# การศึกษาโครโมโซมของหอยลิมเนีย พาหะนำโรคพยาธิใบไม้ตับ ในโค-กระบือ

สุรีย์ ธรรมศาสตร์
ทัศนีย์ ชมภูจันทร์
สถาบันสุขภาพสัตว์และผลิตสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ บางเขน กทม. 10900

**Abstract** **Chromosomal Studies in Lymnaea Species, Intermediate Hosts of Cattle and Buffalo Liver Fluke.**

Suree Thammasart and Tasanee Chompoochan
National Animal Health and Production Institute,
Department of Livestock Development, Bangkhen, Bangkok 10900

Lymnaea species, intermediate hosts of cattle and buffalo liver fluke, from Indonesia *(L. (a.) rubiginosa),* India *(L. luteola),* Guam Island *(L. viridis)* and Thailand (Chaiyaphum province, Tak province, Nakhonsawan province, Prachubkirikun province and Bangkok) have been studied for chromosome numbers and their karyotypes. Modified Colchicine-treated embryos technique was used for chromosomes preparation in snails. Diploid chromosome numbers of 34 were found in *L. (a.) rubiginosa, L. luteola* and the lymnaea species from Thailand. The karyotype of lymnaea species from Chaiyaphum province, Tak province, Nakhonsawan province and Prachubkirikun province was the same as *L. (a.) rubiginosa* which consisted of 2 metacentric, 4 submetacentric and 11 subtelocentric chromosomes. *L. luteola* and lymnaea species from Bangkok showed 2n of 34 with 1 metacentric 5 submetacentric and 11 subtelocentric chromosomes. *L. viridis* showed 2n of 34 with 1 metacentric 7 submetacentric and 8 subtelocentric chromosomes. These results might be used as a guideline for future detailed work on karyotype studies of lymnaea species.

**บทคัดย่อ** หอยลิมเนียพาหะนำโรคพยาธิใบไม้ตับในโค กระบือ จากประเทศอินโดนีเซีย *(Lymnaea(a.) rubiginosa)* จากประเทศอินเดีย *(Lymnaea luteola)* จากเกาะกวม *(Lymnaea viridis)* และหอยลิมเนียจากท้องที่ในประเทศไทยคือ จ.ชัยภูมิ, จ.ตาก, จ.นครสวรรค์, จ.ประจวบคีรีขันธ์ และกรุงเทพฯ นำมาศึกษาโครโมโซม โดยเตรียมโครโมโซมจาก Colchicine-treated-embryos ผลการศึกษาพบว่า *L.(a.) rubiginosa, L. Luteola* และหอยลิมเนียจากท้องที่ในประเทศไทยมีจำนวนโครโมโซม (2n) = 34 สำหรับ *L. viridis* มีจำนวนโครโมโซม

(2n) = 32 หอยลิมเนียจากท้องที่ จ.ชัยภูมิ, จ.ตาก, จ.นครสวรรค์ และ จ.ประจวบคีรีขันธ์ มี karyotype เหมือนกับ *L.(a.) rubiginosa* คือประกอบด้วย metacentric chromosome 2 คู่ submetacentric chromosome 4 คู่ และ subtelocentric chromosome 11 คู่ หอยลิมเนียจากกรุงเทพฯ จะมี karyotype เหมือนกับ *L. luteola* ประกอบด้วย metacentric chromosome 1 คู่ submetacentric 5 คู่ และ subtelocentric chromosome 11 คู่ สำหรับ *L. viridis* จะมี karyotype ที่ประกอบด้วย metacentric chromosome 1 คู่ submetacentric chromosome 7 คู่ และ subtelocentric chromosome 8 คู่ ผลการศึกษานี้อาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษา karyotype ของหอยลิมเนียเพื่อแยกชนิด (species) อย่างละเอียดต่อไป

## คำนำ

โรคพยาธิใบไม้ตับในโค กระบือ นำความสูญเสียมาสู่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ ปีหนึ่งๆเป็นมูลค่านับร้อยล้านบาท สิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคนี้อย่างกว้างขวางก็คือหอยน้ำจืดในสกุล Lymnaea ดังนั้นหอยลิมเนียจึงถือเป็นพาหะสำคัญในการนำโรคพยาธิใบไม้ในตับของสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเฉพาะโค กระบือ การศึกษาเกี่ยวกับหอยลิมเนียจึงมีรายงานมากมายในท้องที่ที่มีการระบาดของโรคพยาธิใบไม้ในตับ ชนิดของหอยลิมเนียจากในแต่ละท้องที่จะมีความแตกต่างกันในรายละเอียดและความสามารถในการเป็นพาหะนำโรค เช่นที่ประเทศจอร์แดนพบว่า *L.natalensis* เป็นพาหะนำพยาธิ *Fasciola gigantica* และ *L. truncatula* นำพยาธิ *Fasciola hepatica* ในหลายประเทศทั่วโลก สำหรับประเทศไทยพบว่า *L.auricularia rubiginosa* เป็นพาหะนำโรคพยาธิใบไม้ตับในโค กระบือ (ทัศนีย์และคณะ 2519, จิรพล, 2524) และยังมีรายงานว่าหอยลิมเนียที่พบในประเทศไทยมี 4 ชนิด (Brandt, 1974) ซึ่งการแยกชนิดจากรายงานดังกล่าวอาศัยลักษณะรูปร่างของเปลือกหอยเป็นหลัก ในวิชาสังขวิทยา (Malacology) การแยกชนิดของหอยชนิดใดชนิดหนึ่งจะไม่ใช้ลักษณะเปลือกหอยเป็นหลักเพียงอย่างเดียวเพราะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจน ดังนั้นนักพิสูจน์ (Taxonomist) จะใช้การศึกษารายละเอียดรูปร่างลักษณะทั่วๆไป ดูลักษณะของอวัยะสืบพันธุ์ ดูลักษณะของฟัน (Radular forms) หรือดูจำนวนและลักษณะโครโมโซมเป็นหลักใหญ่ซึ่งจะบ่งชี้ได้เฉพาะชัดเจนกว่าการดูลักษณะเปลือกหอย

การศึกษาเกี่ยวกับ Cytotaxonomic ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีประโยชน์และได้รับความสนใจจากนักพิสูจน์มาเป็นเวลานานในการกำหนดความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แทนที่จะใช้เพียงลักษณะภายนอกเป็นเครื่องบ่งชี้ การศึกษาโครโมโซมในหอยชนิดต่างๆ ได้เริ่มมีมาตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 19 แต่ก็ยังไม่มีความก้าวหน้ามากนัก ปัจจุบันมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของจำนวนโครโมโซมกับการจัดระบบการแยกชนิดหอย (Burch, 1965 ; 1967 และ Patterson, 1967 ; 1969)

จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อให้รู้ถึงลักษณะรูปร่างและจำนวนโครโมโซมของหอยลิมเนียที่พบในส่วนต่างๆของประเทศไทยเปรียบเทียบกับโครโมโซมของหอยลิมเนียที่แยกชนิดแล้ว เพื่อจะได้ทราบถึงชนิดของหอยลิมเนียในประเทศไทย

## อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

### 1. สถานที่เก็บตัวอย่าง

1.1 หอยลิมเนียที่ใช้เป็นชนิดอ้างอิง *(Reference spp.)* นำมาจากประเทศอินโดนีเซีย *(L. (a) rubiginosa)* ประเทศอินเดีย *(L.luteola)* และเกาะกวม

*(L.viridis)*

1.2 หอยลิมเนียที่เก็บจากท้องที่ในประเทศไทย คือ
- อ่างเก็บน้ำบ้านกุดจิก อ.เกษตรสมบูรณ์ จ.ชัยภูมิ
- บึงบรเพ็ด อ.ท่าตะโก จ.นครสวรรค์
- หนองหลวง อ.เมือง จ.ตาก
- บึงสามร้อยยอด อ.ปราณบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์
- สระน้ำในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

## 2. การเตรียมตัวอย่าง

นำหอยลิมเนียแต่ละชนิดมาเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงในอ่างแก้ว ให้ใบผักกาดหอมเป็นอาหาร และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา เลี้ยงจนกระทั่งหอยจากแหล่งต่างๆออกไข่ นำไข่ที่มีตัวอ่อนมาเตรียมเพื่อศึกษาโครโมโซมตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ใช้ไข่หอยลิมเนียที่มีอายุ 5-6 วัน
2. แยกไข่หอยออกจากวุ้นที่หุ้มอยู่ให้เป็นฟองเดี่ยวๆ
3. นำไข่หอยที่แยกได้แช่ใน 0.01% colchicine solution ตั้งไว้นานประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง
4. ล้าง colchicine solution ออก
5. เติม 0.275% KCl solution ลงไปและแช่ไว้นานประมาณ 3 ชั่วโมง
6. ดูด 0.275% KCl solution ออกให้หมด ใช้ petridish กดให้เปลือกไข่แตก แล้วแยก embryo ออกจากเปลือกไข่
7. ใส่สาร fixative (methanol 3 ส่วน + glacial acetic acid 1 ส่วน) ลงไปพอสมควร
8. นำหลอดที่มีสาร fixative และ embryo ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,500 รอบ นาน 5 นาที
9. ดูดสาร fixative ออก แล้วเติมใหม่ ทำซ้ำแบบเดิมอีก 2 ครั้ง
10. ครั้งสุดท้ายเติมสาร fixative ลงไปจำนวนพอประมาณ นำเข้าเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ตั้งไว้ค้างคืนก่อนนำไปใช้
11. เตรียมกระจก (สไลด์) ให้สะอาด นำ embryo และสาร fixative ออกจากตู้เย็น ดูดสาร fixative ทิ้งเกือบหมดแล้วใช้ pipette ดูด embryo หยดลงบนกระจก
12. ปล่อยกระจกให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
13. ย้อมตัวอย่างบนกระจกที่แห้งแล้วด้วยสี giemsa 5% นาน 45 นาที
14. ตัวอย่างที่ย้อมสีแล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x 100 เท่า

## ผลการศึกษา

พบว่าจำนวนโครโมโซมของหอยลิมเนียชนิดอ้างอิง *(Reference spp.)* และหอยลิมเนียที่เก็บจากท้องที่จะเท่ากันและต่างกันดังนี้

*L. (a. ) rubiginosa* จำนวนโครโมโซม (2n) = 34(ภาพที่1)

*L.luteola* จำนวนโครโมโซม (2n) = 34 (ภาพที่ 2)

*L.viridis* จำนวนโครโมโซม (2n) = 32 (ภาพที่ 3)

หอยลิมเนียที่เก็บจากท้องที่จำนวนโครโมโซม (2n) จะอยู่ระหว่าง 32-34 โดยแต่ละชนิดจำนวนโครโมโซมสูงสุด (2n) จะเท่ากับ 34 (ภาพที่ 4, 5, 6, 7, 8)

สำหรับการจัดเรียงตัวและลักษณะของโครโมโซม (karyotype) เมื่อนำมาทำ karyogram พบว่า

: *L.(a.) rubiginosa* ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| metacentric chromosome | 2 | คู่ |
| submetacentric chromosome | 4 | คู่ |
| subtelocentric chromosome | 11 | คู่ |

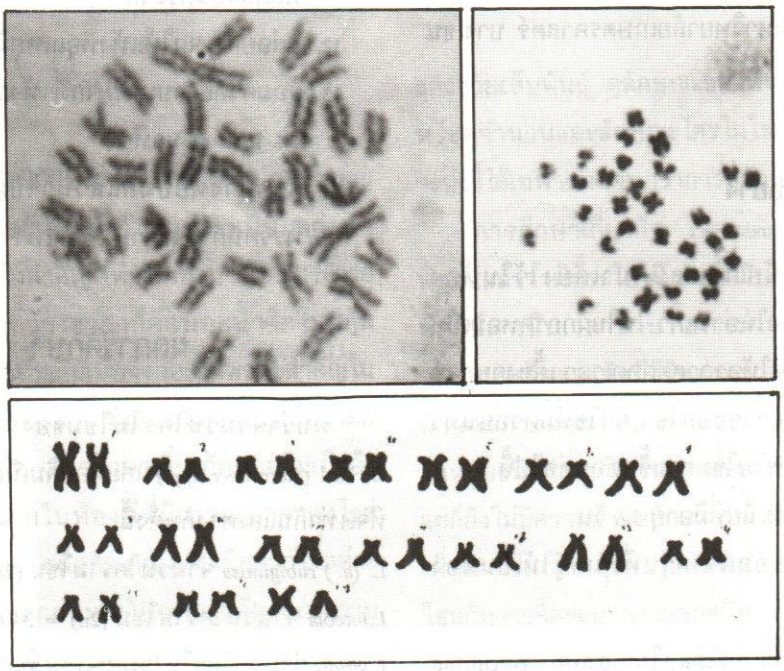
: *L.luteola* ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| metacentric chromosome | 1 | คู่ |
| submetacentric chromosome | 5 | คู่ |
| subtelocentric chromosome | 11 | คู่ |

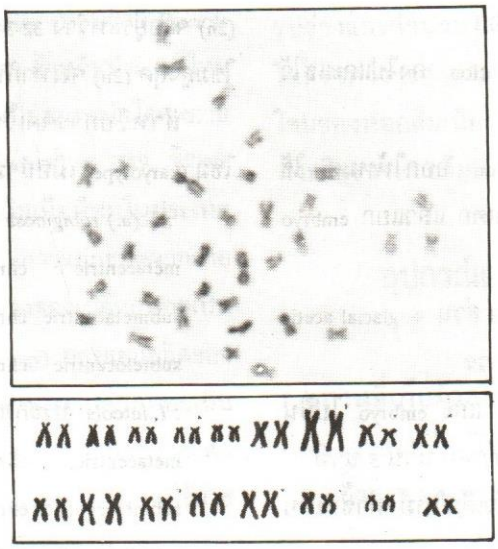
: *L.viridis* ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| metacentric | chromosome | 1 คู่ |
| submetacentric | chromosome | 7 คู่ |
| subtelocentric | chromosome | 8 คู่ |

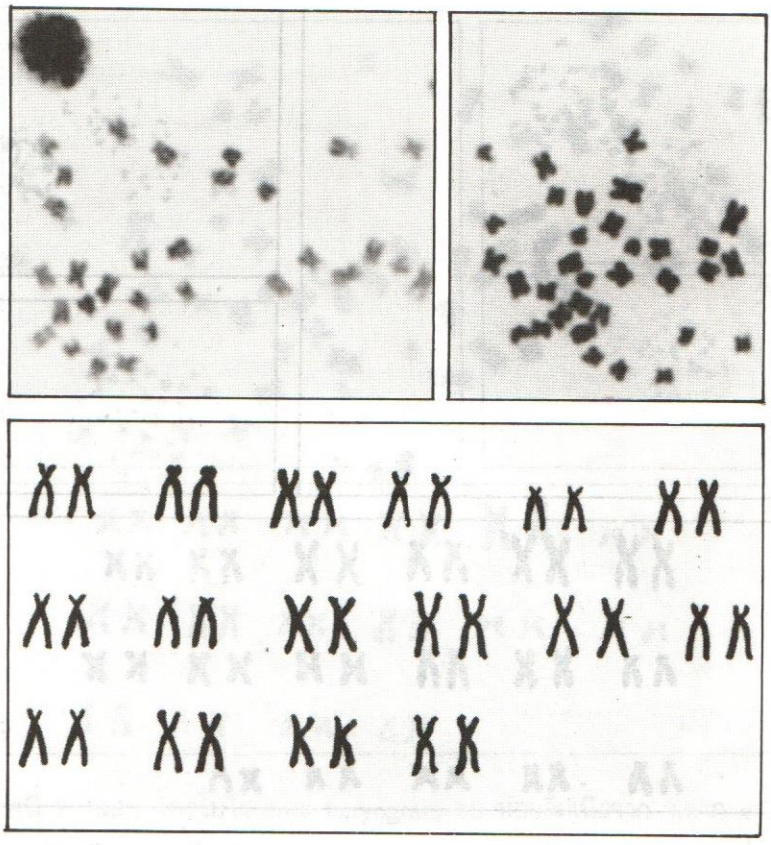
หอยลิมเนียจากท้องที่พบว่า หอยลิมเนียจาก จ.ชัยภูมิ จ.ตาก จ.นครสวรรค์ จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีจำนวนโครโมโซม (2n) = 34 และมีลักษณะ karyotype เหมือนกับ *(L.(a.) rubiginosa)* ส่วนหอยลิมเนียจากสระน้ำในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบจำนวนโครโมโซม (2n) = 34 แต่มีลักษณะ karyotype เหมือน *L.luteola*



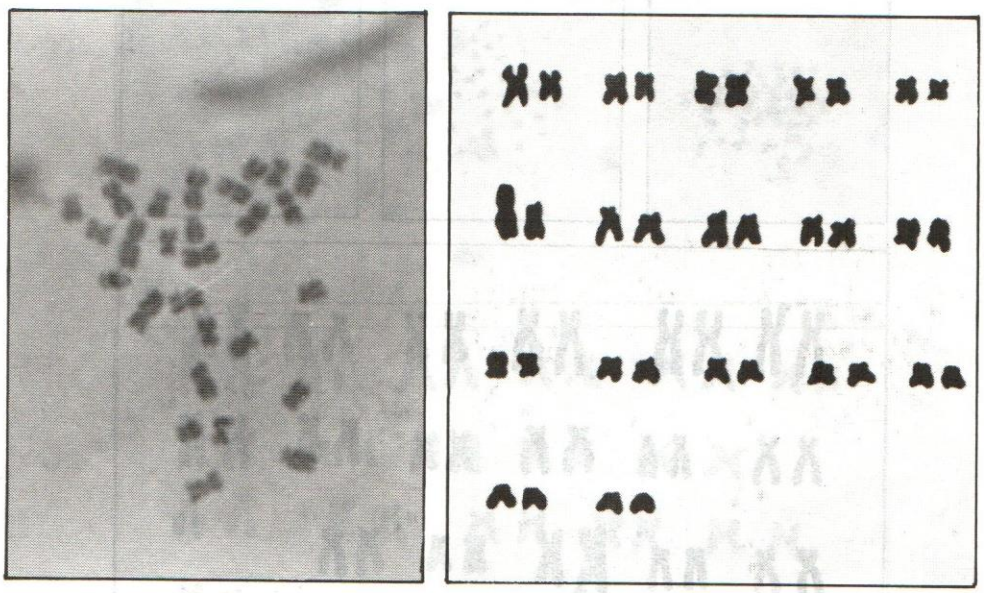
**ภาพที่ 1** แสดงโครโมโซมและ karyogram ของหอย *L. a. rubiginosa* x 100



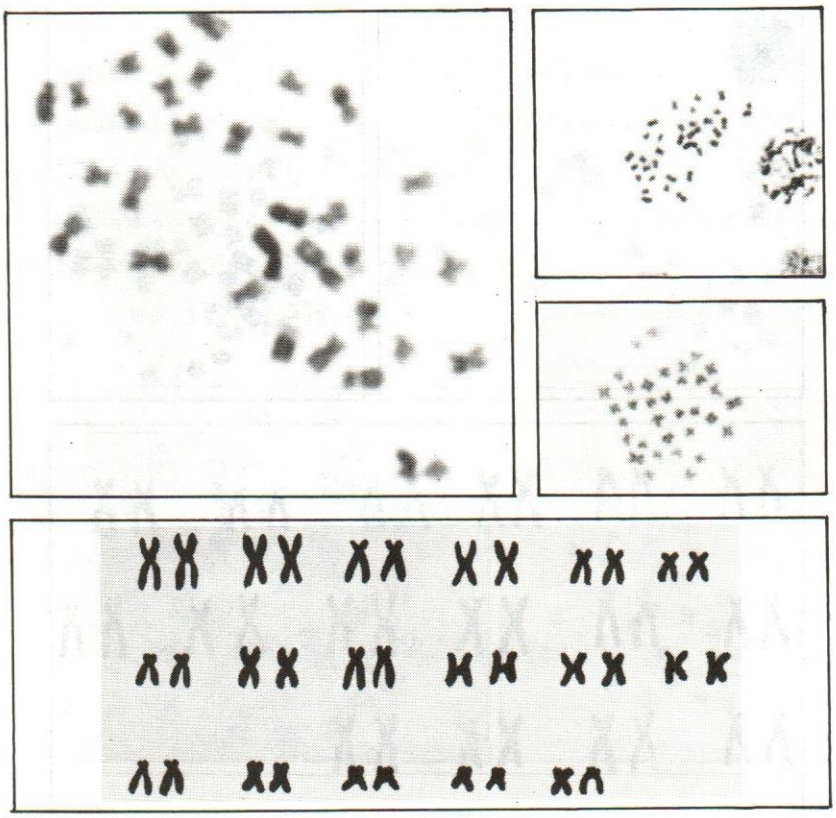
**ภาพที่ 2** แสดงโครโมโซมและ karyogram ของหอย *L. luteola* x 100



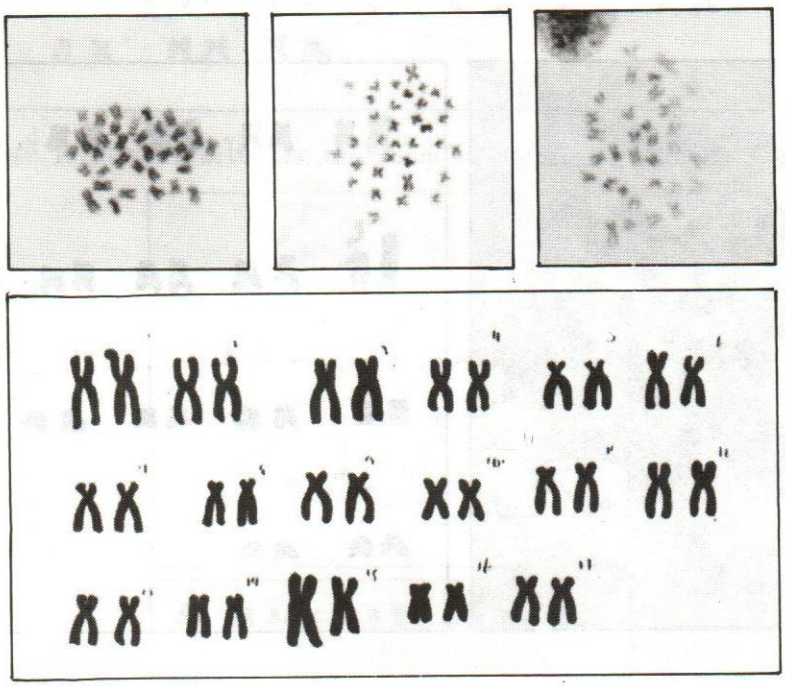
**ภาพที่ 3** แสดงโครโมโซมและ karyogram ของหอย *L. viridis* x 100



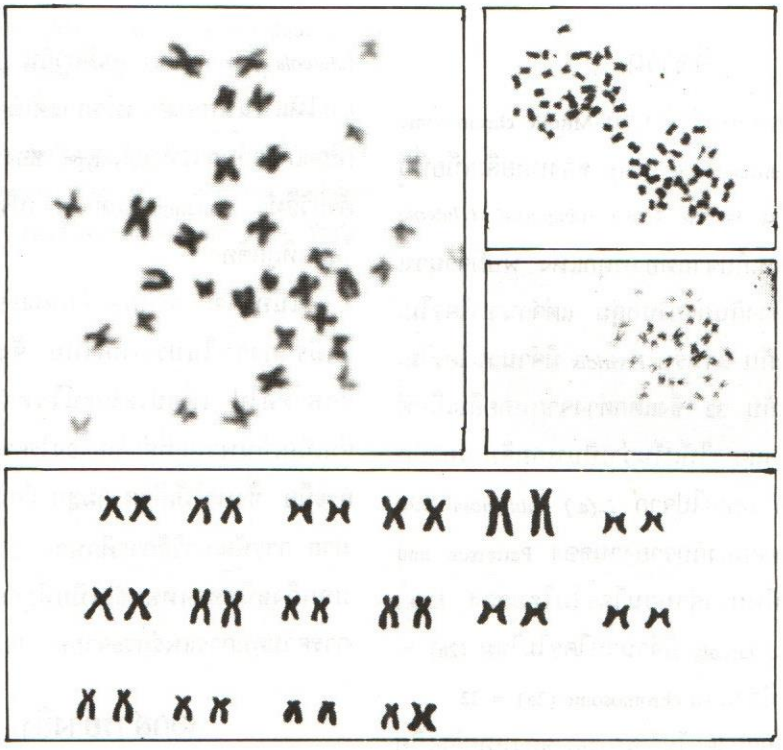
**ภาพที่ 4** แสดงโครโมโซมและ karyogram ของหอยลิมเนียจากสระน้ำในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ x 100



**ภาพที่ 5** แสดงโครโมโซมและ karyogram ของหอยลิมเนียจาก จ.ชัยภูมิ x 100



**ภาพที่ 6** แสดงโครโมโซมและ karyogram ของหอยลิมเนียจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ x 100



**ภาพที่ 7** แสดงโครโมโซมและ karyogram ของหอยลิมเนียจาก จ.ตาก x 100



**ภาพที่ 8** แสดงโครโมโซมและ karyogram ของหอยลิมเนียจาก จ.นครสวรรค์ x 100

## วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่าจำนวน Mitotic chromosome หรือ Diploid chromosome (2n) ของหอยลิมเนียที่มีจำนวนเท่ากับ 34 พบใน *L.(a.) rubiginosa*, *L.luteola* ส่วนหอยลิมเนียที่เก็บจากท้องที่ทุกแห่ง พบมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันภายในกลุ่ม แต่จำนวนโครโมโซมสูงสุดจะเท่ากัน สำหรับ *L.viridis* มีจำนวนโครโมโซม (2n) เท่ากับ 32 ซึ่งแตกต่างจากหอยลิมเนียที่ศึกษาทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าเป็นหอยลิมเนียชนิด (species) ที่ต่างกันออกไปจาก *L.(a.) rubiginosa* และ *L.luteola* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Patterson and Burch, 1978 ที่พบว่าจำนวนโครโมโซมของ *L.(a.) rubiginosa* และ *L.luteola* มีจำนวนโครโมโซม (2n) = 34 และ *L.viridis* มีจำนวน chromosome (2n) = 32

สำหรับจำนวนโครโมโซม (2n) ของหอยลิมเนียที่เก็บจากท้องที่พบว่าอยู่ระหว่าง 32-34 ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากขั้นตอนในการเตรียม หรือเป็นสิ่งแปลกปลอม การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมในสัตว์อาจเกิดขึ้นได้จากสาเหตุดังต่อไปนี้

(1) เกิด chromosome fusion

(2) fragmentation

(3) meiotic หรือ mitotic non-disjunction

(4) duplication ของ entire chromosome complement (Patterson and Burch, 1978)

การศึกษา karyotype ด้วยการทำ karyogram ของหอยลิมเนียทั้งหมดพบว่า *L.(a.) rubiginosa* มีลักษณะที่แตกต่างจาก *L.luteola* และ *L.viridis* ซึ่งเป็นการแสดงความแตกต่างของหอยแต่ละชนิด (species) สำหรับหอยลิมเนียที่เก็บจากท้องที่ของจังหวัดชัยภูมิ, จังหวัดตาก, จังหวัดนครสวรรค์ และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์มี karyotype ใกล้เคียงกับ *L.(a.) rubiginosa* จึงอาจเป็นไปได้ว่าหอยลิมเนียดังกล่าวนี้จะเป็นชนิด *L.(a.)rubiginosa*

ส่วนหอยลิมเนียที่เก็บจากสระน้ำในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ มี karyotype เหมือนกับ *L.luteola* จึงอาจเป็นชนิดเดียวกับ *L.luteola* ซึ่งการยืนยันให้แน่นอนจะต้องทำการศึกษาต่อไปในรายละเอียดเกี่ยวกับการทำkaryotype ของหอยลิมเนียเหล่านี้ด้วยวิธีทำ Banding วิธีต่างๆ เปรียบเทียบกันเพื่อจะได้ผลที่ถูกต้อง

เนื่องจากการศึกษาลักษณะนี้ในหอยลิมเนียยังไม่มีรายงานในประเทศไทย จึงน่าที่จะได้ทำการศึกษาต่อไป เพื่อประโยชน์ในทางวิชาการและหอยลิมเนียเป็นพาหะที่สำคัญของโรคพยาธิใบไม้ตับในโคกระบือ ซึ่งทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก การพัฒนาวิธีการศึกษาทาง Cytology จะช่วยบ่งบอกถึงชนิดของหอยลิมเนียที่ถูกต้องอันจะนำมาซึ่งการควบคุมการแพร่กระจายของโรคต่อไป

## เอกสารอ้างอิง


1. ทัศนีย์ ชมภูจันทร์, บรรจง อภิวัฒน์นากร, วิสุทธิ์ เสนีย์วงศ์ ณ อยุธยา และสมชาย เพ็ญไพรัชกุล 2519. การศึกษาชีพจักรของพยาธิใบไม้ในตับโคกระบือ. สัตวแพทยสาร 27 (4) : 43-47.
2. จิรพล วิบูลย์วัฒน์ 2524. หอยพาหะกลางนำโรคพยาธิใบไม้ตับโค กระบือในประเทศไทย. ประมวลเรื่องประชุมวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 8 : 32-37.
3. Brandt, R.A.M. 1974. The non-marine aquatic mollusca of Thailand. Archiv. Fur. Mollusken Kunde. 105 : 228-233.
4. Burch, J.B. 1965. Chromosome numbers and systematics in euthyneuran snails. Proc. First. Ear. Malacol. Congr. 1962 : 215-241.
5. Burch, J.B. 1967. Cytological relationships of some Pacific gastropods. Venus. Jpn. J. Malacol. 25 : 118-135.
6. Patterson, C.M. 1967. Chromosome numbers and systematics in strepneuran snails. Malacologia. 5 : 111-125.
7. Patterson, C.M. 1969. Chromosomes of molluses. Proc. Symp. Moll. Mar. Biol. Assoc. India. 2 : 635-686.

8. Patterson, C.M. 1971. A karyotype technique using snail-embryos. Malacol. Rev. 4 : 27.
9. Patterson, C.M. and Burch, J.B. 1978. Chromosomes of pulmonate molluses. Fretter, V. and Peake, J. (Eds.) Pulmonates. Vol. 2A, Systematics, evalution and ecology. Academic Press, Inc. New York : 171-217.

สัตวแพทยสาร เป็นของสมาชิกสัตวแพทยสมาคมฯ ทุกๆ ท่าน

สมาชิกที่ไม่ได้รับหนังสือ หรือย้ายที่อยู่ โปรดแจ้งโดยตรงที่

สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยฯ
เลขที่ 69/26 ซอยโรงภาพยนตร์เอเธนส์
ถนนพญาไท เขตพญาไท กทม. 10400
โทร. 252-8773

ติดต่อตามวัน เวลาราชการ มีเจ้าหน้าที่ประจำตลอดเวลา