



รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

ข้อมูลทางชีวโมเลกุลและพยาธิสภาพของ *Hepatozoon* ในกิ้งก่าบินปีกจุด
(*Draco maculatus*)

MOLECULAR DATA AND HISTOPATHOLOGY OF *HEPATOZOON* IN
DRACO MACULATUS

รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคลกุล

อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

ข้อมูลทางชีวโมเลกุลและพยาธิสภาพของ *Hepatozoon* ในกิ้งก่าบินปีกจุด
(*Draco maculatus*)

MOLECULAR DATA AND HISTOPATHOLOGY OF *HEPATOZOON* IN
DRACO MACULATUS

รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคลกุล
อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา กองทัพบก ตลอดจนเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

การติดปรสิตในกระแสดเลือดเป็นสิ่งพบได้ทั่วไปในสัตว์สี่ขาทั้งกลุ่มสัตว์เลี้ยงและกลุ่มที่พบบ่อยตามป่า อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยพบมีข้อมูลอยู่ไม่มากนักสำหรับการติดปรสิตในกระแสดเลือดของสัตว์เลื้อยคลานขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ตามป่า งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการติดปรสิตในกระแสดเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* ซึ่งเป็นกิ้งก่าขนาดเล็กดำรงชีวิตอยู่ตามต้นไม้และกินแมลงเป็นอาหารพบได้ตามป่าหลายแห่งของประเทศไทย กิ้งก่าบินปีกจุดจำนวน 8 ตัวถูกจับจากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี การตรวจหาปรสิตในกระแสดเลือดโดยการทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางแล้วย้อมด้วยสี Giemsa จากตัวอย่างเลือดของกิ้งก่าบินทั้ง 8 ตัว พบว่า 6 ตัวมีการติดปรสิต *Hepatozoon* sp. และจำนวน 2 ใน 6 ตัวนี้มีการติดปรสิต *Trypanosoma* sp. ร่วมด้วย การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อเลือดของกิ้งก่าบิน กล่าวคือ ในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดปรสิต *Hepatozoon* sp. ระยะแกมีโตไซท์ พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะมีขอบเขตไม่ชัดเจนและแตกสลายไป การเพิ่มจำนวนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอจากกิ้งก่าบินปีกจุดที่ติดเชื้อจำนวน 2 ตัว ร่วมกับการวิเคราะห์โดยใช้ BLAST ยืนยันสถานภาพทางอนุกรมวิธานว่าปรสิตที่ตรวจพบเป็นปรสิตชนิดหนึ่งในสกุล *Hepatozoon* นอกจากนี้ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนนิ่งหลายสายแสดงให้เห็นว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากกิ้งก่าบินที่ตรวจสอบทั้งสองตัวมีความคล้ายคลึงกันสูงมากและมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน ซึ่งให้เห็นว่าปรสิต *Hepatozoon* ที่ติดในกระแสดเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุดน่าจะมาจากชนิดเดียวกัน

คำสำคัญ: ปรสิต สมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอ สัตว์เลื้อยคลาน อนุชีววิทยา เอพิคอมเพลกซา

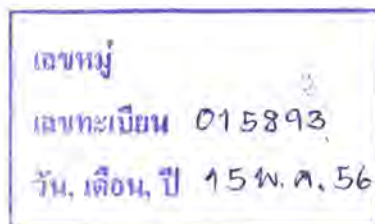
Abstract

Infection of blood parasites is commonly found in a wide variety of tetrapod vertebrates both domestic and wild ones. However, in Thailand, little is known from wild lizards of small sizes. In this study, we examined the parasitic infection in the spotted flying lizard, *Draco maculatus* – an arboreal entomophagous agamid lizard indigenous to forests throughout Thailand. A total of eight *Draco maculatus* were captured during 2011–2012 from Khao Wang Khamen, Kanchanaburi Province. Blood specimens were examined using thin-filmed blood smear preparations with Giemsa staining. Six of them were found positive with the presence of *Hepatozoon* sp. and two of which were co-infected with *Trypanosoma* sp. Microscopic observation revealed that red blood cells infecting with *Hepatozoon* gametocytes showed a sign of loss in their plasma membrane integrity. Amplification and sequencing of SSU rDNAs of the two infected lizards confirmed the same taxonomic identity of this apicomplexan parasite by BLAST analysis. Sequence and phylogenetic analyses based on SSU rDNA sequences of several clones showed high percentages of sequence similarities and their close relationships, suggesting the infection of single *Hepatozoon* species.

Keywords: parasite, small subunit ribosomal DNA, reptile, molecular biology, apicomplexa

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญเรื่อง.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
ปรสิตในกิ้งก่าบินสกุล <i>Draco</i>	2
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
การเก็บตัวอย่างกิ้งก่าบินปีกจุดจากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี.....	4
การตรวจหาปรสิตในเลือดและพยาธิสภาพที่เกิดกับเนื้อเยื่อเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด.....	4
การศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของ <i>Hepatozoon</i>	7
ผลการศึกษา.....	14
ปรสิตในเลือดและพยาธิสภาพที่เกิดกับเนื้อเยื่อเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด <i>Draco maculatus</i>	14
การศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของปรสิต <i>Hepatozoon</i> ที่พบในกิ้งก่าบินปีกจุด.....	18
ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรสิต <i>Hepatozoon</i> ที่พบในกิ้งก่าบินปีกจุด.....	30
วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา.....	33
เอกสารอ้างอิง.....	36
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	39



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การติดปรสิตในเลือดและค่าความชุกของปรสิตที่พบในเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด.....	16
ตารางที่ 2 ค่าเปรียบเทียบเป็นคู่ของจำนวนความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1,417 คู่เบสของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต <i>Hepatozoon</i> sp. จำนวนทั้งหมด 5 สาย.....	29
ตารางที่ 3 ค่าเปรียบเทียบเป็นคู่ของค่าความแตกต่าง p-distance ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1,417 คู่เบสของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต <i>Hepatozoon</i> sp. จำนวนทั้งหมด 5 สาย.....	29
ตารางที่ 4 ค่าเปรียบเทียบเป็นคู่ของค่าความแตกต่างโดยใช้ Kimura 2-parameter model ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1,417 คู่เบสของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต <i>Hepatozoon</i> sp. จำนวนทั้งหมด 5 สาย.....	30

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	เส้นทางพื้นที่สำรวจและเก็บตัวอย่างกิ่งก่าบินปีกจุด พื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี.... 4
ภาพที่ 2	การนำตัวอย่างเลือดออกจากกิ่งก่าบินปีกจุดด้วยวิธีการใช้กรรไกรตัดปลายหางเล็กน้อย..... 5
ภาพที่ 3	ส่วนปลายหางและแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางของกิ่งก่าบินปีกจุด..... 6
ภาพที่ 4	การรักษาสภาพแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางของกิ่งก่าบินปีกจุด..... 6
ภาพที่ 5	การย้อมสีแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางของกิ่งก่าบินปีกจุดด้วยสีย้อม Giemsa..... 7
ภาพที่ 6	การเก็บตัวอย่างเลือดจากกิ่งก่าบินปีกจุดเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตรวจหาปรสิตด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล..... 8
ภาพที่ 7	ลักษณะทั่วไปของกิ่งก่าบินปีกจุด <i>Draco maculatus</i> 14
ภาพที่ 8	ปรสิต <i>Hepatozoon</i> sp. ในระยะแกมีโตไซท์ที่พบในกระแสเลือดของกิ่งก่าบินปีกจุด..... 15
ภาพที่ 9	ปรสิต <i>Trypanosoma</i> sp. ที่พบในเลือดของกิ่งก่าบินปีกจุดจากพื้นที่เขาวังเขมร..... 15
ภาพที่ 10	แผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางของกิ่งก่าบินปีกจุดที่ตรวจพบว่ามีปรสิต <i>Hepatozoon</i> sp. และ <i>Trypanosoma</i> sp. พร้อมกัน..... 16
ภาพที่ 11	แผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางและพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเลือดของกิ่งก่าบินปีกจุดที่มีการติดเชื้อปรสิต <i>Hepatozoon</i> sp. ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนมาก..... 17
ภาพที่ 12	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์ SSU-NPF1 กับ SSU-R4 ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส..... 18
ภาพที่ 13	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์ SSU-NPF1 กับ SSU-Api1738R ขนาดประมาณ 1,450 คู่เบส..... 19
ภาพที่ 14	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากปรสิตในเลือดของกิ่งก่าบินปีกจุดตัวที่ 1 จำนวน 1,417 คู่เบส โคลน DmBL1C3 กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST..... 20
ภาพที่ 15	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรสิต <i>Hepatozoon</i> sp. ที่ได้จากเลือดของกิ่งก่าบินปีกจุด..... 31

ข้อมูลทางชีวโมเลกุลและพยาธิสภาพของ *Hepatozoon* ในกิ้งก่าบินปีกจุด
(*Draco maculatus*)
MOLECULAR DATA AND HISTOPATHOLOGY OF *HEPATOZOON* IN
DRACO MACULATUS

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ชิตชัย จันทร์ตั้งสี
Malinee Chutmongkonkul and Chitchai Chantangsi

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

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันนักวิจัยได้ตระหนักและเล็งเห็นถึงความสำคัญของการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับบทบาทของปรสิตในระบบนิเวศมากขึ้น เนื่องจากการดำรงชีวิตของปรสิตมีความสัมพันธ์ต่อจำนวนประชากรและสังคมของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศที่ดำรงชีวิตเป็นเจ้าบ้านของปรสิต ยิ่งไปกว่านั้น การดำรงชีวิตของปรสิตยังมีผลกระทบต่อสุขภาพ อนามัย และความเป็นอยู่ของมนุษย์อีกด้วย

ในงานวิจัยทางการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม นักวิจัยบางกลุ่มพยายามที่จะพัฒนาวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตแบบภาวะปรสิตเพื่อใช้เป็นดัชนีประเมินสถานภาพของระบบนิเวศ โดยปรสิตอาจเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างทางสังคมของสิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้าน สภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรมอาจมีปรสิตเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปรสิตที่ศึกษา ในบางกรณีปรสิตที่มีความหลากหลายของชนิดและมีเป็นจำนวนมากอาจแสดงถึงสถานภาพของระบบนิเวศที่อุดมสมบูรณ์ โดยสะท้อนให้เห็นว่าระบบนิเวศดังกล่าวมีความหลากหลายของทั้งชนิดและจำนวนของเจ้าบ้านสูงด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อาศัยอยู่ร่วมกันและมีความเกี่ยวโยงกันในแง่ของห่วงโซ่และสายใยอาหาร

การศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตแบบปรสิตกับเจ้าบ้าน ซึ่งมีวิวัฒนาการร่วมกันมาช้านานจึงมีความจำเป็นและสำคัญยิ่ง อย่างไรก็ตาม ความเข้าใจที่แท้จริงจะก่อเกิดมิได้ หากขาดการศึกษาระดับพื้นฐานทางชีววิทยา ได้แก่ อนุกรมวิธาน พันธุศาสตร์ นิเวศวิทยา จีสเต็มติกส์ (systematics) และ ไฟโลเจเนติกส์ (phylogenetics) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่เกี่ยวข้อง ซึ่งการได้มาของข้อมูลเหล่านี้จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ความรู้ความเข้าใจถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปรสิตกับสิ่งมีชีวิตอื่นทั้งในทางการแพทย์ การเกษตร และการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพและก่อประโยชน์สูงสุด

ปรสิตในกิ้งก่าบินสกุล *Draco*

กิ้งก่าบิน (flying dragon หรือ flying lizard) ในสกุล *Draco* เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานที่พบกระจายทั่วไปในหลายภูมิภาค และประกอบด้วยสมาชิกในสกุลมากกว่า 30 ชนิด (วิริยุทธิ์ เสาหะจินดา, 2552) การศึกษาปรสิตของกิ้งก่าบินหลายชนิดในสกุลนี้ (*Draco* spp.) พบว่ามีรายงานมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 แต่ยังมีการศึกษาอยู่ไม่มากนัก

Laird (1960) รายงานพบเชื้อมาลาเรียในเลือดของกิ้งก่าบินหัวสีฟ้า *Draco volans* จากตัวอย่างที่เก็บจาก Hulu Langat, Selangor ประเทศมาเลเซียจำนวน 1 ตัว โดยตั้งชื่อเชื้อที่พบว่า *Plasmodium vastator* Laird, 1960 ซึ่งระยะโทโฟซอइट (trophozoite) ของเชื้อที่พบใหม่นี้มีลักษณะเหมือนอะมีบาสูง (highly amoeboid) และมีระยะแกมีโตไซท์ (gametocyte) ขนาดใหญ่ ซึ่งก่อพยาธิสภาพและทำลายเซลล์เม็ดเลือดของเจ้าบ้าน

Telford (1986) ศึกษาปรสิตในเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* ในประเทศไทยจำนวน 14 ตัว ในจำนวนที่จับได้นั้น 1 ตัว พบการติดเชื้อผสม คือ *Fallisia* และ *Plasmodium* สกุลย่อย *Carinamoeba* โดยชนิดหนึ่งพบเฉพาะในเซลล์เม็ดเลือดชนิด thrombocyte และได้ตั้งชื่อไว้ว่า *Plasmodium (Fallisia) siamense* ส่วนอีกชนิดหนึ่งพบในเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งจำแนกไว้ในสกุล *Plasmodium* แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1988 Telford ได้ย้าย *Plasmodium (Fallisia) siamense* มาไว้ในสกุล *Fallisia* เนื่องจาก *Fallisia* เป็นสกุลของเชื้อปรสิตในเลือดที่วางชีวิตไม่มียุคที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Telford, 1995)

Telford (1995) ได้รายงานพบเชื้อมาลาเรียในกิ้งก่าบินหัวสีฟ้าในประเทศฟิลิปปินส์ สามารถจำแนกได้เป็น *Plasmodium vastator* และชนิดใหม่อีก 2 ชนิด ได้แก่ *Plasmodium draconis* และ *Plasmodium volans* โดยทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะรูปร่างและขนาดของ schizont จำนวนของ merozoite และแกมีโตไซท์แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบโปรโตซัวในกลุ่ม haemogregarine ติดเชื้อในเซลล์เม็ดเลือด monocyte และ erythroblast ในกิ้งก่าบินหัวสีฟ้านั้นด้วย แต่ไม่พบข้อมูลรายงานในรายละเอียด

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และคณะ (2548) ได้ศึกษาปรสิตในเลือดของกิ้งก่าบินหลายชนิด (*Draco* spp.) ที่พบในพื้นที่เกาะช้าง จังหวัดตราด ทางภาคตะวันออกของประเทศไทย และ พื้นที่เกาะพระทองและเกาะระ จังหวัดพังงา ฝั่งทะเลอันดามัน ทางภาคใต้ของประเทศไทย พบว่า กิ้งก่าบินปีกจุดที่พบจากพื้นที่เกาะช้าง มีการติดเชื้อหนอนพยาธิตัวกลมในกลุ่ม microfilaria

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และคณะ (2552) ได้ศึกษาปรสิตในเลือดของกิ้งก่าบิน (*Draco* spp.) จากเกาะกูด จังหวัดตราด พบว่า กิ้งก่าบินปีกจุดมีการติดเชื้อปรสิต 4 ชนิด ได้แก่ *Fallisia* sp., haemogregarine 1 ชนิด, *Plasmodium* sp. และ *Trypanosoma* sp. สำหรับกิ้งก่าบินปีกลาย *Draco taeniopterus* พบมีการติดเชื้อหนอนพยาธิตัวกลมในกลุ่ม microfilaria

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และคณะ (2554) ได้ศึกษาปรสิตในเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* จากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี พบว่ากิ้งก่าบินปีกจุดในพื้นที่ดังกล่าวมีการติดเชื้อปรสิตกลุ่ม haemogregarine โดยมีความชุก (prevalence) เท่ากับ 66.7% โดยเชื้อปรสิตที่พบยังไม่

สามารถจำแนกได้ถึงระดับสกุลระดับชนิด และยังไม่ได้มีการศึกษาถึงพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจากการติดปรสิตดังกล่าวอย่างชัดเจน

การใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลในการจำแนกและระบุกลุ่ม สกุล และชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สำรวจพบเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับว่าให้ผลที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง อีกทั้งยังมีการใช้แพร่หลายในปัจจุบันในสิ่งมีชีวิตหลายกลุ่มตั้งแต่จุลชีพที่มีขนาดเล็กไปจนถึงสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดใหญ่ (Chantangsi *et al.*, 2007) โดยข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่นิยมใช้อันหนึ่ง คือ การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่พบได้ในพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่กำลังศึกษา หนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (small subunit ribosomal DNA หรือ SSU rDNA) ซึ่งเป็นยีนที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและมีผู้นิยมศึกษามาก ทำให้ในปัจจุบันมีฐานข้อมูลของยีนนี้ในสิ่งมีชีวิตหลายกลุ่มหลายชนิด ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิจัยเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตที่กำลังศึกษา นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอยังสามารถนำมาใช้ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่กำลังศึกษากับสิ่งมีชีวิตอื่นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการแสดงและทำนายรูปแบบของวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นในสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่กำลังศึกษา (Chantangsi and Leander, 2010)

งานวิจัยครั้งนี้จึงนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการระบุกลุ่ม สกุล และชนิด ตลอดจนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรสิตที่สำรวจพบในเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* จากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี โดย มาลินี ฉัตรมงคลกุล และคณะ ในปี พ.ศ. 2554 นอกจากนี้ยังทำการศึกษาพยาธิสภาพที่อาจมีขึ้นจากปรสิตในเลือดที่ตรวจพบต่อเนื้อเยื่อเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุดเจ้าบ้าน ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะนำไปสู่ความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างปรสิตและเจ้าบ้าน และยังเป็นแนวทางในการช่วยทำนายการแพร่กระจายหรือภาวะการระบาดของปรสิต อันจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ การเกษตร และการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืนและมีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลและพยาธิสภาพของ *Hepatozoon* ในกิ้งก่าบินปีกจุด (*Draco maculatus*) ในพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างกิ่งก่าบินปีกจุดจากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

ทำการเก็บตัวอย่างกิ่งก่าบินปีกจุดจากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี 2 ครั้ง ได้แก่ ระหว่างวันที่ 19-21 สิงหาคม 2554 และ 27-29 เมษายน 2555 เก็บตัวอย่างได้รวม 8 ตัว โดยตัวอย่างกิ่งก่าบินที่เก็บได้มาจากพื้นที่ทางเดินสำรวจบริเวณช่องเขาขาด (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงเส้นทางพื้นที่สำรวจและเก็บตัวอย่างกิ่งก่าบินปีกจุด ทางเดินบริเวณช่องเขาขาด พื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

2. การตรวจหาปรสิตในเลือดและพยาธิสภาพที่เกิดกับเนื้อเยื่อเลือดของกิ่งก่าบินปีกจุด

การตรวจหาปรสิตในเลือดของกิ่งก่าบินปีกจุดที่จับมาได้ โดยใช้กรรไกรตัดปลายหางเล็กน้อย (ประมาณ 1-2 เซนติเมตร จากปลายหาง) (ภาพที่ 2) บีบไล่เลือดมาที่บริเวณปลายหางและแตะหยุดเลือดลงบนกระจกสไลด์ ใช้กระจกสไลด์อีกแผ่นไถไปที่หยุดเลือดที่อยู่บนกระจกสไลด์เพื่อทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบาง (ภาพที่ 3) รักษาสภาพเนื้อเยื่อเลือดโดยการจุ่มลงใน methanol 100% (ภาพที่ 4) จากนั้นย้อมด้วยสี Giemsa (1:10 ใน phosphate buffer, pH 7.2) เป็นเวลา 20-30 นาที (ภาพที่ 5) ล้างสีย้อมออกด้วย

น้ำประปา ทิ้งสไลด์ไว้จนแห้ง แล้วจึงนำมาตรวจดูปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยในขั้นแรกตรวจด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่ำก่อนเพื่อหาปรสิตขนาดใหญ่ เช่น trypanosome แล้วจึงปรับมาที่กำลังขยายสูงเพื่อหาปรสิตที่อยู่ภายในเม็ดเลือดแดง และศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดกับเนื้อเยื่อเลือดและเซลล์เม็ดเลือดจากแผ่นฟิล์มเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคำนวณหาค่าความชุก (prevalence) จากสูตร

$$\text{ค่าความชุก (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวสัตว์ที่ติดปรสิต}}{\text{จำนวนตัวสัตว์ที่ตรวจทั้งหมด}} \times 100$$



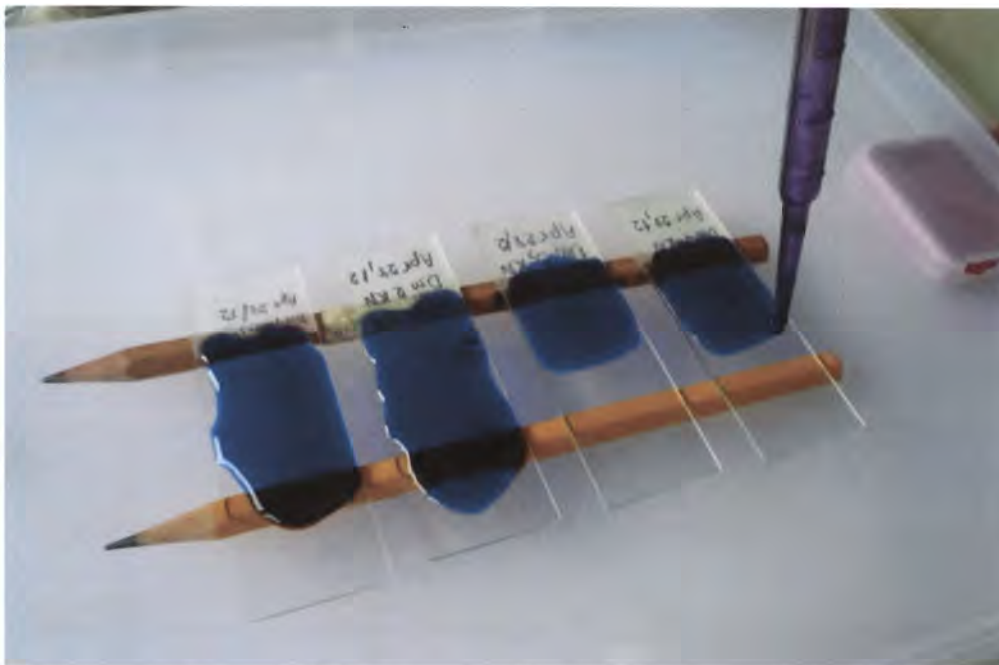
ภาพที่ 2 แสดงการนำตัวอย่างเลือดออกจากกึ่งกำบังจุดด้วยวิธีการใช้กรรไกรตัดปลายทางเล็กน้อย



ภาพที่ 3 แสดงส่วนปลายทางและแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางของกิ้งก่าบินปีกจุด (ลูกศร) ที่เตรียมไว้เพื่อนำไปรักษาภาพและย้อมสีในขั้นต่อไป



ภาพที่ 4 แสดงการรักษาภาพแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางของกิ้งก่าบินปีกจุดด้วย methanol 100%



ภาพที่ 5 แสดงการย้อมสีแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางของกิ่งกำบับปีกจุดด้วยสีย้อม Giemsa เป็นเวลา 20-30 นาที จากนั้นจึงล้างสีย้อมออกด้วยน้ำประปา ทิ้งให้แห้งก่อนนำไปตรวจดูปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของ *Hepatozoon*

การศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของ *Hepatozoon* ที่ดำรงชีวิตเป็นปรสิตในกิ่งกำบับปีกจุด ด้วยการเพิ่มจำนวนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (small subunit ribosomal DNA หรือ SSU rDNA) มีรายละเอียดดังนี้

3.1 การสกัดดีเอ็นเอของ *Hepatozoon* โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit ของ EPICENTRE (Madison, WI, USA, Cat. No. MC85200) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด ดังนี้

(1) ใช้กรรไกรที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ตัดปลายหางของกิ่งกำบับปีกจุด

(2) ใช้นิ้วบีบไล่เลือดจากหางของกิ่งกำบับปีกจุด และปลายหางที่มีหยดเลือดลงผนังด้านในของหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 2X Tissue and Cell lysis buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร อยู่ (ภาพที่ 6)

(3) เขย่าผสมตัวอย่างเลือดกับ 2X Tissue and Cell lysis buffer ให้เข้ากัน

(4) เติมเอนไซม์ proteinase K ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง และผสมให้เข้ากันบนเครื่อง vortex mixer

(5) เติมน้ำ ultrapure ลงในตัวอย่างให้ได้ปริมาตรสุทธิ 300 ไมโครลิตร



ภาพที่ 6 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือดจากกิ่งกำปับนปีกจุดลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตรวจหาปรสิต *Hepatozoon* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

(6) นำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีตัวอย่างเลือดไปตั้งบนเครื่องให้ความร้อน (heat block) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-9 ชั่วโมง และทำการเขย่าเป็นระยะๆ

(7) นำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีตัวอย่างไปแช่บนน้ำแข็ง เพื่อลดอุณหภูมิเป็นเวลา 3-5 นาที

(8) ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดสารละลาย MPC protein precipitation ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีตัวอย่าง เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาอย่างน้อย 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน

(9) ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดส่วนน้ำใสไปใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทั้งส่วนตะกอนกันหลอดไป

(10) ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูด isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีตัวอย่างอยู่ กลับหลอดขึ้นลง 30-40 ครั้ง เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

(11) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง เหลือส่วนของดีเอ็นเอที่ตกตะกอนไว้กันหลอด

(12) เติมเอทานอลความเข้มข้น 75% ลงในหลอดตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้วใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใสออก ทำซ้ำ 2 ครั้ง

(13) นำหลอดตัวอย่างไปตั้งโดยเปิดฝาไว้บนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเอทานอลในหลอดระเหยออกไปจนหมด

(14) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ทีอี (Tris EDTA buffer: TE) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ นำตัวอย่างดีเอ็นเอไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทำปฏิกิริยาขั้นต่อไป

3.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction: PCR) หรือพีซีอาร์

(1) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ข้างต้นเป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับนำไปเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ KAPA2G™ Robust HotStart PCR Kit (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA, Cat. No. KK5531) โพรเมอร์ (primer) และสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

[1] 5X KAPA2G Buffer A	5	ไมโครลิตร
[2] dNTP mix (10 mM each)	0.5	ไมโครลิตร
[3] Forward primer: SSU-NPF1 (5'-TGCGCTACCTGGTTGATCC-3')		
ความเข้มข้น 10 µM	2	ไมโครลิตร
[4] Reverse primer: SSU-R4 (5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3')		
ความเข้มข้น 10 µM	2	ไมโครลิตร
[5] ดีเอ็นเอจากข้อ (14)	4	ไมโครลิตร
[6] PCR grade water	11.3	ไมโครลิตร
[7] KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase (5 units/µl)	0.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุดท้าย	25	ไมโครลิตร

นำหลอดพีซีอาร์ที่เติมสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรม COIKP50:

	Heat	95 °C	เป็นเวลา	3	นาที	
45 รอบ	{	Denaturation step	95 °C	เป็นเวลา	30	วินาที
		Annealing step	50 °C	เป็นเวลา	30	วินาที
		Extension step	72 °C	เป็นเวลา	1	นาที
		Final extension step	72 °C	เป็นเวลา	10	นาที
	Hold step	20 °C	จนกว่าจะนำปฏิกิริยาออกจากเครื่อง			

(2) นำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาครั้งแรก (primary PCR) ข้างต้นไปใช้เป็นแม่พิมพ์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นต่อไป (secondary PCR) โดยเติมสารในการทำปฏิกิริยาตามลำดับ ดังนี้

[1] 5X KAPA2G Buffer A	5	ไมโครลิตร
[2] dNTP mix (10 mM each)	0.5	ไมโครลิตร

[3] Forward primer: SSU-NPF1 (5'-TGCGCTACCTGGTTGATCC-3')		
ความเข้มข้น 10 μ M	2	ไมโครลิตร
[4] Reverse primer: SSU-Api1738R (5'-GACCTGTRTWGCCTHAMRCTTCC-3')		
ความเข้มข้น 10 μ M	2	ไมโครลิตร
[5] ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งแรกข้างต้น	1	ไมโครลิตร
[6] PCR grade water	14.3	ไมโครลิตร
[7] KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase (5 units/ μ l)	0.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุดท้าย	25	ไมโครลิตร

โปรแกรม COIKP55:

นำหลอดพีซีอาร์ที่เติมสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

	Heat	95 °C	เป็นเวลา	3	นาที
45 รอบ	{	Denaturation step	95 °C	เป็นเวลา	30 วินาที
		Annealing step	55 °C	เป็นเวลา	30 วินาที
		Extension step	72 °C	เป็นเวลา	1 นาที
	Final extension step	72 °C	เป็นเวลา	10	นาที
	Hold step	20 °C	จนกว่าจะนำปฏิกิริยาออกจากเครื่อง		

โดยยีนและช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นมา คือ บริเวณ ribosomal DNA (rDNA) ที่ประกอบด้วย ยีน 18S หรือ SSU rDNA (small subunit ribosomal DNA) ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ SSU-NPF1 และ SSU-R4 ประมาณ 1,800 คู่เบส (base pair: bp) และจากไพรเมอร์ SSU-NPF1 และ SSU-Api1738R ประมาณ 1,450 คู่เบส

(3) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ (1) และ (2) โดยการสกัดแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis) ใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 0.8% และสารละลายบัฟเฟอร์ทีเออี (Tris Acetate EDTA buffer: TAE) พร้อม molecular marker ชนิด 1 kb plus (Invitrogen, Grand Island, NY, USA, Cat. No. 10787-018) โดยตั้งค่าแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

(4) หลังจากครบ 30 นาที นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที

(5) ล้างสารละลาย ethidium bromide ส่วนเกินออกโดยนำแผ่นเจลไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจดูผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายใต้แสงยูวี พร้อมบันทึกภาพ

(6) ทำปฏิกิริยาซ้ำในข้อ (1)-(5) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นมากพอเพื่อใช้ในการโคลนยีนลงไปในแบคทีเรียต่อไป

(7) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้งหมดจากข้อ (6) ไปสกัดแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 0.8% และสารละลายบัฟเฟอร์ทีเออีตามข้อ (3) จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมตามข้อ (4)-(5)

(8) นำแผ่นเจลไปตรวจดูภายใต้แสงยูวีและใช้ไบมิตที่สะอาดตัดเอาเฉพาะเจลในส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3 การทำความสะอาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย UltraClean™ 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA, Cat. No. 12100-300)

(1) เติม ULTRA SALT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีแถบเจลดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการบรรจุอยู่ ผสมให้เข้ากัน

(2) นำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ไปตั้งบนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เจลละลายจนหมด นำหลอดออกจากเครื่องให้ความร้อน ทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

(3) ใส่ ULTRA BIND ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ลงในสารละลายเจลข้อ (2) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

(4) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและเก็บส่วนตะกอน ULTRA BIND ที่ก้นหลอดไว้

(5) เติม ULTRA WASH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ ดูดสารขึ้นลงให้ ULTRA WASH ผสมกับ ULTRA BIND จนไม่เหลือส่วนของ ULTRA BIND เป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด

(6) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและเก็บส่วนตะกอน ULTRA BIND ที่ก้นหลอดไว้

(7) ทำซ้ำในข้อ (5) และ (6)

(8) นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดส่วน ULTRA WASH ที่เหลืออยู่ในหลอดออกจนหมด

(9) นำหลอดตัวอย่างไปตั้งโดยเปิดฝาไว้บนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง ULTRA WASH ในหลอดระเหยออกไปจนหมด ประมาณ 5 นาที

(10) ละลายดีเอ็นเอออกจาก ULTRA BIND โดยเติมน้ำ ultrapure water ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันให้เข้ากับ ULTRA BIND จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที

(11) นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ส่วนของ ULTRA BIND ตกติดมากับส่วนน้ำใส

(12) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทำปฏิกิริยาขั้นต่อไป

3.4 การโคลนยีน SSU rDNA ของ *Hepatozoon* ที่เพิ่มจำนวนได้ โดยใช้ชุดโคลนนิ่ง StrataClone™ PCR Cloning Kit (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA, Cat. No. 240205) ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

(1) เติมสารต่อไปนี้ตามลำดับลงในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร

- StrataClone™ Cloning Buffer 3 ไมโครลิตร
- ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำความสะอาดแล้วของยีน SSU rDNA 2 ไมโครลิตร
- StrataClone™ Vector Mix 1 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

(2) เมื่อครบ 5 นาทีแล้ว นำหลอดปฏิกิริยาไปตั้งบนน้ำแข็ง

(3) นำหลอด StrataClone SoloPack competent cells ออกจากตู้ให้ความเย็น -80 องศาเซลเซียส และวางบนน้ำแข็งจนละลาย

(4) ดูปฏิกิริยาในข้อ (1) เติมลงใน StrataClone SoloPack competent cells ที่ละลายแล้ว ผสมให้เข้ากันเบาๆ ตั้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

(5) heat shock ปฏิกิริยาในข้อ (4) ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที

(6) นำหลอดตัวอย่างไปวางบนน้ำแข็งทันที และตั้งไว้เป็นเวลา 2 นาที

(7) เติมสารละลาย SOC ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ลงในหลอดตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร

(8) นำหลอดตัวอย่างไปเขย่าในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(9) หลังจาก 1 ชั่วโมง ดูปฏิกิริยาในข้อ (8) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LB agar) ซึ่งมียาปฏิชีวนะ ampicillin อยู่และเติม X-gal 2% ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ก่อนหน้านั้น เกลี่ย (spread) ปฏิกิริยาให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ

(10) ทำซ้ำในข้อ (9) กับปฏิกิริยาที่เหลืออยู่ในจานเพาะเชื้อใหม่

(11) บ่มจานเพาะเชื้อทั้งสองในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมง

(12) ตรวจสอบโคโลนีขาวและโคโลนีน้ำเงินหลังจากบ่มปฏิกิริยาไว้ข้ามคืน โดยโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาวจะมีชั้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปอยู่

3.5 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสหรือพีซีอาร์จากโคโลนีของแบคทีเรีย (colony PCR)

(1) ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จิ้มที่โคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาว

(2) นำไม้จิ้มฟันในข้อ (1) ไปแกว่งในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่มีน้ำ ultrapure water อยู่ 10 ไมโครลิตร

(3) ทำซ้ำในข้อ (1) และ (2) กับโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาว 6-8 โคโลนี

(4) ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก โดยการนำหลอดตัวอย่างใส่ลงในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(5) ใช้สารละลายในข้อ (4) เป็นแม่พิมพ์สำหรับนำไปเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ GeNei™ Red Dye PCR Master Mix (2X) (Merck Ltd., Klongtoey, Bangkok, Thailand, Cat. No. 61060210003) ไพรมเมอร์ (primer) และสภาวะในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

[1] GeNei™ Red Dye PCR Master Mix (2X) 5 ไมโครลิตร

[2] Forward primer: T3 (5'- ATTAACCCTCACTAAAG-3')
ความเข้มข้น 10 µM 1 ไมโครลิตร

[3] Reverse primer: T7 (5'- AATACGACTCACTATAG-3')
ความเข้มข้น 10 µM 1 ไมโครลิตร

[4] ดีเอ็นเอจากข้อ (4)	2	ไมโครลิตร
[5] PCR grade water	1	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุดท้าย	10	ไมโครลิตร

นำหลอดพีซีอาร์ที่เติมสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรม BAC50:

35 รอบ	{	Heat	95 °C	เป็นเวลา	5	นาที
		Denaturation step	95 °C	เป็นเวลา	1	นาที
		Annealing step	50 °C	เป็นเวลา	1	นาที
		Extension step	72 °C	เป็นเวลา	1:30	นาที
		Final extension step	72 °C	เป็นเวลา	10	นาที
		Hold step	20 °C	จนกว่าจะนำปฏิกิริยาออกจากเครื่อง		

(6) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยการสกัดแยกด้วยกระแสไฟฟ้าเช่นเดียวกับ 3.2 ข้อที่ (3)-(5)

(7) ในกรณีที่โคลนที่ถูกเลือกมียื่นที่ต้องการโคลนอยู่ให้ทำซ้ำในข้อ (5)-(6) ให้ได้ผลิตภัณฑ์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หรือให้มีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอเพียงพอในการส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของยีนที่ต้องการด้วยโปรแกรมที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติแบบธรรมดา (normal automatic sequencing) ด้วยเครื่อง 3730XL DNA sequencer โดยทำการส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสหรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในข้อ 3.5 (7) ไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

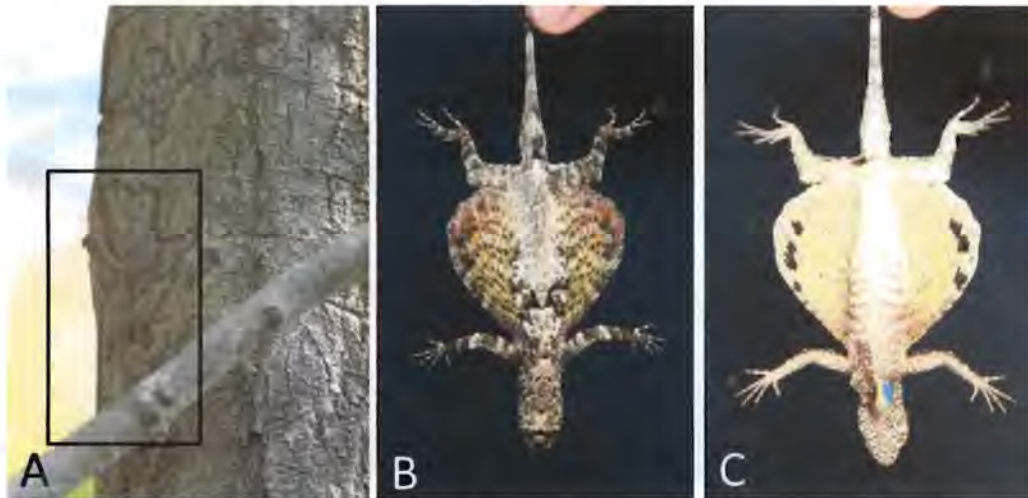
3.7 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม FinchTV (PerkinElmer, Inc.) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยนำไปเทียบเบื้องต้นกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้ โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อช่วยในการจัดจำแนกและระบุชนิดของ *Hepatozoon* ที่สำคัญพบ ร่วมกับการตรวจทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) เวอร์ชัน 5 (Tamura *et al.*, 2011), jModelTest (Posada, 2008), MrBayes version 3.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003) และ phyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010; Guindon and Gascuel, 2003)

ผลการศึกษา

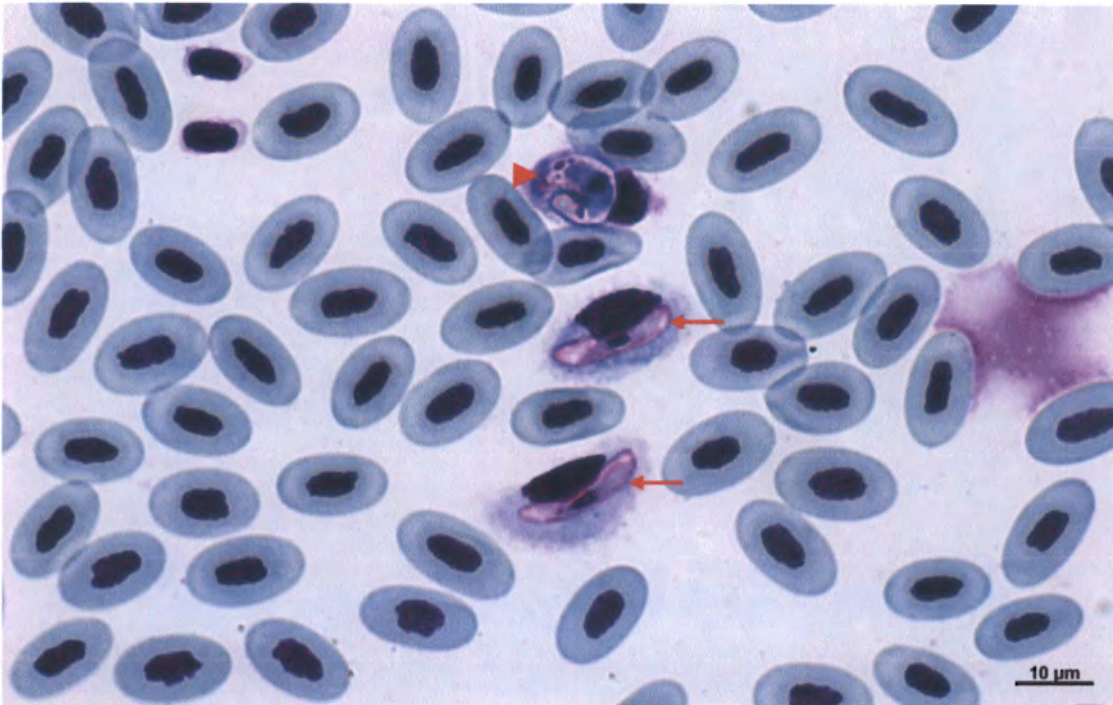
1. ปรสิตในเลือดและพยาธิสภาพที่เกิดกับเนื้อเยื่อเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus*

จากการเก็บตัวอย่างกิ้งก่าบินปีกจุดจำนวน 2 ครั้ง คือ ในเดือนสิงหาคม 2554 และเดือนเมษายน 2555 สามารถเก็บตัวอย่างกิ้งก่าบินปีกจุดจากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี ได้รวมทั้งหมดจำนวน 8 ตัว (ภาพที่ 7) การตรวจปรสิตในเลือดของกิ้งก่าบินที่จับได้โดยวิธีการทำแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางและย้อมด้วยสี Giemsa พบปรสิตโปรโตซัว 2 สกุล ได้แก่ สกุล *Hepatozoon* (ภาพที่ 8) และ *Trypanosoma* (ภาพที่ 9) โดยคิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความชุกของปรสิตในแต่ละสกุลดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ในกิ้งก่าบินปีกจุดที่จับได้บางตัวแสดงการติดปรสิตโปรโตซัวทั้ง 2 สกุลพร้อมกันในกระแสเลือด (ภาพที่ 10)

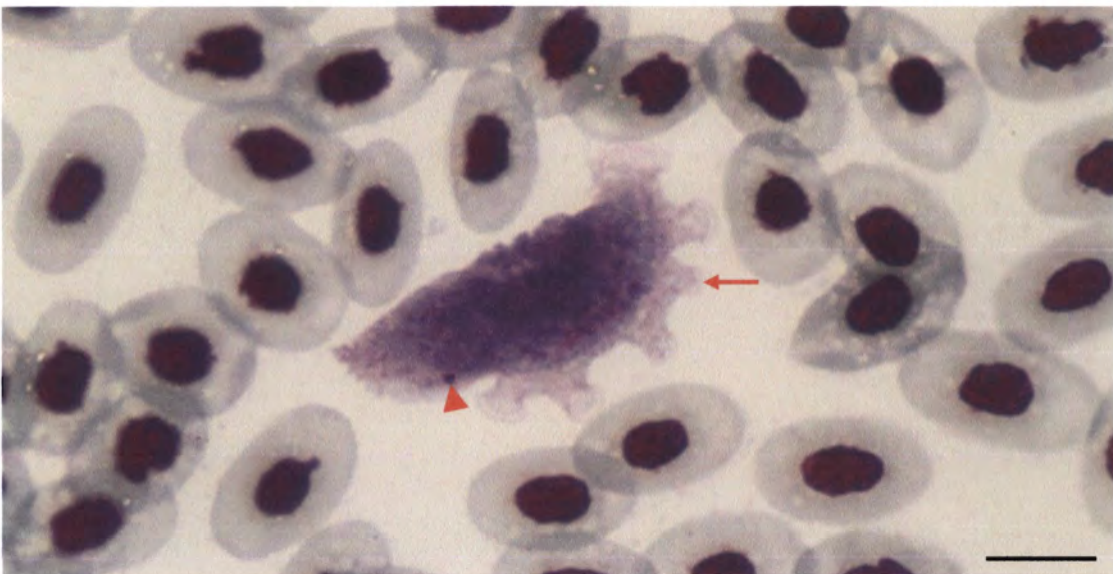


ภาพที่ 7 แสดงลักษณะทั่วไปของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* A: กิ้งก่าบินปีกจุด (ภาพในกรอบสี่เหลี่ยม) ขณะที่กำลังเกาะอยู่บนต้นไม้ โดยมีการพรางตัวให้ลำตัวมีสีน้ำตาลกลมกลืนกับสีของเปลือกไม้; B: ภาพจากด้านหลังของกิ้งก่าบินปีกจุด แสดงลักษณะสวดลายและสีของผิวหนังข้างลำตัวที่แผ่ออกคล้ายปีก โดยโครงสร้างนี้ช่วยพยุงตัวในขณะที่มีการร่อนของกิ้งก่าจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง; C: ภาพจากด้านท้องของกิ้งก่าบินปีกจุด แสดงจุดสีน้ำตาลดำที่บริเวณใต้โครงสร้างผิวหนังที่มีลักษณะคล้ายปีก (ภาพจากสุวิชา ธงพานิช, 2554)

ปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่พบในกระแสเลือดของกิ้งก่าบินเป็นปรสิตในระยะแกมีโตไซท์ (gametocyte) เซลล์มีนิวเคลียสอยู่กลางเซลล์และมีเปลือกหุ้ม (parasitophorous vacuole) อยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง ลักษณะปรสิตที่พบมีรูปร่างแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 เปลือกหุ้มมีลักษณะยาวตรง และปลายไม่โค้งงอ วัดขนาดความยาวและความกว้างของเปลือกหุ้มและเชื้อที่อยู่ภายในได้เท่ากับ $15.6-18.2 \times 2.6-3.1 \mu\text{m}$ และ $10.0 \times 2.0 \mu\text{m}$ ตามลำดับ และ แบบที่ 2 เปลือกหุ้มมีลักษณะกว้างและปลายโค้งงอ วัดขนาดความยาวและความกว้างของเปลือกหุ้มและเชื้อที่อยู่ภายในได้เท่ากับ $18.4-24.8 \times 3.5-5.7 \mu\text{m}$ และ $7.5-8.0 \times 2.5-3.0 \mu\text{m}$ ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



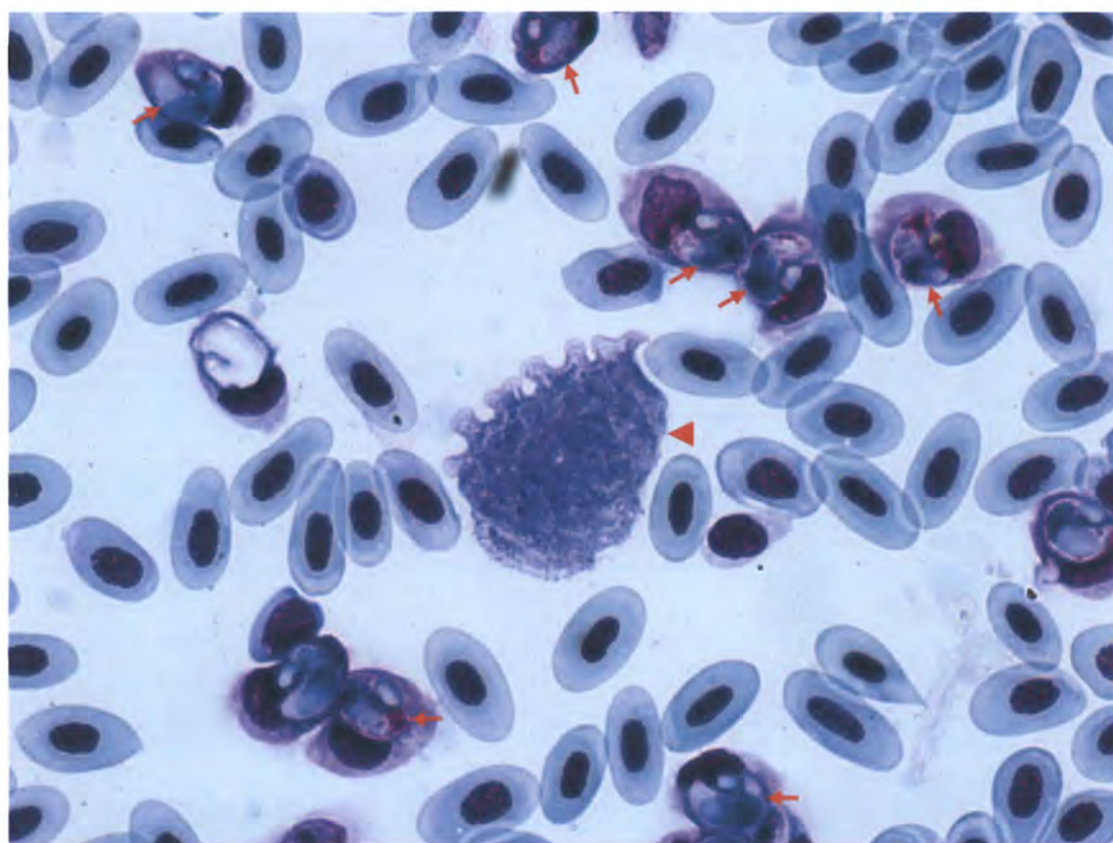
ภาพที่ 8 แสดงปรสิต *Hepatozoon* sp. ในระยะแกมีโตไซต์ (gametocyte) แบบที่ 1 (ลูกศร) และ แบบที่ 2 (หัวลูกศร) ที่พบในเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุดที่จับได้จากพื้นที่เขาวังเขมร



ภาพที่ 9 แสดงปรสิต *Trypanosoma* sp. ที่พบในกระแสเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด ด้านข้างของเซลล์มีโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่ เรียกว่า undulating membrane (ลูกศร) และบริเวณ kinetoplast (หัวลูกศร) ย้อมติดสีแดง (scale bar = 10 ไมครอน)

ตารางที่ 1 การติดปรสิตในเลือดและค่าความชุกของปรสิตที่พบในเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* ในพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนกิ้งก่าบินที่ศึกษา (ตัว)	จำนวนกิ้งก่าบินที่ติดปรสิต (ตัว)	ความชุก (%)	ความชุก (%)/จำนวนที่ติดปรสิต (ตัว)	
				<i>Hepatozoon</i>	<i>Trypanosoma</i>
19-21 สิงหาคม 2554	4	3	75	75/3	25/1
27-28 เมษายน 2555	4	3	75	75/3	25/1
รวม	8	6	75	75/6	25/2

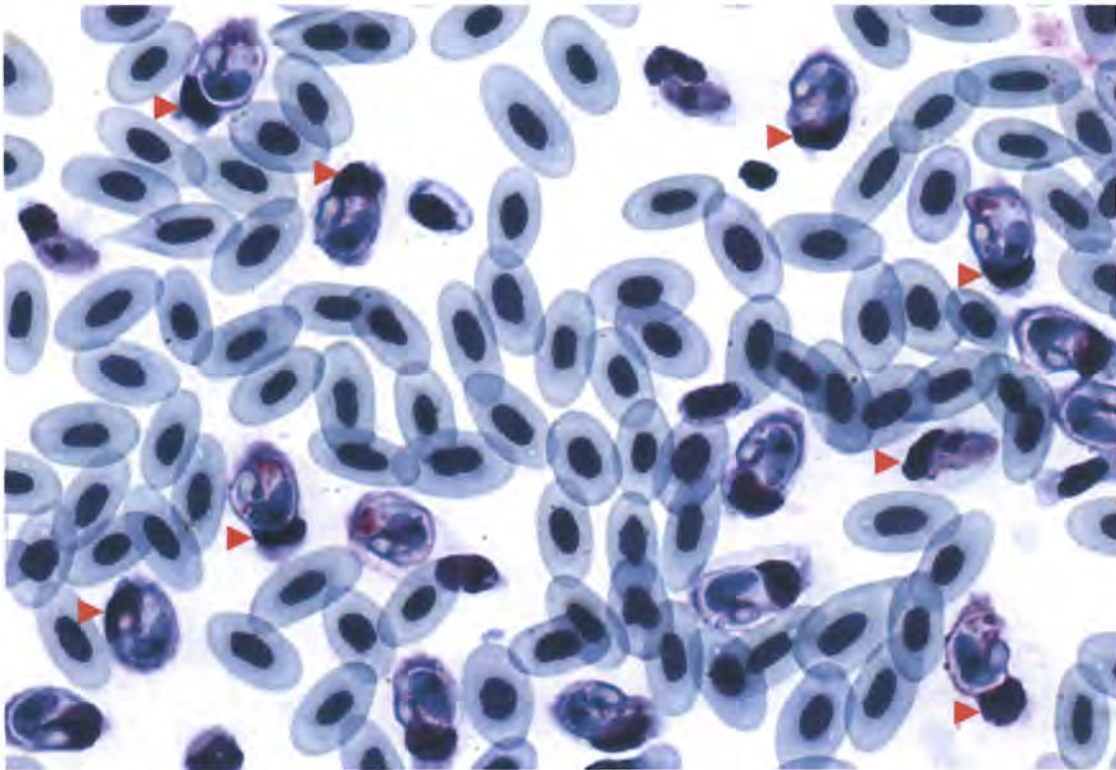


ภาพที่ 10 แสดงแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางของกิ้งก่าบินปีกจุดที่ตรวจพบว่ามีปรสิตติดเชื้อปรสิตทั้ง *Hepatozoon* sp. (ลูกศร) และ *Trypanosoma* sp. (หัวลูกศร) พร้อมกัน

ปรสิต *Trypanosoma* sp. ที่พบในกระแสเลือดของกิ้งก่าบินเป็นปรสิตในระยะ trypomastigote เซลล์มีนิวเคลียสเป็นแถบอยู่ริมเซลล์ บริเวณด้านข้างของตัวเซลล์มี undulating membrane ซึ่งมีแฟลก

เจลลัมไซในการเคลื่อนที่ติดอยู่ ด้านท้ายของเซลล์มีโครงสร้างที่เรียกว่า kinetoplast เป็นจุดย้อมติดสีแดงเข้มชัดเจน เซลล์มีขนาดความยาวและความกว้างประมาณ 35.6-45.8 x 3.3-10.0 μm ตามลำดับ (ภาพที่ 9 และ 10)

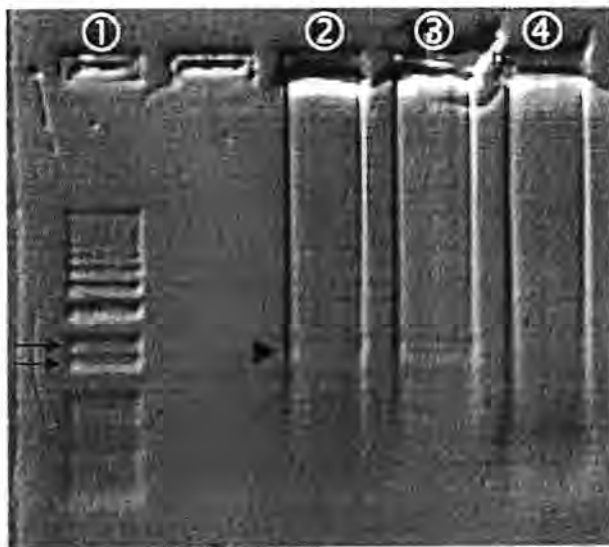
การศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดจากปรสิตต่อเนื้อเยื่อเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุดที่ติดปรสิต *Hepatozoon* sp. ระยะแกมีโตไซท์ (gametocyte) ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่ภายในจะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ ไซโตพลาสติดสีจาง นอกจากนี้นิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและในบางเซลล์พบว่านิวเคลียสจะถูกแยกออกเป็น 2 ส่วน ยิ่งไปกว่านั้นตัวเซลล์ของเชื้อปรสิต *Hepatozoon* sp. จะเบียดนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงไปอยู่ริมเซลล์ พยาธิสภาพที่เห็นได้ชัดเจนในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อปรสิตอยู่ภายในอีกประการหนึ่งก็คือ เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงจะปรากฏเป็นขอบเขตไม่ชัดเจนต่างจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดปรสิต (ภาพที่ 8 และ 11) อย่างไรก็ตาม ในกิ้งก่าบินปีกจุดที่ติดปรสิต *Trypanosoma* sp. ยังไม่พบพยาธิสภาพที่เกิดจากการติดปรสิตชนิดนี้ เนื่องจากปรสิตอาศัยอยู่นอกเซลล์เม็ดเลือดแดง ไม่ได้ไปเจริญภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงเหมือนกับ *Hepatozoon* sp.



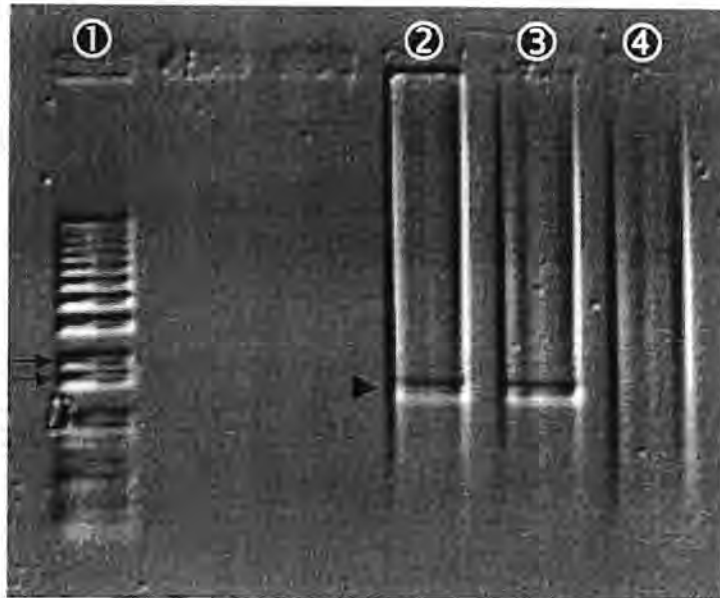
ภาพที่ 11 แสดงแผ่นฟิล์มเลือดชนิดบางและพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุดที่มีการติดเชื้อปรสิต *Hepatozoon* sp. ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนมาก โดยนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดปรสิตจะมีขนาดใหญ่กว่าปกติและตำแหน่งของนิวเคลียสจะถูกเบียดชิดไปอยู่ริมเซลล์ (หัวลูกศร) อีกทั้งเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่สลายไปเห็นขอบเขตไม่ชัดเจน

2. การศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของปรสิต *Hepatozoon* ที่พบในกิ้งก่าบินปีกจุด

การศึกษาตัวอย่าง *Hepatozoon* sp. ในระดับอนุชีววิทยาที่ได้จากกิ้งก่าบินปีกจุดที่เก็บจากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี ในเดือนสิงหาคม 2554 (มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ คณะ 2554) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบว่าติดเชื้อปรสิต *Hepatozoon* sp. ด้วยการตรวจเลือดและย้อมด้วยสี Giemsa ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง และทดลองเพิ่มจำนวนยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (SSU rDNA) โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส และหาสถานะในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 3 ตัว ได้แก่ SSU-NPF1, SSU-Api1738R และ SSU-R4 ตลอดจนสถานะในการทำปฏิกิริยา คือ โปรแกรมที่ตั้งในเครื่อง thermal cycler ได้แก่ COIKP50 สำหรับคู่ไพรเมอร์ SSU-NPF1 กับ SSU-R4 และ COIKP55 สำหรับคู่ไพรเมอร์ SSU-NPF1 กับ SSU-Api1738R สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ SSU rDNA ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบสจากไพรเมอร์คู่แรก (ภาพที่ 12) และขนาดประมาณ 1,450 คู่เบสจากไพรเมอร์คู่หลังได้ (ภาพที่ 13) โดยหนึ่งในไพรเมอร์คู่หลังนี้ คือ SSU-Api1738R ได้ถูกออกแบบมาเพื่อให้มีความจำเพาะเจาะจงในการเพิ่มจำนวนยีน SSU rDNA ของโพรติสต์ในกลุ่ม Apicomplexa ซึ่งมี *Hepatozoon* เป็นหนึ่งในสมาชิกของจุลชีพกลุ่มนี้



ภาพที่ 12 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (หัวลูกศร) ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์ SSU-NPF1 กับ SSU-R4 ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส จากตัวอย่างเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* ที่ติดปรสิต 3 ตัวอย่าง ซึ่งจับเมื่อวันที่ 19-21 สิงหาคม 2554: ช่องที่ 1 คือ 1 kb molecular marker (ลูกศรด้านบนแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบสและลูกศรด้านล่างแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,650 คู่เบส) ช่องที่ 2-4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ของ *Draco maculatus* ตัวที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยพบว่าการทำปฏิกิริยาในครั้งนี้นี้ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *D. maculatus* ตัวที่ 3 ได้ จึงไม่เห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏบนเจล

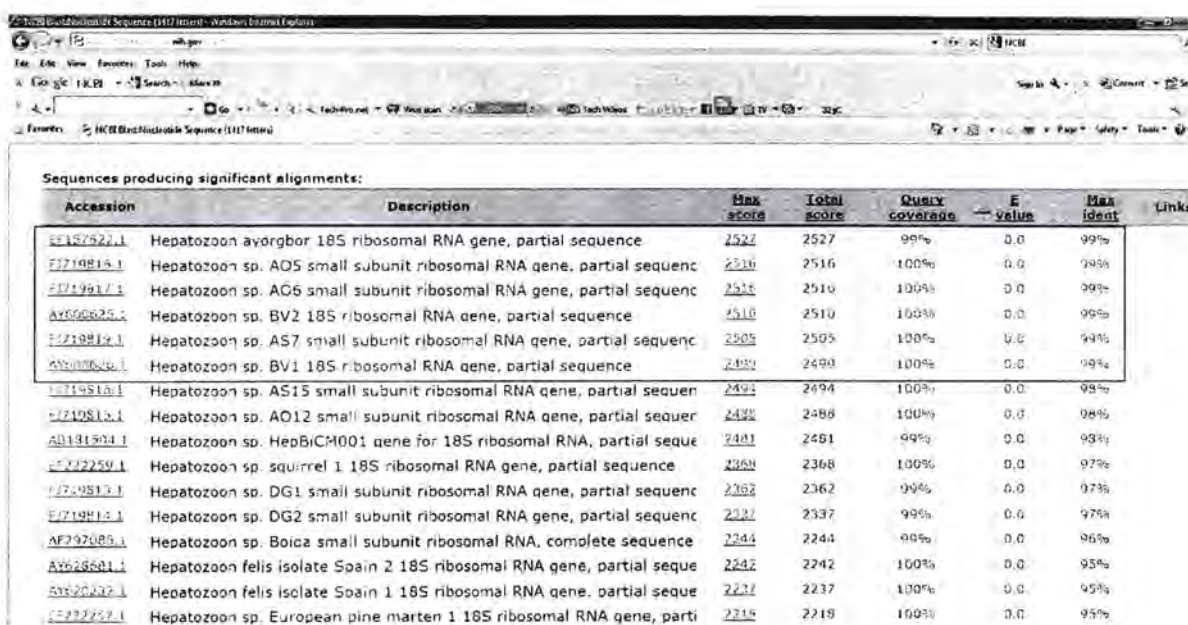


ภาพที่ 13 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของสมอลซัปปูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอ (หัวลูกศร) ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยไพรเมอร์ SSU-NPF1 กับ SSU-Api1738R ขนาดประมาณ 1,450 คู่เบส จากตัวอย่างเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* 3 ตัวอย่าง โดยใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรกที่ได้จากไพรเมอร์ SSU-NPF1 กับ SSU-R4 เป็นแม่พิมพ์ของการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ SSU-NPF1 กับ SSU-Api1738R: ช่องที่ 1 คือ 1 kb molecular marker (ลูกศรด้านบนแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบสและลูกศรด้านล่างแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,650 คู่เบส) ช่องที่ 2-4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของสมอลซัปปูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,450 คู่เบส ของ *Draco maculatus* ตัวที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยพบว่าการทำปฏิกิริยาในครั้งนี้นี้ยังคงไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนสมอลซัปปูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *D. maculatus* ตัวที่ 3 ได้ จึงไม่เห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏบนเจล

จากตัวอย่างกิ้งก่าบินปีกจุดที่จับได้จากการออกเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง ในเดือนสิงหาคม 2554 และเดือนเมษายน 2555 จำนวนรวม 8 ตัวอย่าง พบกิ้งก่าบินปีกจุดที่ติดปรสิต *Hepatozoon* sp. จำนวน 6 ตัวอย่าง การเพิ่มจำนวนยีนสมอลซัปปูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อปรสิต *Hepatozoon* sp. ในตัวอย่างทั้ง 6 สามารถเพิ่มจำนวนได้ผลิตภัณฑ์แถบดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการดังกล่าวทั้งหมด 5 ตัวอย่าง หลังจากได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดที่ต้องการแล้ว จึงทำความสะอาดผลิตภัณฑ์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ และทำการโคลนยีนที่บริสุทธิ์นี้ลงไปในแบคทีเรีย เพื่อเพิ่มปริมาณยีนก่อนส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้นั้นเป็นยีนสมอลซัปปูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอตามที่ต้องการจริง โดยทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนที่ใส่ลงไปแบคทีเรียอย่างน้อย 2-3 โคลน ด้วยไพรเมอร์ของพาหะที่ใช้ในการโคลนยีน (cloning vector primer) T3 และ T7

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอจำนวน 5 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนได้นั้น สามารถใส่เข้ากับพลาสมิดพาหะและนำสู่แบคทีเรียได้จำนวน 2 ตัวอย่าง (กึ่งกำบับนิกจุดตัวที่ 1 และกึ่งกำบับนิกจุดตัวที่ 3 จากการเก็บตัวอย่างในเดือนสิงหาคม 2554) จากนั้นได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนที่ใส่ลงไปแบคทีเรียอย่างน้อย 2-3 โคลน เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้นั้นเป็นยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอตามที่ต้องการจริง ด้วยไพรเมอร์ของพาหะที่ใช้ในการโคลนยีน T3 และ T7 ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม FinchTV เพื่อเช็คสัญญาณอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ว่าอยู่ในลักษณะที่อ่านได้ถูกต้องและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านผิดพลาด จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้สัญญาณดีและถูกต้องไปใช้ในการทดลองระบุสกุลของปรสิตที่ได้จากตัวอย่างเลือดของกึ่งกำบับนิกจุดกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ภาพที่ 14) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไปยัง 3' ของปรสิตที่ได้จากกึ่งกำบับนิกจุดตัวที่ 1 จำนวน 1,417 คู่เบส ทั้ง 3 โคลน ได้แก่ DmBL1C3, DmBL1C4 และ DmBL1C6 และกึ่งกำบับนิกจุดตัวที่ 3 จำนวน 1,417 คู่เบส ทั้ง 2 โคลน ได้แก่ DmBL3C1-3 และ DmBL3C11-2 ดังแสดงข้างล่าง



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
F2187527.1	Hepatozoon ayorgbor 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2527	2527	99%	0.0	99%	
F2719815.1	Hepatozoon sp. A05 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc	2516	2516	100%	0.0	99%	
F1719817.1	Hepatozoon sp. AC6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc	2516	2516	100%	0.0	99%	
AY606625.2	Hepatozoon sp. BV2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2516	2516	100%	0.0	99%	
F2719812.1	Hepatozoon sp. AS7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc	2505	2505	100%	0.0	99%	
F2719813.1	Hepatozoon sp. BV1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2490	2490	100%	0.0	99%	
F2719818.1	Hepatozoon sp. AS15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequen	2494	2494	100%	0.0	99%	
F2719812.1	Hepatozoon sp. AO12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequer	2488	2488	100%	0.0	98%	
AB181504.1	Hepatozoon sp. HepBiCM001 gene for 18S ribosomal RNA, partial seque	2481	2481	99%	0.0	93%	
F272259.1	Hepatozoon sp. squirrel 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2368	2368	100%	0.0	97%	
F2719813.1	Hepatozoon sp. DG1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc	2362	2362	99%	0.0	97%	
F2719812.1	Hepatozoon sp. DG2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc	2337	2337	99%	0.0	97%	
AF297089.1	Hepatozoon sp. Boica small subunit ribosomal RNA, complete sequence	2244	2244	90%	0.0	96%	
AY628581.1	Hepatozoon felis isolate Spain 2 18S ribosomal RNA gene, partial seque	2242	2242	100%	0.0	95%	
AY628582.1	Hepatozoon felis isolate Spain 1 18S ribosomal RNA gene, partial seque	2237	2237	100%	0.0	95%	
F272259.1	Hepatozoon sp. European pine marten 1 18S ribosomal RNA gene, parti	2215	2215	100%	0.0	95%	

ภาพที่ 14 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากปรสิตในเลือดของกึ่งกำบับนิกจุดตัวที่ 1 จำนวน 1,417 คู่เบส โคลน DmBL1C3 กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึงถึง 99% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Hepatozoon ayorgbor* ที่ติดเชื้อได้ในงูหลาม *Python regius* และ *Hepatozoon* spp. ที่ไม่ได้รับยูนิตอีกหลายสายพันธุ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไปยัง 3' ของ
 ผลิตภัณฑ์ได้จากกิ่งก่าบินปีกจุดตัวที่ 1 จำนวน 1,417 คู่เบส ทั้ง 3 โคลน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 3
 โคลนนี้มีความคล้ายคลึงกันสูงมากมีเพียง 4 ตำแหน่ง จาก 1,417 คู่เบส คือ ตำแหน่งที่ 106, 163, 458
 และ 1,386 เท่านั้น (แสดงเป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้กำกับ) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน

DmBL1C3	TGCCAGTAGT	CATATGCTTG	TCTTAAAGAT	TAAGCCATGC	ACGTC ^u TAAGT	50
DmBL1C4	TGCCAGTAGT	CATATGCTTG	TCTTAAAGAT	TAAGCCATGC	ACGTC ^u TAAGT	50
DmBL1C6	TGCCAGTAGT	CATATGCTTG	TCTTAAAGAT	TAAGCCATGC	ACGTC ^u TAAGT	50
DmBL1C3	ATAAGCAAAA	ATACAGTAAA	ACTGCAAAATG	GCTCATTACA	ACAGTTATAG	100
DmBL1C4	ATAAGCAAAA	ATACAGTAAA	ACTGCAAAATG	GCTCATTACA	ACAGTTATAG	100
DmBL1C6	ATAAGCAAAA	ATACAGTAAA	ACTGCAAAATG	GCTCATTACA	ACAGTTATAG	100
DmBL1C3	TTTCT ^u CTGAT	AACAAACGTT	TACATGGATA	ACCGTGGTAA	TTCTAGAGCT	150
DmBL1C4	TTTCT ^u CTGAT	AACAAACGTT	TACATGGATA	ACCGTGGTAA	TTCTAGAGCT	150
DmBL1C6	TTTCT ^u CTGAT	AACAAACGTT	TACATGGATA	ACCGTGGTAA	TTCTAGAGCT	150
DmBL1C3	AATACATGAG	TAAAT ^u TCTCA	ACTGTTTTAA	GAAGAGAAGC	ATTTATTAGA	200
DmBL1C4	AATACATGAG	TACAT ^u TCTCA	ACTGTTTTAA	GAAGAGAAGC	ATTTATTAGA	200
DmBL1C6	AATACATGAG	TAAAT ^u TCTCA	ACTGTTTTAA	GAAGAGAAGC	ATTTATTAGA	200
DmBL1C3	TAAAAAACCA	ATATATGTTT	TTAAAGCATA	AAAAATTGGTG	ATTTACAATA	250
DmBL1C4	TAAAAAACCA	ATATATGTTT	TTAAAGCATA	AAAAATTGGTG	ATTTACAATA	250
DmBL1C6	TAAAAAACCA	ATATATGTTT	TTAAAGCATA	AAAAATTGGTG	ATTTACAATA	250
DmBL1C3	ACTAAGCAAA	TCGCACAGTG	CAAAC ^u TAGCG	ATAAATCATT	CAAGTTTCTG	300
DmBL1C4	ACTAAGCAAA	TCGCACAGTG	CAAAC ^u TAGCG	ATAAATCATT	CAAGTTTCTG	300
DmBL1C6	ACTAAGCAAA	TCGCACAGTG	CAAAC ^u TAGCG	ATAAATCATT	CAAGTTTCTG	300
DmBL1C3	ACCTATCAGC	FTTCGACGGT	AAGGTATTGG	CTTACCGTGG	CAGTGACGGT	350
DmBL1C4	ACCTATCAGC	FTTCGACGGT	AAGGTATTGG	CTTACCGTGG	CAGTGACGGT	350
DmBL1C6	ACCTATCAGC	FTTCGACGGT	AAGGTATTGG	CTTACCGTGG	CAGTGACGGT	350
DmBL1C3	TAACGGGGAA	TTAGGGTTCA	ATTCCGGAGA	GGGAGCCTGA	GAAACGGCTA	400
DmBL1C4	TAACGGGGAA	TTAGGGTTCA	ATTCCGGAGA	GGGAGCCTGA	GAAACGGCTA	400
DmBL1C6	TAACGGGGAA	TTAGGGTTCA	ATTCCGGAGA	GGGAGCCTGA	GAAACGGCTA	400
DmBL1C3	CCACATCTAA	GGAAGGCAGC	AGGCGCGCAA	ATTACCCAAT	TCTAACAGCA	450
DmBL1C4	CCACATCTAA	GGAAGGCAGC	AGGCGCGCAA	ATTACCCAAT	TCTAACAGCA	450
DmBL1C6	CCACATCTAA	GGAAGGCAGC	AGGCGCGCAA	ATTACCCAAT	TCTAACAGCA	450
DmBL1C3	TAAGAGAG ^u GT	AGTGACAAGA	AATAACAGTA	CAAGGCAGTT	AAAATGCTTT	500
DmBL1C4	TAAGAGAG ^u GT	AGTGACAAGA	AATAACAGTA	CAAGGCAGTT	AAAATGCTTT	500
DmBL1C6	TAAGAGAG ^u GT	AGTGACAAGA	AATAACAGTA	CAAGGCAGTT	AAAATGCTTT	500
DmBL1C3	GTAATTGGAA	TGATAGAAAT	TTAAATACTT	TTTAAAGTAT	CAATTGGAGG	550
DmBL1C4	GTAATTGGAA	TGATAGAAAT	TTAAATACTT	TTTAAAGTAT	CAATTGGAGG	550
DmBL1C6	GTAATTGGAA	TGATAGAAAT	TTAAATACTT	TTTAAAGTAT	CAATTGGAGG	550
DmBL1C3	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATT	CCAGCTCCAA	TAGCGTATAT	600
DmBL1C4	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATT	CCAGCTCCAA	TAGCGTATAT	600
DmBL1C6	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATT	CCAGCTCCAA	TAGCGTATAT	600

DmBL1C3	TAAAATTGTT	GCAGTTAAAA	AGCTCGTAGT	TGAATTTTGG	CTAAAAATAA	650
DmBL1C4	TAAAATTGTT	GCAGTTAAAA	AGCTCGTAGT	TGAATTTTGG	CTAAAAATAA	650
DmBL1C6	TAAAATTGTT	GCAGTTAAAA	AGCTCGTAGT	TGAATTTTGG	CTAAAAATAA	650
DmBL1C3	CCGGTCTGCT	TTTATTAATA	AAAGTGGTAT	CTTGGTGTGT	TTTTAGCAAT	700
DmBL1C4	CCGGTCTGCT	TTTATTAATA	AAAGTGGTAT	CTTGGTGTGT	TTTTAGCAAT	700
DmBL1C6	CCGGTCTGCT	TTTATTAATA	AAAGTGGTAT	CTTGGTGTGT	TTTTAGCAAT	700
DmBL1C3	AATGTCCTTT	GAAATGTTTT	TTACTTTTAT	GTAAAAAGCA	ATTTTCAGGA	750
DmBL1C4	AATGTCCTTT	GAAATGTTTT	TTACTTTTAT	GTAAAAAGCA	ATTTTCAGGA	750
DmBL1C6	AATGTCCTTT	GAAATGTTTT	TTACTTTTAT	GTAAAAAGCA	ATTTTCAGGA	750
DmBL1C3	TTTTTACTTT	GAGAAAATTA	GAGTGTTC	AGCAGGCTAA	CGTTTTGAAT	800
DmBL1C4	TTTTTACTTT	GAGAAAATTA	GAGTGTTC	AGCAGGCTAA	CGTTTTGAAT	800
DmBL1C6	TTTTTACTTT	GAGAAAATTA	GAGTGTTC	AGCAGGCTAA	CGTTTTGAAT	800
DmBL1C3	ACTGCAGCAT	GGAAATAATA	AATAGGATTT	TAGTTCACG	TTATTGGTTT	850
DmBL1C4	ACTGCAGCAT	GGAAATAATA	AATAGGATTT	TAGTTCACG	TTATTGGTTT	850
DmBL1C6	ACTGCAGCAT	GGAAATAATA	AATAGGATTT	TAGTTCACG	TTATTGGTTT	850
DmBL1C3	TAAGAACTAA	ATTAATGATT	GATAGGAGCA	GTGGGGGCA	TTTGTAATTA	900
DmBL1C4	TAAGAACTAA	ATTAATGATT	GATAGGAGCA	GTGGGGGCA	TTTGTAATTA	900
DmBL1C6	TAAGAACTAA	ATTAATGATT	GATAGGAGCA	GTGGGGGCA	TTTGTAATTA	900
DmBL1C3	ACTGTCAGAG	GTGAAATTC	TAGATTTGTT	AAAGACACAC	TACTGCGAAA	950
DmBL1C4	ACTGTCAGAG	GTGAAATTC	TAGATTTGTT	AAAGACACAC	TACTGCGAAA	950
DmBL1C6	ACTGTCAGAG	GTGAAATTC	TAGATTTGTT	AAAGACACAC	TACTGCGAAA	950
DmBL1C3	GCATTTGCCA	AAGATGTTTT	CATTAATCAA	GAACGAAAGT	TAGGGGATCG	1000
DmBL1C4	GCATTTGCCA	AAGATGTTTT	CATTAATCAA	GAACGAAAGT	TAGGGGATCG	1000
DmBL1C6	GCATTTGCCA	AAGATGTTTT	CATTAATCAA	GAACGAAAGT	TAGGGGATCG	1000
DmBL1C3	AAGACGATCA	GATACCGTCG	TAGTCTTAAC	TATAAACTAT	GCCGACTAGA	1050
DmBL1C4	AAGACGATCA	GATACCGTCG	TAGTCTTAAC	TATAAACTAT	GCCGACTAGA	1050
DmBL1C6	AAGACGATCA	GATACCGTCG	TAGTCTTAAC	TATAAACTAT	GCCGACTAGA	1050
DmBL1C3	GATTGGAGGT	CGTCTTTATA	AACGACTCCT	TCAGCACCTT	ACGAGAAATC	1100
DmBL1C4	GATTGGAGGT	CGTCTTTATA	AACGACTCCT	TCAGCACCTT	ACGAGAAATC	1100
DmBL1C6	GATTGGAGGT	CGTCTTTATA	AACGACTCCT	TCAGCACCTT	ACGAGAAATC	1100
DmBL1C3	AAAGTCTTTG	GGTCTGGGG	GGAGTATGGT	CGCAAGGCTG	AAACTTAAAG	1150
DmBL1C4	AAAGTCTTTG	GGTCTGGGG	GGAGTATGGT	CGCAAGGCTG	AAACTTAAAG	1150
DmBL1C6	AAAGTCTTTG	GGTCTGGGG	GGAGTATGGT	CGCAAGGCTG	AAACTTAAAG	1150
DmBL1C3	GAATTGACGG	AAGGGCACCA	CCAGGCGTGG	AGCCTGCGGC	TTAATTTGAC	1200
DmBL1C4	GAATTGACGG	AAGGGCACCA	CCAGGCGTGG	AGCCTGCGGC	TTAATTTGAC	1200
DmBL1C6	GAATTGACGG	AAGGGCACCA	CCAGGCGTGG	AGCCTGCGGC	TTAATTTGAC	1200
DmBL1C3	TCAACACGGG	AAAACTCACC	AGGTCCAGAC	ATAGAAAGGA	TTGACAGATT	1250
DmBL1C4	TCAACACGGG	AAAACTCACC	AGGTCCAGAC	ATAGAAAGGA	TTGACAGATT	1250
DmBL1C6	TCAACACGGG	AAAACTCACC	AGGTCCAGAC	ATAGAAAGGA	TTGACAGATT	1250

DmBL1C3	GACAGCTCTT	TCTTAAATTC	ATGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTTCTTAGTT	1300
DmBL1C4	GACAGCTCTT	TCTTAAATTC	ATGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTTCTTAGTT	1300
DmBL1C6	GACAGCTCTT	TCTTAAATTC	ATGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTTCTTAGTT	1300
DmBL1C3	GGTGGAGTGA	TTTGTCTGGT	TAATCCGTT	AACGAACGAG	ACCTTAACCT	1350
DmBL1C4	GGTGGAGTGA	TTTGTCTGGT	TAATCCGTT	AACGAACGAG	ACCTTAACCT	1350
DmBL1C6	GGTGGAGTGA	TTTGTCTGGT	TAATCCGTT	AACGAACGAG	ACCTTAACCT	1350
DmBL1C3	GCTAAATAGG	GTTAAAAACA	TTTGTTTTGTG	AATTATTTCT	TAGAAGGACT	1400
DmBL1C4	GCTAAATAGG	GTTAAAAACA	TTTGTTTTGTG	AATTACTTCT	TAGAAGGACT	1400
DmBL1C6	GCTAAATAGG	GTTAAAAACA	TTTGTTTTGTG	AATTACTTCT	TAGAAGGACT	1400
DmBL1C3	TTGCGTGTTT	AACGCAA	1417			
DmBL1C4	TTGCGTGTTT	AACGCAA	1417			
DmBL1C6	TTGCGTGTTT	AACGCAA	1417			

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไปยัง 3' ของปริสตีที่ได้จากกิ่งกำบับปีกจุดตัวที่ 3 จำนวน 1,417 คู่เบส ทั้ง 2 โคลน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 2 โคลนนี้มีความคล้ายคลึงกันสูงมากมีเพียง 2 ตำแหน่ง จาก 1,417 คู่เบส คือ ตำแหน่งที่ 732 และ 1,056 เท่านั้น (แสดงเป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้กำกับ) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน

DmBL3C1-3	TGCCAGTAGT	CATATGCTTG	TCTTAAAGAT	TAAGCCATGC	ACGTCTAAGT	50
DmBL3C11-2	TGCCAGTAGT	CATATGCTTG	TCTTAAAGAT	TAAGCCATGC	ACGTCTAAGT	50
DmBL3C1-3	ATAAGCAAAA	ATACAGTAAA	ACTGCAAAATG	GCTCATTACA	ACAGTTATAG	100
DmBL3C11-2	ATAAGCAAAA	ATACAGTAAA	ACTGCAAAATG	GCTCATTACA	ACAGTTATAG	100
DmBL3C1-3	TTTCTTTGAT	AACAAACGTT	TACATGGATA	ACCGTGGTAA	TTCTAGAGCT	150
DmBL3C11-2	TTTCTTTGAT	AACAAACGTT	TACATGGATA	ACCGTGGTAA	TTCTAGAGCT	150
DmBL3C1-3	AATACATGAG	TACATTCTCA	ACTGTTTTTAA	GAAGAGAAGC	ATTTATTAGA	200
DmBL3C11-2	AATACATGAG	TACATTCTCA	ACTGTTTTTAA	GAAGAGAAGC	ATTTATTAGA	200
DmBL3C1-3	TAAAAAACCA	ATATATGTTT	TTAAAGCATA	AAAATTGGTG	ATTTACAATA	250
DmBL3C11-2	TAAAAAACCA	ATATATGTTT	TTAAAGCATA	AAAATTGGTG	ATTTACAATA	250
DmBL3C1-3	ACTAAGCAAA	TCGCACAGTG	CAAAC TAGCG	ATAAATCATT	CAAGTTTCTG	300
DmBL3C11-2	ACTAAGCAAA	TCGCACAGTG	CAAAC TAGCG	ATAAATCATT	CAAGTTTCTG	300
DmBL3C1-3	ACCTATCAGC	TTTCGACGGT	AAGGTATTGG	CTTACCGTGG	CAGTGACGGT	350
DmBL3C11-2	ACCTATCAGC	TTTCGACGGT	AAGGTATTGG	CTTACCGTGG	CAGTGACGGT	350
DmBL3C1-3	TAACGGGGAA	TTAGGGTTCA	ATTCCGGAGA	GGGAGCCTGA	GAAACGGCTA	400
DmBL3C11-2	TAACGGGGAA	TTAGGGTTCA	ATTCCGGAGA	GGGAGCCTGA	GAAACGGCTA	400
DmBL3C1-3	CCACATCTAA	GGAAGGCAGC	AGGCGCGCAA	ATTACCCAAT	TCTAACAGCA	450
DmBL3C11-2	CCACATCTAA	GGAAGGCAGC	AGGCGCGCAA	ATTACCCAAT	TCTAACAGCA	450
DmBL3C1-3	TAAGAGAGGT	AGTGACAAGA	AATAACAGTA	CAAGGCAGTT	AAAATGCTTT	500
DmBL3C11-2	TAAGAGAGGT	AGTGACAAGA	AATAACAGTA	CAAGGCAGTT	AAAATGCTTT	500

DmBL3C1-3	GTAATTGGAA	TGATAGAAAT	TTAAATACTT	PTTAAAGTAT	CAATTGGAGG	550
DmBL3C11-2	GTAATTGGAA	TGATAGAAAT	TTAAATACTT	PTTAAAGTAT	CAATTGGAGG	550
DmBL3C1-3	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATT	CCAGCTCCAA	TAGCGTATAT	600
DmBL3C11-2	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATT	CCAGCTCCAA	TAGCGTATAT	600
DmBL3C1-3	TAAAATTGTT	GCAGTTAAAA	AGCTCGTAGT	TGAATTTTTG	CTAAAAATAA	650
DmBL3C11-2	TAAAATTGTT	GCAGTTAAAA	AGCTCGTAGT	TGAATTTTTG	CTAAAAATAA	650
DmBL3C1-3	CCGGTCTGCT	TTTATTAATA	AAAGTGGTAT	CTTGGTGTGT	TTTTAGCAAT	700
DmBL3C11-2	CCGGTCTGCT	TTTATTAATA	AAAGTGGTAT	CTTGGTGTGT	TTTTAGCAAT	700
DmBL3C1-3	AATGTCCFTT	GAAATGTTTT	TTACTTTATT	GCAAAAAGCA	ATTTTCAGGA	750
DmBL3C11-2	AATGTCCFTT	GAAATGTTTT	TTACTTTATT	GTAAAAAGCA	ATTTTCAGGA	750
DmBL3C1-3	TTTTTACTTT	GAGAAAATTA	GAGTGTTTCA	AGCAGGCTAA	CGTTTTGAAT	800
DmBL3C11-2	TTTTTACTTT	GAGAAAATTA	GAGTGTTTCA	AGCAGGCTAA	CGTTTTGAAT	800
DmBL3C1-3	ACTGCAGCAT	GGAATAATAA	AATAGGATTT	TAGTCTTACG	TTATTGGTTT	850
DmBL3C11-2	ACTGCAGCAT	GGAATAATAA	AATAGGATTT	TAGTCTTACG	TTATTGGTTT	850
DmBL3C1-3	TAAGAACTAA	ATTAATGATT	GATAGGAGCA	GTTGGGGGCA	TTTGTATTTA	900
DmBL3C11-2	TAAGAACTAA	ATTAATGATT	GATAGGAGCA	GTTGGGGGCA	TTTGTATTTA	900
DmBL3C1-3	ACTGTCAGAG	GTGAAATTCT	TAGATTTGTT	AAAGACACAC	TACTGCGAAA	950
DmBL3C11-2	ACTGTCAGAG	GTGAAATTCT	TAGATTTGTT	AAAGACACAC	TACTGCGAAA	950
DmBL3C1-3	GCATTTGCCA	AAGATGTTTT	CATTAATCAA	GAACGAAAGT	TAGGGGATCG	1000
DmBL3C11-2	GCATTTGCCA	AAGATGTTTT	CATTAATCAA	GAACGAAAGT	TAGGGGATCG	1000
DmBL3C1-3	AAGACGATCA	GATACCGTCG	TAGTCTTAAC	TATAAACTAT	GCCGACTAGA	1050
DmBL3C11-2	AAGACGATCA	GATACCGTCG	TAGTCTTAAC	TATAAACTAT	GCCGACTAGA	1050
DmBL3C1-3	GATTGGAGGT	CGTCTTTATA	AACGACTCCT	TCAGCACCTT	ACGAGAAATC	1100
DmBL3C11-2	GATTGAAGGT	CGTCTTTATA	AACGACTCCT	TCAGCACCTT	ACGAGAAATC	1100
DmBL3C1-3	AAAGTCTTTG	GGTTCTGGGG	GGAGTATGGT	CGCAAGGCTG	AAACTTAAAG	1150
DmBL3C11-2	AAAGTCTTTG	GGTTCTGGGG	GGAGTATGGT	CGCAAGGCTG	AAACTTAAAG	1150
DmBL3C1-3	GAATTGACGG	AAGGGCACCA	CCAGGCGTGG	AGCCTGCGGC	TTAATTTGAC	1200
DmBL3C11-2	GAATTGACGG	AAGGGCACCA	CCAGGCGTGG	AGCCTGCGGC	TTAATTTGAC	1200
DmBL3C1-3	TCAACACGGG	AAAACACACC	AGGTCCAGAC	ATAGAAAGGA	TTGACAGATT	1250
DmBL3C11-2	TCAACACGGG	AAAACACACC	AGGTCCAGAC	ATAGAAAGGA	TTGACAGATT	1250
DmBL3C1-3	GACAGCTCTT	TCTTAATTCT	ATGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTTCTTAGTT	1300
DmBL3C11-2	GACAGCTCTT	TCTTAATTCT	ATGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTTCTTAGTT	1300
DmBL3C1-3	GGTGGAGTGA	TTTGTCTGGT	TAATTCCGTT	AACGAACGAG	ACCTTAACCT	1350
DmBL3C11-2	GGTGGAGTGA	TTTGTCTGGT	TAATTCCGTT	AACGAACGAG	ACCTTAACCT	1350
DmBL3C1-3	GCTAAATAGG	GTTAAAAACA	TTTGTTTTTG	AATTACTTCT	TAGAAGGACT	1400
DmBL3C11-2	GCTAAATAGG	GTTAAAAACA	TTTGTTTTTG	AATTACTTCT	TAGAAGGACT	1400

DmBL3C1-3 TTGCGTGTTT AACGCAA 1417
 DmBL3C11-2 TTGCGTGTTT AACGCAA 1417

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไปยัง 3' ของปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่ได้จากกิ้งก่าบินปีกจุดตัวที่ 1 ทั้งสามสายพบความแตกต่างจำนวน 4 ตำแหน่งจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,417 คู่เบส คิดเป็นค่าความแตกต่าง p-distance เฉลี่ยเท่ากับ 0.1882% และค่าความแตกต่างโดยใช้ Kimura 2-parameter model เฉลี่ยเท่ากับ 0.1885% สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไปยัง 3' ของปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่ได้จากกิ้งก่าบินปีกจุดตัวที่ 3 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันพบว่า ทั้งสองสายมีความแตกต่างกันจำนวน 2 ตำแหน่งจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,417 คู่เบส คิดเป็นค่าความแตกต่าง p-distance เท่ากับ 0.1411% และค่าความแตกต่างโดยใช้ Kimura 2-parameter model เท่ากับ 0.1413%

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไปยัง 3' ของปรสิต *Hepatozoon* sp. ทั้งสามสายที่ได้จากกิ้งก่าบินปีกจุดตัวที่ 1 และสองสายที่ได้จากกิ้งก่าบินปีกจุดตัวที่ 3 พบความแตกต่างจำนวน 6 ตำแหน่งจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,417 คู่เบส ได้แก่ ตำแหน่งที่ 106, 163, 458, 732, 1,056 และ 1386 ดังแสดงด้านล่าง

DmBL1C3	TGCCAGTAGT	CATATGCTTG	TCTTAAAGAT	TAAGCCATGC	ACGTCTAAGT	50
DmBL1C4	50
DmBL1C6	50
DmBL3C1-3	50
DmBL3C11-2	50
DmBL1C3	ATAAGCAAAA	ATACAGTAAA	ACTGCAAATG	GCTCATTACA	ACAGTTATAG	100
DmBL1C4	100
DmBL1C6	100
DmBL3C1-3	100
DmBL3C11-2	100
DmBL1C3	TTTCTCTGAT	AACAAACGTT	TACATGGATA	ACCGTGGTAA	TTCTAGAGCT	150
DmBL1C4T.....	150
DmBL1C6T.....	150
DmBL3C1-3T.....	150
DmBL3C11-2T.....	150
DmBL1C3	AATACATGAG	TAAATCTCTCA	ACTGTTTAA	GAAGAGAAGC	ATTTATTAGA	200
DmBL1C4C.....	200
DmBL1C6	200
DmBL3C1-3C.....	200
DmBL3C11-2C.....	200
DmBL1C3	TAAAAACCA	ATATATGTTT	TTAAAGCATA	AAAATTGGTG	ATTTACAATA	250
DmBL1C4	250
DmBL1C6	250
DmBL3C1-3	250
DmBL3C11-2	250

DmBL1C3	ACTAAGCAAA	TCGCACAGTG	CAAAC TAGCG	ATAAATCATT	CAAGTTTCIG	300
DmBL1C4	300
DmBL1C6	300
DmBL3C1-3	300
DmBL3C11-2	300
DmBL1C3	ACCTATCAGC	TTTCGACGGT	AAGGTATTGG	CTTACCGTGG	CAGTGACGGT	350
DmBL1C4	350
DmBL1C6	350
DmBL3C1-3	350
DmBL3C11-2	350
DmBL1C3	TAACGGGGAA	TTAGGGTTCA	ATTCCGGAGA	GGGAGCCTGA	GAAACGGCTA	400
DmBL1C4	400
DmBL1C6	400
DmBL3C1-3	400
DmBL3C11-2	400
DmBL1C3	CCACATCTAA	GGAAGGCAGC	AGGCGCGCAA	ATTACCCAAT	TCTAACAGCA	450
DmBL1C4	450
DmBL1C6	450
DmBL3C1-3	450
DmBL3C11-2	450
DmBL1C3	TAAGAGAGGT	AGTGACAAGA	AATAACAGTA	CAAGGCAGTT	AAAATGCTTT	500
DmBL1C4A.....	500
DmBL1C6	500
DmBL3C1-3	500
DmBL3C11-2	500
DmBL1C3	GTAATTGGAA	TGATAGAAAT	TTAAATACTT	TTTAAAGTAT	CAATGGGAGG	550
DmBL1C4	550
DmBL1C6	550
DmBL3C1-3	550
DmBL3C11-2	550
DmBL1C3	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATT	CCAGCTCCAA	TAGCGTATAT	600
DmBL1C4	600
DmBL1C6	600
DmBL3C1-3	600
DmBL3C11-2	600
DmBL1C3	TAAAATTGTT	GCAGTTAAAA	AGCTCGTAGT	TGAATTTTTG	CTAAAAATAA	650
DmBL1C4	650
DmBL1C6	650
DmBL3C1-3	650
DmBL3C11-2	650
DmBL1C3	CCGGTCTGCT	TTTATTAATA	AAAGTGGTAT	CTTGGTGTGT	TTTTAGCAAT	700
DmBL1C4	700
DmBL1C6	700
DmBL3C1-3	700
DmBL3C11-2	700

DmBL1C3	GAATTGACGG	AAGGGCACCA	CCAGGCGTGG	AGCCTGCGGC	TTAATTTGAC	1200
DmBL1C4	1200
DmBL1C6	1200
DmBL3C1-3	1200
DmBL3C11-2	1200
DmBL1C3	TCAACACGGG	AAAAC TCACC	AGGTCCAGAC	ATAGAAAGGA	TTGACAGATT	1250
DmBL1C4	1250
DmBL1C6	1250
DmBL3C1-3	1250
DmBL3C11-2	1250
DmBL1C3	GACAGCTCTT	TCTTAATTCT	AIGGGTGGTG	GTGCATGGCC	GTTCTTAGTT	1300
DmBL1C4	1300
DmBL1C6	1300
DmBL3C1-3	1300
DmBL3C11-2	1300
DmBL1C3	GGTGGAGTGA	TTTGTCTGGT	TAATTCGGT	AACGAACGAG	ACCTTAACCT	1350
DmBL1C4	1350
DmBL1C6	1350
DmBL3C1-3	1350
DmBL3C11-2	1350
DmBL1C3	GCTAAATAGG	GTTAAAAACA	TTTGT TTTTG	AATTATTTCT	TAGAAGGACT	1400
DmBL1C4C.....	1400
DmBL1C6C.....	1400
DmBL3C1-3C.....	1400
DmBL3C11-2C.....	1400
DmBL1C3	TTGCGTGTTT	AACGCAA	1417			
DmBL1C4	1417			
DmBL1C6	1417			
DmBL3C1-3	1417			
DmBL3C11-2	1417			

เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้ง 5 สาย พบว่ามีจำนวนความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละคู่ตั้งแต่ 2-4 นิวคลีโอไทด์ โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันรวมเท่ากับ 2.6 นิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาค่าความแตกต่าง p-distance พบมีค่าตั้งแต่ 0.1411-0.2823% และมีค่าความแตกต่าง p-distance เฉลี่ยรวมของทั้ง 5 สาย เท่ากับ 0.1835% (ตารางที่ 3) สำหรับค่าความแตกต่างโดยใช้ Kimura 2-parameter model ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้ง 5 สาย พบว่ามีค่าเปรียบเทียบแต่ละคู่ตั้งแต่ 0.1413-0.2829% และมีค่าความแตกต่างโดยใช้ Kimura 2-parameter model เฉลี่ยรวม เท่ากับ 0.1838% (ตารางที่ 4) โดยพบว่ามีค่าความแตกต่างที่คำนวณได้ไม่ว่าจะเป็นค่าความแตกต่าง p-distance หรือการคำนวณโดยใช้ Kimura 2-parameter model มีค่าในแต่ละคู่เปรียบเทียบไม่ถึง 1% แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่ได้จากกิ้งก่าบินปีกจุดทั้งสองตัวหรือที่มาจากแต่ละโคลนในตัวเดียวกันน่าจะเป็นปรสิต *Hepatozoon* sp. ชนิดเดียวกัน หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ กิ้งก่า

บินปักจูดตัวที่ 1 และตัวที่ 3 ติดปรสิต *Hepatozoon* sp. ชนิดเดียวกัน นอกจากนั้น ในขั้นตอนการโคลน ยีนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต *Hepatozoon* sp. พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่มีลักษณะของการซ้อนทับหรือผสมกัน แสดงว่าปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่ติดใน กิ่งก่าบินทั้งสองน่าจะมีเพียงชนิดเดียว หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ไม่พบการติดเชื้อปรสิต *Hepatozoon* มากกว่า 1 ชนิดในตัวอย่างเลือดและกิ่งก่าบินปักจูดที่ทำการศึกษา

ตารางที่ 2 แสดงค่าเปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise comparison) ของจำนวนความแตกต่างระหว่างลำดับ นิวคลีโอไทด์ (number of nucleotide differences) ความยาว 1,417 คู่เบสของยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต *Hepatozoon* sp. จำนวนทั้งหมด 5 สาย 3 สายจากกิ่งก่าบินปักจูดตัวที่ 1 (DmBL1C3, DmBL1C4 และ DmBL1C6) และ 2 สายจากกิ่งก่าบินปักจูดตัวที่ 3 (DmBL3C1-3 และ DmBL3C11-2)

ชื่อโคลน	DmBL1C3	DmBL1C4	DmBL1C6	DmBL3C1-3	DmBL3C11-2
DmBL1C3	-				
DmBL1C4	4	-			
DmBL1C6	2	2	-		
DmBL3C1-3	4	2	2	-	
DmBL3C11-2	4	2	2	2	-

ตารางที่ 3 แสดงค่าเปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise comparison) ของค่าความแตกต่าง p-distance ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1,417 คู่เบสของยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต *Hepatozoon* sp. จำนวนทั้งหมด 5 สาย 3 สายจากกิ่งก่าบินปักจูดตัวที่ 1 (DmBL1C3, DmBL1C4 และ DmBL1C6) และ 2 สายจากกิ่งก่าบินปักจูดตัวที่ 3 (DmBL3C1-3 และ DmBL3C11-2)

ชื่อโคลน	DmBL1C3	DmBL1C4	DmBL1C6	DmBL3C1-3	DmBL3C11-2
DmBL1C3	-				
DmBL1C4	0.2823%	-			
DmBL1C6	0.1411%	0.1411%	-		
DmBL3C1-3	0.2823%	0.1411%	0.1411%	-	
DmBL3C11-2	0.2823%	0.1411%	0.1411%	0.1411%	-

ตารางที่ 4 แสดงค่าเปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise comparison) ของค่าความแตกต่างโดยใช้ Kimura 2-parameter model ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1,417 คู่เบสของยีนสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต *Hepatozoon* sp. จำนวนทั้งหมด 5 สาย 3 สายจากกิ้งก่าบินปีกจุดตัวที่ 1 (DmBL1C3, DmBL1C4 และ DmBL1C6) และ 2 สายจากกิ้งก่าบินปีกจุดตัวที่ 3 (DmBL3C1-3 และ DmBL3C11-2)

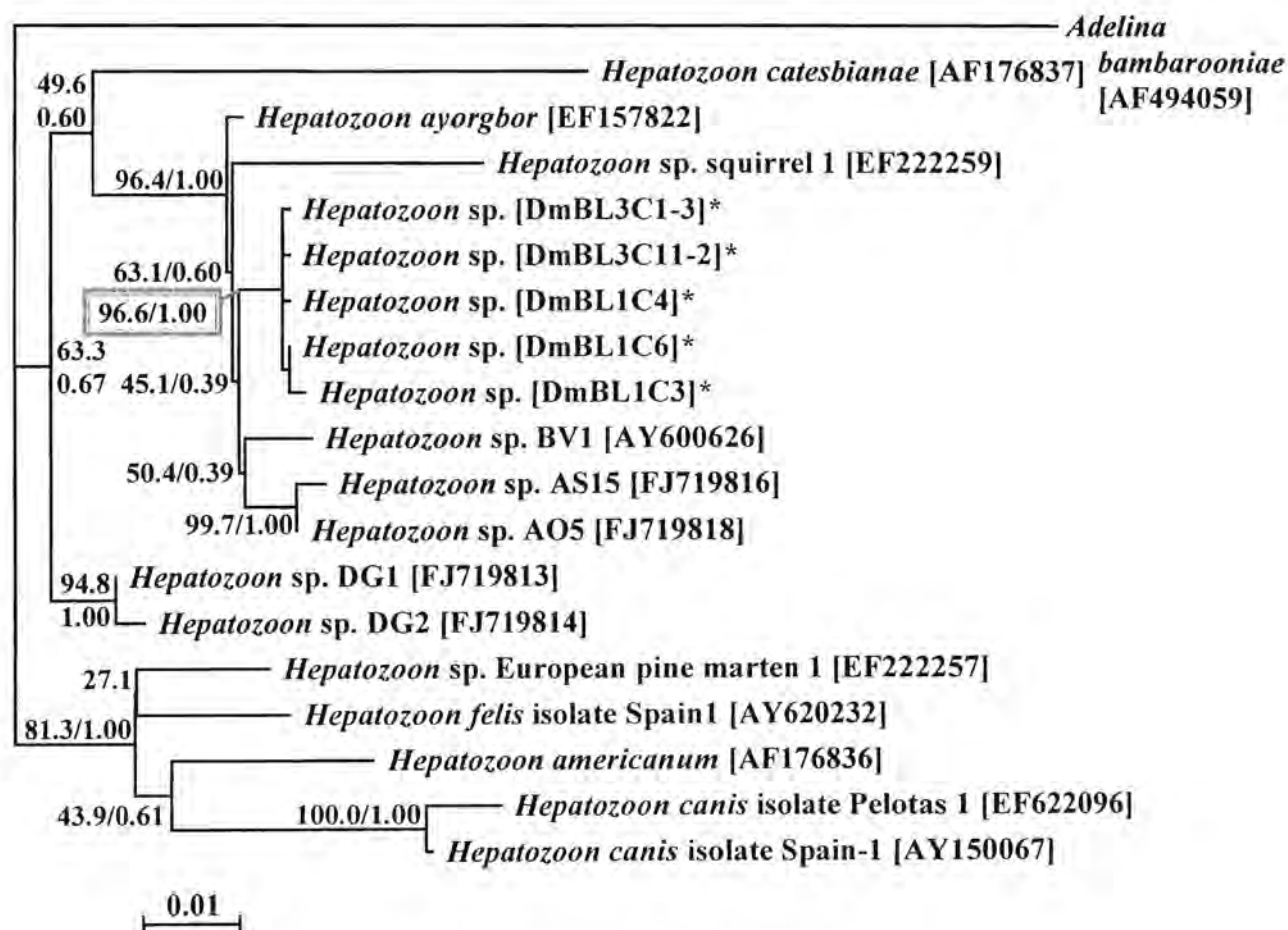
ชื่อโคลน	DmBL1C3	DmBL1C4	DmBL1C6	DmBL3C1-3	DmBL3C11-2
DmBL1C3	-				
DmBL1C4	0.2829%	-			
DmBL1C6	0.1413%	0.1413%	-		
DmBL3C1-3	0.2829%	0.1413%	0.1413%	-	
DmBL3C11-2	0.2829%	0.1413%	0.1413%	0.1413%	-

3. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรสิต *Hepatozoon* ที่พบในกิ้งก่าบินปีกจุด

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 1,417 คู่เบสของยีนสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต *Hepatozoon* sp. จำนวนทั้งหมด 5 สาย นำมาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับปรสิต *Hepatozoon* ชนิดและสายพันธุ์อื่นๆ จำนวน 13 สายพันธุ์ ที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยทำการสร้างไฟล์ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 18 สาย พร้อมกับสิ่งมีชีวิตที่ใช้เป็น outgroup คือ *Adelina bambambooniae* [GenBank accession number AF494059] อีก 1 สาย รวมทั้ง 19 สายของลำดับนิวคลีโอไทด์ ก่อนการวิเคราะห์ผลได้ทำการตัดส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ จึงได้ความยาวสุทธิของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ในไฟล์ alignment เท่ากับ 1,406 คู่เบส

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรสิต *Hepatozoon* ที่พบในกิ้งก่าบินปีกจุดด้วยโปรแกรม phyML 3.0 และ MrBayes เวอร์ชัน 3.2 โดยใช้แบบจำลองของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution model) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม jModelTest คือ General Time Reversible (GTR) model ร่วมกับ gamma distribution ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 ช่วง (category) แล้วนำผลการวิเคราะห์มาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการสุดท้าย (ภาพที่ 15) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอของปรสิต *Hepatozoon* sp. จำนวนทั้งหมด 5 สายจับกลุ่มอยู่ด้วยกันด้วยค่าสนับสนุน (support value) ที่สูง คือ ค่า bootstrap 96.6% จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม phyML และ ค่า posterior probability สูงสุด คือ 1.00 จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MrBayes แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสมอลซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอที่มาจากกิ้งก่าบินปีกจุดคนละตัวน่าจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มาจาก *Hepatozoon* sp. ชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ *Hepatozoon* ที่พบในกิ้งก่าบินปีกจุด แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Hepatozoon* 3 สายพันธุ์ คือ *Hepatozoon* sp. BV1 [AY600626] จากเลือดของ สัตว์ฟันแทะ bank vole ชนิด

Clethrionomys glareolus, *Hepatozoon* sp. AS15 [FJ719816] จากเลือดของสัตว์ฟันแทะชนิด *Abrothrix sanborni* และ *Hepatozoon* sp. AO5 [FJ719818] จากเลือดของ สัตว์ฟันแทะชนิด *Abrothrix olivaceus* อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์นี้อาจยังมีความไม่แน่ชัด เนื่องจากค่าสนับสนุนที่ได้ไม่สูงทั้งสองค่า คือ 45.1% และ 0.39



ภาพที่ 15 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่ได้จากเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด (ดอกจัน) แผนภูมินี้ถูกสร้างด้วยโปรแกรม phyML โดยใช้แบบจำลองของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ คือ GTR model ร่วมกับ gamma distribution ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 ช่วง และแสดงค่าสนับสนุน bootstrap บนกิ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากการวิเคราะห์ 1,000 ซ้ำ ส่วนค่าสนับสนุน posterior probability ที่อยู่ถัดจากค่า bootstrap คิดเป็นจำนวนเต็ม 1 ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MrBayes โดยใช้แบบจำลองของการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เดียวกันกับข้างต้นร่วมกับ gamma distribution ซึ่งแบ่งออกเป็น 8 ช่วง ทำการวิเคราะห์แบบคู่ขนาน (2 parallels runs) โดยในแต่ละครั้ง (run) ทำการวิเคราะห์จำนวน 5,000,000 ครั้ง รวมทั้งหมด 10,000,000 ครั้ง โดยทำการสุ่มการวิเคราะห์ที่ได้ทุกๆ 50 ครั้ง แต่

ตัดการวิเคราะห์ที่สุ่มขึ้นมาใน 25,000 ครั้งแรกของแต่ละชุดการวิเคราะห์ (run) ทิ้งก่อนที่จะนำการวิเคราะห์ที่เหลือจำนวน 150,002 [75,001x2] การวิเคราะห์มาสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการสุดท้าย (ความยาวของขีดที่กำกับด้วยเลข 0.01 แสดงความยาวที่ใช้เปรียบเทียบกับความยาวกิ่งของแผนภูมิเพื่อประมาณการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อ 1 ตำแหน่งในสายวิวัฒนาการ)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาปรสิตในเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* จำนวน 8 ตัว จากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี พบกิ้งก่าบินปีกจุดจำนวน 6 ตัว ติดปรสิตสกุล *Hepatozoon* sp. และจำนวน 2 ใน 6 ตัวนี้มีการติดปรสิตสกุล *Trypanosoma* sp. ร่วมด้วย ซึ่งปรสิตทั้งสองเป็นปรสิตที่ดำรงชีวิตอยู่ในกระแสเลือดของเจ้าบ้านและมีสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่กินเลือดเป็นอาหารเป็นพาหะ การติดปรสิตในครั้งนี้เมื่อทำการคิดเปอร์เซ็นต์ความชุกได้ค่าเท่ากับ 75% ซึ่งถือเป็นเปอร์เซ็นต์ความชุกที่สูงเมื่อเทียบกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ Telford (1986) ศึกษาปรสิตในเลือดของกิ้งก่าชนิดเดียวกันจำนวน 14 ตัวจากพื้นที่ใกล้กับกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย พบปรสิตในเลือด *Fallisia* และ *Plasmodium* ในกิ้งก่าบินปีกจุดเพียงตัวเดียวจากทั้งหมดคิดเป็นความชุกเท่ากับ 7.14% (1/14) เท่านั้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาเมื่อไม่นานนี้ของ สุวิชา ธงพานิช (2554) ซึ่งทำการสำรวจกิ้งก่าบินปีกจุดจำนวน 8 ตัว จากพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี พบปรสิต 1 ชนิดคือ *Hepatozoon* sp. ในกิ้งก่าบินจำนวน 5 ตัว คิดเป็นความชุกเท่ากับ 62.50% (5/8) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่าเปอร์เซ็นต์ความชุกสูงที่พบเป็นผลเนื่องมาจากความชุกของพาหะของปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่มีมากในพื้นที่ต่างจังหวัดเมื่อเทียบกับพื้นที่ในกรุงเทพหรือบริเวณใกล้เคียง โดยจากการศึกษาหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่ามีพาหะหลายชนิดหลายกลุ่มที่สามารถนำเชื้อ *Hepatozoon* sp. มาสู่สัตว์มีกระดูกสันหลังสี่เท้า (tetrapod vertebrate) ได้ โดยพาหะของเชื้อ *Hepatozoon* sp. จะเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่กินเลือดเป็นอาหาร (hematophagous invertebrate) จำพวกปลิง (leech) และสัตว์ขาข้อ (arthropod) เช่น ยุง เห็บ เป็นต้น (Irwin, 2002; Vilcins et al., 2009a; Wilson and Carpenter, 1996) การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความชุกในการติดปรสิต *Hepatozoon hinuliae* ในจิ้งเหลนน้ำ (Eastern water skink) *Eulamprus quoyii* โดย Salkeld และ Schwarzkopf (2005) พบว่า ในจิ้งเหลนน้ำตัวเต็มวัยจะมีการติดปรสิตมากกว่าในจิ้งเหลนน้ำวัยเยาว์ (juvenile) ทั้งนี้อาจเป็นเป็นผลเนื่องมาจากรูปแบบพฤติกรรมที่เปลี่ยนไป หมายรวมถึงการเปลี่ยนลักษณะที่อยู่อาศัยจากวัยเยาว์มาเป็นตัวเต็มวัย รูปแบบอาหารที่เปลี่ยนไป ซึ่งอาจนำมาถึงโอกาสที่จิ้งเหลนน้ำตัวเต็มวัยจะพบเจอต่อพาหะที่นำปรสิตมีมากกว่าในจิ้งเหลนน้ำวัยเยาว์

นอกจากปรสิตสกุล *Hepatozoon* sp. แล้ว การศึกษาค้นครั้งนี้ยังพบปรสิตสกุล *Trypanosoma* sp. *Trypanosoma* เป็นโปรโตซัวที่ใช้แฟลกเจลลัมในการเคลื่อนที่อยู่ในกลุ่ม Euglenozoa พวก Kinetoplastida ดำรงชีวิตเป็นปรสิตอยู่ในระบบเลือดของสัตว์มีกระดูกสันหลังทั้งกลุ่มสัตว์เลือดเย็นและสัตว์เลือดอุ่น โดยมีสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่กินเลือดเป็นพาหะ เช่น ยุง (Desser et al., 1973) และ ปลิง (Barta et al., 1989) *Trypanosoma* มีรูปร่างหลายแบบขึ้นอยู่กับระยะของเชื้อและชนิดของเจ้าบ้าน *Trypanosoma* sp. ที่ตรวจพบในการศึกษาค้นครั้งนี้อยู่ในระยะ trypomastigote แต่ยังไม่สามารถระบุถึงระดับชนิดได้ จากรายงานของ มาลินี ฉัตรมงคล และคณะ (2552) ที่ศึกษาปรสิตในเลือดของกิ้งก่าบินหลายชนิด (*Draco* spp.) จากเกาะภูเก็ต จังหวัดตราด พบว่า กิ้งก่าบินปีกจุด *D. maculatus* มีการติดปรสิต *Trypanosoma* sp. เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวอย่างกว้างขวางของปรสิตสกุลนี้ในกิ้งก่าบิน อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อมูลไม่เพียงพอที่จะทราบได้ว่า *Trypanosoma* sp. ที่พบจากกิ้งก่าบินปีกจุดของ

ทั้งสองพื้นที่เป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ ซึ่งควรจะมีการศึกษาในระดับโมเลกุลเพื่อยืนยันสถานภาพทางอนุกรมวิธานที่แท้จริงของ *Trypanosoma* spp. ทั้งสองที่พบ นอกจากนี้ งานวิจัยของ Telford (1982) ซึ่งศึกษาปรสิตสกุล *Trypanosoma* ในสัตว์เลื้อยคลาน *Mabuya multifasciata*, *Mabuya macularia* และ *Takydromus sexlineatus* ที่จับได้จากประเทศไทย พบ *Trypanosoma* 2 ชนิดใหม่ โดยให้ชื่อว่า *Trypanosoma scincorum* ซึ่งพบในเลือดของ *Mabuya multifasciata* และ *Mabuya macularia* และ *Trypanosoma takydrom* ที่พบในเลือดของ *Takydromus sexlineatus* ซึ่งมีรูปร่างคล้ายคลึงกับ *Trypanosoma* sp. ที่พบในกิ้งก่าบินปีกจุด *D. maculatus* ในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม ควรที่จะมีการศึกษาในรายละเอียดเพื่อยืนยันถึงชนิดที่พบต่อไป

การศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดในเนื้อเยื่อเลือดของกิ้งก่าบินปีกจุดที่ตรวจพบปรสิต แสดงให้เห็นว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อปรสิตจะมีขอบเขตเซลล์ไม่ชัดเจนหรือสลายไป นิวเคลียสของเม็ดเลือดที่ติดเชื้อจะมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดปกติและจะถูกเบียดไปอยู่ซิดริมเซลล์ ซึ่งพยาธิสภาพเช่นนี้พบมีรายงานในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อปรสิต *Hepatozoon mocassini* ซึ่งแสดงการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ (Nadler and Miller, 1985) นอกจากนี้ ปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่พบติดเชื้อใน *Dendrelaphis punctulatus* สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเสียรูปร่างและนิวเคลียสถูกเบียดไปอยู่ด้านหนึ่งของเซลล์ ยิ่งไปกว่านั้น เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อปรสิตยังมีการเปลี่ยนแปลงและยืดยาวออกในทิศทางที่ติดเชื้อชนิดเดียวกันนี้ (Vilcins et al., 2009b) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ยังไม่ได้ทำการตรวจสอบพยาธิสภาพที่อาจเกิดขึ้นกับอวัยวะอื่นๆ นอกจากเนื้อเยื่อเลือด เช่น ตับ ปอด และม้าม เป็นต้น ซึ่งเป็นอวัยวะที่ปรสิตสามารถมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยแบบ merogony และก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้ที่อวัยวะเหล่านี้ (Wozniak et al., 1996) ถึงแม้ว่าโดยปกติแล้วเจ้าบ้านที่ติดเชื้อปรสิตกลุ่ม haemogregarine มักไม่แสดงอาการหรือสามารถทนต่อเชื้อที่ติดได้ อย่างไรก็ตาม สัตว์ที่ติดเชื้อ *Hepatozoon* ในเซลล์เม็ดเลือดอาจแสดงภาวะโลหิตจางในระบบไหลเวียนโลหิตได้ (Nadler and Miller, 1985; Telford, 1984; Wozniak et al., 1996)

สำหรับการศึกษาวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากปรสิต *Hepatozoon* sp. ทั้ง 5 สาย พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำมาก กล่าวคือน้อยกว่า 1% ในการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการแยกชนิดของโปรติสต์โดย Chantangsi และคณะ (2007) พบว่า แม้ในซิติโอตสกุล *Tetrahymena* ซึ่งมีสมาชิกในสกุลที่มีความใกล้เคียงกันสูงยังพบความแตกต่างเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอระหว่างชนิดเท่ากับ 1.56% แสดงให้เห็นว่าปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่ติดเชื้อในกิ้งก่าบินที่จับได้จากพื้นที่เขาวังเขมร น่าจะเป็นปรสิตที่อยู่ในชนิดหรือสายพันธุ์เดียวกัน นอกจากนี้ การเป็นสายพันธุ์เดียวกันนี้ยังได้รับการสนับสนุนจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากปรสิต *Hepatozoon* sp. ทั้ง 5 สายจับอยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วยค่าสนับสนุนที่สูงมาก อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่พบในกิ้งก่าบินปีกจุด *D. maculatus* ในการศึกษาครั้งนี้กับปรสิต *Hepatozoon* sp. ที่มีข้อมูลทางอนุชีววิทยาสายพันธุ์อื่นๆ พบว่า *Hepatozoon* sp. ที่พบในกิ้งก่าบินปีกจุดมีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการ

กับ *Hepatozoon* 3 สายพันธุ์ ที่ได้จากเลือดของสัตว์ฟันแทะ 3 ชนิด ในการศึกษาของ Criado-Fornelio และคณะ (2006) และ Merino และคณะ (2009) อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์นี้อาจยังไม่แน่ชัด เนื่องจากค่าสนับสนุนความสัมพันธ์ที่ต่ำ เพื่อให้ได้ความสัมพันธ์ที่ชัดเจนและมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ควรที่จะมีการศึกษาปรสิต *Hepatozoon* ในเจ้าบ้านชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Hepatozoon* ที่ติดในเจ้าบ้านที่มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับกิ้งก่าบินปีกจุดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- มาลินี ฉัตรมงคลกุล ผุสดี ปริยานนท์ และ สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา 2548 ปรสิตของกิ้งก่าบิน (*Draco* spp.) พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี การประชุมวิชาการครั้งที่ 2 โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ณ อาคารประชุม 2 ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ คลองไผ่ จ. นครราชสีมา: 452-458.
- มาลินี ฉัตรมงคลกุล พงษ์ชัย หาญยุทธนากร วิเชษฐุ์ คนชื้อ และ ผุสดี ปริยานนท์ 2552 ปรสิตในเลือดของกิ้งก่าบิน (*Draco* spp.) จากเกาะกูด จังหวัดตราด การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 4 โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ณ ศูนย์อนุรักษ์และพัฒนาทรัพยากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี: 325-332.
- มาลินี ฉัตรมงคลกุล พงษ์ชัย หาญยุทธนากร ชิตชัย จันทร์ตั้งสี วิเชษฐุ์ คนชื้อ และ ผุสดี ปริยานนท์ 2554 ปรสิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่โครงการ อพ.สธ. รายงานวิจัยทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน โครงการ อพ.สธ.-จพ.
- วิรัชท์ เลาหะจินดา 2552 วิทยาสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุวิชา ธงพานิช 2554 ปรสิตในเลือดและพยาธิสภาพจากปรสิตในกิ้งก่าบินปีกจุด *Draco maculatus* ในพื้นที่เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Barta, J.R., Boulard, Y., and Desser, S.S. 1989. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: comparison of its parasites with those of Eastern North American ranids in the context of host phylogeny. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 108: 6-20.
- 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., 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.
- Criado-Fornelio, A., Ruas, J.L., Casado, N., Farias, N.A.R., Soares, M.P., Müller, G., Brum, J.G.W., Berne, M.E.A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C. 2006. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *J. Parasitol.* 92: 93-99.
- Desser, S.S., McIver, S.B., and Ryckman, A. 1973. *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. *J. Parasitol.* 59: 353-358.

- Guindon, S. and Gascuel, O. 2003. PhyML - a simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307-321.
- Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 17: 754-755.
- Irwin, P.J. 2002. Companion animal parasitology: a clinical perspective. *Int. J. Parasitol.* 32: 581-593.
- Laird, M. 1960. Malayan protozoa 3. Saurian malaria parasites. *J. Protozool.* 7: 245-250.
- Merino, S., Vasquez, R., Martinez, J., Celis-Diez, J., Gutierrez-Jimenez, L., Ippi, S., Sanchez-Monsalvez, I., Martinez-de la Puente, J. 2009. Molecular characterization of an ancient *Hepatozoon* species parasitizing the "living fossil" marsupial "monito del monte" *Dromiciops gliroides* from Chile. *Biol. J. Linn. Soc.* 98: 568-576.
- Nadler, S.A. and Miller, J.H. 1985. Fine structure of *Hepatozoon mocassini* (Apicomplexa, Eucoccidiurida) gamonts and modifications of the infected erythrocyte plasmalemma. *J. Protozool.* 32: 275-279.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253-1256.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 19: 1572-1574.
- Salkeld, D.J. and Schwarzkopf, L. 2005. Epizootiology of blood parasites in an Australian lizard: a mark-recapture study of a natural population. *Int. J. Parasitol.* 35: 11-18.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Telford, Jr., S.R. 1982. New saurian trypanosomes from Southeast Asian skinks and lacertids. *J. Parasitol.* 68: 319-324.
- Telford, Jr., S.R. 1984. Reptilian hemoparasites. In: *Diseases of amphibians and reptiles* (Edited by Hoff, G. L., Frye, F. L., and Jacobson, E. R.), pp. 385-517. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Telford, Jr., S.R. 1986. *Fallisia* parasites (Haemosporidea: Plasmodiidae) from the flying lizard, *Draco maculatus* (Agamidae) in Thailand. *J. Parasitol.* 72: 766-769.

- Telford, Jr., S.R. 1988. A contribution to the systematics of the reptilian malaria parasites, family Plasmodiidae (Apicomplexa: Haemosporina). *Bull. Florida State Mus., Biol. Sci.* 34: 65-96.
- Telford, Jr., S.R. 1995. *Plasmodium* spp. (Apicomplexa: Plasmodiidae) of the flying lizard *Draco volans* (Agamidae). *Syst. Parasitol.* 31: 53-60.
- Vilcins, I.-M.E., Old, J.M., and Deane, E. 2009a. Detection of a *Hepatozoon* and spotted fever group Rickettsia species in the common marsupial tick (*Ixodes tasmani*) collected from wild Tasmanian devils (*Sarcophilus harrisii*), Tasmania. *Vet. Parasitol.* 162: 23-31.
- Vilcins, I.-M.E., Ujvari, B., Old, J.M., and Deane, E. 2009b. Molecular and morphological description of a *Hepatozoon* species in reptiles and their ticks in the Northern Territory, Australia. *J. Parasitol.* 95: 434-442.
- Wilson, S.C. and Carpenter, J.W. 1996. Endoparasitic diseases of reptiles. *Semin. Avian Exot. Pet.* 5: 64-74.
- Wozniak, E. J., Kazacos, K. R., Telford, S. R., Jr., McLaughlin, G. L. 1996. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. *Int. J. Parasitol.* 26: 141-146.

ประวัติคณะวิจัย

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 การสำรวจชนิดของปลาและเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลาไมเกิ้ลในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี, งบประมาณปี 2552

7.2.2 ปริสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จังหวัดสตูล, งบประมาณปี 2552

7.2.3 ปริสิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ อพ.สธ., งบประมาณปี 2553-2554

7.2.4 การสำรวจเบื้องต้นของเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลาที่รับประทานเป็นอาหารในพื้นที่เขื่อนวชิราลงกรณ จังหวัดกาญจนบุรี, งบประมาณปี 2554

7.2.5 สันฐานวิทยาและพยาธิสภาพของปรสิตบางชนิด, งบประมาณปี 2555

7.3 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.3.1 ความหลากหลายของโพรโทซัวและแพลงก์ตอน พื้นที่โครงการ อพ.สธ., งบประมาณปี 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 ชิตชัย จันทร์ตั้งสี. 2548. *แพลงก์ตอน*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท เวิร์ค สแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 352 หน้า.

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

7.4.2 Journal articles

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

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

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

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, กรณ์วี เอี่ยมสมบูรณ์, พงชัย หาญยุทธนากร และ วิมล เหมะจันทร์. 2554. การสำรวจชนิดของปลาและเมตาเซอคาเรียของพยาลีโปไมโนปลา ในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 448-456.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, วิเชษฐ วนิชื้อ, พงชัย หาญยุทธนากร และผุสดี ปริยานนท์. 2550. ปรสิตรในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะกูด จังหวัดตราด. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. พิพิธภัณฑธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย อำเภอสัตหีบ จ. ชลบุรี*. หน้า 300.

- มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร, วิเชษฐุ์ คนชื้อ และ ผุสดี ปรียานนท์. 2552. ปรสิตในเลือดของ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จ.สตูล. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 4 ชมรมคณะ ปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ. ชลบุรี*. หน้า 108.
- มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร, วิเชษฐุ์ คนชื้อ และ ผุสดี ปรียานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของ สัตว์เลื้อยคลานจากพื้นที่หมู่เกาะสิมิลัน จังหวัดพังงา. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะ ปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 442-447.
- มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร, วิเชษฐุ์ คนชื้อ และ ผุสดี ปรียานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากหมู่เกาะอ่างทอง จังหวัดสุราษฎร์ธานี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 457-464.
- ทัศนธร ภูมิยุทธ์ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในป่าชายเลนปลูก บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงาน วิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล อีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 277-284.
- ศรัณย์ อัครวานิชิต, มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร และ นิพาดา เรือนแก้ว ดิษยทัต. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในสภาพที่มีสาหร่ายไกอในแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน. *การประชุมวิชาการ ประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 758-768.
- สุชา เฉยศิริ, ชิตชัย จันทรตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของ โปรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 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 Kaewwiyudth, S. 2006. Helminths infection in snake skin gourami *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910). In *Comparative Endocrinology and Biodiversity in Asia and Oceania, Proceedings of the 5th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology*, 7–10 February 2006, Bangkok, Thailand: 251–255.
- Prasankok, P., Chutmongkonkul, M., and Kanchanakhan, S. 2005. Characterisation of iridovirus isolated from diseased marbled sleepy goby, *Oxyeleotris marmoratus*. In P. Walker, R. Lester, and M. G. Bondad-Reantaso, (eds). *Diseases in Asian Aquaculture V: Fish Health Section*, Asian Fisheries Society, Manila: 197–206.
- Sailasuta, A., Satetasit, J., and Chutmongkonkul, M. 2011. Pathological Study of Blood Parasites in Rice Field Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). *Vet. Med. Int.* doi:10.4061/2011/850568.
- Satetasit, J., Chutmongkonkul, M., and Sailasuta, A. 2009. Blood parasites of the rice field frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1835) from Wang Nam Yen district, Sra-kaew province, Thailand. *Proceedings of the 8th Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference*, April 3, 2009: 84.

2. อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

- | | |
|--|--|
| 1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) | นายชิตชัย จันทร์ตั้งสี |
| ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) | Mr. Chitchai Chantangsi |
| 2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน | 3 1002 00170 19 1 |
| 3. ตำแหน่งปัจจุบัน | อาจารย์ |
| 4. 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 โปรติสต์วิทยา (Protistology)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.1.1 การประเมินศักยภาพในการกำจัดโลหะหนักของโปรติสต์ที่สกัดจากบ่อบำบัดน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำของกรุงเทพมหานคร

7.1.2 ความหลากหลายทางชีวภาพและการระบุชนิดของโปรติสต์บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยอาศัยรหัสดีเอ็นเอ

7.2 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 ความหลากหลายของโปรโตซัวและแพลงก์ตอนในพื้นที่ อพ.สธ.

7.2.2 ปริมาณสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ อพ.สธ.

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ผลงานวิจัย)

7.3.1 Book

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

7.3.2 Journal articles

สุชา เฉยศิริ, ชิตชัย จันทรตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโปรติสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 36–47.

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

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

- Chantangsi, C., Hoppenrath, M., and Leander, B. S. 2010. Evolutionary relationships among marine cercozoans as inferred from combined SSU and LSU rDNA sequences and polyubiquitin insertions. *Mol. Phylogenet. Evol.* DOI:10.1016/j.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 Ikononi, P. 2007. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of genus *Tetrahymena*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2412–2425.