



## รายงานการวิจัย

เทคนิคดิจิทัลอิมเมจและมิถุนวิทยาเพื่อศึกษาคัพภะของปูแสม

*Episesarma versicolor*

Digital imaging and histology techniques for embryo  
development study of sesarmid crab *Episesarma versicolor*

ชาญยุทธ สุตทองคง      Chanyut Sudtongkong  
ศิลปชัย เสนารัตน์      Sinlapachai Senarat

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
งบรายได้ประจำปี พ.ศ. 2565

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง เทคนิคดิจิทัลอิมเมจและมิถุนวิทยาเพื่อศึกษาคัพภะของปูแสม *Episesarma versicolor* ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย พ.ศ. 2565 และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่สนับสนุนปัจจัยพื้นฐานการวิจัย เช่น โรงเรือน ครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ และอุปกรณ์อื่นๆ ทำให้การดำเนินการวิจัยในครั้งนี้บรรลุตามวัตถุประสงค์และใคร่ขอขอบคุณทีมวิจัยห้องปฏิบัติการวิจัยปูน้ำเค็ม (Marine Crab Research Laboratory) ประกอบด้วย นายมุฮัมหมัด จิตรณรงค์ และ น.ส.ศุภรัตน์ คงโอ ที่ช่วยเก็บข้อมูลต่างๆ

ชาญยุทธ สุดทองคง  
ศิลปชัย เสนารัตน์  
สิงหาคม 2566

เทคนิคดิจิทัลอิมเมจและมิถุนวิทยาเพื่อศึกษาคัพภะของปูแสม  
*Episesarma versicolor*

ชาญยุทธ สุดทองคง<sup>1</sup> และศิลาปชัย เสนารัตน์<sup>1</sup>

บทคัดย่อ

การวิจัยเกี่ยวกับพัฒนาการของคัพภะปูแสม *Episesarma versicolor* พบคัพภะปูแสมชนิดนี้แบ่งเป็น 8 ช่วงตามพัฒนาการที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาขนาดและปริมาตรของไข่ปูแสม พบขนาดและปริมาตรเพิ่มขึ้นตามพัฒนาการของคัพภะ สำหรับการศึกษาด้านมิถุนวิทยา พบระยะพัฒนาการของคัพภะของปูแสมชนิดนี้สามารถแบ่ง 3 ระยะ คือ 1. การเจริญระยะต้น (early development) 2. ระยะต้นของการเจริญของอวัยวะ (early organogenesis) และ 3. ระยะปลายของการเจริญของอวัยวะ (late organogenesis) ส่วนการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของคัพภะของปูแสมชนิดนี้ พบกรดไขมัน (Fatty Acid) ที่สะสมที่คัพภะ ได้แก่ Eicosapentaenoic acid (C20:5n3), Oleic acid (C18:1n9c), Docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6n3), Arachidonic acid (C20:4n6) และ Linoleic acid (C18:2n6c)

**คำสำคัญ:** ปูแสม, ชีววิทยาการสืบพันธุ์, พัฒนาการของคัพภะ

---

<sup>1</sup> สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเลและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
อ. สีเกา จ. ตรัง

# Digital imaging and histology techniques for embryo development study of sesarmid crab *Episesarma versicolor*

Chanyut Sudtongkong<sup>1</sup> and Sinlapachai Senarat<sup>1</sup>

## Abstract

Investigation on the embryonic development of the sesarmid crab *Episesarma versicolor* showed that the embryo can be classified into 8 periods according to different embryonic development. When examining the size and volume of the embryo, it was observed that both size and volume increase throughout the embryo development stages. In terms of histology, the developmental stages of this crab can be divided into three phases: 1. Early developmental stage, 2. Early organogenesis stage, and 3. Late organogenesis stage. For studying the chemical composition of the sesarmid embryonic, various fatty acids have been identified and accumulated in the various embryonic including Eicosapentaenoic acid (C20: 5n3), Oleic acid (C18: 1n9c), Docosahexaenoic acid (DHA) (C22: 6n3), Arachidonic acid (C20: 4n6) and Linoleic acid (C18: 2n6c).

**Keywords:** Sesarmid crab, Reproductive biology, Embryonic Development

---

<sup>1</sup> Department of Marine Science and Environment, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang.

## สารบัญ

เนื้อเรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	2
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	4
สรุปผลการวิจัย	21
เอกสารอ้างอิง	23

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลักษณะคัพภะของปูแสม <i>E. versicolor</i> กับปูชนิดอื่นๆ	13
ตารางที่ 2 เส้นผ่านศูนย์กลาง และปริมาตรของไข่ปูแสม <i>E. versicolor</i>	15
ตารางที่ 3 พื้นที่ของไข่ และพื้นที่ของไข่แดงของแต่ละช่วงการพัฒนาของคัพภะปูแสม <i>E. versicolor</i>	16
ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณ (mg/100g) ของกรดไขมันที่พบในคัพภะของปูแสม <i>E. versicolor</i>	20

## สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 ปูแสม <i>Episesarma versicolor</i>	1
ภาพที่ 2 แหล่งเก็บตัวอย่างปูแสม <i>E. versicolor</i> บริเวณชายฝั่ง จังหวัดตรัง	2
ภาพที่ 3 พัฒนาการของคัพภะ (embryonic) ช่วงที่ 1 (Period 1)	5
ภาพที่ 4 พัฒนาการของคัพภะ (embryonic) ช่วงที่ 2 (Period 2)	6
ภาพที่ 5 พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic) ช่วงที่ 3 (Period 3)	7
ภาพที่ 6 พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic) ช่วงที่ 4 (Period 4)	8
ภาพที่ 7 พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic) ช่วงที่ 5 (Period 5)	9
ภาพที่ 8 พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic) ช่วงที่ 6 (Period 6)	10
ภาพที่ 9 พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic) ช่วงที่ 7 (Period 7)	11
ภาพที่ 10 พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic) ช่วงที่ 8 (Period 8)	12
ภาพที่ 11 พื้นที่ไข่และพื้นที่ไข่แดงตามการพัฒนาของคัพภะปูแสม <i>E. versicolor</i>	16
ภาพที่ 12 อัตราส่วนพื้นที่ไข่แดงต่อพื้นที่ไข่ (%) ตามการพัฒนาของคัพภะปูแสม <i>E. versicolor</i>	17
ภาพที่ 13 มิถุนวิทยาระยะพัฒนาของคัพภะวิทยาของปูแสม <i>E. versicolor</i>	19

## บทนำ

การใช้เทคนิคการวิเคราะห์ภาพถ่ายดิจิทัล (Digital image techniques) สามารถนำมาใช้ในการนับจำนวน การวัดขนาด และการคำนวณพื้นที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้เทคนิคแบบนี้มีประโยชน์ในการช่วยเก็บข้อมูลได้อย่างรวดเร็ว ช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ ประหยัดค่าใช้จ่าย มีความสะดวกในการเก็บข้อมูล และเพิ่มความแม่นยำในการเก็บข้อมูล (ชลิ และคณะ 2558) เช่นการศึกษาการนับจำนวนลูกปลาจากการถ่ายภาพเปรียบเทียบการนับด้วยวิธีปกติ พบว่าการนับจำนวนลูกปลาด้วยวิธีการถ่ายภาพมีความถูกต้องและแม่นยำมากกว่าการชั่งน้ำหนักและการนับด้วยวิธีปกติ (Chatain *et al.*, 1996) จึงมีการนำมาใช้ในการศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูชนิดต่างๆ เช่น การศึกษาของ Stevens (2006) ได้นำโปรแกรม ImageJ มาใช้ในเทคนิคการวิเคราะห์ภาพถ่ายดิจิทัล (Digital image techniques) เพื่อศึกษาพัฒนาการของคัพภะปูชนิด *Paralithodes platypus* และสามารถแสดงการเพิ่มพื้นที่ของคัพภะตามระยะการพัฒนาดังกล่าวอย่างชัดเจน และจากรายงานของ Martelli และคณะ (2016) ใช้โปรแกรม ImageJ มาใช้วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของคัพภะของปูชนิด *Ovalipes trimaculatus* และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของคัพภะระยะต่างๆ นอกจากนี้พบการใช้โปรแกรม ImageJ ในการศึกษาผลของการเพิ่มอุณหภูมิและความชื้นต่อการพัฒนาการของคัพภะปูก้ามดาบ โดยพบปริมาตรของคัพภะสูงกว่าในสภาพที่มีการเพิ่มอุณหภูมิและเพิ่มความชื้น (Pardo and Costa, 2021) นอกจากนี้ยังพบการใช้โปรแกรม ImageJ เพื่อศึกษาคัพภะปูชนิดต่างๆ ดังปรากฏในรายงานของ Webb *et al.* (2016) เป็นต้น

ปูแสม *Episesarma versicolor* (ภาพที่ 1) เป็นปูที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของปูแสม 4 ชนิดที่คนไทยนิยมจับมาแปรรูปเป็นปูเค็มเพื่อบริโภคและจำหน่ายเป็นรายได้ ปัจจุบันผลผลิตปูแสมของประเทศไทยมีแนวโน้มไม่เพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศ เนื่องจากการบริโภคปูแสมของคนไทยเท่ากับ 18,000 ตัน ต่อปี แต่ผลผลิตปูแสมของประเทศไทยประมาณ 12,000 ตันต่อปี ไม่เพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศ จึงต้องนำเข้าปูแสมจากต่างประเทศ (บรรจง, 2552) ซึ่งแนวโน้มการขาดแคลนปูแสมเพื่อการบริโภคในประเทศจะมีมากยิ่งขึ้น ดังรายงานของด่านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดตราด กรมประมง แสดงข้อมูลการนำเข้าปูแสมจากประเทศเพื่อนบ้านระหว่างปี พ.ศ.2556 เท่ากับ 1,953.22 ตัน มีมูลค่า 97,682,000 บาท และพบการนำเข้าปูแสมเพิ่มขึ้นในปี พ.ศ.2558 เท่ากับ 2,511.44 ตัน คิดเป็นเงิน 112,391,000 บาท (ด่านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดตราด, 2559)



ภาพที่ 1 ปูแสม *Episesarma versicolor*

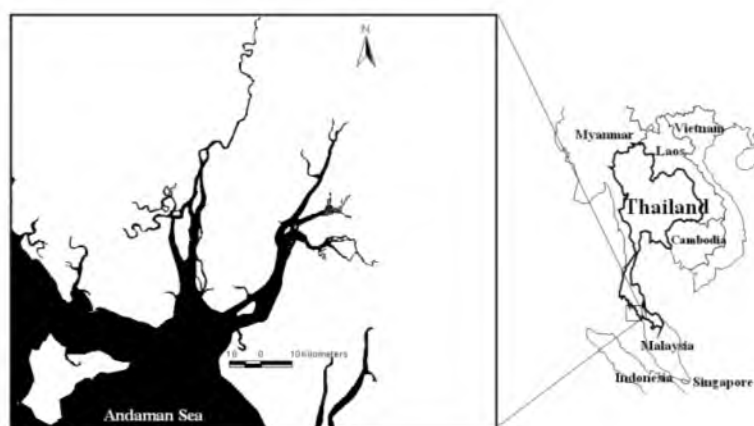


แม้ว่าปูแสมชนิดนี้เป็นปูที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีแนวโน้มขาดแคลนไม่เพียงพอต่อการบริโภคของคนไทย เนื่องจากปูแสมที่ใช้บริโภคทั้งหมดได้จากการจับจากแหล่งอาศัยธรรมชาติในป่าชายเลน ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อฟื้นฟูประชากรปูแสมในแหล่งอาศัยธรรมชาติจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับประเทศไทย การฟื้นฟูประชากรปูแสมของประเทศไทยจำเป็นต้องดำเนินการหลายแนวทางที่ต้องทำควบคู่กัน เช่น การจัดการเกี่ยวกับการทำประมงปูแสม การรักษาป่าชายเลนอันเป็นแหล่งอาศัยของปูแสม และการผลิตลูกปูแสมที่ได้จากเพาะพันธุ์ในโรงเพาะฟักเพื่อปล่อยกลับสู่ธรรมชาติ ที่ต้องอาศัยความรู้ด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูแสม การศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ในปูชนิดต่างๆ ยังมีความสำคัญบ่งบอกถึงศักยภาพการสืบพันธุ์ของปูชนิดต่างๆ รวมทั้งใช้ในการประมาณของประชากร (Mantelatto and Fransozo, 1997; Figueiredo et al., 2008) จึงเป็นประเด็นที่นักวิจัยได้ให้ความสนใจ โดยเฉพาะปูที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Hamasaki et al., 2006) ดังปรากฏในรายงานวิจัยต่างๆ เช่น Brante et al., (2003); Costa et al., 2006; César et al., 2007; Luppi et al., 1998; Leme (2004); Rasheed and Mustaquim (2010); Oniam et al., 2012; Ikhwanuddin et al., (2012); Sant'anna et al. (2014) เป็นต้น แต่จากการสืบค้นยังไม่พบรายงานการวิจัยเกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูแสม *E. versicolor* ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของคัพภะ จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นจึงได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับพัฒนาการด้วยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจและมิวชันวิทยา รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของคัพภะปูแสม *E. versicolor* ที่อาศัยในบริเวณป่าชายเลน จ. ตรัง โดยคาดว่าองค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูชนิดนี้

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. สถานที่เก็บตัวอย่างปูแสม

สถานที่เก็บตัวอย่างปูแสม *E. versicolor* เพื่อนำมาศึกษาอยู่ในบริเวณชายฝั่งของจังหวัดตรัง ประกอบด้วยพื้นที่ป่าชายเลนบริเวณจังหวัดตรัง เช่นอำเภอสิเกา อำเภอกันตัง อำเภอย่านตาขาว เป็นต้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แหล่งเก็บตัวอย่างปูแสม *E. versicolor* บริเวณชายฝั่ง จังหวัดตรัง

## 2. การเก็บตัวอย่างปูแสม

ทำการเก็บตัวอย่างปูแสม *E. versicolor* ในป่าชายเลนบริเวณจังหวัดตรัง โดยเก็บตัวอย่างปูแสมในเวลากลางวันช่วงน้ำลง นำปูแสมที่จับได้ใส่ในถังขนาด 20 ลิตร ที่มีกิ่งไม้และใบไม้ชายเลนอยู่ข้างใน เพื่อลดการทำร้ายกัน ก่อนขนย้ายปูแสมไปยังห้องปฏิบัติการวิจัยปูน้ำเค็ม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย เพื่อทำการเลี้ยงปูแสมและเก็บตัวอย่างสำหรับการศึกษาวิทยวิทยาการสืบพันธุ์ของปูแสมต่อไป

## 3. การศึกษาพัฒนาการของคัพภะ (Embryonic Development) ของปูแสม

การศึกษาพัฒนาการของคัพภะ (Embryonic Development) ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

### 3.1 การศึกษาคัพภะ (Embryonic Development) ด้วยเทคนิคดิจิทัลอิมเมจ

การศึกษาพัฒนาการของคัพภะ (Embryonic Development) ปูแสม *E. versicolor* มีวิธีการศึกษาที่ดัดแปลงจาก Pinheiro and Hattori (2003) โดยทำการจับปูแสม *E. versicolor* เพศเมีย มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด  $1.0 \times 1.0 \times 0.5$  เมตรจำนวน 3 ถัง โดยเลี้ยงปูแสม 10 ตัวต่อถัง สำหรับความเค็มที่ใช้เลี้ยงปูแสมคือ 20-25 PSU. ให้อาหารประเภทเนื้อกุ้งสด เนื้อปลาสด และอาหารกุ้งสำเร็จรูปชนิดเม็ดจมน้ำ และต้องทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันพร้อมตรวจสอบการมีไขนอกกระดองของปูแสมเพศเมีย เมื่อพบปูแสมเพศเมียมีไขนอกกระดองจึงนำมาแยกเลี้ยงเดี่ยวในขวดพลาสติกขนาด 5 ลิตร แล้วใช้ปากคีบสุ่มเก็บไข่ของปูแสมให้ได้ไขไม่น้อยกว่า 30 ฟอง ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปศึกษาพัฒนาการภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วจึงศึกษาขนาดและปริมาตรของคัพภะปูแสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการวัด Length of larger diameter และ Length of smaller diameter เพื่อใช้คำนวณหาค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลาง (Mean diameter) และปริมาตร (Volume) ตามวิธีของ Pinheiro and Hattori (2003); García-Guerrero and Hendrickx (2006) นอกจากนี้ทำการบันทึกภาพลักษณะของคัพภะ (embryo) ที่อยู่ภายในไขของปูแสมด้วยกล้องถ่ายภาพรูปดิจิตัลที่ติดกับกล้องจุลทรรศน์ รูปถ่ายที่ได้จะถูกนำไปศึกษาพื้นที่ส่วนต่างๆ ของคัพภะปูแสมเช่น thoracic-abdominal process ด้วยโปรแกรม ImageJ ซึ่งเป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับประมวลผลภาพดิจิทัลที่ใช้ในทางการแพทย์และชีววิทยา (Schneider *et al.* 2012) หลังจากนั้นจึงนำไขปูแสมไปเก็บรักษาในสารละลาย Steedmen เพื่อใช้สำหรับวาดภาพแสดงพัฒนาการของคัพภะ (embryo) ที่อยู่ภายในไขของปูแสมด้วยกล้องจุลทรรศน์ประกอบด้วยชุดวาดภาพ Lucida camera เช่น ลักษณะของ yolk, optic lobe, antennule, antenna, mandible, thoracic-abdominal process, rudiment of maxilla and maxillule, maxillipeds1, maxillipeds2, abdomen, pigmented optic lobe, heart, abdominal chrophores, mandibular chromatophores ของตัวอ่อน เพราะการถ่ายภาพวัตถุที่มีความโค้งนูน ไม่สามารถโฟกัสให้ภาพคมชัดทุกระยะคลอบคลุมลักษณะของคัพภะที่ต้องการแสดงได้ทั้งหมด จึงจำเป็นต้องใช้การวาดภาพแสดงพัฒนาการของคัพภะปูแสม นำข้อมูลเกี่ยวกับขนาด พื้นที่และปริมาตรของคัพภะปูแสมที่มีพัฒนาการต่างกันมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ANOVA ตามวิธีในเอกสารของ Sokal and Rohlf (1995)

### 3.2 การศึกษาพัฒนาการของคัพภะ (Embryonic Development) เทคนิคมิถุวิทยา (Histology)

สำหรับการศึกษาพัฒนาการของคัพภะปูแสมด้วยเทคนิคมิถุวิทยา (Histology) ทำการสุ่มตัวอย่างคัพภะปูแสมที่สังเกตเห็นพัฒนาการแตกต่างกันจากภายนอก ไปศึกษาทางเทคนิคมิถุวิทยา

(Histology) ตามวิธีของ Stewart *et al* (2007) โดยนำคัพภะปูแสมแช่ในสารละลาย Davidson's fixative (330 ml 95% ethyl alcohol, 220 ml 100% formalin, 115 ml glacial acetic acid และ 335 distilled H<sub>2</sub>O) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิปกติแล้ว นำไปผ่านกระบวนการขจัดน้ำ (dehydration) ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากนั้นนำคัพภะปูแสมไปแช่ในสารละลาย dioxane และ molten paraffin แล้วจึงนำไป embed ด้วย paraffin ก่อนที่จะนำไปตัดด้วยเครื่อง rotary microtome ให้ได้ความหนา 5  $\mu$ m เพื่อนำไป section บนแผ่นสไลด์ หลังจากนั้นจึงย้อมสี Hematoxylin-Eosin และ Periodic Acid Schiff (PAS) แล้วจึงนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคัพภะปูแสมระยะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายรูปด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัล

### 3.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของคัพภะของปูแสม

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของคัพภะของปูแสม ดัดแปลงจากวิธีที่นำเสนอในเอกสารของ Lemos and Rodriguez (1998); Naz (2008); Tantikitti, (2015) โดยนำรังไข่ของปูแสมเพศเมียจากตัวอย่างปูแสมที่สุ่มได้จากป่าชายเลนและนำคัพภะของปูแสมได้จากการเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยง ไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ Fatty acid เป็นต้น

## ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

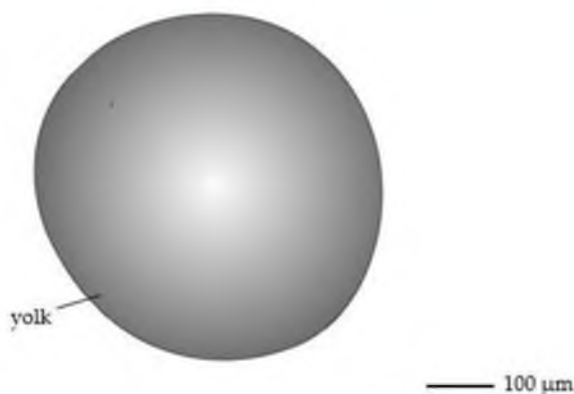
### 1. การศึกษาเกี่ยวกับพัฒนาการของคัพภะปูแสม *E. versicolor*

#### 1.1. พัฒนาการของคัพภะปูแสม *E. versicolor*

การพัฒนาของคัพภะ (embryonic development) ของปูแสม *E. versicolor* เป็นแบบการเจริญของคัพภะที่ไม่เกิดขึ้นพร้อมกันทั้งหมด (asynchronous development) หมายความว่าคัพภะไม่พัฒนาเหมือนกันในช่วงเวลาเดียวกัน ลักษณะนี้พบในรายงานเกี่ยวกับปูชนิดอื่นๆ เช่นงานวิจัยของ García-Guerrero และ Hendrickx (2004) การพัฒนาของคัพภะในปูแสมนั้นเริ่มต้นจากไข่นอกกระดอง (Fertilized egg) ของแม่พันธุ์ที่ได้รับการผสมกับสเปิร์ม โดยคัพภะ (embryonic) ของปูแสม *E. versicolor* ถูกแบ่งเป็นช่วง (period) ตามที่ García-Guerrero และ Hendrickx (2004) ได้เสนอแนะเพื่อสะท้อนถึงธรรมชาติของคัพภะที่พัฒนาอย่างต่อเนื่อง (continuous) ซึ่งแบ่งการพัฒนาเป็นทั้งหมด 8 ช่วง (period) ดังนี้

### พัฒนาการของคัพภะช่วงที่ 1 (Period 1)

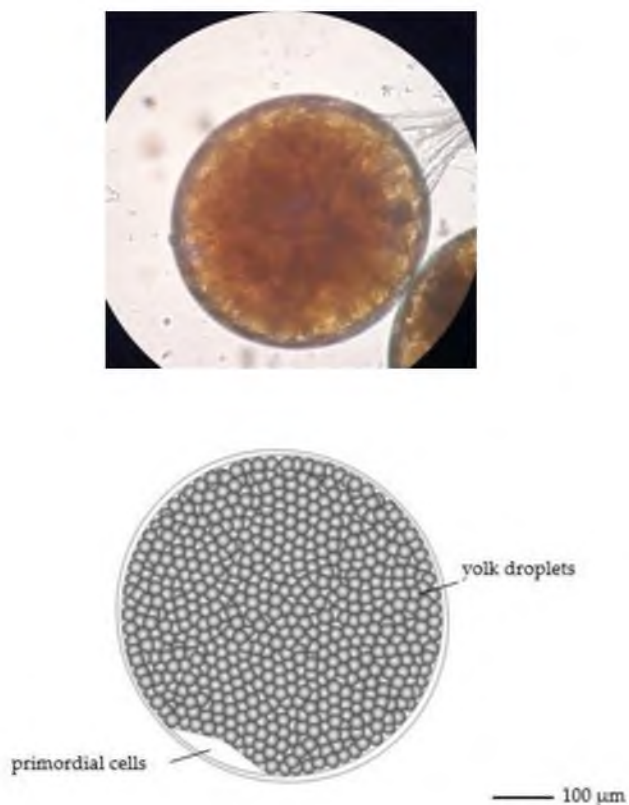
การพัฒนาคัพภะเกิดขึ้นของคัพภะเกิดขึ้นในไข่ของปูแสมที่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อ (fertilized eggs) ที่เพิ่งถูกปล่อย (early spawn) และไข่เกาะอยู่กับส่วนของรยางค์ที่จับปั้ง (abdomen) ในช่วงนี้เมื่อสำรวจลักษณะภายนอกของไข่ รูปร่างของไข่มีลักษณะกลม มีสีทึบแสงหรือสีน้ำตาล และภายในไข่เต็มไปด้วยไข่แดง (yolk) แต่ยังไม่มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นภายในไข่ในช่วงนี้ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 พัฒนาการของคัพภะ (embryonic) ช่วงที่ 1 (Period 1)

### พัฒนาการของคัพภะช่วงที่ 2 (Period 2)

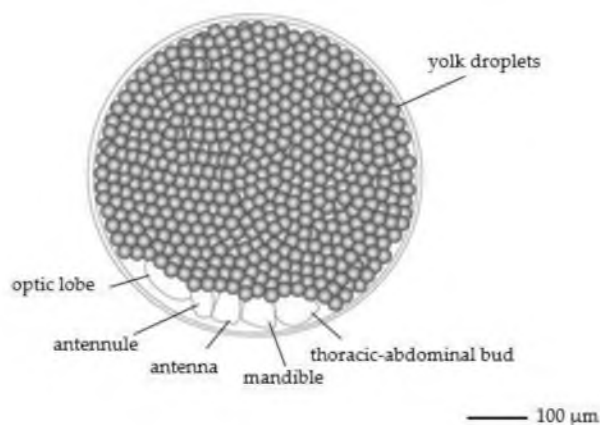
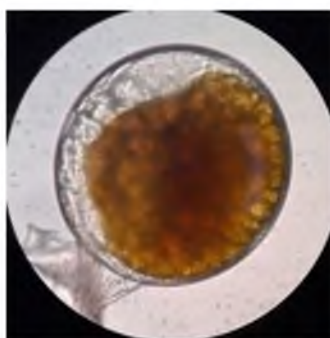
พัฒนาของคัพภะในช่วงที่ 2 พบขณะที่ไข่ของปูแสมถูกปล่อยและเกาะกับส่วนของร่างกายที่จับปิ้ง (abdomen) ประมาณ 2 วันหลังจากการปล่อยไข่ จากการสังเกตดูภายนอกของไข่พบว่ามีสีเหลืองและมีลักษณะใสสว่าง แต่ไม่ทึบเหมือนกับไข่ในช่วง period 1 ภายในไข่พบว่าการแบ่งของไข่แดง (yolk) เป็นหยดไขมันเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปในไข่ ระหว่างช่วงนี้ยังไม่สามารถจำแนกลักษณะของคัพภะเมื่อมองทางด้านข้าง (lateral view) นอกจากนี้ยังพบ primordial cells ที่กำลังเริ่มต้นพัฒนาตั้งแต่ด้านล่างของไข่ ตามที่แสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 พัฒนาการของคัพภะ (embryonic) ช่วงที่ 2 (Period 2)

### พัฒนาการของคัพภะช่วงที่ 3 (Period 3)

พัฒนาการคัพภะของปูแสมช่วงนี้เกิดขึ้นภายในไข่หลังจากที่ไข่ถูกปล่อยและเกาะกับส่วนของรยางค์ที่จับปิ้ง (abdomen) 5 วัน ขณะพิจารณาลักษณะภายนอกของไข่พบมีสีสว่างขึ้น และภายในไข่พบไข่แดงที่มีลักษณะคล้ายรูปหยดน้ำ และไข่แดง (yolk) ที่แบ่งเป็นหยดไขมัน (yolk droplets) ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้เมื่อมองจากด้านข้าง ยังพบคัพภะกำลังพัฒนามีลักษณะเป็นแอ่งสี่เหลี่ยมอยู่ด้านล่างของไข่ โดยพื้นที่ของคัพภะมีประมาณ 1/5 ของพื้นที่ไข่ ส่วนสำคัญของคัพภะในช่วงนี้คือ "primordial cells" ที่กำลังพัฒนาเป็นโครงสร้างต่างๆ เช่น optic lobe, antennule, antenna, mandible และ thoracic-abdominal bud ที่พบอยู่ด้านล่างของไข่ ซึ่งแสดงในภาพที่ 5

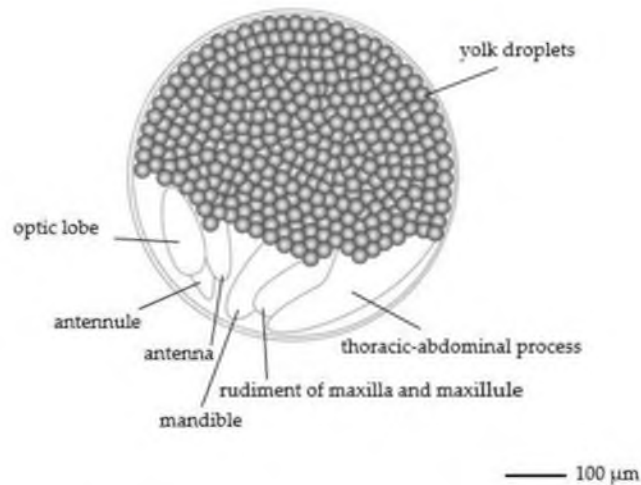
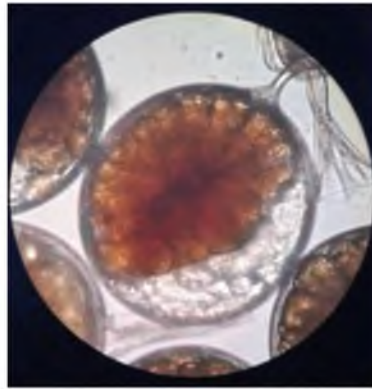


ภาพที่ 5 พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic) ช่วงที่ 3 (Period 3)



#### พัฒนาการของคัพภะช่วงที่ 4 (Period 4)

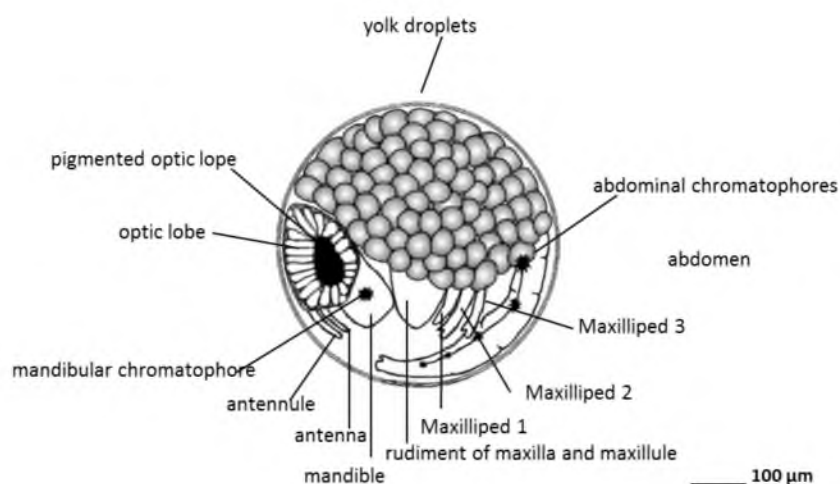
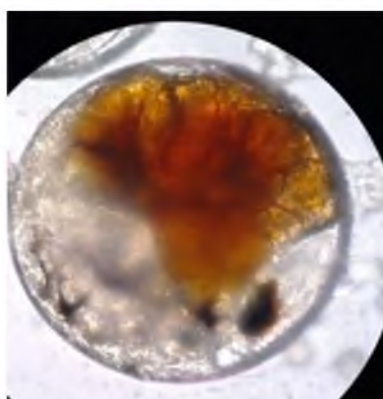
พัฒนาการของคัพภะในช่วงนี้เกิดขึ้นภายในไข่ของปูแสม หลังจากไข่ถูกปล่อยและเกาะกับส่วนของรยางค์ที่จับปั้ง (abdomen) ได้เป็นเวลา 8 วัน การสังเกตทางภายนอกพบส่วนของคัพภะมีขนาดประมาณ 1/3 ของพื้นที่ของไข่ อวัยวะสำคัญของคัพภะที่มีการเจริญเติบโตและสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนคือ optic lobe, antennule, antenna, mandible, maxilla-maxillule rudiment และ thoracic-abdominal process ซึ่งทั้งหมดพบอยู่ด้านล่างของไข่ สำหรับ optic lobe ไม่พบ pigmented optic lobe และส่วนของ thoracic-abdominal process มีการเจริญเติบโตและขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับช่วงพัฒนาการที่ผ่านมา อย่างไรก็ตามคัพภะยังไม่มีการแบ่งข้อปล้อง ดังที่แสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic) ช่วงที่ 4 (Period 4)

### พัฒนาการของคัพภะช่วงที่ 5 (Period 5)

พัฒนาการของคัพภะช่วงนี้เกิดขึ้นภายในไข่ของปูแสมหลังจากไข่ถูกปล่อยและเกาะกับส่วนของรยางค์ที่จับปิ้ง (abdomen) ได้ 10 วัน เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกพบสีไข่มีสีดำและเหลือง ส่วนของไข่แดง (Yolk) มีอัตราส่วนประมาณ 1/2 เมื่อเทียบกับปริมาตรของไข่ ส่วน optic lobe เห็นได้ชัดเจนและมีลักษณะกลมรี และที่บริเวณตอนกลางของ optic lobe มี pigmented optic lobe ส่วนของ antennule, antenna, mandible, maxilla-maxillule rudiment และ thoracic-abdominal process มีการเจริญเติบโตและมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วน Cephalothorax และ abdomen แยกออกจากกัน การแบ่งเป็นข้อปล้องที่บริเวณ abdomen ยังไม่ชัดเจน นอกจากนี้สามารถมองเห็น chromatophores ที่บริเวณ abdomen ดังแสดงในภาพที่ 7

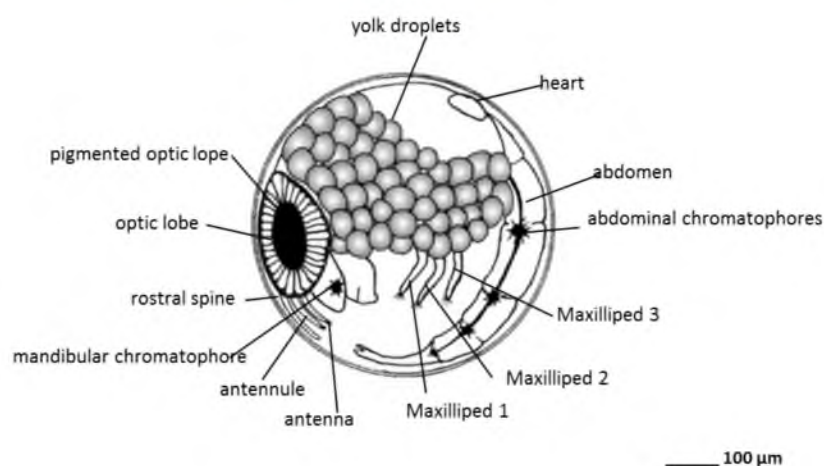
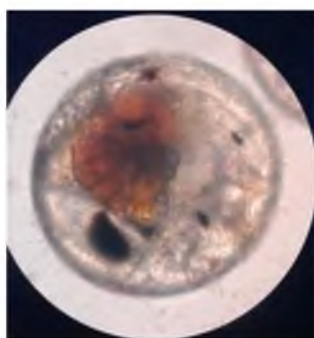


ภาพที่ 7 พัฒนาการของคัพภะ (embryonic) ช่วงที่ 5 (Period 5)



### พัฒนาการของคัพภะช่วงที่ 6 (Period 6)

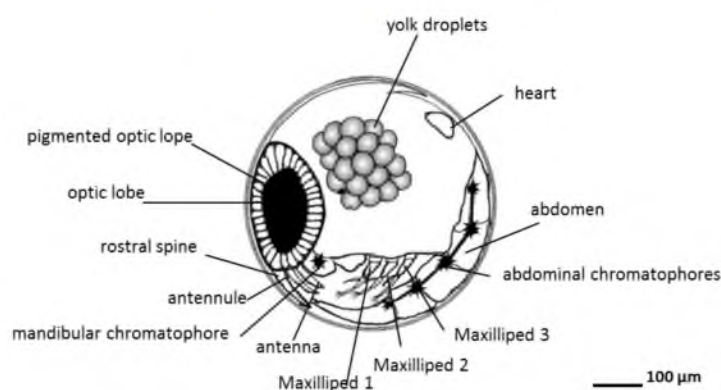
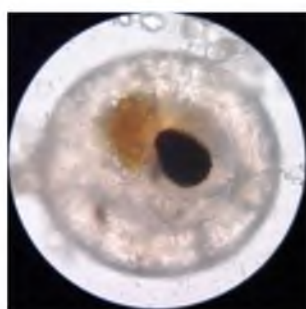
พัฒนาการของคัพภะช่วงนี้เกิดขึ้นภายในไข่ของปูแสมหลังจากไข่ถูกปล่อยและเกาะกับส่วนของทรายที่จับปั้งไปแล้วเป็นเวลา 14 วัน เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกของไข่พบมีสีน้ำตาลดำและเหลือง ส่วนของไข่แดง (Yolk) ถูกนำไปใช้ในกระบวนการพัฒนาของคัพภะโดยมีอัตราส่วนประมาณ 1/3-1/4 เมื่อเทียบกับพื้นที่ของไข่ ส่วนคัพภะ (embryonic) มีอัตราส่วนประมาณ 1/2 เมื่อเทียบกับพื้นที่ของไข่ นอกจากนี้ยังพบบริเวณ optic lobe ขยายใหญ่และมี pigmented optic lobe ที่เข้มอย่างเด่นชัด หัวใจมีขนาดใหญ่สามารถสังเกตเห็นได้ง่ายและมีการเต้นของหัวใจที่ชัดเจนขึ้น บริเวณ abdomen มีขนาดใหญ่ โคนังพับไปยังส่วน optic lobe และมีการแบ่งเป็นปล้องเกือบสมบูรณ์ และพบ chromatophores ในแต่ละปล้องที่เชื่อมต่อกัน (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 พัฒนาการของคัพภะ (embryonic) ช่วงที่ 6 (Period 6)

### พัฒนาการของคัพภะช่วงที่ 7 (Period 7)

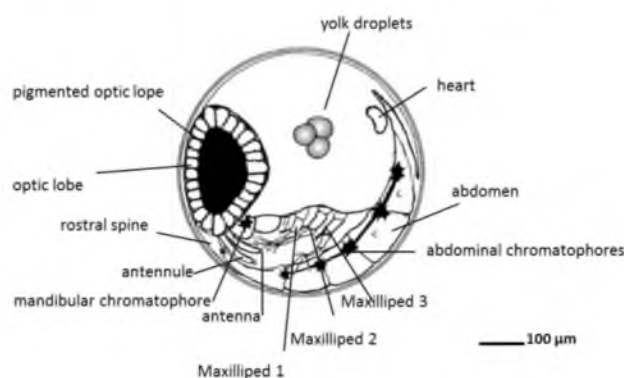
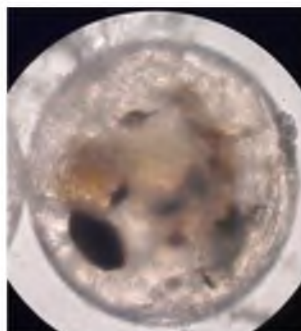
พัฒนาการของคัพภะในช่วงนี้เกิดขึ้นภายในไข่ของปูแสมหลังจากไข่ถูกปล่อยและเกาะกับส่วนของทรายที่จับปั้งเป็นเวลา 16 วัน จากการสังเกตด้านนอกพบว่าสีของไข่เป็นสีใส ส่วนคัพภะเต็มพื้นที่เกือบทั้งหมดของไข่ จากมุมมองด้านข้างพบว่าส่วนคัพภะเต็มพื้นที่ประมาณ  $\frac{2}{3}$  ของปริมาตรของไข่ ส่วนหยดไขมันอยู่ที่ด้านบนของ cephalothorax บริเวณ optic lobe ขยายใหญ่ครอบคลุมพื้นที่ประมาณ  $\frac{1}{6}$  -  $\frac{1}{8}$  ของไข่ เมื่อมองด้านข้างและมี pigmented optic lobe ที่เข้มเป็นสีดำ การเต้นของหัวใจเกิดขึ้นอย่างถี่ขึ้นและสามารถสังเกตเห็นชัดเจน บริเวณ abdomen แบ่งออกเป็น 6 ส่วนอย่างสมบูรณ์ บริเวณปลาย maxillipeds และ Telson มี setae (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 พัฒนาการของคัพภะ (embryonic) ช่วงที่ 7 (Period 7)

### พัฒนาการของคัพภะช่วงที่ 8 (Period 8)

พัฒนาการของคัพภะช่วงนี้เกิดขึ้นภายในไข่ของปูแสมหลังจากไข่ถูกปล่อยและเกาะกับส่วนของรยางค์ที่จับปิ้ง (abdomen) ได้ 18 วัน เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกพบไข่มีสีใส สัตว์ส่วนของคัพภะ (embryonic) พบเกือบเต็มพื้นที่ทั้งหมดของไข่ พบหยดไขมัน (yolk droplets) ของไข่แดง (yolk) เพียงเล็กน้อยที่บริเวณด้านบนของ cephalothorax คิดเป็นอัตราส่วน  $1/7-1/8$  ของพื้นที่ของไข่ บริเวณ optic lobe ขยายใหญ่ และพัฒนาสมบูรณ์ ส่วน abdomen และ maxillipeds พัฒนาและแบ่งเป็นปล้องอย่างสมบูรณ์ และกำลังใกล้ฟักเป็นตัวอ่อนระยะ Zoea 1 (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 พัฒนาการของคัพภะ (embryonic) ช่วงที่ 8 (Period 8)

การศึกษาค้นคว้าพบพัฒนาการของคัพภะปูแสม (*E. versicolor*) ทั้งหมด 8 ช่วง (Period) คล้ายกับพัฒนาการของคัพภะของปูชนิดอื่นด้วย เช่น ปูชนิด *Ucides cordatus*, *Portunus pelagicus*, *Goniopsis pulchra*, *Aratus pisonii* และปูแสม *Episesarma singaporense* (Pinheiro and Hattori, 2003; García-Guerrero and Hendrickx, 2004; Ravi and Manisseri, 2013; ชาญยุทธ และวัฒนา, 2563) อย่างไรก็ตามพัฒนาการของคัพภะแต่ละช่วงอาจมีความคล้ายคลึงหรือแตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของชนิดและชีววิทยา (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลักษณะคัพภะของปูแสม *E. versicolor* กับปูชนิดอื่นๆ

พัฒนาการของคัพภะปูแสม <i>E. versicolor</i>	คัพภะของปูแสม <i>E. singaporense</i> (ชาญยุทธ และวัฒนา, 2563 )	คัพภะของปู <i>Ucides cordatus</i> (Pinheiro and Hattori, 2003)	คัพภะของปู <i>Aratus pisonii</i> (García-Guerrero and Hendrickx, 2004)
ช่วง (period) ที่ 1 รูปร่างของไข่มีลักษณะกลม ไข่มีสีเข้มทึบแสงหรือสีน้ำตาลอมดำ และภายในไข่มีไข่แดง (yolk) อยู่เต็ม แต่ยังไม่พบการแบ่งเซลล์ของไข่	+	+	+
ช่วง (period) ที่ 2 ไข่มีสีเหลือง และมีลักษณะใสสว่าง ไม่ทึบเหมือนกับช่วงที่ 1 ภายในมีการแบ่งของไข่แดง (yolk) เป็นหยดไขมัน (yolk droplets) ขนาดเล็กเต็มทั้งใบ และเมื่อมองทางด้านข้างพบ primordial cells เริ่มพัฒนาที่บริเวณด้านล่างของไข่	+	+	+
ช่วง (period) ที่ 3 ไข่มีสีสว่างขึ้น ภายในไข่พบไข่แดงมีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำ และมีการแบ่งของไข่แดง (yolk) เป็นหยดไขมัน (yolk droplets) มีขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ชัด และเมื่อมองจากด้านข้าง พบการพัฒนาของคัพภะเป็นลักษณะเป็นแองกัสสี อยู่ทางด้านล่างของไข่ คิดเป็นปริมาตรประมาณ 1/5 ของปริมาตรไข่ ส่วนของ primordial cells พัฒนาเป็นโครงสร้างคัพภะที่สำคัญ คือ optic lobe, antennule, antenna, mandible และ thoracic-abdominal bud	+	+	+
ช่วง (period) ที่ 4 คัพภะมีอัตราส่วนประมาณ 1/3 เมื่อเทียบกับพื้นที่ของไข่ อวัยวะสำคัญของคัพภะที่มีการเจริญเติบโตและสามารถสังเกตเห็นได้ชัด คือ optic lobe, antennule, antenna, mandible, maxilla-maxillule rudiment และ thoracic-abdominal process ซึ่งทั้งหมดพบอยู่ด้านล่างของไข่ บริเวณ optic lobe ไม่พบ pigmented optic lobe และบริเวณ thoracic-abdominal process มีการเจริญเติบโต มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับช่วงเวลาที่ผ่านมา แต่ยังไม่แบ่งข้อปล้อง	+	+	+
ช่วง (period) ที่ 5 สีไข่มีสีดำและเหลือง ส่วนของไข่แดง (Yolk) มีอัตราส่วนประมาณ 1/2 เมื่อเทียบกับปริมาตรของไข่ ส่วน optic lobe เห็นได้ชัดเจนและมีลักษณะกลมรี และที่บริเวณตอนกลางของ optic lobe มี pigmented optic lobe ส่วนของ antennule, antenna, mandible, maxilla-maxillule rudiment และ thoracic-abdominal process มีการเจริญเติบโตและมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วน Cephalothorax และ abdomen แยกออกจากกัน การแบ่งเป็นข้อปล้องที่บริเวณ abdomen ยังไม่ชัดเจน นอกจากนี้สามารถมองเห็น chromatophores ที่บริเวณ abdomen	+	+	+
ช่วง (period) ที่ 6 สีไข่มีสีน้ำตาลดำและเหลือง ส่วนของไข่แดง (Yolk) ถูกนำไปใช้ในการพัฒนาของคัพภะและมีอัตราส่วนประมาณ 1/3-1/4 เมื่อเทียบกับปริมาตรของไข่ ส่วนคัพภะ (embryonic) มีอัตราส่วนประมาณ 1/2 เมื่อเทียบกับปริมาตรของไข่ บริเวณ optic lobe ขยายใหญ่ และมี pigmented optic lobe ที่เข้มเห็นได้ชัดเจน หัวใจใหญ่มีขนาดใหญ่สามารถสังเกตเห็นได้ง่ายและมีการเต้นของหัวใจชัดเจน บริเวณ abdomen มีขนาดใหญ่ มีการแบ่งเป็นปล้องเกือบสมบูรณ์ โค้งพับไปยังส่วน optic lobe และมี chromatophores ในแต่ละปล้องที่เชื่อมต่อกัน	+	+	+

## ตารางที่ 1 (ต่อ)

พัฒนาการของคัพภะปูแสม <i>E. versicolor</i>	คัพภะของปูแสม <i>E. singaporense</i> (ชาณูยุทธ และวัฒนา, 2563 )	คัพภะของปู <i>Ucides cordatus</i> (Pinheiro and Hattori, 2003)	คัพภะของปู <i>Aratus pisonii</i> (García-Guerrero and Hendrickx, 2004)
ช่วง (period) ที่ 7 ไข่มีสีใส คัพภะ (embryonic) พบกลุ่มพื้นที่เกือบทั้งหมดของไข่ จากมุมมองจากด้านข้างพบส่วนคัพภะ (embryonic) มีอัตราส่วนประมาณ 2/3 เมื่อเทียบกับปริมาตรของไข่ ส่วนหยดไขมัน (yolk droplets) ของไข่แดง (yolk) อยู่บริเวณด้านบนของ cephalothorax บริเวณ optic lobe ขยายใหญ่ครอบคลุมพื้นที่คิดเป็นอัตราส่วน 1/6- 1/8 ของไข่เมื่อมองทางด้านข้าง และมี pigmented optic lobe ที่เข้มเป็นดำ การเดินของหัวใจขึ้นและสามารถสังเกตเห็นชัดเจน บริเวณ abdomen แบ่งเป็น 6 ปล้องอย่างสมบูรณ์ บริเวณปลาย maxillipeds และ Telson มี setae	+	+	+
ช่วง (period) ที่ 8 ไข่มีสีใส สัดส่วนของคัพภะ (embryonic) พบเกือบเต็มพื้นที่ทั้งหมดของไข่ พบหยดไขมัน (yolk droplets) ของไข่แดง (yolk) เพียงเล็กน้อยที่บริเวณด้านบนของ cephalothorax คิดเป็นอัตราส่วน 1/8 ของปริมาตรไข่ บริเวณ optic lobe ขยายใหญ่ และพัฒนาสมบูรณ์ ส่วน abdomen และ maxillipeds พัฒนาและแบ่งเป็นปล้องอย่างสมบูรณ์ และ กำลังใกล้ฟักเป็นตัวอ่อนระยะ Zoea 1	+	+	+

หมายเหตุ + คือคล้ายคลึงกัน

## 1.2. ขนาดและปริมาตรของไข่ปูแสม *E. versicolor*

จากการศึกษาขนาดและปริมาตรของไข่ปูแสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนกว้าง (Length of larger diameter) และการวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนแคบ (Length of smaller diameter) เพื่อใช้คำนวณค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลาง (Mean diameter) และคำนวณปริมาตร (Volume) ของไข่ปูแสมตามพัฒนาการของคัพภะ พบขนาดและปริมาตรของไข่เพิ่มขึ้นตามพัฒนาการของคัพภะ โดยเฉพาะช่วงที่คัพภะมีการพัฒนาก่อนฟักเป็นตัวอ่อนระยะ Zoea มีการเพิ่มของเส้นผ่านศูนย์กลางและปริมาตรไข่แตกต่างกับช่วงแรกเริ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งลักษณะเช่นนี้พบในรายงานที่กล่าวถึงการเพิ่มเส้นผ่านศูนย์กลางและปริมาตรของไข่ตามพัฒนาการของปูแสมชนิด *Episesarma singaporense* ปูชนิด *Ucides cordatus* และปูชนิด *Goniopsis pulchra* (Pinheiro and Hattori, 2003; García-Guerrero and Hendrickx, 2004, ชาญยุทธ และวัฒนา, 2563)

ตารางที่ 2 เส้นผ่านศูนย์กลาง และปริมาตรของไข่ปูแสม *E. versicolor* แต่ละช่วงการพัฒนาของคัพภะ

ช่วงการพัฒนา (Development Period)	เส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ (Egg Diameter; $\mu\text{m}$ )	ปริมาตรไข่ของไข่ (Egg Volume; $\mu\text{m}^3 \times 10^6$ )
1	357.65 $\pm$ 4.35 <sup>g</sup>	23.97 $\pm$ 0.86 <sup>f</sup>
2	363.27 $\pm$ 3.21 <sup>f</sup>	25.12 $\pm$ 0.66 <sup>f</sup>
3	370.53 $\pm$ 2.91 <sup>e</sup>	26.65 $\pm$ 0.63 <sup>e</sup>
4	375.29 $\pm$ 2.03 <sup>e</sup>	27.69 $\pm$ 0.45 <sup>e</sup>
5	393.50 $\pm$ 6.56 <sup>d</sup>	31.94 $\pm$ 1.57 <sup>d</sup>
6	403.78 $\pm$ 3.41 <sup>c</sup>	34.49 $\pm$ 0.88 <sup>c</sup>
7	423.86 $\pm$ 1.98 <sup>b</sup>	39.89 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>
8	439.60 $\pm$ 3.88 <sup>a</sup>	44.51 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>

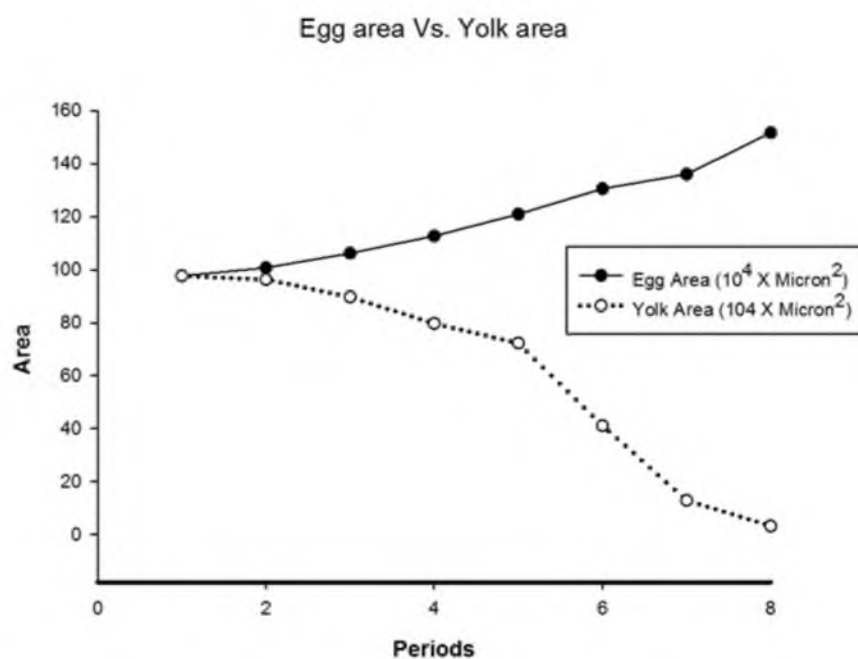
หมายเหตุ ความแตกต่างของตัวอักษรในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

นอกจากนี้จากการใช้โปรแกรม ImageJ ซึ่งเป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับประมวลผลภาพดิจิทัลที่ใช้ในทางการแพทย์และชีววิทยา (Schneider *et al.* 2012) เพื่อศึกษาพื้นที่ไข่และพื้นที่ไข่แดง พบพื้นที่ไข่มีการเพิ่มขึ้นตามพัฒนาการ แต่พื้นที่ไข่แดงกลับมีพื้นที่ลดลงตามพัฒนาการของคัพภะ (ตารางที่ 3; ภาพที่ 12-13) แสดงถึงการไข่แดงเพื่อสร้างอวัยวะต่างๆ ของคัพภะ

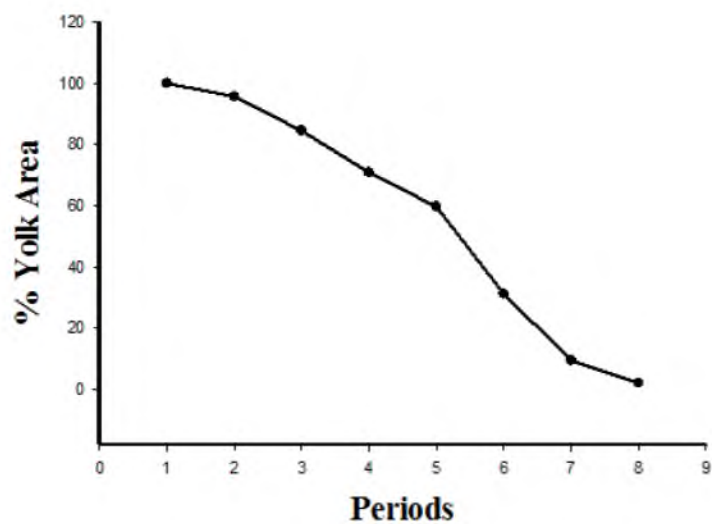
ตารางที่ 3 พื้นที่ของไข่ และพื้นที่ของไข่แดงของแต่ละช่วงการพัฒนาของคัพภะปูแสม *E. versicolor*

ช่วงการพัฒนา (Development Period)	พื้นที่ของไข่ (Egg area; $\mu\text{m}^2 \times 10^4$ )	พื้นที่ของไข่แดง (Yolk area; $\mu\text{m}^2 \times 10^4$ )
1	97.68±5.16 <sup>a</sup>	97.68±5.16
2	100.73±3.79 <sup>ab</sup>	96.30±2.50
3	106.20±2.72 <sup>b</sup>	89.76±3.70
4	112.71±7.23 <sup>cb</sup>	79.68±1.72
5	120.99±4.76 <sup>d</sup>	72.28±10.05
6	130.59±8.79 <sup>e</sup>	41.08±10.99
7	136.04±7.24 <sup>e</sup>	12.85±0.96
8	151.71±4.47 <sup>f</sup>	3.19±0.62

หมายเหตุ ความแตกต่างของตัวอักษรในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 12 พื้นที่ไข่และพื้นที่ไข่แดงตามการพัฒนาของคัพภะปูแสม *E. versicolor*



ภาพที่ 13 อัตราส่วนพื้นที่ไข่แดงต่อพื้นที่ไข่ (%) ตามการพัฒนาของคัพภะปูแสม *E. versicolor*



## 2. มิถุนวิทยาของคัพภะปูแสม *E. versicolor*

งานวิจัยเกี่ยวกับการแบ่งระยะพัฒนาการของคัพภะวิทยาของกลุ่มครัสตาเซียมีการศึกษาอย่างแพร่หลาย (John Samuel 2003, Quintio and Parado-Esteba, 2003; Rajkumar *et al.*, 2023; Muller *et al.* (2003)) เช่น 6 ระยะของคัพภะวิทยา ได้แก่ newly spawned egg, multi-cell stage, eye stage, pigment stage, heart beat stage และ pre-hatching stage หรือ 7 ระยะ ได้แก่ cleavage, blastulation, gastrulation, segmentation formation of appendages formation of heart และ formation of chromatophores (John Samuel 2003, Quintio and Parado-Esteba 2003) แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยครั้งนี้ระยะพัฒนาการของคัพภะวิทยาของปูแสม *E. versicolor* ที่ศึกษาทางมิถุนวิทยา สามารถสรุปเป็น 3 ระยะ คือ 1. การเจริญระยะต้น (early development) หรือ (cleavage blastula and gastrula) 2. ระยะต้นของการเจริญของอวัยวะ (early organogenesis) หรือ (post-gastrula) และ 3. ระยะปลายของการเจริญของอวัยวะ (late organogenesis) แต่ละระยะมีรายละเอียด ดังนี้

### การเจริญระยะต้น (Early development)

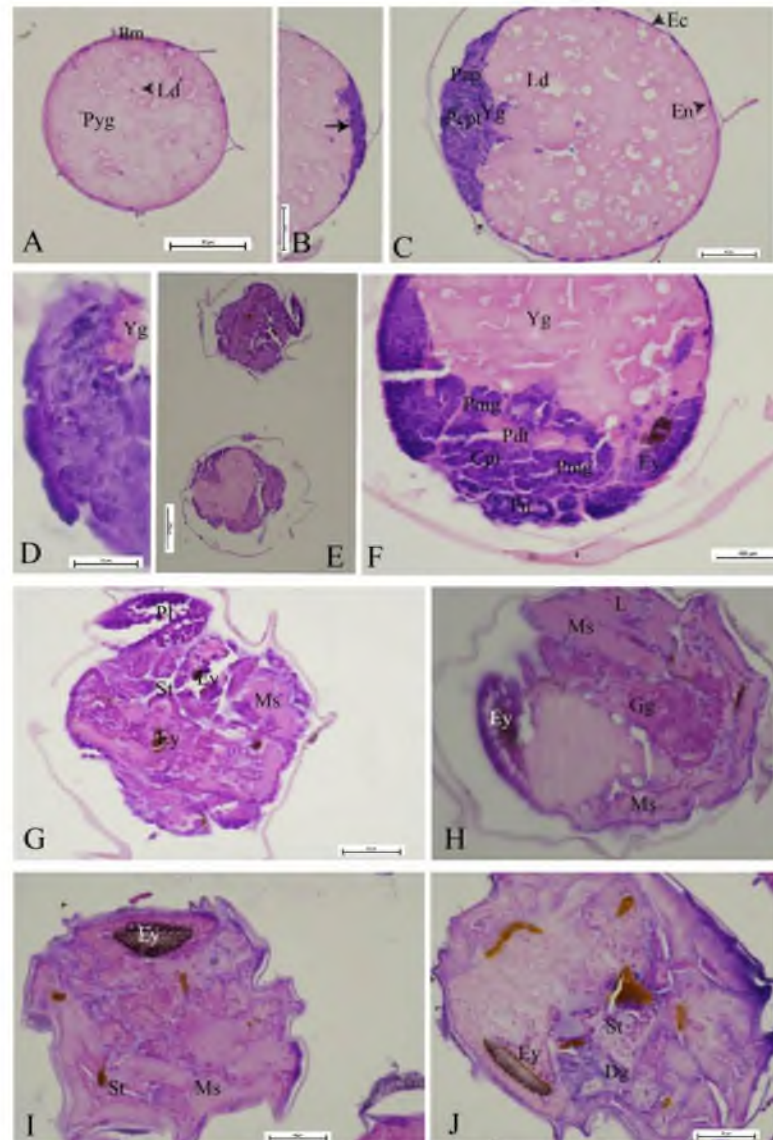
พัฒนาการของการเจริญระยะต้นมีรูปทรงกลมและบรรจุด้วยแผ่นไข่แดง ร่วมกับหยดไขมัน ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงใสกระจายทั่วทั้งเซลล์ไข่ จัดเป็นรูปแบบ centrolecithal egg หลังจากนั้นมีการพัฒนาของเซลล์ที่มีรูปร่างชั้นเดียว (a single layer of cells) หรือเรียกว่า blastomere (ภาพที่ 11A) และกลุ่มเซลล์ blastomere หนาตัว (ภาพที่ 11B) เนื่องจากเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 11C) เข้าสู่ระยะ gastrular ซึ่งระยะนี้เริ่มสังเกตชั้นเซลล์หนาตัว (ภาพที่ 11D) และบริเวณนี้อาจจะกลายเป็นส่วนหัวและส่วนอก (Presumptive for cephalothorax region) และส่วนท้อง (Presumptive for abdomen) แต่อย่างไรก็ตามในภาพรวมของระยะนี้ยังไม่สามารถแยกอวัยวะได้ เช่นเดียวกับการรายงานในคัพภะวิทยาของปู *Emerita taiwanesis* (Senarat *et al.*, 2018)

### ระยะต้นของการเจริญของอวัยวะ (Early organogenesis)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระยะนี้ (ภาพที่ 11E) มีลักษณะเด่นของระยะต้นของการเจริญของอวัยวะ พบว่าเริ่มสังเกตการเจริญของอวัยวะที่จะกลายเป็นเกี่ยวกับทางเดินอาหาร (presumptive for digestive organ) ตา อวัยวะประสาท และต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) จึงทำให้สามารถแยกโครงสร้างระหว่าง cephalothorax และ abdomen ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ในระยะนี้พบว่าปริมาณของไข่แดงลดลง (ภาพที่ 11F) เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการใช้เป็นพลังงานสำหรับการเจริญของคัพภะวิทยา (Herring, 1974) สอดคล้องกับการรายงานถึงปริมาณไข่แดงและคัพภะวิทยาของกุ้งน้ำจืด *Macrobrachium carcinus* (Lara and Wehrtmann, 2009)

### ระยะปลายของการเจริญของอวัยวะ (Late organogenesis)

ในช่วงพัฒนาการของระยะปลายของการเจริญของอวัยวะ ซึ่งปริมาณของไข่แดงและหยดไขมันลดลง ต่างจากการเจริญของอวัยวะหลากหลายส่วนและแยกได้ชัดเจนมากขึ้น ได้แก่ มัดกล้ามเนื้อลาย กระเพาะอาหาร ต่อมย่อยอาหาร และการเจริญของขา (ภาพที่ 11G-11J) สอดคล้องกับรายงานในเช่นเดียวกับการรายงานในคัพภะวิทยาระยะปลายของการเจริญของอวัยวะของปู *E. taiwanesis* (Senarat *et al.*, 2018)



ภาพที่ 11 มิถุนวิทยาระยะพัฒนาของคัพภะวิทยาของปูแสม *E. versicolor* ประกอบด้วยระยะ 1. การเจริญระยะต้น (A-D) 2. ระยะต้นของการเจริญของอวัยวะ (early organogenesis (E-F) และ 3. ระยะปลายของการเจริญของอวัยวะ (late organogenesis (G-J))

หมายเหตุ Bm = blastomere, Ec = ectoderm cell, En = endoderm cell, Ey = eye, Gg = gastric gland, L = leg, Pap = presumptive of abdomen, Pcpt = presumptive of cephalothorax, pdt = presumptive for digestive tract, Pl = presumptive of leg, Png = presumptive of midgut, Pn = presumptive of nervous tissue, Pyg = Plate of yolk granule, Ld = lipid droplet, St = stomach, arrow = formation of blastomere,

### 3. องค์ประกอบทางเคมีของคัพภะปูแสม *E. versicolor*

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของคัพภะ (Embryonic) ของปูแสมชนิดนี้ พบกรดไขมัน (Fatty Acid) สะสมในคัพภะช่วงต่างๆ เช่น Palmitic acid (C16:0), Palmitoleic acid (C16:1), Linoleic acid (C18:2n6c), Oleic acid (C18:1n9c), Arachidonic acid (C20:4n6), Eicosapentaenoic acid (C20:5n3) และ Docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6n3) เป็นต้น ดังรายละเอียดในตารางที่ 3

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณ (mg/100g) ของกรดไขมันที่พบในคัพภะของปูแสม *E. versicolor*

กรดไขมัน (Fatty Acid)	คัพภะ (Period 1-2)	คัพภะ (Period 3-4)	คัพภะ (Period 5-6)	คัพภะ (Period 7-8)
Myristic acid (C14:0)	209.97±4.43	140.92±2.67	138.87±2.80	132.29±3.24
Pentadecanoic acid (C15:0)	232.27±2.48	132.76±1.13	139.06±1.85	128.50±2.38
Palmitic acid (C16:0)	4,476.03±31.56	2,802.70±5.22	2,632.71±7.02	2,594.31±14.85
Palmitoleic acid (C16:1)	1,788.12±16.23	1,240.12±6.92	1,132.23±14.67	1,121.95±9.87
Heptadecanoic acid (C17:0)	396.84±3.51	214.30±0.95	202.62±0.53	157.52±0.61
cis-10-Heptadecenoic acid(C17:1)	273.57±2.03	149.14±21.32	158.73±1.02	136.19±4.82
Stearic acid (C18:0)	1,301.01±10.45	806.03±1.73	708.35±5.68	692.29±7.81
Oleic acid (C18:1n9c)	3,789.69±24.64	2,214.12±14.33	2,036.23±11.42	1,936.00±17.54
Linoleic acid (C18:2n6c)	1,689.93±7.02	972.84±6.71	915.27±3.00	746.70±2.46
Alpha Unolenic Acid (ALA) (C18:3n3)	1,435.55±8.90	927.32±2.14	884.52±2.32	615.41±7.27
Arachidic acid (C20:0)	151.38±3.90	82.84±3.61	81.37±1.17	81.81±1.67
Arachidonic acid (C20:4n6)	166.68±15.49	109.64±1.65	127.34±1.19	154.55±4.43
Eicosapentaenoic acid (EPA) (C20:5n3)	318.04±6.93	194.96±2.31	190.38±2.54	223.76±4.50
Docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6n3)	112.74±9.15	78.65±1.89	82.38±1.26	92.37±6.95

กรดไขมันเป็นสิ่งสำคัญที่มีบทบาทในการเติบโตและการพัฒนาของตัวอ่อนครัสเตเชียน เมื่อกรดไขมันมีปริมาณต่ำหรือไม่เพียงพอต่อความต้องการของตัวอ่อนครัสเตเชียน จะส่งผลให้ตัวอ่อนมีปัญหาในการเติบโต การรอดชีวิต การต้านทานโรค และทำให้ระยะเวลาการพัฒนาก่อนครัสเตเชียนนานกว่าปกติ (Mourete and Rodríguez 1997, Takeuchi et al. 1999a-c, D'Souza and Kelly, 2000) กรดไขมัน Palmitic acid (C16:0) และ Oleic acid (C18:1n9c) ถูกพบเป็นแหล่งกรดไขมันสำคัญที่สะสมที่ตับอ่อนและรังไข่ของปูทะเลเทศเมีย (*Scylla paramamosain*) (Tantikitti, et al. 2015) ส่วนกรดไขมัน Eicosapentaenoic acid (C20:5n3) และ Docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6n3) มีความสำคัญต่อการเติบโตของตัวอ่อนปูและครัสเตเชียนต่างๆ (Jones et al. 1997, Sulkin and McKeen 1999) จึงพบการสะสมของกรดไขมันเหล่านี้ในรังไข่ของครัสเตเชียนกลุ่มต่างๆ (Teshima and Kanazawa 1983, Jeckel et al. 1989 a, b, Tantikitti, et al. 2015) กรดไขมันเป็นองค์ประกอบสำคัญของฟอสโฟไลปิด (phospholipids) ซึ่งมีความสำคัญคือเป็นองค์ประกอบเนื้อเยื่อเซลล์ (cell membranes) และมีบทบาทในการเคลื่อนย้ายไลปิดร่วมกับโปรตีน (high-density lipoproteins) และยังช่วยเคลื่อนย้ายคอเลสเตอรอล (cholesterol) จากตับอ่อน (hepatopancreas) เข้าสู่เลือด (Anger, 2001) ดังนั้นการพบกรดไขมันในคัพภะ

ช่วงต่างๆ ของปูแสม จึงเป็นยืนยันการส่งผ่านกรดไขมันในแม่พันธุ์สู่ตัวอ่อนปูแสมชนิดนี้ และเป็นพลังงานสำหรับตัวอ่อน ซึ่งเป็นการลงทุนในการสืบพันธุ์ (reproductive investment) ของปูเพศเมีย

### สรุปผลการวิจัย

#### 1. พัฒนาการของคัพภะปูแสม *E. versicolor*

จากการศึกษาคัพภะ (embryonic) ของปูแสม *E. versicolor* สามารถแบ่งการพัฒนาเป็น 8 ช่วง (period) ดังนี้

ช่วงที่ 1 (Period 1) พบรูปร่างของไข่มีลักษณะกลม ไข่มีสีเข้มทึบแสงหรือสีน้ำตาลอมดำ และภายในไข่มีไข่แดง (yolk) อยู่เต็ม แต่ยังไม่พบการแบ่งเซลล์ของไข่ในระยะนี้

ช่วงที่ 2 (Period 2) พบไข่มีสีเหลือง และมีลักษณะใสสว่าง ไม่ทึบเหมือนกับไข่ในระยะ period 1 ภายในไข่พบมีการแบ่งของไข่แดง (yolk) เป็นหยดไขมัน (yolk droplets) ขนาดเล็กเต็มทั้งใบ ระยะนี้ยังไม่สามารถจำแนกลักษณะของคัพภะเมื่อมองทางด้านข้าง (lateral view) นอกจากนี้พบ primordial cells เริ่มพัฒนาที่บริเวณด้านล่างของไข่

ช่วงที่ 3 (Period 3) พบไข่มีสีสว่างขึ้น ภายในไข่พบไข่แดงมีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำ และมีการแบ่งของไข่แดง (yolk) เป็นหยดไขมัน (yolk droplets) มีขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ชัด และเมื่อมองจากด้านข้าง พบแอ่งสีใส อยู่ทางด้านล่างของไข่ คิดเป็นปริมาตรประมาณ 1/5 ของปริมาตรไข่ ส่วนของ primordial cells พัฒนาเป็นโครงสร้างคัพภะที่สำคัญ คือ optic lobe, antennule, antenna, mandible และ thoracic-abdominal bud ซึ่งทั้งหมดพบอยู่ด้านล่างของไข่

ช่วงที่ 4 (Period 4) พบส่วนของคัพภะมีอัตราส่วนประมาณ 1/3 เมื่อเทียบกับพื้นที่ของไข่ อวัยวะสำคัญของคัพภะที่มีการเจริญเติบโตและสามารถสังเกตเห็นได้ชัด คือ optic lobe, antennule, antenna, mandible, maxilla-maxillule rudiment และ thoracic-abdominal process บริเวณ optic lobe ไม่พบ pigmented optic lobe และบริเวณ thoracic-abdominal process มีการเจริญเติบโต มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับช่วงเวลาที่ผ่านมา แต่ยังไม่แบ่งข้อปล้อง

ช่วงที่ 5 (Period 5) สีไข่มีสีดำและเหลือง ส่วนของไข่แดง (Yolk) มีอัตราส่วนประมาณ 1/2 เมื่อเทียบกับปริมาตรของไข่ ส่วน optic lobe เห็นได้ชัดเจนและมีลักษณะกลมรี และที่บริเวณตอนกลางของ optic lobe มี pigmented optic lobe ส่วนของ antennule, antenna, mandible, maxilla-maxillule rudiment และ thoracic-abdominal process มีการเจริญเติบโตและมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วน Cephalothorax และ abdomen แยกออกจากกัน การแบ่งเป็นข้อปล้องที่บริเวณ abdomen ยังไม่ชัดเจน นอกจากนี้สามารถมองเห็น chromatophores ที่บริเวณ abdomen

ช่วงที่ 6 (Period 6) สีไข่มีสีน้ำตาลดำและเหลือง ส่วนของไข่แดง (Yolk) ถูกนำไปใช้ในการพัฒนาของคัพภะและมีอัตราส่วนประมาณ 1/3-1/4 เมื่อเทียบกับปริมาตรของไข่ ส่วนคัพภะ (embryonic) มีอัตราส่วนประมาณ 1/2 เมื่อเทียบกับปริมาตรของไข่ บริเวณ optic lobe ขยายใหญ่ และมี pigmented optic lobe ที่เข้มเห็นได้ชัดเจน หัวใจใหญ่มีขนาดใหญ่สามารถสังเกตเห็นได้ง่ายและมีการเด่นของหัวใจชัดเจน บริเวณ abdomen มีขนาดใหญ่ มีการแบ่งเป็นปล้องเกือบสมบูรณ์ โค้งพับไปยังส่วน optic lobe และมี chromatophores ในแต่ละปล้องที่เชื่อมต่อกัน

ช่วงที่ 7 (Period 7) สีไข่มีสีใส คัพภะ (embryonic) พบคลุมพื้นที่เกือบทั้งหมดของไข่ จากมุมมองจากด้านข้างพบส่วนคัพภะ (embryonic) มีอัตราส่วนประมาณ 2/3 เมื่อเทียบกับปริมาตรของไข่ ส่วน

หยดไขมัน (yolk droplets) ของไข่แดง (yolk) อยู่บริเวณด้านบนของ cephalothorax บริเวณ optic lobe ขยายใหญ่ครอบคลุมพื้นที่คิดเป็นอัตราส่วน 1/6- 1/8 ของไข่เมื่อมองทางด้านข้าง และมี pigmented optic lobe ที่เข้มเป็นดำ การเต้นของหัวใจถี่ขึ้นและสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน บริเวณ abdomen แบ่งเป็น 6 ปล้องอย่างสมบูรณ์ บริเวณปลาย maxillipeds และ Telson มี setae

ช่วงที่ 8 (Period 8) สีไข่มีสีใส สัดส่วนของคัพภะ (embryonic) พบเกือบเต็มพื้นที่ทั้งหมดของไข่ พบหยดไขมัน (yolk droplets) ของไข่แดง (yolk) เพียงเล็กน้อยที่บริเวณด้านบนของ cephalothorax คิดเป็นอัตราส่วน 1/8 ของปริมาตรไข่ บริเวณ optic lobe ขยายใหญ่ และพัฒนาสมบูรณ์ ส่วน abdomen และ maxillipeds พัฒนาและแบ่งเป็นปล้องอย่างสมบูรณ์ และ กำลังใกล้ฟักเป็นตัวอ่อนระยะ Zoea 1

ขนาดและปริมาตรของไข่ปูแสม *E. versicolor* จากการศึกษาขนาดและปริมาตรของไข่ปูแสม พบขนาดและปริมาตรของไข่เพิ่มขึ้นตามพัฒนาการของคัพภะ โดยเฉพาะคัพภะช่วงที่มีการพัฒนาก่อนฟักเป็นตัวอ่อนระยะ Zoea มีการเพิ่มของขนาดและปริมาตรไข่แตกต่างกับช่วงแรกเริ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

2. สำหรับการศึกษาด้านชีววิทยา พบระยะพัฒนาการของคัพภะวิทยาของปูแสม *E. versicolor* สามารถสรุปเป็น 3 ระยะ คือ 1. การเจริญระยะต้น (early development) หรือ (cleavage blastula and gastrula) 2. ระยะต้นของการเจริญของอวัยวะ (early organogenesis) หรือ (post-gastrula) และ 3. ระยะปลายของการเจริญของอวัยวะ (late organogenesis)

3. องค์ประกอบทางเคมีของคัพภะ จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของคัพภะของปูแสมชนิดนี้ พบกรดไขมัน (Fatty Acid) เช่น Palmitic acid (C16:0), Palmitoleic acid (C16:1), Linoleic acid (C18:2n6c), Oleic acid (C18:1n9c), Arachidonic acid (C20:4n6), Eicosapentaenoic acid (C20:5n3) และ Docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6n3) เป็นต้น และเป็นกรดไขมันกลุ่มเดียวกันที่พบในรังไข่ (Ovary) ของปูแสมชนิดนี้ จึงเป็นยืนยันการส่งผ่านกรดไขมันในแม่พันธุ์สู่ตัวอ่อนปูแสมชนิดนี้ เพื่อเป็นพลังงานสำหรับตัวอ่อน

## เอกสารอ้างอิง

- ด่านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดตราด. กรมประมง. 2559. สรุปข้อมูลการนำเข้า - ส่งออกสินค้าสัตว์น้ำ ชากสัตว์น้ำใน แต่ละปีงบประมาณ. ด่านตรวจสัตว์น้ำจังหวัดตราด. กรมประมง. เว็บไซต์: <http://tdprovince.fishquarantine.org/%E0%B8%82%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B8%A1%E0%B8%B9%E0%B8%A5%E0%B8%99%E0%B8%B3%E0%B9%80%E0%B8%82%E0%B9%89%E0%B8%B2%20%E0%B8%AA%E0%B9%88%E0%B8%87%E0%B8%AD%E0%B8%AD%E0%B8%81.html> (เข้าถึงเมื่อ 8 สิงหาคม 2559)
- ชลี ไพบุลย์กิจกุล เกรียงไกร แพทย์ประดิษฐ์ และ เบ็ญจมาศ ไพบุลย์กิจกุล. 2558. การวัดการเจริญเติบโตของ กุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* ด้วยภาพถ่าย แก่นเกษตร 43 (1): 536-541.
- ชาญยุทธ สุดทองคง และ วัฒนา วัฒนกุล. 2563. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูแสม *Episesarma singaporense* บริเวณป่าชายเลน จังหวัดตรัง. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 37 หน้า
- บรรจง เทียนสงฆ์รัตน์. 2552. ปูแสม...กำลังวิกฤติ ร่วมคิดร่วมเลี้ยงปู ดูแลป่า แก้ปัญหา พัฒนาป่าชุมชน. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) กรุงเทพฯ. 104 หน้า
- Anger, K. 2001. The Biology of Decapod Crustacean Larvae, Crustacean Issues 14, A.A. Balkema, The Netherlands: 419 pp.
- Brante, A., Fernández, M., Eckerle, L., Mark, F., Poirtner, H.-O., Arntz, W. 2003. Reproductive investment in the crab *Cancer setosus* along a latitudinal line: egg production, embryo losses and embryo ventilation. Mar. Ecol. Prog. Ser. 251: 221–232.
- Chatain, B., Debas, L. and Bourdillon, A., 1996. A photographic larval fish counting technique: comparison with other methods, statistical appraisal of the procedure and practical use. Aquaculture 141: 83 - 96.
- César, Il., Arnedariz, L.C. and Becerra, R.V. 2007. Fecundity of *Uca uruguayensis* and *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura) from the “Refugio de Vida Silvestre” Bahía Samborombón. Argentina. Braz. J. Biol., 67(4): 749-753
- Costa, M.T., Janeiro Silva, S.M. and Negreiros-Fransozo, M.L. 2006. Reproductive pattern comparison of *Uca thayeri* Rathbun, 1900 and *U. uruguayensis* Nobili, 1901 (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae). Brasil. Arq. Biol. Technol., vol. 49, no. 1, p. 117-123.
- Figueiredo, J., Penha-Lopes, G., Anto, J., Narciso, L., and Lin, J. 2008. Fecundity, brood loss and egg development through embryogenesis of *Armases cinereum* (Decapoda: Grapsidae). Marine Biology. 154: 287–294.
- Garcia-Guerrero, M. and Hendrickx, M.E. 2004. Embryology of decapod crustaceans I: Embryonic development of the mangrove crabs *Goniopsis pulchra* and *Aratus pisonii* (Decapoda: Brachyura). Journal of crustacean biology. 24(4): 666-672 p.

- Garcia-Guerrero, M. and Hendrickx, M.E. 2006. Embryology of decapod crustaceans, III: Embryonic development of *Eurypanopeus canalensis* Abele & Kim, 1989, and *Panopeus chiensis* H. Milne Edwards & Lucas, 1844 (Decapoda, Brachyura, Panopeidae). *Belgian Journal of Zoology*. 136(2): 249-253 p.
- Herring, P.J. 1974. Size, density and lipid content of some decapod eggs. *Deep Sea Research* 21: 91-94.
- Ikhwanuddin, M., Azra, M.N., Siti-Aimuni, H. and Abol-Munafi, A.B., 2012. Fecundity, embryonic and ovarian development of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) in coastal water of Johor, Malaysia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15(15): 720-728.
- Jeckel, W.H., Aizpun de Moreno, J.E., and Moreno, V.J. 1989a. Biochemical composition, lipid classes and fatty acids in the male reproductive system of the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. *Comparative Biochemistry and Physiology* 93B: 807-811.
- Jones, D.A., Yule, A.B., and Holland, D.L. 1997. Larval nutrition. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M. (eds), *Advances in World Aquaculture 6; Crustacean Nutrition*: 353-389.
- John Samuel, N. 2003. Fishery potential of commercially important crab along parangipettai coast. PhD Thesis, Annamalai University, India
- Lara, L.R. and Wehrtmann I.S. 2009. Reproductive biology of the freshwater shrimp *Macrobrachium carcinus* (L) (Decapoda: Palaemonidae) from Costa Rica, Central America. *Journal of Crustacean Biology*. 29: 343-349
- Lemos, D., and Rodriguez, A. 1998. Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. *Aquaculture* 160: 103-116.
- Luppi, T.A. Bas, C.C., Spivak, E.D. and Anger, K. 1998. Fecundity of two grapsid crab species in the Laguna Mar Chiquita. *Archive of Fishery and Marine Research*. 45(2): 149-166.
- Mantelatto, F.L. and Fransozo, A. 1997. Fecundity of the crab *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Decapoda, Brachyura, Portunidae) from the Ubatuba region, São Paulo, Brazil. *Crustaceana* 70 (2): 214-226.
- Martelli, A., Tapella, F., González-Pisani, X., Fernando Dellatorre, F., and Barón, P.J. 2016. Embryonic development of the southern surf crab *Ovalipes trimaculatus* (Decapoda: Brachyura: Portunoidea) *Scientia Marina* 80(4); 499-509.
- Mourente, G. and Rodriguez, A. 1997. Effects of salinity and dietary DHA (22:6n-3) content on lipid composition and performance of *Penaeus kerathurus* postlarvae. *Marine Biology* 128: 289-298.
- Muller, Y. Naxari, M. and Simoes E. 2003. Costa Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium offersii* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*. 32: 869-875.

- Naz, M. 2008. The changes in the biochemical compositions and enzymatic activities of rotifer (*Brachionus plicatilis*, Muller) and *Artemia* during the enrichment and starvation periods. *Fish physiology Biochemistry* 34: 391–404.
- Oniam, V., Chuchit, L. and Arkronrat, W. 2012. Reproductive performance and larval quality of blue swimming crab (*Portunus pelagicus*) broodstock, fed with different feeds. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 34 (4), 381-386.
- Pardo, J.C.F., and Costa, T.M. 2021. Multiple-stressor effects of warming and acidification on the embryonic development of an estuarine fiddler crab. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 254 (107296); 1-9.
- Phnheiro, M.A.A. and Hattori, G.Y. 2003. Embryology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyuran: Ocypodidae). *Journal of crustacean biology*. 23: 729-737.
- Quinitio, E.T. and Parado-Estepa, F.D. 2003. Biology and hatchery of mud crabs *Scylla* spp. Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Rajkumar, M., Sivakumar, J., Venu, S. and Bhuvanewari, S. 2023.  $\beta$ -Carotene Analysis and Histological Investigation on Different Egg Stages of Anomuran Crab, *Emerita Asiatica* (H. Milne Edwards, 1837). *Asian Journal of Science and Applied Technology*. 12: 1-11.
- Rasheed, R and Mustaquim, J. 2010. Size at sexual maturity, breeding season and fecundity of three-spot swimming crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst, 1783) (Decapoda, Brachyura, Portunidae) occurring in the coastal waters of Karachi. *Pakis. Fish. Res.* 103: 56–62.
- Sant'anna, B.S., Borges, R.P., Hattori, G.Y., and Pinheiro, M.A. 2014. Reproduction and management of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) at Iguape, São Paulo, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 86(3):63-73.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7): 671-675.
- Senarat, S., Biaklai, S., Kettratad, J., Jitpraphai, S. M., Wongkamhaeng, K., Sukparangsi, W.,... & Thongboon, L. (2018). Field evidence of the gametogenic maturation and embryonic development of the sand crab, *Emerita taiwanesis*: Implications for the understanding of the basis of the reproductive biology. *EurAsian Journal of BioSciences*, 12: 253-262
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J., 1995. *Biometry; The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Freeman, New York, NY. 887 pp.
- Stevens, B. G. 2006. Embryonic development and morphometry in the blue king crab, *Paralithodes platypus*, studied by image and cluster analysis. *Journal of Shellfish Research* 25 (2); 569–576.



- Stewart, M.J., Soonklang, N., Stewart, P., Hanna, P., Wanichanon, C., Parratt, A., Duan, W., and Sobhon, P. 2007. Histological studies of the ovaries of two tropical portunid crabs, *Portunus pelagicus* (L.) and *Scylla serrata* (F.). *Invertebrate Reproduction and Development*, 50(2): 85–97.
- Sulkin, S.D. and McKeen, G.L. 1999. The significance of feeding history on the value of heterotrophic microzooplankton as prey for larval crabs. *Marine Ecology Progress Series* 186: 219-225.
- Takeuchi, T., Nakamoto, Y., Hamasaki, K., Sekiya, S., and Watanabe, T. 1999a. Requirement of n-3 highly unsaturated fatty acids for larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 65 (5): 797-803.
- Takeuchi, T., Satoh, N., Sekiya, S., Shimizu, T., and Watanabe, T. 1999b. Influence of the different feeding schedule of food organisms for larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 65 (5): 804-809.
- Takeuchi, T., Satoh, N., Sekiya, S., Shimizu, T., and Watanabe, T. 1999c. The effect of dietary EPA and DHA on the molting rate of larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 65 (6): 998-1004.
- Teshima, S. and Kanazawa, A. 1983. Variation in lipid compositions during the ovarian maturation of the prawn. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 49: 957-962.
- Tantikitti, C., Kaonoona, R., and Pongmaneerat, 2015. Fatty acid profiles and carotenoids accumulation in hepatopancreas and ovary of wild female mud crab (*Scylla paramamosain*, Estampador, 1949). *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 37 (6): 609-616.
- Webb, J.B., Slater, L.M., Eckert, G.L., and Kruse, G.H. 2016. The contribution of fecundity and embryo quality to reproductive potential of eastern Bering Sea snow crab (*Chionoecetes opilio*) *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 73: 1–15.