รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

สัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของปรสิตบางชนิด
Morphology and molecular data of some parasites

รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคลกุล
นางสาวกนกวรรณ อรุณฤกษ์ดีวงศ์
นายฉัฐกรณ์ รังษี
นางสาวชนม์นิภา ว่องวีรวัฒนกุล
นายชวณัฐ สัตยเสวนา
นายวรัตถ์ ศิวายพราหมณ์
นางสาววริษฐา ลิ้มยังเจริญ
นายศิริศักดิ์ วงศ์ภักดี
นายอภิวัฒน์ มูลนางเดียว
นางสาวอัญญาพร สุคนธพันธ์
อาจารย์ ดร.ชิดชัย จันทร์ตั้งสี

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

จากการสำรวจระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้ในหอยน้ำจืด 5 ชนิด ที่เก็บจากแหล่งน้ำจืด 3 แห่ง ในพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี จำนวนทั้งหมด 247 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการทุบหอยและตรวจดูตัวอย่างสด พบเซอร์คาเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันจำนวน 2 สัณฐาน ได้แก่ เซอร์คาเรียหาง 2 แฉก และ เซอร์คาเรียหาง 1 แฉก จากหอยเจดีย์ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรวม 3.64% เมื่อนำเซอร์คาเรียที่แยกได้จากหอยที่ติดเชื้อทั้ง 9 ตัว มาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มจำนวนรวมทั้งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,900–3,300 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยการ BLAST และการเรียงเปรียบเทียบลำดับ พบว่า เซอร์คาเรียที่ตรวจพบสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) เซอร์คาเรีย 5 ตัว มีความใกล้เคียงกับหนอนตัวแบนในวงศ์ Transversotrematidae; (2) เซอร์คาเรีย 1 ตัว น่าจะอยู่ในวงศ์ Lecithodendriidae; และ (3) เซอร์คาเรีย 3 ตัว เป็นสมาชิกของพยาธิใบไม้ในสกุล *Centrocestus*

คำสำคัญ: เซอร์คาเรีย, หนอนตัวแบน, พยาธิใบไม้, เมตาเซอร์คาเรีย, 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 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ปรสิตที่ตรวจพบในหอยและปูที่เก็บจากพื้นที่บ่อน้ำต้นพุ 9
ตารางที่ 4 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ปรสิตที่ตรวจพบในหอยที่เก็บจากพื้นที่สถานีประมง 9

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 พื้นที่เก็บตัวอย่างหอยน้ำจืด....7
ภาพที่ 2 ตัวอย่างหอยน้ำจืดที่พบ....8
ภาพที่ 3 ตัวอย่างเซอร์คาเรียหาง 2 แฉก ที่พบในตัวอย่างหอยเจดีย์....10
ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอแสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 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 กับหนอนตัวแบนสกุลใกล้เคียง โดยพิจารณาตำแหน่ง deletion....17
ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 กับฐานข้อมูล....18
ภาพที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 กับหนอนตัวแบนสกุลใกล้เคียง โดยพิจารณาตำแหน่ง insertion....19
ภาพที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 กับหนอนตัวแบนสกุลใกล้เคียง 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 กับหนอนตัวแบนสกุลใกล้เคียง โดยพิจารณาตำแหน่ง deletion และตำแหน่งที่มีเบสร่วมกัน....24

สัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของปรสิตบางชนิด
Morphology and molecular data of some parasites

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, กนกวรรณ อรุณฤกษ์ดีวงศ์, ฉัฐกรณ์ รังษี, ชนม์นิภา ว่องวีรวัฒนกุล,
ชวณัฐ สัตยเสวนา, วรัตถ์ ศิวายพราหมณ์, วริษฐา ลิ้มยังเจริญ, ศิริศักดิ์ วงศ์ภักดี,
อภิวัฒน์ มูลนางเดียว, อัญญาพร สุคนธพันธ์ และ ชิดชัย 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 ในงานวิจัยทางด้านการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม นักวิจัยพยายามที่จะพัฒนาวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตแบบภาวะปรสิตเพื่อเป็นดัชนีประเมินสถานภาพของระบบนิเวศ โดยปรสิตอาจเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างสังคมสิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้าน สภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรมอาจมีปรสิตเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของปรสิตที่ศึกษา ในบางกรณีปรสิตที่มีความหลากหลายของชนิดและมีเป็นจำนวนมากอาจแสดงถึงสถานภาพของระบบนิเวศที่อุดมสมบูรณ์ โดยสะท้อนให้เห็นว่าระบบนิเวศดังกล่าวมีความหลากหลายของชนิดและจำนวนของเจ้าบ้านสูงด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอยู่ร่วมกันและมีความเกี่ยวโยงกันในแง่ของสายใยและห่วงโซ่อาหาร

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

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

<u>เซอร์คาเรียในหอยน้ำจืด</u>

พยาธิใบไม้เป็นหนอนพยาธิที่ก่อโรคในสัตว์หลายชนิด โดยวงชีวิตของพยาธิเหล่านี้ต้องการโฮสต์กึ่งกลาง 1 ถึง 2 ชนิด โฮสต์กึ่งกลางที่ 1 คือ พวกหอยน้ำจืดชนิดต่างๆ ตามแต่ชนิดของพยาธิใบไม้ โดยในหอยน้ำจืดจะพบตัวอ่อนระยะต่างๆ ได้แก่ สปอร์โรซิสต์ เรเดีย เซอร์คาเรีย ตามลำดับ เมื่อเซอร์คาเรียเจริญเต็มที่จะออกจากหอยน้ำจืด หากเป็นพยาธิใบไม้ในเลือดเซอร์คาเรียจะไชเข้าสู่โฮสต์สุดท้าย สำหรับพยาธิใบไม้ชนิดอื่นๆ เซอร์คาเรียจะไชเข้าไปอยู่ในโฮสต์กึ่งกลางที่ 2 ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด เช่น ปลาน้ำจืด กุ้ง หรือเกาะอยู่บนพืชน้ำ เป็นต้น แล้วเจริญไปเป็นเมตาเซอร์คาเรียซึ่งเป็นระยะติดต่อ เมื่อคน

หรือสัตว์มีกระดูกสันหลังที่เป็นโฮสต์สุดท้ายได้กินอาหารที่ปนเปื้อนเมตาเซอร์คาเรียนี้เข้าไป เมตาเซอร์คาเรียจะเจริญเป็นตัวเต็มวัยและเพิ่มจำนวนอยู่ภายในอวัยวะต่างๆ ในร่างกายของโฮสต์ตามแต่ละชนิด และขับถ่ายระยะไข่ปนเปื้อนออกมากับอุจจาระลงไปในแหล่งน้ำ (Schmidt and Roberts, 2010)

จากการศึกษาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยน้ำจืดในบางบริเวณ ได้แก่ พื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวในปี 2545 ตรวจหาเซอร์คาเรียโดยวิธีทุบเปลือกหอย 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 หอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) ตรวจหาเซอร์คาเรียโดยวิธีทุบเปลือกหอย 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) Renicolid cercariae: *Cercariacaribbea* LXVIII; และ (9) Cotylomicrocercous cercariae: *Podocotyle* (*Podocotyle*) *lepomis*

ในพื้นที่บริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี เป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติ สภาพพื้นที่มีทั้งบริเวณที่เป็นป่า ภูเขา แหล่งน้ำจืด และเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่านานาชนิด สัตว์ป่าที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้อาจขับถ่ายอุจจาระที่มีระยะไข่ปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำได้ ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะพบหอยน้ำจืดที่มีตัวอ่อนของพยาธิใบไม้อาศัยอยู่ การศึกษาตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในหอยน้ำจืดจึงมีความสำคัญต่อการศึกษาทางนิเวศวิทยาและการประเมินความสมบูรณ์ของสัตว์ในพื้นที่นั้นๆ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของปรสิตเซอร์คาเรียที่พบในหอยน้ำจืด บริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

ทฤษฎี สมมุติฐาน 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.)

จากนั้นนำตัวอย่างกลับมาศึกษาต่อในระดับสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาที่ห้องปฏิบัติการ

ภาคปฏิบัติการ: ห้องปฏิบัติการ Parasitology Laboratory และ Protistology Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดระดับสัณฐานวิทยา

1. เก็บตัวอย่างหอยในแหล่งน้ำจืด พื้นที่บริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี โดยทำการจับจำแนกชนิดโดยศึกษาจากรูปร่างและลักษณะของเปลือกตามเอกสาร Brandt (1974)

2. ตรวจหาเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดด้วยวิธี crushing method โดยทำการทุบเปลือกหอยให้แตก แล้วคีบเนื้อหอยส่วนที่นิ่มวางลงบนสไลด์และกดทับเนื้อหอยให้แบนด้วยสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง นำสไลด์มาตรวจหาเซอร์คาเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. ศึกษาสัณฐานวิทยาของเซอร์คาเรียและทำการถ่ายภาพตัวอย่างสด โดยเซอร์คาเรียบางส่วนจะทำการรักษาสภาพด้วยเอธานอลความเข้มข้น 95% เพื่อนำมาใช้ศึกษาระดับชีวโมเลกุลต่อในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดระดับชีวโมเลกุล

1. ทำการแยกเซอร์คาเรียออกเป็นตัวๆ ด้วยปิเปตต์แก้ว แล้วนำตัวอย่างเซอร์คาเรียไปล้างในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 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 ไมโครลิตร ลงในหลอด 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 เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

3. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) หรือพีซีอาร์

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ในข้อ 2. ใช้เป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับนำไปเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ One*Taq*® DNA Polymerase (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA, Cat. No. M0480) ไพรเมอร์ (primer) องค์ประกอบ และสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

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

นำหลอดพีซีอาร์ที่เติมสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรม NBHELV2:

	Heat	94 °C	เป็นเวลา	5	นาที
40 รอบ	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 โดยการสกัดแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 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 ตรวจดูผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายใต้แสงยูวี พร้อมบันทึกภาพ

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

6. ทำการรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม BioEdit เวอร์ชั่น 7.2.5 (Hall, 1999) จากนั้นตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information และทำการวิเคราะห์ลำดับด้วยโปรแกรม MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) เวอร์ชั่น 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'-ATAACAGGTCHGWRATGCCCT-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

<u>การปฏิบัติงานในภาคสนาม</u>

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, หอยจุ๊บหรือหอยขม, หอยสองฝา, หอยฝาเดียวแบบแบนขดเป็นก้นหอย, หอยฝาเดียว unknown A และปูนา (ภาพที่ 2)

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

ทำการตรวจหาเซอร์คาเรียในตัวอย่างหอยจำนวน 247 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจาก 3 พื้นที่ โดยใช้ค้อนทุบเปลือกหอยให้แตกออก แล้วใช้ปากคีบคีบเนื้อหอยส่วนที่นิ่มวางบนสไลด์ กดทับเนื้อหอยด้วยสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง จากนั้นจึงนำไปตรวจหาเซอร์คาเรียในเนื้อเยื่อของหอยน้ำจืดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และหาเปอร์เซ็นต์การพบปรสิต ดังนี้

<u>พื้นที่ที่ 1 บ่อห้วยไทรโยค</u> 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 ตรวจพบเซอร์คาเรียเฉพาะในหอยเจดีย์เป็นเซอร์คาเรียหาง 2 แฉก (furcocercous cercaria) จากหอยเจดีย์จำนวน 5 ตัว และเซอร์คาเรียหาง 1 แฉก จากหอยเจดีย์จำนวน 4 ตัว (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนปรสิตและเปอร์เซ็นต์เซอร์คาเรียที่ตรวจพบในหอยที่เก็บจากพื้นที่บ่อห้วยไทรโยค

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

<u>พื้นที่ที่ 2 บ่อน้ำต้นพุ</u> 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

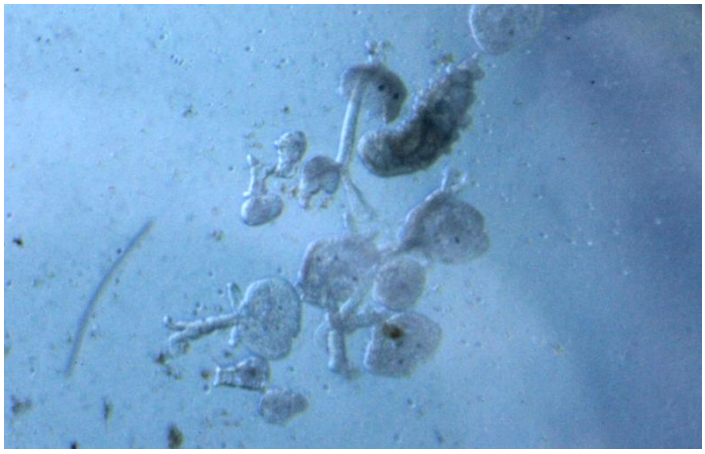
<u>พื้นที่ที่ 3 สถานีประมง</u> พิกัด Latitude: 14.343571 (14° 20' 36.86" N); Longitude: 98.937716 (98° 56' 15.78" E)

จากการศึกษาหอยจำนวน 3 ชนิด ที่เก็บได้จากพื้นที่นี้ คือ หอยเจดีย์, หอยฝาเดียวแบบแบนขด และ หอยจุ๊บหรือหอยขม จำนวน 64 ตัวอย่าง ตรวจพบเมตาเซอร์คาเรีย 2 ชนิด ชนิดที่มีหนามและไม่มีหนาม อย่างละ 1 ตัว เฉพาะในหอยจุ๊บ นอกจากนี้ ยังพบปรสิตกลุ่มซิลิเอตในหอยจำนวน 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
หอยจุ๊บ	6	3	3	50

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



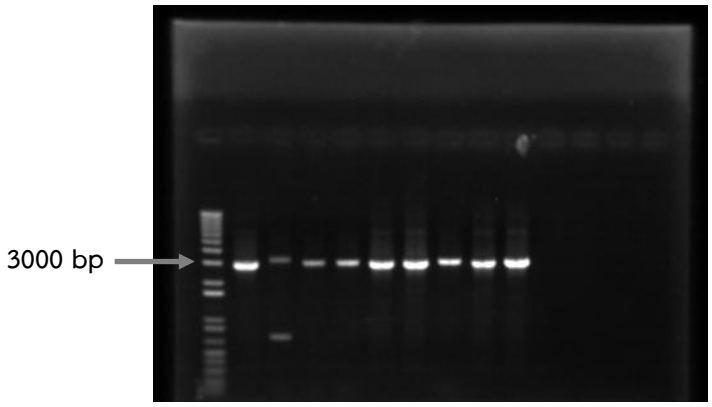
ภาพที่ 3 ตัวอย่างเซอร์คาเรียหาง 2 แฉก (furcocercous cercaria) ที่พบในตัวอย่างหอยเจดีย์ มีลักษณะลำตัวแบนสีน้ำตาลอ่อน มี eye spot ขนาดใหญ่เห็นชัดเจน และมี ventral sucker กลมใหญ่ ปลายหางแยกเป็น 2 แฉกมีลักษณะแบน (furcal tail)

<u>การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ</u>

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

จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ จากตัวอย่างเซอร์คาเรียทั้ง 2 สัณฐาน ที่ได้จากหอยเจดีย์ทั้ง 9 ตัว โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอแสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส ของยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชอร์คาเรียทั้ง 2 สัณฐานที่พบในตัวอย่างหอย จำนวน 9 ตัวอย่าง Cer1-1 ถึง Cer1-9 (เลนที่ 2-10) โดยเทียบขนาดจาก DNA marker 1 kb plus ในเลนที่ 1

<u>การศึกษาผลและวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยา</u>

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนที่ต้องการเพิ่มจำนวนแล้ว ทำการส่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยเชอร์คาเรียหาง 2 แฉก ในตัวอย่าง Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ [ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับลำดับในสายบนสุด จะแสดงด้วยสัญลักษณ์จุด (·) เท่านั้น ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไปจะแสดงด้วยสัญลักษณ์ขีด (–)]

```
Cer1-1  --------GA TCCTGCCAGT AGTCATATGC TTGTCTCGCA GACTAAGCCA TGCATGTCTA  52
Cer1-5  ACCTGGTT.. .......... .......... .......... .......... ..........  60
Cer1-6  ACCTGGTT.. .......... .......... .......... .......... ..........  60
Cer1-8  ACCTGGTT.. .......... .......... .......... .......... ..........  60
Cer1-9  ACCTGGTT.. .......... .......... .......... .......... ..........  60

Cer1-1  AGTACAAACC TAAAAACGGT GAAACCGCGA ATGGCTCATT ATATCAGATA TGGTTCCTTA 112
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 120
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 120
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 120
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 120

Cer1-1  GATCATACAT CACCACACGG ATAACTGTGG TAATTCTAGA GCTAATACGT GCCGTCATGC 172
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180

Cer1-1  CCTGACCCGC AAGGGAACGG GTGGCTTTAT TAGATCAAAA CCAACCGCGG TGAAAACCGC 232
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 240
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 240
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 240
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 240

Cer1-1  GTCGGTTGTG ATGACTCTGG ATAACTTTAT TGATCGCAGT CGGCCTCGCG CTGGCGACGG 292
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 300
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 300
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 300
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 300
```

```
Cer1-1  ATCTTTCAAA TGTCTGCCCT ATCAATTGTC GATGGTAGGT GACCTGCCTA CCATGGTGAT  352
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  360
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  360
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  360
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  360

Cer1-1  AACGGGTAAC GGGGAATCAG GGTTCGATTC CGGAGAGGGA GCCTGAGAAA CGGCTACCAC  412
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  420
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  420
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  420
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  420

Cer1-1  ATCCAAGGAA GGCAGCAGGC GCGCAACTTA CCCATTCCCG GCACGGGGAG GTAGTGACGA  472
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  480
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  480
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  480
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  480

Cer1-1  AAAATATGAA TACGGGACTC TTTTGAGGCT CCGTAATTCG AATGAGTACA CTTTAAATCC  532
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  540
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  540
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  540
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  540

Cer1-1  TTTAACGAGG AACAACTGGA GGGCAAGTCT GGTGCCAGCA GCCGCGGTAA CTCCAGCTCC  592
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  600
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  600
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  600
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  600

Cer1-1  AGTAGCGTAT ATTAAAGTTG TTGCAGTTAA AAAGCTCGTA GTTGGATCTG GGTCACATGG  652
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  660
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  660
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  660
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  660

Cer1-1  CTACATGCCA GTGCCAGATC TGATCGTGCG GTTCTTCCGT GCGGTCAGTG AGGCACGGTG  712
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  720
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  720
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  720
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  720

Cer1-1  TAGTGGTTGT GTGATCTTTC TGCCGTGTCT TTTAAAGGTG CTGACCATTT GGTGGATTTA  772
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  780
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  780
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  780
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  780

Cer1-1  TCTGTCATTT GGCTGGCATG CCTCCTGGTG CCTTTAAACG GGTGTCGGAG GCGGACGGCA  832
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  840
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  840
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  840
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  840

Cer1-1  AGTTTACTTT GAACAAATCT GAGTGCTCAA AGCAGGCCTA AGTGCCTGAA AGTCCGTGCA  892
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  900
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  900
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  900
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  900

Cer1-1  TGGAATAATG GAATAGGACT TCGGTTCTAT TTTGTTGGTT TTCAGTTCCG AAGTAATGGT  952
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  960
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  960
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  960
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  960
```

```
Cer1-1  TAAGAGGGAC AGACGGGGGC ATTTGTATGG CGGTGTTAGA GGTGAAATTC TTGGATCATC  1012
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1020
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1020
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1020
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1020

Cer1-1  GCCAGACAAA CTAAAGCGAA AGCATTTGCC AAGGATGTTT TCATTGATCA AGAGCGACAG  1072
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1080
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1080
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1080
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1080

Cer1-1  TCGGAGGTTC GAAGACGATC AGATACCGTC CTAGTTCTGA CCATAAACGA TGCCAACTGA  1132
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1140
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1140
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1140
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1140

Cer1-1  CGATCCGCGT GCGTCTTTCT GTGACCTCGT GGGCAGTCCC CGGTAAACCT TTAAGTCTTT  1192
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1200
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1200
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1200
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1200

Cer1-1  GGGCTCCGGG GGAAGTATGG TTGCAAAGCT GAAACTTAAA GGAATTGACG GAAGGGCACC  1252
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1260
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1260
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1260
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1260

Cer1-1  ACCAGGAGTG GAGCCTGCGG CTCAATTTGA CTCAACACGG GAAAACTCAC CCGGTCCGGA  1312
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1320
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1320
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1320
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1320

Cer1-1  CACTGTGAGG ATTGACAGAT TGATAGCTCT TTCATGATTC GGTGGTTGGT GGTGCATGGC  1372
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1380
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1380
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1380
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1380

Cer1-1  CGTTCTTAGT TGGTGGAGTG ATTTGTCTGG TTAATTCCGA TAACGAACGA GACTCTAGCC  1432
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1440
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1440
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1440
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1440

Cer1-1  TGCTAAATAG TATGCATGTC CTCTGCAGTT GCTTAGTTCA TGTTGTTGTT AGCCCCTAAT  1492
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1500
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1500
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1500
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1500

Cer1-1  CGGGACTACG GCGGCATTGT TCGGTGATTG CGGTGCATGT ATTTACTTCT TAGAGGGACA  1552
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1560
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1560
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1560
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1560

Cer1-1  AGTGAGCAAA ATCACACGAA ATTGAGCAAT AACAGGTCTG TGATGCCCTT AGATGTCCGG  1612
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1620
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1620
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1620
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1620
```

```
Cer1-1  GGCCGCACGT GCGCTACAAT GTTGGTTTCA ACGAGTGTGG AATCCCGGCC CGAAGGGGTT  1672
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1680
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1680
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1680
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1680

Cer1-1  GGGCAAACTG TGTCATAACC AACGTGACTG GGATCGGGGT TTGCAATTTT CCCCCGTGAA  1732
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1740
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1740
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1740
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1740

Cer1-1  CGAGGAATTC CTAGTAAGTG CAAGTCATTA GCTTGCGCTG ATTACGTCCC TGCCCTTTGT  1792
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1800
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1800
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1800
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1800

Cer1-1  ACACACCGCC CGTCGCTACT ACCGATTGAA TGGTTTAGCG AGGTCATCGG ATTGGTGCTG  1852
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1860
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1860
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1860
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1860

Cer1-1  TTGTTGCGGT GAGAGCCGCT TTAACAGCAC TGAAAAGATA ACCGAACTTG ATCATTTAGA  1912
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1920
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1920
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1920
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1920

Cer1-1  GGAAGTAAAA GTCGTAACAA GGTTTCCGTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTACAGTAA  1972
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1980
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1980
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1980
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1980

Cer1-1  TCCCAAGTTT CGTATAAAAG CACCCATGTC CCGGCGGCAA CATCAGATCG TCATATCTGG  2032
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2040
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2040
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2040
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2040

Cer1-1  AATTGCTGCG GCATAGCTTG AGGTTTTGTG CGCCTCGTAG GCCGTCGTAT CACAATCGGG  2092
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2100
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2100
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2100
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2100

Cer1-1  ACAATCCTGA GTGAGAGCTC AGTCATTGTC CCCTTGTGCG CGTGGCCAAG CGTGTCATTC  2152
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2160
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2160
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2160
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2160

Cer1-1  AGGAGTGTGC CCGAGTGAGA GCTCCGGTAC ACTCCCCCTA CCACGGGGTG CCTACCCGTT  2212
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2220
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2220
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2220
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2220

Cer1-1  GATACCCCAT AGGTTGTCTT GTGATGCGAG CGATCGTTCA CATGTTCTAA CCAGGGTGAC  2272
Cer1-5  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2280
Cer1-6  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2280
Cer1-8  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2280
Cer1-9  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  2280
```

Cer1-1 GGGATGTGCA ACAGTGGGCG TTTACGTCCA CTGTTGTGCA AGGCTCAATG AGGGTTTAGC 2332
Cer1-5 2340
Cer1-6 2340
Cer1-8 2340
Cer1-9 2340
Cer1-1 GACCCCGCCC CGCGTTTTGT TTACTGGCAA TTTTGCTACC TTTCACTGTT 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 AATGTGAACT GCTTCCTGCC 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 GAGTCTGCCA 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 CTCGTTCACC AACCTTGTTT TGGTTTATTT TGGTGTTGGG ATGTTGCCTT 2872
Cer1-5 2880
Cer1-6 2880
Cer1-8 2880
Cer1-9 2880
Cer1-1 TTTATCCTGA CCTCGGATCA GACGTGAATA CCCGCTGAAC TTAAGCATAT CACTAAGCGG 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] โดยเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในส่วนของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอไปทำการสืบค้นในฐานข้อมูล 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:

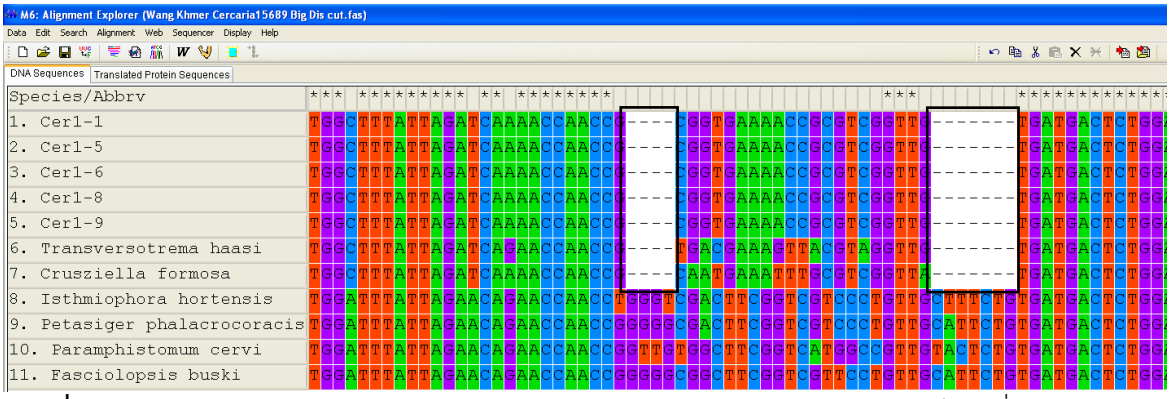
Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

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 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-1, Cer1-5, Cer1-6, Cer1-8 และ Cer1-9 จำนวน 1,970 คู่เบส กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึง 94% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของหนอนตัวแบนชนิด *Transversotrema haasi* ที่พบติดเชื้อครั้งแรกในปลาที่เก็บได้จากทะเลแดง (Red Sea fish) (Witenberg, 1944)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย 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], *Petasiger phalacrocoracis* [AY245709.1], *Paramphistomum cervi* [KJ459938.1] และ *Fasciolopsis buski* [L06668.1] พบว่าเซอร์คาเรียที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 5 ตัว มีช่วงบริเวณการหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *T. haasi* และ *C. formosa* หลายช่วงบริเวณ (ภาพที่ 6) แสดงความใกล้เคียงของเซอร์คาเรียที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับ *T. haasi* และ *C. formosa*



ภาพที่ 6 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย 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)

สำหรับเซอร์คาเรียหาง 1 แฉก 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 สามารถหาได้เพียงในส่วนของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอนั้น

เซอร์คาเรียหาง 1 แฉก ในตัวอย่าง Cer1-2 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 3,299 คู่เบส ดังแสดงด้านล่าง โดยเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในส่วนของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอไปทำการสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่า เซอร์คาเรีย Cer1-2 มีความใกล้เคียงกับหนอนตัวแบนในวงศ์ Lecithodendriidae โดยมีค่าความเหมือนของลำดับเท่ากับ 97% (ภาพที่ 7)

```
ACCGTAAAGG ACATTCTAGA GATTTAGCCA TGCATGTCAA GTACAAACCT TAAAACGGTG AAACCGCGAA   70
TGGCTCATTA AATCAGCTAT GGTTCCTTAG ACCATACCTA CTACATGGAT AACTGTAGTA ATTCTAGAGC  140
TAATACATGC CACGATGCCC TGACCCTTCG GGGGATGGGT GCATTTATTA GAACAGAACC AACCGGGTGC  210
ATTCCTTCGG TTTGCGCCTG TTATATTCTG TGATGACTCT GGATAACTTT GCTGATCGCA GTCGGCCTTG  280
TGTCGGCGAC GAGTCTTTCA AATGTCTGCC CTATCAATTG TCGATGGTAG GTGACCTGCC TACCATGGTG  350
ATAACGGGTA ACGGGGAATC AGGGTTCGAT TCCGGAGAAA GAGCCTGAGA AACGGCTACT ATTTCCAAGG  420
AAGGCAGCAG GCGCGCAACT TACCCAATCC TGGCACGGGG AGGTAGTGAC GAAAAATACG GATGCGGAAC  490
TCAACAGAGG CTCCGTAATT CGAATGAGTA CAATTCAAAT CCTTTAACGA GGATCAACTG GAGGGCAAGT  560
CTGGTGCCAG CAGCCGCGGT AACTCCAGCT CCAGAAGCGT ATATTAAATT TGTTGCAGTT AAAAAGCTCG  630
TAGTTGGATC TGGGACGCAC GGTTACGAGT CGTTTCTTGC ATTTCTAACC TGACTCCGTC GGGCCGGTTA  700
TGTGAGGCGA TTTTGTAGCT GTGTAGCCTT TCTGCCGTGT CTGTTTACGG GTGCTGACGG TCTATACGTT  770
GGCATGCTTC CAGATGCTCT TAACCGGGTG TCTGGGGCGG ACGGCAAGTT TACTTTGAAC AAATTTGAGT  840
GCTCAAAGCA GGCCTTTGCC TGACAATTCT TGCATGGAAT AATGGAATAG GACTTCGGTT CTATTTTGTT  910
GGTTTTCGGA TCCGAAGTAA TGGTTAAGAG GGACAGACGG GGGCATTTGT ATGGCGGTGT TAGAGGTGAA  980
ATTCTATGAT CATCGCCAGA CAAACTAAAG CGAAAGCATT TGCCAAGGAT GTTTTCATTA ATCTGGAGCG 1050
AAAGTCAGAG GTTCAAAGAC GATCAGATAC CGTCGTAGTT 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 ATGGCCGTTC TTAGTTGGTG GAGCGATTTG TCTGGTTAAT TCCGATAACG 1400
AACGAGACTT TGGCCTGCTA ACTAGTATGC CTGTCTCCTG CTTTCGCGCG GGTGGCGGTA GCGTCGGCCT 1470
TTCGGATTGA TGCTGCCGTT GCCGGCGAGA GCAACGCAGA TGTATACTTC TTAGAGGGAC AAGCGGTATT 1540
TAGCCGCACG AAATTGAGCA ATAACAGGTC TGTGATGCCC TTAGATGTCC GGGGCCACAC GTGCGCGACA 1610
ATGACGGTTT CAGCGAGTAT GGAGCCCTGG CTCGAAAGAG TTGGGTAAAC TGAAACATGA CCGTCGTAAC 1680
TGGGATCGGG GTTTGCAATT GTCCCCCGTG AACGAGGAAT CCCTGGTAAG TGCAAGTCAT TAGCTTGCGC 1750
TGATTACGTC CCTGCCCTTT GTACACACCG CCCGTCGCTA CTACCGATTG AGTGGTTTAG TGAGGACTTT 1820
GGATCGGTTC CATTGCAGTT GCTTCGGCAG CTCGACCGGG ACTGAAAAGA TGTCCGAACT TGATCATTTA 1890
```

```
GAGGAAGTAA AAGTCGTAAC AAGGTTTCCG TAGGTGAACC TGCGGAAGGA TCATTACAGT ATTCCCTACC 1960
CAAAATTGCT CAGTGTTCCA CTGAGTAAGC TCTGTGTCCA TGTCAGCGTA TGTGGACTGC ATGCGGCATT 2030
CGACTGCCTG TGGTGAAGCG CCCTAGTTTC ACCCGGCCCC TATGTAGCTT CGGCTGCCTG TGGTGTGGCG 2100
TGCAGTCGCA CCCGGTCCTA TGTAGTCGGA TGCAGCAGCA TGTTTTTCTA TTGATGGCTA TTCGAATATG 2170
GTTGTGCACT GAATCTGCCT GTGGTGGAGC GTTGTCAGTT TCACCCGGCC CTATGTAGCT TCGGCTGCCT 2240
GTGGTGTGGC GTGCAGTCGC ATCCGGTCCT ATGCAGTGGT GCACGGCTTT CTCAGCGGCT ATTCGAATAC 2310
GGCTGGCTTT GTGCGAGCAG TTCTCTGCCT GTGGTGAAGC GCCCTAGTTT CACCCGGCCC CTATGTAGCT 2380
TCGGCTGCCT GTGGTGTGGC GTGCAGTCGC ACCCGGTCCA ATGTAGAGTC TGCTTGCACG GGCCAACCAA 2450
CCGGGCTATA CCTGGTACGC CTAGTGCCTA CGTATAGTCC CTGCTTGATG GGGTGTCTCC CTGTCTGATG 2520
CCTTCCGGGT GCTCGCGGCC TTGCGGCTGC CAGTCCACTT CAGGGAGGTG ACAGGATGTG CTGGATCCGG 2590
CCAGTGCTAG GCTTAAAGAG TGATGTCTCG GCTACGGCCA GCTCACCGCC CTGATTGTTT GTAAAACCCA 2660
TTTTACACTG TTCAAGTGAT GCGTGCTGGC CCATGGCTGG TGCGTGTCAT TGCCCCAACA TGCACCTGGT 2730
TTCTGACCAG ACTGTATGTG CAGTCGCTCG GAGGTGCCTT GCCCCGGGTT GGACTGTGAA ACACGACGGA 2800
TGTTCGGGCA ACCGAATGTT CGAAGTGCGA ACAACTCTGA TCGGTGGATC ACTCGGCTCG TGTGTCGATG 2870
AAGAGCGCAG CCAACTGTGT GAATTAATGT GAACTGCATA CTGCCTTGAA CATCGACTTC TTGAACGCAT 2940
ATTGCGGCCA TGGGTTAGCC TATGGCCACG CCTGTCCGAG GGTCGGCTTA TAAACTATCA CGACGCCCTT 3010
AAAGTCGTGG CTTGGGTCTT GCCAACTGGC GTGATTTCCT TACACGGCCA TTGTGCTGTT TGTTGAGGTG 3080
CCAGGTCTAT GGCTTTTCCC TAATGTGTCC GGACATCGCC ATGTAAGTGT GGTGTCGGAG TCGTGGCTCA 3150
ATGATAATAG CGCGCTCCGT TAGCTGGCAT GGTTGTGTGT TGTCTGAGAC TTCTTTGTTT GTGTGTTGCG 3220
CTTACAATTG CGCTTCCCTA CCTGACCTCG GATCAGACGT GATTACCCGC TGAACTTAAG CATATCACTA 3290
AGCGGAGGA 3299
```

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

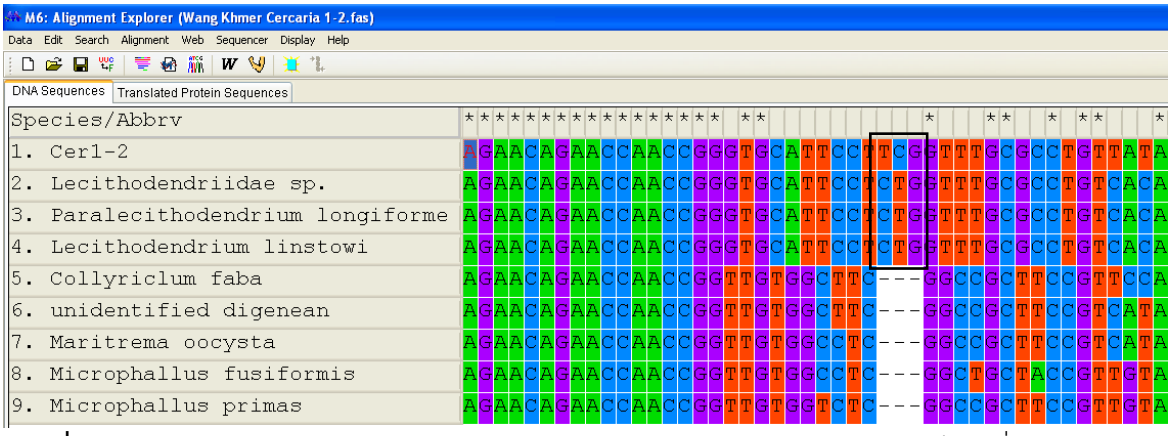
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

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

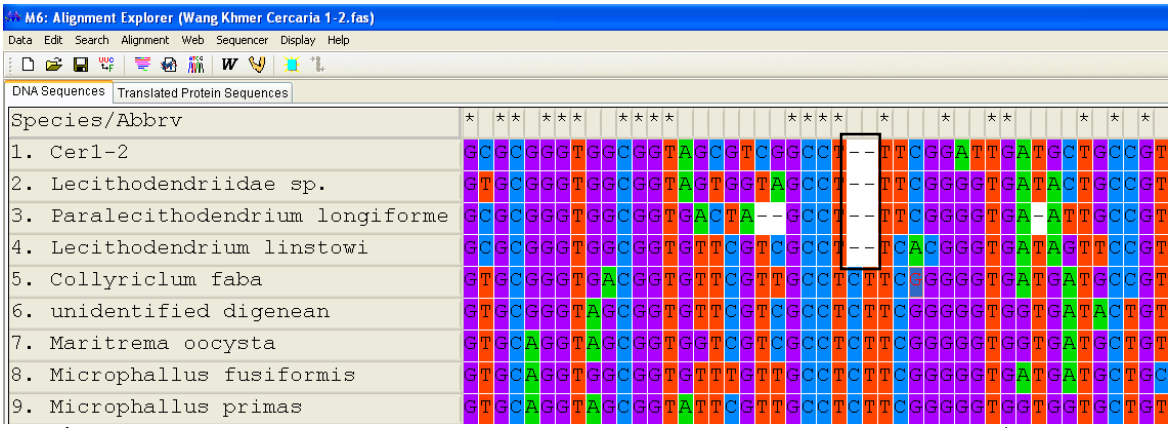
ภาพที่ 7 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 จำนวน 1,942 คู่เบส กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึง 97% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของหนอนตัวแบนที่อยู่ในวงศ์ Lecithodendriidae

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย 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

ของ Lecithodendriidae sp., *P. longiforme* และ *L. linstowi* แสดงความใกล้เคียงของเซอร์คาเรีย Cer1-2 กับหนอนตัวแบนในวงศ์ Lecithodendriidae



ภาพที่ 8 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ได้จากผลของ BLASTn 8 อันดับแรก ซึ่งมีช่วงบริเวณการเพิ่มใส่ (insertion) 1 ช่วงบริเวณ ของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Lecithodendriidae sp., *P. longiforme* และ *L. linstowi* (กรอบสีดำ)



ภาพที่ 9 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย Cer1-2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ได้จากผลของ BLASTn 8 อันดับแรก ซึ่งมีช่วงบริเวณการหายไป (deletion) 1 ช่วงบริเวณ ของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Lecithodendriidae sp., *P. longiforme* และ *L. linstowi* (กรอบสีดำ)

สำหรับเซอร์คาเรียหาง 1 แฉก ในตัวอย่าง Cer1-3, Cer1-4 และ Cer1-7 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 3,085, 1,997 และ 1,997 คู่เบส ตามลำดับ [ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับลำดับในสายบนสุด จะแสดงด้วยสัญลักษณ์จุด (·) เท่านั้น ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไปจะแสดงด้วยสัญลักษณ์ขีด (–)] ดังแสดงด้านล่าง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 สาย ที่ได้จากเซอร์คาเรียทั้ง 3 ตัว มีความเหมือนกันในตำแหน่งที่เทียบกันได้ทุกตำแหน่ง และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในส่วนของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอไปทำการสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่า เซอร์คาเรีย Cer1-3, Cer1-4

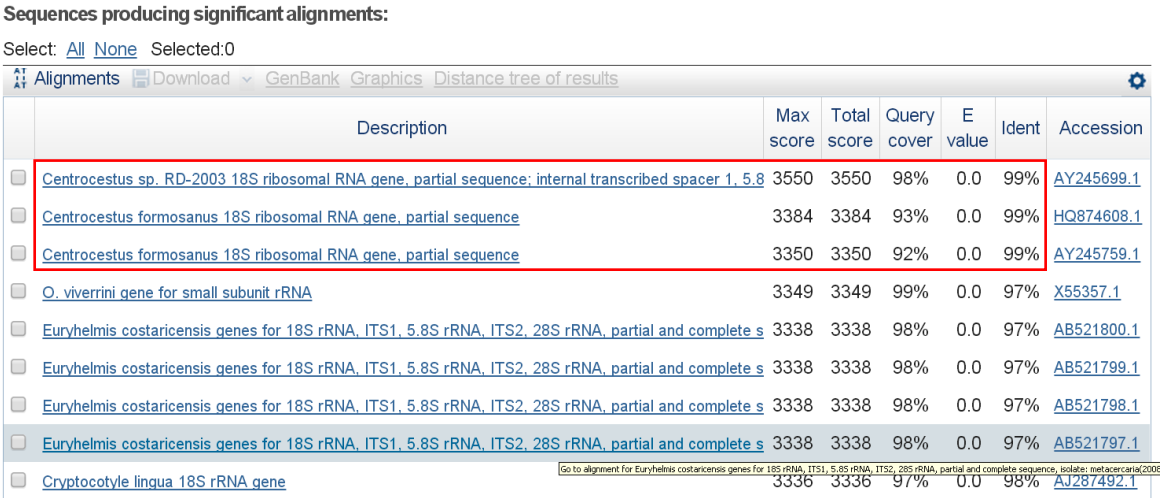
และ Cer1-7 มีความใกล้เคียงกับหนอนตัวแบนในสกุล *Centrocestus* โดยมีค่าความเหมือนของลำดับถึง 99% (ภาพที่ 10)

```
Cer1-3  ACCTGGTTGA TCCTGCCAGT AGTCATATGC TTGTCTCAGA GATTAAGCCA TGCATGTCTA  60
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  60
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  60

Cer1-3  AGTACAAACC TTCATACGGT GAAACCGCGA ATGGCTCATT AAATCAGCTA TGGTTCCTTA 120
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 120
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 120

Cer1-3  GATCGTACAT ACTACATGGA TAACTGTAGT AATTCTAGAG CTAATACATG CCACTATGCC 180
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180

Cer1-3  CTGACCCGCA AGGGAATGGG TGGATTTATT AGAACAGAAC CAACCGGTGG TGACTTCGGT 240
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 240
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 240

Cer1-3  CGCTGCCGTT GCACTCTGTG ATGACTCTGG ATAACTTTAC TGATCGCAGT CGGCCTTGTG 300
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 300
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 300

Cer1-3  TCGGCGACGG ATCTTTCAAA TGTCTGCCCT ATCAATTTTC GATGGTAGGT GACCTGCCTA 360
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 360
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 360

Cer1-3  CCATGGTGAT AACGGGTAAC GGGGAATCAG GGTTCGATTC CGGAGAGGGA GCCTGAGAAA 420
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 420
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 420

Cer1-3  CGGCTACCAC TTCCAAGGAA GGCAGCAGGC GCGCAAATTA CCCAATCCCG GCACGGGGAG 480
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 480
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 480

Cer1-3  GTAGTGACGA AAAATACGGA TACGGGACTC ATTAGAGGCT CCGTAATTCG AATGAGTACA 540
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 540
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 540

Cer1-3  ATTTAAATCC TTTAACGAGG AGCAACTGGA GGGCAAGTCT GGTGCCAGCA GCCGCGGTAA 600
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 600
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 600

Cer1-3  CTCCAGCTCC AGAAGCGTAT ATTAAAGTTG TTGCAGTTAA AAAGCTCGTA GTTGGATCTG 660
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 660
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 660

Cer1-3  GGTCGCATGG CTACATGCTG TTGCTCGTAA TCCTGGTCCG GTTCACACTG GGCTGGTTTA 720
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 720
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 720


Cer1-3  TGAGTCGGCG TCGTGGTTGT GCAGCCTTTC TGCCGTGTCT GTTTCGACAG GTGTTGGCAT 780
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 780
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 780

Cer1-3  GATTGGTGGG TTCGTCCTGC TGATCTGTCG GCATGCTTCC AGGTGCCCTT AACCGGGTGT 840
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 840
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 840

Cer1-3  CGGGGGCGGA CGGCACGTTT ACTTTGAACA AATTTGAGTG CTCAAAGCAG GCCAATGTGC 900
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 900
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 900
```

```
Cer1-3  CTGAAAATTC TTGCATGGAA TAATGGAATA GGACTTCGGT TCTATTTTGT TGGTTTTCGG  960
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  960
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  960

Cer1-3  ATCCGAAGTA ATGGTTAAAA GGGACAGACG GGGGCATTTG TATGGCGGTG TTAGAGGTGA 1020
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1020
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1020

Cer1-3  AATTCTTGGA TCGCCGCCAG ACAAACTACA GCGAAAGCAT TTGCCAAGGA TGTTTTCATT 1080
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1080
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1080

Cer1-3  GATCTGGAGC GAAAGTCAGA GGTTCGAAGA CGATCAGATA CCGTCCTAGT TCTGACCATA 1140
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1140
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1140

Cer1-3  AACGATGCCA ACTGACGATC CGTGGTGGCT CGATTATTGG CCCCGCGGGC AGTCCCCGGG 1200
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1200
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1200

Cer1-3  AAACCTTTAA GTCTTTGGGC TCCGGGGGAA GTATGGTTGC AAAGCTGAAA CTTAAAGGAA 1260
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1260
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1260

Cer1-3  TTGACGGAAG GGCACCACCA GGAGTGGAGC CTGCGGCTTA ATTCGACTCA ACACGGGAAA 1320
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1320
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1320

Cer1-3  ACTCACCCGG CCCGGACACT GTGAGGATTG ACAGATTGAT AGCTCTTTCT TGATTCGGTG 1380
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1380
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1380

Cer1-3  GTTGGTGGTG CATGGCCGTT CTTAGTTGGT GGAGCGATTT GTCTGGTTAA TTCCGATAAC 1440
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1440
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1440

Cer1-3  GAACGAGACT TTGGCCTGCT AAATAGTACG CCTGTCCTCT GTATCCGTGC GGGTGGCGGT 1500
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1500
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1500

Cer1-3  GCTCATTGCT TCTCTGATGT GATGGAGCCG TTCGCCGGCG GGTGCGGCGC AGGTGTCTAC 1560
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1560
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1560

Cer1-3  TTCTTAGAGG GACAAGCGGC GTGACAGTCG CACGAAATTG AGCAATAACA GGTCTGTGAT 1620
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1620
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1620

Cer1-3  GCCCTTAGAT GTCCGGGGCC GCACGTGCGC TACAATGACG GTTTCAACGA GTTTGGGATC 1680
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1680
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1680


Cer1-3  CTAGCCCGAA AGGGTTGGGT AAACTGAACC ATAACCGTCG TGACTGGGAT CGGGGCTTGC 1740
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1740
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1740

Cer1-3  AATTATTCCC CGTGAACGAG GAATTCCTGG TAAGTGCAAG TCATAAGCTT GCGCTGATTA 1800
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1800
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1800

Cer1-3  CGTCCCTGCC CTTTGTACAC ACCGCCCGTC GCTACTACCG ATTGAATGGT TTAGCGAGGT 1860
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1860
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... .......... 1860
```

```
Cer1-3  CATCGGATCG GTTCCAGTGT AGTTGCTTCG GCAGCTCGTC TGGAGCTGAA AAGACGACCA  1920
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1920
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1920

Cer1-3  AACTTGATCA TTTAGAGGAA GTAAAAGTCG TAACAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA  1980
Cer1-4  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1980
Cer1-7  .......... .......... .......... .......... .......... ..........  1980

Cer1-3  AGGATCATTA CAGAAAAAGA CAACCCCAAA CCCCCCCCCT CAGTCTAACT GAGAAACGCG  2040
Cer1-4  .......... .......--- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  .......... .......--- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  CGAGTCGACA TACTCGTTTG GTAAAGCAGC TTAGTCTGCC TAAGGTAAGG CGAATCAGTC  2100
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  TTGCCATTTG ACGACCAACA TGTTGGTCGT TGCATTTTGC AGTCACGACT GCCTAAGGTG  2160
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  AAGCGCCTTT AGTTTCGCCA TCTCCAGGCT ATACCTGGTA TGTGTACAAT GTATACATAC  2220
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  CTACGTACAG TCGACCTTTC GACAGGGTGC CTACCCGTCT GATGCTCTTG GTGTGCTTGC  2280
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  TACCTTTGGT GGTCAGTCCA CACTGGGAGT GACGGGATGT GCTGTCATAA TAGGCAGTGC  2340
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  TAGGCTTAAA GAGTAGGCCC GGGCTACGGC TCACCTACCG CCCTGGTTTC GTTGTTTCTA  2400
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  TCCTACCATT TTACACTGTT AAAGTGACAG GCTGGCTTGT CTGGTCTGCT TCACTGCCCC  2460
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  GACATGCACC CGGTGTTCTA CACTGGAATG CATGTGCAGT CGCCCGGCGG TGCCTTATCC  2520
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  CGGGTACGAC TTGCAAACAC GTCGTTCTTC TGGGTGACCA GTTGATCGAT ATGAGTACAA  2580
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  CTCTGAGCGG TGGATCACTC GGCTCGTGTG TCGATGAAGA GCGCAGCCAA CTGTGTGAAT  2640
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997


Cer1-3  TAATGTGAAC TGCATACTGC TTTGAACATC GACATCTTGA ACGCACATTG CGGCCATGGG  2700
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  TTTTCCTGTG GCCACGCCTG TCCGAGGGTC GGCTTATAAA CTATCACGAC GCCCAAAAAG  2760
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

Cer1-3  TCGTGGCTTG GGTCTTGCCA GCCGGCGTGA TTTCCTTGTG CTTTGCATGG GGTGCCGGAT  2820
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
```

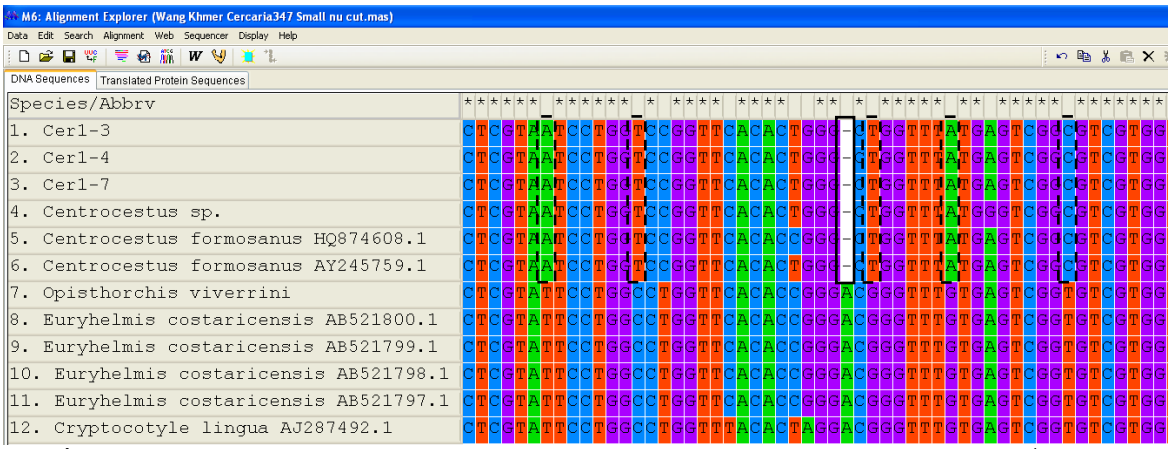
```
Cer1-3  CTATGGCTTT TCCCTAATGT GCCGGACGCA ACCATCTCCA GGCTGGCGGT CTGGATGAGG  2880
Cer1-4  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997
Cer1-7  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  1997

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

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

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

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



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

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย 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



ภาพที่ 11 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากเซอร์คาเรีย 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

การศึกษาความชุกและสัณฐานวิทยาของเซอร์คาเรียที่พบในพื้นที่ อพ.สธ. บริเวณเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2555 โดยทำการเก็บตัวอย่างหอยจากแหล่งน้ำ 3 แห่ง รวมทั้งสิ้น 247 ตัว จำแนกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ หอยฝาเดียวแบบแบนขดเป็นก้นหอย, หอยเจดีย์, หอยสองฝา, หอยจุ๊บ หรือหอยขม และหอยฝาเดียว unknown A เพื่อตรวจหาเซอร์คาเรียโดยใช้ค้อนทุบเปลือกหอยให้แตกออก และศึกษาสัณฐานวิทยาของเซอร์คาเรียจากตัวอย่างสด 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 เพื่อศึกษาทางอณูชีววิทยาโดยการเพิ่มจำนวนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมด 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 *Circuitiocoelium*, *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 พยาธิใบไม้ในวงศ์นี้ส่วนใหญ่เป็นปรสิตพบในลำไส้ของค้างคาว, สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และนก (Schell, 1970) เคยมีรายงานพบพยาธิวงศ์นี้ในคนไทย โดยพบในผู้ป่วยหญิงอายุ 44 ปี ที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ร่วมกับการติดปรสิตพยาธิใบไม้ในลำไส้และตับชนิดอื่น (Kaewkes et al., 1991) เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่าง Cer1-2 ที่ได้ พบว่า มีความใกล้เคียงกับสมาชิกหนึ่งในวงศ์ Lecithodendriidae ในฐานข้อมูลมากที่สุด โดยมีค่าความเหมือนของลำดับเท่ากับ 97% ค่าที่ได้อาจแสดงถึงเซอร์คาเรียที่พบ

ในการศึกษาครั้งนี้ อาจจะเป็นตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิใบไม้สกุลใดสกุลหนึ่งในวงศ์ 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*), ปลาซิว (*Pseudorasbora parva*), ปลากินยุง (*Gambusia affinis*), กลุ่มปลาช่อน [ได้แก่ *Channa formosana* และ *Ophicephalus tadianus*], ปลารากกล้วย (*Misgurnus anguillicaudatus*), กลุ่มปลาตะเพียน [ได้แก่ *Zacco platypus*, *Cyprinus carpio*, *Puntius semifasciolatus* และ *Putinus brevis*], ปลาบู่จักรพรรดิ (*Glossogobius giurus*), 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) นอกจากนี้เคยมีรายงานพบคนที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ลำไส้ชนิด *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

งานวิจัยครั้งนี้ผนวกเทคนิคทางด้านสัณฐานวิทยาเข้ากับเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา เข้าทำการสำรวจเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืด เพื่อใช้ช่วยในการระบุชนิดและให้ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมเพิ่มเติมจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่มีอยู่ในปัจจุบัน การริเริ่มเพิ่มเติมข้อมูลในส่วนนี้นอกจากจะช่วยให้สามารถระบุชนิดเซอร์คาเรียให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้นแล้ว ยังจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับปรสิตต่อไป เช่น ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรสิตหนอนตัวแบนในแต่ละกลุ่มแต่ละสายพันธุ์ หรือเป็นข้อมูลประกอบในการตรวจวินิจฉัยชนิดของปรสิตที่พบติดเชื้อในคนไข้ เพื่อช่วยในการรักษาได้อย่างถูกต้องและทันท่วงที

เอกสารอ้างอิง

เปรมกมล ทองคงอ่วม. 2545. *ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ในหอยน้ำจืดฝาเดียวจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี*. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิภาวี ปวราจารย์, กรภัทร แก้วเนิน และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2556. สัณฐานวิทยาของเซอร์คาเรียในหอยน้ำจืดในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 6 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ อาคารประชุมวิชาการ เฉื่อนศรีนครินทร์ 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, งบแผ่นดินปี 2552
   7.2.2 ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จังหวัดสตูล, งบแผ่นดินปี 2552
   7.2.3 ปรสิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ อพ.สธ., งบแผ่นดินปี 2553-2554
   7.2.4 การสำรวจเบื้องต้นของเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลาที่รับประทานเป็นอาหารในพื้นที่เขื่อนวชิราลงกรณ จังหวัดกาญจนบุรี, งบแผ่นดินปี 2554
   7.2.5 สัณฐานวิทยาและพยาธิสภาพของปรสิตบางชนิด, งบแผ่นดินปี 2555
   7.3 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย
   7.3.1 ความหลากหลายของโพรโทซัวและแพลงก์ตอน พื้นที่โครงการ อพ.สธ., งบแผ่นดินปี 2553
   7.3.2 ความหลากหลายของโปรโตซัวและแพลงก์ตอนในพื้นที่โครงการ อพ.สธ., งบแผ่นดินปี 2554
   7.3.3 ความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืดบางชนิด, งบแผ่นดินปี 2555

7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ผลงานวิจัย)

7.4.1 Book

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

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

7.4.2 Journal articles

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

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

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

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์, พงชัย หาญยุทธนากร และ วิมล เหมะจันทร. 2554. การสำรวจชนิดของปลาและเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลา ในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 448–456.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, วิเชฎฐ์ คนซื่อ, พงชัย หาญยุทธนากร และผุสตี ปริยานนท์. 2550. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะกูด จังหวัดตราด. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย อำเภอสัตหีบ จ. ชลบุรี*. หน้า 300.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร, วิเชฎฐ์ คนซื่อ และผุสตี ปริยานนท์. 2552. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จ.สตูล. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 4 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ สวนสัตว์เปิดเขาชียว จ. ชลบุรี*. หน้า 108.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร, วิเชฎฐ์ คนซื่อ และ ผุสตี ปริยานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของสัตว์เลื้อยคลานจากพื้นที่หมู่เกาะสิมิลัน จังหวัดพังงา. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 442–447.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร, วิเชฎฐ์ คนซื่อ และ ผุสตี ปริยานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากหมู่เกาะอ่างทอง จังหวัดสุราษฎร์ธานี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา.* หน้า 457–464.

ทัศนธร ภูมิยุทธิ์ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในป่าชายเลนปลูกบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 277–284.

ศรัณย์ อัศวานุชิต, มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร และ นิพาดา เรือนแก้ว ดิษยทัต. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในสภาพที่มีสาหร่ายไกในแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 758–768.

สุชา เฉยศิริ, ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. 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 Kaewviyudth, S. 2006. Helminths infection in snake skin gourami *Trichogastor 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, Thailalnd. *Proceedings of the 8th Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference*, April 3, 2009: 84.

2. อาจารย์ ดร.ชิดชัย จันทร์ตั้งสี

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายชิดชัย จันทร์ตั้งสี
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chitchai Chantangsi
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1002 00170 19 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

   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 โพรติสต์วิทยา (Protistology)
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

   7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

   7.1.1 การประเมินศักยภาพในการกำจัดโลหะหนักของโพรติสต์ที่สกัดจากบ่อบำบัดน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำของกรุงเทพมหานคร

   7.1.2 ความหลากหลายทางชีวภาพและการระบุชนิดของโพรติสต์บริเวณเกาะสีชัง 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 ชิดชัย จันทร์ตั้งสี. 2548. *แพลงก์ตอน*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท เวิร์ค สแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 352 หน้า.

7.3.2 Journal articles

สุชา เฉยศิริ, ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี, ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน 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.ympev.2010.07.007.

Rueckert, S., Chantangsi, C., and Leander, B. S. 2010. Molecular systematics of marine gregarines (Apicomplexa) from North-eastern Pacific polychaetes and nemerteans, 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.