

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาพันธุประชากรศาสตร์ของพยาธิใบไม้ต้บอย่างเป็นระบบโดยการวิเคราะห์พยาธิรายตัวที่มีแหล่งกำเนิดจากแหล่งระบาดในประเทศไทยและลาว ผลการจัดสร้างหอสุดจิ้นไมโครแซทเทลโลนดีเอ็นเอ (microsatellite DNA) ของพยาธิใบไม้ต้บทำให้ได้ลำดับดีเอ็นเอจำเพาะได้จำนวน 41 ขึ้นสามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อไมโครแซทเทลโลนดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้ต้บได้จำนวน 12 ตำแหน่งสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการศึกษาประชากรพันธุศาสตร์ของพยาธิ ผลการประยุกต์ใช้ไมโครแซทเทลโลนดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ตัวอย่างพยาธิใบไม้ต้บระยะตัวเต็มวัยจำนวน 150 ตัวจาก 5 ลุ่มน้ำคือ ลำปาง บุรีรัมย์ ชัยภูมิ นครพนม ในประเทศไทย และเวียงจันทร์ ประเทศลาว พบความหลากหลายของรูปแบบของยีน หรืออัลลีลซึ่งแตกต่างจากสมดุลย์ฮาร์ดีไวท์เบอร์เกอร์อย่างมีนัยสำคัญ และมีเฮเทอโรไซกอสเกิน (heterozygote excess) ซึ่งแสดงถึงการผสมพันธุ์ในลักษณะเลือดชิด หรือผสมพันธุ์ในตัวเอง (inbreeding or selfing) นอกจากนั้นผลการวิเคราะห์รูปแบบของอัลลีล พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic differentiation) ซึ่งแสดงว่าการเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ของพยาธิระหว่างลุ่มน้ำต่างๆมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ในการศึกษาต่อมาเพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบประชากรพยาธิใบไม้ต้บในแหล่งระบาดขนาดเล็กในเขตจังหวัดขอนแก่นและแหล่งระบาดขนาดใหญ่ในประเทศไทยและลาวพบว่าปัจจัยด้านระยะทางระหว่างพื้นที่ไม่มีความสัมพันธ์กับความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ลักษณะเฉพาะของพื้นที่หรือลักษณะทางภูมิศาสตร์อื่นๆ เช่นภูเขา หรือแม่น้ำที่แบ่งแยกระหว่างพื้นที่น่าจะมีอิทธิพลต่อความแตกต่างทางพันธุกรรมของพยาธิมากกว่า และระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมมีความผันแปรขึ้นอยู่กับลุ่มน้ำที่เป็นแหล่งระบาดของพยาธิ

การประยุกต์ใช้อัลโลไซม์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมโดยใช้เอ็นไซม์ 3 ชนิดในการวิเคราะห์ทางพันธุประชากรศาสตร์ของพยาธิใบไม้ต้บตามพื้นที่ เวลา และชนิดของปลาที่เป็นพาหะตัวกลางของพยาธิ พบว่าปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย และพบว่าพยาธิใบไม้ต้บมีการผสมพันธุ์ในลักษณะเลือดชิดคล้ายกับการศึกษาที่ผ่านมาโดยใช้ ไมโครแซทเทลโลนดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม นอกจากนั้นการวิเคราะห์พยาธิใบไม้ต้บจากสุวรรณเขต ประเทศลาวพบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมความคล้ายคลึง กับพยาธิจากนครพนมและสกลนครซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจัยในเชิงภูมิศาสตร์น่าจะมีความสำคัญมากกว่าการแบ่งพื้นที่การเมืองและอาณาเขตระหว่างประเทศ ผลการศึกษาครั้งนี้ได้ยืนยันว่าประชากรพยาธิใบไม้ต้บในประเทศไทยและลาวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับที่สามารถจำแนกออกเป็น cryptic species ได้เป็นอย่างน้อยจำนวน 2 สปีชีส์คือในประเทศไทยและลาว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมว่ามี cryptic species ในแหล่งระบาดอื่นๆอีกหรือไม่ และมีความสัมพันธ์หรือไม่อย่างไรกับความรุนแรงในการก่อโรค รวมทั้งอุบัติการณ์มะเร็งที่น้ำตึในประเทศไทยและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Abstract

The purpose of this study is to perform a systematic population genetic analysis of *O. viverrini* by focusing on individual worms from five distinct *O. viverrini* populations from endemic river wetlands in Thailand and Lao PDR. In this study, both novel microsatellite DNA and existing allozyme markers were used to examine population structure of *O. viverrini* in Thailand and Lao PDR. Constructions of the new microsatellite DNA libraries of *O. viverrini* provided 41 microsatellite DNA sequences. From these sequences, 12 loci were successfully employed to establish specific primers for PCR-based genotyping. Analyses of 150 adult worms from 5 major river wetlands including Lampang (LP), Buri Rum (BR), Chaiya Phum (CP), Nakhon Phanom (NP) and Vientiane (VT) revealed high allelic diversities which are significantly deviated from Hardy Weinberg equilibrium with significant heterozygote excess suggesting reproduction by inbreeding (selfing). Genetic differentiations (reflecting gene flow) between localities were also highly significant but with variable in gene flows between worms from different river wetlands.

A subsequent study on small scale (within Khon Kaen province) and large scale endemic localities (Thailand and Lao PDR) showed no correlation between genetic differentiation and separating distance. The results suggest that the nature of physical/environmental barrier or other local characteristics such as mountain range may contribute to the observed genetic differentiation and hence speciation of *O. viverrini*. Allelic profile analysis yielded pattern of inbreeding as a reproductive mode in *O. viverrini*.

Application of allozyme markers by using 3 polymorphic enzymes (*Enol*, *Pgam* and *Tpi*) to analyze genetic differentiation of *O. viverrini* at spatial, temporal and fish species revealed no significant variation. Low levels of genetic differentiations were recorded between these populations but heterozygote deficiency within locality and overall population were similar. A new *O. viverrini* population from Savannakhat (Lao PDR) which originated from across the Mekong River from Thailand are clustered with those from Nakhon Phanom and Sakon Nakhon in Thailand and Vientiane, Lao PDR. This indicated that population relatedness may associate with geographical characteristics rather than political and country boundary.

This research uncovers the existence and characteristics of population genetic variation and population sub structuring of *O. viverrini* supporting the previous hypothesis on occurrence of cryptic

or sibling species in *O. viverrini*. The results highlight the need for more study of parasite genetic variation on epidemiology of the parasite, their virulence in human host and the association with geographical incidence of CCA in Thailand as well as in Southeast Asia.