

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การพิสูจน์ทราบชนิดของปลากลุ่มตัวอย่าง

ทำการเก็บรวบรวมปูที่อาศัยอยู่บริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ นำมาตรวจดูลักษณะต่าง ๆ อันได้แก่ ส่วนก้าม กระดอง ขาเดิน เบ้าตา และสีลำตัว เพื่อทำการพิสูจน์ทราบชนิดของปูโดยเทียบจากการศึกษาอนุกรมวิธานของปูแสมในอ่าวไทย และ การยืนยันการจำแนกชนิดปูโดยท่านรองศาสตราจารย์ สุรินทร์ มัจฉาชีพ จากภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา เขตบางแสน จังหวัดชลบุรี ทำให้สามารถทราบชนิดปูที่ได้เก็บรวบรวมทำการทดลองครั้งนี้ มีรวมอยู่ทั้งหมด 5 ชนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งปูทั้ง 5 ชนิดนี้ล้วนอยู่ในวงศ์ Grapsidae โดยจากการศึกษาลักษณะภายนอกได้ผลดังต่อไปนี้

##### 4.1.1 ปูชนิด *Varuna literata*

พบจำนวนน้อยในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอพระสมุทรเจดีย์ กระดองมีความโค้งรีและแบน ลอนบนกระดองบางไม่ชัดเจน มีร่องตรงกลางลึกเป็นรูปตัว H ลำตัวและขาเดินเป็นสีน้ำตาลใสปนเหลืองอ่อน ขาเดินเป็นแผ่นแบนแผ่กว้างมีขนอ่อน ๆ เป็นแถบยาว เคลื่อนไหวว่องไวรวดเร็วมาก มักหลบเกาะแน่นอยู่ใต้ก้อนหิน รูปภาพประกอบ 4.1

##### 4.1.2 ปูชนิด *Sesarma mederi*

เก็บรวบรวมจากอำเภอพระสมุทรเจดีย์ ขนาดที่พบส่วนมากเป็นปูขนาดใหญ่ น้ำหนักมาก กระดองลักษณะสีเหลืองมัจจุรัส ขรุขระหยาบ ลำตัวและก้ามใหญ่ แข็งแรง ขาเดินทั้ง 4 คู่มีขนาดใหญ่แข็งแรง มีขนหยาบปกคลุมหนาแน่น ลำตัว ขาเดินมีสีน้ำตาล อมม่วง ก้ามหนีบเป็นสีแดงส้ม รูปภาพประกอบ 4.2

##### 4.1.3 ปูชนิด *Sesarma polita*

เก็บรวบรวมจากอำเภอพระสมุทรเจดีย์ มีขนาดจนถึงขนาดใหญ่ใกล้เคียงกับปูชนิด *Sesarma mederi* กระดองเป็นลักษณะรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ผิวมัน มีความยาวมากกว่าความกว้างชัดเจน ขอบด้านหน้ากระดองมีรอยหยักเป็นหนามแหลม

หลายอัน ส่วนกลางเว้าลึกเป็นตัว V ก้ามหนีบใหญ่ ขรุขระ ขาเดินค่อนข้างเล็กมีขนปกคลุมช่วงปลาย กระดองและขาสีน้ำตาลเข้ม ก้ามหนีบสีแดง มักอยู่นิ่งบนผิวน้ำ รูปภาพประกอบ 4.3

#### 4.1.4 ปูชนิด *Sesarma moeschii*

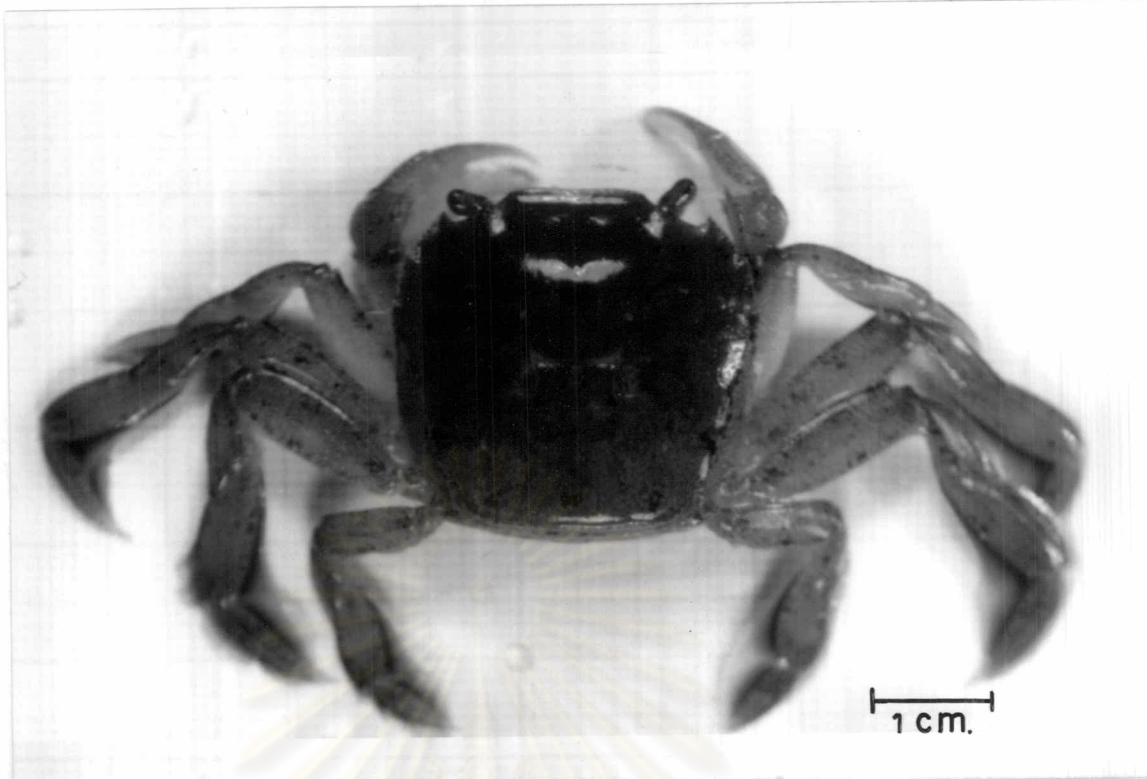
พบมากในอำเภอยะรังและจังหวัดปัตตานี ส่วนมากมีขนาดเล็ก กระดองลักษณะสี่เหลี่ยมโค้งมน ผิวน้ำเรียบ แบ่งเป็นลอนชัดเจน ก้ามหนีบแข็งแรงสีส้มสว่าง ขาเดินเรียวยาวเล็กมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ลำตัวสีดำ ส่วนล่างสีเทาอ่อน เคลื่อนไหวบนทางบกได้อย่างรวดเร็ว มันรวมเป็นกลุ่มใกล้เครื่องให้อากาศ และเกาะตามหิน รูปภาพประกอบ 4.4

#### 4.1.4 ปูชนิด *Sesarma bocourti*

พบมากในอำเภอยะรังและจังหวัดปัตตานี ส่วนมากมีขนาดเล็ก กระดองลักษณะสี่เหลี่ยมโค้งมน สีดำมัน แบ่งเป็นลอนอย่างชัดเจน ก้ามมีความแข็งแรงขนาดใหญ่กว่าขาเดินมาก มีปุ่มแหลมเล็กๆ เรียงกันจำนวนมาก ขาเดินแบนกว้าง มีขนแข็งเป็นหนาม ลำตัวและขามีสีดำ ส่วนก้ามมีสีเลือดหมู เคลื่อนไหวอย่างรวดเร็วบนทางบก มักเกาะตามพื้นแห้งและหลบตามหิน รูปภาพประกอบ 4.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.



ข.



ภาพประกอบ 4.1 แสดงลักษณะรูชนิด *Varuna literata* เพศเมีย

ก. ด้านบน

ข. ด้านล่าง



ก.



ข.



ภาพประกอบ 4.2 แสดงลักษณะรูชนิด *Sesarma mederi* เพศผู้

ก. ด้านบน

ข. ด้านล่าง

ก.



ข.



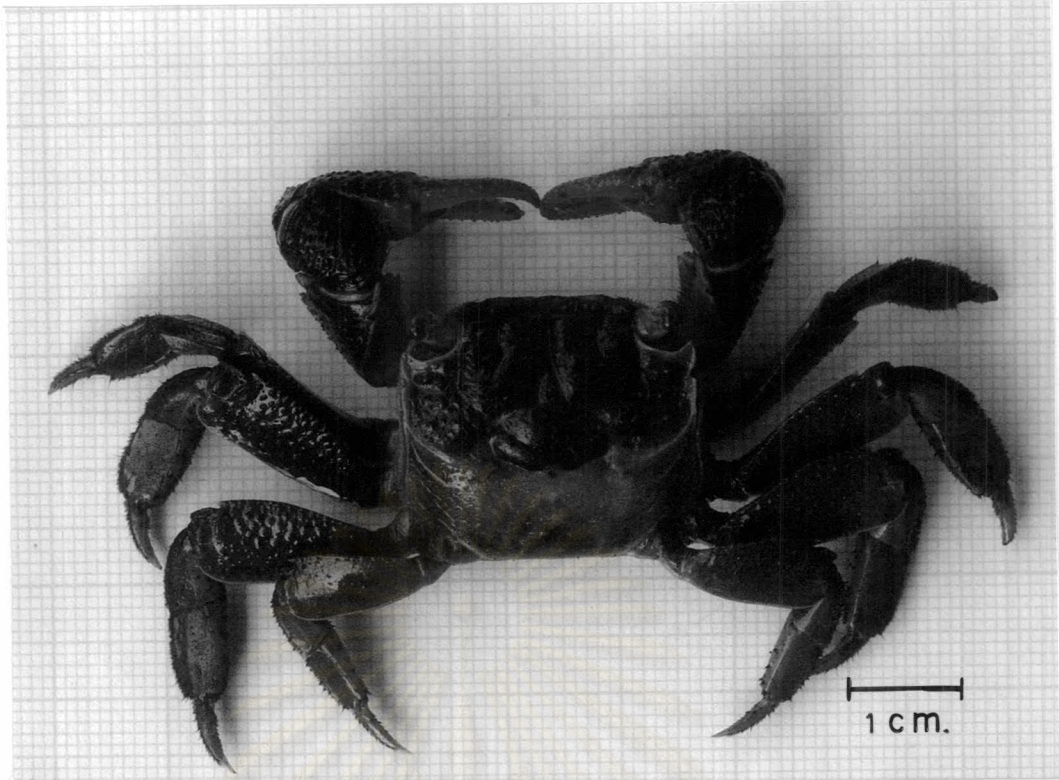
ภาพประกอบ 4.3 แสดงลักษณะรูชนิด *Sesarma polita* เพศเมีย

ก. ด้านบน

ข. ด้านล่าง



ก.



ข.

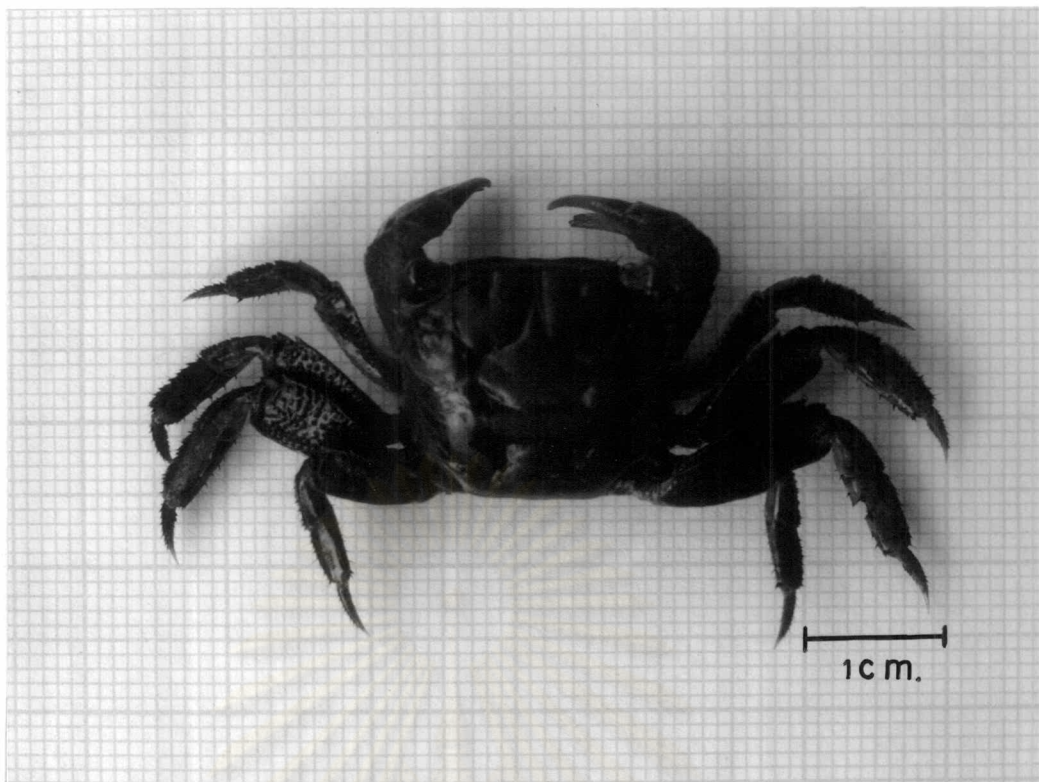


ภาพประกอบ 4.4 แสดงลักษณะรูชนิด *Sesarma moeschii* เพศผู้

ก. ด้านบน

ข. ด้านล่าง

ก.



ข.



ภาพประกอบ 4.5 แสดงลักษณะรูชนิด *Sesarma bocourti* เพศเมีย

ก. ด้านบน

ข. ด้านล่าง



#### 4.2 การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Varuna literata* , *Sesarma mederi* , *Sesarma polita* , *Sesarma moeschii* และ *Sesarma bocourti* จากการเก็บจากธรรมชาติ , การฉีดเหนียวนำด้วยไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูทุกชนิด ดังตาราง 4.1 เนื่องจาก ไม่พบลักษณะการจับตัวของแอนติเจนไวรัสหัวเหลืองกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิด คือ V3-2B , Y18 และ Y19 เป็นตะกอนสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ

ชนิดปู	แบบการทดลอง	ปูจับจากธรรมชาติ	ปูที่ฉีดไวรัสหัวเหลือง	ปูที่กินเนื้อกุ้งที่มีไวรัสหัวเหลือง
	<i>Varuna literata</i>	0/11	0/6	0/5
	<i>Sesarma mederi</i>	0/8	0/15	0/5
	<i>Sesarma polita</i>	0/14	0/17	0/5
	<i>Sesarma moeschii</i>	0/11	0/21	0/6
	<i>Sesarma bocourti</i>	0/12	0/30	0/20

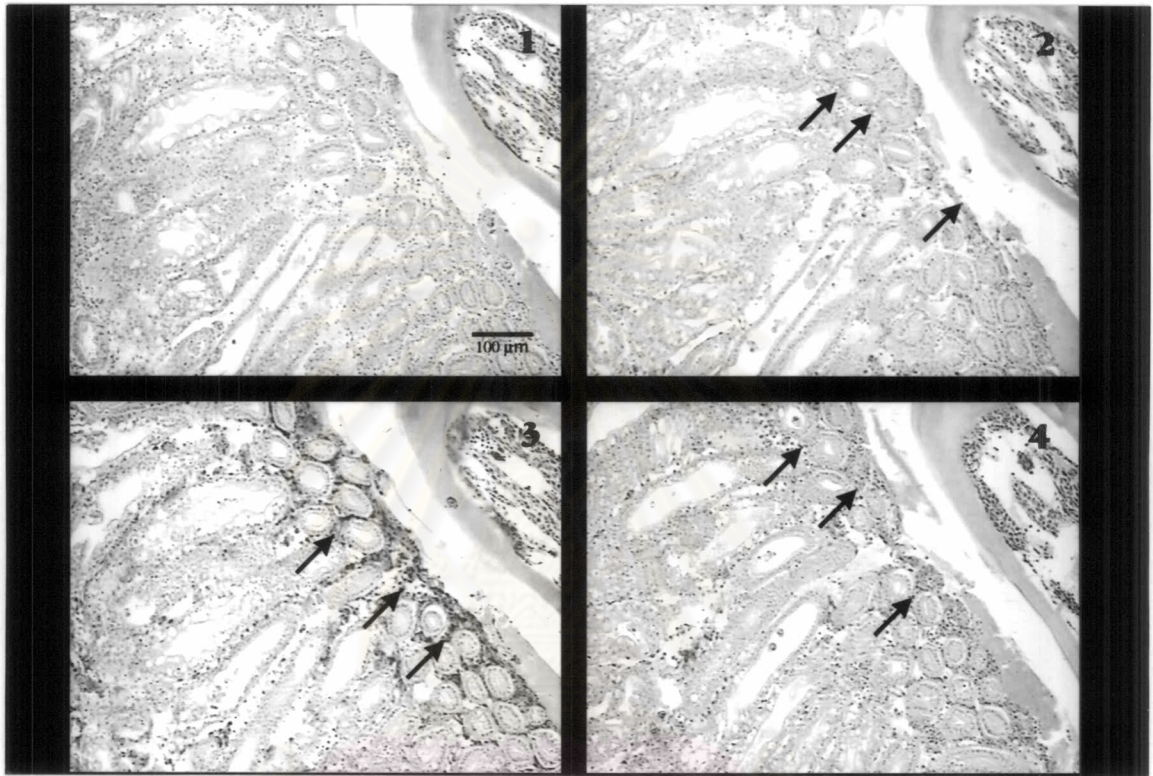
ตาราง 4.1 จำนวนปูที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองต่อทั้งหมดในปูแต่ละชนิด และแบบของการทดลอง เมื่อตรวจสอบโดยวิธี immunohistochemistry



สำหรับกึ่งกุลาดำที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยเป็นตัวควบคุมควบคู่กับการทดลอง พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นสีน้ำตาลกับแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด ดังภาพประกอบ 4.6 โดยพบแอนติบอดีชนิด Y19 ให้สีน้ำตาลเข้มที่สุด รองลงมาเป็น Y18-2D และ V3-2B ตามลำดับ โดยเนื้อเยื่อที่ทำการตรวจสอบและพบการติดเชื้อ เช่น หัวใจ(heart) กล้ามเนื้อ (muscle) เหงือก (gill) ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissue) รังไข่ (ovary) และ อัณฑะ (testis) ดังภาพประกอบ 4.7 แสดงเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกึ่งกุลาดำที่ฉีดไวรัสหัวเหลืองและตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19 เนื่องจากเป็นแอนติบอดีที่ให้ผลการติดเชื้อที่เข้มที่สุด และภาพประกอบ 4.8 - 4.12 แสดงเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ที่ตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19 เช่นกัน



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

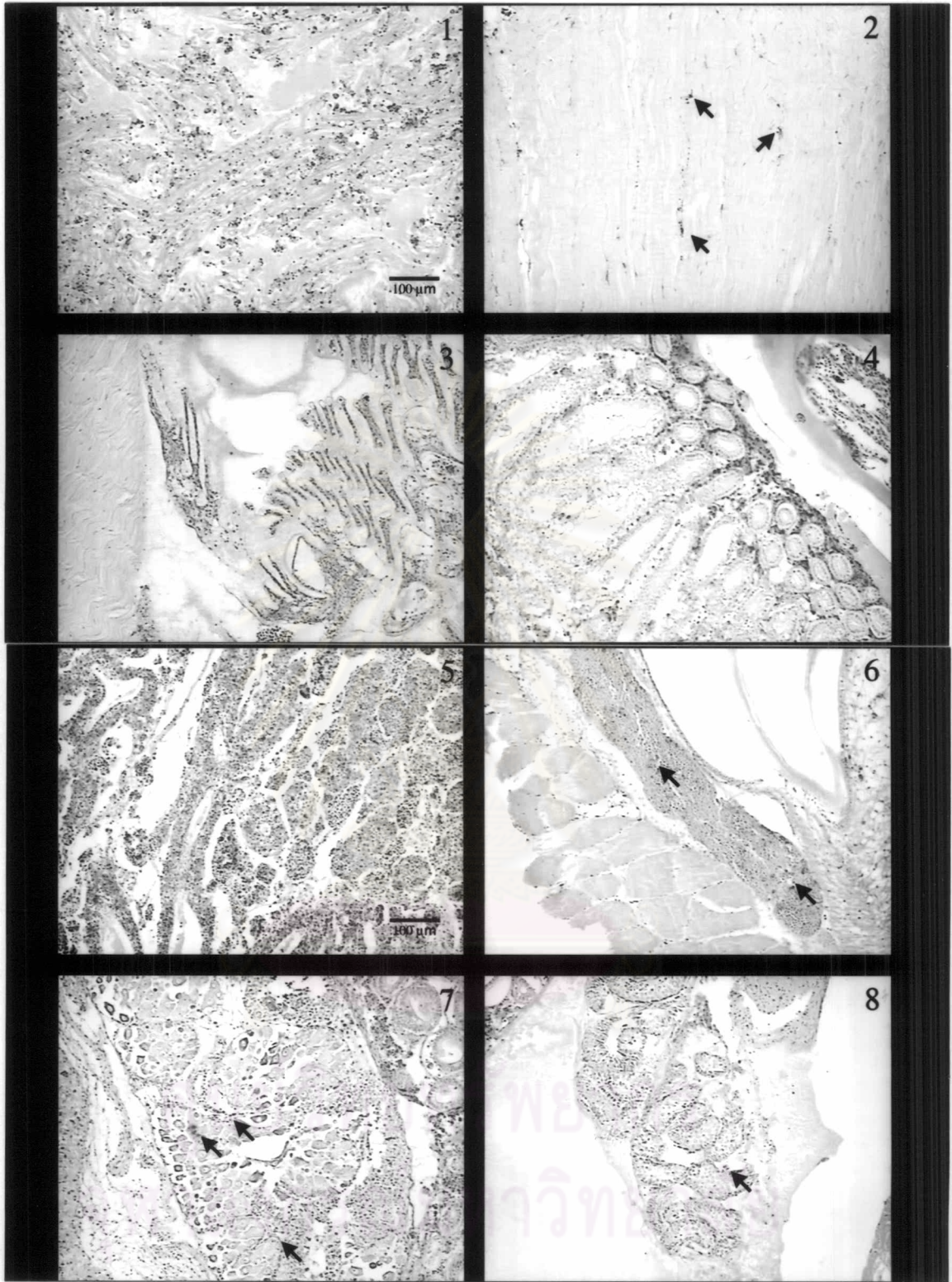


## ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 4.6 แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่เป็นตัวควบคุมโดยฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองบริเวณแสดงลูกศรเกิดเป็นตะกอนสีน้ำตาล

โดย 1 = ไม่หยดแอนติบอดี    2 = หยดแอนติบอดี V3-2B    3 = หยดแอนติบอดี Y19  
4 = หยดแอนติบอดี Y18-2D

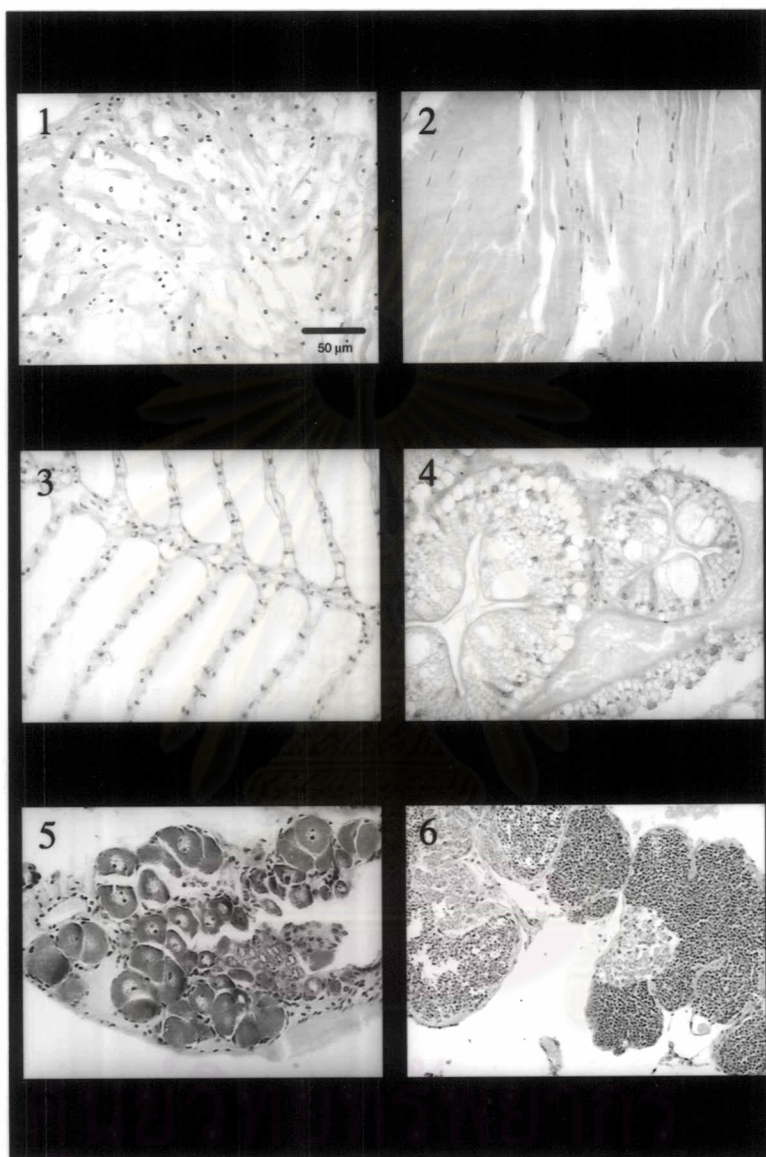




ภาพประกอบ 4.7 แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่เป็นตัวควบคุมโดยฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันและตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19 พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองบริเวณแสดงลูกศรเกิดเป็นตะกอนสีน้ำตาล

โดย 1 = หัวใจ 2 = กล้ามเนื้อ 3 = เหงือก 4 = ตับและตับอ่อน 5 = อวัยวะน้ำเหลือง  
6 = อวัยวะสร้างเม็ดเลือด 7 = รังไข่ และ 8 = อวัยวะ

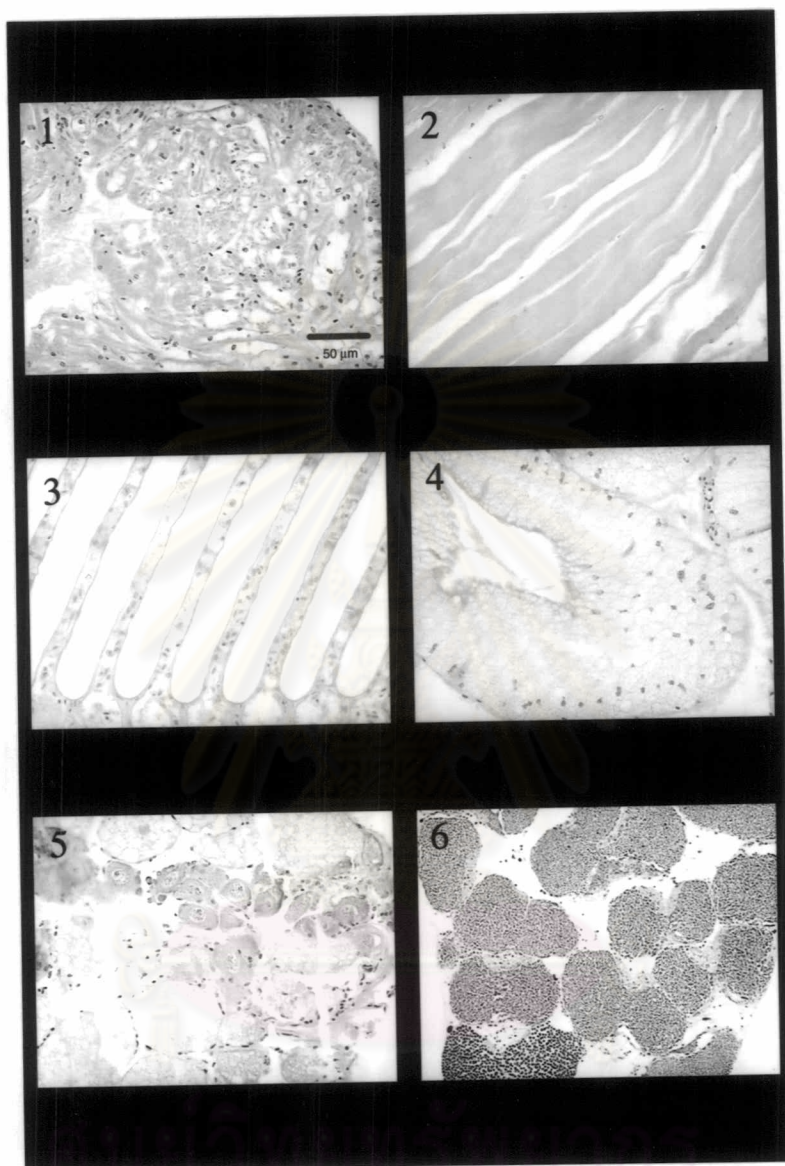




## จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

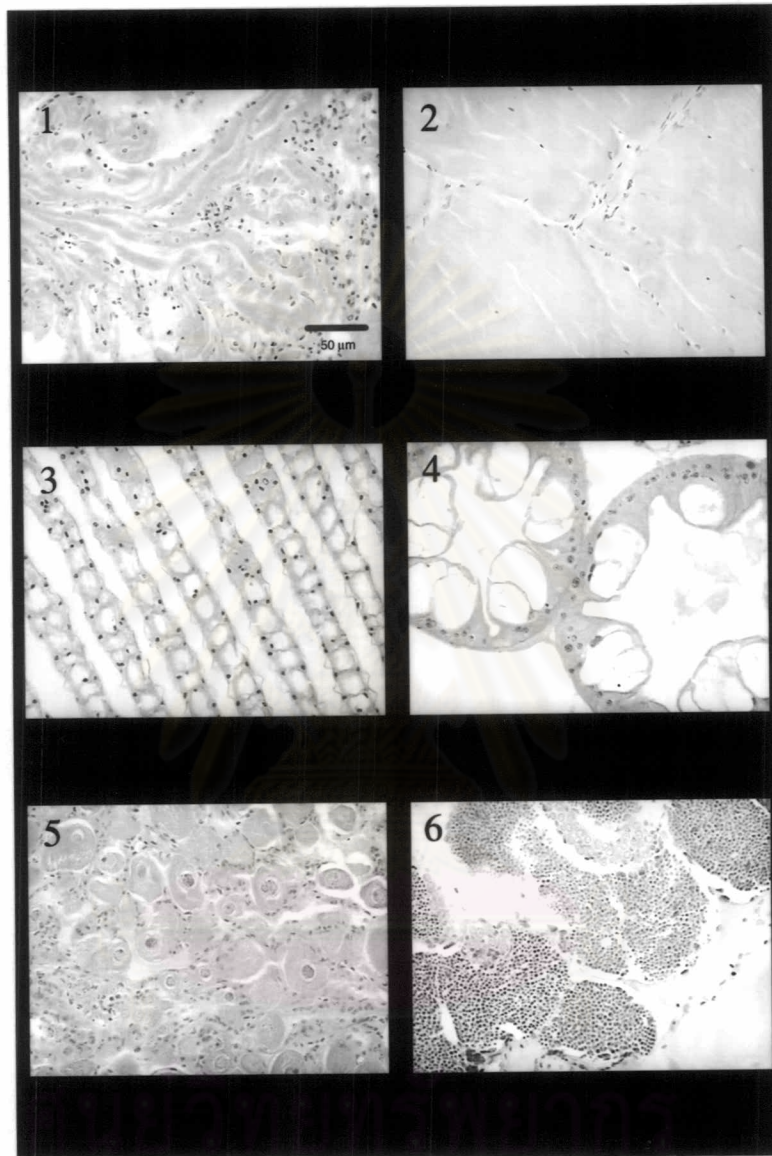
ภาพประกอบ 4.8 แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อ *Varuna literata* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19 ไม่พบบริเวณใดที่มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดย 1 = หัวใจ 2 = กล้ามเนื้อ 3 = เหงือก 4 = ตั๊กและตั๊กอ่อน 5 = รังไข่ และ 6 = อวัยวะ



ภาพประกอบ 4.9 แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อ *Sesarma mederi* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19 ไม่พบบริเวณใดที่มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดย 1 = หัวใจ                      2 = กล้ามเนื้อ      3 = เหงือก      4 = ตับและตับอ่อน      5 = รังไข่  
และ 6 = อวัยวะ

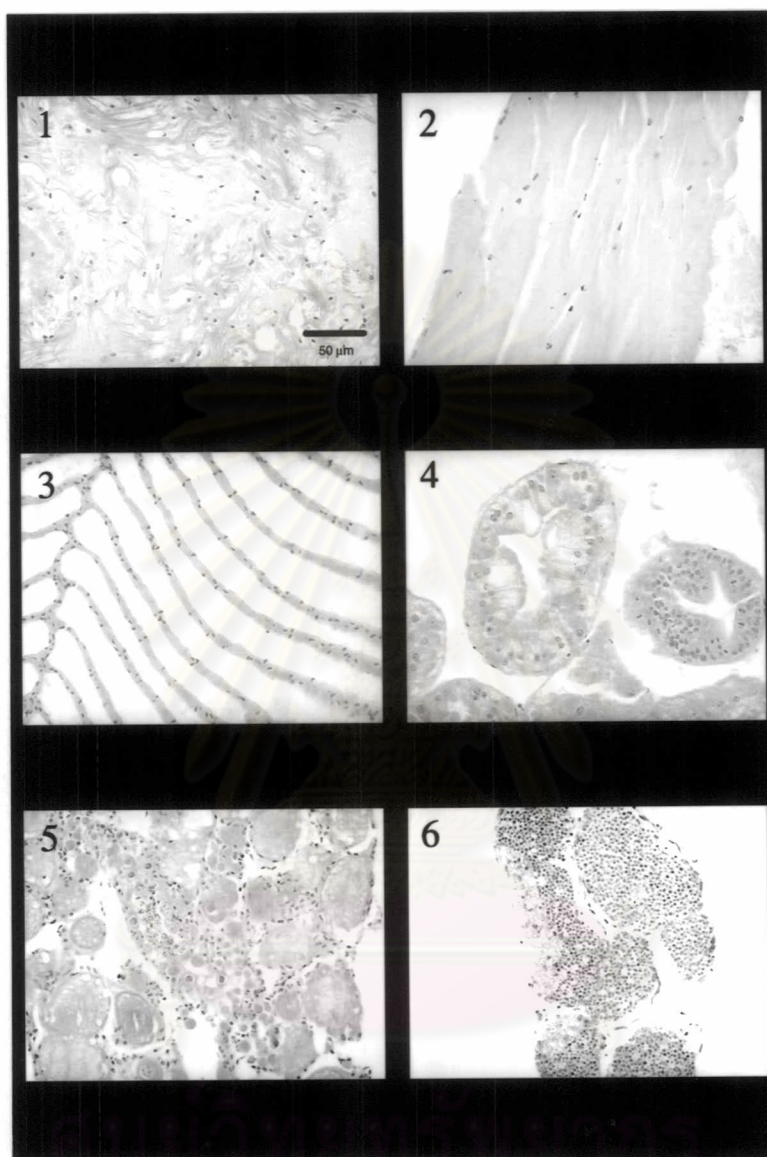


## จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 4.10 แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อ *Sesarma polita* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19 ไม่พบบริเวณใดที่มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดย 1 = หัวใจ      2 = กล้ามเนื้อ      3 = เหงือก      4 = ตับและตับอ่อน      5 = รังไข่  
และ 6 = อวัยวะ

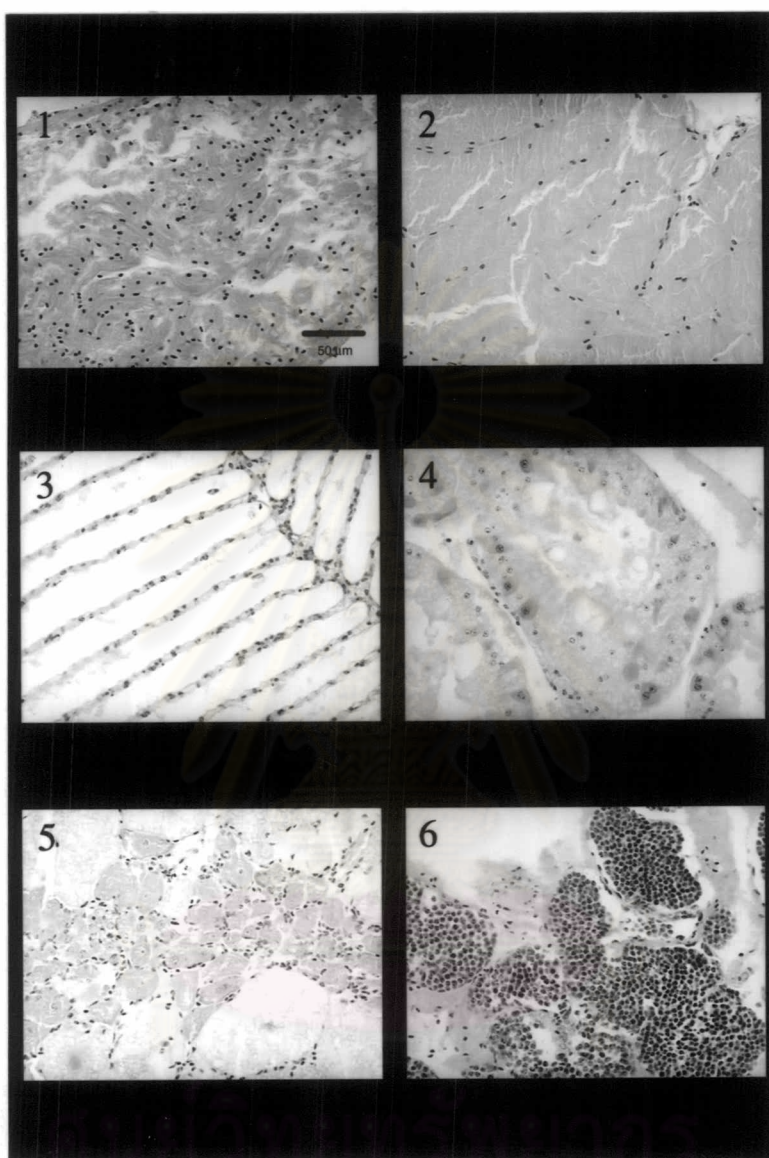




## จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 4.11 แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อปู *Sesarma moeschii* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19 ไม่พบบริเวณใดมีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดย 1 = หัวใจ      2 = กล้ามเนื้อ      3 = เหงือก      4 = ตับและตับอ่อน      5 = รั้งไข่  
และ 6 = อวัยวะ



## จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบ 4.12 แสดง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อปู *Sesarma bocourti* ที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดี Y19 ไม่พบบริเวณใดที่มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดย 1 = หัวใจ      2 = กล้ามเนื้อ      3 = เหงือก      4 = ตับและตับอ่อน      5 = รั้งไข่  
และ 6 = อวัยวะ

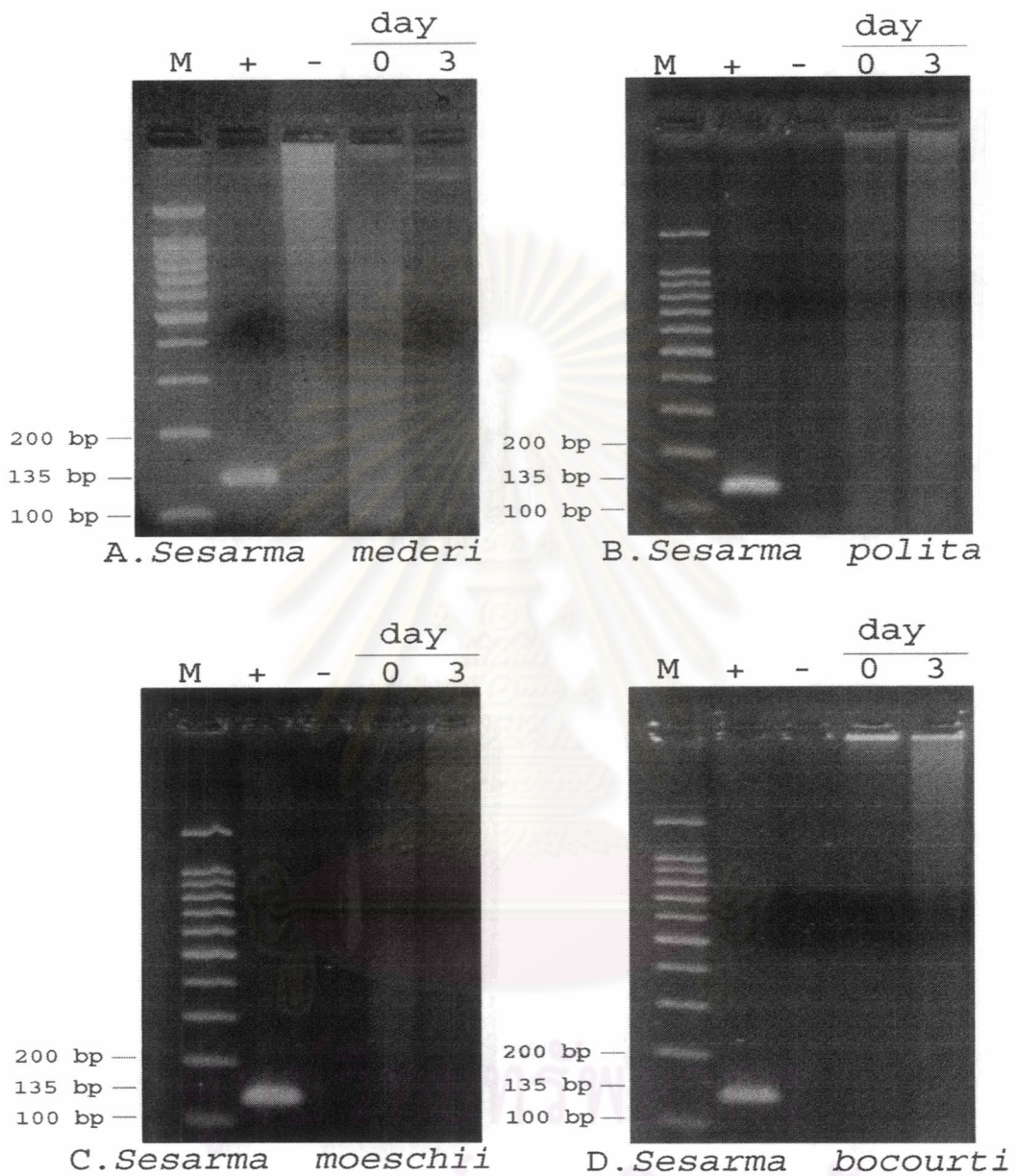
#### 4.3 การตรวจเชื้อไวรัสหิวเหลืองด้วยวิธี one step RT – PCR

จากการตรวจยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสหิวเหลืองโดยวิธี RT-PCR ในปูทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Sesarma mederi* , *Sesarma polita* , *Sesarma moeschii* และ *Sesarma bocourti* จากการเก็บจากธรรมชาติ และการฉีดเหี่ยวนำด้วยไวรัสหิวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหิวเหลืองในปูทุกชนิด                      ดังภาพประกอบที่                      4.13



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาพประกอบ 4.13 RT-PCR ของปู 4 ชนิด ได้แก่ A= *Sesarma mederi* , B = *Sesarma polita* , C = *Sesarma moeschii* และ D= *Sesarma bocourti* ที่จับจากธรรมชาติ (0 day) และจากการฉีดไวรัสหัวเหลือง เลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน(3 day) ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แสดงผลบนเจล agarose โดย M = DNA มาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบขนาด(100 bp DNA marker) , + = เลือดกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (positive control) ขนาด 135 คู่เบส , - = น้ำกลั่น (negative control)