การตรวจสอบความหลากหลายพันธุกรรมของชันโรงในจังหวัดนครนายกด้วยเทคนิค HAT-RAPD และการวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน 16SrRNA

ศิริกุล ธรรมจิตรสกุล[1]* ภาวินี ดีแท้[2] และกัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์[3]

[1]คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ นครนายก 26120
[2]สาขาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี ไทรโยค กาญจนบุรี 71150
[3]คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ นครนายก 26120
*E-mail: sirikul.thum@gmail.com

รับบทความ: 29 กรกฎาคม 2557 ยอมรับตีพิมพ์: 22 กันยายน 2557

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในพื้นที่จังหวัดนครนายกด้วยวิธี HAT-RAPD และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16SrRNA ของชันโรง 6 ชนิด จำนวน 43 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HAT-RAPD พบว่า *Tetragonula pagdeni* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด โดยมีรูปแบบของ haplotype จำนวน 10 แถบ มี %polymorphic band เท่ากับ 76.92 และ mean of heterozygosity เท่ากับ 0.224±0.056 ในขณะ *Tetragonilla collina*, *Tetragonula sirindhornae*, *Tetragonula hirashimai*, *Lisotrigona furva* และ *Lepidotrigona terminata* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ จากการวิเคราะห์ AMOVA บ่งชี้ว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดชันโรงอย่างมีนัยสำคัญ (Φ_{PT} = 0.46, *p*-value = 0.0001) เมื่อวิเคราะห์ยีน 16SrRNA ของชันโรงแต่ละชนิด พบว่า ประกอบด้วยเบส A และ T ในสัดส่วนที่สูง โดย *T. pagdeni* มีรูปแบบของ haplotype มากที่สุดถึง 18 แบบ และการวิเคราะห์ลำดับยีนสามารถบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสูง ยกเว้น *L. terminata* โดยให้ค่า haplotype diversity อยู่ในช่วง 0.833 ถึง 1.000 และค่า nucleotide diversity อยู่ในช่วง 0.086 ถึง 0.318 นอกจากนี้ลำดับเบสสามารถบ่งบอกความแตกต่างพันธุกรรมระหว่างชนิดชันโรงแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (χ^2= 220.000, *p*-value = 0.0225)

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม HAT-RAPD ยีน 16SrRNA ชันโรง

Determining Genetic Diversity of Stingless Bees in Nakorn Nayok by HAT-RAPD and 16SrRNA analysis

Sirikul Thummajitsakul[1]*, Pawinee Detae[2] and Kun Silprasit[3]

[1]Faculty of Health Science, Srinakharinwirot University, Ongkharak, Nakhon Nayok 26120, Thailand
[2]Food Technology Program, Mahidol University, Kanchanaburi Campus, Saiyok, Kanchanaburi 71150, Thailand
[3]Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University, Ongkharak, Nakhon Nayok 26120, Thailand
*E-mail: sirikul.thum@gmail.com

Abstract

The genetic differentiation of stingless bees in Nakorn Nayok was determined by HAT-RAPD and 16SrRNA analysis in 43 individuals. The HAT-RAPD results indicated that *Tetragonula pagdeni* revealed the highest genetic diversity (10 haplotypes, %polymorphic band = 76.92 and mean of heterozygosity = 0.224±0.056) whereas *Tetragonilla collina, T. sirindhornae, Tetragonula hirashimai, Lisotrigona furva* and *Lepidotrigona terminata* showed relatively low HAT-RAPD polymorphisms. Moreover, the AMOVA results indicated that genetic differentiation among six species of stingless bees was statistically significant. (Φ_{PT} = 0.46, *p*-value = 0.0001). The 16SrRNA analysis showed a high level of A and T components. Among these, *T. pagdeni* revealed 18 haplotypes. In addition, the 16SrRNA analysis indicated high genetic differentiation in each species, except for *L. terminata*. There were the values of haplotype diversity and the nucleotide diversity in ranges of 0.833 to 1.000 and 0.086 to 0.318, respectively. The 16SrRNA sequences also revealed that genetic differentiation among six species were statistically significant (χ^2= 220.000, *p*-value = 0.0225).

Keywords: Genetic diversity, HAT-RAPD, 16SrRNA genes, Stingless bees

บทนำ

ชันโรงเป็นแมลงสังคมจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับผึ้งแต่ไม่มีเหล็กใน สามารถป้องกันการบุกรุกจากศัตรู ด้วยการสะสมยางไม้ที่เก็บมาจากพืชชนิดต่าง ๆ ไว้ในรัง (Roubik, 1989) ชันโรงกระจายตัวทั่วไปตามเขตร้อนทั่วโลก สร้างรังในโพรงไม้และโพรงดิน และเป็นแมลงที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ โดยเป็นแมลงที่ช่วยผสมเกสรและมีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร (Heard, 1999) และยังสามารถผลิตน้ำผึ้งและพรอพอลิสได้เช่นเดียวกับผึ้งทั่วไป การเลี้ยงชันโรงเพื่อเก็บน้ำผึ้ง เกสร และพรอพอลิส (meliponiculture) มีมาตั้งแต่อดีตในพื้นที่ชนบท เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์แผนโบราณ (Foster, 1942) นอกจากนั้นชันโรงยังมีความสำคัญต่อระบบนิเวศและมีความหลากหลายทางชนิด ลักษณะปากรัง และโครงสร้างรัง ปัจจุบันพบชันโรงเกือบ 500 ชนิด (Michener, 2007) ชันโรงสกุล *Melipona* เป็นสกุลที่นิยมเพาะเลี้ยงในทวีปอเมริกากลางและใต้ และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Dain, 1991) ชันโรงสกุล *Trigona* เป็นสกุลที่พบมากในประเทศแถบเอเชีย เช่น ไทย อินเดีย ศรีลังกา ไต้หวัน (Michener, 2000) โดยมีรายงานในประเทศไทยว่า พบชันโรงจำนวน 32 ชนิด ที่อยู่ในสกุล *Trigona* (Klakasikorn et al., 2005) ชันโรงชนิด *T. pagdeni* เป็นชนิดที่พบได้มากและพบได้ทั่วไปตามลักษณะภูมิศาสตร์ของประเทศไทย โดยสร้างรังตามสิ่งก่อสร้างของมนุษย์ และตามแหล่งธรรมชาติอื่น ๆ ได้แก่ โพรงหินโพรงดินและโพรงต้นไม้ (Thummajitsakul et al., 2011) ซึ่งประเทศไทยมีทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นฐานทรัพยากรอาหารที่สำคัญของประเทศ โดยเฉพาะจังหวัดนคร-

นายกเป็นพื้นที่อุดมด้วยทรัพยากรธรรมชาติ และมีการทำนาและสวนผลไม้เป็นจำนวนมาก (กลุ่มงานข้อมูลสารสนเทศและการสื่อสาร, 2557) แต่ข้อมูลเกี่ยวกับชันโรงและประโยชน์ทางสุขภาพยังมีอยู่น้อยมาก โดยหากการพัฒนาทางเทคโนโลยีและสิ่งก่อสร้างของมนุษย์ เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วอาจส่งผลให้เกิดการลดลงและสูญพันธุ์ของชันโรงได้ และคุณค่าที่ได้จากชันโรงและผลผลิตต่อคุณภาพชีวิตที่ดีของมนุษย์จะสูญหายไป

เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อวิเคราะห์จีโนมดีเอ็นเอกันอย่างแพร่หลาย ใช้ง่าย รวดเร็วและไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่สนใจมาก่อน โดยเคยมีรายงานการใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาพันธุกรรมและวิวัฒนาการของแมลงชนิดต่าง ๆ (Harry et al., 1998) และเทคนิค RAPD สามารถใช้บ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมตามลักษณะทางภูมิศาสตร์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง *Tetragonisca angustula* (Baitala et al., 2006) แต่เทคนิค RAPD มีข้อเสีย คือ มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ และเมื่อทำซ้ำมักจะให้ผลที่ต่างจากเดิม ซึ่งปัจจุบันนี้การใช้เทคนิค HAT-RAPD (high annealing temperature-RAPD) จะช่วยทำให้ผลที่ได้แม่นยำมากขึ้น โดยการเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนแอนนีลลิ่ง (annealing temperature) ให้อยู่ระหว่าง 45–62°C (Eimert et al., 2003; Ruangsuttapha et al., 2007)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในจังหวัดนครนายกสามารถใช้เป็นข้อมูลที่สำคัญเพื่อการควบคุมและอนุรักษ์ชันโรงในพื้นที่ท้องถิ่นที่มีโอกาสเสี่ยงที่จะถูกทำลายรังที่อยู่อาศัยและอาจก่อให้เกิดการสูญพันธุ์ได้ และสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากชันโรงเพื่อการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรต่อไปได้ ดังนั้นจุดประสงค์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในพื้นที่จังหวัดนครนายก เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอนุรักษ์ชันโรงและการใช้ประโยชน์จากชันโรงอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างชันโรงและการสกัดดีเอ็นเอ

ใช้ตัวอย่างชันโรง 6 ชนิด จาก 4 สกุล ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ *Tetragonula pagdeni* (จำนวน 24 ตัวอย่าง) *Tetragonula sirindhornae* (จำนวน 6 ตัวอย่าง) *Lisotrigona furva* (จำนวน 4 ตัวอย่าง) *Tetragonula hirashimai* (จำนวน 3 ตัวอย่าง) *Tetragonilla collina* (จำนวน 4 ตัวอย่าง) และ *Lepidotrigona terminata* (จำนวน 2 ตัวอย่าง) ตัวอย่างชันโรงทั้งหมดพบในพื้นที่จังหวัดนครนายกและมีการติดตามข้อมูลทางภูมิศาสตร์ด้วยพิกัด GPS (global positioning system) โดยใช้เครื่อง Garmin GPS MAP 62s ในระบบ UTM (x-utm และ y-utm) โดยแสดงจุดพิกัดด้วย Garmin BaseCamp software รุ่น 4.2.5 และแสดงภาพถ่ายดาวเทียมใน Google Earth รุ่น 7.1.2.2041 (ภาพที่ 1) และจำแนกชนิดชันโรงด้วยสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องสเตอริโอ (ZATURN Stereo Microscope) (ศิริกุล ธรรมจิตรสกุล และคณะ, 2557) โดยนำตัวอย่างชันโรง 1 ตัวจากแต่ละรัง ทั้งหมด 43 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen, USA) หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอผ่านเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟไลซิส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และส่องดูภายใต้แสงยูวี

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD

เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 1 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ OPL-11 (Oliveira et al., 2004) ในปฏิกิริยา PCR รวมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่แบบจำนวน 25 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ 2X GoTaq® Green Master Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ประกอบด้วยสารละลายบัฟฟอร์ pH 8.5 dATP เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ dGTP เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ dCTP เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ dTTP เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ และ $MgCl_2$ เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์) โดยมีวัฏจักรของปฏิกิริยา เริ่มที่ขั้นตอน pre-denature 95°C นาน 5 นาที และตามด้วย 35 รอบของ 95°C นาน 45 วินาที (denature) 45°C นาน 45 วินาที (annealing) 72°C นาน 1 นาที (extension) และ final extension 72°C นาน 7 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอผ่านเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟไลซิส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ แล้วย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และส่องดูภายใต้แสงยูวี

การหาลำดับเบสของยีน 16SrRNA

เพิ่มจำนวนชิ้นยีน 16SrRNA ด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Thummajitsakul et al. (2012) โดยปฏิกิริยา

ภาพที่ 1 แผนที่เก็บตัวอย่างชันโรงในพื้นที่จังหวัดนครนายก โดยแสดงจุดพิกัดด้วย Garmin BaseCamp software รุ่น 4.2.5 และแสดงภาพถ่ายดาวเทียมบน Google Earth รุ่น 7.1.2.2041 วันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2557

PCR รวมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบจำนวน 50 นาโนกรัม 0.1 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์และ 2X GoTaq® Green Master Mix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (ประกอบด้วยสารละลายบัฟฟอร์ pH 8.5 dATP เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ dGTP เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ dCTP เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ dTTP เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ และ $MgCl_2$ เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์) วัฏจักรของปฏิกิริยาเริ่มที่ขั้นตอน pre-denature 95°C นาน 3 นาที และตามด้วย 5 รอบของ 95°C นาน 30 วินาที (denature) 45°C นาน 1 นาที (annealing) 72°C นาน 50 วินาที (extension) และตามด้วย 35 รอบของ 95 °C นาน 30 วินาที (denature) 56°C นาน 30 วินาที (annealing) 72°C นาน 50 วินาที (extension) และ final extension 72°C นาน 7 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอผ่านเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟไลซิส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ แล้วย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และส่องดูภายใต้แสงยูวี หลังจากนั้นทำความสะอาด PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยชุด HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) และใช้บริการหาลำดับเบสที่ Macrogen (กรุงโซล, ประเทศเกาหลี) โดยใช้เครื่อง ABI Automatic Sequencer 3730XL ภายใต้ภาวะ BigDye terminator cycling

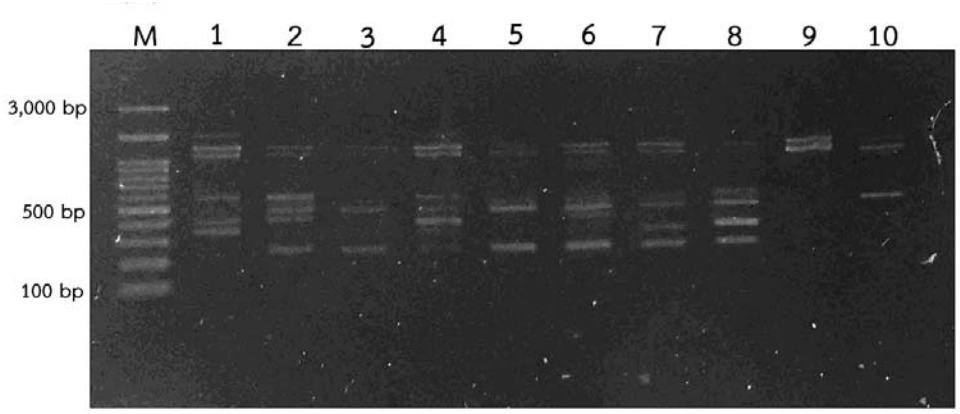
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค HAT-RAPD โดยการแปลผลแถบดีเอ็นเอที่พบให้เป็น 1 และหากไม่พบแถบดีเอ็นเอให้เป็น 0 และวิเคราะห์ค่าความหลากหลาย %polymorphic loci และ heterozygozity และวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ชันโรงด้วย AMOVA ที่อยู่ในโปรแกรม GenAlEx version 6.501 (Peakall and Smouse, 2012) การวิเคราะห์ผลลำดับเบสบนยีน 16sRNA โดยใช้โปรแกรม DnaSP software รุ่น 5.10.1 (Librado et al., 2009) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี UPGMA (un-weighted pairgroup method with averages) ในโปรแกรม MEGA version 6.06 (Tamura et al., 2013)

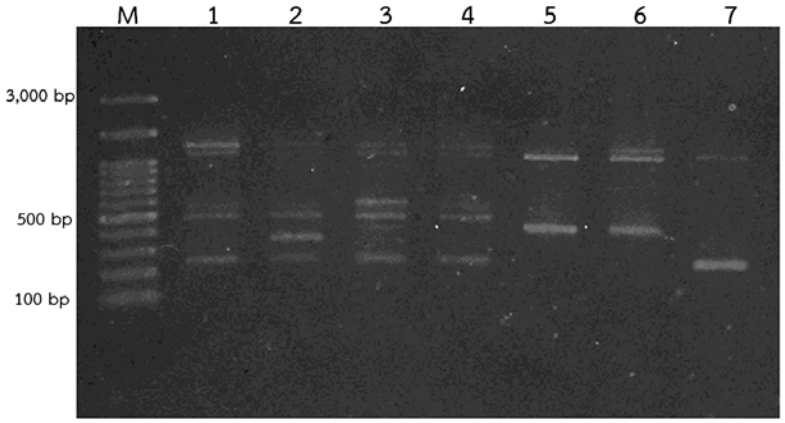
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การวิจัยครั้งนี้ได้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุ-กรรมจากชันโรงจำนวน 43 ตัวอย่าง ที่พบใน 16 ตำบล ได้แก่ ตำบลพรหมณี ตำบลเขาพระ ตำบลหินตั้ง ตำบลนครนายก

ตำบลท่าทราย ตำบลสาริกา ตำบลเกาะหวาย ตำบลโคกกรวด ตำบลบ้านพร้าว ตำบลอาษา ตำบลพิกุลออก ตำบลบ้านนา ตำบลป่าขะ ตำบลศรีกระอาง ตำบลบางปลากด และตำบลองครักษ์ ในพื้นที่อำเภอเมือง อำเภอปากพลี อำเภอบ้านนา และอำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก) ดังในภาพที่ 1 การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างชันโรง 43 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม พบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (amplified PCR products) มีขนาดระหว่าง 200 ถึง 1,500 bp โดยมีรูปแบบของ haplotype ที่พบในกลุ่มชนิดชันโรงทั้งหมด มี 22 แบบ จากตำแหน่งดีเอ็นเอ 12 ตำแหน่ง (loci) (ภาพที่ 2 และ 3)



ภาพที่ 2 ตัวอย่างรูปแบบของ HAT-RAPD ของชันโรงที่ทดสอบ โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp marker; 1 – 8 คือ PCR product ของตัวอย่าง *T. pagdeni*; 9 – 10 คือ PCR product ของตัวอย่าง *T. sirindhornae*



ภาพที่ 3 ตัวอย่างรูปแบบของ HAT-RAPD ของชันโรงที่ทดสอบ โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp marker; 1 – 4 คือ PCR product ของตัวอย่าง *T. pagdeni*; 5 – 6 คือ PCR product ของตัวอย่าง *L. furva*; 7 คือ PCR product ของตัวอย่าง*T. hirashimai*

การวิเคราะห์พันธุกรรมของชันโรงในพื้นที่จังหวัดนครนายกด้วยเทคนิค HAT-RAPD สามารถบ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดและระหว่างชนิดชันโรงทั้ง 6 ชนิด โดยพบว่า *T. pagdeni* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดสูงสุด โดยมีรูปแบบของ haplotype ทั้งหมด 10 แถบ ค่า %polymorphic band เท่ากับ 76.92 ค่าเฉลี่ย Heterozygosity (Mean H_e) เท่ากับ 0.224±0.056 รองลงมาชนิด *T. collina* (มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ % polymorphic band = 23.08 ค่า Mean H_e = 0.082±0.045 และ *T. sirindhornae* (มีแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ %polymorphic band = 15.38 ค่า Mean H_e = 0.069±0.047) ตามด้วย *T. hirashimai* (มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ %polymorphic band =

7.69 ค่า Mean H_e = 0.038±0.038) *L. furva* (มีแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ %polymorphic band = 7.69 ค่า Mean H_e = 0.018± 0.018) และ *L. terminata* (มีแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ %polymorphic band = 0 และค่า Mean H_e = 0) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามชันโรงชนิด *T. collina T. sirindhornae T. hirashimai L. furva และ L. terminata* มี HAT-RAPD polymorphism ในระดับต่ำ อาจเป็นผลจากจำนวนประชากรมีจำนวนน้อย อันเนื่องมาจากถิ่นที่อยู่อาศัยของชันโรงเหล่านี้ถูกรบกวนจนลดจำนวนลง (Waldschmidt et al. 2002) และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างประชากรด้วย AMOVA พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดชันโรง อย่างมีนัยสำคัญ(Φ_{PT} เท่ากับ 0.46, *p*-value = 0.0001) และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดชันโรง (Φ_{PR} =0.54) (ตาราง 1)

ตาราง 1 ผล AMOVA ของชันโรงทั้ง 6 ชนิดที่วิเคราะห์จาก HAT-RAPD polymorphisms

Variance Source	df	SS	MS	Est. Var.	%Var.	Statistics	*p-value*
Among Populations	5	29.479	5.896	0.879	46%	Φ_{PT} = 0.46	0.0001
Within Populations	37	37.917	1.025	1.025	54%	Φ_{PR} =0.54	
Total	42	67.395		1.903	100%		

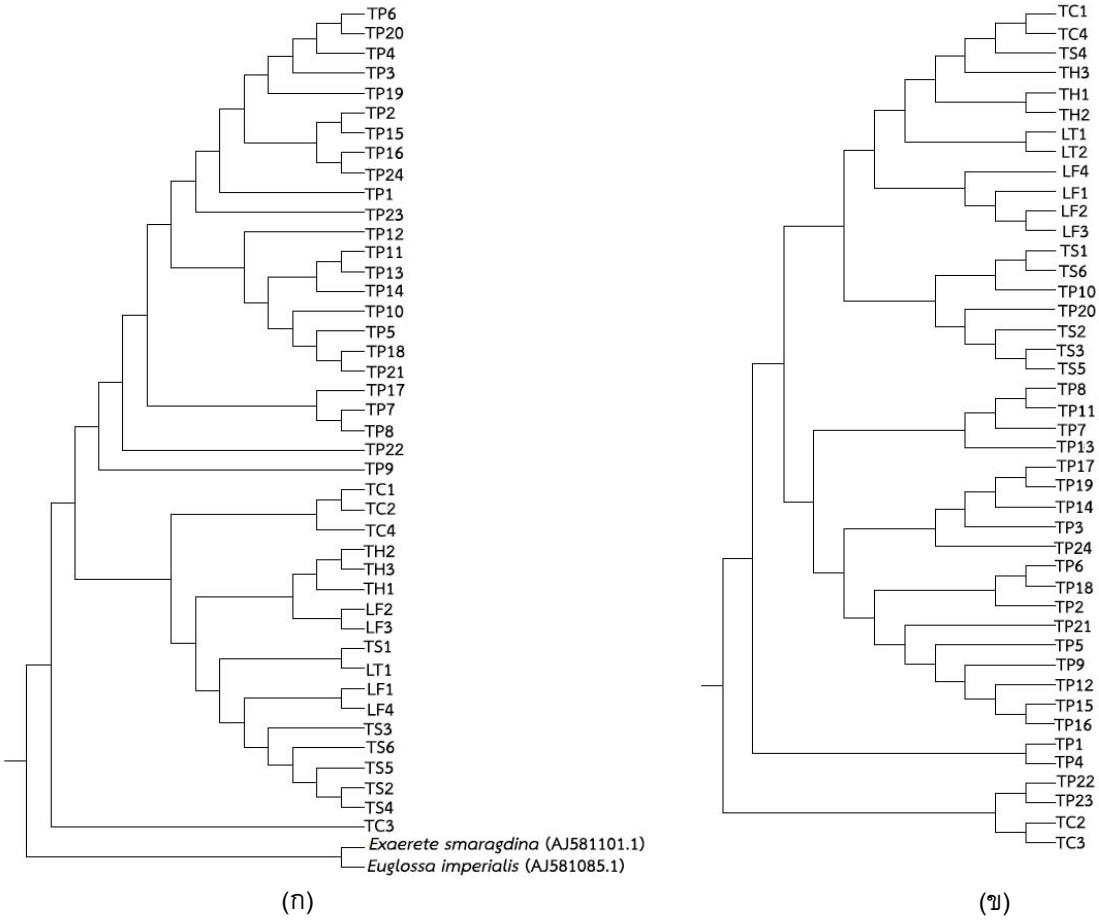
หมายเหตุ SS = Sum of square, MS = Mean square, Est. Var. = estimated variance

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน 16SrRNA จากตัวอย่างชันโรง 6 ชนิด ทั้งหมด 43 ตัวอย่าง พบเบส T, C, A และ G เฉลี่ย 37.0, 10.1, 38.5 และ 14.4% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Thummajitsakul et al. (2013) ที่พบว่ายีนต่าง ๆ ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของชันโรง *T. pagdeni* ประกอบด้วยเบส A และ T ในสัดส่วนที่สูง และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน 16SrRNA ในแต่ละชนิด แสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างชนิดชันโรง โดย *T. pagdeni* ให้จำนวนรูปแบบของ haplotype มากที่สุดถึง 18 แบบ จากทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ซึ่งชันโรงแต่ละชนิดมีค่า haplotype diversity สูง ยกเว้น *L. terminata* และแสดงค่า nucleotide diversity สูงใน *T. collina L. furva* และ *T. pagdeni T. hirashimai* และ *T. sirindhornae* ตามลำดับ (ตาราง 2) โดยลำดับเบสในยีน 16SrRNA ในแต่ละชนิด มีลำดับเบสแตกต่างกันภายในแต่ละชนิดชันโรง และพันธุกรรมระหว่างชนิดชันโรงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า χ^2 เท่ากับ 220.000 (*p*-value = 0.0225) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ลำดับเบสของยีน 16S rRNA สามารถบ่งชี้ความผันแปรทางพันธุกรรมของชันโรงได้ดีกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HAT-RAPD ที่ใช้จำนวน 1 ไพรเมอร์ ซึ่งควรมีการใช้ไพรเมอร์ชนิดอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถจำแนกความหลากหลายพันธุกรรมได้มากขึ้น เมื่อยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ พบว่า phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16SrRNA ขนาด 427 bp ด้วยวิธี UPGMA สามารถแสดงให้เห็นความหลากหลายภายในชนิดชันโรงและสายสัมพันธ์ในกลุ่มชันโรงได้ดีกว่า phylogenetic tree ที่วิเคราะห์จากเทคนิค HAT-RAPD (ภาพที่ 4ข)

ตาราง 2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์จากลำดับเบสของยีน 16SrRNA ของชันโรงที่ทดสอบ

ชนิด	Number of sequences	Number of haplotypes	Haplotype diversity	Nucleotide diversity
T. pagdeni	24	18	0.964	0.133
T. sirindhornae	6	6	1.000	0.086
L. furva	4	4	1.000	0.181
T. hirashimai	3	3	1.000	0.088
T. collina	4	3	0.833	0.318
L. terminata	2	1	-	-

เทคนิค HAT-RAPD เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการศึกษาจีโนมิกดีเอ็เอในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น กล้วย ซึ่งมีความแม่นยำสูงและรวดเร็ว (Ruangsuttapha et al., 2007) อย่างไรก็ตาม การศึกษาพันธุกรรมในชันโรงเคยมีการใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาชันโรงชนิดอื่น ๆ เช่น *Tetragonisca angustula* และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่จัดแบ่งตามลักษณะภูมิศาสตร์ (Oliveira et al., 2004) ขณะที่ Waldschmidt et al. (2000) ใช้เทคนิค RAPD ในการหาตัวบ่งชี้ทางดีเอ็นเอ เพื่อใช้บ่งชี้ชันโรงชนิด *Melipona quadrifasciata* ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมในชันโรงชนิด *T. pagdeni* ในพื้นที่จังหวัดนครนายก ที่ได้จากเทคนิค HAT-RAPD และการวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน 16SrRNA สอดคล้องกับการศึกษาของ Thummajitsakul et al. (2008) ที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง *T. pagdeni* ด้วยเทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ TE-AFLP (three enzyme-amplified fragment length polymorphism) พบความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงภายในชันโรงชนิด *T. pagdeni* และสามารถตรวจวัดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรของ *T. pagdeni* ที่จัดแบ่งกลุ่มตามลักษณะทางภูมิศาสตร์ของประเทศไทย ในทำนองเดียวกันเคยมีรายงานการใช้เทคนิค PCR-SSCP (PCR based single strand conformation polymorphism) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16SrRNA โดยสามารถตรวจวัดความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดและระหว่างกลุ่มประชากร *T. pagdeni* ได้ (Thummajitsakul et al., 2011)



(ก) (ข)

ภาพที่ 4 phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์วิวัฒนาการของชันโรงด้วยวิธี UPGMA (the unweighted pairgroup method with averages) โดยที่ A คือ phylogenetic tree ที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16SrRNA ในตัวอย่างชันโรงทั้งหมด โดย TP คือ *T. pagdeni*, TC คือ *T. collina*, TS คือ *T. sirindhornae*, TH คือ *T. hirashimai*, LF คือ *L. furva* และ LT คือ *L. terminata* และกลุ่มเปรียบเทียบคือ *Exaerete smaragdina* (AJ581101.1) และ *Euglossa imperialis* (AJ581085.1) จากฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) และ B คือ phylogenetic tree ที่วิเคราะห์จาก HAT-RAPD polymorphisms

สรุป

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในพื้นที่จังหวัดนครนายกด้วยวิธี HAT-RAPD และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16SrRNA จากชันโรง 6 ชนิด 43 ตัวอย่าง โดยวิธี HAT-RAPD สามารถบ่งบอกว่า *T. pagdeni* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุด โดยชนิด *T. collina T. sirindhornae T. hirashimai L. furva* และ *L. terminata* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ และการวิเคราะห์ AMOVA บ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดชันโรงอย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน 16SrRNA จากตัวอย่างชันโรงทั้งหมด พบเบส A และ T ในสัดส่วนสูง และสามารถบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งภายในชนิดชันโรงและระหว่างชนิดได้อย่างชัดเจน ดังนั้นข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยในครั้งนี้ จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการการอนุรักษ์ชนิดชันโรงในท้องถิ่น การพัฒนาการใช้ประโยชน์จากชันโรงอย่างยั่งยืนและเป็นตัวชี้วัดสภาพสิ่งแวดล้อมได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผนดิน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2557 ตามสัญญาเลขที่ 058/2557 ขอขอบคุณคณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มงานข้อมูลสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานจังหวัดนครนายก. (2557). **สภาพภูมิประเทศ**. สืบค้นจากเวบไซต์ http://www.nakhonnayok.go.th เมื่อวันที่ 3 กรกฎาคม 2557.

ศิริกุล ธรรมจิตรสกุล ภาวินี ดีแท้ และกัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์. (2557, พฤศจิกายน). ความหลากชนิดและการกระจายของชันโรงพื้นเมืองในจังหวัดนครนายก. **การประชุมระดับชาติมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ** (หน้า 328-337). กรุงเทพฯ; มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

Baitala, T. V., Mangolin, C. A., de Alencar, V., de Toledo, A., and Ruvolo-Takasusuki, M. C. C. (2006). RAPD polymorphism in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera; Meliponinae, Trigonini) populations. **Sociobiology** 48(3): 1-13.

Dain, J. L. (1991). **Seringueiros and stingless bees: a study of change in the Brazilian Amazon.** Florida, USA: Department of Anthropology, University of Florida.

Foster, G. M. (1942). Indigenous apiculture among the Popoluca of Veracruz. **American Anthropologist** 44:538-542.

Harry, M., Robin, S., and Lachaise, D. (1998). Use of polymorphic genetic markers (RAPDs) in evolutionary and applied entomology. **Annales de la Societe Entomologique de France** 34: 9-32.

Heard, T. (1999). The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology** 44: 183-206.

Klakasikorn, A., Wongsiri, S., Deowanish S., and Duangphakdee, O. (2005). New record of stingless bees (Meliponini: Trigona) in Thailand. **Natural History Journal of Chulalongkorn University** 5: 1-7.

Librado, P., and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25**:** 1451-1452.

Michener, C.D. (2000). **The Bees of the World**. Baltimore, USA: Johns Hopkins University.

Michener, C.D. (2007). **The Bees of the World**. 2nd ed. USA: The Johns Hopkins University Press.

Oliveira, R. C., Nunes, F. M. F., Campos, A. P. S., Vasconcelos, S. M, Roubik, D., Goulart, L. R., and Kerr, W. E. (2004). Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology** 27: 181-186.

Peakall, R., and Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update.

Bioinformatics 28: 2537-2539.

Roubik, D. W. (1989). **Ecology and natural history of tropical bees**. New York: Cambridge University.

Ruangsuttapha, S., Eimert, K., Schröder, M. B., Silayoi, B., Denduangboripant, J., and Kanchanapoom, K. (2007). Molecular phylogeny of banana cultivars from Thailand based on HAT-RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution** 54: 1565-1572.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30: 2725-2729.

Thummajitsakul, S., Klinbunga, S., Smith, D., and Sittipraneed, S. (2008). Genetic diversity and population structure of *Trigona pagdeni* Schwarz in Thailand. **Apidologie** 39: 446-455.

Thummajitsakul, S., Silprasit K., Sittipraneed, S., and Klinbunga, S. (2013). The partial mitochondrial sequence of the old World stingless bee, *Tetragonula pagdeni*. **Journal of Genetics** 92: 1-5.

Thummajitsakul, S., Sittipraneed, S., and Klinbunga, S. (2011). Genetic differentiation of the stingless bee (*Tetragonula pagdeni*) in Thailand using SSCP analysis of a large subunit of mitochondrial ribosomal DNA. **Biochemical Genetics** 49: 499-510.

Waldschmidt, A. M., Marco-Junior, P., Barros, E. G., and Campos, L. A. O. (2002). Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology** 62: 923-928.