

ศักยภาพในการเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูวงศ์ Grapsidae, Paguridae
Ocypodidae และ Parathelphusidae

ปริญญานิพนธ์

ของ

รัตนา จิตรขำ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ตุลาคม 2550

ศักยภาพในการเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูวงศ์ Grapsidae, Paguridae
Ocypodidae และ Parathelphusidae

ปริญญานิพนธ์

ของ

รัตนา จิตรขำ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ตุลาคม 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ในการปฏิบัติงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ทรรศनिया ศักดิ์ดี ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. นันทิกา คงเจริญพร สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณสมบัติ รักประธานพร ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องการปฏิบัติการคุณธรรณ เตชะกุล ที่ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณเพ็ญจันทร์ โพธิ์ย้อย คุณฝน ต้นสกุล และทุกคนในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดีของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับน้ำใจอันมีค่ายิ่ง อีกทั้งความช่วยเหลือต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งทางตรงและทางอ้อม

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา พี่ น้อง ที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือสนับสนุนตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอโน้มนำประโยชน์ทั้งหลายอันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ผู้ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

รัตนา จิตรข้า

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัย.....	4
ความสำคัญของการศึกษาวิจัย.....	4
ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	5
สมมติฐานในงานวิจัย.....	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
สัตว์ทดลอง.....	16
วิธีดำเนินการทดลอง.....	20
4 ผลการทดลอง.....	30
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	63
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก.....	74
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	97

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงอุณหภูมิ ระยะเวลา และจำนวนรอบในแต่ละชั้นการทำงาน ของปฏิกิริยา PCR.....	23
2 แสดงชนิดปูที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ และนำมาชักนำให้ติดเชื้อ ไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดและเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ.....	43
3 สรุปศักยภาพในการเป็นพาหะไวรัสตัวแดงดวงขาวของปูในวงศ์ Grapsidae Paguridae, Ocypodidae และ Parathelphusidae โดยการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ในปูชนิดต่าง ๆ	66

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงการตรวจผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis	25
2 แสดงการหยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่งในการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว.....	28
3 แสดงลักษณะของปู <i>Metopograpsus latifrons</i>	32
4 แสดงลักษณะของปูแสม <i>Sesarma mederi</i>	33
5 แสดงลักษณะของปูของจาก <i>Sesarma polita</i>	34
6 แสดงลักษณะของปู <i>Sesarma bocourti</i>	35
7 แสดงลักษณะของปูแสม <i>Sesarma moeschii</i>	36
8 แสดงลักษณะของปูเสฉวน <i>Clibanarius longitarsus</i>	37
9 แสดงลักษณะของปูก้ามดาบ <i>Uca lactea</i>	38
10 แสดงลักษณะของปูก้ามดาบ <i>Uca forcipata</i>	39
11 แสดงลักษณะของปูนา <i>Somanniathelphusa germaini</i>	40
12 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปู <i>Metopograpsus latifrons</i> ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29	45
13 PCR ของปู <i>Metopograpsus latifrons</i>	46
14 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูแสม (<i>Sesarma mederi</i>) ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29	47
15 PCR ของปูแสม (<i>Sesarma mederi</i>).....	48
16 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูของจาก (<i>Sesarma polita</i>) ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29	49
17 PCR ของปูของจาก (<i>Sesarma polita</i>).....	50

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
18 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปู <i>Sesarma bocourti</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29	51
19 PCR ของปู <i>Sesarma bocourti</i>	52
20 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูแสม (<i>Sesarma moeschii</i>) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29.....	53
21 PCR ของปูแสม (<i>Sesarma moeschii</i>).....	54
22 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูเสฉวน (<i>Clibanarius longitarsus</i>) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29.....	55
23 PCR ของปูเสฉวน (<i>Clibanarius longitarsus</i>).....	56
24 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูก้ามดาบ (<i>Uca lactea</i>) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29.....	57
25 PCR ของปูก้ามดาบ (<i>Uca lactea</i>).....	58
26 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูก้ามดาบ (<i>Uca forcipata</i>) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29.....	59
27 PCR ของปูก้ามดาบ (<i>Uca forcipata</i>).....	60
28 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูนา (<i>Somanniathelphusa germaini</i>) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29.....	61
29 PCR ของปูนา (<i>Somanniathelphusa germaini</i>).....	62

ศักยภาพในการเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูวงศ์ Grapsidae, Paguridae
Ocypodidae และ Parathelphusidae

บทคัดย่อ
ของ
รัตนา จิตรขำ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ตุลาคม 2550

รัตนา จิตรขำ. (2550). ศักยภาพในการเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูวงศ์

Grapsidae, Paguridae, Ocypodidae และ Parathelphusidae.

ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทร

วิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล

ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล

จากการรวบรวมปูวงศ์ Grapsidae 5 ชนิด ได้แก่ *Metopograpsus latifrons*, *Sesarma mederi*, *Sesarma polita*, *Sesarma bocourti*, *Sesarma moeschii* ปูวงศ์ Paguridae 1 ชนิด *Clibanarius longitarsus* ปูวงศ์ Ocypodidae 2 ชนิด *Uca lactea*, *Uca forcipata* และปูวงศ์ Parathelphusidae 1 ชนิด ได้แก่ *Somanniathelphusa germaini* จากแหล่งน้ำจืดและเขตป่าชายเลน บริเวณใกล้เคียงกับแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำในจังหวัดสมุทรปราการและนำมาตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติ หรือการทดลองฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวก่อนนำมาตรวจการติดเชื้อที่เวลา 3 7 10 และ 15 วัน ด้วยวิธี PCR และ immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ซึ่งจำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างขนาด 28 kDa พบว่าปูที่จับจากธรรมชาติไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูทุกชนิดจากการตรวจทั้งสองวิธี หลังจากการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 3 วัน พบการติดเชื้อในปูเกือบทุกชนิดยกเว้นปูก้ามดาบ *U. lactea* ที่ไม่พบการติดเชื้อ ปูที่ติดเชื้อทุกชนิดจะมีสัดส่วนการติดเชื้อที่ลดลงในวันต่อมาหลังการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งการตรวจการติดเชื้อทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน จะเห็นได้ว่าปูเกือบทุกชนิดอาจมีกลไกในการกำจัดไวรัส ทำให้มีความทนต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้เป็นเวลานาน และอาจมีศักยภาพในการเป็นพาหะของไวรัสได้

POTENTIAL CARRIERS OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN CRAB FAMILIES:
GRAPSIDAE, PAGURIDAE, OCCYPODIDAE AND PARATHELPHUSIDAE

AN ABSTRACT

BY

RATTANA CHITKHAM

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Education Degree in Biology
at Srinakharinwirot University

October 2007

Rattana Chitkham. (2007). *Potential Carriers of White Spot Syndrome Virus in Crab Families: Grapsidae, Paguridae, Ocypodidae and Parathelphusidae*. Master thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assoc. Prof. Dr. Weerawan Sithigorngul, Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul.

Five species of grapsid crab: *Metopograpsus latifrons*, *Sesarma mederi*, *Sesarma polita*, *Sesarma bocourti*, *Sesarma moeschii*; one species of pagurid crab: *Clibanarius longitarsus*; 2 species of ocypod crab: *Uca lactea*, *Uca forcipata*; and one species of parathelphusid crab: *Somanniathelphusa germaini* were collected from freshwater and mangrove areas nearly *Peneaus monodon* farms in Samutprakan province. Parts of the crabs were determined for natural infection with white spot syndrome virus (WSSV) by PCR and immunohistochemistry using W29 monoclonal antibodies specific to VP28 structural protein. No natural infection was found by both methods. The remaining crabs were injected with WSSV and determined for WSSV infection at 3 7 10 and 15 days after injection. At 3 days post injection, most crab species except *U. lactea* demonstrated WSSV infection by both methods and the proportion of crabs infection with WSSV was reduced as the time after injection increased. This evidence indicated that most crab species might have mechanism that could eliminate viral infection that made them resisted to WSSV infection and remained alive for a long period and might be served as potential carrier for WSSV.

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำนับว่ามีบทบาทสำคัญต่อการสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศและยังมีส่วนในการจ้างแรงงานมีผลต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ (ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์. 2544: 8) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 จนถึงปัจจุบันมีมูลค่าการส่งออกกุ้งกุลาดำในแต่ละปีหลายหมื่นล้านบาท (ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543: 202) โดยในปี พ.ศ. 2546 ระหว่างเดือนมกราคม-พฤศจิกายน มีการส่งออกกุ้ง 213,684 ตันเป็นมูลค่า 66,599 ล้านบาท แต่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำมักประสบปัญหาเรื่องโรคในการเลี้ยงตลอดมา (วัชรียา ภูววิโรจน์กุล; สุรพล วิเศษสรรค์ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2547: 22) สาเหตุการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำมาจากโปรโตซัว แบคทีเรีย และไวรัส เช่น โรคที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. (Vibriosis) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรืองแสง (จันทนา นิธิเมธาสัย. 2539: 1) และโรคที่เกิดจากไวรัส ได้แก่ โรคหัวเหลือง (Yellow-head disease) ซึ่งระบาดตั้งแต่ช่วงปลายปี พ.ศ.2533 ในประเทศไทยมีการระบาดครั้งแรกในภาคกลางในช่วงปลายปีพ.ศ. 2523 (จิราพร เกษรจันทร์; และ สิริทิ บุญยรัตผลิน. 2538: 2) สร้างความเสียหายอย่างรวดเร็วในระยะเวลานั้น มีรายงานการพบโรคนี้ครั้งแรกที่ไต้หวันในปี ค.ศ.1992 (Chou et al; 1995: 133-141) จากนั้นได้มีรายงานการระบาดทั่วไปในกลุ่มประเทศที่มีอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง สำหรับประเทศไทยพบการระบาดของไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในฟาร์มกุ้งกุลาดำที่อำเภอระโนด และอำเภोजะนะ จังหวัดสงขลา รวมถึงอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง (Kasornchadra & Boonyaratpalin. 1994: 9-11) โดยเกิดขึ้นในกุ้งอายุประมาณ 2 เดือน สร้างความเสียหายอย่างมากให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในภาคใต้ ภาคตะวันออกแถบจังหวัดจันทบุรี และตราด ถึงแม้ว่าจะมีการระบาดของโรคในภาคใต้ ได้แก่ นครศรีธรรมราช ตรัง สงขลา สตูล สุราษฎร์ธานีและปัตตานี เมื่อปี พ.ศ. 2538 บริเวณการระบาดของโรคก็แพร่กระจายไปถึง จังหวัดระนอง กระบี่ พังงา ภูเก็ตและจังหวัดอื่น ๆ ที่มีการเลี้ยงกุ้ง (อมรรัตน์ อังอัฉริยะ. 2544: 13)

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus) เป็นไวรัสที่ก่อโรคในกุ้งสกุล *Penaeus* ซึ่งเป็นกุ้งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งอย่างมาก ไวรัสนี้สามารถก่อให้เกิดการตายของกุ้ง 100% ภายในเวลา 3-10 วันหลังการตรวจพบการติดโรค ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถติดต่อกันในกุ้งที่สำคัญทางเศรษฐกิจเกือบทุกชนิด (Lightner. 1996) ทั้งกุ้งทะเลและกุ้งน้ำจืด และตรวจพบใน

คริสต์เขียนหลายชนิดทั้งที่อาศัยในน้ำทะเลและน้ำจืด นอกจากนี้พบว่าปูมีแนวโน้มในการเป็นพาหะนำไวรัสสูงเนื่องจากพฤติกรรมการดำรงชีวิต ความทนทานต่อโรคและสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง (Supamattaya et al; 1998: 79-85) ซึ่งสัตว์เหล่านี้สามารถเป็นพาหะนำโรคสู่กุ้งได้ (Kanchanaphum et al; 1998: 1-7)

เนื่องจากไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นโรคที่ยังไม่มีวิธีการรักษา จึงหาวิธีป้องกันอย่างง่าย ๆ หลายวิธี ได้แก่ การเตรียมบ่อให้เหมาะสมและถูกสุขลักษณะ ปริมาณกุ้งที่เหมาะสมต่อหนึ่งบ่อเลี้ยง การป้องกันพาหะตามธรรมชาติของโรคตัวแดงดวงขาว เช่น ปู และอาร์โทรพอดอื่น ๆ การเลือกชนิดอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง โดยได้แนะนำให้หลีกเลี่ยงอาหารสด เช่น ปูสด ปลาสด หรือหอยสดซึ่งอาจเป็นพาหะการเพาะเลี้ยงในระบบปิด การทำการตรวจคุณภาพน้ำสม่ำเสมอ (Kasornchandra & Boonyaratpalin.1994: 9-11) นอกจากนี้ กุ้งที่นำมาเลี้ยงอาจได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยกุ้งก่อนนำมาเลี้ยงจึงเป็นการป้องกันการเสียหายที่ดีและมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

จากเหตุผลดังกล่าว จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ไวรัสตัวแดงดวงขาวขึ้นหลายวิธี เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน (Chang, et al 1996: 131-139, Lightner & Redmen. 1998: 201-220, Kasornchandra, et al 2002: 32-41, Chen, et al 2000: 157-161) PCR เป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรม (nucleic acid) ของไวรัสโดยตรงจึงมีความไวสูง โดยสามารถตรวจพบการติดเชื้อตั้งแต่ในระยะแรก นอกจากนี้วิธี PCR ใช้เวลาในการตรวจสอบเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวินิจฉัยแบบอื่นๆ เช่น การวินิจฉัยจากอาการที่ปรากฏ (symptomatic diagnosis) และการตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อ (histological examination) (Wongteerasupaya, et al 1995: 69-77, Lightner & Redman 1998: 201-220, Mohan, et al 1998: 9-12, Park, et al 1998: 71-75) ซึ่งวิธีการดังกล่าวนอกจากต้องใช้เวลาในการที่มีประสบการณ์แล้ว การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสในระยะแรกก็ทำได้ยากเนื่องจากจำนวนไวรัสต่ำ นอกจากนี้อาการของโรคที่ปรากฏอาจมาจากสาเหตุอื่น เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียซึ่งอาจทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ แม้การวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR จะเป็นวิธีที่มีความไวสูงในการตรวจวิเคราะห์ แต่ยังมีข้อจำกัดในทางปฏิบัติทั้งนี้เนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์พิเศษและบุคคลที่มีความชำนาญ นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ยังมีราคาสูง รวมทั้งไม่สามารถรับรองความแม่นยำและไม่สามารถนำผลมาเทียบเคียงระหว่างห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากวิธีการที่แตกต่างกันอาจให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันได้ซึ่งจะก่อให้เกิดความสับสนในการแปลผล

กระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นวิธีการที่มีความสะดวกและความแม่นยำสูง ดังนั้นวิธีการนี้จึงได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์จำนวนมาก และได้เกิดความพยายามนำกระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยามาใช้สำหรับตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว (Nadala et al; 1997:141-146; 2000 175-179) แต่วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยานี้มีข้อจำกัด คือ ประสิทธิภาพการใช้งานไม่ดี เนื่องจากแอนติบอดีที่ผลิตได้อาจทำปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนของกุงและความไวในการตรวจโรคค่อนข้างต่ำ ในปัจจุบันได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: MAbs) โดยใช้ไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์เป็นแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถใช้ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และตรวจการติดเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry และ immunofluorescence ได้ดี แต่ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของไวรัสสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ (Poulos et al; 2001: 13-23 , Anil et al ; 2002: 67-75)

จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางทำให้ทราบข้อมูลอื่นต่าง ๆ ของไวรัส (Van Hulten et al; 2000a: 227-236) และสามารถจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนโครงสร้างของไวรัส 5 ชนิดด้วยกัน คือ VP28, VP26, VP24, VP19 และ VP15 โดย VP26, VP24 และ VP15 เป็นองค์ประกอบของนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ส่วน VP28 และ VP19 เป็นส่วนประกอบของโปรตีนเปลือกนอก (enveloped protein) (Van Hulten et al; 2000b: 100-110, Van Hulten et al; 2001: 228-233) ข้อมูลดังกล่าวได้นำมาใช้ในการผลิต recombinant protein ขององค์ประกอบส่วนเปลือกของไวรัสได้แก่ VP28 เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตำแหน่ง (epitope) ที่ต่างกัน ซึ่งสามารถใช้เพื่อพัฒนาวิธีการ antigen-capture ELISA สำหรับตรวจไวรัสจากเลือด (hemolymph) และสารสกัดจากเนื้อเยื่อที่มีความไวของการตรวจเทียบเคียงกับวิธี PCR (Liu et al; 2002: 11-18)

มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวขึ้น โดยนำยีนของโปรตีน VP28 และ VP28F118 (โปรตีน VP28 ที่ปราศจากส่วน transmembrane) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนส่วนเปลือก (envelope) ของไวรัสตัวแดงดวงขาวมาโคลนเข้าสู่ expression vector (p QE300) และนำเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ M15 (p REP4) สามารถสร้างโปรตีน VP28 และ VP28F118 ที่มีขนาดประมาณ 28 และ 23 kDa ตามลำดับและเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดย SDS-PAGE สามารถผลิตโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงซึ่งนำไปฉีดให้หนูขาวสำหรับนำไปสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ rVP28 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถจับกับโปรตีน VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในเลือดกุงที่มีการ

ติดเชื้อโดยวิธี dot-blot และ Western blot และสามารถนำมาใช้ตรวจหาการติดเชื้อในเนื้อเยื่อกุ้งโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (Chaivisuthangkura et al; 2004: 359-363)

ในการวิจัยนี้จะเลือกใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวร่วมกับวิธี immunohistochemistry ในการตรวจสอบก่อนในขั้นแรกและยืนยันผลการทดลองด้วยการใช้วิธี PCR มาเป็นเครื่องมือตรวจสอบการติดไวรัสในปูบางชนิดที่มักพบบ่อย ๆ ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากคาดว่าปูดังกล่าวอาจจะเป็นพาหะนำไวรัสได้

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อสำรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติของปูชนิดต่าง ๆ จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและการติดเชื้อจากการทดลองโดยฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กับปูชนิดต่าง ๆ

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของปูที่อาจเป็นพาหะนำไวรัสตัวแดงดวงขาว
2. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการวางแผนการป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. สำรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวของปูชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Grapsidae, Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae ในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอเมืองและอำเภอสระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ โดยจำนวนปูแต่ละชนิดประมาณ 15-20 ตัว
2. เหมียวนำการติดไวรัสโดยการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Grapsidae Paguridae, Ocypodidae และ Parathelphusidae โดยจำนวนปูแต่ละชนิดประมาณ 15-20 ตัว
3. ตรวจหาการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติ และการติดไวรัสโดยการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวของปูชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Grapsidae, Paguridae, Ocypodidae และ Parathelphusidae โดยวิธี indirect peroxidase immunohistochemistry
4. ยืนยันผลการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Grapsidae, Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae ที่เหมียวนำการติดไวรัสด้วยวิธีการฉีด โดยวิธี PCR ในการตรวจสอบ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. **ศัพท์ที่ 1 White Spot Syndrome Virus (WSSV)** หมายถึง ไวรัสตัวแดงดวงขาว มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งขนาด 275x120 นาโนเมตร รูปท่อนอัดตัวแน่นภายใต้เยื่อหุ้ม 3 ชั้น (trilaminar envelope) นิวคลีโอแคปซิดที่ปราศจากเยื่อหุ้มมีขนาด 300 x70 นาโนเมตร ภายในนิวคลีโอแคปซิดบรรจุด้วย DNA เส้นคู่เชื่อมต่อกันเป็นวง เปลือกหุ้มไวรัสประกอบด้วยโปรตีนหลัก ๆ 2 ชนิดคือโปรตีนที่มีขนาด 28 kDa และ 19 kDa ในขณะที่นิวคลีโอแคปซิดประกอบด้วยโปรตีนหลัก ๆ 3 ชนิดที่มีขนาด 15 kDa 24 kDa และ 26 kDa (Wang; et al. 1995: 239-242, Van Hulten; et al. 2001: 228-233)

2. **ศัพท์ที่ 2 Indirect peroxidase immunohistochemistry** หมายถึง เทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนซึ่งก็คือเชื้อไวรัสภายในเนื้อเยื่อของสัตว์ อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อกัน โดยเทคนิคนี้ใช้เป็นวิธีแบบอ้อม (indirect) คือใช้แอนติบอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ horseradish peroxidase มาจับกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง จากนั้นเติมสับสเตรต คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และสารที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ได้แก่ 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ปฏิกิริยาที่ได้เกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) กลายเป็นผลผลิต (product) ได้แก่ ออกซิเจน (O_2) และ น้ำ (H_2O) ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะไปทำปฏิกิริยากับ DAB เปลี่ยนสถานะจากสารละลายเป็นตะกอนจับอยู่ที่บริเวณแอนติบอดีจับกับแอนติเจนทำให้เกิดการติดสีบริเวณที่มีแอนติเจนอยู่ หลังจากนั้นจึงย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีอีมาทอกไซลิน (Hematoxylin) ซึ่งจะติดสีน้ำเงินบริเวณนิวเคลียสและอีโอซิน (Eosin) จะติดสีแดงบริเวณไซโทพลาซึม ทำให้สามารถมองเห็นและระบุชนิดเนื้อเยื่อโดยรอบได้ ซึ่งวิธีนี้ยังช่วยให้เพิ่มความไวในการติดสี เนื่องจากมีแอนติบอดีตัวที่สองจำนวนมากสามารถจับแอนติบอดีตัวที่หนึ่งแต่ละตัว จึงเป็นการเพิ่มจำนวนโมเลกุลที่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่ตำแหน่งที่แอนติบอดีจับอยู่ และไม่เกิดความยุ่งยากต่อการนำเอนไซม์ไปติดกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่ผลิต และมีปริมาณอยู่จำกัดด้วย (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76)

3. **ศัพท์ที่ 3 Polymerase Chain Reaction (PCR)** หมายถึง วิธีการสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สนใจในห้องปฏิบัติการได้อย่างรวดเร็วไม่ว่าจะเป็นไวรัส แบคทีเรีย หรือสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยอาศัยหลักการ DNA replication ใช้ไพรเมอร์ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (Oligonucleotide primer) สายสั้น ๆ ประมาณ 15-40 เบส ที่มีความสอดคล้องกับ DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวน ในการเพิ่มปริมาณ DNA จะเติมเอนไซม์ DNA polymerase เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้นได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาสั้น

สมมติฐานในการวิจัย

ปูในวงศ์ Grapsidae, Paguridae, Ocypodidae และ Parathelphusidae ที่อาศัยอยู่ในแหล่ง
เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอาจจะมีการติดโรคตัวแดงดวงขาว และมีศักยภาพในการเป็นพาหะโรคตัวแดงดวงขาว
ได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome)

กุ้งที่เป็นโรคนี้จะมีอาการตัวแดงและมีจุดขาวในเปลือกและผิวหนังของกุ้ง กุ้งที่ปรากฏอาการดวงขาวนั้นไม่ได้เป็นอาการระยะสุดท้ายของการได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวเสมอไป ตัวอย่างเช่น กุ้งที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวและมีอาการลำตัวเป็นดวงขาวอาจจะมีชีวิตอยู่รอดได้ถ้าเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ก่อให้เกิดอาการเครียดแก่กุ้ง อย่างไรก็ตาม ถ้ากุ้งได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น กุ้งมีอาการเฉื่อยชาไม่กระปรี้กระเปร่า เชื่องซึม ลำตัวมีสีชมพูถึงสีน้ำตาลแดงรวมทั้งลอยตัวอยู่ริมขอบบ่อ ในระหว่างนี้ กุ้งจะกินอาหารได้น้อยลง ต่อมาก็จะมีอัตราการตายสูงภายใน 2-3 วัน และอาจทำให้กุ้งตายได้ทั้งหมด ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากมาย และจนกระทั่งบัดนี้ยังไม่มีรายงานการต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ของกุ้งสปีชีส์ต่าง ๆ ทั้งในได้วันหรือจากแหล่งอื่น ๆ (Lightner. 1996) ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถติดเชื้อในโฮสต์ได้หลายชนิดไม่ใช่เฉพาะกุ้งเท่านั้น แต่ยังรวมถึงปู และอาร์โทรพอดอื่น ๆ ด้วย เช่น copepods แมลง (Lo et al; 1996: 133-141, Chen et al; 2000: 157-161)

สัณฐานวิทยาของไวรัสตัวแดงดวงขาว

ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นไวรัสที่มีขนาดใหญ่ มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่เชื่อมต่อกันเป็นวง (dsDNA) (Chou et al; 1995: 133-141, Chang et al; 1996: 131-139) จัดอยู่ใน Family Nimaviridae Genus *Whispovirus* เนื่องจากไวรัสมีส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (Nima เป็นภาษาลาตินหมายถึงหาง) และเป็นสายพันธุ์เดียวของวงศ์นี้ ชื่ออื่น ๆ ที่มีรายงานในการวิจัยต่าง ๆ นอกจาก WSSV (White Spot Syndrome Virus) คือ HHNBV (Hypodermic and Hematopoietic Necrosis baculovirus), RV-JP (Rod Shaped virus of *Penaeus japonicus*), SEMBV (Systemic ectodermal mesodermal baculovirus) และ WSBV (White spot baculovirus) (Chou et al; 1995: 133-141, Wang et al; 1995: 297-302 and Lo et al; 1996: 133-141) ไวรัสตัวแดงดวงขาวมีขนาดใหญ่ รูปไข่ (Chou; et al. 1995: 133-141) มีขนาดประมาณ 275×120 นาโนเมตร ที่ปลายด้านหนึ่งของไวรัสมีส่วนของรยางค์ที่ยื่นออกมา ลักษณะคล้ายหาง (tail like) ไวรัสประกอบด้วยนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) รูปท่อนซึ่งอัดตัวแน่นภายใต้เยื่อหุ้ม 3 ชั้น นิวคลีโอแคปซิดที่ปราศจากเยื่อหุ้มมีขนาด 300×70 นาโนเมตร ไวรัสประกอบด้วย polypeptide สำคัญ ๆ อย่างน้อย 5 ชนิด ที่มีขนาดต่าง ๆ ระหว่าง 15-28 kDa

สปีชีส์และลักษณะของปูในวงศ์ Grapsidae, Paguridae, Ocypodidae และ Parathelphusidae

สปีชีส์ของปู

ชนิดของปูในวงศ์ Grapsidae เช่น *Metopograpsus latifrons*, *Sesarma mederi*, *Sesarma polita*, *Sesarma bocourti*, *Sesarma moeschii*

ชนิดของปูในวงศ์ Paguridae เช่น *Clibanarius longitarsus*

ชนิดของปูในวงศ์ Ocypodidae เช่น *Uca forcipata*, *Uca lactea*

ชนิดของปูในวงศ์ Parathelphusidae เช่น *Somanniathelphusa germaini*

สปีชีส์ของปูในวงศ์ Grapsidae

กระดองมีลักษณะกลมโค้งหรือคล้ายรูปสามเหลี่ยมด้านใน (front) กว้าง เบ้าตาอยู่ตรงขอบด้านหน้าของมุมกระดองด้านนอก แผ่นกั้นระหว่างหนวดคู่ที่ 1 มีลักษณะกว้าง maxilliped คู่ที่ 3 มี palp อยู่ตรงกลางหรือตรงขอบด้านนอกของ merus ส่วนของ exognath มีลักษณะกว้างหรือยาว เรียวช่องว่างระหว่าง maxilliped คู่ที่ 3 เป็นรูปสามเหลี่ยมขนมเปียกปูน ก้ามหนีบและขาเดินแข็งแรง ส่วนท้องของตัวผู้อาจแผ่ขยายเต็มหรือไม่เต็มช่องว่างระหว่างขาเดินคู่สุดท้าย ช่องเปิดเพศผู้อยู่บนปล้องอก ในประเทศไทยพบประมาณ 37 สปีชีส์ (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2516: 10; 2544: 6)

สปีชีส์ของปูในวงศ์ Paguridae

กระดองค่อนข้างยาว ส่วนหลังกระดองค่อนข้างอ่อนและมีความกว้างมากกว่าส่วนหน้ากระดอง กิริยาไม่เต็มที่ มีขนาดเล็กมาก หรือบางพวกอาจไม่มีกิริยา 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 ส่วนมากมีรยางค์ว่ายน้ำที่เจริญแล้วอยู่ทางด้านซ้ายของส่วนท้อง ส่วนท้องปล้องที่ 6 มีแพนหางด้านซ้ายขนาดใหญ่และแข็งแรงกว่าด้านขวา ในประเทศไทยพบประมาณ 3 สปีชีส์ (สุพจน์ แสงมณี. 2530: 124-125)

สปีชีส์ของปูในวงศ์ Ocypodidae

กระบอกตายาวเกือบตลอดด้านหน้าของกระดอง ขอบนอกของกระบอกตามักจะไม่สมบูรณ์ ก้านตาเรียวยาว ด้านในแคบและงุ้มลงเล็กน้อย ไรยางค์ปล้องที่ 5 ของ maxilliped คู่ที่ 3 อยู่บริเวณมุมบนอกด้านหน้าของ murus โดยทั่วไป exognath เรียวยาวและจะงุ้มงัดไว้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับแต่ละชนิด maxilliped คู่ที่ 3 ปกคลุมช่องปากไว้จนมองไม่เห็นช่องปาก ตัวผู้ก้ามข้างหนึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าอีกข้างหนึ่ง ในประเทศไทยพบประมาณ 11 สปีชีส์ (เสรี บรรพกิจตร. 2522: 22-23)

สปีชีส์ของปูในวงศ์ Parathelphusidae

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

การศึกษาและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไวรัสตัวแดงดวงขาว

แอนเดอร์สันและคณะ (Anderson; et al.1992: 265–273) ได้ตรวจพบ non-occluded baculovirus ในปูทะเล (*Scylla serrata*) และกุ้ง crayfish (*Cherax quadricarinatus*) จากประเทศออสเตรเลียทั้งในระยะวัยรุ่นและตัวเต็มวัย จากการรวบรวมกุ้งและ crayfish ทั้งหมด 61 ตัวมาศึกษาพบว่า 32 ตัว (52%) ได้รับเชื้อ baculovirus จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยนำ hepatopancreas มาทำให้คงรูป (fix) ใน Davidson's fixative และผ่านกระบวนการทาง histology โดยตัดเนื้อเยื่อหนา 5 ไมโครเมตร และย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) นอกจากนี้ยังได้มีการนำสี Giemsa Alcian blue, Gram, Feulgen และ Periodic Acid-Schiff (PAS) มาย้อมเนื้อเยื่อตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษาคุณลักษณะของอินคลูชัน (inclusion) พบว่าภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนของ crayfish มี eosinophilic inclusion และพบว่าเซลล์เยื่อบุของตับและตับอ่อนที่ได้รับเชื้อไวรัสมีนิวเคลียสขยายใหญ่กว่าเดิมถึง 2.5 เท่าของเซลล์ปกติ อินคลูชันมีสีแดงแต่บางอินคลูชันก็มีสีม่วงแดงและไม่ถูกย้อมด้วย PAS, Giemsa, Feulgen และ Alcian blue และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่านิวคลีโอแคปซิดมีรูปร่างเป็นแท่งทรงกระบอก มีขนาดโดยเฉลี่ย 34x154 นาโนเมตร

ไวรัสมีความยาว 172-220 นาโนเมตร และมีเปลือกหุ้มไวรัสปกคลุมอยู่อย่างหลวม ๆ ในปูทะเล ตรวจพบว่า 27% ของตัวอย่างที่รวบรวมได้รับเชื้อ baculovirus และมี basophilic inclusion ภายในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวของตับและตับอ่อนขยายใหญ่ขึ้นถึง 5 เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ นิวคลีโอแคปซิดมีรูปร่างเป็นแท่งทรงกระบอก เช่นเดียวกับที่พบใน crayfish มีขนาดโดยเฉลี่ย 24x205 นาโนเมตร ไวรัสมีความยาว 24x253 นาโนเมตร มีเปลือกหุ้มไวรัสและมีโครงสร้างคล้ายเส้นใยยื่นออกมาจากเปลือกหุ้มไวรัสด้วย

ซู และคณะ (Chou; et al. 1995: 165–173) พบว่ามีโรคแพรระบาดอย่างรุนแรงในกุ้ง penaeid ในประเทศไต้หวัน ซึ่งประกอบด้วยกุ้งกุลาดำ กุ้งกุลูมา และกุ้งหางแดง มีอาการคือเป็นดวงขาวบนแผ่นแก้มปิดเหงือก (carapace) รยางค์และที่ผิวภายในของลำตัวจึงเรียกไวรัสที่ทำให้เกิดลักษณะอาการที่ปรากฏนี้ว่าไวรัสตัวแดงดวงขาว กุ้งกุลูมาปกติจะแสดงอาการดวงขาวเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลูมาและกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค กุ้งที่เป็นโรคนี้อัตราการตายสะสมเป็น 100% ภายใน 5–7 วัน ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากความเครียดจากการจับและอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงร่วมด้วย จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบไวรัสซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อน (non-occluded rod-shaped viral particle) อยู่ที่ผิวหนัง (epidermis) ของกุ้งกุลูมาที่ได้รับไวรัสเองตามธรรมชาติ และจากการได้รับไวรัสจากการทดลอง ไวรัสเหล่านี้ถูกปกคลุมด้วยเปลือกหุ้มมีความยาว 330 ± 20 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 87 ± 7 นาโนเมตร ลักษณะอาการที่ปรากฏภายนอกและสัณฐานวิทยาของไวรัสมีความคล้ายคลึงกันทั้งในกุ้งที่ได้รับไวรัสเองตามธรรมชาติและกุ้งที่ถูกทำให้ได้รับไวรัส ซึ่งแสดงว่า ไวรัสรูปท่อนชนิดนี้อาจจะเป็นสาเหตุหลักที่กุ้งเป็นโรคตัวแดงดวงขาวในประเทศไต้หวัน

แซง และคณะ (Chang; et al. 1996: 131–139) ได้ตรวจเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เวลา 0, 16, 22, 52, และ 64 ชั่วโมงโดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization เนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ได้รับไวรัสซึ่งผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้วด้วย PmNOB III (*P. monodon* non-occluded baculovirus III) DNA probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin พบว่าเซลล์ที่เริ่มให้ผลบวกกับการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 16 ชั่วโมงหลังจากได้รับไวรัสคือ เซลล์ของกระเพาะอาหาร เหงือก cuticular epidermis ตับและตับอ่อน ขณะที่เวลา 22 ชั่วโมงหลังจากได้รับไวรัส จะพบที่อวัยวะน้ำเหลือง antennal gland เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด กล้ามเนื้อของ midgut และ hindgut ส่วนเนื้อเยื่อประสาทและตาประกอบและที่ 40 ชั่วโมงพบที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่พัฒนามาจาก mesoderm และ ectoderm เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อบุผิว เนื้อเยื่อประสาท และกล้ามเนื้อ โดยที่เวลา 52 และ 64 ชั่วโมง พบที่กระเพาะอาหาร เหงือก cuticular epidermis อวัยวะน้ำเหลือง เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด และ antennal gland

เนื้อเยื่อเหล่านี้กลายเป็น necrotic ส่วนอาการตัวแดงดวงขาวจะสังเกตเห็นได้เมื่อติดไวรัสไปแล้ว 40 ชั่วโมง จากนั้นกุ้งจะเริ่มตายที่เวลา 64 ชั่วโมงหลังจากได้รับไวรัส

โลและคณะ (Lo; et al. 1996: 215–225) พบไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งหลายชนิดในประเทศต่าง ๆ ของทวีปเอเชียโดยใช้วิธี PCR ที่มีความไวสำหรับตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว ทำให้ประสบความสำเร็จในการตรวจหา DNA ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งที่เพาะเลี้ยง ได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งครูลูมา กุ้งหางแดง และกุ้งตะกาด พบว่ากุ้งเหล่านี้มีอาการตัวแดงดวงขาว จากการวิเคราะห์ DNA ที่สกัดได้จากกุ้งที่เก็บรวบรวมได้โดยใช้วิธี PCR พบว่า ให้ PCR product ขนาด 1477 bp มีบางตัวอย่างคือ ปูทะเล ที่เพาะเลี้ยงได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย ขณะที่ตัวอย่างอื่น ๆ จะให้ผลบวกเช่นกันเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธี PCR ในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งก้ามกราม พบว่า กุ้งชนิดนี้ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้ทำให้คณะผู้วิจัยยืนยันว่า กุ้งที่จับได้จากธรรมชาติ นั้น ได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งครูลูมา กุ้ง *Penaeus semisulcatus* กุ้งหางแดง ปูกางเขน ปูม้า และ ปูสามจุด ซึ่งรวบรวมได้จากชายฝั่งทางใต้ของประเทศไต้หวันได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย และจากการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในอาร์โทรพอดซึ่งรวบรวมได้จากฟาร์มกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ปรากฏว่าไรน้ำ small pest (Palaemonidae shrimp) และตัวอ่อนของแมลงจำพวก Ephydriidae เป็นแหล่งสะสมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยอาจถ่ายทอดเชื้อสู่ฟาร์มกุ้งกุลาดำได้

กวง ชุง โกและคณะ (Guang-Hsiung Kou; et al. 1998: 267–271) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อของปูและกุ้งโดยใช้วิธี PCR แบ่งตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ตัวอย่างที่ให้ผล negative กลุ่ม 2 ตัวอย่างที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวเล็กน้อย และกลุ่ม 3 ตัวอย่างที่ให้ผล positive ซึ่งในกลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวจะพบเฉพาะบริเวณเหงือกเป็นส่วนใหญ่ และยังพบใน น้ำเลือด กล้ามเนื้อส่วนท้อง กระเพาะอาหาร pleopods หัวใจ midgut ผิวหนัง pereopods ก้ามตา ตับและตับอ่อน ส่วนในปูที่พบการแพร่กระจายของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้แก่ *Charybdis deriatus*, *Charybdis natator*, *Portunus pelagicus*, *Portunus sanguinolentus* ซึ่งได้ตรวจสอบเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี PCR ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 คือ ให้ผลเป็นบวกซึ่งจะพบการแพร่กระจายของไวรัสตัวแดงดวงขาวมากโดยเฉพาะบริเวณเหงือก และอวัยวะอื่น ๆ ตามลำดับได้แก่ กระเพาะอาหาร ก้ามตา maxillipeds หัวใจ ผิวหนัง อวัยวะสืบพันธุ์ midgut กล้ามเนื้อส่วนท้อง เนื้อเยื่อประสาท ตับและตับอ่อน

ชาฮู ฮามีต, ชาลีส์ และ แอนนิคุมา (Sahul Hameed; Charies; & Anilkumar 2000: 207-213) ได้ตรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งน้ำจืด 3 ชนิดได้แก่ *Macrobrachium idella*, *M. lamerrae* และ *M. rosenbergii* โดยทดสอบ 3 วิธีคือ การจุ่ม การกิน และการฉีด ซึ่งได้ทดลองเปรียบเทียบกับกุ้งน้ำเค็ม 2 ชนิดได้แก่ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และ *P. indicus* พบว่ากุ้ง *M. idella*, *M. lamerrae* ที่ทดสอบโดยการจุ่มมีอัตราการตาย 43.3% และ 53.3% การทดสอบโดยการกินมีอัตราการตาย 53.3% และ 66.7% ส่วนการทดสอบโดยการฉีดมีอัตราการตาย 100% ในกุ้ง *M. idella*, *M. lamerrae*, *P. indicus* และ *P. monodon* จากการนำกุ้งที่กำลังจะตายมาตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี Western blotting หรือทาง histopathology พบการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งน้ำเค็มและกุ้งน้ำจืด ยกเว้นกุ้งก้ามกรามเท่านั้น ซึ่งกลไกของความทนทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งก้ามกรามยังไม่เป็นที่ทราบต้องศึกษาต่อไป

จิราพร เกสรจันทร์และคณะ (2543: บทคัดย่อ) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ของการถ่ายทอดไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพ่อแม่กุ้งกุลาดำสู่ลูกกุ้ง โดยตรวจสอบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างพ่อแม่กุ้งและลูกกุ้งระยะต่าง ๆ ที่ได้จากการเพาะฟักด้วย PCR *in situ* hybridization และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบ่งพ่อแม่กุ้งที่ผ่านการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวออกเป็น 5 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะกินเนื้อปูติดไวรัสวันละ 1 มื้อ ติดต่อกันเป็นเวลา 2, 3, 4 และ 5 วันตามลำดับ ส่วนกุ้งกลุ่มควบคุมให้กินเนื้อปูที่ไม่มีเชื้อไวรัส ตรวจสอบการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ในแม่กุ้งก่อนวางไข่ 1 วันด้วยวิธี PCR ผลปรากฏว่าแม่กุ้งที่กินเนื้อปู 2 วันให้ผลบวก และแม่กุ้งที่กินเนื้อปูติดต่อกัน 3, 4 และ 5 วันให้ผลบวกเช่นกัน โดยยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในแม่กุ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและวิธี *in situ* hybridization พบไวรัสตัวแดงดวงขาวในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) follicle cells เซลล์ไข่อ่อน และไข่ที่กำลังพัฒนา (yolk oocyte) โดยล้างไข่กุ้งที่ได้ในน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนประมาณ 3-4 ครั้ง แล้วเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งได้ลูกกุ้งระยะโพสท์ลาร์วา และเก็บตัวอย่างลูกกุ้งระยะต่าง ๆ คือ นอเพลียส ชูเอีย ไมซิส และโพสท์ลาร์วา-15 เพื่อตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี PCR และ *in situ* hybridization ปรากฏว่าลูกกุ้งระยะนอเพลียสและชูเอียที่ได้จากแม่กุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวเพียงเล็กน้อย เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR ให้ผลเป็นบวก สำหรับลูกกุ้งกลุ่มที่เหลือทั้งหมดให้ผลบวกเช่นกัน ส่วนแม่กุ้งที่กินเนื้อปูติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน ไข่กุ้งจะไม่ฟักเป็นนอเพลียส ขณะที่แม่กุ้งที่กินเนื้อปูติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ไข่กุ้งจะฝ่อ เนื่องจากไข่กุ้งดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นไข่ที่สมบูรณ์ได้ สำหรับการตรวจด้วยวิธี *in situ* hybridization พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในลูกกุ้งระยะไมซิสและโพสท์ลาร์วา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่สู่ลูกกุ้งกุลาดำ (vertical transmission) โดยเชื้อไวรัส

จะเกาะติดที่ผิวไข่และถูกดูดซึมเข้าสู่ภายในไข่ของกิ้งหริ่งหลังจากที่ไข่มีการพัฒนาเป็นไข่แก่ทำให้นอเพลียสที่ได้ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว

จรัสพร ตั้งขบวนบุตร (2547: บทคัดย่อ) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีขึ้นเพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยได้นำยีนของโปรตีน VP28 และ VP28F118 (โปรตีน VP28 ที่ปราศจากส่วน transmembrane) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสตัวแดงดวงขาวมาโคลนเข้าสู่ expression vector (pQE30) และนำเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ M15 (pREP4) สามารถสร้างโปรตีน rVP 28 และ rVP28F118 ที่มีขนาดประมาณ 28 และ 23 kDa ตามลำดับ และเมื่อทำให้บริสุทธิ์โดย SDS-PAGE และผลิตโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงนำไปฉีดให้หนูขาวสำหรับนำไปสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ rVP28 พบว่าผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 9 โคลน โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้จะจับกับโปรตีน VP28 ในเลือดกิ้งหริ่งที่มีการติดเชื้อโดยวิธี dot blotting และ Western blotting และนำมาใช้ตรวจหาการติดเชื้อในเนื้อเยื่อกิ้งหริ่งโดยวิธี immunohistochemistry ได้และคาดว่าสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้พัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสที่ใช้ง่าย มีความไวและแม่นยำสูง ในราคาไม่แพงต่อไปได้

เชนและคณะ (Chen; et al. 2004: 101–114) ได้ศึกษาลักษณะที่ไวต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกิ้ง 3 ชนิด *Penaeus japonicus* *P. monodon* *P. semisulcatus* โดยนำกิ้งระยะโพสท์ลาร์วา (PL₂₈) มาเหนี่ยวนำการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 2 ทางคือ โดยการกินและการจุ่ม โดยหลังจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ 15 วัน มีอัตราการตายเกิดขึ้นในกลุ่มที่กินและจุ่ม 88% และ 94% ตามลำดับ ซึ่งการติดเชื้อโดยการจุ่มจะเริ่มมีอัตราการตายก่อนการติดเชื้อด้วยการกิน ซึ่ง 1 ใน 3 ของกิ้งที่ติดเชื้อโดยการจุ่มจะรอดชีวิตเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR จะให้ผลเป็นบวก สำหรับกิ้งที่ติดเชื้อด้วยการกินมี 1 ใน 3 รอดชีวิตเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR จะให้ผลเป็นบวก สำหรับกิ้ง *Penaeus japonicus*, *P. monodon* *P. semisulcatus* ทั้งหมดที่กำลังจะตายหลังจาก 15 วัน กิ้ง *Penaeus japonicus* และ *P. monodon* จะมีอัตราการตายที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 80% เมื่อมีการตรวจสอบด้วยวิธี PCR จะให้ผลเป็นบวก แต่มีเพียงกิ้ง *P. semisulcatus* เท่านั้นที่มีอัตราการตาย 26-47% เมื่อมีการตรวจสอบด้วยวิธี PCR จะไม่ให้ผลเป็นบวก ดังนั้นสรุปได้ว่ากิ้ง *Penaeus japonicus* และ *P. monodon* มีลักษณะที่ไวต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมากกว่ากิ้ง *P. semisulcatus*

การศึกษาเกี่ยวกับพาหะของโรคตัวแดงดวงขาว

กาญจน์ภูมิ และคณะ (Kanchanaphum; et al. 1998: 1-7) ศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดไวรัสตัวแดงดวงขาวของปู 3 ชนิดที่คาดว่าจะจะเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้แก่ ปูแสม ปูทะเล และปูก้ามดาบ เหนี่ยวนำการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดให้แก่ปูทั้งหมด ผลที่ได้พบว่าตลอดระยะเวลา 45 วันของการทดลอง ปูเหล่านี้ไม่มีการตายหรือมีการแสดงออกของโรค ซึ่งตรวจสอบด้วยผลของเนื้อเยื่อวิทยา *in situ* DNA hybridization และ วิธี PCR ซึ่งพบมีไวรัสแฝงตัวอยู่ ซึ่งปูทั้ง 3 ชนิดที่เป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งกุลาดำได้ โดยผ่านทางน้ำที่อยู่ในบ่อเลี้ยงซึ่งมีการเลี้ยงกุ้งและปูร่วมกัน การถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งตรวจพบด้วยวิธี *in situ* hybridization และ PCR หลังจากปูอยู่ร่วมกันกับกุ้งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และปูก้ามดาบที่อยู่ร่วมกันกับกุ้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้วิธี PCR ซึ่งหลังจากอยู่ร่วมกัน 60 ชั่วโมงพบไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้วิธี *in situ* hybridization และปูทะเลเมื่ออยู่ร่วมกับกุ้งพบมีการถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งหลังจากอยู่ร่วมกันเป็นเวลา 36 ชั่วโมงเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR ที่ 60 ชั่วโมงพบไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้วิธี *in situ* hybridization ส่วนปูแสมเมื่อเลี้ยงรวมกับกุ้งเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยวิธี PCR และหลังจากการอยู่ร่วมกัน 72 ชั่วโมงจะพบไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยใช้วิธี *in situ* hybridization จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าปูทั้ง 3 ชนิดเป็นพาหะของโรคตัวแดงดวงขาวได้

ศุภมาตย์ และคณะ (Supamattaya; et al. 1998: 79-85) ศึกษาการเป็นพาหะไวรัสตัวแดงดวงขาวของคริสต์เซียน 3 ชนิด ได้แก่ ปูม้า ปูทะเล และเคย ที่มักพบอาศัยอยู่ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยให้เคยได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด จุ่มและการกินเนื้อของกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ส่วนปูทั้ง 2 ชนิดทำให้ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดและกินเท่านั้น การตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธีทาง histology ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และ *in situ* hybridization ซึ่งจากการทดลองพบว่าเคยที่ได้รับเชื้อโดยการฉีดมีอัตราการตาย 100% ภายใน 3 วัน ส่วนการจุ่มมีอัตราการตาย 100% ภายใน 5 วัน และการกินมีอัตราการตาย 20% ภายใน 9 วัน ส่วนปูนั้นการได้รับเชื้อโดยการฉีดให้ผลดีกว่าการกินกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยปูม้าที่ได้รับเชื้อโดยการฉีดมีอัตราการตาย 100% ภายใน 8 วัน ขณะที่ปูทะเลมีอัตราการตายเพียง 20% ภายใน 9 วัน ส่วนการติดเชื้อโดยการกินพบว่าปูทั้ง 2 ชนิดสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้มากกว่า 9 วัน ผลจากการศึกษาทาง histology ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่า เซลล์เม็ดเลือด เซลล์เหงือก และเซลล์เยื่อบุผิวของเคยที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ซึ่งพบในปูทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับเชื้อเช่นกัน เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบไวรัสชนิดนี้มีรูปร่างเป็นท่อนเช่นเดียวกับที่พบในกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคและมีขนาดใกล้เคียงกัน

เซน และคณะ (Chen; et al. 2000: 157–161) ได้เหี่ยวนำติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวใน benthic larvae ของปูทะเล (*Scylla serrata*) ซึ่งตรวจพบโดยวิธี PCR และ *in situ* hybridization พบว่า ตัวอ่อนของปูทะเล 60% มีไวรัสตัวแดงดวงขาวแฝงอยู่ และย้ายตัวอ่อนเหล่านี้ไปเลี้ยงในบ่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการยังตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาว จากการทดลองนำตัวอ่อนของปูทะเลซึ่งฟักออกจากไข่ที่ปราศจากไวรัสตัวแดงดวงขาวไปแช่น้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาวปนอยู่ พบว่า ตัวอ่อนของปูทะเลที่แช่น้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือปนอยู่จะมีอัตราการตายสะสมสูงถึง 43% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการตายสะสมเพียง 20% เท่านั้น จากการตรวจวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี PCR ทั้งในปูที่ใกล้จะตายและปูที่ยังมีชีวิต บ่งชี้ว่า ไวรัสนี้เป็นสาเหตุของการตายของตัวอ่อนของปูทะเล ส่วนวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา และ *in situ* hybridization พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวที่พบในตัวอ่อนของปูทะเลนั้นจะพบที่เนื้อเยื่อของอวัยวะเหมือนกันที่พบในกุ้ง

ชาฮู ฮามีด และคณะ (Sahul Hameed; et al. 2001: 179-186) ได้ศึกษาลักษณะการติดโรคตัวแดงดวงขาวของปูน้ำจืด 2 ชนิด คือ *Parathelphusa hydrodomas* และ *P. pulvinata* โดยให้ปูทั้ง 2 ชนิดกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่บริเวณกล้ามเนื้อของปู ผลคือปูน้ำจืดมีการติดโรคคล้ายกับในกุ้งน้ำเค็มซึ่งมีอัตราการตาย 100% ที่ 60 และ 84 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยในวันที่ 8 และ 10 ปูน้ำจืดทั้ง 2 ชนิดจะมีอัตราการตาย 100% หลังจากให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จากการวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี PCR และวิธีเนื้อเยื่อวิทยา พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวคือ เหงือก กล้ามเนื้อหัวใจ ก้านตา กล้ามเนื้อช่องท้องและในเลือด

ชาฮู ฮามีด และคณะ (Sahul Hameed; et al. 2003: 157-161) ศึกษาการเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูน้ำเค็ม 20 ชนิดที่พบในอินเดีย โดยให้ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดและการกินเนื้อของกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งพบว่าตลอดระยะเวลา 50 วัน หลังการฉีดและกินเนื้อกุ้งกุลาดำ มีปู 16 ชนิด ที่ตายและมีการแสดงอาการของโรคโดยการฉีดมีอัตราการตาย 100% ภายใน 10 วัน ส่วนการกินมีอัตราการตาย 60% และ 90% ภายใน 30 วัน ส่วนปูอีก 4 ชนิด (*Atergatis integerrimus*, *Charybdis matator*, *Demania splendida* และ *Menippe rumphii*) ไม่มีการแสดงอาการของโรค จากผลการทดลองในปูพบการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวซึ่งยืนยันการทดสอบด้วยวิธี PCR และเนื้อเยื่อวิทยาและการวิเคราะห์ทางชีวภาพ พบการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในบริเวณเหงือก หัวใจ ก้านตา กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อส่วน cephalothoracic ซึ่งปู 4 ชนิดในการทดลองที่ไม่แสดงอาการอาจมีการสะสมไวรัสตัวแดงดวงขาวและเป็นพาหะนำโรคได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ปูทดลองที่ใช้เป็นปูชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Grapsidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมืองและอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ

ปูในวงศ์ Grapsidae ได้แก่ *Metopograpsus latifrons* ปูแสมก้ามแดง (*Sesarma mederi*) ปูทองจาก (*Sesarma polita*) *Sesarma bocourti* ปูแสม (*Sesarma moeschii*)

ปูในวงศ์ Paguridae ได้แก่ ปูเสฉวน (*Clibanarius longitarsus*)

ปูในวงศ์ Ocypodidae ได้แก่ ปูก้ามดาบ (*Uca forcipata*) ปูก้ามดาบ (*Uca lactea*)

ปูในวงศ์ Parathelphusidae ได้แก่ ปูนา (*Somaniathelphusa germaini*)

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์สำหรับ immunohistochemistry

1. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยา
2. อ่างเลี้ยงปูพร้อมอุปกรณ์การเลี้ยง
3. เครื่องมือผ่าตัด
4. ถังมือยาง
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. แผ่นอุ่นสไลด์ (slide warmer)
18. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome)
19. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope)
20. กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

อุปกรณ์สำหรับสกัด DNA ของไวรัสและวิธี PCR

1. โกร่งเคลือบสำหรับบดเนื้อเยื่อผ่านการฆ่าเชื้อ
2. หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. หลอด thin wall สำหรับ PCR
4. เครื่อง electrophoresis apparatus และ อุปกรณ์
5. เครื่อง ultraviolet transilluminator (Spectroline)
6. เครื่อง microwave oven (Turbora)
7. เครื่องเขย่าผสมสาร (shaker)
8. เครื่อง thermal cycler (Eppendorf)
9. กล้อง Polaroid (Gelcam) พร้อมฟิล์ม
10. เครื่องชั่งสาร
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
12. Collecting tube

สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

1. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70%, 80%, 90% และ 95%
2. นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol)
3. ไซลีน (xylene)
4. Phosphate buffered saline (PBS) 0.1 M pH 7.2
5. สารละลาย P₁⁺ (10% calf bovine serum ใน PBS)
6. ไดอะมิโนเบนซีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)

7. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide, H_2O_2) 30 %
8. สีอีโอซิน (eosin) 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 %
9. สีอีมาทอกไซลีน (hematoxylin)
10. พาราพลาสต์ (Paraplast plus paraffin)
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. แอนติบอดีสำหรับตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว

แอนติบอดีตัวแรก (first antibody) ได้แก่

- โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ซึ่งจำเพาะต่อ capsid protein p20 ของไวรัสหัวเหลี่ยม
- โมโนโคลนอลแอนติบอดี TSV ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสทอรา
- โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว
- โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสเอชพีวี
- โมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV5-3 ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสเอ็มบีวี
- โพลีโคลนอลแอนติบอดี IHNV ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี

แอนติบอดีตัวที่สอง (second antibody) ได้แก่

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

18. haemolymph ของกิ้งกูดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว
19. อาหารเม็ดเลี้ยงกิ้ง

สารเคมีสำหรับสกัด DNA ของไวรัสและวิธี PCR

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

1. Working solution
2. Proteinase K
3. Inhibitor removal buffer
4. Washing buffer
5. Elution buffer
6. 10 x PCR buffer (Promega)
7. DNA polymerase (*Taq* DNA polymerase: Promega)
8. Primer VP28F และ primer VP28R (Bio-Technology Service Unit)

Primer VP28F : 5'-CGGGATCCATGGATCTTTCTTTCACTCTTTTCG-3'

Prime VP28R : 5'-TGCACTGCAGTTACTCGGTCTCAGTGCCAG-3'
9. Lysis buffer
10. 1X TBE buffer
11. Agarose (Promega)
12. Blue/Orange 6x Loading dye (Promega)
13. 1kb plus DNA marker (Bio-Rad)
14. Ethidium bromide (Bio – Rad)
15. Isopropanol (Merck)
16. 25mM MgCl₂ (Promega)
17. dNTP (Promega)

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงปู
2. การพิสูจน์ทราบชนิดของปู
3. การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
4. การวางแผนการทดลอง
5. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงปู

เก็บตัวอย่างปูชนิดต่าง ๆ จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมืองและอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการแล้วแยกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 10 – 20 ตัว ขึ้นอยู่กับจำนวนที่จับได้ ทำการแยกชนิด และนำมาเลี้ยงไว้ในอ่างที่อุณหภูมิและแสงธรรมชาติ

2. การพิสูจน์ทราบชนิด

นำปูชนิดต่าง ๆ ชนิดละ 3 ตัว นำมาถ่ายรูปด้วยฟิล์มสีและดองด้วยสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% เพื่อที่จะได้บันทึกสีตามธรรมชาติของปูแต่ละชนิด เขียนรายละเอียดสถานที่และวันที่เก็บ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับลักษณะตามอนุกรมวิธานจากวิทยานิพนธ์เรื่องการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา ของกัลยานี ยงจินดารัตน์ (2531) วิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานปูนาและลักษณะของโกโนพอด โอมมาติเดีย ของถวิล ประมวล (2533) วิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของปูออร์หนิตในประเทศไทย ของศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ (2532) วิทยานิพนธ์เรื่องเดคาพอดครัสเตเชียนและสโตมาโตพอดครัสเตเชียนในป่าชายเลนจังหวัดชุมพรและจังหวัดระนอง ของสุพจน์ แสงมณี (2530) วิทยานิพนธ์เรื่องปูแสมในอ่างไทย ของสุรินทร์ มัจฉาชีพ (2516) และวิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของปูก้ามดาบในประเทศไทย ของเสรี บรรพพิจิตร (2522)

3. การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

เก็บฮีโมลิมพ์ (hemolymph) จากกิ้งกูดาคำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอย่างรุนแรง นำมาปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนของเม็ดเลือดออกไป กรองฮีโมลิมพ์ ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ให้นำไปเจือจาง ด้วยสารละลาย 2X PBS ในอัตราส่วน 1:500

4. การวางแผนการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ

4.1 การตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติ

สุ่มตัวอย่างปูชนิดต่าง ๆ ชนิดละ 15-20 ตัว ในวันเดียวกับที่เก็บตัวอย่างจาก บริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง เพื่อทำการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ติดมาตามธรรมชาติ

4.2 การตรวจการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

สุ่มตัวอย่างปูชนิดต่าง ๆ ชนิดละ 15-20 ตัว ในวันเดียวกับที่เก็บตัวอย่างจาก บริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เจือจางในสารละลาย 2X PBS 1:500 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บริเวณโคนขาปู จากนั้นเลี้ยงแยกชนิดโดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 2 เวลา เช้า-เย็น เป็นเวลา 3-15 วัน แล้วจึงเก็บมาตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

5. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

นำปูมาสลบในน้ำเย็นจัด ตัดส่วนของขาและกระดองออก ตัดแบ่งส่วนเนื้อและส่วนที่มี อวัยวะออกเป็นสองส่วนเท่า ๆ กันตามความยาวของลำตัว ส่วนหนึ่งเก็บในหลอดที่มี lysis buffer ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำการทดลองตามข้อ 5.1 อีกส่วนหนึ่งแช่ในหลอดที่มี Davidson's fixative อย่าง น้อย 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองตามข้อ 5.2

5.1 การตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี PCR

5.1.1 ขั้นตอนการสกัด DNA ของไวรัสจากตัวอย่างปู

(1) นำเนื้อเยื่อปูมาบดใน lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 9.0, 100 mM EDTA, 50mM NaCl, 2% SDS) ประมาณ 40 มิลลิลิตร ด้วยโกร่งเคลือบที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เนื้อเยื่อที่บดละเอียดแล้วเทใส่ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 3,000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วแบ่ง supernatant ใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 200 ไมโครลิตรแล้วผสมกับ working solution [2.5 มิลลิลิตร binding buffer, 50 ไมโครลิตร poly(A)] ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และเติม proteinase K ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(2) เติม isopropanol ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

(3) ประกอบหลอด high pure spin filter กับ high pure collection เข้าด้วยกัน จากนั้นเติมตัวอย่างลงในหลอดด้านบน นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งหลอด high pure collection รวมทั้งส่วนใส

(4) ประกอบหลอด high pure collection ขึ้นใหม่กับ high pure spin filter เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม inhibitor removal buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตรลงในส่วนผสม นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเปลี่ยนหลอด high pure collection เป็นหลอดใหม่

(5) ล้างส่วนผสมในหลอด high pure spin filter โดยเติม wash buffer ปริมาณ 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยนหลอด high pure collection จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้งหนึ่ง โดยนำไปปั่นที่ความเร็วรอบสูงสุดต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

(6) นำหลอด high pure spin filter ที่ได้จากการล้าง 2 ครั้งด้วยสารละลาย wash buffer นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยนหลอด high pure collection

(7) ประกอบหลอด high pure spin filter กับหลอด microcentrifuge เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ปั่น 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

(8) เก็บ DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5.1.2 ขั้นตอนการทำ PCR

หลักการของ PCR ใช้หลักพื้นฐานในการสังเคราะห์ DNA ภายใต้สภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นส่วนของ DNA ใดๆ โดยมีขั้นตอนหลักดังนี้

(1) ผสมสารเคมีดังรายการข้างล่างนี้ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR แล้วแบ่งใส่ในหลอด thin wall ขนาดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดังนี้

DNA ของไวรัสที่สกัดได้จาก 5.1.1	2.5	ไมโครลิตร
10 x PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	2	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	2	ไมโครลิตร
Primer VP 28F	1	ไมโครลิตร
VP28F 5'-CGGGATCCATGGATCTTTCTTTCACTCTTTTCG-3'		
Primer VP28R	1	ไมโครลิตร
VP28R 5'-TGCACTGCAGTTACTCGGTCTCAGTGCCAG-3'		
DNA polymerase (Promega)	0.25	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	13.75	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

(2) นำเข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf) ที่ปรับอุณหภูมิและเวลาให้เหมาะสม สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงอุณหภูมิ ระยะเวลาและจำนวนรอบ ในแต่ละขั้นตอนการทำงานของปฏิกิริยา PCR

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

ก่อนขั้นตอนการทำ PCR ควรทำการแยกสาย DNA เป็นสองสายโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที เพื่อให้สาย DNA ที่มีความยาวมากแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ขั้นตอน PCR เริ่มจากการแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส (denaturation step) สาย DNA จะแยกออกจากกันเป็น 2 สาย ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (annealing step) เป็นอุณหภูมิที่ primer จะเข้าไปจับที่ตำแหน่งเฉพาะบนสาย DNA และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส (elongation step) เอนไซม์ DNA polymerase ทำงานได้ดีโดยจะเร่งปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าไปที่ปลาย 3' ของ primer ทำให้

เกิดการจำลองสาย DNA เส้นสั้นๆ (PCR product) ที่สมบูรณ์ เมื่อทำปฏิกิริยา 35 รอบจะได้ PCR product ปริมาณมาก หลังจากนั้นบ่ม PCR product ที่ได้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (final extension) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ก่อนการเก็บ PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องมีตัวควบคุม เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการปฏิบัติและตรวจสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยาของสารเคมีที่ใช้ ตัวควบคุมมี 2 แบบ คือ ตัวควบคุมผลบวก (positive control) ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ฮีโมลิมพ์ (hemolymph) ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ใช้เพื่อตรวจสอบสารเคมีและปฏิกิริยา และตัวควบคุมผลลบ (negative control) ใช้น้ำกลั่นหรือ DNA จากกิ้งที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน

5.1.3. การตรวจผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis

(1) เตรียม agarose โดยชั่งผงเจลปริมาณ 0.6 กรัม ละลายใน 1X TBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ความร้อน จากนั้นรอให้เย็นลง เติมนิโคตีนโบรไมด์ 2.5 ไมโครลิตร เทลงไปในถาดเตรียมเจลพร้อมเสียบแผ่นหวีพลาสติก (comb) ให้เกิดเป็นร่องสำหรับใส่ตัวอย่าง ทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

(2) ผสมตัวอย่างที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) กับสี Blue/Orange (6x Loading dye) ในอัตราส่วน 1:6

(3) นำเจลที่แข็งตัวแล้วจัดลงไปในเครื่อง electrophoresis ที่มีสารละลาย 1X TBE buffer ในปริมาตรที่พอประมาณท่วมเจล หยอด PCR product ซึ่งได้จากปูแต่ละชนิด ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก และตัวควบคุมผลลบลงในไปร่องเจล รวมทั้งหยอด DNA marker เพื่อใช้ในการบอกขนาดของชิ้น PCR product ดังภาพประกอบ 1

1	2	3	4	5	6
					

1 คือ DNA marker

2 คือ ตัวอย่างจากการทำ PCR จากปฐูที่เก็บจากธรรมชาติ

3 คือ ตัวอย่างจากการทำ PCR จากปฐูที่ฉีดเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

4 คือ ตัวอย่างจากการทำ PCR จากปฐูที่ฉีดเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

5 คือ ตัวอย่างควบคุมผลลบ

6 คือ ตัวอย่างควบคุมผลบวก

ภาพประกอบ 1 แสดงการตรวจผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis

(5) เมื่อหยอดตัวอย่างครบแล้ว ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 110 โวลต์ เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง หลังจากนั้นนำเจลไปวางบนเครื่อง ultraviolet transilluminator เพื่อดูผลที่ได้ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายภาพบันทึกผล

5.2 การตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี immunohistochemistry

5.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อทางมิถุนวิทยา

(1) นำตัวอย่างปฐูที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เก็บจากบ่อมาล้างให้สะอาด สลบในน้ำเย็นจัด ตัดส่วนของขาและกระดองออก

(2) นำเนื้อเยื่อปฐูที่ผ่าไปทำให้คงรูป (fix) ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกครั้งหนึ่งแช่ในสารละลาย lysis buffer เก็บไว้ที่ตู้ความเย็นที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อทำ PCR

(3) นำเนื้อเยื่อปฐูมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างน้ำยาทำให้คงรูปออก

(4) ดึงน้ำออก (dehydrate) จากเนื้อเยื่อปฐูด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltrate) ด้วยพาราฟลาสต์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์เป็นเวลา 95% จำนวน 2 ครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- แช่ในสารละลายผสมระหว่างนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์กับไซลีน ในอัตราส่วน 1 : 1 แช่เวลา 1 ชั่วโมง

- แช่ในไซลีน จำนวน 2 ครั้ง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในขณะที่ตัวอย่างเนื้อเยื่ออยู่ในไซลีน นำไปกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่องปั๊มดูดอากาศ

- แช่ในไซลีนผสมกับพาราฟลาสต์ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- แช่ในพาราฟลาสต์ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 1 ชั่วโมง

(5) นำเนื้อเยื่อที่อินฟิลเตรตด้วยพาราฟลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพารา ฟลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสี่เหลี่ยม โดยให้ด้านรอยผ่าของตัวอย่างอยู่ทางด้านล่างของบล็อก

(6) ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องมือโครโตมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 8 ไมครอน เรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบิน (ribbon)

(7) นำเซกชัน (section) ของเนื้อเยื่อมาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลาย เจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซกชันไปวางบนหยดน้ำ 1 แถว มี 3 เซกชัน ทำ 1 แถวต่อ 1 สไลด์ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยึดไม่มีการซ้อนทับกันของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกซับให้แห้ง เพื่อให้เนื้อเยื่อติดตรึงบนสไลด์นำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2.2 กระบวนการย้อมโดยวิธีอินไดเรคติมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect peroxidase immunohistochemistry) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ W29, Y19, TSV3, MBV5-3, HPV16-9C และ โพลีโคลนอลแอนติบอดี IHHNV โดยมีขั้นตอนดังนี้ (ภาพประกอบ2)

(1) นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราฟลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffination) โดยวางสไลด์ลงในตะกร้า (slide basket) แล้วจุ่มลงในโถแก้วย้อมสไลด์โดยแช่เนื้อเยื่อใน

- ไซลีนที่ 1 เป็นเวลา 10 นาที

- ไซลีนที่ 2 เป็นเวลา 5 นาที

- ไซลีนที่ 3 เป็นเวลา 5 นาที

(2) เติมน้ำ (hydration) เข้าสู่เนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กันโดยแช่เนื้อเยื่อใน

- นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 80% เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที

(3) ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย phosphate buffer saline (PBS)

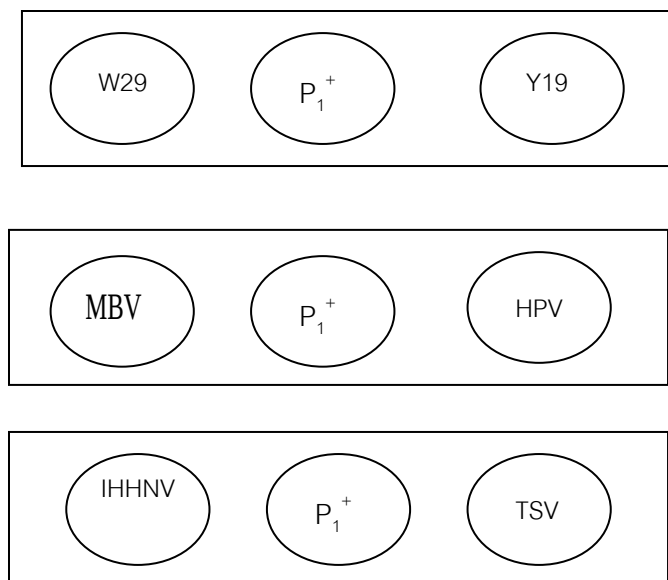
- ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในสารละลายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 10 นาที
- ล้างฟอร์มาลินออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

(4) การใส่แอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (first antibody)

- นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) แล้วหยดสารละลาย P_1^+ คลุมแต่ละเซกชันนำไปเก็บไว้ในที่ชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

- ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซกชันออก ยกเว้นเซกชันที่ 2
- หยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ให้คลุมเซกชันที่ 1 และ 3 โดยแอนติบอดีที่ใช้ คือ

โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29, Y19, MBV5-3, HPV16-9C โพลีโคลนอลแอนติบอดี IHHNV และ TSV3, โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดเจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 แสดงการหยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

(5) การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody)

- ล้างแอนติบอดีตัวที่หนึ่งออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วแช่ในสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที จากนั้นนำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ

- หยดแอนติบอดีที่สอง ได้แก่ goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางในสารละลาย P₁⁺ ปริมาณ 1:1000 ในทุกเซกชัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- ล้างแอนติบอดีตัวที่สอง ออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

(6) นำเซกชันมาทำปฏิกิริยากับ 3, 3'-ไดอะมีโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (DAB) 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006% ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที

- ล้างเซกชันด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

(7) ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซาลีน (haematoxylin) เป็นเวลา 5-10 นาที

- ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อล้างสีส่วนเกินออก

- จุ่มในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก โดยมีความเข้มข้น 0.05% อย่างรวดเร็ว

- จุ่มในสารละลายโซเดียมไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 1% อย่างรวดเร็ว
- ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที

(8) ตี้น้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ดังนี้

- เอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที
- เอทิลแอลกอฮอล์ 80% เป็นเวลา 5 นาที
- เอทิลแอลกอฮอล์ 90% เป็นเวลา 5 นาที
- เอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 5 นาที

(9) ย้อมทับด้วยสีอีโอซิน 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 %

(10) นำเซกชันมาตี้น้ำออกโดยผ่าน

- นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์เป็นเวลา 5 นาที
- นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีน ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 5 นาที
- ไซลีน จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

(11) ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการมึนส์ไลต์ (mount) ด้วยตัวกลางพีนิก (permount) จากนั้นจึงนำสไลด์ที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. พิสูจน์ชนิดตัวอย่างปฐูที่เก็บได้และถ่ายภาพ
2. ตรวจหาและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อ จากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29, Y19, TSV3, MBV5-3, HPV16-9C และโพลีโคลนอลแอนติบอดี IHNV และใช้เนื้อเยื่อทั้งุกุลาดำเป็นกลุ่มควบคุม
3. ตรวจดูการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของอวัยวะต่าง ๆ ภายในอวัยวะต่าง ๆ ของปฐูชนิดต่าง ๆ ในแต่ละวงศ์
4. ถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อ
5. ถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและเนื้อเยื่อทั้งุกุลาดำ
6. ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติ และการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของปฐูชนิดต่าง ๆ โดยวิธี PCR
7. นำเสนอข้อมูลด้วยภาพและตาราง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การพิสูจน์ทราบชนิดของปู

จากการเก็บรวบรวมปูในวงศ์ต่าง ๆ จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แหล่งน้ำธรรมชาติและชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมืองและอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ โดยนำปูมาศึกษา ลักษณะต่าง ๆ เช่น กระดอง ก้าม ขาเดิน ส่วนท้อง อวัยวะเพศผู้ และสี (กระดอง ก้ามและขาเดิน) โดยนำมาเปรียบเทียบกับวิทยานิพนธ์เรื่องการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ต และจังหวัดพังงา ของกัลยาณี ยงจินดารัตน์ (2531) วิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานปูนาและลักษณะของโกโนพอด โอมมาติเดีย ของถวิล ประมวล (2533) วิทยานิพนธ์เรื่องเตคาพอดครัสเตเชียนและสโตมาโตพอดครัสเตเชียนในป่าชายเลนจังหวัดชุมพรและจังหวัดระนอง ของสุพจน์ แสงมณี (2530) วิทยานิพนธ์เรื่องปูแสมในอ่าวไทย ของสุรินทร์ มัจฉาชีพ (2516) และวิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของปูก้ามดาบในประเทศไทย ของเสรี บรรพวิจิตร (2522) ในการพิสูจน์ทราบชนิดของปู ซึ่งสามารถพิสูจน์ทราบปูชนิดต่าง ๆ ได้ดังนี้

1.1 วงศ์ Grapsidae

สามารถจำแนกปูในวงศ์ Grapsidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 2 สกุล (genus) 5 สปีชีส์ คือ

Metopograpsus latifrons กระดองลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมคางหมู พื้นผิวเรียบ มีความกว้างมากกว่าความยาวและขอบด้านข้างจะสอบเข้ามาทางด้านหลัง ก้ามมีลักษณะแข็งแรงขนาดไม่เท่ากัน ขาเดินทั้ง 4 คู่ แข็งแรงและค่อนข้างเรียวยาว กระดองมีสีน้ำตาลอ่อนสลับลวดลายสีเปลือกมังคุด ส่วนก้ามหนีบมีสีม่วง (ภาพประกอบ 3) (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2516: 16-20)

Sesarma mederi กระดองมีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัสมีความกว้างมากกว่าความยาว ก้ามและขาเดินทั้ง 4 คู่ แข็งแรง ขาเดินทุกคู่มีกลุ่มขนปกคลุมอยู่หนาแน่น กระดองมีสีน้ำตาลอมม่วง (ภาพประกอบ 4) (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2516: 42-43)

Sesarma polita กระดองเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า พื้นผิวเรียบ มีความยาวมากกว่าความกว้าง ผิวของก้ามหนีบเป็นปุ่มเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป ก้ามแข็งแรง ขาเดินทั้ง 4 คู่ค่อนข้างเรียว กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลอมม่วง ก้ามหนีบมีสีแดงเข้ม (ภาพประกอบ 5) (สุพจน์ แสงมณี. 2530: 384-386)

Sesarma bocourti กระดองมีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขอบทางด้านในจะมีกลุ่มขนสั้น ๆ เรียงกันกระจัดกระจาย ขาเดินทั้ง 4 คู่ ค่อนข้างแบนและกว้าง ก้ามแข็งแรง กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลเข้ม ก้ามหนีบมีสีแดงเลือดหมู (ภาพประกอบ 6) (สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2516: 61-63)

Sesarma moeschii กระจกมีลักษณะคล้ายสีเหลี่ยมจัตุรัสโค้งมนเล็กน้อยตามความยาว และมีพื้นผิวเรียบ ขอบด้านข้างมีรอยหยักเป็นแฉ่งยื่น 1 อัน ขาเดินทั้ง 4 คู่ และก้ามแข็งแรง กระจกและขาเดินมีสีน้ำตาลอมดำ ก้ามหนีบมีสีแดงส้ม ก้านตาและตามีสีเทาอมดำ (ภาพประกอบ 7) (สุพจน์ แสงมณี. 2530: 378-380)

1.2 วงศ์ Paguridae

สามารถจำแนกในวงศ์ Paguridae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 1 สกุล (genus) 1 สปีชีส์

Clibanarius longitarsus กระจกมีลักษณะมนเล็กน้อยตรงส่วนหน้า ผิวมีตุ่มกระจายอยู่ทั่วไป ขอบด้านข้างมีกลุ่มขนกระจายทั่วไป ก้านตามีลักษณะเป็นรูปกระบอง ก้ามข้างขวามีขนาดใหญ่กว่าข้างซ้ายเล็กน้อย ขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 มีลักษณะเรียวยาวค่อนข้างแบน และมีกลุ่มขนสั้นและยาวกระจายทั่วไป กระจกมีสีน้ำตาลและลวดลายสีน้ำเงินแทรกอยู่เล็กน้อย ผิวด้านนอกของขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 มีแถบสีน้ำเงินตามความยาว ก้านตามีสีเหลืองปนส้ม (ภาพประกอบ 8) (สุพจน์ แสงมณี. 2530: 133-135)

1.3 วงศ์ Ocypodidae

สามารถจำแนกในวงศ์ Ocypodidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 1 สกุล (genus) 2 สปีชีส์

Uca forcipata ด้านข้างของกระจกสอบเข้าสู่ส่วนหลังของกระจก กระจกของตัวผู้และตัวเมียปกติจะมีสีดำ และมักจะมีจุดสีเหลือง ครีมหือเทาอ่อน กระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะบริเวณครึ่งตอนหน้าบนกระจกของปูบางตัว กระบองตาเฉียงปานกลางและพื้นเรียบ ก้านตาวาวและมีสีดำ ตามีสีแดง แต่ปูบางตัวก้านตามีสีแดง (ภาพประกอบ 9) (เสรี บรรพวิจิตร. 2522: 27-32)

Uca lactea กระจกมีลักษณะสีเหลี่ยมผืนผ้า ตัวผู้กระจกมีสีเทาหรือดำ มักสลับด้วยลวดลายคาดขวางสีขาวหรือเทา บางครั้งพบว่ากระจกมีสีเทา ฟ้ำอ่อนหรือขาว ซึ่งมักจะสลับด้วยสีดำเป็นลายหินอ่อน ก้านตาสีเทา ขาและก้ามข้างเล็กมีสีเทาและมักจะมีจุดเล็ก ๆ สีขาวอยู่ทั่วไป บริเวณโคนขาและโคนก้ามข้างเล็กอาจมีสีส้มอ่อน ก้านตาวาวสีเทาและมีขนาดใหญ่ (ภาพประกอบ 10) (เสรี บรรพวิจิตร. 2522: 84-90)

1.4 วงศ์ Parathelphusidae

สามารถจำแนกในวงศ์ Parathelphusidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 1 สกุล (genus) 1 สปีชีส์

Somanniathelphusa germaini กระจกมนค่อนข้างเรียบ สีของกระจกมีตั้งแต่ สีดำ ม่วงดำ เทาเหลือง หรือผสมกัน บางทีก็มีประเป็นจุดขาว ๆ บนกระจกด้านหลังขึ้นกับสภาพแวดล้อม กระจกมีความกว้างประมาณ 40-60 มิลลิเมตร ก้ามหนีบมีผิวเรียบ ขาเดินมีลักษณะเรียวยาว (ภาพประกอบ 11) (ถวิล ประมวล. 2533: 31-33)



ภาพประกอบ 3 แสดงลักษณะของปู *Metopograpsus latifrons*



ภาพประกอบ 4 แสดงลักษณะของปูแสม *Sesarma mederi*



ภาพประกอบ 5 แสดงลักษณะของปูทองจาก *Sesarma polita*



ภาพประกอบ 6 แสดงลักษณะของปู *Sesarma bocourti*



ภาพประกอบ 7 แสดงลักษณะของปูแสม *Sesarma moeschii*



ภาพประกอบ 8 แสดงลักษณะของปูเสฉวน *Clibanarius longitarsus*



ภาพประกอบ 9 แสดงลักษณะของปู้ามดาบ *Uca lactea*



ภาพประกอบ 10 แสดงลักษณะของปูก้ามดาบ *Uca forcipata*



ภาพประกอบ 11 แสดงลักษณะของปูนา *Somanniathelphusa germaini*

2. การตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี immunohistochemistry

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูชนิดต่าง ๆ ที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติทั้งหมดจำนวน 9 ชนิด ประกอบด้วย 4 วงศ์ได้แก่ วงศ์ Grapsidae 5 ชนิด ได้แก่ *Metopograpsus latifrons*, *Sesarma bocourti* ปูแสมก้ามแดง (*Sesarma mederi*) ปูทองจาก (*Sesarma polita*) ปูแสม (*Sesarma moeschii*) วงศ์ Paguridae 1 ชนิด ได้แก่ ปูเสฉวน (*Clibanarius longitarsus*) วงศ์ Ocypodidae ได้แก่ ปูก้ามดาบ (*Uca forcipata*) ปูก้ามดาบ (*Uca lactea*) วงศ์ Parathelphusidae 1 ชนิด ได้แก่ ปูนา (*Somanniathelphusa germaini*) เมื่อนำมาตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากสัตว์ที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติ (0 วัน) โดยวิธี immunohistochemistry ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใด ๆ ของปูทั้ง 4 วงศ์

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากปูที่ทดลองด้วยการฉีด haemolymph ของกิ้งกูด้าที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูวงศ์ Grapsidae ทั้ง 5 ชนิด ปูวงศ์ Paguridae 1 ชนิด ปูวงศ์ Ocypodidae 1 ชนิด และปูวงศ์ Parathelphusidae 1 ชนิด (ตาราง 2) โดยพบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ เช่น เหงือก รั้งไข่ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ โดยในปูวงศ์ Grapsidae ได้แก่ *Metopograpsus latifrons* พบว่ามีการติดเชื้อจำนวนมากในอวัยวะต่าง ๆ ในวันที่ 3 หลังจากฉีดเชื้อ แต่ในวันที่ 7 จำนวนปูที่มีการติดเชื้อจะลดลงและมีการติดเชื้อน้อยลง สำหรับปูในวงศ์ Parathelphusidae ได้แก่ *Somanniathelphusa germaini* พบว่ามีการติดเชื้อจำนวนมากในอวัยวะต่าง ๆ ในวันที่ 3 ส่วนในวันที่ 7 แทบจะไม่พบการติดเชื้อ ส่วนปูในวงศ์ Ocypodidae ได้แก่ *Uca lactea* ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังจากการฉีดทั้งในวันที่ 3 และวันที่ 7 ตามลำดับ (ตาราง 2)

สำหรับการตรวจการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ เช่น ไวรัสหัวเหลือง ไวรัสทอรา ไวรัสเอชพีวี ไวรัสเอ็มบีวี และไวรัสไอเอสเอสเอ็นวี โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสเหล่านี้ในปูที่เก็บรวบรวมจากธรรมชาติและปูที่ทดลองไม่พบการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ในตัวอย่างที่ใช้ทดลอง

3. การตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี PCR

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากปูที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติและจากการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 และ 7 วัน ในปูชนิดต่าง ๆ 5 วงศ์ ได้แก่ Grapsidae Portunidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae ได้ผลดังตาราง 2

โดยวิธี PCR พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูชนิดต่าง ๆ *Metopograpsus latifrons* *Sesarma bocourti* ปูแสมก้ามแดง (*Sesarma mederi*) ปูทองจาก (*Sesarma polita*) ปูแสม (*Sesarma moeschii*) วงศ์ Paguridae 1 ชนิด ได้แก่ ปูเสฉวน (*Clibanarius longitarsus*) วงศ์ Ocypodidae 1 ชนิด ได้แก่ ปูก้ามดาบ (*Uca forcipata*) และปูวงศ์ Parathelphusidae 1 ชนิด ได้แก่ ปูนา (*Somanniathelphusa germaini*) แต่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูก้ามดาบ (*Uca lactea*)

ตาราง 2 แสดงชนิดปูที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ และนำมาชักนำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด และเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ

วงศ์และชนิด	วิธีการตรวจ WSSV	การตรวจการติดเชื้อไวรัสจากธรรมชาติ 0 วัน	ระยะเวลาหลังได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาว (วัน)				แหล่งที่เก็บและความเค็มน้ำทะเล ppt
			3	7	10	15	
<i>Grapsidae</i> <i>Metopograpsus latifrons</i>	IHC	-(15)	+(15)	ND	ND	ND	อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 5 ppt
		-(5)	+(5)	+(4),-(12)	ND	ND	
	PCR	-(5)	+(5)	+(16)	ND	ND	
<i>Sesarma mederi</i>	IHC	-(12)	+(4),-(1)	+(2),-(8)	ND	ND	อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ 5 ppt
		-(5)	+(9),-(6)	+(3),-(9)	ND	ND	
	PCR	-(5)	+(15)	+(12)	ND	ND	
<i>Sesarma polita</i>	IHC	-(15)	+(11),-(4)	+(6),-(9)	ND	ND	อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ 5 ppt
		-(5)	+(5),-(3)	+(3),-(3),	ND	ND	
	PCR	-(5)	+(8)	+(6)	ND	ND	
<i>Sesarma bocourti</i>	IHC	-(10)	+(9),-(1),	ND	ND	+(4),-(3)	อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 5 ppt
		-(5)	+(5)	+(10),-(5)	ND	ND	
	PCR	-(5)	+(5)	+(15)	ND	ND	
<i>Sesarma moeschii</i>	IHC	-(10)	+(8),-(2)	ND	ND	+(3),-(2)	อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 5 ppt
		-(5)	+(3),-(2)	+(2),-(13)	ND	ND	
	PCR	-(5)	+(5)	+(15)	ND	ND	
<i>Pagunidae</i> <i>Clibanarius longitarsus</i>	IHC	-(5)	+(4),-(1)	+(2),-(3)	ND	ND	อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 5 ppt
		-(10)	+(6),-(4)	+(4),-(6)	ND	ND	
	PCR	-(10)	+(10)	+(10)	ND	ND	

ตาราง 2 (ต่อ)แสดงชนิดปูที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ และนำมาชักนำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด และเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ

วงศ์และชนิด	วิธีการตรวจ WSSV	การตรวจการติดเชื้อจากธรรมชาติ 0 วัน	ระยะเวลาหลังได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาว (วัน)				แหล่งที่เก็บและความเค็มน้ำทะเล ppt
			3	7	10	15	
Ocypodidae <i>Uca lactea</i>	IHC	-(15)	-(15)	ND	-(15)	ND	อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 15 ppt
		-(5)	-(5)	ND	ND	ND	
		ND	ND	-(13)	ND	ND	
		-(10)	-(10)	-(10)	-(2)	ND	
	PCR	-(10)	-(10)	-(10)	ND	ND	
<i>Uca forcipata</i>	IHC	-(5)	+(3),-(2)	ND	ND	ND	
		-(10)	+(6),-(4)	+(3),-(7)	ND	ND	
		ND	ND	+(4),-(7)	-(4)	ND	
		-(5)	+(4),-(1)	+(1),-(3)	ND	ND	
	PCR	-(5)	+(5)	+(4)	ND	ND	
Parathelphusidae <i>Somanniathelphusa germaini</i>	IHC	-(5)	+(3),-(2)	ND	ND	ND	อ.เมือง จ.สมุทรปราการ น้ำจืด
		-(15)	+(10),-(5)	+(2),-(13)	ND	ND	
	PCR	-(15)	+(15)	+(15)	ND	ND	

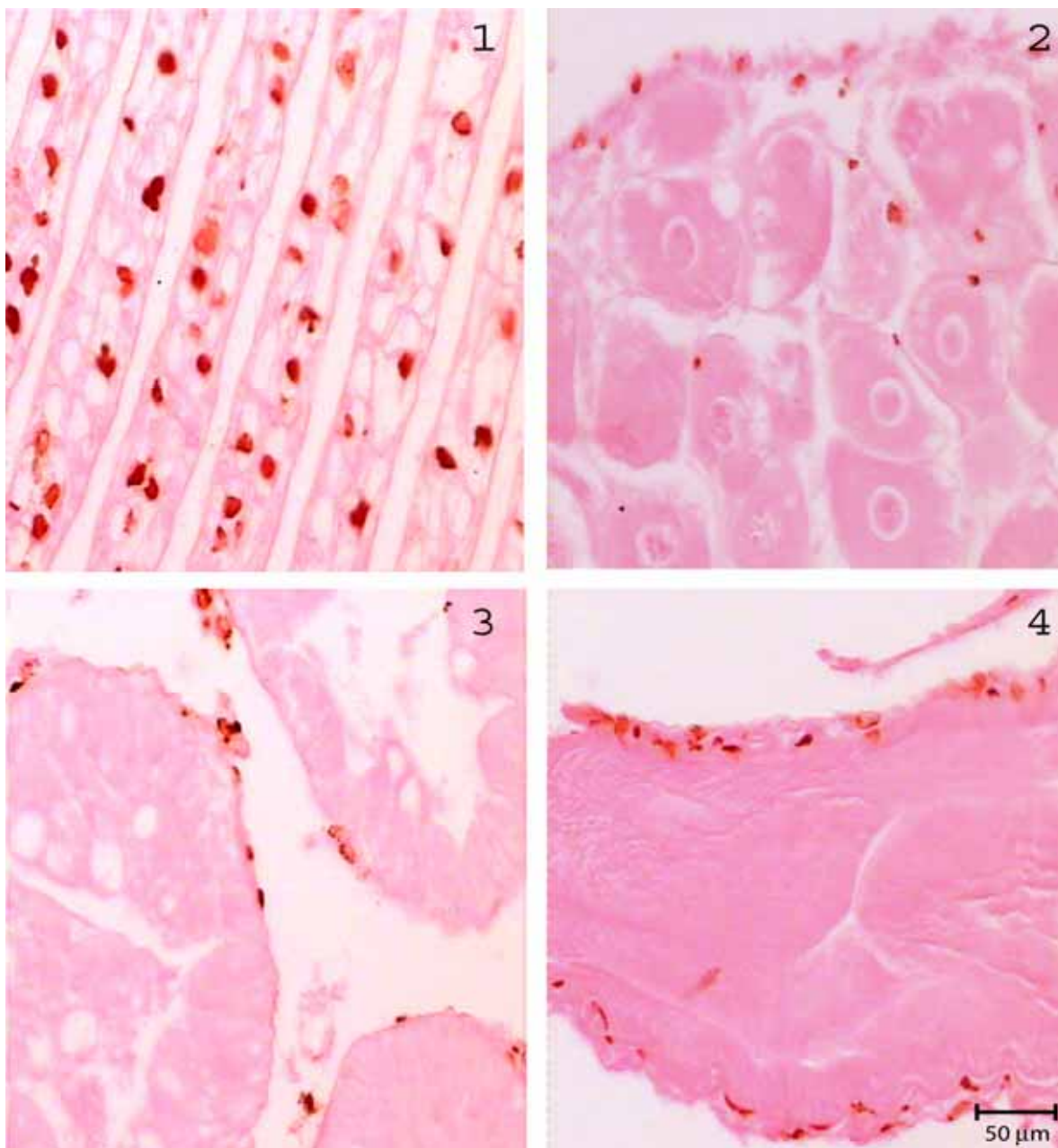
IHC = Immunohistochemistry ทำการตรวจเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากตัวอย่างทุกตัว

PCR = Polymerase chain reaction ทำการตรวจตัวอย่างในแต่ละกลุ่มรวมกัน

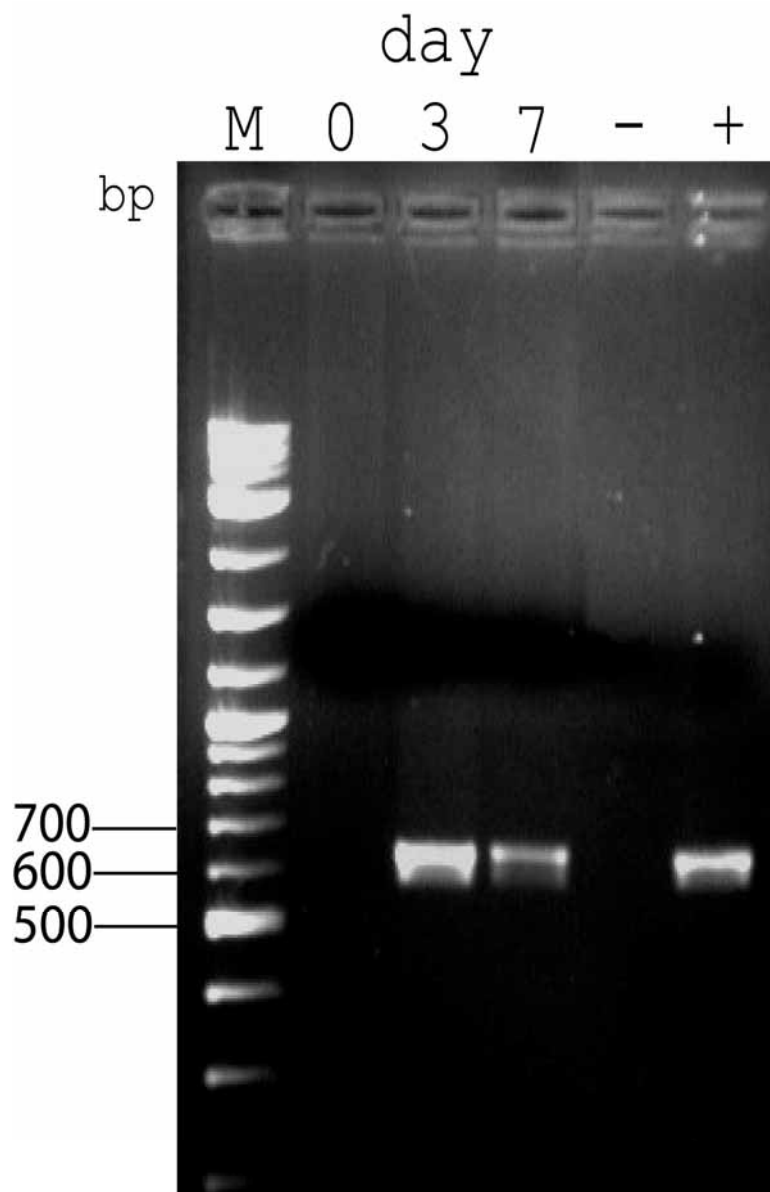
ND = Not determined

+ = พบการติดเชื้อ

- = ไม่พบการติดเชื้อ



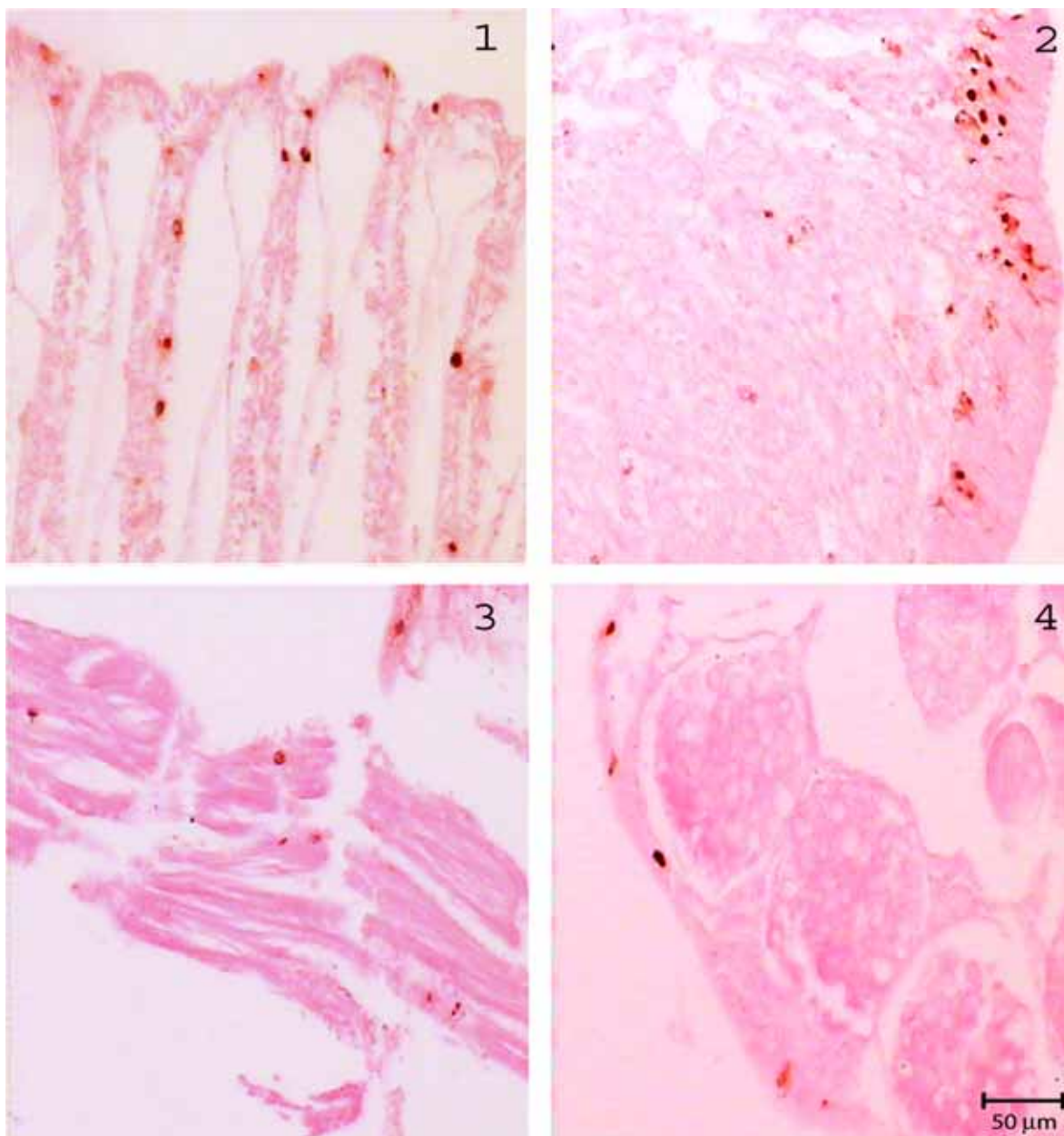
ภาพประกอบ 12 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปู *Metopograpsus latifrons* ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29 (1=เหงือก 2=รังไข่ 3=ตับและตับอ่อน 4=กล้ามเนื้อ)



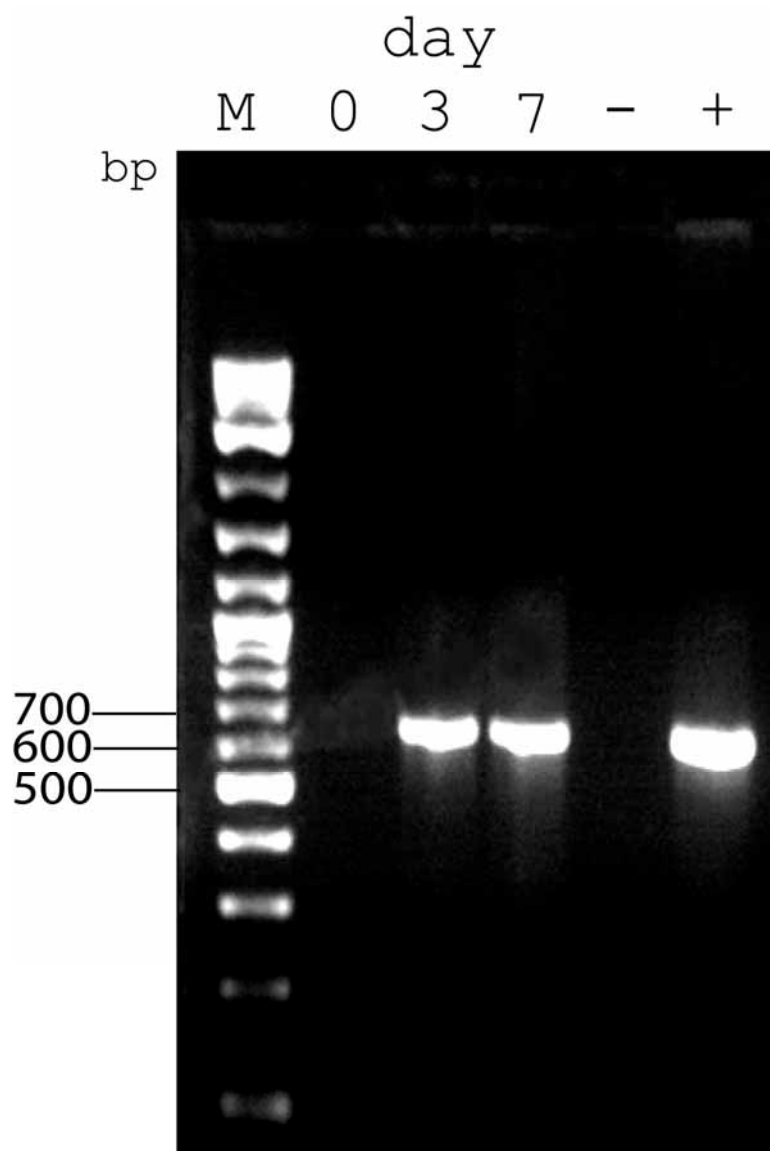
ภาพประกอบ 13 PCR ของปู *Metopograpsus latifrons* M = molecular weight

0 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูจากธรรมชาติ 3 และ 7 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูหลังจากการฉีด

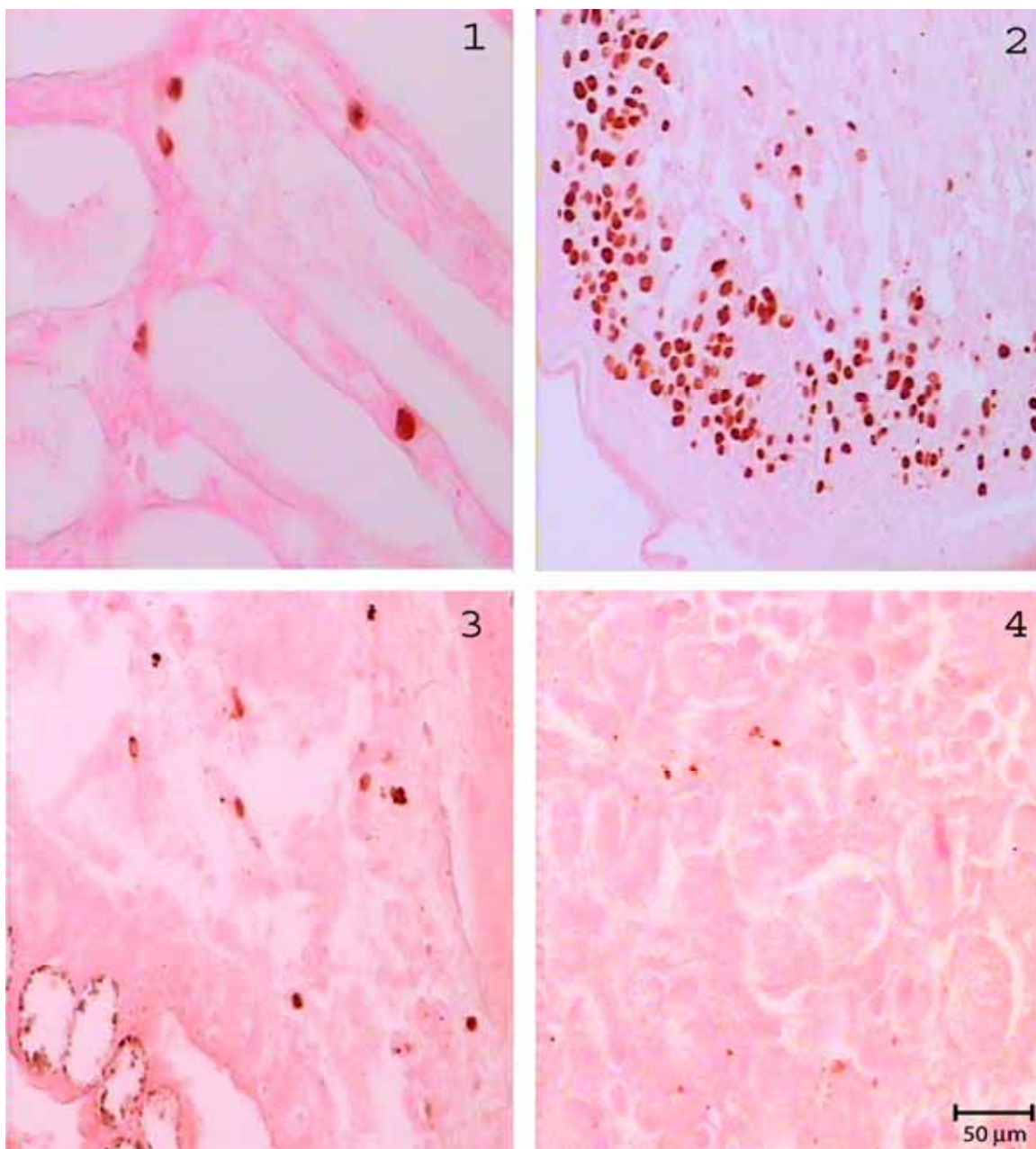
เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 3 และ 7 วัน + = positive control, - = negative control



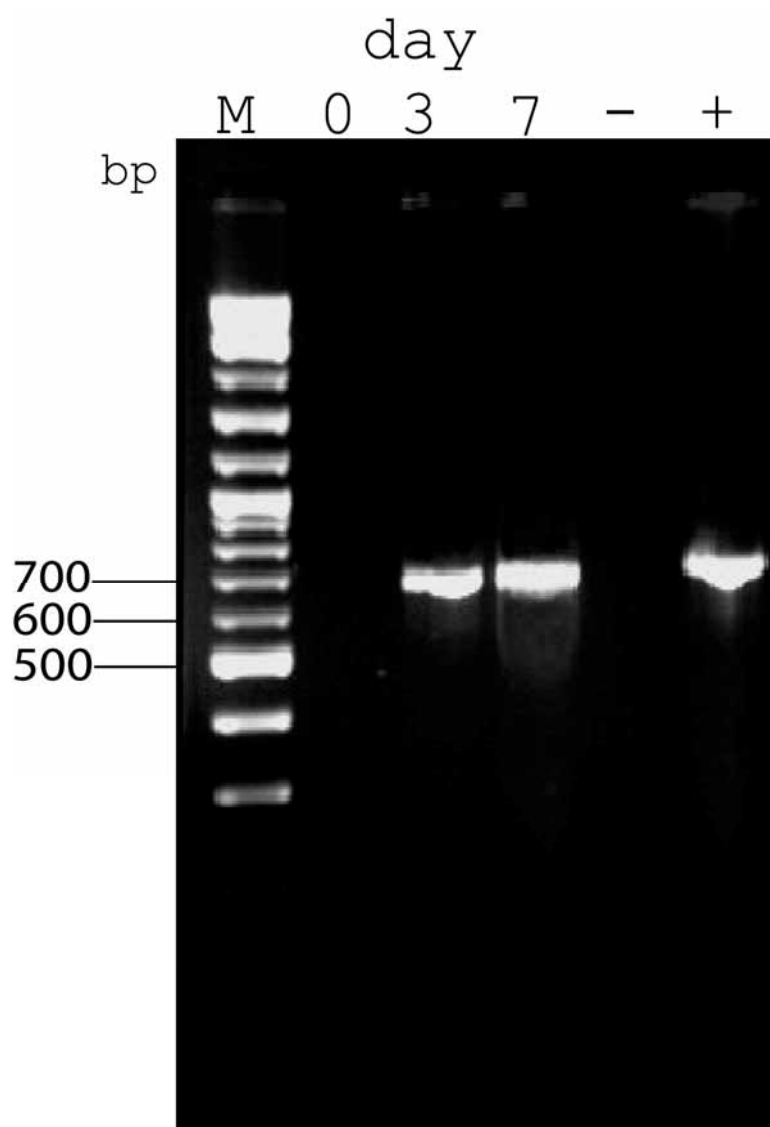
ภาพประกอบ 14 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูแสม *Sesarma mederi* ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29 (1=เหงือก 2=เนื้อเยื่อผิวหนังใต้ผิวหนังเปลือก 3=กล้ามเนื้อ 4=รังไข่)



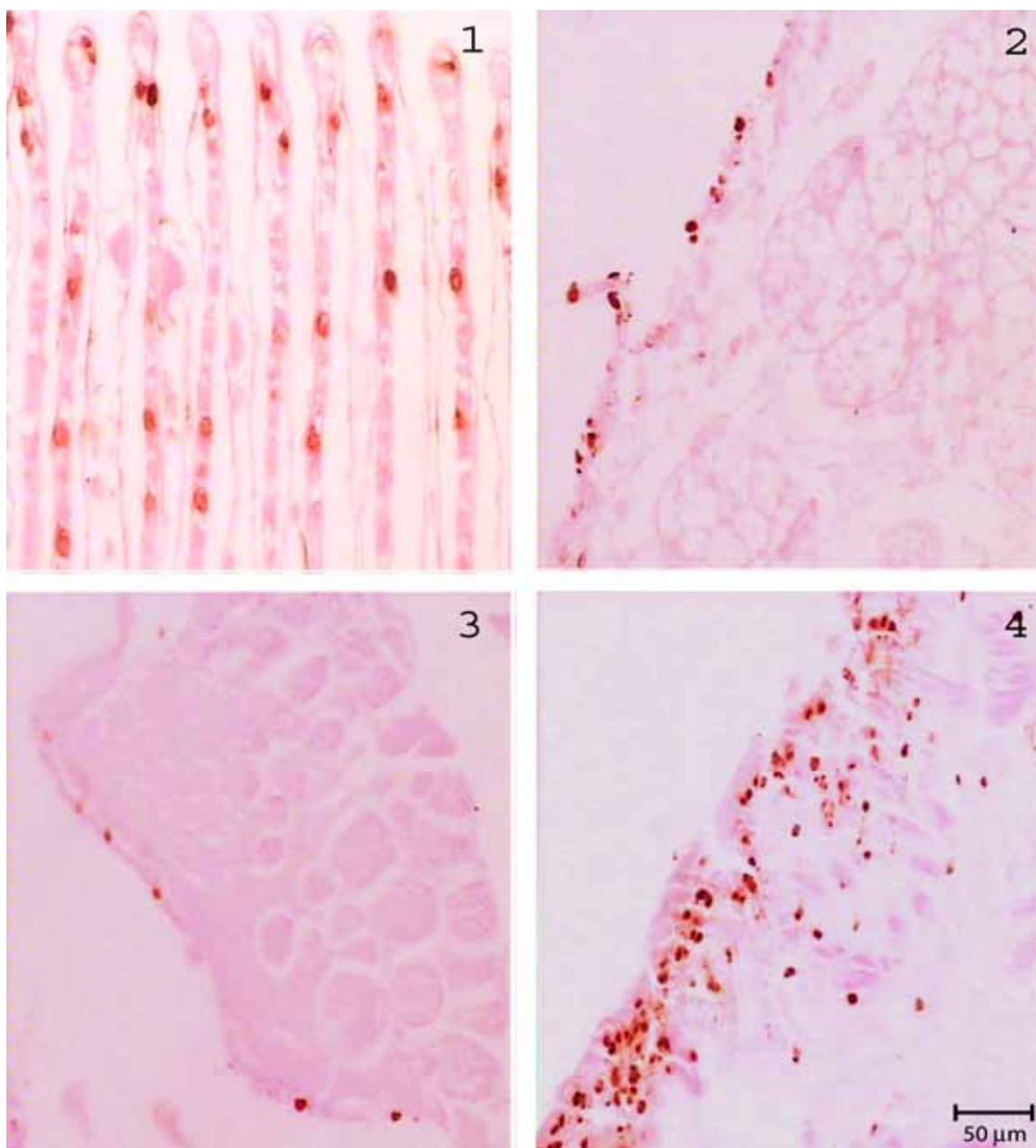
ภาพประกอบ 15 PCR ของปูแสม (*Sesarma mederi*) M = molecular weight , 0 = เนื้อเยื่อ
 ต่าง ๆ ของปูจากธรรมชาติ 3 และ 7 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดง
 ดวงขาว 3 และ 7 วัน + = positive control, - =negative control



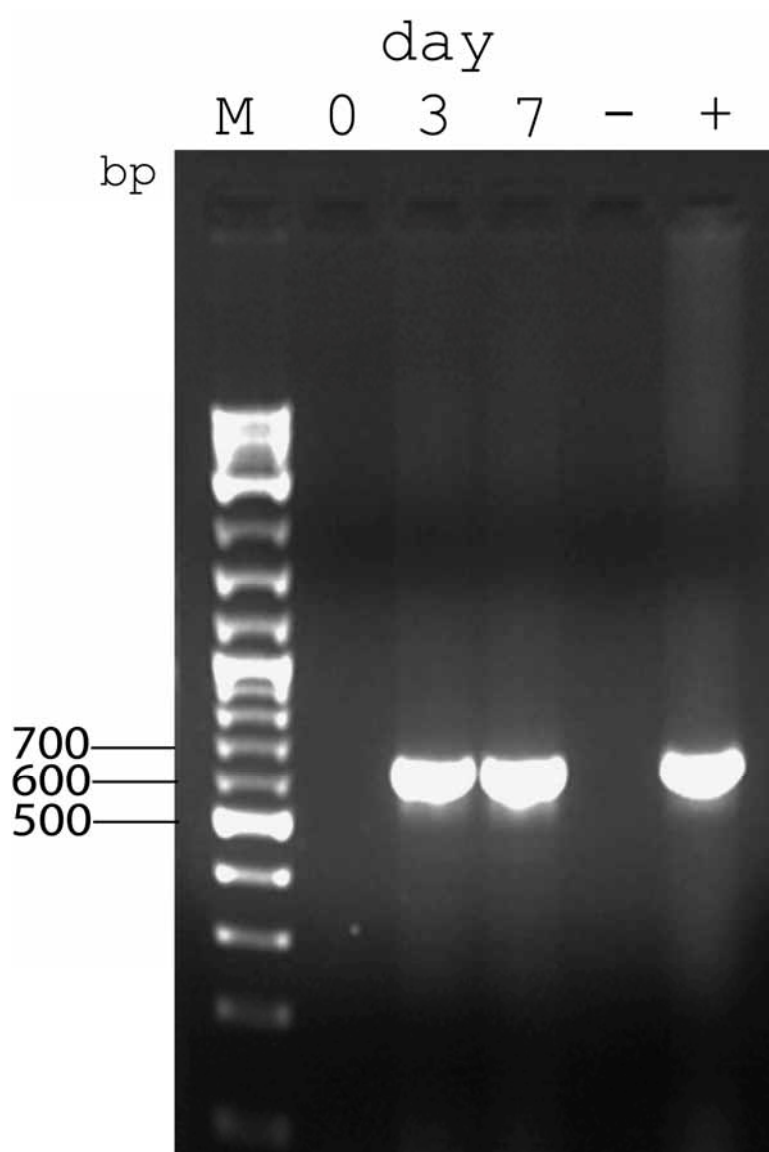
ภาพประกอบ 16 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูของจาก *Sesarma polita* ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29 (1=เหงือก 2=เนื้อเยื่อปฏิกิริยาได้เปลือก 3=ตับและตับอ่อน 4=รังไข่)



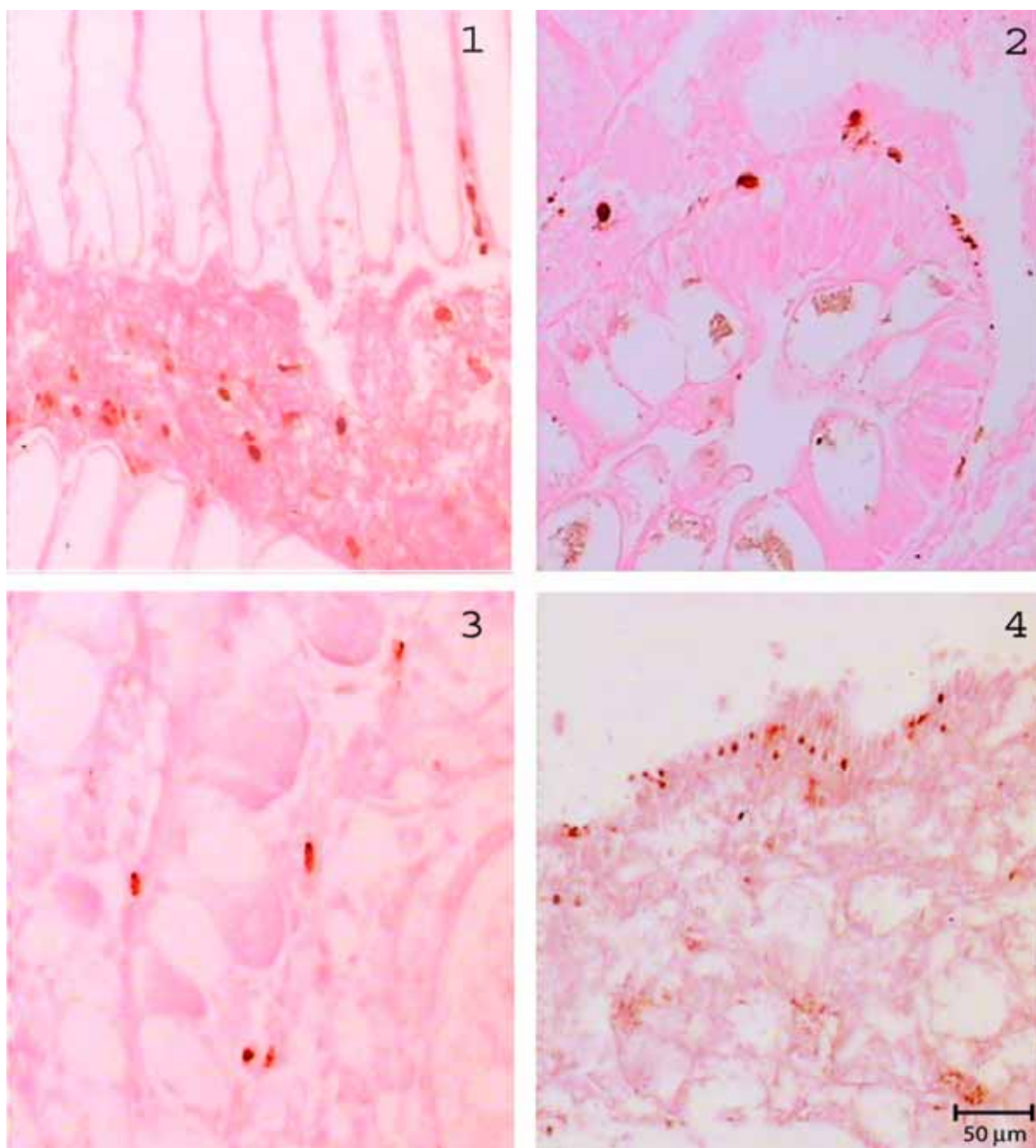
ภาพประกอบ 17 PCR ของปูทองจาก (*Sesarma polita*) M = molecular weight , 0 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูจากธรรมชาติ 3 และ 7 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 3 และ 7 วัน + = positive control, - = negative control



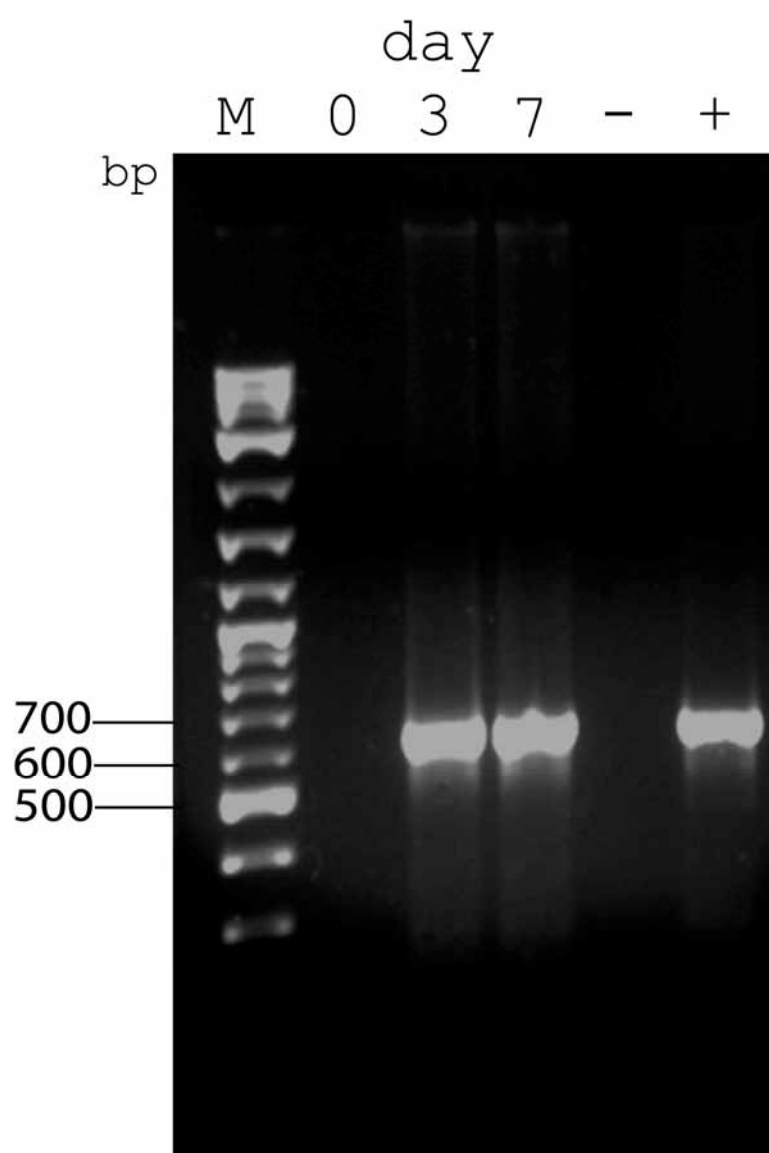
ภาพประกอบ 18 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปู *Sesarma bocourti* ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29 (1=เหงือก 2=ตับและตับอ่อน 3=รังไข่ 4=เนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือก)



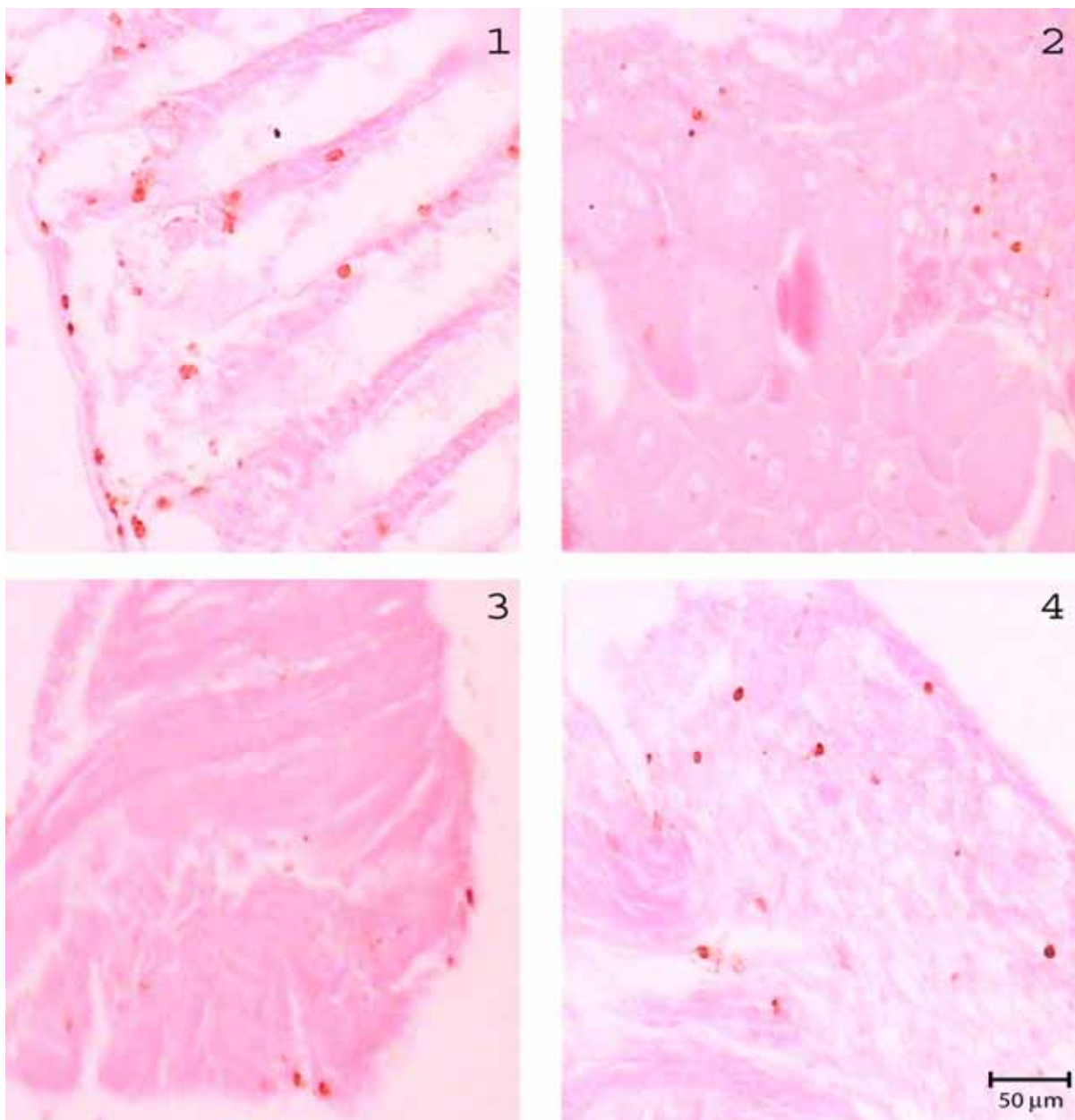
ภาพประกอบ 19 PCR ของปู *Sesarma bocourti* M = molecular weight , 0 = เนื้อเยื่อ
 ต่าง ๆ ของปูจากธรรมชาติ 3 และ 7 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสตัว
 แดงดวงขาว 3 และ 7 วัน + = positive control, - =negative control



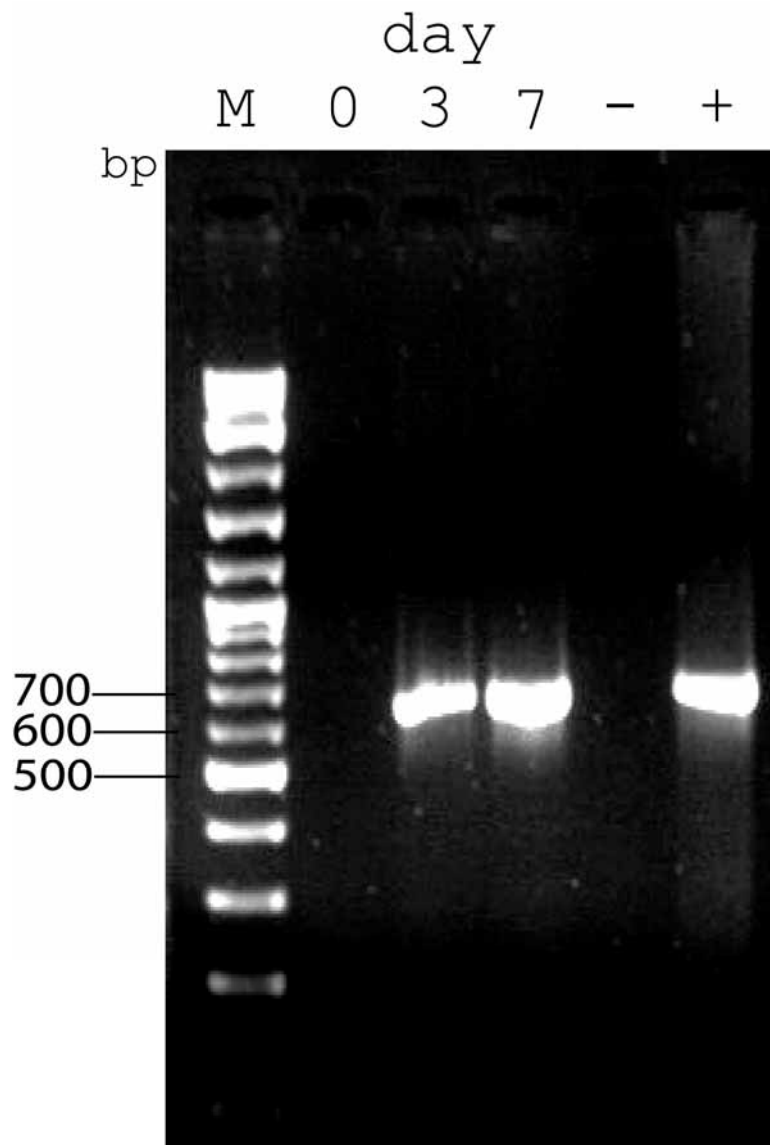
ภาพประกอบ 20 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูแสม *Sesarma moeschii* ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29 (1=เหงือก 2=ตับและตับอ่อน 3=รังไข่ 4=เนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือก)



ภาพประกอบ 21 PCR ของปูแสม (*Sesarma moeschii*) M = molecular weight , 0 = เนื้อเยื่อ
 ต่าง ๆ ของปูจากธรรมชาติ , 3 และ 7 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดง
 ดวงขาว 3 และ 7 วัน + = positive control, - =negative control



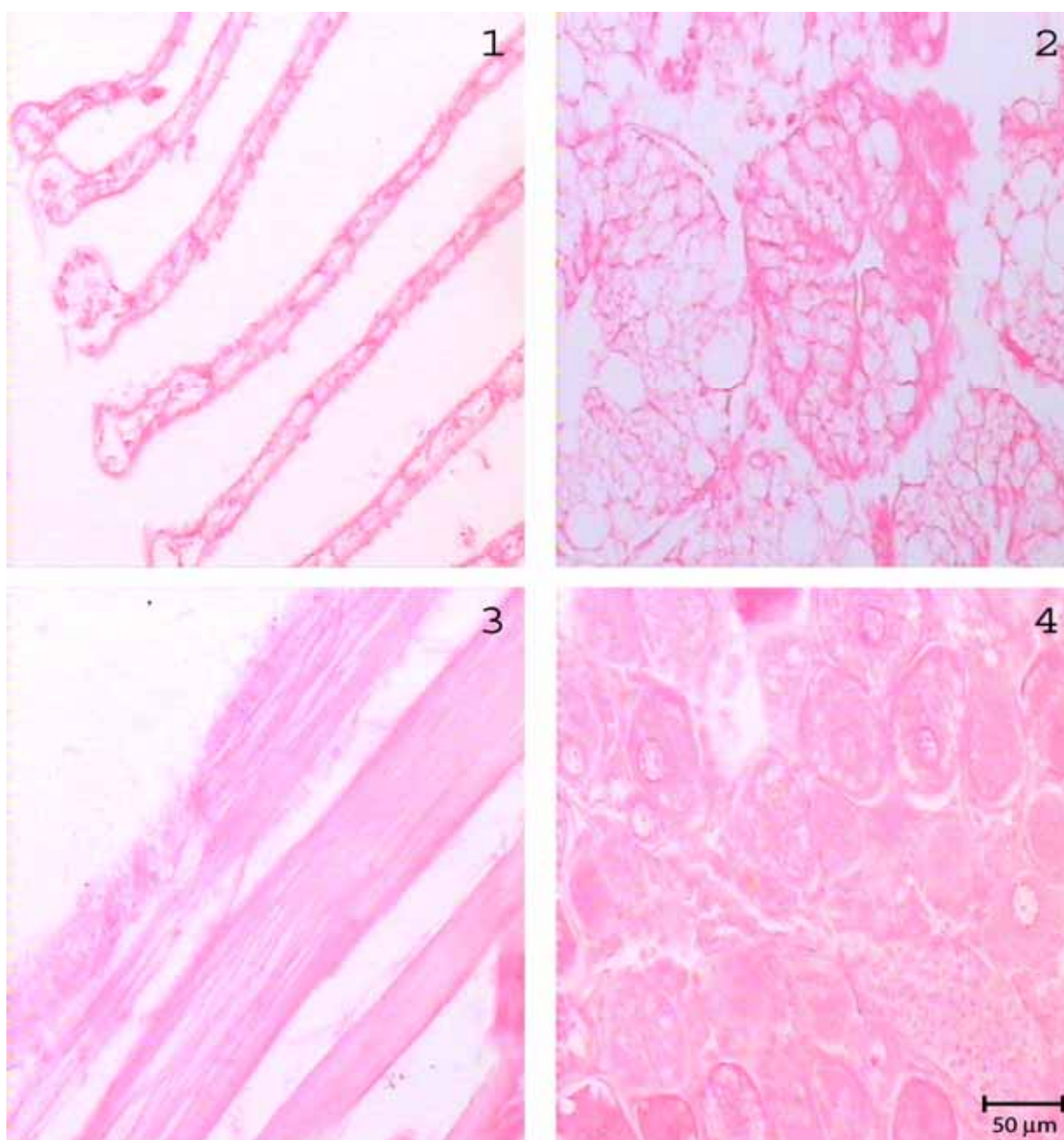
ภาพประกอบ 22 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูเสฉวน *Clibanarius longitarsus* ที่ฉีดไวรัสตัวแดง
 ดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี
 W 29
 (1=เหงือก 2=รังไข่ 3=กล้ามเนื้อ 4=เนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือก)



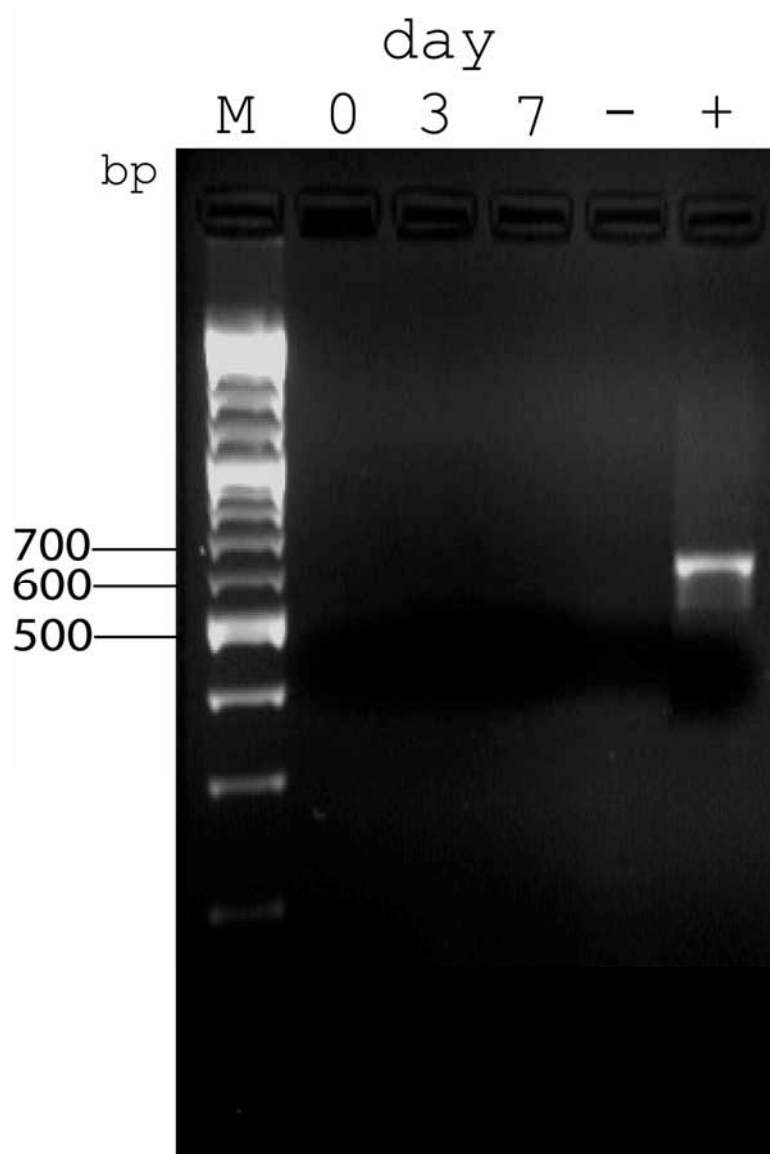
ภาพประกอบ 23 PCR ของปูเสฉวน (*Clibanarius longitarsus*) M = molecular weight

0 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูจากธรรมชาติ 3 และ 7 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูหลังจากการฉีดเชื้อ

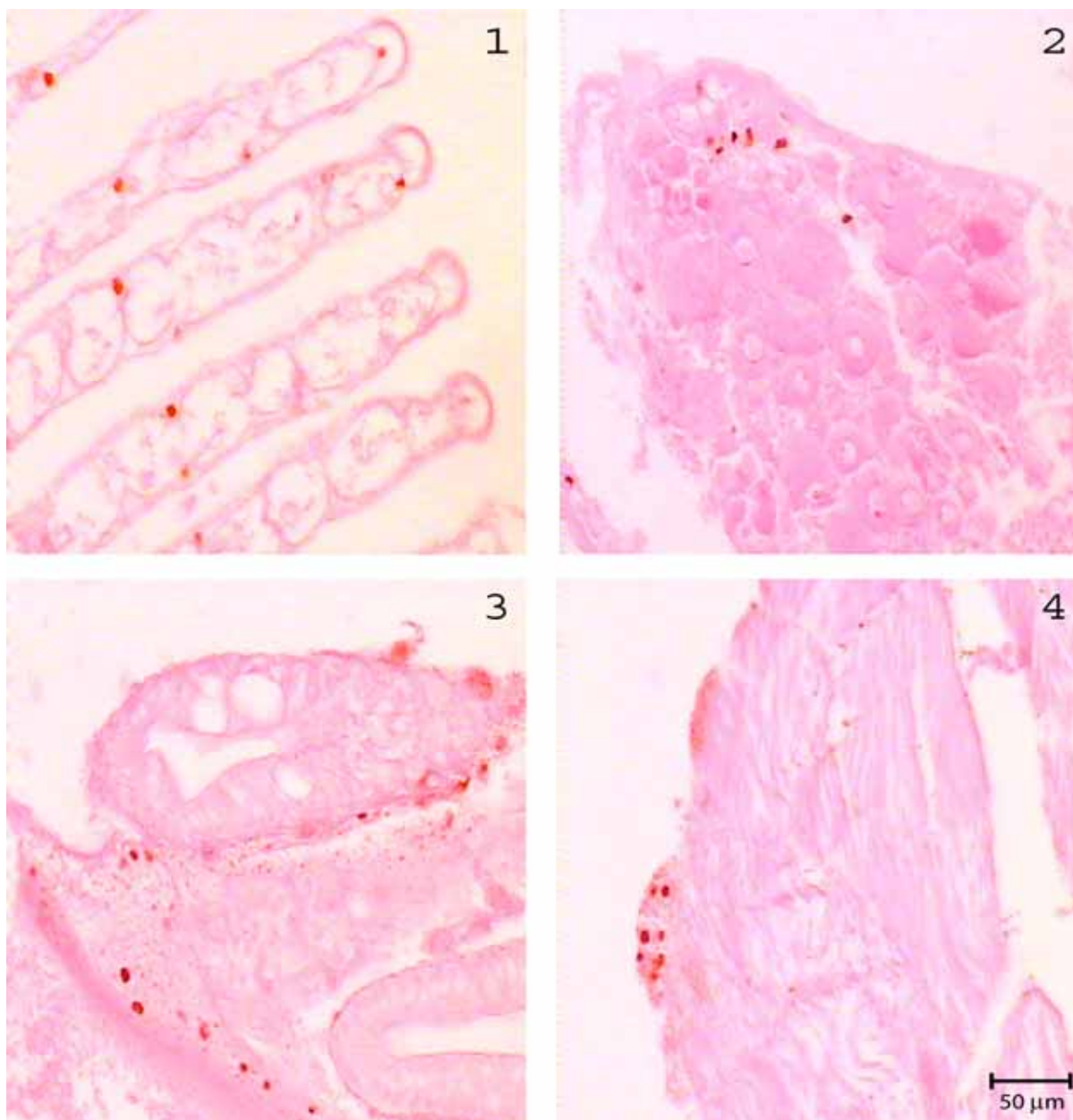
ไวรัสตัวแดงดวงขาว 3 และ 7 วัน + = positive control, - = negative control



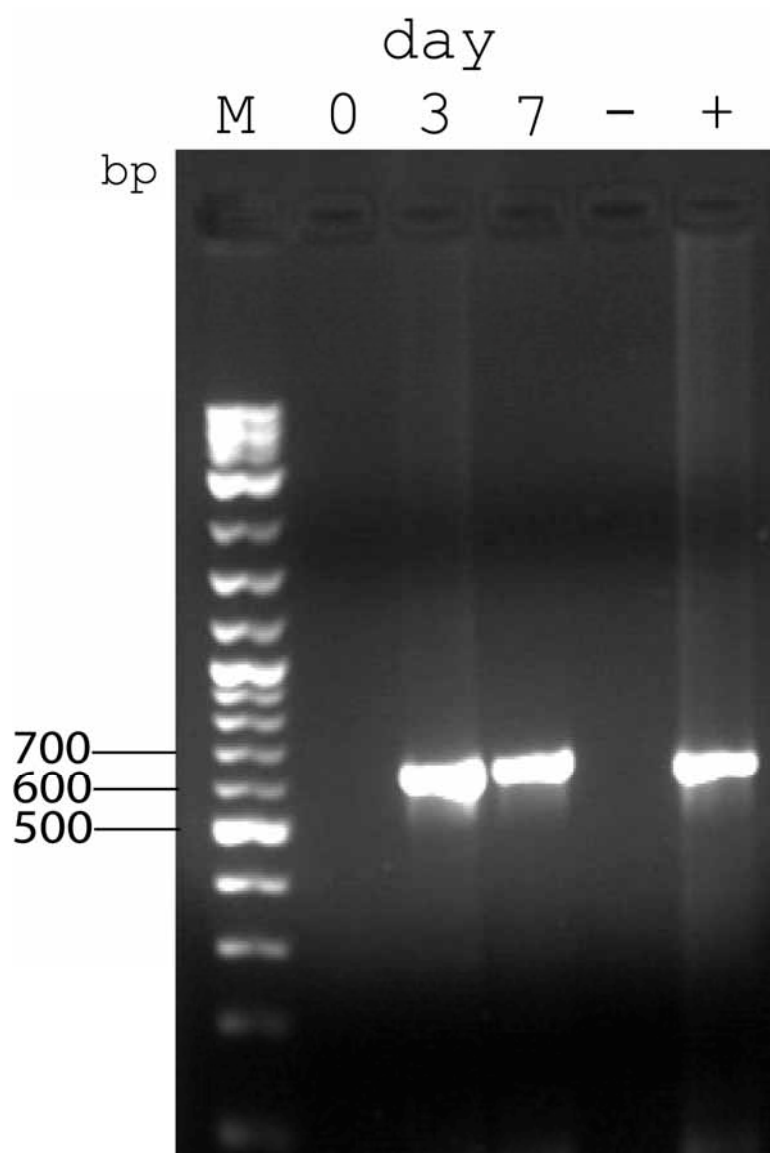
ภาพประกอบ 24 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูก้ามดาบ *Uca lactea* ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29 (1=เหงือก 2=ตับและตับอ่อน 3= กล้ามเนื้อ 4=รังไข่)



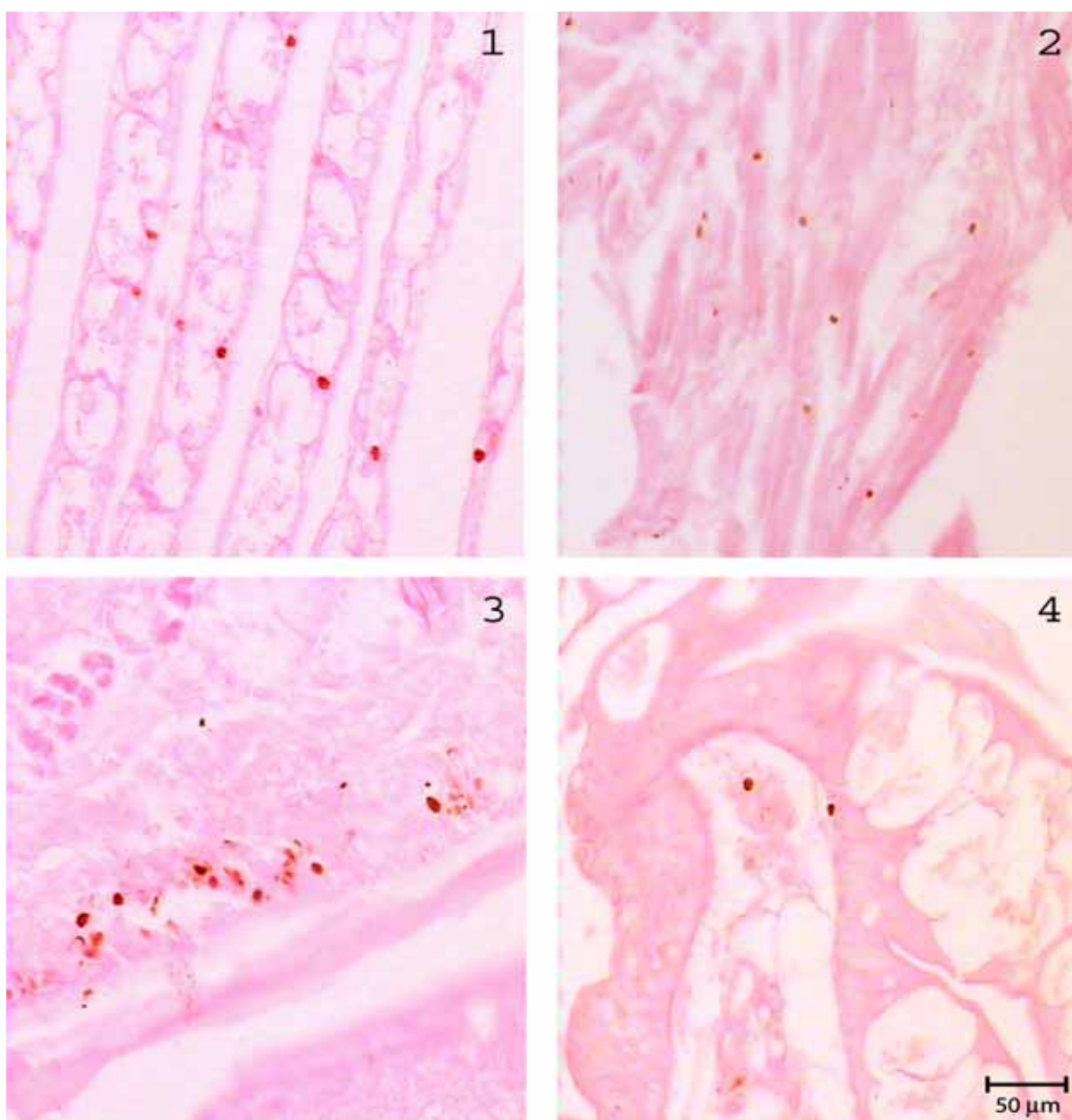
ภาพประกอบ 25 PCR ของปู้ามดาบ (*Uca lactea*) M = molecular weight , 0 = เนื้อเยื่อ
 ต่าง ๆ ของปูจากธรรมชาติ , 3 และ 7 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสตัว
 แดงดวงขาว 3 และ 7 วัน + = positive control, - = negative control



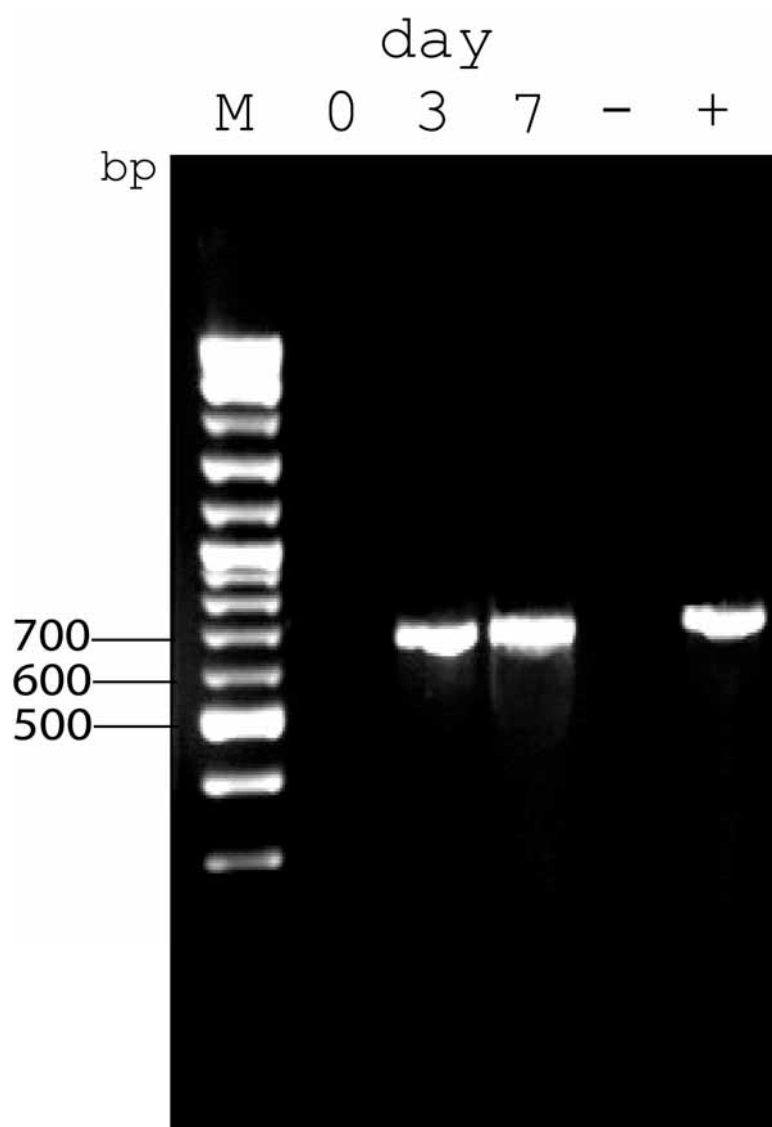
ภาพประกอบ 26 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปู้ามดาบ *Uca forcipata* ที่ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29 (1=เหงือก 2=รังไข่ 3=ตับและตับอ่อน 4=กล้ามเนื้อ)



ภาพประกอบ 27 PCR ของปู้ามดาบ (*Uca forcipata*) M = molecular weight , 0 = เนื้อเยื่อ
 ต่าง ๆ ของปูจากธรรมชาติ , 3 และ 7 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสตัว
 แดงดวงขาว 3 และ 7 วัน + = positive control, - =negative control



ภาพประกอบ 28 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของปูนา *Somanniathelphusa germaini* ที่ฉีดไวรัสตัวแดง ดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W 29
(1=เหงือก 2=กล้ามเนื้อ 3=เนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือก 4=ตับและตับอ่อน)



ภาพประกอบ 29 PCR ของปูนา (*Somaniathelphusa germaini*) M = molecular weight

0 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูจากธรรมชาติ 3 และ 7 = เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปูหลังจากการฉีดเชื้อ

ไวรัสตัวแดงดวงขาว 3 และ 7 วัน + = positive control, - =negative control

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการรวบรวมปูในวงศ์ Grapsidae 5 ชนิด ได้แก่ *Metopograpsus latifrons*, *Sesarma bocourti* ปูแสมก้ามแดง (*Sesarma mederi*) ปูทองจาก (*Sesarma polita*) ปูแสม (*Sesarma moeschii*) วงศ์ Paguridae 1 ชนิด ได้แก่ ปูเสฉวน (*Clibanarius longitarsus*) วงศ์ Ocypodidae 2 ชนิด ได้แก่ ปูก้ามดาบ (*Uca forcipata*) ปูก้ามดาบ (*Uca lactea*) วงศ์ Parathelphusidae 1 ชนิด ได้แก่ ปูนา (*Somanniathelphusa germaini*) จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมืองและอำเภอยะหมะพรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ

ซึ่งการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากตัวอย่างปูที่นำมาทดลองที่รวบรวมได้จากธรรมชาติและจากการทดลองชักนำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าสู่ปูทดลองโดยตรงและนำไปเลี้ยงโดยทำการเก็บตัวอย่างปูทดลองในวันที่ 3 และวันที่ 7 ตามลำดับ นำไปตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี PCR และวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาวคือ W29 (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359) ผลการตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูทุกวงศ์ที่ชักนำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ยกเว้นในปูวงศ์ Ocypodidae ได้แก่ *Uca lactea* ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ชักนำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ผลจากการตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นตะกอนจากปฏิกิริยาแอนติเจนจับกับแอนติบอดีเป็นสีน้ำตาลตามเนื้อเยื่อ ต่าง ๆ ได้แก่ เหงือก รั้งไข่ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ โดยเฉพาะปูวงศ์ Grapsidae ได้แก่ *Metopograpsus latifrons* พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอย่างรุนแรงตั้งแต่วันที่ 3 หลังจากชักนำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบการติดเชื้อในอวัยวะต่าง ๆ เช่น เหงือก รั้งไข่ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ เป็นต้น ส่วนในปูวงศ์ Parathelphusidae ได้แก่ *Somanniathelphusa germaini* พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันที่ 3 หลังจากการฉีด haemolymph เช่นเดียวกันแต่มีจำนวนบริเวณการติดเชื้อที่น้อยกว่าในปูวงศ์ Grapsidae โดยปริมาณการติดเชื้อจะลดลงในวันที่ 7 ตามลำดับ นอกจากนี้ ปูในวงศ์ Ocypodidae ได้แก่ *Uca lactea* ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธี PCR

การตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากปูชนิดต่าง ๆ โดยการชักนำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด haemolymph จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นการชักนำให้ปูได้รับเชื้อโดยตรงและสามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของศุภมาตย์และคณะ (Supamattaya; et al. 1998: 79-85) ที่ศึกษาการถ่ายทอดไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไปยังคริสต์เตียน 3 ชนิด ได้แก่ ปูม้า (*Portunus pelagicus*) ปูทะเล (*Scylla serrata*) และกุ้งเคย (*Acetes sp.*) โดยการชักนำให้ปูทดลองติดเชื้อไวรัสโดยการฉีด การจุ่ม และการกิน พบว่า การฉีดให้ผลดีที่สุด โดยทำให้ปูตาย 100 % ภายใน 3 วัน ส่วนการจุ่มและการกินพบอัตราการตาย 100 % ภายใน 5 วัน และภายใน 9 วัน ตามลำดับ

ผลการตรวจเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ที่มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะเห็นลักษณะของการเกิดสีน้ำตาลภายในนิวเคลียส แสดงให้เห็นว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวซึ่งเป็น DNA virus จะมีการเพิ่มจำนวนภายในนิวเคลียส โดยนิวเคลียสจะมีการบวมโตผิดปกติโดยอวัยวะเป้าหมายในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้แก่ เหงือก และเนื้อเยื่อใต้เปลือก (Chang; et al. 1996: 133) สำหรับการตรวจการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสอื่น ๆ เช่น ไวรัสหัวเหลือง (Sithigorngul ; et al. 2000, 2002: 27-34, 71-76) ไวรัสทอรา (Longyant; et al. 2007) ไวรัสเอชพีวี (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) ไวรัสเอ็มบีวี (Boonsanongcholying; et al. 2006: 371-376) ไม่พบการติดเชื้อไวรัสเหล่านี้ในอวัยวะต่าง ๆ ของปูเหล่านี้

จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นว่าการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถใช้ยืนยันผลจากการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี PCR ในปูเหล่านี้ได้อย่างดี ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าปูบางชนิด เช่น ปูวงศ์ Grapsidae ได้แก่ *Metopograpsus latifrons* อาจเป็นพาหะของโรคตัวแดงดวงขาวได้และบางชนิดเช่นปูวงศ์ Ocypodidae ได้แก่ *Uca lactea* อาจทนทานและสามารถต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้เนื่องจากมีกลไกบางอย่างในการช่วยกำจัดเชื้อไวรัสออกจากร่างกาย

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูวงศ์ต่าง ๆ สามารถแยกปูออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีการติดเชื้อมากในปูวงศ์ Grapsidae ได้แก่ *Metopograpsus litafrons*, *Sesarma bocourti*, *Sesarma moeschii*, *Sesarma polita* กลุ่มที่มีการติดเชื้อน้อยในปูวงศ์ Paguridae ได้แก่ *Clibanarius longitarsus*, วงศ์ Grapsidae ได้แก่ *Sesarma mederi* วงศ์ Ocypodidae ได้แก่ *Uca forcipata* และวงศ์ Parathelphusidae ได้แก่ *Somanniathelphusa germaini* และกลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อในปูวงศ์ Ocypodidae ได้แก่ *Uca lactea*

การตรวจศักยภาพในการเป็นพาหะไวรัสตัวแดงดวงขาวของปูในวงศ์ Grapsidae, Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae โดยตรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี W29 ในปูชนิดต่าง ๆ สามารถสรุปได้ดังตาราง 3

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการทดลองและติดตามการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูสปีชีส์อื่น ๆ ที่พบตามบ่อเลี้ยงกุ้ง
2. ควรทำการเลี้ยงร่วมกันระหว่างกุ้งและปูเพื่อทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากปูไปสู่กุ้งได้อย่างไร และเพื่อเป็นการยืนยันว่าปูอาจเป็นพาหะและสามารถถ่ายทอดเชื้อไปสู่กุ้งได้จริงหรือปูอาจหนทางและจัดการการติดเชื้อไวรัสได้
3. ควรศึกษาความต้านทานการติดไวรัสและกลไกในการช่วยกำจัดไวรัสของปู *Uca lactea*

ตาราง 3 สรุปศักยภาพในการเป็นพาหะไวรัสตัวแดงดวงขาวของปูในวงศ์ Grapsidae, Paguridae, Ocypodidae และ Parathelphusidae โดยตรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ในปูชนิดต่าง ๆ

ชนิดของปู	โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29	ตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry		
		ระยะเวลาหลังได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาว (วัน)		
		ธรรมชาติ	3 วัน	7 วัน
วงศ์ Grapsidae <i>Metopograpsus litafrons</i>	+	0/20 (0)	20/20 (100)	4/16 (25)
<i>Sesarma mederi</i>	+	0/17 (0)	13/20 (65)	5/22 (23)
<i>Sesarma polita</i>	+	0/20 (0)	16/23 (70)	9/21 (43)
<i>Sesarma bocourti</i>	+	0/15 (0)	14/15 (93)	10/15 (66)
<i>Sesarma moeschii</i>	+	0/15 (0)	11/15 (73)	2/15 (13)
วงศ์ Paguridae <i>Clibanarius longitarsus</i>	+	0/15 (0)	10/15 (66)	6/15 (40)
วงศ์ Ocypodidae <i>Uca lactea</i>	+	0/30 (0)	0/23 (0)	0/17 (0)
<i>Uca forcipata</i>	+	0/20 (0)	13/20 (65)	8/25 (32)
วงศ์ Parathelphusidae <i>Somanniathelphusa germaini</i>	+	0/20 (0)	13/20 (65)	2/15 (13)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บเป็นจำนวนร้อยละ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กัลยาณี ยงจินดารัตน์. (2531). **การกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- จรัสพร ตั้งขบวนบุตร. (2547). **การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP 28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- จิรพร เรืองศรี. (2547). **การตอบสนองภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง และไวรัสตัวแดงดวงขาว**. วารสารสงขลานครินทร์ วท.2548 27(ฉบับพิเศษ) : 239-252.
- จันทนา นิธิเมธาโชค. (2539). **การสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดย *Clostridium butyricum***. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- จิราพร เกษรจันทร์และสิทธิ บุญยรัตผลิน. (2538). **การผลิต monoclonal antibodies ในการตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ**. เอกสารวิชาการ. (15) : 1-14.
- จิราพร เกษรจันทร์ และคนอื่น ๆ. (2543). **ศึกษาความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงจากพ่อแม่กุ้งกุลาดำสู่ลูกกุ้ง**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2543. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงทะเลฝั่งอ่าวไทยจังหวัดสงขลา. กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2543). **กุ้งไทย 2000**. กรุงเทพฯ : เจริญรัฐการพิมพ์.
- ชัยณรงค์ วงศ์ทรัพย์. (2544). **การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวใน *Penaeus monodon* โดยวิธี Multiplex RT-PCR**. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปี 2546. คณะแพทยศาสตร์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ถวิล ประมวล. (2533). **อนุกรมวิธานของปูนาและลักษณะของโกโนพอด โออมาติเดีย**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

- วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล; สุรพล วิเศษสรรค์ และนนทวิทย์ อารีย์ชน. (2547). **ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดในการกำจัด *Zoothamnium* sp. และความเป็นพิษในลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius).** ในการประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 5. หน้า 21-30.
- ศุภลักษณ์ วิรัชพันธุ์. (2532). **อนุกรมวิธานปูเปอร์ทูนิตในประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- สุพจน์ แสงมณี. (2530). **เดคาพอดครัสเตเชียนและสโตมาโตพอดครัสเตเชียนในป่าชายเลนจังหวัดชุมพรและจังหวัดระนอง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- สุรินทร์ มัจฉาชีพ. (2516). **ปูแสมในอ่าวไทย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- เสรี บรรพกิจตร. (2522). **อนุกรมวิธานของปูก้ามดาบในประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- อมรรัตน์ อังอัฉะริยะ. (2544). **การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวเพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัสในกุ้งกุลาดำ.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร
- Anderson, I.G. and Prior, H.C. (1992). Baculovirus infections in the mud crab, *Scylla serrata* and a freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* from Australia. *Invertebrate pathol* . 60 : 265-273.
- Anil, T.M. Shankar, K.M. and Mohan, C.V. (2002). Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. *Diseases of Aquatic Organisms*. 51 : 67-75.
- Boonsanongcholying, C. et al. (2006). Production of Monoclonal Antibodies to Polyhedrin of Monodon Baculovirus (MBV) from Shrimp. *Science Asia*. 32 : 371-376.

- Chaivisuthangkura, P. et al. (2004). Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp. *Science Asia*. 30 : 359-363.
- Chang, P.S. et al. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27 : 131-139.
- Chen, L.L. et al. (2000). Natural and experimental infection of white spot syndrome in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 40 : 157-161.
- Chen, L.L. et al. (2004). Susceptibility of *Penaeus japonicus*, *P.monodon* and *P. semisulcatus* to white spot syndrome Virus (WSSV). *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*. 31 (2) : 101-114.
- Chou, H.Y. et al. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25 : 133-141.
- Flegel, T.W.; Boonyaratpalin, S. and Withyachumnarnkul, B. (1997). "Progress in research on yellow-head virus and white spot virus in Thailand." In Flegel, T.W. and I.H. Mac Rae. (eds.), *Diseases in Aquaculture III*, Asian Fisheries Society, pp. 285- 296. Manila, Philippines.
- Guang-Hsiung Kou. et al. (1998). Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In Flegel TW (ed) *Advance in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. 267-271.
- Hameed, A.S.S. Charles, M. X. and Anilumar, M. (2000). Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* of white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 183 : 207-213.
- Hulten, C.W. et al. (2001). White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*. 285 : 228-233.
- Kanchanaphum, P. et al. (1998). Experimental transmission of White spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34 : 1-7.

- Kasornchadra, J. and Boonyaratpalin, S. (1994). White spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. *Farming*. 12 : 9-12.
- Kasornchadra, J. et al. (2002). Vertical transmission of white spot syndrome virus. In *The 2nd National Symposium on Marine Shrimp*, pp. 32-41. Phuket, Thailand.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for disease of penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic method. *Aquaculture*. 164 : 201-220.
- Liu, W. et al. (2002). Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). *Diseases of Aquatic Organisms*. 49 : 11-18.
- Lo, C.F. et al. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25 : 133-141.
- Lo, C.F. et al. (1996). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27 : 215-225.
- Longyant, S. et al. (2007). Taura syndrome virus (TSV) detected in single infection and dual infections with white spot syndrome virus (WSSV) using specific monoclonal antibodies raised against the capsid protein VP3 *Diseases of Aquatic Organisms*. Submitted
- Mohan, C.V. et al. (1998). Histology of cultured shrimp showing gross sign of yellow-head syndrome and white-spot syndrome during 1994 Indian Epizootics. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34 : 9-12.
- Nadala, Jr. et al. (1997). Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 141-146.
- Nadala, Jr. et al. (2000). Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. *Journal of Virological Methods*. 84 : 175-179.

- Park, J.H. et al. (1998). An infections viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34 : 71-75.
- Peng, S.E. et al. (1998). Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 253-262.
- Poulos, B.T. et al. (2001). Development and applications of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27 : 215-225.
- Rukpratanporn, S. et al. (2005). Generation of monoclonal antibodies specific to Hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65 : 85-89.
- Supamattaya, K. et al, (1998). 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.
- Sahul Hameed, A.S. Charles, M.X. and Anikumar, M. (2000). Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 183 : 207-213.
- Sahul Hameed, A.S. et al. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crab (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*. 201 : 179-186.
- Sahul Hameed, A.S. et al. (2003). Experimental infection of twenty species syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 57 : 157-161.
- Sithigorngul, P. et al. (2000) Development of a monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42 : 27-34.
- Sithigorngul, P. et al. (2002) Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 49 : 71-76.
- Van Hulten, M.C.W. et al. (2000a) Anlysis of genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp cotaining ribonucleasetase genes repeat regions. *Journal of General Virology*. pp. 307-316.

- Van Hulten, M.C.W. et al. (2000b) Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*. 266 : 227-236.
- Van Hulten, M.C.W. et al. (2001) White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*. 285 : 228-233.
- Wang, C.H. et al. (1995) Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot virus (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23 : 227-236.
- Wongteerasupaya, C. et al. (1995). A non-occluded, stythetic baculovirus that occurs incells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21 : 69-77.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

Gelatin	1	กรัม
Chrome alum (chromium potassium sulphate)	0.05	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตรเป็น	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 ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1.15	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตร เป็น	1000	มิลลิลิตร

สารละลาย Calf Serum 10% (P₁⁺)

Calf serum	10	มิลลิลิตร
PBS	100	มิลลิลิตร

สี Enrilich'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
เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เจือจาง 1:50 ด้วย 2XPBS		
เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ผ่านการกรองด้วย		
กระดาษกรองปราศจากเชื้อ		
ขนาดรู 0.45 ไมโครมิลลิเมตร	1	ไมโครลิตร
2XPBS	49	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	2	มิลลิกรัม
Elution buffer	0.5	มิลลิกรัม
ควรเก็บที่ อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส		

Binding buffer

เตรียมในปริมาตร 25 มิลลิลิตร

Guanidine-HCl	6	โมลาร์
Urae	10	มิลลิโมลาร์
Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
20% Triton X-100(v/v), pH 4.4		

Proteinase K

Lyophilized proteinase K	90	มิลลิกรัม
Elution buffer	5	มิลลิลิตร
ควรเก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

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
--------------------------------------	----	-----------

10X 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 Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae

ชนิดของปูในวงศ์ Grapsidae

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

จัดอยู่ใน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Grapsidae
Genus	<i>Metopograpsus</i>
Species	<i>latifrons</i>

ชื่อสามัญ –

ลักษณะเด่น

ส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านใน มีความกว้างเป็น 2/3 ของระยะทางระหว่างมุมขอบตาด้านนอกและมีพื้นผิวเรียบ ขอบด้านข้างของกระดองสอบเข้ามาทางด้านหลัง ส่วนท้องปล้องที่ 6 ของตัวผู้แผ่ขยายออกมากทางด้านข้าง

ลักษณะทั่วไป

กระดอง ลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู มีความกว้างมากกว่าความยาวและมีพื้นผิวเรียบส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านใน 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 จะมีสันเพียง 8-9 แถว ขอบด้านข้างของกระดองเรียบและสอบเข้ามาทางด้านหลัง ขอบทางด้านหน้าตรงและมีลักษณะเป็นแบบพื้นเลื่อย ส่วนบนของขอบตาด้านล่างมีเยื่อเหนียวแต่ไม่เป็นสัน

ก้าม มีลักษณะแข็งแรงและมีขนาดไม่เท่ากัน ขอบด้านในของ ischium และส่วนปลายของ merus มีหนามแหลมเป็นพื้นเลื่อยขนาดต่างกันจำนวนหลายอัน พื้นผิวด้านบนของ carpus เป็นปุ่มเล็ก ๆ กระจัดกระจายทั่วไป พื้นผิวด้านบนของ propodus เป็นปุ่มเล็ก ๆ กระจายกันห่าง ๆ พื้นผิวด้านนอกมีสัน

ยาว 1 แถว ซึ่งจะยาวตลอดไปจนถึงส่วนปลายทางด้านล่าง ใต้สันนี้ลงไปมีสันเฉียงเป็นริ้ว ๆ ยาวเลยไปจนถึงขอบด้านล่าง พื้นผิวด้านบนส่วนแรก dactylus เป็นปุ่มเล็ก ๆ ค่อนข้างแหลมคมกระจัดกระจาย

ขาเดิน ทั้ง 4 คู่แข็งแรงและค่อนข้างเรียวยาว ซึ่งขอบด้านหน้าของ merus ใกล้กับส่วนปลายมีแฉ่งยื่น 1 อัน ส่วนขอบด้านหลังตรงปลายแหลมเป็นฟันเลื่อยขนาดต่างกัน 3-4 อัน merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง ส่วน propodus จะมีความยาวเป็น 3 เท่าของความกว้างและเป็น 2 เท่าของ dactylus propodus ของคู่แรกมีขนเป็นแถบยาวเรียงเป็นแถวทางพื้นผิวเรียบด้านบนใกล้กับขอบด้านหน้าแต่คู่สุดท้ายจะมีขนขอบด้านหน้า

ส่วนท้อง ปล้องที่ 6 ของตัวผู้แผ่ขยายออกทางด้านข้าง ส่วนยื่นตรงปลายของอวัยวะเพศผู้เป็นสารพวกไคติน ลักษณะเป็นรูปตัว T เชียงออกไปทางด้านนอก

สี กระดองมีสีน้ำตาลอ่อนสลับลวดลายสีเปลือกมังคุด หรือมีพื้นสีม่วงคล้ำทั้งหมด ส่วนก้ามหนีบ (chela) มีสีม่วง

ถิ่นอาศัย

เกาะอยู่ตามต้นจาก ต้นโกกง ตามเสาสะพานหรือประตูน้ำนาุ้ง บริเวณริมฝั่งคลอง หรือตามเกาะ

การกระจาย

บริเวณอินโด-แปซิฟิก ตั้งแต่อินเดียไปจนถึงบริเวณหมู่เกาะทางฝั่งตะวันออกของออสเตรเลีย

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

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Grapsidae
	Genus	<i>Sesarma</i>
	Species	<i>mederi</i>

ชื่อสามัญ ปูแสม ปูแสมก้ามแดง

ลักษณะเด่น

ผิวด้าน propodus ของก้ามมีสันยาวตามแบบ pectinate 1 แถว พบทั้งในตัวผู้และตัวเมีย ส่วนพื้นผิวด้านในมีสันตามขวางประกอบด้วยเม็ดเล็ก ๆ เรียงกันเป็นแถวสูงขึ้นมาเด่นชัด ขอบด้านบน

dactylus ของก้ามหนีบมีปุ่มลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดเท่า ๆ กันเรียงเป็นแถวตามยาวจำนวน 40 ถึง 60 อัน

ลักษณะทั่วไป

กระดอง มีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างมากกว่าความยาว ผิวด้านบนมีกลุ่มขนกระจายอยู่ทั่วไป ส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านในมีลักษณะชันและแบ่งออกเป็น 4 ลอนอย่างชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่นอก บนลอนทั้ง 4 นี้มีกลุ่มขนค่อนข้างยาวกระจัดกระจายทั่วไป บริเวณ mesogastric ชัดเจนกว่าบริเวณอื่น บริเวณ brachial มีสันเฉียง ขนานกัน 5 ถึง 6 แถว บริเวณ intestinal มีสันเฉียง 2 แถวทำมุมฉากกันสันเฉียงบริเวณ branchial ทั้งสองข้างขอบด้านข้างกระดองหลังมุมขอบตาด้านนอกมีรอยหยักเป็นแฉ่งยื่นข้างละ 1 อัน ขอบด้านหน้าโค้งเป็นคลื่นและเว้าเข้าตรงกลาง เบ้าตาเฉียง หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 เรียวเล็กอยู่ในช่องเบ้าตา

ก้าม แข็งแรง ขอบด้านใน merus หยักเป็นฟันเลื่อยขนาดต่างกัน ขอบด้านบนตรงปลายมีแฉ่งยื่น 1 อัน ผิวบน carpas เป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายทั่วไป ขอบด้านในมีแฉ่งยื่นรูปสามเหลี่ยม 1 อัน ใต้แฉ่งยื่นนี้มีปุ่มเล็ก ๆ เรียงกันเป็นแถวตามแนวตั้งฉาก 3 ถึง 4 อัน ผิวด้านบน propodus มีสันตามยาวแบบ pectinate 1 แถว พบทั้งในตัวผู้และตัวเมีย ผิวด้านใน propodus มีสันตามขวางซึ่งเกิดจากเม็ดเล็ก ๆ 10 ถึง 11 อันเรียงเป็นแถว 1 แถวสูงขึ้นมาเด่นชัดมาก ส่วนผิวด้านนอกเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป บริเวณตรงกลางมีลักษณะเป็นสันตามยาวขนาดสั้น 1 แถว ขอบด้านบนของ dactylus มีปุ่มเล็ก ๆ รูปสี่เหลี่ยมขนาดเท่า ๆ กัน จำนวน 40 ถึง 60 อัน เรียงตัวเป็นแถวตลอดความยาวของ dactylus ซึ่งพบทั้งในตัวผู้และตัวเมีย

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

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

ถิ่นอาศัย

ชุดรูอยู่บริเวณฝั่งแม่น้ำที่เป็นน้ำกร่อยหรือชายฝั่งทะเลที่มีสภาพเป็นป่าชายเลนอยู่ในเขตเหนือระดับน้ำขึ้นสูงสุดของช่วงน้ำตาย ดินเป็นโคลนค่อนข้างแข็ง ภูมิลำเนาขนาดค่อนข้างใหญ่ บางครั้งพบเข้าไปอาศัยในรูของปูทะเล บริเวณปากภูมิลำเนาจะพบรอยเดินมากมายของปู เนื่องจากปูแสมออกหากินตลอดเวลาในช่วงน้ำลง เมื่อมีภัยจะวิ่งลงรู สักครู่จะโผล่ออกมาอีก ในการจับปูแสมนั้นพบว่าชาวบ้านนิยม

จับในตอนกลางคืนเดือนมืด โดยใช้ตะเกียงแก๊สสำหรับส่องปูแสมที่ออกหากิน ใช้มือเปล่าหรือใส่ถุงมือ ตะครุบแล้วบีบให้แน่นใส่ช่องเก็บไว้ หรืออาจใช้ไม้ไผ่ปลายแหลมคอยดักแทงรูกันไม่ให้ปูหนีลงรูได้ นักจับปูบางคนใช้เท้ากระแทบหนัก ๆ หลาย ๆ ครั้งเหนือรู ปูแสมก็จะคลานขึ้นมาให้จับ บางคนจะออกจับปูแสมในช่วงน้ำเกิด เมื่อน้ำท่วมรู ปูแสมจะหนีขึ้นไปเกาะตามกิ่งไม้ ต้นไม้ในป่าชายเลน ก็สามารถเลือกจับได้ที่ละมาก ๆ ปูแสมบางตัวมีปรสิตพวก *Succulina* sp. เกาะอยู่บริเวณส่วนท้องทำให้ท้องของปูตัวผู้แผ่ขยายกว้างออกคล้ายตัวเมีย

การแพร่กระจาย

ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา ปัตตานี นราธิวาส ฝั่งทะเลอันดามัน พิลิปปินส์ ปัตตาเวีย ชวา เซเลเบส บอร์เนียว หมู่เกาะเมโกลี มาเกาส์ชาร์ สิงคโปร์ ปีนัง ปอนเตียนัค ซาราวัก มาลัคคา

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

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Grapsidae
	Genus	<i>Sesarma</i>
	Species	<i>polita</i>

ชื่อสามัญ ปูของจาก

ลักษณะเด่น

กระดอง เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า พื้นผิวเรียบ มีความยาวมากกว่าความกว้างอย่างเด่นชัด front แบ่งออกเป็น 4 ลอน ผิวมีปุ่มแหลมคมเรียงตัวเป็นแถวตามขวางหลายแถว ผิวของก้ามหนีบเป็นปุ่มเล็ก ๆ แหลมคมกระจัดกระจายอยู่ทั่วไป merus ของขาเดินทั้ง 4 คู่เรียวยาว ส่วนท้องปล้องสุดท้ายของตัวผู้เรียวยาว

ลักษณะทั่วไป

กระดองแบนมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า พื้นผิวเรียบ มีความยาวมากกว่าความกว้างอย่างเด่นชัด front มีความกว้างมากกว่าครึ่งหนึ่งของระยะระหว่างมุมขอบตาด้านบนทั้งสองข้างและแบ่งเป็น 4 ลอนชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่นอก ผิวบนลอนทั้ง 4 นี้มีปุ่มเล็ก ๆ แหลมคมเรียงกันเป็นแถวตามขวางหลายแถว บริเวณ mesogastric , cardiac และ intestinal ชัดเจน ส่วนบริเวณ branchial มีสัน

เฉียง 1 แถวใกล้กับขอบด้านหลัง ขอบหลังมุมขอบตาด้านบนนอกโค้งเล็กน้อย และมีแฉกแหลมยื่นออกมา 3 ถึง 4 อัน ขอบด้านหน้ากระดองมีรอยหยักเป็นหนามแหลมหลายอัน และเว้าลึกเป็นรูปตัว V ตรงกลาง เบ้าตาเฉียง หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 อยู่ในช่องเบ้าตา

ก้าม แข็งแรง ขอบด้านในของ ischium และ merus มีแฉกเป็นฟันเลื่อยหลายอัน ผิวด้านบน carpus เป็นสันแบบ pectinate สัน ๆ ตามขวางหลายอัน ขอบด้านในโค้งและมีปุ่มแหลมคมเรียงกันห่าง ๆ เป็นแถว ผิวด้านบน palm เป็นปุ่มแหลมเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป มีสันแบบ pectinate 2 ถึง 3 อันและตรงปลายเป็นแฉกแหลมคม 1 อัน ผิวด้านในเป็นปุ่มแหลมเล็ก ๆ เรียงเป็นกลุ่มตามขวางแต่ไม่เป็นสัน ผิวด้านบนนอกเป็นปุ่มเล็ก ๆ แหลมคมจำนวน 12 ถึง 13 อัน เรียงกันเป็นแถวตามความยาว ผิวด้านบนนอกเรียบมีช่องว่างระหว่างก้ามหนีบมากและมีฟันตรงส่วนโคน dactylus 2 อัน

ขาเดิน ทั้ง 4 คู่ค่อนข้างเรียว ขอบด้านหน้า merus เป็นปุ่มเล็กมาก ใกล้ส่วนปลายมีแฉกแหลมคม 1 อัน ขอบด้านหลังเรียบ ยกเว้นขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ใกล้ส่วนปลายมีหนามแหลมเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวแบบฟันเลื่อย merus ของขาเดินคู่ที่ 3 ยาวเป็น 3.5 เท่าของความกว้าง carpus มีส่วนปลายกว้างกว่าส่วนโคน ผิวด้านบนนอกมีสันตามยาว 2 อัน อาจมีขนบนสันด้วย ผิวด้านในมีสันตามยาว 1 สัน propodus ของขาเดินคู่แรกกว้างกว่าคู่อื่น ๆ 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	<i>Sesarma</i>
	Species	<i>bocourti</i>

ชื่อสามัญ –

ลักษณะเด่น

บริเวณขอบด้านใน carpus ของก้ามมีแฉะ 1 อัน พื้นผิวด้านนอก propodus ของก้ามแบนมาก ขาเดินทุกคู่ค่อนข้างแบนและกว้าง

ลักษณะทั่วไป

กระดอง ลักษณะเป็นรูปคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างมากกว่าความยาว บริเวณส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านในมีกลุ่มขนสั้น ๆ 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 ขอบตาข้างของกระดองเป็นแนวตรงและขยายออกเล็กน้อยทางด้านหลัง บริเวณมุมขอบตาด้านนอกมีรอยหยักเป็นแฉะ 1 อัน ขอบตาด้านหน้าของกระดองเว้าเข้าเล็กน้อยบริเวณตรงกลาง

ก้าม มีลักษณะแข็งแรง ขอบตาด้านในของ ischium และ merus มีแฉะเป็นฟันเลื่อยจำนวนหลายอัน ขอบตาด้านบนของ merus ใกล้กับส่วนปลายเป็นแฉะไม่แหลมคม พื้นผิวด้านบนของ carpus เป็นปุ่มเล็ก ๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป ขอบตาด้านในมีแฉะ 1 อัน พื้นผิวด้านบนและด้านนอกของ propodus เป็นปุ่มเล็ก ๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งมีลักษณะแหลมคมและเรียงกันเป็นแถวตามความยาว

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

ส่วนท้อง ปล้องที่ 6 ของตัวผู้จะยาวกว่าปล้องที่ 5 ส่วนยื่นตรงปลายของอวัยวะเพศผู้เป็นสารพวกไคติน ลักษณะเป็นแท่งใหญ่และสั้นมีขนปกคลุมอยู่อย่างหนาแน่น

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลเข้ม ก้ามหนีบเป็นสีแดงเลือดหมู

ถิ่นอาศัย

ชุกชุมอยู่ตามป่าจาก บริเวณปากแม่น้ำ

การแพร่กระจาย

สมุทรปราการ นครศรีธรรมราช บริเวณอินโด-แปซิฟิก บอร์เนียว สุมาตรา ซาฮาร่า และพอนเทีย

นัค

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

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Grapsidae
	Genus	<i>Sesarma</i>
	Species	<i>moeschii</i>

ชื่อสามัญ ปูแสม

ลักษณะเด่น

บริเวณผิวหนังบนกระดองเรียบ ขอบด้านข้างมีรอยหยักเป็นแฉ่งยื่นข้างละ 1 อันอยู่หลังมุมขอบตา ด้านนอก บางทีมีร่องรอยของแฉ่งยื่นขนาดเล็กถัดมาทางด้านหลังอีก 1 อัน ผิวด้านในของก้ามมีสันตามขวางซึ่งเกิดจากเม็ดเล็ก ๆ 8 ถึง 10 เม็ดเรียงกันเป็นแถว 1 แถวอย่างชัดเจน merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวมากกว่า 2 เท่าของความกว้างเล็กน้อย

ลักษณะทั่วไป

กระดอง มีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส โค้งนูนเล็กน้อยตามความยาว พื้นผิวเรียบ มีความกว้างมากกว่าความยาว front กว้างมากกว่าครึ่งหนึ่งของระยะระหว่างมุมขอบตา ด้านนอกทั้งสองข้างและแบ่งออกเป็น 4 ลอนอย่างชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่นอก ร่องตรงกลางของ cervical ลึกมาก บริเวณ mesogastric และ hepatic ชัดเจน บริเวณ branchial มีสันเฉียง 5 ถึง 6 แถว ขอบด้านข้างของกระดองเป็นแนวตรงเกือบขนานกันขยายออกเล็กน้อยทางด้านหลัง หลังมุมขอบตา ด้านนอกมีรอยหยักเป็นแฉ่งยื่น 1 อัน บางทีมีร่องรอยของแฉ่งยื่นขนาดเล็กถัดมาทางด้านหลังอีก 1 อัน ขอบด้านหน้ากระดองโค้งเป็น

คลื่นและเว้าเข้าเล็กน้อยตรงกลาง เบ้าตาเฉียง หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 อยู่ในช่อง เบ้าตา

ก้าม มีลักษณะแข็งแรงมากกว่าขาเดินมา ขอบด้านในส่วนโคนของ merus มีแฉ่งยื่นออกมาเป็น ฟันเลื้อยขนาดเล็ก ส่วนปลายค่อนข้างเรียบและไม่แผ่ขยายออก ผิวด้านบนของ carpus มีเม็ดเล็ก ๆ เรียง กันเป็นแถวสั้น ๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป มีขนสั้น ๆ ขึ้นประปราย ขอบด้านในโค้งและไม่มีแฉ่ง ยื่น ผิว ด้านบนของ palm เป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะตรงขอบบน เม็ดเล็ก ๆ จะเรียงตัวเป็นแถว ตามความยาว 1 แถว ผิวด้านใน palm มีสันตามขวางซึ่งเกิดจากเม็ดเล็ก ๆ 8 ถึง 10 เม็ดเรียงต่อกันเป็น แถว 1 แถวเห็นชัดเจน ผิวด้านนอกเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป ตรงกลางจะมีสันตามยาวขนาด สั้น 1 แถว ผิวด้านบนส่วนโคนของ dactylus เป็นเม็ดเล็ก ๆ เรียงกันกระจัดกระจาย ส่วนปลายเรียบ ปลาย สุดก้ามหนีบมีลักษณะคล้ายปากคิบบีสีน้ำตาล

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

ส่วนท้อง ปล้องที่ 6 ของตัวผู้ยาวกว่าปล้องที่ 5 มีความกว้างน้อยกว่า 2 เท่าของความยาวขอบ ด้านข้างส่วนปลายมนโค้งสอบเข้าเล็กน้อย ปล้องที่ 7 มีความกว้างใกล้เคียงกับความยาว

อวัยวะเพศผู้ มีลักษณะเป็นแท่งโค้งค่อนข้างสั้น ส่วนปลายมนทู่และมีส่วนยื่นซึ่งเป็นสาร์พวกไค ดินออกมาเล็กน้อย มีกลุ่มขนปกคลุมหนาแน่น

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลอมดำมัน ก้ามหนีบมีสีแดงอมส้ม ก้านตาและตามีสีเทา อดดำ **ถิ่นอาศัย**

หลบซ่อนอยู่ใต้ใบไม้ ขอนไม้ หรือซุกซ่อนอยู่ในดินค่อนข้างแข็งแรง บริเวณป่าชายเลนซึ่งเชื่อมต่อกับ ป่าบก ป่าจาก อยู่ในเขตเหนือระดับน้ำขึ้นสูงสุดของช่วงน้ำตาย

ชนิดของปูในวงศ์ Paguridae

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

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Paguridae
	Genus	<i>Clibanarius</i>
	Species	<i>longitarsus</i>

ชื่อสามัญ ปูเสฉวน

ลักษณะเด่น

ก้ามตามีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก มีความยาวมากกว่าความกว้างของขอบด้านหน้ากระดองเล็กน้อย แต่ยาวเท่ากับความยาวของก้ามหนวดคู่ที่ 1 ก้ามทั้งสองข้างมีขนาดเกือบเท่ากัน ผิวด้านบนและด้านนอก propodus และ dactylus มีตุ่มและหนวดซึ่งมีปลายสีดำกระจายทั่วไป dactylus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีแถบสีน้ำเงินตามความยาว ก้ามตามีสีเหลืองปนส้ม

ลักษณะทั่วไป

กระดอง มีลักษณะนูนเล็กน้อยตรงส่วนหน้า ผิวมีตุ่มกระจายอยู่ทั่วไป ขอบด้านข้างมีกลุ่มขนยาวกระจายทั่วไป ส่วนหลังของกระดองมีกลุ่มขนยาวกระจายอยู่ห่าง ๆ กัน บริเวณกุดจากร่องคอมีกลุ่มขนหนาแน่นกว่าบริเวณอื่น กรีกมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก และมีความยาวเกือบถึงฐานของแผ่นบนก้ามตา

ก้ามตา มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก และมีความยาวมากกว่าความกว้างของขอบด้านหน้ากระดองเล็กน้อย แต่ยาวเท่ากับความยาวของหนวดคู่ที่ 1 ก้ามหนวดคู่ที่ 1,2 และแผ่นกำบังหนวดมีกลุ่มขนสั้นและยาวกระจายอยู่เล็กน้อย แผ่นบนก้ามตามีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ส่วนปลายมีหนามขนาดเล็ก 2 อัน แผ่นกำบังหนวดมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม บริเวณด้านในมีหนามขนาดเล็กมากเรียงเป็นแถว และมีความยาวเกือบถึงฐานปล้องสุดท้ายของก้ามหนวดคู่ที่ 2

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

ตุ้มและหนวดซึ่งมีปลายสีดำกระจายทั่วไป บริเวณฐานของตุ้มและหนามจะมีขนสั้นและยาวอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

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

สี กระดองมีสีน้ำตาลและลวดลายสีน้ำเงินแทรกอยู่เล็กน้อย ผิวด้านนอกของขาเดินคู่ที่ 2 และ 3 มีแถบสีน้ำเงินตามความยาว ก้านตามีสีเหลืองปนส้ม

ถิ่นอาศัย

คลานตามชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ ริมป่าชายเลน ที่มีพื้นเป็นโคลนปนทรายหรือทรายปนโคลนมีต้นโกงกางขึ้นอยู่อย่างหนาแน่นอยู่ในเขตน้ำลงเฉลี่ยจนถึงระดับน้ำลงต่ำสุดของช่วงน้ำตาย

การกระจาย

ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสงคราม สมุทรสาคร เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา ระนอง กระบี่ ตรัง ภูเก็ต สตูล นราธิวาส ปัตตานี เขตอินโดนีเซียฟาก มหาสมุทรอินเดีย ได้หวัน ญี่ปุ่น ชายฝั่งตะวันออกของแอฟริกา

ชนิดของปูในวงศ์ Ocypodidae

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

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Ocypodidae
	Genus	<i>Uca</i>
	Species	<i>forcipata</i>

ชื่อสามัญ ปูก้ามดาบ

ลักษณะเด่น

บริเวณปลาย pollex และ dactylus มีพื้นขนาดใหญ่เรียงเป็นชุด ทำให้มีลักษณะเหมือนปลายปากคืบ ด้านนอกของ dactylus มีร่องยาว 1 ร่อง อยู่ตรงกลางตลอดความยาว พื้นกระบอกตาเรียบ กระบอกตาเฉียงปานกลาง ด้านข้างของกระบอกสอดเข้าสู่ส่วนหลังของกระดอง merus ของขาคู่ที่ 4 แผ่กว้าง ปลายอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เป็นท่อนสั้นและปากกว้างมาก

ลักษณะทั่วไป

กระดูก front แคป ส่วนที่แคบที่สุดอยู่ที่ฐานของก้านตาซึ่งกว้างประมาณ 1.5 เท่าของความกว้างที่ฐานของก้านตา ร่องที่อยู่กึ่งกลาง front แคปไม่มากนักขอบร่องเกือบขนานกันและปลายร่องมน ด้านข้างของกระดูกสอดเข้าสู่ส่วนหลังของกระดูก บริเวณต่าง ๆ บนกระดูกเห็นชัดเจน กระบอตาเฉียง ปานกลาง มุมกระดูกด้านหน้าแหลมและยื่นออกไปไม่มากนัก ขอบกระดูกด้านข้างเป็นสันคมยาวตั้งแต่ มุมกระดูกถึงระดับเดียวกับกึ่งกลางของบริเวณหัวใจ ชิดเล็ก ๆ ที่อยู่บนด้านหลังของกระดูกไม่มี ขอบกระดูกด้านบนแคบ ขอบบนเป็นตุ่มกลมเรียงเป็นแถว ขอบล่างเป็นตุ่มกลมเล็ก ๆ เรียงชิดกันเป็นแถวยาว ประมาณครึ่งหนึ่งของกระบอตา รอยหยักบริเวณขอบกระดูกด้านล่างต่ำและเรียงชิดกัน และรอยหยักจะมีขนาดใหญ่และมีระยะห่างมากขึ้นเมื่อใกล้ปลายขอบของกระดูก พื้นกระดูกตาเรียบ ก้านตายาวและมีเส้นผ่าศูนย์กลางสั้นกว่าตามาก

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

Carpus ขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้าเป็นสัน มีตุ่มเรียงเป็นแถวขอบบนที่อยู่ด้านหลังไม่เป็นสัน แต่เห็นชัดเจน ผิวด้านบนจะมีตุ่มอยู่อย่างหนาแน่นผิวด้านหลังเรียบ แต่ตรงปลายที่อยู่ใต้ขอบบนลงมาจะมีตุ่มอยู่บ้าง

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

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

Pollex และ dactylus มีลักษณะแบนและมีความยาวเกือบเท่ากัน ขอบล่างของ pollex จะโค้งขึ้น ตั้งแต่โคน ขอบบนของ dactylus มีลักษณะตรงและโค้งเล็กน้อย ด้านนอกของ pollex และ dactylus มีร่องยาว 1 ร่องอยู่ตรงกลางตลอดความยาว บริเวณด้านใต้ตรงโคนร่องของ pollex จะมีร่องสั้น ๆ อีก 1 ร่องซึ่งเป็นร่องที่ยาวเลยมาจากร่องเหนือขอบล่างของ manus และบริเวณด้านเหนือตรงโคนร่องของ dactylus จะมีร่องสั้น ๆ สั้น ๆ อีก 1 ร่อง ผิวบนและผิวนอกตรงโคนของ dactylus จะมีตุ่มปกคลุม ส่วนผิวนอกตรงโคนของ pollex จะมีตุ่มปกคลุมอยู่เป็นจำนวนน้อย ส่วนตรงปลาย pollex และ dactylus จะมีลักษณะแหลมจุ่มและมีพื้นขนาดใหญ่เรียงเป็นชุด ทำให้ลักษณะเหมือนกับปากคืบ ถ้าเป็นก้าม brachychelous type บริเวณเกือบตรงกึ่งกลางของ pollex จะมีพื้นขนาดใหญ่อยู่ 1 ซี่ และตรงบริเวณประมาณ 1/3 ของความยาวจากโคนของ dactylus จะมีพื้นขนาดใหญ่อยู่ 1 ซี่เป็นอย่งน้อย ส่วนก้าม leptochelous type จะไม่มีพื้นที่ pollex และ dactylus นอกจากพื้นขนาดใหญ่ที่เรียงเป็นชุดตรงบริเวณปลายของก้ามหนีบทั้งสอง

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

ขา merus แผ่กว้าง ขอบบนโค้งและมีลักษณะเป็นพื้นเลื่อย ผิวด้านหลังจะมีตุ่มขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป ยกเว้นขาคู่สุดท้ายเท่านั้นที่ไม่มี

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ปลายอวัยวะสืบพันธุ์เป็นท่อนสั้นและปากกว้างมาก

ลักษณะเด่นของตัวเมีย ช่องว่างระหว่างก้ามหนีบของก้ามข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างมีพื้นขนาดใหญ่อยู่ 1 คู่

สี กระดองของตัวผู้และตัวเมีย ปกติแล้วจะมีสีดำ และมักจะเป็นจุดสีเหลืองครีม หรือเทาอ่อน กระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะบริเวณครึ่งตอนหน้าบนกระดองของปูบางตัว บริเวณมุมกระดองด้านหลังและบริเวณร่องบนกระดองที่แบ่งบริเวณของกระเพาะอาหารส่วนกลางกับหัวใจออกจากบริเวณของเหงือกจะมีสีฟ้าหรือเทาอ่อน ปูบางตัวมุมกระดองด้านหน้าจะมีสีแดง ตัวเมียที่โตเต็มวัยบางตัวครึ่งตอนหน้าบนกระดองอาจจะมีสีฟ้าและมุมกระดองด้านหน้าจะมีสีแดง maxilliped คู่ที่ 3 อาจจะมีสีฟ้าปกติแล้วก้ามตามีสีดำ ตามีสีแดง แต่ปูบางตัวตาและก้ามตามีสีแดง

ตัวโตเต็มวัยที่มีขนาดเล็กถึงปานกลาง manus จะมีสีเหลือง น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแดง แดงแกมม่วง หรือม่วง ซึ่งครึ่งล่างของ manus จะมีสีเข้มกว่าครึ่งบนและมักจะมีสีน้ำตาลแดง หรือม่วงเข้ม นอกจากนี้แล้วขอบและฐานของ dactylus อาจจะมีสีฟ้าแซม carpus และ merus มีสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาล

แดงหรือม่วง ซึ่งด้านบนและด้านหลังของ carpus และ merus อาจจะมีสีฟ้าแซม pollex และ dactylus ปกติแล้วจะมีสีขาว ตรงโคนอาจจะมีสีเหลือง น้ำตาล หรือม่วง และอาจจะมีสีฟ้าแซม ปูบางตัว pollex และ dactylus มีสีแดง ตรงปลายสุดมีสีขาว สำหรับตัวเต็มวัยที่มีขนาดใหญ่ ครึ่งล่างของ manus มีสีม่วงหรือน้ำตาลเข้ม ส่วนครึ่งบนของ manus carpus และ merus มีสีน้ำตาลอ่อน pollex และ dactylus มีสีขาว ขามีสีดำ โคน merus ของขาคู่สุดท้ายอาจจะมีสีฟ้าหรือเทาอ่อน ตัวเมียบางตัวครึ่งปลายของ merus จนถึงปลายขาก้ามจะมีสีแดง ครึ่งโคนของ merus มีสีดำ

ถิ่นอาศัย

ชายฝั่งทะเล ริมธารน้ำ ลำคลองหรือหนองน้ำ หาดเลนริมหรือปากแม่น้ำ ท่าเทียบเรือ ร่องสวนมะพร้าว ที่มึ่น้ำกร่อยและเป็นโคลน มักเป็นที่ซึ่งมีร่มเงาและใกล้กับต้นเสม

การกระจาย

ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ สุมาตรา ชวา ซาราวัก บอร์เนียว เซเลเบส และฟิลิปปินส์

2. *Uca lactea* (เสรี บรรพกิจตร. 2522 : 84-90)

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Ocypodidae
	Genus	<i>Uca</i>
	Species	<i>lactea</i>

ชื่อสามัญ ปูก้ามดาบ

ลักษณะเด่น

Front กว้าง ส่วนใหญ่กระบอกตาลักษณะตรง และด้านข้างของกระดองจะตั้งได้ฉากกับขอบหลังของกระดอง กระดองมีความกว้างมากกว่าความยาว และกว้างมากกว่าปูก้ามดาบชนิดอื่นด้วย ดังนั้นกระดองจึงมีลักษณะสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีขีดเล็ก ๆ ข้างละ 1 ขีด อยู่ตรงส่วนหลังของกระดอง manus ของก้ามข้างใหญ่จะแคบ บริเวณปลาย pollex จะมีพื้นขนาดใหญ่เป็นรูปสามเหลี่ยมตั้งขึ้น 1 ที่ merus ของขาคู่สุดท้ายเรียวยาวและมีขอบบนตรง อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีการบิดตัว flange ที่อยู่ทางด้านหลังมีความยาวและความกว้างมากกว่า flange ที่อยู่ทางด้านหน้าอย่างเห็นได้ชัดเจน รูเปิดของท่อหายใจอยู่ในแอ่งซึ่งกว้างและตื้นมาก thumb มีขนาดใหญ่และยาวเห็นได้ชัดเจน ปลายอวัยวะสืบพันธุ์ไม่เป็นท่อยื่นยาวออกไป

ลักษณะทั่วไป

กระดอง front กว้าง ส่วนที่แคบที่สุดอยู่ตรงส่วนปลายของ front ซึ่งมีความกว้างประมาณ 2 เท่าของความกว้างประมาณ 2 เท่าของความกว้างของฐานของก้านตา ส่วนใหญ่ด้านข้างของกระดองจะตั้งได้ฉากกับขอบหลังของกระดองบางตัวด้านข้างของกระดองจะสอบเข้าสู่ส่วนหลังของกระดอง บริเวณต่าง ๆ บนกระดองเห็นได้ไม่ชัดเจน ส่วนใหญ่กระบอกตาจะตรง เฉพาะบางตัวกระบอกตาจะเฉียงมาก มุมกระดองด้านหน้าเล็ก แหลม และยื่นออกไปทางด้านหน้าเล็กน้อย ขอบกระดองด้านข้างมีลักษณะเป็นสันคมยาวตั้งแต่มุมกระดองจนถึงบริเวณเดียวกันกับระดับกึ่งกลางของบริเวณหัวใจ ขีดเล็ก ๆ ซึ่งอยู่บนส่วนหลังของกระดองมีจำนวนข้างละ 1 ขีด ขอบกระบอกตาบนแคบ ขอบบนไม่มีตุ่มเรียงเป็นแถวยกเว้นเฉพาะตอนปลายขอบจะมีตุ่มกลมเล็ก ๆ อยู่ ขอบล่างมีลักษณะเป็นตุ่มกลมเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวยาวประมาณ 2/3 ของขอบบนและวกขึ้นไปบรรจบกับขอบบน รอยหยักบริเวณขอบกระบอกตาล่างต่ำและเรียงชิดติดกัน และรอยหยักจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีระยะห่างกันมากขึ้นเมื่อใกล้มุมกระดอง พื้นกระบอกตาไม่มีตุ่มเรียงเป็นแถว ก้านตาวาวและมีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลางสั้นกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของตาเพียงเล็กน้อย

กำข้งใหญ่ merus ขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้าและที่อยู่ทางด้านหลังไม่เป็นสันส่วนปลายของขอบจะมีตุ่มแหลมขนาดใหญ่อยู่อย่างหนาแน่น ส่วนโคนของขอบจะเรียบ ผิวด้านหน้าตรงบริเวณปลาย merus ที่อยู่ใต้ขอบบนลงมาเล็กน้อยจะมีตุ่มแหลมขนาดใหญ่อย่างหนาแน่น ผิวด้านหลังมีตุ่มเล็ก ๆ และรอยย่นกระจายอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณใต้ขอบบนลงมาจะมีเป็นจำนวนมาก

Carpus ขอบบนที่อยู่ทางด้านหน้าเป็นสัน และตรงโคนจะมีตุ่มแหลมขนาดใหญ่อยู่หลายตุ่ม ขอบบนที่อยู่ทางด้านหลังมีลักษณะมน ผิวด้านบนและผิวด้านหลังเรียบจะมีตุ่มขนาดเล็กมากปกคลุม

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

Palm แอ่งที่รองรับ carpus จะค่อย ๆ แคบและตื้นมากขึ้นตามลำดับเมื่อยื่นออกไปใกล้ตรงบริเวณโคน dactylus บริเวณฐานของ dactylus จะมีตุ่มขนาดปกคลุม ริมล่างของแอ่งที่รองรับ carpus จะอยู่ในระดับต่ำและมีลักษณะเป็นสันคม ตรงกลางของ palm มีลักษณะนูนและมีตุ่มขนาดเล็กมากกระจายอยู่ทั่วไป แอ่งสามแฉกกว้างและตื้น แต่ลักษณะที่เป็นสามแฉกยังเห็นได้ชัดเจน สันเดียวจะมีตุ่มเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบตั้งแต่ขอบล่างของฐาน 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 และบริเวณที่อยู่เหนือร่องนี้ขึ้นมาจะมีตุ่มเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวตั้งแต่บริเวณฐานของ pollex จนถึงปลาย pollex บริเวณด้านใต้ตรงโคนขอบบนของ dactylus จะมีร่องสั้น ๆ 1 ร่อง ผิวบนและผิวนอกตรงโคนของ dactylus จะมีตุ่มกระจายอยู่ทั่วไปตรงบริเวณที่เกือบจะถึงปลายสุดของ pollex จะมีพื้นที่ขนาดใหญ่เป็นรูปสามเหลี่ยมหน้าจั่วตั้งขึ้น 1 ที่ ถ้าเป็นกำม brachychelous type ตรงบริเวณกึ่งกลางของ pollex จะไม่มีพื้นที่ขนาดใหญ่ และ dactylus ก็จะไม่มีความใหญ่เช่นเดียวกัน

กำข้งเล็ก ผิวด้านหลังของ merus จะมีตุ่มขนาดเล็กและรอยย่นอยู่ทั่วไป pollex และ dactylus จะมีความยาวมากกว่า manus มาก ช่องว่างระหว่างกำหนีบกว้าง และมีพื้นเป็นแบบพื้นเลื่อยเห็นได้ชัดเจน ยกเว้นเฉพาะส่วนปลายของกำหนีบซึ่งเห็นได้ไม่ชัด ด้านหน้าของ merus ตรงบริเวณปลายจะมีขนยาวอยู่ 1 กระจุก

ขา merus แผ่กว้าง ยกเว้นขาคู่สุดท้ายจะมีลักษณะเรียวยาว ขอบบนโค้งลักษณะที่เป็นแบบฟันเลื่อยเห็นได้ชัดเจน ผิวด้านหลังมีรอยย่นอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณใต้ขอบบนมาจะมีเป็นจำนวนมาก ซึ่งตามรอยย่นจะมีตุ่มเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวลงมา

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ อวัยวะสืบพันธุ์มีการปิดตัว flange ที่อยู่ทางด้านหลังมีความยาวและความกว้างมากกว่า flange ที่อยู่ทางด้านหน้าอย่างเห็นได้ชัด รูเปิดของท่อหน้าเชื้ออยู่ในแอ่งซึ่งกว้างและตื้นมาก thumb มีขนาดใหญ่และยาวเห็นได้ชัดเจน ปลายอวัยวะสืบพันธุ์ไม่เป็นท่อยื่นยาวออกไป

ลักษณะเด่นของตัวเมีย บริเวณขอบของรูเปิดอวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะลาดลงไป และบริเวณขอบรูมีสีน้ำตาล

สี ตัวผู้ กระดองสีเทาหรือดำ และมักสลับด้วยลวดลายคาดขวางสีขาวหรือเทา maxilliped และ pterygostomium region มีสีขาวหรือเทา บางครั้งพบว่ากระดองมีสีเทา ฟ้าอ่อน หรือขาว ซึ่งมักจะสลับด้วยสีดำเป็นลายหินอ่อนงดงาม ก้านตาสีเทา ขาและก้ามขังเล็กมีสีเทาและมักจะมีจุดเล็ก ๆ สีขาวอยู่ทั่วไป บริเวณโคนขาและโคนก้ามขังเล็กอาจมีสีส้ม ก้ามขังใหญ่มีสีชมพูหรือส้มอ่อน propodus และ dactylus เป็นสีขาวหรือเทา บริเวณใต้ขอบบนของ manus มักมีสีเข้มกว่าบริเวณอื่นของ manus บางตัวสีขาวล้วนทั้งตัว

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 ขุดรูอยู่ในบริเวณที่มีรากต้นไม้แผ่จากดิน

การกระจาย

ฝั่งทะเลด้านตะวันออกเฉียงใต้ของอินเดีย ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ชาราวัก ฟิลิปปินส์ นิวกีนิ ฝั่งทะเลด้านตะวันออกของออสเตรเลีย เกาะต่าง ๆ ทางตอนใต้ของมหาสมุทรแปซิฟิก

ชนิดของปูในวงศ์ Parathelphusidae

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

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Parathelphusidae
	Genus	<i>Somanniathelphusa</i>
	Species	<i>germaini</i>

ชื่อสามัญ ปูนา ปูนาม่วง

ลักษณะเด่น

กระดองโค้งมนและตกระทั่วไป ส่วนของ antero-lateral border มีหนามแหลมคล้ายฟันเลื่อย ข้างละ 4 อัน epigastric crest และ post-orbital crest เด่นชัด post-orbital crest จะเชื่อมกับ epigastric crest เพียงเล็กน้อย ซึ่ง post-orbital crest จะยาวไปจนถึงฐานของ epibranthial tooth อันสุดท้าย gonopod คู่ที่ 1 ฐานจะกว้าง ส่วนปลายจะอเพียงเล็กน้อย

ลักษณะทั่วไป

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

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

ขาเดินลักษณะเรียวยาว ขาเดินคู่ที่ 3 จะยาวกว่าขาเดินคู่ที่ 2 4 และ 5 merus จะยาวมีหนามบริเวณใกล้ส่วนปลายของ merus 1 อัน dactylus จะเรียวยาวเล็กปลายแหลม มีหนามเล็ก ๆ อยู่เป็นจำนวนมาก

ส่วนท้องเพศผู้มีลักษณะเป็นรูปตัว T ปล้องที่ 6 ด้านหน้ามีความกว้างน้อยกว่าด้านหลัง ปล้องที่ 6 และปล้องที่ 7 มีความยาวใกล้เคียงกัน

การกระจาย

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

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวรัตนา จิตรขำ
วันเดือนปีเกิด	5 กรกฎาคม 2523
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	65 หมู่ 2 ตำบลสาริกา อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก 26000
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานในปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2546	ค.บ.(ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร จังหวัดกรุงเทพฯ
พ.ศ. 2550	กศ.ม.(ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ