

1. ชุดโครงการวิจัย : แผนงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์และลักษณะทางพันธุกรรมของปรสิตโปรโตซัว, *Sarcocystis singaporensis* โดยวิธีทางอณูชีววิทยา

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study on method for Identification of *Sarcocystis singaporensis* by molecular biology method

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : วิชาญ วรธนะไกว้ล กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ปราสาททอง พรหมเกิด สมเกียรติ กล้าแข็ง ดาราพร รินทะรักษ์ และ

ทรงทัฬห แก้วตา กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ : โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เป็นค็อคซิเดียโปรโตซัวที่มีการสร้างซิสต์ อยู่ในไฟลัม Apicomplexa วงศ์ Sarcocystidae มีวงจรชีวิตอยู่ในสัตว์อาศัย 2 ชนิด ได้แก่ หนูและงู โดยในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ทำการคัดแยกและจำแนกชนิดของโปรโตซัว *S. singaporensis* จากมูลงูเหลือมในประเทศไทย จำนวน 22 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางอณูชีววิทยา จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าสปอร์โรซิสต์ที่พบมีลักษณะรูปไข่ มีขนาดเท่ากับ 9.47×6.91 ($7.39-12.32 \times 4.93-9.86$) ไมโครเมตร ตามลำดับ และมีค่า shape index (SI) เท่ากับ 1.37 การจำแนกชนิดด้วยวิธี multiplex PCR พบว่า โปรโตซัว *S. singaporensis* จะให้แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาดคือขนาด 1,500 และ 265 คู่เบส ผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม บริเวณ 18S rDNA และ 28S rDNA สามารถแบ่งโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ได้เป็น 3 กลุ่ม ตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้าย การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA และ 28S rDNA พบว่าโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมกับโปรโตซัว *S. singaporensis* ในฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank) ร้อยละ 97.5-99.6 และ 98.7-99.3 ตามลำดับ การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการจำแนกชนิดของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซิสต์จากมูลงูเหลือม ด้วยวิธี multiplex PCR เป็นครั้งแรก ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

Abstract : *Sarcocystis singaporensis* (Apicomplexa: Sarcocystidae) is cyst forming coccidian parasites, have 2 host lifecycle between rodent-snake cycle. In this study, fecal specimens of reticulated python (*Python reticulatus*) in Thailand were examined for isolated and identified of *S. singaporensis* using morphological and molecular methods. The 22 isolates of *S. singaporensis* sporocyst from snake fecal specimens are ovoid, 9.47×6.91 ($7.39-12.32 \times 4.93-9.86$) micrometers, shape index (SI) of 1.37. The multiplex PCR showed that the *S. singaporensis* generated 2 bands

1,500 and 265 basepairs (bp). Phylogenetic analysis based on 18S rDNA and 28S rDNA regions reveal into 3 distinct groups of *Sarcocystis* spp. based on their definitive host. The 18S rDNA and 28S rDNA analysis showed that the *S. singaporensis* found in this study had 97.5-99.6 and 98.7-99.3 identity respectively to *S. singaporensis* in GenBank database. This is the first study to use multiplex PCR to identify *S. singaporensis* sporocyst from snake feces.

6. คำนำ: โปรโตซัวในสกุล *Sarcocystis* เป็นค็อคซิเดียโปรโตซัวที่อยู่ในไฟลัม Apicomplexa ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีจำนวนสมาชิกมาก ปัจจุบันพบประมาณ 189 สปีชีส์ (Odening, 1998) เป็นโปรโตซัวกลุ่มใหญ่ที่มีจำนวนสมาชิกมากเป็นอันดับสองรองจากกลุ่ม *Eimeria* spp. มักพบดำรงชีวิตเป็นปรสิตในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ ได้แก่ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์เลื้อยคลานและนก เป็นต้น โปรโตซัวสกุลนี้มีการสร้าง sarcocysts ในกล้ามเนื้อของสัตว์อาศัยตัวกลาง (intermediate host) และดำรงชีวิตเป็นปรสิตโปรโตซัวที่แท้จริง (obligate parasites) โปรโตซัวในสกุลนี้มีการสืบพันธุ์ 2 แบบคือแบบอาศัยเพศ และแบบไม่อาศัยเพศ ต้องการสัตว์อาศัยสองชนิดตลอดวงจรชีวิตของมัน และมีวงจรชีวิตเป็นรูปแบบของสัตว์ผู้ล่าและเหยื่อตามธรรมชาติ (predator - prey or two - host life cycle) โดยทั่วไป สัตว์อาศัยสุดท้าย (definitive host) ของโปรโตซัวสกุลนี้มักเป็นสัตว์ที่เป็นผู้ล่าตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นกลุ่มสัตว์กินเนื้อ (carnivore) ในขณะที่สัตว์อาศัยตัวกลางของโปรโตซัวสกุลนี้ มักเป็นสัตว์ที่เป็นเหยื่อตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นกลุ่มสัตว์กินพืช (herbivore) หรือกลุ่มสัตว์ที่กินทั้งพืชและสัตว์ (omnivore) (Pragas and Butkauskas, 2012)

Sarcocystis singaporensis Zamen & Colley (1976) เป็นปรสิตโปรโตซัวที่มีความจำเพาะต่อสัตว์อาศัย (หนูและงูเหลือม) พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Beaver and Maleckar, 1981; Jaekel *et al.*, 1996) การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ เกิดขึ้นภายในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือม (*Python reticulatus*) และซีสสปอร์โรซิสต์ (sporocyst) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเจริญเติบโตปะปนออกมาพร้อมมูลงูสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก หลังจากนั้นเข้าสู่สัตว์อาศัยตัวกลาง ได้แก่ หนูในสกุลหนูท้องขาว (*Rattus* spp.) และสกุลหนูพุก (*Bandicota* spp.) โดยการปนเปื้อนทางน้ำและอาหาร โดยจะขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในเซลล์บุผิวหลอดเลือดเกิดขึ้นในบริเวณผนังหลอดเลือดฝอย หลังจากนั้นจึงเข้าสู่อวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย และมีการสร้าง sarcocysts ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโต ภายในมี bradizoites บรรจุอยู่ ในระยะนี้เป็นระยะที่พร้อมเข้าสู่ร่างกายของสัตว์อาศัยสุดท้ายซึ่งก็คืองูเหลือม เมื่อหนูตามธรรมชาติที่ติดเชื้อถูกงูเหลือมกินเป็นอาหาร วงจรชีวิตของ *S. singaporensis* จึงกลับมาเริ่มต้นเป็นวงจรชีวิตใหม่อีกครั้ง

โปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซิสต์มีศักยภาพสูง ในการทำให้หนูป่วยตายได้ จึงมีการวิจัยและพัฒนาโปรโตซัวชนิดนี้ เป็นสารชีวอินทรีย์กำจัดหนู (Bio-rodenticide) ซึ่งกรมวิชาการเกษตร โดยกลุ่มงานสัตววิทยา การเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช มีการผลิตสารชีวอินทรีย์กำจัดหนูจากสารแขวนลอยสปอร์โรซิสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในรูปเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู ซึ่งโปรโตซัวชนิดนี้มี

ความจำเพาะต่อสัตว์อาศัย 2 ชนิด ได้แก่ หนูในสกุลหนูทุกกับหนูท้องขาวและงูเหลือม ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยต่อคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม (Jaekel *et al.*, 1996) ซึ่งในปัจจุบัน ได้มีการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคเอกชนเพื่อดำเนินการผลิตและจำหน่ายในเชิงพาณิชย์แล้ว ทำให้ในอนาคตอันใกล้จำเป็นต้องมีการขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์ และต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของโปรโตซัวกำจัดหนูชนิดนี้ ซึ่งนอกจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อโปรโตซัวที่นำมาขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์แล้ว การตรวจหาโปรโตซัว *S. singaporensis* ในก้อนเหื่อนั้นก็มีความสำคัญ เนื่องจากเมื่อสปอร์โรซิสต์ของ *S. singaporensis* อยู่ในก้อนเหื่อซึ่งทำมาจากแป้งนุ่มแล้ว ทำให้การจำแนกชนิดโดยลักษณะสัณฐานวิทยานั้นสามารถทำได้ยากยิ่งขึ้น ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบสปอร์โรซิสต์ของ *S. singaporensis* ในเหื่อโปรโตซัวกำจัดหนูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงได้ อีกทั้งในมูลงูเหลือมนอกจากสปอร์โรซิสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* ยังสามารถพบสปอร์โรซิสต์ของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นๆ ที่มีงูเหลือมเป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายได้เช่นกัน ได้แก่ *S. zamani* และ *S. villivoli* (Beaver and Malekar, 1981) อีกทั้งการปนเปื้อนของค็อคซิเดียโปรโตซัวหลายชนิดได้ เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เหื่อโปรโตซัวกำจัดหนู ที่ผลิตจากสปอร์โรซิสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* นั้น มีประสิทธิภาพและความรุนแรงของการเกิดโรคในหนูลดลงได้

การจำแนกชนิดโปรโตซัวในสกุล *Sarcocystis* และ *S. singaporensis* สามารถจำแนกโดยอาศัยลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์โรซิสต์ และขนาด รูปร่าง ลักษณะผนังเซลล์ของเชื้อระยะซาร์โคซิสต์ในกล้ามเนื้อของหนูหรือสัตว์อาศัยตัวกลางที่ติดเชื้อ ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยาของโปรโตซัวในสกุลนี้มีความใกล้เคียงกันมาก (Yang *et al.*, 2001) โดยเฉพาะในระยะสปอร์โรซิสต์ (Lau *et al.*, 2013) จำเป็นที่ต้องอาศัยบุคลากรที่มีทักษะ ความชำนาญสูง ในการจำแนกชนิด ดังนั้นจึงอาจทำให้การจำแนกชนิดโปรโตซัวในสกุลนี้ เกิดความผิดพลาดได้ ดังนั้นในปัจจุบันนี้การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (molecular biology) และข้อมูลทางพันธุกรรม จึงเข้ามามีบทบาทในด้านอนุกรมวิธาน การจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง เนื่องจากข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งก็คือ ดีเอ็นเอ นั้น ประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ A (adenine), T (thymine), C (cytosine) และ G (guanine) นั้นมีลักษณะเป็นค่าเดี่ยวๆ (discrete character) ไม่มีความผันแปรที่เกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมภายนอก (จรัลธิดา, 2543) ซึ่งรูปแบบชนิดและการเรียงตัวของลำดับเบส ทำให้เกิดความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ในการศึกษาอนุกรมวิธานได้ ซึ่งบริเวณไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ (ribosomal DNA, rDNA) เป็นบริเวณที่นิยมใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ในการจำแนกชนิดของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* (Dahlgren and Gjerde, 2008; Rosenthal *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2009; Stojceki *et al.*, 2012)

เนื่องจากไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ (organelles) ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีปริมาณมากและมีหน้าที่ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิต โดยมีการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ จึงมีลำดับเบสที่จำเพาะแน่นอน เป็นบริเวณที่มีความเหมือนกันของลำดับเบสสูงในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือมีความใกล้เคียงกัน และต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตคนละชนิดหรือต่างชนิดชนิดกัน ทำให้บริเวณนี้ค่อนข้างจะอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด สามารถนำมาใช้เพื่อบ่งชี้และการจัดจำแนกชนิด สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตได้แก่ ลำดับเบส

บริเวณ small subunit (SSU) rDNA หรือ 18S ribosomal DNA (18S rDNA) และ large subunit (LSU) rDNA หรือ 28S ribosomal DNA (28S rDNA)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงทำการจำแนกสายพันธุ์และลักษณะทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซิสต์ เพื่อนำผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ ในด้านต่างๆได้แก่ การแก้ปัญหาการปนเปื้อนของค็อคซิเดียโปรโตซัวชนิดอื่น ในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูเพื่อทำให้สามารถผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพสูงได้ การจำแนกชนิดโปรโตซัวชนิดนี้เพื่อใช้ในการตรวจสอบรับรอง การขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์ ในเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูที่ผลิตโดยภาคเอกชน และการ submission ข้อมูลลำดับเบสของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซิสต์ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ลงในฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank) เพื่อนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับงานวิจัยต่อยอดในอนาคต รวมถึงการนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ในด้านต่างๆ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงงูเหลือมและกรงเลี้ยงเตี้ยสำหรับหนูท้องขาว อาหารหนูและน้ำ
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany), Phusion hotstart taq DNA polymerase (Thermo scientific, USA), Thermo scientific Ins TA clone PCR cloning kit (Thermo scientific, USA) และ gel elution kit (GeneMark, Taiwan)
3. เครื่องทำปฏิกิริยา PCR, เครื่องเจลอิลเล็กโทรโฟรีซิส, U.V. Electronic U.V. Transilluminator (Alphadigidoc™, EEC)
4. สารเคมี TAE/TBE buffer, Agarose gel, nucleic acid stain (gel star), dNTPs (Roche, Germany), gene ruler™ 100 bp DNA ladder plus 0.05 mg (Thermo scientific, USA), loading dye (bromphenol blue 25%, glycerol 30%) และ agarose gel
5. หม้อนึ่ง autoclave
6. เครื่อง spindown, microcentrifuge, auto pipette
7. กระดาษทิชชูแบบอเนกประสงค์ ถู่มืออย่างสำหรับห้องปฏิบัติการ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

- วิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างมูลงูเหลือมภายในโรงเรือนเลี้ยงงูเหลือม กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หรือดักหนูจากธรรมชาติ พร้อมกับบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

(GPS) และนำหนูที่พบโปรโตซัว *S. singaporensis* จากธรรมชาติ มาเป็นอาหารให้หมูเหลืองที่ตรวจสอบจากมูลโดยกล้องจุลทรรศน์แล้ว พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* หลังจากนั้นเก็บมูลหมูเหลืองที่ได้ เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

การคัดแยกและจำแนกชนิดสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างมูลหมูเหลือง และคัดแยกสปอร์โรซีสต์ โดยชั่งมูลหมูเหลือง 5 กรัม ละลายในน้ำ 30 มิลลิลิตร กรองผ่านตะแกรงกรองและปั่นสารแขวนลอยที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำประมาณ 2-3 ครั้ง จนกว่าสารส่วนใสด้านบนตะกอนจะใส หลังจากนั้นทำการล้างสารแขวนลอยโดยวิธี saturate NaCl solution (Bhat and Jithendran, 1995) เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ จำแนกชนิดโดยการตรวจดูลักษณะสปอร์โรซีสต์ที่พบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) วัดขนาดและบันทึกลักษณะสปอร์โรซีสต์ที่พบ วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่า shape index (SI; ความยาว/ความกว้าง) และค่า standard (SD) ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 และเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ ลงในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4-10 °C เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ ในการวิเคราะห์ในระดับชีวโมเลกุลต่อไป

การจำแนกชนิดและการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซีสต์ โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของโปรโตซัว *S. singaporensis* จากสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่คัดแยกได้จากมูลหมูเหลือง โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ไพรเมอร์ (primers) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งหมด 3 คู่ บริเวณ 18S rDNA ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis* ได้แก่ primer 1LF edit (ดัดแปลงจาก Yang *et al.*, 2001); 5'- AGC CAT GCA TGT CTA AGT ATA AG และ 1 hr (Yang *et al.*, 2001); 5'- TAT CCC CAT CAC GAT GCA TAC บริเวณ 28S rDNA ใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คู่แรกใช้ในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis* ได้แก่ KL 1F (ดัดแปลงจาก Mugride *et al.*, 1999); 5'- AAA GAT TAA GCC ATG CA และ IdenLSUR; 5'- TCA CCA TCT TTC GGG TCC TAA TAC คู่ที่สองใช้ในการจำแนกชนิดโปรโตซัว *S. singaporensis* ได้แก่ IdenLSUF; 5'- TTG GTT TTC GGA CTG GAC TTG AA และ IdenLSUR หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวม 20 ul ประกอบด้วยดีเอ็นเอโปรโตซัว

S. singaporensis 2 ul ผสมกับ 10x PCR buffer, 10mM dNTPs, เอนไซม์ hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพรเมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 20 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ภายใต้อุณหภูมิ pre denature 95 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มขึ้นส่วนของดีเอ็นเอ denature 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย 1.5 % อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

การหาลำดับเบส (Nucleotide sequencing)

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.5% เจลอะกาโรส อิเล็กโทรโฟรีซิส และทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอขนาดตรงกับที่คำนวณไว้ หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel elution kit ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และส่งดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ First BASE laboratories ประเทศมาเลเซีย

การโคลนนิ่ง (Cloning)

การโคลนนิ่งเริ่มจากนำดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ (ligation) โดยใช้ชุด TA cloning vector kit (Thermo Scientific Ins TA clone PCR cloning kit; Thermo Scientific, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต หลังจากนั้นทำการการถ่ายขึ้น ดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์แล้ว ลงสู่เซลล์เจ้าบ้าน (competent cell) *Escherichia coli*, DH10B (transformation) ที่อุณหภูมิ 42 °C เวลา 90 วินาที (heat shock) หลังจากนั้นนำไปเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB broth) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำไป spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB agar) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถ่ายลงสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยสุ่มโคโลนี ของเชื้อ (pick up colony) ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้น 1.5% หลังจากนั้นทำการหาลำดับเบสและตรวจสอบลำดับเบสที่ได้

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการโคลนนิ่งเฉพาะในส่วนของ 28S rDNA ของการหาลำดับเบสครั้งแรก หลังจากที่ได้ผลลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA จากการโคลนนิ่งแล้ว จึงอาศัยข้อมูลลำดับเบสที่ได้ เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปหาลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA และ 28S rDNA ของตัวอย่างอื่นๆต่อไป

การวิเคราะห์ผล (Data analysis)

ตรวจสอบผลลำดับเบสที่ได้ทั้ง 22 ตัวอย่าง และรวมแต่ละ contig เป็นสายเดี่ยว ซึ่งมีขนาด 1,500 และ 930 คู่เบส ในบริเวณ 18S rDNA และบริเวณ 28S rDNA ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องและตัดลำดับเบสที่ไม่ชัดเจนหรือมีสัญญาณรบกวนออก เปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank

(www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) จัดเรียง วิเคราะห์ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 (Hall, 1999) ลำดับเบสที่ได้ทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของโปรโตซัว *S. singaporensis*, *Sarcocystis* spp. และโปรโตซัวชนิดอื่นที่ใกล้เคียง ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ในบริเวณ 18S rDNA จำนวน 27 สาย และบริเวณ 28S rDNA จำนวน 12 สาย โดยนำมาวิเคราะห์ดังนี้

1. ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) 3 วิธี ได้แก่ วิธี Neighbor-joining (NJ; Saitou and Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 software (Tamura *et al.*, 2013) คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างหนุ่ตัวอย่างแต่ละคู่ ด้วยแบบจำลอง kimura 2-parameter distance models (Kimura, 1980) วิธี Maximum parsimony (MP; Fitch, 1971) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 software (Tamura *et al.*, 2013) กำหนดให้หาสัญญาณที่ดีที่สุดโดย heuristic search และทำ brance swapping โดยใช้ subtree-pruning-regrafting (SPR) method (Hein *et al.*, 1996) ในขณะที่วิธี Maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981) ดำเนินการโดยใช้โปรแกรม PhyML version 3 (Guindon *et al.*, 2010) กำหนดให้หาสัญญาณที่ดีที่สุดโดย heuristic search ทำ brance swapping โดยใช้ nearest neighbor interchanges (NNI) branch swapping methods (Felsenstein, 2004) ผลการคำนวณใช้แบบจำลอง general time reversible model (GTR) ทั้ง 3 แผนภูมิดังกล่าวนั้น ทำการวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 รอบ โดยที่ค่าทางสถิติที่ได้จะถูกนำมาแสดงเพื่อเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของแผนภูมิ (phylogram) โดยเปรียบเทียบกับโปรโตซัว *S. singaporensis* และโปรโตซัว *Sarcocystis* spp. ที่มีในฐานข้อมูล โดยใช้ *E. tenella* และ *Toxoplasma gondii* เป็นโปรโตซัวนอกกลุ่ม (outgroup) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณ 18S rDNA และบริเวณ 28S rDNA ตามลำดับ

วิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (nucleotide diversity, Pi) และ ค่าความหลากหลายของ haplotypes (haplotypes diversity, Hd) ด้วยโปรแกรม DnaSP v.5 (Librado and Rozas, 2009)

Nucleotide diversity (Pi) คือ ค่าเฉลี่ยความแตกต่างของลำดับเบส เป็นค่าที่สามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรได้ คำนวณได้จากสูตร

$$Pi = \left[\frac{n}{n-1} \right] \left[\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j d_{ij} \right]$$

เมื่อ n = จำนวนตัวอย่าง

k = จำนวน haplotype

p_i = ความถี่ haplotype i

p_j = ความถี่ haplotype j

d_{ij} = ค่าที่คำนวณได้จากความแตกต่างระหว่าง haplotype i และ haplotype j

Haplotype diversity (H_d) คือ ความน่าจะเป็นที่ตัวอย่างของ haplotype ใดๆ มีความแตกต่างกันในกลุ่มประชากร คำนวณได้จากสูตร

$$H_d = \left[\frac{n}{n-1} \right] \left[1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right]$$

เมื่อ n = จำนวนตัวอย่าง

k = จำนวน haplotype

p_i = ความถี่ของแต่ละ haplotype

2. การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส

นำลำดับเบสที่ได้มาหลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 (Hall, 1999)

3. การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันทางพันธุกรรมและระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ค่าร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส (nucleotide identity) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 (Hall, 1999) และวิเคราะห์หาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยการวิเคราะห์แบบ pairwise distance โดยที่ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม คือ ค่าที่คำนวณความแตกต่างกันระหว่างลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่นำมาศึกษา โดยใช้ข้อมูลการแทนที่เบสที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่นำมาศึกษา โดยกระทำภายใต้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม ซึ่งแบบจำลองที่นำมาใช้นั้น เพื่อป้องกันการประเมินจำนวนการแทนที่เบสน้อยกว่าความเป็นจริง (Nei and Kumur, 2000) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 software (Tamura *et al.*, 2013)

4. การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes

วิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes โดยการสร้างเครือข่ายพันธุกรรม (haplotypes net work) จากการประเมินความแตกต่างของลำดับเบส ในแต่ละ haplotype และจากการประเมินความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม Network 4.6.1.3 program (Bandelt *et al.*, 1999)

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2555 - กันยายน 2558 กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร แปลงเกษตรกร อำเภอมหาราช จังหวัดอยุธยา อำเภอเมือง จังหวัดชัยนาท อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซิสต์ ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง (table 1) พบว่ามีลักษณะรูปร่าง มีขนาดเท่ากับ 9.47×6.91 ($7.39-12.32 \times 4.93-9.86$) ไมโครเมตร ตามลำดับ และมีค่า shape index (SI) เท่ากับ 1.37 (table 2) จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ลักษณะสปอร์โรซิสต์ของ โปรโตซัว *S. singaporensis* มีขนาด รูปร่างที่ใกล้เคียงกันมาก (figure 1) และไม่สามารถแยกความแตกต่างกับโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นๆได้ ดังนั้นจึงต้องมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการจำแนกชนิดโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซิสต์ เพื่อได้ผลการจำแนกชนิดที่ถูกต้อง แม่นยำยิ่งขึ้น และอาจให้รายละเอียดทางพันธุกรรมที่มากขึ้น

8.2 การจำแนกชนิดโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่ทำการจำแนกชนิดของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซิสต์ จึงยังไม่ข้อมูลที่น่าสามารถมาใช้อ้างอิงได้โดยตรง ด้วยเหตุนี้เอง ในระยะเริ่มต้นที่ทำการศึกษานั้น พบว่า สารแขวนลอยสปอร์โรซิสต์ของ *S. singaporensis* ที่นำมาใช้ในการทดลองมีการปนเปื้อนจากปรสิตโปรโตซัวชนิดอื่น และเชื้อต่างๆจำนวนมากแม้ว่าจะผ่านการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มาแล้วก็ตาม ดังนั้นจึงต้องทำการโคลนนิ่งเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว โดยการหาลำดับเบสเชื้อแต่ละชนิดที่ปนกันอยู่ให้สามารถแยกจากกันได้ แล้วจึงนำลำดับเบสที่ได้ นำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อ *S. singaporensis* เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป ซึ่งผลจากการโคลนนิ่ง ทำให้ได้ลำดับเบสของโปรโตซัว *S. singaporensis* จึงสามารถดำเนินการศึกษาต่อไปได้

การจำแนกชนิดโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในบริเวณ 18S rDNA และ 28S rDNA อย่างละ 1 คู่ คู่แรกใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis*; 1LF edit / 1Hr ซึ่งโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ทุกชนิดต้องให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 1,500 คู่เบส ในขณะที่คู่ที่สองใช้ในการจำแนกโปรโตซัว *S. singaporensis*; IdenLSU F / IdenLSU R ซึ่งมีเพียงโปรโตซัว *S. singaporensis* ชนิดเดียวเท่านั้น ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 265 คู่เบส ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า

โปรโตซัว *S. singaporensis* ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 1,500 และ 265 คู่เบส ซึ่งภายหลังนำทุกตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นั้น ไปหาลำดับเบสพบว่าทุกตัวอย่างเป็นโปรโตซัว *S. singaporensis* แสดงให้เห็นว่าวิธี multiplex PCR นั้นสามารถจำแนกชนิดของ *S. singaporensis* ได้

โดยการศึกษาครั้งนี้ พบบางตัวอย่างมีการปนเปื้อนโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่น ซึ่งทราบภายหลังจากการนำสปอร์โรซิสต์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ไปให้หนูทดลอง พบมีการสร้างลักษณะ sarcocyst ของ *S. zamani* และ *Sarcocystis* sp. และเมื่อนำไปจำแนกชนิดด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส เท่านั้น และการทดสอบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ได้แก่ หนูนาใหญ่ที่ไม่พบ sarcocyst จากการผ่าซากนั้น ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งผลที่ได้นั้นเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ตอนออกแบบไพรเมอร์ (figure 2) อีกทั้งเมื่อนำตัวอย่าง S151 และ S96 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส จากการทำ multiplex PCR ไปหาลำดับเบส พบว่าเป็นโปรโตซัว *S. zamani* และ *Sarcocystis* sp. ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงให้เห็นการจำแนกชนิดโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซิสต์ ด้วยวิธี multiplex PCR นั้นสามารถให้ผลการจำแนกชนิดได้ถูกต้อง แม่นยำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานด้านต่างๆ ต่อไปได้

8.3 การศึกษาทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis*

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในประเทศไทย วิเคราะห์จากข้อมูล ลำดับเบสบนไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ 2 บริเวณ ได้แก่ 18S rDNA และ 28S rDNA ให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 1,500 และ 930 คู่เบส ตามลำดับ โดยทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของโปรโตซัว *S. singaporensis* บริเวณ 18S rDNA จำนวน 22 ตัวอย่าง และบริเวณ 28S rDNA จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ที่มีในฐานข้อมูล Genbank ในบริเวณ 18S rDNA และ 28S rDNA จำนวน 27 และ 12 สาย ตามลำดับ ให้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

8.3.1 บริเวณ 18S rDNA

จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 18S rDNA กับตัวอย่างสปอร์โรซิสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* จากไพรเมอร์ 1LF edit/1Hr ได้ชิ้นส่วนของยีนที่มีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส จำนวน 22 ตัวอย่าง หลังจากทำการตัดส่วนลำดับเบสที่ไม่ชัดเจน บริเวณปลาย 5' และ 3' ได้ลำดับเบสความยาว 600 คู่เบส ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

8.3.1.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ ร้อยละ ความเหมือนทางพันธุกรรมและระยะห่างทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณ 18S rDNA ของโปรโตซัว *S. singaporensis* 28 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 22 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับเบสของโปรโตซัว

S. singaporensis และ โปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 6 และ 21 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวมลำดับเบสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 49 ตัวอย่าง โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ NJ/ML/MP (fig 3) พบว่าทั้งสามวิธีให้ผลการวิเคราะห์ ในรูปแบบเดียวกัน สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้ายที่โปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* อาศัยอยู่ ได้แก่ clade I เป็นกลุ่มที่มีงูเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย ในขณะที่ clade II เป็นกลุ่มที่มีสัตว์ในตระกูลสุนัขและแมวเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย และ clade III เป็นกลุ่มที่มีนกกเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย โดยที่โปรโตซัว *S. singaporensis* ถูกจัดอยู่ใน clade I จากผลการวิเคราะห์พบว่า clade I มีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม (nucleotide identity) เมื่อเปรียบเทียบกับ clade II (*S. tenella* และ *S. fusiformis*) และ clade III (*S. albifrons*) อยู่ที่ร้อยละ 94.3-97.2 และ 94.3-97.4 ตามลำดับ และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เท่ากับ 0.013-0.027 และ 0.011-0.025 ตามลำดับ (table 4)

Clade I ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีงูเป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายนั้น สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่มย่อย ตามชนิดของงูที่เป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย ประกอบไปด้วย กลุ่ม S ซึ่งเป็นกลุ่มโปรโตซัว *S. singaporensis* กลุ่ม A มีสมาชิก 2 สปีชีส์ ได้แก่ *S. zuoi* และ *S. clethrionomyelaphis* กลุ่ม B มีสมาชิก 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Sarcocystis* sp. ex *Morelia viridis*, *S. zamani* และ *Sarcocystis* sp. 4 และกลุ่ม C มีสมาชิก 2 สปีชีส์ ได้แก่ *S. atheridis* และ *S. nesbitti*

กลุ่ม S ซึ่งภายในกลุ่มสามารถแบ่งได้ 9 haplotypes (S-I – S-IX) เป็นรูปแบบที่พบในประเทศไทย 6 haplotypes (S-I – S-V และ S-IX) โดยรูปแบบ haplotypes S-II เป็นรูปแบบที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50 ของตัวอย่างโปรโตซัว *S. singaporensis* ทั้งหมด ซึ่งเป็นไปได้ว่า haplotypes S-II เป็นรูปแบบที่มีโอกาสพบมากที่สุด ในประเทศไทย โดยเฉพาะในกรุงเทพฯ และพบว่า S-VI – S-VIII เป็นรูปแบบที่พบในประเทศมาเลเซีย ซึ่งในกลุ่มของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีงูที่เป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายแตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ กลุ่มที่มีงูเหลือม (reticulated python, *P. reticulates*) เป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย มีสมาชิก 6 haplotypes (S-I – S-V และ S-IX) ซึ่งพบในประเทศไทยทั้งหมด โดยเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 22 ตัวอย่าง และเป็นลำดับจากฐานข้อมูล GenBank 3 ตัวอย่าง มีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ที่ ร้อยละ 99.4-99.8 และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.002-0.007 ในขณะที่กลุ่มที่มีงู Malyan brown pit viper (*Ovophis convictus*) เป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย มีสมาชิก 3 haplotypes (S-VI – S-VIII) ซึ่งพบในประเทศมาเลเซียทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มที่มีงูเหลือมและกลุ่มที่มีงู Malyan brown pit viper เป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย พบว่ามีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ที่ ร้อยละ 97.5-98.4 ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในงูเหลือม ในทางกลับกันเมื่อวิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มที่มีงูเหลือมและกลุ่มที่มีงู Malyan brown pit viper เป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.007-0.016 ซึ่งมีค่ามากกว่ากลุ่มโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในงูเหลือมเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าแม้ว่าจะเป็นโปรโตซัว *S. singaporensis* สปีชีส์เดียวกัน แต่เมื่อพบในงูที่เป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายต่างชนิดกันส่งผลให้ ความ

เหมือนกันทางพันธุกรรมลดลง แสดงให้เห็นว่าชนิดของงูที่เป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายนั้น มีผลกับความเหมือนและความต่างกันทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis*

ขณะเดียวกันกลุ่ม A (*S. zuoi* และ *S. clethrionomyelaphis*) เป็นโปรโตซัวที่พบในงู Malayan keeled rat snake (*Ptyas carinata*) และงูทางมะพร้าวถ้า (*Elaphe taeniura*) ตามลำดับกลุ่ม B ประกอบไปด้วย *Sarcocystis* sp. ex *Morelia viridis* เป็นโปรโตซัวที่พบในงูหลามต้นไม้สีเขียว (*Morelia viridis*) ส่วน *S. zamani* และ *Sarcocystis* sp. 4 นั้นพบในงูเหลือม (*P. reticulatus*) กลุ่ม C (*S. atheridis* และ *S. nesbitti*) เป็นโปรโตซัวที่พบในงูพิษ ได้แก่ งูพิษใบไม้ (african viper snake; *Atheris nietschei*) และ งูเห่า (cobra; *Naja kaouthia*) โดยพบว่าโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* กลุ่ม A และ B ซึ่งพบในกลุ่มงูไม่มีพิษ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C ซึ่งพบในกลุ่มงูพิษ จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงให้เห็นว่ากลุ่ม A และ B มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับกลุ่ม S (โปรโตซัว *S. singaporensis*) มากกว่ากลุ่ม C (fig 3) ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ค่าร้อยละความเหมือนและค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่าระหว่างกลุ่ม A และ B กับกลุ่ม S มีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ที่ร้อยละ 96.5-98.4 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.004-0.022 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความเหมือนกันทางพันธุกรรมมากกว่า และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่ม A และ B กับกลุ่ม C ที่พบว่ามีความร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ที่ ร้อยละ 94.1-96.3 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.023-0.042 แสดงให้เห็นว่าโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* กลุ่มที่มีงูเป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายนั้น กลุ่มที่มีงูไม่มีพิษเป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายเหมือนกันจะมีใกล้ชิดกันและมีความเหมือนกันทางพันธุกรรมมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับงูที่มีพิษเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย อีกทั้งเมื่อทำการแยกวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในแต่ละกลุ่มย่อย ระหว่าง 4 กลุ่มย่อย (S, A, B และ C) ภายใน clade I พบว่ากลุ่ม S นั้นมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับกลุ่ม A มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่ม B และ C ตามลำดับ และมีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม มีค่าเท่ากับร้อยละ 97.2-98.4, 96.6-98.6 และ 94.1-96.3 ตามลำดับ และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่สอดคล้องกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.004-0.016, 0.002-0.022 และ 0.023-0.042 ตามลำดับ (table 4)

ผลวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (nucleotide diversity, $Pi \pm SD$) พบว่าโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในกรุงเทพฯ จังหวัดอยุธยา จังหวัดชัยนาท และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ของประเทศไทย มีค่า 0.00096 ± 0.00078 , 0.00171 ± 0.00171 , 0.00171 ± 0.00171 และ 0.00114 ± 0.00093 ตามลำดับ (table 2)

ขณะที่ค่าความหลากหลายของ haplotypes (haplotypes diversity, $Hd \pm SD$) พบว่าโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในกรุงเทพฯ จังหวัดอยุธยา จังหวัดชัยนาท และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ของประเทศไทย มีค่า 0.526 ± 0.153 , 1.00 ± 0.500 , 1.00 ± 0.500 และ 0.667 ± 0.204 ตามลำดับ (table 2) ซึ่งค่าความหลากหลายของ haplotypes นั้นขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง ถ้าจำนวนตัวอย่างมากจะทำให้มีโอกาสตรวจพบ haplotypes เพิ่มขึ้นอีก ในขณะที่โปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในจังหวัดพัทลุงมีเพียง 1 ตัวอย่าง จึงไม่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม และค่าความหลากหลายของ haplotypes

จากผลการวิเคราะห์พบว่าโปรโตซัว *S. singaporensis* ในจังหวัดอยุธยาและจังหวัดชัยนาท มีค่าเท่ากัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นั้นมีจำนวนน้อยเพียง จังหวัดละ 2 ตัวอย่าง และมีลำดับเบสแตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ของทั้ง 2 จังหวัดนั้นเท่ากัน อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้จำนวนตัวอย่างของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในจังหวัดต่าง ๆ นั้นมีจำนวนน้อย ดังนั้นการให้ข้อมูลต่างๆ จึงอาจไม่เพียงพอและไม่สามารถบอกรายละเอียดต่างๆ ได้มากนัก

8.3.1.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส

จากความยาวของลำดับเบสที่ทำการศึกษา 600 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบส 41 ตำแหน่ง (table 3) ความแตกต่างของลำดับเบสดังกล่าวสามารถแบ่งโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่นำมาวิเคราะห์ครั้งนี้ได้เป็น 9 haplotypes โดยพบว่าลำดับเบสตำแหน่งที่ 1313 เป็นตำแหน่งสามารถแยกความแตกต่างของโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในประเทศไทย ออกจากโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในประเทศมาเลเซียและโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นได้ โดยโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในประเทศไทย มีลำดับเบสเป็น G (guanine) ในขณะที่ โปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในประเทศมาเลเซียและโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่น มีลำดับเบสเป็น T (thymine) และ A/C (adenine/cytosine) ตามลำดับ และพบว่าลำดับเบสตำแหน่งที่ 1319 และ 1320 สามารถแยกความแตกต่างของโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในประเทศมาเลเซียออกจากประเทศไทยได้ โดยโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในประเทศมาเลเซีย มีลำดับเบสเป็น G (guanine) และ A (adenine) ในขณะที่ โปรโตซัว *S. singaporensis* ที่พบในประเทศไทย มีลำดับเบสเป็น T (thymine) และ C (cytosine) ตามลำดับ

8.3.1.3 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes

ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes จากการนำลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA ของโปรโตซัว *S. singaporensis* ทั้ง 9 haplotypes และโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่น มาสร้างเป็นเครือข่าย (net work) พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของโปรโตซัวทั้งหมดได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้ายเช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้แก่ clade I เป็นกลุ่มที่มีงูเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย ในขณะที่ clade II เป็นกลุ่มที่มีสัตว์ในตระกูลสุนัขและแมวเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย และ clade III เป็นกลุ่มที่มีนกเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย พบว่าภายใน clade I นั้น สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย โดยโปรโตซัว *S. singaporensis* นั้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีงูเหลือมเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย (S-I – S-V และ S-IX) และที่กลุ่มที่มีงู Malyan brown pit viper (*O. convictus*) เป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย (S-VI – S-VIII) ซึ่งพบในประเทศมาเลเซียทั้งหมด ในขณะที่ 3 กลุ่มที่เหลือ (A, B และ C) นั้นพบในงูที่เป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายต่างชนิดกัน และจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มที่แยกจากกันอย่างชัดเจน (fig 5) ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้ นั้น สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นว่าโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีสัตว์อาศัยสุดท้ายเป็นงูต่างชนิดกันนั้น จะมีความเหมือน

และความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมน้อยกว่า สัตว์อาศัยสุดท้ายที่เป็นชนิดเดียวกัน และชี้บ่งว่าโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* นั้นมีความสัมพันธ์กับชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้าย และสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้ายได้ โดยพบว่าโปรโตซัวชนิดเดียวกัน เมื่อพบในสัตว์อาศัยสุดท้ายชนิดเดียวกันหรือกลุ่มเดียวกัน จะมีความใกล้ชิดกันและความเหมือนกันทางพันธุกรรม มากกว่าโปรโตซัวที่พบในสัตว์อาศัยสุดท้ายต่างชนิดหรือต่างกลุ่มกัน

8.3.2 บริเวณ 28S rDNA

จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ของ 28S rDNA กับตัวอย่างสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* จากไพรเมอร์ KL1F/IdenLSUR ได้ชิ้นส่วนของยีนที่มีความยาวประมาณ 930 คู่เบส จำนวน 10 ตัวอย่าง เนื่องจากในบริเวณนี้พบมีการเกิด การแทรกเข้ามาและการหายไปของลำดับเบส (Indel; insertion/deletion) จำนวนมาก ซึ่งส่งผลให้การหาลำดับเบสทำได้ยาก ดังนั้นในการวิเคราะห์ครั้งนี้จึงได้ลำดับเบสบริเวณนี้ เพียง 10 ตัวอย่าง หลังจากทำการตัดส่วนลำดับเบสที่ไม่ชัดเจน บริเวณปลาย 5' และ 3' ได้ลำดับเบสความยาว 400 คู่เบส ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

8.3.2.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรมและระยะห่างทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณ 28S rDNA ของโปรโตซัว *S. singaporensis* 22 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ 10 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับเบสของโปรโตซัว *S. singaporensis* และ โปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 1 และ 10 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวมลำดับเบสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 21 ตัวอย่าง โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ NJ/ML/MP (fig 4) พบว่าทั้งสามวิธีให้ผลการวิเคราะห์ ในรูปแบบเดียวกัน สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้ายที่โปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* อาศัยอยู่ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA ได้แก่ clade I, II และ III เป็นกลุ่มที่มีงู สัตว์ในตระกูลสุนัขหรือแมว และ นกเป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายตามลำดับ โดยที่โปรโตซัว *S. singaporensis* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม clade I จากผลการวิเคราะห์พบว่า clade I มีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม เมื่อเปรียบเทียบกับ clade II และ clade III อยู่ที่ร้อยละ 86.8-90.4 และ 94.4-96.0 ตามลำดับ และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.045-0.086 และ 0.025-0.039 ตามลำดับ (table 6) จากผลที่ได้พบว่าลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA นั้น โปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ที่พบใน clade III มีความใกล้ชิดและความเหมือนกันทางพันธุกรรมกับ clade I มากกว่า clade II

เมื่อทำการวิเคราะห์ภายในกลุ่มโปรโตซัว *S. singaporensis* ซึ่งถูกจัดกลุ่มอยู่ใน Clade I ที่มีงูเป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายร่วมกับ *S. zamani* นั้น พบว่าภายในกลุ่มโปรโตซัว *S. singaporensis* นั้น สามารถแบ่งได้ 5 haplotypes (L-I – L-V) haplotypes L-IV เป็นรูปแบบที่มีสมาชิกมากที่สุด จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 45

ของตัวอย่างโปรโตซัว *S. singaporensis* ทั้งหมด จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA นั้นมีความหลากหลายสูง เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เพียง 11 ตัวอย่าง แต่สามารถแบ่งได้ 5 haplotypes เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA โดยที่ภายในกลุ่มโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับโปรโตซัว *S. singaporensis* ในฐานข้อมูล GenBank มีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ที่ร้อยละ 98.7-99.3 และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.003-0.009 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับ *S. zamani* พบว่ามีค่าร้อยละความเหมือนทางพันธุกรรม อยู่ที่ร้อยละ 90.3-94.2 และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.032-0.042 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าโปรโตซัว *S. singaporensis* และ *S. zamani* นั้น มีความใกล้ชิดและความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง 2 สปีชีส์มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นๆที่พบใน clade II และ clade III

ขณะเดียวกันใน clade II สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้ายซึ่งเป็นสัตว์ในตระกูลสุนัขและแมว นั้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่ามีค่าร้อยละความเหมือนและค่าระยะห่างทางพันธุกรรม อยู่ที่ร้อยละ 90.5-93.2 และ 0.022-0.045 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ต่ำกว่า และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่สูงกว่า เมื่อแยกเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม โดยในกลุ่มที่มีสัตว์ในตระกูลสุนัขเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย มีค่าร้อยละความเหมือนและค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม อยู่ที่ร้อยละ 97.2-99.0 และ 0.003-0.013 และกลุ่มที่มีสัตว์ในตระกูลแมวเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย มีค่าร้อยละความเหมือนและค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม อยู่ที่ร้อยละ 89.9-98.8 และ 0.003-0.039 ตามลำดับ (table 6)

8.3.2.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส

จากความยาวของลำดับเบสที่ทำการศึกษา 400 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบส 5 ตำแหน่ง (table 5) ความแตกต่างของลำดับเบสดังกล่าวสามารถแบ่งโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่นำมาวิเคราะห์ครั้งนี้ได้เป็น 5 haplotypes โดยพบว่าลำดับเบสตำแหน่งที่ 1200, 1694, 1696 และ 1501 เป็นตำแหน่งสามารถแยกความแตกต่างของโปรโตซัว *S. singaporensis* ออกจากโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นได้ โดยที่โปรโตซัว *S. singaporensis* มีลำดับเบสเป็น C (cytosine), T (thymine), G (guanine) และ G (guanine) ตามลำดับ ในขณะที่ลำดับเบสตำแหน่ง 1195 โปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ที่มีงูเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย สามารถแยกความแตกต่างของ ออกจากกลุ่มสัตว์อาศัยสุดท้ายชนิดอื่นได้ ซึ่งกลุ่มที่มีงูเป็นสัตว์อาศัยสุดท้ายนั้นมีลำดับเบสเป็น C กลุ่มที่มีสัตว์อาศัยสุดท้ายชนิดอื่น มีลำดับเบสเป็น T จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA พบว่ามีความผันแปรของลำดับเบสมากกว่าบริเวณ 18S rDNA ซึ่งความผันแปรของลำดับเบสที่มากกว่านั้น สามารถให้ข้อมูลทางพันธุกรรมในการบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตภายในชนิดเดียวกันได้ดีกว่า

8.3.2.3 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes

ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes จากการนำลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA ของ โปรโตซัว *S. singaporensis* ทั้ง 5 haplotypes และโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่น มาสร้างเป็นเครือข่าย พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของโปรโตซัวทั้งหมดได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้าย เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA ได้แก่ clade I, II และ III เป็นกลุ่มที่มีงู สัตว์ในตระกูลสุนัขหรือแมว และ นกเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย ตามลำดับ (fig 6) เช่นเดียวกัน ภายใน clade I นั้น พบว่า *S. zamani* แยกออกจากกลุ่ม *S. singaporensis* อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับ ใน clade II พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มและแยกความแตกต่างระหว่างโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ที่มีสัตว์อาศัยสุดท้ายซึ่งเป็นสัตว์ในตระกูลสุนัขและแมว ออกจากกันอย่างชัดเจนเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม และค่าระยะห่างทางพันธุกรรม รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA

จากการจำแนกชนิดโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซิสต์ ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าสามารถจำแนกชนิดของ *S. singaporensis* ได้และผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมด้านต่างๆในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA และ 28S rDNA พบว่าทุกผลการวิเคราะห์ให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือและความถูกต้องของข้อมูลที่ได้ และเป็นการแสดงให้เห็นว่าโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* นั้นมีความสัมพันธ์กับชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้าย อีกทั้งผลลำดับของ โปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะ sporocyst ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้มีการ submission ลงในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 8 อย่าง ทั้งหมด 16 สาย ได้แก่ KU375528-KU375535 (18S rDNA) และ KU375536-KU375543 (28S rDNA) (table 1) เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาด้านอนุชีววิทยาสำหรับงานวิจัยต่อยอดและการศึกษาในเชิงลึกของโปรโตซัว *S. singaporensis* และโปรโตซัวในสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นๆ อีกทั้งสามารถนำข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ อาทิเช่น การจัดจำแนกชนิด การศึกษาด้านอนุกรมวิธาน และการศึกษาด้านอื่นๆ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

9.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 22 ตัวอย่าง พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก โดยพบว่ามีความยาวเท่ากับ 9.47×6.91 ($7.39-12.32 \times 4.93-9.86$) ไมโครเมตร ตามลำดับ และมีค่า shape index (SI) เท่ากับ 1.37

9.2 การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาการจำแนกชนิดโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซิสต์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยวิธี multiplex PCR เป็นครั้งแรก โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA และ 28S rDNA สามารถจำแนกโปรโตซัว *S. singaporensis* ออกจากโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นได้ โดยโปรโตซัว *S. singaporensis* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 และ 265 คู่เบส ขณะที่โปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นจะให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส เท่านั้น ในขณะที่สัตว์ชนิดอื่นจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

9.3 การศึกษาทางพันธุกรรมบริเวณ 18S rDNA ของโปรโตซัว *S. singaporensis* จำนวน 22 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank 6 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง สามารถจัดรูปแบบโปรโตซัว *S. singaporensis* ได้เป็น 9 haplotypes โดยพบในประเทศไทย 6 haplotypes บนความแตกต่างของลำดับเบส 41 ตำแหน่ง และพบว่าสามารถจัดกลุ่มโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (clade I – clade III) ตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้าย ได้แก่ กลุ่มที่มีงู สัตว์ในตระกูลสุนัขหรือแมว และ นกเป็นสัตว์อาศัยสุดท้าย ตามลำดับ

9.4 การศึกษาทางพันธุกรรมบริเวณ 28S rDNA ของโปรโตซัว *S. singaporensis* จำนวน 10 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 11 ตัวอย่าง โดยทั้งหมดเป็นตัวอย่างในประเทศไทย สามารถจัดรูปแบบโปรโตซัว *S. singaporensis* ได้เป็น 5 haplotypes บนความแตกต่างของลำดับเบส 56 ตำแหน่ง พบว่าลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA มีความผันแปรของลำดับเบสสูงกว่าบริเวณ 18S rDNA และสามารถจัดกลุ่มโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (clade I – clade III) ตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้าย เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : นำผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ ในด้านต่างๆได้แก่

10.1 การแก้ปัญหาการปนเปื้อนของค็อคซิเดียโปรโตซัวชนิดอื่น ในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูเพื่อทำให้สามารถผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพสูงได้

10.2 การจำแนกชนิดโปรโตซัวชนิดนี้เพื่อใช้ในการตรวจสอบรับรอง การขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์ ในเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูที่ผลิตโดยภาคเอกชน

10.3 การ submission ข้อมูลลำดับเบสของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสเปอร์โรไซสต์ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ลงในฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank) และการนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับงานวิจัยต่อยอดในอนาคต

11. คำขอขอบคุณ : คุณยกุลลักษณ์ ขอประเสริฐ ที่สอนเทคนิคและวิธีการจำแนกชนิดของโปรโตซัว *S. singaporensis* โดยการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา และรศ.ดร.นสพ. วรวิทย์ วัชชวัลคุ ที่แนะนำเทคนิคการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตและให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ในการทำโคลนนิ่ง รวมถึงเจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ทุกท่านที่เกี่ยวข้องที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

จรัลธิดา กรรณสูต. 2543. พันธุกรรมของการกำเนิดชนิดพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของชนิดพันธุ์. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ. กรมประมง. กรุงเทพฯ.

- วิชาญ วรธนะไกวัด และวรวิทย์ วัชวัลคุ. 2558. ความหลากหลายทางชีวภาพบนยีน 28S rRNA ของ *Sarcocystis zamani* ที่พบในหนูศัตรูพืชสกุล *Bandicota* และ *Rattus* ในประเทศไทย. ในรายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 53 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2558. หน้า 54.
- Bandlet, H.J., Forster, P. and Rohl, A. 1999. Median-jointing networks for inferring intraspecific phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
- Bhat, T.K. and K.P. Jithendran. 1995. *Eimeria magna*: the effect of varying inoculum size on the course of infection in Angora rabbit. *World Rabbit Science*. 163-165.
- Beaver, P.C. and J.R. Maleckar. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976. *Sarcocystis villivillosi* and *Sarcocystis zamani* : Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *The International Journal for Parasitology*. 67: 241-256.
- Butkauskas, D., A. Sruoga, L. Kutkiene and P. Prakas. 2007. Investigation of the phylogenetic relationships of *Sarcocystis* spp. from graylag (*Anser anser*) and white-fronted (*Anser albifrons*) geese to other cyst forming coccidian using 18S and 28S rRNA gene sequences. *Acta zoologica lituanica*. 17: 124-127.
- Dahlgren, S.S. and B. Gjered. 2008. *Sarcocystis* in moose (*Alces alces*): molecular identification and phylogeny of six *Sarcocystis* species in moose, and a morphological description of three new species. *Parasitology Research*. 103: 93-110.
- Dolecel, D., B. Koudela, M. Jirku, V. Hypsa, M. Obornik, J. Votypka, D. Modry, J.R. Slapeta and J. Lukes. 1999. Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. *The International Journal for Parasitology*. 29: 795-798.
- Dubey, J.P. B.M. Rosenthal and T.A. Felix. 2010. Morphologic and molecular characterization of the sarcocysts of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the mallard duck (*Anas platyrhynchos*). *Journal of parasitology*. 96: 765-770.
- Ellis, T.J., K. Luton, P.R. Baverstock, G. Whitworth, A.M. Tenter and A.M. Johnson. 1995. Phylogenetic relationships between *Toxoplasma* and *Sarcocystis* deduced from a comparison of 18S rDNA sequences. *Parasitology*. 110: 521-528.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences. A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17: 368-376.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies* sinauer associates, Sunderland, Mass. 663p.

- Fischer, S. and K. Odening. 1998. Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. *Journal of parasitology*. 84: 50-54.
- Fitch, W.M. 1971. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*. 20: 406-416.
- Guindon, S. and Gascule, O., 2010. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hein, J., T. Jiang, L. Wang and K. Zhang. 1996. On the complexity of comparing evolutionary trees. *Discrete Applied Mathematics*. 71: 153-169.
- Holmdahl, O.J., D.A. Morrison, J. Ellis and L.T. Huong. 1999. Evolution of ruminant *Sarcocystis* (Sporozoa) parasites based on small subunit rDNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*. 11: 27-37.
- Jaekel, T., H. burgstaller and W. Frank. 1996. *Sarcocystis singaporensis*, studies on host specificity, pathogenicity and potential use as a biocontrol agent of rats. *The Journal for Parasitology*. 82: 280 – 287.
- Jeffries, A.C., B. Schnitzler, A.O. Heydorn, A.M. Johnson and A.M. Tenter. 1997. Identification of synapomorphic characters in the genus *Sarcocystis* based on 18S rDNA sequence comparison. *Journal of eukaryotic microbiology*. 44: 388-392.
- Lau, Y.L., P.Y. Chang, V. Subramaniam, Y.H. Ng, R. Mahmud, A.F. Ahmad and M.Y. Fong. 2013. Genetic assemblage of *Sarcocystis* spp. in Malaysian snakes. *Parasites and Vectors*. 257: 1-6.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111–120.
- Mugridge, N.B., D.A. Morrison, A.M. Johnson and J.P. Dubey. 1999. Phylogenetic relationships of the genus *Frenkelia*: a review of its history and new knowledge gained from comparison of large subunit. *The International Journal for Parasitology*. 29: 957-72.
- Mugridge, N.B., D.A. Morrison, T. Jakel, A.R. Heckerroth, A.M. Tenter and A.M. Johnson. 2000. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family Sarcocystidae. *Molecular biology and evolution*. 17: 1842-1853.

- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 333 pp.
- Odening, K. 1998. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sprozoa, Coccidia). *Systematic parasitology*. 41: 209-233.
- Olias, P., A.D. Gruber, H.M. Hafer and M. Lierz. 2009. A novel *Sarcocystis*-associated encephalitis and myositis in racing pigeons. *Avian parasitology*. 38: 121-128.
- Olias, P., A.D. Gruber, H.M. Hafer, A.O. Heydorn, H. Mehlhorn and M. Lierz. 2010. *Sarcocystis calchasi* is distinct to *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis* sp. from the sparrow hawk (*Accipiter nisus*). *Vetinary parasitology*. 171: 7-14.
- Prakas, P. and D. Butkauskas. 2012. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. *Ekologija*. 58: 45-58.
- Rosenthal, B.M., D.B. Dunams and B. Pritt. 2008. Restricted genetic diversity in the ubiquitous cattle parasite, *Sarcocystis cruzi*. *Infection Genetics and Evolution*. 8: 588-592.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Slapeta, J.R., I. Kyselova, A.O. Richardson, D. Modry and J. Lukes, 2002. Phylogeny and sequence variability of the *Sarcocystis singaporensis* Zaman and Colly,(1975)1976 ssr DNA. *The International Journal for Parasitology*. 88: 810-815.
- Stojecki, K., J. Karamon and T.Cencek. 2012. Molecular diagnostic of *Sarcocystis* spp. infection. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 15: 589-596.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 6. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
- Xiang, Z., X. Chen, L. Yang, Y. He, R. Jiang, B.M. Rosenthal, P. Luan, Y. Zou, Y.P. Zhang and Z. Yang. 2009. Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive host. *Parasitology International*. 58: 293-296.
- Yang, Z.Q., Y.X. Zou, Y.G. Yao, X.W. Chen, G.C. Yang and Y.P. Zhang. 2001. Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. *Molecular and biochemical parasitology*. 115: 283-288.

13. ภาคผนวก :

Table 1 Summary of nucleotide sequences of *S. singaporensis* included in this study.

No.	Accession/Voucher number		Country	Sampling location	Locality coordinating	Host	N	Reference
	18S rDNA	28S rDNA						
1	KU375528 (S42)	KU375536 (S42)	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 672509 1534355	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	1	This study
2	KU375529 (DOA3)	KU375537 (DOA3)	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 669766 1531445	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	1	This study
3	KU375530 (S26)	KU375538 (S26)	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 672509 1534355	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	1	This study
4	KU375531 (S11)	KU375539 (S11)	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 672509 1534356	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	1	This study
5	KU375532 (DOA1)	KU375540 (DOA1)	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 669766 1531445	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	1	This study
6	KU375533 (S54)	KU375541 (S54)	Thailand	Maharat, Ayutthaya	47P 668317 1614214	ricefield rat (<i>R. argentiventer</i>)*	1	This study
7	KU375534 (DOA2)	KU375542 (DOA2)	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 669766 1531445	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	1	This study
8	KU375535 (S1)	KU375543 (S1)	Thailand	Mueng, ChaiNat	47P 627295 1675769	ricefield rat (<i>R. argentiventer</i>)*	1	This study
9	S2	S2	Thailand	Mueng, ChaiNat	47P 627295 1675769	ricefield rat (<i>R. argentiventer</i>)*	1	This study
10	S14	S14	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 672509 1534355	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	1	This study
11	S 2008-1, S 2008-4	S2008-1, S2008-4	Thailand	Hua Hin, PraChuap Khiri Khan	47P 604044 1389620	bandicoot rat (<i>B. indica</i>)*	2	This study
12	SM15, SM19	SM15, SM19	Thailand	Khlong San, Bangkok	-	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	2	This study
13	2012-3, 2012-4	2012-3, 2012-4	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 672509 1534355	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	2	This study
14	P3	P3	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 672509 1534355	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	1	This study
15	S4	S4	Thailand	Khuan Khanun, Patthalung Hua Hin, PraChuap Khiri	47N 624384 842618	ricefield rat (<i>R. argentiventer</i>)*	1	This study
16	S 2008-2, S 2008-3	S2008-2, S2008-3	Thailand	Khan	47P 604044 1389620	bandicoot rat (<i>B. indica</i>)*	1	This study
17	S23	S23	Thailand	Maharat, Ayutthaya	47P 668317 1614214	ricefield rat (<i>R. argentiventer</i>)*	1	This study
18	S9	S9	Thailand	Bangkhen, Bangkok	47P 672509 1534355	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	1	This study
19	AF434051, AF434054, AF434057	-	Thailand	-	-	Sprague dawley rat (<i>R. norvegicus</i>)*	3	Slapeta <i>et al.</i> , 2002.
20	KC878489-KC878491	-	Malaysia	-	-	Malayan brown pit viper (<i>Ovophis convictus</i>)	3	Chang <i>et al.</i> , 2013**
21	-	AF237617	Thailand	-	-	Sprague dawley rat (<i>R. norvegicus</i>)*	1	Mugridge <i>et al.</i> , 2000.

*Offer the dead rat with fully mature muscle cysts of *S. singaporensis* fed to noninfectious with *Sarcocystis* spp. of reticulated python (*P. reticulatus*); ** The unpublished journal.

Table 2 Comparative descriptive measurement of sporocyst measured in micrometers ($M \pm SD$) and molecular diversity of 18S rDNA sequences (600 bp) from *S. singaporensis*, 22 samples were collected in this study.

Study sites in Thailand	N	Hosts	Sporocysts			Haplotypes (18S rDNA sequences)	Number of haplotypes	Number of variation sites	18S rDNA sequences	
			Length (min-max)	Width (min-max)	Shape Index (SI)				<i>Pi</i>	<i>Hd</i>
Bangkok	13	reticulated python (<i>P. reticulatus</i>)	9.46 ± 1.37 (7.39 - 12.32)	6.72 ± 1.24 (4.93 - 9.86)	1.4	hap S-I, S-II, S-V, S-IX	4	2	0.00096 ± 0.00078	0.526 ± 0.153
Ayutthaya	2	ricefield rat (<i>R. argentiventer</i>)	9.37 ± 1.10 (7.39 - 9.86)	6.89 ± 1.10 (4.93 - 7.39)	1.35	hap S-II, S-IX	2	1	0.00171 ± 0.00171	1.00 ± 0.500
ChaiNat	2	ricefield rat (<i>R. argentiventer</i>)	9.37 ± 1.10 (7.39 - 9.86)	6.89 ± 1.10 (4.93 - 7.39)	1.35	hap S-II, S-IX	2	1	0.00171 ± 0.00171	1.00 ± 0.500
PraChuap Khiri Khan	4	bandicoot rat (<i>B. indica</i>)	9.63 ± 1.42 (7.39 - 12.32)	6.78 ± 1.31 (4.93 - 9.86)	1.42	hap S-II, S-IX	2	1	0.00114 ± 0.00093	0.667 ± 0.204
Patthalung	1	ricefield rat (<i>R. argentiventer</i>)	9.86 ± 0.00 (9.86 - 9.86)	6.89 ± 1.10 (4.93 - 7.39)	1.43	hap S-II	1	-	-	-
Total	22		9.47 ± 0.09 (7.39 - 12.32)	6.91 ± 0.10 (4.93 - 9.86)	1.37	hap S-I - S-IX	9	2	0.00098 ± 0.00066	0.541 ± 0.094

Measurement of sporocyst has 5 replicates per sample.

SI, length/width; Pi, nucleotide diversity value ± standard error (SD); Hd, haplotide diversity ± standard error (SD)

Table 4 Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 6 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the 18S rDNA sequences (600 bp) from *S. singaporensis* 9 haplotypes and other *Sarcocystis* spp. sequences in GenBank database.

No. Seq->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 hap S-I		0.998	0.996	0.993	0.996	0.977	0.982	0.975	0.996	0.982	0.982	0.981	0.984	0.979	0.95	0.96	0.96	0.969	0.967
2 hap S-II	0.002		0.998	0.994	0.998	0.979	0.984	0.977	0.998	0.984	0.984	0.982	0.986	0.981	0.951	0.962	0.962	0.97	0.969
3 hap S-III	0.004	0.002		0.996	0.996	0.977	0.982	0.975	0.996	0.982	0.982	0.981	0.984	0.979	0.953	0.963	0.964	0.972	0.97
4 hap S-IV	0.007	0.005	0.004		0.994	0.975	0.981	0.975	0.996	0.979	0.979	0.977	0.981	0.975	0.951	0.96	0.96	0.969	0.967
5 hap S-V	0.004	0.002	0.004	0.005		0.979	0.984	0.977	0.998	0.982	0.982	0.981	0.984	0.979	0.951	0.96	0.96	0.969	0.967
6 hap S-VI	0.014	0.013	0.014	0.016	0.013		0.991	0.982	0.979	0.974	0.975	0.967	0.97	0.97	0.945	0.955	0.953	0.965	0.957
7 hap S-VII	0.009	0.007	0.009	0.011	0.007	0.009		0.987	0.984	0.979	0.981	0.972	0.975	0.975	0.95	0.96	0.959	0.97	0.962
8 hap S-VIII	0.016	0.014	0.016	0.016	0.014	0.018	0.012		0.979	0.972	0.974	0.965	0.969	0.969	0.941	0.953	0.952	0.964	0.955
9 hap S-IX	0.004	0.002	0.004	0.004	0.002	0.013	0.007	0.013		0.982	0.982	0.981	0.984	0.979	0.951	0.96	0.96	0.969	0.967
10 <i>S. zuoi</i>	0.007	0.005	0.007	0.011	0.007	0.016	0.011	0.018	0.007		0.991	0.974	0.979	0.979	0.946	0.965	0.965	0.97	0.969
11 <i>S. clathronomyalaphis</i>	0.005	0.004	0.005	0.009	0.005	0.014	0.009	0.016	0.005	0.005		0.979	0.981	0.982	0.945	0.965	0.965	0.972	0.974
12 <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Moravia viridis</i>	0.011	0.009	0.011	0.014	0.011	0.022	0.016	0.023	0.011	0.013	0.009		0.987	0.982	0.948	0.96	0.953	0.96	0.972
13 <i>S. zamani</i>	0.007	0.005	0.007	0.011	0.007	0.018	0.013	0.02	0.007	0.009	0.005	0.007		0.994	0.956	0.968	0.965	0.969	0.975
14 <i>Sarcocystis</i> sp. 4	0.009	0.007	0.009	0.012	0.009	0.02	0.014	0.022	0.009	0.011	0.007	0.009	0.002		0.951	0.97	0.967	0.969	0.974
15 <i>S. atheridis</i>	0.04	0.038	0.036	0.038	0.038	0.042	0.036	0.046	0.038	0.038	0.038	0.042	0.034	0.036		0.95	0.936	0.943	0.943
16 <i>S. nasbitti</i>	0.027	0.025	0.023	0.027	0.027	0.035	0.029	0.036	0.027	0.025	0.025	0.025	0.022	0.023	0.036		0.963	0.963	0.967
17 <i>S. tenella</i>	0.018	0.016	0.014	0.018	0.018	0.025	0.02	0.027	0.018	0.016	0.016	0.023	0.016	0.018	0.038	0.02		0.979	0.96
18 <i>S. fusiformis</i>	0.016	0.014	0.013	0.016	0.016	0.024	0.018	0.025	0.016	0.018	0.016	0.023	0.016	0.018	0.038	0.022	0.009		0.969
19 <i>S. albifrons</i>	0.014	0.012	0.011	0.014	0.014	0.025	0.02	0.027	0.014	0.016	0.012	0.014	0.013	0.014	0.038	0.02	0.014	0.004	

Table 6 Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 6 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the 28S rDNA sequences (400 bp) from *S. singaporensis* 5 haplotypes and other *Sarcocystis* spp. sequences in GenBank database.

Nb Seq->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 hap L-I		0.99	0.99	0.99	0.99	0.933	0.951	0.948	0.948	0.892	0.897	0.918	0.875	0.865	0.855	0.914
2 hap L-II	0.009		0.993	0.987	0.987	0.93	0.948	0.944	0.944	0.889	0.894	0.915	0.872	0.862	0.852	0.911
3 hap L-III	0.009	0.006		0.993	0.993	0.936	0.954	0.951	0.951	0.895	0.9	0.921	0.878	0.868	0.858	0.917
4 hap L-IV	0.006	0.009	0.003		0.993	0.942	0.96	0.957	0.957	0.901	0.906	0.927	0.884	0.874	0.864	0.923
5 hap L-V	0.009	0.013	0.006	0.003		0.936	0.954	0.951	0.951	0.895	0.9	0.921	0.878	0.868	0.858	0.917
6 AF237616 <i>S. zamani</i>	0.039	0.042	0.035	0.032	0.035		0.951	0.948	0.951	0.927	0.933	0.924	0.904	0.878	0.868	0.924
7 GU188426 <i>S. rileyi</i>	0.032	0.035	0.029	0.025	0.029	0.025		0.996	0.996	0.918	0.924	0.942	0.915	0.905	0.894	0.962
8 AF092927 <i>S. neurana</i>	0.035	0.038	0.032	0.029	0.032	0.029	0.003		0.993	0.918	0.924	0.942	0.915	0.908	0.897	0.959
9 FJ232949 <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Columba livia</i>	0.035	0.039	0.032	0.029	0.032	0.025	0.003	0.006		0.918	0.924	0.942	0.915	0.905	0.894	0.965
10 AF012885 <i>S. capracanis</i>	0.079	0.083	0.076	0.072	0.076	0.059	0.052	0.052	0.052		0.99	0.966	0.928	0.913	0.905	0.9
11 AF076899 <i>S. tenella</i>	0.076	0.079	0.072	0.069	0.072	0.055	0.049	0.049	0.049	0.003		0.972	0.931	0.918	0.908	0.906
12 AF076903 <i>S. cruzi</i>	0.069	0.072	0.065	0.062	0.065	0.045	0.042	0.042	0.042	0.013	0.009		0.928	0.932	0.921	0.923
13 AF076902 <i>S. miescheriana</i>	0.086	0.09	0.083	0.079	0.083	0.069	0.059	0.059	0.059	0.049	0.049	0.045		0.907	0.899	0.897
14 SGU85706 <i>S. gigantea</i>	0.079	0.083	0.076	0.072	0.076	0.059	0.052	0.049	0.052	0.029	0.026	0.022	0.039		0.988	0.89
15 AF012884 <i>S. maulai</i>	0.083	0.086	0.079	0.076	0.079	0.062	0.055	0.052	0.055	0.029	0.029	0.025	0.039	0.003		0.879
16 X75429 <i>T. gondii</i>	0.069	0.072	0.065	0.062	0.065	0.052	0.035	0.039	0.032	0.069	0.066	0.059	0.076	0.065	0.069	

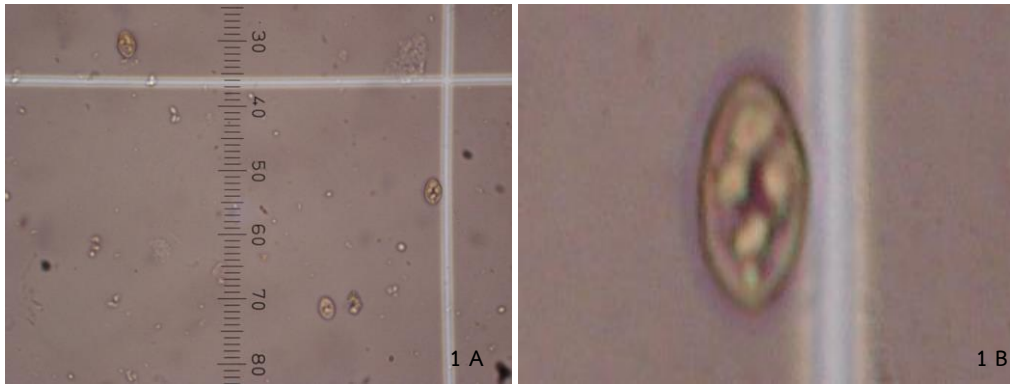


Figure 1 Sporocysts of *S. singaporensis* in this study, **1A)** Light microscope of sporocysts in a fecal flotation (x100), **1B)** Light microscope of sporocysts in a fecal flotation, reveal the oval shaped, each sprocyst contains 4 sporozoites (x400).

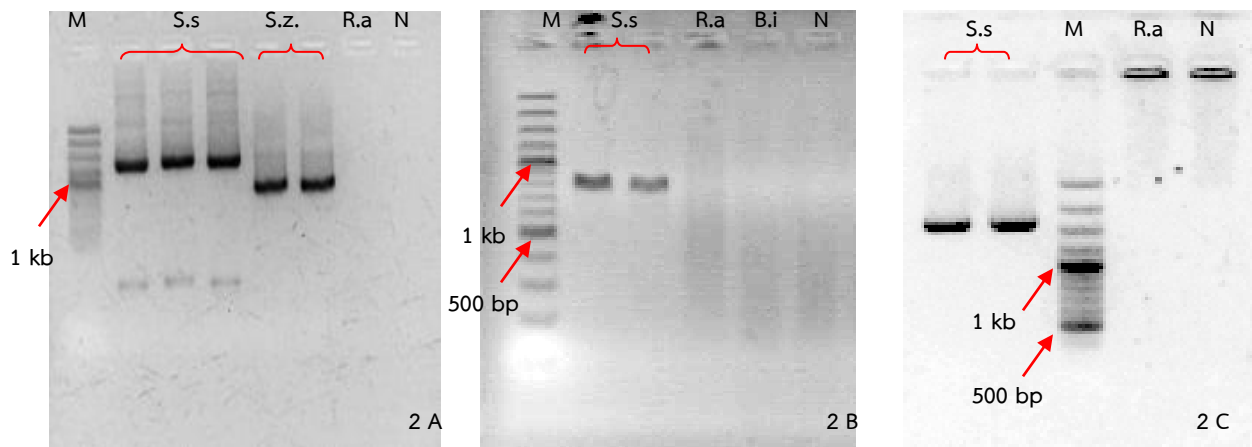


Figure 2 PCR product from sporocyst of *S. singaporensis* detect by 2% agarose gel electrophoresis. **2A)** PCR product of 2 plex PCR with the use of primer 1LF edit/1 hr and KL1F/ IdenLSUR, *S. singaporensis* generated 2 bands in multiplex PCR; 1) 265 bp specific only *S. singaporensis* and 2) 1,500 bp of 18S rDNA region which specific for all *Sarcocystis* species, **2B)** PCR product of 28S rDNA region with the use of primer KL1F/KL3R, **2C)** PCR product of 18S rDNA region with the use of primer 1LF edit/1Hr. M: molecular weight marker (100 bp), S.s: *S. singaporensis*, S.z: *S. zamani*, R.a: *R. argentiventer*, B.i: *B. indica*, N: negative control.



Figure 3 Phylogenetic tree of 18S rDNA sequences (600 bp) of *S. singaporensis* and depicting the genetic relatedness of the *Sarcocystis* species. Bootstrap support 1,000 replicated are given above or below the branches and reconstructed following 3 different methods NJ/ML/MP respectively. The Neighbour joining (NJ) method reconstruction with the Kimura two parameter (K2P) substitution model, Maximum parsimony (MP) method perform using subtree-pruning-regrafting (SPR) method, the model for Maximum likelihood (ML) method using general time reversible model (GTR) and nearest neighbor interchanges (NNI) branch swapping methods. The tree has been rooted using *E. tenella*

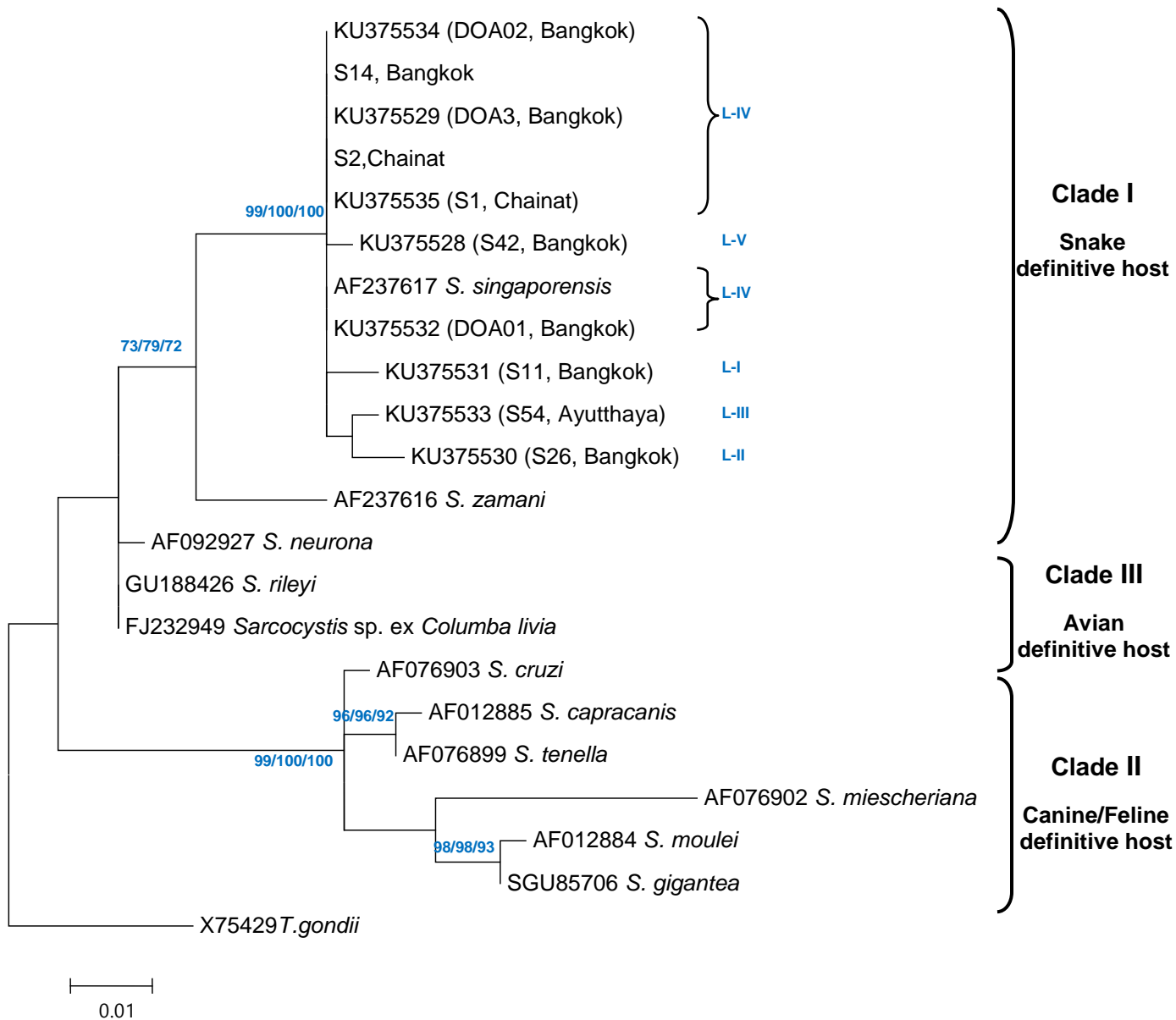


Figure 4 Phylogenetic tree of 28S rDNA sequences (400 bp) of *S. singaporensis* and depicting the genetic relatedness of the *Sarcocystis* species. Bootstrap support 1,000 replicated are given above or below the branches and reconstructed following 3 different methods NJ/ML/MP respectively. The Neighbour joining (NJ) method reconstruction with the kimura two parameter (K2P) substitution model, Maximum parsimony (MP) method perform using subtree-pruning-regrafting (SPR) method, the model for Maximum likelihood (ML) method using general time reversible model (GTR) and nearest neighbor interchanges (NNI) branch swapping methods. The tree has been rooted using *T. gondii*.

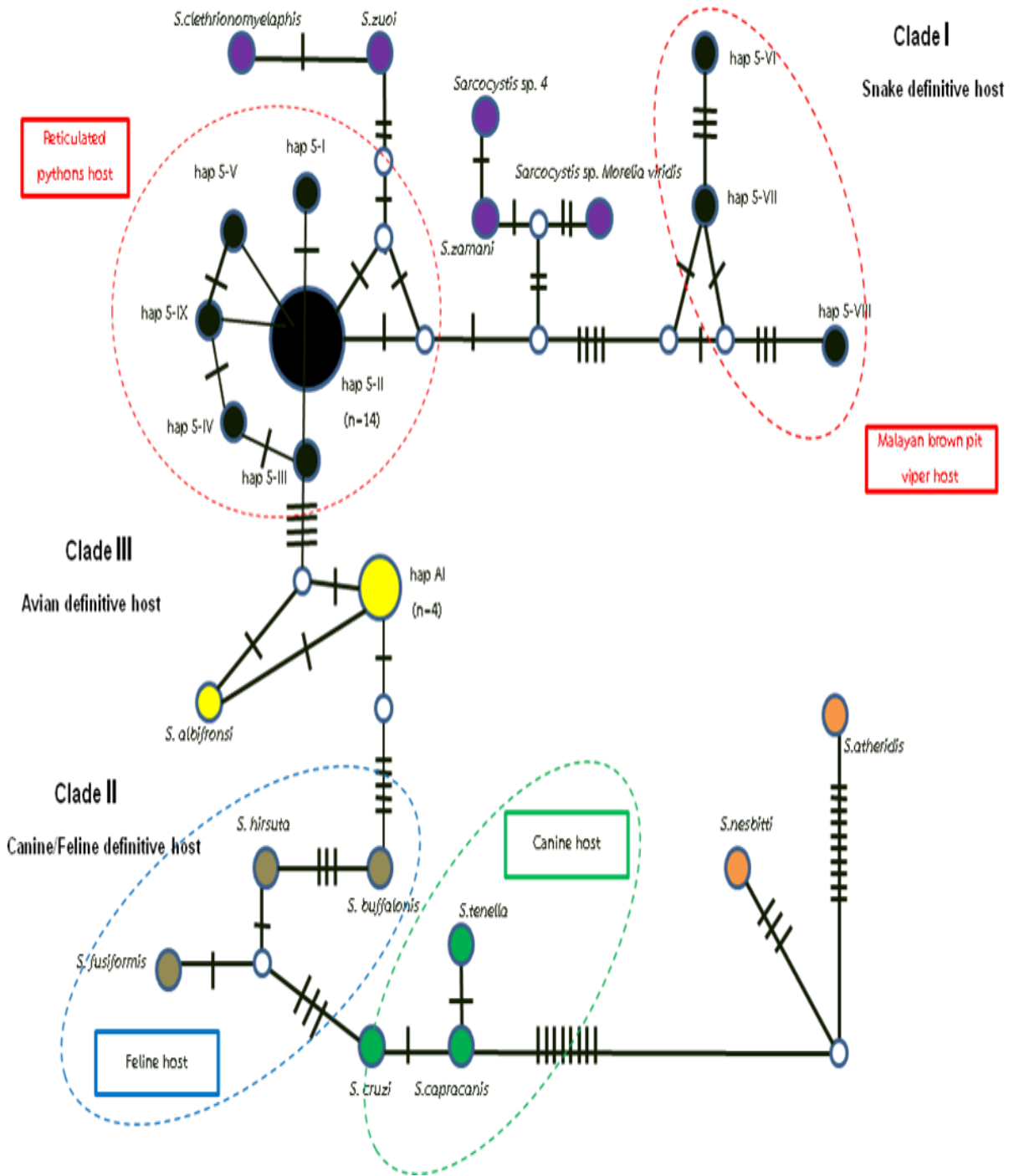


Figure 5 Median-joining network showing the phylogenetic relationship between *S. singaporensis* and *Sarcocystis* species with their definitive host based on 18S rDNA region (600 bp). Hatch marks along branches indicate the number of base differences separating each haplotype.

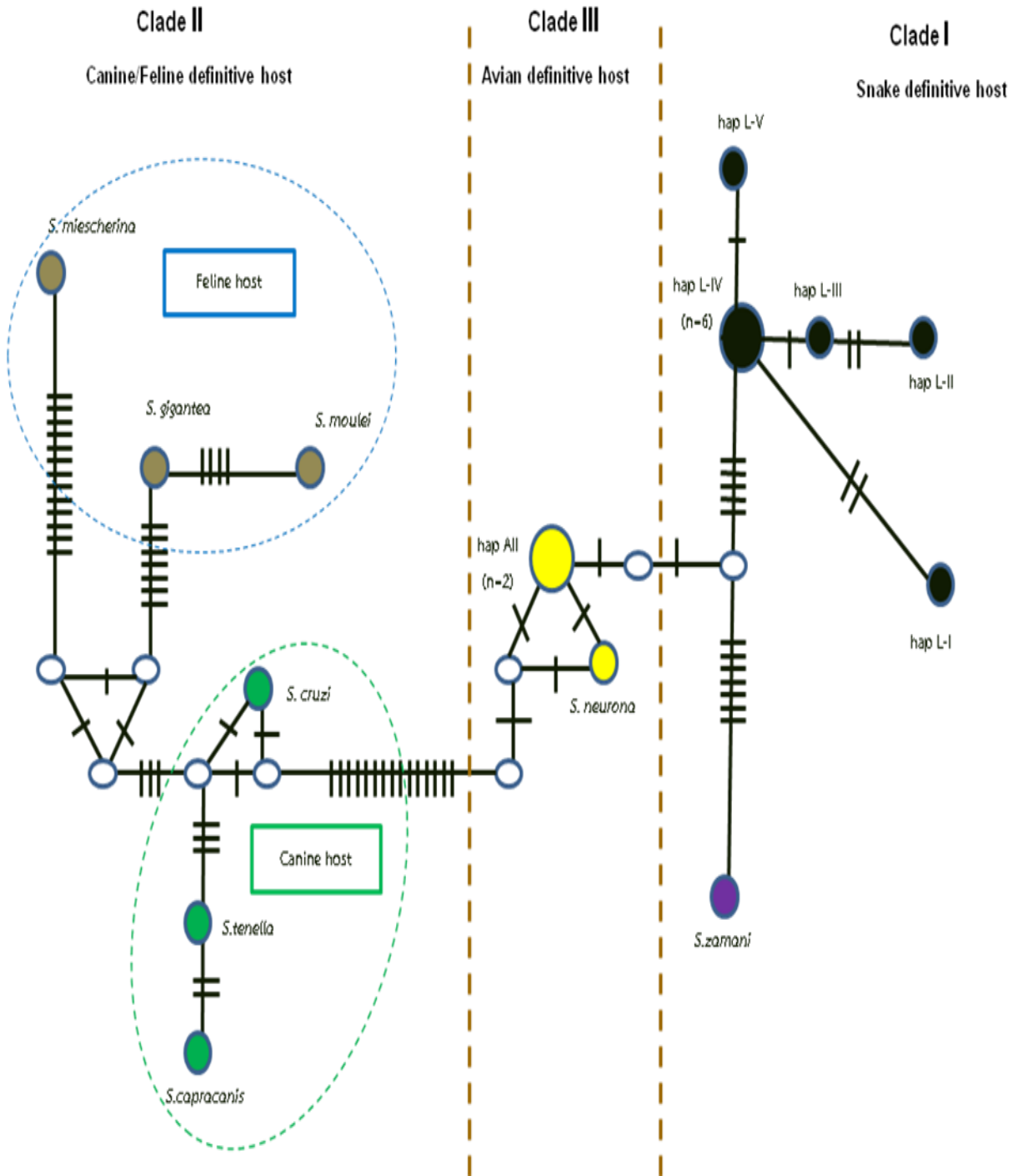


Figure 6 Median-joining network showing the phylogenetic relationship between *S. singaporensis* and *Sarcocystis* species with their definitive host based on 28S rDNA region (400 bp). Hatch marks along branches indicate the number of base differences separating each haplotype.