R250008

RECEIVED
BY [illegible] DATE 5/9/51

# รายงานฉบับสมบูรณ์

**โครงการวิจัย การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม**

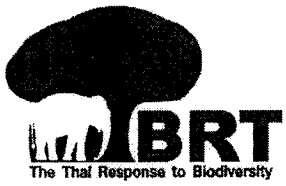
**(*Hipposideros halophyllus*) สัตว์ประจำถิ่นของไทย**

**(The study of genetic diversity in roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*),**

**a Thai endemic mammal)**

**โดย ผศ.ดร. กนกพร ไตรวิทยากร และคณะ**

มิถุนายน พ.ศ. 2551




# รายงานฉบับสมบูรณ์

**โครงการวิจัย การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม**

**(*Hipposideros halophyllus*) สัตว์ประจำถิ่นของไทย**

**(The study of genetic diversity in roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*),**

**a Thai endemic mammal)**

**โดย ผศ.ดร. กนกพร ไตรวิทยากร และคณะ**

มิถุนายน พ.ศ. 2551

# รายงานฉบับสมบูรณ์

**โครงการวิจัย การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม**

**(*Hipposideros halophyllus*) สัตว์ประจำถิ่นของไทย**

**(The study of genetic diversity in roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*),**

**a Thai endemic mammal)**


| คณะผู้วิจัย | สังกัด |
|---|---|
| 1. ผศ.ดร. กนกพร ไตรวิทยากร | สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. นายสุรชิต แวงโสธรณ์ | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว) |



**สนับสนุนโครงการโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้**

**และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT)**

# กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการนี้ ขอบคุณสถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้ความอนุเคราะห์อำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้ คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการนี้จะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการอนุรักษ์ค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม ซึ่งเป็นสัตว์ประจำถิ่นที่พบเฉพาะในประเทศไทย อย่างยั่งยืนต่อไป

**บทคัดย่อ**

การศึกษาวิจัยโครงการนี้ เป็นการศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม ซึ่งเป็นสัตว์ประจำถิ่นของประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่ออกแบบจากดีเอ็นเอของค้างคาวชนิดอื่นที่ได้มีรายงานในฐานข้อมูล โดยการศึกษานั้น ได้ทำการสุ่มจับตัวอย่างค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มจำนาน 135 ตัวอย่างจาก 5 ถ้ำบริเวณเขาสมอคอน จังหวัดลพบุรี และอีก 1 ถ้ำจากเขาสิงห์โต จังหวัดสระแก้ว และทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อใต้ปีกค้างคาวเพื่อนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ จากการศึกษาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม 8 เครื่องหมาย พบว่า ค้างคาวจากถ้ำตาป่าและถ้ำฝาโถมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันมากที่สุด ในขณะที่ตัวอย่างจากถ้ำใต้ดินมีความความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากตัวอย่างจากถ้ำอื่นๆ มากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากถ้ำตาป่าและถ้ำฝาโถนั้นอยู่ไม่ไกลกันในบริเวณเขาสมอคอน ส่วนถ้ำใต้ดินนั้นอยู่บริเวณเขาสิงโตซึ่งไกลจากถ้ำอื่นๆ ออกไป นอกจากนี้แล้วยังพบว่าค้างคาวที่ถ้ำใต้ดินนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุดซึ่งอาจเนื่องมาจากจำนวนประชากรค้างคาวในบริเวณนี่มีอยู่น้อยมากและอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการผสมพันธุ์เลือดชิดในประชากรเดียวกันได้มากขึ้น ความรู้และข้อมูลที่ได้จากการวิจัยโครงการนี้ ทำให้ทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นของความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวชนิดนี้ และจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการอนุรักษ์ค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มเพื่อป้องกันไม่ให้สัตว์ประจำถิ่นของไทยชนิดนี้สูญพันธุ์ไปในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

**Abstract**

In this study, a total of 135 samples of Thai Roundleaf bat *(Hipposideros halophyllus)* were collected from five caves located in Khao Samo Khonat, Lop Buri Province and one cave from Khao Sing To, Sa Kaeo Province. Genetic diversity of the bats was analyzed using eight microsatellite markers derived from DNA sequences of other bats species. The results showed that the closet relationship was found to be the populations sampling from Ta-Pa Cave and Fa-Tho Cave, where located in Khao Samo Khonat, while the population from Tai-Din Cave, Khao Sing To was the most diverge from other populations and this may be due to the geological distance. Consideration the results of heterozygosity, the bats from Tai-Din Cave had lowest heterozygosity than what found from bat samples collected from other caves. This could be explained that less number of bat population at Tai-Din Cave would result in inbreeding of the species. The results of the study contribute the knowledge of genetic information of the Thai Roundleaf bat, which is Thai endemic mammal. Due to the crisis of a sharp decline in the number of the Thai Roundleaf bat, our data will be useful for the further planning to establish an effective conservation plan for this species.

# บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

## โครงการวิจัย การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม (*Hipposideros halophyllus*) สัตว์ประจำถิ่นของไทย (The study of genetic diversity in roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*), a Thai endemic mammal

### บทนำ

ค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม (*Hipposideros halophyllus*) เป็นสัตว์ประจำถิ่นของไทย ที่มีแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ 3 แห่งคือบริเวณเขาสมอคอน จังหวัดลพบุรี บริเวณห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี และบริเวณเขาสิงห์โต จังหวัดสระแก้ว โดยมีจำนวนประชากรรวมกันทั้งหมด 800 -1,600 ตัว ซึ่งมีจำนวนน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ชนิดอื่นๆ ประชากรทั้ง 3 แหล่งอยู่ห่างกันมากว่า 130 กิโลเมตร ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยจำกัดการอพยพระหว่างประชากร และไม่มีการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากร อาจส่งผลให้มีความแตกต่างทางด้านความหลากหลายพันธุกรรมของประชากร และเป็นการเพิ่มโอกาสการผสมพันธุ์เลือดชิดในประชากรเดียวกัน เพราะมีหลักฐานยืนยันว่าสิ่งมีชีวิตเฉพาะถิ่นทั่วโลกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และเป็นปัจจัยหนึ่งที่เร่งอัตราการสูญพันธุ์ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงตั้งสมมติฐานว่า "ค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มจึงมีแนวโน้มของความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ" เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตเฉพาะถิ่นชนิดอื่นๆ อาจส่งผลให้ประชากรมีความอ่อนแอและตกอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์อย่างยิ่ง การศึกษานี้จึงต้องการตรวจสอบสมมติฐานดังกล่าวโดยมุ่งเน้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มทั้ง 3 กลุ่มประชากร โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์

ปัจจุบัน มีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์เพื่อการศึกษาทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด และพบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้สามารถใช้ศึกษากับสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์ได้อีกด้วย โดยในค้างคาวนั้น พบว่าได้มีการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์จากค้างคาวหลายชนิด รวมถึง *Hipposideros turpis* หรือ Bang's leaf-nosed bat ซึ่งเป็นค้างคาวกลุ่มเดียวกันกับค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม ดังนั้นโครงการนี้จึงได้นำเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์จากค้างคาวต่างสปีชีส์มาใช้ในการศึกษาวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มในประเทศไทย

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิจัยและตอบคำถามจากสมมุติฐานที่ว่าค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ โดยวิเคราะห์จากการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์

## อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการสุ่มจับค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มจำนวน 135 ตัวอย่างจาก 5 ถ้ำบริเวณเขาสมอคอน ซึ่งได้แก่ ถ้ำตาป่า (30) ถ้ำฝาโถ (30) ถ้ำสะแก (30) ถ้ำเจตีย์ (10) และถ้ำโอบ (5) จังหวัดลพบุรี และอีก 1 ถ้ำจากบริเวณเขาสิงห์โต จังหวัดสระแก้ว ได้แก่ ถ้ำใต้ดิน (30) และทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อใต้ปีกของค้างคาวแต่ละตัวเพื่อนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้าวคาวโดยใช้โปรแกรม TFPGA

## ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา

โดยในเบื้องต้นนั้น ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 41 คู่ จาก *Hipposideros cervinus*, *Rhinolophus hipposideros* and Bang's leaf-nosed bat (*Hipposideros turpis*) เพื่อทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มทั้ง 135 ตัวอย่าง พบว่ามี 8 คู่ไพร์เมอร์ ได้แก่ Hce22, Hce15, Hce12 และ Hce5 ซึ่งออกแบบจากลำดับเบสของ *H. cervinus*, Rhd119, Rhd107 และ Rhd103 จาก *R. hipposideros* และ Msht9 จาก *H. turpis* ให้ผลแสดงความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่พบนั้นมีตั้งแต่ 2 (Hce22) ถึง 15 (Hce12) อัลลีล โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสเท่ากับ 7.75 ส่วนค่า unbiased heterozygosity ต่อโลคัสคำนวนจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดมีค่าตั้งแต่ 0.3483 (Rhd119) ถึง 0.8459 (Hce12) และค่า direct count heterozygosity มีค่าเท่ากับ 0.2932 (Rhd119) ถึง 0.7926 (Rhd103) เมื่อพิจารณาค่า unbiased heterozygosity ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง พบว่ามีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ 0.4095 (ถ้ำใต้ดิน) ถึง 0.7391 (ถ้ำเจตีย์) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.5707 สำหรับค่า direct count heterozygosity นั้นมีความแตกต่างกันระหว่ากลุ่มตัวอย่าง โดยมีค่าตั้งแต่ 0.4500 (ถ้ำใต้ดิน) ถึง 0.6094 (ถ้ำเจตีย์) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.5244 การวิเคราะห์ค่า percentage of polymorphic loci ที่ 99% criterion พบว่าเฉพาะตัวอย่างจากถ้ำโอบเท่านั้นที่มีค่า 87.5% ในขณะที่ตัวอย่างจากถ้ำอื่นๆ นั้นมีค่าเท่ากับ 100.0% ส่วนค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0.0300 (ถ้ำตาป่าและถ้ำฝาโถ) ถึง 0.5926 (ถ้ำใต้ดินและถ้ำโอบ) ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับค่าที่วิเคราะห์จาก UPGMA

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มที่ได้สุ่มจับมาจากแต่ละถ้ำแล้วนั้น พบว่า ตัวอย่างประชากรจากถ้ำตาป่าและถ้ำฝาโถนั้นมีความสัมพันธ์กันมากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากถ้ำทั้งสองนั้นอยู่ไม่ไกลจากกันในบริเวณเขาสมอคอน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ค้างคาวของทั้งสองถ้ำนั้นมีโอกาสแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมซึ่งกันและกันได้ ในทางตรงข้าม ตัวอย่างประชากรจากถ้ำใต้ดินซึ่งอยู่บริเวณเขาสิงห์โต จังหวัดสระแก้วนั้นมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากประชากรจากถ้ำอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ถ้ำใต้ดินนั้นอยู่ห่างจากถ้ำอื่นๆ ทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของค้างคาวได้ นอกจากนี้แล้วยังพบอีกว่า ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวจากถ้ำใต้ดินนั้นมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างประชากรจากถ้ำอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นผลอันเนื่องมาจากการที่ถ้ำนี้ซึ่งอยู่บริเวณเขาสิงโตนั้นมีประชากรของค้างคาวชนิดนี้อยู่ไม่มากนักเมื่อเทียบกับบริเวณเขาสมอคอน ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดภาวะการผสมพันธุ์ในสายเลือดหรือการผสมพันธุ์เลือดชิดในประชากรเดียวกันได้มากขึ้น

นอกจากนี้แล้ว ระหว่างที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างนั้นยังพบว่าค้าวคาวชนิดนี้มีพฤติกรรมการทำความสะอาดให้กันและกัน โดยสังเกตได้จากการที่ได้ทำการแต้มสีที่แตกต่างกันบริเวณต่างๆ ของลำตัวค้างคาว เพื่อบ่งบอกถึงตำแหน่งของถ้ำที่สำรวจพบตัวอย่างครั้งแรกก่อนทำการเจาะเนื้อเยื่อใต้ปีก ซึ่งต่อมาได้พบว่าสีที่ทาบริเวณลำตัวของค้างคาวที่มีแผลใต้ปีกจากการถูกเจาะเก็บตัวอย่างนั้นถูกลบออกไป ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ตัวค้างคาวเองไม่สามารถทำความสะอาดตัวเองได้ และยังได้พบอีกว่าค้างคาวนั้นมีการย้ายที่อยู่ไป-มาระหว่างถ้ำอีกด้วยจากการพบค้างคาวที่ถูกแต้มสีต่างสีกันในถ้ำเดียวกัน ซึ่งพฤติกรรมการย้ายถ้ำของค้างคาวนี้ สอดคล้องกับผลการวิจัยที่พบว่าค้างคาวที่ถูกจับมาจากถ้ำบริเวณเขาสมอคอนนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก

อย่างไรก็ตาม การวิจัยโครงการนี้ยังคงมีข้อจำกัดในประเด็นของจำนวนตัวอย่างศึกษาโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากถ้ำเจดีย์และถ้ำโอบ ซึ่งจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากถ้ำทั้งสองนี้มีจำนวนประชากรค้างคาวชนิดนี้อาศัยอยู่น้อยมาก จึงทำให้ตัวอย่างที่จับได้นั้นมีน้อยด้วย อีกทั้งจากการสำรวจค้างคาวชนิดนี้ในบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งนั้น ไม่พบว่ามีค้างคาวชนิดนี้อยู่เลย

โดยสรุปแล้ว การวิจัยโครงการนี้ ได้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์นั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์ได้ และผลการวิจัยที่ได้นั้น จะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการอนุรักษ์ค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มซึ่งเป็นสัตว์ประจำถิ่นของไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืนต่อไป เพื่อป้องกันไม่ให้ค้างคาวชนิดนี้สูญพันธุ์ไปในอนาคต

## Executive summary

# โครงการวิจัย การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม (*Hipposideros halophyllus*) สัตว์ประจำถิ่นของไทย (The study of genetic diversity in roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*), a Thai endemic mammal)

## Introduction

The Thailand roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*), a Thai endemic mammal, has been categorized as LOWER RISK, subcategory: Near Threatened (LR/nt) on the IUCN Red List. There are currently three free living populations of Thailand roundleaf bat which are located in Khao Samo Khonat, Lop Buri Province; Huai Kha Khaeng Wildlife Preserve Area, Uthai Thani Province and Khao Sing To, Sa Kaeo Province. These areas are least over 130 km apart from each other. This may prevent gene flow among those three populations. Therefore, the decreasing of genetic variation is expected. The genetic diversity may be in the low level as same as other endemic organisms across the globe. Consequently, the bat populations are susceptible to diseases and lower ability to adapt to the environmental changes, which increases the risk of extinction.

Microsatellites have been identified and used for genetic studies of many organisms. Comparative genome studies have shown that microsatellite primer sequences are often conserved across related species and can be used for the development of markers in related species. Recently, microsatellite markers have been developed for genetic studies of bats including *Hipposideros turpis* or Bang's leaf-nosed bat which is classified in the same genus of the Thailand roundleaf bat. In this study we applied microsatellite markers that have been developed from othe bat species to analyze the genetic variation and diversity of the Thailand roundleaf bat from six different caves located in Thailand.

**Objective**

The objective of the project was to examine the hypothesis stated that "genetic diversity of Thailand roundleaf bat is in the low level". The project aims to evaluate the genetic diversity of the three populations of Thailand roundleaf bat using microsatellite markers.

**Materials and methods**

A total of 135 the Thailand roundleaf bat bat samples were randomly collected from six different caves in two provinces, Lop Buri and Sa Kaeo. The samples from Lop Buri province comprised of 30 samples each from Ta-Pa Cave, Fa-Tho Cave and Sa-Kea Cave, 10 samples from Ja-Dee Cave and five samples from Obb cave, while 30 samples were from collected from Tai-Din Cave, Khao-Sing-To, Sa Kaeo province. Tissue samples of wing skins (4 mm in diameter) were taken from the uropatagium for DNA extraction using Real Genome kit. DNA samples were then analyzed using microsatellite markers derived from other bat species. Genotypic data was analyzed using TFPGA program.

**Results and discussion**

A total of 41 microsatellite primer pairs derived from *Hipposideros cervinus*, *Rhinolophus hipposideros* and Bang's leaf-nosed bat (*Hipposideros turpis*) were screened with 135 samples of The Thailand roundleaf bat. Of these, eight primer pairs, Hce22, Hce15, Hce12 and Hce5 developed from *H. cervinus*, Rhd119, Rhd107 and Rhd103 from *R. hipposideros* and Msht9 from *H. turpis* showed polymorphic patterns. The number of alleles per locus ranged from 2 (Hce22) to 15 (Hce12) with an average of 7.75. Overall unbiased and direct count heterozygosity of each locus calculated from 135 samples varied from 0.3483 (Rhd119) to 0.8459 (Hce12) and 0.2932 (Rhd119) to 0.7926 (Rhd103). For all six populations, the unbiased heterozygosity varied between 0.4095 (Tai-Din Cave), to 0.7391 (Ja-Dee Cave) with an average of 0.5707 and direct count heterozygosity diverged from 0.4500 (Tai-Din Cave), 0.6094 (Ja-Dee Cave) with an average of 0.5244. Analysis of percentage of polymorphic loci using the 99% criterion showed that only bat population from Obb Cave had 87.5% while other populations had 100.0%. The genetic distance according to NEI's

(1972; 1978) ranged from 0.0300 (Ta-Pa Cave/Fa-Tho Cave) to 0.5926 (Tai-Din Cave/ Obb Cave). Considering all distances measured, the closest populations were found to be the populations from Ta-Pa Cave and Fa-Tho Cave, with the populations from Obb Cave and Tai-Din Cave being the most divergent. In support of this analysis, the data from UPGMA also showed similar results.

The genetic diversity analysis results showed that the closet relationship was found to be the populations sampling from Ta-Pa Cave and Fa-Tho Cave. This agrees that the two caves are located nearby at Khao Samo Khonat, Lop Buri Province and thereforethe bats are more likely to have an opportunity to be exchanged. On the other hands, the genetic relationship of the bats from Tai-Din Cave was the most diverge from other populations and this may be due to the geological distance. Consideration the results of heterozygosity, the bats from Tai-Din Cave had lowest heterozygosity than what found from bat samples collected from other caves. This could be explained that less number of bat population at Tai-Din Cave would result in inbreeding of the species.

During our survey and sampling, bats were first painted with different colors according to the cave where we initially found them. However, those bats were found again at different caves nearby indicating that the bats not only live in one cave, but also move from one to another cave. This information supports our results that genetic diversity of bat samples from different caves where located nearby at Khao Samo Khonat, Lop Buri Province have less divergence when compared to the bats from Tai-Din Cave where located far form this area. The limitations that might affect to the statistic analysis of this study was the number of the samples used. The number of bat samples from the two caves, Ja-Dee Cave and Obb Cave was less than other caves, this was because there was a few bats live in these caves. In addition, there was no the Roundleaf bat living in Huai Kha Khaeng Wildlife Preserve Area.

This present study shows the utility of applying microsatellite markers developed from different species of bat for the analysis of diversity and genetic relationships of the Roundleaf bat in Thailand. It is the first report of the genetic relationship of the species in the world. The results of the study contribute the knowledge of genetic information of the Thai Roundleaf bat, which is Thai

endemic mammal. Due to the crisis of a sharp decline in the number of the Thai Roundleaf bat, our data will be useful for the further planning to establish an effective conservation plan for this species.

# สารบัญตาราง

**Table** **Page**

Table 1. Sequences of microsatellite primers used in this project. Highlight indicated the primers that showed polymorphisms. 22

Table 2. Characteristics of eight polymorphic microsatellite markers. The number of alleles and heterozygosities (unbiased and direct count) of each were calculated for 135 Thai Roundleaf bat *(Hipposideros halophyllus)* individuals. 24

# สารบัญรูปภาพ

**Figure** **Page**

Figure 1. Three free living populations of Thailand roundleaf bat which are located in Huai Kha Khaeng Wildlife Preserve Area, Uthai Thani Province (1), Khao Sing To, Sa Kaeo Province (2) and Khao Samo Khonat, Lop Buri Province (3) 15

Figure 2. Polymorphisms generated by the Hce5 primer 25

Figure 3. Polymorphisms generated by the Hce12 primer 26

Figure 4. Polymorphisms generated by the Hce15 primer 27

Figure 5. Polymorphisms generated by the Hce22 primer 28

Figure 6. Polymorphisms generated by the Rhd103 primer 29

Figure 7. Polymorphisms generated by the Rhd107 primer 30

Figure 8. Polymorphisms generated by the Rhd119 primer 31

Figure 9. Polymorphisms generated by the Msht9 primer 32

Figure 10. The UPGMA dendogram showing genetic relationship among six populations of Thai Roundleaf bat using 8 microsatellite loci. 33

## Introduction

The Thailand roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*), a Thai endemic mammal, has been categorized as LOWER RISK, subcategory: Near Threatened (LR/nt) on the IUCN Red List. There are currently three free living populations of Thailand roundleaf bat which are located in Khao Samo Khonat, Lop Buri Province; Huai Kha Khaeng Wildlife Preserve Area, Uthai Thani Province and Khao Sing To, Sa Kaeo Province (Figure 1). These areas are least over 130 km apart from each other. This may prevent gene flow among those three populations. Therefore, the decreasing of genetic variation is expected. The genetic diversity may be in the low level as same as other endemic organisms across the globe. Consequently, the bat populations are susceptible to diseases and lower ability to adapt to the environmental changes, which increases the risk of extinction.

Microsatellites have been identified and used for genetic studies of many organisms (Osman *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Selvi *et al.*, 2004). Comparative genome studies have shown that microsatellite primer sequences are often conserved across related species and can be used for the development of markers in related species (Navani *et al.* 2001). Recently, microsatellite markers have been developed for genetic studies of bats including *Hipposideros turpis* or Bang's leaf-nosed bat Lazaro *et al.* (2002) which is classified in the same genus of the Thailand roundleaf bat. In this study we applied microsatellite markers that have been developed from othe bat species to analyze the genetic variation and diversity of the Thailand roundleaf bat from six different caves located in Thailand.

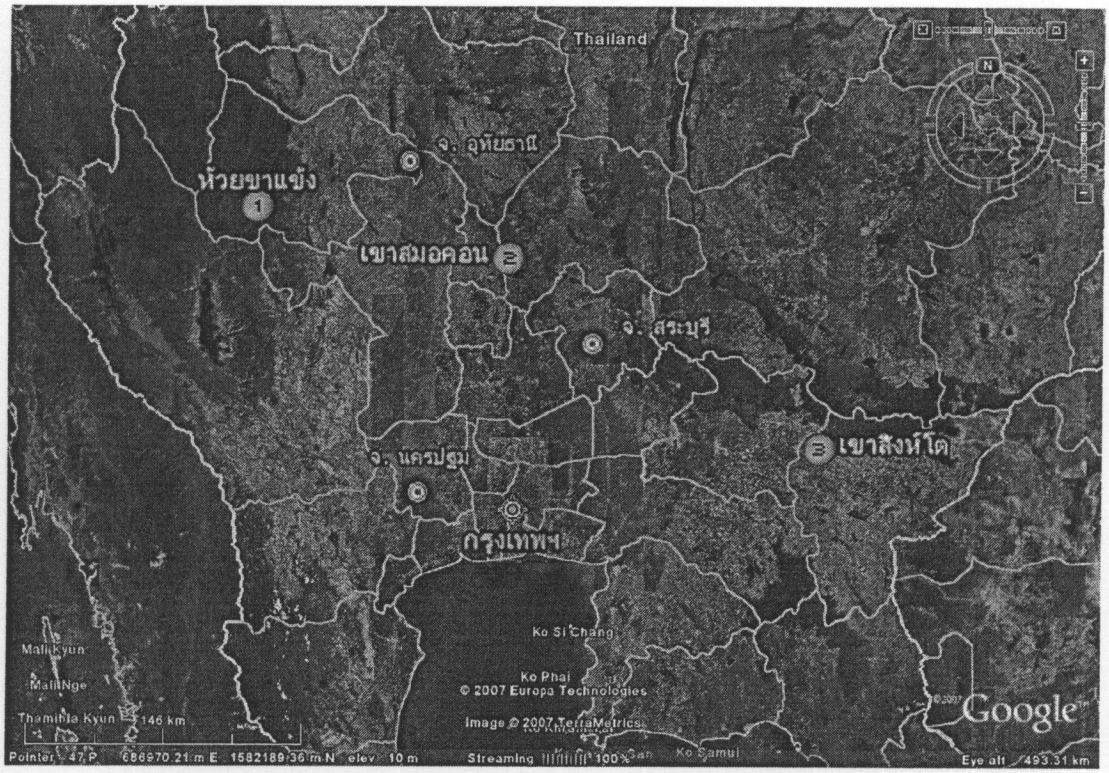



**Figure 1.** Three free living populations of Thailand roundleaf bat which are located in Huai Kha Khaeng Wildlife Preserve Area, Uthai Thani Province (1), Khao Sing To, Sa Kaeo Province (2) and Khao Samo Khonat, Lop Buri Province (3).

*(Source: Google Earth, 2007)*

## Objective

The objective of the project was to examine the hypothesis stated that "genetic diversity of Thailand roundleaf bat is in the low level". The project aims to evaluate the genetic diversity of the three populations of Thailand roundleaf bat using microsatellite markers.

## Materials and methods

*Experimental animals*

A total of 135 bat samples were randomly collected from five different caves in two provinces, Lop Buri and Sa Kaeo. The samples from Lop Buri province comprised of 30 samples each from Ta-Pa Cave, Fa-Tho Cave and Sa-Kea Cave, 10 samples from Ja-Dee Cave and five samples from Obb cave, while 30 samples were from collected from Tai-Din Cave, Khao-Sing-To, Sa Kaeo province.

*Tissue samples*

Samples of wing skins (4 mm in diameter) were taken from the uropatagium without killing the animals, using a punch as described by Wilmer & Barratt (1996). The skins were fixed in lysis buffer and stored at room temperature until DNA extraction.

*DNA extraction*

Genomic DNA was extracted from the skins using Real Genome kit ( ) according to the manufacturers' instructions. DNA concentration was measured by spectrophotometer and diluted for 50 ng/μL. The samples were kept at -20 $^{\circ}$C.

*Primer design*

Nucleotide sequences containing repeat regions of *Hipposideros cervinus* and *Rhinolophus hipposideros* from GenBank database were used to design primers. The primers were designed using http://wsmartins.net/webtroll/troll.html#. In addition, microsatellite markers specific to Bang's leaf-nosed bat (*Hipposideros turpis*) that were reported by Lazaro *et al.* (2002) were also applied to study genetic diversity of the roundleaf bat in this project.

*Microsatellite analysis*

Polymerase chain reaction (PCR) was performed according to Triwitayakorn *et al.* (2006) in a total volume of 20 μl containing 50 ng of genomic DNA, 10 pmole each of forward and reverse primers,

200 µm dNTP (Promega), 1X PCR Buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, and 1.5 U *Taq* polymerase (Promega). PCR was accomplished by 1 min at 94 °C, 1 min at primer annealing temperature and 1 min at 72 °C for 30 cycles. The PCR products were separated on 5% denaturing polyacrylamide gels and a 100 bp DNA standard ladder was loaded in parallel with the samples in order to estimate sizes of the PCR products. The gels were visualized by silver staining according to Sambrook and Russell (2001). The genotypes were scored manually.

*Data analysis*

The genotypic data were scored according to TFPGA format and analysed by TFPGA program as described in Triwitayakorn *et al.* (2006) using TFPGA 1.3 (Miller, 1997) according to location.

## Results

A total of 135 samples of roundleaf bat were randomly collected from Ta-Pa Cave (30), Fa-Tho Cave (30), Sa-Kea Cave (30) Ja-Dee Cave (10) and Obb Cave (5) which are located at Khao Samo Khonat, Lop Buri Province and from Tai-Din Cave (30) located at Khao Sing To, Sa Kaeo Province in Thailand. Wing skin of individual bat was collected. Genomic DNA was isolated from wing skins and used directly in microsatellite analysis.

A total of 21 and 14 microsatellite primer pairs were designed from nucleotide sequences of *Hipposideros cervinus* and *Rhinolophus hipposideros*, respectively that reported in the GenBank database (Table 1). In addition, six primer pairs specific to Bang's leaf-nosed bat (*Hipposideros turpis*) that were reported by Lazaro *et al.* (2002) were also included in this study. Polymorphic patterns were identified from the PCR products using primers Hce22, Hce15, Hce12 and Hce5 developed from *H. cervinus*, Rhd119, Rhd107 and Rhd103 from *R. hipposideros* and Msht9 from *H. turpis* (Figure 2-9). The eight polymorphic microsatellite markers were analyzed on 135 samples that collected from six caves.

The number of alleles per locus ranged from 2 (Hce22) to 15 (Hce12) with an average of 7.75. Overall unbiased and direct count heterozygosity of each locus calculated from 135 samples varied from 0.3483 (Rhd119) to 0.8459 (Hce12) and 0.2932 (Rhd119) to 0.7926 (Rhd103) as shown in Table 2. For all six populations, the unbiased heterozygosity varied between 0.4095 (Tai-Din Cave), to 0.7391 (Ja-Dee Cave) with an average of 0.5707 and direct count heterozygosity diverged from 0.4500 (Tai-Din Cave), 0.6094 (Ja-Dee Cave) with an average of 0.5244. Analysis of percentage of polymorphic loci using the 99% criterion showed that only bat population from Obb Cave had 87.5% while other populations had 100.0%. The genetic distance according to NEI's (1972; 1978) ranged from 0.0300 (Ta-Pa Cave/Fa-Tho Cave) to 0.5926 (Tai-Din Cave/ Obb Cave). Considering all distances measured, the closest populations were found to be the populations from Ta-Pa Cave and Fa-Tho Cave, with the populations from Obb Cave and Tai-Din Cave being the most divergent. In support of this analysis, the data with UPGMA also is shown in Figure 10.

## Conclusion and discussion

In this study, 41 microsatellite primer pairs were developed from different species of bat and applied to genetic diversity study of the Thai Roundleaf bat. Of these, eight primer pairs were successfully amplified and showed polymorphic patterns among the samples. The genetic diversity analysis results showed that the closet relationship was found to be the populations sampling from Ta-Pa Cave and Fa-Tho Cave. This agrees that the two caves are located nearby at Khao Samo Khonat, Lop Buri Province and thereforethe bats are more likely to have an opportunity to be exchanged. On the other hands, the genetic relationship of the bats from Tai-Din Cave was the most diverge from other populations and this may be due to the geological distance. Consideration the results of heterozygosity, the bats from Tai-Din Cave had lowest heterozygosity than what found from bat samples collected from other caves. This could be explained that less number of bat population at Tai-Din Cave would result in inbreeding of the species.

During our survey and sampling, bats were first painted with different colors according to the cave where we initially found them. However, those bats were found again at different caves nearby indicating that the bats are not only live in one cave, but also move from one to another cave. This information supports our results that genetic diversity of bat samples from different caves where located nearby at Khao Samo Khonat, Lop Buri Province have less divergence when compared to the bats from Tai-Din Cave where located far form this area. The limitation that might affect to the statistic analysis of this study was the number of the samples used. The number of bat samples from the two caves, Ja-Dee Cave and Obb Cave were less than other caves, this was because there was a few bats live in these caves. In addition, we found that there was no Roundleaf bat living in the Huai Kha Khaeng Wildlife Preserve Area.

This present study shows the utility of applying microsatellite markers developed from different species of bat for the analysis of diversity and genetic relationships of the Roundleaf bat in Thailand. It is the first report of the genetic relationship of the species in the world. The results of the study contribute the knowledge of genetic information of the Thai Roundleaf bat, which is Thai

endemic mammal. Due to the crisis of a sharp decline in the number of the Thai Roundleaf bat, our data will be useful for the further planning to establish an effective conservation plan for this species.

Table 1. Sequences of microsatellite primers used in this project. Highlight indicated the primers that showed polymorphisms.

| Locus | Accession# | Repeat | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') | Tm (°C) | Product Size (bp) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Hipposideros cervinus* | | | | | | |
| Hce1 | AM157703.1 | (GT)n | CTCCAACGTTCTTAACGTCTACAC | GCAGAGAGCAGAAATACCGTGGTA | 58 | 274 |
| Hce2 | AM157704.1 | $(CT)n(CA)_8$ | AGCACAAGTCATTCTTTCCAGC | GTATGTACACTTGGGGTGACTC | 57 | 211 |
| Hce3 | AM157705.1 | $(CT)_7(TC)_n$ | CAGCCTACCAGTGACATGGA | GGTAGCACAGAGGGCATAG | 59 | 199 |
| Hce4 | AM157706.1 | $(GT)_{26}$ | GGATGGATAATGATGTGTTCAGCA | GTCCATCAATGAAGGTTACACTGC | 57 | 197 |
| Hce5 | AM157707.1 | (CT)n | AGTTATAGTCTTGCCATCCTGGGA | GCTTTCTTCATCTTCCACATCACG | 58 | 272 |
| Hce6 | AM157708.1 | (CA)n | AGCCAGTTCTTAACCATTGCGCCA | ACTTGCTGTCAGAGGTCCACC | 59 | 263 |
| Hce8 | AM157710.1 | $(GT)_{20}$ | CTGCATGTAAACTTTGTGTGTG | ACAGGTGGCAGGATGGCTCAGCTA | 58 | 470 |
| Hce10 | AM157712.1 | $(AC)_{26}$ | TGACAGCAACTTGTCTGTTCC | GTCATGACTAACATTTTCCAGGGA | 58 | 315 |
| Hce12 | AM181606.1 | $(TG)_{17}$ $(GA)_{20}$ | ACCGAAATAGCATTGGCTGT | CTTGCTTTTGAGGGTTGCAT | 60 | 190 |
| Hce14 | AM181608.1 | $(AC)_{24}$ | CAACAGCCATCCAGTTTCCT | GGTAGGCCATAGGCCACATA | 60 | 193 |
| Hce15 | AM181609.1 | $(AG)_{21}$ | GGGGGAATTATATCCATCCA | GGGGTGGACAAAATTGGTTA | 59 | 233 |
| Hce17 | AM181611.1 | $(GT)_{23}$ $(GA)_{12}(AG)_{17}$ | GGTCAGATGGTACCAAGCTGTG | TCAGATACTGTAATGCACCTC | 56 | 266 |
| Hce20 | AM408220.1 | (GA)n | GATCGCCCGAAATTGAAAG | TCAGTATGTGATGCGGGAGA | 60 | 162 |
| Hce22 | AM408223.1 | $(CA)_{10}$ | GATCCCTCCACGAGCACTTA | GAAGCGGTGTTCAGTGATGA | 60 | 199 |
| Hce23 | AM408222.1 | $(AC)_{10}(CA)_8$ | TGTCGGAGCAGTACCCTACC | TACCGGCATATGAGCTTGTG | 60 | 218 |
| Hce25 | AM408225.1 | $(GT)_9$ | GATCAGGTATTATTTTGGTGACAA | TGCTTTCTATGCCTGTTGGTT | 58 | 195 |
| Hce27 | AM408226.1 | $(CA)_{12}$ | TTTCCTTCCTCTTCCTTGTCA | TCGTCAGCTTGAGGGGATTA | 59 | 221 |
| Hce28 | AM408228.1 | $(TC)_7(CT)_{11}$ | GGAACCGACGTTTAGTCCAA | CACGGTGTGTAACATTCACCA | 60 | 255 |
| Hce29 | AM408230.1 | $(CTTTC)_2(TC)_{10}(CA)_7$ $(AC)_{10}$ | GATCAACACCAGGCGAATG | GTAGCCGAGTCGAACTGGAA | 60 | 291 |
| Hce33 | AM408233.1 | $(AC)_{10}$ | TCCTCAGGCCACATTATTTAGAA | CAGAGCATGTTGCTCAGGAC | 60 | 135 |
| Hce38 | AM408237.1 | $(GT)_{23}(TG)_5$ | ATGGCTGCTTTTCTGCTTGT | CACACAGTGAGCGCAGATTT | 60 | 262 |

Table 1. Sequences of microsatellite primers used in this project. Highlight indicated the primers that showed polymorphisms. (cont.)

| Locus | Accession# | Repeat | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') | Tm (°C) | Product Size (bp) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Rhinolophus hipposideros* | | | | | | |
| Rhc3 | DQ102690.1 | $(ATAA)_9$ | ACAGAGCAGTTGTCAGTCCTCA | GAGTCATTTTGGGGTTTGTTTC | 60 | 390 |
| Rhc103 | DQ102688.1 | $(AATA)_7$ | CAGTATGAGGTCGGAGGGATAG | TATCTGTTGGCCGTTTGTATGA | 60 | 230 |
| Rhc108 | DQ102689.1 | $(TTAT)_9$ | TGTCTTGGACTCTTATCGAGCA | TGTGATGGTTCAGTTTGAGGTC | 60 | 326 |
| Rhd2 | DQ102700.1\| | $(AGAT)_{16}$ | TGCGTGTAAATTCATGGTTCTC | TCATTGCTTTTAGGTCTGCTCA | 60 | 187 |
| Rhd9 | DQ102699.1\| | $(TCTA)_{16}(ATCC)_{10}$ | TCTGGATCTCCTACTCCTGGTC | TAACTTGTGAGGAAGCATGTGG | 60 | 341 |
| Rhd3 | DQ102687.1 | $(AAAT)_4(AAAC)_9$ | TGGCTGAGAAGAGGTCATTGTA | CAGATCAAATAGAACAGTCCCAAAG | 60 | 329 |
| Rhd10 | DQ102691.1 | $(TCTA)_{13}(TCCC)_3$ | TATGCCCTTGAGTGAAAAGGTT | CCTGGACTATGAGACCTTAACCA | 60 | 350 |
| Rhd102 | DQ102692.1 | $(TCTG)_5(ATCT)_{13}$ | GATGGCCCCAAATGTTTATG | AGGTATCAAAAGTTCCACCCAA | 60 | 296 |
| Rhd103 | DQ102693.1 | $(ATCT)_{13}(TA)_5$ | GCTTCCTACCTCATCCTCACTC | TACTGTCTTGTTTTCCCAGCAC | 60 | 275 |
| Rhd107 | DQ102694.1 | $(AATG)_3(GATA)_{26}$ | ATTGAGGCCAAGAAAGCAAA | CATCAGCAAGGTTGAGAGCAT | 60 | 256 |
| Rhd111 | DQ102695.1 | $(CA)_5(AC)_9(GATA)_{12}$ | TCTTTCAATGCCTACACACACC | CAAACCCAAGAAATACCCTCAA | 60 | 358 |
| Rhd113 | DQ102696.1 | $(TAGA)_{13}(AGAT)_3$ | TGTCACTCCTTACCCTCCATTC | TGGGTGTCATGTTAAGACTGCT | 60 | 275 |
| Rhd116 | DQ102697.1 | $(TC)_5(CT)_8(TATC)_{11}$ | TGTATCCATCGCACATTTTCTC | GCCACATTAAGGCTGCTAAAA | 60 | 390 |
| Rhd119 | DQ102698.1 | $(TATC)_{11}(CT)_8$ | TACAGGAAGAGGGAGAGACACC | GCTTATAGCCATCCACCATTTC | 60 | 179 |
| *Hipposideros turpis* | | | | | | |
| Msht8 | AB078794.1 | $(AC)_{28}$ | CTCAGTTTAATGTTTCCTGGGC | TAAGTCCTATCGTTTGCTGGTG | 60 | 384 |
| Msht9 | AB078795.1 | $(AC)_{24}$ | CCACGGTAAAGATTGCAGAGTA | TAAAGCTGTTCGTAGTGCCTGA | 60 | 224 |
| Msht15 | AB078796.1 | $(AC)_{13}$ | TCTACAGCAGGTTGGTCAGAAG | CCTCATGTCAATTCCTCAGTCA | 60 | 269 |
| Msht16 | AB078797.1 | $(AC)_{16}$ | GGGATACCACTGCATACCTGTT | ACTGTCATTTTGCACCCCAC | 60 | 153 |
| Msht17 | AB078798.1 | $(AC)_{24}$ | GATCTCATTCTTTTCATGGCTGAGT | TGCATCCCAATGTTCACTGC | 62 | 177 |
| Msht29 | AB078799.1 | $(TC)_{12}(CA)_{16}$ | GATCACTGTGACAATTAAGTTCA | CTGTTCTTCAGGGGTCTGTG | 58 | 290 |

Table 2. Characteristics of eight polymorphic microsatellite markers. The number of alleles and heterozygosities (unbiased and direct count) of each were calculated for 135 Thai Roundleaf bat *(Hipposideros halophyllus)* individuals.

| Locus | # of alleles | Unbiased heterozygosity. | Direct count heterozygosity. |
|---|---|---|---|
| Hce22 | 2 | 0.5005 | 0.4593 |
| Hce5 | 7 | 0.5184 | 0.4148 |
| Hce15 | 7 | 0.6363 | 0.3630 |
| Rhd119 | 5 | 0.3483 | 0.2932 |
| Hce12 | 15 | 0.8459 | 0.6741 |
| Msht9 | 10 | 0.5937 | 0.4889 |
| Rhd107 | 7 | 0.7622 | 0.7185 |
| Rhd103 | 9 | 0.8321 | 0.7926 |

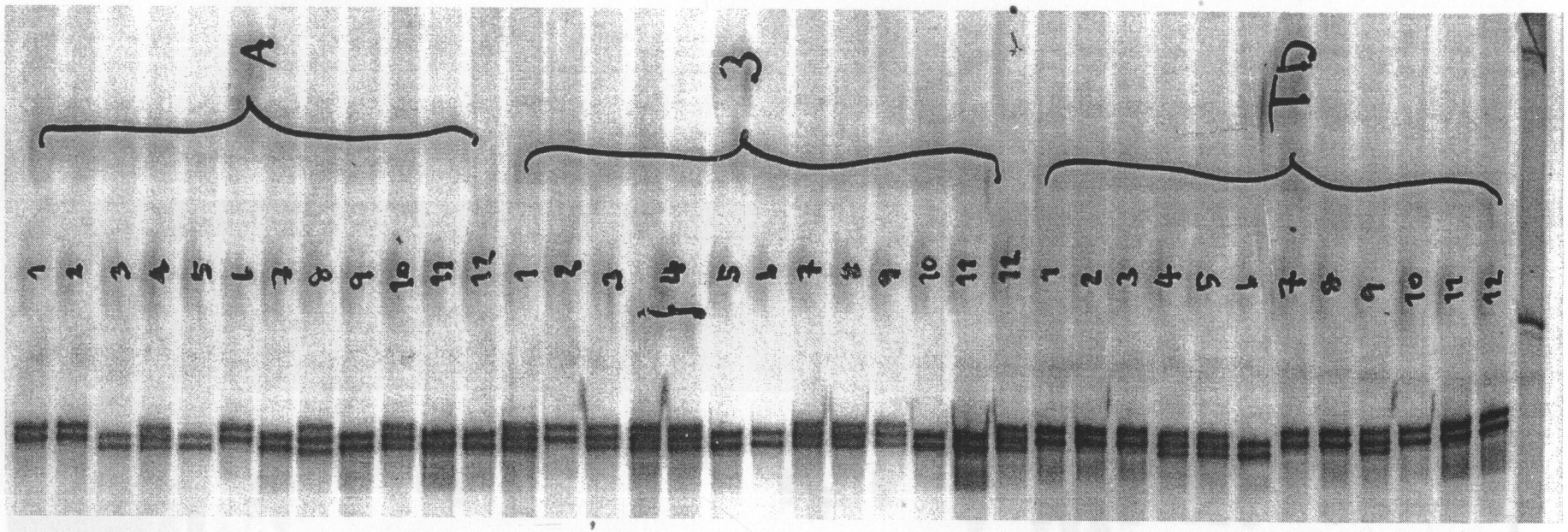



**Figure 2. Polymorphisms generated by Hce5 primer**

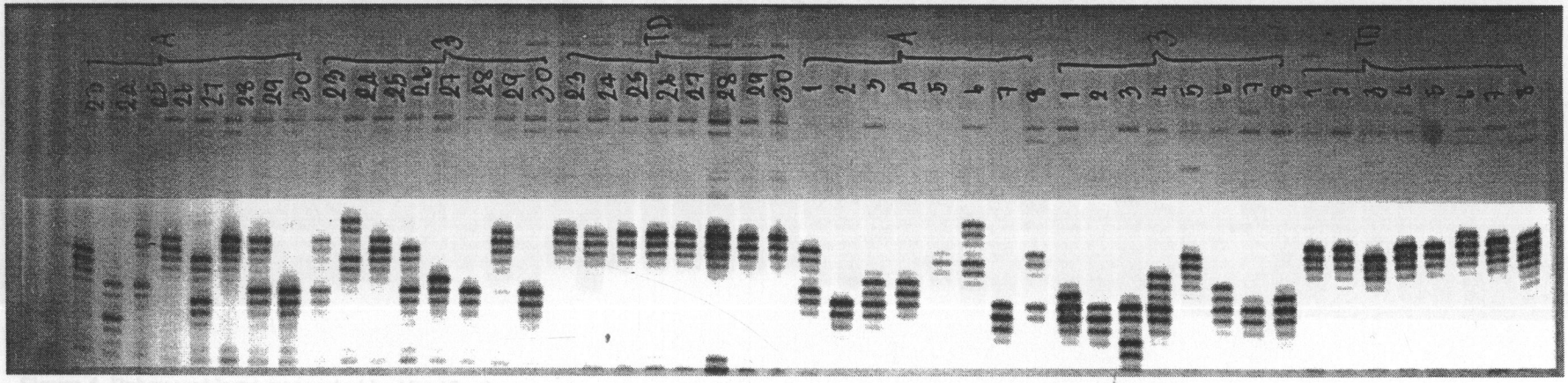


**Figure 3. Polymorphisms generated by Hce12 primer**

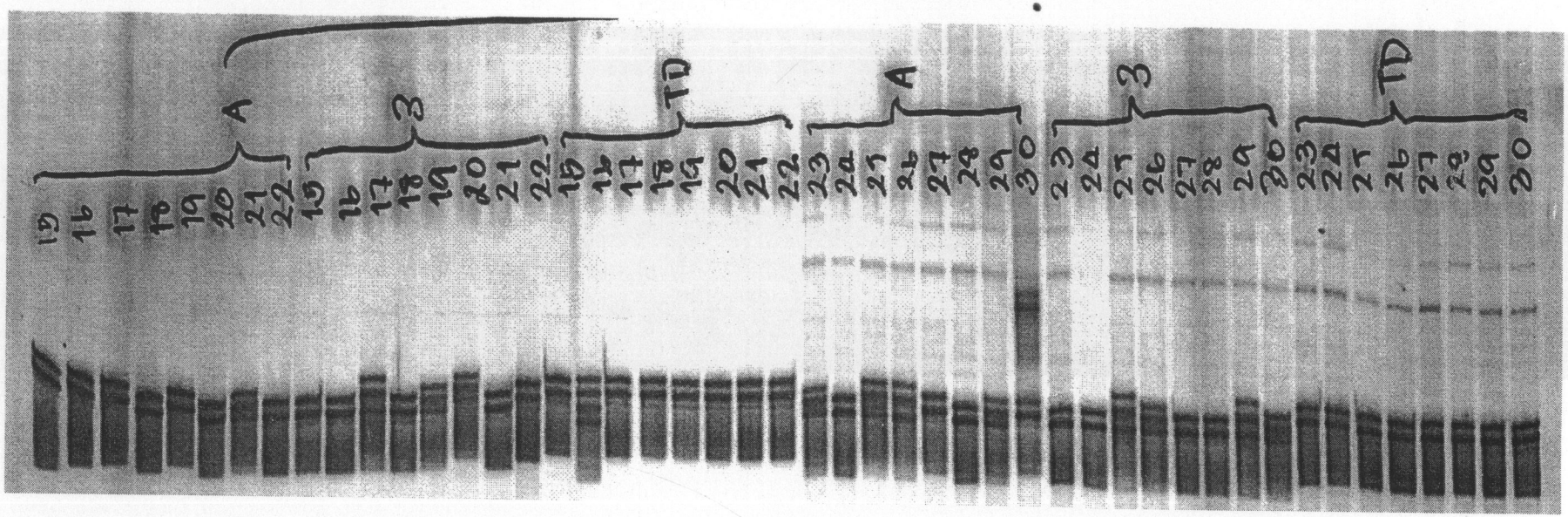



**Figure 4. Polymorphisms generated by Hce15 primer**

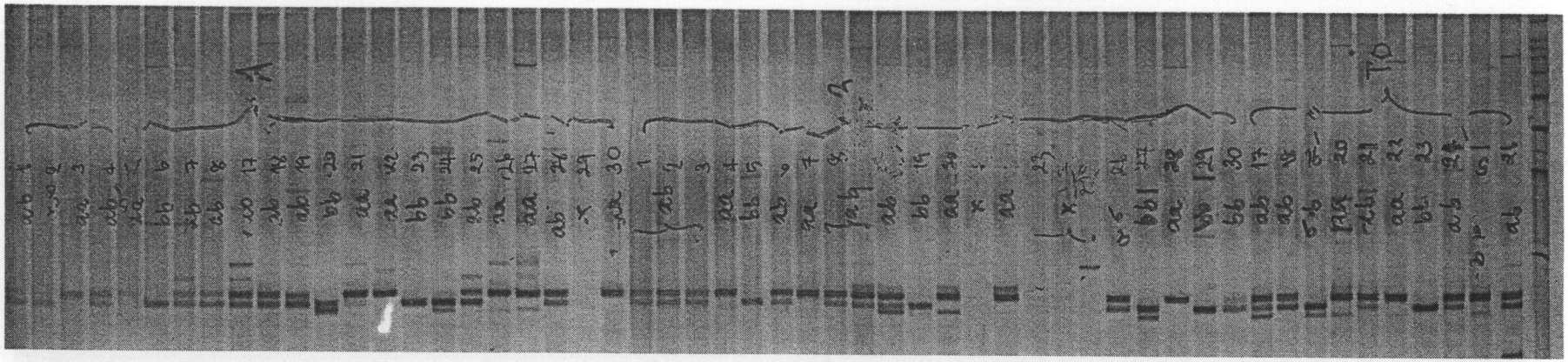


Figure 5. Polymorphisms generated by Hce22 primer

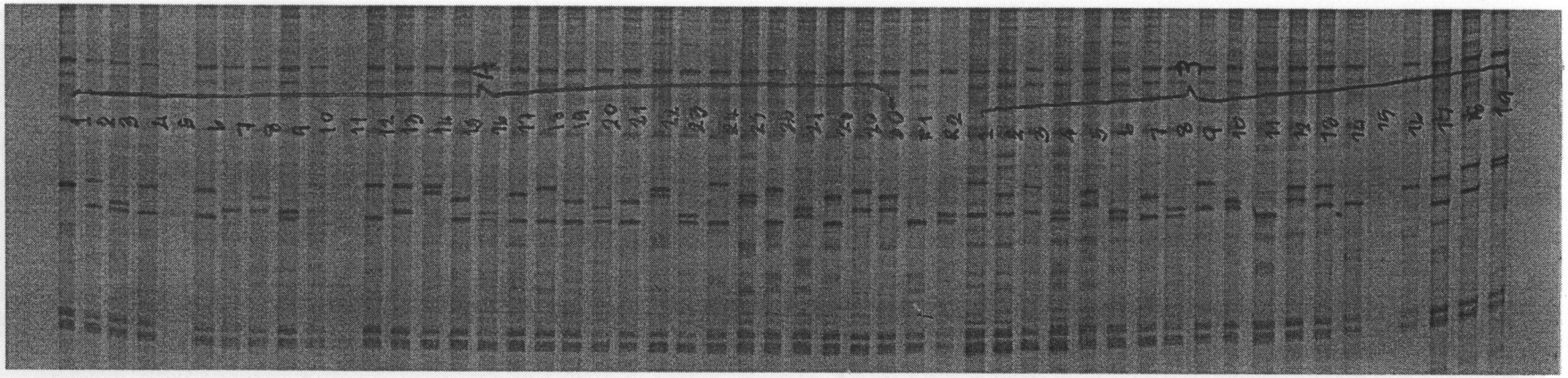


**Figure 6. Polymorphisms generated by Rhd103 primer**

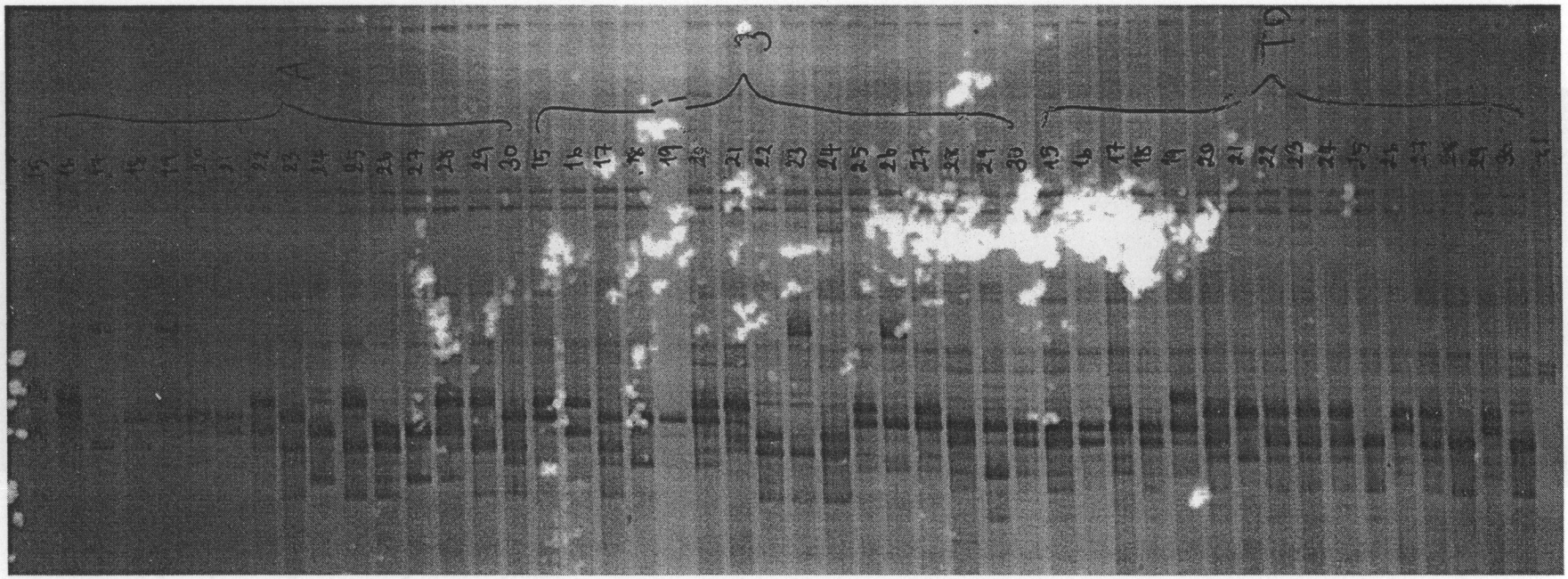



**Figure 7. Polymorphisms generated by Rhd107 primer**

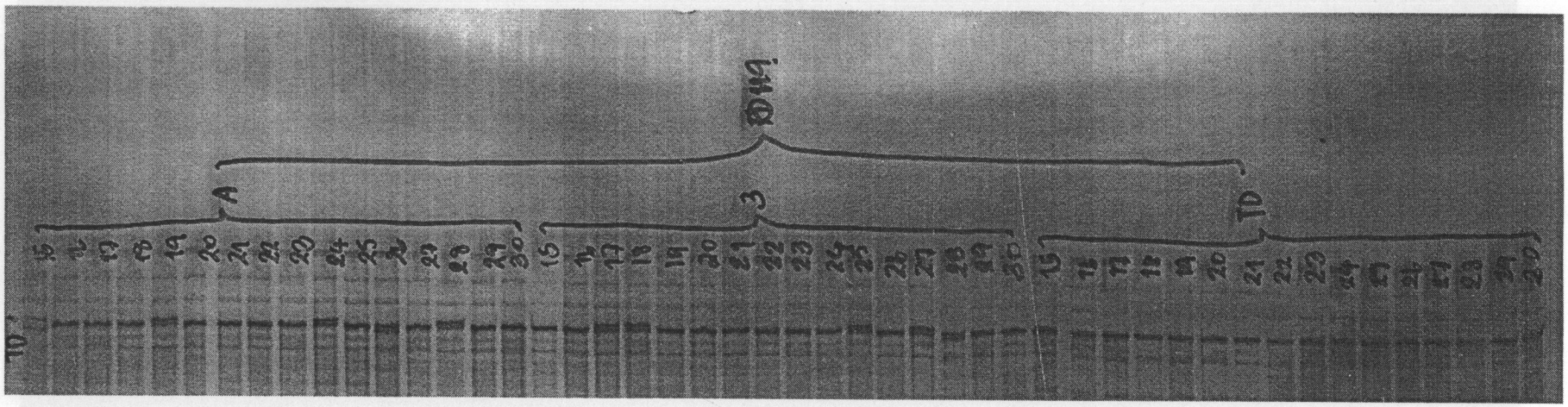



**Figure 8. Polymorphisms generated by Rhd119 primer**

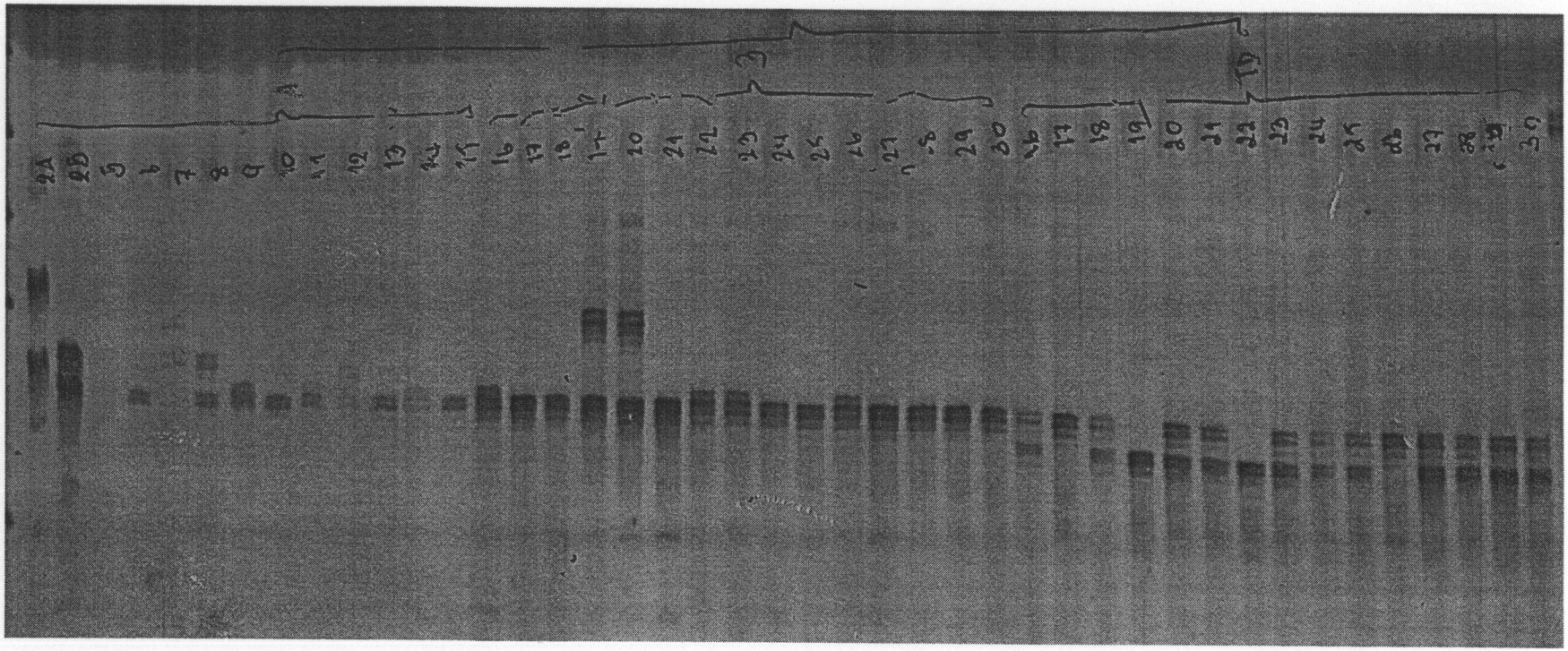


**Figure 9. Polymorphisms generated by Msht9 primer**

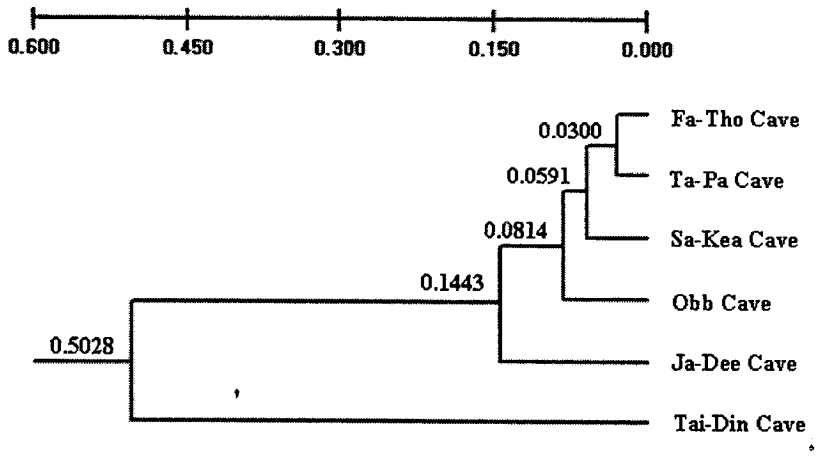



**Figure 10. The UPGMA dendogram showing genetic relationship among six populations of Thai Roundleaf bat using 8 microsatellite loci.**

**ปัญหา/อุปสรรคและแนวทางการแก้ไข**

ตัวอย่างค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มจากบางถ้ำที่เคยมีรายงานการสำรวจพบนั้น เช่น ถ้ำโอบ ถ้ำเจดีย์ ถ้ำระกา บริเวณเขาสมอคอน จังหวัดลพบุรี เมื่อทำการสำรวจเพื่อเก็บตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนตัวอย่างที่ดักจับได้นั้นมีน้อยมาก เพียง 3-5 ตัวอย่าง ซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำมาวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยได้สำรวจพบว่ามีค้าวคาวชนิดนี้เพิ่มเติมในถ้ำสะแก บริเวณเขาสมอคอน จังหวัดลพบุรี ซึ่งได้ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาวิจัยด้วย นอกจากนี้แล้ว จากการสำรวจถ้ำขึ้นกในบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี ไม่พบว่ามีค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มอาศัยอยู่ในบริเวณดังกล่าว

## เอกสารอ้างอิง

Chen G.H., Wu X.S., Wang D.Q., Qin J., Wu S.L., Zhou Q.L., Xie F., Cheng R., Xu Q., Liu B.X., Zhang Y. & Olowofeso O. (2004) Cluster analysis of 12 Chinese Native chicken populations using microsatellite markers. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* **17**:1047-1052.

Lazaro M. Echenique-Diaz, Jun Yokoyama, Masakado Kawata, Syuiti Abe and Yasuyuki Ishibashi. (2002) Isolation and characterization of microsatellite loci in the Bang's leaf-nosed bat *Hipposideros turpis*. *Molecular Ecology Notes*. **2**:396–397.

Miller, MP. 1997. Tools for population genetic analysis. Version 1.3. Dept of Biological Sciences, Northern Arizona Univ., Flagstaff, AZ.

Navani N., Jain P.K., Gupta S., Sisodia B. & Kumar S. (2001) A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Genetics* **33**:149-154.

Nei M. 1972 Genetic distance between populations. *Am Nat.* **106**: 283-92.

Nei M. 1978 Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. **89**:583-92

Osman S.A.-M., Sekino M., Nishibori M., Yamamoto Y. & Tsudzuki M. (2005) Genetic variability and relationships of native Japanese chickens assessed by microsatellite DNA profiling - focusing on the breeds established in Kochi Prefecture, Japan-. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* **18**:755-761.

Sambrook J. and Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Springs Harbour Laboratory Press, Cold Springs Harbour, NY.

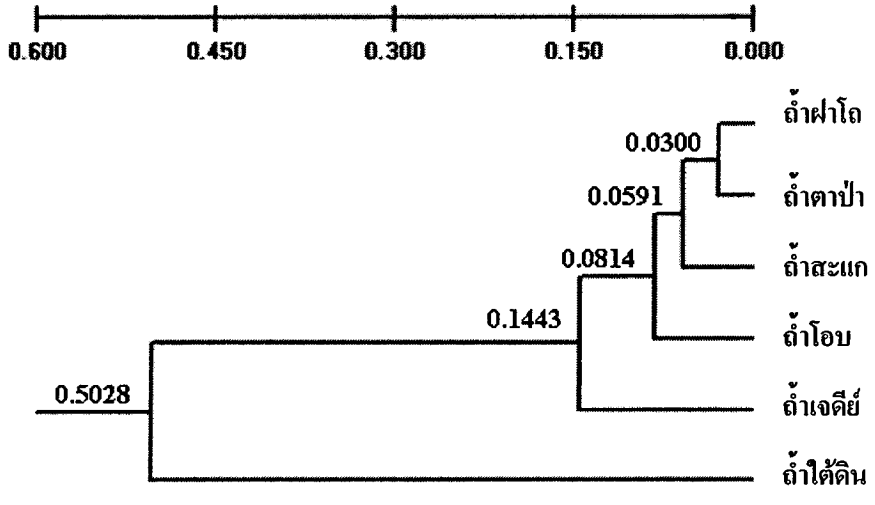
Selvi P.K., Panandam J.M., Yusoff K. & Tan S.G. (2004) Molecular characterisation of the Mafriwal Dairy Cattle of Malaysia using microsatellite markers. *Asian-Australasian Journal of Animal Scienc* **17**:1366-1368

Triwitayakorn, K., B. Moolmuang, S. Sraphet, A. Na-Chiangmai, S. Panyim, and DR. Smith, 2006. Genetic diversity in Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) using cattle microsatellite DNA markers. *Asian Austral J Anim.* **19**:617-621.

Wilmer, WJ. and Barratt, E. 1996. A non-lethal method of tissue sampling for genetic studies of chiropterans. *Bat Research News.* **37**:1-3.

**ภาคผนวก**

การศึกษาวิจัยโครงการนี้ เป็นการศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม ซึ่งเป็นสัตว์ประจำถิ่นของประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่ออกแบบจากดีเอ็นเอของค้างคาวชนิดอื่นที่ได้มีรายงานในฐานข้อมูล โดยการศึกษานั้น ได้ทำการสุ่มจับตัวอย่างค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มจำนาน 135 ตัวอย่างจาก 5 ถ้ำบริเวณเขาสมอคอน จังหวัดลพบุรี และอีก 1 ถ้ำจากเขาสิงห์โต จังหวัดสระแก้ว และทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อใต้ปีกค้างคาวเพื่อนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ จากการศึกษาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม 8 เครื่องหมาย พบว่า ค้างคาวจากถ้ำตาป่าและถ้ำฝาโถมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันมากที่สุด (ภาพที่ 1) ในขณะที่ตัวอย่างจากถ้ำใต้ดินมีความความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากตัวอย่างจากถ้ำอื่นๆ มากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากถ้ำตาป่าและถ้ำฝาโถนั้นอยู่ไม่ไกลกันในบริเวณเขาสมอคอน ส่วนถ้ำใต้ดินนั้นอยู่บริเวณเขาสิงโตซึ่งไกลจากถ้ำอื่นๆ ออกไป นอกจากนี้แล้วยังพบว่าค้างคาวที่ถ้ำใต้ดินนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุดซึ่งอาจเนื่องมาจากจำนวนประชากรค้างคาวในบริเวณนี่มีอยู่น้อยมากและอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการผสมพันธุ์เลือดชิดในประชากรเดียวกันได้มากขึ้น ความรู้และข้อมูลที่ได้จากการวิจัยโครงการนี้ ทำให้ทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นของความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวชนิดนี้ และจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการอนุรักษ์ค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มเพื่อป้องกันไม่ให้สัตว์ประจำถิ่นของไทยชนิดนี้สูญพันธุ์ไปในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป




ภาพที่ 1: แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่มจากถ้ำต่างๆ

**สรุป output ที่ได้จากการดำเนินงาน**

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม (*Hipposideros halophyllus*) สัตว์ประจำถิ่นของไทย (The study of genetic diversity in roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*), a Thai endemic mammal) (รหัสโครงการ BRT R_250008)

ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2551

1. การตีพิมพ์บทความในวารสารวิชาการ

1.1 ตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว (published) จำนวน ..2.. เรื่อง ดังนี้

- กนกพร ไตรวิทยากร สุรชิต แวงโสธรณ์ และสิทธิชัย ศราวุธานุกูล 2550. พบพฤติกรรมการย้ายถิ่นของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม. หมายเหตุนิเวศวิทยา 1(3): 9-10.
- กนกพร ไตรวิทยากร สุรชิต แวงโสธรณ์ และสิทธิชัย ศราวุธานุกูล 2550. พบพฤติกรรมการย้ายถิ่นของค้างคาวหน้ายักษ์จมูกปุ่ม (*Hipposiderose halophyllus*) มีฤติกรรมช่วยกันทำความสะอาดร่างกาย. หมายเหตุนิเวศวิทยา 1(4): 13-14.

1.2 อยู่ระหว่างตีพิมพ์ (in press) จำนวน ... เรื่อง ดังนี้ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร)

1.3 อยู่ระหว่างส่งต้นฉบับให้วารสารวิชาการ (submitted) จำนวน ..-.. เรื่อง ดังนี้

(ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง)

1.4 อยู่ระหว่างการจัดทำต้นฉบับ (in manuscript) จำนวน ..1.. เรื่อง ดังนี้

- Triwitayakorn K, Weangsothorn S, Whankaew S, Poopea S. and Tiensiri Moonchan. Genetic diversity of the Thai roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*). CONSERVATION GENETICS

2. การตีพิมพ์ผลงานในรูปแบบ Proceeding/คู่มือ/หนังสือ หรืออื่นๆ (โปรดระบุ) จำนวน ....เรื่อง

3. การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ จำนวน 2 เรื่องดังนี้

- K. Triwitayakorn, S. Waengsothorn, K. Muangkhum, S. Charavuthanukul and T. Moonchan. A study of genetic diversity of the roundleaf bat (Hipposideros halophyllus) in Thailand, a Thai endemic mammal. 11th BRT Annual Meeting, 15-18 ต.ค. 50 ณ โรงแรมนภาลัย จ.อุดรธานี

- Jukkaphop Chaikajornwat, Sutita Wangchiraniran, Pawinee Wathanathavorn, Orawan Piyaboon and Kanokporn Triwitayakorn. The study of genetic diversity in roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*), a Thai endemic mammal.The Second Shanghai International Youth Science and Technology Expo, Shanghai, China, 15-18 July 2008.

4. การนำเสนอผลงานในรูปแบบ oral presentation จำนวน 1 เรื่องดังนี้

   - Jukkaphop Chaikajornwat, Sutita Wangchiraniran, Pawinee Wathanathavorn, Orawan Piyaboon and Kanokporn Triwitayakorn. The study of genetic diversity in roundleaf bat (*Hipposideros halophyllus*), a Thai endemic mammal. The Second Shanghai International Youth Science and Technology Expo, Shanghai, China, 15-18 July 2008.

5. จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาตรี โท เอก ในโครงการ จำนวน ..-.. คน ดังนี้