

ชนิดและการแพร่กระจายของปรสิตมิคโซสปอริเดียในปลาเศรษฐกิจของจังหวัดตรัง
Diversity and Distribution of Myxosporidian from Economic Fishes in Trang Province

นรสิงห์ เพ็ญประไพ¹ วีรวุฒิ เลิศสุทธิชवाल² มาโนช ขำเจริญ¹

กิตติชนม์ อุเทนพะพันธุ์³และกิจการ ศุภมาตย์³

Norasing Penprapai, Theerawoot Lertsutthichawan, Manoch Khumcharoan,
 Kittichon U - taynapun and Kidchakarn Supamattaya

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

²คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

³คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

¹Faculty of Science and Fisheries Technology. Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus.

²Faculty of Science and Technology. Rajamangala University of Technology Srivijaya Nakhonsrithammarat Campus.

³Faculty of Natural Resource, Prince of Songkhla University, Hatyai Campus

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างปลาน้ำจืด น้ำกร่อย และปลาน้ำเค็ม ในจังหวัดตรัง ระหว่างเดือน มกราคม ถึง เดือน กันยายน 2549 เก็บปลาทั้งหมด 647 ตัว จาก 16 วงศ์ 21 ชนิด พบปลาติดเชื้อปรสิต 1.08 เปอร์เซ็นต์ ของปลาทั้งหมด พบปรสิตในปลาหมอไทย 7.1 เปอร์เซ็นต์, ปลาเก็ดเหลือง 5.5 เปอร์เซ็นต์, ปลากระพงขาว 10 เปอร์เซ็นต์, ปลากระบอก 12.5 เปอร์เซ็นต์, ปลาชีกเดียว 3.2 เปอร์เซ็นต์, ปลากระเบน 1.4 เปอร์เซ็นต์, ปลากระรัง จุดแดง 3.3 เปอร์เซ็นต์, และปลาดุกทะเล 3.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตรวจพบปรสิตสกุล *Myxobolus*, *Henneguya* และ *Zschokkella*, ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลา ได้แก่ ผิวหนัง, เกล็ด, เหงือก, กระเพาะอาหาร และ ถุงน้ำดี ในการศึกษาทางพยาธิสภาพไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แต่มีการศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ของปรสิตในตัวเต็มวัยทั้งโครงสร้างภายนอกและภายใน สำหรับ *Zschokkella* พบโครงสร้างที่สามารถเห็นชัด ได้แก่ Volvogenic cell, Sporoplasm, Polar capsule และ Polar filament ส่วนการศึกษาทาง PCR (Polymerase chain Reaction) ยังไม่ปรากฏชัดว่าเป็นชนิดใหม่ (New species)

คำสำคัญ : มิคโซสปอริเดีย, ปลาเศรษฐกิจ, จังหวัดตรัง

Abstract

Some Fresh water, Brackish and Sea water fishes were collected in the area of Trang Province during January and September, 2006 of 647 collected fish samples were classified to be 16 Family and 21 Genus. We found that 1.08 Percent of all specimens were infected by Myxosporidia parasites composed of *Anabas testudineus* (7.1 Percents), *Hemibagrus nemurus* (5.5 Percents), *Lates calcarifer* (10 Percents), *Moolgarda seheli* (12.5 Percents), *Psettodes erumei* (3.2 Percents), *Himantura imbricatus* (1.4 Percents), *Epinephelus coioides* (3.3 Percents) and

Plotosus canius (3.1 Percents), respectively Infections parasite in the genus *Myxobolus*, *Henneguya* and *Zschokkella* found in various organ such as skin, scale, stomach and gall bladder. From histopathological study, no evidence for histopathological lesion. Furthermore, interior and exterior structure of adult parasites were observed Volvogenic cell, Sporoplasm, Polar capsule and Polar filament by electron microscope Following PCR (Polymerase chain reaction) result also no confirm for new species of parasites were found.

Keyword : Myxosporidian, Economic fish, Trang Province.

บทนำ

การศึกษาปรสิตมิซสปอริเดียในปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย ปลาน้ำเค็ม ของแหล่งน้ำต่างๆ ที่อยู่ในจังหวัดตรัง ทำให้ทราบโครงสร้างและการแพร่กระจายของปรสิตมิซสปอริเดียได้เป็นอย่างดี ปรสิตมิซสปอริเดียเป็นปรสิตที่มีบทบาทในส่วนที่เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทางการประมงของประเทศไทย โดยเฉพาะพบในปลาทำให้ออกให้เกิดโรคสัตว์น้ำโดยปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดโรคสัตว์น้ำได้แก่ สิ่งแวดล้อม ที่อยู่อาศัย และตัวเชื้อโรค ปัจจุบันเริ่มมีการตระหนักมากถึงภัยที่เกิดจากปรสิตชนิดนี้ โดยเฉพาะในต่างประเทศที่ระบาดมาก โดยเฉพาะเกิดกับปลาในเขตหนาวสร้างความเสียหายอย่างมากในกลุ่มปลาเศรษฐกิจ เช่น ปลา Trout, Salmol มวลเหตุที่มีการศึกษาค้นคว้าเพื่อต้องการศึกษาสัตวศาสตร์พื้นฐานของการศึกษาในระดับสูงต่อไป รวมทั้งศึกษาด้าน ความชุกชุมของปรสิต ตลอดจนการศึกษาค้นคว้า การเกิดพยาธิสภาพ ข้อมูล การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) รวมถึงกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา เพื่อเป็นแนวทางศึกษาขั้นสูง เพื่อแยก species ของปรสิต โดยศึกษาทางโมเลกุลโดยเทคนิค PCR ด้วย เพื่อเป็นข้อมูล การศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่ก้าวล้ำหน้าต่อไป ซึ่งสภาพภูมิศาสตร์ที่เลือกศึกษาค้นคว้า โดยเลือกที่จะศึกษาในจังหวัดตรังซึ่งอยู่ทางภาคใต้ฝั่งอันดามันของประเทศไทย และจากการศึกษาประวัติความเป็นมาโดยนักวิชาการที่อยู่ในประเทศไทย มีการรายงานไม่บ่อยนักเกี่ยวกับปรสิตชนิดนี้ ที่เด่น ๆ ในการศึกษาภาคกลาง ภาคใต้ ของประเทศไทยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางด้านปรสิตมิซสปอริเดีย จะเป็นแนวทางในการจัดการ และการป้องกันรักษา เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาทางด้านปรสิตมิซสปอริเดียอย่างแพร่หลายต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างปลา

เก็บตัวอย่างปลาในพื้นที่จังหวัดตรังจำนวน 21 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยปลาจำนวน 3 กลุ่มคือ ปลาน้ำจืดจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ ปลานิล, ปลาตะเพียนขาว, ปลาหมอไทย, ปลายี่สกเทศ, ปลาน้ำจืด, ปลาดุกบิ๊กอุย, ปลาดุกยักษ์, ปลาช่อน, ปลาชะโอน, ปลาชิวหางควาย, ปลากระแห และปลาน้ำจืดจำนวน 3

ชนิด ได้แก่ ปลากระบอก, ปลากระพงขาว และปลากะรังจุดแดง รวมถึงปลาน้ำเค็มจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ปลา
 ดุกทะเล, ปลากระเบน, ปลาตาหวาน, ปลาซีกเดียว, ปลาสีกุน และปลาลิ้นหมา โดยรวบรวมตัวอย่างปลาจาก
 ตลาดปลาในท้องถิ่นจังหวัดตรังและทำการเก็บตัวอย่างปลา เดือนละครั้ง เก็บจากตลาดอำเภอเมือง อำเภอ
 กันตัง อำเภอปะเหลียน อำเภอวังวิเศษ จังหวัดตรัง จำนวนปลาที่เก็บได้แต่ละครั้งมีจำนวนไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับ
 ปลาที่นำมาขายในตลาดเป็นเวลา 9 เดือน ระหว่างเดือนมกราคม 2549 ถึงกันยายน 2549

2. การตรวจหาปรสิต

- 2.1 ตรวจดูบริเวณลำตัวปลา เหงือก, ครีบ, ตา, ช่องจมูก และช่องทวาร ด้วยตาเปล่าว่าพบ ปรสิต
 หรือไม่ โดยเฉพาะลักษณะตุ่ม (Cyst)
- 2.2 นำอวัยวะที่พบตุ่ม Cyst มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ
- 2.3 แยกตุ่ม Cyst มาวางบน Slide แล้วกดทับด้วย Cover glass เพื่อให้ cyst แตกกระจาย แล้ว
 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
- 2.4 บันทึกรูปร่างลักษณะของกลุ่มมิกโซสปอริเดีย และทำการถ่ายภาพบันทึก

3. การจำแนกปรสิตในระดับสกุล โดยศึกษาจากเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องได้แก่ ประไพสิริ (2538), นรสิงห์
 (2542), รั้งสัญ (2544), Lom and Dykova (1992), Shulman (1966), Lom and Dykova (2006)

4. คำนวณการแพร่กระจายและความชุกชุมตามสูตร ดังนี้

$$\text{ความชุกชุม (prevalence)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่พบว่ามีปรสิต}}{\text{จำนวนปลาที่ทำการตรวจ}} \times 100$$

5. การศึกษาทางด้านพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

ทำการตรวจอวัยวะปลาที่ดองด้วย formalin 16 เปอร์เซ็นต์ อย่างน้อย 24 ชั่วโมงผ่าน automatic
 tissue processor ตัดเนื้อเยื่อแต่ละส่วนผ่านกระบวนการต่าง ๆ ตามวิธีการศึกษาของ Humason (1962)
 Bancroft (1967) ตามลำดับ

6. การศึกษาโครงสร้างของปรสิตมิกโซสปอริเดียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- 6.1 การศึกษารูปร่างโครงสร้างของปรสิตโดยวิธีการศึกษายานนอกเซลล์โดยวิธี Scanning electron
 microscope (SEM)
- 6.2 การศึกษารูปร่างโครงสร้างของปรสิตโดยวิธีการศึกษายานในของเซลล์โดยวิธี Transmission
 electron microscope (TEM)

7. การศึกษาชนิดของปรสิต (species) โดยเทคนิค PCR

7.1 การสกัด genomic DNA

ทำการแยกสปอร์ของปรสิตออกจากเนื้อเยื่อของปลาเจ้าบ้านตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Buhri และ
 คณะ (2003) โดยการนำเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ 50 mg มาทำการขยี้ในน้ำกลั่นเพื่อให้สปอร์ของปรสิตที่เกาะ
 กลุ่มกระจายตัวออกจากกัน ปั่นตกตะกอนที่ 6,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการล้าง 2 ครั้ง ด้วย PBS buffer pH
 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นจะทำการแยกสปอร์ของปรสิตให้บริสุทธิ์โดยการทำให้ percoll gradient ที่ความ
 เข้มข้น 25% 50% 75% และ 100% ตามลำดับและทำการหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา

10 นาที ทำการเก็บสปอร์และล้างด้วย PBS buffer pH 7.4 จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นทำการย่อยเปลือกหุ้มสปอร์ โดยใช้เอนไซม์ protenase K (2% w/v) ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง ทำการสกัด genomic DNA จากสปอร์ของปรสิตโดยเติม DNAzol 400 μ l บดสปอร์ให้ละเอียด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายตะกอน DNA ด้วย absolute alcohol 200 μ l จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอน DNA ด้วย 95% แอลกอฮอล์ที่เย็นจัด 2 ครั้ง ทำการละลายตะกอน DNA ในน้ำกลั่น 30 μ l โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าตะกอน DNA จะละลายหมด ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน Tris – acetate (TAE; 0.04 M Tris – acetate, 0.001 M EDTA) ย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วตรวจสอบด้วยเครื่อง UV trans – illuminator นำไปวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ด้วยเครื่อง Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm นอกจากนี้ยังทำการสกัด 18S rDNA ของปลาเจ้าปลาที่ไม่ได้ติดเชื้อปรสิตด้วยวิธีเดียวกัน เพื่อนำมาตรวจสอบด้วยความจำเพาะของ Primer ต่อปรสิต

7.2 การเพิ่มจำนวน 18S rDNA

18S rDNA ของปลาเจ้าปลาที่ไม่ได้ติดเชื้อและของปรสิต จะถูกเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer MX5 และ MX3 Andree และคณะ(1998) ซึ่งสามารถสังเคราะห์สาย DNA จากปรสิตขนาดประมาณ 1,650 คู่เบส โดยใช้ DNA ต้นแบบ 10 – 100 nM MgCl₂ 1.5 mM dNTPs 200 μ L primer 0.45 pM และเอนไซม์ Taq polymerase 2 Unit ด้วยเครื่อง Thermocycle (PTC – 100tm MJ Research, MA) ด้วยรอบการทำงาน (cycle) 40 รอบ ตามขั้นตอนต่อไปนี้ บ่ม PCR reaction ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเริ่มปฏิกิริยา จากนั้น denaturation 95 °C 1 นาที annealing 65 °C 1.5 นาที elongation 72 °C 2 นาที แต่รอบสุดท้ายจะเพิ่มเวลาเป็น 10 นาที (ดัดแปลงจาก Buhri และคณะ,2003) ตรวจสอบขนาด PCR product ด้วยเทคนิค Agarose gel eletrophoresis

ผลการศึกษา

1. การแพร่กระจายและปริมาณติดเชื้อปรสิตมิโกโซสปอร์ริเดีย

จากการเก็บตัวอย่างปลา ปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย ปลาน้ำเค็มในจังหวัดตรัง ได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอกันตัง อำเภอปะเหลียน อำเภอวังวิเศษ ในระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนกันยายน 2549 สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาได้ทั้งหมดจำนวน 647 ตัว ใน 16 วงศ์ (Family) 21 ชนิด ซึ่งปริมาณการเก็บตัวอย่างน้ำหนักรวมและความยาวของปลาแสดงในตารางที่ 4, 5, 6 พบการติดเชื้อในปลา 8 ชนิด โดยเป็นปลาน้ำจืด 2 ชนิด ได้แก่ ปลาหมอไทย และปลากดเหลือง, ปลาน้ำกร่อย 3 ชนิด ได้แก่ ปลากระบอก, ปลากระังจุดแดง และปลากระพงขาว ในขณะที่พบการติดเชื้อในปลาน้ำเค็ม 3 ชนิด ได้แก่ ปลาดุกทะเล, ปลากะเบน และปลาชีกเดียว ซึ่งคิดเป็น 1.08 เปอร์เซ็นต์ของปลาที่ทำการสำรวจทั้งหมด ซึ่งการติดเชื้อปรสิตมีดังนี้ การติดเชื้อในปลาน้ำจืด ได้แก่ ปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) ติดเชื้อปรสิต *Henneguya* sp. ชนิด A จำนวน 2 ตัว จากปลาตัวอย่างจำนวน 28 ตัว คิดเป็น 7.1 เปอร์เซ็นต์, ปลากดเหลือง ติดเชื้อปรสิต *Henneguya* sp. ชนิด B จำนวน 2

ตัว จากปลาตัวอย่าง 36 ตัว คิดเป็น 5.5 เปอร์เซ็นต์, ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ติดเชื้อปรสิต *Henneguya* sp. ชนิด C จำนวน 2 ตัว จากปลาตัวอย่าง 20 ตัว คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์, ปลากะบอก (*Moolgarda sehelii*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* sp. ชนิด A จำนวน 3 ตัว จากปลาตัวอย่าง 24 ตัว คิดเป็น 12.5 เปอร์เซ็นต์, ปลากะเบน (*Himantura imbricatus*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* ชนิด C, 1 ตัว จากปลาตัวอย่าง 69 ตัว คิดเป็น 1.4 เปอร์เซ็นต์, ปลากะรังจุดแดง (*Epinephelus coioides*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* sp. ชนิด B จำนวน 2 ตัว จากปลาตัวอย่าง 60 ตัว คิดเป็น 3.3 เปอร์เซ็นต์, ปลากะเบน (*Himantura imbricatus*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* sp. Type C จำนวน 4 ตัว จากปลาตัวอย่าง 69 ตัว คิดเป็น 5.7 เปอร์เซ็นต์, ปลาซีกเดียว (*Psettodes erumei*) ติดเชื้อปรสิต *Myxobolus* sp. ชนิด D จำนวน 1 ตัว จากปลาตัวอย่าง 31 ตัว คิดเป็น 3.2 เปอร์เซ็นต์, ปลาตุกทะเล (*Plotosus canius*) ติดเชื้อปรสิต *Zschokkella* sp. จำนวน 2 ตัว จากปลาตัวอย่าง 63 ตัว คิดเป็น 3.1 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะจำเพาะ

Host : *Moolgarda sehelii* (ปลากะบอก)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : Skin and Scale

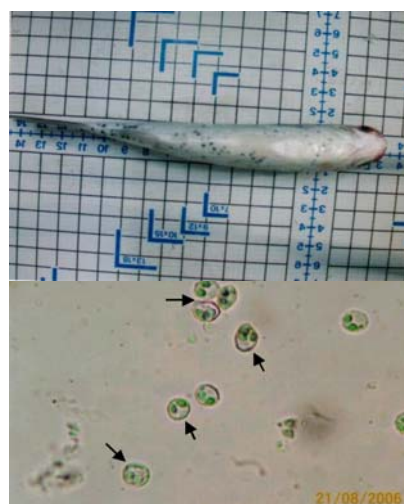
Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 7.42 μ m

ยาว = 8.48 μ m

Polar capsule dimensions: กว้าง = 2.12 μ m

ยาว = 3.18 μ m



Myxobolus sp. Type A.

ภาพที่ 1 แสดงสปอร์ตัวเต็มวัยของปรสิต

Myxobolus sp. (กำลังขยาย 40X)

Host : *Epinephelus coioides* (กะรังจุดแดง)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : Gill

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 14.84 μ m

ยาว = 16.96 μ m

Polar capsule dimensions: กว้าง = 5.3 μ m

ยาว = 8.48 μ m

Prevalence : 2 of 60 (3.3 Percent)



Myxobolus sp. Type B.

ภาพที่ 2 แสดงปรสิต *Myxobolus* sp.

ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Himantura imbricatus* (กะเบน)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : Gill

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 18.02 μ m

ยาว = 19.08 μ m

Polar capsule dimensions: กว้าง = 2.12 μ m

ยาว = 5.3 μ m

Prevalence : 1 of 69 (1.4 Percent)



Myxobolus sp. Type C

ภาพที่ 3 แสดงปรสิต *Myxobolus* sp. ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Psettodes erumei* (ปลาซีกเดียว)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : stomach

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

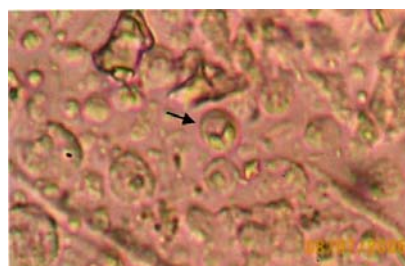
Spore dimensions: กว้าง = 9.54 μ m

ยาว = 12.72 μ m

Polar capsule dimensions: กว้าง = 3.18 μ m

ยาว = 5.3 μ m

Prevalence : 1 of 31 (3.2 Percent)



Myxobolus sp. Type D

ภาพที่ 4 แสดงปรสิต *Myxobolus* sp. ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Anabas testudineus* (หมอไทย)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : Gill

Locality : Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 9.54 μ m

ยาว = 95.4 μ m

Prevalence : 2 of 28 (7.1Percent)



Henneguya sp. Type A

ภาพที่ 5 แสดงปรสิต *Henneguya* sp. Type A. ชนิด 2 ทาง (กำลังขยาย 40X)

Host : *Hemibagrus nemurus* (กตเหล็ก)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : Gill

Locality :Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 7.42 μ m

ยาว = 60.42 μ m

Polar capsule dimensions: กว้าง = 2.12 μ m

ยาว = 12.72 μ m

Prevalence : 2 of 36 (5.5 Percent)



Henneguya sp. Type B

ภาพที่ 6 แสดงปรสิต *Henneguya* sp.

Type B ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Lates calcarifer* (กะพงขาว)

Spore stage: Mature spore

Site of infection : Gill

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 3.18 μ m

ยาว = 19.08 μ m

Prevalence : 2 of 20 (10 Percent)



Henneguya sp. Type C

ภาพที่ 7 แสดงปรสิต *Henneguya* sp.

Type C ตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

Host : *Plotosus canius* (ตุ๊กทะเล)

Spore Stage: Mature spore

Site of infection : gall bladder

Locality : Andaman Sea, Trang Province, South of Thailand

Spore dimensions: กว้าง = 8.48 μ m

ยาว = 9.42 μ m

Prevalence : 2 of 63 (3.1 Percent)



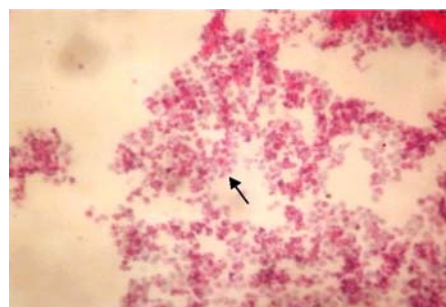
Zschokkella sp.

ภาพที่ 8 แสดงปรสิต *Zschokkella* sp.

ระยะตัวเต็มวัย (กำลังขยาย 40X)

3 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เกิดจากเชื้อปรสิตมิคโซสปอร์ริเดีย

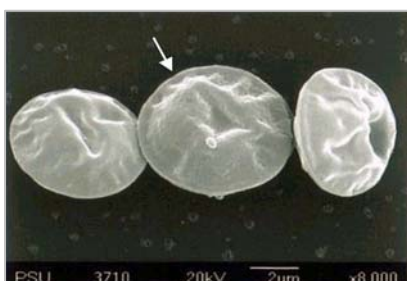
ปรสิตที่นำมาทำการศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาเจ้าบ้าน มี 1 ชนิด คือ ปรสิต *Myxobolus* sp. Type A เนื่องจากมีสัดส่วนการติดเชื้อในธรรมชาติสูงสุด ประกอบกับการเกิดหุลุมบนเกล็ดที่มี plasmodia ของปรสิต จากการศึกษาพบว่าไม่พบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เกิดจากการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังของปรสิตที่พบ *Myxobolus* sp. ในผิวหนังของปลากระบอก แต่อย่างไรก็ตาม พบการสะสมของเมลานินใน plasmodia ของปรสิต ซึ่งกลุ่มของสปอร์แสดงในภาพที่ 9



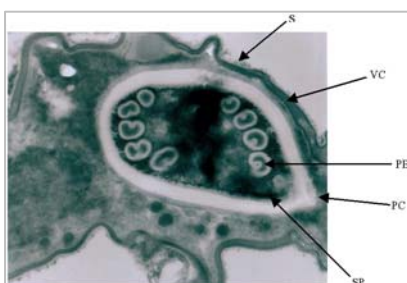
ภาพที่ 9 แสดงสปอร์ของ *Myxobolus* sp. ที่แตกออกจาก Cyst (H&E กำลังขยาย 40X)

4 การศึกษาปรสิตมิคโซสปอร์ริเดียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

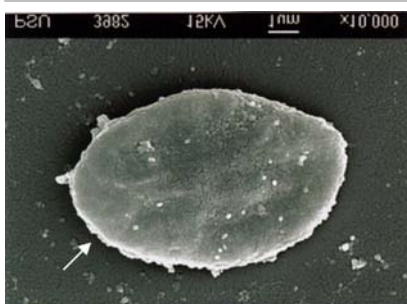
ปรสิตที่นำมาศึกษาโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Myxobolus* sp. Type A ที่พบในปลากระบอก และ *Zschokklla* sp. ซึ่งพบในปลาตุ๊กทะเล จากการศึกษาปรสิต *Myxobolus* sp. Type A แสดงให้เห็นว่า ผิวของสปอร์มีลักษณะเรียบ ภายใน polar capsule มี polar filament ขดเรียงเป็นเกลียว 4-5 รอบ รวมถึงเส้นขอบสปอร์ไม่พาดผ่านระหว่าง polar capsule ทั้ง 2 อัน (ดังแสดงในภาพที่ 10, 11 และ 12) ในขณะที่การศึกษา *Zschokklla* sp. แสดงให้เห็นว่า บริเวณผิวของสปอร์มีลักษณะเรียบแบน แนวแกนสปอร์อยู่ระหว่าง polar capsule ของเซลล์ โดยภายใน polar capsule พบ polar filament ขดอยู่ (ดังแสดงในภาพที่ 12 และ 13)



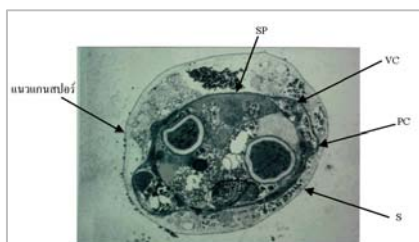
ภาพที่ 10 แสดง *Myxobolus* sp. Type A ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ยูรานิลอะซิเตรทและเลคซิเตรท 8,000X)



ภาพที่ 11 ปรสิต *Myxobolus* sp. ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ประกอบด้วย cell ระยะที่เป็นสปอร์โพลาคซึม เปลือกหุ้มสปอร์ (vc), โพลาร์แคปซูล (PC) โพลาร์ฟิลลาเมนต์ (PE) และแนวแกนสปอร์ (ยูรานิลอะซิเตรทและเลคซิเตรท, กำลังขยาย 7,000X)



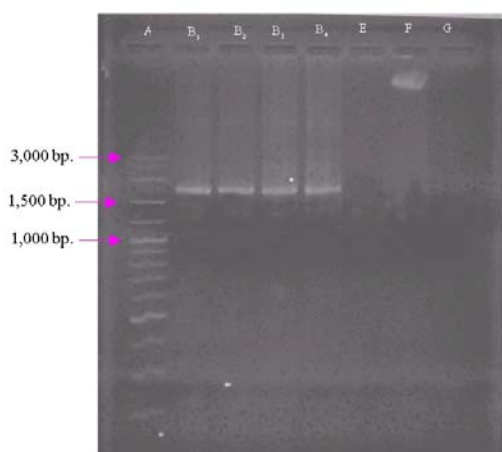
ภาพที่ 12 ปรสิต *Zschokklla* sp. แสดงโครงสร้างภายนอกลักษณะรีคล้ายรูปไข่ (ยูรานิลอะซิเตรทและเลคซิเตรท, กำลังขยาย 10,000X)



ภาพที่ 13 แสดงปรสิต *Zschokkella* sp. ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน *Zschokkella* sp. แสดงส่วนของสปอร์ประกอบด้วย cell ระยะเวลาที่เป็นสปอร์โรพลาสซึม (SP) เปลือกหุ้มสปอร์ (VC, โพลาร์แคปซูล (PC), สปอร์ (S) (ยูรานิลอะซิเตรทและเลดอะซิเตรท, 7,000X)

5. การเพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิตด้วยเทคนิค PCR

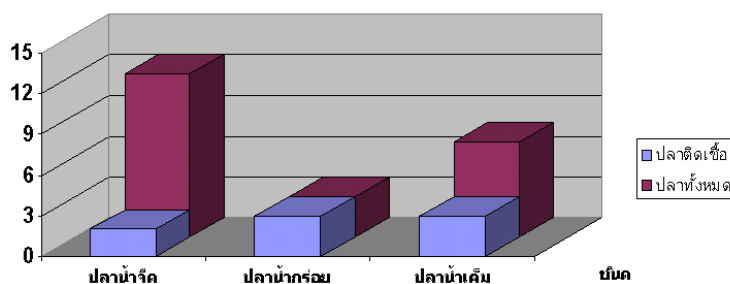
การศึกษากการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของปรสิตที่สนใจนั้น จะเลือกศึกษาเฉพาะ *Myxobolus* sp. ชนิดที่พบได้แก่ปรสิตบรอกเท่านั้น (*Myxobolus* sp. Type A) ทั้งนี้เนื่องจากปรสิตดังกล่าวมีปริมาณตัวอย่างที่มากเพียงพอต่อการศึกษา ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัด DNA ดังกล่าวสามารถสกัด DNA ของปรสิตที่มีเปลือกแข็งและทนทานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของปรสิตสามารถใช้ primer MX3-MX5 ในการเพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิต *Myxobolus* sp. Type A ด้วยเทคนิค PCR ได้ดังแสดงดังภาพ 15 โดยสามารถสังเคราะห์ 18S rDNA ขนาดความยาวประมาณ 1,600 bp. ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานที่มีการใช้ primer ดังกล่าวในการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ในปรสิตกลุ่ม Myxosporidian สายพันธุ์อื่น ๆ และ primer ดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะต่อปรสิต โดยไม่เกิดการสังเคราะห์ DNA ในตำแหน่งที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าปลาบรอกที่ไม่มีการติดเชื้อปรสิตชนิดดังกล่าว จะไม่เกิดปฏิกิริยาในการเพิ่มจำนวน DNA ซึ่งผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า primer MX3-MX5 สามารถเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของปรสิต *Myxobolus* sp.A ได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถนำ PCR product ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไปทำการศึกษาต่อไปได้



ภาพที่ 14 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของ *Myxobolus* sp. ด้วย MX3-MX5 primer maker, B₁-B₄ samples, C. healthy fish, F. extracted Myxosporidia DNA, E. negative control)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาปรสิตมิกโซสปอริเดียในปลาเศรษฐกิจของจังหวัดตรัง พบปรสิตจำนวน 3 สกุล ได้แก่ *Myxobolus*, *Henneguya* และ *Zschokkella* จำนวน 8 ชนิด แต่เนื่องจากเป็นการศึกษาเบื้องต้น ที่มุ่งเน้นถึงชนิดและการแพร่กระจายของปรสิตเป็นสำคัญ จึงไม่สามารถศึกษาถึงรายละเอียดในส่วนของ Morphology และ SSU rDNA ของปรสิตแต่ละชนิดได้



ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณชนิดของปลาที่ติดเชื้อมีปรสิตกับปลาที่ทำการศึกษา

ความหลากหลายทางชีวภาพของมิกโซสปอริเดียในปลาเศรษฐกิจในจังหวัดตรัง จากการศึกษาค้นพบจำนวน 8 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย *Myxobolus* spp. จำนวน 4 ชนิด *Henneguya* spp. จำนวน 3 ชนิดและ *Zschokkella* spp. จำนวน 1 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีขนาดของสปอร์และ polar capsule ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นชนิดที่ต่างกันและเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับชนิดที่มีรายงานในอดีตพบว่า มีหลายชนิดที่ไม่ตรงกับชนิดที่มีรายงานมาแล้ว (Lom and Dyková, 2006) ทั้งในแง่ของขนาดของสปอร์ ขนาดของ polar capsule รวมถึงสัตว์เจ้าบ้านและอวัยวะที่มีการติดเชื้อมีปรสิต

Myxobolus sp. ในปลากระบอกเป็นปรสิตที่มีอัตราการพบสูงสุดจากการศึกษาค้นพบครั้งนี้และปลากระบอกก็เป็นปลาเศรษฐกิจที่มีมูลค่าสูง จึงนำปรสิตชนิดดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับชนิดอื่น ๆ ซึ่งจากรายงานของ Lom และ Dyková (2006) ในการจัดลำดับของปรสิต *Myxobolus* sp. พบว่ามีอยู่มากกว่า 790 ชนิด ในจำนวนนี้มีประมาณ 30 ชนิด ที่เป็นปรสิตในปลาน้ำกร่อยและน้ำเค็ม ซึ่งในปลากระบอกมีรายงานการพบ 13 ชนิด (Buhri และ Marqius, 1996; Kent และคณะ, 2001 และ Buhri และคณะ, 2003) ซึ่ง *Myxobolus* sp. ที่พบในปลากระบอกนั้นไม่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่มีรายงานในอดีต แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาค้นพบครั้งนี้ก็ไม่เพียงพอต่อการจำแนกชนิด ซึ่งการเปรียบเทียบรูปร่างของสปอร์แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูลรูปร่างสปอร์ของ *Myxobolus* sp. กับ *Myxobolus* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีขนาดสปอร์และอวัยวะในการติดเชื้อใกล้เคียงกัน

<i>Myxobolus</i> sp. (present work)	<i>M. episqmalis</i> (Egusa และคณะ, 1990)	<i>M.muelleri</i> (Buhri และคณะ, 2003)
1. สปอร์ กลม	1. สปอร์คล้ายรูปไข่	1. สปอร์รูปวงรี
- ความยาวสปอร์ 8.48 μm	- ความยาวสปอร์ 7.5 – 9.5 μm	- ความยาวสปอร์ 10 - 12 μm
- ความกว้างสปอร์ 7.42 μm	- ความกว้างสปอร์ 6.0 – 7.5 μm	- ความกว้างสปอร์ 9 - 11 μm
2. Polar capsule	2. Polar capsule	2. Polar capsule
- ความยาว 3.18 μm	- ความยาว 3.8 – 5.0 μm	- ความยาว 4 – 5 μm
- ความกว้าง 2.12 μm	- ความกว้าง 2.0 μm	- ความกว้าง 2 -3 μm
3. Localization	3. Localization	3. Localization
- Scale	- Scale	- gill filament

ลักษณะของปรสิต *Myxobolus* sp. ที่กล่าวมา แตกต่างกับ *Myxobolus* ชนิดอื่นๆ ที่พบในปลากระบอก ไม่ว่าจะเป็นขนาดของสปอร์และPolar capsule แต่อย่างไรก็ตามยังจำเป็นที่จะต้องทราบถึงจำนวนรอบของ polar filament, intercapsular appendix, iodophilus vacuole รวมถึงข้อมูลทางพันธุกรรม (SSU rDNA) เพื่อใช้ในการจัดจำแนกปรสิตที่พบตามสายวิวัฒนาการ ซึ่งข้อมูลทั้งหมดจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

เนื่องจากการจำแนกชนิดปรสิตมิซอสปอร์ริเดียโดยใช้ลักษณะทางกายวิภาคเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถจำแนกชนิดของปรสิตได้อย่างชัดเจน การศึกษาครั้งนี้จึงนำ *Myxobolus* sp. Type A ซึ่งเป็นปรสิตที่พบในปลากระบอกมาทำการเพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิตในหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาลำดับเบสและ Phylogenetic tree ต่อไป โดยได้เพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิตโดยใช้ primer MX3 – MX5 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ 18S rDNA ของปรสิตขนาด 1,600 bp. ได้อย่างจำเพาะ นอกจากนี้ขนาดของ DNA เป้าหมายยังมีขนาดใกล้เคียงกับการทดลองอื่น ๆ ที่ใช้ primer ดังกล่าวในการเพิ่มจำนวน 18S rDNA ของปรสิตชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มมิซอสปอร์ริเดีย (Andree และคณะ, 1998; Buhri และคณะ, 2003 และ Dyková และคณะ, 2003) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วน DNA ที่สังเคราะห์ได้สามารถนำไปทำการศึกษาลำดับเบสและใช้ในการจัดสายวิวัฒนาการของปรสิตเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของปรสิตที่พบได้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาปรสิตมิซอสปอร์ริเดียในปลาเศรษฐกิจของจังหวัดตรัง สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาได้ทั้งหมดจำนวน 647 ตัว ใน 16 ครอบครัว 21 ชนิด สำหรับปลาที่นำมาตรวจพบปลาติดเชื้อปรสิตมิซอสปอร์ริเดียจำนวน 8 ชนิด ใน 16 ครอบครัว คิดเป็น 1.08 เปอร์เซ็นต์ของชนิดปลาทั้งหมด
2. จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อแต่อย่างใด โดยกลุ่มของปรสิต *Myxobolus* sp. ที่พบมากบริเวณเกล็ดและผิวหนัง ของปลากระบอก เมื่อศึกษาทางHistopathology ไม่

พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยเซลล์ Cyst ของปรสิตที่พบมีจำนวนมากมีตัวอ่อนอยู่ภายในจำนวนมากนับไม่ได้

3. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบเซลล์ที่อยู่ภายใน ได้แก่ ปรสิต *Myxobolus* sp. และ *Zschokkella* sp. มีทั้งเซลล์วัยอ่อนและตัวเต็มวัย จากการศึกษาโครงสร้างภายในพบเซลล์ Sporoplasm ที่ทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ Valvogenic cell เปลือกหุ้มสปอร์, Polar capsule 2 อัน ภายใน Polar capsule มี Polar filament 8 – 9 เกลียว สำหรับการศึกษาโครงสร้างภายนอกเห็นเซลล์ภายนอกชัดเจน สำหรับ *Myxobolus* sp. เซลล์ลักษณะกลมรี ส่วน *Zschokkella* sp. รูปร่างลักษณะวงรี ฝักนูนออกมา

4. การสกัด DNA โดยใช้เอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ทำการสกัดเปลือกหุ้มปรสิตก่อนทำการสกัด DNA เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60° C ทำให้สามารถสกัด DNA จากปรสิตโดยใช้ DNAsol ได้อย่างมีประสิทธิภาพและได้ DNA ของปรสิตที่มีคุณภาพดี

5. การพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของปรสิต *Myxobolus* sp. (A) ซึ่งพบในปลากระบอกนั้น สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 18S rDNA ได้โดยใช้ primer MX3-MX5 ซึ่งสามารถสังเคราะห์สาย DNA ขนาดประมาณ 1,600 bp.

เอกสารอ้างอิง

- นรสิงห์ เพ็ญประไพ. 2542. การศึกษาชนิดและพยาธิสภาพของการติดเชื้อมิกโซสปอริเดียในปลาตุ๊กทะเลที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ประไพศิริ สิริกาญจน. 2538. ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ. ภาควิชาชีววิทยาประมง, คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 199 หน้า.
- รังสฤษฎ์ รักษมกล. 2544. การศึกษาปรสิตมิกโซสปอริเดียในปลาทะเลและปลาน้ำจืดในบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- Andree, K. B., MacConnell, E. and Hedrick, R.P. 1998. A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat. Org. 34: 145-154.
- Bancroft, J.D. 1967. Histological Techniques Butterworths. London. 348 p.
- Buhri, S. and Marques, A. 1996. Myxosporean parasites of the genus *Myxololus* from *Mugil cephalus* in Ichkeul lagoon, Tunisia : description of two new species. Dis Aquat. Org. 27 : 115 – 122.
- Buhri, S., Andree, K.B. and Hedrick, R.P. 2003. Morphological and Phylogenetic studies of marine *Myxobolus* sp. from mullet in ichkeul lake, Tunisia. J. Eukaryot. Microbiol. 50: 463 – 470.
- Dyková, I., Fiala, I. and Nie, P. 2003. New data on *Myxobolus longisporus* (Myxozoa: Myxobolidae), a gill infecting parasite of carp, *Cyprinus carpio haematopterus*, from Chinese lakes

- Egusa, S., Maeno, O and Sorimachi, M. 1990. A new species of Myxozoa, *Myxobolus episqualmalis* sp. Nova infecting the Scales of the mullet, *Mugil cephalus*. Fish Patho. 25 : 87 – 94
- Humason, G. L. 1962. Animal Tissue Technique. Freeman and Company Ltd, Sanfrancisco 641 p.
- Kent, M.L., Andree, K.B., Bartholomew, J.B., El-Matbouli, M., Desser, S.S., Devlin, R.H., Feist, S.W., Hedrick, R.P., Hoffman, R.W., Khattra, J., Hallett, S.L., Lester, J.G., Longshaw, M., Palenzuela, O., Siddall, M.E. and Xiao, C. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. J. Eukaryot. Microbiol. 48: 395-413.
- Lom, J., D and Dykova, I. 1992. Protozoan Parasites of fish Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. 315 p.
- Lom, J. and Dykova, I. 2006. Myxozoa genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia Parasitol. 53: 1-36.
- Shulman, S.S. 1966. Myxosporidia of the USSR (English translation from Russian) American Publishing Co, Washington, D.C. 631 p.