

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

- 1. ขุดโครงการวิจัย** : แผนงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- 2. โครงการวิจัย** : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย
- 3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ความหลากหลายชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Muridae) ที่พบในประเทศไทย
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Diversity and genetic relationships of mice group in the genus *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) in Thailand.
- 4. คณะผู้ดำเนินงาน**
หัวหน้าการทดลอง : วิชาญ วรธนะไกวล์ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน : ปราสาททอง พรหมเกิด สมเกียรติ กล้าแข็ง และ ทรงทัต แก้วตา กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- 5. บทคัดย่อ** : การศึกษาความหลากหลายชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) ที่พบในประเทศไทย ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 ได้ดำเนินการดักหนูหริ่งศัตรูพืชจำนวน 110 ตัวอย่าง จากพื้นที่ทำการเกษตร 11 แห่ง (10 จังหวัด) 4 ภูมิภาคของประเทศไทย ผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา โดยการวัดลักษณะขนาดรูปร่างภายนอก และการวัดลักษณะกะโหลก ร่วมกับการศึกษาทางชีวโมเลกุล บริเวณยีนไซโทโครม บี โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน สามารถจำแนกชนิดหนูหริ่งศัตรูพืช ได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ หนูหริ่งนาหางสั้น (Fawn-colored mouse; *Mus cervicolor*) 50 ตัวอย่าง, หนูหริ่งใหญ่ (Cook's mouse; *Mus cookii*) 12 ตัวอย่าง, หนูหริ่งนาหางยาว (Ryukyu mouse; *Mus caroli*) 42 ตัวอย่าง และ หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน (Shortridge's shrewmouse; *Mus pahari*) 6 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยของลักษณะขนาด รูปร่าง ภายนอก 5 ลักษณะ และค่าเฉลี่ยของลักษณะกะโหลก 21 ลักษณะ ในแต่ละสปีชีส์นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ ส่วนผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ ความหลากหลายของ haplotypes ความหลากหลายของลำดับเบส และ ผลการทดสอบสมมุติประชากร ทั้ง 4 พารามิเตอร์ ได้แก่ Tajima's D, Fu's Fs, Fu and Li's D และ Fu and Li's F บ่งชี้ว่าหนูหริ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ที่สูง และกลุ่มประชากรหนูหริ่งนั้นมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้น

Abstract : The study of diversity and genetic relationships of mice group in the genus *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) in Thailand was conducted during October 2016 to September 2019. We collected 110 of *Mus* spp. samples in 11 agricultural areas (10 provinces) obtain from 4 regions of Thailand. The morphological identification based on the external characters and cranial character measurements combined with molecular characteristics using cytochrome *b* region by phylogenetic analysis, nucleotide differentiation, nucleotide identity, genetic distance and amino acid translation can divided into 4 species such as Fawn-colored mouse (*Mus cervicolor*) 50 samples, Cook's mouse (*Mus cookii*) 12 samples, Ryukyu mouse (*Mus caroli*) 42 samples and Shortridge's shrewmouse (*Mus pahari*) 6 samples. The measurements of the average number of 5 external characters and 21 cranial characters in each species, no statistical differences when separated in each characters. The result of genetic diversity test (haplotype diversity and nucleotide diversity) and the neutrality test such as Tajima's *D*, Fu's *F_s*, Fu and Li's *D* and Fu and Li's *F* indicated that haplotype and nucleotide diversity were very high and possible population expansion in the *Mus* species in this study.

6. คำนำ: หนูเป็นศัตรูสำคัญในกระบวนการผลิตพืช-สัตว์และทางการแพทย์ในประเทศไทย หนูสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ตั้งแต่ระยะปลูก ตลอดจนหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ถั่วเหลือง โกโก้ ปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ความเสียหายที่เกิดขึ้นคิดเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี นอกจากการทำลายพืชทางการเกษตรแล้ว หนูยังเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์ และสัตว์เลี้ยง เช่น กาฬโรค โรคเลปโตสไปโรซิสหรือโรคไขข้อหนู เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยา นิเวศวิทยาและอนุกรมวิธานของหนูเพื่อศึกษาเรียนรู้พฤติกรรมของมันเพื่อนำไปสู่การป้องกันและกำจัด

โดยทั่วไปสัตว์ในวงศ์ Muridae จะมีรูปร่างแบบหนู คือ รูปร่างทรงกระบอกและด้านหัว มีทรงแหลม มีสี่ขาหางยาว สูตรของฟันโดยทั่วไป คือ 1/1, 0/0, 0/0, 3/3 = 16 สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในวงศ์นี้ มีจำนวนชนิดที่มากที่สุดในโลกคิดเป็นร้อยละ 65 ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในอันดับสัตว์ ฟันแทะทั้งหมด สำหรับในประเทศไทยหนูในวงศ์ Muridae จัดแบ่งตาม Lekagul and Jeffery (1997)

ลักษณะที่ใช้จำแนกชนิดของหนูที่ใช้กันทั่วไป คือ ลักษณะภายนอก (external characters) เช่น ขนาดน้ำหนัก ลักษณะของขน สี จำนวนเต้านม (เพศเมีย) และอื่นๆ ซึ่งลักษณะเหล่านี้ต้องดูจากหนูที่โตเต็มวัยแล้ว เมื่อนำเอาลักษณะต่างๆมาประกอบกันทำให้สามารถจำแนกจำแนกหนูได้ถึงระดับสกุล (genus) หรือชนิด (species) ส่วนการจำแนกชนิดของหนูที่มีลักษณะใกล้เคียงกันในสกุลเดียวกัน สามารถทำได้ยาก เช่น หนูในสกุล *Rattus* ต้องอาศัย

ลักษณะอื่นๆประกอบ เช่น สันฐานวิทยาของกะโหลกศีรษะ ลักษณะและขนาดของฟันแทะและฟันกราม เป็นต้น (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

หนูหริ่งสกุล *Mus* เป็นหนูที่มีขนาดเล็กที่สุด น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 8-20 กรัม ลักษณะเด่นที่สุดของหนูสกุลนี้คือ ความยาวฟันกรามซี่แรกด้านบน M1 ยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของฟันกรามทั้งแถว (molar row) ในประเทศไทยพบเป็นศัตรูสำคัญของข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ถั่วเขียว ถั่วเหลืองและข้าวโพด เป็นศัตรูสำคัญของการผลิตธัญพืชต่างๆ หนูสกุลนี้ขึ้นลำตัวด้านหลังสีเทา ด้านท้องสีขาว หางมี 2 สี ขูดรูอาศัยตามคันนาหรือในแปลงปลูกพืชที่แห้งและมีหญ้ารก ในหน้าแล้งจะอาศัยอยู่ตามรอยแยกแฉกแฉกระแหงของดิน เพศเมียมีเต้านม 3 คู่ที่อก และ 2 คู่ที่ท้อง ในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ

1. หนูหริ่งนาหางยาว (*Ryukyu mouse : Mus caroli* Bonhote, 1902) พบในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและภาคตะวันออก ฟันแทะคู่บนจะตั้งฉากกับ palate สีผิวด้านหน้าของฟันแทะคู่บนมีสีแทนหรือน้ำตาลเข้มมากกว่าหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ส่วนฟันแทะคู่ล่างมีสีขาว จมูกสั้น จึงทำให้ส่วนหน้าหู หางยาวกว่า ความยาวหัวและลำตัวรวมกันและมี 2 สีชัดเจน คือด้านบนของหางมีสีดำ ด้านล่างมีสีขาว ตีนหลังใหญ่และมีสีเทา ปีนป่ายดีกว่าหนูหริ่งนาหางสั้น (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

2. หนูหริ่งนาหางสั้น (*Fawn-colored mouse : Mus cervicolor* Hodgson, 1845) เขตแพร่กระจายลักษณะต่างๆ คล้ายกับหนูหริ่งนาหางยาว ตัวมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย ฟันแทะคู่บนจะโค้งงอเข้าด้านในและไม่ตั้งฉากกับ palate สีผิวด้านหน้าของฟันแทะคล้ายหนูหริ่งนาหางยาวแต่สีอ่อนกว่ามาก จมูกยาวกว่าทำให้ส่วนหน้าหูแหลม ตีนหลังขาว หางมี 2 สี แต่อ่อนกว่าของหนูหริ่งนาหางยาวและหางสั้นกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

เนื่องจากมียังมีความเข้าใจที่ไม่ตรงกันว่า ในประเทศไทยนั้นพบหนูหริ่งบ้าน (*M. musculus*) หรือไม่ ซึ่งบางแหล่งข้อมูลรายงานว่าพบในประเทศไทย แต่บางแหล่งข้อมูลรวมถึงทางกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรฯ ไม่เคยพบว่ามีในประเทศไทย อีกทั้งในปัจจุบันสภาพแหล่งที่อยู่อาศัยของหนูหริ่งศัตรูพืชตามธรรมชาติหรือในแหล่งทำการเกษตร อาทิเช่น ไร่ข้าวโพด, แปลงถั่วเหลืองและโรงเก็บธัญพืช นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนย้ายของกลุ่มประชากรไม่ว่าจะเป็นการเคลื่อนย้ายแหล่งที่อยู่ของหนูหริ่งเองตามธรรมชาติ หรือเคลื่อนย้ายโดยติดไปกับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร อาทิเช่น เรือบรรทุกสินค้าหรือรถบรรทุกสินค้า เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยที่ทำให้หนูหริ่งสามารถเคลื่อนย้ายไปยังแหล่งที่อยู่อาศัยใหม่ ทำให้ข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งที่พบหนูหริ่งศัตรูพืช ตามธรรมชาตินั้นต้องเปลี่ยนแปลงตามสภาพในปัจจุบันด้วยเพื่อนำไปสู่การป้องกันและกำจัดที่เหมาะสมต่อไป

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการศึกษากายวิภาคของหนูหริ่งศัตรูพืชในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย โดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม (molecular characteristic) ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular technique) ควบคู่ไปกับลักษณะทางสันฐานวิทยา (morphology characteristic) เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลาย ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งที่พบในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย ทำให้ทราบถึงชนิดของหนูหริ่งศัตรูพืชที่พบในประเทศไทย เพื่อเป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานด้านอนุกรมวิธานของหนูหริ่งศัตรูพืช อันจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ใน

การป้องกันกำจัดหนูหริ่งที่สร้างความเสียหายให้แก่ผลิตภัณฑ์ธัญพืชต่างๆรวมถึงนาข้าวและพืชผลทางการเกษตรอื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งเพื่อเป็นการพัฒนาฐานข้อมูลด้านอนุกรมวิธานสำหรับงานวิจัยต่อยอดในด้านอื่นๆต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สารเคมี; ethyl alcohol, ether, ชุด kit สกัดดีเอ็นเอ, hot start taq DNA polymerase, ชุด kit purification gel electrophoresis, TAE/TBE buffer, agarose gel, สีย้อม nucleic acid (gel star)
- สัตว์ทดลอง; หนูหริ่งศัตรูพืชจากธรรมชาติ
- วัสดุและอุปกรณ์; เวอร์เนีย คาลิเปอร์ (vernier caliper), slides + coverglass, เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge), หลอดปั่นขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร, ตู้เย็น, กรรไกรและชุดเครื่องมือผ่าตัด, เครื่องชั่งสาร, beaker, pipette, sterile tips, eppendorf tube (1.5 ml), gel electrophoresis, ชุดถ่ายรูป gel document, กรงคักหนู ขนาด 13 x 22 x 13 ซม. และกรงเลี้ยงหนูสแตนเลส ขนาด 40 x 26 x 15 ซม.

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (sampling)

ดักจับหนูหริ่งในธรรมชาติ ด้วยการใช้กรงดักชนิดจับเป็น จากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย เพื่อเป็นตัวแทนของหนูหริ่งศัตรูพืชที่พบในประเทศไทย

2. การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

นำตัวอย่างหนูหริ่งที่ดักได้จากธรรมชาติ มาวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

2.1 การวัดขนาด รูปร่างภายนอก (external characters)

ทำการบันทึกลักษณะของขน สีขน ชั่งน้ำหนัก หน่วยเป็นกรัม (grams) และวัดลักษณะภายนอกของตัวอย่างหนูหริ่งที่ดักได้ หน่วยเป็นมิลลิเมตร (millimeter) ตามวิธีการของ Aplin *et al.* (2003) ดังนี้

2.1.1 ความยาวของหัวและลำตัว (head and body length; HB) โดยวัดจากปลายจมูกถึงรูทวาร

2.1.2 ความยาวของหาง (tail length; T) โดยวัดจากรูทวารถึงปลายหาง

2.1.3 ความยาวของตีนหลัง (hind foot length; HF) โดยวัดจากปลายนิ้วที่ยาวที่สุดจนถึงสันของตีนหลัง

2.1.4 ความยาวของหู (ear length; E) โดยทำการวัด จากโคนหูจนถึงปลายของใบหู

2.2 การวัดลักษณะกะโหลก (cranial measurements)

ตัดส่วนหัวของหนูหริ่ง ลอกส่วนหนังและเนื้อออก หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดจนได้ชิ้นกะโหลกที่ไม่มีส่วนของเนื้อติดอยู่ หลังจากนั้นทำการวัดลักษณะของกะโหลก 21 ลักษณะ โดยใช้เวอร์เนีย คาลิเปอร์ (vernier caliper) ตามวิธีการของ Musser, (1979) และ Harrison & Bates, (1991) โดยมีหน่วยวัดเป็นมิลลิเมตร ดังนี้ Greatest skull length (GSL), Occipital nasal length (ONL), Condylbasal length (CBL), Zygomatic

breadth (ZB), Interorbital breadth (IB), Length of rostrum (LB), Breadth of rostrum (BR), Breadth of braincase (BB), Height of braincase (HBC), Breadth of zygomatic plate (BZB), Length of nasals (LN), Length of diastema (LD), Length of incisive foramina (LIF), Palatal length (PL), Post palatal length (PPL), Breadth of bony palate at first molars (BBPM¹), Breadth of bony palate at third molars (BBPM³), Length of bullae (LB), Length of maxillary toothrow (ALM¹-M³), Length of mandible (LM) และ Length of mandible toothrow (ALM₁-M₃)

3. การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (molecular characteristics)

3.1 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

3.2 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR)

ใช้ไพรเมอร์ (primers) จำนวน 1 คู่ บริเวณยีนไซโตโครมบี ในไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ (cytochrome *b* gene) คือ Mus cytb F seq; 5'- CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GG-3' และ Mus cytb R; 5'- GGT TGG CCT CCG ATT CAG GTT A-3' เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวม 20 ul ประกอบด้วยดีเอ็นเอหนูหรือหริ่ง 2 ul ผสมกับ 10x PCR buffer, 10mM dNTPs, เอนไซม์ hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพรเมอร์ ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 20 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุม อุณหภูมิ (thermal cycler) ภายใต้อุณหภูมิ pre denature 98 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่ม ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ denature 98 °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 ตรวจสอบ ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย 1.5 % อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

3.3 การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.5% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส และตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ที่มี ขนาดของแถบดีเอ็นเอขนาดตรงกับที่คำนวณไว้ หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel elution kit (GeneMark, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และส่งดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ First BASE laboratories ประเทศมาเลเซีย

3.4 การวิเคราะห์ผล (data analysis)

ตรวจสอบความถูกต้อง และตัดลำดับเบสที่ไม่ชัดเจนหรือมีสัญญาณรบกวนออก จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) จัดเรียง วิเคราะห์ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 (Hall, 1999) รวบรวมแต่ละ contig เป็นสายเดี่ยว

3.4.1 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

วิเคราะห์ความหลากหลายและสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP) และ maximum likelihood (ML) โดยใช้หนูสกุลทองขาว (*Rattus*) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) การสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี neighbor-joining (NJ; Saitou and Nei, 1987) นั้นถูกสร้างจากการวิเคราะห์ข้อมูลคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างลำดับเบสของหนูแต่ละคู่ ด้วยแบบจำลอง kimura 2-parameter distance models (Kimura, 1980) วิธี Maximum parsimony (MP; Fitch, 1971) ทำ branch swapping โดยใช้ subtree-pruning-regrafting (SPR) method (Hein *et al.*, 1996) ในขณะที่วิธี Maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981) หา best fit model และวิเคราะห์ด้วยสมการแบบ TN93+G+I (Tamura - Nei model; GTR, Gamma distributed และ Invariant site (G+I)) ซึ่งทั้ง 3 แผนภูมิต้นไม้ดังกล่าวนี้ วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 software (Kumar *et al.*, 2016) ทำการวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 รอบ โดยค่าทางสถิติที่ได้จะถูกนำมาแสดงเพื่อเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของแผนภูมิ

3.4.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส

นำลำดับเบสที่ได้มาหลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0

3.4.3 การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบสและระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ค่าร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส (nucleotide identity) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 และวิเคราะห์หาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยการวิเคราะห์แบบ pairwise distance โดยที่ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม คือ ค่าที่คำนวณความแตกต่างกันระหว่างลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่นำมาศึกษา โดยใช้ข้อมูลการแทนที่เบสที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่นำมาศึกษา โดยกระทำภายใต้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม ซึ่งแบบจำลองที่นำมาใช้นั้น เพื่อป้องกันการประเมินจำนวนการแทนที่เบสน้อยกว่าความเป็นจริง (Nei and Kumur, 2000) โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 software

3.4.4 การวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

โดยการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายของลำดับเบส (nucleotide diversity, Pi) (Tajima, 1983) และค่าความหลากหลายของ haplotypes (haplotypes diversity, Hd) (Nei, 1987) 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

3.4.5 การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน

นำลำดับเบสบริเวณไซโตโครม b ที่ได้มาหลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0

3.4.6 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial *cyt b* haplotypes

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

3.4.7 การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากร และการทดสอบสมดุลประชากร

วิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากร (population history) และการทดสอบสมดุลประชากร (neutrality test) โดยใช้ การทดสอบ 4 วิธี ได้แก่ Tajima D (Tajima, 1989), Fu's F_s (Fu, 1997), Fu and Li's D (Fu and Li 1993) และ Fu and Li's F (Fu and Li 1993) ทดสอบค่าทางสถิติด้วย permutation 1,000 ครั้ง คำนวณและหาค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้โปรแกรม DnaSP v.5

เวลา และสถานที่

ทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือนตุลาคม 2559 - กันยายน 2562 ภายในกลุ่มงานสัตววิทยา การเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร และพื้นที่ทำการเกษตร 11 แห่ง (10 จังหวัด) 4 ภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ 3 จังหวัด (น่าน, เชียงใหม่ และ เชียงราย) ภาคกลาง 3 จังหวัด (นครสวรรค์, เพชรบูรณ์ และนครนายก) ภาคตะวันตก 2 จังหวัด (เพชรบุรี และ กาญจนบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 จังหวัด (บุรีรัมย์ และนครราชสีมา)

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การเก็บตัวอย่าง

หนูหริ่งศัตรูพืชที่นำมาใช้ในการศึกษาค้างนี้ ทั้งหมด 110 ตัวอย่าง จากพื้นที่ทำการเกษตร 11 แห่ง (10 จังหวัด) 4 ภูมิภาคของประเทศไทย (table 1)

8.2 การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา

8.2.1 การวัดขนาด รูปร่างภายนอก

ผลการวัดลักษณะภายนอกของตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืช ทั้ง 5 ลักษณะ (figure 1) ได้แก่ ความยาวของหัวและลำตัว (HB) ความยาวของหาง (T) ความยาวของตีนหลัง (HF) ความยาวของหู (E) และทำการชั่งน้ำหนัก (weight) พบว่าตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชที่ดักมาได้ทั้งหมด 110 ตัวอย่าง นั้น สามารถจำแนกชนิดหนูหริ่งศัตรูพืช ได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ หนูหริ่งนาหางสั้น (Fawn-colored mouse; *M. cervicolor*) จำนวน 50 ตัวอย่าง, หนูหริ่งใหญ่ (Cook's mouse; *M. cookii*) จำนวน 12 ตัวอย่าง, หนูหริ่งนาหางยาว (Ryukyu mouse; *M. caroli*) จำนวน 42 ตัวอย่าง และหนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น (Shortridge's shrewmouse; *M. pahari*) จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยที่หนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น มีขนาดลำตัวใหญ่และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวมากที่สุด รองลงมาคือ หนูหริ่งใหญ่ และ หนูหริ่งนาหางสั้น ในขณะที่หนูหริ่งนาหางยาวมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวน้อยที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวอยู่ที่ 27, 19.61, 16.83 และ 12.24 กรัม ตามลำดับ ซึ่งหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น หนูหริ่งใหญ่ และ หนูหริ่งนาหางสั้น นั้นมีความยาวของส่วนหัวและลำตัวสั้นกว่าความยาวของหาง โดยมีหนูหริ่งนาหางยาวเพียงสปีชีส์เดียวเท่านั้น ที่มีความยาวหางมากกว่าความยาวของส่วนหัวและลำตัว ซึ่งมีค่าร้อยละของความยาวหางต่อหัวและลำตัว (Tail/HB %) เท่ากับ 86.40%, 84.31%, 76.85% และ 107.47% ตามลำดับ ขณะเดียวกันพบว่า หนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น มีค่าเฉลี่ยความยาวของหูมากที่สุด รองลงมาคือ หนูหริ่งใหญ่ และ หนูหริ่งนาหางสั้น ในขณะที่ หนูหริ่งนาหางยาวมีค่าเฉลี่ยความยาวหูน้อยที่สุด เช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว โดยมีค่าเฉลี่ยความยาวหู เท่ากับ 16.8, 13.64, 13.14 และ 12.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในส่วนค่าเฉลี่ยความยาวของตีนหลังนั้น พบว่า หนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น มีค่าเฉลี่ยความยาวของตีนหลังมากที่สุด รองลงมาคือ หนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาหางยาว และหนูหริ่งนาหางสั้น โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 20.8, 16.64, 16.18 และ 15.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ (table 2) และเมื่อนำลักษณะทาง

สัณฐานวิทยาภายนอกทุกลักษณะที่นำมาใช้วิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 ผลที่ได้พบว่า ค่าเฉลี่ยของลักษณะภายนอกของหนูหริ่งศัตรูพืช ทั้ง 5 ลักษณะ ในแต่ละสปีชีส์นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ ดังนั้นการจำแนกชนิดของหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ในการศึกษาครั้งนี้ จากลักษณะภายนอกนั้น จำเป็นต้องอาศัยลักษณะต่างๆ ร่วมกันเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดดังนี้

- หนูหริ่งนาหางสั้น; หางสั้นกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน หางมี 2 สี ด้านบนสีดำ ในขณะที่ด้านล่างมีสีขาว แต่ไม่ชัดเจนเท่าหนูหริ่งนาหางยาว ฟันแทะคู่บนจะโค้งงอเข้าด้านในและไม่ตั้งฉากกับเพดานปาก (palate) ส่วนหน้าแหลม ตีนหลังขาว (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

- หนูหริ่งใหญ่; หางสั้นกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน หางมี 2 สี ด้านบนสีน้ำตาล ในขณะที่ด้านล่างมีสีน้ำตาลที่อ่อนกว่า ขนด้านหลังเป็นสีเทาเข้ม ส่วนด้านท้องเป็นสีเทาอ่อน และมีขนแข็งที่หลัง (stiff fur) (Bibi *et al.*, 2019)

- หนูหริ่งนาหางยาว; หางยาวกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน หางมี 2 สีชัดเจน ด้านบนสีดำ ในขณะที่ด้านล่างมีสีขาว ฟันแทะคู่บนมีสีน้ำตาลเข้มกว่าหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ฟันแทะคู่ล่างมีสีขาว จมูกสั้นจึงทำให้ส่วนหน้าทู่ ตีนหลังใหญ่และมีสีเทา (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

- หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน; หางสั้นกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน ส่วนลำตัว หู และตีนหลัง มีขนาดใหญ่กว่าหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ขนด้านหลังเป็นสีดำ ส่วนด้านท้องเป็นสีเทา

8.2.2 การวัดลักษณะกะโหลก

ผลการวัดลักษณะกะโหลก จำนวน 21 ลักษณะ (figure 2) ตามวิธีการของ Musser (1979) และ Harrison & Bates (1991) กับตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 110 ตัวอย่าง พบว่าหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยของลักษณะกะโหลก ที่มีค่ามากที่สุดใหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 15 ลักษณะ (GSL, ONL, CBL, ZB, IB, LR, BR, BB, BZP, LN, LD, PL, PPL, BBPM³ และ ML) ในขณะที่ หนูหริ่งใหญ่ มีค่าเฉลี่ยของ HBC และหนูหริ่งนาหางสั้น มีค่าเฉลี่ยของ LIF, BBPM¹, LB, ALM¹-M³ และ ALM¹-M³ มากที่สุดในหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ ในการศึกษาครั้งนี้ ขณะเดียวกันหนูหริ่งนาหางยาว มีค่าเฉลี่ยของลักษณะกะโหลก ที่มีค่าน้อยที่สุดในหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 18 ลักษณะ (GSL, ONL, IB, LR, BR, BB, HBC, BZP, LN, LD, LIF, PL, PPL, BBPM¹, BBPM³, ALM¹-M³, ML และ ALM¹-M³) โดยที่ หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยของ LB และหนูหริ่งนาหางสั้น มีค่าเฉลี่ยของ CBL และ ZB น้อยที่สุดในหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ (table 3) และเมื่อนำลักษณะกะโหลกทุกลักษณะที่นำมาใช้วิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 ผลที่ได้พบว่า ค่าเฉลี่ยของกะโหลกทุกลักษณะ ในแต่ละสปีชีส์นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ เช่นเดียวกับผลการวัดขนาดรูปร่างภายนอก

8.3 การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล

การศึกษาครั้งนี้ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของหนูหริ่งศัตรูพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในบริเวณยีนไซโตโครมบี จำนวน 1 คู่ (Mus cytb F seq / Mus cytb R) จากผลการทดลองพบว่า หนูหริ่งศัตรูพืชจะให้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 800 คู่เบส (bp) ซึ่งผลที่ได้นั้นเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ในขั้นตอนออกแบบไพรเมอร์ (figure 3) หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่างเพื่อหาลำดับเบสตามขั้นตอนในข้อ 3.2 -3.3 และนำผลลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล ดังนี้

8.3.1 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน ไซโตโครมบี ความยาว 500 คู่เบส ของสกุลหนูหริ่ง 130 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชในประเทศไทยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 110 ตัวอย่าง เป็นลำดับเบสจากฐานข้อมูล GenBank 20 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับเบสของสกุลหนูท้องขาว (*Rattus*) ในฐานข้อมูล GenBank 5 ตัวอย่าง เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (out group) รวมลำดับเบสที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ จำนวน 135 ตัวอย่าง โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ NJ/MP/ML พบว่า ทั้งสามวิธีให้ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบเดียวกัน และสามารถแบ่งกลุ่มหนูหริ่ง ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (clades) ประกอบด้วย Clade A (หนูหริ่งนาทางสั้น; *M. cervicolor*, หนูหริ่งใหญ่; *M. cookie* และ หนูหริ่งนาทางยาว; *M. caroli*) Clade B (หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน; *M. pahari*) และ Clade C (หนูหริ่งบ้าน; *M. musculus*, Macedonian mouse; *M. macedonicus* และ Steppe mouse; *M. spicilegus*) (fig 4)

Clade A สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย (sub clade) ได้แก่ AI และ AII ซึ่งหนูหริ่งในกลุ่มนี้เป็น monophyletic ทั้ง 2 กลุ่มย่อย สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ไม่มีสมาชิกของหนูหริ่งในสปีชีส์อื่นเข้ามาปะปนและ interior branch ระหว่างสปีชีส์ให้ค่าผลการทดสอบ bootstrap ที่มีค่าสูง โดยกลุ่มย่อย AI ประกอบไปด้วยสมาชิก 2 กลุ่ม คือ AI/I; กลุ่มหนูหริ่งนาทางสั้น มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด 50 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกตะไคร้ จ. กาญจนบุรี (15 ตัว) นาข้าว จ. นครนายก และเพชรบูรณ์ (1 และ 5 ตัว) แปลงอ้อย จ. บุรีรัมย์ (8 ตัว) แปลงถั่วลิสง จ. เพชรบุรี (9 ตัว) แปลงถั่วเหลือง จ. นครสวรรค์ (12 ตัว) คิดเป็นร้อยละ 46 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 27 haplotypes (Hap 1-27) และ AI/II; กลุ่มหนูหริ่งใหญ่ มีจำนวนสมาชิก 12 ตัวอย่าง จากนาข้าว จ. น่าน และเพชรบูรณ์ (2 และ 1 ตัว) และแปลงมะคาเดเมีย จ. เพชรบูรณ์ (9 ตัว) คิดเป็นร้อยละ 11 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 6 haplotypes (Hap 28-33) ส่วนกลุ่มย่อย AII นั้น มีสมาชิกเพียงสปีชีส์เดียว คือกลุ่มหนูหริ่งนาทางยาว จำนวน 42 ตัวอย่าง จากนาข้าว จ. เชียงราย, นครนายก, เพชรบูรณ์ และนครราชสีมา (4, 6, 2 และ 10 ตัว ตามลำดับ) แปลงอ้อย จ. บุรีรัมย์ (5 ตัว) แปลงถั่วเหลือง จ. นครสวรรค์ (13 ตัว) และแปลงมะคาเดเมีย จ. เพชรบูรณ์ (2 ตัว) คิดเป็นร้อยละ 38 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 22 haplotypes (Hap 34-55)

ขณะที่ Clade B เป็นกลุ่มของหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีจำนวนสมาชิก 6 ตัวอย่าง จากแปลงมะคาเดเมีย จ. เพชรบูรณ์ ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 5 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 6 haplotypes

(Hap 56-61) จากผลการศึกษาเป็นที่น่าสังเกตว่าหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีที่อยู่อาศัยที่ค่อนข้างจำกัด และไม่แพร่กระจายไปตามภูมิภาคต่างๆ ในประเทศไทย โดยสามารถพบได้เฉพาะในแปลงปลูกมะคาเดเมีย ที่ อ. เขาค้อ จ. เพชรบูรณ์ เท่านั้น ต่างกับหนูหริ่งศัตรูพืชอีก 3 สปีชีส์ ที่พบว่าสามารถพบได้ตามภูมิภาคต่างๆ ยกเว้นทางภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสำรวจและดักหนูหริ่งในนาข้าวที่ จ. สงขลา และ จ. พัทลุง รวมถึงสวนปาล์มน้ำมันที่ อ.ปะทิว และ อ.สวี จ. ชุมพร ผลปรากฏว่าไม่พบหนูหริ่งศัตรูพืชในพื้นที่เกษตรและสภาพตามธรรมชาติของทั้ง 3 จังหวัด ดังกล่าว

ส่วน Clade C นั้น เป็นกลุ่มหนูหริ่งบ้าน, Macedonian mouse และ Steppe mouse จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งหนูทั้ง 3 กลุ่มนี้ไม่พบในประเทศไทยจากการศึกษาในครั้งนี้ โดยในกลุ่มของ Macedonian mouse และ Steppe mouse นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Krystufek & Vohralik (2016) และ Coroiu *et al.* (2016) ที่ได้รายงานไว้ว่า Macedonian mouse พบได้ในประเทศตุรกี อิรัก อิหร่าน และจอร์แดน ส่วน Steppe mouse นั้น พบได้ในทวีปยุโรปแถบประเทศ ยูเครน โรมาเนีย และฮังการี เป็นต้น ในขณะที่การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบหนูหริ่งบ้านตามพื้นที่เกษตรและสภาพตามธรรมชาติในประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานที่ผ่านมาของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร (2544) แต่ขัดแย้งกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Musser & Carleton (2005) ที่ได้รายงานไว้ว่าสามารถพบแพร่กระจายได้ตามทวีปต่างๆทั่วโลก

8.3.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส

จากความยาวของลำดับเบสที่ทำการศึกษา 500 คู่เบส เปรียบเทียบตำแหน่งกับลำดับเบสของหนูหริ่งนาทางสั้น Accession number; AY057811 *M. cervicolor* *cytb* gene, complete cds ตรงกับตำแหน่งที่ 450 - 950 bp พบความแตกต่างของลำดับเบส 79 ตำแหน่ง สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มหนูหริ่งนาทางสั้น หนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาทางยาว และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน และสามารถแบ่งได้เป็น 61 haplotypes โดยพบว่า ลำดับเบส 3 ตำแหน่ง ได้แก่ตำแหน่งที่ 481 (T; thymine), 511 (C; cytosine) และ 523 (T; thymine) สามารถแยกหนูหริ่งใหญ่ออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นได้ ขณะเดียวกันลำดับเบสในตำแหน่งที่ 456 (A; adenine), 475 (T; thymine), 478 (T; thymine), 514 (T; thymine) และ 569 (A; adenine) นั้นสามารถแยกหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน ออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นได้ ส่วนหนูหริ่งนาทางสั้นและหนูหริ่งนาทางยาวนั้น ลำดับเบสในตำแหน่งที่ 463 (C; cytosine) และ 472 (T; thymine) สามารถแยกความแตกต่างของหนูหริ่งทั้ง 2 ชนิดนี้ ออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นได้ ตามลำดับ

8.3.3 การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบสและระยะห่างทางพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส (nucleotide identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) จากลำดับเบสบริเวณยีนไซโตโครมบี ความยาว 500 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบส 79 ตำแหน่ง และมีทั้งหมด 61 haplotypes พบว่าหนูหริ่งนาทางสั้น (50 ตัวอย่าง) มี 27 haplotypes (Hap 1-27) มีค่าร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 96-99 และระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.002 - 0.04 (table 4A) หนูหริ่งนาทางยาว (42 ตัวอย่าง) มี 22 haplotypes (Hap 34-55) มีค่าร้อยละ

ความเหมือนกันของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 95-99 และระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.002 – 0.05 (table 4B) ส่วนหนูหริ่งใหญ่ (12 ตัวอย่าง) มี 6 haplotypes (Hap 28-33) มีค่าร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 98-99 และระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.002 – 0.01 (table 4C) ในขณะที่หนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น (6 ตัวอย่าง) มี 6 haplotypes (Hap 56-61) มีร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 93-99 และระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.002 – 0.06 (table 4D)

8.3.4 การวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ในการศึกษาครั้งนี้หนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ มีค่าความหลากหลายของ haplotypes เท่ากับ 1 ทุกสปีชีส์ ในขณะที่ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.007 – 0.025 (table 5) แสดงให้เห็นว่าหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม สายแม่สูงเช่นเดียวกันทั้ง 2 การวิเคราะห์ สอดคล้องกับจำนวน haplotypes เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละสปีชีส์ โดยเฉพาะในกลุ่มหนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น ที่มีจำนวน ตัวอย่างน้อย (8 ตัวอย่าง; ในการศึกษาครั้งนี้ 6 ตัวอย่าง และจากฐานข้อมูล GenBank 2 ตัวอย่าง) แต่สามารถพบได้ 6 haplotypes ซึ่งค่าความหลากหลายของ haplotypes นั้นขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง ถ้าจำนวนตัวอย่างมากจะทำให้มีโอกาสตรวจพบ haplotypes เพิ่มขึ้นอีก

8.3.5 การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน

เมื่อนำลำดับเบสของหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน พบว่ากรดอะมิโนทั้ง 138 ตำแหน่ง มีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 124 ลำดับ แตกต่างกัน 14 ลำดับ โดยกรดอะมิโน ลำดับที่ 84 (L; leucine) และ 85 (S; serine) สามารถแยกความแตกต่างของหนูหริ่งนาทางสั้นจากหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน F (phenylalanine) และ L (leucine) ตามลำดับ ในขณะที่หนูหริ่งใหญ่ กรดอะมิโน ลำดับที่ 81 (I; isoleucine) และ 88 (M; methionine) สามารถแยกความแตกต่างออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน L (leucine) และ I (isoleucine) ตามลำดับ ส่วนหนูนานาทางสั้นนั้น กรดอะมิโนลำดับที่ 41 (A; alanine) สามารถแยกความแตกต่างออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน V (valine) ได้ และหนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น กรดอะมิโนลำดับที่ 89 (A; alanine และ I; isoleucine) สามารถแยกความแตกต่างหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน T (threonine) ได้ (fig 5)

8.3.6 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial cyt b haplotypes

ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial cyt b haplotypes ของหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มาสร้างเป็นเครือข่ายทางพันธุกรรม (haplotypes net work) พบว่าเป็นแบบ complicated MSN ไม่สามารถสามารถแบ่งแยกกลุ่มประชากรหนูหริ่งตามสภาพภูมิศาสตร์ได้ แต่สามารถจัดกลุ่มหนูหริ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มหนูหริ่งนาทางสั้น มีรูปแบบเป็น star – like network มี haplotype 8, 15, 16, 17 และ 21 เป็น common haplotype ในขณะที่กลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มของหนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาทางยาว และหนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ซึ่งแต่ละกลุ่มนั้นมีการเชื่อมต่อกันด้วยการกลายพันธุ์ 20-35 mutation step

โดยกลุ่มที่ 2 (กลุ่มหนูหริ่งใหญ่) มี haplotype 29-32 เป็น common haplotype ขณะที่กลุ่มที่ 3 (กลุ่มหนูหริ่งนาหางยาว) มีลักษณะเป็นแบบ long genealogy และมี haplotype 50 และ 53 เป็น common haplotype ส่วนกลุ่มที่ 4 (กลุ่มหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน) มี common haplotype คือ haplotype 57-59 ซึ่งในกลุ่มนี้สมาชิกในกลุ่มทั้งหมด 6 ตัวอย่าง มาจากแปลงมะคาเดเมีย ที่ อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ ทั้งหมด (fig 6)

จากการที่ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes ในครั้งนี้ไม่สามารถสามารถแบ่งแยกกลุ่มประชากรหนูหริ่งตามสภาพภูมิศาสตร์ได้นั้น สอดคล้องกับลักษณะการหากินตามธรรมชาติของหนูที่จะมีการอพยพเคลื่อนย้ายไปยังแหล่งที่อยู่ใหม่ได้ ซึ่งขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ แหล่งอาหารตามธรรมชาติ สภาพนิเวศที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ จำนวนความหนาแน่นของประชากรหนูในแต่ละพื้นที่ และสัตว์ผู้ล่าตามธรรมชาติ เป็นต้น จะมีเพียงกลุ่มหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยนเท่านั้น ที่ในการศึกษาค้นคว้าพบว่ามีแหล่งอาศัยในแปลงมะคาเดเมีย ที่ จ. เชียงใหม่ เท่านั้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแปลงมะคาเดเมียดังกล่าว ตั้งอยู่บนภูเขาความสูงอยู่เหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง 1,300 เมตร มีอากาศหนาวเย็นทั้งปี ทำให้มีผลมะคาเดเมียตลอดทั้งปี จึงทำให้ประชากรหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยนกลุ่มนี้มีแหล่งอาหารตลอดทั้งปี จึงไม่มีการอพยพเคลื่อนย้ายไปยังแหล่งอื่น อีกทั้งสภาพภูมิประเทศที่เป็นภูเขาสูงอาจเป็นกำแพงตามธรรมชาติ (natural barrier) ทำให้ประชากรหนูกลุ่มนี้ไม่มีการอพยพเคลื่อนย้ายไปยังแหล่งอื่น แต่เนื่องจากจำนวนหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยนในการศึกษาค้นคว้า มีเพียง 6 ตัวอย่างเท่านั้น จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ผลที่ได้จากการศึกษาค้นคว้านี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

8.3.7 การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรและการทดสอบสมดุลประชากร

วิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรของหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ โดยทำการทดสอบสมดุลประชากร 4 วิธี ได้แก่ Tajima's D , Fu's F_s , Fu and Li's D และ Fu and Li's F ด้วยการทดสอบการเบี่ยงเบนไปจาก neutral population พบว่าค่า Tajima's D มีค่าเบี่ยงเบนไปจาก neutral state โดยมีค่าติดลบในกลุ่มหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าประชากรหนูหริ่งนั้นมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้น (population expansion) อาจเกิดการขยายขนาดประชากรมาก่อน อีกทั้งค่า Fu's F_s , Fu and Li's D และ Fu and Li's F มีค่าติดลบทุกพารามิเตอร์ ในหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ จึงเป็นการยืนยันว่าประชากรหนูหริ่งเคยมีการขยายขนาดประชากรมาก่อน โดยเฉพาะในหนูหริ่งใหญ่ ที่ค่า Tajima D นั้น มีค่าเป็นลบที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่าศูนย์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (table 5) ซึ่งสอดคล้องกับจำนวน haplotypes ที่พบ และสอดคล้องกับผลการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ผลการวิเคราะห์ ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมถึงการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial cyt b haplotypes ซึ่งแต่ละผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมทางสายแม่ที่สูง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการขยายขนาดประชากรของหนูหริ่งในประเทศไทย ส่งผลให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ที่สูง อีกทั้ง ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับสภาพหนูหริ่งที่พบในธรรมชาติ เนื่องจากสามารถพบหนูหริ่งได้ทุกภูมิภาคของประเทศ (ยกเว้นทางภาคใต้) อันเป็นผลมาจากการที่หนูเป็นสัตว์ที่มีการเรียนรู้ และมีการปรับตัวให้สามารถเข้ากับปัจจัยสภาพแวดล้อมที่อาศัยได้ ดังนั้นผลที่ได้จาก

การศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาต่อยอดด้านอนุกรมวิธาน นิเวศวิทยา และทางชีวโมเลกุลของหนูหริ่งศัตรูพืชได้ อีกทั้งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการป้องกันกำจัดหนูหริ่งศัตรูพืช ทำให้การป้องกันกำจัดนั้นมีประสิทธิภาพ อันจะนำไปสู่การเกษตรที่ดี มีคุณภาพและเหมาะสม

อีกทั้งยังสามารถนำข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

หนูหริ่งที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 110 ตัวอย่าง จากพื้นที่ทำการเกษตร 11 แห่ง (10 จังหวัด) 4 ภูมิภาคของประเทศไทย สามารถจำแนกชนิดหนูหริ่งศัตรูพืช ได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ หนูหริ่งนาหางสั้น (Fawn-colored mouse; *M. cervicolor*) 50 ตัวอย่าง, หนูหริ่งใหญ่ (Cook's mouse; *M. cookii*) 12 ตัวอย่าง, หนูหริ่งนาหางยาว (Ryukyu mouse; *M. caroli*) 42 ตัวอย่าง และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน (Shortridge's shrewmouse; *M. pahari*) 6 ตัวอย่าง

9.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวน 5 ลักษณะ ได้แก่ การชั่งน้ำหนัก การวัดขนาดความยาวของหัวและลำตัว (HB) ความยาวของหาง (T) ความยาวของตีนหลัง (HF) ความยาวของหู (E) หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยนมีขนาดลำตัวใหญ่และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวมากที่สุด รองลงมาคือ หนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาหางสั้น และหนูหริ่งนาหางยาว ตามลำดับ หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน หนูหริ่งใหญ่ และ หนูหริ่งนาหางสั้น มีความยาวของส่วนหัวและลำตัวสั้นกว่าความยาวของหาง โดยมีหนูหริ่งนาหางยาวเพียงสปีชีส์เดียว ที่มีความยาวหางมากกว่าความยาวของส่วนหัวและลำตัว หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยความยาวของหู ตีนหลัง และน้ำหนักตัว มากที่สุด ค่าเฉลี่ยของลักษณะภายนอก ขนาด รูปร่างภายนอกทุกลักษณะ ในแต่ละสปีชีส์นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ ดังนั้นการจำแนกชนิดของหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ จากลักษณะภายนอกนั้น ต้องอาศัยลักษณะภายนอกต่างๆ ได้แก่ ขนาดลำตัว ความยาวหางเปรียบเทียบกับความยาวหัวและลำตัว ลักษณะและสีขนด้านหลังและด้านท้อง สีของหาง ลักษณะและสีของฟันแทะคู่บน ลักษณะของส่วนหน้า รวมถึงลักษณะและสีของตีนหลังร่วมกันจึงจะสามารถจำแนกชนิดได้

9.2 ผลการวัดลักษณะกะโหลก จำนวน 21 ลักษณะ หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยที่มีค่ามากที่สุด 15 ลักษณะ (GSL, ONL, CBL, ZB, IB, LR, BR, BB, BZP, LN, LD, PL, PPL, BBPM³ และ ML) หนูหริ่งใหญ่ มีค่าเฉลี่ยของ HBC มากที่สุด หนูหริ่งนาหางสั้น มีค่าเฉลี่ยของ LIF, BBPM¹, LB, ALM¹-M³ และ ALM₁-M₃ มากที่สุด ในขณะที่หนูหริ่งนาหางยาว มีค่าเฉลี่ยที่มีค่าน้อยที่สุด 18 ลักษณะ (GSL, ONL, IB, LR, BR, BB, HBC, BZP, LN, LD, LIF, PL, PPL, BBPM¹, BBPM³, ALM¹-M³, ML และ ALM₁-M₃) หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยของ LB น้อยที่สุด และหนูหริ่งนาหางสั้น มีค่าเฉลี่ยของ CBL และ ZB น้อยที่สุด ค่าเฉลี่ยของลักษณะกะโหลกทุกลักษณะ ในแต่ละสปีชีส์นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ

9.3 การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน ไซโตโครมบี ความยาว 500 คู่เบส ของสกุลหนูหริ่ง (*Mus*) 130 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 110 ตัวอย่าง เป็นลำดับเบสจากฐานข้อมูล GenBank 20 ตัวอย่าง ผลการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มหนูหริ่ง ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (clades) ได้แก่ Clade A (หนูหริ่งนาทางสั้น, หนูหริ่งใหญ่ และ หนูหริ่งนาทางยาว) Clade B (หนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น) และ Clade C (หนูหริ่งบ้าน, Macedonian mouse และ Steppe mouse) พบความแตกต่างของลำดับเบส 79 ตำแหน่ง สามารถแบ่งได้เป็น 61 haplotypes และสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืช ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้เป็น 4 สปีชีส์ ได้แก่ กลุ่มหนูหริ่งนาทางสั้น หนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาทางยาว และหนูหริ่งป่าเล็กขนสั้น สอดคล้องกับผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความหลากหลายของ haplotypes และ ผลการทดสอบสมดุลประชากร ทั้ง 4 พารามิเตอร์ ได้แก่ Tajima's D, Fu's Fs, Fu and Li's D และ Fu and Li's F บ่งชี้ว่าหนูหริ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ที่สูง และกลุ่มประชากรหนูหริ่งนั้นมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้น

9.4 การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบหนูหริ่งบ้านตามพื้นที่เกษตรและสภาพตามธรรมชาติในประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับสมมุติฐานเดิมก่อนที่จะดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : นำผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ ในด้านต่างๆ ได้แก่

10.1 เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานการจัดจำแนกชนิดหนูหริ่งศัตรูพืช

10.2 เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลการกระจายตัวตามธรรมชาติของหนูหริ่งศัตรูพืชและเป็นต้นแบบในหนูศัตรูพืชชนิดอื่น อันนำไปสู่การป้องกันและกำจัดต่อไป

11. คำขอบคุณ : ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถานีทดลองเกษตรที่สูงแม่จอนหลวง อ. แม่แจ่ม จ. เชียงใหม่ สำนักงานเกษตรอำเภอเบตง อ. น่าน ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครราชสีมา อ.สีคิ้ว จ. นครราชสีมา และศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน รวมถึงเกษตรกรเจ้าของแปลงในจังหวัดต่างๆ ที่คณะวิจัยได้เดินทางไปเก็บตัวอย่างเพื่อดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ ที่ให้ความอนุเคราะห์ ช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณอุรัสยาน์ ขวัญเรือน นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ศูนย์วิจัยข้าวเชียงราย กรมการข้าว ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างหนูหริ่งนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ คุณปรีชา มีนาค นักวิชาการส่งเสริมการเกษตรชำนาญการ สำนักงานเกษตรอำเภอบรรพตพิสัย กรมส่งเสริมการเกษตร และคุณพิกุลทอง สุอนงค์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรบุรีรัมย์ กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณบรรจง บุญครอบ คุณวิชา สีแจ่ม คุณเกษมสุข อินสุธา และคุณธนากรณ์ ภัคดีสุข ที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการงานวิจัยในครั้งนี้

12. เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า
- 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.
- Bandlet, H.J., Forster, P. and Rohl, A. 1999. Median-jointing networks for inferring intraspecific phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
- Bibi, S., M.S. Nadeem, M.B. Anwar, S.I. Shah, A.R. Kayani, M. Mushtaq, M.A. Beg and T. Mahmood. 2019. First record of *Mus cookii* (Cook's mouse) from Pothwar, Pakistan: a probable case of range extension? *Mammalia*. 83: 198-202.
- Coroiu, I., B. Krystufek and V. Vohralik. 2016. *Mus spicilegus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T13984A544549.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences. A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17: 368-376.
- 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.
- 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.
- Harrison, D.L. and P.J.J. Bates. 1991. The mammals of Arabia, 2nd edition. Harrison Zoological Museum, Sevenoaks, Kent, 354 pp.
- Hein, J., T. Jiang, L. Wang and K. Zhang. 1996. On the complexity of comparing evolutionary trees. *Discrete Applied Mathematics*. 71: 153-169.
- 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.

- Krystufek, B and V. Vohralik. 2016. *Mus macedonicus* (errata version published in 2017). The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T13966A115117069.
- Kumar S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets .Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.
- Lekagul, B. and A.M. Jeffery. 1977. Mammal of Thailand. Printed at Kurusapha Ladprao Press by Naitkamthon Sathirakul, Bangkok. 758 p.
- Musser, G.G. 1979. Results of the Archbold Expeditions. No 102. The species of *Chiropodomys* arboreal mice of Indochina and the Malay Archipelago. Bulletin of the American Museum of Natural History 162: 381–445.
- Musser, G.G. and M.D. Carleton. 2005. Family Muridae. In: Wilson DE, Reeder DM (Eds) Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference, 3rd ed. Johns Hopkins University Press Baltimore Maryland: 894–1531.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 333 pp.
- Pimsai, U., M.J. Pearch, C. Satasook, S. Bumrungsri and P.J.J. Bates. 2014. Murine rodents (Rodentia: Murinae) of the Myanmar-Thai-Malaysian peninsula and Singapore: taxonomy, distribution, ecology, conservation status, and illustrated identification keys. Bonn zoological Bulletin. 63: 15-114.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4: 406-425.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics. 105: 437–460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123: 597-601.

13. ภาคผนวก :

Table 1 Summary of the species identification and mitochondrial (Cyt *b* gene) sequences of *Mus* spp. include in this study.

Region	Sampling location	Locality coordinating	N	Species (n)	Voucher number	Mitochondrial (Cyt <i>b</i> gene)	
						Clade	Haplotypes
Northern Thailand	MaeChaem, ChiangMai ; MJ (macademia plantation)	18.647320, 98.476502	6	<i>M. pahari</i> (6)	MJ1-6	B	Hap 58-61
	Thoeng, ChiangRai; T (rice field)	19.683735, 100.191085	4	<i>M. caroli</i> (4)	T1-4	AIII	Hap 34-37
	BoKluea, Nan; BK (rice field)	19.104218, 101.191022	2	<i>M. cookii</i> (2)	BK1/ BK2	AI	Hap 29/ Hap 33
Central Thailand	BanphotPhisai, NakhonSawan; NKW (soybean field)	15.967748, 99.897299	25	<i>M. cervicolor</i> (12)	NKW8/ NKW19, 24/ NKW5, 29/ NKW20/ NKW13, 25, 27, 28/ NKW11, 18	AI	Hap 8/Hap 9/ Hap 15/ Hap 16/ Hap 17/ Hap 19
				<i>M. caroli</i> (13)	NKW23, 26/ NKW6, 12/ NKW1, 2/ NKW14, 17/ NKW16/ NKW7, 15, 21, 22	AIII	Hap 41/ Hap 44/ Hap 46 Hap 49/ Hap 50/ Hap 53
	LomKao, Phetchabun; LK (rice field)	16.850098, 101.200224	8	<i>M. cervicolor</i> (5)	LK2/ LK1, 4, 24, 26	AI	Hap 13/ Hap 14
				<i>M. cookii</i> (1)	LK25	AI	Hap 31
				<i>M. caroli</i> (2)	LK3, 5	AIII	Hap 45
	KhaoKho, Phetchabun; KK (macademia plantation)	16.588535, 100.960216	11	<i>M. cookii</i> (9)	KK3-4/ KK5, 7/ KK1, 2, 6, 9, 11	AI	Hap28/ Hap 30/ Hap 31
				<i>M. caroli</i> (2)	KK8/ KK10	AIII	Hap 47/ Hap 48
	Mueang, NakhonNayok; NYK (rice field)	14.159897, 101.134773	7	<i>M. cervicolor</i> (1)	NYK6	AI	Hap 15
				<i>M. caroli</i> (6)	NYK1, 2/ NKY3/ NKY4, 9, 10	AIII	Hap 49/ Hap 50/ Hap 51

Table 1 Summary of the species identification and mitochondrial (Cyt *b* gene) sequences of *Mus* spp. include in this study (continue).

Region	Sampling location	Locality coordinating	N	Species (n)	Voucher number	Mitochondrial (Cyt <i>b</i> gene)	
						Clade	Haplotypes
Western Thailand	BanLat, Phetchaburi; P (peanut field)	13.072184, 99.887626	9	<i>M. cervicolor</i> (9)	P3/ P4, 7/ P10/ P8/ P6/ P9/ P1, 5	AI	Hap4/ Hap5/ Hap7/ Hap17/ Hap21/ Hap24/ Hap26
	Mueang, Kanchanaburi; K (lemon grass field)	14.111819, 99.4964177	15	<i>M. cervicolor</i> (15)	K18, 20/ K25/ K2/ K11/ K4, 8/ K7/ K1, 10, 22, 23/ K15/ K19/ K14	AI	Hap 6/ Hap 7/ Hap 10/ Hap 18 Hap19/ Hap 20/ Hap 22/ Hap 23/ Hap 25/ Hap 27
Northeast Thailand	Sikhio, NakhonRatchasima; SK (rice field)	14.872284, 101.650930	10	<i>M. caroli</i> (10)	SK13/ SK28/ SK16, 27/ SK20, 21/ SK3, 4, 15/ SK22	AIII	Hap 40/ Hap 43/ Hap 52/ Hap 53 Hap 54/ Hap 55
	NaPho, BuriRam; NP (sugarcane field)	15.625610, 102.947091	13	<i>M. cervicolor</i> (8) <i>M. caroli</i> (5)	NP11/ NP1, 6, 7, 12/ NP2, 13/ NP9 NP4/ NP8, 10/ NP3, 5	AI AIII	Hap 1/ Hap 2/ Hap 3/ Hap 11 Hap 39/ Hap 40/ Hap 55
		Total	110				

Table 2 The body length measurements (mean \pm SD) of *Mus* spp. in this study.

Species	N	Weight \pm SD (g) (min-max)	Body length (mm)				
			HB \pm SD (min-max)	Tail \pm SD (min-max)	(Tail/HB)%	E \pm SD (min-max)	HF \pm SD (min-max)
<i>M. cervicolor</i>	50	16.83 \pm 4.09 (8.8 - 30.1)	81.47 \pm 8.33 (59 - 100)	62.61 \pm 6.63 (50 - 84)	76.85%	13.14 \pm 1.22 (10 - 15)	15.63 \pm 1.58 (11 - 19)
<i>M. cookii</i>	12	19.61 \pm 8.76 (11.5 - 31.5)	82.81 \pm 13.72 (62 - 105)	69.82 \pm 4.83 (66 - 84)	84.31%	13.64 \pm 1.86 (11 - 16)	16.64 \pm 2.69 (11 - 20)
<i>M. caroli</i>	42	12.24 \pm 2.88 (7.6 - 19)	73.08 \pm 7.34 (58 - 88)	78.54 \pm 6.83 (65 - 95)	107.47%	12.67 \pm 1.47 (8 - 15)	16.18 \pm 1.76 (11 - 19)
<i>M. pahari</i>	6	27 \pm 4.31 (22 - 31.5)	114 \pm 25.2 (93 - 150)	98.5 \pm 0.71 (98-99)	86.40%	16.8 \pm 1.1 (16 - 18)	20.8 \pm 1.3 (20 - 23)
Total	110						

Table 3 The cranial and dental character measurements (mean \pm SD; millimeters) of *Mus* spp. in this study.

Species	N	Cranial and dental length (mm)										
		GSL \pm SD (min-max)	ONL \pm SD (min-max)	CBL \pm SD (min-max)	ZB \pm SD (min-max)	IB \pm SD (min-max)	LR \pm SD (min-max)	BR \pm SD (min-max)	BB \pm SD (min-max)	HBC \pm SD (min-max)	BZP \pm SD (min-max)	LN \pm SD (min-max)
<i>M. cervicolor</i>	50	22.42 \pm 4.99 (20.74 - 25.81)	22.82 \pm 4.85 (20 - 25.54)	20.39 \pm 4.34 (19.66 - 25.03)	9.85 \pm 1.47 (7.87 - 11.04)	3.84 \pm 0.31 (3.41 - 4.15)	7.07 \pm 0.92 (5.6 - 8.79)	3.42 \pm 0.84 (2.84 - 3.86)	9.36 \pm 0.46 (8.02 - 10.19)	7.35 \pm 0.60 (6.11 - 7.98)	3.07 \pm 1.57 (2.29 - 3.82)	9.12 \pm 1.2 (7.26 - 12.98)
<i>M. cookii</i>	12	25.14 \pm 2.22 (22.75 - 28.59)	25.32 \pm 2.82 (20.34 - 29.57)	23.06 \pm 1.62 (20.13 - 25.66)	10.71 \pm 1.09 (9.58 - 12.28)	3.98 \pm 0.24 (3.7 - 4.52)	7.95 \pm 1.41 (6.47 - 10.97)	3.31 \pm 0.36 (2.54 - 3.81)	10.16 \pm 0.37 (9.62 - 10.86)	7.95 \pm 1.41 (7.49 - 8.57)	3.06 \pm 0.38 (2.59 - 4)	9.69 \pm 1.52 (7.49 - 11.34)
<i>M. caroli</i>	42	21.73 \pm 3.81 (19.87 - 25.32)	22.24 \pm 3.66 (21.01 - 25.04)	20.75 \pm 3.25 (19 - 23.97)	9.9 \pm 1.18 (9 - 10.69)	3.76 \pm 0.36 (2.66 - 4.24)	5.89 \pm 0.87 (4 - 7.95)	3.3 \pm 0.7 (2 - 3.9)	9.07 \pm 0.42 (8.21 - 10.07)	7.31 \pm 0.57 (6.22 - 8.78)	2.6 \pm 1.54 (1.82 - 2.69)	8 \pm 1.01 (6.69 - 9.95)
<i>M. pahari</i>	6	26.41 \pm 2.42 (23.91 - 30.72)	27.95 \pm 1.70 (25.64 - 30.76)	22.93 \pm 1.40 (21.02 - 25.27)	11.11 \pm 0.58 (10.2 - 11.75)	4.78 \pm 0.17 (4.55 - 5.04)	8.31 \pm 0.90 (7.44 - 9.27)	3.51 \pm 0.29 (3.11 - 3.8)	10.55 \pm 0.33 (10.06 - 11.01)	7.68 \pm 0.53 (7.02 - 8.31)	3.35 \pm 0.45 (2.57 - 3.88)	10.70 \pm 1.13 (9.28 - 12.35)

Species	N	Cranial and dental length (mm)									
		LD \pm SD (min-max)	LIF \pm SD (min-max)	PL \pm SD (min-max)	PPL \pm SD (min-max)	BBPM1 \pm SD (min-max)	BBPM3 \pm SD (min-max)	LB \pm SD (min-max)	ALM1-M3U \pm SD (min-max)	ML \pm SD (min-max)	ALM1-M3L \pm SD (min-max)
<i>M. cervicolor</i>	50	7.83 \pm 1.08 (6.64 - 9.54)	5.21 \pm 1.87 (4.13 - 7.27)	11.30 \pm 0.73 (9.89 - 11.8)	7.61 \pm 1.89 (4.93 - 9.18)	3.33 \pm 2.81 (2.06 - 3.24)	3.21 \pm 3.06 (2.11 - 3.04)	3.19 \pm 3.37 (1.63 - 2.99)	4.26 \pm 3.26 (2.93 - 3.82)	12.60 \pm 1.75 (10.66 - 13.18)	3.88 \pm 3.79 (2.5 - 3.91)
<i>M. cookii</i>	12	7.93 \pm 0.97 (7.02 - 9.27)	5.05 \pm 1.34 (3.66 - 5.45)	11.87 \pm 3.65 (10.46 - 12.89)	7.50 \pm 1.22 (4.52 - 9.28)	2.91 \pm 0.32 (2.48 - 3.44)	2.97 \pm 0.21 (2.69 - 3.29)	2.12 \pm 0.44 (1.48 - 2.84)	3.95 \pm 0.25 (3.43 - 4.12)	12.93 \pm 1.04 (11.69 - 14.78)	3.71 \pm 0.3 (3.25 - 4.37)
<i>M. caroli</i>	42	7.27 \pm 1.02 (5 - 8.42)	4.39 \pm 1.53 (3.42 - 5.01)	10.75 \pm 0.73 (9.34 - 11.72)	7.26 \pm 1.57 (5.86 - 9.3)	2.77 \pm 2.27 (1.78 - 2.68)	2.69 \pm 2.44 (1.82 - 2.71)	2.81 \pm 2.62 (1.6 - 3.3)	3.74 \pm 2.59 (3 - 4)	11.83 \pm 1.63 (9.63 - 13.2)	3.62 \pm 2.95 (2.48 - 3.82)
<i>M. pahari</i>	6	8.33 \pm 0.67 (7.48 - 9.22)	5.10 \pm 0.42 (4.37 - 5.63)	12 \pm 0.46 (11.27 - 12.51)	9.44 \pm 1.34 (7.61 - 10.1)	3.17 \pm 0.36 (2.72 - 3.68)	3.32 \pm 0.09 (3.2 - 3.46)	2.02 \pm 0.46 (1.53 - 2.77)	3.98 \pm 0.07 (3.89 - 4.05)	13.66 \pm 0.65 (12.7 - 14.73)	3.72 \pm 0.20 (3.49 - 4.1)

Total	110											
-------	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Table 4A Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 7 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the mitochondrial *cytb* sequences (500 bp) from *M. cervicolor* 27 haplotypes.

Haplotypes no.	Voucher name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1	KJ530559 <i>M. cervicolor</i> , NP11	ID	0.993	0.991	0.969	0.969	0.967	0.965	0.969	0.965	0.967	0.967	0.965	0.963	0.959	0.967	0.969	0.971	0.965	0.969	0.965	0.973	0.969	0.971	0.965	0.967	0.967	0.965	
2	NP1, NP6, NP7, NP12	0.006 ID	0.997	0.975	0.971	0.973	0.971	0.975	0.971	0.973	0.973	0.971	0.969	0.965	0.973	0.975	0.977	0.971	0.975	0.971	0.979	0.975	0.973	0.971	0.969	0.969	0.967	0.967	
3	NP2, NP13	0.008 0.002 ID	0.973	0.969	0.971	0.969	0.973	0.969	0.971	0.971	0.969	0.967	0.963	0.971	0.973	0.975	0.969	0.973	0.969	0.977	0.973	0.971	0.969	0.967	0.967	0.967	0.965		
4	P3	0.031 0.024 0.027 ID	0.995	0.997	0.991	0.991	0.987	0.989	0.989	0.987	0.987	0.985	0.981	0.981	0.989	0.991	0.993	0.987	0.991	0.987	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.985	0.975	
5	P4, P7	0.031 0.029 0.031 0.004 ID	0.993	0.987	0.987	0.983	0.985	0.985	0.983	0.977	0.977	0.985	0.987	0.989	0.989	0.983	0.987	0.989	0.983	0.987	0.987	0.987	0.985	0.983	0.981	0.981	0.981	0.971	
6	K18, K20	0.033 0.027 0.029 0.002 0.006 ID	0.989	0.993	0.989	0.987	0.987	0.985	0.979	0.979	0.987	0.989	0.991	0.985	0.989	0.989	0.991	0.985	0.989	0.985	0.989	0.989	0.987	0.985	0.983	0.983	0.983	0.973	
7	P10, K25	0.035 0.029 0.031 0.008 0.012 0.01 ID	0.991	0.987	0.989	0.989	0.987	0.977	0.981	0.989	0.991	0.993	0.987	0.991	0.987	0.991	0.995	0.991	0.995	0.991	0.995	0.995	0.993	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975
8	AY057811 <i>M. cervicolor</i> , NKW8	0.031 0.024 0.027 0.008 0.012 0.006 0.008 ID	0.995	0.993	0.993	0.991	0.981	0.985	0.993	0.995	0.997	0.991	0.995	0.991	0.995	0.991	0.995	0.991	0.995	0.995	0.993	0.991	0.989	0.989	0.989	0.989	0.989	0.979	
9	NKW19, NKW24	0.035 0.029 0.031 0.012 0.016 0.01 0.012 0.004 ID	0.989	0.989	0.987	0.977	0.981	0.989	0.991	0.993	0.987	0.991	0.987	0.991	0.987	0.991	0.989	0.987	0.991	0.991	0.989	0.989	0.987	0.985	0.985	0.985	0.975		
10	K2	0.033 0.027 0.029 0.01 0.014 0.012 0.01 0.006 0.01 ID	0.995	0.993	0.979	0.983	0.987	0.991	0.993	0.995	0.989	0.993	0.995	0.989	0.993	0.989	0.993	0.989	0.993	0.993	0.991	0.989	0.987	0.987	0.987	0.977			
11	JQ685755 <i>M. cervicolor</i> , NP9	0.033 0.027 0.029 0.01 0.014 0.012 0.01 0.006 0.01 0.004 ID	0.997	0.983	0.987	0.991	0.993	0.995	0.989	0.993	0.987	0.991	0.987	0.991	0.989	0.993	0.989	0.993	0.989	0.993	0.993	0.991	0.989	0.987	0.987	0.987	0.977		
12	KJ530560 <i>M. cervicolor</i>	0.035 0.029 0.031 0.012 0.0165 0.014 0.012 0.008 0.012 0.006 0.002 ID	0.985	0.989	0.989	0.991	0.993	0.987	0.991	0.987	0.991	0.987	0.991	0.987	0.991	0.989	0.987	0.991	0.987	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975			
13	LK2	0.037 0.031 0.033 0.018 0.022 0.02 0.022 0.018 0.022 0.02 0.016 0.014 ID	0.995	0.979	0.981	0.983	0.977	0.981	0.977	0.981	0.981	0.979	0.981	0.983	0.977	0.981	0.977	0.981	0.981	0.979	0.977	0.975	0.975	0.969					
14	LK1, LK4, LK24, LK26	0.041 0.035 0.037 0.018 0.022 0.02 0.018 0.014 0.018 0.016 0.012 0.01 0.004 ID	0.983	0.985	0.987	0.981	0.985	0.981	0.985	0.981	0.985	0.981	0.985	0.983	0.981	0.979	0.979	0.969											
15	NKW5, NKW29, NKY6	0.033 0.027 0.029 0.01 0.014 0.012 0.01 0.006 0.01 0.008 0.008 0.01 0.02 0.015 ID	0.993	0.995	0.989	0.993	0.989	0.993	0.993	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.983	0.981	0.979	0.979	0.969										
16	NKW20	0.031 0.024 0.027 0.008 0.012 0.01 0.008 0.004 0.008 0.006 0.006 0.008 0.018 0.014 0.006 ID	0.997	0.991	0.995	0.991	0.995	0.995	0.993	0.991	0.989	0.987	0.987	0.989	0.989	0.991	0.989	0.987	0.987	0.977									
17	NKW13, NKW25, NKW27, NKW28, P8	0.029 0.022 0.024 0.006 0.01 0.008 0.006 0.002 0.006 0.004 0.004 0.006 0.016 0.012 0.004 0.002 ID	0.993	0.997	0.993	0.997	0.997	0.995	0.993	0.991	0.991	0.981	0.981	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975											
18	K11	0.035 0.029 0.031 0.012 0.015 0.014 0.012 0.008 0.012 0.01 0.01 0.012 0.022 0.018 0.01 0.008 0.006 ID	0.995	0.991	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975																		
19	K4, K8, NKW11, NKW18	0.031 0.024 0.027 0.008 0.012 0.01 0.008 0.004 0.008 0.006 0.006 0.008 0.018 0.014 0.006 0.004 0.002 0.004 ID	0.995	0.995	0.995	0.993	0.991	0.989	0.989	0.989	0.979																		
20	K7	0.035 0.029 0.031 0.012 0.016 0.014 0.012 0.008 0.012 0.01 0.01 0.012 0.022 0.018 0.01 0.008 0.006 0.008 0.004 ID	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975																				
21	P6	0.027 0.02 0.022 0.008 0.012 0.01 0.008 0.004 0.008 0.006 0.006 0.008 0.018 0.014 0.006 0.004 0.002 0.008 0.004 0.008 ID	0.995	0.993	0.991	0.989	0.989	0.989	0.979																				
22	K1, K10, K22, K23	0.031 0.024 0.027 0.008 0.012 0.01 0.008 0.004 0.006 0.006 0.006 0.008 0.018 0.014 0.006 0.004 0.002 0.008 0.004 0.008 0.004 ID	0.993	0.991	0.989	0.989	0.983																						
23	K15	0.029 0.027 0.029 0.01 0.014 0.012 0.01 0.006 0.01 0.008 0.008 0.01 0.02 0.016 0.008 0.006 0.004 0.01 0.006 0.01 0.006 0.006 ID	0.993	0.995	0.991	0.981																							
24	P9	0.035 0.029 0.031 0.012 0.016 0.014 0.012 0.008 0.012 0.01 0.01 0.012 0.022 0.018 0.01 0.008 0.006 0.012 0.008 0.012 0.008 0.008 0.006 ID	0.993	0.985	0.975																								
25	K19	0.033 0.031 0.033 0.014 0.018 0.016 0.014 0.01 0.014 0.012 0.012 0.014 0.024 0.02 0.012 0.01 0.008 0.014 0.01 0.014 0.01 0.01 0.004 0.006 ID	0.987	0.977																									
26	P1, P5	0.033 0.031 0.033 0.014 0.018 0.016 0.014 0.01 0.014 0.012 0.012 0.014 0.024 0.02 0.012 0.01 0.008 0.014 0.01 0.014 0.01 0.01 0.008 0.014 0.012 ID	0.981																										
27	K14	0.035 0.033 0.035 0.024 0.029 0.027 0.024 0.02 0.024 0.022 0.022 0.024 0.031 0.031 0.022 0.02 0.018 0.024 0.02 0.024 0.02 0.016 0.018 0.024 0.022 0.018 ID																											

Table 4B Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 7 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the mitochondrial *cytb* sequences (500 bp) from *M. caroli* 22 haplotypes.

Haplotypes no.	Voucher name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
34	AB213499 <i>M. caroli</i> ; T4	ID	0.997	0.995	0.993	0.963	0.967	0.969	0.955	0.959	0.961	0.963	0.959	0.957	0.959	0.959	0.959	0.961	0.957	0.957	0.959	0.953	0.955
35	T3	0.002 ID		0.997	0.991	0.965	0.969	0.971	0.957	0.957	0.959	0.961	0.957	0.955	0.957	0.957	0.957	0.959	0.955	0.955	0.957	0.951	0.953
36	T1	0.004	0.002 ID		0.989	0.963	0.967	0.969	0.955	0.955	0.957	0.959	0.955	0.953	0.955	0.955	0.955	0.957	0.953	0.953	0.955	0.949	0.951
37	T2	0.006	0.008	0.01 ID		0.961	0.965	0.967	0.957	0.957	0.959	0.961	0.957	0.955	0.957	0.957	0.957	0.959	0.955	0.955	0.957	0.951	0.953
38	AB213510 <i>M. caroli</i>	0.037	0.035	0.037	0.039 ID		0.993	0.993	0.967	0.967	0.969	0.975	0.971	0.973	0.975	0.975	0.975	0.977	0.973	0.973	0.975	0.969	0.971
39	NP4	0.033	0.031	0.033	0.035	0.006 ID		0.997	0.969	0.969	0.971	0.977	0.969	0.971	0.973	0.973	0.973	0.975	0.971	0.971	0.973	0.967	0.969
40	NP8, NP10, SK13	0.031	0.029	0.031	0.033	0.006	0.002 ID		0.969	0.969	0.971	0.977	0.969	0.971	0.973	0.973	0.973	0.975	0.971	0.971	0.973	0.967	0.969
41	AB033698 <i>M. caroli</i> ; NKW23, NKW26	0.045	0.043	0.045	0.043	0.033	0.031	0.031 ID		0.987	0.981	0.979	0.975	0.977	0.979	0.979	0.979	0.977	0.973	0.973	0.975	0.971	0.973
42	AB213502 <i>M. caroli</i>	0.041	0.043	0.045	0.043	0.033	0.031	0.031	0.012 ID		0.981	0.987	0.975	0.977	0.979	0.979	0.979	0.977	0.973	0.973	0.975	0.971	0.973
43	SK28	0.039	0.041	0.043	0.041	0.031	0.029	0.029	0.018	0.018 ID		0.985	0.981	0.983	0.985	0.985	0.985	0.983	0.979	0.979	0.981	0.975	0.977
44	NKW6, NKW12	0.037	0.039	0.041	0.039	0.024	0.022	0.022	0.02	0.012	0.014 ID		0.987	0.989	0.987	0.989	0.991	0.985	0.981	0.981	0.983	0.977	0.979
45	LK3, LK5	0.041	0.043	0.045	0.043	0.029	0.031	0.031	0.024	0.024	0.018	0.012 ID		0.993	0.991	0.993	0.995	0.989	0.985	0.985	0.987	0.981	0.983
46	NKW1, NKW2	0.043	0.045	0.048	0.045	0.027	0.029	0.029	0.022	0.022	0.016	0.01	0.006 ID		0.995	0.995	0.997	0.991	0.987	0.987	0.989	0.983	0.985
47	KK8	0.041	0.043	0.045	0.043	0.024	0.027	0.027	0.02	0.02	0.014	0.012	0.008	0.004 ID		0.995	0.995	0.993	0.989	0.989	0.991	0.985	0.987
48	KK10	0.041	0.043	0.045	0.043	0.024	0.027	0.027	0.02	0.02	0.014	0.01	0.006	0.004	0.004 ID		0.997	0.993	0.989	0.989	0.991	0.985	0.987
49	NKW14, NKW17, NKY1, NKY2	0.041	0.043	0.045	0.043	0.024	0.027	0.027	0.02	0.02	0.014	0.008	0.004	0.002	0.004	0.002 ID		0.993	0.989	0.989	0.991	0.985	0.987
50	NKY3, NKW16	0.039	0.041	0.043	0.041	0.022	0.024	0.024	0.022	0.022	0.016	0.014	0.01	0.008	0.006	0.006	0.006 ID		0.995	0.995	0.997	0.991	0.993
51	NKY4, NKY9, NKY10	0.043	0.045	0.048	0.045	0.027	0.029	0.029	0.027	0.027	0.02	0.018	0.014	0.012	0.01	0.01	0.01	0.004 ID		0.991	0.993	0.987	0.989
52	SK16, SK27	0.043	0.045	0.048	0.045	0.027	0.029	0.029	0.027	0.027	0.02	0.018	0.014	0.012	0.01	0.01	0.01	0.004	0.008 ID		0.997	0.991	0.993
53	AY057812 <i>M. caroli</i> ; SK20, SK21, NKW7, NKW15, NKW21, NKW22	0.041	0.043	0.045	0.043	0.024	0.027	0.027	0.024	0.024	0.018	0.016	0.012	0.01	0.008	0.008	0.008	0.002	0.006	0.002 ID		0.993	0.995
54	SK3, SK4, SK15	0.048	0.05	0.052	0.05	0.031	0.033	0.033	0.029	0.029	0.024	0.022	0.018	0.016	0.014	0.014	0.014	0.008	0.012	0.008	0.006 ID		0.997
55	SK22, NP3, NP5	0.045	0.048	0.05	0.048	0.029	0.031	0.031	0.027	0.027	0.022	0.02	0.016	0.014	0.012	0.012	0.012	0.006	0.01	0.006	0.004	0.002 ID	

Table 4C Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 7 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the mitochondrial *cytb* sequences (500 bp) from *M. cookii* 6 haplotypes.

Haplotypes		1	2	3	4	5	6	
no.	Voucher name							
28	KK3, KK4	ID		0.983	0.985	0.987	0.985	0.985
29	BK1	0.016	ID		0.993	0.995	0.993	0.993
30	KK5, KK7	0.014	0.006	ID		0.997	0.995	0.995
31	AY057813 <i>M. cookii</i> , KK1, KK2, KK6, KK9, KK11, LK25	0.012	0.004	0.002	ID		0.997	0.997
32	AB125768 <i>M. cookii</i>	0.014	0.006	0.004	0.002	ID		0.995
33	BK2	0.014	0.006	0.004	0.002	0.004	ID	

Table 4D Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 7 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the mitochondrial *cytb* sequences (500 bp) from *M. pahari* 6 haplotypes.

Haplotypes no.	Voucher name	1	2	3	4	5	6	
56	AB096839 <i>M. pahari</i>	ID	0.939	0.941	0.941	0.939	0.939	
57	KY038052 <i>M. pahari</i>	0.063	ID		0.997	0.995	0.993	0.993
58	MJ5	0.061	0.002	ID		0.997	0.995	0.995
59	MJ2, MJ4	0.061	0.004	0.002	ID		0.997	0.997
60	MJ1, MJ3	0.063	0.006	0.004	0.002	ID		0.995
61	MJ6	0.063	0.006	0.004	0.002	0.004	ID	

Table 5 Summary statistics of the genetic diversity indices and neutrality test of Cytb sequence (500 bp) of *Mus* spp. in this study.

Populations (species)	N	Haplotypes (n)	S	Hd ± SD	Pi ± SD	Tajima's D	Fu's Fs	Fu and Li 's D	Fu and Li 's F
<i>M. cervicolor</i>	50	27	51	1 ± 0.01	0.015 ± 0.002	-1.622	-24.709	-1.214	-1.583
<i>M. cookii</i>	12	6	11	1 ± 0.096	0.007 ± 0.002	-1.445	-2.814	-1.481	-1.593
<i>M. caroli</i>	42	22	46	1 ± 0.014	0.025 ± 0.003	-0.424	-12.702	-0.319	-0.411
<i>M. pahari</i>	6	6	32	1 ± 0.096	0.022 ± 0.012	-1.488*	-0.804	-1.458	-1.602

Remark: N = numbers of samples, S = number of polymorphic (segregation), Hd = haplotype diversity, Pi = nucleotide diversity, SD = standard deviation.

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

* P < 0.05: significant

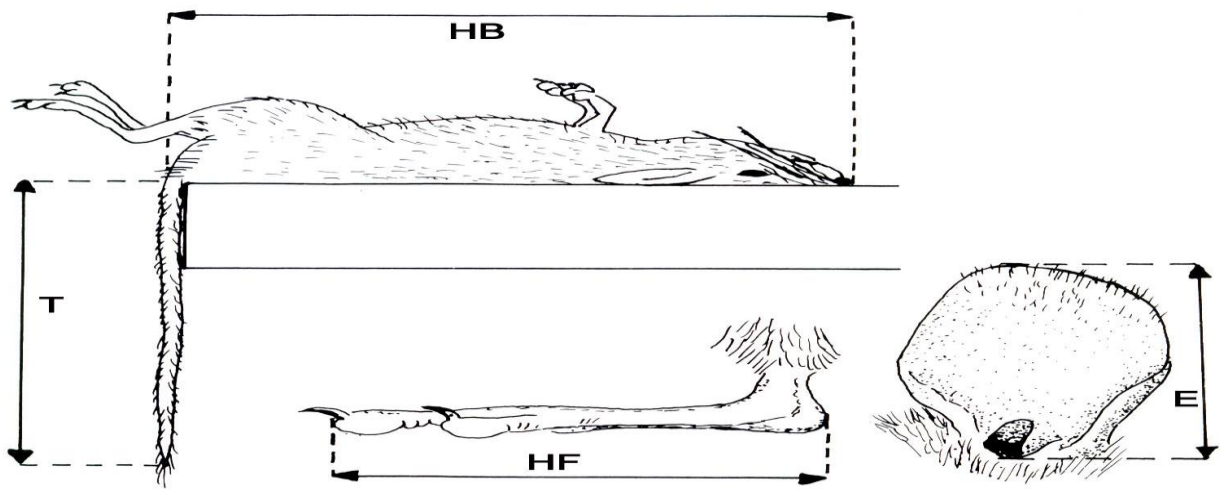


Figure 1 External characters of adult rodent, as referred to in this study; (HB): head and body length, (T): tail length, (HF): hind foot length and (E); ear length (กลุ่มงานสัตววิทยา การเกษตร, 2544)

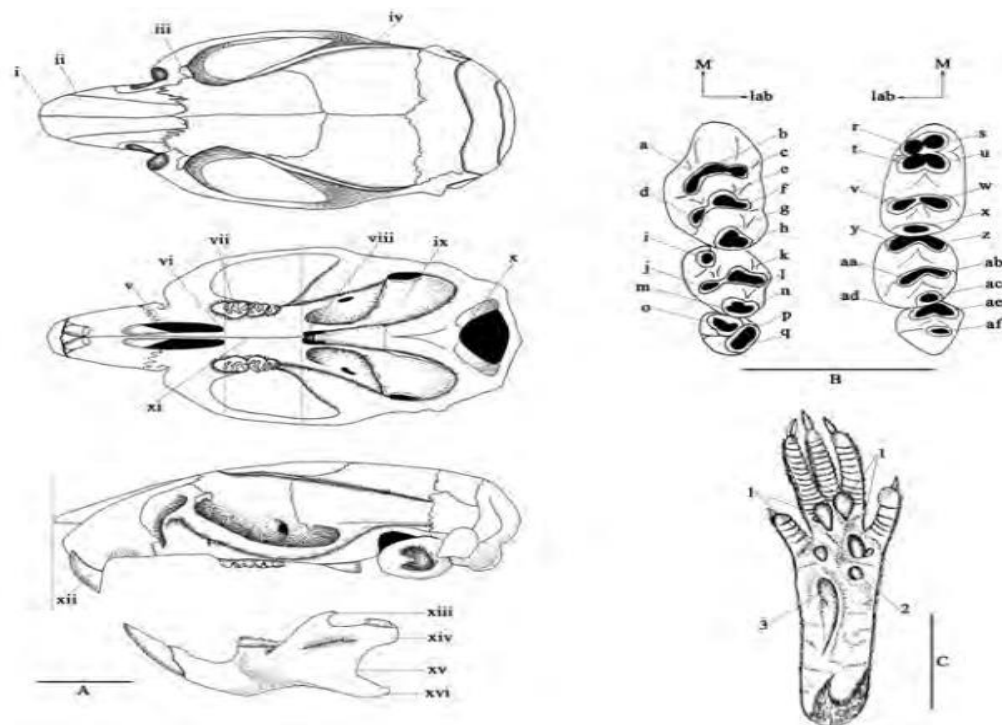


Figure 2 Skull and dentition of *Mus musculus* (JTM6912). (A): dorsal, ventral and lateral view of skull and mandible (Scale = 5 mm); (B): occlusal view of upper (left) and lower (right) left molars (Scale = 2 mm); (C): left hind foot of *M. musculus* (HZM457.18657), Beesham, Pakistan (Scale = 5 mm). Indicative numbers (i–xvi) and (1–3) and letters (a–af) are explained in the text ‘Description’ for *Mus*. M: mouth; lab: labial. (Pimsai *et al.*, 2014)

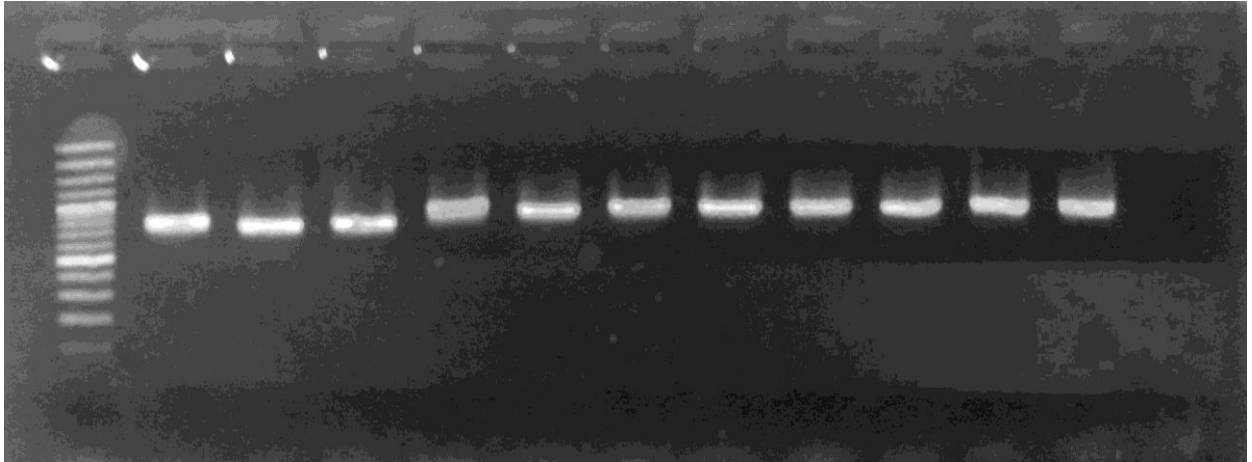


Figure 3 PCR product with the use of primer *Mus cytb* F seq / *Mus cytb* R (cytochrome *b* region) of *Mus* spp. generated 800 bp (estimate) detect by 1.5% agarose gel electrophoresis, (left to right) lane 1 contains DNA markers (100 bp), and lane 2-12 are samples *Mus* spp. (NP1-11), lane 13 is negative control.

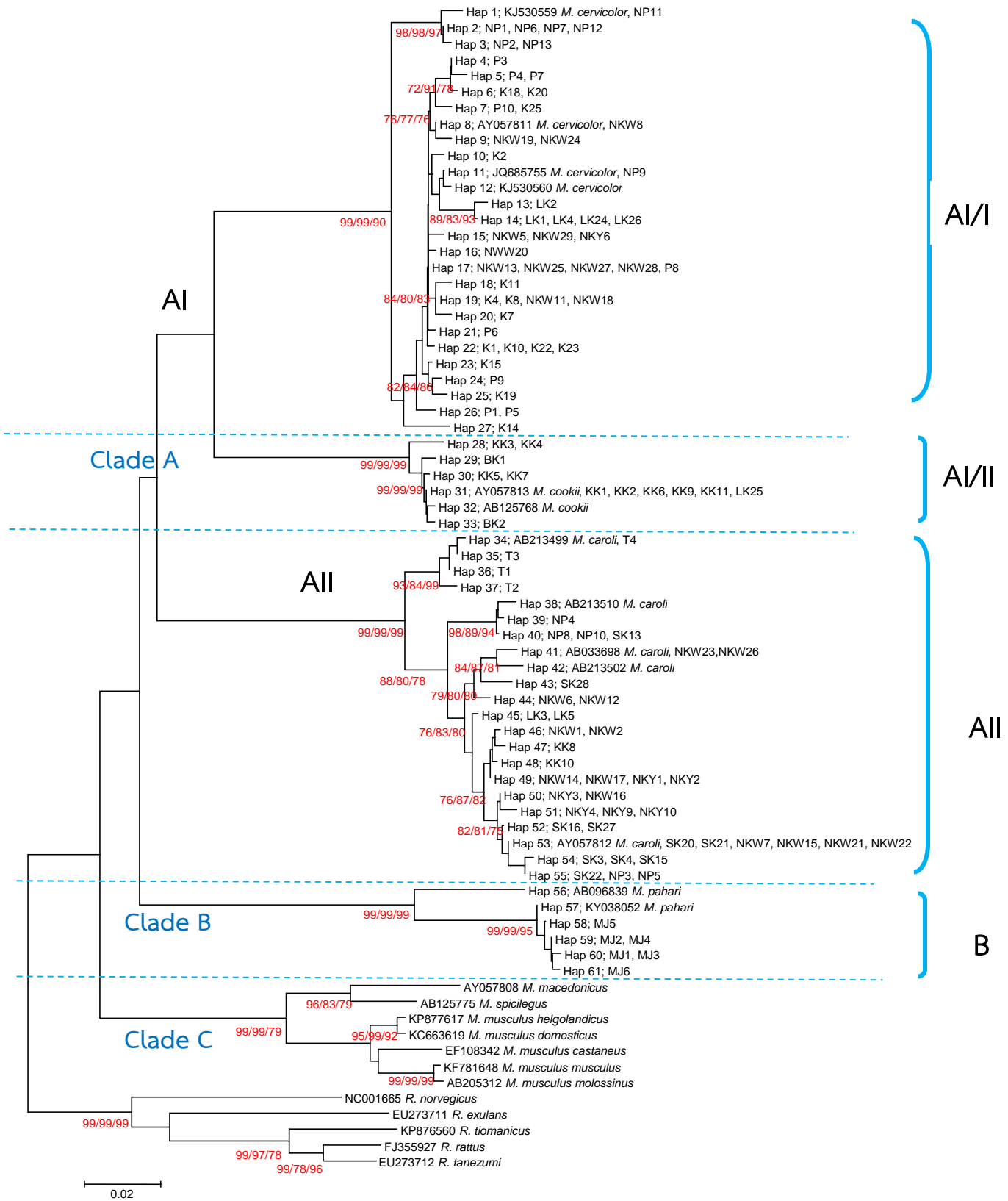


Figure 4 Phylogenetic tree of *cytb* sequences (500 bp) of *Mus* spp. and depicting the genetic relatedness of the *Rattus* species. Bootstrap support 1,000 replicated are given above or below the branches and reconstructed following 3 different methods NJ/MP/ML respectively. The tree has been rooted using *Rattus* spp.



Figure 5 The amino acid based on KJ530559 *M. cervicolor*, *cytb* gene (500 bp). Dots indicate amino acid identical to the haplotype of *Mus* spp. in this study.

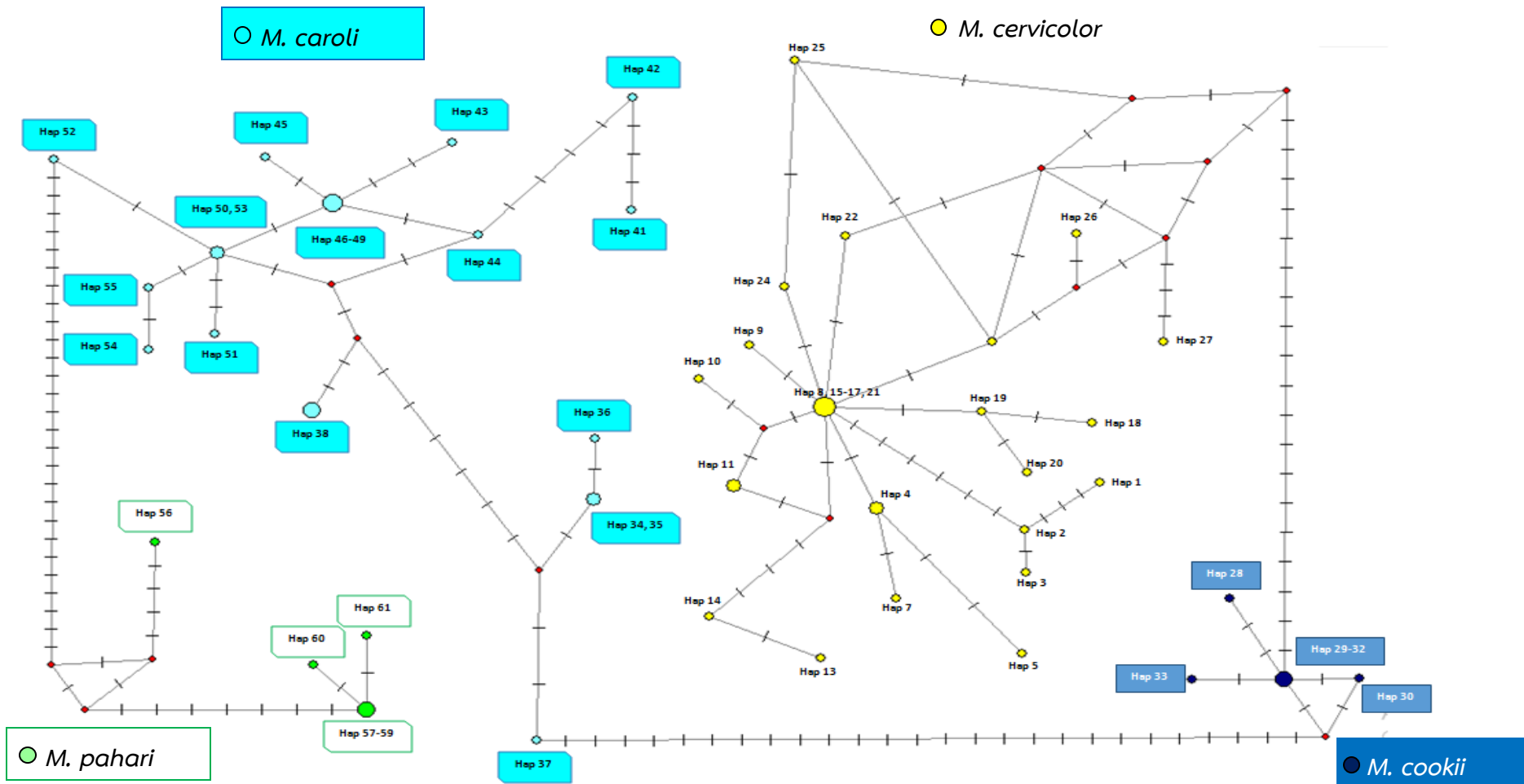


Figure 6 Haplotype network based on partial cytochrome *b* sequences (500 bp) reconstructed by Median-joining analysis (NETWORK 4.6.1.3 program). All haplotypes were plotted on to their sampling areas and haplotypes were represented by circles with diameter proportional to their population size.

