

อนุกรมวิธานและแคโรไทป์ของปลิงน้ำจืดวงศ์ย่อย Hirudinae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ  
ประเทศไทย



นางสาวจรรุวรรณ ทับทิมอ่อน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2556  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5471928923

TAXONOMY AND KARYOTYPES OF FRESHWATER LEECHES SUBFAMILY HIRUDINAE IN  
THE NORTHEASTERN THAILAND

Miss Jaruwan Tubtimon




A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Zoology  
Department of Biology  
Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2013  
Copyright of Chulalongkorn University


Thesis Title TAXONOMY AND KARYOTYPES OF FRESHWATER  
LEECHES SUBFAMILY HIRUDINAE IN THE  
NORTHEASTERN THAILAND  
By Miss Jaruwan Tubtimon  
Field of Study Zoology  
Thesis Advisor Professor Somsak Panha, Ph.D.  
Thesis Co-Advisor Assistant Professor Bangon Kongim, Ph.D.


---

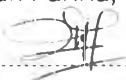
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

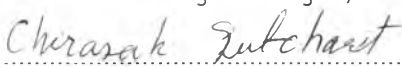
..... Dean of the Faculty of Science  
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

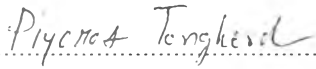
THESIS COMMITTEE

.....Chairman  
(Noppadon Kitana, Ph.D.)

.....Thesis Advisor  
(Professor Somsak Panha, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor  
(Assistant Professor Bangon Kongim, Ph.D.)

.....Examiner  
(Assistant Professor Chirasak Sutcharit, Ph.D.)

.....Examiner  
(Piyoros Tongkerd, Ph.D.)

.....External Examiner  
(Associate Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

จากรวรรณ ทับทิมอ่อน : อนุกรมวิธานและแคโรไทป์ของปลิงน้ำจืดวงศ์ย่อย Hirudinae ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. (TAXONOMY AND KARYOTYPES OF FRESHWATER LEECHES SUBFAMILY HIRUDINAE IN THE NORTHEASTERN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร.สมศักดิ์ ปัญหา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.บังอร กองอิม, 111 หน้า.

การศึกษาอนุกรมวิธานของปลิงน้ำจืดในวงศ์ย่อย Hirudinae จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 435 ตัว ที่เป็นตัวเต็มวัยจากแหล่งน้ำ 17 พื้นที่ ระหว่างเดือนเมษายน 2555 จนถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2557 จำแนกโดยลักษณะสัณฐานภายนอกและภายในได้เป็นสามชนิด คือ *Hirudinaria manillensis* (Lesson, 1842) เป็นชนิดที่พบได้ทั่วไป คิดเป็นร้อยละ 78.2 ของตัวอย่างทั้งหมด และพบทั้ง 17 พื้นที่ *Hirudinaria javanica* (Wahlberg, 1856) พบร้อยละ 20.3 จาก 5 พื้นที่ และ *Hirudinaria* sp. เป็นชนิดที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ พบเพียงหกตัวอย่างจาก 2 พื้นที่ คิดเป็นร้อยละ 1.5 โดยปลิงชนิด *H. javanica* มีลักษณะเด่นคือ ช่องเปิดเพศผู้กับช่องเปิดเพศเมียห่างกัน 7 ปล้องย่อย มี sensillae บนแวนด์ูดด้านท้ายประมาณ 4-5 อัน atrium เล็กและสั้น vagina caecum สั้นเป็นรูปไข่ ส่วนชนิด *H. manillensis* ช่องเปิดเพศผู้กับช่องเปิดเพศเมียห่างกัน 5 ปล้องย่อย มี sensillae บน แวนด์ูดด้านท้าย 4-5 อัน atrium มีขนาดใหญ่และค่อนข้างยาว vagina caecum เป็นรูปไข่ค่อนข้างยาว *Hirudinaria* sp. มีลักษณะที่แตกต่างจากทั้งสองชนิดโดยที่ช่องเปิดเพศผู้กับช่องเปิดเพศเมียมีระยะห่าง 5 ปล้องย่อย sensillae บนแวนด์ูดด้านท้ายมีเพียง 2 อัน atrium มีขนาดปานกลางและค่อนข้างยาว vagina caecum มีรูปร่างยาวรี การศึกษาแคโรไทป์ของปลิงทั้งสามชนิด พบว่า *H. manillensis* มีจำนวนโครโมโซมแฮพลอยด์และดิพลอยด์ เท่ากับ 12 ( $2n=24$ ) *H. javanica* มีเท่ากับ 13 ( $2n = 26$ ) และ *Hirudinaria* sp. มีเท่ากับ 14 ( $2n=28$ ) จากความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมแสดงให้เห็นว่า *Hirudinaria* sp. เป็นชนิดที่ต่างจากปลิงสองชนิดแรกอย่างชัดเจน แคโรไทป์ของปลิงทั้งสามชนิดมีลักษณะไม่สมมาตร ส่วนมากประกอบด้วยโครโมโซมทีโลเซนตริก ส่วนโครโมโซมที่มีสองแขนพบน้อย และมีจำนวนแตกต่างกันในปลิงแต่ละชนิด โดย *H. javanica* พบที่โครโมโซมคู่ที่ 1 ส่วน *H. manillensis* พบในโครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3 และ 5 สำหรับ *Hirudinaria* sp. พบที่โครโมโซมคู่ที่ 3 และ 5

ภาควิชา ชีววิทยา  
สาขาวิชา สัตววิทยา  
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต Jarawan Tubtimon

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก 

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม 

# # 5471928923 : MAJOR ZOOLOGY

KEYWORDS: FRESHWATER LEECHES HIRUDINEA KARYOTYPES MORPHOLOGY

JARUWAN TUBTIMON: TAXONOMY AND KARYOTYPES OF FRESHWATER LEECHES SUBFAMILY HIRUDINAE IN THE NORTHEASTERN THAILAND. ADVISOR: PROF. SOMSAK PANHA, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. BANGON KONGIM, Ph.D., 111 pp.

Taxonomy of freshwater leeches in subfamily Hirudinae from northeastern Thailand was investigated. In total, 435 specimens were collected from 17 localities during April 2012 to February 2014. Three morphological distinct species were classified: (i) the common *Hirudinaria manillensis* (Lesson, 1842) is the majority found 78.2% from 17 locations, (ii) 20.3% for *Hirudinaria javanica* (Wahlberg, 1856) from five locations, and (iii) only six samples (1.5%) for an unidentified morphospecies, *Hirudinaria* sp., from two locations. Three species show distinct diagnostic characters as follows: *H. javanica*, gonopore separated by seven annuli, 4-5 dorsal sensillae on caudal sucker per radius, atrium short and small, and vaginal caecum short and ovate; *H. manillensis*, gonopore separated by five annuli, dorsal sensillae on caudal sucker with 4-5 sensillae per radius, atrium large and relatively elongated, vaginal caecum relatively long and ovate; and *Hirudinaria* sp., gonopores separated by five annuli, dorsal sensillae on caudal sucker with two sensillae per radius, atrium moderate and somewhat elongated, and vaginal caecum long and elongated. The karyotypes of the three species were also examined. The haploid chromosome numbers were confirmed of 12 ( $2n=24$ ) for *H. manillensis*, 13 ( $2n=26$ ) for *H. javanica*, and 14 ( $2n=28$ ) for *Hirudinaria* sp. The different chromosome number suggested the unknown *Hirudinaria* sp. is a distinct biological species. Karyotypes of all species were asymmetric with mostly telocentric and difference bi-armed chromosomes in each species. The bi-armed chromosomes were found on the first pair in *H. javanica*, on pairs 1, 2, 3, and 5 in *H. manillensis*, and on pairs 3 and 5 in *Hirudinaria* sp.

Department: Biology

Field of Study: Zoology

Academic Year: 2013

Student's Signature Jarwan Tubtimon

Advisor's Signature [Signature]

Co-Advisor's Signature [Signature]



## ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful to my advisor Professor Dr. Somsak Panha and co-advisor Assistant Professor Dr. Bangon Kongim for their generous support, encouragement, and guidance throughout my studies. I would also express my sincere appreciation to the committee members: Associate Professor Dr. Kumthorn Thirakhupt, Dr. Noppadon Kitana, Assistant Professor Dr. Chirasak Sutcharit, and Dr. Piyoros Tongkerd for their constructive comments and suggestions.

I am also much indebted to Dr. Ekgachai Jeratthitikul and Dr. Nattawadee Nantarat for their kind advices on data analysis. I also thank members of Animal Systematics Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, and to Kridsada Deenin, Pramook Ruekaewma and Parinda Ratanadang from Fisheries Department, Ministry of Agriculture for assistance in collecting some material. Thanks also go to Miss Thita Krutchuen for making excellence all leech illustrations in this thesis.

This research was partly supported for student training by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund. The major funding supports were from Animal Systematics Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Finally, I would also express my deep gratitude to my parents for their encouragement, love, and caring, which make everything possible.



## CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT .....	iv
ENGLISH ABSTRACT .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
CONTENTS .....	vii
LIST OF TABLES .....	viii
LIST OF FIGURES .....	ix
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW .....	3
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS .....	19
CHAPTER IV RESULTS .....	28
CHAPTER V DISCUSSION & CONCLUSION .....	60
REFERENCES .....	67
APPENDIXES.....	71
VITA.....	111

320602390



## LIST OF TABLES

Table	Page
Table 3-1. Locality, co-ordinations and sample size of each leech species used in the present study. Locality numbers refer to the localities shown in Figure 3-1. ....	26
Table 4-1. Chromosome numbers of freshwater leeches genus <i>Hirudinaria</i> collected from northeastern Thailand. ....	57
Table 4-2. Number of salivary papillae and number of teeth of genus <i>Hirudinaria</i> . ....	58
Table 4-3. The body length and body width of freshwater leeches genus <i>Hirudinaria</i> . ....	59
Table 5-1. Comparative morphological characters among Thai <i>Hirudinaria</i> species. ...	65
Table 5-2. Comparison of chromosome numbers of the genera <i>Hirudo</i> and <i>Hirudinaria</i> . ....	66





## LIST OF FIGURES

Figure	Page
Figure 2-1. Dorsal (A) and ventral (B) view of <i>H. manillensis</i> (Lesson, 1842) showing general external characters. Specimen CUMZ 3403 collected from Nawa, Nakhon Phanom province. ....	15
Figure 2-2. Ventral dissection of the head of <i>Hirudo medicinalis</i> showing jaws.....	16
Figure 2-3. Internal characters of <i>H. javanica</i> (Wahlberg, 1856). Specimen CUMZ 3404 from Ban Donsala, Na Wa, Nakhon Phanom province.....	17
Figure 2-4. Karyotypes of three medicinal leeches species: <i>Hirudo medicinalis</i> (A) <i>Hirudo verbena</i> ; (B) <i>Hirudo orientalis</i> ; (C). (after Utevsky et al., 2009). ....	18
Figure 3-1. Map of northeastern boundary of Thailand showing sampling localities. Sampling localities are numbered referring to the list in Table 3-1 (Black squares indicate localities where failed to obtain specimens). ....	23
Figure 3-2. The measurement body length and body width of freshwater leeches..	24
Figure 3-3. Habitat characteristics of freshwater leeches that were sampled from this study (A) general paddy field; (B) several ponds with variety of aquatic plants; (C) water buffaloes that involve in paddy system were found to be the best host of leeches.....	25
Figure 4-1. Fresh preserved specimens of <i>H. javanica</i> CUMZ 3404 from Ban Donsala, Na Wa, Nakhon Phanom: (A) dorsal side, (B) ventral side.....	40
Figure 4-2. SEM images of the jaws of <i>H. javanica</i> CUMZ 3404 from Nakhon Phanom; (A) overall jaw, (B) each jaw characteristic and, (C) salivary papillae. ....	41
Figure 4-3. The reproductive system of <i>H. javanica</i> CUMZ 3404 from Ban Donsala, Na Wa, Nakhon Phanom. Abbreviations: ag = albumin gland, at = atrium, cod = common oviduct, eb = ejaculatory bulb, ep = epididymis, g = ganglion, o = ovary, ps = penis sheath, vas = vas deferens, vc = vagina sac, vd = vagina duct. ....	42
Figure 4-4. External morphology of <i>H. javanica</i> CUMZ 3404 from Nakhon Phanom showing caudal sucker and sensillae. ....	43
Figure 4-5. Color pattern variations of <i>H. javanica</i> observed in this study: (A) Type A, CUMZ 3424 from Ban Nonghai, Khamcha-i, Mukdahan, (B) Type B CUMZ 3404 from Ban Donsala, Na Wa, Nakhon Phanom.....	44
Figure 4 6. Fresh preserved specimens of <i>H. manillensis</i> CUMZ 3403 from Nakhon Phanom showing life body color; (A) dorsal side, (B) ventral side.....	45
Figure 4-7. SEM images of the jaws of <i>H. manillensis</i> CUMZ 3403 from Nakhon Phanom; (A) overall jaw, (B) each jaw characteristic and, (C) salivary papillae. ....	46



Figure 4-8. The reproductive system of <i>H. manillensis</i> CUMZ 3403 from Nakhon Phanom. Abbreviations: ag = albumin gland, at = atrium, cod = common oviduct, eb = ejaculatory bulb, ep = epididymis, g = ganglion, o = ovary, ps = penis sheath, vas = vas deferens, vc = vagina sac, vd = vagina duct.....	47
Figure 4 9. External morphology of <i>H. manillensis</i> CUMZ 3403 from Nakhon Phanom showing caudal sucker and sensillae. ....	48
Figure 4-10. Color pattern variations of <i>H. manillensis</i> observed in this study: (A) Type A, CUMZ 3425 from Huai E-pong, Phu Wiang, Khon Kaen; (B) Type B CUMZ 3427 from Ban Majang, Na Wa, Nakhon Phanom; (C) Type C CUMZ 3427 from Ban Majang, Na Wa, Nakhon Phanom. ....	49
Figure 4-11. Fresh preserved specimens of <i>Hirudinaria</i> sp CUMZ 3406 from Ban Majang, Na Wa, Nakhon Phanom. showing life body color; (A) dorsal side, (B) ventral side. ....	50
Figure 4-12. SEM images of the jaws of <i>Hirudinaria</i> sp. CUMZ 3405 from Nakhon Phanom; (A) overall jaw, (B) each jaw characteristic and, (C) salivary papillae.....	51
Figure 4 13. The reproductive system of <i>Hirudinaria</i> sp. CUMZ 3405 from Nakhon Phanom. Abbreviation: ag = albumin gland, at = atrium, cod = common oviduct, eb = ejaculatory bulb, ep = epididymis, g = ganglion, o = ovary, ps = penis sheath, vas = vas deferens, vc = vagina sac, vd = vagina duct.....	52
Figure 4-14. External morphology of <i>Hirudinaria</i> sp. CUMZ 3405 from Nakhon Phanom showing caudal sucker and sensillae. ....	53
Figure 4-15. Meiotic and mitotic metaphase chromosome spreads of (A, B) <i>H. javanica</i> (n = 13, 2n = 26), CUMZ 3424 from Ban Nonghai, Khamcha-i, Mukdahan; (C, D) <i>H. manillensis</i> (n = 12, 2n = 24), CUMZ 3407 from Ban Thatoom, Mueang, Mahasarakham; and (E, F) <i>Hirudinaria</i> sp. (n = 14, 2n = 28), CUMZ 3406 from Ban Majang, Na Wa, Nakhon Phanom. ....	54
Figure 4-16. Karyotypes of three <i>Hirudinaria</i> species: (A) <i>H. javanica</i> , (B) <i>H. manillensis</i> , and (C) <i>Hirudinaria</i> sp. ....	55
Figure 4-17. The chromosome aberration of <i>H. manillensis</i> from Ban Thatoom, Mahasarakham, CUMZ 3407 from Ban Thatoom, Mueang, Mahasarakham, showing (A-B) chromosome of undefined shape and (C-D) chromosomes in a large number.....	56

