ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246368

RTA4580012 ศ.ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย

โครงการ: การศึกษาปัจจัยการอยู่รอดของผึ้งมิ้ม ชันโรง และพืชอาศัยที่สัมพันธ์กับความหลากหลายทางชีวภาพของถิ่นที่อยู่อาศัยในเขตร้อน

Maintaining Tropical Biodiversity: The Role of the Dwarf Honeybees, Stinglessbees and Beeplants

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีรัตน์ เดี่ยววาณิชย์
รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร
รองศาสตราจารย์ ดร. นิรันดร์ จันทวงศ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี สวาสดิ์ธรรม
Dr. Ratna Thapa

กันยายน 2553

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246368
b00251057

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาปัจจัยการอยู่รอดของผึ้งมิ้ม ชันโรง และพืชอาศัยที่สัมพันธ์กับความหลากหลายทางชีวภาพของถิ่นที่อยู่อาศัยในเขตร้อน

Maintaining Tropical Biodiversity: The Role of the Dwarf Honeybees, Stinglessbees and Beeplants

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

คณะผู้วิจัย

ศ. ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร. สุรีรัตน์ เดี่ยววาณิชย์	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร. วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ผศ. ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รศ. ดร. นิรันดร์ จันทวงศ์	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผศ. ดร. อัญชลี สวาสดิ์ธรรม	คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีธัญบุรี
Dr. Ratna Thapa	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สรุปงานวิจัย

1. สำรวจพืชอาหารและพืชอาศัยของผึ้งและชันโรงชนิดต่าง ๆ

จากการสำรวจชนิดและจำนวนรังของผึ้งชันโรงและชนิดของพืชอาหารสำหรับผึ้งชันโรง บริเวณป่าผลัดใบ ในเขตพื้นที่สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ ระหว่างเดือนเมษายน 2546 ถึง เดือนมีนาคม 2547 พบผึ้งชันโรงจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Trigona apicalis* Smith, *T. collina* Smith, *T. fimbriata* Smith, *T. pagdeni* Schwarz, *T. terminata* Smith และ *T. ventralis* Smith โดยมีพืชที่ออกดอกทั้งสิ้นจำนวน 78 ชนิด และจากการศึกษาจากก้อนเรณูของผึ้งชันโรง *T. collina* Smith และ *T. ventralis* Smith โดยใช้วิธี acetolysis พบพืชที่เป็นอาหารจำนวน 19 และ 15 ชนิด ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์สังคมพืชบริเวณพื้นที่ศึกษาพบว่าพืชอาหารแต่ละชนิดของผึ้งชันโรงไม่ได้ขึ้นอยู่กับความหนาแน่น และความเด่นของพรรณไม้ชนิดนั้นในสังคมพืช ที่ผึ้งชันโรงอาศัยอยู่แสดงถึงพฤติกรรมเลือกชอบในการหาอาหารของผึ้ง

จากการศึกษาการออกหาอาหารโดยนับจำนวนผึ้งมิ้ม *Apis florea* และชันโรง 2 ชนิด คือ *Trigona laeviceps* และ *T. collina* ที่เข้าตอมดอกบัว พบว่า *T. laeviceps* จะเข้าตอมดอกบัวเช้าที่สุด คือ เวลา 07.30 น. และพบมากที่สุดในเวลา 08.30-09.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่เริ่มพบ *T. collina* และ *A. florea* แต่จำนวนการเข้าตอมดอกบัวของ *T. laeviceps* ไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างช่วงเวลาของวัน ในขณะที่ *T. collina* และ *A. florea* จะพบมากเฉพาะในช่วงเวลา 09.30–11.00 น. หลังจากนั้นจะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบ *T. laeviceps* เข้าตอมดอกบัวตลอดทั้งปี และพบมากที่สุดในเดือนมิถุนายน ส่วน *T. collina* ไม่พบเข้าตอมในเดือนพฤษภาคม แต่จะพบมากในเดือนกรกฎาคม และ *A. florea* ไม่พบเข้าตอมในเดือนกรกฎาคมและสิงหาคม แต่จะพบมากที่สุดในเดือนพฤษภาคม แสดงว่าชันโรง โดยเฉพาะ *T. laeviceps* มีความสม่ำเสมอในการออกหาอาหารตลอดทั้งวัน คือพบจำนวนชันโรงเข้าตอมไม่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา ของวัน ซึ่งเป็นรายงานใหม่เพิ่มเติมจากรายงานวิจัยในปี พ.ศ. 2532 ส่วนผึ้งนั้นจะพบมากเฉพาะในช่วงเช้าและเย็นของวันเท่านั้น (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532) นอกจากนี้ พบ *T. laeviceps* และ *T. collina* เข้าตอมดอกบัวเร็วกว่าผึ้งมิ้ม แสดงว่าชันโรงมีพฤติกรรมการออกหาอาหารเร็วกว่าผึ้ง คุณสมบัติเหล่านี้เหมาะแก่การใช้เป็นแมลงผสมเกสรอย่างยิ่ง เนื่องจากการเข้าเก็บอาหารตลอดทั้งวันจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการทำหน้าที่ผสมเกสรแก่พืชที่เราต้องการให้สูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามคุณลักษณะอื่นของชันโรงก็มีส่วนช่วยสนับสนุนประสิทธิภาพในการผสมเกสร เช่น ชันโรง *T. laeviceps* และ *T. collina* เป็นชันโรงที่พบได้ง่าย คือ มักจะทำรังตามบ้านเรือนหรือ

สิ่งก่อสร้างต่าง ๆ (Sakagami et al., 1983) ทำให้ง่ายต่อการย้ายมาเลี้ยงในกล่องหรือหีบเลี้ยง และสะดวกต่อการเคลื่อนย้ายเพื่อนำไปช่วยผสมเกสร

2. **ศึกษาเปรียบเทียบ** natural history **ของ** *Apis florea*, *A. andreniformis* **และ** *Trigona* spp.

ผึ้งมิ้ม *Apis florea* เป็นแมลงผสมเกสรซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรในประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม โดยเฉพาะไม้ผล เช่น มะม่วง ลำไย ลิ้นจี่ และเงาะ แต่นักล่าผึ้ง (bee hunters) ตีรังผึ้งมิ้มเพื่อนำตัวอ่อนและน้ำผึ้งมาเป็นอาหารและขายเป็นสินค้าเป็นจำนวนมาก โดยจะพบรังของผึ้งมิ้มวางขายตามตลาดทั่วไป เช่น ตลาดนัดสวนจตุจักร และบริเวณริมถนนจังหวัดนครสวรรค์ เป็นต้น เนื่องจากผึ้งมิ้มเป็นผึ้งขนาดเล็กและสร้างรังบนต้นไม้ที่ไม่สูงนัก ตลอดจนมีพฤติกรรมในการป้องกันตัวที่ไม่ดุร้าย ดังนั้นนักล่าผึ้งสามารถตีเอารังได้ง่าย ทำให้ประชากรผึ้งมิ้มลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว และส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทย (Oldroyd and Wongsiri, 2006) ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวงจรชีวิตของการเจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ (ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ ไข่ถึงตัวเต็มวัย) ของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้ในผึ้งมิ้ม และการสร้างผึ้งนางพญา เพื่อจะนำไปสู่ความรู้เบื้องต้นในการผสมเทียมผึ้งมิ้มเพื่อขยายพันธุ์ของผึ้งมิ้ม

จากการศึกษาพบว่า ระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของผึ้งงาน ผึ้งนางพญา และผึ้งตัวผู้ มีระยะไข่ ระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ ไข่จนถึงตัวเต็มวัย ตามลำดับดังนี้ ผึ้งงาน 3 วัน (ระยะไข่) 6.32 วัน (ระยะตัวหนอน) 11.72 วัน (ระยะดักแด้) และ 21.04 วัน (ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย) ผึ้งนางพญา 3 วัน (ระยะไข่) 6.66 วัน (ระยะตัวหนอน) 8.04 วัน (ระยะดักแด้) และ 17.7 วัน (ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย) และผึ้งตัวผู้ 3 วัน (ระยะไข่) 6.62 วัน (ระยะตัวหนอน) 12.73 (ระยะดักแด้) และ 22.25 วัน (ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย) จากผลการทดลองพบว่า การสร้างนางพญาผึ้งมิ้มขึ้นมาใหม่เพื่อทดแทนนางพญาตัวเดิม มีค่าเฉลี่ย 7.8 ตัวต่อรัง สำหรับผึ้ง *A. andreniformis* มีระยะการเจริญเติบโตหรือวงจรชีวิตใกล้เคียงกับผึ้ง *A. florea*

ผึ้งงานของผึ้งมิ้มปกติจะไม่สามารถผสมพันธุ์ แต่รังไข่ยังมีอย่างปกติ เมื่อขาดนางพญา รังไข่ของผึ้งงานจะเริ่มเจริญเช่นเดียวกับนางพญาพร้อมที่จะวางไข่ แต่ไข่ของผึ้งงานนั้นจะถูกกำจัดกันเอง (worker policing) โดยผึ้งงานตัวอื่น ๆ ในรัง จากงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเป็นเวลา 2 ปี พบว่าผึ้งมิ้ม 40 รังที่ขาดนางพญา จะมีเพียง 2 รังเท่านั้นที่ไข่ของผึ้งงานออกมาเป็นตัวเต็มวัย แต่เป็นตัวผู้ทั้งหมด ส่วนอีก 38 รัง จะไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากถูกกำจัดและหนีรังไปทั้งหมด การพิสูจน์ในห้องปฏิบัติการโดยการผ่าตัด พบว่าผึ้งมิ้ม 6% จะมีรังไข่เริ่มเจริญ หลังจากผึ้งนางพญาหายไป 4 วัน และ 33% ของผึ้งงานทั้งหมด จะเริ่มมีรังไข่เจริญภายใน 3 สัปดาห์ ผึ้งงาน

จะเริ่มวางไข่ภายใน 4 วัน ได้มีการศึกษาทางพันธุ์ศาสตร์เพิ่มเติมโดย microsatellites พบว่าผึ้งงานที่เป็นพี่น้องกันโดยตรงจากพ่อเดียวกันจะกำจัดไข่พวกเดียวกันน้อยกว่าไข่ที่มาจากพี่น้องที่ต่างพ่อกัน การหนีรังมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากรังที่มีพฤติกรรมกาฝากเกิดขึ้นด้วย (Nanork, Wongsiri and Oldroyd, 2006)

ผึ้งมิ้ม *A. florea* และผึ้งมิ้มเล็ก *A. andreniformis* สร้างรังเดี่ยวในที่โล่งบนกิ่งไม้ ซึ่งมีโอกาสรับแสงแดดในฤดูร้อนและรับฝนในฤดูฝน จากการศึกษาพฤติกรรมการควบคุมอุณหภูมิและป้องกันฝนของผึ้งทั้งสองชนิดนี้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าเมื่อรังผึ้งถูกแสงแดดโดยตรง ผึ้งมิ้มจะกระพือปีกจนสูญเสียการเรียงตัวแบบม่าน (curtain) และบินสั้น ๆ เพื่อลดอุณหภูมิให้กับหลอดรวงตัวอ่อน ส่วนผึ้งมิ้มเล็กก็กระพือปีก แต่ยังคงรักษาการเรียงตัวแบบม่านในบริเวณด้านล่างของรัง ในช่วงฤดูฝน ผึ้งมิ้มทุกตัวที่เรียงตัวแบบม่านจะขึ้นไปบนลานเต้นรำและกางปีกซ้อน ๆ กันเป็นร่มคล้ายหลังคาป้องกันรังจากฝน ส่วนผึ้งมิ้มเล็กที่เรียงตัวแบบม่านจะหันหัวขึ้นและยึดกันแน่นที่บริเวณหลอดรวงตัวอ่อน และกางปีกเป็นรูปตัววีหัวกลับ ซึ่งปีกจะวางทับอยู่บนปีกของผึ้งอีกตัวหนึ่ง ผึ้งทั้งสองชนิดนี้มีขนาดหลอดรวงน้ำผึ้งใหญ่เป็นสองเท่าของหลอดรวงตัวอ่อนราวกับเป็นหลังคาของรังผึ้ง (Oldroyd and Wongsiri, 2006)

3. ศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างผึ้งใน species ต่าง ๆ ในระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ RNA และ DNA

3.1 Purification of alpha-glucosidase (AG) in *Apis florea*

ทำการศึกษาในผึ้งมิ้ม จากการใช้ RT-PCR พบการแสดงออกสูงสุดของยีนแอลฟากลูโคซิเดสในผึ้งระยะผึ้งหาออกอาหาร พบการแสดงออกบ้างในผึ้งระยะพยาบาล แต่ไม่พบการแสดงออกเลยในไข่ จากการใช้เทคนิคเดียวกันได้ลำดับ cDNA ของยีนดังกล่าวที่มีความยาว 1,739 bp ทำการ Align ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน (ความยาว 568 กรดอะมิโน) โดยใช้โปรแกรม Clustal W ผลที่ได้แสดงความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่มีต่อยีนดังกล่าวในผึ้งพันธุ์ถึง 95% สร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม UPGMA และ NJ ทำการสกัดบริสุทธิ์เอนไซม์ AG โดยใช้ DEAE-cellulose (0.17 u/ mg) และ Superdex 200 (0.5 และ 2.38 u/ mg) รวมทั้งใช้ Sephadex G-150 (1.355 u/ mg) ทำการหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค MALDI - TOF MS (Chanchao, Padoongsupalai and Sangvanich, 2007)

3.2 Purification of alpha-glucosidase (AG) in *Apis cerana*

จากการศึกษาในผึ้งโพรง ได้ลำดับเบสของยีนแอลฟากลูโคซิเดสขนาด 1,740 bp โดยใช้เทคนิค RT-PCR ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับยีนนี้ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ พบว่ามีความเหมือนสูงสุดถึง 96% กับยีนนี้ในผึ้งพันธุ์ จากการใช้โปรแกรม UPGMA และ NJ ของลำดับกรดอะมิโนพบสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันระหว่างผึ้งโพรงกับผึ้งพันธุ์ ทำการสกัดบริสุทธิ์เอนไซม์ AG โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบ DEAE-cellulose (2.171 u/ mg) และ Superdex 200 (1.804 u/ mg) หลังจากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว พบว่าอยู่ที่ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50°C และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มคือ 50 นาที ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (ซูโครส) ที่เหมาะสมคือ 60 mM ได้มวลโมเลกุลของ AG คือประมาณ 68 กิโลดาลตัน ได้ลำดับของกรดอะมิโนของ AG โดยใช้เทคนิค MALDI – TOF MS (Chanchao, Pilalam and Sangvanich, 2008)

4. การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทั้งภายในและระหว่างชนิดของ *A. florea*, *A. andreniformis* และ *Trigona* spp.

4.1 การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริก และทางพันธุกรรมของผึ้งมิ้ม *A. florea* Fabricius, 1787 ในประเทศไทย

ผึ้งมิ้ม *Apis florea* Fabricius, 1787 เป็นผึ้งพื้นเมืองชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งมีการศึกษาทางด้านมอร์โฟเมตริกน้อยมาก การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความแตกต่างภายในชนิดของผึ้งมิ้ม จึงสุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งงานจากรังผึ้งมิ้มที่อยู่ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยจำนวน 50 รัง ๆ ละ 15 ตัว จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์เพื่อรอการผ่าตัด โดยเลือกผ่าตัดส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษาลักษณะ 9 ชนิดได้แก่ โพรบอสซิส (proboscis) หนวด (antenna) ปีกหน้า (forewing) ปีกหลัง (hindwing) ขาหลัง (hind leg) สเตอร์ไนต์ที่ 3 และ 6 (3^{rd} and 6^{th} sternites) และเทอร์ไกต์ที่ 3 และ 4 (3^{rd} and 4^{th} tergites) จากนั้นติดตัวอย่างบนสไลด์ เพื่อวัดขนาดความกว้าง ความยาวและมุมของลักษณะที่ศึกษา 22 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและบันทึกลงในคอมพิวเตอร์

ผลการวิเคราะห์ปัจจัย (Factor Analysis) พบว่ามี 14 ลักษณะที่ถูกคัดเลือกเป็นปัจจัยใหม่ได้ 4 กลุ่ม คือ ปัจจัยที่ 1 ประกอบด้วยลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับความยาวของลำตัว ขาหลังและหนวด ปัจจัยที่ 2 มีความสัมพันธ์กับความยาวเส้นปีกหน้าและปีกหน้า ปัจจัยที่ 3 มีความสัมพันธ์กับจำนวนฮามูไลและขนาดมุมที่ 37 และปัจจัยที่ 4 มีความสัมพันธ์กับขนาดมุมที่ 34 ผลการ

วิเคราะห์ปัจจัยและการจำแนกกลุ่ม (Factor and Cluster Analysis) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 22 ลักษณะ พบว่าไม่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างผึ้งมิ้มได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยสถิติ Student-Newman-Keuls กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา 4 ลักษณะ ได้แก่ forewing radial cell length, metatarsus length, 3rd sternite length และ antenna length แสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกตัวอย่างผึ้งมิ้มที่อาศัยอยู่ในหมู่เกาะพะงันและสมุยออกจากแผ่นดินใหญ่ได้ ซึ่งอาจจะอธิบายได้จากเหตุผลที่ผึ้งมิ้มมีพฤติกรรมการอพยพตามฤดูกาล การแยกรังและการหนีรังค่อนข้างสูง ทำให้ผึ้งมิ้มมีการแพร่กระจายในธรรมชาติอย่างรวดเร็วและครอบคลุมทั่วทั้งประเทศมากกว่าการจำกัดอยู่ภายในท้องถิ่น (Chaiyawong et al., 2004)

ได้มีการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของผึ้งมิ้ม (*Apis florea* Fabricius, 1787) ซึ่งเป็นผึ้งพื้นเมืองขนาดเล็กที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ 3 บริเวณ คือบริเวณระหว่างยีน CO I และ CO II, ยีน L-rRNA, และยีน Cytb I-tRNA^{Ser} ซึ่งตัวอย่างผึ้งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 180 รัง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากทั่วประเทศไทย รวมทั้งเกาะสมุยและเกาะพะงัน หลังจากเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในทั้ง 3 บริเวณดังกล่าวแล้ว ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 1590, 760, และ 870 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยเอ็นไซม์ที่ใช้ทั้งหมดคือ *Acl* I, *Afl* I, *Ase* I, *bam*H I, *Bcl* I, *Dra* I, *Eco*R I, *Hin*d III, *Hin*f I, *Rsa* I, *Ssp* I และ *Swa* I แต่มีเพียง 6 เอ็นไซม์ คือ *Ase* I, *Bcl* I, *Dra* I, *Hin*d III, *Hin*f I และ *Ssp* I ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอระหว่างบริเวณ CO I และ CO II ได้ และมีเพียง 3 เอ็นไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในบริเวณยีน L-rRNA และ Cytb I-tRNA^{Ser} ได้ คือ *Ase* I, *Dra* I และ *Ssp* I

จากการวิเคราะห์ความแปรผันของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอภายในกลุ่มประชากรของผึ้งมิ้มในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่าเมื่อตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอระหว่างบริเวณยีน CO I และ CO II ด้วยเอ็นไซม์ *Ase* I สามารถจำแนกความแตกต่างออกเป็น 2 รูปแบบ ซึ่งรูปแบบที่แตกต่างจากประชากรทั้งหมดนั้นพบเพียง 1 รังเท่านั้น คือ ผึ้งมิ้มที่มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สำหรับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในบริเวณยีน L-rRNA และ ยีน Cytb I-tRNA^{Ser} นั้น เมื่อวิเคราะห์ด้วยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะในบริเวณที่ต้องการแล้ว ไม่สามารถตรวจสอบความแปรผันของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอภายในสปีชีส์ของผึ้งมิ้มในประเทศไทยได้ เนื่องจากบริเวณระหว่าง CO I และ CO II ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของผึ้งมิ้ม มีขนาดเล็กกว่าบริเวณเดียวกันในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ของผึ้งพันธุ์ *A. mellifera* และ ผึ้งโพรง *A. cerana* ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่พบความแตกต่างในผึ้งมิ้มได้น้อยกว่าในทั้งสองสปีชีส์ดังกล่าว

นอกจากนี้ พฤติกรรมการอพยพตามฤดูกาล การแยกรัง การหนีรัง รวมทั้งความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีของผึ้งมิ้ม ทำให้ผึ้งชนิดนี้สามารถดำรงและแพร่กระจายในธรรมชาติได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในกลุ่มประชากรของผึ้งมิ้มในประเทศไทยไม่มีความแตกต่างกันมากนัก

4.2 <u>การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริก และทางพันธุกรรมของผึ้งมิ้มเล็ก *A. andreniformis* Smith, 1858 ในประเทศไทย</u>

เก็บผึ้งมิ้มเล็กจำนวน 30 รังเพื่อใช้ศึกษาความแปรผันทางมอร์โฟเมตริกและเก็บจำนวน 37 รังเพื่อใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม ในส่วนของความแปรผันทางมอร์โฟเมตริก ทำการวัดและวิเคราะห์ลักษณะทางมอร์โฟเมตริกทั้งหมด 24 ลักษณะในผึ้งงาน จากการใช้ค่าเฉลี่ยของรังในการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 1 พบว่ามี 20 ลักษณะจากทั้งหมด 24 ลักษณะที่ถูกคัดเลือกไว้เป็นปัจจัยใหม่ และเมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 สามารถจัดกลุ่มทั้ง 20 ลักษณะที่เลือกมาจากข้างต้นได้เป็น 4 กลุ่มปัจจัยใหม่ จากการนำคะแนนปัจจัยที่ได้มาสร้างกราฟ ผลที่ได้แสดงว่าผึ้งมิ้มเล็กจากประเทศไทย และจากเมืองทีนอม ประเทศมาเลเซียอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้จากการใช้เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แบบคลัสเตอร์ สามารถจัดกลุ่มผึ้งมิ้มเล็กดังกล่าวนี้เป็น 1 กลุ่มเช่นเดียวกัน แต่ผลจากการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นของค่าปัจจัยใหม่ทั้ง 4 ปัจจัย กับค่าละติจูด และลองติจูด แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางมอร์โฟเมตริกของผึ้งมิ้มเล็กในประเทศไทย กล่าวคือขนาดของผึ้งมิ้มเล็กจากภาคใต้ไปยังภาคเหนือจะมีขนาดเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของผึ้งมิ้มเล็กจากภาคตะวันตกไปภาคตะวันออกจะมีขนาดเล็กลง

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดย 2 วิธี วิธีแรกโดยการดูรูปแบบของชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสหลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บางส่วนของยีน Cytb ที่ได้ (520 คู่เบส) ไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Dra*I และ *Alu* I พบว่าไม่พบความแปรผันทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างผึ้งมิ้มเล็กจากบริเวณต่าง ๆ ในประเทศไทย แต่เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบหลังตัดของผึ้งมิ้มเล็กจากประเทศไทยและจากเมืองทีนอม ประเทศมาเลเซียก็ไม่พบความแตกต่างหลังจากตัดผลิตภัณฑ์ด้วย *Alu* I แต่พบรูปแบบที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ หลังทำการตัดผลิตภัณฑ์ด้วย *Dra*I วิธีที่ 2 ทำการหาลำดับเบสบางส่วนของยีน Cytb จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ พบว่าผึ้งมิ้มเล็กจากบริเวณแผ่นดินใหญ่ของประเทศไทยมีดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึมต่ำกว่าตัวอย่างผึ้งจากบริเวณเกาะภูเก็ตและเชียงใหม่ของประเทศไทย สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรมเอ็นเจและยูพีจีเอ็มเอ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มผึ้งมิ้ม

เล็กในประเทศไทย ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A ซึ่งพบได้ในตัวอย่างผึ้งมิ้มเล็กจากแผ่นดินใหญ่ของประเทศไทย ส่วนกลุ่ม B พบในตัวอย่างผึ้งจากจังหวัดภูเก็ต และจังหวัดเชียงใหม่ (Rattanawannee, Chanchao and Wongsiri, 2007)

4.3 การวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกของชันโรง *Trigona collina* Smith,1987 ในประเทศไทย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวน 19 ลักษณะของชันโรง *Trigona collina* Smith, 1857 ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริก โดยเก็บตัวอย่างชันโรงจาก 95 รัง จำนวน 1,900 ตัว ที่พบในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย จากการศึกษาพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชันโรง *T. collina* จำนวน 19 ลักษณะ นำมาคัดเลือกเพียง 17 ลักษณะ และจัดเป็นกลุ่มปัจจัยใหม่ได้ 3 กลุ่ม พบว่า ความยาวของขาหลัง อก ปีกหน้า และปีกหลังมีแนวโน้มที่จะแสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างชันโรงที่พบทางภาคใต้มีความแตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างชันโรงที่พบในบริเวณอื่น ๆ แต่ไม่สามารถแยกออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน

5. ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับอณูของ *A. florea*, *A. andreniformis*, *A. mellifera* และ *Trigona* spp.

5.1 การสำรวจสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยบนพื้นฐานความผันแปรทางพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* นำเข้าสู่ประเทศไทยเมื่อประมาณ 60 ปีก่อน ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์ของประชากรผึ้งพันธุ์ที่กระจายตัวในประเทศไทยยังไม่แน่ชัดนัก กระทั่งในปี 2547-2549 จึงเริ่มเก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์จากฟาร์มเลี้ยงผึ้งทั่วประเทศ จำนวน 476 รัง แบ่งเป็นกลุ่มประชากรผึ้งพันธุ์ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมกุล PCR-RFLP และการหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ของดีเอ็นเอในไมโตรคอนเดรีย เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ที่กระจายตัวอยู่ในปัจจุบัน จากการตรวจสอบผึ้งพบความแตกต่างของรูปแบบทางพันธุกรรม 8 แบบ โดยมี 3 รูปแบบทางพันธุกรรมที่พบจำนวนมากและ 5 รูปแบบพันธุกรรมที่พบจำนวนน้อย ซึ่งรูปแบบพันธุกรรมทั้งหมดสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม ThaiA1 พบประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม ThaiA2 พบประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสายวิวัฒนาการ C ของสายพันธุ์ผึ้งพันธุ์ที่พบการกระจายตัวในแถบยุโรป ซึ่งได้แก่ *A. m. ligustica* และ *A. m. carnica* ตามลำดับ ส่วนกลุ่ม ThaiB พบประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสายวิวัฒนาการ O ของสายพันธุ์ผึ้งพันธุ์ที่พบการกระจายในแถบตะวันนออกกลาง และจากการตรวจสอบลำดับเบสที่บริเวณ non-coding ของผึ้งพันธุ์กลุ่ม ThaiB พบความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ *A. m. syriaca* หรือ *A. m. lamarckii* จากการวิเคราะห์สถิติด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลแสดงว่าพบการ

ผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรของผึ้งพันธุ์ในฟาร์มเลี้ยงผึ้ง และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการรวมประชากรผึ้งพันธุ์ภาคเหนือ+ภาคกลาง และกลุ่มประชากรผึ้งพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ+ภาคใต้ (Suppasat et al., 2007)

5.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของชันโรงในประเทศไทย

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทยโดยวิธี PCR - RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length polymorphism) โดยใช้บริเวณ 16S rRNA ของ mitochondrial DNA ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 550 bp มีการแปรผันในยีนส่วน 16S rRNA ของชันโรง โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Dra* I, *Hpy*188 III, *Ssp* I, และ Pac I

ผลที่ได้จากการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย เอนไซม์ *Dra* I, *Hpy*188 III, *Ssp* I, และ Pac I แสดงให้เห็น 25 haplotypes, 9 haplotypes, 15 haplotypes, and 5 haplotypes ตามลำดับ การรวมกันของรูปแบบที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์เหล่านี้ สามารถสร้างได้ 47 composite haplotypes จากตัวอย่างจำนวน 482 ตัวอย่าง ผลการวิจัยพบความหลากหลายสูงในกลุ่มตัวอย่างของชันโรงในประเทศไทย ทั้งความแตกต่างทางด้านชนิดและความแตกต่างทางระดับพันธุกรรมของทั้งระดับ intraspecific และ interspecific ส่วน Phylogenetic trees ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ สร้างขึ้นโดยวิธี neighbor-joining (NJ) และโดยโปรแกรม WINCLADA สามารถแยกชันโรงได้เป็น 7 และ 9 กลุ่มตามลำดับ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทย และบ่งชี้ว่าวิธีการวิเคราะห์ PCR - RFLP ในยีน 16S rRNA สามารถใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทยได้

6. ศึกษาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสาร propolis และ sticky band ของ *A. florea*, *A. andreniformis* และ *Trigona* spp.

6.1 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Ascospheara apis* ของพรอพอลิส จากรังชันโรง (Chemical compositions and anti-fungus *Ascospheara apis* of propolis from the nest of stingless bee)

จากการศึกษาองค์ประกอบของพรอพอลิสจากรังชันโรง *Trigona laeviceps* ที่เก็บจากจังหวัดร้อยเอ็ด ประเทศไทย นำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascophaera apis* ที่ก่อโรคซอล์กบรูด พบว่า ที่ความเข้มข้น 190 ppm ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 250 ppm

ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แยกสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟีได้ 7 ส่วนย่อย สารสกัดที่แยกได้ในส่วนที่ 3 และ 4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ascosphaera apis* ได้โดยใช้วิธี TLC autographic เมื่อนำพรอพอลิสมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วย gas chromatography-mass spectrometer พบว่าสารที่น่าจะเป็นองค์ประกอบคือ 2-methylpropyl ester, camphor, 2, 4 – bis (dimethylbenzyl) - 6 - t- butylphenol, 1H- cycloprop[e]azulen-7-ol, 6-oxohuperzine A และ 2,6-diphenyl-1,7-dihydrodipyrrolo[2,3-b:3',2'-E]pyridine สารที่ออกมาที่ Rt 13.02 นาที เป็นองค์ประกอบหลักในพรอพอลิส แต่ไม่มีข้อมูลตรงกับฐานข้อมูลของ Wiley ถึงแม้ว่า camphor ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แสดงให้เห็นว่า camphor ไม่สามารถยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascosphaera apis*

6.2 Effects of bioactive of Thai propolis against the pathogenic bacteria

พรอพอลิส เป็นสารที่ได้จากยางไม้ที่ผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* เก็บสะสมมาจากพืช มีสีแตกต่างกันตั้งแต่สีเขียวเหลืองถึงสีน้ำตาลเข้มขึ้นอยู่กับชนิดของพืชเช่นเดียวกับคุณสมบัติในการเป็นยา งานวิจัยในครั้งนี้ เพื่อหาการเกิดผลของสาร flavonoids ซึ่งเป็น bioactive compound ที่ยับยั้งเชื้อโรคจากแบคทีเรียที่ถูกแยกมาจากโรคผิวหนังของแมวและสุนัขจากโรงพยาบาลสัตว์จังหวัดเชียงราย ด้วยวิธี swabbing technique โดยนำพรอพอลิสที่ถูกบดและละลายใน ethanol ที่ความเข้มข้น 5%, 20% และ 30% ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. aureus* และ *P. diminuta* พบว่าความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับแสดงผลยับยั้งเชื้อ *S. gallinarum* ได้มากที่สุด แต่ยับยั้งเชื้อ *S. felis* ได้น้อยที่สุด นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 20% และ 30% แสดงผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าความเข้มข้นของสาร 5% ดังนั้น พรอพอลิสของไทยมีสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดนี้ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผิวหนังในสัตว์เล็กได้ (Thapa, 2009)

6.3 Reinforcing a barrier-a specific social defense of the dwarf honeybee (*Apis florea*) released by the weaver ant (*Oecophylla smaragdina*)

In the arboreal habitat of *Apis florea* one of the dominant insectivorous predators is the weaver ant, *Oecophylla smaragdina*. The main mechanism of *A. florea* to protect its nest against ants and other crawling arthropods are “barriers” of sticky material (sticky bands) which the bees build around the branches and all structures which connect the comb to the outside. We studied whether the presentation of an *O. smaragdina* ant on the comb releases a specific behavioral response of the bees. After

the exposure of a living *O. smaragdina* worker, held by forceps on the top of the *A. florea* comb, the number of bees at the sticky band zone increased and remained on higher level for 2 hours compared to control experiments (presentation of an empty forceps, *Tenebrio molitor* larva or another arboreal ant species, *Crematogaster rogenhoferi*). Further, more sticky material was deposited by the bees after exposure of a weaver ant. This behavior seems to be a specific reaction of *A. florea* to it most important predator *O. smaragdina*. (Duangphakdee et al., 2005)

7. Bumble bees (Hymenoptera, apidae, bombinae) of the upperNorthern parts of Thailand

Bumblebees are social insects that are characterized by black and yellow body hairs, often in bands found in the mountainous areas. We have investigated that the numberof species of bumblebees in the northern parts of Thailand particularly from Chiang Mai (Doi Inthanon, Doi Suthep, Doi Pui, Chiang Doi, Doi Inching), Chiang Rai (Doi Mae Salon, Doi Tong, Doi Nygem) and Nan. The specimens were caught and chilled in an ice-cooler box. After 20 minutes of chilling, the specimens were examined. The results show that three species of bumblebees; *B. haemorrhoidalis*, *B. trifasciatus*, *and B. breviceps* were found in the mountainous of the upper northern parts of Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยโครงการ “การศึกษาปัจจัยในการอยู่รอดของผึ้งมิ้ม ชันโรง และพืชอาศัยที่สัมพันธ์กับความหลากหลายทางชีวภาพของถิ่นที่อยู่อาศัยในเขตร้อน” ขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ที่ให้ความร่วมมือ ความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและสถานที่ และการสนับสนุนในด้านต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ในการศึกษาและวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งทำให้โครงการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
รหัสโครงการ RTA 45800012

สารบัญ

หน้า

สรุปงานวิจัย ก

กิตติกรรมประกาศ ฎ

สารบัญ ฎ

สารบัญตาราง ฑ

สารบัญภาพ ณ

1. เนื้อหาผลงานวิจัย..... 1

1.1 สำรวจพืชอาหารและพืชอาศัยของผึ้งและชันโรงชนิดต่าง ๆ..... 1

1.2 ศึกษาเปรียบเทียบ natural history ของ *Apis florea* *A. andreniformis* และ *Trigona* spp. 10

1.2.1 การศึกษาวงจรชีวิตของการเจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ ของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้ของผึ้งมิ้ม *A. florea*..... 10

1.2.2 The reproductive dilemmas of queenless red dwarf honeybee (*Apis florea*) workers..... 13

1.2.3 Ecology behavior of dwarf honeybee; *Apis florea* and *A. andreniformis*... 13

1.3 ศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างผึ้งใน species ต่าง ๆ ในระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ RNA และ DNA..... 19

1.3.1 Purification of alpha-glucosidase (AG) in *Apis florea* 19

1.3.2 Purification of alpha-glucosidase (AG) in *Apis cerana*..... 53

1.4 การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทั้งภายในและระหว่างชนิดของ *A. florea* *A. andreniformis* และ *Trigona* spp. 95

1.4.1 การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริกและทางพันธุกรรมของผึ้งมิ้ม *A. florea* Fabricius, 1787 ในประเทศไทย..... 95

1.4.2 การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริกและทางพันธุกรรมของผึ้งมิ้มเล็ก *A. andreniformis* Smith, 1787 ในประเทศไทย..... 99

1.4.3 การวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกของชันโรง *Trigona collina* Smith, 1987 ในประเทศไทย..... 99

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.5 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับอณูของ *Apis flore, A. andreniformis*, *A. mellifera* และ *Trigona* spp. 106

1.5.1 การสำรวจสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยบนพื้นฐานความผันแปรทางพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ..... 107

1.5.2 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของขันโรงในประเทศไทยโดยวิธี PCR – RFLP..... 125

1.6 ศึกษาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสาร propolis และ sticky band ของ *A. florea* *A. andreniformis A. mellifera* และ *Trigona* spp. 129

1.6.1 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Ascospheara apis* ของพรอพอลิสจากรังขันโรง..... 129

1.6.2 Effects of bioactive of Thai propolis against the pathogenic bacteria..... 138

1.6.3 Reinforcing a barrier-a specific social defense of the dwarf honeybee (*Apis florea*) released by the weaver ant (*Oecophylla smaragdina*)..... 144

1.7 Bumble bees (Hymenoptera, apidae, bombinae) of the upper Northern parts of Thailand..... 145

2. ผลงาน outstanding ที่ส่งไปลงตีพิมพ์และเสนอใน conference และ congress ต่าง ๆ..... 146

3. การจัดการประชุมวิชาการ..... 168

4. Output ที่ได้จากโครงการ..... 169

5. ชื่อวารสารระดับนานาชาติที่ได้ลงตีพิมพ์..... 170

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1..... 171

ภาคผนวก 2..... 202

ภาคผนวก 3..... 210

ภาคผนวก 4..... 218

ภาคผนวก 5..... 228

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ (Wilcoxon Rank Test) ของจำนวนผึ้งมิ้ม *A. florea* ชันโรง *T. laeviceps* และ *T. collina* ในแต่ละช่วงเวลา.....	6
2	แสดงจำนวนรังวันที่ผึ้งแต่ละวรรณะ (ผึ้งงาน ผึ้งตัวผู้ และผึ้งนางพญา) เจริญจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยของผึ้งมิ้ม *A. florea*.....	12
3	จำนวนผึ้งมิ้มนางพญาที่สร้างได้จากการนำเอาผึ้งนางพญาเดิมที่อยู่ในรังออก.....	12
4	Intensity of amplified product bands from Fig. 10.....	21
5	Similarity of the *AG* sequence in *A. florea* (1,773 bp) and that in other organisms.....	24
6	Summary of purification procedures of *AG*.....	44
7	Protein content in crude of HPGs and honey crop.....	72
8	Specific activity of AG after various AS saturation.....	74
9	Summary of purification procedures of *AG*.....	80
10	Purification procedures of unprecipitated crude.....	82
11	Peptide mass (Da) from MALDI – TOF analysis of trypsin – treated AG of *A. cerana* compared to tryptic fragments of AG in *A. mellifera*, +1 Da mass accuracy.....	93
12	ความสัมพันธ์ของกลุ่มปัจจัยใหม่ 3 กลุ่มปัจจัย ที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2....	102
13	สรุปขั้นตอนการเพิ่มปริมาณไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอ 4 บริเวณ ที่ใช้ในการจำแนกผึ้งพันธุ์ในประเทศไทย สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ M= West European lineage, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ C = East Mediterranean, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ A = African, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ O = Middle.....	115
14	การกระจายตามภูมิศาสตร์ของรูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างกัน 8 รูปแบบ จากตัวอย่างผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยจำนวน 476 รัง อักษร 7 ตัว แทนรูปแบบของพันธุกรรมโดยใช้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	116

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ผลการวิเคราะห์ด้วย Molecular Analysis of Variance (AMOVA: Excoffier et al., 1992; Excoffier, 1995).....	119
16	แสดง primer ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ 16S rDNA ใน mtDNA ของชันโรง.....	125
17	ผลการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดไดคลอโรมีเธนที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	134
18	สารสกัดไดคลอโรมีเธนที่แยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ส่วนที่1-7.....	134
19	Bacterial species isolated from diseased skin of cats and dogs.....	140

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	พื้นที่ทำการศึกษา (ก) และการเข้าตอมดอกบัวเพื่อเก็บเกสรของผึ้งมิ้มและซันโรง (ข)....	3
2	แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *T. laeviceps* ที่เข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546.....	4
3	แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *T. collina* ที่เข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546.....	5
4	แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *A. florea* ที่เข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546.....	5
5	แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของจำนวนผึ้งและซันโรงตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546 (ก) = *T. laeviceps* (ข) = *T. collina* (ค) = *A. florea*.....	7
6	Combs cover during rain (a) *Apis florea* without tail (b) *Apis andreniformis* with a tail.....	16
7	Rain proof curtain formation of *A. florea* (a). Abandon comb after heavy rain (b). Position of curtain formation bees.....	16
8	Top view during raindrops on the colony (a) dancing floor damaged by raindrops (b) curtain formation bees' position during rain.....	17
9	Total RNA extracted from different stages heads of *A. florea* on native agarose gel (A) and formaldehyde gel (B).....	20
10	Expression profile of *AG*.....	21
11	Control experiment by using primers from *EF* and *28S RNA* genes. Total RNA for all reactions were from forager bee.....	22
12	RT - PCR product amplified by 3 different pairs of primers.....	23
13	The multiple alignment of nucleotide sequences of *AG* in *A. florea* with other organisms. Common residues are indicated by asterisks below the sequences.....	28
14	The multiple alignment of amino acid sequences deduced from the cDNA sequences of AG in *A. florea* with other organisms. Common residues are indicated by asterisks below the sequences.....	30

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

15 A phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of *AG* in *A. florea* among other organisms by UPGMA method. A number on each branch indicate differential..... 31

16 A phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of *AG* in *A. florea* among that in other organisms by NJ method. The upper numbers on each branch indicate the differential between genes. The lower numbers (in bold type) were the full heuristic bootstrap percentages of 1,000 replicates..... 32

17 Pattern of major proteins in crude of head and honey crop. 33

18 Specific activity of crude precipitation by various concentrations of ammonium sulfate..... 34

19 Protein profile of precitate from various concentrations of ammonium sulfate (AS). Protein (20 µg) of all precipitates were electrophoresed by SDS polyacrylamide gel and CBB stained..... 34

20 AG on a DEAE-cellulose column. Crude protein, 300 mg; column, 1.6 x 13 cm; equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— OD at 280 nm; —○— alpha glucosidase activity; ····· , molarity of NaCl..... 35

21 AG on a gel filtration (Superdex 200) column. Bound peak solution of DEAE, 10 mg protein; column, 1.6 x 51 cm; equilibrium and elution, 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 mM NaCl (pH 6.3); flow rate, 30 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— , OD at 280 nm; —○— , AG activity..... 36

22 AG on a gel filtration (Superdex 200) column. Unbound peak sample of DEAE - cellulose, 18 mg protein; column, 1.6 x 38 cm; equilibrium and elution, 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 mM NaCl (pH 6.3); flow rate, 30 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— ,OD at 280 nm; —○—, AG activity. 37

23 CBB staining of SDS - PAGE..... 38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	AG on a gel filtration (Sephadex G - 150) column. Unbound peak sample of DEAE, 10 mg protein; column, 1.5 x 87 cm; equilibrium and elution, 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 M NaCl (pH 6.3); flow rate, 15 ml/ h; fraction size,3 ml; —●— , protein concentration (Bradford's assay); —○—, AG activity.....	39
25	SDS - PAGE of positive fractions from Sephadex G - 150. Lanes 1-7 contained fraction# 40 – 46 (100 µg), respectively.....	40
26	AG on CM cellulose. Unbound peak sample of DEAE, 100 mg protein; column, 1.6 x 13 cm; equilibrium, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— OD at 280 nm;—○— , AG activity; ····· , molarity of NaCl.....	41
27	AG on CM cellulose. Crude protein, 300 mg; column, 1.6 x 13 cm equilibrium, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— OD at 280 nm; —○— , AG activity; ·····, molarity of NaCl.....	42
28	Unprecipitated AG on DEAE cellulose. Crude protein without precipitation with ammonium persulfate, 250 mg; column, 1.6 x 13 cm; equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 0 - 1 M NaCl;flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●—, OD at 280 nm; —○— , AG activity; ·····, molarity of NaCl.....	43
29	CBB staining (A) and activity staining (B) of fractions containing highest activity from DEAE – cellulose and Sephadex G – 150.....	45
30	Relationship between R_f value and log MW of broad range protein MW marker. MW of AG from Fig. 21 was estimated.....	46
31	Relationship between R_f value and log MW of low MW marker. MW of Af1, Af2, and Af3 from Fig. 15 was calculated. The LMW standard marker contains phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa),	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
	ovalbumin (45 kDa),carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and alpha - lactalbumin (14.4 kDa).....	46
32	The amino acid sequence of AG in *A. mellifera* (Q17958). Matched peptides are shown in bold and underline letter.....	47
33	Compare amino acid sequence between deduced amino acid sequence from cDNA (upper line) and amino acid from MALDI – TOF MS (lower line).....	48
34	Two - D electrophoresis of crude protein (2 mg). Lane M contained low MW marker.....	49
35	The optimum pH of partial purified AG in *A. florea*. Briton - Robinson buffer at various pHs ranging between 3.0 - 7.5 was used. The optimum pH is 5.0.....	50
36	The optimum temperature partial of purified AG of *A. florea*. The reaction mixture in acetate buffer (pH 5.0) containing 0.1 M sucrose was incubated at various temperatures ranging among 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, and 80°C for 10 min. The optimum temperature is 55°C.....	50
37	The optimum concentration of sucrose of partial purified AG in *A. florea*. The reaction mixture was incubated with sucrose at various concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 mM, respectively. The optimum concentration of sucrose is 80 mM.....	51
38	The optimum incubation time of purified AG in *A. florea*. The reaction mixture was incubated at 55 °C for 10, 20, 30, 40, 60, and 90 min, respectively. The optimum incubation time is 40 min.....	51
39	Total RNA extracted from HPGs of forager bees was electrophoresed on 1.2% (w/v) agarose gel (A) and formaldehyde gel (B).....	52
40	The RT - PCR product of AG from HPGs. Lanes 1 in all figures contained 100 bp ladder marker. Lane 2 contained product by FW2 and R3 primers (A) and product by FW2 and oligo dT primers (B). Lane 3 contained product by FW3 and R3 primers (C).....	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
41	Control primers for RT - PCR amplification.....	55
42	The cDNA sequence of alpha – glucosidase obtained by RT – PCR.....	57
43	The amino acid sequence of alpha – glucosidase deduced from the cDNA sequence. The underline amino acid sequences were different from amino acid of *AG* in *A. mellifera* recorded in Genbank.....	58
44	The multiple alignment of the nucleotide sequences of *AG* in *A. cerana* and that in other organisms. '*' Residues in that column are identical in all sequences in the alignment.....	66
45	The multiple alignments of amino acid sequences deduced from cDNA sequence of *AG* in *A. cerana* and that in other organisms.....	69
46	Phylogenetic trees illustrating the genetic relationship among amino acid sequences of various species by Neighbor - joining. Numbers above branches indicate bootstrap support percentage over 50% in 1000 replicates. Amino acid sequences of *AG* from *A. mellifera* maltase 1 and *Lactobacillus sakei* were used as outgroups.....	70
47	UPGMA tree of the genetic relationship among amino acid sequences of various species. *Lactobacillus sakei* was used as an outgroup.....	71
48	SDS - PAGE of HPGs and honey crop.....	72
49	Renaturation of AG from HPGs and honey crops. Arrows indicate two major subunit bands.....	73
50	Specific activity of AG precipitated by a stepwise increase of AS concentration.....	74
51	SDS - PAGE of protein (50 µg/ lane) saturated by various concentrations of AS.....	75
52	Purification of AG on DEAE - cellulose. Equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 1 M NaCl; flow rate 60 ml/ h; fraction size 10 ml/ fraction.....	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
53	Purification of AG on CM - cellulose. Equilibrium, 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 1 M NaCl; flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.....	77
54	Pooled bound fractions containing AG activity were applied to gel filtration Sephadex 200 column. Equilibration and elution, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.....	78
55	Pooled unbound fractions containing AG activity was applied to a gel filtration Sephadex 200 column. Equilibration and elution, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.....	79
56	Chromatography of AG on DEAE – cellulose. Equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 1 M NaCl; flow rate 60 ml/ h; fraction size 10 ml/ fraction.....	81
57	Chromatography of AG on CM - cellulose. Equilibrium, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 1 M NaCl; flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.....	82
58	SDS - PAGE and CBB.....	83
59	Relationship between Log and R_f of standard MW of broad range protein marker.....	84
60	SDS - PAGE and CBB.....	85
61	Relationship between Log and R_f of low molecular weight (LMW). The LMW standard containing phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and alpha - lactalbumin (14.4 kDa).....	85
62	CBB (A) and activity stain (B) of SDS polyacrylamide (12.5%). An arrow indicates an activity band of AG after renaturation.....	86
63	CBB (A) and activity stain (B) of SDS polyacrylamide (10%). Arrows indicate AG bands in both condition.....	87

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
64	The optimum pH of purified AG. Briton - Robinson buffer at various pHs ranging between 3.0 - 7.5 was used. The optimum pH was 5.0.....	88
65	The optimum temperature of purified AG. The reaction mixture in acetate buffer (pH 5.0) containing 0.1 M sucrose was incubated at various temperatures ranging between 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, and 70°C for 10 min. The optimum temperature was 50°C.....	89
66	The optimum concentration of sucrose as substrate. The reaction mixture was incubated with sucrose at various concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 mM, respectively. The optimum concentration of sucrose was 60 mM.....	90
67	The optimum incubation time of purified AG. The reaction mixture was incubated for 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70 min, respectively. The optimum incubation time was 50 min.....	91
68	A 2 – D gel of AG by CBB – stained gel (12.5% *T*, 2.6% *C*, and pH 3 – 10).....	92
69	From NCBI blast search, it indicates an amino acid sequence of JC4714 alpha – glucosidase (EC. 3.2.1.20) – honeybee by using the mascot search. The underline amino acid sequences are derived from in – solution digestion. For in – gel digestion, matched peptides are shown in bold.....	94
70	แสดงภาพถ่ายส่วนต่าง ๆ ของผึ้งมิ้มที่ใช้ศึกษาทางด้าน morphometric A = antenna, B = proboscis, C = forewing, D = hindwing E = sternite ที่ 3, F = tergite ที่ 3, G = sternite ที่ 6 และ H = tergite ที่ 4.....	96
71	แสดงภาพถ่ายส่วนต่าง ๆ ของผึ้งมิ้มที่ใช้ศึกษาทางด้าน morphometric I = hind basitarsus และ J = hind femur และ tibia.....	97
72	ส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชันโรงงาน *T. collina*.....	101
73	เดนโดรแกรมแสดงการรวมกลุ่มตัวอย่างชันโรงโดยแบ่งตามภูมิภาค.....	102

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

74 บริเวณที่ตั้งของฟาร์มผึ้งพันธุ์ *A. mellifera* ที่เก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ อักษรภาษาอังกฤษแทนจังหวัดในประเทศไทยที่เก็บตัวอย่าง วงกลมแทนตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่เก็บจากศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพเกษตรผึ้งทั้ง 5 ศูนย์ สี่เหลี่ยมแทนตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงผึ้ง ตัวเลขในวงกลมหรือสี่เหลี่ยมแสดงจำนวนรังของผึ้งพันธุ์ที่เก็บในแต่ละตำแหน่ง..... 110

75 แผนภาพแสดงรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆใน 4 บริเวณที่ศึกษาตัวอย่างอ้างอิง (สัญญลักษณ์ในภาพ) *A. m. ligustica* (lig), *A. m. carnica* (car), *A. m. mellifera* (mel), Turkish *A. m. syriaca* (mid) and *A. m. scutellata* (scu) ผึ้งพันธุ์ไทยแทนด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้ (A1 = ThaiA1 group, A2 = ThaiA2 group and B = ThaiB group) สัญลักษณ์ “a”, “b” and “c” แทนรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่พบในผึ้งพันธุ์ในประเทศไทย (A) แทนบริเวณ $tRNA^{leu}$-COII ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Dra I และ HinfI (B) แทนบริเวณ cytochrome b ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bgl II, Dra I และ Hinf I (C) แทนบริเวณ large subunit ribosomal RNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I (D) แทนบริเวณ COI ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinc* II. ขนาดของแถบอ้างอิงโดย 100 bp และ 25 bp ladder..... 114

76 แผนภาพ Neighbor-joining แสดงความเหมือนกันระหว่างรูปแบบพันธุกรรมในไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอจากรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ รูปแบบพันธุกรรมแสดงไว้ตารางที่ 14 C = สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้กับผึ้งพันธุ์ที่มีจุดกำเนิดจาก East European และ O = สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้กับผึ้งพันธุ์ที่มีจุดกำเนิดจาก Middle Eastern..... 117

77 ลำดับนิวคลีดอไทด์ที่บริเวณ non-coding region ระหว่าง $tRNA^{leu}$ - cytochrome oxidase II ในไมโตรคอนเดรียของผึ้งพันธุ์ แสดงส่วน 3’ end of $tRNA^{leu}$, P or Po, and Q sequences. Q1, Q2, and Q3 อ้างถึงส่วน 5' ส่วนตอนกลาง และส่วน 3' ของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน Q ซึ่งแทนด้วย 1, 2, 3 หรือซ้ำมากขึ้น Primes (‘ e.g., Q1', Q1'') ใช้แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หนึ่ง ที่สองซึ่งเป็นซ้ำที่เกิดขึ้นในส่วนของ Q เป็นต้น ผึ้งพันธุ์ไทย (ThaiA1, ThaiA2 and ThaiB) จะเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับผึ้งพันธุ์ในสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *A.m. intermissa*, *A. m. mellifera*, *A. m.*

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
	lamarckii, *A. m. syriaca* (Franck *et al.*, 2000), *A. m. ligustica* (GenBank accession # L-06178), and *A. m. carnica* อักษรใหญ่ในลำดับเบสส่วนแรกแทนสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการดังนี้ C = East Mediterranean; M = West European; A = African; O = Middle Eastern ตัวเลขและอักษรตัวเล็ก แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก Franck *et al.* (2000) เช่น O-1c = Middle East sequence 1c จุด (.) แสดงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายแรกสุด ขีด (-) แสดงช่องว่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ สายวิวัฒนาการแบบ East Mediterranean or C ไม่พบส่วน P ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ non-coding.....	118
78	การกระจายของรูปแบบพันธุกรรมในไมโตรคอนเดรียของผึ้งพันธุ์ใน 4 ภาคของประเทศไทย กราฟแท่งแสดงความถี่ของจำนวนรังในแต่ละรูปแบบพันธุกรรมของผึ้งพันธุ์ (A) ความถี่ของรูปแบบพันธุกรรมที่พบบ่อย (B) ความถี่ของรูปแบบพันธุกรรม 3 แบบ ThaiA1 สัมพันธ์กับรูปแบบพันธุกรรมของ *A. m. ligustica* ThaiA2 สัมพันธ์กับรูปแบบพันธุกรรมของ *A. m. carnica* ThaiB สัมพันธ์กับรูปแบบพันธุกรรมของ Middle Eastern.....	120
79	แสดงผลการสกัดดีเอ็นเอของซันโรง.....	125
80	Nighbor-joining tree (bootrap 1000 replications) by using Mega 3.0 program (Kumar et al. 1993).....	127
81	Heurestics test tree (bootstap 1000 replications) by using Winclada program (Nixon, K. C., 1999).....	128
82	(A) รา *Ascosphaera apis* อายุ 3 วัน (B) อายุ 7 วัน (C) สปอร์และเส้นใยของรา *Ascosphaera apis* อายุ 7วัน.....	131
83	แสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Ascosphaera apis* โดยใช้การทดสอบบนแผ่น TLC.....	135
84	ผลการองค์ประกอบของสารส่วนที่ 3 (A) และสารส่วนที่ 4 (B) โดยใช้วิธี GC-MS.....	136

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

85 Effects of three different concentrations (% w/v) of ethanolic extraction of propolis against seven pathogenic bacteria. Zone of inhibition of S. *gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. aureus* and *P. diminuta* against 5, 20 and 30 percent of EEP are expressed in mean±S.D..... 141