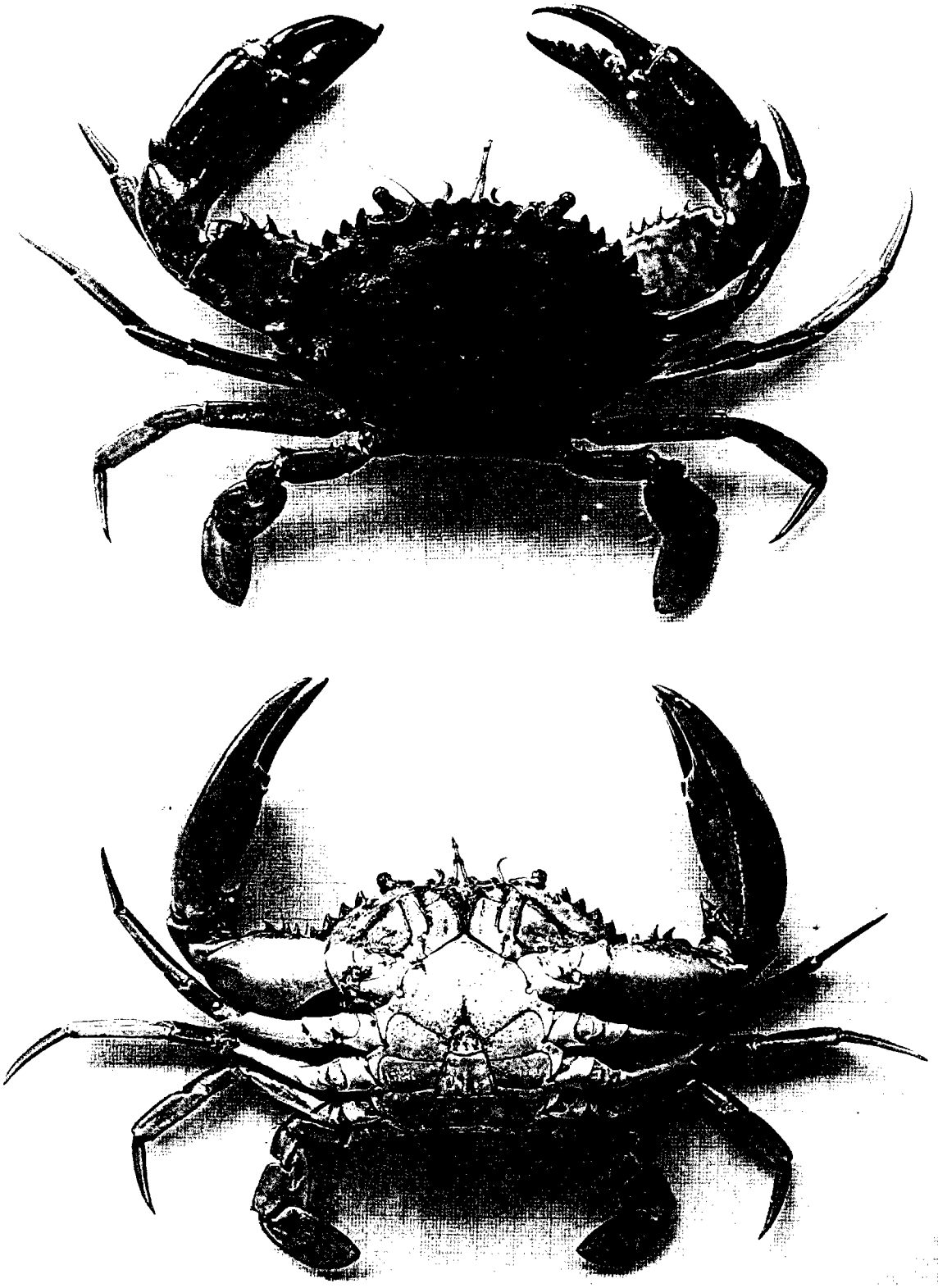


ภาพประกอบ 9 แสดงลักษณะของปูแป้น *Varuna literata*

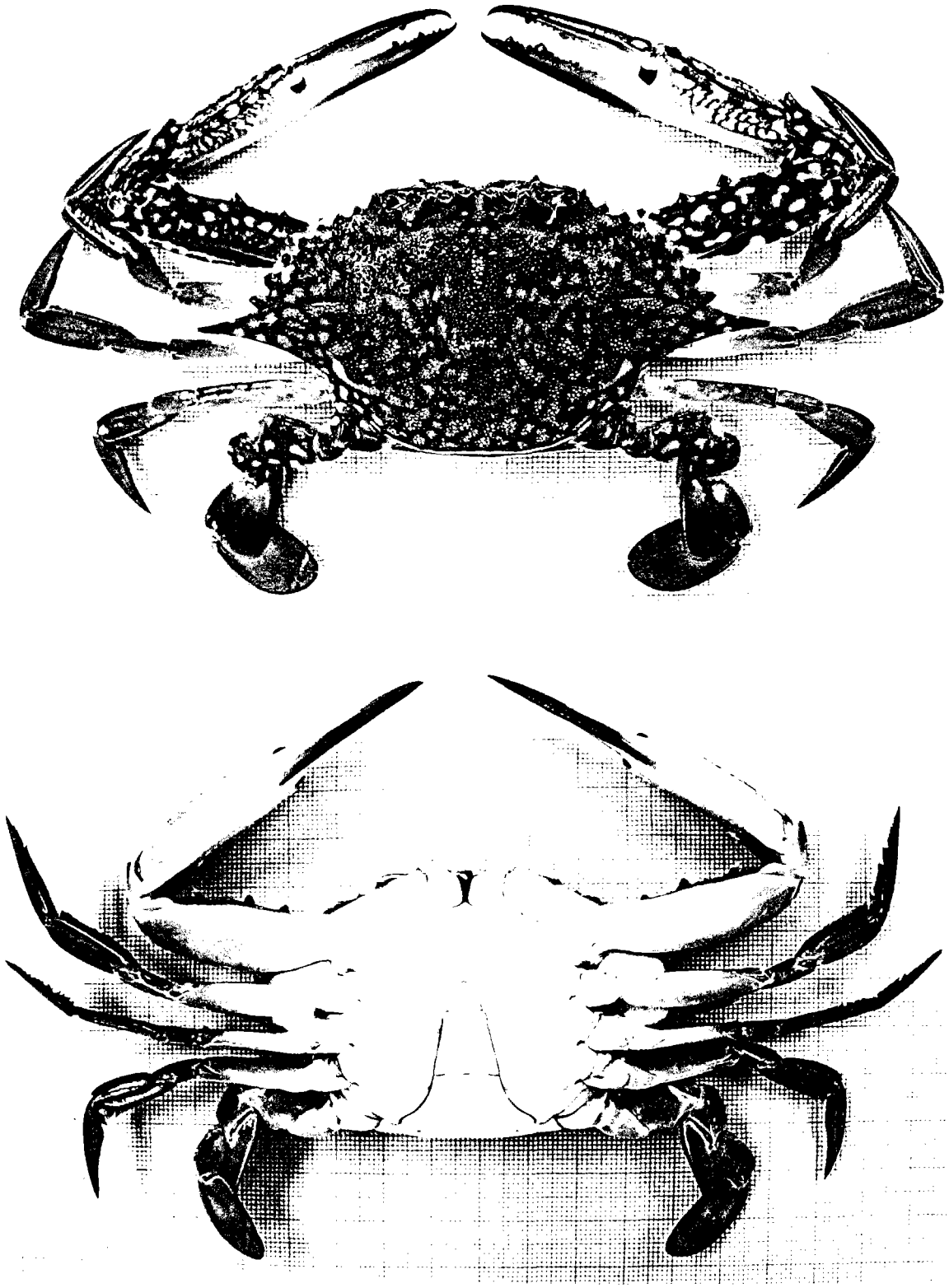
ภาพประกอบ 10 แสดงลักษณะของปูม้าเล็ก *Charybdis affinis*



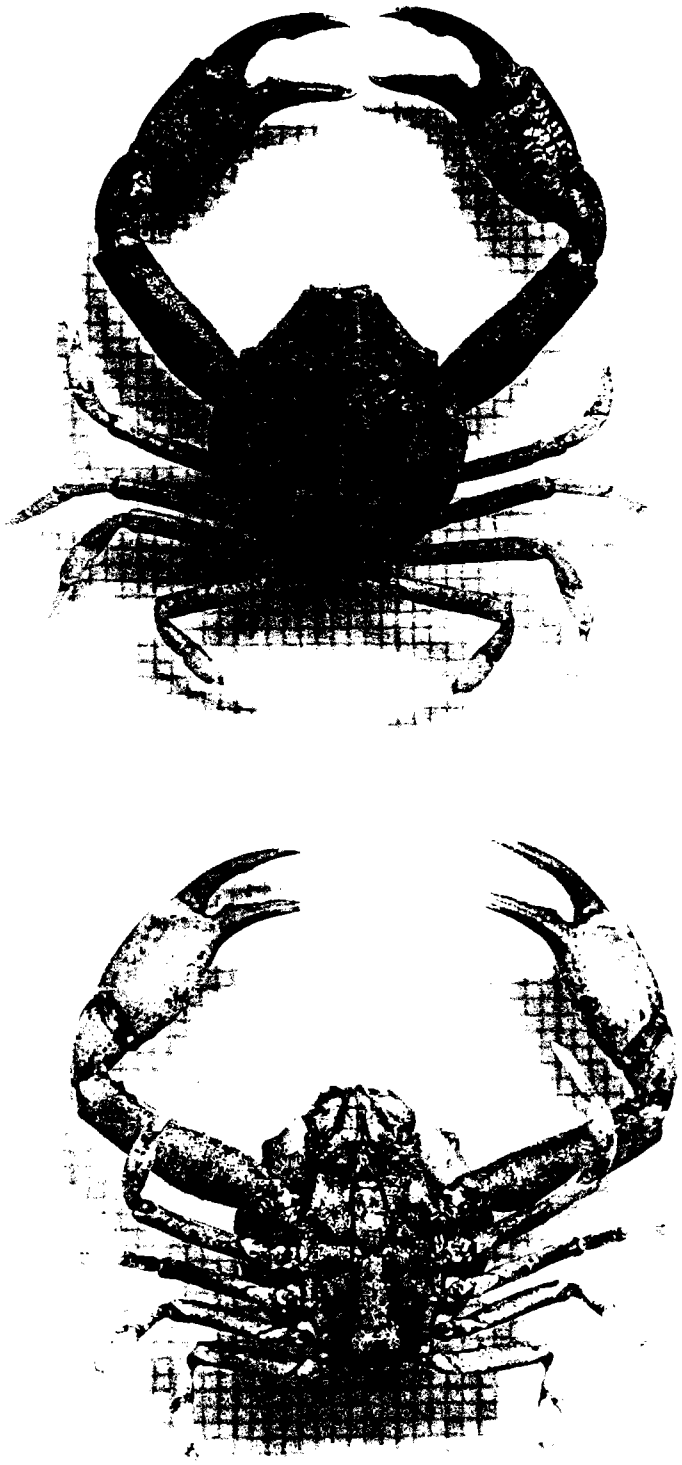
ภาพประกอบ 11 แสดงลักษณะของปูกางเขน *Charybdis feriatus*



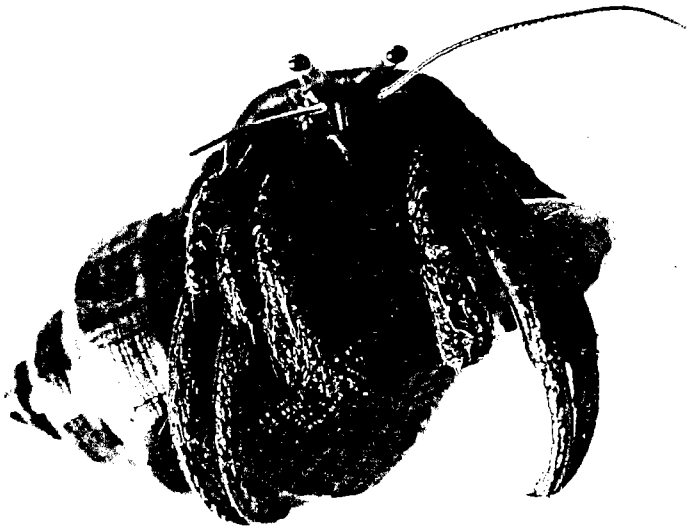
ภาพประกอบ 12 แสดงลักษณะของปูทะเล *Scylla serrata*



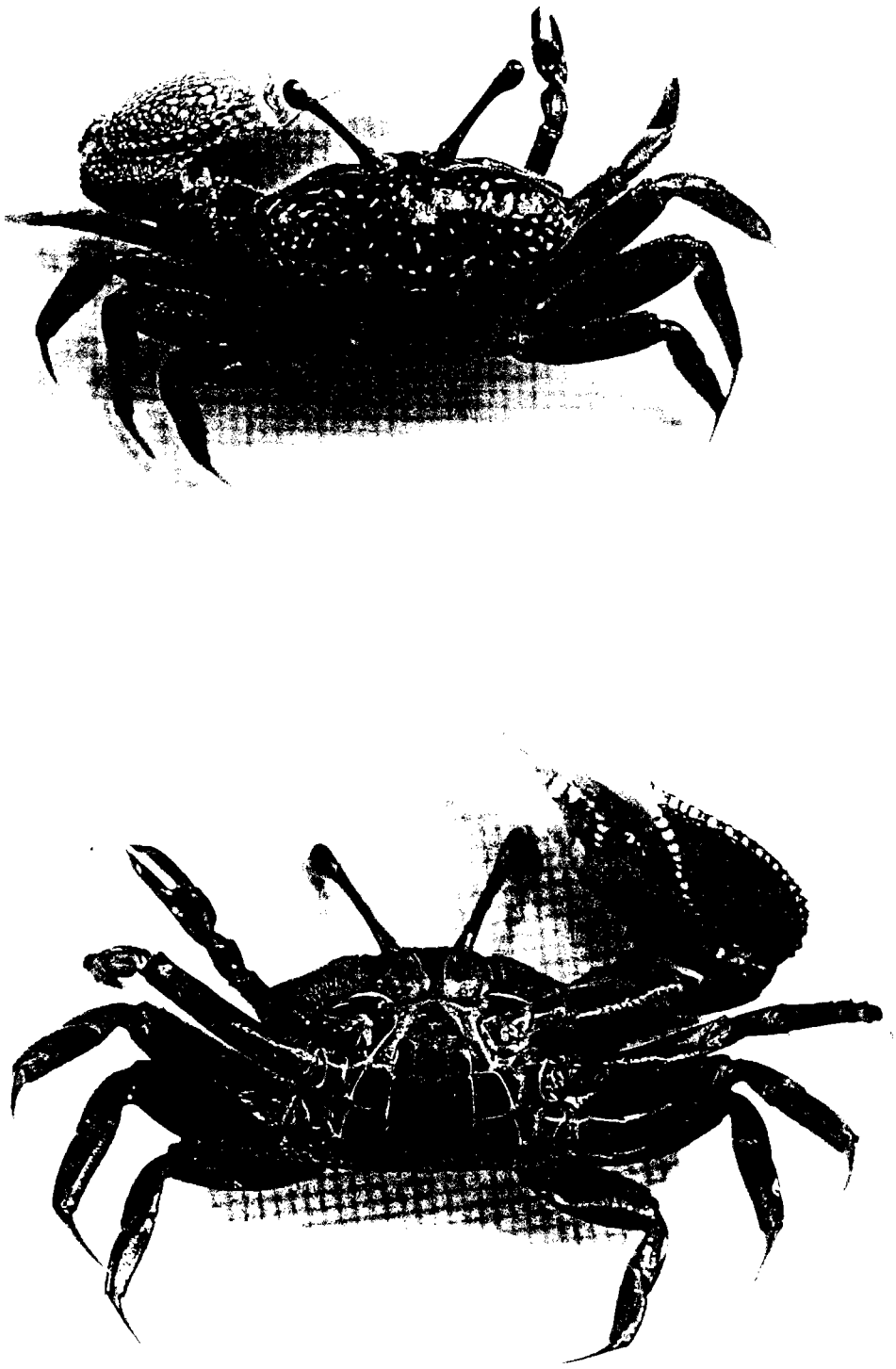
ภาพประกอบ 13 แสดงลักษณะของปูม้า *Portunus pelagicus*



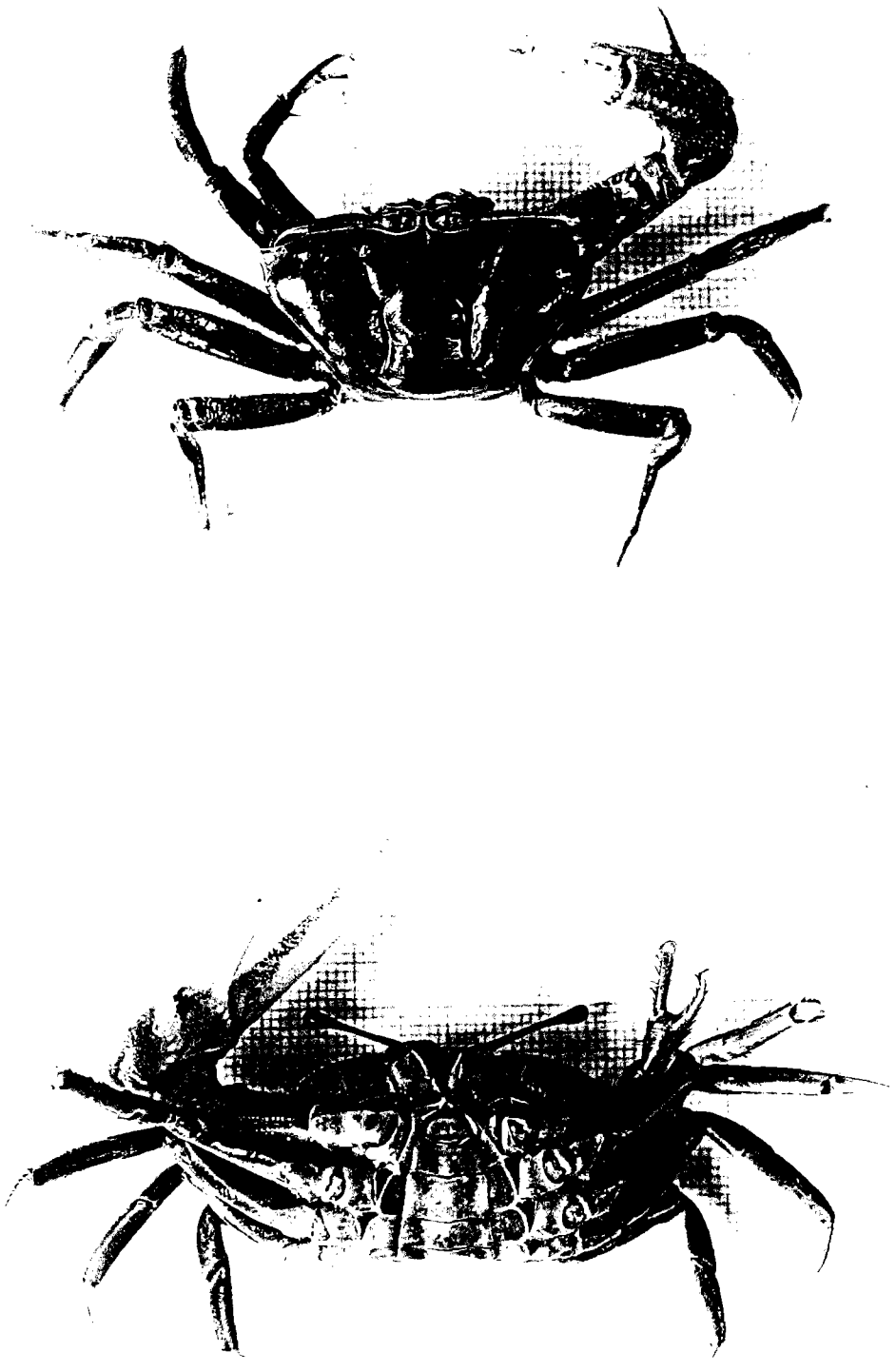
ภาพประกอบ 14 แสดงลักษณะของ *Philyra olivacea*



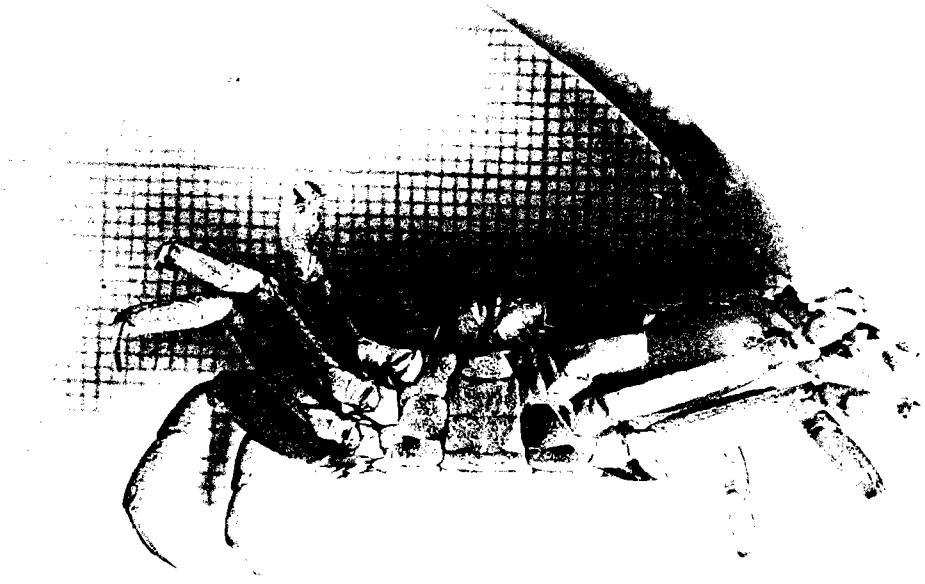
ภาพประกอบ 15 แสดงลักษณะของปูเสฉวน *Clibanarius longitarsus*



ภาพประกอบ 16 แสดงลักษณะของปูก้ามดาบ *Uca forcipata*



ภาพประกอบ 17 แสดงลักษณะของปูก้ามดาบ *Uca vocans*



ภาพประกอบ 18 แสดงลักษณะของปูก้ามดาบ *Uca lactea*

ภาพประกอบ 19 แสดงลักษณะของปูนา *Somanniathelphusa germaini*

2. การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากปูที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติและจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 10 และ 30 วัน (จำนวนวันขึ้นอยู่กับจำนวนของตัวอย่าง) ในปูชนิดต่างๆ 6 วงศ์ ได้แก่ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae ได้ผลดังตาราง 3

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูวงศ์ต่างๆ ที่ได้จากการรวบรวมตามธรรมชาติและจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (ภาพประกอบ 20) ซึ่งการทดลองในแต่ละครั้งได้ใช้กุ้งกุลาดำเป็นตัวควบคุมการทดลองและพบว่ากุ้งกุลาดำที่ทำการทดลองพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (ภาพประกอบ 21) แต่การตรวจโดยวิธี immunohistochemistry พบการเกิด occlusion bodies ในตับและตับอ่อนในปูแสม *Sesarma mederi* (7/84) และ *S. moeschii* (3/49) (ตาราง 3 และภาพประกอบ 23) และพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากการติดเชื้อจากธรรมชาติในปูม้าเล็ก *Charybdis affinis* (33/74) ปู *Philyra olivacea* (11/33) และ ปูม้า *Portunus pelagicus* (2/33) (ตาราง 3 และภาพประกอบ 24)

3. การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากปูที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติและจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 10 และ 30 วัน (จำนวนวันขึ้นอยู่กับจำนวนของตัวอย่าง) ในปูชนิดต่างๆ 6 วงศ์ ได้แก่ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae ได้ผลดังตาราง 3

ซึ่งจากการตรวจสอบยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR นั้นไม่พบว่าการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในตัวอย่างใดๆ นอกจากในกรณีของปูก้ามดาบ *Uca forcipata* เท่านั้นที่ให้ผลบวกอ่อนๆ ในการตรวจครั้งที่ 1 ทำให้ต้องมีการเก็บตัวอย่างใหม่เพื่อยืนยันผลการทดลอง และเมื่อทำการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR ครั้งที่ 2 พบว่าปูก้ามดาบ *Uca forcipata* ให้ผลเป็นลบเหมือนกับปูในวงศ์อื่นๆ (ภาพประกอบ 22) และเนื่องจากมีการตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูม้าเล็ก *Charybdis affinis* และปู *Philyra olivacea* โดยวิธี immunohistochemistry จึงมีการตรวจสอบยืนยันผลด้วยวิธี PCR พบว่าได้ผลเช่นเดียวกัน (ภาพประกอบ 25) แต่ในกรณีของปูม้า *Portunus pelagicus* พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวปริมาณน้อยในปู 2 ตัว จาก 33 ตัว ซึ่งจากการแบ่งตัวอย่างเพื่อการตรวจด้วยวิธี PCR ของตัวอย่างรวมไม่พบการติดเชื้อคาดว่าเชื้ออาจถูกเจือจางมากเกินกว่าที่จะพบการติดเชื้อ

ตาราง 3 แสดงชนิดปูที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ และนำมาชักนำให้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีดและเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ

วงศ์และชนิด	วิธีการตรวจ YHV	การตรวจการติดเชื้อจากธรรมชาติ 0 วัน	การตรวจการติดเชื้อหลังได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง (วัน)			หมายเหตุ	แหล่งที่เก็บ ความเค็มน้ำทะเล ppt
			3	10	30		
Grapsidae							อ. พระสมุทรเจดีย์ จ. สมุทรปราการ 5 ppt
Metapograpsus latifrons	IHC	- (20)	- (20)	- (20)	- (8)		
	RT-PCR	- (25)	- (20)	- (20)	ND (8)		
Sesarma mederi	IHC	- (8)	- (10)			พบ occlusion body ในนิวเคลียสของตับและตับอ่อน (7/84)	
		- (7)	- (15)	- (14)			
		- (15)	- (15)				
	RT-PCR	- (8)	- (10)				
		- (15)	- (15)	ND(14)			
Sesarma polita	IHC	- (16)	- (15)	- (2)	- (2)		
	RT-PCR	- (16)	- (15)	ND (2)	ND (2)		
Sesarma bocourti	IHC	- (15)	- (15)	- (15)	- (21)		
	RT-PCR	- (15)	- (15)	- (15)	- (21)		
Sesarma moeschii	IHC	- (15)	- (15)	- (10)	- (9)	พบ occlusion bodies ในนิวเคลียสของตับและตับอ่อน (3/49)	
	RT-PCR	- (15)	- (15)	- (10)	- (9)		
Varuna literata	IHC	- (15)	- (15)	- (18)			
	RT-PCR	- (15)	- (15)	ND (18)			
Portunidae							อ. เมือง จ. สมุทรปราการ 25 ppt
Charydis affinis	IHC	- (20)	- (20)	- (9)		พบการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาว (33/74)	
		- (10)	- (15)				
	RT-PCR	- (20)	- (20)	- (9)			
Charydis feriatus	Dot-blot	- (7)	- (4)	- (2)		เก็บตัวอย่างเป็นน้ำเลือด	
	RT-PCR	- (7)	- (4)	ND (2)			
Scylla serrata	IHC	-(21) haemocyte smear	- (6)	- (3)		เก็บตัวอย่างเป็นน้ำเลือด	
	RT-PCR	- (21)	- (15)	ND (14)			
Portunus pelagicus	IHC	- (10)	- (10)	- (13)		พบการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาว (2/33)	
	RT-PCR	- (10)	- (10)	ND (13)			
Leucosiidae							อ. เมือง จ. สมุทรปราการ 25 ppt
Philyra olivacea	IHC	- (8)	- (15)	- (10)		พบการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาว (1/33)	
	RT-PCR	(8)	- (15)	(10)			

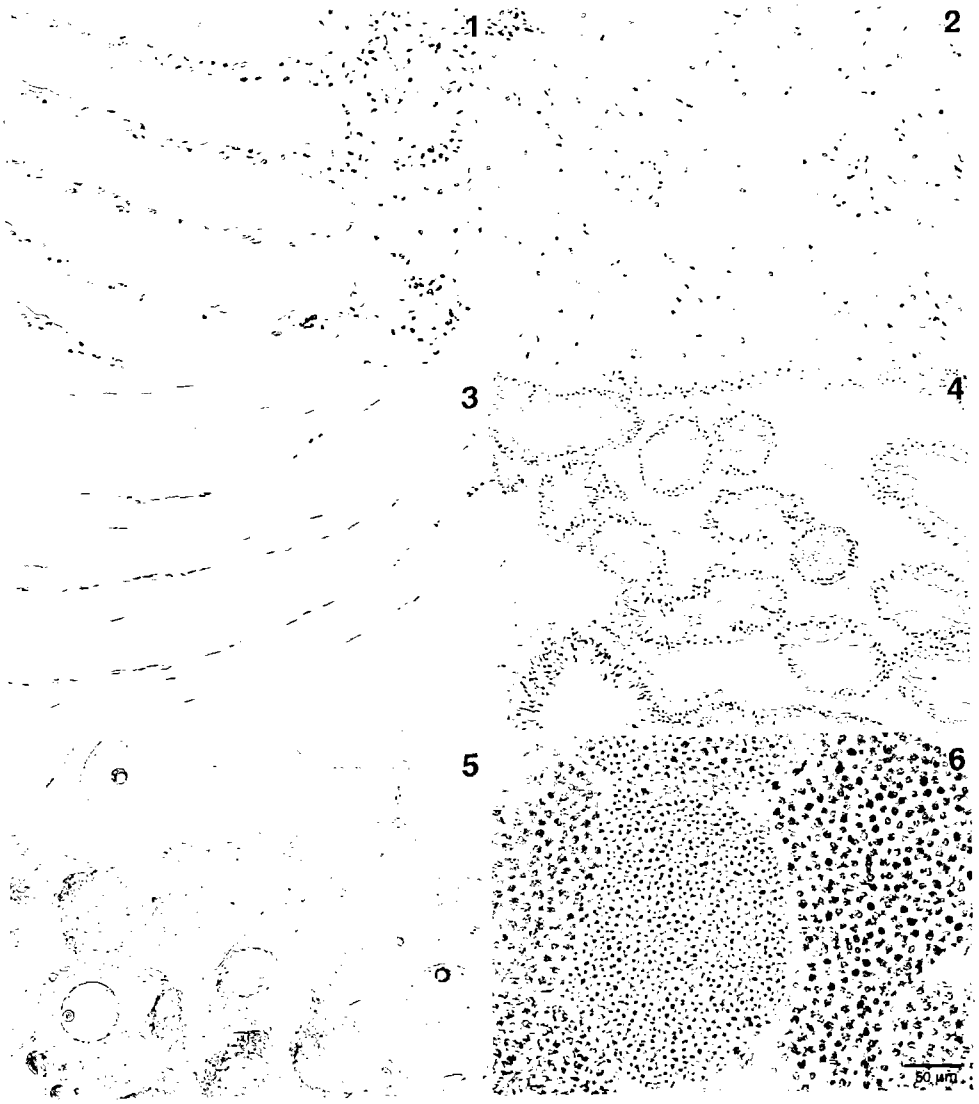
ตาราง 3 (ต่อ) แสดงชนิดปูที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ และนำมาชักนำให้ติดเชื้อ YHV โดยการฉีดและเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ

วงศ์และ species	วิธีการตรวจ YHV	การตรวจการติดเชื้อจากธรรมชาติ 0 วัน	การตรวจการติดเชื้อหลังได้รับเชื้อ YHV (วัน) 3	10	30	หมายเหตุ	แหล่งที่เก็บ ความเค็มน้ำทะเล ppt
Paguridae							
Clibanarius longitarsus	IHC	- (15)	- (15)	- (20)			อ. เมือง จ. สมุทรปราการ 5 ppt
	RT-PCR	- (15)	- (15)	ND (20)			
Uca forcipata	IHC	- (15)	- (15)	- (23)			อ. เมือง จ. สมุทรปราการ 15 ppt
		- (15)	- (15)	- (20)			
	RT-PCR	± (15)	± (15)	- (23)			
		- (15)	- (15)	ND (20)			
Uca vocans	IHC	- (15)	- (15)				
	RT-PCR	- (15)	- (15)				
Uca lactea	IHC	- (15)	- (15)	- (17)			
	RT-PCR	- (15)	- (15)	ND (17)			
Parathelphusidae							
Somanniathelphusa germaini	IHC	- (20)	- (20)	- (20)			อ. เมือง จ. สมุทรปราการ น้ำจืด
	RT-PCR	- (20)	- (20)	ND (20)			

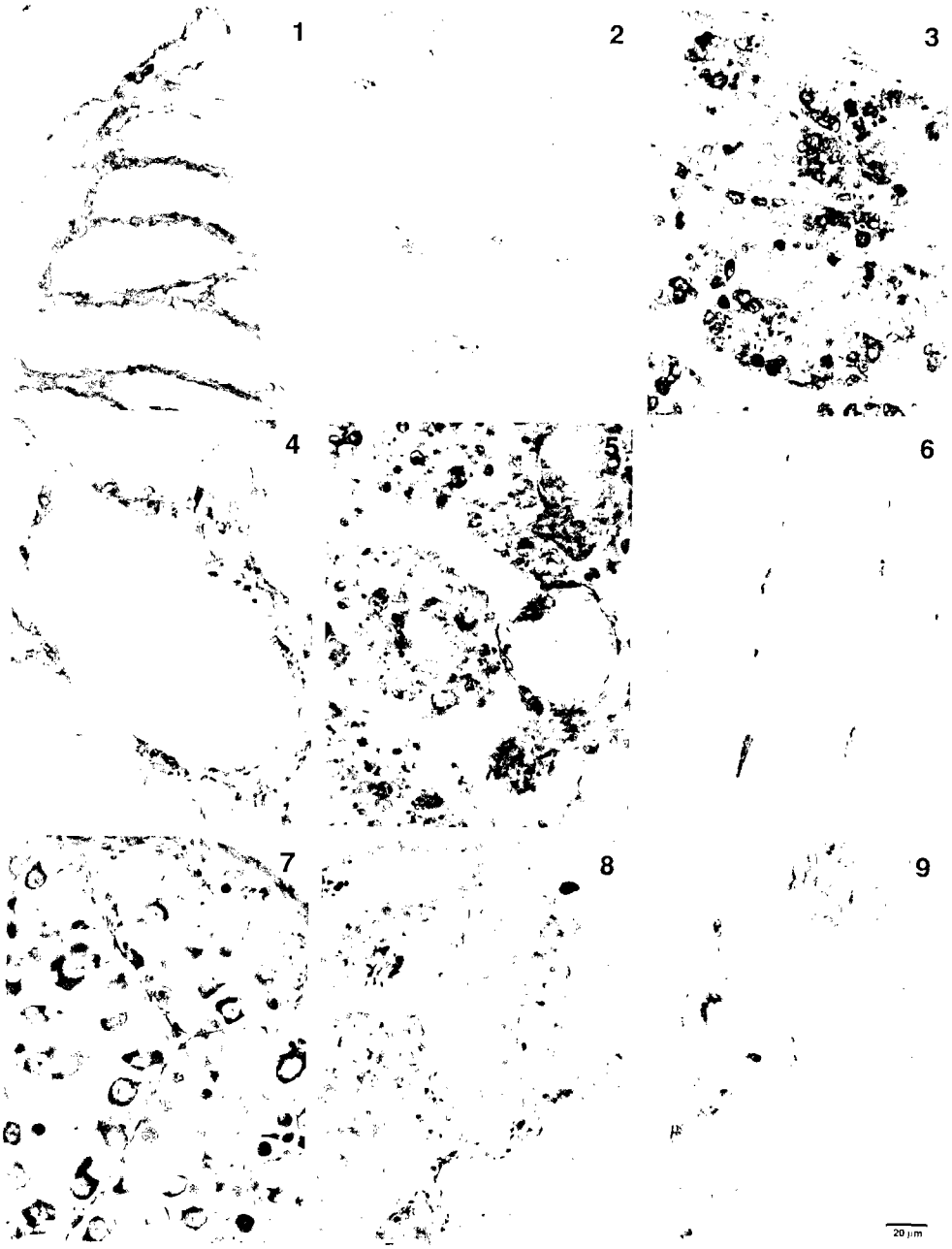
IHC = Immunohistochemistry ทำการตรวจเนื้อเยื่อต่างๆ จากตัวอย่างทุกตัว

RT-PCR = Reverse transcriptase polymerase chain reaction ทำการตรวจตัวอย่างในแต่ละกลุ่มรวมกัน

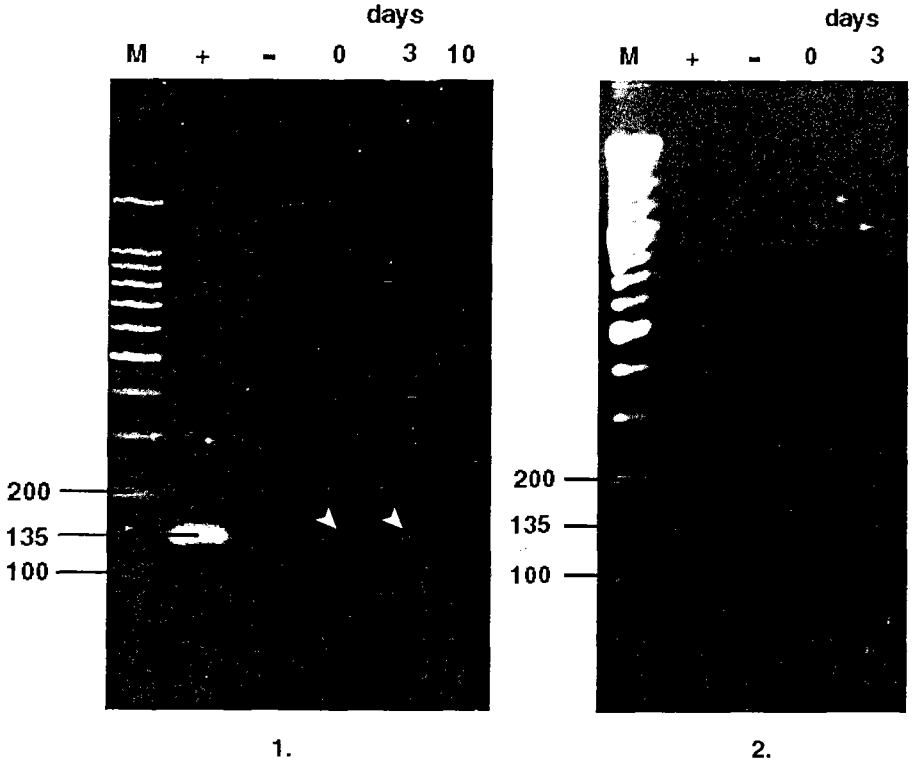
ND = Not determined



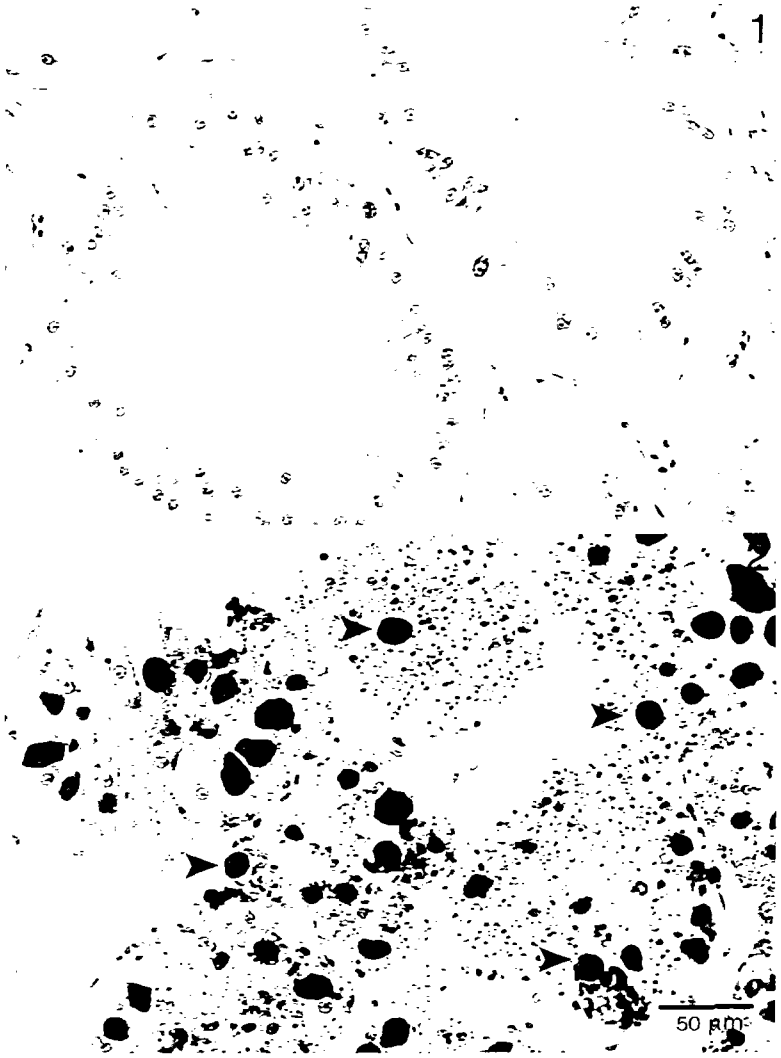
ภาพประกอบ 20 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ของปูม้าเล็ก *Charybdis affinis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 (1 = เหงือก 2 = หัวใจ 3 = กล้ามเนื้อ 4 = ตับและตับอ่อน 5 = รังไข่ และ 6 = อัณฑะ)



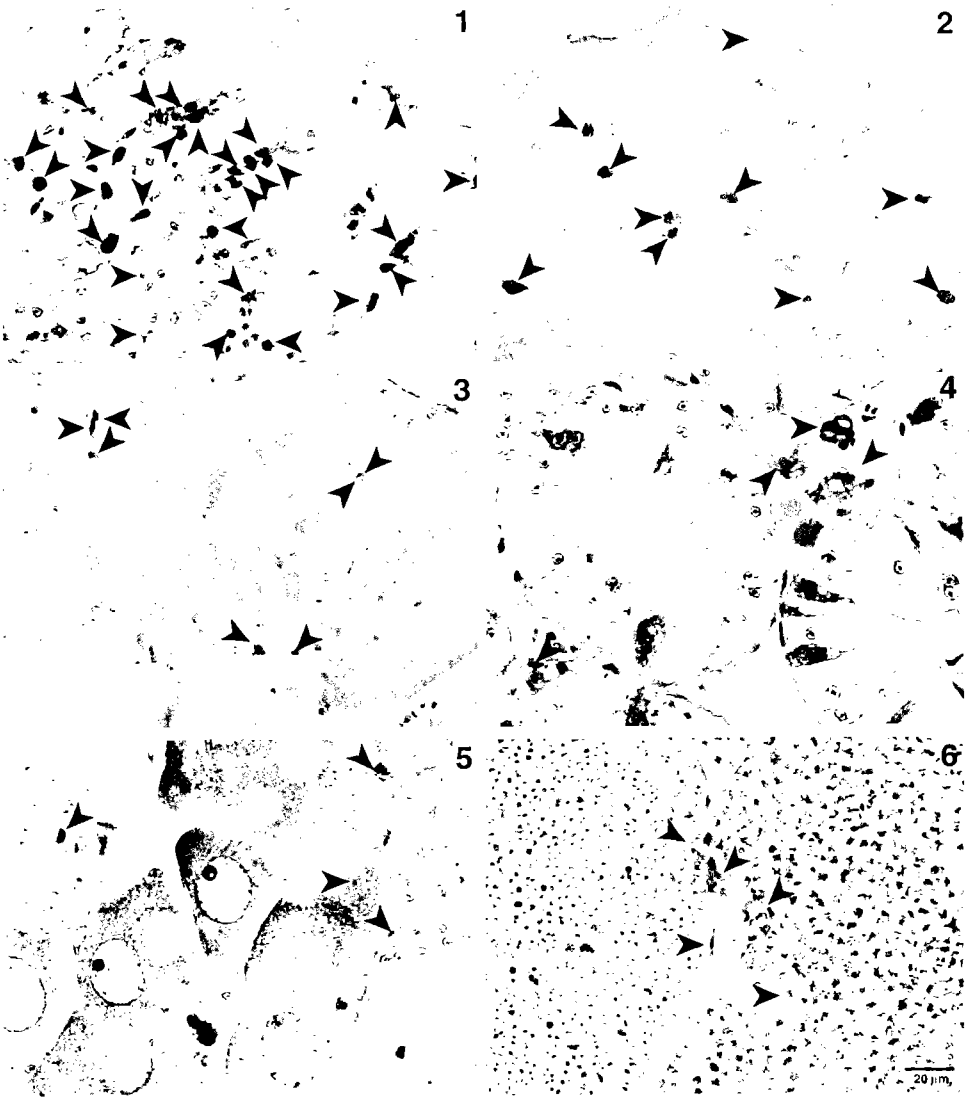
ภาพประกอบ 21 แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ของกุ้งกุลาดำที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 (1 = เหงือก 2 = หัวใจ 3 = เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด 4 = ตับและตับอ่อน 5 = อวัยวะน้ำเหลือง 6 = กล้ามเนื้อ 7 = รังไข่ 8 = อัณฑะ และ 9 = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน)



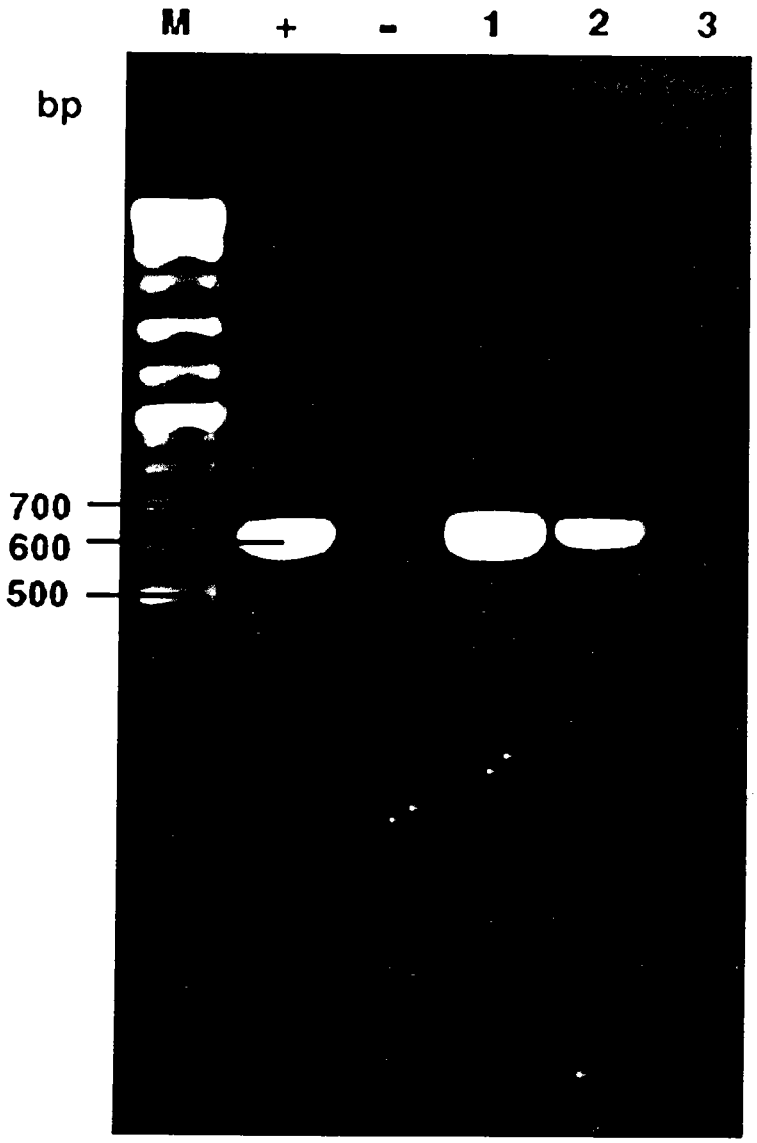
ภาพประกอบ 22 RT-PCR ของปูก้ามดาบ (*Uca forcipata*) 1. การตรวจครั้งที่ 1 และ 2. การตรวจครั้งที่ 2 M = molecular weight ladder, + = positive control, - = negative control, 0 = เนื้อเยื่อต่างๆของปูจากตามธรรมชาติ, 3 และ 10 = เนื้อเยื่อต่างๆของปูหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง 3 และ 10 วัน



ภาพประกอบ 23 แสดงตับและตับอ่อนของปูแสม (*Sesarma mederi*) 1.เนื้อเยื่อปกติ 2. เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ซึ่งเกิด occlusion bodies ในนิวเคลียสของเซลล์ (ลูกศร) ซึ่งในกรณีของเนื้อเยื่อปกติจะไม่มี occlusion bodies เกิดขึ้นภายในเซลล์



ภาพประกอบ 24 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ (ลูกศร) ของปูม้าเล็ก (*Charybdis affinis*) ตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 (1 = เหงือก 2 = หัวใจ 3 = กล้ามเนื้อ 4 = ตับและตับอ่อน 5 = รังไข่ และ 6 = อัณฑะ)



ภาพประกอบ 25 PCR สำหรับตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาว M = molecular weight ladder, + = positive control, - = negative control, 1 = ปูม้าเล็ก (*Charybdis affinis*) , 2 = *Philyra olivacea* และ 3 = ปูม้า (*Portunus pelagicus*)

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สามารถรวบรวมปูในวงศ์ Grapsidae 6 ชนิด คือ *Metopograpsus latifrons Sesarma mederi S. polita S. bocourti S. moeschii* และ *Varuna literata*; Portunidae 3 ชนิด คือ *Charybdis affinis C. feriatus Scylla serrata* และ *Portunus pelagicus*; Leucosiidae 1 ชนิด คือ *Philyra olivacea*; Paguridae 1 ชนิด คือ *Clibanarius longitarsus*; Ocypodidae 3 ชนิด คือ *Uca forcipata U. vocans และ U. lactea* และ Parathelphusidae 1 ชนิด คือ *Somanniathelphusa germaini* จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมืองและอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากปูเหล่านั้น โดยการจับจากธรรมชาติ การทดลองชักนำให้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีดเป็นเวลา 3 วัน และ 10 วัน นำไปตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Y19, Y18-2D และ V3–2B ซึ่งจำเพาะต่อโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสขนาด p20 gp64 และ gp116 ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นตะกอนจากปฏิกิริยาแอนติเจนจับกับแอนติบอดีเป็นสีน้ำตาลตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ กล้ามเนื้อ เหงือก รังไข่ อัณฑะ ตับและ ตับอ่อน ซึ่งจากการรายงานของ ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูล; และคนอื่นๆ (2545 : 138) ได้ทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae 5 ชนิด และตรวจเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดนี้เช่นเดียวกัน พบว่าให้ผลบวกชัดเจนเมื่อใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสได้แก่ p20 และ gp64 นั่นคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด Y19 และ Y18-2D และให้ผลเป็นลบในโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ที่จำเพาะต่อโปรตีน gp116 ดังนั้น จากการทดลองจึงสรุปได้ว่า ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิด Y19 และ Y18-2D มาตรวจสอบในวิธี immunohistochemistry ได้ ดังนั้นการตรวจไม่พบเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงเป็นที่แน่นอนว่าไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อของปูเหล่านั้นได้ ซึ่งผลจากการตรวจโดย RT-PCR ได้ผลเช่นเดียวกัน

จากการทดลองการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปยังสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียน 3 ชนิด ได้แก่ ปูม้า (*Portunus pelegicus*) ปูทะเล (*Scylla serrata*) และเคย (*Acetes* sp.) พบว่าการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อโดยการฉีดไวรัสเข้าสู่สัตว์ทดลองนั้นทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสได้มากกว่าการให้กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหรือการจุ่มแช่ในน้ำที่มีเชื้อไวรัสปนเปื้อน (Supamattaya; et al. 1998 : 79) และจากการทดลองโดยยัยนับ แวและ (2545 : 111-113) ได้มีการทดลองตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งในวงศ์

Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae นำมาตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อโดยการฉีดหรือการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสอย่างรุนแรงในเวลา 3 วัน และจับจากธรรมชาติ โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่างๆ (p20 gp64 และ gp116) ของไวรัสหัวเหลือง คือ Y19, Y18 และ V3-2B ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งที่จับจากธรรมชาติทั้ง 3 วงศ์ สำหรับกุ้งในวงศ์ Panaeidae เท่านั้นที่พบการติดเชื้อจากการกิน ส่วนใหญ่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงเมื่อได้รับการฉีด ส่วนกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ทุกชนิดไม่มีการติดเชื้อจากการกินแต่การเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อโดยการฉีดพบว่า ส่วนน้อยเท่านั้นที่แสดงการติดเชื้อ และกุ้งในวงศ์ Atyidae ไม่พบการติดเชื้อเมื่อได้รับเชื้อโดยการกิน แต่ไม่ได้ทดลองโดยการฉีดเนื่องจากมีขนาดเล็ก ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวทำให้การวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาการติดเชื้อในปูด้วยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองมากกว่าการให้กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

จากการวิจัยครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าไม่มีปูชนิดใดเลยที่แสดงอาการของการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR ในปูก้ามดาบ (*U. forcipata*) พบว่าให้ผลเป็นบวกในปูที่เก็บตัวอย่างจากธรรมชาติและหลังจากฉีดเชื้อ 3 วัน แต่ไม่พบการติดเชื้อที่ 10 วัน ซึ่งไม่พบการติดเชื้อโดยดูผลจากการตรวจสอบโดยวิธี immunohistochemisty คาดว่าผลบวกใน RT-PCR อาจเกิดจากการปนเปื้อนของไวรัสในธรรมชาติซึ่งติดอยู่ในตัวปูและการปนเปื้อนจากการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้นจึงได้มีการเก็บตัวอย่าง ปูก้ามดาบ (*U. forcipata*) เพื่อทดลองซ้ำอีกครั้งและผลที่ได้คือให้ผลเป็นลบเหมือนปูชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูม้าเล็ก (*Charybdis affinis*) *Philyra olivacea* และ ปูม้า (*Portunus pelagicus*) เช่นเดียวกับที่มีรายงานจาก Supamattaya; et al (1998 : 79) ว่าปูม้า (*Portunus pelagicus*) ปูทะเล (*Scylla serrata*) และเคย (*Acetes* sp.) เป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยให้เคยได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด จุ่มและการกินเนื้อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ส่วนปูทั้ง 2 ชนิด ทำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดและการกินเท่านั้น และผลจากการศึกษาทาง histology ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า เซลล์เม็ดเลือด เซลล์เหงือก และเซลล์เยื่อบุผิวของกุ้งเคยที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ลักษณะเช่นนี้ก็พบในปูทั้ง 2 ชนิด ที่ได้รับเชื้อไวรัสเช่นเดียวกัน เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าอนุภาคของไวรัสชนิดนี้มีรูปร่างเป็นท่อนเช่นเดียวกับที่พบในกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคและมีขนาดใกล้เคียงกัน และจากการรายงานของ Kanchanaphum; et al (1998 : 1) ได้ทำการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าไปในปูทั้ง 3 ชนิด คือ ปูแสม (*Sesarma* sp.) ปูทะเล (*Scylla serrata*) และปูก้ามดาบ (*Uca pugilator*) ซึ่งพบว่ามีไวรัสตัวแดงดวงขาวแฝงตัวอยู่ในปูทั้ง 3 ชนิด และปูทั้ง 3 ชนิดที่เป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวนี้สามารถถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งกุลาดำได้ โดยผ่านทางน้ำที่อยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงหรือที่กักขังสัตว์น้ำ และยังพบ occlusion bodies ใน ตับและตับอ่อน ของปูแสม

(*Sesarma mederi*) และ ปูแสม (*S. moeschii*) ซึ่งปูทั้ง 2 ชนิดนี้อาจจะเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่ไม่ทราบชนิดได้ ซึ่งไม่ใช่การติดเชื้อจากไวรัสเอชพีวีและไวรัสเอ็มบีวี เนื่องจากไวรัสเอชพีวี นั้นเราได้มีการตรวจสอบโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C แล้วไม่พบการติดเชื้อ ส่วนไวรัสเอ็มบีวี นั้นจากการตรวจการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีของ ชลอ ลิ้มสุวรรณ (2543 : 191) โดยการตับและตับอ่อนของกุ้งมาบี้บดสไลด์และหยดสารละลายมาลาไคท์กรีน 0.1% หรือ 0.5% หรือย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลีนและสีอิโอซิน แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นเม็ดกลมๆ ซึ่งเป็น occlusion bodies (ก้อนโปรตีนของเชื้อไวรัส) กระจายอยู่โดยนิวเคลียสจะติดสีแบบ eosinophilic จากภาพประกอบ 23 พบว่านิวเคลียสมีสีดำซึ่งไม่ใช่การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี

จะเห็นว่าการสำรวจครั้งนี้สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจการติดเชื้อไวรัสในสัตว์เหล่านี้ได้ดีและได้ผลสอดคล้องกับ RT-PCR ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าปูเหล่านี้ไม่น่าจะมีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเนื่องจากปูมีวิวัฒนาการห่างจากกุ้งในวงศ์ Panaeidae มากกว่ากุ้งในวงศ์อื่นๆเช่น กุ้งก้ามกราม ไม่พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเช่นกัน (สุดา ชูถิ่น. 2547 : บทคัดย่อ)

แต่จากการทดลองของ รัชนี กลิ่นพุฒซ้อน (2545 : บทคัดย่อ) ได้ศึกษาพบว่าปู 4 ชนิด คือ ปูม้า ปูทะเล ปูแสม และ ปูก้ามดาบ มีความสามารถที่จะเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองได้ โดยการทดลองฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูและนำไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งกุลาดำ แล้วตรวจสอบด้วยวิธี one-step nested RT-PCR ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวนั้นอาจเกิดจากกรณีที่วิธี RT-PCR นั้นมีความไวสูงมาก สามารถตรวจพบไวรัสในปริมาณที่น้อยมากๆ ได้ ผลบวกที่ได้อาจเกิดจากการปนเปื้อนของไวรัสที่อยู่ในน้ำ ซึ่งค้างอยู่ภายในกระดองปูและเหงือก โดยที่ปูเหล่านั้นยังไม่ได้มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ไม่พบว่าการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองใน ปูม้า ปูทะเล ปูก้ามดาบ และปูแสม แต่อย่างใด

สรุปได้ว่าปูที่ศึกษาทุกชนิดมีความต้านทานต่อไวรัสหัวเหลืองสูงและสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายได้ดี

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กัลยาณี ยงจินดารัตน์. (2531). *การกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

กรีสัลย์ พรรคทองสุข. (2545). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจหาไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

จันทนา นิธิเมธาโชค. (2539). *การเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ Penaeus monodon โดย Clostridium butyricum.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

จันทสิงห์ ดวงบ้านเช่า; และ ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. (2545). การใช้แบคทีเรียเพื่อจัดการคุณภาพน้ำและปริมาณสารอินทรีย์ในตะกอนดินในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิด. ใน *การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 4.* หน้า 221-225. ม.ป.พ.

จิราพร เกษรจันทร์; และ สิทธิ บุณยรัตผลิน. (2538). การผลิต monoclonal antibodies ในการตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. *เอกสารวิชาการ.* (15) : 1-14.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2543). *กุ้งไทย 2000.* กรุงเทพฯ: เจริญรัตน์การพิมพ์.

ถวิล ประมวล. (2533). *อนุกรมวิธานของปูนาและลักษณะของโกโนพอต โอมมาติเดีย.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

บริษัท สยาม ซิตโต้ จำกัด. (2545). *โรคกุ้งกุลาดำ.* กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์พานิชพระนคร.

ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูล; และคนอื่นๆ. (2545). ความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae. ใน *การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 4.* หน้า 138-149. ม.ป.พ.

พรเทพ ปลอดภัย. (2538). *การศึกษาช่วงระยะเวลาการมีชีวิตของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในน้ำทะเลและการเปลี่ยนทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (วิทยาศาสตร์การประมง). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

ยัยนับ แวและ. (2545). *การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี.* ปริญญานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต.

(ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

รัชนี กลิ่นพุฒซ้อน. (2543). *การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่ไวโดยวิธี Nested RT-PCR.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีวเคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล; สุรพล วิเศษสรรค์ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. (2547). ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดในการกำจัด *Zoothamnium* sp. และความเป็นพิษในลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). ใน *การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 5.* หน้า 21-30. ม.ป.พ.

ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ. (2532). *อนุกรมวิธานของปูปอร์ทูนิดในประเทศไทย.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

ศิวาพร ลงยันต์; และคนอื่นๆ. (2544,กรกฎาคม). ความทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งตะกาดโอคักและกุ้งตะกาดหัวมัน. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.* 17(2) ; 120-129.

สุดา ชูถิ่น. (2547). *การตรวจสอบการเป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล Macrobrachium.* ปริญญานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

สุพจน์ แสงมณี. (2530). *เดคาพอดครัสเตเซียนและสโตมาโตพอดครัสเตเซียนในป่าชายเลนจังหวัดชุมพรและจังหวัดระนอง.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

สุรินทร์ มัจฉาชีพ. (2516). *ปูแสมในอ่าวไทย.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

สุรินทร์ มัจฉาชีพ. (2544, กันยายน-ธันวาคม). ปูแสม Grapsid crabs. *จุลสาร สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.* 13(3) : 6-8.

เสรี บรรพวิจิตร. (2522). *อนุกรมวิธานของปูก้ามดาบในประเทศไทย.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์; และ สิทธิ บุณยรัตผลิน. (2540). ประสิทธิภาพของคลอรีนต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. *เอกสารวิชาการ.* (13) : 1-8.

Chantanachookin, C.; et al. (1993, November). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow head disease.

Diseases of Aquatic Organisms. 17 : 145-157.

Chen, L., L.; et al. (2000, March). Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata. Diseases of Aquatic Organisms.* 40 : 157-161.

Jitrapakdee, S.; et al. (2003, April). Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. *Journal of General Virology.* 84 : 863-873.

Kanchanaphum, P.; et al. (1998, September). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms.* 34 : 1-7.

Khanobdee, K.; et al. (2002, March). Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Diseases of Aquatic Organisms.* 48 : 79-90.

Kiatpathomchai, W.; et al (2004,February). RT-PCR detection of yellow head virus (YHV) infection in *Penaeus monodon* using dried haemolymph spots. *Diseases of Aquatic Organisms.* 48 : 79-90.

Lu, L.; et al (1995, September). Distribution of yellow head virus in selected tissued and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei. Diseases of Aquatic Organisms.* 23 : 67-70.

Nadala, Cesar B., E., Jr.; Tapay, M., L.; & Loh, C., P. (1997, November). Yellow-head virus:a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms.* 31 : 141-146.

Sithigorngul, P.; et al. (2000, August). Develoment of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms.* 119 : 1-5.

Sithigorngul, P.; et al. (2002, April). Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon. Diseases of Aquatic Organisms.* 49 : 71-76.

Sittidilokratna, N.; et al. (2002, July). Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow-head virus is an invertebrate nidovirus. *Diseases of Aquatic Organisms.* 50 : 87-93.

Supamattaya, K.; et al. (1998, March). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelegicus*, mud crab Scylla serrata and Krill Acetes sp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 32 : 79-85.

Tang, K., F.,J.; & Lightner, D. V. (1999, February). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridizayion. *Diseases of Aquatic Organisms*. 35 : 165-173.

Wongteerasupaya, C.; et al. (1995, May). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 22 : 45-50.

Wongteerasupaya, C.; et al. (1997, December). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 181-186.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

Gelatin	1	กรัม
Clone alum (chromium potassium sulphate)	0.05	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตร เป็น	100	มิลลิลิตร

Davidson's fixative

95 % Ethyl alcohol	30	มิลลิลิตร
100 % Formalin	20	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10	มิลลิลิตร
Distilled water	30	มิลลิลิตร

Phosphate buffered saline (PBS) 0.15 M, pH 7.2

NaCl	8	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
$Na_2HPO_4.7H_2O$	1.15	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตร เป็น	1000	มิลลิลิตร

สารละลาย Calf Serum 10% (P_1^+)

Calf serum	10	มิลลิลิตร
PBS	100	มิลลิลิตร

สี Enrilich's acid hematoxylin

Hematoxylin	8	กรัม
95% Ethyl alcohol	400	มิลลิลิตร
Aluminium Potassium Sulphate	8	กรัม

Distilled water	400	มิลลิลิตร
Glycerine	400	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400	มิลลิลิตร

0.2 % Eosin Y ใน 95% Ethyl alcohol

Eosin Y	0.2	กรัม
95% Ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

เชื้อไวรัสหัวเหลือง เจือจาง 1:500 ด้วย 2XPBS

เชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการกรองด้วย

กระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขนาดรู 0.45 ไมโครมิลลิเมตร	1	ไมโครลิตร
2X PBS	499	ไมโครลิตร

Lysis buffer (Flegel pers. Comm., 1998)

Tris - HCl pH 9.0	50	มิลลิโมลาร์
EDTA	100	มิลลิโมลาร์
NaCl	50	มิลลิโมลาร์
2% SDS		

Working solution

ต้องทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ สัดส่วนนี้พอดีสำหรับตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง

Poly(A)carrier RNA	50	ไมโครลิตร
Binding buffer	2.5	มิลลิลิตร

Poly(A)carrier RNA

Poly(A)carrier RNA	2	มิลลิกรัม
Elution buffer	0.5	มิลลิลิตร

ควรเก็บที่ อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

Binding buffer

เตรียมในปริมาตร 25 มิลลิลิตร

Guanidine – HCl	6	โมลาร์
Urea	10	มิลลิโมลาร์
Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์

20 % Triton X – 100(v/v), pH4.4

Proteinase K

Lyophilized proteinase K	90	มิลลิกรัม
Elution buffer	5	มิลลิลิตร

ควรเก็บที่ อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

Inhibitor removal buffer

เตรียมในปริมาตร 33 มิลลิลิตร

Guanidine – HCl	5	โมลาร์
Tris – HCl, pH 6.6	20	มิลลิโมลาร์

เมื่อจะใช้เติมด้วย

Ethanol บริสุทธิ์	20	มิลลิลิตร

Wash buffer

เตรียมในปริมาตร 20 มิลลิลิตร

NaCl	20	มิลลิโมลาร์
Tris – HCl , pH 7.5	2	มิลลิโมลาร์

เมื่อจะใช้เติมด้วย

Ethanol บริสุทธิ์	40	มิลลิลิตร

Elution buffer

Nuclease free double distilled water	30	มิลลิลิตร

X 10 TBE buffer, pH 8.3

Tris-base	100	กรัม

Boric acid	55	กรัม
EDTA	9.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย กรด HCl		

Ethidium bromide

Ethidium bromide	20	ไมโครลิตร
Distilled water	400	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ชนิดของปูในวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae

ชนิดของปูในวงศ์ Grapsidae

1. *Metopograpsus latifrons* (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2516 : 18-20)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Grapsidae
Genus	Metopograpsus
Species	latifrons

ชื่อสามัญ -

ลักษณะเด่น

ส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านใน มีความกว้างเป็น 2/3 ของระยะทางระหว่างมุมขอบตาด้านนอกและมีพื้นผิวเรียบ ขอบด้านข้างของกระดองสอบเข้ามากทางด้านหลัง ส่วนท้องปล้องที่ 6 ของตัวผู้แผ่ขยายออกมากทางด้านข้าง

ลักษณะทั่วไป

กระดอง ลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู มีความกว้างมากกว่าความยาวและมีพื้นผิวเรียบ ส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านใน มีความกว้างเป็น 2/3 ของระยะทางระหว่างมุมขอบตาด้านนอกทั้งสองข้าง และแบ่งออกเป็น 4 ลอนอย่างชัดเจน 2 ลอน ที่อยู่ด้านนอกจะมีขนาดใหญ่กว่า 2 ลอนที่อยู่ด้านใน และมีพื้นผิวเรียบทั้ง 4 ลอน ร่องของ cervical ลึก บริเวณ cardiac และบริเวณ intestinal ชัดเจน ส่วนบนบริเวณ branchial จะมีสันเฉียง 8-9 แถว ขอบด้านข้างของกระดองเรียบและสอบเข้ามากทางด้านหลัง ขอบทางด้านหน้าตรงและมีลักษณะหยักเป็นแบบฟันเลื่อย ส่วนบนของขอบตาด้านล่างมีแง่ยื่นแหลมคมแต่ไม่เป็นสัน

ก้าม มีลักษณะแข็งแรงและมีขนาดไม่เท่ากัน ขอบด้านในของ ischium และส่วนปลายของ merus มีหนามแหลมเป็นฟันเลื่อยขนาดต่างกันจำนวนหลายอัน พื้นผิวด้านบนของ carpus เป็นปุ่มเล็กๆ กระจัดกระจายทั่วไป พื้นผิวด้านบนของ propodus เป็นปุ่มเล็กๆ กระจายกันห่างๆ พื้นดินด้านนอกมีสันยาว 1 แถว ซึ่งจะยาวตลอดไปจนถึงส่วนปลายทางด้านล่าง ใต้สันนี้ลงไปมีสันเฉียงเป็นริ้วๆ

ยาวเลยไปจนถึงขอบด้านล่าง พื้นผิวด้านบนส่วนแรก dactylus เป็นปุ่มเล็กๆ ค่อนข้างแหลมคมกระจัดกระจาย

ขาเดิน ทั้ง 4 คู่ แข็งแรงและค่อนข้างเรียวยาว ซึ่งขอบด้านหน้าของ merus ใกล้กับส่วนปลายมีแง่ยื่น 1 อัน ส่วนขอบด้านหลังตรงปลายหนามแหลมเป็นฟันเลื่อยขนาดต่างกัน 3-4 อัน merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง ส่วน propodus จะมีความยาวเป็น 3 เท่าของความกว้างและเป็น 2 เท่าของ dactylus propodus ของคู่แรกมีขนเป็นแถบยาวเรียงเป็นแถวทางพื้นผิวด้านบนใกล้กับขอบด้านหน้าแต่คู่สุดท้ายจะมีบนขอบด้านหน้า

ส่วนท้อง ปล้องที่ 6 ของตัวผู้แผ่ขยายออกทางด้านข้าง ส่วนยื่นตรงปลายของอวัยวะเพศผู้เป็นสารพวกไคติน ลักษณะเป็นรูปตัว T เฉียงออกไปทางด้านนอก

สี กระดองมีสีน้ำตาลอ่อนสลับลวดลายสีเปลือกมังคุด หรือมีพื้นสีม่วงคล้ำทั้งหมด ส่วนก้ามหนีบ (chela) มีสีม่วง

ถิ่นอาศัย

เกาะอยู่ตามต้นจาก ต้นโกงกาง ตามเสาสะพานหรือประตูน้ำนากุ้ง บริเวณริมฝั่งคลอง หรือตามเกาะ

การแพร่กระจาย

บริเวณอินโด-แปซิฟิก ตั้งแต่อินเดียไปจนถึงบริเวณหมู่เกาะทางฝั่งตะวันออกของออสเตรเลีย

2. *Sesarma mederi* (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 362-365)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Grapsidae
Genus	Sesarma
Species	mederi

ชื่อสามัญ ปูแสม ปูแสมก้ามแดง

ลักษณะเด่น

ผิวบน propodus ของก้ามมีสันยาวตามแบบ pectinate 1 แถว พบทั้งในตัวผู้และตัวเมีย ส่วนพื้นผิวด้านในมีสันตามขวางประกอบด้วยเม็ดเล็กๆ เรียงกันเป็นแถว นูนขึ้นมาเด่นชัด ขอบด้านบน dactylus ของก้ามหนีบมีปุ่มลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดเท่าๆ กันเรียงเป็นแถวตามความยาวจำนวน 40 ถึง 60 อัน

ลักษณะทั่วไป

กระดอง มีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างมากกว่าความยาว ผิวด้านบนมีกลุ่มขนกระจายอยู่ทั่วไป ส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านในมีลักษณะซันและแบ่งออกเป็น 4 ลอนอย่างชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่นอก บนลอนทั้ง 4 นี้มีกลุ่มขนค่อนข้างยาวกระจัดกระจายอยู่ทั่วไป บริเวณ mesogastric ชัดเจนกว่าบริเวณอื่น บริเวณ branchial มีสันเฉียง ขนานกัน 5 ถึง 6 แถว บริเวณ intestinal มีสันเฉียง 2 แถวทำมุมฉากกับสันเฉียงบริเวณ branchial ทั้งสองข้างขอบด้านข้างกระดองหลังมุมขอบตาด้านนอกมีรอยหยักเป็นแง่ยื่นข้างละ 1 อัน ขอบด้านหน้าโค้งเป็นคลื่นและเว้าเข้าตรงกลาง เบ้าตาเฉียง หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 เรียวเล็กอยู่ในช่องเบ้าตา

ก้าม แข็งแรง ขอบด้านใน merus หยักเป็นฟันเลื่อยขนาดต่างกัน ขอบด้านบนตรงปลายมีแง่ยื่น 1 อัน ผิวบน carpus เป็นเม็ดเล็กๆ กระจายทั่วไป ขอบด้านในมีแง่ยื่นรูปสามเหลี่ยม 1 อัน ใต้แง่ยื่นนี้มีปุ่มเล็กๆ เรียงกันเป็นแถวตามแนวตั้งฉาก 3 ถึง 4 อัน ผิวด้านบน propodus มีสันตามยาวแบบ pectinate 1 แถว พบทั้งในตัวผู้และตัวเมีย ผิวด้านใน propodus มีสันตามขวางซึ่งเกิดจากเม็ดเล็กๆ 10 ถึง 11 อันเรียงเป็นแถว 1 แถวนูนขึ้นมาเด่นชัดมาก ส่วนผิวด้านนอกเป็นเม็ดเล็กๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป บริเวณตรงกลางมีลักษณะเป็นสันตามยาวขนาดสั้น 1 แถว ขอบด้านบนของ dactylus มีปุ่มเล็กๆ รูปสี่เหลี่ยมขนาดเท่าๆ กัน จำนวน 40 ถึง 60 อัน เรียงตัวเป็นแถวตลอดความยาวของ dactylus ซึ่งพบทั้งในตัวผู้และตัวเมีย

ขาเดิน ทั้ง 4 คู่แข็งแรง ขอบด้านหน้าของ merus ใกล้กับส่วนปลายมีแง่ยื่นออกมา 1 อัน ขอบด้านหลังเรียบ merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวประมาณ 2 เท่าของความกว้าง propodus มีความยาวประมาณ 1.5 เท่าของ dactylus ขอบด้านหน้าและด้านหลัง propodus และ dactylus ของขาเดินทุกคู่มีกลุ่มขนปกคลุมหนาแน่น

ส่วนท้อง ของตัวผู้ค่อนข้างกว้าง ปล้องที่ 6 มีความยาวประมาณ ครึ่งหนึ่งของความกว้าง ขอบด้านข้างส่วนปลายมนโค้งสอบเข้าข้างใน

อวัยวะเพศผู้เป็นแท่งยาว มีขนประปรายตามขอบด้านข้าง ส่วนปลายแผ่ขยายออกเล็กน้อย มีลักษณะมนโค้ง ผิวด้านนอกตรงกลางมีร่องลึก มีส่วนยื่นตรงปลายสุด เป็นสารพวกไคติน ลักษณะเป็นแผ่นแบนปลายตัด มีกลุ่มขนปกคลุมหนาแน่น

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลอมม่วง มีกลุ่มขนสีน้ำตาลปกคลุมทั่วไป ก้ามหนีบมีสีม่วงอมแดง ส่วนปลายสุดของ dactylus มีสีขาว และปลายสุด fix finger มีสีน้ำตาล ก้านตาสีม่วง ตา สีดำ

ถิ่นอาศัย

ขุดรูอยู่บริเวณริมฝั่งแม่น้ำที่เป็นน้ำกร่อยหรือชายฝั่งทะเลที่มีสภาพเป็นป่าชายเลนอยู่ในเขตเหนือระดับน้ำขึ้นสูงสุดของช่วงน้ำตาย ดินเป็นโคลนค่อนข้างแข็ง รูปูแสมมีขนาดค่อนข้างใหญ่ บาง

ครั้งพบเข้าไปอาศัยในรูของปูทะเล บริเวณปากรูปูแสมจะพบรอยเดินมากมายของปู เนื่องจากปูแสมออกหากินตลอดเวลาในช่วงน้ำลง เมื่อมีภัยจะวิ่งลงรู สักครู่จะโผล่ออกมาอีก ในการจับปูแสมนั้นพบว่าชาวบ้านนิยมจับในตอนกลางคืนเดือนมืด โดยใช้ตะเกียงแก๊สสำหรับส่องปูแสมที่ออกหากิน ใช้มือเปล่าหรือใส่ถุงมือตะครุบแล้วบีบให้แน่นใส่ข้องเก็บไว้ หรืออาจใช้ไม้ไผ่ปลายแหลมคอยดักแทงรูกันไม่ให้ปูหนีลงรูได้ นักจับปูบางคนใช้เท้ากระทืบหนักๆ หลายๆ ครั้งเหนือรู ปูแสมก็จะคลานขึ้นมาให้จับ บางคนจะออกจับปูแสมในช่วงน้ำเกิด เมื่อน้ำท่วมรู ปูแสมจะหนีขึ้นไปเกาะตามกิ่งไม้ ต้นไม้ในป่าชายเลน ก็สามารถเลือกจับได้ทีละมากๆ ปูแสมบางตัวมีปรสิตพวก *Succulina* sp. เกาะอยู่บริเวณส่วนท้อง ทำให้ส่วนท้องของปูตัวผู้แผ่ขยายกว้างออกคล้ายตัวเมีย

การแพร่กระจาย

ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา ปัตตานี นราธิวาส ฝั่งทะเลอันดามัน ฟิลิปปินส์ ปัตตาเวีย ชวา เซเลเบส บอร์เนียว หมู่เกาะเมอไก มากาสซาร์ สิงคโปร์ ปีนัง ปอนเตียนัค ซาราวัค มาลัคคา

3. *Sesarma polita* (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 384-386)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Grapsidae
Genus	Sesarma
Species	polita

ชื่อสามัญ ปูซองจาก

ลักษณะเด่น

กระดอง เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า พื้นผิวเรียบ มีความยาวมากกว่าความกว้างอย่างเด่นชัด front แบ่งออกเป็น 4 ลอน ผิวมีปุ่มแหลมคมเรียงตัวเป็นแถวตามขวางหลายแถว ผิวของก้ามหนีบเป็นปุ่มเล็กๆ แหลมคมกระจัดกระจายอยู่ทั่วไป merus ของขาเดินทั้ง 4 คู่เรียว ส่วนท้องปล้องสุดท้ายของตัวผู้เรียวยาว

ลักษณะทั่วไป

กระดอง แบนมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า พื้นผิวเรียบ มีความยาวมากกว่าความกว้างอย่างเด่นชัด front มีความกว้างมากกว่าครึ่งหนึ่งของระยะระหว่างมุมขอบตาด้านนอกทั้งสองข้างและแบ่งเป็น 4 ลอนชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่นอก ผิวบนลอนทั้ง 4 นี้มีปุ่มเล็กๆ แหลมคมเรียงกัน

เป็นแถวตามขวางหลายแถว บริเวณ mesogastric , cardiac และ intestinal ชัดเจน ส่วนบริเวณ branchial มีสันเฉียง 1 แถวใกล้กับขอบด้านหลัง ขอบหลังมุมขอบตาด้านนอกโค้งเล็กน้อย และมีแง่แหลมยื่นออกมา 3 ถึง 4 อัน ขอบด้านหน้ากระดองมีรอยหยักเป็นหนามแหลมหลายอัน และเว้าลึกเป็นรูปตัว V ตรงกลาง เบ้าตาเฉียง หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 อยู่ในช่องเบ้าตา

ก้าม แข็งแรง ขอบด้านในของ ischium และ merus มีแง่ยื่นเป็นฟันเลื่อยหลายอัน ผิวด้านบน carpus เป็นสันแบบ pectinate สั้นๆ ตามขวางหลายอัน ขอบด้านในโค้งและมีปุ่มแหลมคมเรียงกันห่างๆ เป็นแถว ผิวด้านบน palm เป็นปุ่มแหลมเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป มีสันแบบ pectinate 2 ถึง 3 อัน และตรงปลายเป็นแง่ยื่นแหลมคม 1 อัน ผิวด้านในเป็นปุ่มแหลมเล็กๆ เรียงเป็นกลุ่มตามขวางแต่ไม่เป็นสัน ผิวด้านนอกเป็นปุ่มเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป ส่วนที่ใกล้กับๆ dactylus ทั้งผิวด้านนอกและด้านในมีปุ่มขนาดใหญ่ด้านละ 2 ปุ่ม ส่วนขอบด้านล่างเป็นปุ่มแหลมเรียงกันเป็นแถวตามความยาว ขอบบน dactylus มีปุ่มเล็กๆ แหลมคมจำนวน 12 ถึง 13 อัน เรียงกันเป็นแถวตามความยาว ผิวด้านนอกเรียบ มีช่องว่างระหว่างก้ามหนีบมากและมีฟันตรงส่วนโคน dactylus 2 อัน

ขาเดิน ทั้ง 4 คู่ค่อนข้างเรียว ขอบด้านหน้า merus เป็นปุ่มเล็กมาก ใกล้ส่วนปลายมีแง่แหลมคม 1 อัน ขอบด้านหลังเรียบ ยกเว้นขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ใกล้ส่วนปลายมีหนามแหลมเล็กๆ เรียงเป็นแถวแบบฟันเลื่อย merus ของขาเดินคู่ที่ 3 ยาวเป็น 3.5 เท่าของความกว้าง carpus มีส่วนปลายกว้างกว่าส่วนโคน ผิวด้านนอกมีสันตามยาว 2 อัน อาจมีขนบนสันด้วย ผิวด้านในมีสันตามยาว 1 สัน propodus ของขาเดินคู่แรกกว้างกว่าคู่อื่นๆ ขอบด้านหน้าและด้านหลัง propodus และ dactylus ของขาเดินทุกคู่มีกลุ่มขนหนาแน่น

ส่วนท้อง ปล้องที่ 6 กว้างเป็น 2 เท่าของความยาว ปล้องสุดท้ายมีความยาวมากกว่าความกว้าง ขอบด้านข้างขนานกัน ขอบส่วนปลายของปล้องที่ 5 เว้าเข้าเล็กน้อยตรงกลาง

อวัยวะเพศผู้เป็นแท่งสั้น ส่วนปลายโค้งมน ส่วนยื่นปลายสุดค่อนข้างสั้นเป็นสารพวกไคติน มีกลุ่มขนปกคลุมหนาแน่น

สี กระดอง ขาเดิน มีสีน้ำตาลอมม่วง ก้ามหนีบมีสีแดงเข้ม ตามขอบมีสีค่อนข้างดำ

ถิ่นอาศัย

พบอาศัยอยู่ในป่าจาก โดยแทรกตัวอยู่ระหว่างกาบใบจาก อยู่ในเขตระดับน้ำขึ้นสูงสุดของช่วงน้ำตายจนถึงระดับน้ำลงเฉลี่ย

การแพร่กระจาย

ชุมพร สุราษฎร์ธานี ปัตตานี นราธิวาส เขตอินโด-แปซิฟิก หมู่เกาะเมอไก หมู่เกาะนิโคบาร์ สิงคโปร์ เกาะซัลลิแวน ชายฝั่งตะวันตกของหมู่เกาะอินเดีย

4. *Sesarma bocourti* (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2516 : 61-63)

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Grapsidae
	Genus	Sesarma
	Species	bocourti

ชื่อสามัญ -

ลักษณะเด่น

บริเวณขอบด้านใน carpus ของก้ามมีแง่ยื่น 1 อัน พื้นผิวด้านนอก propodus ของก้ามแบนมาก ขาเดินทุกคู่ค่อนข้างแบนและกว้าง

ลักษณะทั่วไป

กระดอง ลักษณะเป็นรูปคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างมากกว่าความยาว บริเวณส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านในมีกลุ่มขนสั้นๆ เรียงกันกระจัดกระจายเป็นแถวตามขวางและมีความกว้างมากกว่าครึ่งหนึ่งของระยะทางระหว่างมุมขอบตาด้านนอกทั้งสองข้าง ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ลอนอย่างชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่ด้านนอก บริเวณ mesogastric จะชัดเจนกว่าบริเวณอื่น บนบริเวณ hepatic มีลักษณะเป็นปุ่มขนาดใหญ่ 1 ปุ่ม และปุ่มขนาดเล็ก 3 ถึง 4 ปุ่ม บริเวณ branchial มีสันเฉียง 5 ถึง 6 แถว ขอบตาด้านข้างของกระดองเป็นแนวตรงและขยายออกเล็กน้อยทางด้านหลัง บริเวณหลังมุมขอบตาด้านนอกมีรอยหยักเป็นแง่ยื่น 1 อัน ขอบตาด้านหน้าของกระดองเว้าเข้าเล็กน้อยบริเวณตรงกลาง

ก้าม มีลักษณะแข็งแรง ขอบตาด้านในของ ischium และ merus มีแง่ยื่นเป็นฟันเลื่อยจำนวนหลายอัน ขอบตาด้านบนของ merus ใกล้กับส่วนปลายเป็นแง่ยื่นไม่แหลมคม พื้นผิวด้านบนของ carpus เป็นปุ่มเล็กๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป ขอบตาด้านในมีแง่ยื่น 1 อัน พื้นผิวด้านบนและด้านนอกของ propodus เป็นปุ่มเล็กๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งมีลักษณะแหลมคมและเรียงตัวเป็นแถวทางขอบด้านล่าง พื้นผิวด้านนอกของ dactylus มีปุ่มเล็กๆ แหลมคมจำนวนมากเรียงกันเป็นแถวตามความยาว

ขาเดิน ทั้ง 4 คู่ค่อนข้างแบนและกว้าง ขอบด้านหน้าของ merus ใกล้กับส่วนปลายมีแง่ยื่นออกมา 1 อัน ส่วนขอบด้านหลังเรียบ merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง บริเวณขอบด้านหน้า propodus และ dactylus ของขาเดินทุกคู่มีกลุ่มขนหนาแน่น ส่วนบริเวณขอบด้านหลังมีขนแข็งคล้ายหนามเรียงกันห่างๆ เป็นแถวตามความยาว

ส่วนท้อง ปล้องที่ 6 ของตัวผู้จะยาวกว่าปล้องที่ 5 ส่วนยื่นตรงปลายของอวัยวะเพศผู้เป็นสารพวกไคติน ลักษณะเป็นแท่งใหญ่และสั้นมีขนปกคลุมอยู่อย่างหนาแน่น

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลเข้ม ก้ามหนีบเป็นสีแดงเลือดหมู

ถิ่นอาศัย

ขุดรูอยู่ตามป่าจาก บริเวณปากแม่น้ำ

การแพร่กระจาย

สมุทรปราการ นครศรีธรรมราช บริเวณอินโด-แปซิฟิก บอร์เนียว สุมาตรา ซาราวัก และพอนเทียนัค

5. *Sesarma moeschii* (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 378-380)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Grapsidae
Genus	Sesarma
Species	moeschii

ชื่อสามัญ ปูแสม

ลักษณะเด่น

บริเวณผิวด้านบนกระดองเรียบ ขอบด้านข้างมีรอยหยักเป็นแง่ยื่นข้างละ 1 อันอยู่หลังมุมขอบตาด้านนอก บางทีมีร่องรอยของแง่ยื่นขนาดเล็กถัดมาทางด้านหลังอีก 1 อัน ผิวด้านในของก้ามมีสันตามขวางซึ่งเกิดจากเม็ดเล็กๆ 8 ถึง 10 เม็ดเรียงกันเป็นแถว 1 แถวอย่างชัดเจน merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวมากกว่า 2 เท่าของความกว้างเล็กน้อย

ลักษณะทั่วไป

กระดอง มีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส โค้งนูนเล็กน้อยตามความยาว พื้นผิวเรียบ มีความกว้างมากกว่าความยาว front กว้างมากกว่าครึ่งหนึ่งของระยะระหว่างมุมขอบตาด้านนอกทั้งสองข้าง และแบ่งออกเป็น 4 ลอนอย่างชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่นอก ร่องตรงกลางของ cervical ลึกมาก บริเวณ mesogastric และ hepatic ชัดเจน บริเวณ branchial มีสันเฉียง 5 ถึง 6 แถว ขอบด้านข้างของกระดองเป็นแนวตรงเกือบขนานกันขยายออกเล็กน้อยทางด้านหลัง หลังมุมขอบตาด้านนอกมีรอยหยักเป็นแง่ยื่น 1 อัน บางทีมีร่องรอยของแง่ยื่นขนาดเล็กถัดมาทางด้านหลังอีก 1 อัน ขอบด้านหน้ากระดองโค้งเป็นคลื่นและเว้าเข้าเล็กน้อยตรงกลาง เบ้าตาเฉียง หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 อยู่ในช่องเบ้าตา

ก้าม มีลักษณะแข็งแรงมากกว่าขาเดินมาก ขอบด้านในส่วนโคนของ merus มีแง่ยื่นออกมาเป็นฟันเลื่อยขนาดเล็ก ส่วนปลายค่อนข้างเรียบและไม่แผ่ขยายออก ผิวด้านบนของ carpus มีเม็ดเล็กๆ เรียงกันเป็นแถวสั้นๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป มีขนสั้นๆ ขึ้นประปราย ขอบด้านในโค้งและไม่มีแง่ยื่น ผิวด้านบนของ palm เป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะตรงขอบบน เม็ดเล็กๆ จะเรียงตัวเป็นแถวตามความยาว 1 แถว ผิวด้านใน palm มีสันตามขวางซึ่งเกิดจากเม็ดเล็กๆ 8 ถึง 10 เม็ดเรียงต่อกันเป็นแถว 1 แถวเห็นชัดเจน ผิวด้านนอกเป็นเม็ดเล็กๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป ตรงกลางจะมีสันตามยาวขนาดสั้น 1 แถว ผิวด้านบนส่วนโคนของ dactylus เป็นเม็ดเล็กๆ เรียงกันกระจัดกระจาย ส่วนปลายเรียบ ปลายสุดก้ามหนีบมีลักษณะคล้ายปากคีบมีสีน้ำตาล

ขาเดิน ทั้ง 4 คู่แข็งแรง ขอบด้านหน้า merus ใกล้ส่วนปลายมีแง่ยื่น 1 อัน ขอบด้านหลังเรียบ merus ของขาเดินคู่ที่ 3 ยาวมากกว่า 2 เท่า ของความยาวเล็กน้อย ขอบด้านหน้าและด้านหลังของ propodus และ dactylus มีกลุ่มขนสีน้ำตาลปกคลุมหนาแน่น

ส่วนท้อง ปล้องที่ 6 ของตัวผู้ยาวกว่าปล้องที่ 5 มีความกว้างน้อยกว่า 2 เท่าของความยาว ขอบด้านข้างส่วนปลายมนโค้งสอบเข้าเล็กน้อย ปล้องที่ 7 มีความกว้างใกล้เคียงกับความยาว

อวัยวะเพศผู้ มีลักษณะเป็นแท่งโค้งค่อนข้างสั้น ส่วนปลายมนทู่และมีส่วนยื่นซึ่งเป็นสารพวกไคตินออกมาเล็กน้อย มีกลุ่มขนปกคลุมหนาแน่น

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลอมดำมัน ก้ามหนีบมีสีแดงอมส้ม ก้านตาและตามีสีเทา อมดำ

ถิ่นอาศัย

หลบซ่อนอยู่ใต้ใบไม้ ขอนไม้ หรือขุดรูอยู่ในดินค่อนข้างแข็งแรง บริเวณป่าชายเลนซึ่งเชื่อมต่อกับป่าบก ป่าจาก อยู่ในเขตเหนือระดับน้ำขึ้นสูงสุดของช่วงน้ำตาย

การแพร่กระจาย

ตราด จันทบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลาปัตตานี เขตอินโด- แปซิฟิค หมู่เกาะเมอไก สุราบายา ฮ่องกง ไต้หวัน เซเลเบส

6. *Varuna literata* (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 355-356)

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Grapsidae
	Genus	Varuna
	Species	literata

ชื่อสามัญ ปูจาก ปูแป้น ปูลอยแพ

ลักษณะเด่น

ร่องของ carvical ลึก โดยเฉพาะตรงกลางกระดองมีลักษณะเป็นรูปตัว H บนบริเวณ branchial มีสันเฉียง 1 แถวเด่นชัดมาก บริเวณขอบตาด้านบนมีรอยแยก 1 แห่ง ขอบตาใน carpus ของก้ามมีแง่ยื่นไปข้างหน้า 1 อัน propodus และ dactylus ของขาเดินแบนและแผ่ขยายออก

ลักษณะทั่วไป

กระดอง มีลักษณะเป็นรูปโค้งกลมค่อนข้างแบน มีความกว้างมากกว่าความยาวและมีพื้นผิวเรียบ ส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านใน มีลักษณะลาดและกว้าง แต่ไม่แบ่งออกเป็นลอนบริเวณต่างๆ บนกระดองไม่ชัดเจน ร่องของ cervical ลึก โดยเฉพาะตรงกลางมีลักษณะเป็นรูปตัว H บนบริเวณ branchial มีสันเฉียง 1 แถวเด่นชัดมาก ขอบด้านข้างของกระดองโค้งและมีรอยหยักเป็นแง่ยื่น 2 อัน ขอบด้านหน้าเกือบเป็นเส้นตรง เบ้าตามีขนาดเล็ก ตรงขอบด้านบนมีรอยแยก 1 แห่ง

ก้าม ของตัวอ่อนมีขนาดเล็กกว่าก้ามตัวแก่มาก ขอบด้านใน merus มีลักษณะหยักเป็นฟันเลื่อยขนาดเล็กและมีขนเป็นแถบยาวเรียงกันเป็นแถว ขอบด้านใน carpus มีแง่ยื่นลักษณะกลมตรงไปข้างหน้า 1 อัน ถัดจากแง่นี้ลงไปด้านล่างจะมีแง่ยื่นขนาดเล็กอีก 1 อัน พื้นผิวด้านบนของ carpus เรียบ พื้นผิวทุกด้านของ propodus เรียบ ส่วนบริเวณด้านนอกมีสันตามยาว ประกอบด้วยเม็ดเล็ก ๆ เรียงตัวกันเป็นแถว 1 แถว ยาวตลอดไปจนถึงส่วนปลายทางด้านล่าง dactylus ยาวเรียวมีปลายแหลม

ขาเดิน คู่แรกมีขนาดสั้นที่สุด คู่ที่ 3 ยาวที่สุดและยาวใกล้เคียงกับคู่ที่ 2 ขอบด้านหน้า merus ของขาเดินทุกคู่ใกล้กับส่วนปลายมีแง่แหลมคมยื่นออกมา 1 อัน ส่วนขอบด้านหลังเรียบ และมีขนเป็นแถบยาวเรียงกันเป็นแถว merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวเป็น 3 เท่าของความกว้าง propodus และ dactylus ของขาเดินทุกคู่มีลักษณะแบนและแผ่ขยายออก ตรงขอบด้านหน้าและด้านหลังมีขนเป็นแถบยาวเรียงกัน ขอบด้านหน้าของ dactylus มีความยาวมากกว่า propodus

ส่วนท้อง ของตัวผู้เป็นรูปสามเหลี่ยมยาวเรียว ปล้องแรกแผ่ขยายไม่เต็มช่องว่างระหว่างขาเดินคู่สุดท้าย ปล้องที่ 6 มีความกว้างประมาณ 1.5 เท่าของความยาว ปล้องสุดท้ายมีความยาวมากกว่าความกว้าง

อวัยวะเพศผู้มีลักษณะเป็นแท่ง 2 แท่งประกบกัน ส่วนปลายมนโค้งมีกลุ่มขนปกคลุมอยู่เป็นกระจุก

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลปนเหลืองอ่อน ก้ามหนีบมีสีเหลืองอ่อน บริเวณ gastric และบริเวณ branchial มีจุดเล็กๆ สีเหลือง 3 ถึง 4 จุด

ถิ่นอาศัย

พบอาศัยอยู่ใต้รากไม้ริมคลอง ว่ายน้ำหรือเกาะกอหญ้าลอยตามน้ำในลำคลอง แม่น้ำบริเวณป่าชายเลน มักพบเฉพาะในช่วงฤดูฝนเท่านั้น

การแพร่กระจาย

ตราด จันทบุรี ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลา ปัตตานี นราธิวาส ฝั่งทะเลอันดามันจากอัฟริกาถึงนิวซีแลนด์ จากออสเตรเลียถึงญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ เกาะมินดาเนา ชายฝั่งทางเหนือของนิวกินี มหาสมุทรอินเดีย

ชนิดของปูในวงศ์ Portunidae

1. *Charybdis affinis* (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 173-176)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Portunidae
Genus	Charybdis
Species	affinis

ชื่อสามัญ ปูม้าเล็ก

ลักษณะเด่น

กระดองมีขนอ่อนปกคลุมทั่วไป ไม่มีสันตามแนวขวางบนกระดองส่วนท้ายเมื่อนับจากหนามข้างกระดองอันสุดท้ายมาทางด้านหลัง ส่วนท้ายกระดองมีลักษณะโค้งมน หนามข้างกระดองอันแรกปลายตัดทู่ขอบนอกมีรอยเว้า ขอบด้านหน้า merus ของก้ามมีหนาม 3 อัน ด้านบน palm มีหนาม 5 อันมีขนาดใหญ่ 3 อัน ขนาดเล็ก 2 อัน หนามระหว่างตาคู่กลางเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายมนเล็กน้อยยื่นล้ำหนามอื่น merus ของขาเดินคู่สุดท้ายมีความกว้างเท่ากับความยาว ส่วนปล้องท้องคู่ที่ 6 ของตัวผู้มีขอบด้านข้างขนานกันเป็นเส้นตรงเกือบตลอดความยาว

ลักษณะทั่วไป

กระดอง มีขนอ่อนปกคลุมทั่วไป มีตุ่มเล็กๆ เรียงกันเป็นสันตามแนวขวางอยู่เหนือบริเวณ protogastric จำนวน 2 แนว แนวแรกแยกออกเป็น 2 ตอน แนวที่สองติดกันระหว่างหนามข้างกระดองอันสุดท้ายมีสันตามยาวและมีช่องว่าง 2 ช่อง ทำให้สันไม่ต่อเป็นเส้นเดียวกัน front มีหนาม 3 คู่ ไม่รวมหนามตรงเบ้าตาด้านใน หนามคู่กลางมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายแหลมชี้ตรงไปข้างหน้า หนามคู่ที่ 2 มีปลายแหลมกว่าและชี้ออกในแนวเฉียง หนามคู่ที่ 3 อยู่นอกสุดมีลักษณะแคบยาว ปลายแหลมและชี้เข้าในแนวเฉียง หนามเบ้าตาด้านในเป็นรูปสามเหลี่ยมฐานกว้าง มีขนาดใหญ่กว่าหนามระหว่างตา เบ้าตาด้านบนมีรอยบาก 2 รอย หนวดคู่ที่ 1 พับตามแนวขวาง หนวดคู่ที่ 2 มีส่วนฐานแยกจากเบ้าตาและติดกับส่วนหน้ากระดอง ปลายหนวดเรียวยาว หนามข้างกระดองมี 6 อันนับรวมหนามเบ้าตาด้านนอกด้วย หนามอันแรกปลายมนขอบนอกเว้าตรงกลาง หนามอันที่ 2 ถึง 6 ปลายแหลมคมมีขนาด

และรูปร่างเหมือนกัน ส่วนปลายของหนามอันที่ 6 ชี้ออกด้านข้าง ด้านข้างกระดองสอบเข้าสู่ส่วนหลังมีลักษณะเรียบไม่มีหนาม ตามขอบมีตุ่มเล็กๆ เรียงเป็นสันเห็นไม่ชัดเชื่อมกับส่วนท้ายกระดอง ซึ่งมีสันเรียบตามขอบและโค้งมนตรงมุมกระดองส่วนท้าย

ก้าม มีขนาดใกล้เคียงกันทั้งสองข้าง ผิวด้านบนมีขนปกคลุมบางๆ ขอบบนด้านหน้า merus มีหนาม 3 อัน และมีแถบขนละเอียดตลอดแนวที่มีหนาม ผิวด้านนอก carpus มีสัน 2 อัน และมีหนามขนาดเล็ก 3 อัน ตรงมุมด้านในมีหนามขนาดใหญ่ 1 อัน บริเวณ palm มีสัน 6 อัน มีหนาม 5 อัน คือ บริเวณต้นข้อ 1 อัน ส่วนปลายที่ต่อกับ dactylus 2 อัน และบนสัน 2 สัน บริเวณตรงกลางสันละ 1 อัน ปลายก้ามหนีบเรียวแหลมโค้ง ปลาย dactylus จะอยู่ด้านในเมื่อจรดกับปลายของ fix finger ก้ามหนีบมีฟันซี่ใหญ่มองเห็นได้ชัดเจน ขบกันได้สนิท

ขาเดิน คู่ที่ 1, 2 และ 3 มีลักษณะเรียวยาว มีขนอ่อนปกคลุมทั่วไป dactylus เรียวแหลมคล้ายใบหอก มีขนละเอียดที่ขอบบนและขอบล่าง ขาเดินคู่ที่ 4 แผ่แบนแบบใบพาย ขอบบน merus มีแผงขนละเอียด ส่วนปลายขอบล่างมีหนามแหลม 1 อัน carpus, propodus และ dactylus มีแผงขนละเอียดทั้งขอบบนและขอบล่าง

ส่วนท้อง ตัวผู้มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ปล้องที่ 2 และ 3 มีสันตามขวางตลอดความกว้าง ปล้องที่ 3, 4 และ 5 เชื่อมต่อกัน ปล้องที่ 6 มีขอบด้านข้างขนานกันประมาณ 2 ใน 3 ของความยาว และมีความกว้างมากกว่าความยาว ส่วนท้องของตัวเมียแผ่กว้างมาก ขอบด้านข้างทุกปล้องมีขนละเอียดปกคลุมตลอดแนว

อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 ตรงส่วนฐานแบนปลายเรียวแคบชี้ออกด้านข้างตรงกลางปล้องอกที่ 3 บริเวณปลายตรงขอบนอกมีขนเรียงเป็นแถวหนาแน่น ขอบในมีหนามเรียงเป็นแถว 2 แถว ตั้งแต่บริเวณที่โค้งจนถึงปลาย ขอบด้านล่างปล้องอกที่ 2 มีตุ่มรองรับอวัยวะเพศ ช่องเปิดเพศผู้อยู่ตรงบริเวณปล้องแรกของขาเดิน อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 2 ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของอันแรก ส่วนปลายสอดอยู่ในร่องด้านใน

สำหรับช่องเปิดเพศเมียอยู่ที่ปล้องอกที่ 3 ติดกับขอบล่างมีลักษณะเป็นรูกลมอยู่ในแนวเฉียง ขอบด้านบนแข็งหนาและยื่นเป็นติ่ง ขอบล่างเว้าเป็นแอ่ง

สี กระดอง ก้าม และขาเดินสีเขียวอมน้ำตาลอ่อน ส่วนปลายก้ามหนีบสีน้ำตาลอ่อน

ถิ่นอาศัย

ว่ายน้ำในคลองบริเวณป่าชายเลน

การกระจาย

จันทบุรี ชลบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี สงขลา ปัตตานี มาลัคคา ตรังกานู สิงคโปร์ หมู่เกาะเมอไก โอริสสา ฮ่องกง

2. *Charybdis feriatus* (ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ. 2532 : 113-117)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Portunidae
Genus	Charybdis
Species	feriatus

ชื่อสามัญ ปูลาย ปูกางเขน ปูม้าเข้ารีต

ลักษณะเด่น

กระดองเกลี้ยงมาก ฟันระหว่างตาเป็นหนามปลายมน 3 คู่ ฟันข้างกระดองชิ้นแรกปลายตัดเว้าเข้าตรงกลาง สันบนกระดองส่วนหน้าไม่ชัดเจน ไม่มีสันบนกระดองส่วนหลัง บนกระดองมีลวดลายสีส้มปนชมพูในพื้นสีน้ำตาลทำให้เห็นเป็นรูปกางเขนอยู่ตรงกลางกระดองและรูปตัว Y คว่ำ 2 ข้างของกระดอง ก้ามและรยางค์ขามีรอยปะสีส้ม ขาว และน้ำตาลทั่วไป

ลักษณะทั่วไป

ฟันระหว่างตาเป็นหนามปลายมน 3 คู่ แต่ละอันแยกออกจากกันชัดเจน คู่กลางและคู่ที่ 2 มีขนาดและรูปร่างเท่ากัน คู่ที่ 3 มีปลายมนมากกว่าและยื่นเด่นกว่าสันเบ้าตาในเล็กน้อย สันเบ้าตาในเป็นรูปสามเหลี่ยมฐานกว้าง เบ้าตาลึกเป็นรูปตัว U มีรอยบาก 2 รอย หนวดคู่ที่ 2 เรียวยาว ฐานหนวดติดกับกระดองส่วนหน้า ปลายหนวดอยู่ห่างจากเบ้าตา

กระดอง มีผิวเกลี้ยงมาก สันบนกระดองส่วนหน้าไม่ชัดเจน มีสันที่บริเวณเหนือกระเพาะตอนกลาง และสันบริเวณเหนือเหงือกส่วนหน้าซึ่งมีช่องแบ่ง 2 ช่อง ไม่มีสันบนกระดองส่วนท้าย ฟันบนกระดอง 6 ซี่เป็นรูปสามเหลี่ยมฐานกว้าง ปลายหนามแหลมชี้ออกด้านหน้า ยกเว้นฟันซี่ที่ 1 เป็นรูปสี่เหลี่ยมปลายตัดมีรอยบากตรงกลาง ฟันซี่สุดท้ายมีขนาดเล็กที่สุด ขอบหลังกระดองเป็นรูปโค้ง

ก้าม ยาวและมีขนาดใกล้เคียงกันทั้งสองข้าง ผิวเรียบเป็นมันเช่นเดียวกับกระดอง ขอบบนแขนมีหนามขนาดใหญ่ปลายแหลม 3 อัน ขอบล่างด้านหลังแขนเรียบ ข้อมือมีหนามขนาดใหญ่ 1 อันที่ผิวด้านใน และมุมด้านนอกมีสัน 2 สันและหนามขนาดเล็ก 3 อัน มือยาวมีหนาม 4 อันบนสันด้านบน ผิวมือด้านนอกและด้านในมีสันเรียบ นิ้วยาวปลายนิ้วทั้งสองจรดกัน ฟันบนนิ้วทู่กลมขนาดใหญ่และกลมขนาดเล็ก

ขาเดิน 3 คู่เรียวยาว ผิวเกลี้ยงเป็นมัน ขอบล่างของ dactylus มีขนยาวเป็นแผงหนา ปลาย dactylus แหลมมาก ขาคู่ที่ 5 ขอบล่างด้านหลังของ merus เป็นหนามแหลม 1 อัน ขอบล่างด้านหลังของ propodus เรียบ ทั้งปล้อง propodus และ dactylus มีขนสั้นแข็งเป็นขอบ

ท้องเพศผู้เป็นรูปสามเหลี่ยม ปล้องที่ 3 และ 4 มีสันตามแนวขวางตลอดความกว้าง ปล้องที่ 3 ถึง 5 เชื่อมติดกัน ปล้องที่ 6 ขอบด้านข้างโค้งออกเล็กน้อยความกว้างมากกว่าความยาว ปล้องที่ 7 เป็นรูปสามเหลี่ยมปลายมน

อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 ปลายเรียวยาวโค้งเล็กน้อย ผิวด้านนอกตั้งแต่ส่วนปลายลงมาถึงเกือบกึ่งกลางของความยาวมีหนามเรียงเป็นแถวจำนวนสองแถว ผิวด้านนอกมีหนามสั้น เฉพาส่วนปลายเป็นแถวเช่นกัน

สี กระดองมีสีส้มปนชมพูเป็นรูปไม้กางเขนตรงกลางกระดอง และรูปอักษรตัว Y คว่ำทั้งสองข้างของกระดอง ลายนี้อยู่บนพื้นสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะลายรูปไม้กางเขนนี้ทำให้เรียกชื่อปูโดยทั่วไปว่าปูกางเขนหรือปูม้าเข้ารีต ก้ามมีจุดสีน้ำตาลสลับสีขาว ในพื้นสีส้มปนชมพู ด้านล่างเป็นสีครีมหรือขาว นิ้วมีสีขาวส่วนปลายสีส้มและน้ำตาลเข้ม ขาเดินทุกคู่มีสีชมพูและมีจุดสีขาวจางมาก ขาคู่ที่ 5 มีสีเช่นเดียวกับก้ามแต่จางมาก ส่วนอกสีขาว

การกระจาย

จันทบุรี ชลบุรี สงขลา ตรัง สตูล ภูเก็ต สุราษฎร์ธานี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง ชุมพร และนราธิวาส

3. *Scylla serrata* (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 199-201)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Portunidae
Genus	Scylla
Species	serrata

ชื่อสามัญ ปูทะเล ปูดำ ปูทองหลาง ปูทองโหลง ปูทองแดง

ลักษณะเด่น

กระดองกว้างเรียบนูน มีหนามข้างกระดอง 9 อันรวมทั้งหนามเบ้าตาด้านนอกมีรูปร่างและขนาดเหมือนกัน เหนือบริเวณ mesogastric และบริเวณ cardiac จะโป่งออก front มีลักษณะเป็นหนาม 4 อัน มีขนาดและรูปร่างเหมือนกัน ก้ามสั้นป้อม แข็งแรง เรียบไม่มีสัน ขอบบนด้านหน้า merus มีหนาม 3 อัน ขอบด้านหลังใกล้ส่วนปลายมีหนาม 2 อัน และด้านล่างใกล้ปลายข้อมีติ่งคล้ายหนาม 1 อัน carpus มีลักษณะโป่งออก

ลักษณะทั่วไป

กระดอง กว้างเรียบ นูน ไม่มีขนอ่อนปกคลุม เหนือบริเวณ mesogastric และบริเวณ cardiac โปงออกเป็นรูปตัว H ระหว่างหนามข้างกระดองอันสุดท้ายมีตุ่มเล็กๆ เรียงเป็นสันเห็นไม่ชัดเจน front มีลักษณะเป็นหนามจำนวน 4 อัน ไม่รวมหนามเบ้าตาด้านใน มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมฐานกว้าง ขนาดใกล้เคียงกันมีปลายค่อนข้างแหลม ขอบเบ้าตาด้านบนมีรอยบาก 2 รอย รอยหนึ่งลึกอีกรอยหนึ่งตื้น หนวดคู่ที่ 1 พับตามแนวขวาง หนวดคู่ที่ 2 มีฐานติดกับส่วนหน้ากระดอง ส่วนปลายเรียวยาว หนามข้างกระดองมี 9 อัน รวมทั้งหนามเบ้าตาด้านนอก หนามทุกอันมีขนาดใกล้เคียงกัน มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายค่อนข้างแหลมชี้ไปข้างหน้า หนามอันสุดท้ายมีขนาดเล็กและแหลมที่สุด ด้านข้างกระดองสอบเข้าสู่ส่วนหลัง ส่วนสันกระดองมีสันเป็นขอบตามแนวกว้างของกระดอง

ก้าม มีขนาดใกล้เคียงกันทั้งสองข้าง มีลักษณะสั้นป้อม แข็งแรง เรียบและไม่มีสัน ขอบบนด้านหน้า merus มีหนาม 3 อัน ขอบด้านหลังมีหนาม 2 อันอยู่ตรงส่วนปลาย ผิวด้านล่างส่วนปลายมีตุ่มเล็กๆ 1 อัน carpus เรียบ มีหนามขนาดใหญ่ที่มุมด้านใน 1 อัน และมีหนามขนาดเล็กที่มุมด้านนอก 1 อัน palm โป่งพองออก เรียบมันมีหนาม 3 อันคือ ตรงส่วนโคน 1 อัน และส่วนปลายทางด้านบน 2 อัน dactylus มีปลายแหลมโค้งซ้อนเกยกับ fix finger มีฟันขนาดใหญ่ขบกันได้สนิท

ขาเดิน คู่ที่ 1, 2 และ 3 มีลักษณะเรียวยาว ผิวเรียบ propodus และ dactylus มีแผงขนละเอียดทั้งขอบบนและขอบล่าง ปลาย dactylus เรียวแหลมคล้ายใบหอก ขาเดินคู่ที่ 4 แผ่แบนแบบใบพาย ขอบบนของ merus และ carpus มีแผงขนละเอียด ส่วน propodus และ dactylus มีแผงขนละเอียดทั้งขอบบนและขอบล่าง

ส่วนท้อง ตัวผู้มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ปล้องที่ 1 และ 2 แคบเล็ก ปล้องที่ 3, 4 และ 5 เชื่อมต่อกัน ปล้องที่ 6 มีส่วนโคนกว้างกว่าส่วนปลาย สำหรับตัวเมียส่วนท้องแผ่แบนกว้าง ขอบด้านข้างมีขนละเอียดปกคลุมทุกปล้อง

อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 มีลักษณะเรียวยาว มีส่วนปลายยาวถึงกลางปล้องอกที่ 3 มีหนามเล็กๆ ที่ขอบด้านในและด้านนอก ปุ่มรองรับอวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 เป็นติ่งแหลมอยู่ตรงขอบล่างปล้องอกที่ 2 อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 2 ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของอวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 มีลักษณะเรียวเล็ก ท่อนำเชื้อยาวเป็นครึ่งหนึ่งของอวัยวะเพศผู้คู่ที่ 2

สำหรับช่องเปิดเพศเมียอยู่ตรงปล้องอกที่ 3 เป็นรูปรีในแนวนอน ขอบหนาอยู่กลางปล้องค่อนมาทางขอบบน

สี กระดอง ก้าม และขาเดินมีสีเขียวหรือสีเขียวขี้ม้า ครึ่งล่างของ palm ของก้ามมีสีน้ำตาลอมแดง ปลายก้ามหนีบมีสีขาวปนเหลืองอ่อน

ถิ่นอาศัย

ขุดรูอยู่ตามริมคลอง ใต้รากไม้หรือเนินดิน ในบริเวณป่าชายเลน อยู่ในเขตระดับน้ำลงเฉลี่ยจนถึงเหนือระดับน้ำขึ้นสูงสุดของช่วงน้ำตาย รูมีขนาดใหญ่มาก มักมีทางเข้าและทางออกหลายทาง การจับในปูต้องใช้ตะขอเกี่ยวขึ้นมา ปกตินิยมจับในคลองโดยใช้แร้วปูมากกว่าเพราะจับได้ง่ายกว่าและระยางค์ของปูไม่หัก ปูไม่บอบช้ำ เก็บไว้ขายได้นาน

การกระจาย

ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา ตรัง เขตอินโดแปซิฟิก มหาสมุทรอินเดีย จีน เกาะฟอร์โมซา ญี่ปุ่น นิวคาลิโดเนีย ออสเตรเลีย เกาะฟิจิ นิวซีแลนด์ อัฟริกา ทะเลแดง ฮาวาย ตาฮิติ ซามัวร์ เกาะนิโคบาร์ ออคแลนด์

4. *Portunus pelagicus* (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 186-189)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Portunidae
Genus	Portunus
Species	pelagicus

ชื่อสามัญ ปูม้า

ลักษณะเด่น

กระดองแบนกว้างมาก มีตุ่มเล็กๆ กระจายทั่วไป หนามข้างกระดองมี 9 อัน หนามอันสุดท้ายยาวใหญ่ปลายแหลมชี้ออกด้านข้าง มีหนามที่ขอบเบ้าตาด้านบน ด้านล่าง front มีหนามแหลมของริมฝีปากบนยื่นล้ำออกมาตรงกึ่งกลาง 1 อัน ขอบเบ้าตาด้านล่างด้านในมีหนามแหลม 1 อัน กระดองส่วนท้ายเชื่อมต่อกับด้านข้างเป็นรูปโค้งมน มุมบนขอบนอก merus ของ maxilliped คู่ที่ 3 มนโค้ง ก้ามมี merus ขนาดเท่ากับ palm หรือใหญ่กว่า เพียงเล็กน้อย ขอบด้านบน merus ตรงส่วนปลายมีหนามแหลม 1 อัน

ลักษณะทั่วไป

กระดอง แบนกว้างมาก มีตุ่มเล็กๆ กระจายทั่วไป มีสันที่เกิดจากตุ่มเล็กๆ เรียงต่อกันเป็นแถวตั้งแต่หนามข้างกระดองอันสุดท้ายมายังบริเวณ branchial front มีลักษณะเป็นหนามจำนวน 2 คู่ไม่รวมเบ้าตาด้านใน หนามคู่กลางมีขนาดเล็กที่สุด หนามคู่ที่ 2 เป็นรูปสามเหลี่ยมมีปลายแหลมชี้ไปข้างหน้า ระหว่างหนามคู่กลางทางด้านล่างมีหนามแหลมยื่นล้ำออกมา 1 อันตรงริม ฝีปากบน บริเวณ

ฐานของหนามระหว่างตาเรียบ ขอบเบ้าตาด้านบนเรียบ และมีรอยบาก 2 รอย ขอบเบ้าตาด้านล่างทางด้านในมีหนามแหลม 1 อัน หนวดคู่ที่ 1 พับตามแนวขวาง หนวดคู่ที่ 2 ส่วนฐานมีขนาดใหญ่ติดกับเบ้าตาและอยู่ใต้หนามเบ้าตาด้านใน หนามข้างกระดองมี 9 อัน หนามอันแรกมีขนาดใหญ่ปลายแหลมยกขึ้น หนามอันที่ 2 ถึง 8 มีขนาดใกล้เคียงกันและเล็กกว่าอันแรก มีปลายแหลมยกขึ้นเช่นกัน หนามอันสุดท้ายมีขนาดใหญ่และยาวมากที่สุดมีปลายแหลมชี้ออกด้านข้าง ขอบกระดองสอบเข้าสู่ส่วนหลังและมีตุ่มเล็กๆ เรียงกันเป็นสันตลอดแนว เชื่อมต่อกับสันบนขอบกระดองส่วนท้ายเป็นมุมโค้ง

ก้าม มีขนาดใกล้เคียงกันทั้งสองข้าง มีลักษณะเรียวยาว ผิวด้านบนและด้านล่างเรียบ ขอบด้านบนและด้านล่างมีตุ่มเล็กๆ กระจายทั่วไป ขอบด้านหน้า merus มีหนามแหลม 3 อัน carpus มีสัน 3 สัน มีหนามขนาดใหญ่ตรงมุมด้านใน 1 อัน และหนามขนาดเล็ก ตรงมุมด้านนอก 1 อัน palm มีสัน 5 สัน มีหนามบริเวณโคน 1 อัน และบริเวณปลายด้านบน merus มีขนละเอียดเรียงเป็นแถว dactylus เรียวยาวโค้งงอจรดกับ fix finger มีฟันขนาดใหญ่และเล็กขบกันได้สนิท

ขาเดิน คู่ที่ 1, 2 และ 3 มีลักษณะเรียวยาว ผิวเรียบ propodus และ dactylus มีขนละเอียดตรงขอบล่าง ส่วนปลาย dactylus เรียวแหลมคล้ายใบหอก ขาเดินคู่ที่ 4 แผ่แบนแบบใบพาย ขอบบน merus และ carpus มีขนละเอียด ขอบบนและขอบล่างของ propodus และ dac มีแผงขนละเอียดตลอดแนว

ส่วนท้อง ตัวผู้มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ปล้องที่ 1 เรียวแคบ ปล้องที่ 2 และ 3 มีสันคมตามขวางตลอดความกว้าง ปล้องที่ 3, 4 และ 5เชื่อมต่อกัน ปล้องที่ 6 มีความยาวมากกว่าความกว้าง ส่วนท้องตัวเมียแผ่กว้าง ขอบด้านข้างทุกปล้องมีขนละเอียดปกคลุมตลอดแนว

อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 มีลักษณะเรียวยาว ส่วนปลายแคบบางชี้ตรงถึงปล้องอกที่ 2 ส่วนฐานมีขนเล็กๆ สั้นๆ ผิวด้านในและด้านนอกส่วนปลายมีหนามสั้นๆ ปุ่มรองรับอวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 อยู่ตรงขอบล่างของปล้องอกที่ 2 อวัยวะเพศผู้คู่ที่ 2 ยาวประมาณ 1 ใน 4 ของอวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 ท่อนำเชื้อเรียวยาว มีความยาวประมารครึ่งหนึ่งของอวัยวะเพศผู้คู่ที่ 2

สำหรับช่องเปิดของเพศเมียอยู่ตรงบริเวณกลางปล้องอกที่ 3 มีลักษณะเป็นรูปกลมรีอยู่ในแนวนอน มีสันยกขอบแข็ง

สี กระดองและก้ามมีสีน้ำเงินอมเขียวขี้ม้า มีแต้มสีขาวกระจายอยู่ทั่วไป ครึ่งล่างของ palm ส่วนโค้งของก้ามหนีบ และขาเดินมีสีฟ้าสด ปลายสุดของก้ามหนีบมีสีน้ำเงินเข้ม ขนตามขอบของ propodus และ dactylus ของขาเดินทุกคู่มีสีส้มอมแดง

ถิ่นอาศัย

ว่ายน้ำในคลอง ปากแม่น้ำหรือชายฝั่งทะเล ในบริเวณป่าชายเลน

การกระจาย

ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลา ตรัง ภูเก็ต สตูล ปัตตานี สิงคโปร์ คาบสมุทรมลายู หมู่เกาะเมอร์ไก เกาะนิโคบาร์ ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา นิวซีแลนด์ อินเดีย ญี่ปุ่น นิวคาลิโดเนีย จีน แอฟริกาฝั่งตะวันออก โมแซมบิค อ่าวเปอร์เซีย ทะเลแดง ทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ออสเตรเลีย มาดากาสการ์

ชนิดของปูในวงศ์ Leucosiidae

1. *Philyra olivacea* (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 161-163)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Leucosiidae
Genus	Philyra
Species	olivacea

ชื่อสามัญ -

ลักษณะเด่น

กระดองหนานูน กลมรี มีสันคมแนวเฉียงแบ่งบริเวณ hepatic อย่างเด่นชัด ส่วนปลายสุดของ maxilliped คู่ที่ 3 มองเห็นจากด้านบน ขอบด้านล่างของบริเวณ hepatic มีลักษณะเป็นมุมแหลม 1 มุม ขอบด้านหลังกระดองมีลักษณะเป็นมุมทำให้เกิดลอน 3 ลอน ก้ามยาวกว่าความยาวกระดอง 1.5 เท่า และมีตุ่มปกคลุมตามขอบ ส่วนท้องปล้องที่ 3 ถึง 5 เชื่อมต่อกัน

ลักษณะทั่วไป

กระดองหนานูน กลมรี มีสันคมแนวเฉียงแบ่งบริเวณ hepatic ออกมาชัดเจนด้านข้างบริเวณ cardiac และ intestinal เป็นรอยบุ๋มขนาดใหญ่ ผิวบนกระดองมีตุ่มกลมปกคลุมทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณขอบกระดองซึ่งลาดลงไปมาก ขอบด้านข้างกระดองส่วนท้ายมีตุ่มเรียงเป็นแถว 2 แถวมาบรรจบกันเป็นรูปสามเหลี่ยมเล็กๆ front โค้งเล็กน้อยยื่นออกไปด้านหน้า และตรงกลางมีส่วนยื่นยาวออกไปคล้ายสามเหลี่ยมขนาดเล็ก ถัดเข้ามาตรงกลางมีตุ่มเรียงเป็นสันตามยาวจนถึงบริเวณ cardiac ขอบด้านล่างของบริเวณ intestinal มีลักษณะเป็นมุมแหลม 1 มุม ถัดมาด้านข้างกระดองจะมีลักษณะเป็นมุมอีก 2 มุม ซึ่งเป็นส่วนที่กว้างที่สุดของกระดอง ขอบกระดองด้านหลังแคบและมีลักษณะเป็นมุมทำให้เกิดลอน 3 ลอน ซึ่งจะเห็นชัดเจนในตัวผู้มากกว่าตัวเมีย epistome ยื่นยาวเลย front ช่องปากกว้างคล้ายรูปสี่เหลี่ยม มุมตรงส่วนปลายกลมกว้าง ส่วนปลาย maxilliped คู่ที่ 3 มองเห็นจากด้านบนขอบมีตุ่มเล็กๆ เรียงเป็นแถว exognath เป็นแผ่นแบนกว้างมีขอบด้านนอกโค้งมน merus ของ

endognath แคบ ปลายแหลมคล้ายสามเหลี่ยม มีขอบด้านนอกตรง มีความยาวน้อยกว่า ischium เล็กน้อย ในตัวเมียมีขนเรียงเป็นแถวตามขอบด้านในของ endognath เบ้าตาเล็กและลึก ตายาวและมีขนาดเล็ก หนวดคู่ที่ 1 พับตาขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 เรียวเล็กอยู่ในร่องตรงมุมด้านในของเบ้าตา บริเวณอกด้านหน้ามีตุ่มกระจายอยู่ทั่วไปและเรียงเป็นขอบขนานกับขอบของส่วนท้องปล้องที่ 6 และ 7

ก้ามแข็งแรง มีขนาดเท่ากันทั้งสองข้าง ในตัวผู้มีความยาวเป็น 1.5 เท่าของความยาวกระดอง ในตัวเมียมีความยาวเป็น 1.25 เท่าของความยาวกระดอง merus คล้ายทรงกระบอกยาว ผิวด้านบนมีตุ่มเรียงเป็นแถวตามความยาว 3 แถว carpus สั้น ส่วนโคนมีขนาดเล็กกว่าส่วนปลาย ขอบบนมีสันนูนตามยาว 2 อัน palm มีผิวค่อนข้างเรียบ มีความกว้างเท่ากับ 2 ใน 3 ของความยาว ขอบด้านนอกตรง ขอบด้านในนูนโค้ง dactylus และ fix finger เรียวยาวปลายแหลมโค้งงอ มีเฉพาะฟันขนาดเล็ก

ขาเดินเรียวเล็ก ผิวเรียบ ขาเดิน 2 คู่แรกยาวถึง carpus ของก้าม dactylus ของขาเดินทุกคู่เรียวยาวคล้ายใบหอกมีขนเรียงเป็นแถวตามขอบทั้ง 2 ข้าง

ส่วนท้องตัวผู้ปล้องที่ 3 ถึง 5 เชื่อมต่อกัน ปล้องที่ 1, 2 และขอบด้านนอกของปล้องที่ 3 มีตุ่มเล็กปกคลุม ปล้องที่ 6 มีความกว้างมากกว่าปล้องที่ 7 ในตัวเมียก็มีตุ่มเรียงเป็นแถวตามขอบของส่วนท้อง

อวัยวะเพศผู้ ลักษณะเป็นแท่งยาวเรียว ส่วนปลายสุดเว้าเข้าและโค้งงอเล็กน้อยมีขนปกคลุมไม่มาก ท่อน้ำเชื้อเห็นชัดเจน มีช่องเปิดขนาดเล็กอยู่ตรงปลายสุด

สี กระดองมีสีน้ำตาลเข้ม มีลายสีม่วงอมดำเป็นแถบตามยาวและกระจายเป็นหย่อมๆ ก้ามและขาเดินสีน้ำตาล ตาและก้านตาสีดำ

ถิ่นอาศัย

ฝังตัวอยู่ในโคลน ในลำคลองเล็กๆ บริเวณป่าชายเลน อยู่ในเขตต่ำกว่าระดับน้ำลงต่ำสุดของช่วงน้ำตาย จับโดยการใช้ตะแกรงร่อนโคลนเหลวกลางลำคลองในขณะน้ำลงต่ำสุด

การกระจาย

อ่าวไทย

ชนิดของปูในวงศ์ Paguridae

1. *Clibanarius longitarsus* (สุพจน์ แสงมณี. 2530 : 133-135)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Paguridae
Genus	Clibanarius

Species longitarsus

ชื่อสามัญ ปูเสฉวน

ลักษณะเด่น

ก้านตามีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก มีความยาวมากกว่าความกว้างของขอบด้านหน้ากระดองเล็กน้อย แต่ยาวเท่ากับความยาวของก้านหนวดคู่ที่ 1 ก้ามทั้งสองข้างมีขนาดเกือบเท่ากัน ผิวด้านบนและด้านนอก propodus และ dactylus มีตุ่มและหนวดซึ่งมีปลายสีดำกระจายทั่วไป dactylus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีแถบสีน้ำเงินตามความยาว ก้านตามีสีเหลืองปนส้ม

ลักษณะทั่วไป

กระดอง มีลักษณะนูนเล็กน้อยตรงส่วนหน้า ผิวมีตุ่มกระจายอยู่ทั่วไป ขอบด้านข้างมีกลุ่มขนยาวกระจายทั่วไป ส่วนหลังของกระดองมีกลุ่มขนยาวกระจายอยู่ห่างๆ กัน บริเวณถัดจากร่องคอมีกลุ่มขนหนาแน่นกว่าบริเวณอื่น กรีมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก และมีความยาวเกือบถึงฐานของแผ่นบนก้านตา

ก้านตา มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก และมีความยาวมากกว่าความกว้างของขอบด้านหน้ากระดองเล็กน้อย แต่ยาวเท่ากับความยาวของหนวดคู่ที่ 1 ก้านหนวดคู่ที่ 1, 2 และแผ่นกำบังหนวดมีกลุ่มขนสั้นและยาวกระจายอยู่เล็กน้อย แผ่นบนก้านตามีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ส่วนปลายมีหนามขนาดเล็ก 2 อัน แผ่นกำบังหนวดมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม บริเวณด้านในมีหนามขนาดเล็กมากเรียงเป็นแถว และมีความยาวเกือบถึงฐานปล้องสุดท้ายของก้านหนวดคู่ที่ 2

ก้าม ก้ามข้างขวามีขนาดใหญ่กว่าก้ามข้างซ้ายเล็กน้อย ผิวด้านนอก merus เป็นตุ่มกระจายทั่วไป ตรงขอบล่างส่วนปลายทางด้านนอกมีหนาม 2 อัน ผิวด้านนอก carpus มีตุ่มกระจายอยู่ทั่วไป ขอบด้านบนส่วนปลายมีหนามซึ่งมีปลายสีดำ 1 อัน ผิวด้านบนและด้านนอกของ propodus และ dactylus มีตุ่มและหนวดซึ่งมีปลายสีดำกระจายทั่วไป บริเวณฐานของตุ่มและหนามจะมีขนสั้นและยาวอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

ขาเดิน ขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 มีลักษณะเรียวยาว ค่อนข้างแบน ขอบบนและขอบล่างมีกลุ่มขนสั้นและยาวกระจายอยู่ทั่วไป กลุ่มขนที่ dactylus จะหนาแน่นกว่าบริเวณอื่น ผิวด้านนอก merus, carpus และ propodus เป็นกระจายอยู่เล็กน้อย dactylus มีความยาวมากกว่า propodus อย่างเด่นชัด

สี กระดองมีสีน้ำตาลและลวดลายสีน้ำเงินแทรกอยู่เล็กน้อย ผิวด้านนอกของขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 มีแถบสีน้ำเงินตามความยาว ก้านตามีสีเหลืองปนส้ม

ถิ่นอาศัย

คลานตามชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ ริมป่าชายเลน ที่มีพื้นเป็นโคลนปนทรายหรือทรายปนโคลน มีต้นโกงกางขึ้นอยู่อย่างหนาแน่นอยู่ในเขตน้ำลงเฉลี่ยจนถึงระดับน้ำลงต่ำสุดของช่วงน้ำตาย

การกระจาย

ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา ระนอง กระบี่ ตรัง ภูเก็ต สตูล นราธิวาส ปัตตานี เขตอินโดแปซิฟิก มหาสมุทรอินเดีย ไต้หวัน ญี่ปุ่น ชายฝั่ง ตะวันออกของแอฟริกา

ชนิดของปูในวงศ์ Ocypodidae

1. *Uca forcipata* (เสรี บรรพวิจิตร. 2522 : 27-32)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Ocypodidae
Genus	Uca
Species	forcipata

ชื่อสามัญ ปูก้ามดาบ

ลักษณะเด่น

บริเวณปลาย pollex และ dactylus มีฟันขนาดใหญ่เรียงเป็นเป็นชุด ทำให้มีลักษณะเหมือนปลายปากคีบ ด้านนอกของ dactylus มีร่องยาว 1 ร่อง อยู่ตรงกลางตลอดความยาว พื้นกระบอกตาเรียบ กระบอกตาเฉียงปานกลาง ด้านข้างของกระดองสอบเข้าสู่ส่วนหลังของกระดอง merus ของขาคู่ที่ 4 แผ่กว้าง ปลายอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เป็นท่อสั้นและปากรูกว้างมาก

ลักษณะทั่วไป

กระดอง front แคบ ส่วนที่แคบที่สุดอยู่ที่ฐานของก้านตาซึ่งกว้างประมาณ 1.5 เท่าของความกว้างที่ฐานของก้านตา ร่องที่อยู่กึ่งกลาง front แคบไม่มากนักขอบร่องเกือบขนานกันและปลายร่องมน ด้านข้างของกระดองสอบเข้าสู่ส่วนหลังของกระดอง บริเวณต่างๆ บนกระดองเห็นชัดเจน กระบอกตาเฉียงปานกลาง มุมกระดองด้านหน้าแหลมและยื่นออกไปไม่มากนัก ขอบกระดองด้านข้างเป็นสันคมยาวตั้งแต่มุมกระดองถึงระดับเดียวกับกึ่งกลางของบริเวณหัวใจ ขีดเล็กๆ ที่อยู่บนด้านหลังของกระดองไม่มี ขอบกระบอกตาบนแคบ ขอบบนเป็นตุ่มกลมเรียงเป็นแถว ขอบล่างเป็นตุ่มกลมเล็กๆ เรียงชิดกันเป็นแถวยาวประมาณครึ่งหนึ่งของกระบอกตา รอยหยักบริเวณขอบกระบอกตาล่าง

ต่ำและเรียงชิดกัน และรอยหยักจะมีขนาดใหญ่และมีระยะห่างมากขึ้นเมื่อเข้าใกล้ปลายขอบของกระดอง พื้นกระบอกตาเรียบ ก้านตายาวและมีเส้นผ่าศูนย์กลางสั้นกว่าตามาก

ก้ามข้างใหญ่ merus ขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้ามีตุ่มขนาดไม่เท่ากันเรียงเป็นแถวและตุ่มที่อยู่บริเวณตรงปลายจะมีขนาดใหญ่หลายตุ่ม ขอบบนที่อยู่ทางด้านหลังเป็นสัน ลักษณะเป็นฟันเลื่อยซึ่งระยะห่างไม่เท่ากัน ผิวบนเรียบและตอนปลายจะเว้าเล็กน้อย ผิวด้านหน้าเรียบ บริเวณปลาย merus ที่อยู่ใต้ขอบบนลงมาเล็กน้อยจะมีตุ่มอยู่หลายตุ่ม ผิวด้านหลังมีตุ่มและรอยย่นกระจายอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณขอบจะมีเป็นจำนวนมาก

Carpus ขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้าเป็นสัน มีตุ่มเรียงเป็นแถวขอบบนที่อยู่ด้านหลังไม่เป็นสันแต่เห็นชัดเจน ผิวด้านบนจะมีตุ่มอยู่อย่างหนาแน่นผิวด้านหลังเรียบ แต่ตรงปลายที่อยู่ใต้ขอบบนลงมาจะมีตุ่มอยู่บ้าง

Manus ผิวด้านนอกจะมีตุ่มขนาดใหญ่ปกคลุม และบริเวณฐานของ pollex จะมีตุ่มขนาดใหญ่ที่สุด ขอบบนที่อยู่ทางด้านนอกและที่อยู่ทางด้านในจะมีตุ่มเรียงกันเป็นแถว ร่องที่อยู่ใต้ขอบบนจะเห็นได้ชัดเจน cuff เห็นได้ชัดเจนและจะมีตุ่มขนาดเล็กอยู่ด้วย บริเวณใกล้กับฐานของ pollex มีร่องสามแฉกและเป็นที่เริ่มต้นของ pollex ร่องซึ่งยาวตลอดความยาวของ pollex ขอบล่างมีตุ่มเรียงเป็นแถวจนถึงกึ่งกลางของ pollex

Palm แอ่งที่รองรับ carpus จะค่อยๆ แคบและตื้นขึ้นตามลำดับเมื่อยื่นออกไปใกล้ตรงบริเวณโคน dactylus ซึ่งริมแอ่งไม่มีตุ่มเรียงเป็นแถว ตรงกลางของ palm มีลักษณะนูนและมีตุ่มเล็กๆ ปกคลุมอย่างหนาแน่น แอ่งสามแฉกลึก สันเฉียง จะมีตุ่มเรียงเป็นแถวตั้งแต่ขอบล่างของโคน pollex จนถึงริมล่างของแอ่งรองรับ carpus proximal ridge จะมีตุ่มเรียงเป็นแถวตั้งแต่โคน pollex จนถึงฐานของ dactylus distal ridge จะมีตุ่มขนาดเล็กกว่าเรียงเป็นแถว

Pollex และ dactylus มีลักษณะแบนและมีความยาวเกือบเท่ากัน ขอบล่างของ pollex จะโค้งขึ้นตั้งแต่โคน ขอบบนของ dactylus มีลักษณะตรงและโค้งเล็กน้อย ด้านนอกของ pollex และ dactylus มีร่องยาว 1 ร่องอยู่ตรงกลางตลอดความยาว บริเวณด้านใต้ตรงโคนร่องของ pollex จะมีร่องสั้นๆ อีก 1 ร่องซึ่งเป็นร่องที่ยาวเลยมาจากร่องเหนือขอบล่างของ manus และบริเวณด้านเหนือตรงโคนร่องของ dactylus จะมีร่องตื้นๆ สั้นๆ อีก 1 ร่อง ผิวบนและผิวนอกตรงโคนของ dactylus จะมีตุ่มปกคลุม ส่วนผิวนอกตรงโคนของ pollex จะมีตุ่มปกคลุมอยู่เป็นจำนวนน้อย ส่วนตรงปลาย pollex และ dactylus จะมีลักษณะแหลมงุ้มและมีฟันขนาดใหญ่เรียงเป็นชุด ทำให้ลักษณะเหมือนกับปากคีบ ถ้าเป็นก้าม brachychelous type บริเวณเกือบตรงกึ่งกลางของ pollex จะมีฟันขนาดใหญ่อยู่ 1 ซี่ และตรงบริเวณประมาณ 1/3 ของความยาวจากโคนของ dactylus จะมีฟันขนาดใหญ่อยู่ 1 ซี่เป็นอย่าง

น้อย ส่วนก้าม leptochelous type จะไม่มีฟันที่ pollex และ dactylus นอกจากฟันขนาดใหญ่ที่เรียงเป็นชุดตรงบริเวณปลายของก้ามหนีบทั้งสอง

ก้ามข้างเล็ก ผิวด้านหลังของ merus จะมีตุ่มขนาดเล็กและรอยย่นอยู่ทั่วไป pollex และ dactylus จะมีความยาวมากกว่า manus ไม่มากนัก ช่องว่างระหว่างก้ามหนีบแคบ และมีฟันเป็นแบบฟันเลื่อยเห็นได้ชัดเจน ตอนบนของ palm จะมีขนยาวเรียงเป็นแถว

ขา merus แผ่กว้าง ขอบบนโค้งและมีลักษณะเป็นฟันเลื่อย ผิวด้านหลังจะมีตุ่มขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป ยกเว้นขาคู่สุดท้ายเท่านั้นที่ไม่มี

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ปลายอวัยวะสืบพันธุ์เป็นท่อสั้นและปากรูกว้างมาก

ลักษณะเด่นของตัวเมีย ช่องว่างระหว่างก้ามหนีบของก้ามข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างมีฟันขนาดใหญ่อยู่ 1 คู่

สี กระดองของตัวผู้และตัวเมีย ปกติแล้วจะมีสีดำ และมักจะเป็นจุดสีเหลืองครีม หรือเทาอ่อนกระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะบริเวณครึ่งตอนหน้าบนกระดองของปูบางตัว บริเวณมุมกระดองด้านหลังและบริเวณร่องบนกระดองที่แบ่งบริเวณของกระเพาะอาหารส่วนกลางกับหัวใจออกจากบริเวณของเหงือกจะมีสีฟ้าหรือเทาอ่อน ปูบางตัวมุมกระดองด้านหน้าจะมีสีแดง ตัวเมียที่โตเต็มวัยบางตัวครึ่งตอนหน้าบนกระดองอาจจะมีสีฟ้าและมุมกระดองด้านหน้ามีสีแดง maxilliped คู่ที่ 3 อาจจะมีสีฟ้าปกติแล้วก้านตามีสีดำ ตามีสีแดง แต่ปูบางตัวตาและก้านตามีสีแดง

ตัวโตเต็มวัยที่มีขนาดเล็กถึงปานกลาง manus จะมีสีเหลือง น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแดง แดงแกมม่วง หรือม่วง ซึ่งครึ่งล่างของ manus จะมีสีเข้มกว่าครึ่งบนและมักจะมีสีน้ำตาล แดง หรือม่วงเข้ม นอกจากนี้แล้วขอบและฐานของ dactylus อาจจะมีสีฟ้าแซม carpus และ merus มีสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาล แดง หรือม่วง ซึ่งด้านบนและด้านหลังของ carpus และ merus อาจจะมีสีฟ้าแซม pollex และ dactylus ปกติแล้วจะมีสีขาว ตรงโคนอาจจะมีสีเหลือง น้ำตาล หรือม่วง และอาจจะมีสีฟ้ามาแซม ปูบางตัว pollex และ dactylus มีสีแดง ตรงปลายสุดมีสีขาว สำหรับตัวเต็มวัยที่มีขนาดใหญ่ ครึ่งล่างของ manus มีสีม่วงหรือน้ำตาลเข้ม ส่วนครึ่งบนของ manus carpus และ merus มีสีน้ำตาลอ่อน pollex และ dactylus มีสีขาว ขามีสีดำ โคน merusของขาคู่สุดท้ายอาจจะมีสีฟ้าหรือเทาอ่อน ตัวเมียบางตัวครึ่งปลายของ merus จนถึงปลายขาก้ามจะมีสีแดง ครึ่งโคนของ merus มีสีดำ

ถิ่นอาศัย

ชายฝั่งทะเล ริมธารน้ำ ลำคลองหรือหนองน้ำ หาดเลนริมหรือปากแม่น้ำ ท่าเทียบเรือ ร่องสวนมะพร้าว ที่มีน้ำกร่อยและเป็นโคลน มักเป็นที่ซึ่งมีร่มเงาและใกล้กับต้นแสม

การกระจาย

ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ สุมาตรา ชวา ซาราวัค บอร์เนียว เซเลเบส และฟิลิปปินส์

2. *Uca vocans* (เสรี บรรพวิจิตร. 2522 : 65-70)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Ocypodidae
Genus	Uca
Species	vocans

ชื่อสามัญ ปูก้ามดาบ

ลักษณะเด่น

Pollex และ dactylus ของก้ามข้างใหญ่มีลักษณะแบนและกว้างมาก ด้านนอกของ pollex มีร่องตื้นๆ 1 ร่องอยู่ตรงกลางเกือบตลอดความยาว ซึ่งร่องนี้เป็นร่องที่ยาวเลยมาจากแอ่งสามเหลี่ยม ถ้าเป็นก้าม brachychelous type ตรงบริเวณปลาย pollex และตรงบริเวณกึ่งกลางของ pollex จะมีฟันสามเหลี่ยมขนาดใหญ่อยู่บริเวณละ 1 ซี่ ฟัน 2 ซี่นี้มักจะมีความสูงไม่มากนัก ทำให้ช่องว่างระหว่างฟันทั้งสองมีความเว้าน้อย ถ้าเป็นก้าม leptochelous type ขอบล่างของ propodus มักจะตรงและงอนขึ้นตรงส่วนปลาย บริเวณครึ่งล่างของ manus และ pollex เป็นสีแสด ปลายอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีลักษณะค่อนข้างกลม thumb ยาวสันเฉียงของ palm สูง ตรงบริเวณปลายสุดของขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้าของ manus จะมีตุ่มขนาดใหญ่และแหลมอยู่ 1 ตุ่ม กระบอกตาเฉียงไม่มากนัก ด้านข้างของกระดองสอบเข้าสวนหลังของกระดองไม่มากนัก และค่อนข้างจะตั้งได้ฉากกับขอบหลังของกระดอง ขอบกระดองด้านข้างไม่เป็นสันคม pollex และ dactylus ของก้ามข้างเล็กยาวกว่า manus มาก ช่องว่างระหว่างก้ามหนีบกว้างและไม่มีฟันเป็นแบบฟันเลื่อย merus ของขาทุกขามีลักษณะเรียวยาว

ลักษณะทั่วไป

กระดอง front แคบ ส่วนที่แคบที่สุดอยู่ที่ฐานของก้านตาซึ่งกว้างประมาณ 1.5 เท่า ของความกว้างที่ฐานของก้านตา ร่องที่อยู่กึ่งกลาง front แคบ ขอบร่องอาจจะขนานกันหรือสอบเข้า ปลายร่องอาจจะมีลักษณะแหลมหรือมน ด้านข้างของกระดองสอบเข้าสู่ส่วนหลังของกระดองไม่มากนัก และค่อนข้างจะตั้งได้ฉากกับขอบหลังของกระดอง บริเวณต่างๆ บนกระดองเห็นได้ชัดเจน กระบอกตาเฉียงไม่มากนัก มุมกระดองด้านหน้าแหลมและยื่นออกไปทางด้านหน้าไม่มากนัก ขอบกระดองด้านข้างไม่เป็นสันคม ขีดเล็กๆ ที่อยู่ด้านหลังของกระดองไม่มี ขอบกระบอกตาบนแคบมาก ขอบบนเป็นตุ่มกลมเรียงเป็นแถว ขอบล่างเป็นตุ่มกลมเล็กๆ เรียงชิดติดกันเป็นแถวและยาวประมาณครึ่งหนึ่งของกระบอกตา รอยหยักบริเวณขอบกระบอกตาล่างมีขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน พื้นกระบอกตาไม่มีตุ่มเรียงเป็นแถว ก้านตายาวและมีเส้นผ่าศูนย์กลางสั้นกว่าของตา

ก้ามข้างใหญ่ merus ขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้ามีลักษณะมน ส่วนปลายจะมีตุ่มเล็กๆ อยู่หลายตุ่ม และตรงบริเวณปลายสุดจะมีตุ่มขนาดใหญ่และแหลมอยู่หนึ่งตุ่ม ขอบบนที่อยู่ทางด้านหลังเป็นสันต่ำ ส่วนปลายจะมีตุ่มเรียงเป็นแถว ส่วนโคนค่อนข้างเรียบ ผิวบนเรียบ ผิวด้านหน้าเรียบ ตรงบริเวณเหนือขอบล่างขึ้นมาจะมีตุ่มขนาดเล็กอยู่อย่างหนาแน่น ผิวด้านหลังมีตุ่มกระจายอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณขอบจะมีเป็นจำนวนมาก

Carpus ขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้าเป็นสัน ไม่มีตุ่มเรียงเป็นแถวและตรงโคนจะมีตุ่มแหลมขนาดใหญ่อยู่ 1 ตุ่ม ขอบบนที่อยู่ทางด้านหลังมีลักษณะมน ผิวด้านบนจะมีตุ่มขนาดเล็กอยู่อย่างหนาแน่น ผิวด้านหลังมีตุ่มขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป

Manus ผิวด้านนอกจะมีตุ่มปกคลุม บริเวณครึ่งบนของ manus จะมีตุ่มขนาดเล็กกว่าบริเวณครึ่งล่าง ขอบบนที่อยู่ทางด้านนอกมีตุ่มเรียงเป็นแถว ส่วนขอบที่อยู่ทางด้านในไม่มีตุ่มเรียงเป็นแถว ร่องที่อยู่ใต้ขอบบนเห็นได้ชัดเจน cuff เห็นได้ชัดเจนและจะมีตุ่มเรียงเป็นแถว บริเวณฐานของ pollex จะมีแอ่ง pollex จะไม่มีฟันขนาดใหญ่อยู่เลย แต่ตรงบริเวณเกือบจะถึงปลายมักจะมักลักษณะนูนขึ้นเล็กน้อย ขอบล่างของ propodus มักจะตรงและงอนขึ้นตรงส่วนปลาย dactylus จะไม่มีฟันขนาดใหญ่อยู่เลย

ก้ามข้างเล็ก ผิวด้านหลังของ merus มีรอนย่นอยู่เป็นจำนวนมากและจะมีตุ่มขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป ตรงบริเวณปลายของผิวด้านหน้าของ merus จะมีขนยาวอยู่ 1 กระจุก pollex และ dactylus จะมีความยาวมากกว่าความยาวของ manus มาก ช่องว่างระหว่างก้ามหนีบกว้างและไม่มีฟันเป็นแบบฟันเลื่อย ตอนบนของ palm จะไม่มีขนยาวเรียงเป็นแถว

ขา merus แผ่กว้างไม่มากนัก ขาคู่สุดท้ายมีลักษณะเรียวยาว และขอบบนและขอบล่างเกือบขนานกัน ขอบบนโค้งและมีลักษณะเป็นแบบฟันเลื่อยขนาดเล็กๆ ผิวด้านหลังเรียบ บริเวณที่อยู่ใต้ขอบบนลงมามีรอยย่นอยู่เป็นจำนวนน้อย ซึ่งตามรอยย่นจะมีตุ่มขนาดเล็กเรียงเป็นแถว

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ มีการบิดตัว ทำให้ thumb ซึ่งอยู่ทางด้านหน้าจะไปอยู่ทางด้านหลัง ปลายอวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะค่อนข้างกลมและ thumb ยาว

ลักษณะเด่นของตัวเมีย รูเปิดของอวัยวะเพศมีลักษณะเป็นรอยแกะสลักเป็นรูปตัว C ช่องว่างระหว่างก้ามหนีบจะมีความกว้างมากกว่าความกว้างของ pollex สามเหลี่ยมตื้นๆ ขนาดใหญ่มากภายในแอ่งจะไม่มีตุ่มอยู่ มุมที่ฐานของสามเหลี่ยมมุมหนึ่งจะอยู่ตรงบริเวณกึ่งกลางของ pollex มุมยอดของสามเหลี่ยมจะอยู่ตรงบริเวณเกือบถึงขอบล่างของ dactylus ขอบล่างมีตุ่มขนาดเล็กเรียงเป็นแถวจนถึงปลาย pollex

Palm แอ่งที่รองรับ carpus จะค่อยๆ และตื้นขึ้นตามลำดับเมื่อยื่นออกไปใกล้ตรงบริเวณโคน dactylus ตรงกลางของ palm มีลักษณะนูนและมีตุ่มเล็กๆ ปกคลุมอย่างหนาแน่น แอ่งสามแฉกกว้าง

และตื้น แต่ลักษณะที่เป็นสามแฉกเห็นได้ชัด สันเฉียงสูง และจะมีตุ่มเรียงชิดกันเป็นแถวตั้งแต่บริเวณเหนือจากขอบล่างตรงบริเวณฐานของ pollex ขึ้นมาเล็กน้อยจนเกือบจะถึงริมล่างของแอ่งรองรับ carpus preximal ridge มีตุ่มเรียงเป็นแถวตั้งแต่โคน pollex จนถึงฐานของ dactylus ซึ่งบริเวณกึ่งกลางของสันจะมีความสูงมากกว่าและมีตุ่มขนาดใหญ่กว่าบริเวณอื่นๆ distal ridge มีตุ่มขนาดเล็กเรียงเป็นแถว

Pollex และ dactylus มีลักษณะแบนและกว้างมาก ฐานของ pollex มีลักษณะกว้างมาก pollex มีความยาวมากกว่า dactylus เล็กน้อย ขอบล่างของ pollex โค้ง ขอบบนของ dactylus ตรงส่วนปลายโค้งลง ด้านนอกของ pollex มีร่องตื้นๆ 1 ร่องอยู่ตรงกลางและยาวตลอดความยาว ซึ่งร่องนี้เป็นร่องที่ยาวเลยมาจากแอ่งสามเหลี่ยม บริเวณด้านใต้ขอบบนตรงโคนของ dactylus มีร่องตื้นๆ 1 ร่องซึ่งเห็นได้ไม่ชัด ผิวบนและผิวนอกตรงโคนของ dactylus จะมีตุ่มปกคลุม ผิวนอกตรงโคนของ pollex จะตุ่มปกคลุม ถ้าเป็นก้าม brachychelous type ตรงบริเวณปลายและกึ่งกลางของ pollex จะมีฟันสามเหลี่ยมขนาดใหญ่อยู่บริเวณละ 1 ซี่ ฟัน 2 ซีกนี้มักจะมีความสูงไม่มากนัก ทำให้ช่องว่างระหว่างฟันทั้งสองมีความเว้าน้อย บริเวณขอบฟันของฟัน 2 ซี่นี้จะเป็นตุ่มเล็กๆ เรียงชิดกันเป็นแถว dactylus มีฟันขนาดใหญ่ซึ่งมีลักษณะเป็นตุ่มอยู่หลายอัน

สี กระดอง ขา และก้ามของตัวเมียและตัวผู้ (ยกเว้นก้ามข้างใหญ่ของตัวผู้) จะมีสีเทาหรือสีเขียวขี้ม้า และอาจจะมีจุดสีขาวกระจายอยู่ทั่วไป ก้ามข้างใหญ่ของตัวผู้จะมีสีส้มหรือเทาอ่อน ยกเว้นบริเวณครึ่งล่างของ manus และ pollex จะมีสีแสดหรือสีส้มเข้มตัวที่มีขนาดเล็ก บริเวณปลาย pollex มักจะมีสีขาวหรือส้ม บางครั้งพบว่าปูตัวผู้มีกระดองขาและก้ามข้างเล็กเป็นสีขาว และอาจจะมีจุดขนาดใหญ่สีฟ้าอยู่บริเวณกลางกระดอง ก้ามข้างใหญ่มีสีม่วงแดง dactylus จะมีสีอ่อนกว่าบริเวณอื่น บริเวณส่วนปลายของ pollex และ dactylus จะมีสีขาว ส่วนตัวเมีย นอกจากจะมีสีขาวทั้งตัวแล้ว บนกระดองอาจจะมีสีฟ้า ชมพู หรือเทาอยู่ด้วย

ถิ่นอาศัย

ชายฝั่งทะเล ท่าเทียบเรือ ริมธารน้ำหรือหนองน้ำที่อยู่ติดกับทะเล ซึ่งเป็นดินทรายปนโคลนและไม่มีร่มเงา

การกระจาย

ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และเกาะริวกิว ญี่ปุ่น

3. *Uca lactea* (เสรี บรรพวิจิตร. 2522 : 84-90)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda

Family	Ocypodidae
Genus	Uca
Species	lactea

ชื่อสามัญ ปูก้ามดาบ

ลักษณะเด่น

Front กว้าง ส่วนใหญ่กระบอกตาลักษณะตรง และด้านข้างของกระดองจะตั้งได้ฉากกับขอบหลังของกระดอง กระดองมีความกว้างมากกว่าความยาว และกว้างมากกว่าปูก้ามดาบชนิดอื่นด้วย ดังนั้นกระดองจึงมีลักษณะสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีขีดเล็กๆ ข้างละ 1 ขีด อยู่ตรงส่วนหลังของกระดอง manus ของก้ามข้างใหญ่จะแคบ บริเวณปลาย pollex จะมีฟันขนาดใหญ่เป็นรูปสามเหลี่ยมตั้งขึ้น 1 ซี่ merus ของขาคู่สุดท้ายเรียวยาวและมีขอบบนตรง อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีการบิดตัว flange ที่อยู่ทางด้านหลังมีความยาวและความกว้างมากกว่า flange ที่อยู่ทางด้านหน้าอย่างเห็นได้ชัดเจน รูเปิดของท่อนำเชื้ออยู่ในแอ่งซึ่งกว้างและตื้นมาก thumb มีขนาดใหญ่และยาวเห็นได้ชัดเจน ปลายอวัยวะสืบพันธุ์ไม่เป็นท่อยื่นยาวออกไป

ลักษณะทั่วไป

กระดอง front กว้าง ส่วนที่แคบที่สุดอยู่ตรงส่วนปลายของ front ซึ่งมีความกว้างประมาณ 2 เท่าของความกว้างประมาณ 2 เท่าของความกว้างของฐานของก้านตา ส่วนใหญ่ด้านข้างของกระดองจะตั้งได้ฉากกับขอบหลังของกระดองบางตัวด้านข้างของกระดองจะสอบเข้าสู่ส่วนหลังของกระดองบริเวณต่างๆ บนกระดองเห็นได้ไม่ชัดเจน ส่วนใหญ่กระบอกตาจะตรง เฉพาะบางตัวกระบอกตาจะเฉียงมาก มุมกระดองด้านหน้าเล็ก แหลม และยื่นออกไปทางด้านหน้าเล็กน้อย ขอบกระดองด้านข้างมีลักษณธเป็นสันคมยาวตั้งแต่มุมกระดองจนถึงบริเวณเดียวกันกับระดับกึ่งกลางของบริเวณหัวใจ ขีดเล็กๆ ซึ่งอยู่บนส่วนหลังของกระดองมีจำนวนข้างละ 1 ขีด ขอบกระบอกตาบนแคบ ขอบบนไม่มีตุ่มเรียงเป็นแถว ยกเว้นเฉพาะตอนปลายขอบจะมีตุ่มกลมเล็กๆ อยู่ ขอบล่างมีลักษณะเป็นตุ่มกลมเล็กๆ เรียงเป็นแถวยาวประมาณ 2/3 ของขอบบนและจะวกขึ้นไปบรรจบกับขอบบน รอยหยักบริเวณขอบกระบอกตาล่างต่ำและเรียงชิดติดกัน และรอยหยักจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีระยะห่างกันมากขึ้นเมื่อใกล้มุมกระดอง พื้นกระบอกตาไม่มีตุ่มเรียงเป็นแถว ก้านตายาวและมีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางสั้นกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของตาเพียงเล็กน้อย

ก้ามข้างใหญ่ merus ขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้าและที่อยู่ทางด้านหลังไม่เป็นสันส่วนปลายของขอบจะมีตุ่มแหลมขนาดใหญ่อยู่อย่างหนาแน่น ส่วนโคนของขอบจะเรียบ ผิวด้านหน้าตรงบริเวณปลาย merus ที่อยู่ใต้ขอบบนลงมาเล็กน้อยจะมีตุ่มแหลมขนาดใหญ่อยู่อย่างหนาแน่น ผิวด้านหลังมีตุ่มเล็กๆ และรอยย่นกระจายอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณใต้ขอบบนลงมาจะมีเป็นจำนวนมาก

Carpus ขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้าเป็นสัน และตรงโคนจะมีตุ่มแหลมขนาดใหญ่อยู่หลายตุ่ม ขอบบนที่อยู่ทางด้านหลังมีลักษณะมน ผิวด้านบนและผิวด้านหลังเรียบจะมีตุ่มขนาดเล็กมากปกคลุม

Manus ผิวด้านนอกจะมีตุ่มขนาดเล็กมากปกคลุมอย่างหนาแน่น ซึ่งถ้ามองด้วยตาเปล่าจะเห็นผิวเรียบ ขอบบนที่อยู่ทางด้านนอกจะมีตุ่มเรียงเป็นแถวแต่เห็นไม่ชัด ขอบบนที่อยู่ทางด้านในและร่องที่อยู่ใต้ขอบบนจะไม่มี cuff เห็นได้ชัดเจนและจะมีตุ่มขนาดกลางเรียงเป็นแถว ขอบบนมีตุ่มกลมเรียงเป็นแถวจนถึงโคน pollex ร่องที่อยู่เหลือขอบล่างของ manus มีความยาวถึงโคน pollex และเห็นได้ชัดเจน

Palm แอ่งที่รองรับ carpus จะค่อยๆ แคบและตื้นมากขึ้นตามลำดับเมื่อยื่นออกไปใกล้ตรงบริเวณโคน dactylus บริเวณฐานของ dactylus จะมีตุ่มขนาดกลางปกคลุม ริมล่างของแอ่งที่รองรับ carpus จะอยู่ในระดับต่ำและมีลักษณะเป็นสันคม ตรงกลางของ palm มีลักษณะนูนและมีตุ่มขนาดเล็กมากกระจายอยู่ทั่วไป แอ่งสามแฉกกว้างและตื้น แต่ลักษณะที่เป็นสามแฉกยังเห็นได้ชัด สันเฉียงจะมีตุ่มเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบตั้งแต่ขอบล่างของฐาน pollex จนถึงริมล่างของแอ่งที่รองรับ carpus และจะมีตุ่ม 2-3 ตุ่ม อยู่ตรงบริเวณริมล่างของแอ่งที่รองรับ carpus อีกด้วย proximal ridge มีตุ่มเรียงเป็นแถวตั้งแต่โคน pollex จนถึงฐานของ dactylus distal ridge มีตุ่มขนาดเล็กกว่าเรียงเป็นแถว

Pollex และ dactylus มีลักษณะแบนและตรง ส่วนปลายของ dactylus จะโค้งและงุ้มลง ด้านนอกของ pollex จะมีร่องอยู่เหนือขอบล่างของ pollex ขึ้นมาเล็กน้อย ร่องนี้เป็นร่องที่อยู่เหนือขอบล่างของ manus ซึ่งยาวเลยมายัง pollex และบริเวณที่อยู่เหนือร่องนี้ขึ้นมาจะมีตุ่มเล็กๆ เรียงเป็นแถวตั้งแต่บริเวณฐานของ pollex จนถึงปลาย pollex บริเวณด้านใต้ตรงโคนขอบบนของ dactylus จะมีร่องสั้นๆ 1 ร่อง ผิวบนและผิวนอกตรงโคนของ dactylus จะมีตุ่มกระจายอยู่ทั่วไปตรงบริเวณที่เกือบจะถึงปลายสุดของ pollex จะมีฟันขนาดใหญ่เป็นรูปสามเหลี่ยมหน้าจั่วตั้งขึ้น 1 ซี่ ถ้าเป็นก้าม brachychelous type ตรงบริเวณกึ่งกลางของ pollex จะมีฟันขนาดใหญ่ 1 ซี่ และ dactylus จะมีฟันขนาดใหญ่ 2 ซี่ ส่วนก้าม leptochelous type ตรงบริเวณกึ่งกลางของ pollex จะไม่มีฟันขนาดใหญ่ และ dactylus ก็จะไม่มีฟันขนาดใหญ่เช่นเดียวกัน

ก้ามข้างเล็ก ผิวด้านหลังของ merus จะมีตุ่มขนาดเล็กและรอยย่นอยู่ทั่วไป pollex และ dactylus จะมีความยาวมากกว่า manus มาก ช่องว่างระหว่างก้ามหนีบกว้าง และมีฟันเป็นแบบฟันเลื่อยเห็นได้ชัดเจน ยกเว้นเฉพาะส่วนปลายของก้ามหนีบซึ่งเห็นได้ไม่ชัด ด้านหน้าของ merus ตรงบริเวณปลายจะมีขนยาวอยู่ 1 กระจุก

ขา merus แผ่กว้าง ยกเว้นขาคู่สุดท้ายจะมีลักษณะเรียวยาว ขอบบนโค้งลักษณะที่เป็นแบบฟันเลื่อยเห็นได้ไม่ชัด ผิวด้านหลังมีรอยย่นอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณใต้ขอบบนมาจะมีเป็นจำนวนมาก ซึ่งตามรอยย่นจะมีตุ่มเล็กๆ เรียงเป็นแถวลงมา

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ อวัยวะสืบพันธุ์มีการบิดตัว flange ที่อยู่ทางด้านหลังมีความยาวและความกว้างมากกว่า flange ที่อยู่ทางด้านหน้าอย่างเห็นได้ชัด รูเปิดของท่อนำเชื้ออยู่ในแอ่งซึ่งกว้างและตื้นมาก thumb มีขนาดใหญ่และยาวเห็นได้ชัดเจน ปลายอวัยวะสืบพันธุ์ไม่เป็นท่อยื่นยาวออกไป

ลักษณะเด่นของตัวเมีย บริเวณขอบของรูเปิดอวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะลาดลงไป และบริเวณขอบรูมีสีน้ำตาล

สี ตัวผู้ กระดองสีเทาหรือดำ และมักสลับด้วยลวดลายคาดขวางสีขาวหรือเทา maxilliped และ pterygostomium region มีสีขาวหรือเทา บางครั้งพบว่ากระดองมีสีเทา ฟ้าอ่อน หรือขาว ซึ่งมักจะสลับด้วยสีดำเป็นลายหินอ่อนงดงาม ก้านตาสีเทา ขาและก้ามข้างเล็กมีสีเทาและมักจะมีจุดเล็กๆ สีขาวอยู่ทั่วไป บริเวณโคนขาและโคนก้ามข้างเล็กอาจมีสีส้ม ก้ามข้างใหญ่มีสีชมพูหรือส้มอ่อน propodus และ dactylus เป็นสีขาวหรือเทา บริเวณใต้ขอบบนของ manus มักมีสีเข้มกว่าบริเวณอื่นของ manus บางตัวมีสีขาวล้วนทั้งตัว

ตัวเมีย กระดองมีสีเทา เหลือง หรือขาว บางตัวกระดองมีสีดำและสลับด้วยลวดลายสีขาว บริเวณขอบหลังของกระดอง maxilliped และ pterygostomium region มีสีขาว บางตัวกระดองมีสีน้ำตาลอ่อน และส่วนหลังของกระดองเป็นสีขาว ขาสีดำ น้ำตาล น้ำตาลแดง หรือขาวทุกขา บางตัวขาบางคู่มีสีไม่เหมือนกับขาคู่อื่น หรือขาข้างเดียวกันมี 2 สี เช่น โคน merus มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนที่เหลือมีสีขาวเป็นต้น ก้านตามีสีเทา

ถิ่นอาศัย

ชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ ริมธารน้ำ ลำคลองหรือหนองน้ำ ที่อยู่ใกล้กับทะเลซึ่งเป็นดินทรายปนโคลน ขุดรูอยู่ในบริเวณที่มีรากต้นแสมโผล่จากดิน

การกระจาย

ฝั่งทะเลด้านตะวันออกเฉียงใต้ของอินเดีย ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ซาราวัค ฟิลิปปินส์ นิวกีนี ฝั่งทัเลด้านตะวันออกของออสเตรเลีย เกาะต่างๆ ทางตอนใต้ของมหาสมุทรแปซิฟิค

ชนิดของปูในวงศ์ Parathelphusidae

1. *Somanniathelphusa germaini* (ถวิล ประมวล. 2533 : 31-33)

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda

Family	Parathelphusidae
Genus	*Somanniathelphusa*
Species	germaini

ชื่อสามัญ ปูนา ปูนาม่วง

ลักษณะเด่น

กระดองโค้งนูนและตกกระทั่วไป ส่วนของ antero-lateral border มีหนามแหลมคล้ายฟันเลื่อยข้างละ 4 อัน epigastric crest และ post-orbital crest เด่นชัด post-orbital crest จะเหลื่อมกับ epigastric crest เพียงเล็กน้อย ซึ่ง post-orbital crest จะยาวไปจนถึงฐานของ epibranchial tooth อันสุดท้าย gonopod คู่ที่ 1 ฐานจะกว้าง ส่วนปลายจะงอเพียงเล็กน้อย

ลักษณะทั่วไป

กระดองนูนและค่อนข้างเรียบ ขอบหน้าเกือบตรง ส่วนของ antero-lateral border มีหนามแหลมคล้ายฟันเลื่อยข้างละ 1 อัน ซึ่งรวมทั้ง exorbital tooth และ epibranchial tooth อันสุดท้ายด้วย epigastric crest และ post-orbital crest เด่นชัด post-orbital crest เป็นแนวยาวจนถึงฐานของ epibranchial tooth อันสุดท้าย H-groove semicircular groove และ cervical groove เด่นชัด แต่ภายในของ cervical groove จะมีจุด 2 จุด สีของกระดองมีตั้งแต่ สีดำ ม่วงดำ เทาเหลือง หรือผสมกัน บางทีก็มีประเป็นจุดขาวๆ บนกระดองด้านหลังหรือขึ้นกับสภาพแวดล้อม ขนาดของกระดองมีความกว้างประมาณ 40-60 มิลลิเมตร

ก้ามหนีบผิวเรียบ และ dactylus มีความยาวมากกว่าความยาวของ carpus merus มี predistal spine 1 อัน carpus มี inner spine 1 อัน ก้ามหนีบมีฟันที่มีขนาดแตกต่างกันอยู่ที่ส่วนกลางของ dactylus มีสีตั้งแต่ สีดำ ม่วงดำ เทา และเหลือง หรือผสมกันไป ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ในเพศเมียก้ามหนีบทั้ง 2 ข้างมีขนาดใกล้เคียงกัน

ขาเดินลักษณะเรียวยาว ขาเดินคู่ที่ 3 จะยาวกว่าขาเดินคู่ที่ 2 4 และ 5 merus จะยาวมีหนามบริเวณใกล้ส่วนปลายของ merus 1 อัน dactylus จะเรียวเล็กปลายแหลม มีหนามเล็กๆ อยู่เป็นจำนวนมาก

ส่วนท้องเพศผู้มีลักษณะเป็นรูปตัว T ปล้องที่ 6 ด้านหน้ามีความกว้างน้อยกว่าด้านหลัง ปล้องที่ 6 และปล้องที่ 7 มีความยาวใกล้เคียงกัน

การกระจาย

ราชบุรี นครสวรรค์ เพชรบุรี กำแพงเพชร สุพรรณบุรี กาญจนบุรี พิษณุโลก นครนายก ชุมพร พิจิตร จันทบุรี สงขลา อุทัยธานี นครศรีธรรมราช ตราด สระบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง ปราจีนบุรี ลพบุรี เพชรบูรณ์ และเชียงราย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวสุณีรัตน์ ศรัทธามั่น
วันเดือนปีเกิด	7 กันยายน 2522
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลศิริราช
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 179/3 แขวงท่าพระ เขตบางกอกใหญ่ จังหวัดกรุงเทพฯ 10600
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2538	มัธยมศึกษาปีที่ 6 (แผนกวิทย์-คณิต) จากโรงเรียนมัธยมวัดดุสิตาราม
พ.ศ. 2543	วท.บ. (ชีววิทยา) จากสถาบันราชภัฏ บ้านสมเด็จเจ้าพระยา
พ.ศ. 2547	กศ.ม. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ