

1. **ชุดโครงการวิจัย** : แผนงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. **โครงการวิจัย** : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่, *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) ที่พบในประเทศไทย
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Genetic Diversity of Ricefield Rat, *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) in Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : วิชาญ วรรณนะไกวล์ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ปราสาททอง พรหมเกิด สมเกียรติ กล้าแข็ง เกียรติศักดิ์ หามะฤทธิ์ และ

ทรงทัฬห แก้วตา กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ : การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916)) ทำการเก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่จำนวน 77 ตัวอย่าง ใน 15 จังหวัด จาก 5 ภูมิภาค ในประเทศไทย เพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ในประเทศไทย ด้วยเทคนิค multiplex PCR ในบริเวณไซโตโครม บีในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการจำแนกชนิดหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทย ด้วยเทคนิค multiplex PCR เป็นครั้งแรก ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าหนูนาใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด ได้แก่ ขนาด 1,300 และ 199 คู่เบสตามลำดับ และผลจากการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บี และบริเวณไซโตโครม บี ถึงส่วนต้นบริเวณควบคุมไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ สามารถแบ่งหนูนาใหญ่ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ clade A และ clade B ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 5 และ 9 haplotypes ตามลำดับ ในขณะที่ผลจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes และการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากร บริเวณไซโตโครม บี เป็นไปได้ว่าหนูนาใหญ่ในประเทศไทย ที่พบทางภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อพยพมาจากทางภาคใต้ของประเทศ และผลจากการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน สามารถแบ่งหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่มประชากร ซึ่งมีที่มาจากแหล่งที่ต่างกัน

Abstract : The study of genetic diversity of ricefield rats (*Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916)). We collected 77 of ricefield rat samples in 15 provinces obtain from 5 regions of Thailand. The objectives were to investigate the genetic diversity of ricefield rats in Thailand. This is the first study to use multiplex PCR to identify ricefield rats in Thailand, the multiplex PCR based on cytochrome *b* region showed that the ricefield rats generated 2 bands 1,300 and 199 basepairs (bp) respectively. Phylogenetic analysis using cytochrome *b* (*cytb*) and cytochrome *b* (*cytb*) to the

heading of control region (D-loop) in mitochondrial region identified 2 distinct sequence clades, referred to as clade A and clade B. According phylogenetic tree, both region in mitochondrial DNA of ricefield rats in Thailand are classified into 5 and 9 haplotypes respectively. While our nucleotide diversity, median-joining network analysis and the population history analysis based on cytochrome *b* region, these result suggest that the ricefield rats in Thailand as migration from the South to the Central, North, East and Northeast of Thailand and the amino acid substitution result indicate that the ricefield rats in Thailand can divided into 2 groups and descended from distinct origin.

6. คำนำ: หนูนาใหญ่ (ricefield rat, *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916)) เป็นศัตรูสำคัญในแหล่งปลูกข้าวและธัญพืชอื่นๆ ทางภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย รวมถึงแหล่งปลูกข้าวในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Lekagul and Jeffrey, 1977) ต้นกำเนิดของหนูนาใหญ่เชื่อว่าเดิมเคยเป็นสปีชีส์ย่อย (sub species) ในกลุ่มหนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) โดยมีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคอินโด-ออสเตรเลีย (Indo-Australian region) และภูมิภาคอินโด-มาลายัน (Indo-Malayan region) (Musser, 1973) มีขนาดของลำตัว (ความยาวหัวและลำตัว) 204 มิลลิเมตร หางยาว 187 มิลลิเมตร ซึ่งสั้นกว่าความยาวหัวและลำตัว ใบหูเล็ก ขนาด 22 มิลลิเมตร ตีนหลังใหญ่ ขนาด 39 มิลลิเมตร มีน้ำหนักตัว 212 กรัม (Lekagul and Jeffrey, 1977) ขนด้านหลังมีสีน้ำตาลจนถึงดำและมีขนแข็งสีขาวแทรกอยู่เมื่อใช้มือลูบย้อนขนขึ้นไปจะรู้สึกเจ็บมือ ในตัวเมียเต็มวัยมีนมที่อกและที่ท้อง อย่างละ 3 คู่ ตีนมีสีดำ (เสริมศักดิ์, 2536)

เนื่องจากในสภาพตามธรรมชาติในปัจจุบันพบว่า หนูนาใหญ่ในธรรมชาตินั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างและสังคมชีวิตที่พบในแหล่งทำการเกษตร หรือในธรรมชาติ ซึ่งจากเดิมเคยพบทางภาคใต้และภาคกลางตอนล่างของประเทศไทย (Aplin *et al.*, 2003) แต่ในปัจจุบันสามารถพบกระจายอยู่ทั่วทุกภาคในประเทศไทย (ปราสาททอง และคณะ, 2553) ซึ่งการกระจายที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ประชากรหนูนาใหญ่ตามธรรมชาติมีโอกาสผสมพันธุ์เพิ่มขึ้นไม่ว่าภายในกลุ่มประชากรย่อยด้วยกันเองหรืออาจผสมพันธุ์แบบข้ามกลุ่มประชากร (Wright, 1951) อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้หนูนาใหญ่ที่พบตามธรรมชาติในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากขึ้นก็เป็นได้

ในการศึกษาอนุกรมวิธานเพื่อการจัดจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตนั้น ในอดีตใช้ลักษณะลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) เป็นหลักในการจัดจำแนก ซึ่งการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจไม่สามารถจัดกลุ่มแยกจากกันได้ ดังนั้นในปัจจุบันนี้การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (molecular biology) และข้อมูลทางพันธุกรรม จึงเข้ามามีบทบาทในด้านอนุกรมวิธาน การจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง เนื่องจากข้อมูลทางพันธุกรรม ซึ่งก็คือดีเอ็นเอ นั้น ประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ A (adenine), T (thymine), C (cytosine) และ G (guanine) นั้นมีลักษณะเป็นค่าเดี่ยวๆ (discrete character) ไม่มีความผันแปรที่เกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมภายนอก (จรัสธิดา, 2543) ซึ่งรูปแบบชนิดและการเรียงตัวของลำดับเบส ทำให้เกิดความแตกต่างและ

ความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ในการศึกษาอนุกรมวิธานได้ ซึ่งลำดับเบสบริเวณไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA) เป็นส่วนที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ซึ่งไมโทคอนเดรีย (mitochondria) นั้นเป็นออร์แกเนลล์ที่เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ พบในเซลล์ยูคาริโอตทั้งในพืชและในสัตว์ มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอและสังเคราะห์โปรตีนเอง ที่สำคัญปริมาณยีนของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ในเซลล์ 1 เซลล์ จะมีมากกว่าพันชุด ในขณะที่นิวเคลียสของเซลล์ 1 เซลล์ จะมีดีเอ็นเออยู่เพียง 2 ชุด (วรกมล, 2553) จึงสามารถแก้ปัญหาในกรณีที่ตัวอย่างมีน้อยมากได้ อีกทั้งไมโทคอนเดรียได้รับการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมจากเพศเมีย (maternal inheritance) ดังนั้นการศึกษาลำดับเบสในไมโทคอนเดรียจึงเป็นการศึกษาการสืบสายพันธุ์ทางแม่เท่านั้น ซึ่งลูกจะมี ดีเอ็นเอเหมือนแม่และญาติทางแม่ที่มีการสืบสายเลือดกันต่อมา (วิชัย, 2547) จึงเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของการสืบสายพันธุ์ของสัตว์กลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกันได้

ยีนไซโตโครม บี ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondria cytochrome *b* gene) มีลำดับเบสที่ค่อนข้างอนุรักษ์ เนื่องจากต้องมีการแปลรหัสเป็นโปรตีน ทำหน้าที่ในระบบขนส่งอิเล็กตรอน ของการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน และพบว่าลำดับเบสในบางช่วงมีลักษณะที่มีความจำเพาะต่อสัตว์แต่ละชนิด จึงมีการนำยีนส่วนนี้มาใช้ในการระบุชนิดของสัตว์ (species identification) อีกทั้งมีความหลากหลายสูง สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสองสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกันมากได้ ในขณะเดียวกันในไมโทคอนเดรียยังมีส่วนที่ไม่เป็นรหัสของยีน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง มากกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสประมาณ 10 เท่า เรียกว่าบริเวณควบคุม (control region, displacement loop หรือ D-loop) ดังนั้นยีนในบริเวณไซโตโครม บี และบริเวณควบคุม จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Andrews *et al.*, 1998; Irwin *et al.*, 1991; Avise *et al.*, 1998) อาทิเช่น การศึกษาในลิง (Sukmak *et al.*, 2014) และ (Lv *et al.*, 2015) และ ช้าง (Noro *et al.*, 1998; ปรีดา และคณะ, 2546) เป็นต้น รวมถึงการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในหนู (Liu *et al.*, 2004; Jing *et al.*, 2007; Pages *et al.*, 2010; Aplin *et al.*, 2011; Balakirev and Rozhnov, 2012) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทย เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ใช้ในการจัดจำแนกชนิดหนูนาใหญ่เพื่อเป็นข้อมูลด้านอนุกรมวิธาน ตลอดจนนำข้อมูลที่ได้เป็นต้นแบบไปใช้ในการจัดจำแนกหนูศัตรูพืชแต่ละชนิด และการ submission ข้อมูลลำดับเบสของหนูนาใหญ่ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับงานวิจัยด้านอนุกรมวิธาน และงานวิจัยด้านอื่นๆ ในอนาคต รวมถึงนำผลที่ได้ในครั้งนี้เป็นข้อมูลในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูศัตรูพืชชนิดอื่นๆ เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงและกรงคักสำหรับหนูนาใหญ่ อาหารหนูและน้ำ
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany), Phusion hotstart taq DNA polymerase (Thermo scientific, USA) และ gel elution kit (GeneMark, Taiwan)
3. เครื่องทำปฏิกิริยา PCR, เครื่องเจลอเล็กโตรโฟเรซิส, U.V. electronic U.V. transilluminator (Alphadigdoc™, 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 ถุงมือสำหรับห้องปฏิบัติการ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

- วิธีการ

การเก็บตัวอย่าง (Sampling)

ทำการเก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่จากนาข้าว จำนวน 77 ตัวอย่าง ใน 15 จังหวัด จาก 5 ภูมิภาคในประเทศไทย ได้แก่จังหวัด สุโขทัยและอุตรดิตถ์ (ภาคเหนือ) จังหวัดกรุงเทพฯ สุพรรณบุรี ชัยนาท นครสวรรค์ อโยธยา และลพบุรี (ภาคกลาง) จังหวัดร้อยเอ็ด และหนองบัวลำภู (ภาคอีสาน) จังหวัดปราจีนบุรี (ภาคตะวันออก) จังหวัดกระบี่ สงขลา นครศรีธรรมราชและพัทลุง (ภาคใต้) เพื่อเป็นตัวแทนของหนูในภูมิภาคนั้นๆ บันทึกตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างและพิกัดทางภูมิศาสตร์

การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

ทำการชั่งน้ำหนักและวัดลักษณะภายนอกของตัวอย่างหนูนาใหญ่จากนาข้าว ตามวิธีการของ Aplin *et al.*, 2003 ดังนี้ ความยาวของหัวและลำตัว (HB) วัดจากปลายจมูกถึงรูทวาร ความยาวของหาง (T) วัดจากรูทวารถึงปลายหาง ความยาวของตีนหลัง (HF) วัดจากปลายนิ้วที่ยาวที่สุดจนถึงสันของตีนหลัง ความยาวของหู (E) วัดจากโคนหูจนถึงปลายของใบหู หน่วยเป็นมิลลิเมตร ในกรณีเป็นเพศเมียนับจำนวนเต้านมและบันทึกลักษณะการเรียงตัวของเต้านม ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ ด้วยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม โดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อหรืออวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ ปอด ไต และตับ เป็นต้น โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร (ul) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

ไพรเมอร์ (primers) ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ ทั้งหมด 3 คู่ บริเวณยีนไซโตโครมบี (cytochrome *b* gene) ใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คู่แรกใช้ในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่; R.a outer F new (5'-ACA GCA TTC TCA TCA GTT ACT CAC ATC -3') และ R.a outer R new (5'-GGG TTG TTG ATT TCA CGG AGG ATG G-3') คู่ที่สองใช้ในการจำแนกหนูนาใหญ่; Ra inner F (5'-GAT ATT TAC ACG CCA ACG GG-3') และ R.a inner R (5'-GAT TAC GGT GGC TCC TCA A-3') บริเวณควบคุม (D-loop) ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่; Ra D-loop F (5'-CCA ATC TCT GGA ATC ATT GAA GAC-3') และ Ra D-loop R (5'-GCT GAC CTT CAT GCC TTG ACG GC-3') เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวม 20 ul ประกอบด้วยดีเอ็นเอหนูนาใหญ่ 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 65 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย 1.5 % อะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

การหาลำดับเบส (Nucleotide sequencing)

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.5% เจลอะกาโรส อิเล็กโตรโฟรีซิส และทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอขนาดตรงกับที่คำนวณไว้ หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel elution kit ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และส่งดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ First BASE laboratories ประเทศมาเลเซีย

การวิเคราะห์ผล (Data analysis)

ตรวจสอบผลลำดับเบสที่ได้ทั้ง 77 ตัวอย่าง และรวมแต่ละ contig เป็นสายเดี่ยว ซึ่งมีขนาด 1,300 และ 700 คู่เบส ในบริเวณไซโตโครม บี และบริเวณควบคุม 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) ลำดับเบสที่ได้ทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของหนูนาใหญ่ที่มีในฐานข้อมูล Genbank ในบริเวณไซโตโครม บี มีจำนวน 11 สาย และบริเวณควบคุมมีจำนวน 5 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) คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างหนูตัวอย่างแต่ละคู่ 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 tree-bisection-reconnection (TBR) brance swapping (Sorenson, 1999) 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 jukes-cantor-corrected distance (Jukes และ Cantor, 1969) ทั้ง 3 แผนภูมิดังกล่าวนั้น ทำการวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 รอบ โดยที่ค่าทางสถิติที่ได้จะถูกนำมาแสดงเพื่อเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของแผนภูมิ (phylogram) โดยเปรียบเทียบกับหนูท้องขาวชนิดอื่น (*Rattus species*) ที่มีในฐานข้อมูล โดยใช้หนูพุกใหญ่ (*Bandicota indica*) และหนูนอร์เว (*R. norvegicus*) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณไซโตโครม บี และบริเวณไซโตโครมบีจนถึงส่วนต้นของบริเวณควบคุม 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 (Hd) คือ ความน่าจะเป็นที่ตัวอย่างของ haplotype ใดๆ มีความแตกต่างกันในกลุ่มประชากร คำนวณได้จากสูตร

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

เมื่อ n = จำนวนตัวอย่าง

k = จำนวน haplotype

p_i = ความถี่ของแต่ละ haplotype

2. การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส

นำลำดับเบสที่ได้มาหลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 (Hall, 1999)

3. การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบสและระยะห่างทางพันธุกรรม

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. การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน

นำลำดับเบสบริเวณไซโตโครม พี ที่ได้มาหลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 (Hall, 1999)

5. การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial haplotypes

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

6. การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากร (population history) และการทดสอบสมมติฐานประชากร (neutrality)

การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรและการทดสอบสมมติฐานประชากร โดยใช้ การทดสอบ 4 วิธี ได้แก่ Fu and Li's D (Fu and Li 1993), Fu and Li's F (Fu and Li 1993), Tajima D (Tajima, 1989) และ Fu 's F_s (Fu, 1997) ซึ่งทั้ง 4 วิธีทดสอบนั้นเป็นการทดสอบว่าประชากรอยู่ในสภาพสมดุลหรือไม่ (neutrality test of equilibrium) ทดสอบค่าทางสถิติด้วย permutation 1,000 ซ้ำ จำนวนและหาค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้โปรแกรม DnaSP v.5 (Librado and Rozas, 2009) ค่าการวิเคราะห์ที่ได้เป็นไปได้ 3 กรณี คือ มีค่าเป็นศูนย์เมื่อประชากรอยู่ในสภาพสมดุล มีค่าเป็นลบเมื่อจำนวนประชากรเพิ่มขึ้น และมีค่าเป็นบวกเมื่อขนาดของประชากรลดลง อันเกิดจากการอพยพย้ายถิ่นของประชากรหรือการเกิดปรากฏการณ์คอขวด (population bottleneck หรือ genetic bottleneck) (Maruyama and Fuerst, 1985)

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2555 - กันยายน 2558 กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร แปลงนาข้าวของเกษตรกร ในพื้นที่ 15 จังหวัด ได้แก่ อำเภอกงไกรลาศ จังหวัดสุโขทัย อำเภอพิชัย จังหวัดอุตรดิตถ์ อำเภอบรรพตพิสัย จังหวัดนครสวรรค์ อำเภอบำเหน็จ จังหวัดลพบุรี อำเภอ महाराช จังหวัดอยุธยา อำเภอเมือง จังหวัดชัยนาท เขตหนองจอก กรุงเทพฯ อำเภอบางปลาม้า จังหวัดสุพรรณบุรี อำเภอจันทหาร จังหวัดร้อยเอ็ด อำเภอโนนสังข์ จังหวัดหนองบัวลำภู อำเภอศรีมหาโพธิ์ จังหวัดปราจีนบุรี อำเภอคลองประมง จังหวัดกระบี่ อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง อำเภอเชียรใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช และอำเภอกระเสสินธุ์ จังหวัดสงขลา

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากผลการวัดลักษณะภายนอกของตัวอย่างหนูนาใหญ่ ได้แก่ ความยาวของหัวและลำตัว (HB) ความยาวของหาง (T) ความยาวของตีนหลัง (HF) ความยาวของหู (E) นับจำนวนและลักษณะการเรียงตัวของเต้านม ในกรณีเป็นหนูเพศเมียบันทึก และทำการชั่งน้ำหนัก ซึ่งหนูนาใหญ่ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 77 ตัวอย่าง จาก 15 จังหวัด ใน 5 ภูมิภาคในประเทศไทย นั้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกทุกลักษณะที่นำมาใช้วิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 พบว่าไม่ต่างกันทางสถิติ และไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหนูนาใหญ่ในแต่ละภูมิภาคได้ (table 1) ซึ่งอาจจำเป็นต้องทำการศึกษาถึงขนาดและลักษณะของกะโหลกและกระดูกซี่โครงต่างๆ ทั้ง 18 ลักษณะ โดยใช้เวอร์เนียร์ในการวัด ตามวิธีการของ William *et al.*, 1981 และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับผลการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ซึ่งจะสามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ สามารถบอกลักษณะความแตกต่างของหนูนาใหญ่ในแต่ละภูมิภาคได้

8.2 การจำแนกชนิดหนูนาใหญ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การจำแนกชนิดหนูนาใหญ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยวิธี multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในบริเวณ ยีนไซโตโครมบี จำนวน 2 คู่ คู่แรกใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่; R.a outer F new / R.a outer R new ซึ่งหนูทุกชนิดต้องให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 1,300 คู่เบส ในขณะที่คู่ที่สองใช้ในการจำแนกหนูนาใหญ่; Ra inner F / R.a inner R ซึ่งมีเพียงหนูนาใหญ่ชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 199 คู่เบส ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า หนูนาใหญ่ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 77 ตัวอย่าง สามารถให้แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 1,300 และ 199 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบนั้นเป็นหนูนาใหญ่ทุกตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในขณะที่หนูชนิดอื่นที่นำมาทดสอบให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,300 คู่เบส เท่านั้น และการทดสอบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ไม่ใช่หนู ได้แก่ งูเห่า (Python reticulatus) และโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* นั้นไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งผลที่ได้นั้นเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ตอนออกแบบไพรเมอร์ (figure 1)

8.3 การศึกษาทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทย ทำการวิเคราะห์จากข้อมูลลำดับเบสบนไมโทคอนเดรีย 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณไซโตโครมบี (cytochrome b gene) และบริเวณควบคุม (D-loop) ให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 1,300 และ 700 คู่เบส โดยทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของหนูนาใหญ่ทั้ง 77 ตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในครั้งนี้ จาก 15 จังหวัด ใน 5 ภูมิภาคในประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออกและภาคใต้) และทำการวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของหนูนาใหญ่ที่มีในฐานข้อมูล Genbank ในบริเวณไซโตโครม บี จำนวน 11 สาย รวมทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 88 ตัวอย่าง ให้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

8.3.1 บริเวณไซโตโครมบี (cytochrome b gene)

จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน ไซโตโครมบี กับหนูนาใหญ่จากธรรมชาติ ที่ทำการตรวจวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นหนูนาใหญ่ จากไพรเมอร์ R.a outer F new/ R.a outer R new ได้ขึ้นส่วนของยีนที่มีความยาวประมาณ 1,300 คู่เบส หลังจากทำการตัดส่วนลำดับเบสที่ไม่ชัดเจน บริเวณปลาย 5' และ 3' ได้ลำดับเบสความยาว 740 คู่เบส ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

8.3.1.1 ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน ไซโตโครมบี ของหนูนาใหญ่ 88 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างหนูนาใหญ่ในประเทศไทยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 77 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank 11 ตัวอย่าง โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ NJ/ML/MP (fig 2) พบว่าทั้งสามวิธีให้ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบเดียวกัน และแสดงให้เห็นว่าหนูนาใหญ่ มีสายวิวัฒนาการแยกออกจากหนูชนิดอื่นอย่างชัดเจน เนื่องจากสมาชิกของหนูนาใหญ่มีตำแหน่งในแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นกลุ่มก้อนชัดเจนไม่มีสมาชิกของหนูชนิดอื่นเข้ามาปะปน และ interior branch ระหว่างหนูนาใหญ่กับหนูชนิดอื่นและภายในหนูนาใหญ่แต่ละกลุ่ม ให้ค่าผลการทดสอบ bootstrap ที่มีค่าสูง นอกจากนี้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้แสดงให้เห็นว่า หนูในสกุล *Rattus* มีวิวัฒนาการแบบ monophyletic group และสามารถจัดกลุ่มหนูนาใหญ่ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (clades) ได้แก่ clade A มีจำนวนสมาชิก 75 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 85.2 ของตัวอย่างทั้งหมด และ clade B มีจำนวนสมาชิก 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.7 ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่ง หนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทย สามารถแบ่งได้เป็น 5 haplotypes จากทั้งหมด 8 haplotypes

Clade A ประกอบไปด้วย haplotypes CI, CII, CIII และ CIV เป็นรูปแบบที่พบในประชากรหนูนาใหญ่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ส่วนที่เป็นแผ่นดินใหญ่ หรือตอนบนของประเทศแถบอาเซียน (North ASEAN) ซึ่งพบว่า haplotypes CI, CII และ CIV เป็นรูปแบบที่พบในประชากรหนูนาใหญ่ในประเทศไทยเท่านั้น พบทางภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก โดย haplotype CI เป็นรูปแบบที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด 55 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 64 ของตัวอย่างทั้งหมด haplotype CII พบในจังหวัดอยุธยา 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2 ของตัวอย่างทั้งหมด ส่วน haplotype CIV พบในภาคใต้ 4 จังหวัด ได้แก่ นครศรีธรรมราช สงขลา กระบี่และพัทลุง จำนวน 8 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทางภาคใต้ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 23 ของตัวอย่าง

ทั้งหมด ขณะที่ haplotype CII ประกอบไปด้วยหนุณาใหญ่จากเมือง Veal Renh ประเทศกัมพูชา 3 ตัวอย่าง (accession number HM217362, HM217364 และ JN675488) และเมือง Vinh Long และ Ho Chi Min city ประเทศเวียดนาม อย่างละ 5 และ 1 ตัวอย่าง (accession number FR775875- FR775877, FR775879, FR775881 และ JN675490) ตามลำดับ ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10 ของตัวอย่างทั้งหมด

ในขณะที่ clade B ประกอบไปด้วย haplotypes CV, CVI, CVII และ CVIII เป็นรูปแบบที่พบในประชากรหนุณาใหญ่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ส่วนที่ติดมหาสมุทร หรือทางตอนล่างของประเทศแถบอาเซียน (South ASEAN) โดย haplotypes CVI และ CVII เป็นรูปแบบที่พบในภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น มีจำนวนสมาชิก 1 และ 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1 และ 11 ของตัวอย่างทั้งหมด ตามลำดับ ส่วน haplotypes CV และ CVIII เป็นรูปแบบที่พบในเมือง Sumbava ประเทศอินโดนีเซีย (accession number JN675493) และเมือง Soc Trang ซึ่งเป็นเมืองที่อยู่ตอนใต้ของประเทศเวียดนามติดกับอ่าวไทย (accession number JN675489) มีจำนวนสมาชิก haplotypes ละ 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1 ของตัวอย่างทั้งหมด

ผลวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (nucleotide diversity, $Pi \pm SD$) พบว่าหนุณาใหญ่จากทางภาคใต้ และภาคกลางของประเทศไทย มีค่า 0.00753 ± 0.00138 และ 0.00021 ± 0.00036 ตามลำดับ (table 4) ขณะที่ค่าความหลากหลายของ haplotypes (haplotypes diversity, $Hd \pm SD$) พบว่าหนุณาใหญ่จากทางภาคใต้ และภาคกลางของประเทศไทยมีค่า 0.657 ± 0.080 และ 0.153 ± 0.092 ตามลำดับ (table 4)

ค่าความหลากหลายของ haplotypes (haplotype diversity, $Hd \pm SD$) นั้นขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง ถ้าจำนวนตัวอย่างมากจะทำให้มีโอกาสตรวจพบ haplotypes เพิ่มขึ้นอีก ในขณะที่หนุณาใหญ่จากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออก (haplotype CI) ไม่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม และค่าความหลากหลายของ haplotypes เนื่องจากไม่มีความแตกต่างของลำดับเบสภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน (table 4)

ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่าหนุณาใหญ่ทางภาคกลางมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และมีค่ากว่าความหลากหลายของ haplotypes สูง ซึ่งเป็นผลจากการที่กลุ่มประชากรมีความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงอันเป็นผลจากการเกิดปรากฏการณ์คอขวด (population bottleneck หรือ genetic bottleneck) (Nyakaana *et al.*, 2002; Kholodova *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2015) โดยที่ปรากฏการณ์คอขวด นั้นเป็นเหตุการณ์ที่เกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการอย่างหนึ่ง เกิดขึ้นในประชากรซึ่งแต่เดิมมีขนาดใหญ่ และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่ขนาดของประชากรลดลงอย่างมาก เนื่องจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมไปชั่วขณะหนึ่ง อาจเกิดจากภัยธรรมชาติต่างๆ เช่น น้ำท่วม โรคระบาด หรือการขาดแคลนอาหาร เป็นต้น หลังจากนั้นประชากรเพิ่มขนาดขึ้นมาใหม่ ซึ่งมีผลกระทบทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรนั้นลดลง ส่งผลให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมไป อีกทั้งจากผลการวิเคราะห์พบว่า หนุณาใหญ่ทางภาคใต้มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าหนุณาใหญ่ทางภาคกลางประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าหนุณาใหญ่ทางภาคใต้มีวิวัฒนาการที่ยาวนานกว่าหนุณาใหญ่ทางภาคกลาง และมีความเป็นไปได้ว่ากลุ่มประชากรหนุณาใหญ่ทางภาคกลางเป็นกลุ่มประชากรที่อพยพมาจากทางภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลแหล่งที่อยู่อาศัยเดิมของหนุณาใหญ่นั้นพบทางภาคใต้ของประเทศไทยและ

แหล่งปลูกข้าวในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Lekagul and Jeffrey, 1977) อีกทั้งสภาพการปลูกพืชทางภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากเดิมทางภาคใต้มีการทำนาปลูกข้าวกันมาก แต่ในช่วง 10 ปีหลังมานี้เกษตรกรมีการปลูกข้าวกันน้อยลง โดยหันมาปลูกยางพาราและปาล์มน้ำมันกันมากขึ้น ทำให้นาข้าวที่เป็นแหล่งอาหารของหนูนาใหญ่ลดลง จึงเกิดภาวะการขาดแคลนอาหารของหนูนาใหญ่ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ ข้อมูลแหล่งที่อยู่เดิมและสภาพการปลูกพืชทางภาคใต้ของประเทศไทย ให้ผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเดิมหนูนาใหญ่ในประเทศไทยนั้น มีที่อยู่ดั้งเดิมทางภาคใต้ของประเทศไทย ดังนั้นหนูนาใหญ่ทางภาคใต้จึงพบความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าภาคอื่นๆ (3 haplotypes, CIV, CVI และ CVII) แต่เนื่องจากเกิดภาวะการขาดแคลนอาหาร เนื่องจากเกษตรกรทางภาคใต้ของประเทศไทยปลูกข้าวน้อยลง ส่งผลให้หนูนาใหญ่เกิดการอพยพขึ้นสู่ทางตอนบนของประเทศไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคเหนือ ซึ่งผลจากการเกิดปรากฏการณ์คอขวดทำให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมไป ดังนั้นตัวอย่างหนูนาใหญ่จากทั้ง 4 ภาคดังกล่าว ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ จึงพบความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำเพียง 2 haplotypes (CI และ CII) จากการเก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่ทั้งหมด 57 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้ ในพื้นที่ทั้ง 4 ภูมิภาคในประเทศไทยดังกล่าว

8.3.1.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส

จากความยาวของลำดับเบสที่ทำการศึกษา 740 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบส 21 ตำแหน่ง (table 3) ความแตกต่างของลำดับเบสดังกล่าวสามารถแบ่งหนูนาใหญ่ที่นำมาวิเคราะห์ครั้งนี้ได้เป็น 8 haplotypes โดยพบว่า ลำดับเบส 16 ตำแหน่ง ได้แก่ตำแหน่งที่ 333, 348, 426, 462 549, 629, 630, 660, 693, 696, 862, 901, 918, 941, 957 และ 975 นั้น สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหนูนาใหญ่ทั้ง 2 กลุ่มใหญ่ คือ clade A และ clade B ออกจากกันได้ โดยใน clade A นั้น ลำดับเบสตำแหน่งที่ 444 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหนูนาใหญ่ที่พบใน 4 ภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ haplotype CI (หนูนาใหญ่ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก) มีลำดับเบสเป็น C (cytosine) ในขณะที่ haplotype CII (หนูนาใหญ่ในภาคกลาง จังหวัดอยุธยา) มีลำดับเบสเป็น T (thymine) และลำดับเบสตำแหน่งที่ 384, 640 และ 963 สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง หนูนาใหญ่ใน 4 ภูมิภาคของประเทศไทย (haplotypes CI และ CII) กับหนูนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทย (haplotype CIV) ที่อยู่ใน clade A ออกจากกันได้ ขณะเดียวกันลำดับเบสในตำแหน่งที่ 384 นั้น สามารถบอกความแตกต่างระหว่างหนูนาใหญ่ใน 4 ภูมิภาคของประเทศไทย (haplotypes CI และ CII) กับหนูนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทย (haplotypes CIV, CVI และ CVII) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น T (thymine) และ C (cytosine) ตามลำดับ ถึงแม้ว่าหนูนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทย (haplotype CIV) จะถูกจัดอยู่ใน clade A เช่นเดียวกับหนูนาใหญ่ใน 4 ภูมิภาคของประเทศไทย (haplotypes CI และ CII) ก็ตาม

8.3.1.3 การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบสและระยะห่างทางพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส (nucleotide identity) พบว่า หนูนาใหญ่ทั้ง 8 haplotypes (CI-CVII) ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มี ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 98-99 ซึ่งมีค่า

มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบหนูนาใหญ่กับหนูชนิดอื่นอีก 4 ชนิด ได้แก่ *Rattus norvegicus*, *R. exulans*, *R. rattus*, *R. losea* และ *B. indica* ซึ่งมีค่าร้อยละความเหมือนกับหนูนาใหญ่อยู่ที่ ร้อยละ 87-90 (table 5) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (fig 1) ที่พบว่าสามารถจัดกลุ่มและแยกความแตกต่างระหว่างหนูนาใหญ่กับหนูชนิดอื่นออกจากกันได้อย่างชัดเจน และสามารถจัดกลุ่มหนูนาใหญ่ที่นำมาวิเคราะห์ในครั้งนี้ ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ clade A (haplotypes CI-CIV) และ clade B (haplotypes CV-CVIII) เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) พบว่าหนูนาใหญ่ทั้ง 8 haplotypes (CI-CVII) ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.001-0.02 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบหนูนาใหญ่กับหนูชนิดอื่นอีก 4 ชนิด ได้แก่ *R. norvegicus*, *R. exulans*, *R. rattus*, *R. losea* และ *B. indica* ซึ่งมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.09-0.15 (table 5) อีกทั้งพบว่า หนูนาใหญ่ที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ใน clade เดียวกัน จะมีค่าร้อยละความเหมือนของลำดับเบสสูงกว่า และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำกว่าหนูนาใหญ่ที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ต่าง clade กัน โดยมีค่าร้อยละความเหมือนของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 99 และ 98 และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.001-0.004 และ 0.01-0.02 ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ลำดับเบสบริเวณ ไซโตโครม บี ในไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ นั้น สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหนูนาใหญ่ออกจากหนูชนิดอื่นๆ และสามารถแยกความแตกต่างของหนูนาใหญ่ภายในสปีชีส์เดียวกันได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ สอดคล้องกับผลจากแผนภูมิวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งในกรณีหนูนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทยทั้งหมด 20 ตัวอย่าง พบว่าถูกจัดกลุ่มแยกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ใน clade A (haplotype CIV) มีจำนวนสมาชิก 8 ตัวอย่าง จากทั้ง 4 จังหวัด ที่เก็บตัวอย่างในครั้งนี้ ได้แก่ จังหวัดกระบี่ สงขลา นครศรีธรรมราชและพัทลุง ในขณะที่เดียวกัน ใน clade B (haplotypes CVI, CVII) มีจำนวนสมาชิก 11 ตัวอย่าง จากทั้ง 4 จังหวัดดังกล่าวเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าหนูนาใหญ่ใน 4 จังหวัด ทางภาคใต้ของประเทศไทย ที่ทำการเก็บตัวอย่างในครั้งนี้ มีที่มาที่แตกต่างกันของ 2 กลุ่มประชากรระหว่าง clade A (haplotype CIV) กับ clade B (haplotypes CVI, CVII) ซึ่งมีค่าร้อยละความเหมือนของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 98.1-98.5 และมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.017-0.019 ตามลำดับ

8.3.1.4 การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน

เมื่อนำลำดับเบสของหนูนาใหญ่ทั้ง 8 haplotypes มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน พบว่ากรดอะมิโนทั้ง 246 ตำแหน่ง มีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 244 ลำดับ แตกต่างกัน 2 ลำดับ ได้แก่กรดอะมิโนลำดับที่ 123 หนูนาใหญ่ที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย (haplotype CVII) มีการแปลรหัสเป็น V (valine) ขณะที่หนูนาใหญ่อีก 7 haplotypes มีการแปลรหัสเป็น G (glycine) และกรดอะมิโนลำดับที่ 127 สามารถแบ่งหนูนาใหญ่ทั้งหมดได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ซึ่งทั้งหมดเป็นหนูนาใหญ่ในประเทศไทย ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในครั้งนี้ ได้แก่ haplotypes CI, CII, CVI และ CVII มีการแปลรหัสเป็น N (asparagine) ในขณะที่กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นลำดับเบสของหนูนาใหญ่จากประเทศในแถบอาเซียน จากฐานข้อมูล GenBank และหนูนาใหญ่ที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย (haplotype CIV) มีการแปลรหัสเป็น D (aspartic acid) (fig 4)

เมื่อพิจารณาผลการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแสดงให้เห็นว่าหนุณาใหญ่ทั้ง 8 haplotypes ที่นำมาวิเคราะห์ในครั้งนี้มีที่มาจาก 2 แหล่งประชากร จากผลการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนลำดับที่ 127 โดยกลุ่มแรกคือกลุ่มที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน aspartic acid (D) ซึ่งเป็นกลุ่มของหนุณาใหญ่ที่มีลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ haplotypes CIII, CV และ CVIII ซึ่งพบในประเทศ กัมพูชา เวียดนาม และอินโดนีเซีย รวมถึง haplotype CIV ซึ่งเป็นหนุณาใหญ่ที่พบทางภาคใต้ของประเทศไทย ในขณะที่กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีการแปลรหัสเป็น asparagines (N) ได้แก่ haplotypes CI, CII, CVI และ CVII ซึ่งทั้งหมดเป็นตัวอย่างหนุณาใหญ่ที่พบในประเทศไทย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าหนุณาใหญ่กลุ่มที่มีการแปลรหัสเป็น asparagines (กลุ่มที่ 2) นั้นเป็นกลุ่มที่มีถิ่นฐานดั้งเดิมหรือชนิดท้องถิ่นในประเทศไทย (native species) อีกทั้งการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนลำดับที่ 123 กลุ่มหนุณาใหญ่ทางภาคใต้ haplotype CVII มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน valine (V) ต่างจากกลุ่มหนุณาใหญ่ haplotype CVI ที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน glycine (G) โดยที่หนุณาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทยทั้ง 2 haplotypes นี้ นั้นจัดเป็นกลุ่มหนุณาใหญ่ชนิดท้องถิ่นเช่นเดียวกัน จึงแสดงให้เห็นว่าหนุณาใหญ่ทางภาคใต้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าภูมิภาคอื่นๆในประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนุณาใหญ่ ที่พบว่าหนุณาใหญ่ทางภาคใต้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าหนุณาใหญ่ทางภาคกลางของประเทศไทย นั่นเป็นไปได้ว่าเมื่อเกษตรกรทางภาคใต้ของประเทศไทยหันมาปลูกพืชอื่นแทนการทำนาข้าวกันมากขึ้น ทำให้หนุณาใหญ่เกิดภาวะการขาดแคลนอาหารจึงอพยพขึ้นสู่ทางตอนบนของประเทศ ทำให้กลุ่มประชากรของหนุณาใหญ่กลุ่มใหม่ที่เกิดขึ้นทางตอนบนของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก นั้นไม่มีความหลากหลายพันธุกรรม ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ในครั้งนี้พบเพียง 2 haplotypes (CI และ CII) อีกทั้งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับต่ำ ในขณะที่เดียวกันกลุ่มหนุณาใหญ่ haplotype CIV ซึ่งพบทางภาคใต้ของประเทศไทยที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนลำดับที่ 127 เป็น aspartic acid นั้นเป็นกลุ่มชนิดต่างถิ่น (introduced species) ไม่ได้มีถิ่นฐานดั้งเดิมในประเทศไทย เนื่องจากมีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน aspartic acid เช่นเดียวกันกับกลุ่มหนุณาใหญ่ haplotypes CIII, CV และ CVIII ซึ่งพบในประเทศ กัมพูชา เวียดนาม และอินโดนีเซีย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่ามีที่มาจากแหล่งเดียวกันกับกลุ่มหนุณาใหญ่ทั้ง 3 haplotypes (CIII, CV และ CVIII) ซึ่งไม่ได้พบในประเทศไทย และได้อพยพเข้ามาตั้งถิ่นฐานในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้หนุณาใหญ่ทางภาคใต้นั้น มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าภูมิภาคอื่นๆในประเทศไทย

8.3.1.5 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial cytochrome *b* haplotypes

ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial cytochrome *b* haplotypes จากการนำลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บี ของหนุณาใหญ่ทั้ง 8 haplotypes มาสร้างเป็นเครือข่าย (net work) โดยอิงกับพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ สามารถจัดกลุ่มหนุณาใหญ่ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (fig 5) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม หนุณาใหญ่ใน haplotypes CI-CIV ถูกจัดอยู่ใน clade A ขณะที่หนุณาใหญ่ใน haplotypes CV-CVIII ถูกจัดอยู่ใน clade B โดยมีความแตกต่างกันของลำดับเบส 16 ตำแหน่ง (table 3) และแสดงให้เห็นว่าหนุณาใหญ่ในประเทศไทย มีการจัดกลุ่มแบ่งออกเป็น 5 haplotypes โดยหนุณาใหญ่ทางตอนบนของประเทศไทย 4 ภูมิภาค ได้แก่

haplotypes CI และ CII มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน อีกทั้งหุนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งพบว่ามี 3 haplotypes (CIV, CVI และ CVII) นั้น สามารถแยกเป็น 2 กลุ่มออกจากกันอย่างชัดเจน โดยที่หุนาใหญ่ haplotypes CVI และ CVII มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า haplotypes CIV ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการแปลรหัส เป็นกรดอะมิโน ชี้บ่งว่าหุนาใหญ่ทั้ง 2 กลุ่มนี้มีที่มาจากแหล่งที่ต่างกัน

3.1.6 การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรและการทดสอบสมดุลประชากร

ทำการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากร (population history) ของหุนาใหญ่ จากลำดับเบส บริเวณไซโตโครม บี ความยาว 740 คู่เบส ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (table 4) โดยทำการทดสอบสมดุลประชากร (neutrality test) 4 วิธี ได้แก่ ได้แก่ Fu and Li's D (Fu and Li 1993), Fu and Li's F (Fu and Li 1993), Tajima D (Tajima, 1989) และ $Fu's F_s$ (Fu, 1997) พบว่าหุนาใหญ่ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออก และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (haplotype CI) ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ เนื่องจากไม่มีความแตกต่างของลำดับเบส ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน โดยหุนาใหญ่ทางภาคกลางของประเทศไทย มีค่าFu and Li's D และFu and Li's F เท่ากับ 0.617 และ 0.299 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเป็นบวกแต่เข้าใกล้ศูนย์ และมีค่า Tajima D และ $Fu's F_s$ เท่ากับ - 0.698 และ - 0.283 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเป็นลบแต่เข้าใกล้ศูนย์ จากค่าดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าทั้ง 4 ค่าที่ได้นั้น แม้ว่า จะมีค่าบวกและลบ แต่มีความแตกต่างจากค่าศูนย์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสามารถสรุปได้ว่าหุนาใหญ่ทาง ภาคกลางที่นำมาวิเคราะห์ในครั้งนี้ อยู่ในสภาพสมดุล ไม่ได้เกิดขึ้นจากการเพิ่มขนาดของประชากรอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเกิดจากการที่หุนาใหญ่จากที่อื่นอพยพเข้าในบริเวณภาคกลางของประเทศไทย เป็นระยะเวลาานาน จึงทำให้โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรหุนาใหญ่ในภาคกลางมีการเปลี่ยนแปลงทีละน้อยจนกระทั่งเข้าสู่ สมดุล

ขณะเดียวกันหุนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทย มีค่า Fu and Li's D และ Fu and Li's F เท่ากับ 1.419 และ 2.056 ซึ่งมีค่าเป็นบวกและมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่าศูนย์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 98 % ตามลำดับ และมีค่า Tajima D และ $Fu's F_s$ เท่ากับ 2.794 และ 4.765 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเป็นบวก โดยที่ค่า Tajima D นั้นมีค่าเป็นบวกที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่าศูนย์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % และค่า $Fu's F_s$ มีค่าเป็นบวกสูง จากผลการวิเคราะห์สมดุลประชากรหุนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทย ทั้ง 4 วิธี ทดสอบ พบว่ามีค่าเป็นบวกแสดงให้เห็นว่าหุนาใหญ่ทางภาคใต้มีจำนวนประชากรลดลง และมีความเป็นไปได้ว่าเกิด ปรากฏการณ์คอขวด ส่งผลให้ขนาดของประชากรหุนาใหญ่ทางภาคใต้ลดลงและหุนาใหญ่ทางภาคใต้เกิดการอพยพ ย้ายถิ่นฐาน อันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรม ผลการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และจากข้อมูลถิ่นที่อยู่อาศัยเดิมของหุนาใหญ่ในประเทศไทย นั้นเดิมมีถิ่นที่อยู่อาศัยทางภาคใต้ของประเทศไทย อีกทั้งผลจากการวิเคราะห์สมดุลประชากรของหุนาใหญ่ในภาคกลาง ที่เป็นตัวบ่งชี้ ดังนั้นเป็นไปได้ว่ากลุ่มหุนาใหญ่ ทางภาคกลางเป็นกลุ่มประชากรที่อพยพขึ้นมาจากทางภาคใต้ของประเทศไทย อันเนื่องมาจากสภาพการเพาะปลูกทาง

ภาคใต้ของประเทศไทยได้เปลี่ยนไป เกษตรกรหันมาปลูกปาล์มน้ำมันและยางพารากันมากขึ้น พื้นที่เพาะปลูกข้าวจึงลดลง หนุณาใหญ่ทางภาคใต้จึงเกิดภาวะขาดแคลนอาหาร ดังนั้นจึงอพยพขึ้นสู่ด้านบนของประเทศไทย และเกิดการจับคู่ผสมพันธุ์กับหนุณาใหญ่ในพื้นที่ ที่มีอยู่เดิมจึงเกิดหนุณาใหญ่รูปแบบ haplotype ใหม่ (CI และ CII) แต่ขาดซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมส่งผลให้ประชากรหนุณาใหญ่ใน 4 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ในครั้งนี้ พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ พบรูปแบบประชากรเพียง 2 haplotypes (CI และ CII) เท่านั้น

8.3.2 บริเวณไซโตโครม บีถึงส่วนต้นบริเวณควบคุม (cytochrome *b* gene and initial of control region)

8.3.2.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณไซโตโครม บี ถึงส่วนต้นบริเวณควบคุม

จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณควบคุม กับหนุณาใหญ่จากธรรมชาติ ที่ทำการตรวจวัด ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นหนุณาใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ Ra D-loop F และ Ra D-loop R ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่มีความยาวประมาณ 700 คู่เบส หลังจากทำการตัดส่วนลำดับเบสที่ไม่ชัดเจนบริเวณปลาย 5' และ 3' ได้ลำดับเบสความยาว 563 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบส 29 ตำแหน่ง และทำการรวบรวมลำดับเบสแต่ละ contig ของทั้ง 2 บริเวณ ได้แก่บริเวณไซโตโครม บี และบริเวณควบคุมเป็นสายเดี่ยวทั้ง 77 ตัวอย่าง อีกทั้งได้ submission ข้อมูลลำดับเบสของหนุณาใหญ่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ลงในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 9 สาย หมายเลข accession number KU375519-KU375527 (table 1) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณไซโตโครม บี ถึงส่วนต้นบริเวณควบคุม ความยาวรวม 1,300 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบสรวม 40 ตำแหน่ง วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ NJ/ML/MP (fig 3) พบว่า ทั้งสามวิธีให้ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบเดียวกัน และให้ผลการวิเคราะห์รูปแบบเดียวกับการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บี โดยสามารถแบ่งกลุ่มหนุณาใหญ่ ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ clade A มีจำนวนสมาชิก 65 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 84.4 ของตัวอย่างทั้งหมด และ clade B มีจำนวนสมาชิก 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 15.6 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 9 haplotypes

Clade A ประกอบไปด้วย haplotypes CDI - CDIV เป็นรูปแบบที่พบในประชากรหนุณาใหญ่ที่พบกระจายทั้ง 5 ภูมิภาค ในประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้ ซึ่งพบว่า haplotypes CDI และ CDII เป็นรูปแบบที่พบในภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก มีจำนวนสมาชิก 12 และ 44 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 15.6 และ 57.1 ของตัวอย่างทั้งหมด ตามลำดับ โดย haplotype CDII เป็นรูปแบบที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด

ในขณะที่ clade B ประกอบไปด้วย haplotypes CDV - CDIX เป็นรูปแบบที่พบในประชากรหนุณาใหญ่ในภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น ได้แก่จังหวัด สงขลา กระบี่ และนครศรีธรรมราช มีจำนวนสมาชิก 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 15.6 ของตัวอย่างทั้งหมด โดย haplotypes CDV, CDVI และ CDVII มีจำนวนสมาชิกรูปแบบละ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ KU375523 (สงขลา) KU375524 (กระบี่) และ KU375525 (สงขลา) ตามลำดับ

คิดเป็นร้อยละ 1.2 ของตัวอย่างทั้งหมด ส่วน haplotypes CDVIII และ CDIX มีจำนวนสมาชิก 4 และ 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.2 และ 6.5 ตามลำดับ เป็นรูปแบบที่พบในจังหวัดสงขลา และจังหวัดกระบี่กับนครศรีธรรมราชตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์พบว่าหนุณาใหญ่ในจังหวัดสงขลาที่มีรูปแบบที่หลากหลายมากที่สุด 4 haplotypes ได้แก่ CDIV, CDV, CDVII และ CDVIII ในขณะที่หนุณาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทยที่สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (clade A และ B) นั้นสอดคล้องกับผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บี ที่แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าหนุณาใหญ่ทางภาคใต้มีที่มาจาก 2 แหล่งประชากร ซึ่งสอดคล้องกับผลการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บี โดยที่ haplotype CDIV มีจำนวนสมาชิกเหมือนกับ haplotype CIV ดังนั้นเป็นไปได้ว่าหนุณาใหญ่ที่มีรูปแบบ haplotypes CDIV และ CIV มีที่มาจากประเทศอินโดนีเซีย เวียดนาม และกัมพูชา ไม่ได้เป็นหนุณาใหญ่สายพันธุ์ดั้งเดิมในประเทศไทย ขณะเดียวกันตัวอย่างหนุณาใหญ่ในประเทศไทย ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า clade B มีสมาชิกเหมือนกันในการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้ง 2 บริเวณ (ยกเว้นตัวอย่าง KU375523 ในจังหวัดสงขลา ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม clade A; haplotype CIV ในการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บี) โดยใน clade B ของการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บีถึงส่วนต้นบริเวณควบคุมนั้น พบรูปแบบของ หนุณาใหญ่ 5 haplotypes (CDV-CDIX) ซึ่งมากกว่า การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บี เท่านั้น ซึ่งพบเพียง 2 haplotypes (CVI และ CVII) จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความยาวของลำดับเบส ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสที่พบความแตกต่างของลำดับเบสได้มากขึ้น ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถให้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกความแตกต่างได้มากขึ้น

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมด้านต่างๆในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าวิธี multiplex PCR สามารถใช้ในการจำแนกชนิด หนุณาใหญ่ออกจากหนุณาชนิดอื่นๆ ได้ และทุกผลการวิเคราะห์ให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือและความถูกต้องของข้อมูลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าหนุณาใหญ่ที่พบในประเทศไทยนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยมีที่มาจาก 2 แหล่งที่ต่างกัน อีกทั้งหนุณาใหญ่ที่พบกระจายทั่วไปทางภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออกนั้น เป็นไปได้ว่าอพยพมาจากทางภาคใต้ของประเทศไทย ผลลำดับเบสของหนุณาใหญ่ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้มีการ submission ลงในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 9 อย่าง ได้แก่ KU375519-KU375527 (table 1) เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานการจัดจำแนกชนิดหนุณาใหญ่ หนุศัตรูพืชและงานวิจัยด้านอื่นๆ อีกทั้งสามารถนำข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

9.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนุณาใหญ่ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 77 ตัวอย่าง จาก 5 ภูมิภาคในประเทศไทย โดยการวัดขนาดความยาวของหัวและลำตัว (HB) ความยาวของหาง (T) ความยาวของ

ตีนหลัง (HF) ความยาวของหู (E) ในกรณีเป็น หนูเพศเมีย นับจำนวนและลักษณะการเรียงตัวของเต้านม นั้น ไม่ต่างกันทางสถิติ และไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างหนูนาใหญ่ในแต่ละภูมิภาคได้

9.2 การจำแนกชนิดหนูนาใหญ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยวิธี multiplex PCR ในบริเวณไซโตโครม บี สามารถจำแนกหนูนาใหญ่ออกจากหนูชนิดอื่นได้ โดยที่หนูนาใหญ่จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,300 และ 199 คู่เบส ขณะที่หนูชนิดอื่นจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,300 คู่เบส เท่านั้น ในขณะที่สัตว์ชนิดอื่นจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

9.3 การศึกษาทางพันธุกรรมบริเวณไซโตโครม บี ของหนูนาใหญ่ในประเทศไทย จำนวน 77 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank 11 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 88 ตัวอย่าง สามารถจัดรูปแบบหนูนาใหญ่ได้เป็น 8 haplotypes โดยพบในประเทศไทย 5 haplotypes สามารถแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ clade A ได้แก่ haplotypes CI-CIV และ clade B ได้แก่ haplotypes CV-CVIII บนความแตกต่างของลำดับเบส 21 ตำแหน่ง พบว่าหนูนาใหญ่ทางภาคใต้มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าหนูนาใหญ่ทางภาคกลาง และมีค่าการทดสอบสมดุประชากรเป็นบวกทั้ง 4 วิธีการทดสอบ ได้แก่ Fu and Li's D , Fu and Li's F , Tajima D และ $Fu's F_s$ ขณะเดียวกันผลจากการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ในลำดับที่ 127 สามารถแบ่งกลุ่มหนูนาใหญ่ได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีมีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน aspartic acid และ asparagines ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ทั้งหมดให้ผลที่สอดคล้องกัน บ่งชี้ว่าหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทยนั้น มีที่มาจาก 2 แหล่งประชากร คือกลุ่มหนูนาใหญ่ที่เป็นชนิดดั้งเดิมในประเทศไทยที่มีถิ่นฐานเดิมอยู่ทางภาคใต้และเกิดการอพยพขึ้นสู่ทางด้านบนของประเทศไทย ได้แก่ haplotypes CI, CII, CVI และ CVII ขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่มีที่มาเดียวกันกับหนูนาใหญ่ในประเทศกัมพูชา เวียดนาม และอินโดนีเซีย ซึ่งได้อพยพเข้าสู่ทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ haplotypes CIII, CIV, CV และ CVIII

9.4 การศึกษาทางพันธุกรรมบริเวณไซโตโครม บี ถึงส่วนต้นบริเวณควบคุม ของหนูนาใหญ่ในประเทศไทย จำนวน 77 ตัวอย่าง สามารถแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ clade A ได้แก่ haplotypes CDI-CDIV และ clade B ได้แก่ haplotypes CDV-CDIX และสามารถจัดรูปแบบหนูนาใหญ่ได้เป็น 9 haplotypes บนความแตกต่างของลำดับเบส 40 ตำแหน่ง โดยพบว่าการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณไซโตโครม บี ถึงส่วนต้นบริเวณควบคุม ซึ่งมีความยาวของลำดับเบสมากกว่าบริเวณไซโตโครม บี จะพบความแตกต่างของลำดับเบสเพิ่มขึ้น ทำให้ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มากขึ้นเช่นกัน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : นำผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ ในด้านต่างๆ ได้แก่

10.1 เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานการจัดจำแนกชนิดหนูนาใหญ่ หนูศัตรูพืช

10.2 เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลการอพยพของหนูนาใหญ่และเป็นต้นแบบในหนูศัตรูพืชชนิดอื่น อันนำไปสู่การป้องกันและกำจัดต่อไป

10.3 การ submission ข้อมูลลำดับเบสของหนูนาใหญ่ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ลงในฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank) เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทย

11. คำขอบคุณ : ขอขอบคุณ ดร. ณัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล คุณรุ่งนภา ทองเคิ่ง และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานแบคทีรี กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และคุณภัทรพร สรรพนุเคราะห์ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่อง gel document รวมทั้งเจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ช่วยให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จ ลุล่วงด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

- จรัลธิดา วรรณสุต. 2543. พันธุกรรมของการกำเนิดชนิดพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของชนิดพันธุ์. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ. กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และทรงทัฬห แก้วดา, 2553. ศึกษาความแปรปรวนของลักษณะภายนอกในประชากรหนูนาใหญ่ *Rattus argentiventer*. ในเอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร. หน้า 80-83.
- ปรีดา เลิศวัชรสารกุล นิกร ทองทิพย์ สุปราณี บุญโนนแต่ วรวิทย์ วัชชวัลคุ สิทธิเดช มหาสาวิงกุล ทวีโภค อังควาณิช และศรัณย์ จันทร์สิทธิเวช. 2546. ความหลากหลายของรหัสพันธุกรรมในส่วนยีน cytochrome b ของช้างไทย. วารสารกำแพงแสน ปีที่1 ฉบับที่ 1: 33-39.
- เสริมศักดิ์ หงส์นาค พวงทอง บุญทรง เกษม ทองทวี ชมพูนุช จรรยาเพศ กรแก้ว เสือสะอาด ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และทรงทัฬห แก้วดา. 2536. การประเมินความเสียหายของข้าวที่เกิดจากหนูศัตรูข้าวในประเทศไทย. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2536 กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 10-18.
- วรกมล แน่นอุดร. 2553. ความผันแปรของไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ตำแหน่ง 8271-8873 ในการถ่ายทอดพันธุกรรมฝ่ายแม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- วิชัย บุญแสง. 2547. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. ปทุมธานี.
- Andrews, T.D., L.S. Jermin and S. Eastal. 1998. Accelerated evolution of cytochrome *b* in simian primates: adaptive evolution in concert with other mitochondrial protein. *Journal of Molecular Evolution*. 47: 249-257.

- Aplin K.P., P.R. Brown, J. Jacob, C.J. Krebs and G.R. Singleton. 2003. Fields method for rodent studies in Asia and the Indo-Pacific. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.
- Avise, J.C., Walker, D. and John, G.C. 1998. Speciation and pleistocene effects on the vertebrates phylogeography. *Proceedings of the Royal Society B* 265, 1707-1712.
- Balakirev A.E. and V.V. Rozhnov. 2012. Contribution to the species composition and taxonomic status of some *Rattus* inhabiting Southern Vietnam and Sundaland. *Russian Journal of Theriology*. 11: 33-45.
- Bandlet, HJ., Forster, P. and Rohl, A. 1999. Median-jointing networks for inferring intraspecific phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
- 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.
- Fitch, W.M. 1971. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*. 20: 406-416.
- Fu, Y.X. and Li, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 133. 693-709.
- Fu, X.Y., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147. 915-925.
- 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.
- Irwin, D.M., T.D. Kocher and A.C. Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*. 32: 128-144.
- Jing, M., H.T. Yu, S.H. Wu, W. Wang and X. Zheng. 2006. Phylogenetic relationships in genus *Niviventer* (Rodentia : Muridae) in China inferred from complete mitochondrial cytochrome *b* gene. *Molecular phylogenetics and evolution*. 44: 521-529.
- Jukes, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York. 132 p.

- Kholodova, M.V., N.S. Korytin, N.S. and Bolshakov, V.N. 2014. The rule of the urals in the genetic diversity of the European moose subspecies (*Alces alces alces*). *Biology Bulletin*. 41: 522-528.
- 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.
- Lekagul, B. and A.M. Jeffery. 1977. *Mammals of Thailand*. Printed at Kurusapha Ladprao Press by Nai kamthon Sathirakul, Bangkok. 758 p.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liu, X.M., F.W. Wei, M. Li, X.L. Jiang, Z.J. Feng and J.C. Hu. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of wood mice (genus *Apodemus* Kaup, 1829) based on complete mtDNA cytochrome *b* sequences, with emphasis on Chinese species. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1-15.
- Lv, F.H., W.F. Peng, J. Yang, Y.X. Zhao, W.R. Li, M.J. Liu, Y.H. Ma, Q.J. Zhao, G.L. Yang, F. Wang, J.Q. Li, Y.G. Liu, Z.Q. Shen, S.G. Zhao, E. Hehua, N.A. Gorkhali, M. Muladno, A.N. Naqvi, J. Tabell, T.I. Touru, M.W. Bruford, J. Kantanen, J.L. Han and M.H. Li. 2015. Mitogenomic meta-analysis identifies two phases of migration in the history of Eastern Eurasian sheep. *Molecular Biology and Evolution*. 32: 2515-2533.
- Maruyama, T and P.A. Fuerst. 1985. Population bottlenecks and non-equilibrium model in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*. 111: 675-689.
- Musser, G.G. 1973. Zoogeographical significance of the Rice field rat, *Rattus argentiventer*, on Celebes and New Guinea and the Identity of *Rattus pestivulus*. *The American Museum of Natural History*. 2511: 1-30.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 333 pp.
- Noro, M.R., I.A. Dubrovo, M.C. Yoshida and M. Kato. 1998. Molecular phylogenetic inference of the woolly mammoth *Mammuthus primigenius*, based on complete sequences of mitochondrial cytochrome *b* and 12S ribosomal RNA genes. *Journal of Molecular Evolution*. 46: 314-326.

- Nyakaana, S., P. Arctander and H.R. Siegismund. 2002. Population structure of the African savannah elephant inferred from mitochondrial control region sequences and nuclear microsatellite loci. *Heredity*. 89: 90-98.
- Pages M., Y. Chaval, V. Herbreteau, S. Waengsothorn, J.F. Cosson, J.P. Hugot, S. Morand and J. Michaux. 2010. Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. *BMC Evolutionary Biology*. 10: 184-212.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Sorenson, M.D. 1999. TreeRot, version 2. Boston university, Boston, Massachusetts.
- Sukmak, M., S. Malaivijitnond, O. Schulke, J. Ostner, Y. Hamada and W. wajjwalku. 2014. Preliminary study of the genetic diversity of eastern Assamese macaques (*Macaca assamensis assamensis*) in Thailand based on mitochondrial DNA and microsatellite markers. *Primates*. 55: 189-197.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 597-601.
- 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.
- William, R.A., J.J. Rutledge and E.C. David. 1981. Genetic components of size and shape II multivariate covariance patterns in the rat and moused skull. *Evolution*. 35: 1037-1055.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of population. *Annals of Eugenics*. 15: 323 – 354.

13. ภาคผนวก :

Table 1 Summary of nucleotide sequences of *R. argentiventer* included in this study.

Country	Sampling location	Locality coordinating	Acession/Voucher number	N	Reference
Thailand					
Northern Thailand	KongKrailat, Sukhothai	47P 585155 1861101	RaSuk 1-7	7	This study
	Phichai, Uttaradit	47P 616427 1937841	RaUtt 1-7	7	This study
Central Thailand	Banphot Phisai, Nakhonsawan	47Q 613975 1774880	RaNak 1-2	2	This study
	BanMi, Lopburi	47P 659640 1669000	RaLop 075, 079	2	This study
	Maharat, Ayutthaya	47P 668317 1614214	KU375520 (RaAyu 3), RaAyu 1, 2, 4	4	This study
	Mueng, ChaiNat	47P 627295 1675769	RaCha 1-3	3	This study
	NongChok, Bangkok	47P 704297 1541106	KU375519 (RaBkk 8), RaBkk 2,5,7,10	5	This study
	BangPlaMa, SuphanBuri	47P 620665 1583885	RaSup H-J,8-12	8	This study
Northeastern					
Thailand	Junghan, RoiEt	48Q 338556 1789505	RaRoi A,1	2	This study
	NonSang, Nongbualamphu	48Q 245995 1864940	KU375521 (RaNong 7), RaNong C,E,G,K-N,2,4,5	11	This study
Eastern Thailand	Srimahapho, PrachinBuri	47P 766775 1547216	RaPra 1,2,5,7-9	6	This study
Southern Thailand	Klongprasong, Krabi	47P 492682 889352	KU375524 (RaKrabi 4), RaKrabi 1-3,Klong1,Klong2,Klong4	7	This study
	Chian Yai, Nakhon Si Thammarat	47P 618916 905369	KU375527 (RaNakSi 1), RaNakSi,2	2	This study
	Krasaesin, Songkhla	47N 649220 844496	KU375523 (RaSong 4), KU375525 (RaSong 24), KU375526 (RaSong 11),RaSong 1,2,3,5,12,41	9	This study
	Khuan Khanun, Patthalung	47N 624384 842618	KU375522 (RaPat 9), RaPat 7	2	This study
Indonesia	Sumbava	-	JN675493	1	Aplin <i>et al.</i> , 2011
Vietnam	Vinh Long	-	FR775875-77,FR775879	5	Balakirev <i>et al.</i> , 2012
	Ho Chi Minh city	-	JN675490	1	Aplin <i>et al.</i> , 2011
	Soc Trang	-	JN675489	1	Aplin <i>et al.</i> , 2011
Combdia	Veal Renh	-	JN675488, HM217362, HM217363	1	Aplin <i>et al.</i> , 2011 and Pages <i>et al.</i> , 2010

Table 2 Measurement of weight and body length in ricefield rats (*R. argentiventer*) collected in Thailand ($M \pm SD$). All measurement were not significant ($p > 0.05$)

Measurement	Localities collected (N)					F	P
	North (14) (min-max)	Northeast (13) (min-max)	Central (24) (min-max)	East (6) (min-max)	South (20) (min-max)		
weight (g)	182.29 \pm 45.94 (126.7-284.6)	208.93 \pm 27.11 (177.80-258.50)	201.05 \pm 45.33 (120-364.5)	195.98 \pm 35.83 (165.7-261.3)	217.66 \pm 51.38 (145.1-324.9)	1.38	0.248
Body length (mm)							
Head and Body (HB)	191.21 \pm 14.30 (168-213)	202.78 \pm 11.21 (185-220)	193.76 \pm 11.93 (175-220)	187.0 \pm 8.12 (175-200)	199.95 \pm 9.41 (185-220)	3.11	0.021
Tail (T)	182.6 \pm 12.46 (165-197)	183.11 \pm 10.54 (167-197)	180.5 \pm 9.87 (155-200)	179.17 \pm 10.82 (162-196)	187.19 \pm 10.24 (165-200)	1.37	0.254
Hind Foot (HF)	36.57 \pm 1.98 (32-40)	34.78 \pm 2.10 (32-38)	36.16 \pm 2.35 (33-44)	36.17 \pm 2.22 (33-39)	37.53 \pm 2.15 (33-42)	2.7	0.038
Ear (E)	22.29 \pm 1.26 (20-24)	23.56 \pm 1.33 (22-26)	22.24 \pm 1.58 (20-25)	22.50 \pm 1.04 (21-24)	22.0 \pm 1.22 (20-25)	2.15	0.083

Mean, standard deviation and min-max values of body length measurements and weight of ricefield rats (*R. argentiventer*) in this study were tested by analysis of variance (ANOVA; SPSS/PC+4.0)

Table 3 Variable nucleotide positions within the mitochondrial cytochrome *b* gene (740 bp) from different haplotypes of ricefield rats (*R. argentiventer*). The nucleotide for these sequences based on FR775875 *R. argentiventer*, mitochondrial cytochrome *b* gene. Dots indicate base pairs identical to the Ra-A haplotype of *R. argentiventer*.

Haplotype	Nucleotide positions																				N	References	
	333	348	384	426	444	462	549	629	630	640	660	693	696	730	862	901	918	941	957	963			975
CI	A	A	T	G	C	A	T	G	A	A	T	A	A	T	C	T	T	G	T	C	T	55	[1]
CII	T	2	[1]
CIII	G	.	.	.	C	9	[2,3 and 4]
CIV	.	.	C	G	T	.	8	[1]
CV	G	G	C	.	.	C	.	.	.	G	.	G	G	.	T	.	C	.	A	.	.	1	[2]
CVI	G	G	C	.	.	C	G	G	.	T	.	C	.	A	.	.	1	[1]
CVII	G	G	C	.	.	C	C	T	G	.	.	G	G	.	T	.	C	.	A	.	.	10	[1]
CVIII	G	G	C	A	.	C	.	.	.	G	C	G	G	.	T	C	.	A	.	.	C	1	[2]

1; This study, 2; Aplin *et al.*, 2011, 3; Balakirev and Rozhnov, 2012 and 4; Pages *et al.*, 2010

Table 4 Diversity and overall of ricefield rats (*R. argentiventer*) population parameters based on mitochondrial cytochrome *b* gene nucleotide sequences (740 bp).

Study sites	N	Haplotypes	number of haplotypes	number of variation sites	<i>Pi</i>	<i>Hd</i>	Neutrality test			
							Fu and Li's <i>D</i>	Fu and Li's <i>F</i>	Tajima's <i>D</i>	<i>Fu's Fs</i>
Thailand										
Northern Thailand	14	CI	1	0	0	0	NA	NA	NA	NA
Central Thailand	24	CI, CII	2	1	0.00021±0.00036	0.153±0.092	0.617	0.299	-0.698	-0.283
Northeastern Thailand	13	CI	1	0	0	0	NA	NA	NA	NA
Eastern Thailand	6	CI	1	0	0	0	NA	NA	NA	NA
Southern Thailand	20	CIV,CVI,CVII	3	10	0.00753±0.00138	0.657±0.080	1.419*	2.056**	2.794 ⁺	4.765
Indonesia	1	CV	1	0	0	0	NA	NA	NA	NA
Vietnam	7	CIII, CVIII	2	14	0.00873±0.00187	0.600±0.131	0.686	0.974	1.405	5.952
Combodia	3	CIII	1	0	0	0	NA	NA	NA	NA
Total	88	CI - CVIII	8	21	0.00400±0.00130	0.625±0.057	-1.824	-1.829	-1.041	0.435

N = total number of samples; *Pi*, nucleotide diversity value ± standard error (SD); *Hd*, haplotide diversity ± standard error (SD)

Estimates of Fu and Li's *D*, Fu and Li's *F*, Tajima's *D* and *Fu's Fs* are follow by 95% confidence and statistical significance derived from 1000 coalescent simulation.

NA indicated that value could not be calculated due to single haplotype found in the population in this study.

* $P < 0.05$: significant

** $P < 0.02$: significant

⁺ $P < 0.01$: significant

Table 5 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 mitochondrial cytochrome *b* gene region (740 bp) from ricefield rats (*R. argentiventer*) 8 haplotypes and 5 rodent species.

Haplotypes	CI	CII	CIII	CIV	CV	CVI	CVII	CVIII	R.n	R.e	R.r	R.l	B.i
CI		0.998	0.997	0.995	0.985	0.987	0.983	0.981	0.872	0.899	0.909	0.907	0.873
CII	0.001		0.995	0.994	0.984	0.985	0.981	0.98	0.871	0.9	0.907	0.906	0.872
CIII	0.003	0.004		0.995	0.985	0.984	0.98	0.981	0.875	0.899	0.909	0.91	0.873
CIV	0.004	0.006	0.004		0.987	0.985	0.981	0.983	0.873	0.9	0.91	0.906	0.872
CV	0.014	0.016	0.014	0.013		0.998	0.994	0.99	0.875	0.899	0.915	0.913	0.868
CVI	0.013	0.014	0.016	0.014	0.001		0.995	0.988	0.873	0.898	0.913	0.912	0.869
CVII	0.017	0.019	0.02	0.019	0.006	0.004		0.984	0.872	0.898	0.912	0.907	0.868
CVIII	0.019	0.02	0.019	0.017	0.01	0.011	0.016		0.873	0.898	0.91	0.906	0.868
R.n	0.15	0.152	0.146	0.148	0.146	0.148	0.15	0.148		0.888	0.892	0.881	0.869
R.e	0.114	0.112	0.114	0.112	0.113	0.115	0.115	0.115	0.13		0.896	0.905	0.872
R.r	0.1	0.102	0.1	0.099	0.093	0.095	0.097	0.099	0.123	0.117		0.939	0.876
R.l	0.103	0.105	0.099	0.105	0.096	0.097	0.103	0.105	0.139	0.106	0.065		0.865
B.i	0.15	0.152	0.15	0.152	0.158	0.156	0.158	0.158	0.158	0.152	0.146	0.163	

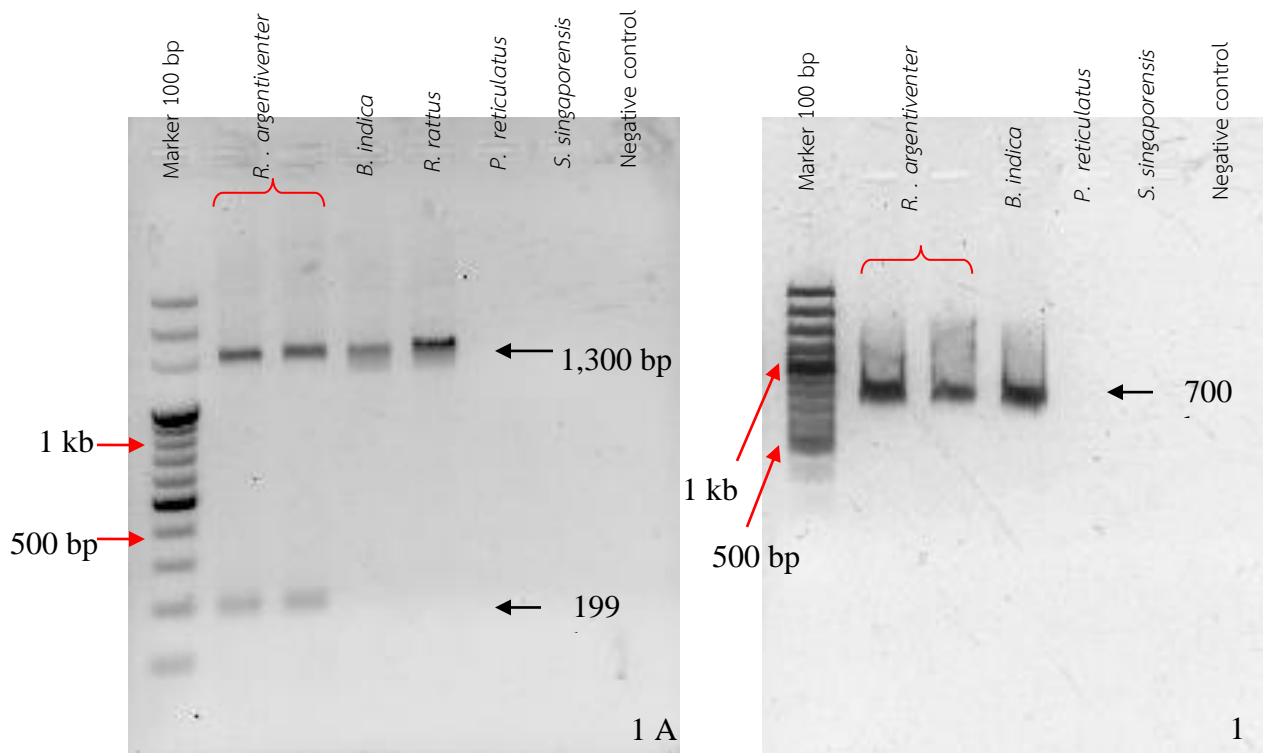


Figure 1 1A; PCR product with the use of primers R.a cyt b new F/ R.a cyt b new R and Ra inner F/ Ra inner R (cytochrome *b* region) of ricefield rats (*R. argentiventer*) generated 2 bands in multiplex PCR; 1) 199 bp specific only rice-field rats and 2) 1,300 bp of cyt *b* gene which specific for all rats detect by 2% agarose gel electrophoresis, (Left to right) lane 1 contains DNA markers, and lane 2-3 are samples from ricefield rats, lane 4-5 are samples from other rats, Lane 6-7 are samples from *P. reticulates* and *S. singaporensis* respectively, lane 8 is negative control. **1B;** 700 bp of D-loop region are amplified by PCR product with the use of primer R.a D-loop F/ R.a D-loop R and detect by 2% agarose gel electrophoresis, (Left to right) lane 1 is 100 bp DNA marker, lane 2-3 are samples from ricefield rats (*R. argentiventer*), lane 4-6 are *B. indica*, *P. reticulates* and *S. singaporensis* respectively and lane 7 is negative control.

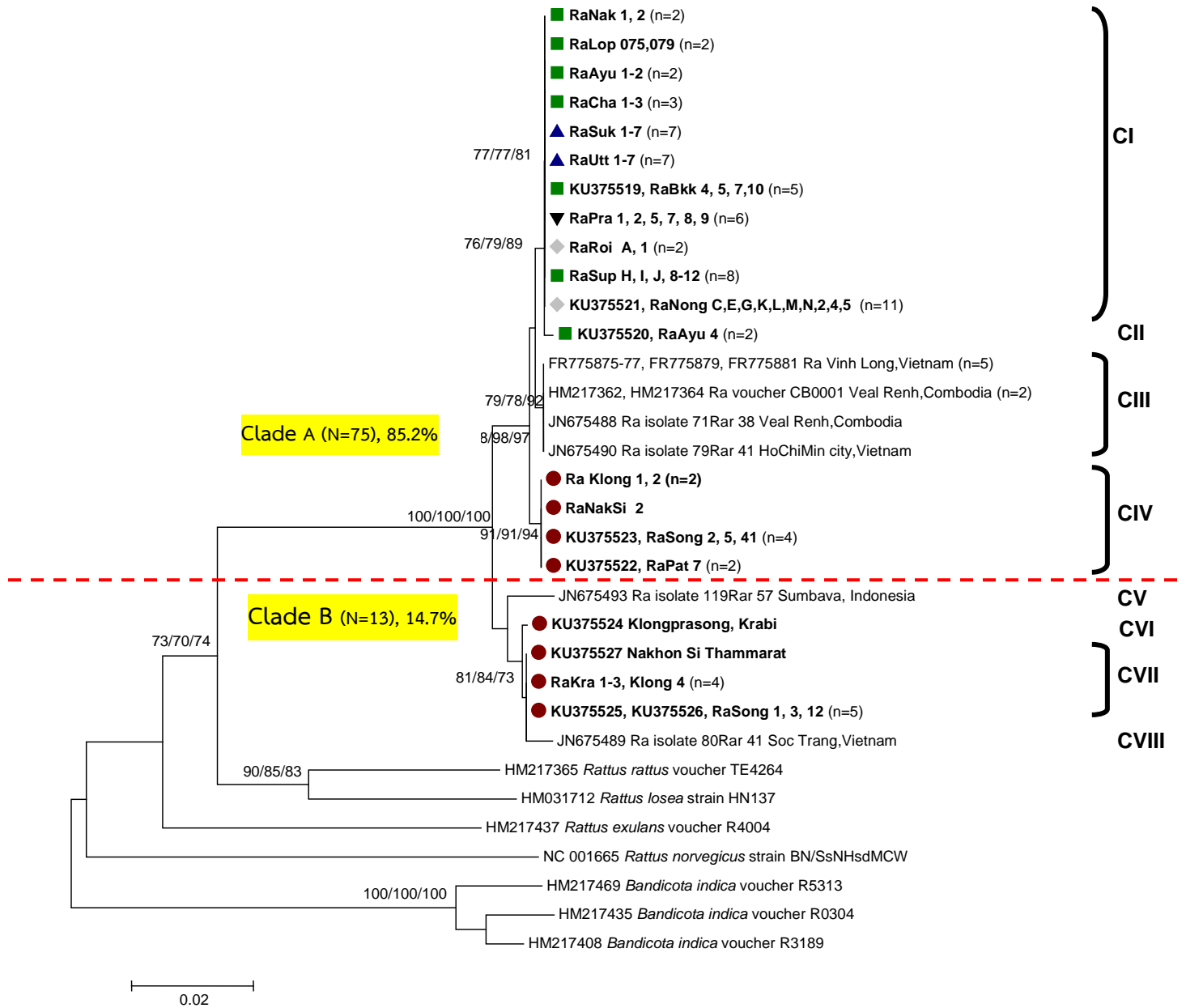


Figure 2 Phylogenetic tree of *cytb* sequences (740 bp) of *R. argentiventer* and depicting the genetic relatedness of the *Rattus* species. Bootstrap support 1,000 replicated are given above or below the branches and reconstructed following 3 different methods NJ/ML/MP respectively. The Neighbour joining (NJ) method reconstruction with the Kimura two parameter (K2P) substitution model, the model for Maximum likelihood (ML) method using Model test was GTR+I+G model and Maximum parsimony (MP) method perform using heuristic search with tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping, and mulpars options were selected. The tree has been rooted using *B. indica*

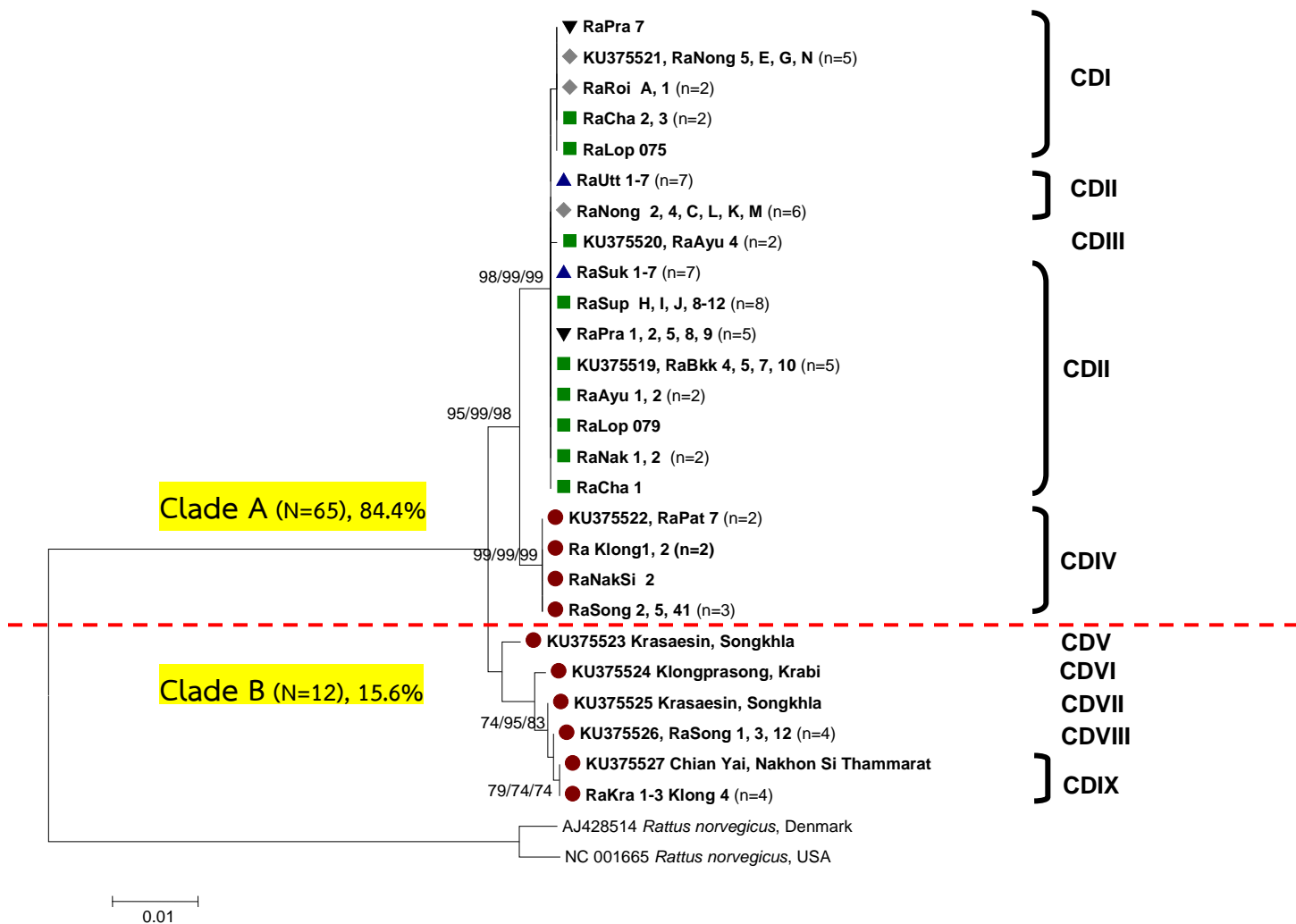


Figure 3 Phylogenetic tree of *cytb* + D-loop sequences (1,300 bp) of *R. argentiventer* and depicting the genetic relatedness of the *Rattus* species. Bootstrap support 1,000 replicated are given above or below the branches and reconstructed following 3 different methods NJ/ML/MP respectively. The Neighbour joining (NJ) method reconstruction with the Kimura two parameter (K2P) substitution model, the model for Maximum likelihood (ML) method using Model test was GTR+I+G model and Maximum parsimony (MP) method perform using heuristic search with tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping, and mulpars options were selected. The tree has been rooted using *R. norvegicus*

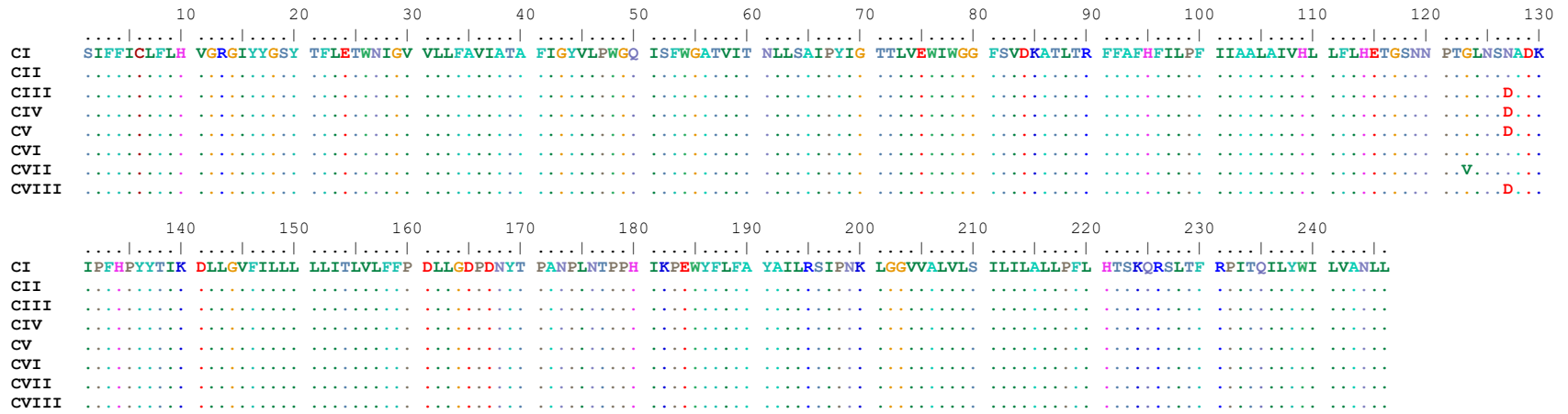


Figure 4 The amino acid based on FR775875 *R. argentiventer*, mitochondrial cytochrome b gene. Dots indicate amino acid identical to the CI haplotype of *R. argentiventer*.

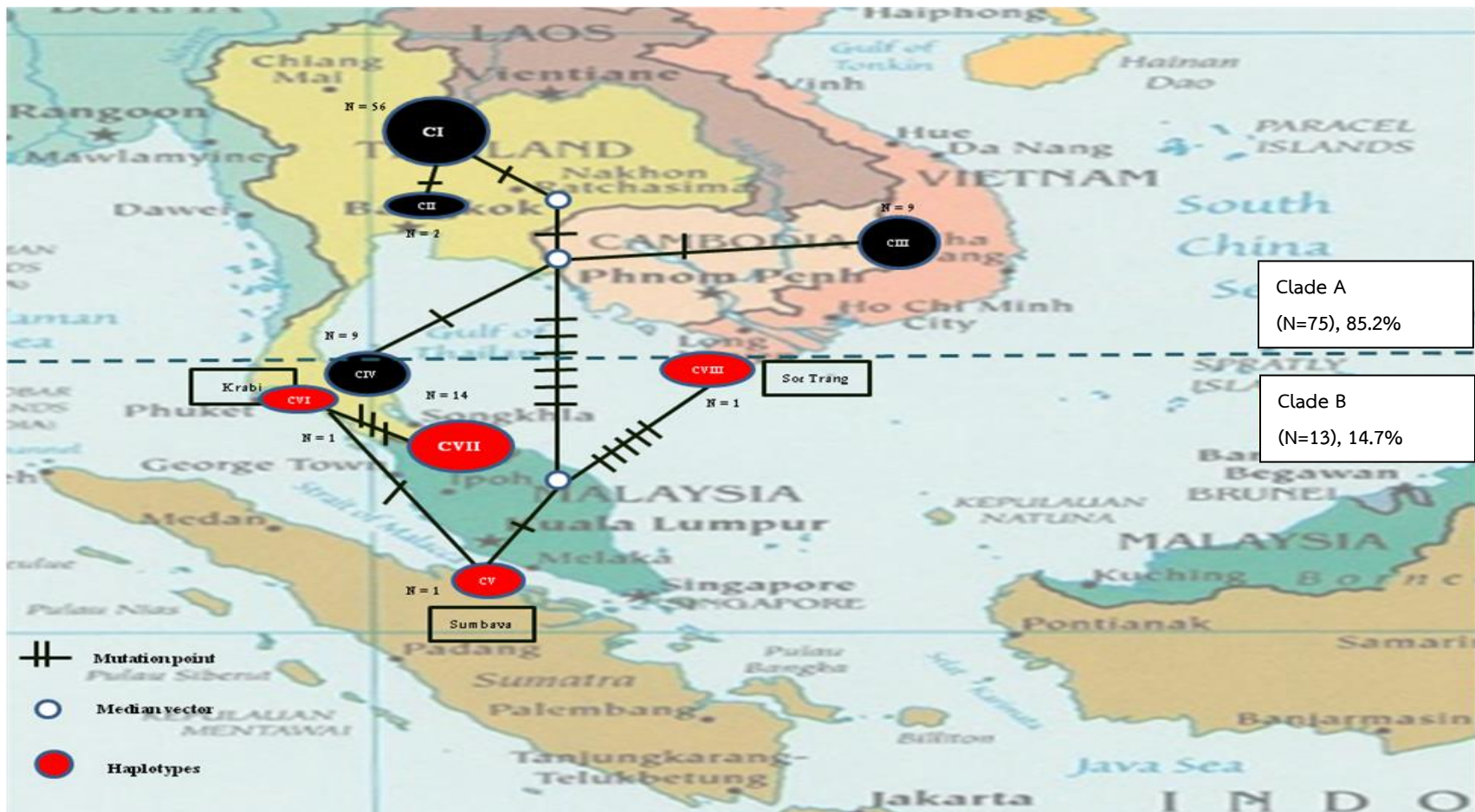


Figure 5 Haplotype network based on partial cytochrome *b* region (740 bp) reconstructed by Median-joining analysis (NETWORK 4.6.1.3 program). All haplotypes were plotted on to their sampling areas and haplotypes were represented by circles with diameter proportional to their population size.