ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer,* Robinson and Kloss 1916) ที่พบในประเทศไทย

Genetic variation of Ricefield Rat (*Rattus argentiventer,* Robinson and Kloss 1916) in Thailand

วิชาญ วรรธนะไกวัล ปราสาททอง พรหมเกิด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์
สมเกียรติ กล้าแข็ง ทรงทัพ แก้วตา
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ ออกแบบ primer จำนวน 2 ชุด โดยชุดแรกออกแบบให้จำเพาะกับหนูนาใหญ่เท่านั้น เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของหนูด้วยเทคนิค PCR ชุดที่สอง ออกแบบ primer ให้ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ เพื่อนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเทคนิค Sequencing โดยที่ primer ชุดที่ออกแบบไว้ใช้ในการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่จำนวน 2 คู่ คือ Multiplex (2 plex) PCR ได้แก่ R.a outer F- R.a outer R และ R.a Inner F - R.a Inner R ซึ่งหนูนาใหญ่จะให้ผลเป็นแถบ DNA 2 แถบ ขนาด 439 และ 179 เบส ขณะที่หนูสปีชีส์อื่นๆ จะมีแถบดีอ็นเอเพียง 1 แถบ ขนาด 439 เบส เท่านั้น จากผลการออกแบบไพร์เมอร์ดังกล่าว เมื่อนำมาทดสอบกับหนูนาใหญ่ที่ดักได้จากธรรมชาติทางจังหวัดในภาคกลางและภาคใต้ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นหนูนาใหญ่และหนูชนิดอื่นมาเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ซึ่งจากผล PCR ที่ได้ต้องทำการถอดรหัสพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ที่ได้มาเพื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-34-56

คำนำ

หนูเป็นศัตรูสำคัญในกระบวนการผลิตพืช-สัตว์และทางการแพทย์ในประเทศไทย หนูสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ตั้งแต่ระยะปลูก ตลอดจนหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ถั่วเหลือง โกโก้ ปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ความเสียหายที่เกิดขึ้นคิดเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี นอกจากการทำลายพืชทางการเกษตรแล้ว หนูยังเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์ และสัตว์เลี้ยงอีกด้วย เช่น กาฬโรค โรคเลปโตสไปโรซีสหรือโรคไข้ฉี่หนู โรค Scrup Thyphus เป็นต้น ด้วยเหตุนี้เองจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยา นิเวศวิทยาและอนุกรมวิธานของหนูเพื่อศึกษาเรียนรู้พฤติกรรมของมันเพื่อนำไปสู่การป้องกันและกำจัด หนูมีการจัดลำดับชั้นดังนี้

Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Class	Mammalia
Order	Rodentia
Family	Muridae (Rat and Mice)

โดยทั่วไปสัตว์ในวงศ์ Muridae จะมีรูปร่างแบบหนู คือ รูปร่างทรงกระบอกและด้านหัวมีทรงแหลม มีสี่ขา หางยาว สูตรของฟันโดยทั่วไป คือ 1/1 ,0/0 , 0/0 , 3/3 = 16 หนูเป็นสัตว์ที่มีวิวัฒนาการมาช้านาน และสามารถแข่งขันกับสัตว์ชนิดอื่นๆในโลกนี้ในการหาอาหารได้เป็นอย่างดี ด้วยเหตุที่ว่า หนูเป็นสัตว์ที่มีสามารถในการปรับตัวเข้ากับถิ่นที่อยู่ (habitat) ที่หลากหลายได้เป็นอย่างดี สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในวงศ์นี้ จึงมีจำนวนชนิดที่มากที่สุดในโลกคิดเป็นร้อยละ 65 ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในอันดับสัตว์ฟันแทะทั้งหมด

ลักษณะที่ใช้จำแนกชนิดของหนูที่ใช้กันทั่วๆไป คือ ลักษณะภายนอก(external characters) เช่น ขนาด น้ำหนัก ลักษณะของขน สี จำนวนเต้านม(เพศเมีย) และอื่นๆ ลักษณะเหล่านี้จะต้องดูจากหนูที่โตเต็มวัยแล้ว เมื่อนำเอาลักษณะต่างๆมาประกอบกันทำให้สามารถจำแนกจำแนกหนูได้ถึงสกุล (genus) หรือชนิด (species)

ส่วนการจำแนกชนิดของหนูที่มีลักษณะใกล้เคียงกันในสกุลเดียวกันทำได้ยาก เช่น หนูในสกุล *Rattus* ทำได้ยากต้องอาศัยลักษณะอื่นๆประกอบ เช่น สัณฐานวิทยาของกะโหลกศีรษะ ลักษณะและขนาดของฟันแทะและฟันกราม เป็นต้น

หนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer*) เป็นศัตรูสำคัญที่สุดในแหล่งปลูกข้าวและธัญพืชอื่นๆ ทางภาคกลางและภาคใต้รวมถึงแหล่งปลูกข้าวในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Lekagul, 1977) แต่เนื่องจากในสภาพตามธรรมชาติในปัจจุบันพบว่า หนูนาใหญ่ในธรรมชาตินั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างและสังคมชีวิตที่พบ ในแหล่งทำการเกษตร หรือในธรรมชาติ ซึ่งลักษณะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมด้านรูปร่างลักษณะ อันเป็นลักษณะที่เกิดจากความแปรปรวนทางอนุกรมวิธานของหนู

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาหาวิธีการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ในระดับพันธุกรรมโดยวิธีทางชีวโมเลกุลเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ร่วมกับการจำแนกจากสัณฐานวิทยาของหนูเพื่อเป็นการยืนยันให้เกิดความถูกต้องเพื่อนำไปเป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานประยุกต์ใช้ในการ

ป้องกันกำจัดหนูนาใหญ่ที่สร้างความเสียหายให้แก่นาข้าว พืชผลทางการเกษตร รวมถึงด้านอนุกรมวิธานและงานวิจัยต่อยอดในด้านอื่นๆต่อไป

ในสภาพตามธรรมชาติในปัจจุบันพบว่า หนูนาใหญ่ในธรรมชาตินั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างและสังคมชีวิตที่พบ ในแหล่งทำการเกษตร หรือในธรรมชาติ ซึ่งลักษณะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมด้านรูปร่างลักษณะ อันเป็นลักษณะที่เกิดจากความแปรปรวนทางอนุกรมวิธานของหนู ความแปรปรวนของลักษณะภายนอกในประชากรหนูนาใหญ่อยู่ภายใต้อิทธิพลของยีนส์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาหาวิธีการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ในระดับพันธุกรรมโดยวิธีทางชีวโมเลกุล เพื่อนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ร่วมกับการจำแนกจากสัณฐานวิทยาของหนูเพื่อเป็นการยืนยันให้เกิดความถูกต้องเพื่อนำไปเป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดหนูนาใหญ่ที่สร้างความเสียหายให้แก่นาข้าว พืชผลทางการเกษตร รวมถึงด้านอนุกรมวิธานและงานวิจัยต่อยอดในด้านอื่นๆต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กรงดักและกรงเลี้ยงเดี่ยวสำหรับหนูนาใหญ่ อาหารหนูและน้ำ
2. ชุด kit สกัดดีเอ็นเอ , ชุด kit PCR , ชุด kit Pure gel , ชุด kit remove dye
3. อุปกรณ์ run gel electrophoresis , ชุดถ่ายรูป gel electrophoresis
4. สารเคมีเตรียม TAE/TBE buffer , Agarose gel , Ethidium bromide (gel star)
5. หม้อนึ่ง Autoclave
6. เครื่อง spindown , microcentrifuge , autopipette
7. กระดาษทิชชูแบบอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อศึกษาเป็นแนวทาง
2. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของยีนต่างๆที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank (data base ของ NCBI) ของหนูนาใหญ่ หนูศัตรูพืชสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และกลุ่มอื่นที่ใกล้เคียงกันเพื่อมาใช้เปรียบเทียบอ้างอิง
3. ออกแบบ primer โดยใช้ลำดับเบสของหนูนาใหญ่ที่มีในฐานข้อมูล Genbank Accession number AB033701 , FR 775875 – 82 , HM217362 – 64 , JN675488 – 94 จำนวน 2 ชุด โดยชุดแรกออกแบบให้จำเพาะกับหนูนาใหญ่เท่านั้น เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของหนูด้วยเทคนิค PCR ชุดที่สอง ออกแบบ primer ให้ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ เพื่อนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเทคนิค Sequencing
4. เก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่ที่คัดเลือกไว้ภาคละจำนวน 3 ตัว เพื่อเป็นตัวแทนของหนูในภูมิภาคนั้นๆ ทั้งตัวอย่างสดที่แช่แข็งที่ อุณหภูมิ -70°C และตัวอย่างแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เช่น กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ ไต ปลายหู และปลายหาง
5. สกัดดีเอ็นเอของหนูนาใหญ่ด้วยเทคนิค Phenol extraction/Alcohol precipitation DNA ทั้งจากธรรมชาติและในห้องปฏิบัติการโดยเลือกตัวอย่างหนูนาใหญ่ให้ครบทุกภูมิภาคในประเทศไทยเพื่อเป็นตัวแทนในแต่ละภาคของประเทศด้วยวิธีการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้นแล้วเก็บ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ อุณหภูมิ -20 หรือ -70°C

6. ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ ที่พบภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย โดยวิธี Multiplex (2 plex) PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนของ ไซโตโครม บี จำนวน 2 คู่ มีลำดับเบสดังนี้

Multiplex (2 plex) PCR

R.a outer F 5’ ACA GCA TTC TCA TCA GTT ACT C

R.a outer R 5’ GTT GTT TGA TCC TGT TTC GTG

R.a Inner F 5’ GAT ATT TAC ACG CCA ACG GG

R.a Inner R 5’ GAT TAC GGT GGC TCC TCA A

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ul ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของหนูนาใหญ่ 2ul ผสมกับ 5x PCR buffer , 10mM dNTPs , เอนไซม์ Hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพร์เมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 20 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ($^{\circ}$c)	เวลา(นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (Initial Denaturing)	98	30 วินาที
2. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Denaturing)	98	30 วินาที
3. ไพร์เมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing)	55	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Extension)	72	45 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ รอบสุดท้าย (Final Extension)	72	5 นาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 40 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 $^{\circ}$c นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 5 ul มาผสมกับ loading dye ปริมาณ 1 ul จากนั้นทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5% อะกาโรสใน 0.5xTAE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 135 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมดีเอ็นด้วยเอธิเดียมโบรไมด์หรือสีย้อม Syber green dye ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

7. วิเคราะห์ผลลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้จากหนูนาใหญ่แต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA 5 วิเคราะห์ค่า Bootstrap และนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวอย่างหนูนาใหญ่ในประเทศไทยแต่ละตัวอย่างกับหนูนาใหญ่และหนูชนิดอื่นๆที่มีในฐานข้อมูล Genbank ด้วย Maximum likely hood แล้วจัดทำ Phylogenetic tree เพื่อศึกษาความหลากหลาย ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น รวมไปถึงการกระจายตัวของหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทย

8. วิเคราะห์ผลลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับผลข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของหนูนาใหญ่แล้วนำมาสรุปเป็นผลการทดลองที่ได้

เวลาและสถานที่

เก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่จากธรรมชาติระหว่างเดือนตุลาคม 2555 - กันยายน 2556 บริเวณภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย และปฏิบัติการทางชีวโมเลกุลภายในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการออกแบบ primer ที่ใช้จำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ ให้ต่างจากหนูชนิดอื่นๆนั้น primer ชุดที่ออกแบบไว้ใช้ในการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่จำนวน 2 คู่ Multiplex (2 plex) PCR ได้แก่ R.a outer F- R.a outer R และ R.a Inner F - R.a Inner R ซึ่งหนูนาใหญ่จะให้ผลเป็นแถบ DNA 2 แถบ ขนาด 439 และ 179 เบส ขณะที่หนูสปีชีส์อื่นๆ จะมีแถบดีอ็นเอเพียง 1 แถบ ขนาด 439 เบส เท่านั้น จากผลการออกแบบไพร์เมอร์ดังกล่าวเมื่อนำมาทดสอบกับหนูนาใหญ่ที่ดักได้จากธรรมชาติทางจังหวัดในภาคกลางและภาคใต้ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นหนูนาใหญ่และหนูชนิดอื่นมาเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ซึ่งจากผล PCR ที่ได้ต้องทำการถอดรหัสพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ที่ได้มาเพื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป เนื่องจากผลจาก PCR ที่ได้มาเป็นเพียงการยืนยันการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ร่วมกับการจำแนกทางสัณฐานวิทยาเท่านั้น ดังนั้นต้องมีการศึกษาถึงรหัสพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ที่ได้มาจากธรรมชาติเพื่อบ่งบอกถึงความหลายหลายทางพันธุกรรมอันเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกได้ การทดลองงานวิจัยนี้ยังไม่สิ้นสุด ยังต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไปอีก

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณสมเกียรติ กล้าแข็ง นักสัตววิทยาปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยเก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่จากธรรมชาติเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ทรงทัพ แก้วตา , 2553 ศึกษาความแปรปรวนของลักษณะภายนอกในประชากรหนูนาใหญ่ *Rattus argentiventer. ใน* เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร. หน้า 80-83

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ,2545 . จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี ,ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 115 หน้า

Chaval, Y., M. Pages, V. Herbreteau, S. Waengsothorn, J.F. Cosson, J.P. Hugot, S. Morand and J. Michaux. 2009. A Multi – Approach Survey as the most Reliable Tool to Accurately Assess Biodiversity : an Example of Thai Murine Rodents . Kasetsart Journal. 44 : 590-603.

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.

Lecompte , E. , K. Aplin, C. Denys, F. Catzeflis, M. Chades and P. Chevret. 2005. Confrontation of morphological and molecular data : The Praomys group (Rodentia ,Murinae) as a case of adaptive convergences and morphological stasis. Molecular Phylogenetics and Evolution. 37: 899-919.

Lekagul, B. and A.M.Jeffery. 1977. Mammal of Thailand. Printed at Kurusapha Ladprao Press by Nai kamthon Sathirakul, Bangkok. 758 p.

Martin, Y. 1999 Molecular Phylogeny of European Muroid Rodents Based on Complete Cytochrome b Sequences . Molecular Phylogenetics and Evolution. 16: 37-47.

Martin, M., G. Gerlach, C. Schlotterer and A. Meyer. 2007. Detection of cat, dog and rat or mouse tissues in food and animals feed using species-specific polymerease chain reaction. Journal of Anim Science. 85: 2734-2739.

Meyer, J., A. Kohnen, R. Harf, G. Froeschke and R. Brandl. 2006. Molecular markers for some small mammals of southern Africa . Folia Zoology. 55: 444 - 447.

Rad, S.A., R. Jalal, J. Darvish and M.M. Matin. 2008. Identification of three Iranian species of the genus *Rattus* (Rodentia , Muridae) using a PCR-RFLP technique on mitochondrial DNA. The Italian Journal of Mammalogy 20: 69-77.

Tucker, P.K., S.A. Sandstedt and B.L. Lundrigan. 2003 . Phylogetic relationships in the subgenus *Mus* (genus *Mus* , family Muridae ,subfamily Murinae) : examining gene trees and species trees . Biology journal of the Linnean Society. 84, 653-662.