



รายงานผลงานดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

สัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของปรสิตบางชนิด
Morphology and molecular data of some parasites

รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคลกุล

นางสาวกนกวรรณ อรุณฤกษ์ดีวงศ์

นายฉัฐกรณ์ รัชชี

นางสาวชนมณีภา ว่องวีรวัฒนกุล

นายชวณัฐ สัตยเสวนา

นายวิรัตน์ ศิวยไพราหมณ์

นางสาววิรัชฐา ลิ้มยังเจริญ

นายศิริศักดิ์ วงศ์ภักดี

นายอภิวัฒน์ มุสนางเดี่ยว

นางสาวอัญญาพร สุขนธพันธ์

อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

สัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของปรสิตบางชนิด
Morphology and molecular data of some parasites

รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคลกุล
นางสาวกนกวรรณ อรุณฤกษ์ตีวงศ์
นายฉัฐกรณ์ รังษี
นางสาวชนมณีภา ว่องวีรวัฒนกุล
นายชวณัฐ สัตยเสวนา
นายวรรตต์ ศิวยายพราหมณ์
นางสาววิรัชฐา ลิ้มยังเจริญ
นายศิริศักดิ์ วงศ์ภักดี
นายอภิวัฒน์ มุลนางเดียว
นางสาวอัญญาพร สุคนธ์พันธ์
อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี่

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และวิทยากรและเจ้าหน้าที่จากกองการเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

จากการสำรวจระยะเชอร์คาเรียของพยาธิตัวแบนในหอยน้ำจืด 5 ชนิด ที่เก็บจากแหล่งน้ำจืด 3 แห่งในพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี จำนวนทั้งหมด 247 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการทุบหอยและตรวจดูตัวอย่างสด พบเชอร์คาเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันจำนวน 2 สปีชีส์ ได้แก่ เชอร์คาเรียหาง 2 แฉก และ เชอร์คาเรียหาง 1 แฉก จากหอยเจดีย์ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรวม 3.64% เมื่อนำเชอร์คาเรียที่แยกได้จากหอยที่ติดเชื้อทั้ง 9 ตัว มาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มจำนวนรวมทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,900–3,300 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยการ BLAST และการเรียงเปรียบเทียบลำดับ พบว่า เชอร์คาเรียที่ตรวจพบสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ (1) เชอร์คาเรีย 5 ตัว มีความใกล้เคียงกับหนอนตัวแบนในวงศ์ *Transversotrematidae*; (2) เชอร์คาเรีย 1 ตัว น่าจะอยู่ในวงศ์ *Lecithodendriidae*; และ (3) เชอร์คาเรีย 3 ตัว เป็นสมาชิกของพยาธิตัวแบนในสกุล *Centrocestus*

คำสำคัญ: เชอร์คาเรีย, หนอนตัวแบน, พยาธิตัวแบน, เมตาเชอร์คาเรีย, เทคนิคทางชีวโมเลกุล, หอย

Abstract

A total of 247 samples from five species of freshwater snails collected from three sampling sites at Khao Wang Khamen, Kanchanaburi Province were examined for the presence of trematode cercariae. Using crushing method and lived microscopic observation, nine thiarid snails were found to carry two morphotypes of cercariae: furcocercous and one-tailed cercariae, giving the overall cercaria infection rate of 3.64%. Genomic DNA was extracted from cercariae individually isolated from the nine infected mollusks. Amplification and nucleotide sequencing of ribosomal DNA, giving the amplicons of about 2,900–3,300 bp, were conducted. Using BLAST search tool and sequence alignment analysis, the examined cercariae were divided into three groups: (1) five cercariae relating to transversotrematid flatworm; (2) one belonging to lecithodendriid fluke; and (3) three assigning to *Centrocestus* trematode.

Keywords: cercaria, flatworm, fluke, metacercaria, molecular technique, mollusk

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ.....	1
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
การศึกษาเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดระดับสัณฐานวิทยา.....	4
การศึกษาเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดระดับชีวโมเลกุล.....	4
ผลการศึกษา	7
การปฏิบัติงานในภาคสนาม.....	7
การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ.....	10
การศึกษาผลและวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยา.....	11
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	27
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาและหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	5
ตารางที่ 2 จำนวนปรสิตและเปอร์เซ็นต์เซอร์คาเรียที่ตรวจพบในหอยที่เก็บจากพื้นที่บ่อห้วยไทรโยค.....	8
ตารางที่ 3 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ปรสิตที่ตรวจพบในหอยและปูที่เก็บจากพื้นที่บ่อน้ำตื้นพ.....	9
ตารางที่ 4 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ปรสิตที่ตรวจพบในหอยที่เก็บจากพื้นที่สถานีประมง	9

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 พื้นที่เก็บตัวอย่างหอยน้ำจืด.....	7
ภาพที่ 2 ตัวอย่างหอยน้ำจืดที่พบ.....	8
ภาพที่ 3 ตัวอย่างเซอร์คาเรียหาง 2 แฉก ที่พบในตัวอย่างหอยเจดีย์.....	10
ภาพที่ 4 แฉบดีเอ็นเอแสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส.....	11
ภาพที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 กับฐานข้อมูล.....	16
ภาพที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 กับหอนต้นฉบับบนสกุลใกล้เคียง โดยพิจารณาตำแหน่ง deletion.....	17
ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 กับฐานข้อมูล.....	18
ภาพที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 กับหอนต้นฉบับบนสกุลใกล้เคียง โดยพิจารณาตำแหน่ง insertion.....	19
ภาพที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 กับหอนต้นฉบับบนสกุลใกล้เคียง โดยพิจารณาตำแหน่ง deletion.....	19
ภาพที่ 10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 กับฐานข้อมูล.....	23
ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 กับหอนต้นฉบับบนสกุลใกล้เคียง โดยพิจารณาตำแหน่ง deletion และตำแหน่งที่มีเบสร่วมกัน.....	24

สัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของปรสิตบางชนิด Morphology and molecular data of some parasites

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, กนกวรรณ อรุณฤกษ์ดีวงศ์, ฉัฐกรณ รั้งซี, ชนม์นิภา ว่องวีรวัฒน์กุล,
ชวณัฐ สัตยเสวนา, วรต์ถ์ ศิวยาพรพราหมณ์, วริษฐา ลิ้มยังเจริญ, ศิริศักดิ์ วงศ์ภักดี,
อภิวัฒน์ มุลนางเดี่ยว, อัญญาพร สุคนธ์พันธ์ และ ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan,
Bangkok, 10330

บทนำ

ในปัจจุบันนักวิจัยได้ตระหนักและเห็นความสำคัญในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับบทบาทของปรสิตในระบบนิเวศมากขึ้น เพราะว่าปรสิตมีผลกระทบต่อจำนวนประชากรและสังคมของสิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้าน รวมทั้งมีผลกระทบต่อสุขภาพ อนามัย และความเป็นอยู่ของมนุษย์ ในงานวิจัยทางการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม นักวิจัยพยายามที่จะพัฒนาวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตแบบภาวะปรสิตเพื่อเป็นดัชนีประเมินสถานภาพของระบบนิเวศ โดยปรสิตอาจเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างสังคมสิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้าน สภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรมอาจมีปรสิตเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของปรสิตที่ศึกษา ในบางกรณีปรสิตที่มีความหลากหลายของชนิดและมีเป็นจำนวนมากอาจแสดงถึงสถานภาพของระบบนิเวศที่อุดมสมบูรณ์ โดยสะท้อนให้เห็นว่าระบบนิเวศดังกล่าวมีความหลากหลายของชนิดและจำนวนของเจ้าบ้านสูงด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอยู่ร่วมกันและมีความเกี่ยวข้องกันในแง่ของสายใยและห่วงโซ่อาหาร

การศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตแบบปรสิตกับเจ้าบ้าน ซึ่งมีวิวัฒนาการร่วมกันมาช้านาน มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาพื้นฐานด้านชีววิทยา ได้แก่ อนุกรมวิธาน พันธุศาสตร์ นิเวศวิทยา ชีวเคมีติกส์ (systematics) และ ไฟโลเจเนติกส์ (phylogenetics) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่เกี่ยวข้อง มิฉะนั้นแล้วก็ไม่อาจจะเข้าใจในปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องกันอย่างซับซ้อนเหล่านี้ได้ ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ การเกษตร และการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซอร์คาเรียในหอยน้ำจืด

พยาธิใบไม้เป็นหนอนพยาธิที่ก่อโรคในสัตว์หลายชนิด โดยวงจรชีวิตของพยาธิเหล่านี้ต้องการโฮสต์กึ่งกลาง 1 ถึง 2 ชนิด โฮสต์กึ่งกลางที่ 1 คือ พวกรวมหอยน้ำจืดชนิดต่างๆ ตามแต่ชนิดของพยาธิใบไม้ โดยในหอยน้ำจืดจะพบตัวอ่อนระยะต่างๆ ได้แก่ สปอร์โรซีสต์ เรเดีย เซอร์คาเรีย ตามลำดับ เมื่อเซอร์คาเรียเจริญเต็มที่ก็จะออกจากหอยน้ำจืด หากเป็นพยาธิใบไม้ในเลือดเซอร์คาเรียจะไชเข้าสู่โฮสต์สุดท้าย สำหรับพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ เซอร์คาเรียจะไชเข้าไปอยู่ในโฮสต์กึ่งกลางที่ 2 ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด เช่น ปลาน้ำจืด กุ้ง หรือเกาะอยู่บนพืชน้ำ เป็นต้น แล้วเจริญไปเป็นเมตาเซอร์คาเรียซึ่งเป็นระยะติดต่อ เมื่อคน

หรือสัตว์มีกระดูกสันหลังที่เป็นโฮสต์สุดท้ายได้กินอาหารที่ปนเปื้อนเมตาเซอร์คาเรียนี้เข้าไป เมตาเซอร์คาเรียจะเจริญเป็นตัวเต็มวัยและเพิ่มจำนวนอยู่ภายในอวัยวะต่างๆ ในร่างกายของโฮสต์ตามแต่ละชนิด และขับถ่ายระยะไข่ปนเปื้อนออกมากับอุจจาระลงไปในแหล่งน้ำ (Schmidt and Roberts, 2010)

จากการศึกษาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยน้ำจืดในบางบริเวณ ได้แก่ พื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวในปี 2545 ตรวจหาเซอร์คาเรียโดยวิธีทูปเปลือกหอย ศึกษาสัณฐานวิทยาของเซอร์คาเรียจากตัวอย่างสดและย้อมสี พบการติดเชื้อเซอร์คาเรียในหอยขม (*Filopaludina martensi*) และหอยเจดีย์ (*Melanoides tuberculata*) โดยพบเซอร์คาเรียในกลุ่ม Xiphidiocercariae (เปรมกมล ทองคำอ่วม, 2545) และการศึกษาความชุกและสัณฐานวิทยาของเซอร์คาเรียที่พบในหอยน้ำจืดในพื้นที่เดียวกันในปี 2555-2556 โดยเก็บตัวอย่างหอยรวมทั้งสิ้น 1,446 ตัว จำแนกเป็น 7 ชนิด ได้แก่ หอยขม (*Filopaludina martensi*), หอยคันชนิดที่ 1 (*Lymnaea rubiginosa*), หอยคันชนิดที่ 2 (*Lymnaea* sp.), หอยคันชนิดที่ 3 (*Indoplanorbis exustus*), หอยเจดีย์ (*Melanoides tuberculata* และ *Clea helena*) และ หอยเซอริ (*Pomacea canaliculata*) ตรวจหาเซอร์คาเรียโดยวิธีทูปเปลือกหอย ศึกษาสัณฐานวิทยาของเซอร์คาเรียจากตัวอย่างสด ย้อมสี และด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า ความชุกของการติดเซอร์คาเรียรวมมีค่าเท่ากับ 1.31% และสามารถจำแนกกลุ่มเซอร์คาเรียได้เป็น 4 กลุ่ม 6 แบบ ได้แก่ กลุ่ม furcocercous cercariae (Fc.type1 และ Fc.type2) และกลุ่ม gymnocephalous cercaria of pleurolophocercous type (Gc.) พบในหอยคันชนิดที่ 1 (*Lymnaea rubiginosa*) กลุ่ม pleurolophocercous cercariae (Pc.) พบในหอยเจดีย์ และกลุ่ม xiphidiocercariae (Xc.type1 และ Xc.type2) พบในหอยขม (*Filopaludina martensi*) (วิภาวี ปวราจารย์, กรภัทร แก้วเนิน และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล, 2556)

Krailas และคณะ (2014) ศึกษาตัวอ่อนหนอนพยาธิใบไม้ที่พบในหอยเจดีย์ (*Melanoides tuberculata*) ในพื้นที่ต่างๆ 120 แห่งในประเทศไทย ระหว่างปี ค.ศ. 2004 ถึง 2009 พบว่ามีความชุกของการติดปรสิตในหอย 18.79% (หอยที่ติดปรสิตมี 6,019 ตัว จากหอยที่ตรวจทั้งสิ้น 32,026 ตัว) พบเซอร์คาเรียจำแนกเป็น 9 แบบ 18 ชนิด ได้แก่ (1) Parapleurophocercous cercariae: *Haplorchis pumilio*, *Haplorchis taichui* และ *Stictodora tridactyla*; (2) Pleurophocercous cercariae: *Centrocestus formosanus*; (3) Xiphidiocercariae: *Acanthatrium hitaense*, *Loxogenoides bicolor* และ *Haematoloechus similis*; (4) Megalurous cercariae: *Cloacitrema philippinum* และ *Philophthalmus* sp.; (5) Furcocercous cercariae: *Cardicola alseae*, *Alaria mustelae*, *Transversotrema laruei*, *Apatemon gracilis* และ *Mesostephanus appendiculatus*; (6) Echinostome cercariae: *Echinochasmus pelecani*; (7) Amphistome cercariae: *Gastrothylax crumenifer*; (8) Rencolid cercariae: *Cercariacaribbea* LXVIII; และ (9) Cotylomicrocercous cercariae: *Podocotyle (Podocotyle) lepomis*

ในพื้นที่บริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี เป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติ สภาพพื้นที่ทั้งบริเวณที่เป็นป่า ภูเขา แหล่งน้ำจืด และเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่านานาชนิด สัตว์ป่าที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้อาจขับถ่ายอุจจาระที่มีระยะไข่ปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำได้ ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะพบหอยน้ำจืดที่มีตัวอ่อนของพยาธิใบไม้อาศัยอยู่ การศึกษาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยน้ำจืดจึงมีความสำคัญต่อการศึกษาทางนิเวศวิทยาและการประเมินความสมบูรณ์ของสัตว์ในพื้นที่นั้นๆ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของปรสิตเซอร์คาเรียที่พบในหอยน้ำจืด บริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

บทบาทของปรสิตในระบบนิเวศมีผลกระทบต่อจำนวนประชากรและสังคมของสิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้าน รวมทั้งมีผลกระทบต่อสุขภาพ อนามัย และความเป็นอยู่ของมนุษย์ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตแบบภาวะปรสิตสามารถใช้เป็นดัชนีประเมินสถานภาพของระบบนิเวศ โดยปรสิตอาจเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างสังคมสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน สภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรมอาจมีการติดปรสิตเพิ่มขึ้นหรือลดลงขึ้นกับชนิดของปรสิต ในบางกรณีปรสิตที่มีความหลากหลายของชนิดและมีเป็นจำนวนมากอาจแสดงถึงสถานภาพของระบบนิเวศที่อุดมสมบูรณ์ โดยสะท้อนให้เห็นว่าระบบนิเวศดังกล่าวมีความหลากหลายของชนิดและจำนวนของเจ้าบ้านสูงด้วย การประเมินความหลากหลายทั้งในระดับสัณฐานวิทยาและในระดับชีวโมเลกุล สามารถใช้ในการบ่งบอกความหลากหลายทางชีวภาพและความหลากหลายทางพันธุกรรม ตลอดจนนำไปสู่ความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างปรสิตและเจ้าบ้านของปรสิตได้

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของปรสิตเซอร์คาเรียที่พบในหอยน้ำจืด ที่เก็บได้จากแหล่งน้ำบริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) เป็นเครื่องหมายทางชีวโมเลกุล

สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

ภาคสนาม: พื้นที่เก็บตัวอย่าง คือ แหล่งน้ำจืด 3 แหล่ง ในพื้นที่ อพ.สธ. บริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี ได้แก่

แหล่งที่ 1 บ่อห้วยไทรโยค ศูนย์การเรียนรู้ทุ่งสาม

แหล่งที่ 2 บ่อน้ำต้นพุ

แหล่งที่ 3 สถานีประมง กองการเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา (กกส.สทพ.นทพ.)

จากนั้นนำตัวอย่างกลับมาศึกษาต่อในระดับสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยาที่ห้องปฏิบัติการ

ภาคปฏิบัติการ: ห้องปฏิบัติการ Parasitology Laboratory และ Protistology Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดระดับสัณฐานวิทยา

1. เก็บตัวอย่างหอยในแหล่งน้ำจืด พื้นที่บริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี โดยทำการจับจำแนกชนิดโดยศึกษาจากรูปร่างและลักษณะของเปลือกตามเอกสาร Brandt (1974)
2. ตรวจสอบเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดด้วยวิธี crushing method โดยทำการทุบเปลือกหอยให้แตกแล้วคีบเนื้อหอยส่วนที่นิ่มวางลงบนสไลด์และกดทับเนื้อหอยให้แบนด้วยสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง นำสไลด์มาตรวจสอบเซอร์คาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
3. ศึกษาสัณฐานวิทยาของเซอร์คาเรียและทำการถ่ายภาพตัวอย่างสด โดยเซอร์คาเรียบางส่วนจะทำการรักษาสภาพด้วยเอธานอลความเข้มข้น 95% เพื่อนำมาใช้ศึกษาระดับชีวโมเลกุลต่อไปในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดระดับชีวโมเลกุล

1. ทำการแยกเซอร์คาเรียออกเป็นตัวๆ ด้วยปิเปตต์แก้ว แล้วนำตัวอย่างเซอร์คาเรียไปล้างในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิว์กขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัวอย่าง
2. ทำการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่าง โดยใช้ QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0 ดังนี้
 - 2.1 เติมน้ำยา QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0 ปริมาตร 20-40 ไมโครลิตรลงในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยการดูดสารขึ้นลงหรือเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นปั่นสารละลายทั้งหมดลงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
 - 2.2 นำหลอดตัวอย่างใส่ในเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 6 นาที
 - 2.3 จากนั้นนำหลอดตัวอย่างใส่ในเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98 °C เป็นเวลาอีก 2 นาที
 - 2.4 หลังจากครบเวลา นำหลอดตัวอย่างออกจากเครื่องให้ความร้อน เพื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป หรือ เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน
3. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) หรือพีซีอาร์ นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ในข้อ 2. ใช้เป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับนำไปเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ OneTaq® DNA Polymerase (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA, Cat. No. M0480) ไพรเมอร์ (primer) องค์กรประกอบ และสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

(1) DNA template	ปริมาณ	2	ไมโครลิตร
(2) 5X One Taq Standard Reaction Buffer	ปริมาณ	5	ไมโครลิตร
(3) One Taq Hot Start DNA Polymerase	ปริมาณ	0.125	ไมโครลิตร
(4) dNTP mix (10 mM each)	ปริมาณ	0.5	ไมโครลิตร
(5) Forward primer: RPF1 (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3')			
ความเข้มข้น 10 µM	ปริมาณ	0.5	ไมโครลิตร
(6) Reverse primer: 28S-59R Hel (5'-TCCTCCGCTTAVTKATATGCTTAA-3')			
ความเข้มข้น 10 µM	ปริมาณ	0.5	ไมโครลิตร
(7) Molecular grade water	ให้ได้ปริมาตรสุทธิเป็น	25	ไมโครลิตร

นำหลอดพีซีอาร์ที่เติมสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้
โปรแกรม NBHELV2:

40 รอบ	Heat	94 °C	เป็นเวลา	5	นาที	
	Denaturation step	94 °C	เป็นเวลา	30	วินาที	
		Annealing step	57 °C	เป็นเวลา	1	นาที
		Extension step	68 °C	เป็นเวลา	2:30	นาที
	Final extension step	68 °C	เป็นเวลา	10	นาที	
Hold step	25 °C	จนกว่าจะนำปฏิกิริยาออกจากเครื่อง				

โดยยีนและช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นมา คือ บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA: rDNA) ที่ประกอบด้วย ยีน 18S หรือสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (small subunit ribosomal DNA: SSU rDNA), ช่วงลำดับ ITS1 (internal transcribed spacer 1), ยีน 5.8S, ช่วงลำดับ ITS2 (internal transcribed spacer 2) และยีน 28S หรือลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (large subunit ribosomal DNA: LSU rDNA) ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์คู่นี้ประมาณ 2,900–3,300 คู่เบส (base pair: bp)

4. ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยการสกัด แยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 0.8% และสารละลายบัฟเฟอร์ทีเออี (Tris Acetate EDTA buffer: TAE) พร้อม molecular marker ชนิด 1 kb plus โดยตั้งค่าแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (EtBr) เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างสารละลาย EtBr ส่วนเกินออกจากเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลาอีก 10 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายใต้แสงยูวี พร้อมบันทึกภาพ

5. ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ของยีนที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสม (ตารางที่ 1) โดยใช้เทคนิค normal automatic sequencing ด้วยเครื่อง 3730XL DNA sequencer โดยส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

6. ทำการรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม BioEdit เวอร์ชัน 7.2.5 (Hall, 1999) จากนั้นตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information และทำการวิเคราะห์ลำดับด้วยโปรแกรม MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) เวอร์ชัน 6 (Tamura et al., 2013)

ตารางที่ 1 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของงานวิจัยครั้งนี้

ไพรเมอร์	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
SSU-RPF1	Forward	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
SSU-525F	Forward	5'-AAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'
SSU-525R	Reverse	5'-GGCTGCTGGCACCAGACTT-3'
SSU-607R	Reverse	5'-CAACTACGAGCTTTTTAACTGCA-3'
SSU-SR4	Reverse	5'-AAACCAACAAAATAGAA-3'

ไพรเมอร์ (ต่อ)	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
SSU-1379F	Forward	5'-ATAACAGGTCHGW RATGCCCT-3'
SSU-1385F	Forward	5'-GGTCTGTGATGCCCTTAGATG-3'
SSU-1580F	Forward	5'-CCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGT-3'
18S-R1513 Hypo	Reverse	5'-TGATCCTTCYGCAGGTTC-3'
SSU-1732F	Forward	5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3'
SSU-R4	Reverse	5'-GATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3'
ITS1	Forward	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
5-8SR EukF	Forward	5'-TCGATGAAGAACGCAGCG-3'
5-8SPlatF1	Forward	5'-CTGTGTGAATTAATGTGAACTGC-3'
5-8SPlatR1	Reverse	5'-GCAGTTCACATTAATTCACACAG-3'
28S-1FMR	Reverse	5'-ATATGCTTAARTTCAGCRGGT-3'
28S-59R Hel	Reverse	5'-TCCTCCGCTTAVTKATATGCTTAA-3'

ผลการศึกษา

การปฏิบัติงานในภาคสนาม

การปฏิบัติงานในภาคสนามเริ่มจากการเก็บตัวอย่างหอยน้ำจืดจากแหล่งน้ำ 3 บริเวณ (ภาพที่ 1) ได้แก่

บริเวณที่ 1 บ่อห้วยไทรโยค ศูนย์การเรียนรู้ทุ่งสาม

บริเวณที่ 2 บ่อน้ำต้นพุ

บริเวณที่ 3 สถานีประมง กองการเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา (กกส.สทพ.นทพ.)



ภาพที่ 1 พื้นที่เก็บตัวอย่างหอยน้ำจืดจากแหล่งน้ำ 3 บริเวณ ได้แก่ (บนซ้าย) บ่อห้วยไทรโยค ศูนย์การเรียนรู้ทุ่งสาม, (บนขวา) บ่อน้ำต้นพุ และ (ล่างซ้าย) สถานีประมง กกส.สทพ.นทพ.

จากนั้นนำตัวอย่างหอยไปล้างน้ำให้สะอาดจนไม่มีคราบดินโคลนเปื้อนอยู่ และจำแนกตัวอย่างที่เก็บได้ออกเป็นประเภทๆ ได้แก่ หอยเจดีย์, หอยจู้บหรือหอยขม, หอยสองฝา, หอยฝาเดียวแบบแบนชนิดเป็นก้นหอย, หอยฝาเดียว unknown A และปูนา (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ตัวอย่างหอยน้ำจืดที่พบจากทั้ง 3 บริเวณ ได้แก่ หอยฝาเดียวแบบแบนขดเป็นก้นหอย (ซ้ายบน), หอยเจดีย์ (ขวาบน), หอยสองฝา (กลาง), หอยจู้บหรือหอยขม (ซ้ายล่าง) และหอยฝาเดียว unknown A (ขวาล่าง)

ทำการตรวจหาเชอร์คาเรียในตัวอย่งหอยจำนวน 247 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจาก 3 พื้นที่ โดยใช้ค้อนทุบเปลือกหอยให้แตกออก แล้วใช้ปากคีบคีบเนื้อหอยส่วนที่นิ่มวางบนสไลด์ กดทับเนื้อหอยด้วยสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง จากนั้นจึงนำไปตรวจหาเชอร์คาเรียในเนื้อเยื่อของหอยน้ำจืดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และหาเปอร์เซ็นต์การพบปรสิต ดังนี้

พื้นที่ที่ 1 บ่อห้วยไทรโยค พิกัด Latitude: 14.338405 (14° 20' 18.26" N); Longitude: 98.941160 (98° 56' 28.18" E)

จากการศึกษาหอยจำนวน 5 ชนิด ที่เก็บได้จากพื้นที่นี้ คือ หอยเจดีย์, หอยขม, หอยสองฝา, หอยฝาเดียวแบบแบนขดเป็นก้นหอย และ หอยฝาเดียว (A) จำนวน 124 ตัวอย่าง ตรวจพบเชอร์คาเรียเฉพาะในหอยเจดีย์เป็นเชอร์คาเรียหาง 2 แฉก (furcocercous cercaria) จากหอยเจดีย์จำนวน 5 ตัว และเชอร์คาเรียหาง 1 แฉก จากหอยเจดีย์จำนวน 4 ตัว (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนปรสิตและเปอร์เซ็นต์เชอร์คาเรียที่ตรวจพบในหอยที่เก็บจากพื้นที่บ่อห้วยไทรโยค

ชนิด	จำนวนทั้งหมด (ตัว)	จำนวนตัวที่พบปรสิต (ตัว)	จำนวนตัวที่ไม่พบปรสิต (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ที่พบปรสิต (%)
หอยเจดีย์	100	9	91	9
หอยขม	4	-	4	0
หอยสองฝา	1	-	1	0
หอยฝาเดียวแบบแบนขดเป็นก้นหอย	2	-	2	0
หอยฝาเดียว (A)	17	-	17	0

พื้นที่ที่ 2 บ่อน้ำต้นพุ พิกัด Latitude: 14.382308 (14° 22' 56.31" N); Longitude: 98.936573 (98° 56' 11.66" E)

จากการศึกษาหอยจำนวน 1 ชนิด ที่เก็บได้จากพื้นที่นี้ คือ หอยขม จำนวน 59 ตัวอย่าง และ ปู จำนวน 1 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบเซอร์คาเรีย แต่พบปรสิตอาร์โทรพอดเฉพาะหอยขม 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ปรสิตที่ตรวจพบในหอยและปูที่เก็บจากพื้นที่บ่อน้ำต้นพุ

ชนิด	จำนวนทั้งหมด (ตัว)	จำนวนตัวที่พบปรสิต (ตัว)	จำนวนตัวที่ไม่พบปรสิต (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ที่พบปรสิต (%)
หอยขม	59	1	58	1.7
ปู	1	-	1	0

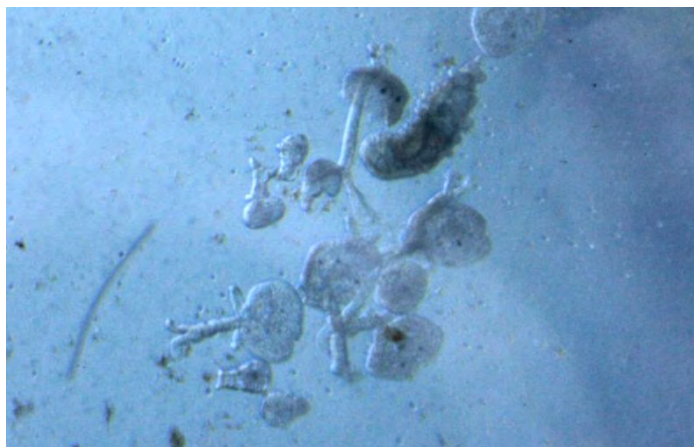
พื้นที่ที่ 3 สถานีประมง พิกัด Latitude: 14.343571 (14° 20' 36.86" N); Longitude: 98.937716 (98° 56' 15.78" E)

จากการศึกษาหอยจำนวน 3 ชนิด ที่เก็บได้จากพื้นที่นี้ คือ หอยเจดีย์, หอยฝาเดียวแบบแบนขด และ หอยจู้บหรือหอยขม จำนวน 64 ตัวอย่าง ตรวจพบเมตาเซอร์คาเรีย 2 ชนิด ชนิดที่มีหนามและไม่มีหนาม อย่างละ 1 ตัว เฉพาะในหอยจู้บ นอกจากนี้ ยังพบปรสิตกลุ่มซิติโอตในหอยจำนวน 1 ตัว และปรสิตอาร์โทรพอดอยู่ในหอยจำนวน 1 ตัว (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ปรสิตที่ตรวจพบในหอยที่เก็บจากพื้นที่สถานีประมง

ชนิด	จำนวนทั้งหมด (ตัว)	จำนวนตัวที่พบปรสิต (ตัว)	จำนวนตัวที่ไม่พบปรสิต (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ที่พบปรสิต (%)
หอยเจดีย์	49	-	49	0
หอยฝาเดียวแบบแบนขดเป็นก้นหอย	9	-	9	0
หอยจู้บ	6	3	3	50

ในจำนวนเซอร์คาเรียที่พบสามารถแยกออกได้เป็น 2 สันฐาน ได้แก่ เซอร์คาเรียหาง 2 แฉก จัดอยู่ในกลุ่ม furcocercous cercaria (ภาพที่ 3) และเซอร์คาเรียหาง 1 แฉก



ภาพที่ 3 ตัวอย่างเซอร์คาเรียหาง 2 แฉก (furcocercous cercaria) ที่พบในตัวอย่างหอยเจดีย์ มีลักษณะลำตัวแบนสีน้ำตาลอ่อน มี eye spot ขนาดใหญ่เห็นชัดเจน และมี ventral sucker กลมใหญ่ ปลายหางแยกเป็น 2 แฉกมีลักษณะแบน (furcal tail)

การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษาครั้งนี้พบการติดเชื้อเซอร์คาเรียในหอยจำนวน 9 ตัว เฉพาะในหอยเจดีย์เท่านั้น โดยเป็นเซอร์คาเรียหาง 2 แฉก ในหอยจำนวน 5 ตัว และเซอร์คาเรียหาง 1 แฉก ในหอยจำนวน 4 ตัว การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเริ่มจากการแยกเซอร์คาเรียที่ได้รับการรักษาสภาพในเอธานอลความเข้มข้น 95% ออกมาทีละตัว จากนั้นนำไปล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง โดยให้รหัสระบุเซอร์คาเรียที่แยกออกมาดังนี้

หอยเจดีย์ตัวที่ 1	Cer1-1 เซอร์คาเรียหาง 2 แฉก
หอยเจดีย์ตัวที่ 2	Cer1-2 เซอร์คาเรียหาง 1 แฉก
หอยเจดีย์ตัวที่ 3	Cer1-3 เซอร์คาเรียหาง 1 แฉก
หอยเจดีย์ตัวที่ 4	Cer1-4 เซอร์คาเรียหาง 1 แฉก
หอยเจดีย์ตัวที่ 5	Cer1-5 เซอร์คาเรียหาง 2 แฉก
หอยเจดีย์ตัวที่ 6	Cer1-6 เซอร์คาเรียหาง 2 แฉก
หอยเจดีย์ตัวที่ 7	Cer1-7 เซอร์คาเรียหาง 1 แฉก
หอยเจดีย์ตัวที่ 8	Cer1-8 เซอร์คาเรียหาง 2 แฉก
หอยเจดีย์ตัวที่ 9	Cer1-9 เซอร์คาเรียหาง 2 แฉก

จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนยีนโรโบโซมอลดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ จากตัวอย่างเซอร์คาเรียทั้ง 2 สปีชีส์ ที่ได้จากหอยเจดีย์ทั้ง 9 ตัว โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส (ภาพที่ 4)

Cer1-1	GGGATGTGCA ACAGTGGCG TTTACGTCCA CTGTTGTGCA AGGCTCAATG AGGGTTTAGC	2332
Cer1-5	2340
Cer1-6	2340
Cer1-8	2340
Cer1-9	2340
Cer1-1	GACCCCGCCC CGCGTTTGT TTA CTGGCAA TTTTGCTACC TTCACTGTT CAAGTATGTT	2392
Cer1-5	2400
Cer1-6	2400
Cer1-8	2400
Cer1-9	2400
Cer1-1	TCGCTGTACT TCAGCGGGAC ATGCTGCCCC ATCTGTGCAT TCAATATTAA GTTATTGCTT	2452
Cer1-5	2460
Cer1-6	2460
Cer1-8	2460
Cer1-9	2460
Cer1-1	GTACAGAGGA TCGCCTGTTT GTGCCACTCA GGCTTGATCC AATTGTCGGC TTGTCCGGCA	2512
Cer1-5	2520
Cer1-6	2520
Cer1-8	2520
Cer1-9	2520
Cer1-1	AATGTACAAC TCTATGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG CGCAGCGAAC	2572
Cer1-5	2580
Cer1-6	2580
Cer1-8	2580
Cer1-9	2580
Cer1-1	TGTGTGAATT AATGTGAAC TCTTCCTGCC ATGAACATCG ACAACTTGAA CGCACATTGC	2632
Cer1-5	2640
Cer1-6	2640
Cer1-8	2640
Cer1-9	2640
Cer1-1	GGCCATGGGT TAGCCTGTGG CCACGCCTGT CCGAGAGTCG GCTTATAAAC TATCACGATG	2692
Cer1-5	2700
Cer1-6	2700
Cer1-8	2700
Cer1-9	2700
Cer1-1	CTCAAAAAGT CGTGGCTTGG GAGCTGCCA GCTGACATTG TCAGATCTGT GGCTTCTCTC	2752
Cer1-5	2760
Cer1-6	2760
Cer1-8	2760
Cer1-9	2760
Cer1-1	TAATTCATCC AAAGAACACC TTTGCGGTTG TGGACGGAGT CGTGGCTTAG TGTATGCAGA	2812
Cer1-5	2820
Cer1-6	2820
Cer1-8	2820
Cer1-9	2820
Cer1-1	CAGCTCATGC CTCGTTCAAC AACCTTGTTT TGGTTTATT TGGTGTGGG ATGTTGCCTT	2872
Cer1-5	2880
Cer1-6	2880
Cer1-8	2880
Cer1-9	2880
Cer1-1	TTTATCCTGA CCTCGGATCA GACGTGAATA CCCGCTGAAC <u>TTAAGCATAT</u> <u>CACTAAGCGG</u>	2932
Cer1-5	2936
Cer1-6	2940
Cer1-8	2934
Cer1-9	2937

Cer1-1 AGGA 2936
 Cer1-5 ----- 2936
 Cer1-6 2944
 Cer1-8 ----- 2934
 Cer1-9 ----- 2937

โดย Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 2,936, 2,936, 2,944, 2,934 และ 2,937 คู่เบส ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 สาย ที่ได้จากเซอร์คาเรียทั้ง 5 ตัว มีความเหมือนกันในทุกตำแหน่ง ยกเว้นในช่วงต้นและช่วงปลายสายซึ่งเป็นตำแหน่งของบริเวณไพรเมอร์ที่มีความสมบูรณ์ของลำดับต่างกัน [แสดงตำแหน่งด้วยการขีดเส้นใต้กำกับ] โดยเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในส่วนของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอไปทำการสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่า เซอร์คาเรีย Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 มีความใกล้เคียงกับหนอนตัวแบนชนิด *Transversotrema haasi* โดยมีค่าความเหมือนของลำดับเท่ากับ 94% (ภาพที่ 5)

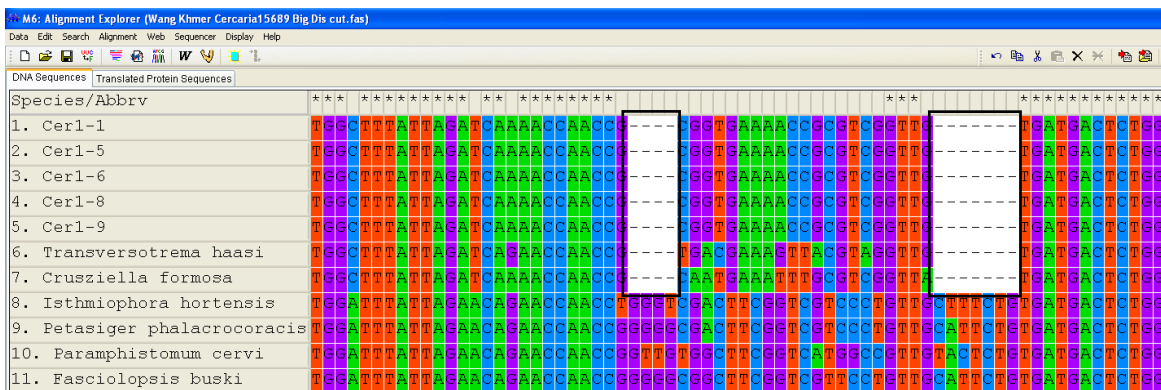
Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transversotrema haasi 18S rRNA gene	2881	2881	97%	0.0	94%	AJ287583.1
Crusziella formosa 18S rRNA gene	2802	2802	97%	0.0	93%	AJ287491.1
Isthmiophora hortensis genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sec	2414	2414	99%	0.0	89%	AB189982.1
Petasiger phalacrocoracis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and	2370	2370	97%	0.0	89%	AY245709.1
Paramphistomum cervi isolate PCD 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac	2359	2359	99%	0.0	88%	KJ459938.1
Fasciolopsis buski 18S ribosomal RNA sequence	2350	2350	99%	0.0	88%	L06668.1

ภาพที่ 5 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 จำนวน 1,970 คู่เบส กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของโรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึง 94% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอของหนอนตัวแบนชนิด *Transversotrema haasi* ที่พบติดเชื้อมากครั้งแรกในปลาที่เก็บได้จากทะเลแดง (Red Sea fish) (Witenberg, 1944)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 จำนวน 5 สาย ไปทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกับเซอร์คาเรียที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ในผล BLASTn 6 อันดับแรก ได้แก่ *Transversotrema haasi* [GenBank accession no. AJ287583.1], *Crusziella formosa* [AJ287491.1], *Isthmiophora hortensis* [AB189982.1], *Petasisger phalacrocoracis* [AY245709.1], *Paramphistomum cervi* [KJ459938.1] และ *Fasciolopsis buski* [L06668.1] พบว่า เซอร์คาเรียที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 5 ตัว มีช่วงบริเวณการหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. haasi* และ *C. formosa* หลายช่วงบริเวณ (ภาพที่ 6) แสดงความใกล้เคียงของเซอร์คาเรียที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับ *T. haasi* และ *C. formosa*



ภาพที่ 6 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ได้จากผลของ BLASTn 6 อันดับแรก ซึ่งมีช่วงบริเวณการหายไป (deletion) 2 ช่วงบริเวณ ของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. haasi* และ *C. formosa* (กรอบสีดำ)

สำหรับเซอร์คาเรียทาง 1 แยก ในตัวอย่าง Cer1-2, Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์แยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย Cer1-2 และ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเซอร์คาเรีย Cer1-4 และ Cer1-7 สามารถหาได้เพียงในส่วนของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอเท่านั้น

เซอร์คาเรียทาง 1 แยก ในตัวอย่าง Cer1-2 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 3,299 คู่เบสดังแสดงด้านล่าง โดยเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในส่วนของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอไปทำการสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่า เซอร์คาเรีย Cer1-2 มีความใกล้เคียงกับหนอนตัวแบนในวงศ์ Lecithodendriidae โดยมีค่าความเหมือนของลำดับเท่ากับ 97% (ภาพที่ 7)

```

ACCGTAAAGG ACATTC TAGA GATTTAGCCA TGCATGTCAA GTACAAACCT TAAAACGGTG AAACCGCGAA 70
TGGCTCATT AATCAGTAT GGTTCC TAG ACCATACCTA CTACATGGAT AACTGTAGTA ATTC TAGAGC 140
TAATACATGC CACGATGCC TGACCC TTCG GGGGATGGGT GCATTTATTA GAACGAAACC AACCGGTGC 210
ATTCC TTCGG TTTGCGCCTG TTATATTCTG TGATGACTCT GGATAACTTT GCTGATCGCA GTCGGCCTTG 280
TGTCGGCGAC GAGTCTTTCA AATGCTGCCC CTATCAATTG TCGATGGTAG GTGACCTGCC TACCATGGTG 350
ATAACGGGTA ACGGGGAA TC AGGGTTCGAT TCCGGAGAAA GAGCC TGAGA AACGGCTACT ATTTCC AAGG 420
AAGGCAGCAG GCGCGCAACT TACCCAA TCC TGGCACGGGG AGGTAGTGAC GAAAAATACG GATGCGGAA 490
TCAACAGAGG CTCCGTAAT CGAATGAGTA CAATTCAAA CTTTTAACGA GGATCAACTG GAGGGCAAGT 560
CTGGTGGCC GACCGCGGT AACTCCAGCT CCAGTAAGCT ATATTAAT TGGTTGACTG AAAAAGCTCG 630
TAGTTGGATC TGGGACGCAC GGTACGAGT CGTTTCTGC ATTTCTAAC TGACTCCCTC GGGCCGTTA 700
TGTGAGGCGA TTTTGTAGCT GTGTAGCCTT TCTGCCGTGT CTGTTTACGG GTGCTGACGG TCTATACGTT 770
GGCATGCTC CAGATGCTT TAACCGGGT TCTGGGGCGG ACGGCAAGTT TACTTTG AAC AAATTTGAGT 840
GCTCAAAGCA GGCCTTTGCC TGACAA TCTT TGCAATGGAA AATGGAATAG GACTTCGGTT CTATTTTGT 910
GGTTTTCGGA TCCGAAGTAA TGGTTAAGAG GGACAGACGG GGGCATTGT ATGGCGGTG TAGAGGTGAA 980
ATTCATGAT CATCGCCAGA CAAACTAAAG CGAAAGCATT TGCCAAGGAT GTTTTCA TTA ATCTGGAGC 1050
AAAGTCAGAG GTTCAAAGAC GATCAGATAC CGTGCTAGTT CTGACCATAA ACGATACCAA CTGACGATCC 1120
GTGGGTGCTC GTTCATTGAC CCCATGGGCA GTCCCCGGGA AACCTTGAAG TCTTTGGGTT CCGGGGGAAG 1190
TATGGTTGCA AAGCTGAAAC TTAAAGGAAT TGACGGAAGG GCACCACCAG GAGTGGAGCG TGCGGTTCAA 1260
TTCGACTCAA CACGGGAAAT CTCACCCGGC CCGGACACTG TGAGGATTGA CAGATTGAGA GCTCTTTCTT 1330
GATTCGGTGG TTGGTGGTGC ATGGCCGTT TTAGTTGGTG GAGCGATTG TCTGGTTAAT TCCGATTAAC 1400
AACGAGACTT TGCCCTGCTA ACTAGTATGC CTGCTCCTG CTTTCGCGCG GGTGGCGGTA GCGTCGGCCT 1470
TTCGGATTGA TTGCTCCGTT GCCGGCGAGA GCAACGCAGA TGTATACCTT TTAGAGGGAC AAGCGGTATT 1540
TAGCCGCAG AAATTGAGCA ATAACAGGTC TGTGATGCC TTAGATGTC GGGGCCACAC CTGCGGCATA 1610
ATGACGGTTT CAGCGAGTAT GGAGCCCTGG CTCGAAAGAG TTGGGTAAAC TGAACATGA CCGTCGTAAC 1680
TGGGATCGGG GTTTGCAATT GTCCCCGTG AACGAGGAA CCCTGGTAAG TGCAAGTCAT TAGCTTGCCG 1750
TGATTACGTC CCTGCCCTTT GTACACACCG CCCGTCGTA CTACCGATTG AGTGGTTTAG TGAGGACTTT 1820
GGATCGGTT CATTGCAGTT GCTTCGGCAG CTCGACCGGG ACTGAAAAGA TGTCCGAAC TGATCATTTA 1890
    
```

GAGGAAGTAA AAGTCGTAAC AAGGTTTCCG TAGGTGAACC TCGGAAGGA TCATTACAGT ATTCCCTACC 1960
 CAAAAATTGCT CAGTGTCCA CTGAGTAAGC TCTGTGTCCA TGTGAGCGTA TGTGGACTGC ATGCGGCATT 2030
 CGACTGCCCTG TGGTGAAGCG CCCTAGTTTC ACCCGGCCCC TATGTAGCTT CCGCTGCCCTG TGGTGTGGCG 2100
 TGCAGTCGCA CCCGGTCCTA TGTAGTCGGA TGCAGCAGCA TGTTTTTCTA TTGATGGCTA TTCGAATATG 2170
 GTTGTGCACT GAATCTGCC TGTGGTGGAG GTTGTGAGTT TCACCCGGCC CTATGTAGCT TCGCCTGCCT 2240
 GTGGTGTGTC GTGCAGTCGC ATCCGGTCC TATGCAGTGGT GCACCGCTTT CTCAGCGGCT ATTCGAATAC 2310
 GGCTGGCTTT GTGCGAGCAG TTCTCTGCCT GTGGTGAAGC GCCCTAGTTT CACCCGGCCC CTATGTAGCT 2380
 TCGGCTGCC TGTGGTGTGGC GTGCAGTCGC ACCCGGTCCA ATGTAGAGTC TGCTTGCACG GGCCAACCAA 2450
 CCGGGCTATA CCTGGTACGC CTAGTGCCTA CGTATAGTCC CTGCTTGATG GGGTGTCTCC CTGCTGATG 2520
 CCTTCCGGGT GCTCGCGGCC TTGCGGCTGC CAGTCCACTT CAGGGAGGTG ACAGGATGTG CTGGATCCGG 2590
 CCAGTGTAG GCTTAAAGAG TGATGTCTG GCTACCGCCA GCTACCGCC CTGATTGTTT GATAAACCCA 2660
 TTTTACACTG TTCAAGTGAT GCGTGTGGC CCATGGCTGG TGCCTGTCAT TGCCCCACA TGCACCTGGT 2730
 TTCTGACCAG ACTGTATGTG CAGTCGCTCG GAGGTGCCCT GCCCGGGTT GGACTGTGAA ACACGACGGA 2800
 TGTTCCGGCA ACCGAATGTT CGAAGTGC GAACAATCTGA TCGGTGGATC ACTCGGCTCG TGTGTCGATG 2870
 AAGAGCGCAG CCAACTGTGT GAATTAATGT GAATGCATA CTGCCTTGAA CATCGACTTC TTGAACGCAT 2940
 ATTGCGGCCA TGGGTTAGCC TATGGCCACG CCTGTCCGAG GGTCCGCTTA TAAACTATCA CGACGCCCTT 3010
 AAAGTCTGG CTTGGGTCTT GCCAATGGC GTGATTTCTT TACACGGCCA TTGTGCTGTT TGTGGAGGTG 3080
 CCAGGTCTAT GGCTTTTCCC TAATGTGTC GGACATCGC ATGTAAGTGT GGTGTCGGAG TCGTGGCTCA 3150
 ATGATAATAG CGCGCTCCCT TAGCTGGCAT GGTGTGTGT TCTCTGAGAC TTCTTTGTTT GTGTGTTGCG 3220
 CTTACAATTG CGCTTCCCTA CCTGACCTCG GATCAGACGT GATTACCCGC TGAACCTAAG CATATCACTA 3290
 AGCGGAGGA 3299

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Lecithodendriidae sp. PAFlukeA 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3206	3206	98%	0.0	97%	EU019964.1
<input type="checkbox"/> Paralecithodendrium longiforme 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2900	2900	94%	0.0	95%	AY222148.1
<input type="checkbox"/> Lecithodendrium linstowi 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2874	2874	95%	0.0	95%	AY222147.1
<input type="checkbox"/> Collyriclum faba 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	2641	2641	99%	0.0	91%	JQ231122.1
<input type="checkbox"/> unidentified digenean 18S, ITS1 and 5.8S rRNA genes (type A1)	2619	2619	99%	0.0	91%	AJ001831.1
<input type="checkbox"/> Maritrema oocysta 18S rRNA gene	2603	2603	98%	0.0	91%	AJ287534.1
<input type="checkbox"/> Microphallus fusiformis 18S rRNA gene	2569	2569	98%	0.0	91%	AJ287531.1
<input type="checkbox"/> Microphallus primas 18S rRNA gene	2516	2516	98%	0.0	91%	AJ287541.1

ภาพที่ 7 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 จำนวน 1,942 คู่เบส กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของโรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึง 97% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอของหนอนตัวแบนที่อยู่ในวงศ์ Lecithodendriidae

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 ไปทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกับเซอร์คาเรียตัวนี้ ในผล BLASTn 8 อันดับแรก ได้แก่ Lecithodendriidae sp. [GenBank accession no. EU019964.1], *Paralecithodendrium longiforme* [AY222148.1], *Lecithodendrium linstowi* [AY222147.1], *Collyriclum faba* [JQ231122.1], unidentified digenean [AJ001831.1], *Maritrema oocysta* [AJ287534.1], *Microphallus fusiformis* [AJ287531.1] และ *Microphallus primas* [AJ287541.1] พบว่า เซอร์คาเรีย Cer1-2 มีช่วงบริเวณการเพิ่มใส่ (insertion) (ภาพที่ 8) และมีช่วงบริเวณการหายไป (deletion) (ภาพที่ 9) ของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์


```

Cer1-3 CTATGGCTTT TCCCTAATGT GCCGGACGCA ACCATCTCCA GGCTGGCGGT CTGGATGAGG 2880
Cer1-4 ----- 1997
Cer1-7 ----- 1997

Cer1-3 AAGTGGCGGC GGAGTCGTGG CTCAATGATA CATATATATA TAYATAATGC GCGCTCCGTT 2940
Cer1-4 ----- 1997
Cer1-7 ----- 1997

Cer1-3 GTCTATTCCCT TGTCTGTGAT CTCGGCATTG GGTTTGGCAA TGCATCCGAT GCAAACATTG 3000
Cer1-4 ----- 1997
Cer1-7 ----- 1997

Cer1-3 CACGCGTTTC TAATGTGTGC TATTTTCC TG ACCTCGGATC AGACGTGAAT ACCCGCTGAA 3060
Cer1-4 ----- 1997
Cer1-7 ----- 1997

Cer1-3 CTTAAGCATA TCACTAAGCG GAGGA 3085
Cer1-4 ----- 1997
Cer1-7 ----- 1997

```

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Centrocestus sp. RD-2003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8	3550	3550	98%	0.0	99%	AY245699.1
<input type="checkbox"/> Centrocestus formosanus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3384	3384	93%	0.0	99%	HQ874608.1
<input type="checkbox"/> Centrocestus formosanus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3350	3350	92%	0.0	99%	AY245759.1
<input type="checkbox"/> O. viverrini gene for small subunit rRNA	3349	3349	99%	0.0	97%	X55357.1
<input type="checkbox"/> Euryhelmis costaricensis genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete s	3338	3338	98%	0.0	97%	AB521800.1
<input type="checkbox"/> Euryhelmis costaricensis genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete s	3338	3338	98%	0.0	97%	AB521799.1
<input type="checkbox"/> Euryhelmis costaricensis genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete s	3338	3338	98%	0.0	97%	AB521798.1
<input type="checkbox"/> Euryhelmis costaricensis genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete s	3338	3338	98%	0.0	97%	AB521797.1
<input type="checkbox"/> Cryptocotyle lingua 18S rRNA gene	3336	3336	97%	0.0	98%	AJ287492.1

ภาพที่ 10 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 จำนวน 1,986 คู่เบส กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึงถึง 99% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของหนอนตัวแบนที่อยู่ในสกุล *Centrocestus*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัยยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 จำนวน 3 สาย ไปทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกับเซอร์คาเรียที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ในผล BLASTn 9 อันดับแรก ได้แก่ *Centrocestus* sp. [GenBank accession no. AY245699.1], *Centrocestus formosanus* [HQ874608.1], *Centrocestus formosanus* [AY245759.1], *Opisthorchis viverrini* [X55357.1], *Euryhelmis costaricensis* [AB521800.1], *Euryhelmis costaricensis* [AB521799.1], *Euryhelmis costaricensis* [AB521798.1], *Euryhelmis costaricensis* [AB521797.1] และ *Cryptocotyle lingua* [AJ287492.1] พบว่า เซอร์คาเรียที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 3 ตัว มีช่วงบริเวณการหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Centrocestus* spp. 1 ตำแหน่ง

นอกจากนี้ ยังมีตำแหน่งในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสร่วมกันระหว่างเซอร์คาเรีย Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 กับหนอนตัวแบนสกุล *Centrocestus* หลายตำแหน่ง (ภาพที่ 11) แสดงความใกล้เคียงของเซอร์คาเรียที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับหนอนตัวแบนสกุลนี้

Species/Abbrv	* * * * *	* * * * *	*	* * * * *	* * * * *	*	*	* * * * *	* * * * *	*	*	* * * * *	*	* * * * *	*	* * * * *	*	* * * * *										
1. Cer1-3	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
2. Cer1-4	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
3. Cer1-7	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
4. Centrocestus sp.	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
5. Centrocestus formosanus HQ874608.1	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
6. Centrocestus formosanus AY245759.1	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
7. Opisthorchis viverrini	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
8. Euryhelms costaricensis AB521800.1	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
9. Euryhelms costaricensis AB521799.1	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
10. Euryhelms costaricensis AB521798.1	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
11. Euryhelms costaricensis AB521797.1	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G
12. Cryptocotyle lingua AJ287492.1	C	T	C	G	T	A	T	T	C	C	T	G	G	C	T	T	C	A	C	A	C	T	G	G	C	T	G	G

ภาพที่ 11 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์ยูนิตรไโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ได้จากผลของ BLASTn 9 อันดับแรก ซึ่งมีช่วงบริเวณการหายไป (deletion) 1 ตำแหน่ง (กรอบสีดำ) และยังมีตำแหน่งในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสร่วมกันระหว่างเซอร์คาเรีย Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 กับหนอนตัวแบนสกุล *Centrocestus* หลายตำแหน่ง (กรอบประสีดำ)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาความชุกและสัญญาณวิทยาของเซอร์คาเรียที่พบในพื้นที่ อพ.สธ. บริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2555 โดยทำการเก็บตัวอย่างหอยจากแหล่งน้ำ 3 แห่ง รวมทั้งสิ้น 247 ตัว จำแนกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ หอยฝาเดียวแบบแบนขดเป็นก้นหอย, หอยเจดีย์, หอยสองฝา, หอยจับหรือหอยขม และหอยฝาเดียว unknown A เพื่อตรวจหาเซอร์คาเรียโดยใช้ค้อนทุบเปลือกหอยให้แตกออก และศึกษาสัญญาณวิทยาของเซอร์คาเรียจากตัวอย่างสด พบความชุกของการติดเซอร์คาเรียรวมเท่ากับ 3.64% โดยพบเฉพาะในหอยเจดีย์ที่เก็บได้จากพื้นที่ที่ 1 คือบ่อห้วยไทรโยค และสามารถจำแนกเซอร์คาเรียออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีหาง 2 แฉก (*furcocercous cercaria*) และกลุ่มที่มีหาง 1 แฉก โดยมีความชุกของการติดเซอร์คาเรียของหอยเจดีย์จากบ่อห้วยไทรโยคเท่ากับ 9% ส่วนในหอยชนิดอื่นๆ จากแหล่งน้ำอื่นๆ ตรวจไม่พบเซอร์คาเรีย เมื่อทำการแยกเซอร์คาเรียจากหอยเจดีย์ทั้ง 9 ตัวที่พบติดเชื้อ เพื่อศึกษาทางอนุชีววิทยาโดยการเพิ่มจำนวนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมด จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่า สามารถแบ่งเซอร์คาเรียที่สำรวจพบออกได้เป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 ที่มีความใกล้เคียงกับพยาธิใบไม้ในสกุล *Transversotrema* โดยพยาธิสกุลนี้มีระยะเซอร์คาเรียพบในหอยเจดีย์ โดยที่ปลายหางของเซอร์คาเรียแยกเป็น 2 แฉก จึงจัดอยู่ในกลุ่ม *furcocercous cercaria* หนอนสกุลนี้มีลักษณะพิเศษต่างจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน กล่าวคือ มีลักษณะลำตัวเหมือนรูปถ้วยแบนสีน้ำตาลอ่อน มี eye spot ขนาดใหญ่เห็นชัดเจน และมี ventral sucker กลมใหญ่ ปลายหางแยกเป็น 2 แฉกมีลักษณะแบน (*furcal tail*) (Krailas et al., 2014) พยาธิสกุลนี้มีเจ้าบ้านกึ่งกลางตัวที่ 2 เป็นปลาหลายชนิด โดยพบระยะ mature metacercaria ดำรงชีวิตเป็นปรสิตภายนอก (ectoparasite) เป็นจำนวนมากใต้เกล็ดปลาของปลาน้ำจืดและปลาน้ำกร่อยหลายชนิด (Manter, 1970) โดยพยาธิบางชนิด เช่น *Transversotrema laruei* มีระยะตัวเต็มวัยอยู่ในลำไส้ของนก (Krailas et al., 2014) เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ได้ทั้ง 5 ตัวอย่าง พบว่า มีความใกล้เคียงกับ *Transversotrema haasi* ในฐานข้อมูลมากที่สุด โดยมีค่าความเหมือนของลำดับเท่ากับ 94% อย่างไรก็ตาม ค่าที่ได้ถือว่ายังมีความต่างกันอยู่มากถึงกว่า 6% แสดงว่าเซอร์คาเรียทั้ง 5 ตัวนี้ไม่น่าจะเป็นเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้สกุล *Transversotrema* แต่อาจจะเป็นตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้สกุลใดสกุลหนึ่งในวงศ์ *Transversotrematidae* ซึ่งมีสมาชิกสกุลอื่นๆ ประกอบด้วย *Circuiticoelium*, *Crusziella*, *Prototransversotrema* และ *Transversotrema* สอดคล้องกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบที่แสดงว่า Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 กับ *Crusziella* และ *Transversotrema* ทั้งหมดมีช่วงบริเวณการหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บางช่วงบริเวณเหมือนกัน

กลุ่มที่ 2 Cer1-2 ที่มีความใกล้เคียงกับพยาธิใบไม้ในวงศ์ *Lecithodendriidae* พยาธิใบไม้ในวงศ์นี้ส่วนใหญ่เป็นปรสิตพบในลำไส้ของค่างคาว, สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และนก (Schell, 1970) เคยมีรายงานพบพยาธิวงค์นี้ในคนไทย โดยพบในผู้ป่วยหญิงอายุ 44 ปี ที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ร่วมกับการติดปรสิตพยาธิใบไม้ในลำไส้และตับชนิดอื่น (Kaewkes et al., 1991) เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่าง Cer1-2 ที่ได้ พบว่า มีความใกล้เคียงกับสมาชิกหนึ่งในวงศ์ *Lecithodendriidae* ในฐานข้อมูลมากที่สุด โดยมีค่าความเหมือนของลำดับเท่ากับ 97% ค่าที่ได้อาจแสดงถึงเซอร์คาเรียที่พบ

ในการศึกษาครั้งนี้ อาจจะเป็นตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้สกุลไตสกุลหนึ่งในวงศ์ Lecithodendriidae ซึ่งมีสมาชิกสกุลอื่นๆ อาทิเช่น *Lecithodendrium* และ *Paralecithodendrium* เป็นต้น สอดคล้องกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบที่แสดงว่า Cer1-2 กับ *Lecithodendrium* และ *Paralecithodendrium* มีช่วงบริเวณการเพิ่มใส่ (insertion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

กลุ่มที่ 3 Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 ที่มีความใกล้เคียงกับพยาธิใบไม้ในสกุล *Centrocestus* ซึ่งเป็นพยาธิใบไม้ขนาดเล็กอยู่ในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและนกหลายชนิด ได้แก่ ไก่ เป็ด หนู กระต่าย สุนัข แมว พยาธิสกุลนี้มีวงชีวิตที่ซับซ้อน มีรายงานว่าปลาน้ำจืดหลายชนิดสามารถเป็นเจ้าบ้านกึ่งกลางตัวที่ 2 ได้ เช่น ปลาทอง (*Carassus auratus*), ปลาชิว (*Pseudorasbora parva*), ปลาकिनยุง (*Gambusia affinis*), กลุ่มปลาช่อน [ได้แก่ *Channa formosana* และ *Ophicephalus tadius*], ปลา รากกล้วย (*Misgurnus anguillicaudatus*), กลุ่มปลาตะเพียน [ได้แก่ *Zacco platypus*, *Cyprinus carpio*, *Puntius semifasciolatus* และ *Putinus brevis*], ปลาบู๊จ๊กรพรรดิ (*Glossogobius giuris*), ปลาหมอ (*Anabas testudineus*) นอกจากนี้ ยังมีกบหนอง (*Rana limnocharis*) และ คางคกบ้าน (*Bufo melanostictus*) (Han et al., 2008) ในการศึกษาครั้งนี้พบระยะเซอร์คาเรียในหอยเจดีย์ (*Melanoides tuberculata*) ซึ่งเป็นเจ้าบ้านกึ่งกลางตัวที่ 1 โดยมีระยะเซอร์คาเรียจัดอยู่ในกลุ่ม pleurophocercous cercaria สอดคล้องกับงานวิจัยของ Krailas และคณะ (2014) และ Pinto and Melo (2010) นอกจากนี้เคยมีรายงานพบคนที่เป็โรคพยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *Centrocestus caninus* ซึ่งเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกับ *Centrocestus formosanus* ในประเทศไทยและสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ได้ทั้ง 3 ตัวอย่าง พบว่า มีความใกล้เคียงกับหนอนตัวแบนสกุล *Centrocestus* ในฐานข้อมูลมากที่สุด โดยมีค่าความเหมือนของลำดับถึง 99% แสดงว่าเซอร์คาเรียทั้ง 3 ตัวนี้น่าจะเป็นเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ชนิดใดชนิดหนึ่งในสกุลนี้ นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้ยังสอดคล้องกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบที่แสดงว่า Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 กับ *Centrocestus* sp. และ *Centrocestus formosanus* ทั้งหมดมีช่วงบริเวณการหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน และยังมีตำแหน่งในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสร่วมกันหลายตำแหน่งตลอดความยาวของลำดับ

งานวิจัยครั้งนี้ผนวกเทคนิคทางด้านสัตวศาสตร์เข้ากับการศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคทางด้านอนุชีววิทยา เข้าทำการสำรวจเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืด เพื่อใช้ช่วยในการระบุชนิดและให้ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมเพิ่มเติมจากข้อมูลทางสัตวศาสตร์ที่มีอยู่ในปัจจุบัน การริเริ่มเพิ่มเติมข้อมูลในส่วนนี้นอกจากจะช่วยให้สามารถระบุชนิดเซอร์คาเรียให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้นแล้ว ยังจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับปรสิตต่อไป เช่น ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรสิตหนอนตัวแบนในแต่ละกลุ่มแต่ละสายพันธุ์ หรือเป็นข้อมูลประกอบในการตรวจวินิจฉัยชนิดของปรสิตที่พบติดเชื้อในคนไข้ เพื่อช่วยในการรักษาได้อย่างถูกต้องและทันที่

เอกสารอ้างอิง

- เปรมกมล ทองคงอ่วม. 2545. ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในหอยน้ำจืดฝาเดียวจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิภาวี ปวรอาจารย์, กรภัทร แก้วเนิน และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2556. สันฐานวิทยาของเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี. การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 6 ชมรมคณะปฏิบัติการวิทยาการ อพ.สธ. ณ อาคารประชุมวิชาการ เขื่อนศรีนครินทร์ จ.กาญจนบุรี. หน้า 641–649.
- Brandt, R. A. M. 1974. The non-marine aquatic Mollusca of Thailand. *Archiv für Molluskenkunde*. 105: 1–423.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Han, E. T., Shin, E. H., Phommakorn, S., Sengvilaykham, B., Kim, J. L., Rim, H. J., and Chai, J. Y. 2008. *Centrocestus formosanus* (Digenea: Heterophyidae) encysted in the freshwater fish, *Puntius brevis*, from Lao PDR. *Korean J. Parasitol.* 46: 49–53.
- Kaewkes, S., Elkins, D. B., Haswell-Elkins, M. R., and Sithithaworn, P. 1991. *Phaneropsolus spinicirrus* n. sp. (Digenea: Lecithodendriidae), a human parasite in Thailand. *J. Parasitol.* 77: 514–516.
- Krailas, D., Namchote, S., Koonchornboon, T., Dechruksa, W., and Boonmekam, D. 2014. Trematodes obtained from the thiarid freshwater snail *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) as vector of human infections in Thailand. *Zoosyst. Evol.* 90: 57–86.
- Manter, H. W. 1970. A new species of *Transversotrema* (Trematoda: Digenea) from marine fishes of Australia. *J. Parasitol.* 56: 486–489.
- Pinto, H. A. and Melo, A. L. 2010. *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) as an intermediate host of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 52: 207–210.
- Schell, S. C. 1970. *The Trematodes*. Wm. C. Brown Company Publishers, USA.
- Schmidt, G. D. and Roberts, L. S. 2010. *Foundation of Parasitology*. 8th edition. McGraw-Hill, Singapore.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- Witenberg, G. 1944. *Transversotrema haasi* a new fish trematode. *J. Parasitol.* 30: 179–180.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคลกุล

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) | นางสาวมาลินี ฉัตรมงคลกุล |
| ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) | Miss Malinee Chutmongkonkul |
| 2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน | 3 1013 00156 54 0 |
| 3. ตำแหน่งปัจจุบัน | รองศาสตราจารย์ ดร. |
| 4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก | |
| ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | |
| โทรศัพท์ | 02-218-5265 |
| โทรสาร | 02-218-5256 |
| E-mail | malinee.c@chula.ac.th |

5. ประวัติการศึกษา

- | | |
|------------------------------|----------------------------------|
| 2519 วท.บ. (ชีววิทยา) | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2525 วท.ม. (สัตววิทยา) | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2534 Dr. rer. nat. (Zoology) | University of Bonn ประเทศเยอรมัน |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ปรสิตวิทยา (Parasitology)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ชื่อแผนงานวิจัย -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 การสำรวจชนิดของปลาและเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลามีเกล็ดในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี, งบประมาณปี 2552

7.2.2 ผลิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จังหวัดสตูล, งบประมาณปี 2552

7.2.3 ผลิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ อพ.สธ., งบประมาณปี 2553-2554

7.2.4 การสำรวจเบื้องต้นของเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลาที่รับประทานเป็นอาหารในพื้นที่เขื่อนวชิราลงกรณ จังหวัดกาญจนบุรี, งบประมาณปี 2554

7.2.5 สัมมนาวิทยาและพยาธิสภาพของปรสิตบางชนิด, งบประมาณปี 2555

7.3 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.3.1 ความหลากหลายของโปรโตซัวและแพลงก์ตอนในพื้นที่โครงการ อพ.สธ., งบประมาณปี 2553

7.3.2 ความหลากหลายของโปรโตซัวและแพลงก์ตอนในพื้นที่โครงการ อพ.สธ., งบประมาณปี 2554

7.3.3 ความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืดบางชนิด, งบประมาณปี 2555

7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ผลงานวิจัย)

7.4.1 Book

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ชิตชัย จันทร์ตั้งสี. 2548. *แพลงก์ตอน*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท เวิร์ค สแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 352 หน้า.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ พงชัย หาญยุทธนากร. 2554. *สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กบางชนิดในแหล่งน้ำจืด*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัทสิริบุตรการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ. 71 หน้า.

7.4.2 Journal articles

ผุสดี ปริยานนท์, มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ อนุสรณ์ ปานสุข. 2548. การเปลี่ยนแปลงของประชากรสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอุทยานแห่งชาติทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 2 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. นครราชสีมา*. หน้า 50.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, ผุสดี ปริยานนท์ และ สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา. 2548. ปรสิตของกิ้งก่าบิน (*Draco spp.*) พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 2 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. นครราชสีมา*. หน้า 124-125.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร และผุสดี ปริยานนท์. 2552. ปรสิตในเลือดกิ้งก่าบินจากเกาะกูด จ.ตราด. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 4 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี*. หน้า 64.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, กรณ์รวี เอี่ยมสมบุรณ์, พงชัย หาญยุทธนากร และ วิมล เหมาะจันทร์. 2554. การสำรวจชนิดของปลาและเมตาเซอคาเรียของพายาโปไมโนปลา ในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 448-456.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, วิเชษฐุ์ คนชื่อ, พงชัย หาญยุทธนากร และผุสดี ปริยานนท์. 2550. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะกูด จังหวัดตราด. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. พิพิธภัณฑสถานชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย อำเภอสัตหีบ จ. ชลบุรี*. หน้า 300.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร, วิเชษฐุ์ คนชื่อ และผุสดี ปริยานนท์. 2552. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จ.สตูล. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 4 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ. ชลบุรี*. หน้า 108.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร, วิเชษฐุ์ คนชื่อ และ ผุสดี ปริยานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของสัตว์เลื้อยคลานจากพื้นที่หมู่เกาะสิมิลัน จังหวัดพังงา. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 442-447.

- มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร, วิเชษฐ คนชื้อ และ ผุสดี ปริยานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากหมู่เกาะอ่างทอง จังหวัดสุราษฎร์ธานี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติการวิทยาการ อพ.สช. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 457-464.
- ทัศนธร ภูมิยุทธ์ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในป่าชายเลนปลูก บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติการ วิทยาการ อพ.สช. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล อีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 277-284.
- ศรัณย์ อัครวานุชิต, มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร และ นิพาดา เรือนแก้ว ดิษยทัต. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในสภาพที่มีสาหร่ายไก่อในแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน. *การประชุม วิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติการวิทยาการ อพ.สช. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึก หนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 758-768.
- สุชา เฉยศิริ, ชิดชัย จันท์ตั้งสี่ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของ โพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติการวิทยาการ อพ.สช. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 36-47.
- Chutmongkonkul, M and Pariyanonth, P. 2005. Endoparasites of five species of anurans in Thailand. *5th World Congress of Herpetology*, 19-24 June 2005, Stellenbosch, South Africa: 125.
- Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2005. Helminths and Blood Parasites of Butterfly Lizards, *Leiolepis* spp., in Thailand. *31st Congress on Science and Technology of Thailand*, 18-20 October 2005, at Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima: 92.
- Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2006. Blood parasites of six species of wild amphibians from Khum Mae Kuang forest area, Thailand. *Proceedings of AZWMP 2006*, Chulalongkorn Uni. Fac. of Vet. Sc., Bangkok, Thailand, 26-29 Oct 2006: 48.
- Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2007. Hematozoa of amphibians in Thailand. *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians 14th Annual Conference*, New Orleans, Louisiana, April 14-18 2007: 118.
- Chutmongkonkul, M., Pariyanonth, P., Tangtrongpiros, J., and Sailasuta, A. 2005. *Lankesterella* in *Hoplobatrachus rugulosus* in Thailand. *31st Congress on Science and Technology of Thailand*, 18-20 October 2005, at Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima: 89-90.
- Plengpanich, W., Chutmongkonkul, M., Sailasuta, A., and Kaewwiudth, S. 2006. Helminths infection in snake skin gourami *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910). In *Comparative Endocrinology and Biodiversity in Asia and Oceania*, *Proceedings of the 5th*

Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 7–10 February 2006, Bangkok, Thailand: 251–255.

- Prasankok, P., Chutmongkonkul, M., and Kanchanakhan, S. 2005. Characterisation of iridovirus isolated from diseased marbled sleepy goby, *Oxyeleotris marmoratus*. In P. Walker, R. Lester, and M. G. Bondad-Reantaso, (eds). *Diseases in Asian Aquaculture V*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila: 197–206.
- Sailasuta, A., Satetasit, J., and Chutmongkonkul, M. 2011. Pathological Study of Blood Parasites in Rice Field Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). *Vet. Med. Int.* doi:10.4061/2011/850568.
- Satetasit, J., Chutmongkonkul, M., and Sailasuta, A. 2009. Blood parasites of the rice field frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1835) from Wang Nam Yen district, Sra-kaew province, Thailand. *Proceedings of the 8th Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference*, April 3, 2009: 84.

2. อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) | นายชิตชัย จันทร์ตั้งสี |
| ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) | Mr. Chitchai Chantangsi |
| 2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน | 3 1002 00170 19 1 |
| 3. ตำแหน่งปัจจุบัน | อาจารย์ |
| 4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก | |
| | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| โทรศัพท์ | 02-218-5378 |
| โทรสาร | 02-218-5386 |
| E-mail | Chitchai.C@Chula.ac.th, chantangsi01@hotmail.com |

5. ประวัติการศึกษา

- | | |
|-----------------------|---|
| 2544 วท.บ. (ชีววิทยา) | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2549 M.Sc. (Zoology) | University of Guelph ประเทศแคนาดา |
| 2552 Ph.D. (Zoology) | University of British Columbia ประเทศแคนาดา |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

โปรติสต์วิทยา (Protistology)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.1.1 การประเมินศักยภาพในการกำจัดโลหะหนักของโปรติสต์ที่สกัดจากบ่อบำบัดน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำของกรุงเทพมหานคร

7.1.2 ความหลากหลายทางชีวภาพและการระบุชนิดของโปรติสต์บริเวณเกาะสี่ซัง จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยอาศัยรหัสดีเอ็นเอ

7.2 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 ความหลากหลายของโพรโตซัวและแพลงก์ตอนในพื้นที่ อพ.สธ.

7.2.2 ปรสิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ อพ.สธ.

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ผลงานวิจัย)

7.3.1 Book

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ชิตชัย จันทร์ตั้งสี. 2548. *แพลงก์ตอน*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท เวิร์ค สแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 352 หน้า.

7.3.2 Journal articles

สุชา ฉวยศิริ, ชิตชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี, ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองกระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 36–47.

Chantangsi, C. and Leander, B. S. 2010. An SSU rDNA barcoding approach to the diversity of marine interstitial cercozoans, including descriptions of four new genera and nine new species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1962–1977.

Chantangsi, C. and Leander, B. S. 2010. Ultrastructure, life cycle and molecular phylogenetic position of a novel marine sand-dwelling cercozoan: *Clautriavia biflagellata* sp. nov. *Protist.* 161: 133–147

Chantangsi, C., Hoppenrath, M., and Leander, B. S. 2010. Evolutionary relationships among marine cercozoans as inferred from combined SSU and LSU rDNA sequences and polyubiquitin insertions. *Mol. Phylogenet. Evol.* DOI:10.1016/j.jympev.2010.07.007.

Rueckert, S., Chantangsi, C., and Leander, B. S. 2010. Molecular systematics of marine gregarines (Apicomplexa) from North-eastern Pacific polychaetes and nemertean, with descriptions of three novel species: *Lecudina phyllochaetopteri* sp. nov., *Difficilina tubulani* sp. nov. and *Difficilina paranemertis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2681–2690.

Okamoto, N., Chantangsi, C., Horák, A., Leander, B. S., and Keeling, P. J. 2009. Molecular phylogeny and description of the novel katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and establishment of the Hacrobia taxon nov. *PLoS ONE.* 4: e7080. doi:10.1371/journal.pone.0007080.

Chantangsi, C. and Lynn, D. 2008. Phylogenetic relationships within the genus *Tetrahymena* inferred from the cytochrome c oxidase subunit 1 and the small subunit ribosomal RNA genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49: 979–987.

- Chantangsi, C., Esson, H. J., and Leander, B. S. 2008. Morphology and molecular phylogeny of a marine interstitial tetraflagellate with putative endosymbionts: *Auranticordis quadriverberis* n. gen. et sp. (Cercozoa). *BMC Microbiol.* 8: 123.
- Chantangsi, C., Lynn, D. H., Brandl, M. T., Cole, J. C., Hetrick, N., and Ikonomi, P. 2007. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of genus *Tetrahymena*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2412–2425.