รายงานการวิจัย

ประจำปีงบประมาณ 2561

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

(ภาษาไทย) สถานภาพและการใช้ทรัพยากรของค้างคาวคุณกิตติ *Craseonycteris thonglongyai*

(ภาษาอังกฤษ) Status and resource utilization of Kitti's hog-nosed bat *Craseonycteris thonglongyai*

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย งามประเสริฐวงศ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาจอง ประทัตสุนทรสาร

นายพชรพล จุ่มศรี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่แล้วเสร็จ

พุทธศักราช 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2561 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ กองการเกษตรและสหกรณ์ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา และหน่วยยานพาหนะและซ่อมบำรุง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

ค้างคาวกินแมลงมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศในการควบคุมประชากรแมลงในธรรมชาติ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบอาหารของค้างคาวคุณกิตติจากมูลค้างคาวที่เก็บจากถ้ำพระ ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของแมลง และใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลง (ZBJ-ArtF1c และ ZBJ-ArtR2c) ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ผลจากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค next-generation sequencing (NGS) พบว่า อาหารของค้างคาวคุณกิตติส่วนใหญ่เป็นแมลงในอันดับผีเสื้อ (Lepidoptera) ในวงศ์ Noctuidae, Hyblaeidae, Geometridae, Depressariidae และ Oecophori นอกจากนั้นยังประกอบด้วยแมลงจำพวกจิ้งหรีด (อันดับ Orthoptera วงศ์ Gryllidae) และมวนง่าม (อันดับ Hemiptera วงศ์ Pentatomidae) ซึ่งพบว่าแมลงบางชนิดนั้นจัดว่าเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ เช่น ผีเสื้อกินใบสัก *Hyblaea puera* ดังนั้นค้างคาวคุณกิตติแมลงจึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในธรรมชาติอีกด้วย

คำสำคัญ : อาหาร ค้างคาวคุณกิตติ แมลงศัตรูพืช ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Abstract

Insectivorous bats play an important role in ecosystem as insect controller. In this study, diet composition of Kitti's hog-nosed bats at Phra cave in the area of Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, Sai Yok district, Kanchanaburi province was investigated using DNA barcode to identify the insect groups from their faeces. The cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using insect-specific primers (ZBJ-ArtF1c and ZBJ-ArtR2c). Results from the next-generation sequencing (NGS) revealed that Kitti's hog-nosed bats prey mainly on insects in order Lepidoptera which composed of many families such as Noctuidae, Hyblaeidae, Geometridae, Depressariidae and Oecophoridae. Other insects like crickets (Orthoptera: Gryllidae) and stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) were also found in bat diets. Some insect pests e.g. *Hyblaea puera*, a native moth considered as one of the major teak pests, could be identified from this study. This highlights the role of this bat species as not only an insect controller but also a pest controller in ecosystem.

Keywords : diets, Kitti's hog-nosed bat, insect pest, DNA barcode

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	8
ขอบเขตการวิจัย	8
วิธีดำเนินการวิจัย	9
ผลและอภิปรายผลการศึกษา	11
สรุปผลการศึกษา	15
ข้อเสนอแนะ	15
เอกสารอ้างอิง	16
ภาคผนวก	17
ประวัตินักวิจัย	20

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	Molecular operational taxonomic unit (MOTU) ของแมลงที่เป็นอาหารของค้างคาวคุณกิตติในพื้นที่ศึกษา	11

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	มูลค้างคาวคุณกิตติบนพื้นถ้ำพระ	10
ภาพที่ 2	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงที่เป็นอาหารของค้างคาวคุณกิตติ	14

บทนำ

พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ผืนป่าตะวันตก เขาวังเขมร และแปลง 905 ในอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี มีลักษณะภูมิประเทศที่เป็นเชิงเขาและที่ราบบนเขา มีความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลางไม่เกิน 560 เมตร สภาพภูเขาเป็นเขาหินปูน มีแม่น้ำแควน้อยไหลผ่าน จัดเป็นพื้นที่ประกอบด้วยถิ่นอาศัยที่หลากหลาย และยังคงมีป่าที่มีสภาพที่ค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ แม้ว่าพื้นที่บางส่วนจะเป็นเขตที่มีราษฎรอาศัยอยู่ทั่วไป จากการศึกษาที่ผ่านมาถือได้ว่าพื้นที่บริเวณนี้มีทรัพยากรสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย มีสัตว์ที่หาพบได้ยากหลายชนิด เช่น ค้างคาวคุณกิตติ และนกเงือกกรามช้าง สมควรอย่างยิ่งที่จะต้องอนุรักษ์พื้นที่บริเวณนี้ไว้ ซึ่งการบริหารจัดการและอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ อย่างยั่งยืนจำเป็นต้องอาศัยองค์ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับทรัพยากรต่างๆ ในพื้นที่ ซึ่งรวมถึงข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของทรัพยากรสิ่งมีชีวิต ลักษณะถิ่นอาศัย และนิเวศวิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

ค้างคาวคุณกิตติ (*Craseonycteris thonglongyai*) ถูกพบเป็นครั้งแรกที่จังหวัดกาญจนบุรีโดยคุณกิตติ ทองลงยา ซึ่งเป็นค้างคาวเพียงชนิดเดียวในวงศ์ Craseonycteridae โดยค้างคาวคุณกิตติเป็นค้างคาวที่มีขนาดเล็กมาก มีน้ำหนักตัวประมาณ 2 กรัม ความยาวลำตัวประมาณ 29-33 มิลลิเมตร มีจมูกลักษณะบวมโตคล้ายหมู ใบหูขนาดใหญ่ ติ่งใบหูเล็ก และไม่มีหาง ค้างคาวคุณกิตติจัดเป็นเป็นสัตว์ที่พบเฉพาะถิ่น (endemic species) โดยจะพบเฉพาะในผืนป่าตะวันตกของประเทศไทย และในพื้นที่ด้านตะวันออกของสหภาพเมียร์ม่าร์เท่านั้น ปัจจุบันค้างคาวคุณกิตติมีสถานภาพเป็นสัตว์คุ้มครอง ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 และถูกจัดอยู่ในสภาวะเสี่ยงต่อการใกล้สูญพันธุ์ตามบัญชีรายชื่อ The IUCN red list of threaten species (Bumrungsri et al., 2006; Lekagul & McNeely. 1977)

ค้างคาวคุณกิตติเป็นค้างคาวที่กินแมลงเป็นอาหาร โดยจะใช้เวลาส่วนใหญ่เกาะนอนในถ้ำ และบินออกหากินในเวลากลางคืนเป็นช่วงสั้นๆ 2 ครั้งคือในช่วงเช้ามืดและช่วงเวลาพลบค่ำ โดยใช้เวลาประมาณครึ่งชั่วโมงถึงหนึ่งชั่วโมงในแต่ละครั้ง ค้างคาวคุณกิตติจะมีเส้นทางหากินประจำ (flight path) และกินแมลงในที่โล่งใกล้เรือนยอดไม้ซึ่งอยู่ในรัศมี 1 กิโลเมตรจากแหล่งอาศัย (Duangkhae, 1990) จากการศึกษาแมลงที่เป็นอาหารของค้างคาวคุณกิตติ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสองตาในการจำแนกกลุ่มแมลงจากลักษณะสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนที่หลงเหลืออยู่ในมูลค้างคาว พบว่าอาหารส่วนใหญ่เป็นผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera และแมลงปีกแข็งในอันดับ Coleoptera (กัลยาณี บุญเกิด และคณะ, 2544; 2548) ต่อมามีการใช้เทคนิคเชิงชีวโมเลกุลมาระบุชนิดแมลงจากมูลค้างคาว ด้วยยีน Cytochrome C oxidase subunit I (*COI*) ซึ่งลำดับดีเอ็นเอมีความผันแปรมากทำให้สามารถแยกความแตกต่างของแมลงชนิดที่มีความใกล้เคียงกันได้ นอกจากนี้ยีน *COI* ยังเป็นยีนที่มีข้อมูลในฐานข้อมูลอ้างอิงมากทำให้ง่ายในการระบุและจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต โดย ปภาวี ลิขิตเดชาโรจน์ (2555) ได้ใช้เทคนิคเชิงชีวโมเลกุลในการศึกษาชนิดแมลงที่เป็นอาหารของค้างคาวคุณกิตติ โดยทำการเพิ่มปริมาณยีน *COI* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymease Chain Reaction) และใช้การโคลนยีน (cloning) เพื่อแยกลำดับดีเอ็นเอของยีน *COI* ของแมลงแต่ละชนิดออกจาก

กันก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ พบแมลงในอันดับ Lepidoptera, Diptera และ Ephemeroptera ในมูลของค้างคาว และในปัจจุบันมีการนำเทคนิค Next generation sequencing (NGS) ซึ่งวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอได้รวดเร็วกว่าและมีราคาถูกกว่าวิธีการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอแบบเดิมมาใช้ในการระบุชนิดแมลงที่เป็นอาหารของค้างคาวกินแมลงหลายชนิด (Czenze et al., 2018; Mata et al., 2016)

การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาองค์ประกอบอาหารของค้างคาวคุณกิตติในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ในพื้นที่เขาวังเขมร และแปลง 905 อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้เทคนิค Next generation sequencing (NGS) ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเสริมสร้างความรู้ทางด้านการใช้ทรัพยากรของค้างคาวคุณกิตติในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ และสามารถนำมาใช้ประเมินสถานภาพความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ และวางแผนในการอนุรักษ์ค้างคาวคุณกิตติในพื้นที่ดังกล่าวได้อย่างเหมาะสมและยั่งยืน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสนองพระราชดำริ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบอาหารของค้างคาวคุณกิตติในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ
3. เพื่อประเมินสถานภาพของค้างคาวคุณกิตติในพื้นที่ศึกษา และเสนอแนะแนวทางในการอนุรักษ์

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาองค์ประกอบอาหารของค้างคาวคุณกิตติในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ในพื้นที่เขาวังเขมร และแปลง 905 อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี
2. ศึกษาองค์ประกอบอาหารของค้างคาวคุณกิตติจากการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส mitochondrial DNA บริเวณ cytochrome C oxidase subunit I โดยใช้เทคนิค Next generation sequencing (NGS)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างมูลค้างคาวคุณกิตติ

ทำการเก็บตัวอย่างมูลค้างคาวคุณกิตติจากถ้ำพระ ซึ่งเป็นแหล่งเกาะนอนของค้างคาวคุณกิตติ (ภาพที่ 1) โดยเลือกเก็บเฉพาะมูลที่ใหม่เท่านั้น โดยสังเกตจากสีและลักษณะเนื้อของมูล ตัวอย่างมูลที่ได้จะถูกบรรจุอยู่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Lysis buffer 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำมาสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสในห้องปฏิบัติการ

สกัดดีเอ็นเอจากมูลของค้างคาว โดยใช้ AccuPrep® Stool Genomic DNA Extraction Kit (ภาคผนวก) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนบริเวณเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยในการศึกษาครั้งนี้จะใช้การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส mitochondrial DNA บริเวณ cytochrome C oxidase subunit I (*COI*) โดยใช้ forward primer: Overhang ZBJ-ArtF1c (5’ TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG AGA TAT TGG AAC WTT ATA TTT TAT TTT TGG 3’) และ reverse primer Overhang ZBJ-ArtR2c (5’ GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GWA CTA ATC AAT TWC CAA ATC CTC C 3’) (Zeale et al., 2011) หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งค่าโปรแกรมดังนี้

1) เริ่มต้นด้วยการแยกสายดีเอ็นเอ (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2) จากนั้นแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
3) ลดอุณหภูมิให้ primer เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
4) เพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจาก primer (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ทำทั้งสิ้น 35 รอบ
5) ตั้งค่าอุณหภูมิสุดท้ายเพื่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

ทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและขนาดของ PCR product ที่ได้ ด้วยวิธี Gel electrophoresis จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด AccuPrep® PCR Purification Kit (ภาคผนวก) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ (OMICS) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการศึกษา

นำผลการวิเคราะห์ NGS ที่ได้มาประมวลผลโดยใช้โปรแกรม Geneious (Kearse et al., 2012) โดยจะได้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *COI* ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ซึ่งจะถูกนำมาจัดกลุ่มเป็น molecular operational taxonomic unit (MOTU) เดียวกันเมื่อมีความเหมือนกัน (similarity criteria) มากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์ (Clare et al., 2016) และใช้ฐานข้อมูล Genbank ช่วยในการจำแนกชนิดและ/หรือระบุอันดับของแต่ละ MOTU เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

ภาพที่ 1 มูลค้างคาวคุณกิตติบนพื้นถ้ำพระ

ผลและอภิปรายผลการศึกษา

จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค next generation sequencing (NGS) พบสารพันธุกรรมของแมลงจากตัวอย่างมูลค้างคาวคุณกิตติรวมทั้งสิ้น 3064 sequences โดยแบ่งกลุ่มออกได้เป็น 12 MOTU (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1) และจัดกลุ่มอยู่ใน 3 อันดับ ได้แก่

1. อันดับ Lepidoptera (แมลงในกลุ่มผีเสื้อ)

   พบมากที่สุด โดยพบทั้งสิ้น 3,031 sequences (98.9%) ประกอบด้วย MOTU1, MOTU2, MOTU3, MOTU4, MOTU5, MOTU6 และ MOTU7 จัดอยู่ในวงศ์ Noctuidae, Hyblaeidae, Geometridae, Depressariidae และ Oecophori
2. อันดับ Hemiptera (แมลงในกลุ่มมวน)

   พบทั้งสิ้น 4 sequences (0.1%) ประกอบด้วย MOTU8 จัดอยู่ในวงศ์ Pentatomidae
3. อันดับ Orthoptera (แมลงในกลุ่มจิ้งหรีด)

   พบทั้งสิ้น 29 sequences (0.9%) ประกอบด้วย MOTU9, MOTU10, MOTU 11 และ MOTU12 จัดอยู่ในวงศ์ Gryllidae

ตารางที่ 1 Molecular operational taxonomic unit (MOTU) ของแมลงที่เป็นอาหารของค้างคาวคุณกิตติในพื้นที่ศึกษา

Order	Family	Species	Taxa	จำนวน sequence ที่พบ
Lepidoptera	Noctuidae	Unknown	MOTU1	20
	Noctuidae	Unknown	MOTU2	2900
	Hyblaeidae	*Hyblaea puera*	MOTU3	50
	Geometridae	*Thalassodes pilaria*	MOTU4	31
	Depressariidae	*Antaeotricha* sp.	MOTU5	12
	Depressariidae	*Antaeotricha* sp.	MOTU6	10
	Oecophori	*Radara* sp.	MOTU7	8
Hemiptera	Pentatomidae	*Halyomorpha halys*	MOTU8	4
Orthoptera	Gryllidae	*Gryllidae* sp.	MOTU9	4
	Gryllidae	*Anaxipha* sp.	MOTU10	8
	Gryllidae	*Anaxipha* sp.	MOTU11	5
	Gryllidae	*Anaxipha* sp.	MOTU12	12

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MOTU ต่างๆ เป็นดังนี้

MOTU1:

AATTTGAGCAGGTATAGTAGGAACTTCATTAAGATTATTAATTCGAGCAGAATTAGGTAATCCCGGTTC
ATTAATTGGTGATGATCAAATTTACAATACAATTGTTACTGCCCATGCTTTTATTATAATTTTTTTCATG
GTTATACCAATTATAATT

MOTU2:

AATTTGAGCAGGTATAGTAGGAACTTCATTAAGATTATTAATTCGAGCAGAATTAGGTAATCCCGGTTC
ATTAATTGGTGATGACCAAATCTACAATACAATTGTTACTGCCCATGCTTTTATTATAATTTTTTTCATG
GTTATACCAATTATAATT

MOTU3:

AATTTGAGCAGGAATAGTAGGAACATCTTTAAGTCTTTTAATTCGAGCAGAATTAGGTAATCCAGGATC
ATTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATACAATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATA
GTAATACCAATTATAATT

MOTU4:

TATTTGAGCAGGAATAATTGGAACTTCTTTAAGTTTATTAATTCGAGCTGAATTAGGAAATCCAGGATC
ATTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATACTATTGTAACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATA
GTTATACCAATTATAATT

MOTU5:

AATTTGAGCAGGAATAGTAGGAACTTCTCTTAGTTTACTTATTCGAGCTGAATTAGGAAACCCTGGATC
ATTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATACTATTGTTACAGGTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATA
GTTATACCTATTATAATC

MOTU6:

AATTTGAGCAGGAATAGTTGGAACTTCTTTAAGATTATTAATTCGAGCTGAATTAGGAAATCCAGGATC
TTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATACTATTGTCACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATA
GTAATACCTATTATAATT

MOTU7:

TATTTGAGCAGGAATAGTAGGAACTTCTTTAAGATTATTAATTCGAGCTGAACTTGGTAATCCTGGATC
TTTGATTGGAGATGATCAAATTTATAATACTATTGTAACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATA
GTTATACCTATTATAATT

MOTU8:

AATATGAGCAGGAATAGTAGGATCAGCTATAAGATTAATTATCCGTATTGAATTAGGACAACCCGGAAG
ATTTATTGGAAATGATCAGATTTATAATGTAATTGTAACAGCACATGCATTTGTAATAATTTTCTTTATA
GTAATACCAATTATAATT

MOTU9:

AGCATGGGCAGGAATAGTAGGAACATTATTATGTATGTTAATTCAACTAGAATTAGGTCAACCTGGATC
TTTAATTAGAAATGATAAAATGTATAATGTTACTGTTACCGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTTTT-
ATAGTTATACCGATCATAATT

MOTU10:

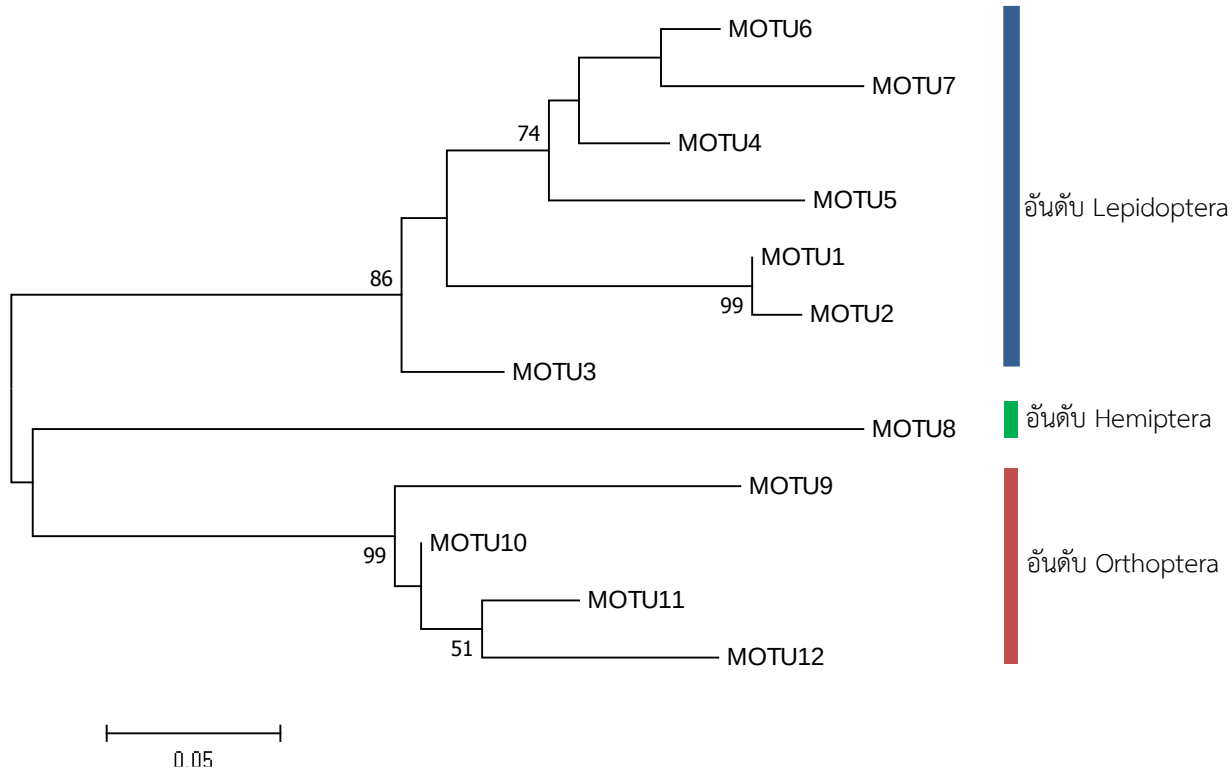
AGCATGGGCTGGAATAGTGGGAACATCATTAAGTATATTAATTCGACTAGAATTAGGTCAACCTGGATC
TTTAATTGGAAATGATCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTTTTTATA
GTTATACCAATTATAATT

MOTU11:

AGCATGGGCTGGAATAGTGGGAACATCGTTTAGTATATTAATTCGACTAGAACTAGGTCAACCTGGATC
TTTAATTGGAAAKGATCAAATTTATAGTGTTATTGTTACTGCCCATGCTTTCGTAATAATTTTTTTTAWA
GTTATACCAATTGTAATT

MOTU12:

AGCATGGGCTGGAATAGTAGGGACATCTTTAAGTATATTAATTCGACTAGAACTAGGTCAACCCGGATC
TTTAATTGGAAATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACCACCCACGCTTTCGTAATAGTTTTTTTTACA
GTTATACCAATTATAATT



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงที่เป็นอาหารของค้างคาวคุณกิตติ

การศึกษาครั้งนี้สามารถระบุชนิดแมลงที่เป็นอาหารของค้างคาวคุณกิตติได้ในระดับ species จำนวน 3 ชนิด คือ ผีเสื้อกลางคืน *Thalassodes pilaria*, ผีเสื้อกินใบสัก *Hyblaea puera* และ มวนง่าม *Halyomorpha halys* ซึ่งสองชนิดหลังจัดได้ว่าเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ

สรุปผลการศึกษา

อาหารของค้างคาวคุณกิตติส่วนใหญ่เป็นแมลงในอันดับผีเสื้อ (Lepidoptera) ในวงศ์ Noctuidae, Hyblaeidae, Geometridae, Depressariidae และ Oecophori นอกจากนั้นยังประกอบด้วยแมลงจำพวกจิ้งหรีด (อันดับ Orthoptera วงศ์ Gryllidae) และมวนง่าม (อันดับ Hemiptera วงศ์ Pentatomidae) ซึ่งพบว่าแมลงบางชนิดนั้นจัดว่าเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ เช่น ผีเสื้อกินใบสัก *Hyblaea puera* ดังนั้นค้างคาวคุณกิตติแมลงจึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในธรรมชาติอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

แนวทางการวิจัยต่อไปควรทำการศึกษาเพิ่มเติมให้มีตัวอย่างมากขึ้นเพื่อให้เป็นตัวแทนที่ดีในแต่ละช่วงเวลาการศึกษา และแม้ว่าข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้น แต่ได้บ่งชี้ถึงบทบาทของค้างคาวคุณกิตติที่สำคัญต่อระบบนิเวศในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด จึงควรมีการวางแผนการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี บุญเกิด, ศันสนีย์ อมรภูรินันท์ และไสว วังหงษา. 2544. นิสัยการกินอาหารของค้างคาวกินแมลงบางชนิด. ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้าของงานวิจัยประจำปี 2543: 1-22.

กัลยาณี บุญเกิด, ศันสนีย์ อมรภูรินันท์ และไสว วังหงษา. 2548. นิสัยการกินอาหารของค้างคาวคุณกิตติ (*Craseonycteris thonglongyai*). ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2547: 23-35.

ปภาวี ลิขิตเดชาโรจน์. 2555. วิเคราะห์อาหารของค้างคาวคุณกิตติ (*Craseonycteris thonglongyai*) โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด. โครงการวิจัยระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

Bumrungsri, S., Harrison, D.L., Satasook, C., Prajukjitr, A., Thong-Aree, S. and Bates, P.J.J. 2006. A review of bat research in Thailand with eight new species records for the country. Acta Chiropterologica 8: 325-360.

Clare, E. L., Chain, F. J. J., Littlefair, J. E., Cristescu, M. E., and Deiner, K. 2016. The effects of parameter choice on defining molecular operational taxonomic units and resulting ecological analyses of metabarcoding data. Genome 59: 981–990.

Duangkhae, S. 1990. Ecology and behavior of Kitti's hog-nosed bat (*Craseonycteris thonglongyai*) in Western Thailand. The Natural History Bulletin of the Siam Society 38: 135-161.

Lekagul, B. and McNeely, J.A. 1977. Mammals of Thailand. Association for the Conservation of Wildlife, Bangkok.

Mata, A. V., Amorim, F., Corley, M. F. V., McCracken, G. F., Rebelo, H. and Beja, P. 2016. Female dietary bias towards large migratory moths in the European free-tailed bat (*Tadarida teniotis*). Biology Letters 12: 1-5

Zeale, M.R.K., Bultin, R.K., Barker, A.G., Lees, D.C. and Jones, G. 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. Molecular Ecology Resource 11: 236-244.

ภาคผนวก

<u>การสกัดดีเอ็นเอจากมูลของค้างคาว (DNA extraction from stool samples)</u>

สกัดดีเอ็นเอจากมูลของค้างคาว โดยใช้ AccuPrep® Stool Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea) ตามขั้นตอนในคู่มือดังนี้

1) นำหลอดที่บรรจุตัวอย่างมูลของค้างคาวและ Lysis buffer มาเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที
2) นำ sample mixture มา centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นทำการแยกบริเวณที่เป็นส่วนใสของ sample mixture ย้ายไปยังหลอดบรรจุสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3) เติม Binding buffer (ST) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดบรรจุสารที่มีส่วนใส จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที
4) เติม Isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และทำการ vortex เป็นระยะเวลาประมาณ 5 วินาที
5) นำ binding column มาประกอบกับหลอดบรรจุสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเทสารละลายลงใน binding column
6) ปิดฝา binding column และนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที
7) ทำการย้าย binding column ไปยังหลอดบรรจุสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติม Washing buffer 1 (W1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน binding column แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที
8) ทำการย้าย binding column ไปยังหลอดบรรจุสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสาร Washing buffer 2 (W2) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที
9) ทำการ centrifuge อีกครั้ง ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด ethanol ออกให้หมด
10) ทำการย้าย binding column ไปยังหลอดบรรจุสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสาร Elution buffer (EL) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นรอเป็นระยะเวลา 5 นาที และนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที เพื่อชะล้างดีเอ็นเอที่อยู่ใน membrane ของ binding column
11) ทำการเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

<u>การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (DNA purification)</u>

ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer, Korea) โดยทำตามขั้นตอนในคู่มือดังนี้

1) เติม PCR Binding buffer ประมาณ 5 เท่า ของปริมาตร PCR product นำ ไป vortex เป็นระยะเวลาประมาณ 5 วินาที
2) ทำการเท mixture ที่ได้ลงใน binding column และนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที
3) เทสารละลายที่ผ่านตัวกรองของ binding column ทิ้ง จากนั้นทำการประกอบ binding column ลงไปในหลอดบรรจุสารขนาด 2 มิลลิลิตร
4) เติม Binding buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงบน binding column จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที
5) เทสารละลายที่ผ่านตัวกรองของ binding column ทิ้ง จากนั้นทำการประกอบ binding column ลงไปในหลอดบรรจุสารขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม Binding buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อีกครั้งแล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที
6) เทสารละลายที่ผ่านตัวกรองของ binding column ทิ้ง จากนั้นทำการประกอบ binding column ลงไปในหลอดบรรจุสารขนาด 2 มิลลิลิตร
7) ทำให้ binding column แห้งด้วยการนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นทำการย้าย binding column ไปยังหลอดบรรจุสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร
8) เติม Buffer 3 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บริเวณตรงกลางของ binding column จากนั้นรอเป็นระยะเวลา 1 นาที
9) ชะดีเอ็นเอที่อยู่ใน binding column โดยการนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที
10) นำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ธงชัย งามประเสริฐวงศ์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Thongchai Ngamprasertwong

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100800234387

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
โทรศัพท์ 02-2185375 โทรสาร 02-2185386

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ประเทศ
2541	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)	วิทยาศาสตร์ทั่วไป	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2544	ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)	สัตววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2551	ปริญญาเอก	Doctor of Philosophy (Ph.D.)	Zoology	University of Aberdeen	UK

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

นิเวศวิทยา

7. ผลงานวิจัย

7.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (ย้อนหลัง 5 ปี)

1. Ngamprasertwong, T., Piertney, S. B., Mackie, I. K., and Racey, P. A. 2014. Roosting habits of Daubenton's bat (*Myotis daubentonii*) during reproduction differs between adjacent river valleys. Acta Chiropterologica 16(2): 337-347.
2. Prakobkarn, A., Thirakhupt, K., and Ngamprasertwong, T. 2016. Sexual dimorphism and geographic variation of *Calotes versicolor* (Squamata: Agamidae) in northern and southern Thailand. Agriculture and Natural Resources 50(6): 474-482.

7.2 บทความ

1. -

7.3 หนังสือ

1. ธงชัย งามประเสริฐวงศ์, กษิดิศ ริสอน, จิตรทิวัส พรประเสริฐ และ พชรพล จุ่มศรี. 2560. ค้างคาวบริเวณเขาถ้ำเสือ-เขาจำปา. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ. 64 หน้า.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) อาจอง ประทัตสุนทรสาร

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Art-ong Pradatsundarasar

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
โทรศัพท์ 02-2185375 โทรสาร 02-2185386

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ประเทศ
2520	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)	ชีววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2525	ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)	สัตววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2537	ปริญญาเอก	Doctor of Philosophy (Ph.D.)	Ecology	University of Aberdeen	UK

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

นิเวศวิทยา

7. ผลงานวิจัย

7.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (ย้อนหลัง 5 ปี)

1. Bundhitwongrut, T., Thirakhupt, K., and Pradatsundarasar, A. 2014. Population ecology of the land hermit crab *Coenobita rugosus* (Anomura, Coenobitidae) at Cape Panwa, Phuket island, Andaman coast of Thailand. Natural History Bulletin of Siam Society 60(1): 31-51.
2. Lerdsuchatavanich, P., Pradatsundarasar, A., Pattanakiat, S., and Utarasakul, T. 2016. Ecotourism is a significant tool for sustainable tourist attraction: a case study of Khao Krajome, Ratchaburi Province, Thailand. Journal of Environmental Management and Tourism (Volume VII, Fall), 3(15): 481-492.

7.2 บทความ

1. -

7.3 หนังสือ

1. -

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) พชรพล จุ่มศรี

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Patcharapon Jumsri

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 1200900162216

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นิสิตปริญญาโท

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท ปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

โทรศัพท์ 02-2185375 โทรสาร 02-2185386

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ประเทศ
2559	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)	ชีววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

นิเวศวิทยา

7. ผลงานวิจัย

7.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (ย้อนหลัง 5 ปี)

1. -

7.2 บทความ

1. **-**

7.3 หนังสือ

1. ธงชัย งามประเสริฐวงศ์, กษิดิศ ริสอน, จิตรทิวัส พรประเสริฐ และ พชรพล จุ่มศรี. 2560. ค้างคาวบริเวณเขาถ้ำเสือ-เขาจำปา. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ. 64 หน้า.