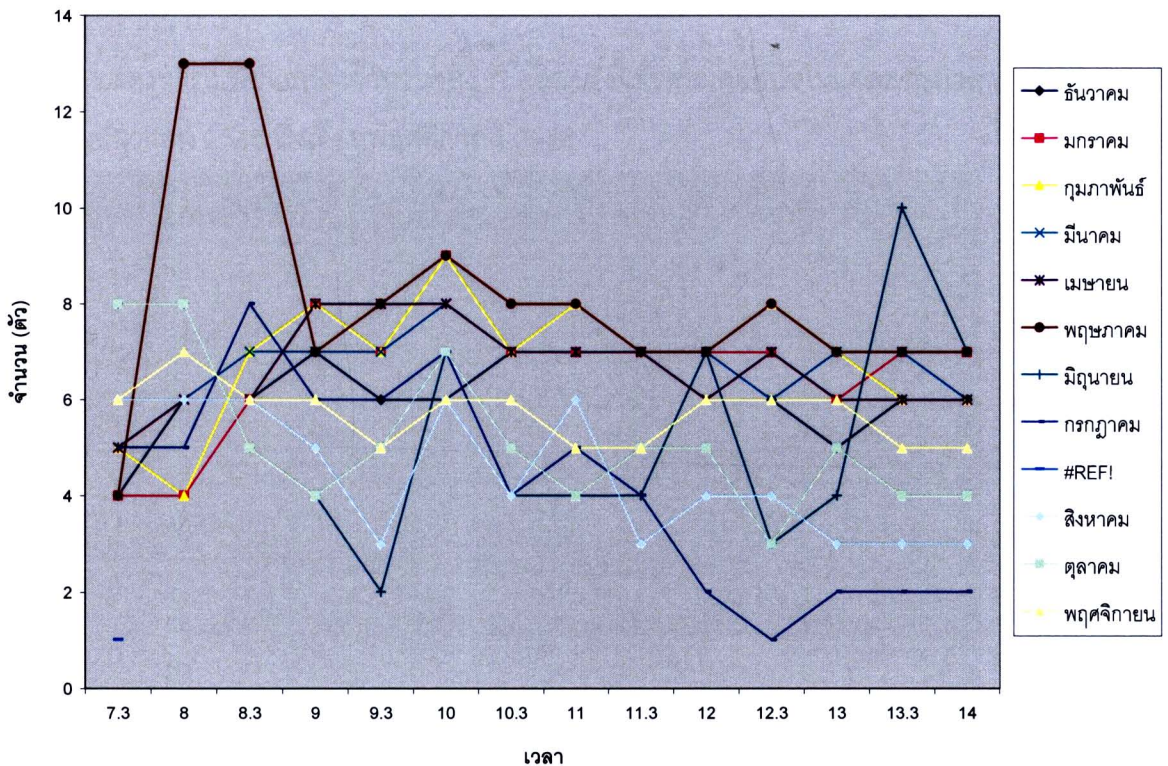
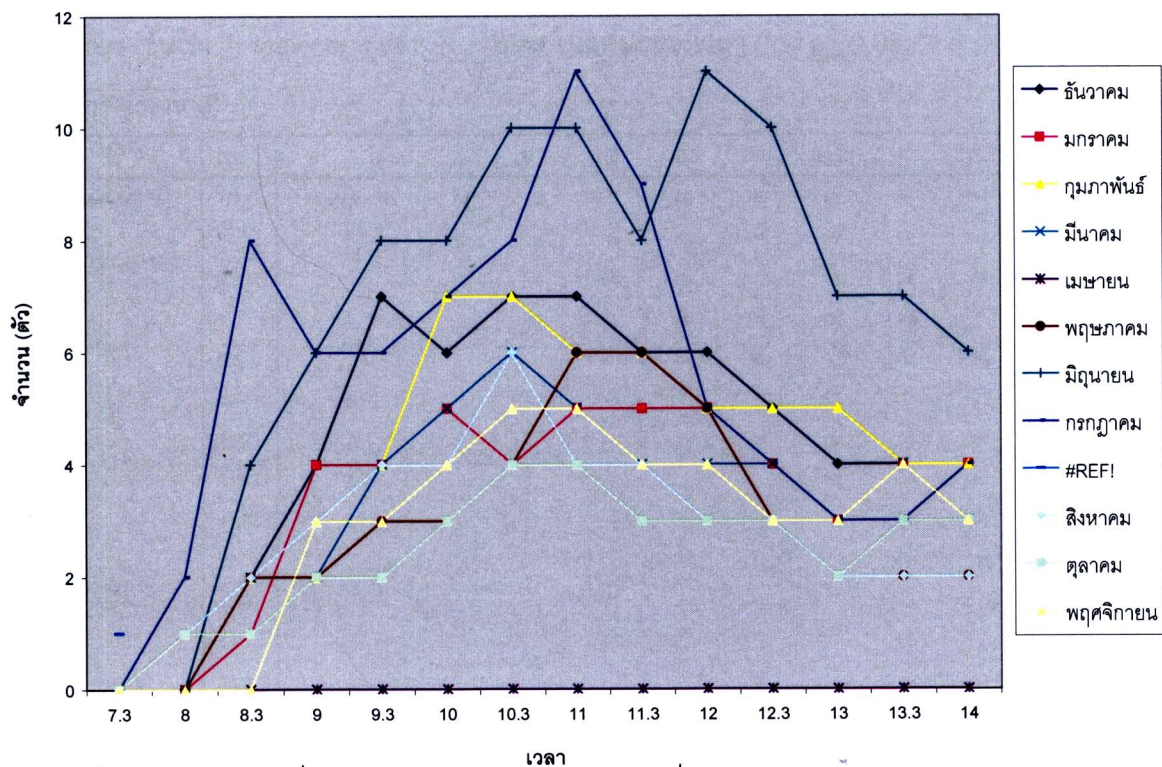


ผลการทดลองและวิจารณ์

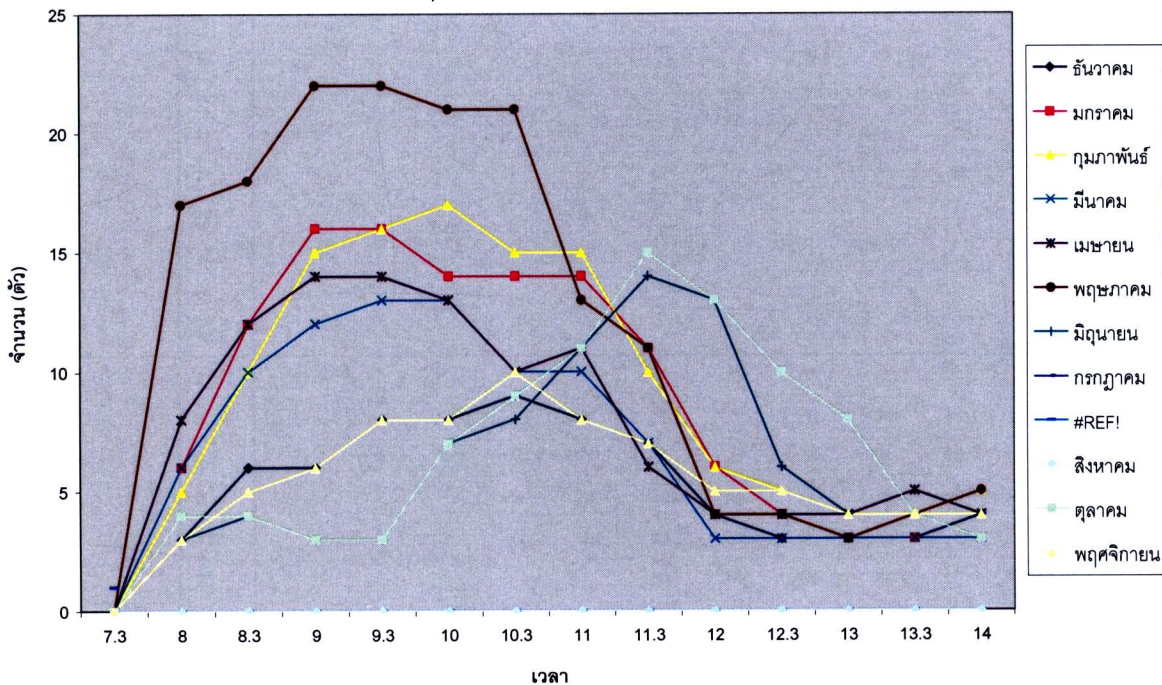
ดอกบัวที่ทำการทดลองเริ่มบานในเวลาประมาณ 07.00 น. และหุบในเวลา 14.00 น. โดยที่ทั้งฝั่งและชันโรงยังคงเข้าตอมดอกบัวเพื่อเก็บเกสร จากภาพที่ 2 แสดงให้เห็นว่า *T. laeviceps* จะเริ่มเข้าตอมดอกบัวเป็นพวกแรก คือ เข้าตอมในเวลา 07.30 น. แล้วปริมาณการเข้าตอมจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจะเพิ่มมากที่สุดในช่วงเวลา 08.30-09.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่เริ่มพบ *T. collina* และ *A. florea* หลังจากนั้นจะลดจำนวนลงเล็กน้อย ส่วน *T. collina* และ *A. florea* จะพบเข้าตอมมากที่สุดในเวลา 10.00-11.00 น. และ 09.00-10.30 น. ตามลำดับ โดยที่ปริมาณการเข้าตอมจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังเวลา 10.30 น. ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการรายงานของ ศิรินันท์ และคณะ (2543) ที่ทำการศึกษานับจำนวนการเข้าตอมดอกบัวของแมลงช่วยผสมเกสรพบว่า *A. florea* จะเข้าตอมดอกบัวมากที่สุดในเวลา 09.00 น. ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Oldroyd และคณะ (1992) ที่รายงานการเข้าตอมดอกปาล์มของ *A. florea* พบว่า จะเข้าตอมมากที่สุดในช่วงเวลา 10.00-13.00 น.



ภาพที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *T. laeviceps* ที่เข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546



ภาพที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *T. collina* ที่เข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546

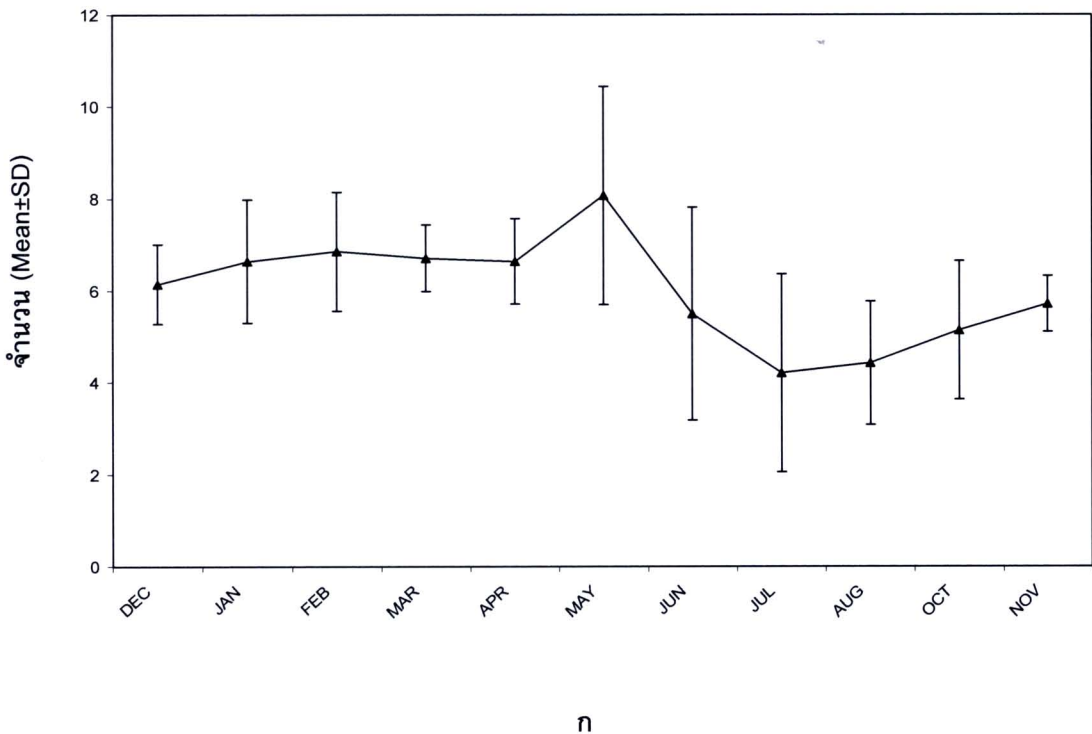


ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ *A. florea* ที่เข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546

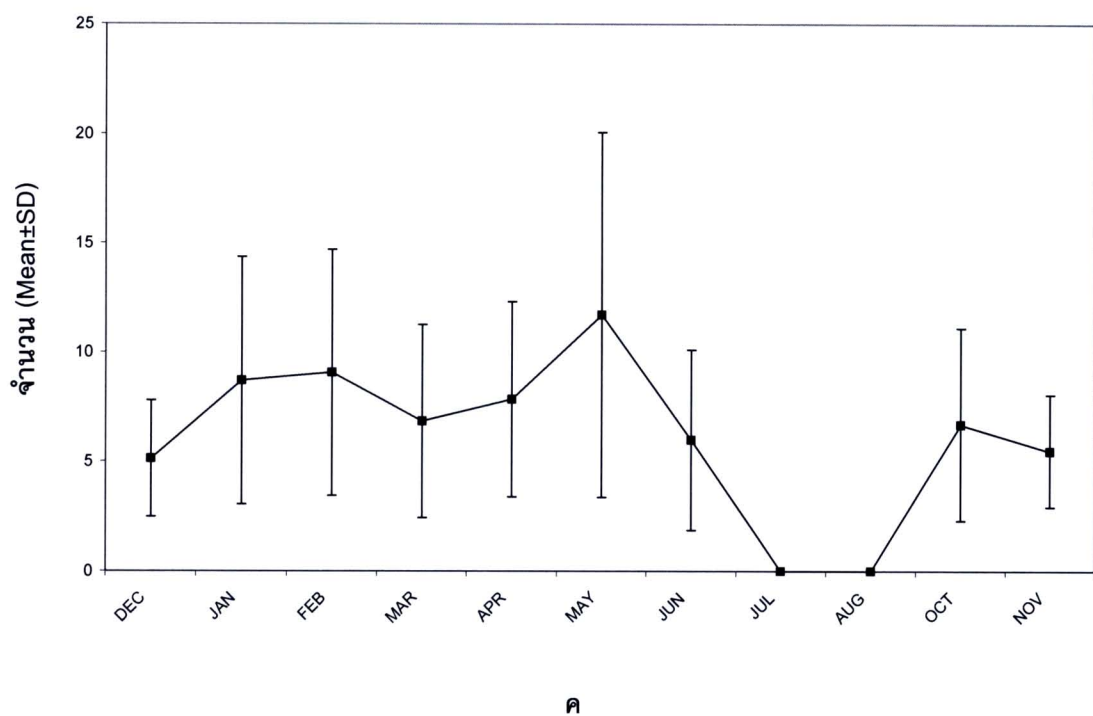
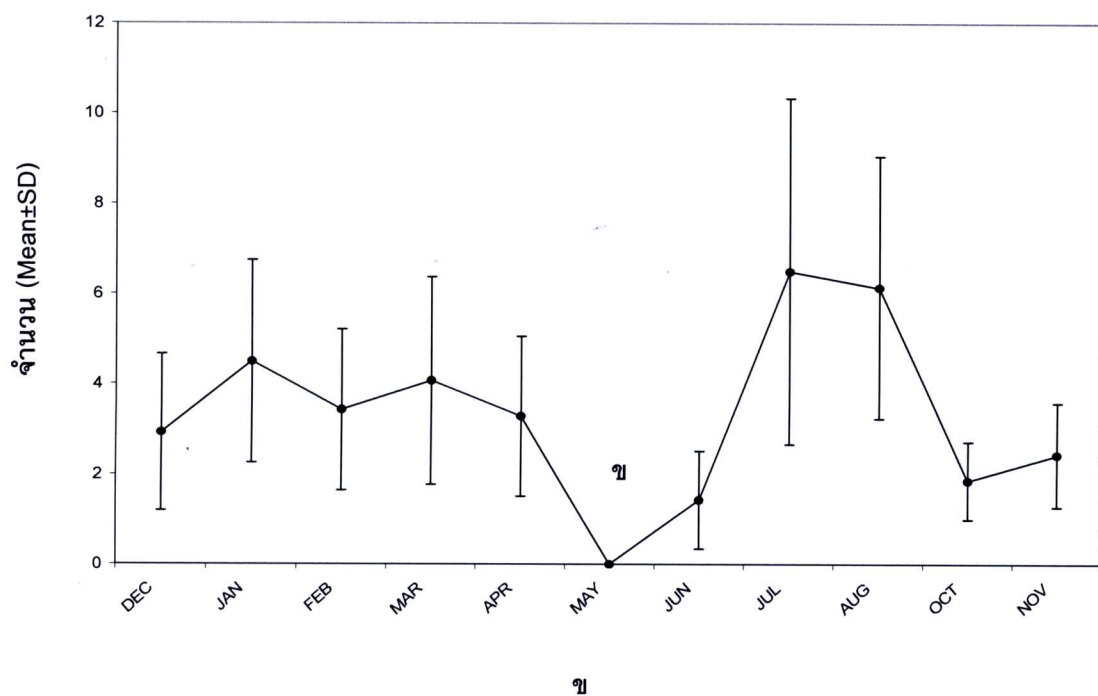
จากตารางที่ 1 พบว่าจำนวนของ *T. laeviceps* ที่เข้าตอมดอกบัวมีความแตกต่างกันระหว่างช่วงเวลาของวันไม่มากนัก โดยพบความแตกต่างในช่วงเวลา 09.00-10.00 น. ส่วน *T. collina* และ *A. florea* พบมีความแตกต่างทั้งในช่วงเวลา 07.30-08.30 น. และ 12.00-14.00 น. แสดงให้เห็นว่า *T. laeviceps* มีความสม่ำเสมอในการออกหาอาหารเกือบทุกช่วงเวลาของวัน

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเก็บข้อมูลทุกเดือนตลอดทั้งปี ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546 ผลปรากฏว่าพบ *T. laeviceps* มากที่สุดในเดือนพฤษภาคม และพบน้อยที่สุดในเดือนมิถุนายน เช่นเดียวกับใน *A. florea* ในขณะที่ *T. collina* พบมากที่สุดในเดือนมิถุนายน และไม่พบเข้าตอมดอกบัวเลยในเดือนพฤษภาคม ส่วน *A. florea* ไม่พบเข้าตอมดอกบัวในเดือนมิถุนายนและเดือนสิงหาคม

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของ *T. laeviceps* ในแต่ละเดือนพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า *T. laeviceps* มีการออกหาอาหารอย่างสม่ำเสมอตลอดทั้งปี ส่วน *T. collina* และ *A. florea* มีความแตกต่างของจำนวนในแต่ละเดือน ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของจำนวนผึ้งและชันโรงตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546 (ก) = *T. laeviceps* (ข) = *T. collina* (ค) = *A. florea*



ภาพที่ 5 (ต่อ) แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของจำนวนผึ้งและชันโรงตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546 (ก) = *T. laeviceps* (ข) = *T. collina* (ค) = *A. florea*

สรุป

ชันโรง โดยเฉพาะ *T. laeviceps* มีความสม่ำเสมอในการออกหาอาหารตลอดทั้งวัน คือพบจำนวนชันโรงเข้าตอมไม่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของวัน ส่วนผึ้งนั้นจะพบมากเฉพาะในช่วงเช้าและเย็นของวันเท่านั้น (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532) และนอกจากนี้ พบ *T. laeviceps* และ *T. collina* เข้าตอมดอกบัวเร็วกว่าผึ้งมี้ม แสดงว่าชันโรงมีพฤติกรรมการออกหาอาหารเร็วกว่าผึ้ง คุณสมบัติเหล่านี้เหมาะแก่การใช้เป็นแมลงผสมเกสรอย่างยิ่ง เนื่องจากการเข้าเก็บอาหารตลอดทั้งวันจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการทำหน้าที่ผสมเกสรแก่พืชที่เราต้องการให้สูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม คุณลักษณะอื่นของชันโรงก็มีส่วนช่วยสนับสนุนประสิทธิภาพในการผสมเกสร เช่น ชันโรง *T. laeviceps* และ *T. collina* เป็นชันโรงที่พบได้ง่าย คือ มักจะทำรังตามบ้านเรือนหรือสิ่งก่อสร้างต่าง ๆ (Sakagami et al, 1983) ทำให้ง่ายต่อการย้ายมาเลี้ยงในกล่องหรือหีบเลี้ยง และสะดวกต่อการเคลื่อนย้ายเพื่อนำไปช่วยผสมเกสร

ชันโรงเป็นแมลงประจำถิ่น เนื่องจากพบชันโรง *T. laeviceps* เข้าตอมทุกเดือน มีความเป็นไปได้ว่าพฤติกรรมการหนีรังหรือย้ายรังตามแหล่งอาหารของชันโรงชนิดนี้พบได้น้อยกว่าผึ้ง เนื่องจากชันโรงมีพฤติกรรมการเข้าตอมดอกไม้เกือบทุกชนิด (Amano et al., 2000) ทำให้ความหลากหลายของแหล่งอาหารของชันโรงมีมากกว่าผึ้ง และการที่ชันโรงมีขนาดเล็กทำให้มีประสิทธิภาพในการช่วยผสมเกสรดอกไม้ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ได้ดี อย่างไรก็ตามต้องศึกษาพฤติกรรมในการหาอาหารของชันโรงแต่ละชนิดด้วย เพราะพฤติกรรมของผึ้งและชันโรงแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน

ความสำคัญอีกประการหนึ่งของชันโรง คือ ชันโรงจะเป็นแมลงที่บินหาน้ำหวานและเกสรที่ไม่ไกลจากรังมากนัก ทำให้สามารถควบคุมพืชเป้าหมายที่ต้องการผสมเกสรได้ และยังสามารถนำชันโรงมาช่วยผสมเกสรในพืชที่ปลูกในเรือนกระจกได้อีกด้วย (Amano et al., 2000)

การเลี้ยงผึ้งในปัจจุบันมีจุดประสงค์หลักเพื่อเก็บน้ำผึ้งและช่วยผสมเกสร แต่พบว่าการเลี้ยงชันโรงในแง่เป็นแมลงช่วยผสมเกสรนั้นยังมีน้อย ซึ่งการเลี้ยงผึ้งในแง่เป็นแมลงช่วยผสมเกสรจะประสบปัญหาที่จะต้องใช้ทุนในการดูแลรักษา และประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคศัตรูผึ้งและโรคต่าง ๆ ในผึ้งพันธุ์ *A. mellifera* และปัญหาการหนีรังในผึ้งโพรง *A. cerana* ดังนั้นการเลี้ยงชันโรงเพื่อประโยชน์ในแง่เป็นแมลงช่วยผสมเกสร จึงเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

- สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2532. ชีววิทยาของผึ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัทต้นอ้อจำกัด.
- ศิริพันธ์ เอี่ยมประภา, สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, และสุรัช ลิขิตกษัตริ์. 2543. การแบ่งช่วงเวลาในการ

เก็บน้ำหวานและเกสรในผึ้งชนิดต่าง ๆ ในลันจี. วารสารวิทยาศาสตร์ 59-63.

Amano, K., Nemoto, T., and Heard, T. A. 2000. What are stingless bees, and why and how to use them as crop pollinations. Japan Agricultural Research Quarterly 34(3). Michener, C.D. 2000. The Bees of the World. Maryland: The John Hopkins University Press. 913 pp.

Oldroyd, B., Rinderer, T. E., and Wongsiri, S. 1992. Pollen resource partitioning by *Apis dorsata*, *A. cerana*, *A. andreniformis* and *A. florea* in Thailand. Journal of Apicultural Research 31(1): 3-7.

Real, L. A. 1981. Nectar availability and bee-foraging on Ipomoea (Convolvulaceae). Biotropica (Supplement) 13(2): 64-69.

Sakagami, S. F., Inoue, T., Yamane, S., and Salmah, S. 1983. Nest Architecture and Colony Composition of The Sumatran Stingless bee *Trigona* (Tetragonula) *laeviceps*. Kontyu 51(1): 100-111.

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

1.2.1 การศึกษาวงจรชีวิตของการเจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ (ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ ไขถึงตัวเต็มวัย) ของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้ของผึ้งมิม *A. florea*

ผึ้งมิม *Apis florea* เป็นแมลงผสมเกสรซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรในประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม โดยเฉพาะไม้ผล เช่น มะม่วง ลำไย ลิ้นจี่ และเงาะ แต่นักล่าผึ้ง (bee hunters) ตีรังผึ้งมิมเพื่อนำตัวอ่อนและน้ำผึ้งมาเป็นอาหารและขายเป็นสินค้าเป็นจำนวนมาก โดยจะพบรังของผึ้งมิมวางขายตามตลาดทั่วไป เช่น ตลาดนัดสวนจตุจักร และบริเวณริมถนนจังหวัดนครสวรรค์ เป็นต้น เนื่องจากผึ้งมิมเป็นผึ้งขนาดเล็กและสร้างรังบนต้นไม้ที่ไม่สูงนัก ตลอดจนมีพฤติกรรมในการป้องกันตัวที่ไม่ดุร้าย ดังนั้นนักล่าผึ้งสามารถตีเอารังได้ง่าย ทำให้ประชากรผึ้งมิมลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว และส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวงจรชีวิตของการเจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ (ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ ไขถึงตัวเต็มวัย) ของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้ในผึ้งมิม และการสร้างผึ้งนางพญา ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ขั้นต้นเพื่อจะนำไปสู่ความรู้เบื้องต้นที่ได้นำไปใช้เป็นข้อมูลในการผสมเทียมผึ้งมิมเพื่อขยายพันธุ์ของผึ้งมิมซึ่งเป็นวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้

วิธีการดำเนินการศึกษา

1. การเก็บรังผึ้งมีม

การศึกษาวงชีวิตของการเจริญเติบโตในระยะเวลาต่าง ๆ ของผึ้งมีม ได้ออกพื้นที่เพื่อผึ้งมีมและรังผึ้งมีมที่อยู่ในธรรมชาติ ณ ตำบลบางขันแตก อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม ซึ่งเป็นบริเวณที่มีผึ้งมีมมาอาศัยอยู่ในระยะเวลาช่วงหนึ่งของทุก ๆ ปีเป็นจำนวนมาก รังผึ้งมีมที่เก็บนั้นนำมาศึกษาที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชบุรี จังหวัดราชบุรี

2. ศึกษาระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของผึ้งมีมแต่ละวรรณะ

ทำเครื่องหมายด้วยปากกาบนแผ่นใสแนบบนรังผึ้งมีม ณ ตำแหน่งของไข่ของผึ้งนางพญาที่วางไข่ใหม่ สังเกตและบันทึกระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็นตัวหนอน ระยะจากตัวหนอนจนเซลล์ปิดเพื่อเข้าระยะดักแด้ เมื่อเซลล์ปิดเพื่อเข้าดักแด้แล้วทำการตัดรังบริเวณที่เซลล์ปิด ณ ตำแหน่งที่ศึกษานำเข้าไปใส่ไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่อุณหภูมิ 34-35 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 55-77 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งผึ้งงาน ผีเสื้อตัวผู้ และผึ้งนางพญาออกมาเป็นตัวเต็มวัย บันทึกและสังเกตระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของผึ้งมีม

3. การสร้างผึ้งมีมนางพญา

การสร้างผึ้งนางพญาทำได้โดยการนำผึ้งนางพญาที่อยู่ในรังออกไป เมื่อผึ้งงานรับรู้ว่ามีนางพญาแล้ว จะสร้างหลอดเซลล์ผึ้งนางพญาขึ้นมาใหม่ โดยจะสร้างหลอดนางพญาในลักษณะที่ห้อยลงอยู่บริเวณด้านล่างของรังภายใน 24 ชั่วโมง และผึ้งงานจะป้อนอาหาร คือ รอยัล เจลลี่ ให้กับตัวหนอนของผึ้งงานซึ่งอยู่ในเซลล์ของผึ้งนางพญาเปลี่ยนมาเป็นผึ้งนางพญา เมื่อเซลล์นางพญาปิดจึงตัดเซลล์ออกจากรังผึ้งมีมและนำมาใส่ไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 34-35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการมีชีวิตของผึ้ง ความชื้นสัมพัทธ์ 55-77 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งผึ้งนางพญาออกมาเป็นตัวเต็มวัย

ผลการศึกษา

จากการศึกษาระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของผึ้งมีมแต่ละวรรณะ พบว่า 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 วัน (ระยะดักแด้) และ 22.25 วัน (ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนรังวันที่ผึ้งแต่ละวรรณะ (ผึ้งงาน ผึ้งตัวผู้ และผึ้งนางพญา) เจริญจากไขจนเป็นตัวเต็มวัยของผึ้งมีม *A. florea*

วรรณะผึ้ง	ระยะการเจริญเติบโต			
	ระยะไข่	ระยะตัวหนอน	ระยะดักแด้	ไขจนถึงตัวเต็มวัย
ผึ้งงาน (n=200)	3	6.32 ± 0.69	11.72 ± 1.14	21.04 ± 1.32
ผึ้งนางพญา (n=50)	3	6.66 ± 0.69	8.04 ± 0.70	17.7 ± 0.99
ผึ้งตัวผู้ (n=100)	3	6.62 ± 0.65	12.73 ± 1.27	22.35 ± 1.44

การสร้างผึ้งมีมนางพญา จากการทดลองพบว่า การสร้างนางพญาผึ้งมีมขึ้นมาใหม่ทดแทนนางพญาผึ้งมีมเดิม มีค่าเฉลี่ย 7.8 ตัวต่อรัง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนผึ้งมีมนางพญาที่สร้างได้จากการนำเอาผึ้งนางพญาเดิมที่อยู่ในรังออก

รังผึ้งมีม	จำนวนผึ้งมีมนางพญาต่อรัง
1	9
2	13
3	12
4	3
5	6
6	5
7	8
8	10
9	7
10	5
ค่าเฉลี่ย	7.8



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

workers

Honeybee (*Apis*) workers cannot mate, but retain functional ovaries. When colonies have lost their queen, many young workers begin to activate their ovaries and lay eggs. Some of these eggs are reared, but most are not and are presumably eaten by other workers (worker policing). Here we explore some of the factors affecting the reproductive success of queenless workers of the red dwarf honeybee *Apis florea*. Over a 2 – year period we collected 40 wild colonies and removed their queens. Only two colonies remained at their translocated site long enough to rear males to pupation while all the others absconded. Absconding usually occurred after worker policing had ceased, as evidenced by the appearance of larvae. Dissections of workers from eight colonies showed that in *A. florea*, 6% of workers have activated ovaries after 4 days of queenlessness, and that 33% of workers have activated ovaries after 3 weeks. Worker-laid eggs may appear in nests within 4 days and larvae soon after, but this is highly variable. As with *Apis mellifera*, we found evidence of unequal reproductive success among queenless workers of *A. florea*. In the two colonies that reared males to pupation and which we studied with microsatellites, some subfamilies had much higher proportions of workers with activated ovaries than others. The significance of absconding and internest reproductive parasitism to the alternative reproductive strategies of queenless *A. florea* workers is discussed. (ภาคผนวก 2)

1.2.3 Ecological Behavior of Dwarf honeybees: *Apis florea* and *Apis andreniformis*

Abstract

Apis florea and *Apis andreniformis* construct a single comb on a twig exposed to sun in the summer and rain in the rainy season. In this study, temperature control and rain proof behaviors of *A. florea* and *A. andreniformis* were observed in the northern part of Thailand. When the nest was directly exposed to the sun light, curtain-forming bees of *A. florea* fanned, deformed the curtain and took a short flight to reduce brood temperature. *A. andreniformis*, fanned but did not deform the curtain and formed a tail-

like structure from the bottom of the nest. During rainy periods, all the curtain-forming bees of *A. florea* came up on the dancing floor and formed an umbrella shape by spreading wings upon wings and formed a roof-like structure of waterproof jacket to protect the nest from rain. In case of *A. andreniformis*, curtain-forming bees oriented their heads upwards and rested compactly against the brood cells and spread the wing in a □-shape, so that one wing overlaid up on the wing of another curtain-forming bee. In both species, the honey cells are double in size than the brood cells, serve as the roof of the nest.

Introduction

The little honeybee; *Apis florea* (Fab.), and the dwarf honeybee; *Apis andreniformis* (Smith) construct a single comb of 38cmX50cm on a flexible twig about 0.8cm diameter (Akratanakul, 1977; Rinderer, *et al.*, 1996, Wongsiri, *et al.*, 1996), a water pipe or the wall of a house. However, *A. florea* use a widely variety of nesting substrate. *A. florea* has a particular adaptational feature for surviving in tropical rainy weather (Akratanakul, 1977, Wongsiri, *et al.*, 1996). *A. florea* and *A. andreniformis* nests have 20-30cm deep honey-storage cells (Akratanakul, 1977), but the honey-storage cells above the twig are gradually reduced (16mm) in depth in order to form a take off and landing and dancing platform (Lindauer, 1957; Akratanakul, 1977) which also serve as a roof to protect rain seep into the comb in rainy season.

Tirgari (1971) observed the biology and behavioral characters of the Iranian dwarf honeybee; *A. florea*. Akratanakul (1977) studied the natural history of *A. florea* in Thailand. Wongsiri, *et al.*, (1996) studied the comparative biology of *A. florea* and *A. andreniformis*. Rinderer, *et al.*, (1996) studies the comparative morphology of *A. florea* and *A. andreniformis*. Previous studied did not mention the rain-proof behavior of *A. florea* and *A. andreniformis* against rain. We hypothesized that *A. florea* and *A. andreniformis* have a particular rain-proof adaptational feature to cope with monsoons in tropical deciduous forest Thailand.

Objective

The purpose of this research was to:-

- understand how the open-nest species, *A. florea* and *A. andreniformis*, protect their nest against the rain.

Materials and methods

1. Materials

- Thermometer
- Stop watch
- Sony digital camera

2. Methods

In this study, three colonies of *Apis florea*; two nests at Mae Fah Luang University (MFLU), Chiang Rai and one colony was on a mango tree (*Mangifera indica* L.) in Government Residential area, 700th National Stadium in Chiang Mai the northern part of Thailand, were observed. A swarm of *A. florea* around 150 meters on 4th floor of E-1 building of MFLU on 16th of March 2004, whereas one colony nested on the window top of The President building. There was a heavily rain with thunderstorm on 16 July at 16:45 hrs. In this study, all *A. florea* nests were observed in natural habitats. Subsequently, rain-protecting behavior of *A. andreniformis* was observed in Chantaburi.

Results

1. Nest temperature control

In summer (March-May), when ambient temperature reached above 40°C, the curtain formation bees of *A. florea* first fanned and as the ambient nest temperature lies above 40°C, then curtain deformed, whereas in *A. andreniformis* curtain formation bees formed a double layers curtain by forming tail-like structure (Figure 6).

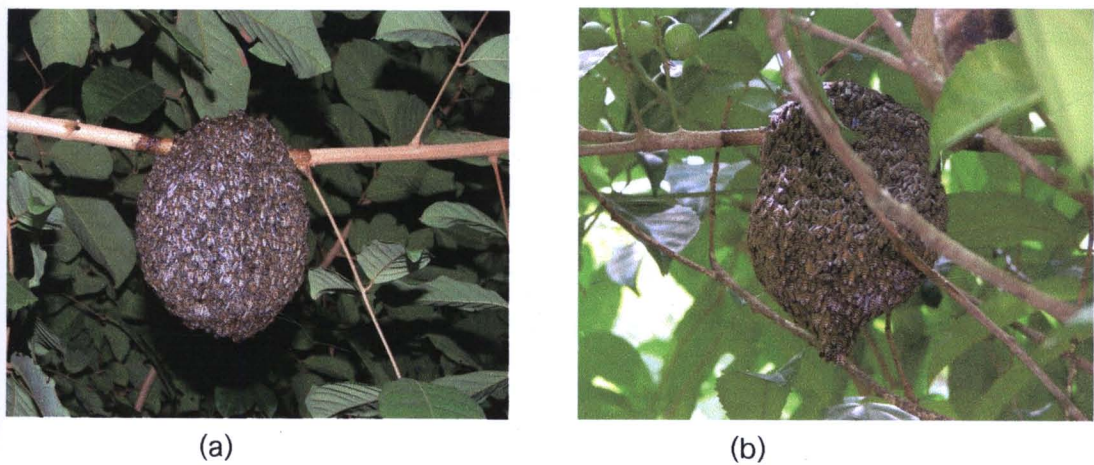


Figure 6 Combs cover during rain (a) *Apis florea* without tail (b) *Apis andreniformis* with a tail.

2. Comb protection in raining times

During the raining time, the curtain formation bees moved up to the dancing floor and formed an umbrella shaped by spreading wings up on wings (waterproof jacket) (Figure 7).

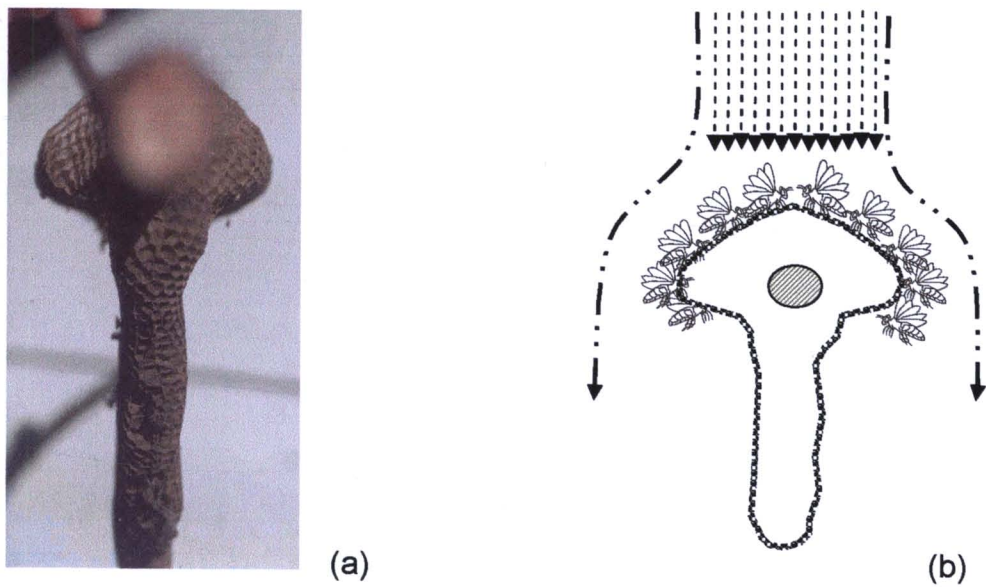
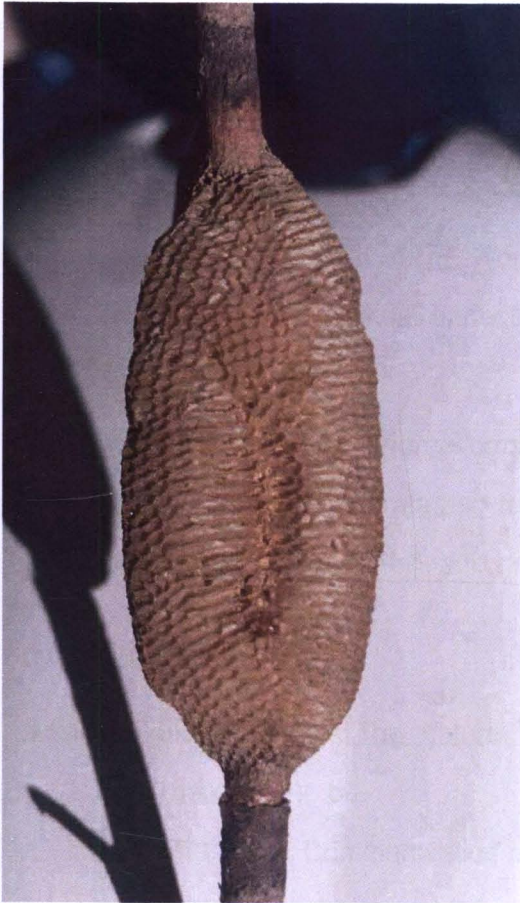


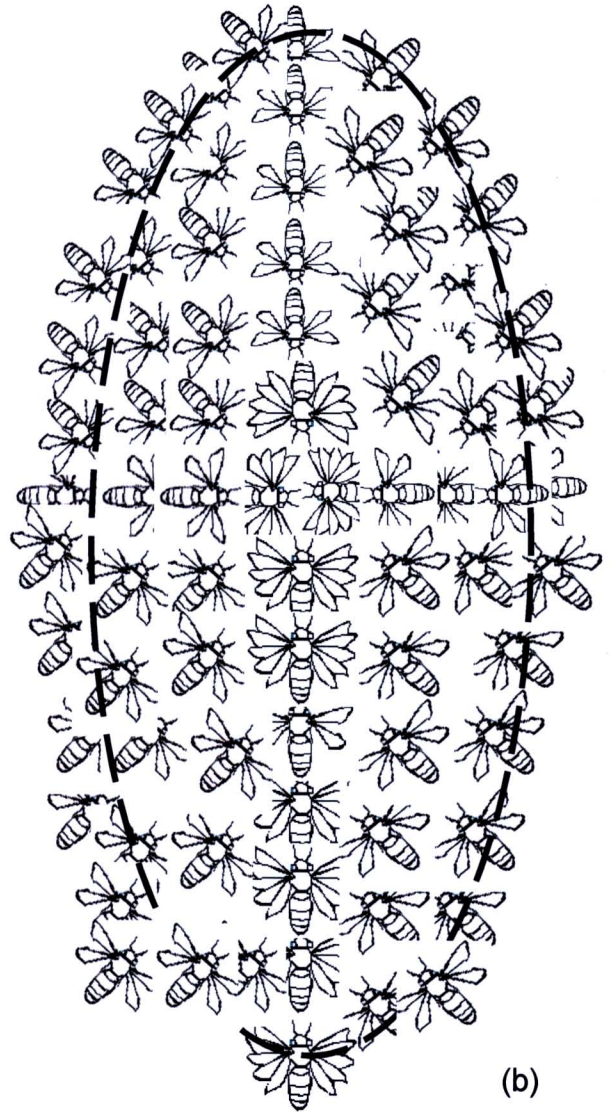
Figure 7 Rain proof curtain formation of *A. florea* (a). Abandon comb after heavy rain (b). Position of curtain formation bees

3. Position of curtain formation bees during rain

During the raining, curtain formation bees of *A. florea* and *A. andreniformis* oriented their heads upwards and spread their wings in inverted V-shaped over the dorsum at 45° angle (Figure 8a). The curtain formation bees kept their head under the body of upper bees and raise their abdomen at about 15°C against the comb surfaces, so that the bottom bees can hid their head from physical impact of rain drops, thus forming tile-like structure of roof (Figure 8b).



(a)



(b)

Figure 8 Top view during raindrops on the colony (a) dancing floor damaged by raindrops (b) curtain formation bees' position during rain

Discussion

In summer, nests are directly exposed to the sun because, the tropical deciduous forest drop their leaves in dry season. So, the nest temperature gradually increases as the ambient temperature rises. First the curtain formation bees deployed physical process like fanning and watering to control the brood nest temperature, as the ambient temperature gradually increase along with the ambient temperature, the curtain is deformed, and if the brood nest temperature is not decreased, the curtain formation bees take a short flight to drop brood temperature.

The curtain formation bees have (temporal) waterproof hair cover and waxed body surface which help to dried the rain. However, if the rain is continues for several days the curtains are broken, as a consequence, bee could not survive and starts absconding. The heavy rain can destroy the dancing floor and found many bees were dead. Lindauer (1957) was also made similar observation. However, *A. florea* and *A. andreniformis* construct their nests on small flexible and partially concealed twigs (Ruttner, 1986; Akartanakul, 1977; Wongsiri *et al.*, 1996), the nest swing with air and rain in order to minimize the rain fall impact on the nest.

Conclusion

A. florea and *A. andreniformis* have several climatic adaptations fanning for reducing brood nest temperate and form rain proof jacket to cop against environmental stresses such as heavy rain fall, and drought.

References

- Akartanakul, P. (1977). The natural history of the dwarf honeybee; *Apis florea* F. in Thailand. 91 pp
- Lindauer, M. (1957). Communication among the honeybee and stingless bees in India. Bee World. 38:3-14
- Rinderer, T. E.; Wongsiri S.; Oldroyd, B.; Sylvester, H. A.; and Guzman, L. (1996). Comparative nest architecture of the dwarf honeybee. J. Apic. Res. 35(1) :19-26

- Tirgari, S. (1971). Biology and behavioral characteristics of the Iranian dwarf honeybee (*Apis florea*). Proceeding of the international Beekeeping Congress 23: 344-345
- Thapa, R. and Wongsiri, S. (1996). Distinct fanning behavior of two dwarf honeybees; *Apis andreniformis* (Smith) and *Apis florea* (Fab.). Proceeding of the Second International Conference of the Asian Apiculture Association, Jakarta, Indonesia.
- Wongsiri, S.; Lekprayoon, C.; Thapa, R.; Thirakupt K.; Rinderer, T. E.; Sylvester H. A.; Oldroyd B.; and Booncham U. (1996). Comparative biology of *Apis andreniformis* and *Apis florea* in Thailand. Bee World. 77(4) 23-35.

1.3 ศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างผึ้งใน species ต่าง ๆ ในระดับแอดติวิตีของเอนไซม์ RNA และ DNA

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

1. An expression level of alpha glucosidase (AG) in *Apis florea*

Honeybees from 3 different stages (egg, nurse bee, and forager bee) were sampled. Total RNA was isolated. The quality of total RNA was determined by (1) native agarose gel and (2) formaldehyde gel. The 18S and 28S rRNA bands were detected on 1.2% agarose gel (Fig.9A) while the 28S RNA band was visible on formaldehyde gel (Fig.9B).

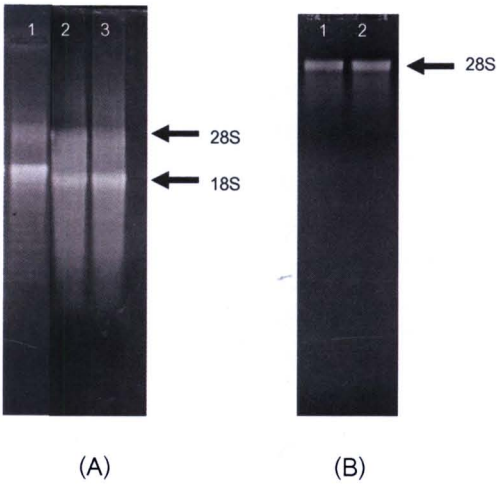


Figure 9. Total RNA extracted from **different stages** heads of *A. florea* on native agarose gel (A) and formaldehyde gel (B).

- Lane 1 (A): total RNA of egg
- Lane 2 (A): total RNA of nurse bee
- Lane 3 (A): total RNA of forager bee
- Lanes 1 – 2 (B): total RNA of forager bee

In order to determine the expression level of AG by RT – PCR, 200 ng of RNA sample (egg, nurse bee, and forager bee) were used for 1 reaction. Primers were designed from the AG cDNA sequence of *A. mellifera* as described in Materials and Methods. The primers for determination of expression are FW1/ R1 primers. Under the optimum condition of RT – PCR, the expression profile of AG was obtained (Fig. 10). The quantity of products was assayed due to intensity of the bands by Quantity one software (Table 4). The result presented that the expression level of AG in three stages (egg, nurse bee, forager bee) was different. There was no amplified product from egg RNA (Fig. 10, lanes 1 - 2) and small amounts of amplified product from nurse bee RNA (Fig. 10, lanes 3 – 4). The highest amount of amplified products was obtained from forager bees (Fig. 10, lanes 5 – 6).

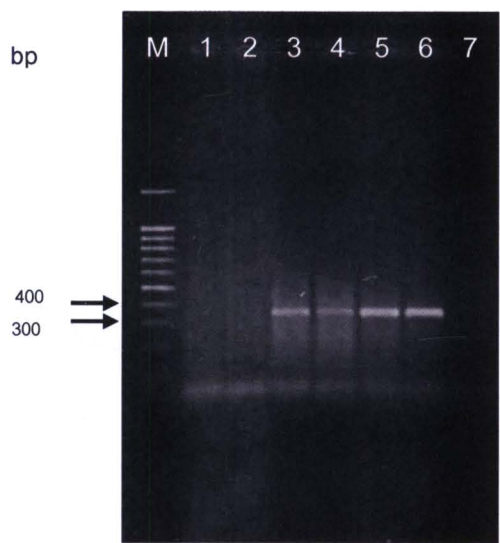


Figure 10. Expression profile of AG.

- Lane M: 100 bp ladder marker
- Lanes 1 - 2: amplified products from egg RNA
- Lanes 3 - 4: amplified products from nurse bee RNA
- Lanes 5 - 6: amplified products from forager bee RNA
- Lane 7: negative control

Table 4. Intensity of amplified product bands from Fig. 10.

.Stage	Average volume intensity*mm ²
Eggs	16.082
Nurse bees	386.633
Forager bees	760.589

As control experiments, primers specific to elongation factor gene (*EF*) in *A. cerana* and 28S RNA in *A. mellifera* were designed. Under the optimum condition, the products of 200 bp (*EF*) and 350 bp (28S RNA) were obtained from all samples, respectively (Fig. 11).

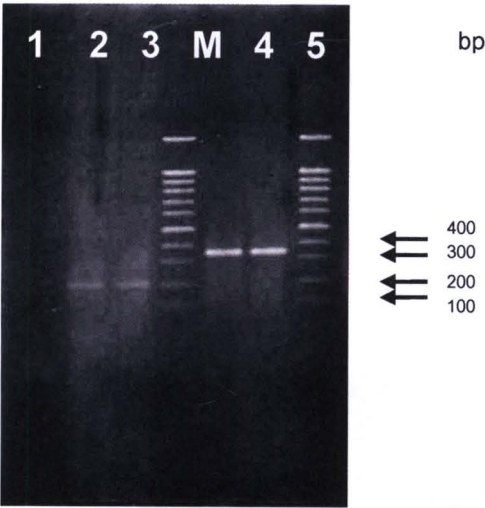


Figure 11. Control experiment by using primers from *EF* and 28S RNA genes. Total RNA for all reactions were from forager bee.

- Lane 1: Negative control
- Lanes 2-3: RT – PCR product by using *EF* primers
- Lanes 4-5: RT – PCR product by using 28S RNA primers
- Lane M: 100 bp ladder marker

2. The cDNA sequence

Total RNA of forager bee was amplified by 3 pairs of primers for RT - PCR. The sizes of RT - PCR product were 350 bp from FW1/ R1 primers (Fig. 12A), 1,000 bp from FW1/ R2 primers (Fig. 12B), and 850 bp from FW2/ R3 primers (Fig. 12C). Three bands (200, 300, and about 380 bp; Fig. 12D) were obtained from FW3/ R3 primers but only the 200 bp product was excised from the agarose gel, purified, and sequenced (Fig. 12E).

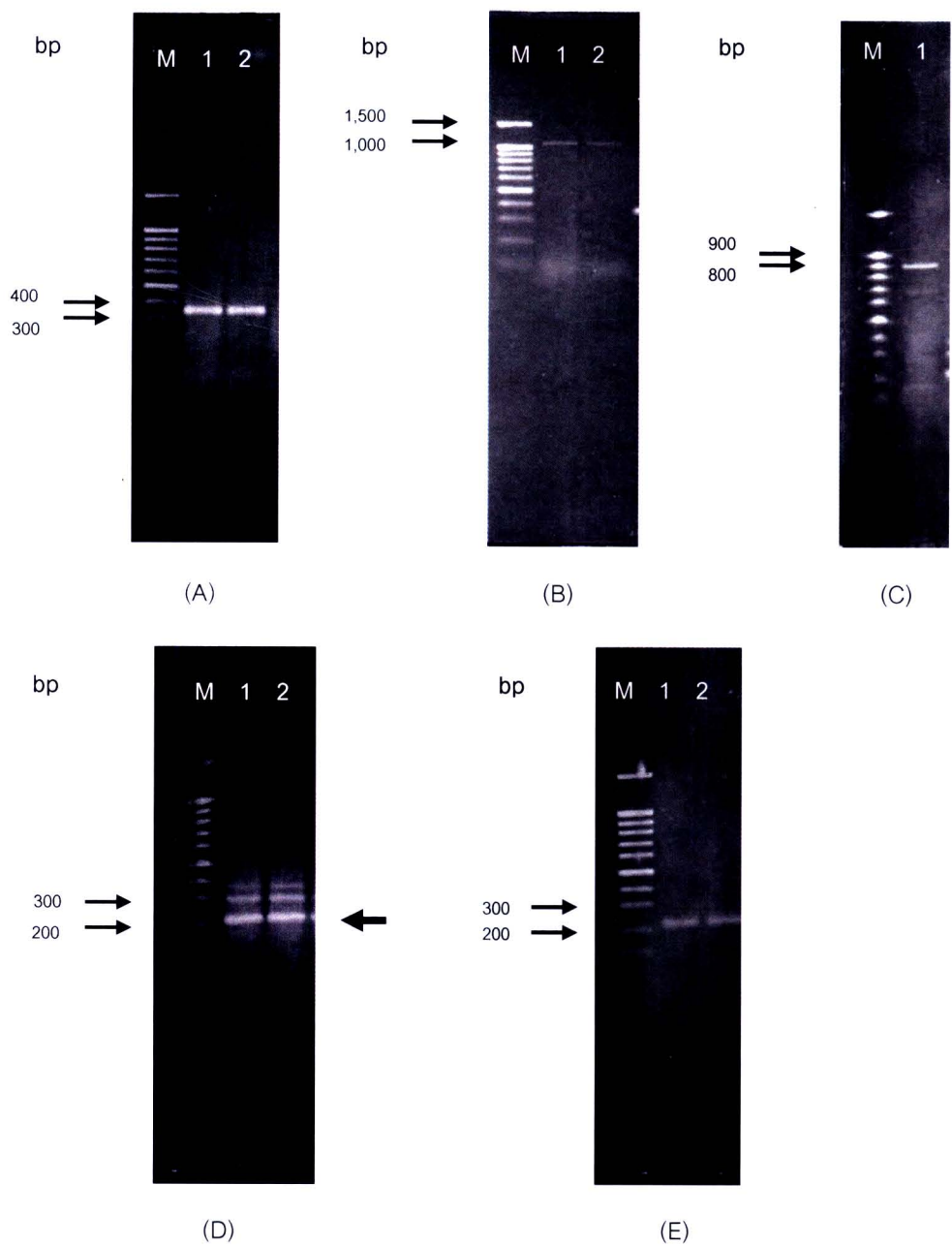


Figure 12. RT - PCR product amplified by 3 different pairs of primers.

- Lane M (all Figs.): 100 bp ladder marker
- Lanes 1 – 2 (A): the 350 bp product by FW1/ R1 primers
- Lanes 1 – 2 (B): the 1,000 bp product by FW1/ R2 primers
- Lane 1 (C): the 850 bp product by FW2/ R3 primers
- Lanes 1 – 2 (D): the 200, 300, and about 380 bp products by FW3/ R3 primers
- Lanes 1 – 2 (E): the excised and purified target band (200 bp)

The cDNA sequences were blasted and aligned with AG in *A. mellifera*. The result of blast showed 95% identity. Furthermore, the cDNA sequence was multiple aligned with sequences of AG sequence in *A. mellifera* (D79208), maltose 1 in *A. mellifera* (XM 393379), AG, α - amylase, and transporter activity in *Drosophila melanogaster* CG14934 - PA (NM 135678), sucrose - specific enzyme II of the PTS (ScrA) and dextran glucosidase (*dexB*) genes in *Lactobacillus sakei* (AF401046), and *Culicoides sonorensis* clone CsMAL1 maltase (AY603565). The similarity between sequences was presented in table 5.

Table 5. Similarity of the AG sequence in *A. florea* (1,773 bp) and that in other organisms.

Organisms	Length (bp)	Score
AG sequence in <i>A. mellifera</i>	1,760	95
maltose 1 in <i>A. mellifera</i>	1,764	38
<i>Drosophila melanogaster</i>	1,751	46
<i>dexB</i> in <i>Lactobacillus sakei</i>	1,946	19
Maltase in <i>Culicoides sonorensis</i>	1,831	41

The nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of AG were aligned (Figs. 13 and 14)

by using Clustal X.

Af. AG.nuc	TTCGACTTCTAGTTGGTAGCATGAAGGCGGTAATCGTGTTCCTT-ATGGCATTGTCC	59
Am. AG.nuc	TTCGACTTCTAGTTGGTAGCATGAAGGCGGTAATCGTGTTCCTT-ATGGCATTGTCC	59
Dm. CG.nuc	TTGTAGTGAAAAATAGCTTTCATTTTGGTGTGGGCTAGTAGGCAT--ATTG----GCCC	54
Cs. maltase.nuc	TATAAAAGAAAAATGATTCCATTAAAAAATTACAATTTTACTATCAATTGCAT-GTTC	59
Am. maltase.nuc	-----ATGAAGAGCCTCGTCGTGGTCTGACTT-----CTGCTC	33
Ls. ScrA.nuc	GTTTAGTTTGGGCTTATCAAACGTTAGGTGCAGTCGGTATGGGATTTTGGCCTGGGTT	60
	* * * *	
Af. AG.nuc	ATT-GTGGACGCAGCATGGAAGCCACTCCCTGAAA--ACTTGAAGGAGGACTTGATCTTG	116
Am. AG.nuc	ATT-GTGGACGCAGCATGGAAGCCGCTCCCTGAAA--ACTTGAAGGAGGACTTGATCTTG	116
Dm. CG.nuc	ATA-AGCACCAGTCAAAGGAGCTGGATGCGAAATATAATTGGTGGCAGCACGAGGTCTTC	113
Cs. maltase.nuc	TGT-ATTGGCAGCACCTGAAGGTGCACGTGAAAAA-GATTGGTGGGAAATTGAAACTTT	117
Am. maltase.nuc	GCG-GTCGGCCTTG-GCGCCGGCCAAACAACAAG-GGTGGTGAAGAACGCGATCTTC	90
Ls. ScrA.nuc	ATTACGAATTTGCTTAACTGGCTTACATCAAAGCTTCCCGAATTGAAACGACATTT	120
	* * * *	
Af. AG.nuc	TATCAGGTTTACCCGA---GGAGCTTCAAGGATAGCAATGGAGATGGTATTGGTGATAT	172
Am. AG.nuc	TATCAGGTTTACCCGA---GAAGCTTCAAGGATAGCAATGGAGATGGTATTGGTGATAT	172
Dm. CG.nuc	TATCAGATCTATCCGA---GATCCTTTCAGGACAGCAATGGTATGGTATTGGTGATCT	169
Cs. maltase.nuc	TATCAAGTCTATCCAC---GAAGTTTCATGGATTCTGATGGCGATGGTGTGGCGATTT	173
Am. maltase.nuc	TATCAGGTATATCCCC---GCAGTTTCATGGATTCCAATAGTGATGGCATCGGGGATTT	146
Ls. ScrA.nuc	TGGCAGATATTGCCAAAACCTGGTGGATCGTTTATTTTCCCGTTGCAGCGATGGCAAATA	180
	* * * * * * * * * *	
Af. AG.nuc	CATAGGTATTAAAGAAAAAATTGGATCAT-TTTCTCGAAATGGGCGTCGACATGTTTTGGT	231
Am. AG.nuc	CGAAGGTATTAAAGAAAAAATTGGATCAT-TTTCTCGAAATGGGCGTCGACATGTTTTGGT	231
Dm. CG.nuc	TCAAGGTATTACTTCTAGGCTACAGTAC-TTCAAGGATACGGGCATCACGTCGGTATGGT	228
Cs. maltase.nuc	GAAAGGAATTTTCAGAAAAAGTCGGTTAT-TTAAAGGAAATCGGCATGGATGGTGTGGC	232
Am. maltase.nuc	AAAAGGTATTAAAGGATAAGCTTTCACAC-TTCATCGAATCTGGAATAACAGCGATATGGT	205
Ls. ScrA.nuc	TTGCTCAAGGGGCTGCAACTTTCGCTGTATTCTTCGTACTAAGAATAAACAACAAAAGT	240
	* * * * * * * *	
Af. AG.nuc	TATCCCCATTTTATCCAAGCCCTATGGTCGATTTTGGTTACGACATTTCCAATTACACCG	291
Am. AG.nuc	TATCCCCATTTTATCCAAGCCCTATGGTCGATTTTGGTTACGACATTTCCAATTACACCG	291
Dm. CG.nuc	TGAGTCCCATTATGAGTCACCAATGGTAGACTTTGGATACGATATATCTAACTATACAA	288
Cs. maltase.nuc	TTTCACCGATTTTGTATTCACCTATGGCAGATTTGGTTATGACATTTCAAATTCACCA	292
Am. maltase.nuc	TATCACCAATTAATCGAAGTCCTATGGTAGATTTTGGATACGATATATCTGACTTTAAAG	265
Ls. ScrA.nuc	CATTACAGACTTCTGCTGGGATTTCTGTC-GATGTTGGGAATTACTGAACGACCATTTAT	299
	* * * * * * * *	
Af. AG.nuc	ACGTTTCATCCCATATTTGGCACCATATCAGATTTAGATGACCTAGTCAGTGCTGCACATG	351
Am. AG.nuc	ACGTTTCATCCCATATTTGGCACCATATCAGACTTAGATAATCTAGTCAGTGCTGCACATG	351
Dm. CG.nuc	ATATACAGCCGGAATATGGCACCCTTGAGGACTTTGACGCCTTGATAGCCAAGGCCAATG	348
Cs. maltase.nuc	AAGTCTTCCCTCAATTCCGAGACTTGTCTTCAATTGATGAACCTGTAGCGGAATCAATA	352
Am. maltase.nuc	ATGTAGATCCAATATTTGGTACTATAAAAGATCTTGAAGATCTCACTGCAGAAGCGAAGA	325
Ls. ScrA.nuc	GGGGTTAATTTAAATGAAGTTTC--CATTCCTTATTGGTTTAAATGTCATCAGGAATCT	357
	* * * * * * *	
Af. AG.nuc	AGAAAGGACTGA--AGATAATCTTGGATTTCGTTCCGAATCATACTCTGATCAACACAA	409
Am. AG.nuc	AGAAAGGATTGA--AGATAATCTTGGATTTCGTTCCGAATCATACTCTGATCAACACGA	409
Dm. CG.nuc	AACTGGGCGTGA--AAGTTATTTTGGACTTTGTTCCTCAATCAGAGCTCAAATAAGCATCC	406
Cs. maltase.nuc	AAAAAGATATGA--AACTATTCTGGACTTTGTTCCTCAATCATAAAGTGACCAATGTGA	410
Am. maltase.nuc	AACAGAATTTAA--AGGTTATTCTAGATCTTGTCCCTAATCATACTTCTGATCAACATAA	383
Ls. ScrA.nuc	CATCGTTTATTATGGTTTATTACATGTTTATCAGTATCAATGGGACCTGCAGGAATTA	417
	* * * * * * *	
Af. AG.nuc	ATGG-TTCCAGTTGAGTTTGAAAAACGTTGAACCT-----TATAACAA	451
Am. AG.nuc	ATGG-TTCCAGTTGAGTTTGAAAAACATTTGAACCT-----TATAACAA	451
Dm. CG.nuc	CTGG-TTC--ATAAAGTCAGTAGCCCGA-GAGCCAGG-----GTACGAGGA	448
Cs. maltase.nuc	GTGG-TTC--AAAAATCAATTACGCGT-GATCTGA-----GTACAATGA	452
Am. maltase.nuc	ATGG-TTCCAAATGAGTATAAATAATACTAATAATAATAATAC--TAATAAATATAAAGA	440
Ls. ScrA.nuc	TTGGGTTTATTGCGATTGACACCTAAGAGCATCCCTAGTTTTATGATGGGAGCTATTATA	477
	*** * * * * * *	
Af. AG.nuc	CTATTATATTTGGC---ATCCAGGAAAAAT-----TGTAAT--GGTAAACGTGTTCC	499
Am. AG.nuc	CTATTACATTTGGC---ATCCAGGAAAAAT-----TGTAAT--GGCAAACGTGTTCC	499
Dm. CG.nuc	TTTCTATGTGTGG---AGGATGGTATTCT---CCTGGAGAAC---GGAACCTGTGTGCC	499
Cs. maltase.nuc	TTACTATATTTGGC---ATCCGGGTAAAGCCAAATCCTGATGGT---GGTCGAAATTTACC	506
Am. maltase.nuc	TTATTACATATGGGTTGATCCTGTCAAAGACGATAAAGGAAATCCAATTAAAGACAAATA	500

Figure 13. (continued)

Ls.ScrA.nuc	GTTTCGTAATTGCCCTTTGTGGGGACATACTTATACGGTAAAAAGGCAATGAAGACAAC TG 537
	* ** *
Af.AG.nuc	ACCAAATAATTGGGTAGGCGTATTTGGTGGATCAGCTTGGTCATGGCGGGAAGAACGACA 559
Am.AG.nuc	ACCAACTAATTGGGTAGGCGTGTGGTGGATCAGCTTGGTCGTGGCGGGAAGAACGACA 559
Dm.CG.nuc	GCCCAACAATTGGCTGTCCGTGTTCTCCGGATCCGCTTGGATGTGGAACGATGAGAGGCA 559
Cs.maltase.nuc	CCCAACTAATTGGGTAAAGTGCCTTCAGAAGTAGTGCCTGGGAATGGAACGAAGAACGTGG 566
Am.maltase.nuc	TCCTAATAATTGGCTTAGTGATTCAATGGTACAGGATGGACTTTCCACGAGGGTAGGAA 560
Ls.ScrA.nuc	AAGAAGAAATAATCAATGAAGCACCAGCTACCCAGA-AGTAGTGGAGAGATTACAAGAT 596
	* *** * *
Af.AG.nuc	GGCATATTATCTGCACCAATTTGCACCAGAACAACCAGATTTAAATTACTA--TAATCCA 617
Am.AG.nuc	GGCATATTATCTGCATCAATTTGCACCAGAACAACCAGATCTAAATTACTA--TAATCCA 617
Dm.CG.nuc	GCAGTACTATCTCAGGCAGTTCACTTATGGACAACCCGATTTGAAC TACCG--AAATCCC 617
Cs.maltase.nuc	CGAATATTATTACATCAATTTTGGGCACAACAACCCGATTTGAATTACCG--CAATCCA 624
Am.maltase.nuc	ACAATTTTATTTCATCAATTTTAAAGCAACAACCAGACTTGAAC TACAG--AAACTCG 618
Ls.ScrA.nuc	GAAAGATTAGTGCACCAAGTTACCGACGAATTGTTGACTTAGCATCAGTACCTGATCCA 656
	* * *** *
Af.AG.nuc	GCT---GTACTGGATGAAATGC-AAAACGTTCTTAGATTCTGGTTGAA-GAGAGGACTTG 672
Am.AG.nuc	GTT---GTACTGGATGATATGC-AAAATGTTCTCAGATTCTGGCTGAG-AAGGGGATTTG 672
Dm.CG.nuc	GCC---GTGATTAAGGCCATGG-ATGATGTGATGCTCTTCTGGCTAAA-CAAGGGTATTG 672
Cs.maltase.nuc	AAA---GTGGTTGAAACAATGA-AAAACGTTTAAAGATTCTGGCTTAG-CAAAGGTATCA 679
Am.maltase.nuc	GAT---GTGAGAGAAGAGATGA-AGAATATAATGAAATTTTGGTTGGA-TAAAGGAATCG 673
Ls.ScrA.nuc	GTTTTTGAAGTGAAGCAATGGGAAAAGGCATTGCGATTATGCCAACTTCTCAGGATGTA 716
	* * *** * *
Af.AG.nuc	ATGGTTTCAGA-GTAGATGCTCTGCCTTAC--ATTGCGAAGATATGCGAT-TCTTAGAC 728
Am.AG.nuc	ATGGTTTCAGA-GTAGATGCTCTGCCTTAC--ATTGCGAAGACATGCGAT-TCTTAGAC 728
Dm.CG.nuc	CCGGCTTCCGC-ATCGATGC--CATTATATATATTACGAGGATGCTCAAC-TGAGGGAT 728
Cs.maltase.nuc	ATGGATTTCAGA-ATTGATGCGGTACCATATTTGTTGAAGTGGGACCAGATGCGAATGGA 738
Am.maltase.nuc	ATGGATTCCGC-ATAGATGCTGTACCACATTTATTTCGAAAGCGCTAACATATCGTTAGAT 732
Ls.ScrA.nuc	CTTGCAACAGTTACCGGTGTGATAACAATTGCGGCTAATACTGGTCACGCA-TACGGGAT 775
	* * * * *
Af.AG.nuc	GAACCCCTATCAGG---TGAAACAAATG---ATCCC-AACAA---AAGTGA---TACAC 775
Am.AG.nuc	GAACCTCTATCAGG---TGAAACAAATG---ATCCC-AATAA---AAGCGAG---TACAC 775
Dm.CG.nuc	GAGCCTCCGAGTGGCACT---ACCGATG---ATCCA-AATAATGAGGCC-----TACTT 775
Cs.maltase.nuc	AATTATCCAGATGAAATTGAAACCCATGCATGCTCA-GATCCTTTATCTCAATGTTACTT 797
Am.maltase.nuc	GAACCCACTTTGGG---TAAAAATCTCA---ACTTA-AGTCTCCAGCT-----TCTTT 779
Ls.ScrA.nuc	AAAATCGGATGATGGTGCAGAAGTGCTA---ATTATATTGGTTTAGATACAGTTAATTT 832
	* *
Af.AG.nuc	TCTCAAGATCTACACTCACGATAT-CCCAGAAACCTACAATGTAGTT----- 821
Am.AG.nuc	TCTCAAGATCTACACTCACGATAT-CCCAGAAACCTACAATGTAGTT----- 821
Dm.CG.nuc	GAGCCACATCTATACCAGAAATCA-GCCTGAGGATTACGGTCTACTT-CAGC----ATTG 829
Cs.maltase.nuc	GTATCACGATTACACTCAAAACAG-GCCTGAAACTTTTGAATGGTACGGA----ATG 852
Am.maltase.nuc	AAATCACACTTTAACGAAAGATCA-ACCCGAGACTTACGAATTTGGTAAAAGA----ATG 833
Ls.ScrA.nuc	AAATGGTATAGGTTTTGAAAAGATTGTCCAACAGGGACAACATGTTAGCGAAGGCGATT 892
	* * *
Af.AG.nuc	--CGCAAATTTAGAGATGTGTAGACGAATTCCCG-----CAACCAAAACACATGCTTA- 873
Am.AG.nuc	--CGCAAATTTAGAGATGTGTAGACGAATTCCCG-----CAACCAAAACACATGCTTA- 873
Dm.CG.nuc	GCGGCAACTTCTGGATAATTATACAGCTAACACGATGGGCCATTGAGGATAATGATGA- 888
Cs.maltase.nuc	AGAGCGACTTTGGAGGAATT-TAAACAAAAGAAATGGAGGACCAACAAGAGTTTAAATGG- 910
Am.maltase.nuc	GCGAGATTTTGTGGACAACATATGCAGAGAAAATAAGCGGGATGAAATAGTACTTTTGA- 892
Ls.ScrA.nuc	ATTAGGTCATTTTGATATTGATAAGATTAAACAAGCCGGGCTAACACCGCTAACATGAC 952
	* *
Af.AG.nuc	--TCGAGGCATACACGAA---TTTGTCCATGACGATGAAATATTACGAT----- 917
Am.AG.nuc	--TCGAGGCATACACGAA---TTTATCGATGACGATGAAATATTACGAT----- 917
Dm.CG.nuc	--CCGAGGGTTATGCTTC---GGTGTGCAACTAATGGAATACTATGAA-GATTGCAAT 941
Cs.maltase.nuc	--TAGAAGCTTATGCTCC---ATTAACAAAAGTAATTCAAATTTATGGTCAAAATGGAC 964
Am.maltase.nuc	--CAGAGCGTATTCTTC---TTTAGAGAACACTCTCAATATTACGAA----- 936
Ls.ScrA.nuc	TATTGTGACGAATACAGCGGGATATGCACAAGTTGATCCGCTTTTAAACAGTCGACAAGGC 1012
	* * *
Af.AG.nuc	-----TACGGAGCAGATTTTCCCTTCAATTTTGCATTTCATCAAGA--ACGTCTCTAGGA 969
Am.AG.nuc	-----TACGGAGCAGATTTTCCCTTCAATTTTGCATTTCATCAAGA--ATGTTTCTAGGG 969
Dm.CG.nuc	GGTGTACAGGGCCCCAGTTTCCCTTCAACTTTGACTTCATCACCG--AACTGAATGCCA 999
Cs.maltase.nuc	AGC-TAAATGGAGCTCAAATCCATTTAATTTTCAGTTCTTGAATA--ATTGGGAGCCG 1021

Figure 13. (continued)

Am.maltase.nuc	-----GTTGGTTCAAATGTTCCCTTCAATTTTAAATTTATAACAG--ATGCAAATTCAT	988
Ls.ScrA.nuc	TGC-TATGCAAGGCGAAGAAATTATTCAATTACAGCTAAAAAGGATTAAGGGGTAGTTA	1071
	* * * * *	
Af.AG.nuc	ATTCAAATTCATCAGACTTCAAAA---AATTGGTCGATAATTGGATGACGTACATGCCAC	1026
Am.AG.nuc	ATTCAAATTCATCAGACTTCAAAA---AATTGGTCGATAATTGGATGACGTACATGCCAC	1026
Dm.CG.nuc	ATTCGACAGCTGCGGACTTTGTCT---TCTATATCTCCAGGTGGCTCATCTATATGCCAC	1056
Cs.maltase.nuc	TAAGTAATGCTCGTGATTTCAAAG---ACGTAATTGACAATTATCTCAGCACAAATCCCAG	1078
Am.maltase.nuc	AAATAAATGTTCCAAATTTGAGTGGGAAACCATGATCGATGTCGTGCGTACACGCTG	1045
Ls.ScrA.nuc	CATGCAAATACTGGTGGCAAAATGCAGTATTTTATCAAGTCTATCCAAGAAGT-TTTC	1130
	* * * * *	
Af.AG.nuc	CAANTGGTATTCTTAAGTGGTGGCCGAAACCANGACCNATTGAGATNGGTGTCGAGAT	1086
Am.AG.nuc	CAAGTGGTATTCTTAAGTGGTGGCCGAAATCACGATCAATTGAGATNGGTGTCGAGAT	1086
Dm.CG.nuc	ATGGTCATGTGGCCAACTGGGTGATGGGAAATCACGACAATCCTCGAGTGGCATCACGAT	1116
Cs.maltase.nuc	AAGGAGCAACACCAAAATGGGTTCAGGAAATCACGATCAACATCGATCAGCATCACGAC	1138
Am.maltase.nuc	AAAATAATGTTCCAAATTTGAGTGGGAAACCATGATCGAGTTCGTGTCGTGACGCTG	1105
Ls.ScrA.nuc	AAGATAGTAATGGAGATGGAATTGGTGATATTCAAGGTATTATTCAAAGATTAGATTACC	1190
	* * * * *	
Af.AG.nuc	TTGGAGAAGAGAAGGGCCGTATGATCACCACGATGTCGCTTTTGC---TGCCAGGTGTTT	1143
Am.AG.nuc	TTGGAGAGGAGAAGGCCCGTATGATCACCACGATGTCGCTTTTGC---TGCCAGGTGTTG	1143
Dm.CG.nuc	TCGGTGAGAAATCTGTGGACGCCATGAATATGCTGCTGATGACAT---TGCCAGGAATTG	1173
Cs.maltase.nuc	TCGGTCCACAAAAGCTGATGCAGTTAATATGTTACTTCAAGTTC---TTCCCGGAGCTG	1195
Am.maltase.nuc	ATCCTGGTAGGGCGGATCACATGATAA---TGTTGGAGATGATT---TGCCTGGAGTCG	1159
Ls.ScrA.nuc	TAGCTGATCTGGGTGTAATGCAATTTGGCTATCACCAGTTTATCAATCCCCTAATGTTG	1250
	* * *	
Af.AG.nuc	CCGTGAATTATTACGGTGATGA--AATTGGTA--TGTC---GGATACTTATATCTCGTGG	1196
Am.AG.nuc	CCGTGAATTACTACGGTGATGA--AATTGGTA--TGTC---GGATACTTATATCTCGTGG	1196
Dm.CG.nuc	GTATTACTTATAATGGCGAGGA--GTTGGGCA--TGACTGACTACAGGGACATCAGCTGG	1229
Cs.maltase.nuc	CAGTCACCTATTATGGTGAAGA--ACTTGCAA--TG---GAAGACGTTTTCTGTTCCATGG	1248
Am.maltase.nuc	CGGTACAGTATTATGGAGAAGA--AATCGGTA--TGTT-----TGCTGCTGATACACC--G	1194
Ls.ScrA.nuc	ATAATGGCTATGATATTTTCAAGTATATCAGGCAATTAATCCGGAATATGGTTCTATGGTGG	1310
	** * * *	
Af.AG.nuc	G-AGGACACGCAGGATCCACAGGGATGCGGTGCCGGTAAAGAAAACATCAAACAAT-GT	1254
Am.AG.nuc	G-AGGATACGCAGGATCCGACAGGGATGCGGCGCCGGTAAAGAAAACATCAAACGAT-GT	1254
Dm.CG.nuc	A-GCGATACGGTGGATCAGCCCGCTTGTGAGGCTGGAATCGACAACATACAAGACGAT-TT	1287
Cs.maltase.nuc	T-CTCGTACTGTCGATCCACAAGCATGTACAACAGATCCAAATATTTTCCATGCCAA-GT	1306
Am.maltase.nuc	G-ATAACACT-ACGATATATAAATATGATGTAC-----GTGATGGTTGTCGTACACC-AT	1246
Ls.ScrA.nuc	ATATGGAGCAGTTAATTGAAGCGGCGAAGATTTCGTAAGATTAAATTTGTTATGGACTTAG	1370
	* ** * *	
Af.AG.nuc	CGAGAGATCCCGCGAG-----AACGCCATTCCAATGGGACGACTCACTTTCTGCTGGATT	1309
Am.AG.nuc	CGAGAGATCCCGCGAG-----AACGCCATTCCAATGGGACGACTCAGTTTCTGCTGGATT	1309
Dm.CG.nuc	CTAGAGATCCTGAGCG-----AATCCCATGCAATGGAGTAGTGATGTGAATGCAGGATT	1342
Cs.maltase.nuc	CACGTGATCCCGCAAG-----AACACCCATGATTTGGACTTACAAAAAACCGCAGGATT	1361
Am.maltase.nuc	TCCAA-----TGGGAT-----AATCCATTAATGCAGGCTTTAGTAA-AATCGCTGAAAA	1295
Ls.ScrA.nuc	TTGTTAATCATACAAGTGACCAACATCCATGGTTTTTAGAAGCACGAAAATCAAAGATA	1430
	*** * *	
Af.AG.nuc	TTCC----TCAAGCTCTAATACGTGGCTTCGTGTCAATGAAAATTACAAGAC---TGTC	1362
Am.AG.nuc	TTCC----TCAAGCTCTAATACGTGGCTTCGTGTCAACGAAAATTACAAGAC---TGTC	1362
Dm.CG.nuc	CTCC----TCCGCCGATCGCACTTGGTTGCCTGTCAATCCGAATTATAAGGA---ACTTA	1395
Cs.maltase.nuc	TTCA----AGTTCAAATTACACATGGCTTCCAACCTGGACCAGATTATCGCAA---AAATA	1414
Am.maltase.nuc	TTTG----CTTGAAAAGAAT---TGGCTACCTGTTTCATACATCTACAAAAGTGGACTAA	1348
Ls.ScrA.nuc	ATCCGTATCGTGATTTTTATATTGGCGAGACCTGCAACCGATGGTAGTGTTCCGAATG	1490
	* ***	
Af.AG.nuc	ATCTAGCTGCTGAAA--AGAAGGACAA---GAACTCGTCTTCAATATGTACAAGAAATT	1417
Am.AG.nuc	ATCTAGCTGCTGAAA--AGAAGGACAA---GAACTCGTCTTCAATATGTTCAAGAAATT	1417
Dm.CG.nuc	ATCTTCGGAATCAGC--AGCAGGCGAG---GCGAAGTCATTACAAGATCTATCAGTCCCT	1450
Cs.maltase.nuc	ATGTTGAAGTGCAGC--GTAGTCAGAG---AGGCAGTCAGTTGAATATCTTTAAAAAGTT	1469
Am.maltase.nuc	ATTTGGAGCAAGAGA--AAAAAGATAG---TATTCTCATTATCATCTTTATACCAACT	1403
Ls.ScrA.nuc	ATTTACAAAGTAATTTTAAAGGATCAGCTTGGGCGTTTGATGCGGTTACTGGGCAATATT	1550
	** * * *	



Figure 13. (continued)

Af.AG.nuc	CGCGTTGCT-----GAAAAAATCGCCATATTTTAAAGAGGCCAATTTAAGTACGAGGA	1470
Am.AG.nuc	TGCGTCGCT-----GAAAAAATCGCCATACTTTAAAGAGGCCAATTTAAATACGAGGA	1470
Dm.CG.nuc	TCTGAAGCT-----CAGACAACTGCCAGTTCTGAAGAACGGATCCTTTGTTCCAGAAG	1503
Cs.maltase.nuc	GACTCAACT-----TCGTAAGCAAGACATTTTGATGTATGGCACTTATGATAGTTACT	1522
Am.maltase.nuc	GACCGCTTT-----AAGAAAGAGAGATGTGTTGAAAAAGGAACTTTACTATAGAAA	1456
Ls.ScrA.nuc	ATTTACATTTTTATGCGAAAGAACAACCGGATTTAAATTGGCAAAATCCTAAAGTTAGAG	1610
	* * *	
Af.AG.nuc	TGCTGAACGACAATGTTTTTCGCNTTCTCTAGG-GAAACCGAAGACAATGGATCTCTTTAC	1529
Am.AG.nuc	TGCTGAACGACAATGTTTTTCGCATTCTCTAGG-GAAACCGAAGATAATGGATCTCTTTAC	1529
Dm.CG.nuc	TGGTTAATCGCAGGGTCTTCGCTTTCAAGCGA-GAACTGAAGAACGAGCACACTCTGCTG	1562
Cs.maltase.nuc	TGGCAAAATGATGACGTTTTGGTGATTAAACGT-GAAATTGAGAATAATCGAACTTTGATT	1581
Am.maltase.nuc	TTTTAAACAAAATGTTCTGGCTGTCTGCGACAAAGCGAAGAGAGCGGTATCTCTTT	1516
Ls.ScrA.nuc	AAGCTGTCTACCAGATGATGACTTGGTGGCTT-CAAAAAGGGATTGGTGGTTTTAGGATG	1669
	* * *	
Af.AG.nuc	GTAATAATGAACTTCTCGAA---CGAGGAACAAATCGTGGATTGAAAGCGTTTG----	1581
Am.AG.nuc	GCAATATTGAACTTCTCGAA---CGAGGAACAAATCGTGGATTGAAAGCGTTCA----	1581
Dm.CG.nuc	ACCATTGTGAACGTGAGCAACCGCACTGAACCTGGTTGACATCGCGGACTTTA-----	1614
Cs.maltase.nuc	GCTGTCTTAACCTGGGT---TTCCTGAACAAGTCGTCAATTTGAATTTAAATGACCGA	1638
Am.maltase.nuc	----TGATCAACTTCTCTAAAAATAATACTATCGTGGATATATCAAAGTTGGT-----	1565
Ls.ScrA.nuc	GACGTTATTGATTGATAGG--GAAGGAACCTGACCGCAAAATTAAGGAAAACGGACCGC	1727
	* * * *	
Af.AG.nuc	----ATC-----ACGTGCCGAAGA-GATTGAATATGTTTTACAACAATTTTAACTC----	1627
Am.AG.nuc	----ATA-----ACGTGCCGAAAA-AATTGAATATGTTTTACAACAATTTTAACTC----	1627
Dm.CG.nuc	----TAGA-----ACAGCCA-ATC-GATTGAGTGTCTTGTGGCGGAGTGGAATCGCAA	1664
Cs.maltase.nuc	GATTGGA-----AAGTCCAGAGA-GAATGGAAGTTGCAACAGCTTCAGTTAACGCAGGA	1692
Am.maltase.nuc	----GA-----ACAAAAGAAATA-ATGCTAAATTTACACAAGCAGCGTAAACTCCAA-	1613
Ls.ScrA.nuc	AATTACATGCGTATCTTCAAGAGATGAACGCAAGGGTACTTTACAGTATGATGTAGTAA	1787
	* * *	
Af.AG.nuc	----TGATATAAAATCCATCTCCAACAACGAGAAAAATAAA-AGTTCTGCTTTAAGATT	1682
Am.AG.nuc	----TGATATAAAGTCCATCTCCAACAATGAACAAGTAAA-AGTTTCTGCTTTAGGATT	1682
Dm.CG.nuc	CACCGGGTGGGGGATCGACTTAAGGCCGAGACAATTGAATTGGCGGCCAACGAGGGATTA	1724
Cs.maltase.nuc	ATGTTTCGAGAGACAACCCGTTGTGACAAGTGAAGTCTACGTATCAGCTGGCGTTGGAGTT	1752
Am.maltase.nuc	--TTTGACAGTAAATCAAATGTAATCCAGTGGCTATCAATATTCTGGAGATACATCT	1671
Ls.ScrA.nuc	CGGTTGGAGAGACAT-GGGGGGCAACACCCGAAATTGGCCAGATG--TACAGTAATCCTA	1844
Af.AG.nuc	NTAATCTTAATCTCTCA--AGATGCTAAATTTGAAAACATTTAATTTCTTCTTGAACATG	1740
Am.AG.nuc	TTCATCTTAATTTCTCA--AGATGCTAAATTTGAAAACATTTAATTTCTTCTTGAATATG	1740
Dm.CG.nuc	GTTATTTCAGCTGAATAAGCGAAAGTAA-----	1751
Cs.maltase.nuc	GTT-CTCGATTATCAAGTAGGGCGTCAAATCCCCGAACCAAGAGGTGACGATCCAGGACT	1811
Am.maltase.nuc	ATAATTGTAGATTCATC---CACTTCAGGCGCTACTATAGTCAATTATTCAATCATGAT-	1727
Ls.ScrA.nuc	ATCGCCACGAACTATCGATGATCTTTCAATTTGAACAATTAATTTAGATAAACAATCAG	1904
	*	
Af.AG.nuc	TCTATNCTTTGAAGCGGCGA-----	1760
Am.AG.nuc	TCTATTCTTTGAAGCGGCGA-----	1760
Dm.CG.nuc	-----	
Cs.maltase.nuc	ATACGAATAAGAAATATTCC-----	1831
Am.maltase.nuc	TTTCTTATCCGAGTGTTTATATCTTTTTTCCAACGG-----	1764
Ls.ScrA.nuc	GGATGACTCGCTGGGATTTAAACCCTTATTCCAGCAGAGT	1946

Figure 13. The multiple alignment of nucleotide sequences of AG in *A. florea* with other organisms. Common residues are indicated by asterisks below the sequences.

Figure 14. (continued)

	570	580	590	600	610	620
Af. AG.nuc	V---PKRLNM	FYNNFNNDIK	SIS--NNEKI	KVPALRFXIL	ISQDAKFENI	F-----
Am. AG.nuc	V---PKKLMN	FYNNFNNDIK	SIS--NNEQV	KVSALGFFIL	ISQDAKGFNG	-----
Dm. CG.nuc	Q---PNRLSV	LVAGVDSQHR	VGDRLKAETI	ELAPNEGLVI	QLNKRK---	-----
Cs. maltase	DWKVPERMEV	ATASVNAQMF	ERQPVVTSEV	YVSAGVGVLV	DYQVGRQIPE	PRGDDPLGLYE
Am. maltase	K---RNNAKI	YTSSVNSNLT	VNGTVNPVAI	NIPGDTSIIV	DSSTSGATIV	NYSIMIFLSA VFISFFQR
Ls. ScrA.nu	T-----MT	IVTNTAGYAQ	VDPLLTVDKA	AMQGEETIQL	HAKKD----	-----
Clustal Co						

Figure 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.

A preliminary phylogenetic tree from deduced amino acid of AG among these organisms was reconstructed using UPGMA and neighbor-joining (NJ) methods as implemented in the program PAUP* version 4.0b (Phylogenetic Analysis Using Parsimony methods*). To investigate support for nodes estimated in the trees, bootstrap analysis was undertaken in PAUP (heuristic search). The bootstrap analysis with 50% deletion was used as indications of branch support for individual clades. The bootstrap values was calculated by using 1,000 replicates. The *dexB* in *Lactobacillus sakei* sequence was selected as an outgroup in NJ and bootstrap methods. A phylogenetic tree from UPGMA method (Fig. 15) was indicated distance between AG of *A. florea* among that in other organisms. Furthermore, a phylogenetic tree from NJ method (Fig. 16) was represented three major clades. Clade I was comprised of the AG of *A. florea* and *A. mellifera*. Clade II was comprised of the AG in *Drosophila melanogaster* and maltase in *Culicoides sonorensis*. Clade III was comprised of maltose 1 in *A. mellifera*.

UPGMA

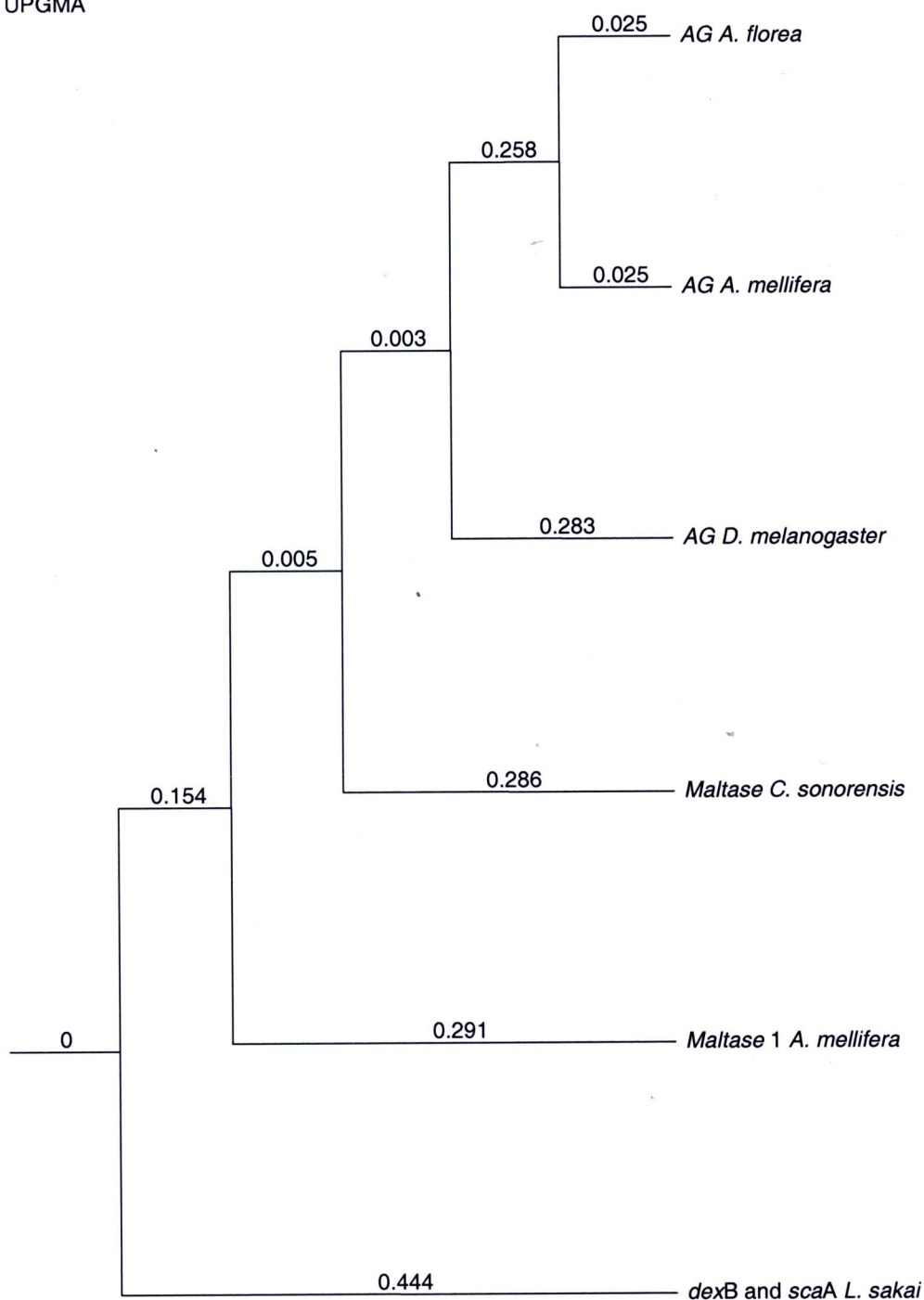


Figure 15. A phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of AG in *A. florea* among other organisms by UPGMA method. A number on each branch indicate differential.

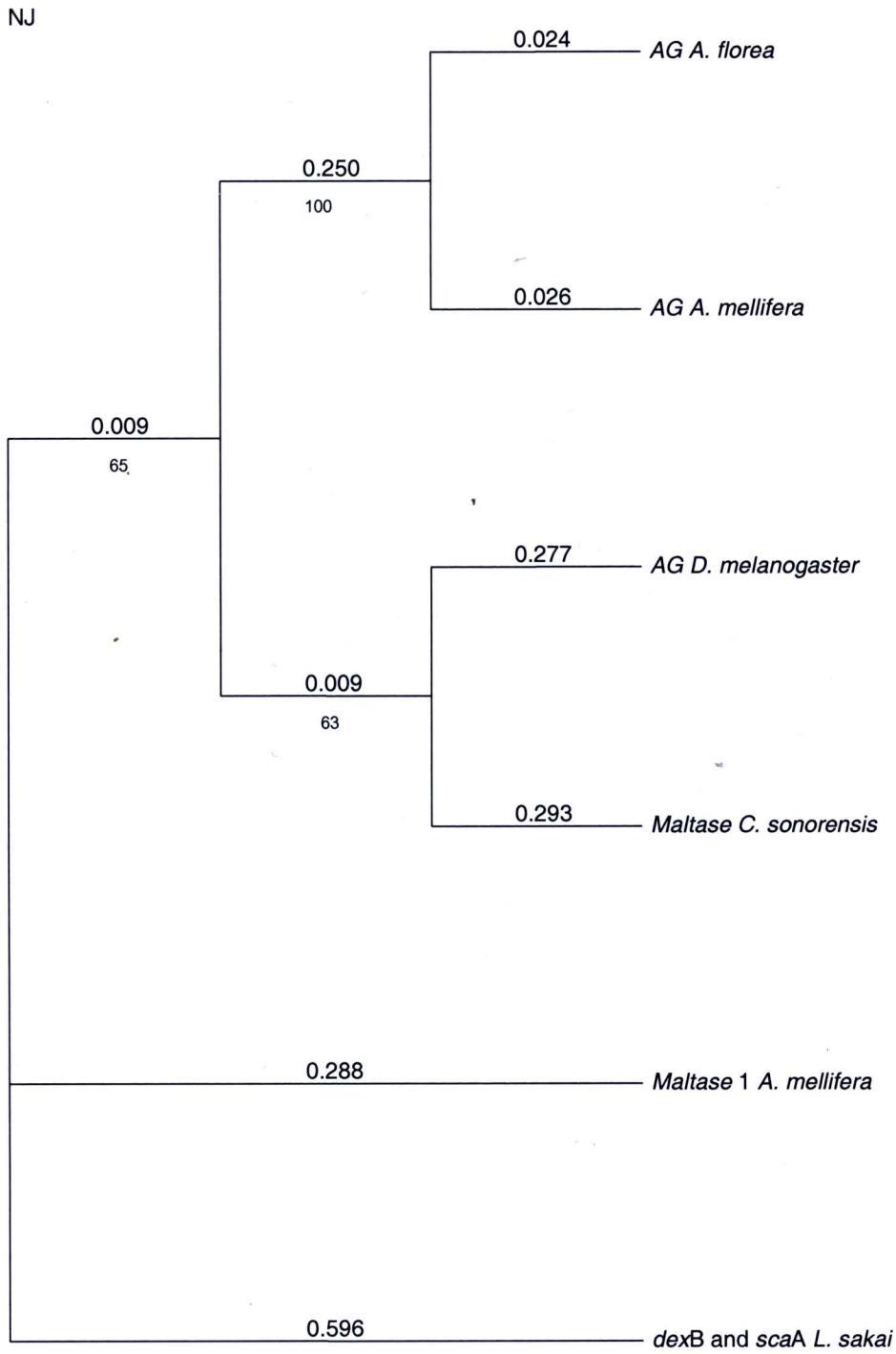


Figure 16. A phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of AG in *A. florea* among that in other organisms by NJ method. The upper numbers on each branch indicate the differential between genes. The lower numbers (in bold type) were the full heuristic bootstrap percentages of 1,000 replicates.

3. Major protein pattern of crude extract

Proteins of head (12 heads) and honey crop (20 honey crops) of forager bee was extracted by buffer insect saline. Crude protein was separated by SDS - PAGE. Different bands of major protein (50 kDa from head and 15 kDa from honey crop) were observed as in Figure 17.

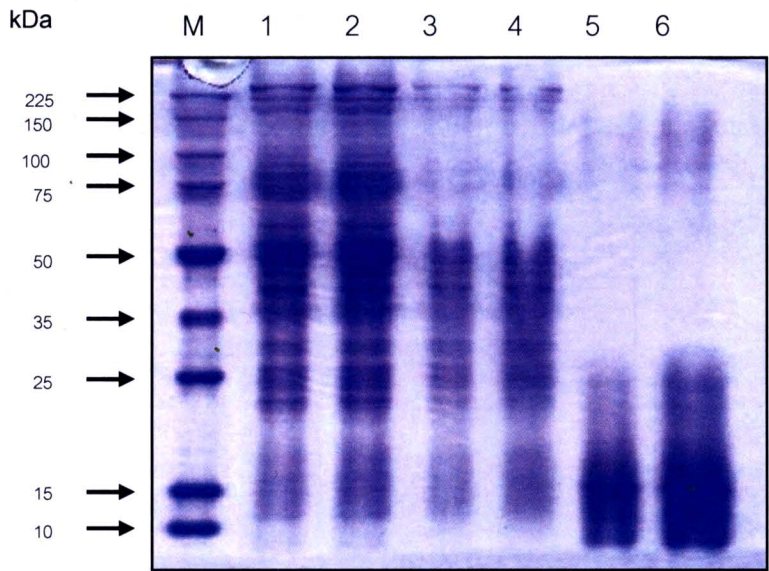


Figure 17. Pattern of major proteins in crude of head and honey crop.

- Lane M: broad range protein MW markers
- Lanes 1 - 2: crude protein of head (1 mg protein)
- Lanes 3 - 4: crude protein of head (0.5 mg protein)
- Lanes 5 - 6: crude protein of honey crop (1 mg protein)

4. Ammonium sulfate precipitation

Various concentrations of ammonium sulfate (AS) were added into crude protein. Due to Fig. 18, the highest specific activity (1 u/ mg) was obtained from crude without AS precipitation. High specific activity (0.7 u/ mg) was also from precipitation of 80 - 95% AS. The lowest specific activity (0.2 u/ mg) was appeared from precipitation in 40 - 50% AS. Due to SDS – PAGE, different pattern of protein was observed in each lane. Common band of 100 kDa was observed in all lanes (Fig. 19).

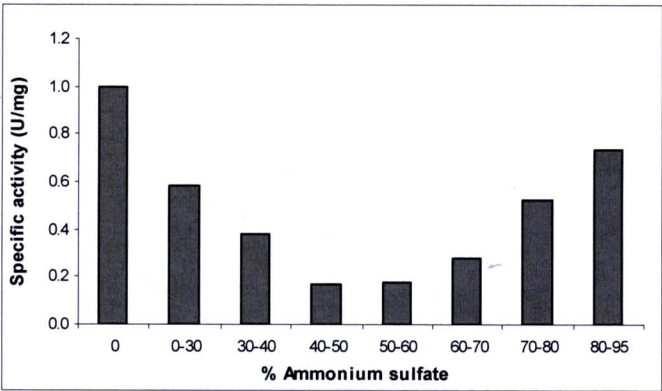


Figure 18. Specific activity of crude precipitation by various concentrations of ammonium sulfate.

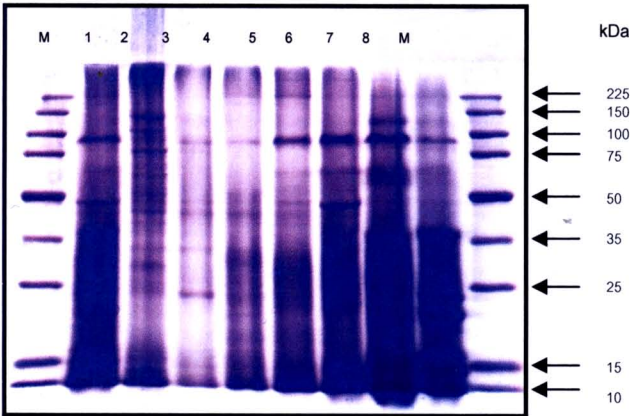


Figure 19. Protein profile of precipitate from various concentrations of ammonium sulfate (AS). Protein (20 µg) of all precipitates were electrophoresed by SDS polyacrylamide gel and CBB stained.

- Lane 1: precipitate by 0% AS
- Lane 2: precipitate by 0 - 30% AS
- Lane 3: precipitate by 30 – 40% AS
- Lane 4: precipitate by 40 - 50% AS
- Lane 5: precipitate by 50 - 60% AS
- Lane 6: precipitate by 60 - 70% AS
- Lane 7: precipitate by 70 - 80% AS
- Lane 8: precipitate by 80 - 90% AS
- Lane M: broad range protein MW markers

5. AG purification

5.1 Crude protein with ammonium sulfate precipitation

5.1.1 Anion exchange (DEAE - cellulose)

Crude protein was injected to DEAE - cellulose equilibrated by 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3). The column was developed by a linear gradient of 0 – 1.0 M NaCl. SDS – PAGE was represent in Figure 3.15 on lane 1 - 4 (B). The AG activity was eluted within unbound (fraction# 4 - 7) and bound peaks (fraction# 21-24) as in fig. 20. Positive fractions were pooled and desalted by dialysis.

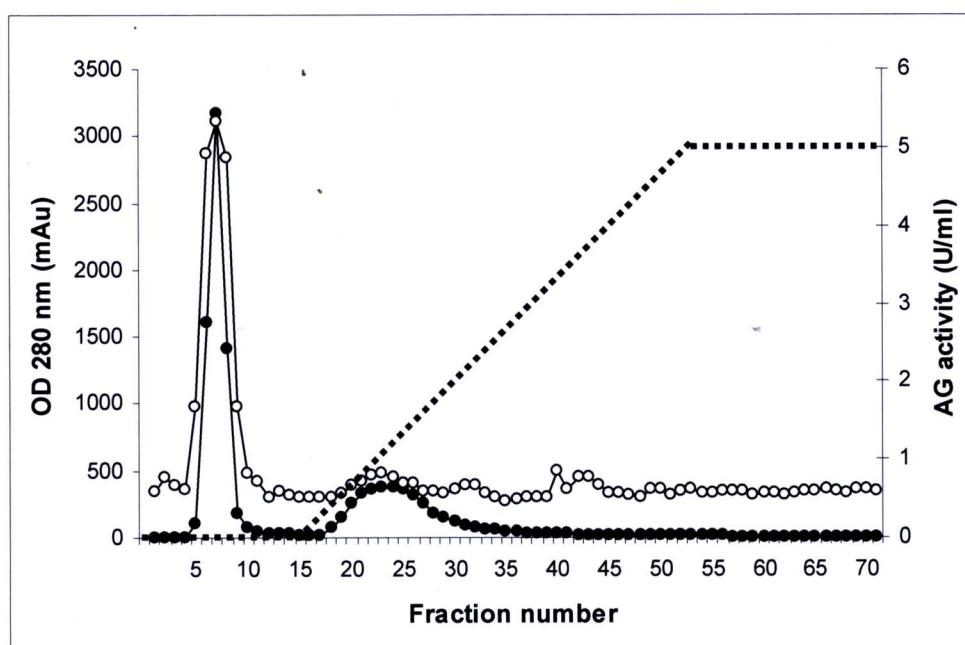


Figure 20. AG on a DEAE-cellulose column. Crude protein, 300 mg; column, 1.6 x 13 cm; equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— OD at 280 nm; —○— , alpha glucosidase activity; , molarity of NaCl.

5.1.2 Gel filtration (Superdex 200)

The dialyzed sample of bound peak from DEAE cellulose was applied to a gel filtration column on Superdex 200 equilibrated by 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 mM NaCl (Fig. 21). Low AG activity (less than 1 u/ ml) of bound peak sample (fraction# 14) was calculated. SDS – PAGE was represent in Figure 23 on lane 1 (A).

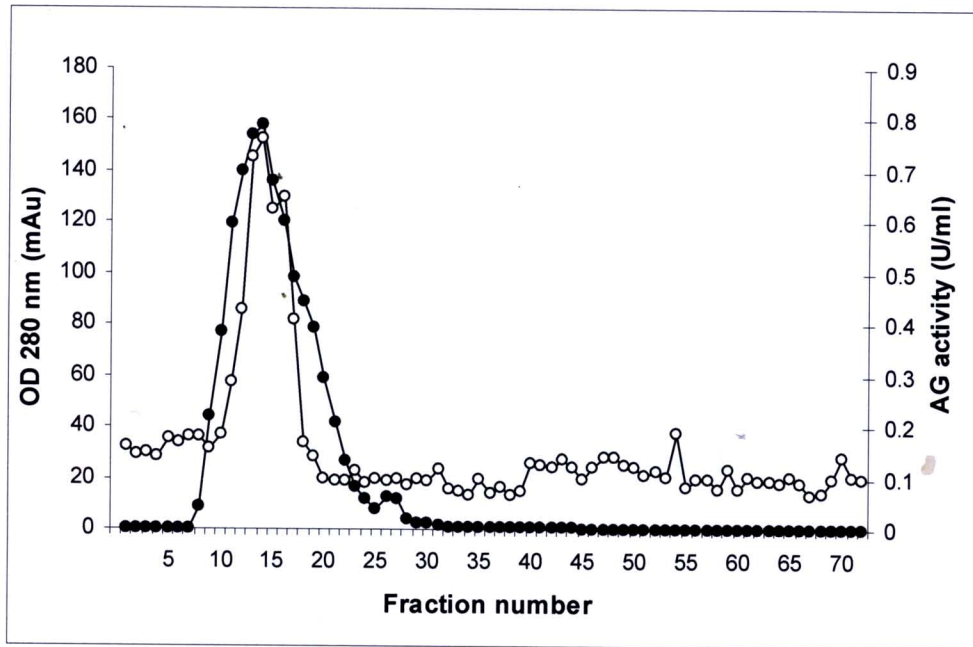


Figure 21. AG on a gel filtration (Superdex 200) column. Bound peak solution of DEAE, 10 mg protein; column, 1.6 x 51 cm; equilibrium and elution, 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 mM NaCl (pH 6.3); flow rate, 30 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— , OD at 280 nm; —○— , AG activity.

The dialyzed sample of unbound peak from DEAE - cellulose was applied to a gel filtration column on Superdex 200 with the same condition. High AG activity (4 u/ ml) was obtained from unbound peak of protein as in Fig. 22. SDS – PAGE was represent in Figure 23 on lane 5 (B).

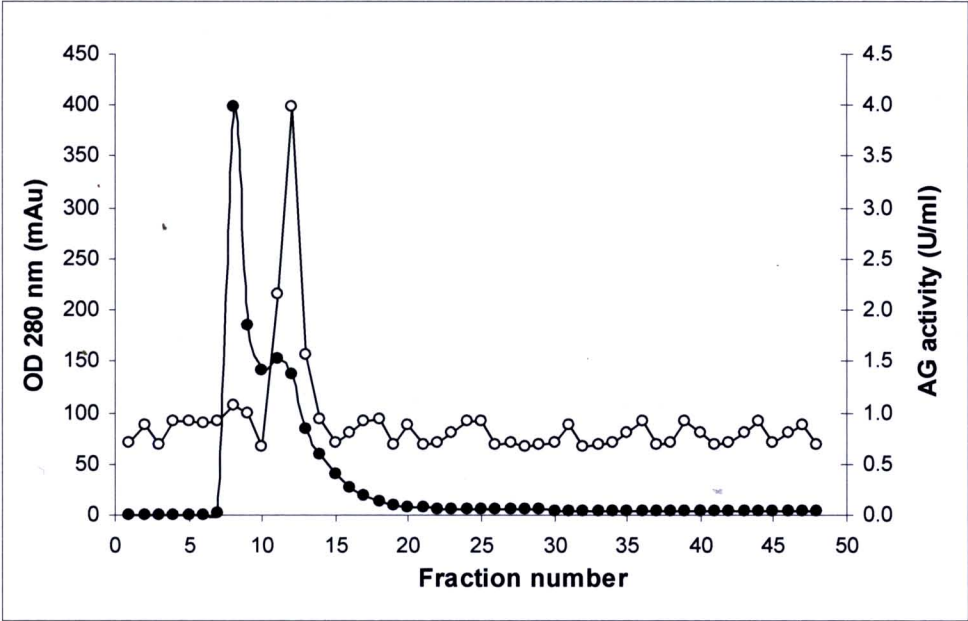


Figure 22. AG on a gel filtration (Superdex 200) column. Unbound peak sample of DEAE - cellulose, 18 mg protein; column, 1.6 x 38 cm; equilibrium and elution, 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 mM NaCl (pH 6.3); flow rate, 30 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— , OD at 280 nm; —○— , AG activity.

Fractions (from Superdex 200) containing highest AG activity were concentrated and desalted by centrifugal filter (MWCO 10,000 Da). The retentive solution was separated by SDS – PAGE as in Fig. 3.15. Bands of Af1 (55 kDa), Af2 (52 kDa), and Af3 (73 kDa) were excised from the gel for MALDI – TOF MS.

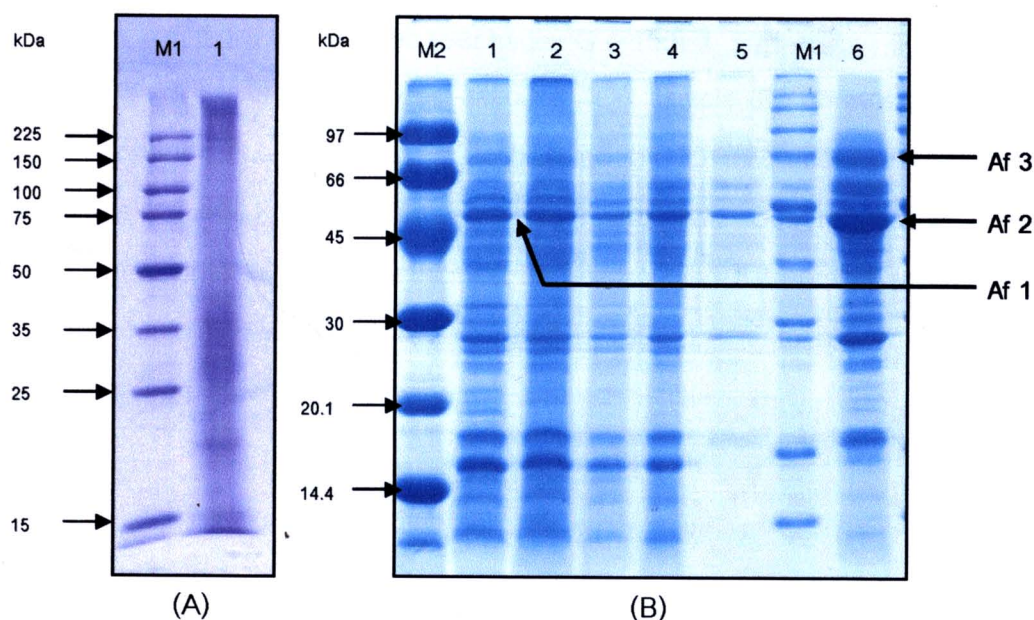


Figure 23. CBB staining of SDS - PAGE.

Lane 1 (A): filtered sample (40 μ g) from fraction# 14 of Superdex 200 (from bound DEAE cellulose)

Lane 1 (B): unbound sample (3 mg) from DEAE cellulose (fraction# 6)

Lane 2 (B): unbound sample (3 mg) from DEAE cellulose (fraction# 7)

Lane 3 (B): unbound sample (3 mg) from DEAE cellulose (fraction# 8)

Lane 4 (B): pooled unbound sample (3 mg) from DEAE cellulose before Superdex - 200

Lane 5 (B): highest activity fraction (0.3 mg) from Superdex - 200 (fraction# 12) from unbound DEAE cellulose)

Lane 6 (B): concentrated sample (3.6 mg) from lane 5

Lane M1: broad range protein MW marker

Lane M2: low molecular weight marker

5.1.3 Gel filtration (Sephadex G – 150)

The dialyzed unbound peak sample (Fig.20) was chromatographed on a Sephadex G - 150 column equilibrated by 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 mM NaCl. AG was eluted in bound peak. Due to figure 16, activity was found in fractions# 40 - 46. The highest fraction contains 3.7 u/ ml of activity. Protein in fractions containing activity was separated by SDS PAGE to determine the purity of purification (Fig. 25). Only one band (50 kDa) was visible.

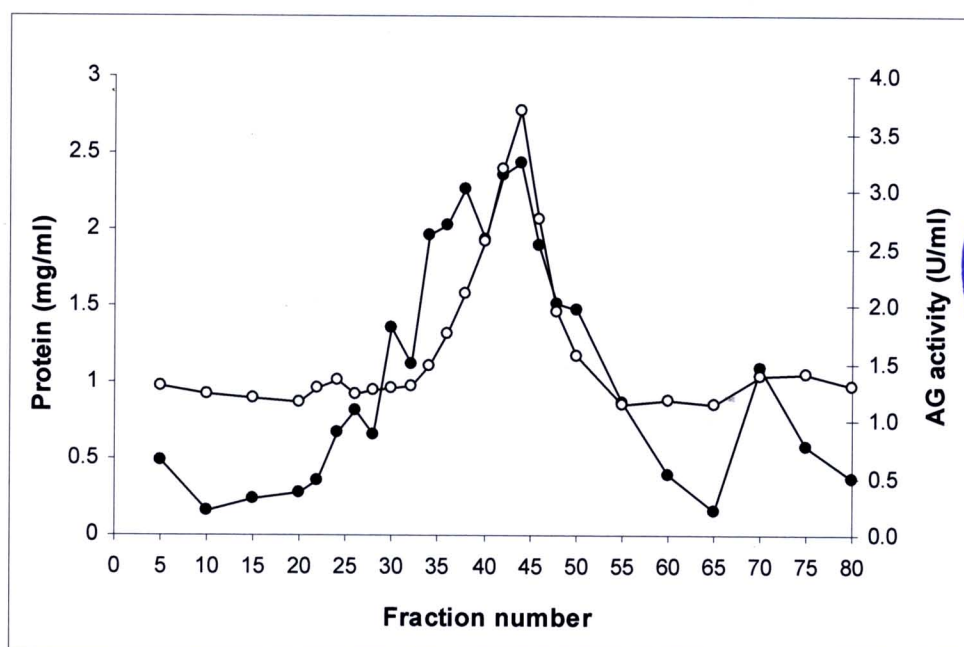


Figure 24. AG on a gel filtration (Sephadex G - 150) column. Unbound peak sample of DEAE, 10 mg protein; column, 1.5 x 87 cm; equilibrium and elution, 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 M NaCl (pH 6.3); flow rate, 15 ml/ h; fraction size, 3 ml; —●— , protein concentration (Bradford's assay); —○— , AG activity.



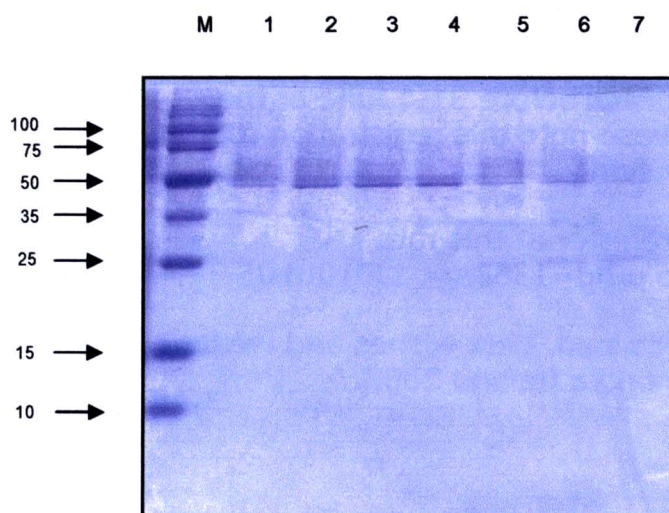


Figure 25. SDS - PAGE of positive fractions from Sephadex G - 150. Lanes 1-7 contained fraction# 40 – 46 (100 μ g), respectively.

5.1.4 Cation exchange (CM cellulose)

Due to the chromatography on DEAE, the protein was not bound on the column. Instead, the dialyzed unbound sample (Fig. 21) was chromatographed on a CM cellulose column equilibrated by 20 mM sodium acetate buffer and eluted by 0 - 1 M NaCl. Almost same activity was found in all fractions although protein was eluted from the column (Fig. 26). In each fraction, the amount of protein was low (less than 100 mAu by O.D. 280).

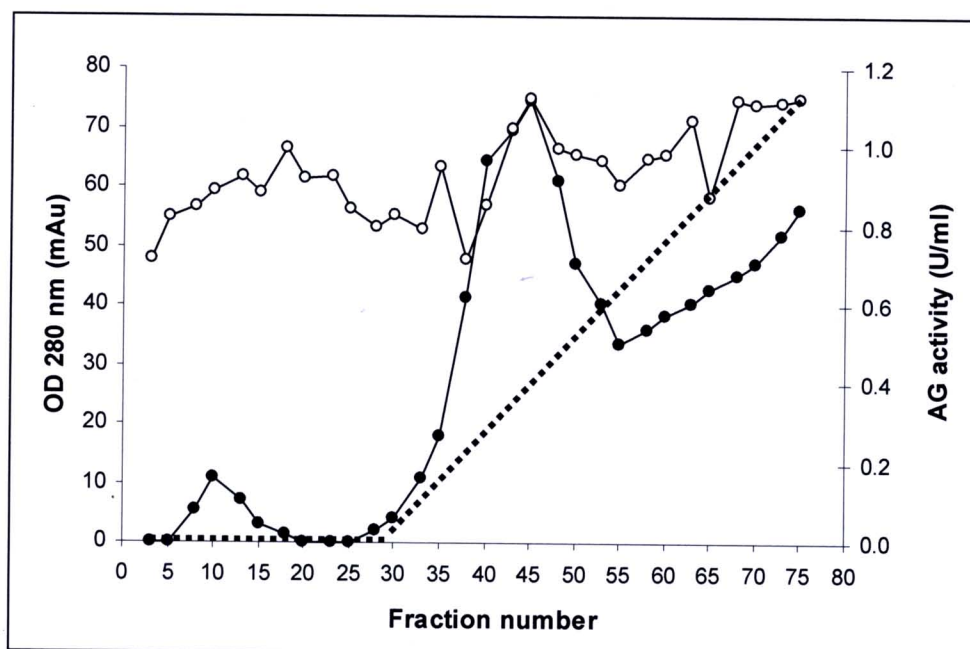


Figure 26. AG on CM cellulose. Unbound peak sample of DEAE, 100 mg protein; column, 1.6 x 13 cm; equilibrium, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— OD at 280 nm; —○— , AG activity; , molarity of NaCl

Furthermore, crude protein was injected onto CM cellulose equilibrated by 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7). The column was developed by a linear gradient of 0 – 1 M NaCl. The AG activity was eluted at second unbound peak (Fig. 27). The obtained activity was low (less than 1 U).

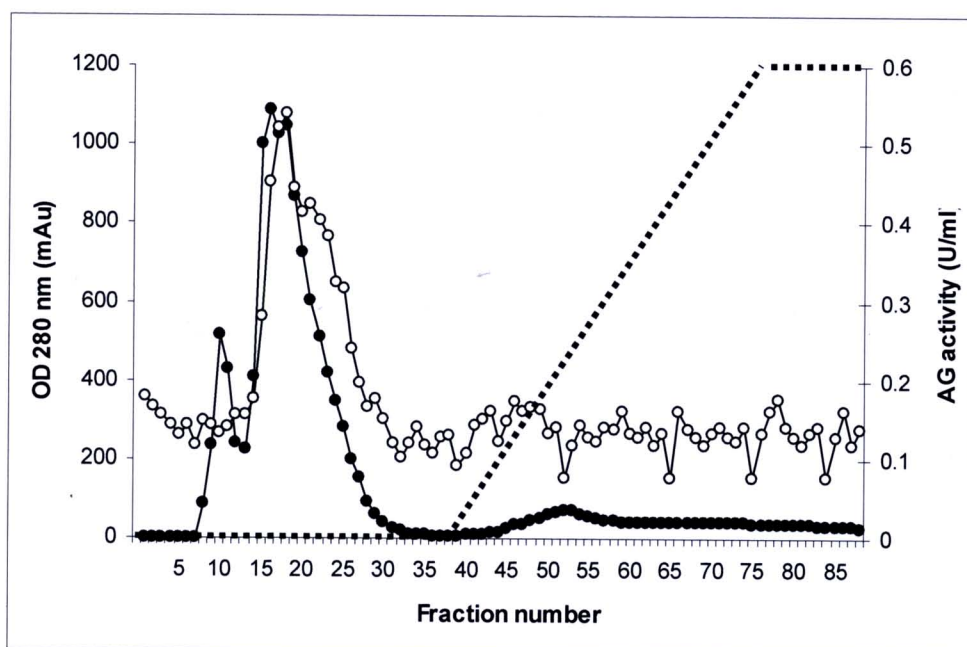


Figure 27. AG on CM cellulose. Crude protein, 300 mg; column, 1.6 x 13 cm equilibrium, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— OD at 280 nm; —○— , AG activity; , molarity of NaCl.

5.2 Crude protein without ammonium sulfate precipitation

5.2.1 Anion exchange (DEAE cellulose)

In order to avoid the loss of AG activity before chromatography (data from Fig. 18), crude protein without being precipitated with ammonium sulfate was applied directly on a DEAE column under the same condition. The high protein was obtained in unbound (fractions# 3-8) and bound (fractions# 28-32) peaks. High AG activity was assayed from the unbound peak. SDS – PAGE was represent in Figure 29 on lane 3 - 4.

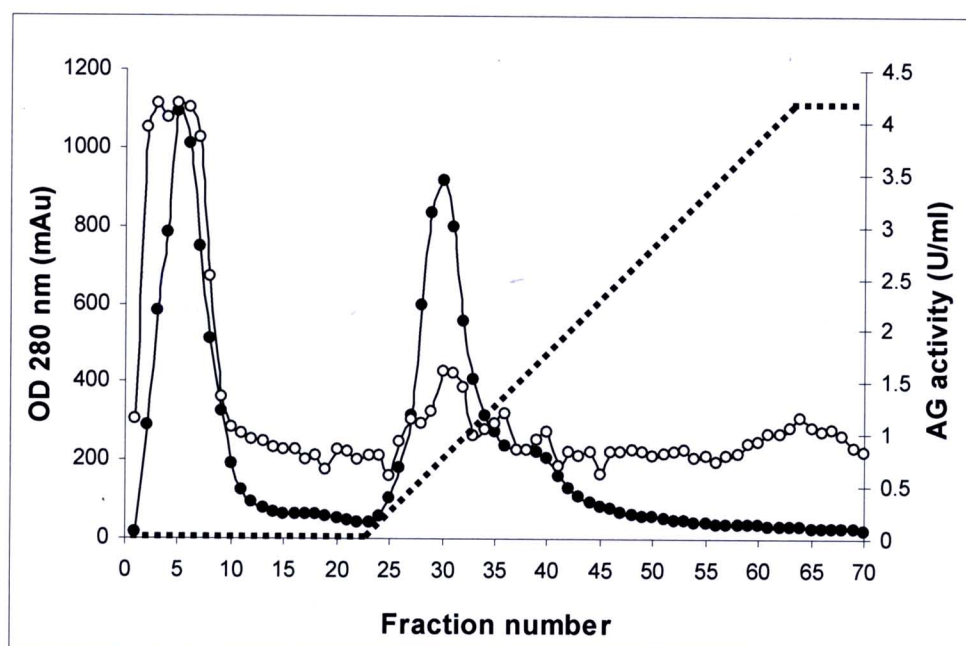


Figure 28. Unprecipitated AG on DEAE cellulose. Crude protein without precipitation with ammonium persulfate, 250 mg; column, 1.6 x 13 cm; equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●—, OD at 280 nm; —○—, AG activity;; molarity of NaCl.

From all procedures of AG purification, it can be summarized in Table 6. Specific activity of AS precipitate was lower than crude. Specific activity after DEAE cellulose is the lowest but it is not greatly different from crude. AG activity in both bound and unbound peaks from DEAE - cellulose was assayed. The bound peak was separated on Superdex 200 while the unbound peak was separated on Superdex 200, Sephadex G - 150, and CM - cellulose. After second times of purification by gel filtration, specific activity was higher.

Table 6. Summary of purification procedures of AG.

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (u)	Specific activity (u/ mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude	4,065	1,228.5	0.302	100	1
Ammonium sulfate (95% saturation)	1,075	195.2	0.182	15.89	0.603
DEAE - cellulose	780	133.52	0.171	10.87	0.566
Superdex 200					
- Bound DEAE peak	44.1	22.8	0.517	1.856	1.712
- Unbound DEAE	52	124	2.3846	10.095	7.89
and ultrafiltration	10.46	42.29	4.043	3.443	13.3874
Sephadex G - 150					
- Unbound DEAE	60	81.3	1.355	6.619	4.487
CM - cellulose					
- Unbound DEAE	25	38.95	1.558	3.171	5.159
- Crude protein	40.92	26.07	0.637	2.122	2.109
DEAE - cellulose (no AS)	20	90	4.5	7.327	14.901

Protein in fractions containing highest AG activity of DEAE – cellulose and Sephadex G – 150 was separated by SDS – PAGE and CBB stain (Fig. 29 A). A major band of 100 kDa and minor bands of 35 and 50 kDa were observed in lane 1 but a major band (35 kDa) and a minor band (50 kDa) were observed in lane 3. This may indicate that AS precipitation affects high MW protein.

Protein was denatured and renatured. Many bands of protein were observed on SDS polyacrylamide gel (Fig. 29A) but only one positive band was visible in lanes 2 – 3 of activity gel (Fig. 29 B). No AG activity at all in lanes 1 and 4 (Fig. 29 B) although lots of protein were detected in Fig. 29 A.

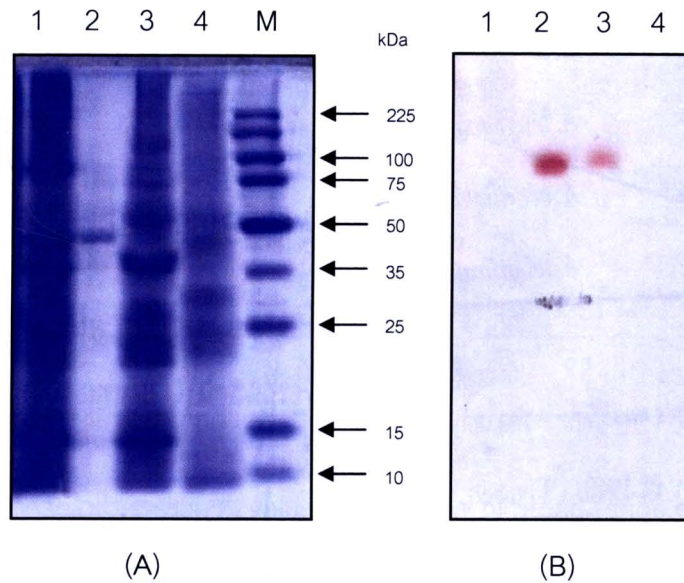


Figure 29. CBB staining (A) and activity staining (B) of fractions containing highest activity from DEAE – cellulose and Sephadex G – 150.

Lane 1: unbound fraction with AS (3 mg) on DEAE (Fig. 12)

Lane 2: unbound fraction (1 mg) on Sephadex G - 150 (Fig. 16)

Lane 3: unbound fraction without AS (1 mg) on DEAE (Fig. 20)

Lane 4: bound fraction without AS (1 mg) on DEAE (Fig. 20)

Lane M: broad range protein MW marker

Three bands on SDS polyacrylamide gel (Fig. 23) were excised. Arrows indicate locations of 3 bands, Af1, Af2, and Af3. Due to the Rf value and log MW of protein marker, MW of Af1, Af2, and Af3 were calculated to be 55, 52, and 73 kDa, respectively (Fig. 31). The bands of Af1 and Af2 were selected because they were always found from any chromatography. While the Af3 band was excised because its MW (about 93 kDa) is closed to MW of AG in *A. mellifera* (Fig 30). Molecular weight of purified AGI, AGII, and AGIII were 98, 76, 68 kDa, respectively (Takewaki *et al.*, 1980 and Nishimoto *et. al.*, 2001). Those bands were later digested by trypsin and analysed for peptide by MALDI - TOF MS at Bioservice unit, Thailand.

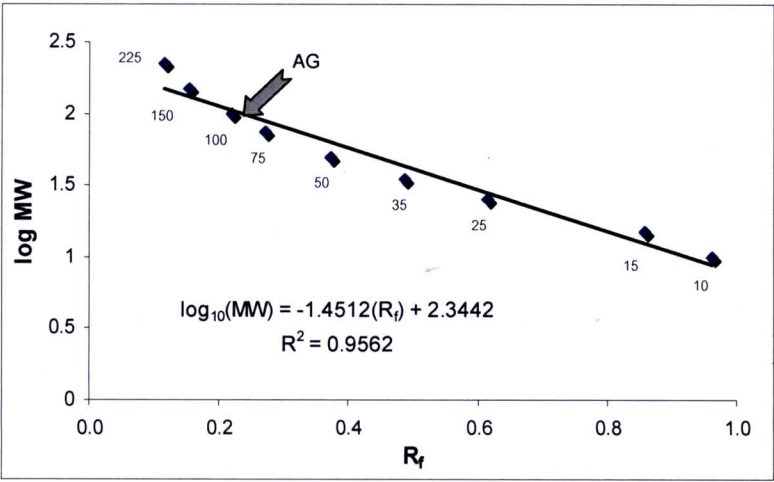


Figure 30. Relationship between R_f value and log MW of broad range protein MW marker. MW of AG from Fig. 21 was estimated.

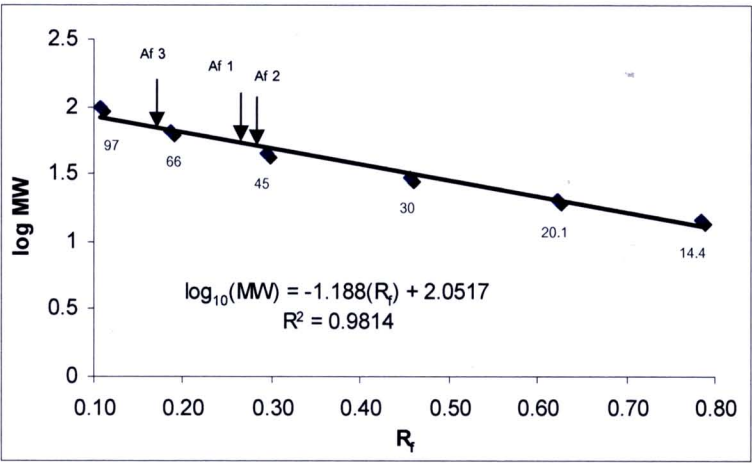


Figure 31. Relationship between R_f value and log MW of low MW marker. MW of Af1, Af2, and Af3 from Fig. 15 was calculated. The LMW standard marker contains phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and alpha - lactalbumin (14.4 kDa).

6. MALDI - TOF peptide mass mapping

Whole body of honeybee was partial purified by 1) various chromatographies; anion exchange (DEAE cellulose), gel permeation (Superdex 200) and 2) by ultrafiltration with centrifugal filter MWCO 10,000 Da. Then, the obtained

protein was separated by SDS - PAGE. The protein complement of partial purified AG was sequenced for peptide by matrix assisted laser desorption ionization/time of flight (MALDI – TOF) mass spectrometer.

The peptide mass was searched in SwissProt database in Mascot program (www.matrixscience.com). Peptide matching for sample mass spectra was based on an accuracy of +1 Da. The MALDI - TOF mass spectrum of Af3 showed six peptide masses, 1163.543 m/z , 1313.55 m/z , 1719.779 m/z , 1977.753 m/z , and 2111.86 m/z , $[M+H]^+$ which were matched to those of AG in *A. mellifera* (Q17958). The score is 70 which is accepted to be significant ($p < 0.05$) since it is greater than 67. According to Fig. 32, the matched peptide is 12% coverage with AG in *A. mellifera* (based on the M_r of 65.5 kDa).

```

1  MKAVIVFCLM  ALSIVDAAWK  PLPENLKEDL  IVYQVYPRSE  KDSNGDGIGD  50
51 IEGIKEKLDH  FLEMGVDMFW  LSPiYPSPMV  DFGYDISNYT  DVHPIFGTIS  100
101 DLNVLVSAAH  EKGLKIILDF  VPNHTSDQHE  WFQLSLKNIE  PYNYYIWHWP  150
151 GKIVNGKRVP  PTNWVGVEGG  SAWSWREERQ  AYYLHQFAPE  QPDLNYYNPV  200
201 VLDDMQNVLR  FWLRRGFDGF  RVDALPYICE  DMRFLDEPLS  GETNDPNKTE  250
251 YTLKIYTHDI  PETYNVVRKE  RDVLDEFPQP  KHMLIEAYTN  LSMTMKYYDY  300
301 GADFPENFAE  IKNVSRDNS  SDFKKLVDNW  MTYMPPSGIP  NWVPGNHDQL  350
351 RLVSRLFGEK  ARMITTMSLL  LPGVAVNYYG  DEIGMSDTYI  SWEDTQDPQG  400
401 CGAGKENYQT  MSRDPARTPF  QWDDSVSAGF  SSSSNTWLRV  NENYKTVNLA  450
451 AEKKDKNSFE  NMEKKFASLK  KSPYFKEANL  NTRMLNDNVE  AFSRETEDNG  500
501 SLYAILNFSN  EEQIVDLKAF  NNVPKKLNMF  YNNFNSDIKS  ISNNEQVKVS  550
551 ALGFFILISQ  DAKFGNF

```

Figure 32. The amino acid sequence of AG in *A. mellifera* (Q17958). Matched peptides are shown in bold and underline letter.

7. Compare amino acid sequence between deduced amino acid sequence from cDNA and amino acid from MALDI – TOF MS

Comparing amino acid sequence between deduced amino acid sequence from cDNA and amino acid from MALDI – TOF MS. Most of residues is same amino acid except only one residue at 32. It is Leucine (L) in deduced amino acid sequence from cDNA and Valine (V) amino acid from MALDI – TOF MS. However the 2 amino acids have close molecular weight. Molecular weight of Valine is 117 Da while Leucine is 131 Da.

1	MKAVIVFCLM	ALSIVDAAWK	PLPENLKEDL	ILYQVYPRSF	KDSNGDGIGD	50
			EDL	IVYQVYPRSF	K	
51	IEGIKEKLDH	FLEMGVDMFW	LSPIYPSPMV	DFGYDISNYT	DVHPIFGTIS	100
101	DLNLSVSAAH	EKGLKIILDF	VPNHTSDQHE	WFQLSLKNIE	PYNYYIWHWP	150
151	GKIVNGKRVP	PTNWVGVFEGG	SAWSWREERQ	AYYLHQFAPE	QPDLYNYPV	200
201	VLDDMQNVLR	FWLRRGFDGF	RVDALPYICE	DMRFLDEPLS	GETNDPNKTE	250
251	YTLKIYTHDI	PETYNVVRKF	RDVLDEFFQP	KHMLIEAYTN	LSMTMKYYDY	300
	IYTHDI	PETYNVVR			YYDY	
301	GADFPENFAF	IKNVSRDSNS	SDFKKLVDNW	MTYMPPSGIP	NWVPGNHDQL	350
	GADFPENFAF	IK				
351	RLVSRFGEEK	ARMITTMSLL	LPGVAVNYYG	DEIGMSDTYI	SWEDTQDPQG	400
401	CGAGKENYQT	MSRDPARTPF	QWDDSVSAGF	SSSSNTWLRV	NENYKTVNLA	450
451	AEKKDKNSFF	NMEKKFASLK	KSPYFKEANL	NTRMLNDNVE	AFSRETEDNG	500
	NSFF	NMEKK	EANL	NTRMLNDNVE	AFSR	
501	SLYAILNFSN	EEQIVDLKAF	NNVPKKLNMF	YNNFNSDIKS	ISNNEQVKVS	550
551	ALGFFILISQ	DAKFGNF				

Figure 33. Compare amino acid sequence between deduced amino acid sequence from cDNA (upper line) and amino acid from MALDI – TOF MS (lower line)

8. Two - dimensional electrophoresis

Crude protein precipitated by 95% ammonium sulfate was desalted and separated on 2 - D electrophoresis. Most MW of protein was low in the range of 14.4 - 45 kDa as in Fig. 34. The distinguished spots were detected in range of pH 3 - 8.5. Owing to result of MALDI – TOF, MW of AG is about 73 kDa. Affirmatively, the assumed AG protein is marked in circle with the expected MW of about 73 kDa at pH 5.5.

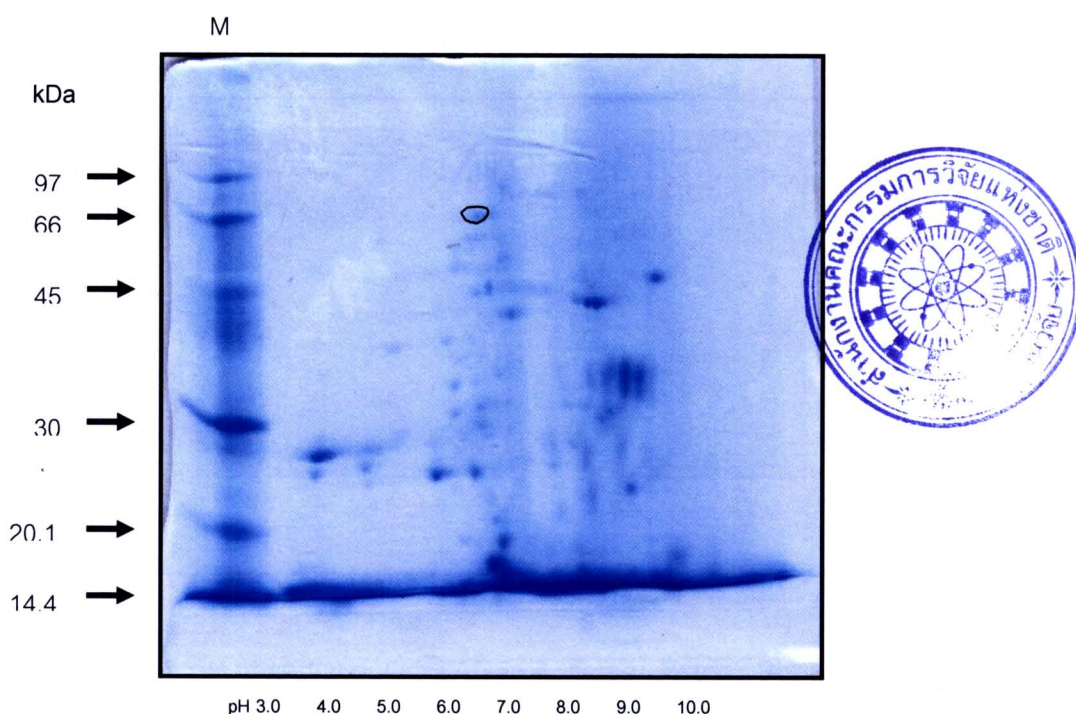


Figure 34. Two - D electrophoresis of crude protein (2 mg). Lane M contained low MW marker.

9. Optimum conditions for AG

A fraction containing activity peak from Superdex 200 (Fig. 22) was selected to study optimum conditions for AG activity. The optimum parameters (pH, temperature, selective concentration of substrate, and incubation time) were measured as mentioned in Materials and Methods. Three replications were performed. The average value was calculated and used to plot a graph.

The obtained optimum pH of purified AG is 5 (Fig. 35). The optimum temperature is 55°C (Fig. 36). The selective concentration of substrate is 80 mM (Fig. 37) and the optimum incubation time is 40 min (Fig. 38).

9.1 Optimum pH

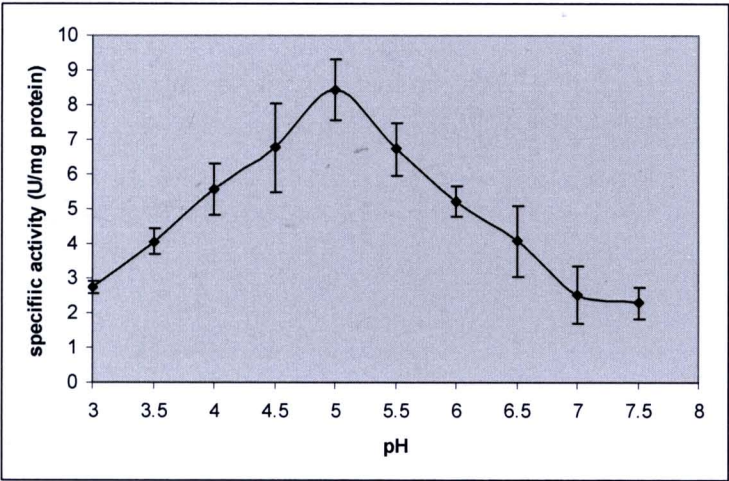


Figure 35. The optimum pH of partial purified AG in *A. florea*. Briton - Robinson buffer at various pHs ranging between 3.0 - 7.5 was used. The optimum pH is 5.0.

9.2 Optimum temperature

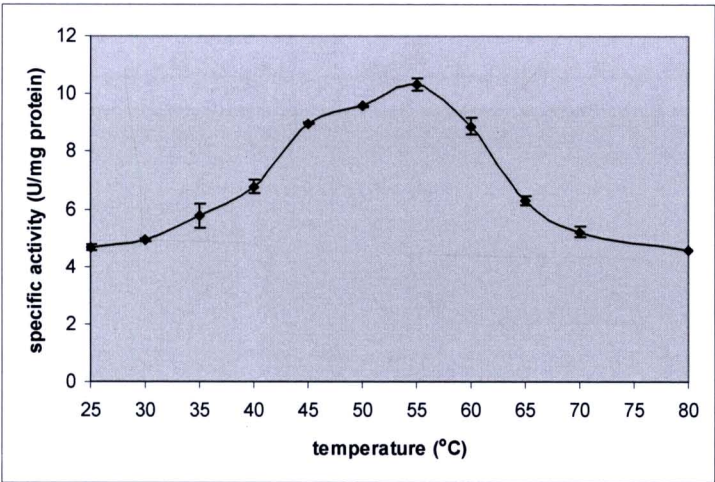


Figure 36. The optimum temperature partial of purified AG of *A. florea*. The reaction mixture in acetate buffer (pH 5.0) containing 0.1 M sucrose was incubated at various temperatures ranging among 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, and 80°C for 10 min. The optimum temperature is 55°C.

9.3 Selective concentration of substrate for partial purified AG

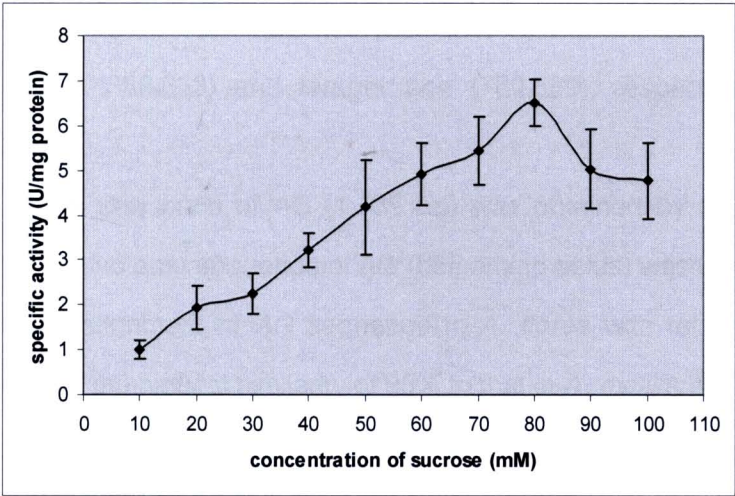


Figure 37. The optimum concentration of sucrose of partial purified AG in *A. florea*. The reaction mixture was incubated with sucrose at various concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 mM, respectively. The optimum concentration of sucrose is 80 mM.

9.4 Optimum incubation time of partial purified AG

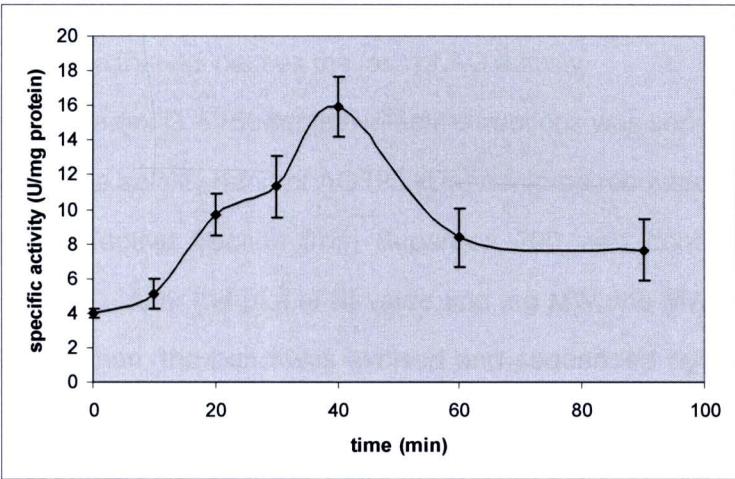


Figure 38. The optimum incubation time of purified AG in *A. florea*. The reaction mixture was incubated at 55 °C for 10, 20, 30, 40, 60, and 90 min, respectively. The optimum incubation time is 40 min.

Conclusions

1) Alpha – glucosidase (AG) expression is highest in forager bee. Quantitative analysis by RT – PCR indicates that an expression profile of AG gets increased in nurse bee (386.633) and forager bee (760.589), respectively. But no express in egg (16.082).

2) The cDNA sequence of AG (1,739 bp) was obtained by RT - PCR. In addition, the deduced amino acid sequence of AG (568 amino acids) was obtained.

3) By blast, alignment of AG sequence in *A. florea* with related genes in other organisms presents the highest similarity of 95% to that in *A. mellifera*.

4) Phylogenetic trees of amino acid sequence by UPGMA and Neighbor - Joining were constructed. The result also supports that the AG from *A. florea* was closed to AG in *A. mellifera*.

5) The suitable purification procedure of AG in *A. florea* was chromatographed on DEAE cellulose (0.171 u/ mg), Superdex-200 (2.3846 u/ mg), and concentrated by centrifugal filter at MWCO 10,000 Da (4.043 u/ mg). This procedure provides the highest activity

6) The specific activity of AG was obtained from DEAE cellulose at 0.171 u/ mg (with 95 % ammonium sulfate, AS, saturation) and at 4.5 u/ mg (without AS precipitation). It is possible that AS causes the loss of AG activity.

7) From Sephadex G – 150 protein in active fractions was separated by SDS - PAGE and renatured. The activity band of AG (93 kDa) could be recovered.

8) The most active fraction from Superdex 200 was concentrated and separated by SDS - PAGE. After the plot of R_f value and log MW, the MW of candidate AG was about 73 kDa. Then, the band was excised and sequenced by MALDI - TOF MS.

9) MALDI - TOF peptide mass maps of purified AG showed six matching masses of AG in AG in *A. mellifera* (gi|58585164), score 70, with 12% coverage (based on the M_r of 65523 Da).

10) The optimum condition for partial purified AG was at pH 5, at temperature of 55°C, at incubation time of 40 min, and in sucrose concentration of 80 mM.

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

1. Alpha glucosidase cDNA sequence

Total RNA was extracted from hypopharyngeal glands of forager bees and determined by 1.2% (w/ v) agarose gel and formaldehyde gel. After electrophoresis, 18S and 28S rRNA were visible on agarose gel (Fig. 39A) while only 28S rRNA was observed on formaldehyde gel (Fig. 39B).

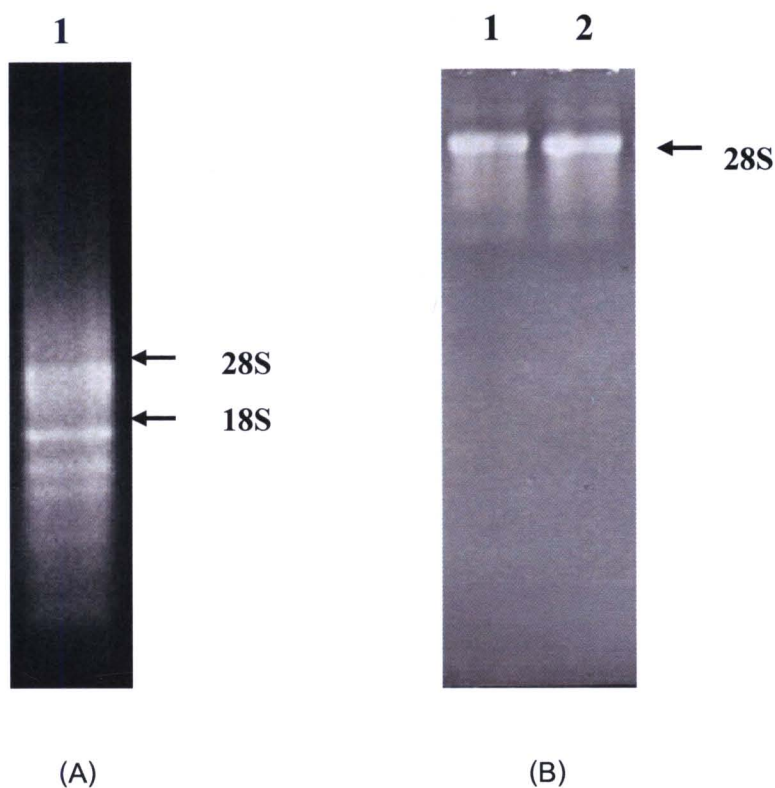


Figure 39. Total RNA extracted from HPGs of forager bees was electrophoresed on 1.2% (w/v) agarose gel (A) and formaldehyde gel (B).

2. Partial cDNA sequence

According to RT - PCR amplification, all primers worked at the same condition as mentioned in Materials and Methods. The PCR product of 850 bp was obtained from FW2 and R3 primers (Fig. 40A). The product of 750 bp was amplified by FW2 and oligo dT primers (Fig. 40B). Also, the product of 220 bp was amplified from FW3 and R3 primers (Fig. 40C). Those PCR products were sequenced by Bioservice unit, Thailand.

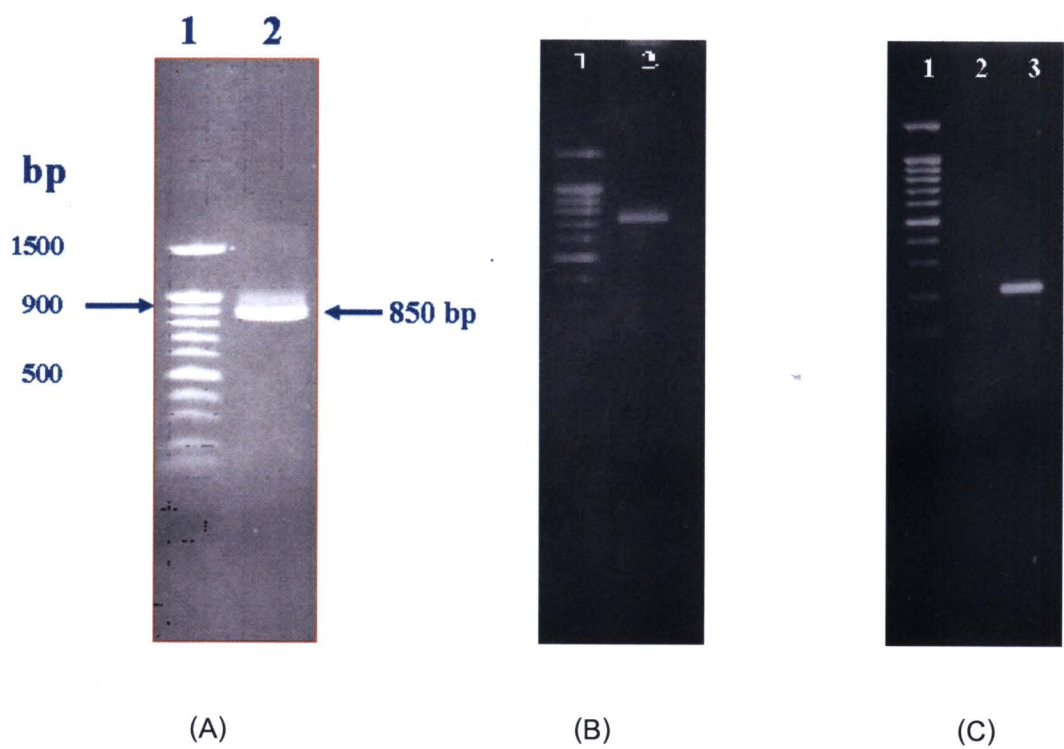


Figure 40. The RT - PCR product of AG from HPGs. Lanes 1 in all figures contained 100 bp ladder marker. Lane 2 contained product by FW2 and R3 primers (A) and product by FW2 and oligo dT primers (B). Lane 3 contained product by FW3 and R3 primers (C).

Control experiments were performed by using primers of 28S RNA and Elongation factor (EF) genes. The sizes of 350 bp and 100 bp RT - PCR products were obtained, respectively (Fig. 41).

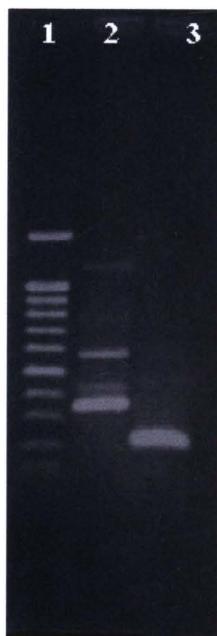


Figure 41. Control primers for RT - PCR amplification.

Lane 1: 100 bp ladder marker

Lane 2: product amplified by 28S rRNA primers

Lane 3: product amplified by Elongation factor (EF) primers

The sequences of all above RT - PCR products were shown in Fig. 42. The obtained cDNA length of AG is 1,740 bp. In addition, the derived amino acid sequence (567 amino acids) is obtained and represented in Fig. 43.


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60
ATGAAGGCGA TAATCGTATT TTGCCTTATG GCATTGTCCA TTGTGGACGC AGCATGGAAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      70      80      90     100     110     120
CCGCTCCCTG AAAACTTGAA GGAGGACTTG ATCGTGTATC AGGTCTACCC AAGAAGCTTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     130     140     150     160     170     180
AAGGATAGCA ATGGAGATGG TATTGGTGAT ATCGAAGGTA TTAAACAAAA ATTGGACCAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     190     200     210     220     230     240
TTTCTCGAAA TGGGCGTCGA TATGTTTTGG TTATCTCCTA TTTATCCAAG TCCTATGGTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     250     260     270     280     290     300
GATTTTGGTT ATGACATTTT GAATTACACC GATGTTTCAT CCATATTTGG CACCTTATCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350     360
GACTTAGATA ACTTAGTTAA TGCTGCACAT GAGAAGGGAC TGAAGATAAT CTTGGATTTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     370     380     390     400     410     420
GTTCCGAATC ATACATCTGA TCAACATGAA TGGTTCCAGC TGAGTTTGAA AAACATTGAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     430     440     450     460     470     480
CCTTATAACA ACTATTATAT TTGGCATCCA GGAAAAATTG TAAATGGTAA ACGTGTTCCTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     490     500     510     520     530     540
CCAACTAATT GGGTAGGCGT ATTTGGTGGA TCAGCTTGGT CATGGCGAGA AGAACGACAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     550     560     570     580     590     600
GCATATTATC TGCATCAATT TGCACCAGAA CAACCAGATC TAAATTACTA TAATCCAGTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     610     620     630     640     650     660
GTACTAGATG ATATGCAAAA CGTTCTCAGA TTCTGGCTGA GAAGAGGACT CGATGGTTTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     670     680     690     700     710     720
AGAGTAGATG CTTTGCCTTA CATTTGCGAG GACATGCGAT TCTTAGACGA ACCCCTATCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     730     740     750     760     770     780
GGTGAAACAA ATGATCCCAA TAAAACCGAG TAACTCTCA AGATCTACAC TCACGATATC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     790     800     810     820     830     840
CCAGAAACCT ACAATATAGT TCGCAAATTT AGAGATGTGT TAGACGAATT CCCGCAACCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

      850      860      870      880      890      900
AAACACATGC TTATCGAGGC ATACACGAAT TTATCGATGA CGATGAAATA TTACGATTAC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      910      920      930      940      950      960
GGAGCAGATT TTCCCTTTAA TTTTGCATTC ATCAAGAATG TCTCTAAGGA TTCAAATTCA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      970      980      990      1000      1010      1020
TCAGACTTCA AGAAATTGGT CGATAATTGG ATGATATACA TGCCAGCAGA TGGTATTCCT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1030      1040      1050      1060      1070      1080
AACTGGGTGC CCGGAAATCA CGATCAATTG AGATTGGTGT CGAGATTTGG AGAGGAGAAG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1090      1100      1110      1120      1130      1140
GCCCGTATGA TCACCGCGAT GTCGCTTTTG CTGCCAGGTG TTGCCGTGAA TTACTACGGT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1150      1160      1170      1180      1190      1200
GATGAAATTG GTATGTCGGA TACTTATATC TCGTGGGAGG ACACGCAGGA TCCACAGGGA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1210      1220      1230      1240      1250      1260
TGCGGTGCCG GCAAAGAAAA CTATCAAACG ATGTCGAGAG ATCCCGCGAG AACGCCATTC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1270      1280      1290      1300      1310      1320
CAATGGGACG ACTCAGTTTC TGCTGGATTT TCCTCAAGCT CTGATACCTG GCTTCGTGTC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
AACGAAAATT ACAAGACTAT CAATTTAGCT GCTGAAAAGA AGGACAAGAA CTCGTTCTTC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
AATATGTTCA AGAAATTTGC AATGCTGAAA AAATCGCCAC ACTTTAAAGA GGCCAATTTA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1450      1460      1470      1480      1490      1500
AATACGAGGA TGCTGAACGA CAGTGTTTTC GCATTCTCTA GGGAAACCGA AGAAAATGGA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1510      1520      1530      1540      1550      1560
TCTCTTTACG CAATATTGAA CTTCTCGAAC GAGGAACAAA TCGTGGACTT GAAAGCGTTT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1570      1580      1590      1600      1610      1620
AATAACGTGC CGAAAAAATT GAATATGTTT TACACCATTT TTAACCTCTGA TATAAAGTCC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1630      1640      1650      1660      1670      1680
ATCTCCAACA ATGAACAAAT AAAAGTTTCT GCTTTAGGAT TTTTGATCTT AATTTCTCAA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1690      1700      1710      1720      1730      1740
GATGCTAAAT TTGGAAATTT TTAATATCTC CCTGAATATG TCTATTCTTT GAAGCGGCGA

```

Figure 42. The cDNA sequence of alpha – glucosidase obtained by RT – PCR.


```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
Am.AG.nuc  ATGAAGGCAG TAATCGTATT TTGCCTT--A TGGCATTGTC CATTGTGGAC
AC.AG      ATGAAGGCGA TAATCGTATT TTGCCTT--A TGGCATTGTC CATTGTGGAC
Cs.maltase ATTTAAAAAA TTAACA-ATT TTACTATCAA TTGCATGTTT TGTATTGGCA
Dm.CG.nuc  ATTTTGAGTG TGGGCCTAGT AGGCAT---A TTGGCCCATATA AGCACCAGTC
Am.maltase1 ATGAAGAGCC TCGTCGTGGT CGTACTTCTG CT-CGCGGTC GGCCTTGGCG
Ls.ScrA.nu ACGTTAGGTG CAGTCGGTAT GGGGATT-TT TGGCCTGGGT TATTCAGCAA
Clustal Co  *          *          *

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90         100
Am.AG.nuc  GCAGCATGGA -AGCCGCTCC CTGAAA-ACT TGAAGGAGGA CTTGAT-CGT
AC.AG      GCAGCATGGA -AGCCGCTCC CTGAAA-ACT TGAAGGAGGA CTTGAT-CGT
Cs.Maltase GCA-CCTGAA -GGTGCACGT GAAAAA-GAT TGGTGGGAAA TTGGAAACTT
Dm.CG.nuc  AAA----GGA -GCTGGATGC GAAATATAAT TGGTGGCAGC ACGAGGTCTT
Am.maltase1 CCG----- --GCCAAAAC AACAAAG-GGT TGGTGGGAAGA ACGCGATCTT
Ls.ScrA.nu TTGTCTTAAC TGGCTTACAT CAAAGCTTCC CGGCAATTGA AACGACACTT
Clustal Co          *          *          *          *          *

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
Am.AG.nuc  GTATCAGGTC TACCCGA--- -GAAGCTTCA AGGATAGCAA TGGAGATGGT
AC.AG      GTATCAGGTC TACCCAA--- -GAAGCTTCA AGGATAGCAA TGGAGATGGT
Cs.Maltase TTATCAAGTC TATCCAC--- -GAAGTTTCA TGGATTCTGA TGGCGATGGT
Dm.CG.nuc  CTATCAGATC TATCCGA--- -GATCCTTTC AGGACAGCAA TGGTGATGGT
Am.maltase1 CTATCAGGTA TATCCCC--- -GCAGTTTCA TGGATTCCAA TAGTGATGGC
Ls.ScrA.nu TTGGCAGATA TTGCCAAAAC TGGTGGATCG TTTATTTTTC CCGTTGCAGC
Clustal Co  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
Am.AG.nuc  ATTGGTGATA TCGAAGGTAT TAAAGAAAAA TTGGATCAT- TTTCTCGAAA
AC.AG      ATTGGTGATA TCGAAGGTAT TAAACAAAAA TTGGACCAT- TTTCTCGAAA
Cs.Maltase GTTGGCGATT TGAAAGGAAT TTCAGAAAAA GTCGTTAT- TTAAAGGAAA
Dm.CG.nuc  ATTGGTGATC TTCAAGGTAT TACTTCTAGG CTACAGTAC- TTCAAGGATA
Am.maltase1 ATCGGGGATT TAAAAGGTAT TAAGGATAAG CTTTCACAC- TTCATCGAAT
Ls.ScrA.nu GATGGCAAAT ATTGCTCAAG GGGCTGCAAC TTTCGCTGTA TTCTTCGTTA
Clustal Co  ** *          *          *          *          ** *

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
Am.AG.nuc  TGGGGGTCGA CATGTTTTTG TTATCCCCTA TTTATCCAAG CCCTATGGTC
AC.AG      TGGGCGTCGA TATGTTTTTG TTATCTCCTA TTTATCCAAG TCCTATGGTC
Cs.Maltase TCGGCATGGA TGGTGTTTTG CTTTCACCGA TTTTTGATTC ACCTATGGCA
Dm.CG.nuc  CGGGCATCAC GTCCGTATGG TTGAGTCCCA TTTATGAGTC ACCAATGGTA
Am.maltase1 CTGGAATAAC AGCGATATGG TTATCACCAA TTAATCGAAG TCCTATGGTA
Ls.ScrA.nu CTAAGAATAA ACAACAAAAG TCATTAACGA CTTCTGCTGG GATTTCGTC-
Clustal Co          *          *  *  *          *

```

Figure 44. (continued)

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      260      270      280      290      300
Am.AG.nuc  GATTTTGGTT ACGACATTTC GAATTACACC GACGTTTCATC CCATATTTGG
AC.AG      GATTTTGGTT ATGACATTTC GAATTACACC GATGTTTCATC CCATATTTGG
Cs.Maltase GATTTTGGTT ATGACATTTC AAATTTTCACC AAAGTCTTCC CTCAATTCGG
Dm.CG.nuc  GACTTTGGAT ACGATATATC TAACTATACA AATATACAGC CGGAATATGG
Am.maltase1 GATTTTGGAT ACGATATATC TGACTTTTAAA GATGTAGATC CAATATTTGG
Ls.ScrA.nu GATGTTGGGA ATTACTGAAC CAGCATTATT TGGGGTTAAT TTAAAATTGA
Clustal Co **  ****  *  *      *      *      *      *

```

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      310      320      330      340      350
Am.AG.nuc  CACCATATCA GACTTAGATA ATCTAGTCAG TGCTGCACAT GAGAAAGGAT
AC.AG      CACCTTATCA GACTTAGATA ACTTAGTTAA TGCTGCACAT GAGAAGGGAC
Cs.Maltase AGACTTGTCT TCAATTGATG AACTTGTAGC GGAATTCAAT AAAAAAGATA
Dm.CG.nuc  CACCCTTGAG GACTTTGACG CCTTGATAGC CAAGGCCAAT GAACTGGGCG
Am.maltase1 TACTATAAAA GATCTTGAAG ATCTCACTGC AGAAGCGAAG AAACAGAATT
Ls.ScrA.nu AGTTTC--CA TTCTTTATTG GTTTAATTGC ATCAGGAATC TCATCGTTTA
Clustal Co          *      *

```

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      360      370      380      390      400
Am.AG.nuc  TGA--AGATA ATCTTGGATT TCGTCCCGAA TCATACATCT GATCAACACG
AC.AG      TGA--AGATA ATCTTGGATT TCGTCCCGAA TCATACATCT GATCAACATG
Cs.Maltase TGA--AACTC ATTCTGGACT TTGTTCCAA TCATACAAGT GACCAATGTG
Dm.CG.nuc  TGA--AAGTT ATTTTGGACT TTGTTCCAA TCACAGCTCA AATAAGCATC
Am.maltase1 TAA--AGGTT ATTCTAGATC TTGTCCCTAA TCATACTTCT GATCAACATA
Ls.ScrA.nu TTATTGGTTT ATTACATGTT TTATCAGTAT CAATGGGACC TGCAGGAATT
Clustal Co *  *      *  **      *  *      *      *

```

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      410      420      430      440      450
Am.AG.nuc  AATGG-TTCC AG----- --TTGAGTTT GA-----AAA --ACATTGAA
AC.AG      AATGG-TTCC AG----- --CTGAGTTT GA-----AAA --ACATTGAA
Cs.Maltase AGTGG-TTCA AAA----- AATCAATTCA GC-----GTG --ATCCTGAG
Dm.CG.nuc  CCTGG-TTCA TAA----- AGTCAGTAGC CC-----GAG --AGCCAGGG
Am.maltase1 AATGG-TTCC AAATGAGTAT AAATAATACT AATAATAATA --ATACTAAT
Ls.ScrA.nu ATTGGGTTTA TTGCGATTGC ACCTAAGAGC ATCCCTAGTT TTATGATGGG
Clustal Co ***  **      *

```

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      460      470      480      490      500
Am.AG.nuc  CCTTATAACA ACTATTACAT TTGGC---AT CCAGGAAA-- --AATTGTAA
AC.AG      CCTTATAACA ACTATTATAT TTGGC---AT CCAGGAAA-- --AATTGTAA
Cs.Maltase ---TACAATG ATTACTATAT TTGGC---AT CCGGGTAAGC CAAATCCTGA
Dm.CG.nuc  ---TACGAGG ATTTCTATGT GTGGG---AG GATGGTATT-- --CTCCTGGA
Am.maltase1 AAATATAAAG ATTATTACAT ATGGGTTGAT CCTGTCAAAG ACGATAAAGG
Ls.ScrA.nu AGCTATTATT AGTTTCGTAA TTGCCTTTGT GGGGACATAC TTATACGGTA
Clustal Co **  *      *  *      **      *      *

```


Figure 44. (continued)

	
	510 520 530 540 550
Am.AG.nuc	--AT---GGC AAACGTGTTC CACCAACTAA TTGGGTAGGC GTGTTTGGTG
AC.AG	--AT---GGT AAACGTGTTC CACCAACTAA TTGGGTAGGC GTATTTGGTG
Cs.Maltase	TGGT---GGT CGAAATTTAC CCCCACCTAA TTGGGTAAGT GCCTTCAGAA
Dm.CG.nuc	GAAC---GGA ACTCGTGTGC CGCCCAACAA TTGGCTGTCTG GTGTTCTCCG
Am.maltasel	AAATCCAATT AAAGACAAAT ATCCTAATAA TTGGCTTAGT GTATTCAATG
Ls.ScrA.nu	AAAAGGCAAT GAAGACAACCT GAAGAAGAAA TAATCAATGA AGCACCAGCT
Clustal Co	* ** *
	
	560 570 580 590 600
Am.AG.nuc	GATCAGCTTG GTCGTGGCGG GAAGAACGAC AGGCATATTA TCTGCATCAA
AC.AG	GATCAGCTTG GTCATGGCGA GAAGAACGAC AGGCATATTA TCTGCATCAA
Cs.Maltase	GTAGTGCCTG GGAATGGAAC GAAGAACGTG GCGAATATTA TTTACATCAA
Dm.CG.nuc	GATCCGCTTG GATGTGGAAC GATGAGAGGC AGCAGTACTA TCTCAGGCAG
Am.maltasel	GTACAGGATG GACTTTCCAC GAGGGTAGGA AACAATTTTA TTTCCATCAA
Ls.ScrA.nu	ACCCGAGA-A GTAGTGGAGA GATTACAAGA TGAAAAGATT AGTGCACCAG
Clustal Co	* * ** *
	
	610 620 630 640 650
Am.AG.nuc	TTTGCACCAG AACAACCAGA TCTAAATTAC TA--TAATCC AGTT---GTA
AC.AG	TTTGCACCAG AACAACCAGA TCTAAATTAC TA--TAATCC AGTT---GTA
Cs.Maltase	TTTTTGGCAC AACAACCCGA TTTGAATTAC CG--CAATCC AAAA---GTG
Dm.CG.nuc	TTCACTTATG GACAACCCGA TTTGAACTAC CG--AAATCC CGCC---GTG
Am.maltasel	TTTTATAAGC AACAACCAGA CTTGAACTAC AG--AAACTC GGAT---GTG
Ls.ScrA.nu	TTACCGGACG AATTGTTGAC TTAGCATCAG TACCTGATCC AGTTTTTGCA
Clustal Co	** * * *
	
	660 670 680 690 700
Am.AG.nuc	CTGGATGATA TGC-AAAATG TTCTCAGATT CTGGC--TGA GAAGGGGATT
AC.AG	CTAGATGATA TGC-AAAACG TTCTCAGATT CTGGC--TGA GAAGAGGACT
Cs.Maltase	GTTGAAACAA TGA-AAAACG TTTTAAGATT CTGGC--TTA GCAAAGGTAT
Dm.CG.nuc	ATTAAGGCCA TGG-ATGATG TGATGCTCTT CTGGC--TAA ACAAGGGTAT
Am.maltasel	AGAGAAGAGA TGA-AGAATA TAATGAAATT TTGGT--TGG ATAAAGGAAT
Ls.ScrA.nu	AGTGAAGCAA TGGGAAAAGG CATTGCGATT ATGCCAACTT CTCAGGATGT
Clustal Co	* * ** * *
	
	710 720 730 740 750
Am.AG.nuc	TGATGGTTTC AGAGTAGATG CTCTGCCTTA CATTTGCGAA GACATGCG--
AC.AG	CGATGGTTTC AGAGTAGATG CTTTGCCTTA CATTTGCGAG GACATGCG--
Cs.Maltase	CAATGGATTG AGAATTGATG CGGTACCATA TTTGTTTGAA GTGGGACC--
Dm.CG.nuc	TGCCGGCTTC CGCATCGATG CCATTATATA TATTACGAG GATGCTCA--
Am.maltasel	CGATGGATTG CGCATAGATG CTGTACCACA TTTATTTCGAA AGCGCTAACA
Ls.ScrA.nu	ACTTGCACCA GTTACCGGTG TGATAACAAT TGCGGCTAAT ACTGGTCACG
Clustal Co	* * ** *



Figure 44. (continued)

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
              760      770      780      790      800
Am.AG.nuc    -ATTCTTAGA CGAACCTCTA TCAGGT--GA AACAAATGAT CCCAATAAAA
AC.AG        -ATTCTTAGA CGAACCCCTA TCTGGT--GA AACAAATGAT CCCAATAAAA
Cs.Maltase   -AGATGCGAA TGGAAATTAT CCAGAT--GA AATTGA-AAC CCATGCATGC
Dm.CG.nuc    -ACTGAGGGA TGAGCCTCCG AGTGGC--AC TACCGATGAT CCAAATAA--
Am.maltase1  TATCGTTAGA TGAACCACCT TTGGGT--AA AAATCTCAAC TTAAGTCT--
Ls.ScrA.nu   CATACGGGAT AAAATCGGAT GATGGTGCAG AAGTGCTAAT TCATATTGGT
Clustal Co   *                               *           *           *
```

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
              810      820      830      840      850
Am.AG.nuc    CCGAGTACAC T--CTCAAGA TC-----TACA CTCACGATAT
AC.AG        CCGAGTACAC T--CTCAAGA TC-----TACA CTCACGATAT
Cs.Maltase   TCAGATCCTT TATCTCAATG TTAATTGTAT CACGATTACA CTCAAAACAG
Dm.CG.nuc    TGAGGCCTAC TTGAGCCACA TC-----TATA CCAGAAATCA
Am.maltase1  CCACGCTTCT TTAAATCACA CT-----TTAA CGAAAGATCA
Ls.ScrA.nu   TTAGATACAG TTAATTTAA TGGT-----ATAGGTTTT GAAAAGATTG
Clustal Co   *           *                   *           *
```

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
              860      870      880      890      900
Am.AG.nuc    CCC--AGAAA CCTACAATGT AGTTCGCA-- AATTTAGAGA TGTGTTAGAC
AC.AG        CCC--AGAAA CCTACAATAT AGTTCGCA-- AATTTAGAGA TGTGTTAGAC
Cs.Maltase   GCC--TGAAA CTTTTGAAAT GGTACCG-- AATGGAGAGC GACTTTGGAG
Dm.CG.nuc    GCC--TGAGG ATTACGGTCT ACTTCAGC-- ATTGGCGGCA ACTTCTGGAT
Am.maltase1  ACC--CGAGA CTTACGAATT GGTAAAAG-- AATGGCGAGA TTTTGTGGAC
Ls.ScrA.nu   TCCAACAGGG ACAACATGTT AGCGAAGGCG ATTTATTAGG TCATTTTGTAT
Clustal Co   **                               * * *           *
```

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
              910      920      930      940      950
Am.AG.nuc    GAATTCCCGC AACCAAA--- -----ACA CATGCTT--- -----ATCGA
AC.AG        GAATTCCCGC AACCAAA--- -----ACA CATGCTT--- -----ATCGA
Cs.Maltase   GAATTTAAAC AAAAGAATGG AGGACCAACA AGAGTTTAA TG---GTAGA
Dm.CG.nuc    AATTATACAG CTAACCACGA TGGGCCATTG AGGATAATGA TG---ACCGA
Am.maltase1  AACTATGCAG AAGAAAATAA GCGGGATGAA ATAGTACTTT TG---ACAGA
Ls.ScrA.nu   ATTGATAAGA TTAAACAAGC CGGGCTAACA CCGCTAACAA TGAATATTGT
Clustal Co   *                               *           *
```

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
              960      970      980      990      1000
Am.AG.nuc    GGCATACACG AA----TTTA TCGATGACGA TGAAATATTA CGATTA----
AC.AG        GGCATACACG AA----TTTA TCGATGACGA TGAAATATTA CGATTA----
Cs.Maltase   AGCTTATGCT CC----ATTA AAAAAAGTAA TTCAAATTTA TGGTCAAAAT
Dm.CG.nuc    GGGTTATGCT TC----GGTG TCGCAACTAA TGGAATACTA TGAAGATTCTG
Am.maltase1  GGCGTATTCT TC----TTTA GAGAACACTC TCAAATATTA CGAAGT----
Ls.ScrA.nu   GACGAATACA GCGGGATATG CACAAGTTGA TCCGCTTTTA ACAGTCGACA
Clustal Co   * *           *           *           **
```

Figure 44. (continued)

					
	1010	1020	1030	1040	1050
Am.AG.nuc	-----	-CGGAGCAGA	TTTTCCCTTC	AATTTTGCAT	TCATCAAGA-
AC.AG	-----	-CGGAGCAGA	TTTTCCCTTT	AATTTTGCAT	TCATCAAGA-
Cs.Maltase	GGACAGCTAA	ATGGAGCTCA	AATTCCATTT	AATTTTCGAGT	TCTTGAATA-
Dm.CG.nuc	AATGGTGTAC	AGGGCCCCCA	GTTTCCCTTC	AACTTTGACT	TCATCACCG-
Am.maltase1	-----	-TGGTTCAAA	TGTTCCCTTC	AATTTTAAAT	TTATAACAG-
Ls.ScrA.nu	AGGCTGCTAT	GCAAGGCGAA	GAAATTATTC	AATTACACGC	TAAAAAGGAT
Clustal Co		* *	** ** *	*	*

					
	1060	1070	1080	1090	1100
Am.AG.nuc	-ATGTTTCTA	GGGATTCAAA	TTCATCAGAC	TTCAAAAAA-	--TTGGTCGA
AC.AG	-ATGTCTCTA	AGGATTCAAA	TTCATCAGAC	TTCAAGAAA-	--TTGGTCGA
Cs.Maltase	-ATTTGGGAG	CCGTAAGTAA	TGCTCGTGAT	TTCAAAGAC-	--GTAATTGA
Dm.CG.nuc	-AACTGAATG	CCAATTCGAC	AGCTGCGGAC	TTTGTCTTC-	--TATATCTC
Am.maltase1	-ATGCAAATT	CATCTTCCAC	GCCAGAACAA	TTTAAAGTA-	--ATTATAGA
Ls.ScrA.nu	TAAGGGGTAG	TTACATGCAA	ACTAACTGGT	GGCAAATGC	AGTATTTTAT
Clustal Co	*	*			*

					
	1110	1120	1130	1140	1150
Am.AG.nuc	TAATTGGATG	ACGTACATGC	CACCAAGTGG	TATTCCTAAC	TGGGTGCCCCG
AC.AG	TAATTGGATG	ATATACATGC	CAGCAGATGG	TATTCCTAAC	TGGGTGCCCCG
Cs.Maltase	CAATTATCTC	AGCACAAATCC	CAGAAGGAGC	AACACCAAAT	TGGGTTC AAG
Dm.CG.nuc	CAGGTGGCTC	ATCTATATGC	CACATGGTCA	TGTGGCCAAC	TGGGTGATGG
Am.maltase1	CAATTGGATA	AAAGGAACGC	CCCAAATAA	TGTTCCAAAT	TGGGTGATGG
Ls.ScrA.nu	CAAGTCTATC	CAAGAAGT-T	TTCAAGATAG	TAATGGAGAT	GGAATTGGTG
Clustal Co	* * *			*	* * *

					
	1160	1170	1180	1190	1200
Am.AG.nuc	GAAATCACGA	TC-----	AATTGAGATT	GGTGTGCGAG	TTTGAGAGG
AC.AG	GAAATCACGA	TC-----	AATTGAGATT	GGTGTGCGAG	TTTGAGAGG
Cs.Maltase	GAAATCACGA	TC-----	AACATCGATC	AGCATCACGA	CTCGGTCCAC
Dm.CG.nuc	GAAATCACGA	CA-----	ATCCTCGAGT	GGCATCACGA	TTCGGTGAGA
Am.maltase1	GAAACCATGA	TC-----	GAGTTCGTGT	CGGTACACGT	TATCCTGGTA
Ls.ScrA.nu	ATATTCAAGG	TATTATTCAA	AGATTAGATT	ACCTAGCTGA	TCTGGGTGTA
Clustal Co	* ** *		*	*	

					
	1210	1220	1230	1240	1250
Am.AG.nuc	AGAAGGCCCCG	TATGATCACC	ACGATGTCGC	TTTTGC--TG	CCAGGTGTTG
AC.AG	AGAAGGCCCCG	TATGATCACC	GCGATGTCGC	TTTTGC--TG	CCAGGTGTTG
Cs.Maltase	AAAAAGCTGA	TGCAGTTAAT	ATGTTACTTC	AAGTTC--TT	CCCGGAGCTG
Dm.CG.nuc	AATCTGTGGA	CGCCATGAAT	ATGCTGCTGA	TGACAT--TG	CCAGGAATTG
Am.maltase1	GGGCGGATCA	CATGATAA--	-TGTTGGAGA	TGATTT--TG	CCTGGAGTCG
Ls.ScrA.nu	AATGCAATTT	GGCTATCACC	AGTTTATCAA	TCCCCTAATG	TTGATAATGG
Clustal Co		* *	*	*	*

Figure 44. (continued)

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1260      1270      1280      1290      1300
Am.AG.nuc CCGTGAATTA CTA--CGGTG ATGAAATTGG TATGTCGGAT ---ACTTATA
AC.AG     CCGTGAATTA CTA--CGGTG ATGAAATTGG TATGTCGGAT ---ACTTATA
Cs.Maltase CAGTCACTTA TTA--TGGTG AAGAACTTGC AATGGAAGAC ---GTTTTTCG
Dm.CG.nuc GTATTACTTA TAA--TGGCG AGGAGTTGGG CATGACTGAC TACAGGGACA
Am.maltase1 CGGTCACGTA TTA--TGGAG AAGAAATCGG TATGGTGGAT -----
Ls.ScrA.nu CTATGATATT TCAGATTATC AGGCAATTAA TCCGGAATAT GGTTCATGG
Clustal Co      *  *  *      *      *  *  *      *      *
```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1310      1320      1330      1340      1350
Am.AG.nuc TC-TCGTGGG AGGATACGCA GGATCCGCAG GGATGCGGCG CCGGTAAAGA
AC.AG     TC-TCGTGGG AGGACACGCA GGATCCACAG GGATGCGGTG CCGGCAAAGA
Cs.Maltase TT-CCATGGT CTCGTACTGT CGATCCACAA GCATGTACAA CAGATCCAAA
Dm.CG.nuc TC-AGCTGGA GCGATACGGT GGATCAGCCC GCTTGTGAGG CTGGAATCGA
Am.maltase1 -----A ACACTACGAT ATATAAATAT G-ATGTACG- -----TGA
Ls.ScrA.nu TGGATATGGA GCAGTTAATT GAAGCGGCGA AGATTCTGTA --GATTAAAA
Clustal Co      *      *      *      *
```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1360      1370      1380      1390      1400
Am.AG.nuc AAACATCAAA ACGATGTCGA GAGATCCCGC GAGA---ACG CCATTCCAAT
AC.AG     AAACATCAAA ACGATGTCGA GAGATCCCGC GAGA---ACG CCATTCCAAT
Cs.Maltase TATTTTCCAT GCCAAGTCAC GTGATCCCGC AAGA---ACA CCCATGATTT
Dm.CG.nuc CAACATCAAG ACGATTCTTA GAGATCCTGA GCGA---ACT CCCATGCAAT
Am.maltase1 TGGTTGTCGT ACACCATTC CAA-----TGG GATA---ACT CCATTAATGC
Ls.ScrA.nu TTGTTATGGA CTTAGTTGTT AATCATACAA GTGACCAACA TCCATGGTTT
Clustal Co      *      *      *  **  *  *
```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1410      1420      1430      1440      1450
Am.AG.nuc GGGACGACTC AGTTTCTGCT GGATTTTCCT CAA-GCTCTA AT---ACCTG
AC.AG     GGGACGACTC AGTTTCTGCT GGATTTTCCT CAA-GCTCTG AT---ACCTG
Cs.Maltase GGAATTCAAA AAAAAACGCA GGATTTT--- CAA-GTTCAA ATTACACATG
Dm.CG.nuc GGAGTAGTGA TGTGAATGCA GGATTCTCCT C----CGCCG ATCGCACTTG
Am.maltase1 AGGCTTTAGT AAAATCGCTG AAAATTT--- ----GCTTGA AAAG-AATTG
Ls.ScrA.nu TTAGAAGCAC GAAAAATCAA AGATAATCCG TATCGTGATT TTTATATTTG
Clustal Co      *      *      *  *  *
```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1460      1470      1480      1490      1500
Am.AG.nuc GCTT--CGTG TCAACGAAAA TTACAAGACT G-TCAATCT- -AGCTGCTGA
AC.AG     GCTT--CGTG TCAACGAAAA TTACAAGACT A-TCAATTT- -AGCTGCTGA
Cs.Maltase GCTT--CCAA CTGGACCAGA TTATCGCAAA A-ATAATGTT GAAGTGCAGC
Dm.CG.nuc GTTG--CCTG TCAATCCGAA TTATAAGGAA C-TTAATCTT CGGAATCAGC
Am.maltase1 GCTA--CCTG TTCATACATC GTACAAAAGT GGAATAAATT TGGAGCAAGA
Ls.ScrA.nu GCGAGACCCCT GCAACCGATG GTAGTGTTC GAATGATTTA CAAAGTAATT
Clustal Co      *  *      **      *  *
```


Figure 44. (continued)

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      1510      1520      1530      1540      1550
Am.AG.nuc AAAGAAGGAC AA---GAACT CGTTCTTCAA TATGTTCAAG AAATTTGCGT
AC.AG     AAAGAAGGAC AA---GAACT CGTTCTTCAA TATGTTCAAG AAATTTGCAA
Cs.Maltase GTAGTCAGAG AG---GCAGT CA--CTTGAA TATCTTTAAA AAGTTGACTC
Dm.CG.nuc  AGCAGGCGAG GC---GAAGT CA--TTACAA GATCTATCAG TCCCTTCTGA
Am.maltase1 GAAAAAAGAT AG---TATTT CTCATTATCA TCTTTATACC AACTTGACCG
Ls.ScrA.nu TTAAAGGATC AGCTTGGGCG TTTGATGCGG TTACTGGGCA ATATTATTTA
Clustal Co

```

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      1560      1570      1580      1590      1600
Am.AG.nuc  CGCT----- -GAAAAAATC GCCATACTTT AAAG-AGGCC AATTTAAA--
AC.AG      TGCT----- -GAAAAAATC GCCACACTTT AAAG-AGGCC AATTTAAA--
Cs.Maltase  AACT----- -TCGTAAG-C  AAGACATTTT GATGTATGGC ACTTATGA--
Dm.CG.nuc   AGCT----- -CAGACAAC T GCCA-GTTCT GAAGAACGGA TCCTTTGT--
Am.maltase1 CTTT----- -AAGAAAG-A  GAGATGTGTT GAAAAAAGGA AACTTTAC--
Ls.ScrA.nu  CATTTTTTATG CGAAAGAACA ACCGGATTTA AATTGGCAAA ATCCTAAAGT
Clustal Co

```

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      1610      1620      1630      1640      1650
Am.AG.nuc  TACGAGGATG CTGAAC--GA CAATGTTTTT GCATTCTCTA GG-GAAACCG
AC.AG      TACGAGGATG CTGAAC--GA CAGTGTTTTT GCATTCTCTA GG-GAAACCG
Cs.Maltase  TAGTTACTTG  GCAAAT--GA TGACGTTTTT GTGATTAAAC GT-GAAATTG
Dm.CG.nuc   TCCAGAAGTG  GTTAAT--CG CAGGGTCTTC GCTTTCAAGC GA-GAACTGA
Am.maltase1 TATAGAAATT  TTAAAC--AA AACTGTTCTG GCTGTCTGTC GACAAAGCGA
Ls.ScrA.nu  TAGAGAAGCT  GTCTACCAGA TGATGACTTG GTGGCTTCAA AAAGGGATTG
Clustal Co

```

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      1660      1670      1680      1690      1700
Am.AG.nuc  -----AA GATAATGGAT CTCTTTACGC AATATTGAAC TTCTCGAACG
AC.AG      -----AA GAAAATGGAT CTCTTTACGC AATATTGAAC TTCTCGAACG
Cs.Maltase  -----AG AATAATCGAA CTTTGATTGC TGTCCTTAAC TTGGGTTTCA
Dm.CG.nuc   -----AG AACGAGCACA CTCTGCTGAC CATTGTGAAC GTGAGCAACC
Am.maltase1 -----AG AAGAAGCGGT ATCTCTTT-- --TGATCAAC TTCTCTAAAA
Ls.ScrA.nu  GTGGTTTTAG  GATGGACGTT ATTGATTG- -ATAGGGAAG GAACCTGACC
Clustal Co

```

```

      ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....| ....|.....|
      1710      1720      1730      1740      1750
Am.AG.nuc  AGGAACAAAT CGTGGATTTG AAAGCGTT-C AATAACGTGC CGAAA-----
AC.AG      AGGAACAAAT CGTGGACTTG AAAGCGTT-T AATAACGTGC CGAAA-----
Cs.Maltase  CTGAACAAGT  CGTCAATTTG AATTTAAA-T GACCGAGATT GGAAAGTTCC
Dm.CG.nuc   GCACTGAAC T GGTGACATC GCGGACTT-T ATAGAACAGT CCAATCGATT
Am.maltase1 ATAATACTAT  CGTGGATATA TCAAAGTT-G GTGAACAAAA GAAAT-----
Ls.ScrA.nu  GCAAAATTAA  GGAAAACGGA CCGCAATTAC ATGCGTATCT TCAAGAGATG
Clustal Co

```

Figure 44. (continued)

							
	1760	1770	1780	1790	1800		
Am.AG.nuc	AAATTGAATA	TG-TTTTACA	ACAATTT---	-TAACT-CTG	ATAT-----A		
AC.AG	AAATTGAATA	TG-TTTTACA	CCATTTT---	-TAACT-CTG	ATAT-----A		
Cs.Maltase	AGAGAGAATG	GA-AGTTGCA	ACAGCTTCAG	TTAACG-CAG	GAATGTTCGA		
Dm.CG.nuc	GAGTGTCCTT	GT-GGCGGGA	GTGGACTCG-	-CAACA-CCG	G-GTGGGGGA		
Am.maltase1	AATGCTAAAA	TT-TACACAA	GCAGCGT---	-AAACT-CCA	ATTTGACAGT		
Ls.ScrA.nu	AACGCAAGGG	TACTTTCACA	GTATGATGTA	GTAACGGTTG	GAGAGACATG		
Clustal Co		*	*	***			
							
	1810	1820	1830	1840	1850		
Am.AG.nuc	AAGTCCATCT	CCAACAATGA	AC-AAGTAAA	AGTTTCTGCT	-----TTAG		
AC.AG	AAGTCCATCT	CCAACAATGA	AC-AAATAAA	AGTTTCTGCT	-----TTAG		
Cs.Maltase	GAGACAACCC	GTTGTGACAA	GTGAAGTCTA	CGTATCAGCT	GG--CGTTGG		
Dm.CG.nuc	TCGACTTAAG	GCCGAGACAA	TT-GAATTGG	CGCCCAACGA	GG--GATTAG		
Am.maltase1	AAATCAAAC	GTAAATCCAG	TGGCTATCAA	TATTCCTGGA	GATACATCTA		
Ls.ScrA.nu	GGGGGCAACA	CCCGAAATTG	GCCAGATGTA	CAGTAATCCT	AATCGCCACG		
Clustal Co			*				
							
	1860	1870	1880	1890	1900		
Am.AG.nuc	GATTTTTTCAT	C-TTAATTTT	TCAAGATG--	CTAAATTT--	-----G		
AC.AG	GATTTTTTGAT	C-TTAATTTT	TCAAGATG--	CTAAATTT--	-----G		
Cs.Maltase	AGTTGTTCTC	G-ATTATCAA	GTAGGGCG--	TCAAATTTCC	GAACCAAGAG		
Dm.CG.nuc	--TTATTCAG	C-TGAATAAG	CGAAAGTA--	A-----	-----		
Am.maltase1	TAATTGTAGA	T-TCATCCAC	TTCAGGCG--	CTACTATAGT	CAATTATTCA		
Ls.ScrA.nu	AACTATCGAT	GATCTTTCAA	TTTGAACAAA	TTAATTTAGA	TAAACAATCA		
Clustal Co	*						
							
	1910	1920	1930	1940	1950		
Am.AG.nuc	GAAACTTTTA	ATTTCTTCCT	GAATATGTC-	TATTCTTTGA	AGCGGCGA..		
AC.AG	GAAATTTTTA	ATATCTCCCT	GAATATGTC-	TATTCTTTGA	AGCGGCGA..		
Cs.Maltase	GTGACGATCC	AGGACTATAC	GAATAAGAAA	TATTCCTCAA	ATCTTTGA..		
Dm.CG.nuc	-----	-----	-----	-----	-----		
Am.maltase1	ATCATGATTT	TCTTATCCGC	AGTGTTTCATA	TCTTTTTTCC	AACGGTAA..		
Ls.ScrA.nu	GGGATGACTC	GCTGGGATTT	AAAACCACTT	ATTCCAGCAG	AGTTACAT..		
Clustal Co							

Figure 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.


```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            10         20         30         40         50
A.c.AG   MKAIIVFCLM ALSIVDAAWK PLPEN----L KEDLIVYQVY PRSFKDSNGD
A.m.AG   MKAVIVFCLM ALSIVDAAWK PLPEN----L KEDLIVYQVY PRSFKDSNGD
Cs.      FKKLTILLSI ACSVLAAP EG AREKD---W WEIGNFYQVY PRSFMDSDGD
Dm.      VKIAFILSVG LVGILAHKHQ SKELDAKYNW WQHEVFYQIY PRSFQDSNGD
A.m.maltas MKSLVVVLL LAVGLGAGQN --NKG----W WKNAIFYQVY PRSFMDSNSD
Ls.      -FVPLIPALT AGGLLMAINN VLTGQG---L FGAQSIVQMF P-----

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            60         70         80         90        100
A.c.AG   GIGDIEGIKQ KLDHFLEMGV DMFWLSPIYP SPMVDFGYDI SNYTDVHPIF
A.m.AG   GIGDIEGIKE KLDHFLEMGV DMFWLSPIYP SPMVDFGYDI SNYTDVHPIF
Cs.      GVGDLKGISE KVGYLKEIGM DGVWLSPIFD SPMADFGYDI SNFTKVFPQF
Dm.      GIGDLQGITS RLQYFKDTGI TSVWLSPIYE SPMVDFGYDI SNYTNIQPEY
A.m.maltas GIGDLKGIKD KLSHFIESGI TAIWLSPINR SPMVDFGYDI SDFKDVDPHF
Ls.      ---QWKGFAE IVNMSSAPF TFLP----- ---ILIAFSA TKRFGGNPYL

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            110        120        130        140        150
A.c.AG   GTLSDDLNLV NAAHEKGLKI ILDFVPNHTS DQHEWFQLSL K-----NIEP
A.m.AG   GTISDDLNLV SAAHEKGLKI ILDFVPNHTS DQHEWFQLSL K-----NIEP
Cs.      GDLSSIDELV AEFNKKDKMKL ILDFVPNHTS DQCEWFKKSI Q-----RDPE
Dm.      GTLEDFDALI AKANELGVKV ILDFVPNHSS NKHPWFIKSV A-----REPG
A.m.maltas GTIKDLEDLT AEAKQNKLKV ILDLVPNHTS DQHKWFQMSI NNTNNNTNKN
Ls.      GAAAGMMLVM PNLVN-GYGV AESIATGHMT ---YWHVFGL N-----IAQAG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            160        170        180        190        200
A.c.AG   YNNYYIWHPG -KIVNGKR-- -VPPTNWVG V FGGSASWRE ERQAYYLHQF
A.m.AG   YNNYYIWHPG -KIVNGKR-- -VPPTNWVG V FGGSASWRE ERQAYYLHQF
Cs.      YNDYYIWHPG KPNPDGGRN- -LPPTNWVSA FRSSAWEWNE ERGEYYLHQF
Dm.      YEDFYVWEDG ILLENGTR-- -VPPNNWLSV FSGSAWMWND ERQQYYLRQF
A.m.maltas YKDYIIVVDP VKDDKGNPIK DKYPNNWLSV FNGTGWTFHE GRKQFYFHQF
Ls.      YQGQVIPVIG VAFILANLE- -KFFHKHLND AVDFTFTPML SIIITGFLTF

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            210        220        230        240        250
A.c.AG   APEQPDNLNY NPVVLDDMQN VLRFWLRRGL DGFRVDALPY ICED-----M
A.m.AG   APEQPDNLNY NPVVLDDMQN VLRFWLRRGF DGFRVDALPY ICED-----M
Cs.      LAQQPDNLNYR NPKVVETMKN VLRFWLSKGI NGFRIDAVPY LFEVGPDANG
Dm.      TYGQPDNLNYR NPAVIKAMDD VMLFWLNKGI AGFRIDAIY IYED-----A
A.m.maltas YKQQPDNLNYR NSDVREEMKN IMKFWLDKGI DGFRIDAVPH LFES-----AN
Ls.      TLVGPALRIV SNGVTDLSLV AYQTLGAVGM GIFGLGYS AI VLTG-----

```


Figure 45. (continued)

					
	260	270	280	290	300
A.c.AG	RFLDEPLSGE	TNDPNKTEYT	LKIYTHDIPE	TYNIVRKFRD	VLDEFPQ---
A.m.AG	RFLDEPLSGE	TNDPNKTEYT	LKIYTHDIPE	TYNVVRKFRD	VLDEFPQ---
Cs.	NYPDEIETHA	CSDPLSQCYL	YHDYTQNRPE	TFEMVTEWRA	TLEEFKQKNG
Dm.	QLRDEPPSGT	TDDPNNEAYL	SHIYTRNQPE	DYGLLQHWQ	LLDNYTANHD
A.m.maltas	ISLDEPPLGK	NLNLSSLHASL	NHTLTKDQPE	TYELVKEWRD	FVDNYAEENK
Ls.	-LHQSFPAAE	TTLLADIAKT	GGSFIFPVAA	MANIAQGAAT	FAVFFVTKNK
					
	310	320	330	340	350
A.c.AG	--PKHMLIEA	YTNLSMTMKY	YD-----YGA	DFPFNFAFIK	NVSKDSNSSD
A.m.AG	--PKHMLIEA	YTNLSMTMKY	YD-----YGA	DFPFNFAFIK	NVSRDSNSSD
Cs.	GPTRVLMVEA	YAPLTKVIQI	YGQNGQLNGA	QIPFNFDFLN	NLGAVSNARD
Dm.	GPLRIMMTEG	YASVSQLEMY	YEDSNGVQGP	QFPFNFDFIT	ELNANSTAAD
A.m.maltas	RDEIVLLTEA	YSSLENTLKY	YE-----VGS	NVPFNFKFIT	DANSSSTPEQ
Ls.	QQKSLTTSAG	ISAMLGITEP	AL-----FGV	NLKLKFPFFI	GLIASGISSF
					
	360	370	380	390	400
A.c.AG	FKKLVDNWMI	YMPADGIPNW	VPGNHDQLRL	VSRFGEEKAR	MITAMSLLLP
A.m.AG	FKKLVDNWMT	YMPPSGIPNW	VPGNHDQLRL	VSRFGEEKAR	MITTMSLLLP
Cs.	FKDVIDNYLS	TIPEGATPNW	VQGNHDQHRS	ASRLGPQKAD	AVNMLLQVLP
Dm.	FVFYISRWLI	YMPHGHVANW	VMGNHDNPRV	ASRFGEKSVD	AMNMLLMTLP
A.m.maltas	FKVIIDNWIK	GTPQNNVPNW	VMGNHDRVVR	GTRY-PGRAD	HMIMLEMILP
Ls.	IIGLLHVLSV	SMGPAGIIGF	IAIAPKS---	-----IPSFM	MGAIISFVIA
					
	410	420	430	440	450
A.c.AG	GVAVNYYGDE	IGMSDT-YIS	WEDTQDPQGC	GAGKENYQTM	SRDPARTPFQ
A.m.AG	GVAVNYYGDE	IGMSDT-YIS	WEDTQDPQGC	GAGKENYQTM	SRDPARTPFQ
Cs.	GAAVTYYGEE	LAMEDV-FVP	WSRTVDPQAC	TTDPNIFHAK	SRDPARTPMI
Dm.	GIGITYNGEE	LGMTDYRDIS	WSDTVDPQAC	EAGIDNYKTI	SRDPERTPMQ
A.m.maltas	GVAVTYYGEE	IGMVDN----	-----	---TTIYKYD	VRDGCRTPFQ
Ls.	FVGTYLYGKK	AMKTTEEEII	NEAPATPEVV	ERLQDEKISA	PVTG--RIVD
					
	460	470	480	490	500
A.c.AG	WDDSVSAGFS	SSSD-----T	WLRVNENYKT	-INLAAEKKD	KNSFFNMFKK
A.m.AG	WDDSVSAGFS	SSSN-----T	WLRVNENYKT	-VNLAAEKKD	KNSFFNMFKK
Cs.	WTSQKNAGFS	SSNY-----T	WLPTGPDYRK	-NNVEVQRSQ	RGSHLNIFKK
Dm.	WSSDVNAGFS	SADR-----T	WLPVNPNYKE	-LNLRNQQA	RRSHYKIYQS
A.m.maltas	WDNSINAGFS	KIAENLLEKN	WLPVHTSYKS	GLNLEQEKKD	SISHYHLYTN
Ls.	LASVPDPVFA	SEAMG----K	GIAIMPTSQD	VLAPVTGVIT	IAANTGHAYG

Figure 45. (continued)

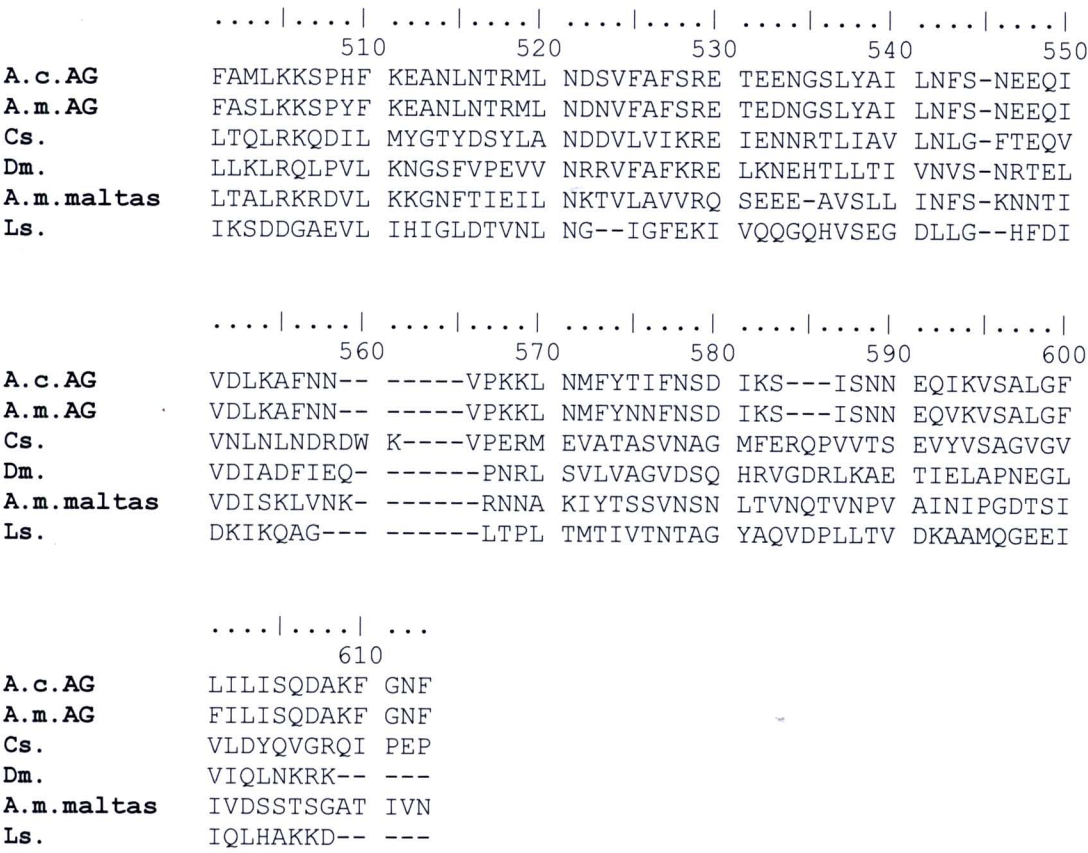


Figure 45. The multiple alignments of amino acid sequences deduced from cDNA sequence of AG in *A. cerana* and that in other organisms.

Aligned sequences were imported into a phylogenetic analysis program, PAUP (version 4.0b). One tree was founded from each program when UPGMA and Neighbor - joining programs were used for the analysis. As shown in Figs. 46 and 47, phylogenetic trees from deduced amino acid were constructed. A pattern of genetic distance was observed from both Figs. 46 and 47. The obtained trees from each program share similar characters. AG amino acid sequence of *A. cerana* is mostly closed to AG amino acid sequence of *A. mellifera*.

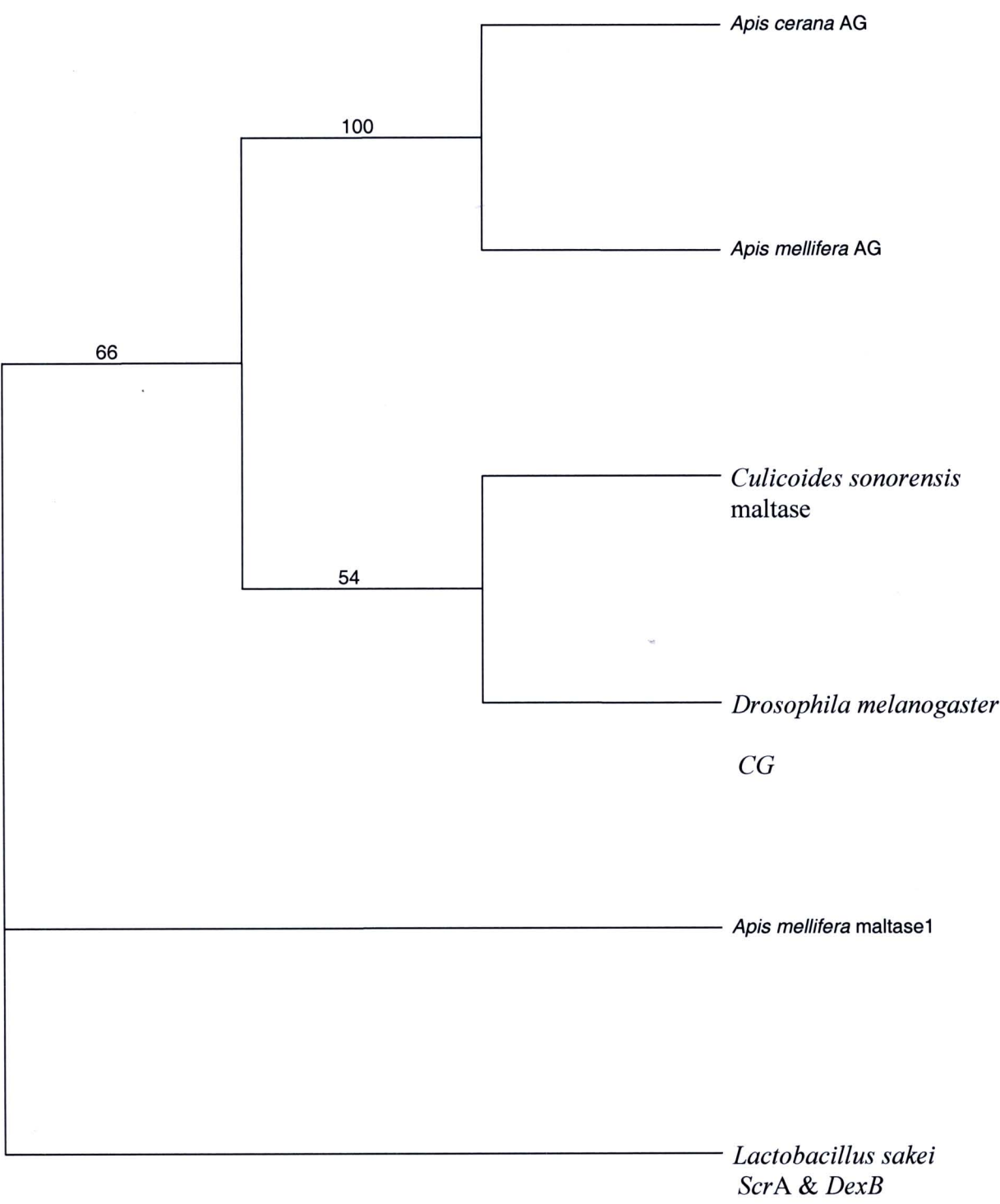


Figure 46. Phylogenetic trees illustrating the genetic relationship among amino acid sequences of various species by Neighbor - joining. Numbers above branches indicate bootstrap support percentage over 50% in 1000 replicates. Amino acid sequences of AG from *A. mellifera* maltase 1 and *Lactobacillus sakei* were used as outgroups.

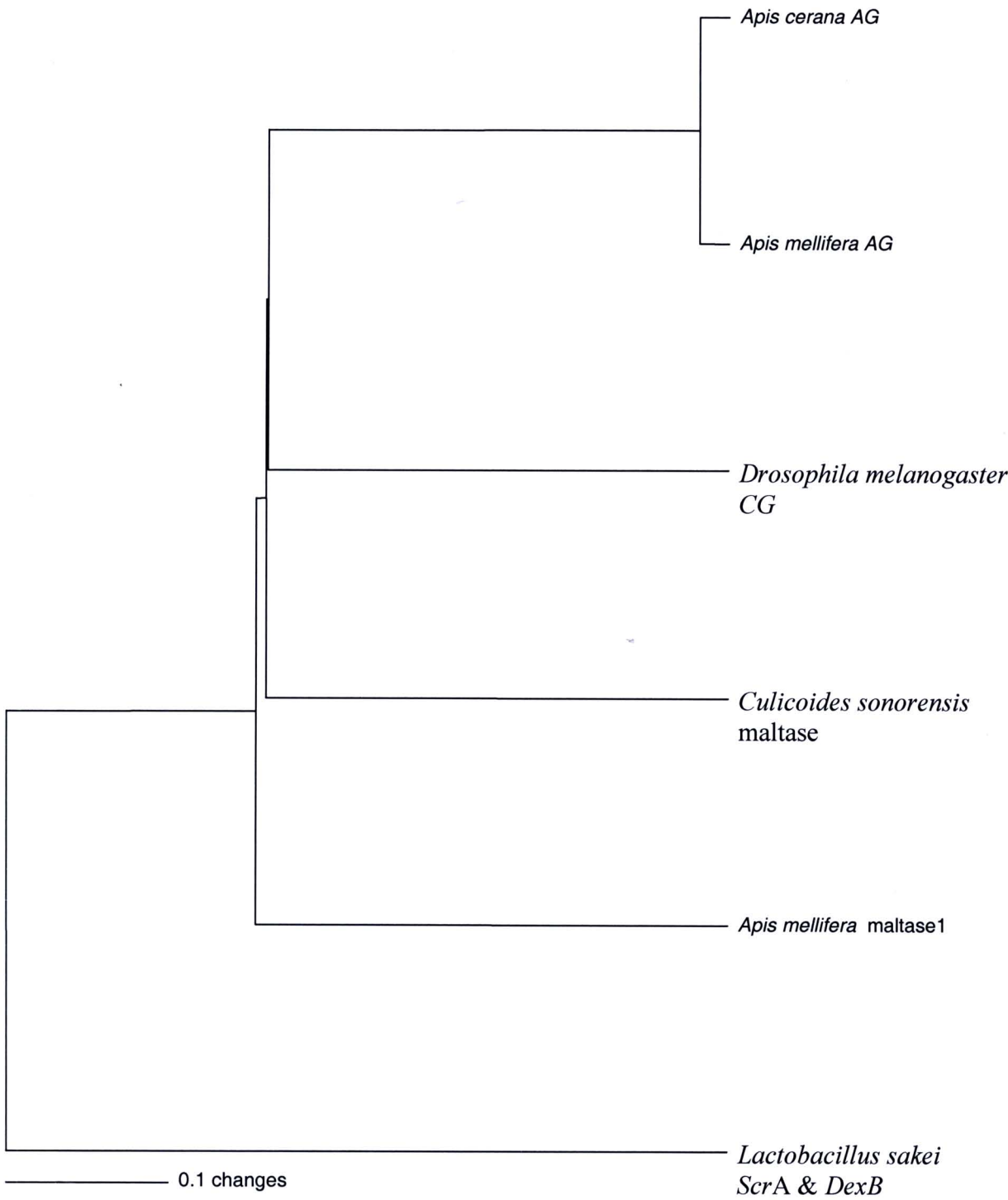


Figure 47. UPGMA tree of the genetic relationship among amino acid sequences of various species. *Lactobacillus sakei* was used as an outgroup.

4. Denaturation and renaturation of AG

4.1. SDS - polyacrylamide gel electrophoresis of crude extract

Crude extract of hypopharyngeal glands (HPGs) and honey crops was quantitated for protein by Bradford's assay. Due to standard curve of BSA, higher protein content (1.03 g/ g) was obtained from honey crops (table 7).

Table 7. Protein content in crude of HPGs and honey crop.

Protein source	Amount (g/ g)
HPGs	< 0.33
Honey crop	1.03

Later, crude was separated by SDS – PAGE and stained by coomassie brilliant blue (CBB). Different pattern of protein in crude extract was visible on SDS - PAGE as in Fig. 48. Honey crop crude shows widely MW ranging from 10 to 225 kDa while HPGs crude has two major proteins with approximate MW of 50 and 75 kDa.

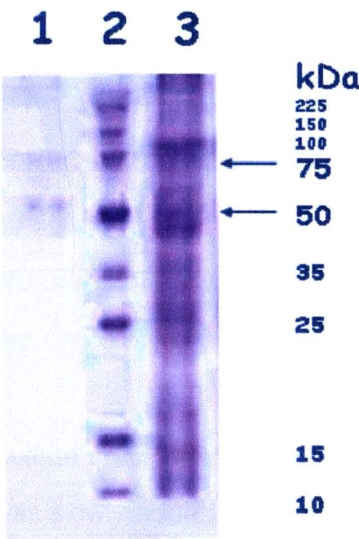


Figure 48. SDS - PAGE of HPGs and honey crop.

Lane 1: crude extract of HPGs (50 µg)

Lane 2: Broad range protein marker

Lane 3: crude extract of honey crop (50 µg)

Then, the CBB gel was renatured and stained for AG activity. Only single activity band was appeared in both HPGs and honey crop (Fig.49).

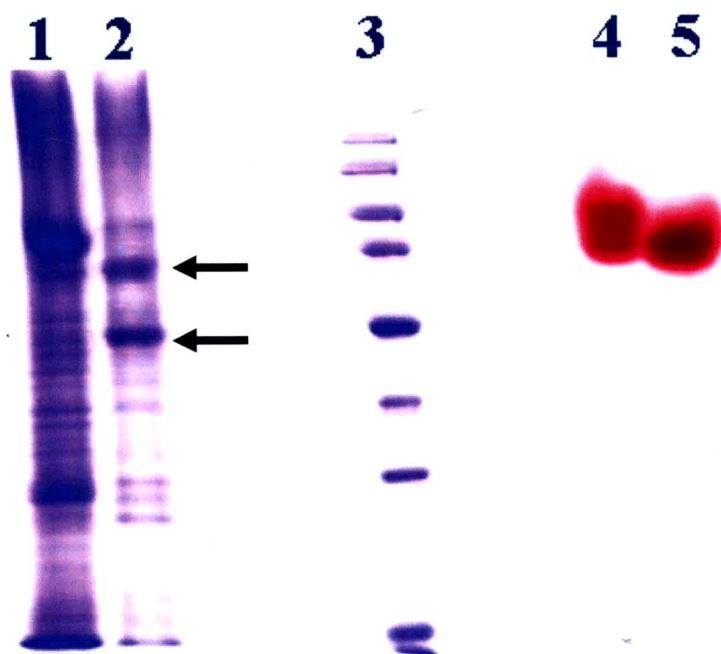


Figure 49. Renaturation of AG from HPGs and honey crops. Arrows indicate two major subunit bands.

Lane 1: crude of honey crop (50 µg; CBB gel)

Lane 2: crude of HPGs (50 µg; CBB gel)

Lane 3: protein marker

Lane 4: renatured crude of HPGs (50 µg)

Lane 5: renatured crude of honey crops (50 µg)

5. Ammonium sulfate precipitation

Crude extract was slowly added by solid ammonium sulfate (AS) to be 0 - 30, 30 - 40, 40 - 50, 50 - 60, 60 - 70, 70 - 80, and 80 - 95% saturation, respectively. Later, the suspension was dialyzed by dialysis bag at MWCO 3500. As shown in Fig. 50 and table 8, the specific activity of AG was high in unprecipitated suspension (0.87 u/ mg). Low specific activity was assayed from suspension with low concentration of AS. The specific

activity got increasing when the concentration of AS was increased. Saturation of AS (95%) was used for purification since it provided the highest specific activity.

Table 8. Specific activity of AG after various AS saturation.

% Ammonium sulfate saturation	Specific activity (u/ mg)
Not precipitated	0.87
0-30	0.17
30-40	0.15
40-50	0.21
50-60	0.28
60-70	0.46
70-80	1.23
80-95	1.36

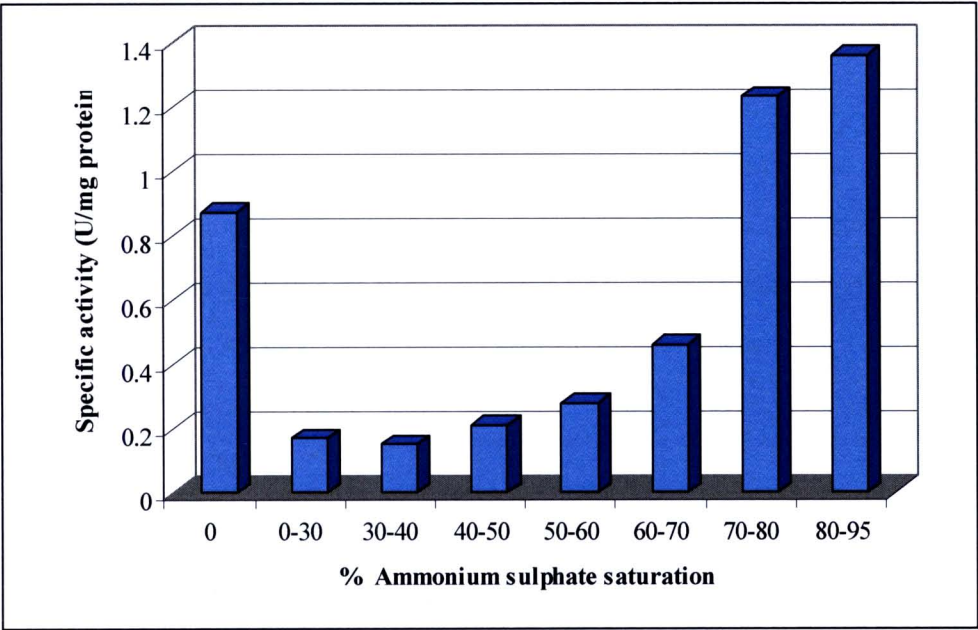


Figure 50. Specific activity of AG precipitated by a stepwise increase of AS concentration.



Precipitated crude was separated by SDS – PAGE. Less protein bands were observed than in unprecipitated crude. Protein band of 100 kDa was observed in unprecipitated crude only while protein band of 75 kDa was observed in all samples (Fig.51).

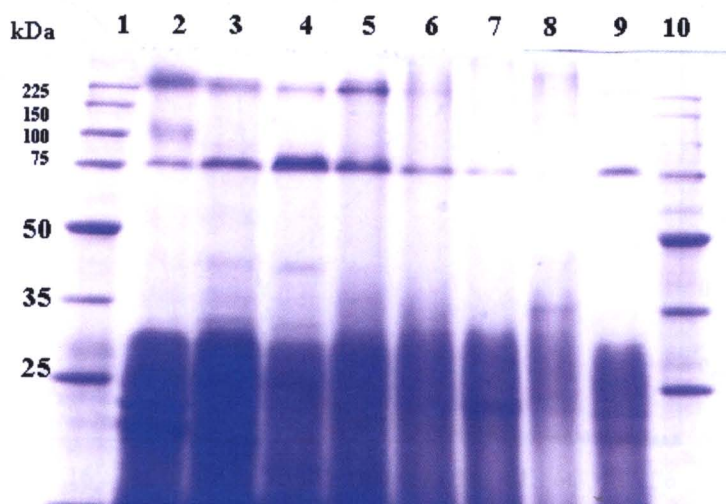


Figure 51. SDS - PAGE of protein (50 µg/ lane) saturated by various concentrations of AS.

Lane 1: Protein marker	Lane 2: unprecipitated protein
Lane 3: 0 - 30% AS saturation	Lane 4: 30 - 40% AS saturation
Lane 5: 40 - 50% AS saturation	Lane 6: 50 - 60% AS saturation
Lane 7: 60 - 70% AS saturation	Lane 8: 70 - 80% AS saturation
Lane 9: 80 - 95% AS saturation	Lane 10: Protein marker

6. Purification of AG

6.1 Ion Exchange Chromatography

Crude protein was applied to DEAE – cellulose column (1.6 × 17 cm) as mentioned in Materials and Methods. After elution and AG assay, it showed that activity in Peak I (fractions no. 2 - 12) was not bounded to DEAE - cellulose column. While being eluted by gradient of 0 - 1 M NaCl, activity from Peak II (fractions no. 28 - 33) was eluted at 0.13 M NaCl (Fig. 52).

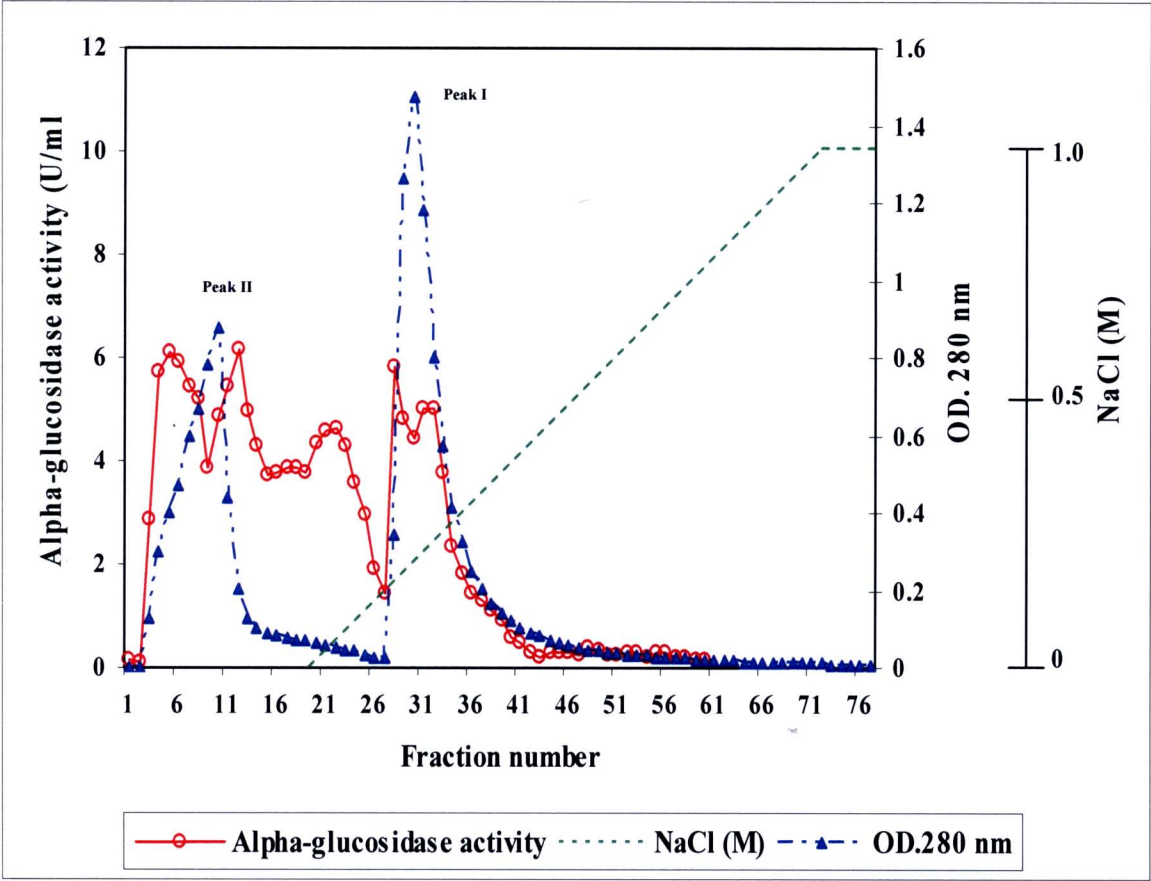


Figure 52. Purification of AG on DEAE - cellulose. Equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 1 M NaCl; flow rate 60 ml/ h; fraction size 10 ml/ fraction.

Furthermore, active and unbound fractions (fractions no. 2 - 12) from DEAE - cellulose column (20 ml) were subjected to CM - cellulose column (1.6 × 17 cm) equilibrated by 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7). Bound materials were eluted by a linear gradient of 0 to 1 M NaCl at flow rate of 0.5 ml/ min and maintained at 4°C. Two main peaks of protein were eluted from CM - cellulose column but there was no activity peak as shown in Fig. 53.

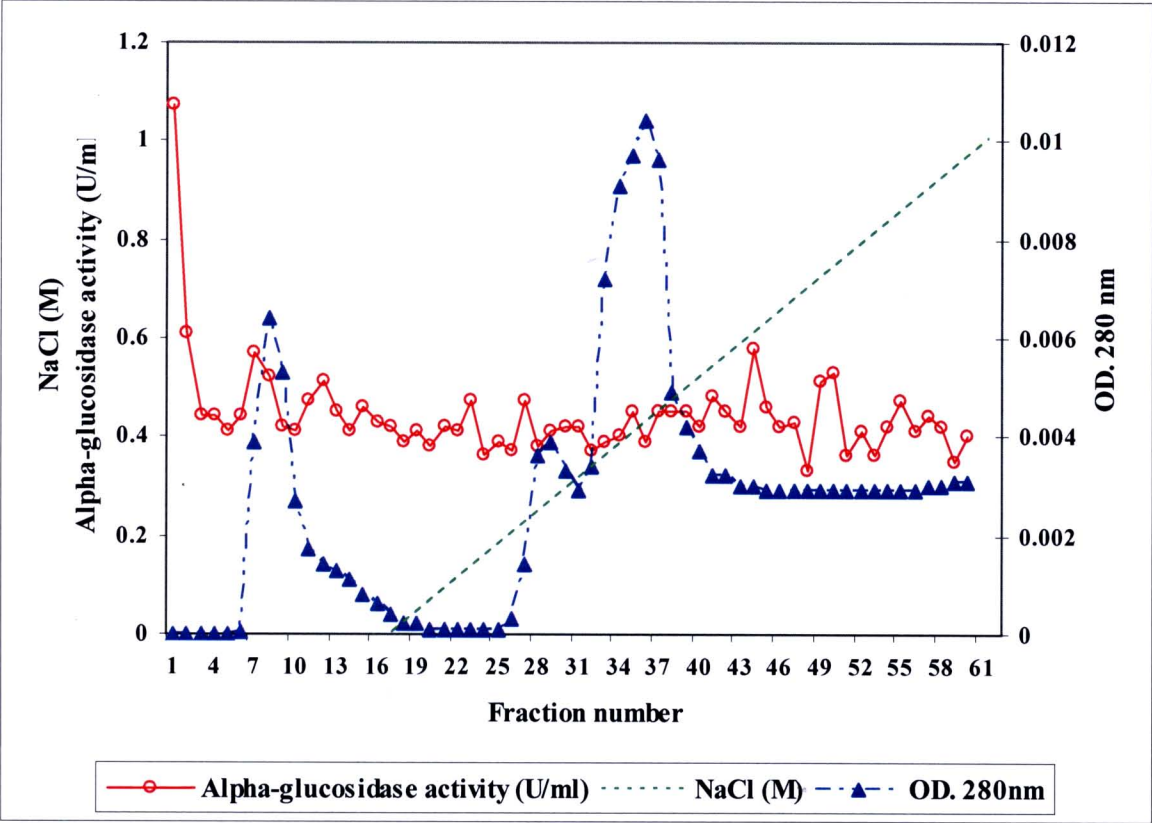


Figure 53. Purification of AG on CM - cellulose. Equilibrium, 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 1 M NaCl; flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.

6.2 Gel filtration chromatography

Unbound (peak I) and bound peaks (peak II) from Fig.52 were concentrated and injected onto a gel filtration column (Superdex 200). Considering Fig. 54, AG activity was eluted after the protein peak. Highest peak containing the specific activity of 1.804 u/ mg was collected. The purification fold was calculated to be 2.59 (table 9). Due to Fig. 55, AG activity was discovered after the protein peak. The highest peak (fractions no. 17 – 22) contained the specific activity of 1.032 u/ mg. Also, the purification fold was 1.48 as shown in table 9.

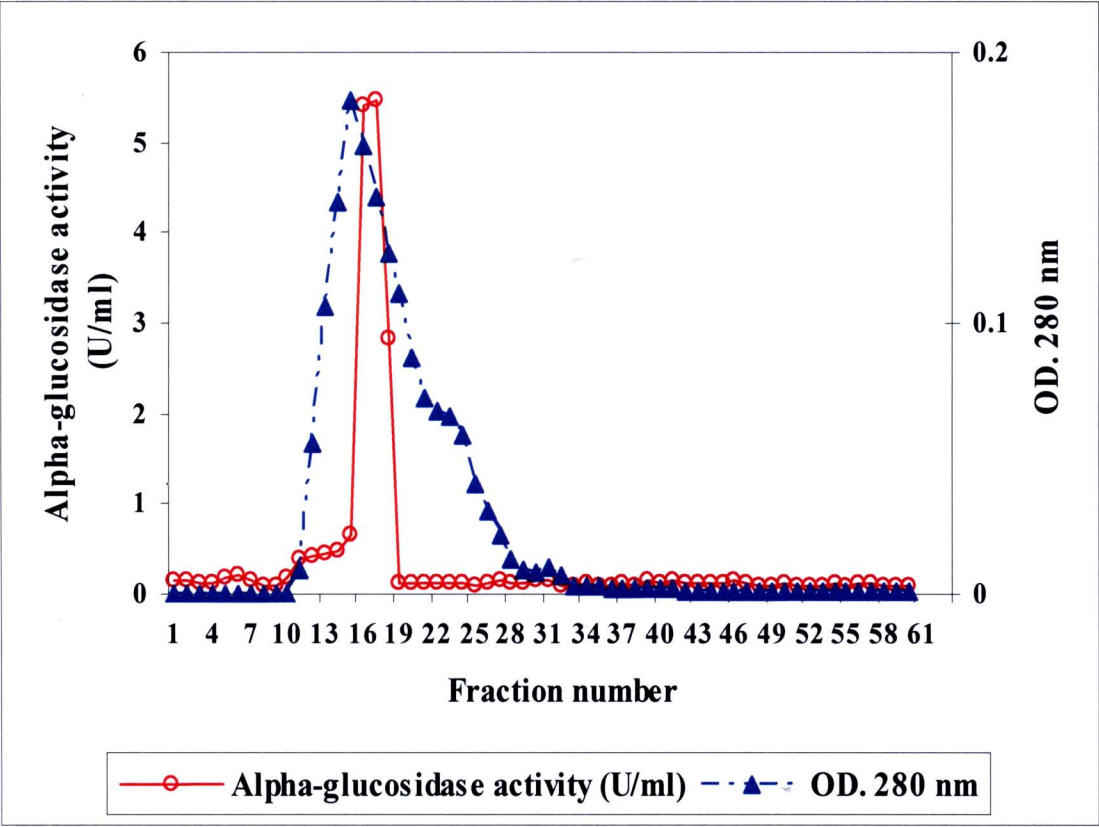


Figure 54. Pooled bound fractions containing AG activity were applied to gel filtration Sephadex 200 column. Equilibration and elution, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.

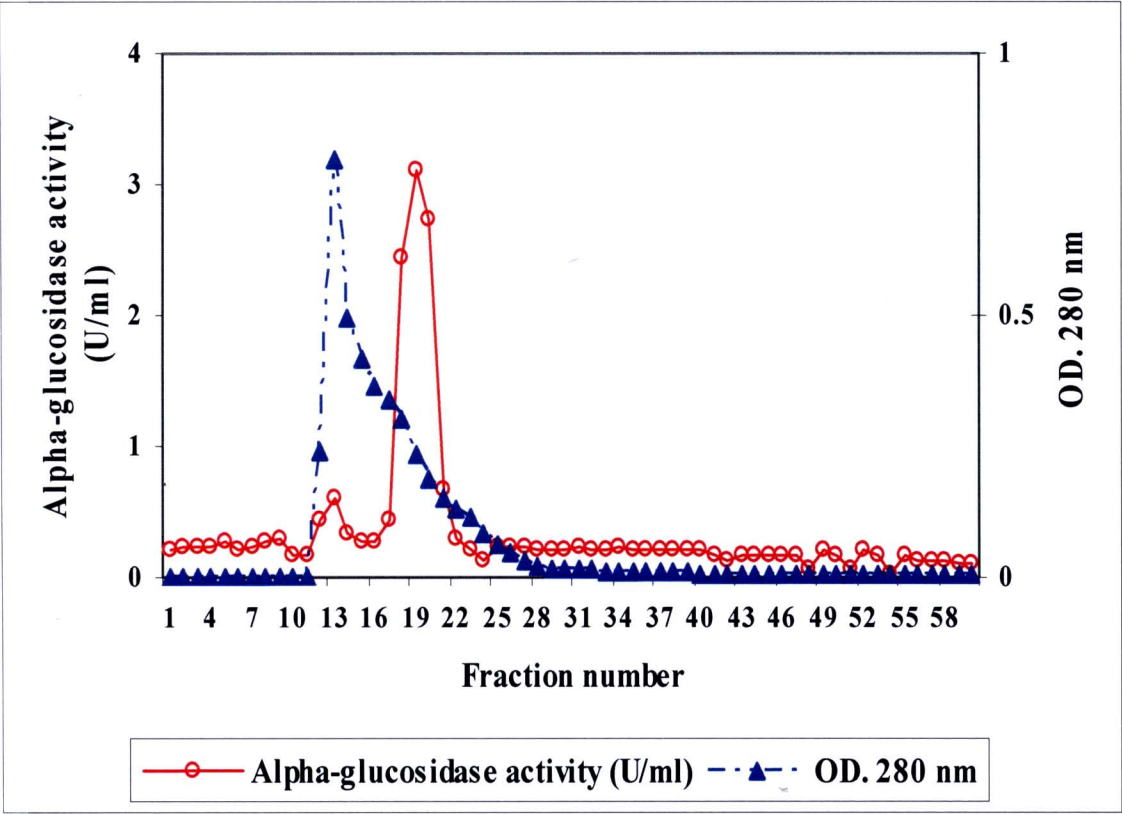


Figure 55. Pooled unbound fractions containing AG activity was applied to a gel filtration Sephadex 200 column. Equilibration and elution, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.

Table 9. Summary of purification procedures of AG.

Procedure	Total protein (mg) ^a	Total activity (unit) ^b	Specific activity (unit/ mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude protein ^c	5951.2	4145.2	0.696	100	1
95% sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	1302	306	0.235	7.382	0.34
DEAE cellulose	137.5	298.5	2.171	7.201	3.11
Superdex 200 (bound)	75.9	136.92	1.804	3.303	2.59
Superdex 200 (unbound)	93	96	1.032	2.315	1.48
CM cellulose (unbound)	77.7	12	0.154	0.289	0.22

^aThis was calculated on the basis of the fact that E^{1%}_{1cm} at 280 nm.

^bAlpha - glucosidase activity

^cThis corresponded to the amount of protein from 430 g of honey bees.

In order to avoid the loss of AG activity during AS precipitation, crude extract (150 mg) was directly applied to DEAE - cellulose and CM - cellulose columns. The result of purification was presented in Figs. 56 and 57.

Due to fig. 56, specific activity (0.757 u/ mg) in fractions no. 6 - 11 was determined. The purification fold was 1.21. Also, in Fig. 19, specific activity (0.53 u/ mg) in fractions no. 7 – 12 from CM - cellulose was observed but purification fold was 0.85. The result was in table 10.

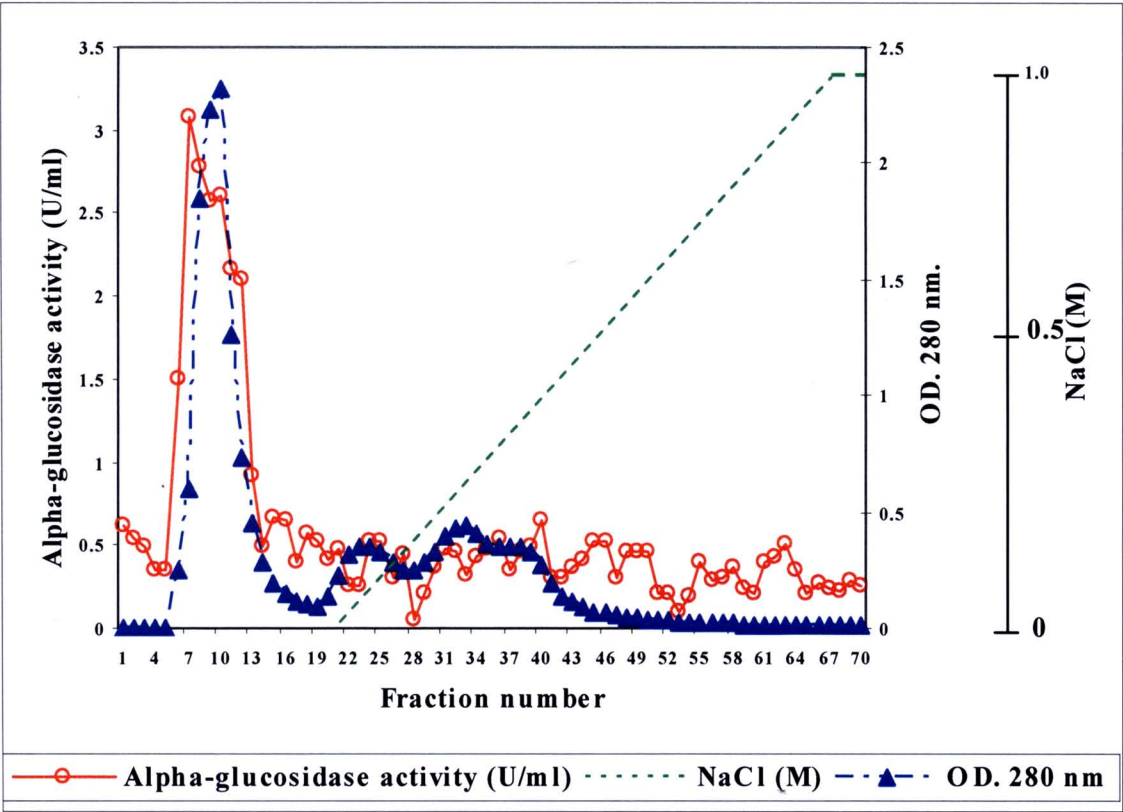


Figure 56. Chromatography of AG on DEAE – cellulose. Equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 1 M NaCl; flow rate 60 ml/ h; fraction size 10 ml/ fraction.

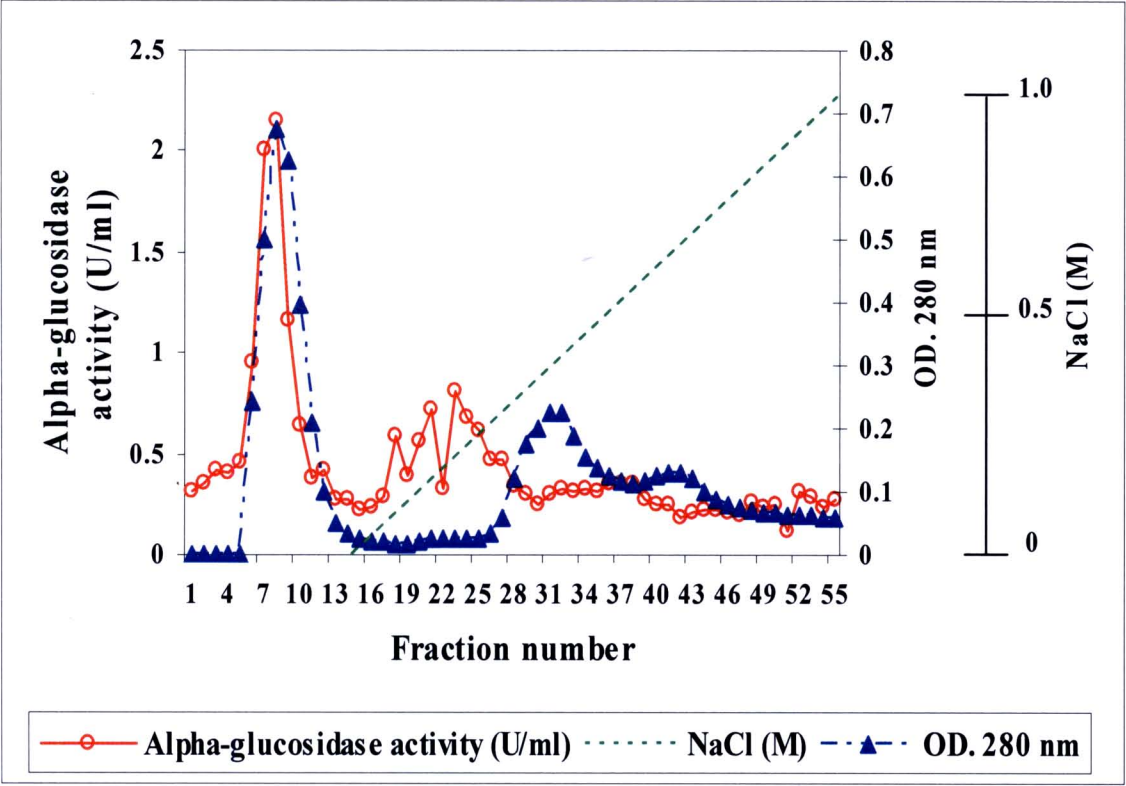


Figure 57. Chromatography of AG on CM - cellulose. Equilibrium, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 1 M NaCl; flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.

Table 10. Purification procedures of unprecipitated crude.

Procedure	Total protein (mg) ^a	Total activity (unit) ^b	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude protein ^c	1044	654.9	0.627	100	1
DEAE - cellulose	139.2	105.4	0.757	16.09	1.21
CM - cellulose (unbound)	65	34.5	0.530	5.27	0.85

^aThis was calculated on the basis of the fact that E^{1%}_{1cm} at 280 nm.

^bAlpha - glucosidase activity

^cThis corresponded to the amount of protein from 100 g of honey bees.

7. SDS - PAGE of purified AG

Purity of AG (from precipitated crude of 95% AS) was checked by SDS - PAGE as shown in Figs. 58 (A), (B), and 60. The R_f and mass weight (MW) was plotted (Figs. 59 and 61). The molecular mass of AG was preliminarily estimated to be 68 kDa. Activity staining was performed in order to determine the AG (Figs. 62 and 63). After SDS - PAGE, the first part of the gel was CBB stained. The copied gel was renatured in Triton X - 100 and activity stained as mentioned in Materials and Methods. The activity band of MW between 50 – 75 kDa was clearly visible.

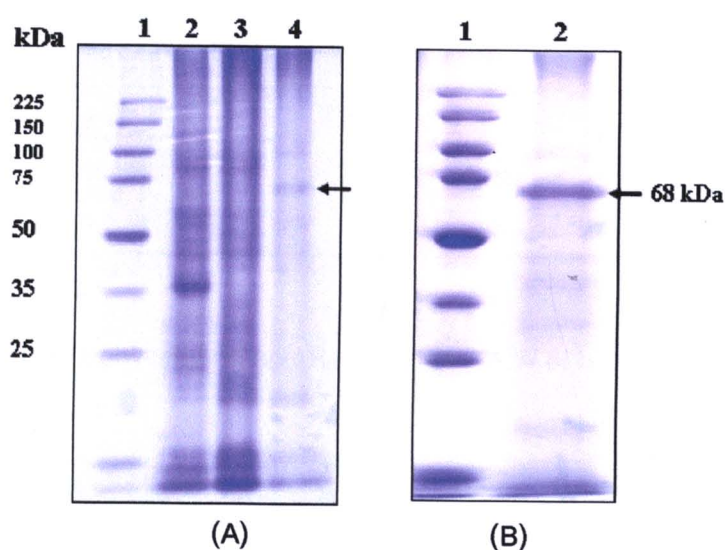


Figure 58. SDS - PAGE and CBB.

A:

Lane 1: broad range protein marker

Lane 2: crude protein (100 μ g)

Lane 3: 95% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate (50 μ g)

Lane 4: pooled active fraction of DEAE - cellulose (30 μ g)

B:

Lane 1: broad range protein marker

Lane 2: pooled active fractions of Superdex 200 (50 μ g)

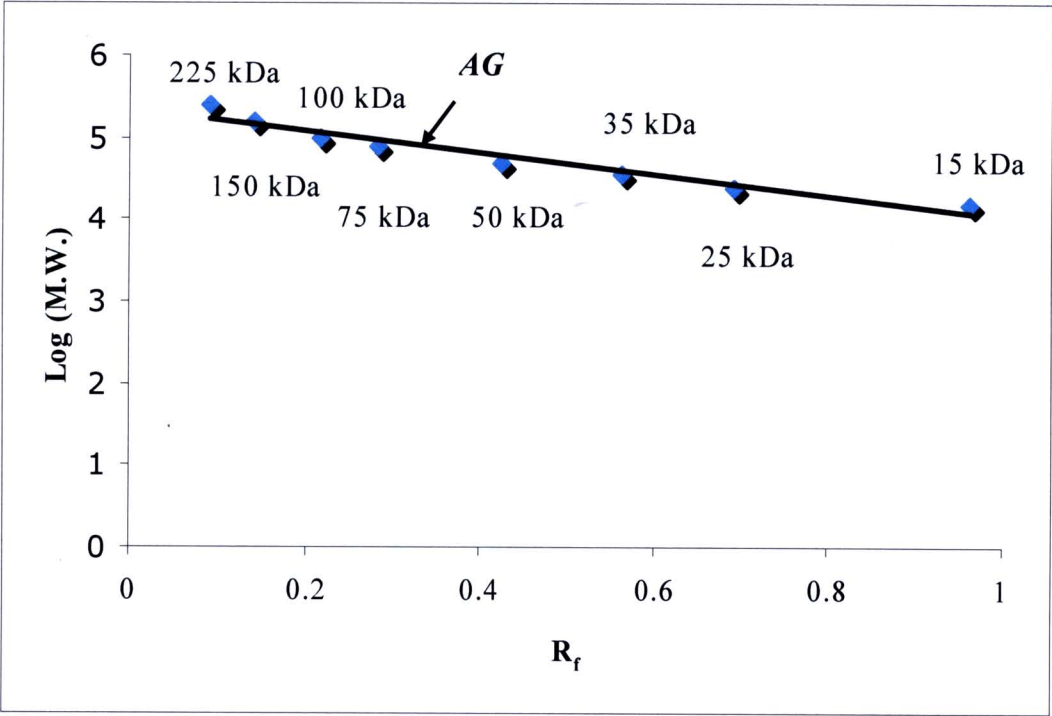


Figure 59. Relationship between Log and R_f of standard MW of broad range protein marker.

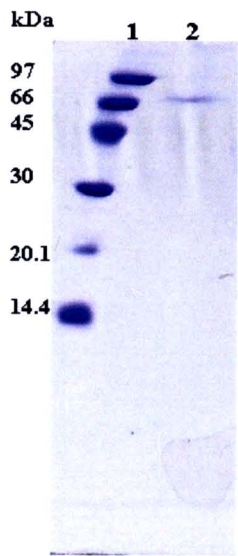


Figure 60. SDS - PAGE and CBB.

Lane 1: low molecular weight (LMW) marker

Lane 2: pooled active fractions of Superdex 200 (20 μ g)

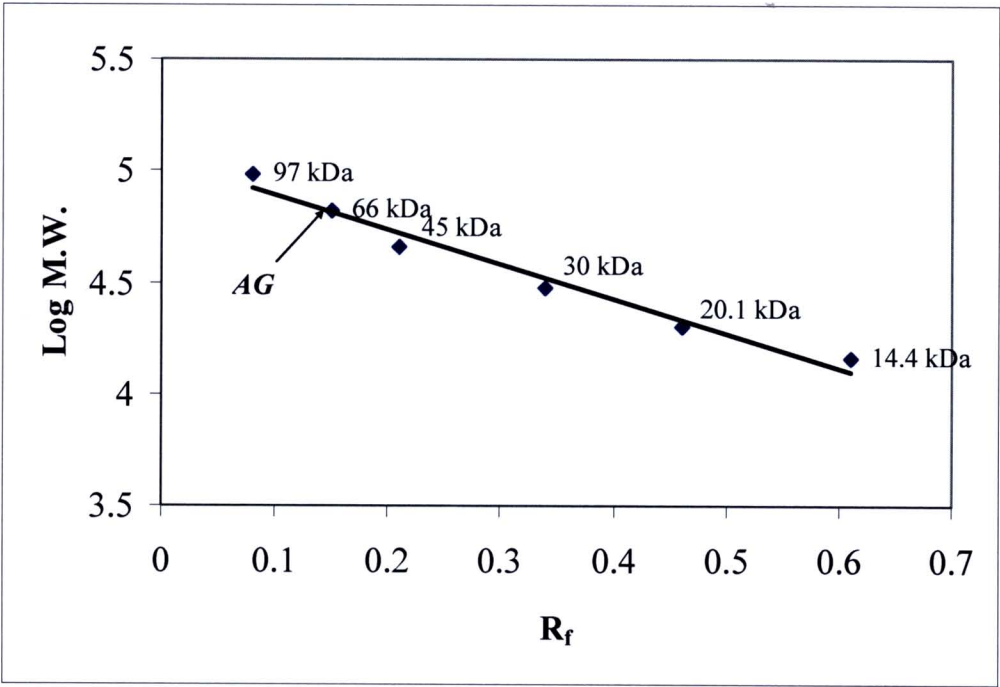


Figure 61. Relationship between Log and R_f of low molecular weight (LMW). The LMW standard containing phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α -lactalbumin (14.4 kDa).

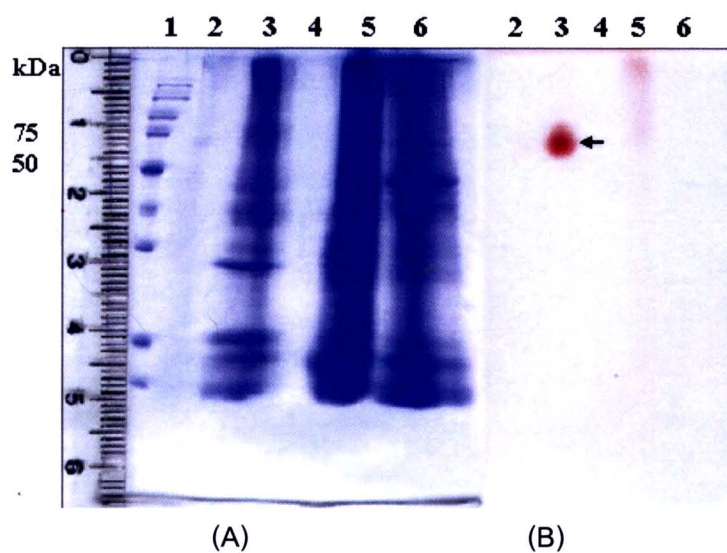


Figure 62. CBB (A) and activity stain (B) of SDS polyacrylamide (12.5%). An arrow indicates an activity band of AG after renaturation.

Lane 1: broad range protein marker

Lane 2: pooled active fractions from Superdex 200 (10 μg); bound peak from DEAE - cellulose

Lane 3: pooled active fractions from Superdex 200 (50 μg); unbound peak from DEAE - cellulose

Lane 4: pooled active fractions from CM - cellulose (10 μg); unbound peak from DEAE - cellulose

Lane 5: pooled active fractions from DEAE - cellulose (120 μg) from unprecipitate

Lane 6: represents CM-cellulose (80 μg) from unprecipitate

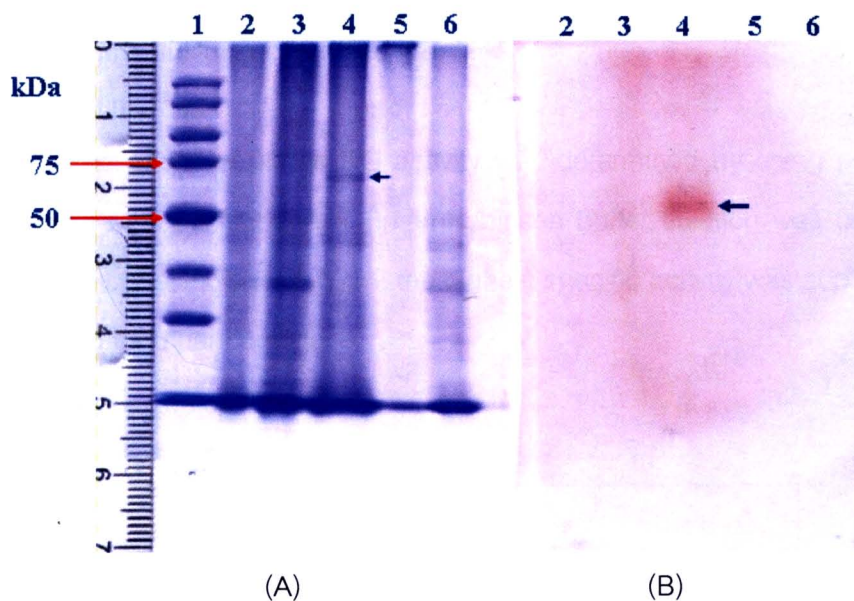


Figure 63. CBB (A) and activity stain (B) of SDS polyacrylamide (10%). Arrows indicate AG bands in both conditions.

Lane 1: broad range protein marker

Lane 2: crude protein (20 μg)

Lane 3: precipitate with 95% AS saturation (50 μg)

Lane 4: pooled active fractions from unbound peak of DEAE - cellulose
(30 μg)

Lane 5: pooled active fractions from Superdex 200 (fractions no. 12 – 16);
unbound peak from DEAE – cellulose (10 μg)

Lane 6: pooled active fractions from Superdex 200 (fractions no. 17 – 23);
unbound peak from DEAE – cellulose (20 μg)

8. Optimum conditions of purified AG

8.1 Optimum pH

The effect of pH on AG activity was determined by using purified AG. Sucrose was used as the substrate. Britton-Robinson buffer solution was used as the buffer to adjust pH. As shown in Fig. 64, the highest specific activity was at pH 5.0. This pH was then used for other conditions.

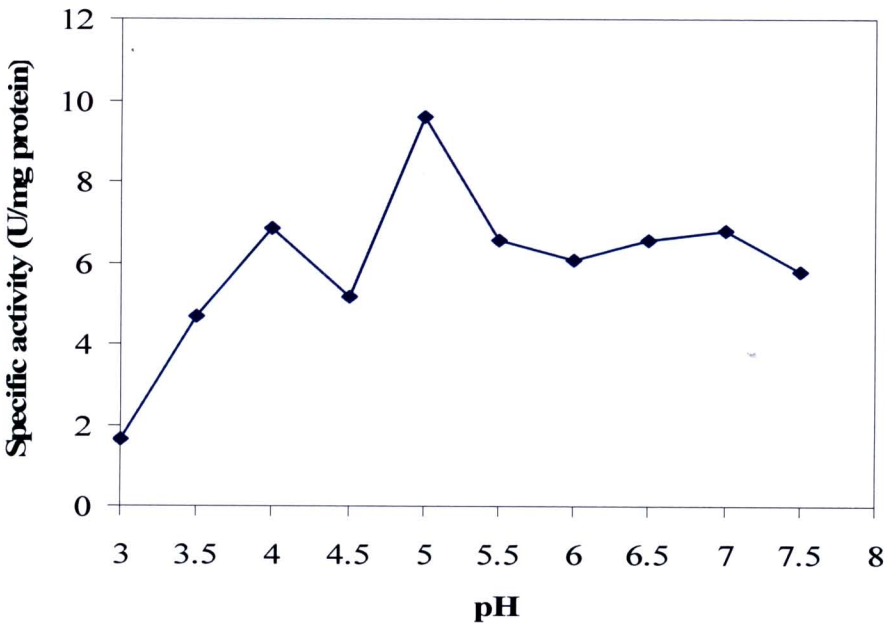


Figure 64. The optimum pH of purified AG. Briton - Robinson buffer at various pHs ranging between 3.0 - 7.5 was used. The optimum pH was 5.0.

8.2 Optimum temperature

The result of optimum pH (pH 5.0) for AG activity was used for this experiment. Acetate buffer (pH 5.0) containing 0.1 M sucrose was used as the substrate buffer. The highest specific activity was at 50°C as shown in Fig. 65. This temperature was further used for selective concentration of substrate.

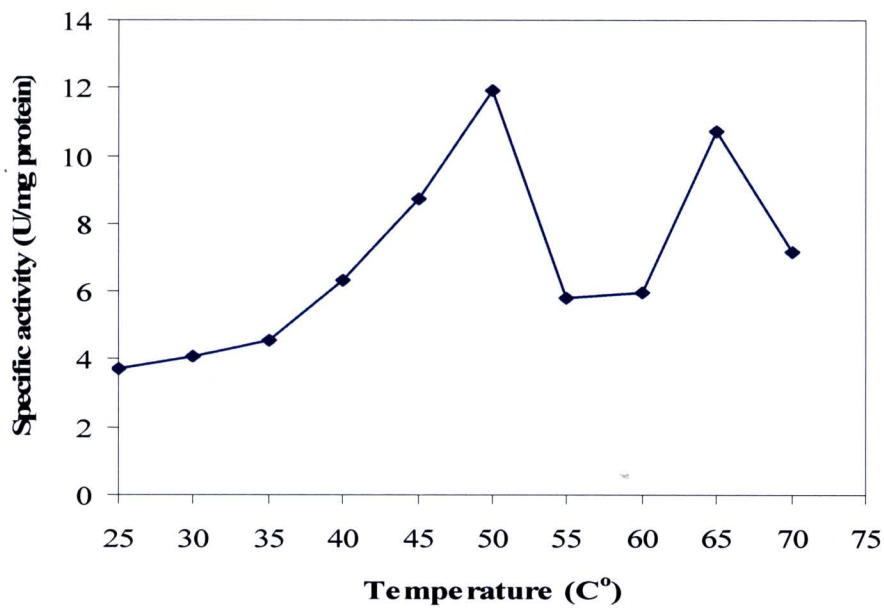


Figure 65. The optimum temperature of purified AG. The reaction mixture in acetate buffer (pH 5.0) containing 0.1 M sucrose was incubated at various temperatures ranging between 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, and 70°C for 10 min. The optimum temperature was 50°C.

8.3 Selective concentration of substrate

The results of optimum pH (pH 5.0) and optimum temperature (50°C) were used for this experiment. The mixture was prepared in various concentrations of sucrose from 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70 mM. The reaction was continued for 10 min. The highest specific activity was in a reaction containing 60 mM sucrose (Fig. 66).

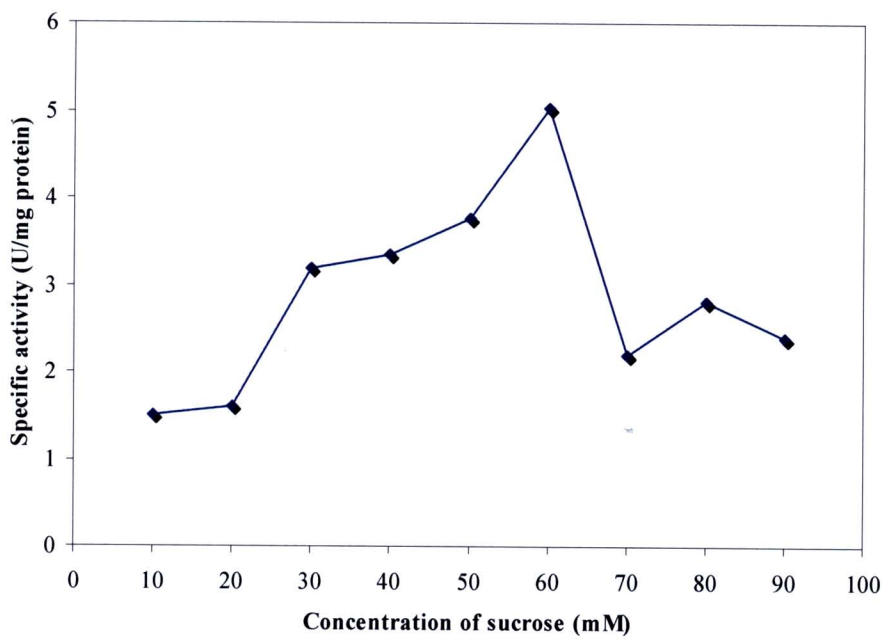


Figure 66. The optimum concentration of sucrose as substrate. The reaction mixture was incubated with sucrose at various concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 mM, respectively. The optimum concentration of sucrose was 60 mM.

8.4 Optimum incubation time

The effect of incubation time was studied. The reaction mixture in acetate buffer (pH 5.0) containing 60 mM sucrose was incubated at 50°C. The incubation time was varied from 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70 min, respectively. The highest specific activity was obtained from the incubation time of 50 min (Fig. 67).

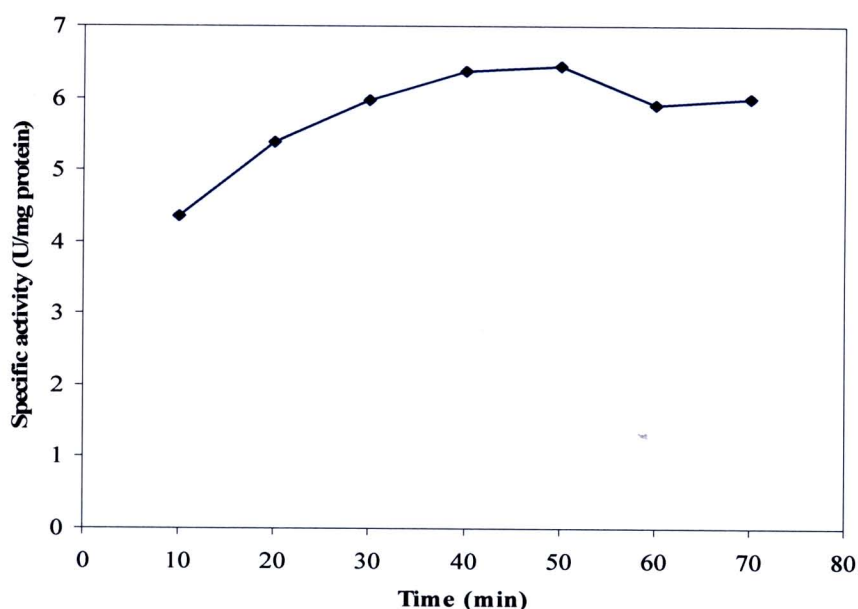


Figure 67. The optimum incubation time of purified AG. The reaction mixture was incubated for 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70 min, respectively. The optimum incubation time was 50 min.

9. Protein identification

A two - dimensional (2 - D) gel of AG with the different immobilized pH gradients (IPG; pH 3 - 10) was demonstrated in Fig. 68. A 2 - D gel was spotted by many types of protein with various molecular mass ranging between 14.4 - 97 kDa. There were more protein spots in CBB - stained gel (12.5% T, 2.6% C, and pH 3 - 10). Most of protein spots are grouped in the bottom region, which range between pH 4.0 - 8.0. The circle protein spot in Fig. 68 is interesting, it is molecular mass ranging between 66 - 97 kDa and ranging of pH 6 - 7. Some of protein spots are grouped in right region, which is the basic (high pI) region. These can be presumed that most of proteins from *A. cerana*

are basic proteins. The narrow pI range (pH 6 – 8) gel image reveals the protein much clearer than a wide pI range (pH 4 – 9) gel.

The protein bands of interest [Figs. 20B (lane 2) and 25A (lane 4)] were manually excised and in – gel digested with trypsin. In contrast, for in – solution digestion with trypsin, fraction no. 17 of Superdex 200 (bound peak from DEAE – cellulose) was used. The tryptic fragments from both digestions were used for protein identification via a peptide mass mapping technique. The amino acid of AG from *A. mellifera* digested by trypsin was simulated by the MassLynx software of BioLynx, Protein/ peptide editor. Therefore, both in – gel and in – solution digestions were used for the peptide mass mapping technique. MALDI – TOF mass spectra of tryptic fragments are shown in Appendix H. The significant peaks in mass spectra were shown in table 11 and Fig. 69.

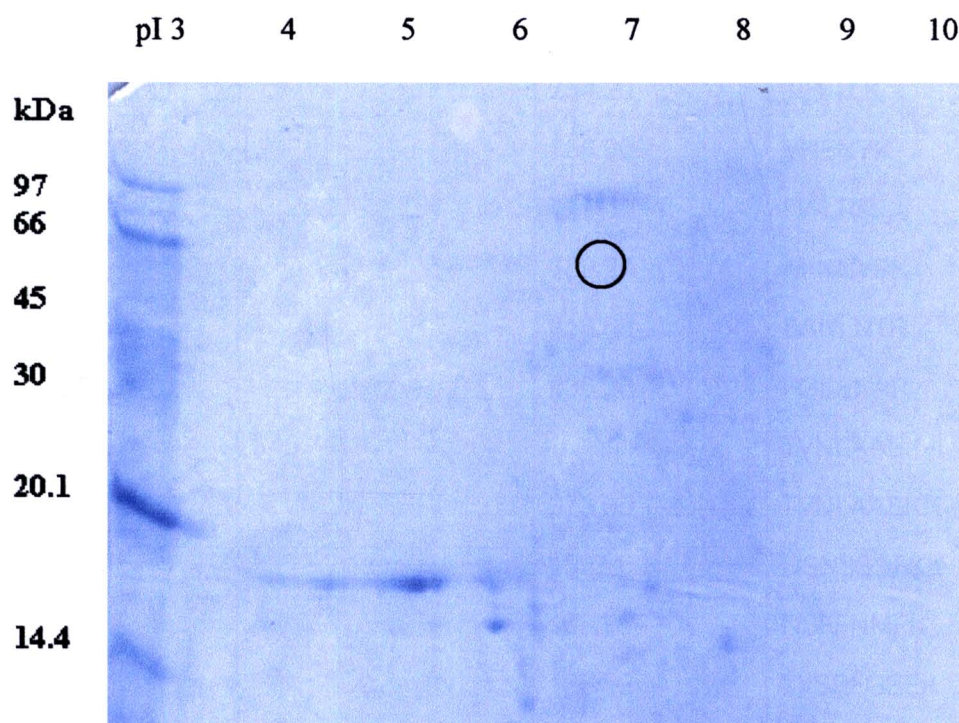


Figure 68. A 2 – D gel of AG by CBB – stained gel (12.5% T, 2.6% C, and pH 3 – 10).

Table 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.

Observed Mass* (m/ z)			Sequences of tryptic fragments
<i>A. mellifera</i> [Mass (Da)]	<i>A. cerana</i> [Mass (Da)]		
	In – gel	In – solution	
530.32	350.97	530.59	IVNGK
609.29		608.36	FGEEK
641.33	641.87		SPYFK
686.43	686.56	686.31	IVNGKR
693.43		693.36	FASLKK
698.33		698.9	GFDGFR
754.40		754.20	TEYTLK
766.37		766.09	VNENYK
777.45		777.41	FWLRR
789.43		789.27	AFNNVPK
817.42		816.68	EANLNTR
836.43		836.38	FGEEKAR
845.47	845.71		TVNLAAEK
973.57		973.95	TVNLAAEKK
1028.45		1027.59	DSNSSDFKK
1034.48		1033.59	NSFFNMFK
1064.57		1064.25	LVSRLFGEK
1467.67		1468.27	ENYQTMSRDPAR
1756.93		1757.53	EDLIVYQVYPRSFK

```

1  MKAVIVFCLM ALSIVDAAWK PLPENLKEDL IVYQVYPRSF KDSNGDGIGD
51  IEGIKEKLDH FLEMGVDMFW LSPIYSPMV DFGYDISNYT DVHPIFGTIS
101 DLDNLVSAAH EKGLKIILDF VPNHTSDQHE WFQLSLKNIE PYNYYIWHP
151 GKIVNGKRVP PTNWVGVEGG SAWSWREERQ AYYLHQFAPE QPDLNYYNPV
201 VLDDMQNVLR FWLRRGFDGF RVDALPYICE DMRFLDEPLS GETNDPNKTE
251 YTLKIYTHDI PETYNVVRKF RDVLDEFPQP KHMLIEAYTN LSMTMKYYDY
301 GADFPFNFAF IKNVSRDSNS SDFKKLVDNW MTYMPPSGIP NWVPGNHDQL
351 RLVSRFGEEK ARMITTMSLL LPGVAVNYYG DEIGMSDTYI SWEDTQDPQG
401 CGAGKENYQT MSRDPARTPF QWDDSVSAGF SSSSNTWLRV NENYKTVNLA
451 AEKKDKNSFF NMFKKFASLK KSPYFKEANL NTRMLNDNVF AFSRETEDNG
501 SLYAILNFSN EEQIVDLKAF NNVPKKLNMF YNNFNSDIKS ISNNEQVKVS
551 ALGFFILISQ DAKFGNF

```

Figure 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.

Conclusions

1) Various primers of alpha – glucosidase (AG) for RT – PCR were designed from AG in *A. mellifera*. Under the optimum condition, the length of 1,740 bp was obtained. The similarity of the sequence to that in *A. mellifera* is 96%, to maltase 1 in *A. mellifera* at 53.44%, to maltase in *Culicoides sonorensis* at 48.75%, and to CG in *Drosophila melanogaster* at 53.66%.

2) The deduced amino acid of AG (567 amino acid) in *A. cerana* was obtained.

3) Due to phylogenetic trees of amino acid sequence by UPGMA and NJ, it supports the data of blast. It can be summarized that *A. cerana* AG is mostly similar to *A. mellifera* AG.

4) Crude protein was extracted and determined by Bradford's assay (Bradford, 1976). There is less than 0.33 g/ g protein in hypopharyngeal glands (HPGs) but there is 1.03 g/ g protein in honey crop. Due to SDS – PAGE, different patterns of crude protein from both sources were obtained. Protein at MW of about 75 kDa was found in both

sources while protein at MW of 50 kDa was found only in HPGs crude. After renaturation of AG in crude, a positive band at the MW of 75 kDa was visible.

5) The AG activity (by Momose's method) was assayed from honeybee worker (500 g). They were homogenized to be crude (0.696 u/ mg), precipitated with 95% ammonium sulfate (0.235 u/ mg), and purified by DEAE - cellulose (2.171 u/ mg), CM - cellulose (0.154 u/ mg), and Superdex 200 gel filtration chromatographies (1.804 u/ mg). The activity fold was 0.34, 3.11, 0.22, and 2.59, respectively.

6) According to positive fractions of Superdex 200, mass weight of AG was clarified to be 68 kDa.

7) The optimum pH, temperature, and incubation time for AG activity were at 5.0, at 50°C, and for 50 min, respectively. The proper concentration of sucrose for AG activity was 60 mM.

8) Unprecipitated crude of *A. cerana* was separated by 2 – D electrophoresis. Pattern was obtained in a range of pH 4.0 – 8.0.

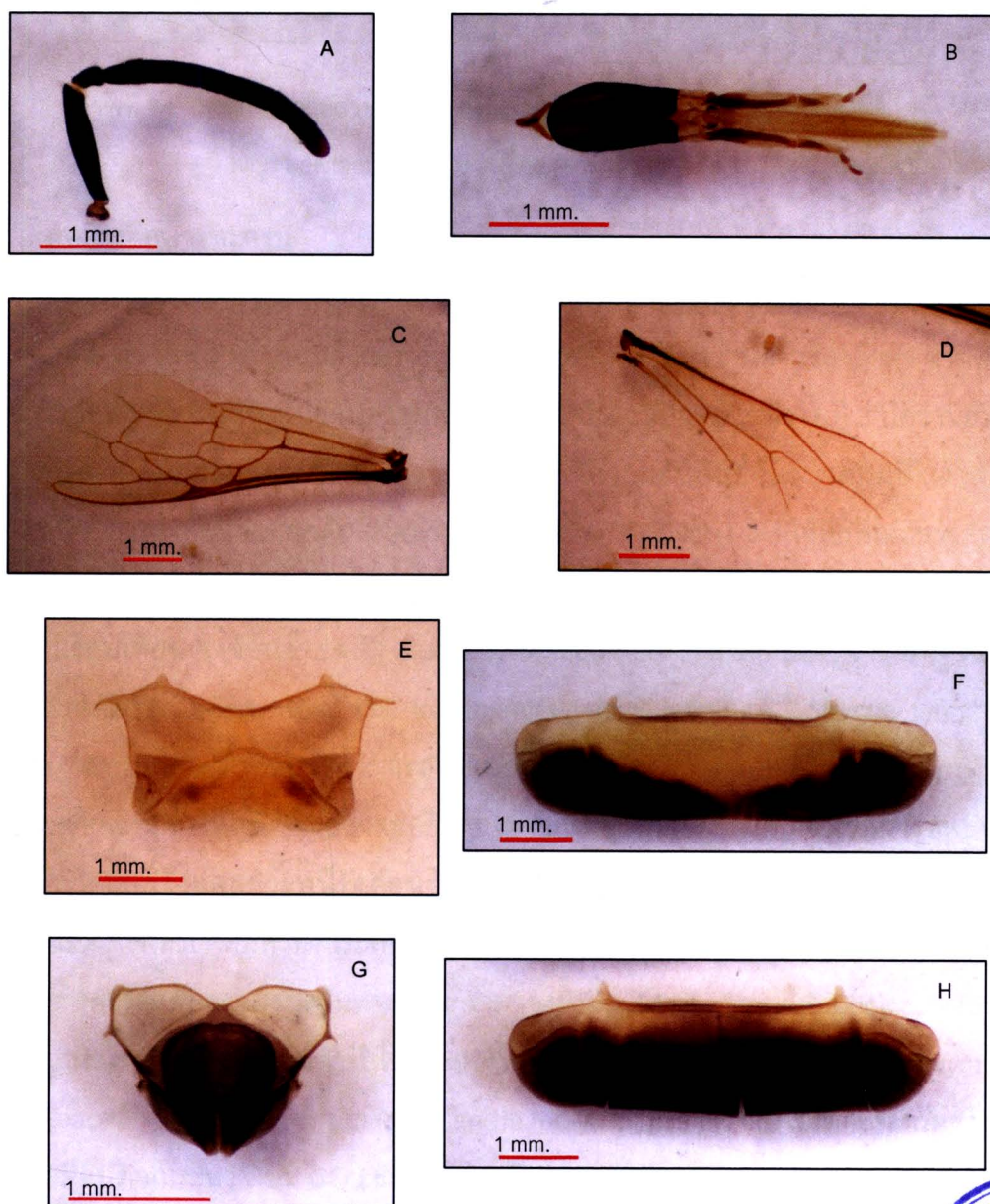
9) AG was analyzed by in – gel and in – solution digestions (or trypsin digestion) and peptide analysed by MALDI/ TOF MS. The peptide masses showed that there are at least 4 matching masses with 4% coverage matched to AG in NCBI blast search (score of 37). Furthermore, there are at least 18 matching masses with 19% coverage matched to AG in NCBI blast search (score of 153). The peptide sequence is corresponded to the amino acid sequence of AG in *A. mellifera*.

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

1.4.1 การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริกและทางพันธุกรรมของผึ้งมี *A. florea* Fabricius, 1787 ในประเทศไทย

ผึ้งมี *Apis florea* Fabricius, 1787 เป็นผึ้งพื้นเมืองชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งมีการศึกษาทางด้านมอร์โฟเมตริกน้อยมาก การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความแตกต่างภายในชนิดของผึ้งมี จึงสุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งงานจากรังผึ้งมีที่อยู่ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยจำนวน 50 รัง ๆ ละ 15 ตัว จากนั้นเก็บรักษาดตัวอย่างในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์เพื่อรอการผ่าตัด โดยเลือกผ่าตัดส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษาลักษณะ 9 ชนิดได้แก่ โพรบอสซิส

(proboscis) หนวด (antenna) ปีกหน้า (forewing) ปีกหลัง (hindwing) ขาหลัง (hind leg) สเตอไรไนต์ที่ 3 และ 6 (3rd and 6th sternites) และเทอร์ไรโกต์ที่ 3 และ 4 (3rd and 4th tergites) (ภาพที่ 70 และ 71) จากนั้นติดตัวอย่างบนสไลด์ เพื่อวัดขนาดความกว้าง ความยาวและมุมของลักษณะที่ศึกษา 22 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและบันทึกลงในคอมพิวเตอร์

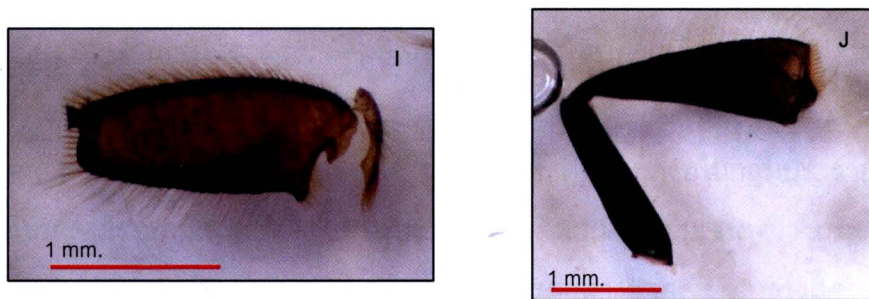


ภาพที่ 70 แสดงภาพถ่ายส่วนต่าง ๆ ของมดงมัมที่ใช้ศึกษาทางด้าน morphometric

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





ภาพที่ 71 แสดงภาพถ่ายส่วนต่าง ๆ ของผึ้งมิมที่ใช้ศึกษาทางด้าน morphometric

I = hind basitarsus และ J = hind femur และ tibia

ผลการศึกษาและสรุป

ผลการวิเคราะห์ปัจจัย (Factor Analysis) พบว่ามี 14 ลักษณะที่ถูกคัดเลือกเป็นปัจจัยใหม่ ได้ 4 กลุ่ม คือ ปัจจัยที่ 1 ประกอบด้วยลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับความยาวของลำตัว ขาหลังและหนวด ปัจจัยที่ 2 มีความสัมพันธ์กับความยาวเส้นปีกหน้าและปีกหน้า ปัจจัยที่ 3 มีความสัมพันธ์กับจำนวนสเกลและขนาดมุมที่ 37 และปัจจัยที่ 4 มีความสัมพันธ์กับขนาดมุมที่ 34 ผลการวิเคราะห์ปัจจัยและการจำแนกกลุ่ม (Factor and Cluster Analysis) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 22 ลักษณะ พบว่าไม่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างผึ้งมิมได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยสถิติ Student-Newman-Keuls กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา 4 ลักษณะ ได้แก่ forewing radial cell length, metatarsus length, 3rd sternite length และ antenna length แสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกตัวอย่างผึ้งมิมที่อาศัยอยู่ในหมู่เกาะพะงันและสมุยออกจากแผ่นดินใหญ่ได้ ซึ่งอาจจะอธิบายได้จากเหตุผลที่ผึ้งมิมมีพฤติกรรมการอพยพตามฤดูกาล การแยกรังและการหนีรังค่อนข้างสูง ทำให้ผึ้งมิมมีการแพร่กระจายในธรรมชาติอย่างรวดเร็วและครอบคลุมทั่วทั้งประเทศมากกว่าการจำกัดอยู่ภายในท้องถิ่น

การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของผึ้งมิม (*Apis florea* Fabricius, 1787) ซึ่งเป็นผึ้งพื้นเมืองขนาดเล็กที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ 3 บริเวณ คือบริเวณระหว่างยีน CO I และ CO II, ยีน L-rRNA, และยีน Cytb I-tRNA^{Ser} ซึ่งตัวอย่างผึ้งที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวนทั้งหมด 180 รัง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากทั่วประเทศไทย รวมทั้งเกาะสมุยและเกาะพะงัน หลังจากเพิ่มปริมาณไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในทั้ง 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, *Hind* III, *Hinf* I, *Rsa* I, *Ssp* I และ *Swa* I แต่มีเพียง 6 เอ็นไซม์ คือ *Ase* I, *Bcl* I,

Dra I, *Hind* III, *Hinf* I และ *Ssp* I ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอระหว่างบริเวณ CO I และ CO II ได้ และมีเพียง 3 เอนไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในบริเวณยีน L-rRNA และ Cytb I-tRNA^{Ser} ได้ คือ *Ase* I, *Dra* I และ *Ssp* I

จากการวิเคราะห์ความแปรผันของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอภายในกลุ่มประชากรของผึ้งมัมในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่าเมื่อตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอระหว่างบริเวณยีน CO I และ CO II ด้วยเอนไซม์ *Ase* I สามารถจำแนกความแตกต่างออกเป็น 2 รูปแบบ ซึ่งรูปแบบที่แตกต่างจากประชากรทั้งหมดนั้นพบเพียง 1 รังเท่านั้น คือ ผึ้งมัมที่มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สำหรับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในบริเวณยีน L-rRNA และ ยีน Cytb I-tRNA^{Ser} นั้น เมื่อวิเคราะห์ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในบริเวณที่ต้องการแล้ว ไม่สามารถตรวจสอบความแปรผันของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอภายในสปีชีส์ของผึ้งมัมในประเทศไทยได้ เนื่องจากบริเวณระหว่าง CO I และ CO II ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของผึ้งมัม มีขนาดเล็กกว่าบริเวณเดียวกันในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของผึ้งพันธุ์ *A. mellifera* และ ผึ้งโพรง *A. cerana* ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่พบความแตกต่างในผึ้งมัมได้น้อยกว่าในทั้งสองสปีชีส์ดังกล่าว นอกจากนี้ พฤติกรรมการอพยพตามฤดูกาล การแยกรัง การหนีรัง รวมทั้งความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีของผึ้งมัม ทำให้ผึ้งชนิดนี้สามารถดำรงและแพร่กระจายในธรรมชาติได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในกลุ่มประชากรของผึ้งมัมในประเทศไทยไม่มีความแตกต่างกันมากนัก

เอกสารอ้างอิง

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. (2532). ชีววิทยาของผึ้ง. กรุงเทพมหานคร: แสงศิลป์การพิมพ์.

Amssalu, B. et al. (2004). Multivariate morphometric analysis of honeybees (*Apis mellifera*) in the Ethiopian region. *Apidologie*, 35, 71 – 81.

Hepburn, H. R. et al. (2001). Morphometric analysis of *Apis cerana* populations in the southern Himalayan region. *Apidologie*, 32, 435 – 447.

Ruttner, F. (1988). Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Berlin: Springer-Verlag.

Radloff, S. E. & Hepburn, H. R. (1997). Multivariate analysis of honeybees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), of the horn of Africa. *African Entomology*, 5 (1), 57 – 64.

1.4.2 การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริก และทางพันธุกรรมของผึ้งมีมเล็ก *Apis andreniformis* Smith, 1858 ในประเทศไทย

เก็บผึ้งมีมเล็กจำนวน 30 รังเพื่อใช้ศึกษาความแปรผันทางมอร์โฟเมตริกและเก็บจำนวน 37 รังเพื่อใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม ในส่วนของความแปรผันทางมอร์โฟเมตริก ทำการวัดและวิเคราะห์ลักษณะทางมอร์โฟเมตริกทั้งหมด 24 ลักษณะในผึ้งงาน จากการใช้ค่าเฉลี่ยของรังในการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 1 พบว่ามี 20 ลักษณะจากทั้งหมด 24 ลักษณะที่ถูกคัดเลือกไว้เป็นปัจจัยใหม่ และเมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 สามารถจัดกลุ่มทั้ง 20 ลักษณะที่เลือกมาจากข้างต้นได้เป็น 4 กลุ่มปัจจัยใหม่ จากการนำคะแนนปัจจัยที่ได้มาสร้างกราฟ ผลที่ได้แสดงว่าผึ้งมีมเล็กจากประเทศไทย และจากเมืองทีนอม ประเทศมาเลเซียอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้จากการใช้เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แบบคลัสเตอร์ สามารถจัดกลุ่มผึ้งมีมเล็กดังกล่าวนี้เป็น 1 กลุ่มเช่นเดียวกัน แต่ผลจากการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นของค่าปัจจัยใหม่ทั้ง 4 ปัจจัย กับค่าละติจูด และลองจิจูด แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางมอร์โฟเมตริกของผึ้งมีมเล็กในประเทศไทย กล่าวคือขนาดของผึ้งมีมเล็กจากภาคใต้ไปยังภาคเหนือจะมีขนาดเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของผึ้งมีมเล็กจากภาคตะวันตกไปภาคตะวันออกจะมีขนาดเล็กลง

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดย 2 วิธี วิธีแรกโดยการดูรูปแบบของชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บางส่วนที่ยีน Cytb ที่ได้ (520 คู่เบส) ไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I และ *Alu* I พบว่าไม่พบความแปรผันทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างผึ้งมีมเล็กจากบริเวณต่าง ๆ ในประเทศไทย แต่เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบหลังตัดของผึ้งมีมเล็กจากประเทศไทยและจากเมืองทีนอม ประเทศมาเลเซียก็ไม่พบความแตกต่างหลังจากตัดผลิตภัณฑ์ด้วย *Alu* I แต่พบรูปแบบที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ หลังทำการตัดผลิตภัณฑ์ด้วย *Dra* I วิธีที่ 2 ทำการหาลำดับเบสบางส่วนที่ยีน Cytb จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ พบว่าผึ้งมีมเล็กจากบริเวณแผ่นดินใหญ่ของประเทศไทยมีดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึมต่ำกว่าตัวอย่างผึ้งจากบริเวณเกาะภูเก็ตและเชียงใหม่ของประเทศไทย สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรมเอ็นเจและยูฟี่จีเอ็มเอ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มผึ้งมีมเล็กในประเทศไทย ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A ซึ่งพบได้ในตัวอย่างผึ้งมีมเล็กจากแผ่นดินใหญ่ของประเทศไทย ส่วนกลุ่ม B พบในตัวอย่างผึ้งจากจังหวัดภูเก็ต และจังหวัดเชียงใหม่

1.4.3 การวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกของชันโรง *Trigona collina* Smith, 1987 ในประเทศไทย

ชันโรง (stingless bee) เป็นแมลงสังคมชั้นสูง (eusocial insects) ที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับผึ้งที่ให้น้ำหวาน ลักษณะสำคัญที่แตกต่างจากผึ้งคือ ชันโรงไม่มีเหล็กใน จึงไม่สามารถต่อยได้ มี

นิสัยไม่ดุร้าย แต่สามารถเก็บน้ำหวานและเกสรดอกไม้ไว้ในรังเช่นเดียวกับผึ้ง บางครั้งอาจเรียกว่า stingless honey bees ชันโรงเป็นแมลงที่มีบทบาทสำคัญอีกชนิดหนึ่งนอกเหนือจากผึ้ง นอกจากชันโรงจะให้น้ำหวานที่มีคุณค่าทางโภชนาการแล้ว ยังช่วยผสมเกสรให้กับพืชปลูกและพืชป่า ทำให้พืชผลของเกษตรกรมีผลผลิตเพิ่มมากขึ้นและช่วยในการขยายพันธุ์ไม้ในป่า ทำให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศ (สมนึก บุญเกิด, 2541) จากการศึกษาของ Velthuis (1997) พบว่าชันโรงมีการแพร่กระจายทั่วไปในเขตร้อนตลอดจนบริเวณใกล้เคียงที่ติดกับเขตร้อนทั่วโลก ซึ่งสำรวจพบแล้วประมาณ 400 ชนิด 50 สกุล และจากการสำรวจความหลากหลายชนิดและการกระจายตัวของชันโรง พบว่าชันโรงมีการแพร่กระจายทั่วไปในพื้นที่ต่าง ๆ ตั้งแต่บริเวณที่ราบตลอดจนพื้นที่ที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลแตกต่างกัน (Sakagami, Inoue & Salmah, 1990)

จากการสำรวจชนิดของชันโรงในประเทศไทยพบว่า *Trigona collina* Smith, 1857 สามารถแพร่กระจายตั้งแต่บริเวณพื้นที่ที่มีระดับความสูง 100 – 1,500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล โดยพบในบริเวณที่ราบเขตที่มีการเพาะปลูก ป่าดิบแล้ง และป่าเบญจพรรณ เนื่องจาก *T. collina* จะสร้างรัง อยู่ในโพรงใต้ดินหรือจอมปลวก จึงได้รับผลกระทบน้อยกว่าชันโรงชนิดอื่น ซึ่งจะถูกทำลายที่อยู่อาศัยได้ง่ายเพราะส่วนใหญ่จะสร้างรังอยู่ในโพรงของต้นไม้ *T. collina* จึงสามารถดำรงชีวิตอยู่และแพร่กระจายพันธุ์ได้ทั่วไปในประเทศไทย อย่างไรก็ตามประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่มีความแตกต่างกัน พบว่าชันโรง *T. collina* มีการแพร่กระจายพันธุ์อยู่ได้ในสภาพพื้นที่ต่าง ๆ เหล่านี้ ดังนั้น ชันโรง *T. collina* ที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในระบบนิเวศหรือสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน อาจจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน และเนื่องจากยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความแตกต่างของชันโรงด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริก ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามาวิเคราะห์ร่วมกับการวิเคราะห์ทางสถิติ และสามารถนำมาใช้จัดจำแนกสายพันธุ์หรือจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่กระจายตัวอยู่ในถิ่นที่อยู่อาศัยต่าง ๆ และจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคลายคลึงกันหรือมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันได้ จึงควรมีการศึกษาวิจัยในด้านดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชันโรงต่อไป

วิธีการศึกษา

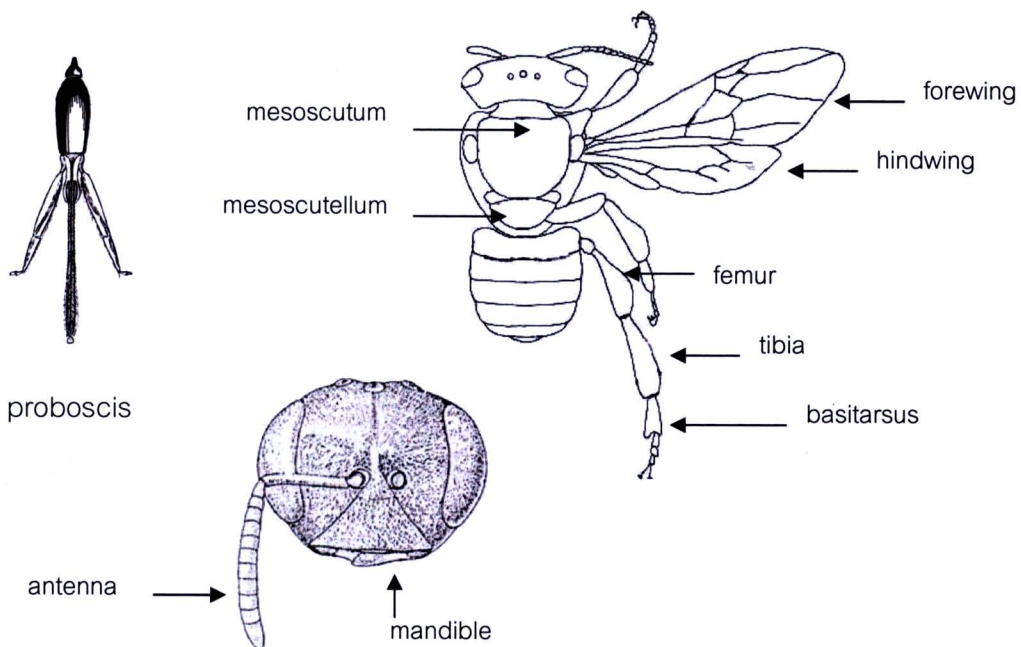
1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างชันโรงงาน *T. collina* จากรังที่พบในประเทศไทย จำนวน 95 รัง ๆ ละ 20 ตัว ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง

2. การผ่าตัดและการทำสไลด์ตัวอย่าง

1. นำชันโรงงาน *T. collina* วางบนถาดผ่าตัดที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ บรรจุอยู่เพื่อไม่ให้ตัวอย่างแห้ง โดยทำการผ่าตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

2. ผ่าตัดชันโรงงานแต่ละตัวเพื่อแยกส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ forewing hindwing antenna mandible proboscis hind leg mesoscutum mesoscutellum (ภาพที่ 72)



ภาพที่ 72 ส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชันโรงงาน *T. collina*
(ที่มา: Sung et al., 2004; Dade, 1985; Schwarz, 1939)

จากนั้นติดตัวอย่างบนสไลด์ เพื่อวัดขนาดความกว้าง ความยาวของลักษณะที่ศึกษา 19 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและบันทึกลงในคอมพิวเตอร์

ผลการศึกษา

ผลจากการวิเคราะห์ปัจจัย พบว่าสามารถจัดกลุ่มตัวแปรหรือปัจจัยใหม่ (factor score) ได้ 3 กลุ่ม (ตาราง 12) ซึ่งปัจจัยใหม่ทุกกลุ่มมีค่าความแปรปรวน (eigenvalues) มากกว่า 1 และในแต่ละกลุ่มปัจจัยทุกตัวแปรมีค่าสัมประสิทธิ์มากกว่าค่าสัมบูรณ์ 0.6 และถือว่าปัจจัยใหม่ทั้ง 3 กลุ่มเป็นตัวแปรใหม่ที่นำไปวิเคราะห์ต่อไปได้

- 1. ปัจจัยที่ 1 ประกอบด้วย 7 ตัวแปร มีความสัมพันธ์กับ hind leg ความยาวของ thorax ความยาวของ forewing และ hindwing ได้แก่ TBL FML BTL MSL STL FWL และ HWL
- 2. ปัจจัยที่ 2 ประกอบด้วย 7 ตัวแปร มีความสัมพันธ์กับ mandible ความกว้างของ mesoscutum mesoscutellum และความยาวของ labial palp ได้แก่ MNW MNL AL FL STW MSW และ LPL
- 3. ปัจจัยที่ 3 ประกอบด้วย 3 ตัวแปร มีความสัมพันธ์กับความกว้างของ forewing hindwing และความยาวของ radial cell ได้แก่ FWW HWW และ RCL

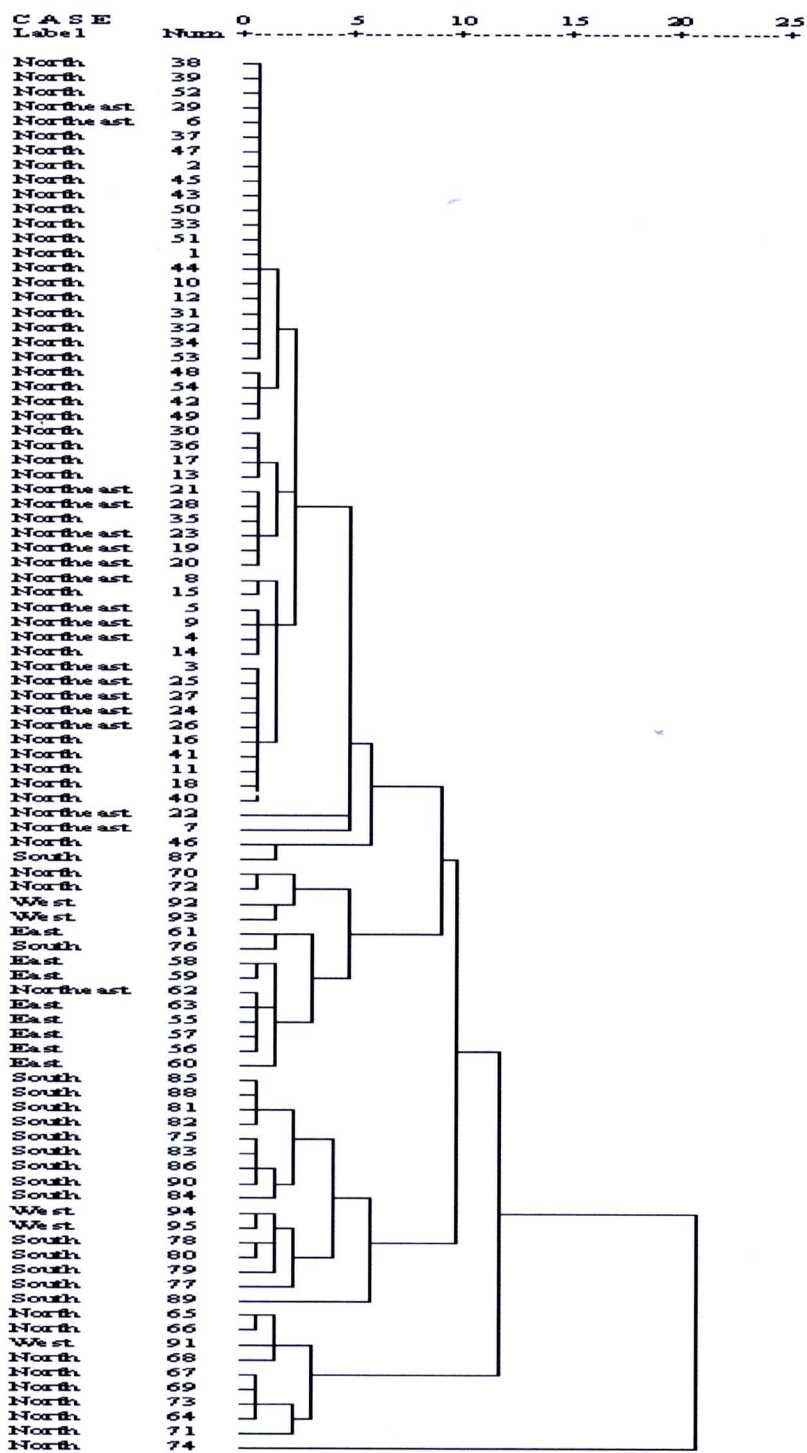
ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ของกลุ่มปัจจัยใหม่ 3 กลุ่มปัจจัย ที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2

	ปัจจัยที่ 1	ปัจจัยที่ 2	ปัจจัยที่ 3
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	forewing - ความยาว forewing hindwing - ความยาว hindwing hind leg - ความยาว tibia - ความยาว femur - ความยาว basitarsus thorax - ความยาว mesoscutum - ความยาว mesoscutellum	mandible - ความกว้าง mandible - ความยาว mandible antenna - ความยาว flagellum - ความยาว antenna thorax - ความกว้าง mesoscutum - ความกว้าง mesoscutellum mouth part - ความยาว Labial palp	forewing - ความกว้าง forewing - ความยาว radial cell hindwing - ความกว้าง hindwing

ผลการจัดกลุ่มตัวอย่างชันโรง *T. collina* โดยใช้กลุ่มปัจจัยใหม่ 3 กลุ่ม

เมื่อนำค่าปัจจัยใหม่ 3 กลุ่ม ที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 มาใช้เป็นตัวแปรในการจัดกลุ่มตัวอย่างชันโรงด้วยสถิติ cluster analysis โดยใช้วิธีการรวมกลุ่มแบบ Between - groups Linkage หรือเรียกว่า UPGMA (Unweigthed Pair - Group Method Using Arithmetic Average) วัดความคล้ายด้วยระยะห่างของตัวอย่างแต่ละคู่ พบว่าจัดกลุ่มตัวอย่างชันโรงได้เป็น 5 กลุ่ม ที่ระยะห่างระหว่างกลุ่ม 25 หน่วย และจากการเขียนเดนไดรแกรมแสดงการรวมกลุ่มตัวอย่างชันโรง (ภาพที่ 73) พบว่าตัวอย่างชันโรงมีค่าระยะห่างระหว่างกลุ่มใกล้เคียงกัน จึงไม่สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างชันโรงได้

Rescaled Distance Cluster Combine



ภาพที่ 73 เคนไดรแกรมแสดงการรวมกลุ่มตัวอย่างชั้นโรงโดยแบ่งตามภูมิภาค

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกลุ่มตัวอย่างชันโรง *T. collina* ที่พบในประเทศไทย

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกลุ่มตัวอย่างชันโรง *T. collina* ที่พบใน 5 ภูมิภาค คือ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ จากตัวแปรที่มีค่า factor loading มากกว่าค่าสัมบูรณ์ 0.6 มาวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกลุ่มตัวอย่างชันโรงด้วยสถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One – Way ANOVA) ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกลุ่มตัวอย่างชันโรงทั้ง 5 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชันโรง *T. collina* ด้วยวิธีทางมอร์โฟเมตริก จำนวน 19 ลักษณะ จากตัวอย่างชันโรง 95 รัง รังละ 20 ตัว พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกลุ่มตัวอย่างชันโรงที่พบในเขตภาคตะวันออกและภาคใต้ มีแนวโน้มที่แสดงให้เห็นความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ของชันโรง จากตัวอย่างชันโรงที่พบในประเทศ แต่ยังไม่สามารถแยกออกเป็นกลุ่มอย่างชัดเจน เมื่อทำการจำแนกกลุ่มตัวแปรและจัดกลุ่มตัวอย่างประชากรด้วยสถิติ factor analysis และ cluster analysis ตามลำดับ

ผลจากการจำแนกกลุ่มตัวแปรด้วยสถิติ factor analysis โดยการจัดกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความสัมพันธ์กันนำมารวมไว้ในกลุ่มเดียวกัน พบว่าจากการวิเคราะห์ปัจจัยในครั้งที่ 1 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือตัวแปรที่มีค่าสัมประสิทธิ์มากกว่าค่าสัมบูรณ์ 0.6 จำนวน 17 ลักษณะ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 สามารถจำแนกกลุ่มตัวแปรได้เป็น 3 กลุ่มปัจจัยใหม่ ซึ่งปัจจัยที่ 1 มีความสัมพันธ์กับ hind leg ความยาวของ thorax ความยาวของ forewing และ hindwing ได้แก่ TBL FML BTL MSL STL FWL และ HWL ปัจจัยที่ 2 มีความสัมพันธ์กับ mandible ความกว้างของ mesoscutum mesoscutellum และความยาวของ labial palp ได้แก่ MNW MNL AL FL STW MSW และ LP และปัจจัยที่ 3 มีความสัมพันธ์กับความกว้างของ forewing hindwing และความยาวของ radial cell ได้แก่ FWW HWW และ RCL เมื่อเขียนกราฟการกระจายของชันโรงด้วยปัจจัยใหม่ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าปัจจัยที่ 1 มีแนวโน้มที่เป็นตัวแปรในการจำแนกตัวอย่างชันโรงที่พบในภาคใต้จากกลุ่มตัวอย่างชันโรงที่พบในบริเวณอื่น และปัจจัยที่ 3 มีแนวโน้มที่เป็นตัวแปรในการจำแนกตัวอย่างชันโรงที่พบในภาคตะวันออกจากกลุ่มตัวอย่างชันโรงที่พบในบริเวณอื่น แต่ยังไม่สามารถจำแนกออกมาได้อย่างชัดเจน

ผลการศึกษาการจำแนกกลุ่มตัวอย่างประชากรชันโรง *T. collina* ที่พบในประเทศไทย ด้วยสถิติ cluster analysis โดยใช้กลุ่มปัจจัยใหม่ 3 กลุ่ม พบว่าปัจจัยใหม่หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชันโรงไม่มีผลทำให้เกิดความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มตัวอย่างประชากร

ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธีของ Scheffe (SPSS for Windows 11.0, 2547) เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชันโรง *T. collina* ที่พบในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ พบว่าตัวอย่างชันโรงมีขนาดเล็กลงจากภาคตะวันตกไปตะวันออก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hepburn et al. (2001) ที่พบว่าขนาดของผึ้ง *A. cerana* จะมีขนาดลดลงจากภาคตะวันตกไปทางภาคตะวันออก และตัวอย่างชันโรงที่พบทางภาคเหนือมีขนาดใหญ่กว่าตัวอย่างชันโรงที่พบทางภาคใต้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะจากการวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกของผึ้ง *A. cerana* ในประเทศไทยและคาบสมุทรมลายู ที่พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ forewing hindwing proboscis labial palp hind leg tergite และ sternite ของผึ้งโพรงที่อาศัยอยู่บริเวณเหนือเส้นละติจูดที่ 13° เหนือ (northern latitude) มีขนาดใหญ่กว่าผึ้งโพรงบริเวณใต้เส้นละติจูดที่ 13° เหนือ (southern latitude) และเกาะสมุย เอกสารอ้างอิง

- Limbipichai, K. (1990). Morphometric studies on the eastern honeybee (*Apis cerana* Fabricius) in Thailand and the Malaysian Peninsula. Master Thesis,
- Hepburn, H. R. et al. (2001). Morphometric analysis of *Apis cerana* populations in the southern Himalayan region. Apidologie, 32, 435 – 447.
- Schwarz, H. F. (1939). The Indo – Malayan species of *Trigona*. Bulletin of American Museum Natural History, 76, 83 – 141.
- Sung, I. H. et al. (2004). Morphological caste and sex differences in the Taiwanese stingless bee *Trigona ventralis hoozana* (Hymenoptera: Apidae). Entomological Science, 7, 263 – 269.

1.5 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับอนุของ *A. florea*, *A. andreniformis*, *A. mellifera* และ *Trigona* spp.

1.5.1 การสำรวจสายพันธุ์ผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยบนพื้นฐานความแปรผันทางพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (A survey of *A. mellifera* L. subspecies in Thailand base on variation in mitochondrial DNA)

ผึ้งพันธุ์นำเข้าสู่ประเทศไทยในช่วงต้นคริสต์ศตวรรษ 1940 (Wongsiri, 1988) และศตวรรษ 1950 (Akranakul, 2000) เพื่อใช้ในงานวิจัย ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัย ตามลำดับ แต่ประชากรของผึ้งพันธุ์ที่นำเข้านั้นไม่สามารถแพร่กระจายได้ดีนัก แต่ในช่วงคริสต์ศตวรรษ 1970 ได้มีการนำเข้าประชากรผึ้งพันธุ์จำนวนมากจากประเทศไต้หวันไปยังภาคเหนือของประเทศไทยที่จังหวัดลำพูนและจังหวัดเชียงใหม่เพื่อการเลี้ยงเพื่อเป็นอุตสาหกรรม (Wongsiri et al., 1995) จากนั้นยังคงมีการนำเข้าผึ้งพันธุ์เพิ่มเติมจากอีกหลายประเทศ ได้แก่ ออสเตรเลีย ยุโรป และรัสเซีย (Wongsiri et al., 2000; Kavinseksan et al., 2004) การกระจายของประชากรผึ้งพันธุ์ขยายตัวเป็นวงกว้างในแถบภาคเหนือของไทยโดยเฉพาะในจังหวัดเชียงใหม่ต่อมาถือเป็นแหล่งสำคัญของการกระจายประชากรของผึ้งในประเทศไทย (Thapa and Wongsiri, 1997) ปัจจุบันนี้มีรายงานประชากรผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยมีการจัดการเลี้ยงในรังจำนวนประมาณ 300,000 รัง ซึ่งประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งกระจายตัวอยู่ในแถบจังหวัดภาคเหนือ และมีรายงานการพบการทำรังในสภาพธรรมชาติอยู่น้อยมาก (Wongsiri et al., 2000)

จุดกำเนิดของสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยในปัจจุบันยังคงไม่แน่ชัดแต่สามารถกล่าวได้เพียงว่ามีหลายสายพันธุ์ที่ปะปนกันอยู่ในประชากรที่กระจายอยู่ทั่วประเทศ ผึ้งพันธุ์มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่หลากหลาย เช่น สายพันธุ์ที่ทนทานกับโรคต่างๆ สายพันธุ์ที่มีพฤติกรรมดุร้าย น้อยลง หรือสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ต่างๆ (Ruttner, 1988) การจัดจำแนกประชากรของสายพันธุ์ผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยมีความน่าสนใจอย่างยิ่งเพื่อการดูแลปรับปรุงผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยต่อไป

ในปัจจุบันรายงานจุดกำเนิดของสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ในแถบยุโรป แอฟริกา และตะวันออกกลาง ด้วยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาพบอย่างน้อยประมาณ 24 สายพันธุ์ (Ruttner, 1988; Engel, 1999) การศึกษาด้วยไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอพบว่าจากสายพันธุ์ทั้งหมดที่ค้นพบนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 4 สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ได้แก่ M (West European) C (Eastern Mediterranean) A (African) (Hall and Muralidharan, 1989; Smith et al., 1989; Cornuet and Gamery, 1991; Arias and Sheppard, 1996) สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ O (Middle Eastern lineage) (Franck et al., 2000; Palmer et al., 2000) และพบสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ Y ซึ่งกระจายในประเทศเอธิโอเปียในทวีปแอฟริกา (Franck et al., 2001)

การศึกษาในปัจจุบันตัวอย่างเช่นในทวีปอเมริกามีการใช้หลายวิธีทางชีวโมเลกุลหลายวิธี เช่น วิธี microsatellites และ การทำ RFLP ในไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการตรวจสอบลักษณะความแตกต่างในกลุ่มประชากรของผึ้งพันธุ์แอฟริกา (African honey bee) และผึ้งพันธุ์ผสมสายพันธุ์แอฟริกา (Africanized honey bee) ซึ่งเกิดจากการปะปนของสายพันธุ์แอฟริกา (Clarke et al., 2001; 2002; Coulson et al., 2005; Diniz et al., 2003; Pinto et al., 2004; 2005) การตรวจสอบสายพันธุ์ของพันธุ์ด้วยการศึกษาความแตกต่างด้วยวิธี RFLP ในไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอ แสดงไว้ใน Table 1 การจำแนกความแตกต่างของสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสายพันธุ์ผึ้งพันธุ์อาศัยข้อมูลการแปรผันทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง non-coding ในไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในส่วนของ P, Po และ Q ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการนิยมนำมาใช้ในการแยกสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในผึ้งพันธุ์ (Cornuet et al., 1991; Garnery et al., 1992; Palmer et al., 2000)

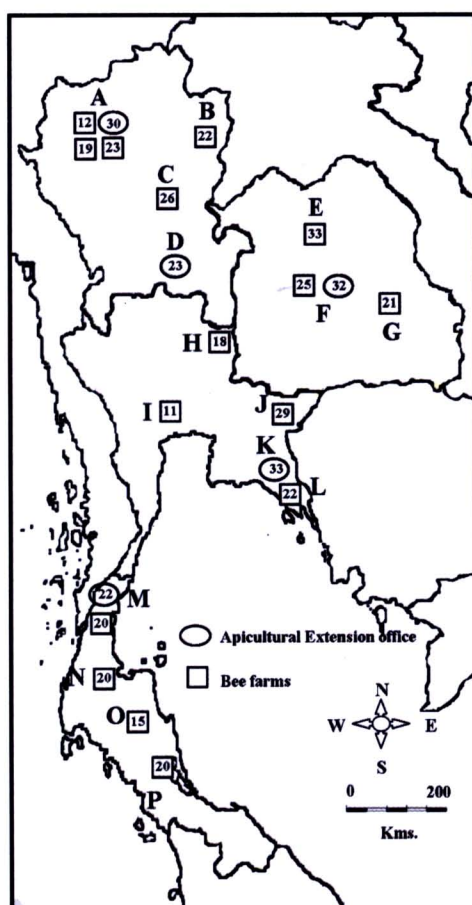
เพื่อความชัดเจนของจุดเริ่มต้นของประชากรผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยโดยอาศัยการตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะจากทางแม่ในประชากรผึ้งพันธุ์โดยอาศัยการศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP ใน 4 บริเวณของไมโตรคอนเดรีย และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 6 เบส *Dra* I, *Bgl* II, *Eco*R I, *Hinc* II และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 4 เบส *Hinf* I รวมทั้งศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง non-coding ของยีน tRNA^{leu} - cytochrome c oxidase II (COII)

วิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่าง เก็บผึ้งพันธุ์จำนวน 476 รัง จากบริเวณภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก เชียงเหนือ และภาคใต้ ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2546 ถึงมกราคม 2549 (ภาพที่ 74, ตารางที่ 13) และใช้ตัวอย่างผึ้งพันธุ์อ้างอิงจำนวน 27 ตัวอย่าง ดังนี้ ผึ้งพันธุ์สายพันธุ์ *A. m. ligustica*-derived จากประเทศออสเตรีย จำนวน 5 รัง และจากประเทศนิวซีแลนด์จำนวน 1 รัง ผึ้งพันธุ์สายพันธุ์ *A. m. carnica* จาก Gratz จำนวน 2 รัง จาก Klagenfurt จำนวน 1 รัง และจาก Lunz-am-See จำนวน 3 รัง ในประเทศออสเตรีย อีก 3 รังจากสถาบัน Bienenkunde ในประเทศเยอรมัน และจาก Medvode ในประเทศสโลวาเนีย จำนวน 1 รัง ผึ้งพันธุ์สายพันธุ์ *A. m. mellifera* จำนวน 2 รัง จาก Asker ประเทศนอร์เวย์ ซึ่งผึ้งพันธุ์ตัวอย่างจากยุโรปเป็นตัวอย่างอ้างอิงจาก DRS laboratory ในปี 1987 (รายละเอียดใน Smith, 1991) ผึ้งพันธุ์สายพันธุ์ *A. m. scutellata* จำนวน 2 รัง จากประเทศแอฟริกาใต้ ซึ่งเก็บตัวอย่างโดย Orley Taylor, Jr. ในปี 1991 และผึ้งพันธุ์สายพันธุ์ *A. m. syriaca* จำนวน 7 รัง จาก Hatay ในประเทศตุรกี ซึ่งเก็บตัวอย่างโดย O. Kaftanoglu ในปี 1997 ตัวอย่างเก็บรักษาใน 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์โดยไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ สัดดีเอ็นเอจากส่วนนอกของฝั่งพันธุ์จากตัวอย่างทั้งหมด 476 ตัวอย่างโดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอมาตรฐานวิธี phenol-chloroform extraction เพิ่มปริมาณชนิดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจำนวน 4 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ tRNA^{leu} - 5' end of COII (รวมส่วน non-coding region ระหว่าง tRNA^{leu} และ COII) บริเวณ cytochrome-b บริเวณ large ribosomal subunit และบริเวณ COI โดยลำดับของขึ้น primers และลำดับขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละบริเวณแสดงดังตารางที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ non-coding region ระหว่าง tRNA^{leu} และ COII โดยเลือกสุ่มจากตัวอย่างที่มีพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียแตกต่างกันจากการตรวจสอบข้างต้นผลของกาหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ รูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างโดยอาศัยรูปแบบที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากทั้ง 4 บริเวณที่ศึกษาในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (ภาพที่ 75 ตารางที่ 14) คำนวณระยะความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างรูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างและความถี่ของการกระจายระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม REAP (McElroy et al., 1992) แผนภาพแสดงความคล้ายกันระหว่างกลุ่มความแตกต่างทางพันธุกรรมอาศัยข้อมูลจากระยะความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor-joining method ในโปรแกรม Mega 3.0 (Kumar et al., 2004) ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพื้นที่ ระหว่างฟาร์มในพื้นที่เดียวกันคำนวณโดยใช้ AMOVA (Excoffier et al., 1992) ด้วยโปรแกรม AMOVA 1.55 (Excoffier et al., 1995) ทดสอบความแตกต่างด้วยการคำนวณเปรียบเทียบ 1,000 รอบ จากตัวอย่างที่ศึกษาในฟาร์มระหว่างพื้นที่ที่สนใจศึกษา ส่วนข้อมูลลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับด้วยตาและใช้โปรแกรม ClustalW ในโปรแกรม Mega 3.0 (Kumar et al., 2004)



ภาพที่ 74. บริเวณที่ตั้งของฟาร์มผึ้งพันธุ์ *A. mellifera* ที่เก็บตัวอย่างในการศึกษารั้งนี้ อักษรภาษาอังกฤษแทนจังหวัดในประเทศไทยที่เก็บตัวอย่าง วงกลมแทนตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่เก็บจากศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพเกษตรผึ้งทั้ง 5 ศูนย์ สี่เหลี่ยมแทนตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงผึ้ง ตัวเลขในวงกลมหรือสี่เหลี่ยมแสดงจำนวนรังของผึ้งพันธุ์ที่เก็บในแต่ละตำแหน่ง

ผลการศึกษา

รูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างจากวิธี RFLP รูปแบบของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการศึกษา ทั้ง 4 บริเวณของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ สรุปไว้ดังภาพที่ 75 และตารางที่ 14 ตัวอย่างของประชากรผึ้งพันธุ์ตัวอย่างในประเทศไทยทั้งหมดสามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* II ในบริเวณ cytochrome b (รูปแบบ “b” ภาพที่ 75B) แสดงว่าผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยยังไม่พบผึ้งพันธุ์สายพันธุ์ที่มีสายวิวัฒนาการคล้ายกับผึ้งพันธุ์ในสายความสัมพันธ์วิวัฒนาการแบบ A หรือ African เช่นเดียวกันที่บริเวณ COI ไม่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinc* II (รูปแบบ “a” ภาพที่ 75D) แสดงว่าผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยยังไม่พบผึ้งพันธุ์สายพันธุ์ที่มีสายวิวัฒนาการคล้ายกับผึ้งพันธุ์ในสายความสัมพันธ์วิวัฒนาการแบบ M หรือ West European จากตัวอย่างผึ้งพันธุ์ในประเทศไทย

ทั้งหมดพบรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมือนกับฝั่งพันธุ์ในสายความสัมพันธ์วิวัฒนาการแบบ C หรือ Mediterranean และฝั่งพันธุ์ในสายความสัมพันธ์วิวัฒนาการแบบ O หรือ Middle East

การเพิ่มจำนวนของบริเวณ tRNA^{leu} – COII ได้รับผลิตภัณฑ์ที่ยาวไม่เท่ากัน คือ ขนาด 573 คู่เบส และขนาด 837 คู่เบส ขึ้นที่มีขนาดสั้นพบในตัวอย่างที่จัดให้ชื่อว่า ThaiA ซึ่งจัดให้คล้ายกับฝั่งพันธุ์ในสายความสัมพันธ์วิวัฒนาการแบบ C และการตัดขึ้นของบริเวณ tRNA^{leu} – COII ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I พบรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างออกในสายความสัมพันธ์วิวัฒนาการแบบ C และพบว่ามีความคล้ายกับสายพันธุ์ของฝั่งพันธุ์ *A.m. ligustica* และ *A. m. carnica* (ThaiA รูปแบบ “b” ภาพที่ 75A) รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I พบความแตกต่างของรูปแบบ โดย “b” พบใน *A. m. carnica* ในตัวอย่างอ้างอิงเช่นกัน ส่วน “c” พบใน *A. m. ligustica* และมีจำนวนน้อยที่คล้ายกับ *A. m. carnica* ในตัวอย่างอ้างอิงเช่นกัน รูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบ “c” ให้เป็นกลุ่ม ThaiA1 และอีกรูปแบบ “b” ให้เป็นกลุ่ม ThaiA2 (ภาพที่ 75A) สำหรับตัวอย่างที่มีขนาดของบริเวณ tRNA^{leu} – COII ขนาดใหญ่นั้น ให้เป็นกลุ่ม ThaiB รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I ให้รูปแบบที่เหมือนกับฝั่งพันธุ์อ้างอิงตัวอย่างจากสายความสัมพันธ์แบบ O จากประเทศตุรกี ซึ่งให้รูปแบบ “a” ส่วนรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I ให้รูปแบบของการตัดแบบ “a” เช่นกัน ซึ่งทั้งหมดเหมือนกับตัวอย่างอ้างอิงที่ไม่มีสายความสัมพันธ์แบบ C ในตัวอย่างอ้างอิงและพบในประชากรของฝั่งพันธุ์ในประเทศไทยกลุ่ม ThaiB

ผลการศึกษาที่บริเวณอื่น เอนไซม์ *Dra* I และ *Hinf* I ที่บริเวณ cytochrome b, เอนไซม์ *EcoR* I ตัดที่บริเวณ lsRNA สรุปลงในตารางที่ 14 ภาพที่ 75 รูปแบบของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ศึกษา 7 รูปแบบ แยกความแตกต่างของรูปแบบทางพันธุกรรมได้ เช่น bbbababa โดยเรียงลำดับดังนี้ [tRNA^{LEU}–COII / *Dra* I] [tRNA^{LEU}–COII / *Hinf* I] [CytB / *Bgl* II] [CytB / *Dra* I] [CytB / *Hinf* I] [lsRNA / *EcoR* I] [COI / *Hinc* II]

8 รูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างกันในตัวอย่างของฝั่งพันธุ์ในประเทศไทยจำนวน 476 รัง รูปแบบพันธุกรรมกลุ่ม ThaiA1 รวมรูปแบบของพันธุกรรมแบบ bcb-aba (- อาจจะเป็น a หรือ b) รูปแบบพันธุกรรมกลุ่ม ThaiA2 ได้แก่รูปแบบพันธุกรรมแบบ bbb---a และ รูปแบบพันธุกรรมกลุ่ม ThaiB ได้แก่รูปแบบพันธุกรรมแบบ aab---a (ตารางที่ 14) การเปรียบเทียบระยะความแตกต่างทางพันธุกรรมเป็นคู่ด้วยข้อมูลจาก ข้อมูลของเอนไซม์ตัดจำเพาะ อยู่ในช่วงระหว่าง 0.006-0.06 ซึ่งระยะทางนี้ใช้ในการสร้างแผนภาพด้วยวิธี neighbor-joining และจัดกลุ่มของความแตกต่างทางพันธุกรรมออกเป็น 2 กลุ่ม ที่สัมพันธ์กับสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ C และ แบบ O

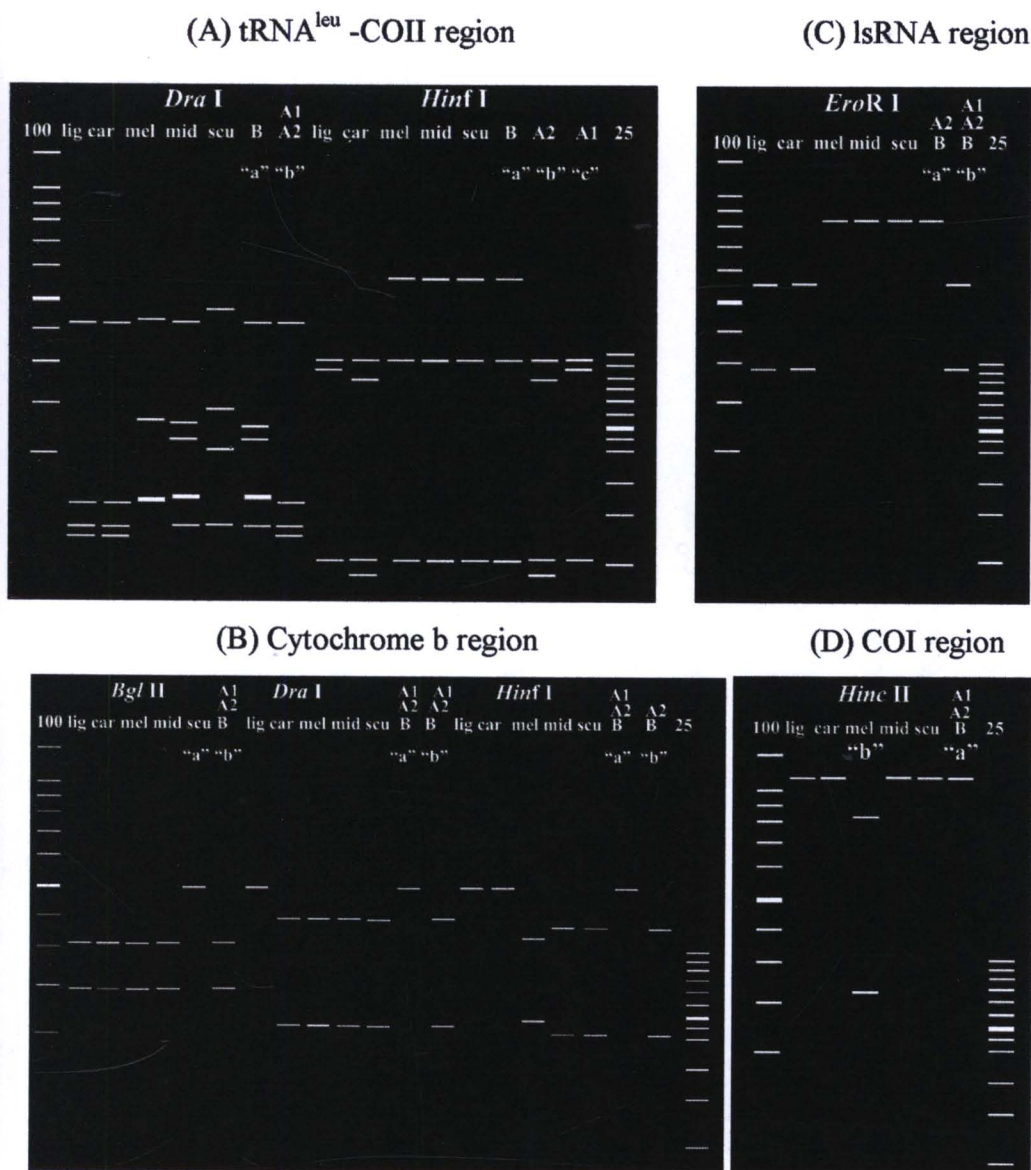
กลุ่ม ThaiA2.1 (bbbbaba) เป็นกลุ่มรูปแบบพันธุกรรมที่พบได้เป็นส่วนใหญ่ประมาณ 58.1 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งจำแนกได้เช่นเดียวกับตัวอย่างอ้างอิงจำนวน 7 ตัวอย่างจากออสเตรียและเยอรมัน ส่วนกลุ่มรูปแบบพันธุกรรม ThaiA1.2 (bcbbaba) ซึ่งคล้ายกับ 3 ตัวอย่างของ *A. m. carnica* จากประเทศออสเตรียและสโลวาเนีย กลุ่มที่สองที่มีรูปแบบพันธุกรรมที่พบได้เป็นส่วนใหญ่คือ ThaiA1.1 (bcbaaba) ประมาณ 19.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคล้ายกับรูปแบบพันธุกรรมของผึ้งพันธุ์ *A. m. ligustica* อ้างอิงจากประเทศออสเตรียและนิวซีแลนด์ สำหรับรูปแบบพันธุกรรมของกลุ่ม ThaiA2.2 (bbbaaba) และ ThaiA2.3 (bbbbbaa) ไม่เหมือนกับรูปแบบพันธุกรรมของตัวอย่างอ้างอิง อย่างไรก็ตามรูปแบบพันธุกรรมทั้งหมดดังกล่าวจัดเป็นสมาชิกของสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ C (ภาพที่ 76) ด้วยเหตุผลที่ตัวอย่างทั้งหมดมีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* II ที่บริเวณ Cytochrome b แต่ไม่พบรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinc* II ที่บริเวณ COI รวมทั้งที่บริเวณ tRNA^{LEU}-COII มีขนาดเล็กและไม่พบลำดับเบสของส่วน P และรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I ให้รูปแบบที่สามารถแยกแยะ *A. m. carnica* และ *A. m. ligustica* ส่วนที่เหลืออีก 18 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในกลุ่มรูปแบบพันธุกรรม ThaiB ซึ่งรวมรูปแบบพันธุกรรมแบบ ThaiB2.1 (aabbbaa, 17 เปอร์เซ็นต์) ThaiB2.2 (aababaa) และ ThaiB2.3 (aabaaba) และ ThaiB2.1 มีรูปแบบของพันธุกรรมเหมือนกับผึ้งพันธุ์ตัวอย่างอ้างอิงสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ O ได้แก่ *A. m. syriaca* จากทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศตุรกี

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ การวิเคราะห์การแปรผันทางพันธุกรรมของตัวอย่างผึ้งพันธุ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ tRNA^{LEU} และ COII พบความแตกต่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ non-coding ยืนยันว่ากลุ่มรูปแบบพันธุกรรม ThaiA1 และ ThaiA2 จัดอยู่ในสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ C ซึ่งไม่มีส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน P และยังแสดงความเหมือนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง *A. m. carnica* และ *A. m. ligustica* กลุ่มรูปแบบพันธุกรรม ThaiB ไม่เหมือนกับสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ C เพราะ ThaiB ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน P แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ThaiB แตกต่างจากผึ้งพันธุ์สายความสัมพันธ์วิวัฒนาการแบบ M เพราะว่าในส่วนของ P ไม่พบการหายไป 13 คู่เบส พบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งส่วนของ P และ Q ซึ่งทำให้ ThaiB ไม่เหมือนกับผึ้งพันธุ์ในสายวิวัฒนาการแบบ A แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ThaiB คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. m. lamarckii* และ *A. m. syriaca* โดยพบการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่งในส่วน P และการแทนที่ 3 ตำแหน่งในส่วน Q2 และการแทนที่ 2 ตำแหน่งในส่วน Q3 ดังนั้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ThaiB แสดงการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน Q (Q' และ Q'') ในขณะที่ *A. m. lamarckii* และ *A. m. syriaca* แสดงการซ้ำของส่วน Q เพียงหนึ่งครั้งเท่านั้น

การกระจายและความสมบูรณ์ของรูปแบบพันธุกรรม จำนวนมากกว่า 450 รัง จาก 476 รัง จัดอยู่ในกลุ่มรูปแบบพันธุกรรมที่พบมากเป็นส่วนใหญ่ 3 รูปแบบดังผลข้างต้น ซึ่งคิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด รูปแบบพันธุกรรมแบบ ThaiA2.1 bbbaba พบได้ในทุกๆพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง รูปแบบพันธุกรรมแบบ ThaiA1.1 bcbaaba ไม่พบในภาคใต้แต่พบในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วน ThaiB1.1 aabbbbaa พบจำนวนน้อยมากในภาคเหนือและภาคกลาง แต่พบมากในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ภาพที่ 78A) รูปแบบการกระจายของรูปแบบพันธุกรรมทั้ง 8 รูปแบบคล้ายกับภาพที่ 78B การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างการกระจายในพื้นที่ต่างกันด้วยการวิเคราะห์ AMOVA แสดงไว้ในตารางที่ 15 การจัดกลุ่มของฟาร์มในแต่ละภาคไม่พบความแตกต่างกันในรูปแบบพันธุกรรมที่เกิดขึ้น ค่าความผันแปรระหว่างบริเวณมีค่า 19.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อจัดกลุ่มฟาร์มฝั่งภาคเหนือรวมภาคกลาง และภาคใต้รวมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นความแปรผันที่เกิดขึ้นในกลุ่มประชากร ค่าความผันแปรระหว่างบริเวณมีค่า 29.9 เปอร์เซ็นต์ และสนับสนุนได้จากการกระจายของรูปแบบพันธุกรรมในภาคต่างๆ ดัง ภาพที่ 78 อย่างไรก็ตามพบว่าในประชากรของผึ้งพันธุ์ในไทยในฟาร์มต่างๆมีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมสูงภายในฟาร์มฝั่งเดียวกัน





ภาพที่ 75. แผนภาพแสดงรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆใน 4 บริเวณที่ศึกษา ตัวอย่างอ้างอิง (สัญลักษณ์ในภาพ) *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 Hinf I (B) แทนบริเวณ cytochrome b ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bgl II, Dra I และ Hinf I (C) แทนบริเวณ large subunit ribosomal RNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I (D) แทนบริเวณ COI ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hinc II. ขนาดของแถบอ้างอิง โดย 100 bp และ 25 bp ladder.

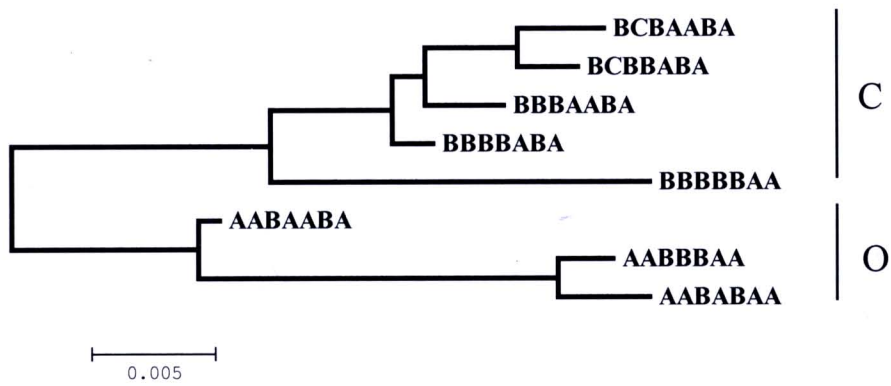
ตารางที่ 13. สรุปขั้นตอนการเพิ่มปริมาณไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ 4 บริเวณ ที่ใช้ในการจำแนกสิ่งพันธุ์ในประเทศไทย สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ M= West European lineage, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ C = East Mediterranean, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ A = African, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ O = Middle

Regions Amplified	Primers	PCR thermal profile	Restriction Enzyme	M	C	A	O
tRNA ^{leu} -COII (Garnery et al., 1993)	E2: 5'GGCAGAATAAGTGCATTG 3'	94°C-60s, (94°C -30 s,					
	H2: 5'CAATATCATTTGATGACC 3'	55°C - 30s, 72°C - 60s) ³⁰ , 72°C -10 min	Hinf I	+	+ ^C , + ^B	+ ^D	+ ^A
Cyt b (Crozier et al., 1991)	OLD1: 5'TATGTACTACCATGAGGACAAATATC3'	94C°-60s, (92 C° - 60s,	Bgl II	+	+	-	+
	OLD2: 5'ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT 3'	50 C° - 60s, 72 C° - 90s) ³⁵ , 72 C°-5 min	Dra I	+	-,+	+	-,+
			Hinf I	+ ^C	-	+ ^B	+ ^B
IsRNA (Hall & Smith, 1991)	Ls1: 5'TTTTGTACCTTTTGTATCAGGGTTG 3'	94C°-60 s, (94 C° -30 s,					
	Ls2: 5'CTATAGGGTCTTATCGTCCC 3'	55 C° - 30 s and 72 C° - 60 s) ³⁵ , 72 C° -5 min	EcoR I	-	+	-	-
COI (Hall & Smith, 1991)	COI-1908: 5' TTAAGATCCCCAGGATCATG 3'	94C°-60s, (94 C° -60s,					
	COI-2932: 5' TGCAAATACTGCACCTATTG 3'	50 C° - 60s, 72 C° -60 s) ³⁵ , 72 C° -5 min	Hinc II	+	-	-	-

+ แทนการติดด้วยเอนไซม์ดีจีเออะ – แทนไม่มีการติดด้วยเอนไซม์ดีจีเออะ +^A, +^B, +^C, +^D และ +^E แทนรูปแบบการตัดที่แตกต่างกันของเอนไซม์ดีจีเออะ

ตารางที่ 14. การกระจายตามภูมิศาสตร์ของรูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างกัน 8 รูปแบบ จากตัวอย่างผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยจำนวน 476 รัง อักษร 7 ตัว แทนรูปแบบของพันธุกรรมโดยใช้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้ (tRNA^{leu} – COII/ *Dra* I, tRNA^{leu} – COII / *Hinf* I, *cyt-b*/ *Bgl* II, *cyt-b*/ *Dra* I, *Cytb*/ *Hinf* I, *lsRNA*/ *EcoR* I และ *COI*/ *Hinc* II, ตามลำดับ) A, B,..., P แทนจังหวัดที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์ซึ่งแทนอยู่ในภาพที่ 72

Regions	Localities	Haplotpye								Total
		Eastern Medditerranean lineage					Middle Eastern lineage			
		ThaiA1		ThaiA2			ThaiB			
		ThaiA1.1 bcbaaba	ThaiA1.2 bcbbaba	ThaiA2.1 bbbbaba	ThaiA2.2 bbbaaba	ThaiA2.3 bbbbbbaa	ThaiB1.1 aabbbba a	ThaiB1.2 aababaa	ThaiB1.3 aabaaba	
North (155)	Chiangmai (A)	7		67		1	8	1		84
	Nan (B)	20	1	1						22
	Utaradit (C)			25			1			26
	Phithsanulok (D)	16		7						23
Northeast (111)	Udornthani (E)	12		16			5			33
	Khon khan(F)	7	6	9			32	1	2	57
	Loi-Ed (G)			15		2	3	1		21
Central (113)	Lopburi (H)			18						18
	Bangkok (I)			11						11
	Srakeaw (J)	10		15	2		2			29
	Chantaburi (K)			33						33
	Trat (L)	20		2						22
South (97)	Chumporn (M)			27		2	13			42
	Surat thani (N)		3	11			6			20
	Nakornsrithammarat (O)		1	10		1	3			15
	Shong-Kla (P)		1	10		1	8			20
Total		92	12	277	2	7	81	3	2	476



ภาพที่ 76 แผนภาพ Neighbor-joining แสดงความเหมือนกันระหว่างรูปแบบพันธุกรรมในไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอจากรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ รูปแบบพันธุกรรมแสดงไว้ตารางที่ 14 C = สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้กับฝั่งพันธุ์ที่มีจุดกำเนิดจาก East European และ O = สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้กับฝั่งพันธุ์ที่มีจุดกำเนิดจาก Middle Eastern

intermissa (A-8) TTAATAAATTAAATAAATAAACAACAAATATAACAAATATATTTATTAATAATTAAATTTATTTAAAA-
 mellifera (M-6)T.....T.....T.....
 lamarkkii (O-1c) T.....T.....G.....C.....
 syriaca (O-3) T.....T.....G.....C.....
 ThaiBT.....G.....C.....
 carnica (C)
 ThaiA2
 ligustica (C)
 ThaiA1

Q1

intermissa -TTCCCCACTTAATTCATATTAATTTAAGAAATAAATTA-TAACAA-
 mellifera T.....T.....A.....A.....T
 lamarkkii T.....A.....A.....A.....T
 syriaca T.....A.....A.....A.....T
 ThaiBQ1' T.....A.....A.....A.....T
 ThaiBQ1'' -.....A.....A.....A.....T
 carnica T.....A.....A.....A.....T
 ThaiA2 T.....A.....A.....A.....T
 ligustica T.....A.....A.....A.....T
 ThaiA1 T.....A.....A.....A.....T

Q2

intermissa TTTTAAATAAATAAATAA--TTAATTTTATTTTATATGAAATTTTAAATTCATCTTAAAGATTTAATCTTTTATTTAA
 melliferaTAA.....A.....A.....
 lamarkkiiTAA.....A.....A.....
 syriacaTAA.....A.....A.....
 ThaiBQ2TAA.....A.....A.....
 ThaiBQ2''TAA.....A.....A.....
 carnicaTAA.....A.....A.....
 ThaiA2TAA.....A.....A.....
 ligusticaTAA.....A.....A.....
 ThaiA1TAA.....A.....A.....

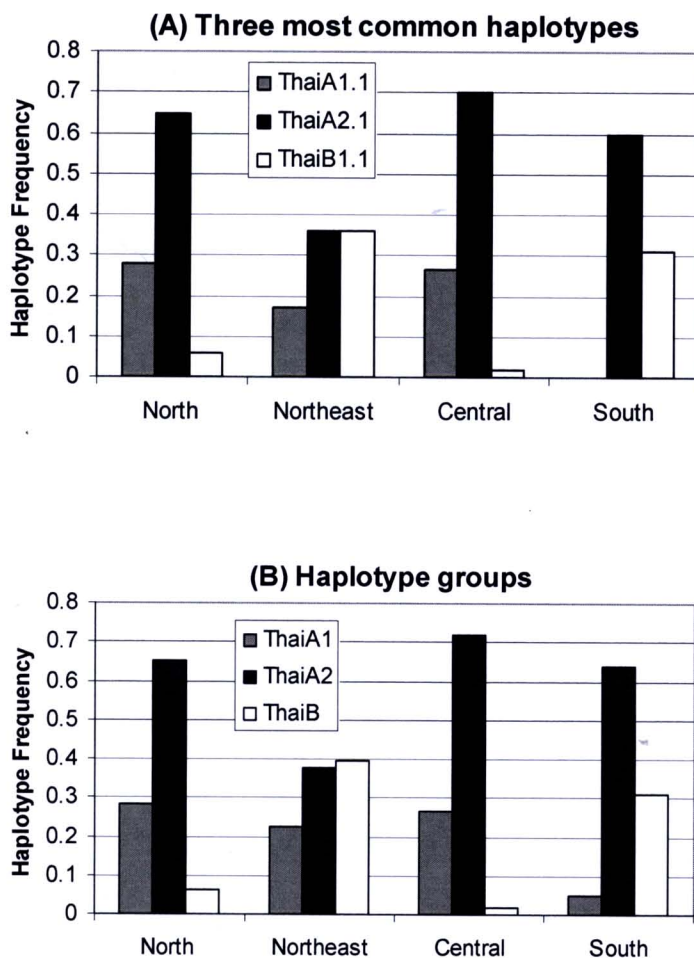
Q3

intermissa ATTAATAAATTAAATAAATAA--TAAACAAATAAATAACAAATATATTTATTTATTAATAATTAAATTTATTTAAAA-
 melliferaAA.....A.....A.....
 lamarkkiiT.....T.....C.....
 syriacaT.....T.....C.....
 ThaiBQ3'T.....T.....C.....
 ThaiBQ3''T.....T.....C.....
 carnicaT.....T.....C.....
 ThaiA2T.....T.....C.....
 ligusticaT.....T.....C.....
 ThaiA1T.....T.....C.....

ภาพที่ 77. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 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'') ใช้แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หนึ่งที่สองซึ่งเป็นซ้ำที่เกิดขึ้นในส่วนของ Q เป็นต้น ผึ้งพันธุ์ไทย (ThaiA1, ThaiA2 and ThaiB) จะเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์กับผึ้งพันธุ์ในสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *A.m. intermissa*, *A. m. mellifera*, *A. m. lamarkkii*, *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 ชิด (-) แสดงช่องว่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ สายวิวัฒนาการแบบ East Mediterranean or C ไม่พบส่วน P ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ non-coding

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ด้วย Molecular Analysis of Variance (AMOVA: Excoffier et al., 1992; Excoffier, 1995) (A) ฟาร์มเลี้ยงผึ้งจัดกลุ่มเป็นสี่ภาค ได้แก่ ภาคเหนือ North, ภาคกลาง Central, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ Northeast, และภาคใต้ South. (B) ฟาร์มเลี้ยงผึ้งจัดกลุ่มเป็นสองบริเวณ ภาคเหนือ รวมภาคกลาง North+Central, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือรวมภาคใต้ Northeast+South.

AMOVA analysis	Variance components	(A)			(B)		
		Partition of observed variance			Partition of observed variance		
		Variance	%Total	Φ -statistics	Variance	%Total	Φ -statistics
Nested analysis	Among regions	0.002	19.20	$\Phi_{ct} = 0.192$	0.003	29.92	$\Phi_{ct} = 0.299$
	Among apiaries/ within regions	0.001	16.81	$\Phi_{sc} = 0.208$	0.001	12.93	$\Phi_{sc} = 0.184$
	Within apiaries	0.006	63.99	$\Phi_{st} = 0.360$	0.006	57.15	$\Phi_{st} = 0.428$
Analysis among apiaries	Among apiaries	0.003	33.14		0.003	33.14	
	Within apiaries	0.006	66.86		0.006	66.86	
Analysis among regions	Among regions	0.002	22.38		0.003	31.15	
	Within regions	0.008	77.62		0.007	68.85	



ภาพที่ 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.

สรุปผลการศึกษา

ประชากรผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยจัดว่าเป็นผึ้งที่มีต้นกำเนิดมาจากสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ C และ แบบ O โดยอาศัยการศึกษาด้วยไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอ และพบว่าประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ มีสายความสัมพันธ์จากทางแม่มาจากผึ้งพันธุ์สายพันธุ์ *A. m. carnica* (รูปแบบพันธุกรรมแบบ ThaiA2.1) ประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ มาจากสายพันธุ์ *A. m. ligustica* (รูปแบบ

พันธุ์กรรมแบบ ThaiA1.1) และ 18 เปอร์เซ็นต์ มาจากสายพันธุ์ที่อาศัยในบริเวณตะวันออกกลางเป็นสายพันธุ์ที่มีสายวิวัฒนาการแบบ O (รูปแบบพันธุ์กรรมแบบ ThaiB) การศึกษานี้ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ฝั้วพันธุ์ที่เคยรายงานในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ThaiB เป็นเรื่องน่าสนใจอย่างมากที่มีความคล้ายกับฝั้วที่มีสายวิวัฒนาการแบบ O ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน และยังคงต้องการตัวอย่างของฝั้วพันธุ์ให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามในประเทศไทยไม่พบหลักฐานของไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอจากสายความสัมพันธ์วิวัฒนาการแบบ A และ M ในประชากรฝั้วพันธุ์ที่ได้ทำการศึกษาครั้งนี้

การเปรียบเทียบกับฝั้วพื้นเมืองมีความสัมพันธ์เล็กน้อยกับลักษณะโครงสร้างทางภูมิศาสตร์เกี่ยวกับการกระจายตัวของพันธุ์กรรมจากแม่ของฝั้วพันธุ์ในประเทศไทย ในฝั้วโพรงแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนเกี่ยวกับความแตกต่างทางพันธุ์กรรมระหว่างพื้นที่ของฝั้วโพรงทางตอนเหนือและตอนใต้ของประเทศไทยโดยมีบริเวณเชื่อมต่ออยู่ที่คอคออดกระ กลับกันการแปรผันของไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอในฝั้วพันธุ์ของไทยพบความแตกต่างกันในฟาร์มเลี้ยง ซึ่งสามารถสนับสนุนเหตุผลเรื่องการนำเข้าฝั้วพันธุ์ของประเทศไทยนั้นนำเข้ามาจากหลายแหล่งและมีพันธุ์กรรมที่หลากหลายมาก แม้ว่าจะพบความผันแปรในฟาร์มเลี้ยงแต่ก็พบการกระจายที่เป็นรูปแบบตามลักษณะทางภูมิศาสตร์ฝั้วพันธุ์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ O พบน้อยในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนฝั้วพันธุ์ที่เหมือนกับสายพันธุ์ *A. m. ligustica* พบน้อยในภาคใต้ รูปแบบการกระจายที่เกิดขึ้นเช่นนี้เป็นผลมาจากประวัติการนำเข้าฝั้วพันธุ์สู่ประเทศไทย การเคลื่อนย้ายรังฝั้วพันธุ์ภายในประเทศ หรืออาจจะเกิดจากปัจจัยอื่นๆ เป็นต้น

เป็นเรื่องน่าประหลาดใจสำหรับการพบฝั้วพันธุ์ในประเทศไทย ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดสายพันธุ์ทางวิวัฒนาการแบบ O ซึ่งเป็นฝั้วพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในบริเวณตะวันออกกลาง หลักฐานการสนับสนุนการนำเข้าฝั้วสายพันธุ์นี้ยังไม่ปรากฏชัดแต่จากข้อมูลการสัมภาษณ์ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพเกษตรกร (ฝั้ว) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จำนวน 5 ศูนย์ของประเทศไทย ตั้งอยู่ในจังหวัดต่างๆต่อไปนี้ เชียงใหม่ พิษณุโลก ขอนแก่น จันทบุรี และชุมพร รวมทั้งเกษตรกรผู้เลี้ยงฝั้วในฟาร์มต่างๆที่เก็บตัวอย่าง ต่างสนับสนุนเรื่องการนำเข้าฝั้วพันธุ์สู่ประเทศไทยนั้นมีที่มาของฝั้วจากหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศในแถบยุโรป ออสเตรเลีย และรัสเซีย เป็นต้น ซึ่งอาจมีลูกผสมของฝั้วพันธุ์สายวิวัฒนาการของตะวันออกกลาง O ปะปนเข้ามาด้วย จึงเป็นสาเหตุให้พบฝั้วสายพันธุ์นี้ในประเทศไทยเช่นกัน ส่วนอีกเหตุผลหนึ่งจากข้อมูลการสัมภาษณ์ผู้เชี่ยวชาญการศึกษาชีววิทยาของฝั้ว ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ ได้ให้ข้อมูลการนำเข้าฝั้วพันธุ์จากประเทศอิสราเอลในปี 1990-1995 เพื่อการทำงานวิจัยร่วมระหว่างสองประเทศ ซึ่งในช่วงนั้นมีการ

ชนสงรังผึ้งพันธุ์และผึ้งนางพญาเข้าสู่ประเทศไทยจำนวนหนึ่ง ซึ่งผึ้งเหล่านี้สามารถอยู่รอดได้ดีในประเทศไทยได้จึงอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่สนับสนุนการค้นพบผึ้งสายพันธุ์นี้ในประเทศไทย

การศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP ในไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นวิธีที่รวดเร็วสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจากแม่ของประชากรผึ้ง และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นวิธีที่ช่วยในการยืนยันสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงอาศัยวิธีการศึกษาทั้งสองวิธีนี้เพื่อใช้ในการตรวจสอบจุดกำเนิดและลักษณะพันธุกรรมของประชากรผึ้งพันธุ์ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นที่เข้ามามีบทบาทกระจายอยู่ทั่วไปและเป็นแมลงเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Akratanakul P. (2000) Apiculture development in Thailand, pp. 395-398 in: Anonymous (Ed.), Proceedings of the Seventh International Conference on Tropical Bees: Management and diversity, and Fifth Asian Apicultural Association Conference, Chiang Mai, Thailand, IBRA
- Arias M. C., Sheppard W. S. (1996) Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence, Molecular Phylogenetics and Evolution 5, 557-566.
- Clarke K. E., Oldroyd B. P., Javier J., Quezada-Euan G., Rinderer T. E. (2001) Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis, Molecular Ecology 10, 1347-1355.
- Clarke K. E., Rinderer T. E., Franck P., Quezada-Euán J. G., Oldroyd B. P. (2002) The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: A study of a massive hybridization event across time, Evolution 56, 1462-1474.
- Cornuet J. M., Garnery L., Solignac M. (1991) Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA, Genetics 128, 393-403.
- Cornuet J.-M., Garnery L. (1991) Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications, Apidologie 22, 627-642.
- Crozier Y. C., Koulianos S., Crozier R. H. (1991) An improved test for Africanized honey bee mitochondrial DNA, Experientia 47, 968-969.
- Diniz N. M., Soares A. E. E., Sheppard W. S., Del Lama M. A. (2003) Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay, Genetics and Molecular Biology 26, 47-52.
- Engel M. S. (1999) The taxonomy of recent and fossil honeybees (Hymenoptera: Apidae: *Apis*), Journal of Hymenopteran Research 9, 165-196.
- Excoffier L. (1995) AMOVA 1.55 (Analysis of Molecular Variance), University of Geneva, Geneva
- Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric

- distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics* 131, 479-491.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J. M. (2000) Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from Near East, *Apidologie* 31, 167-180.
- Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B. P., Hepburn H. R., Solignac M., Cornuet J. M. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: Microsatellite and mitochondrial data, *Heredity* 86, 420-430.
- Garnery L., Cornuet J.-M., Solignac M. (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis, *Molecular Ecology* 1, 145-154.
- Garnery L., Solignac M., Celebrano G. & Cornuet J.-M. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L., *Experientia* 49, 1016-1021.
- Hall H. G., Muralidharan K. (1989) Evidence from mitochondrial DNA that African honey bees spread as continuous maternal lineages, *Nature* 339, 211-213.
- Hall H. G., Smith D. R. (1991) Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 88, 4548-4552.
- Kavinseksan B., Wongsiri S., Rinderer T. E., De Guzman L. I. (2004) Comparison of the hygienic behavior of ARS Russian commercial honey bees in Thailand, *American Bee Journal* 144, 870-872.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.
- McElroy D., Moran P., Bermingham E., Kornfield I. (1992) The Restriction Enzyme Analysis Package (REAP) Version 4.0., *Journal of Heredity* 83, 157-158.
- Meixner M. D., Sheppard W. S., Poklukur J. (1993) Asymmetrical distribution of a mitochondrial DNA polymorphism between two introgressing honey bee subspecies, *Apidologie* 24, 147-153.
- Nei M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York.
- Nei M., Li W.-S. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 5269-5273.
- Palmer M. R., Smith D. R., Kaftanoglu O. (2000) Turkish honey bees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA, *Journal of Heredity* 91, 42-46.
- Ruttner F. (1988) *Biogeography and taxonomy of honeybees*, Springer-Verlag, Berlin.
- Sheppard W. S., Arias M. C., Grech A., Meixner M. (1997) *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta, *Apidologie* 28, 287-293.

- Sheppard W. S., Meixner M. (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia, *Apidologie* 34, 367-375.
- Sheppard W. S., Smith D. R. (2000) Identification of African-derived bees in the Americas: A survey of methods, *Annals of the Entomological Society of America* 93, 159-176.
- Smith D. R. (1991) Mitochondrial DNA and honey bee biogeography, in: Smith D. (Ed.), *Diversity in the Genus Apis*, Westview, Boulder, CO.
- Smith D. R., Brown W. M. (1988) Polymorphisms in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*), *Experientia* 44, 257-260.
- Smith D. R., Brown W. M. (1990) Restriction endonuclease cleavage site and length polymorphisms in mitochondrial DNA of *Apis mellifera mellifera* and *A.m. carnica* (Hymenoptera: Apidae), *Annals of the Entomological Society of America* 83, 81-88.
- Smith D. R., Brown W. M., Taylor O. R. J. (1989) Neotropical Africanized bees have African mitochondrial DNA, *Nature* 339, 213-215.
- Smith D. R., Hagen R. H. (1996) The biogeography of *Apis cerana* as revealed by mitochondrial DNA sequence data, *Journal of the Kansas Entomological Society* 69, 294-310.
- Smith D. R., Hagen R. H. (1999) Phylogeny and Biogeography of *Apis cerana* subspecies: testing alternative hypotheses, in: Hoopingarner R., Connor L. (Ed.), *Apiculture for the 21st Century*, Wicwas Press, Cheshire, CT.
- Smith D. R., Slaymaker A., Palmer M., Kaftanoglu O. (1997) Turkish honey bees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage, *Apidologie* 28, 269-274.
- Thapa R., Wongsiri S. (1997) *Eupatorium odoratum*: a honey bee plant for beekeepers in Thailand, *Bee World* 78, 175-178.
- Warrit N., Smith D. R., Lekprayoon C. (2006) Genetic subpopulations of *Varroa* mites and their *Apis cerana* hosts in Thailand, *Apidologie* 37, 19-30.
- Wongsiri S. (1988) The effect of import of *Apis mellifera* L. to Thailand., pp. 162-167 in: Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates, Cairo, Egypt.
- Wongsiri S., Chanchao C., Deowanish S., Aemprapa S., Chaiyawong T., Peterson S., Leepitakrat S. (1995) Honeybee diversity and beekeeping in Thailand, *Bee World* 81, 20-29.
- Wongsiri S., Chanchao C., Lekprayoon C., Wattanasermkit K., Deowanish S., Leepitakrat S. (2000) Honeybee diversity and management in the new millennium in Thailand, pp. 9-14 in: Anonymous (Ed.), *Proceeding of the Seventh international conference on tropical bees: management and diversity*, Chiang Mai, Thailand.

1.5.2 ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทยโดยวิธี PCR-RFLP

1. เก็บตัวอย่างชันโรงในประเทศไทย จำนวน 482 ตัวอย่าง แช่ไว้ใน 95% alcohol และเก็บไว้ที่ 4°C สกัดดีเอ็นเอจากชันโรงโดยนำตัวอย่างส่วนของขาของชันโรง 1 ตัว มาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Phenol Chloroform Extraction และวัดขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis ได้ตัวอย่างผลการสกัดดีเอ็นเอดังแสดงในภาพที่ 79



ภาพที่ 79 แสดงผลการสกัดดีเอ็นเอของชันโรง

Lane M = λ /Hind III

Lane 1-17 = ตัวอย่างชันโรง

2.การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอตรงบริเวณ 16S rDNA ใน mtDNA ของชันโรง โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 16 และได้มีการปรับสภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจนกระทั่งได้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอของชันโรงได้ทุกชนิด

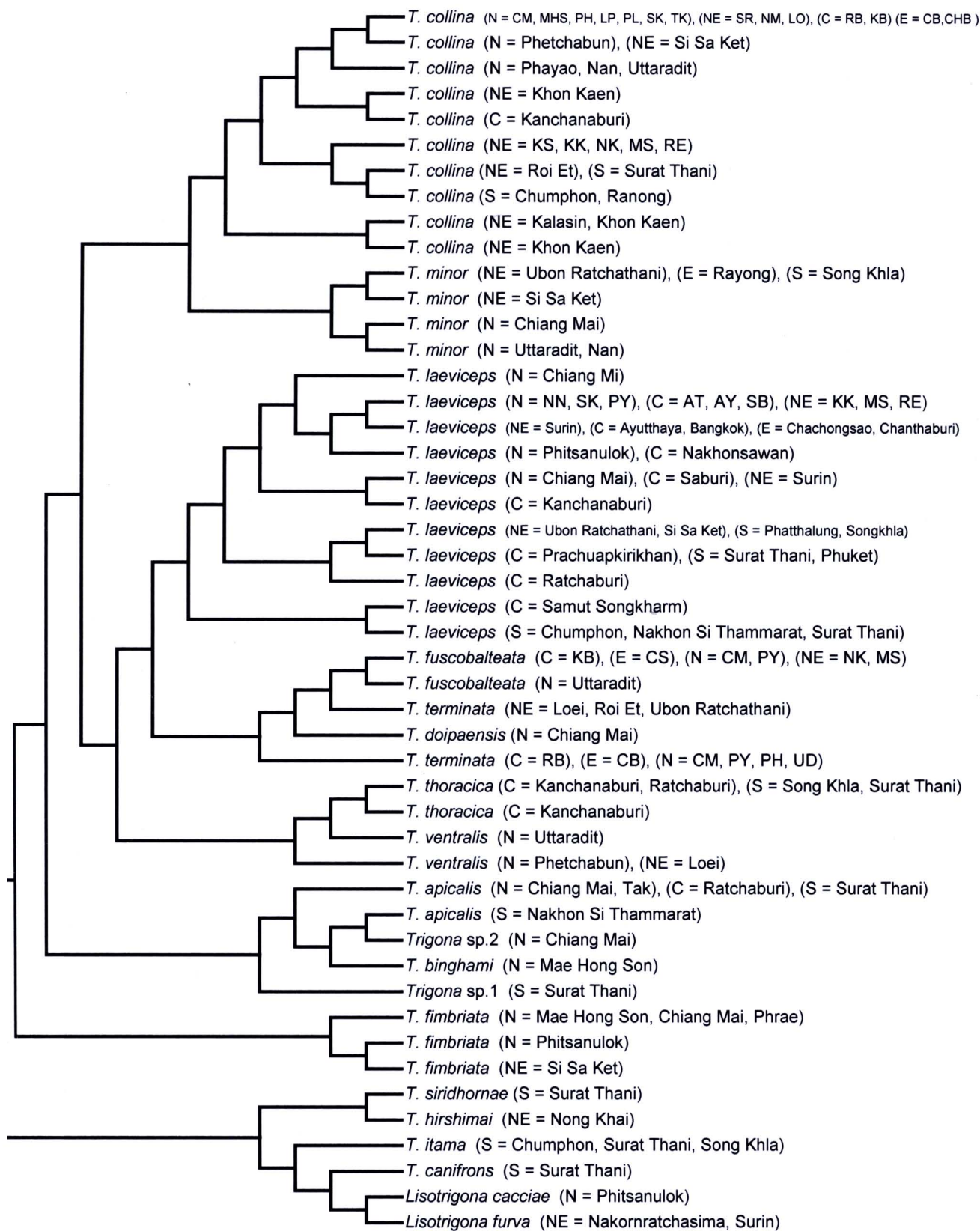
ตารางที่ 16 แสดง primer ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ 16S rDNA ใน mtDNA ของชันโรง

mtDNA	Primers
16S rDNA	Primer 1:5' - CACCTGTTTATCAAAAACAT -3' Primer 2:5' - CGTCGATTTGAACTCAAATC -3'

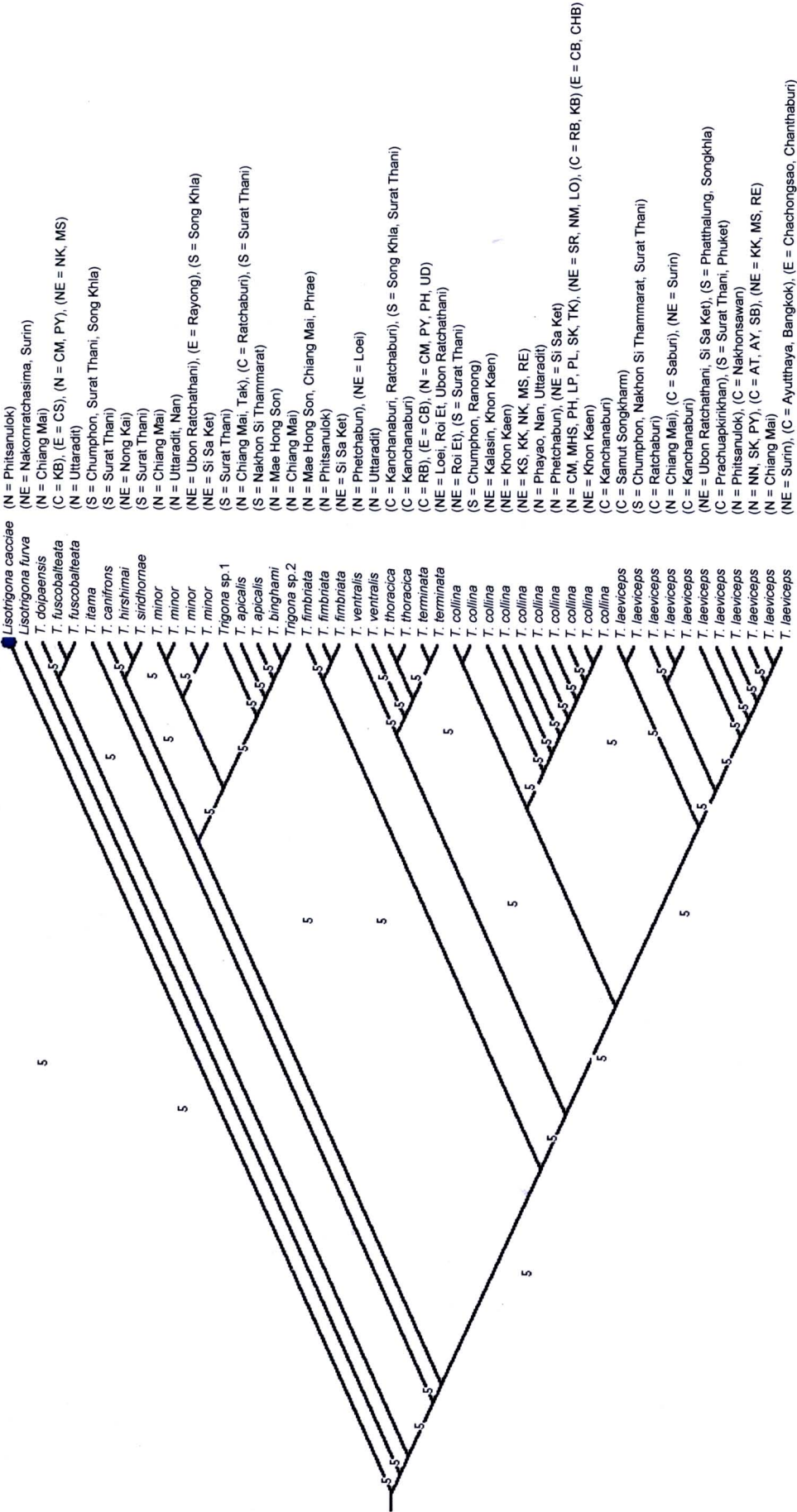
ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ เอนไซม์ *Dra* I
เอนไซม์ *Hpy*188 III เอนไซม์ *Ssp* I และเอนไซม์ *Pac* I และทำการบันทึกลงผล

ผลการศึกษา

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 (ภาพที่ 80 และ 81)



ภาพที่ 80 Nighbor-joining tree (bootstrap 1000 replications) by using Mega 3.0 program
(Kumar et al. 1993)



ภาพที่ 81 Heuristics test tree (bootstap 1000 replications) by using Winclada program (Nixon, K. C., 1999)

สรุปผลการศึกษา

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

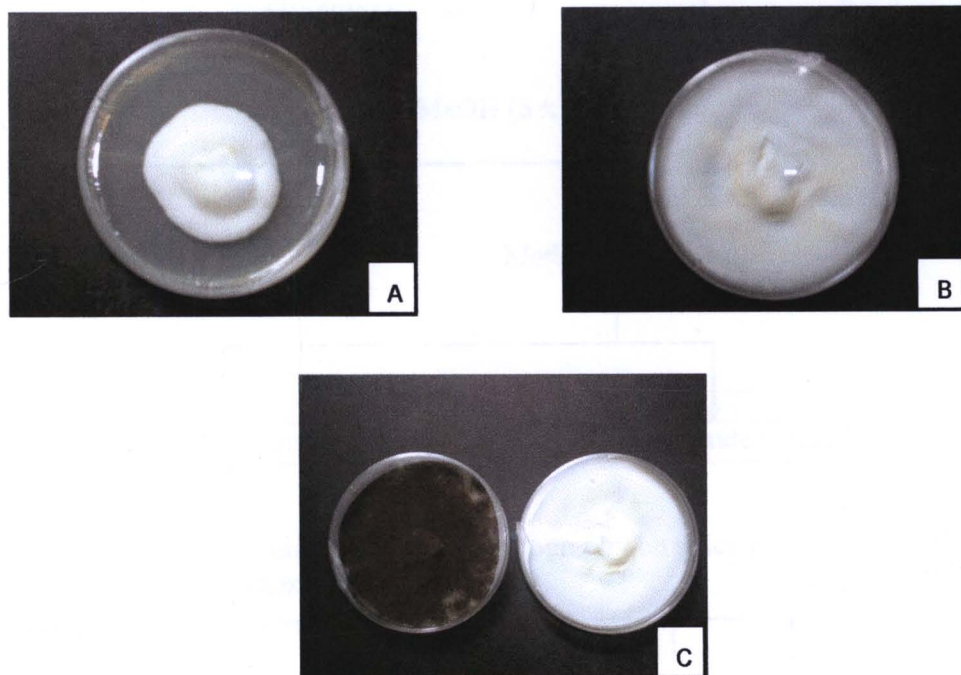
1.6 ศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร propolis และ sticky band ของ *A. florea*, *andreniformis* และชันโรง

1.6.1 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Ascosphaera apis* ของพรอพอลิสจากรังชันโรง (Chemical compositions and anti-fungus *Ascosphaera apis* of propolis from nest of stingless bee)

มนุษย์มีการนำผลิตภัณฑ์ต่างๆของผึ้งมาใช้ประโยชน์อย่างมากมายพรอพอลิสหรือยางไม้ นับเป็นผลิตภัณฑ์จากผึ้งชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมและเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 300 ปีก่อนคริสตกาลในรูปแบบของยาแผนโบราณ โดยแหล่งที่มาที่สำคัญของพรอพอลิส คือ ยางไม้เหนียวอ่อน หรือยางของยอดอ่อนของต้นไม้ ซึ่งผึ้งจะนำยางไม้มาผสมกับน้ำเหนียว ๆ และไขผึ้ง สารสกัดพรอพอลิส จากธรรมชาติที่ประกอบด้วย Organic flavonoids ประมาณ 85% องค์ประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดี และพบว่าสามารถยับยั้งการขยายเพิ่มขึ้นของเชื้อดังกล่าว คุณสมบัติที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียของพรอพอลิสนี้ สามารถคงตัวได้นานหลายปี ถ้าหากทำการเก็บรักษาอย่างดี นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพการป้องกันโรคและการทำงานระบบต่างๆ ของเซลล์รวมถึงการดูดซึมและการใช้วิตามินซี ให้แก่ร่างกายของมนุษย์ จึงได้มีการพัฒนา

มาใช้เป็นประโยชน์ทางการรักษาโรคต่างๆ เช่น ด้านอนุมูลอิสระ, ด้านการอักเสบ, เป็นยาปฏิชีวนะธรรมชาติ ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส รา, ลดเสมหะในลำคอ โพร่งจมูกอักเสบ เนื้อเยื่อในช่องปาก และคออักเสบ เจ็บคอ ลมหายใจมีกลิ่น ภูมิแพ้ ภูมิ-ต้านทานอ่อนแอ ในปัจจุบันพบว่ามียาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีส่วนผสมของพรอพอลิสจำหน่ายอย่างแพร่หลายในท้องตลาด เช่น เครื่องสำอาง ยาสีฟัน น้ำยารักษาปาก ครีมทาผิว รวมถึงยาทาแผลต่าง ๆ (Ayala *et al.*, 1985; Bankova *et al.*, 1983; Bjorkner, 1994) พรอพอลิสที่พบโดยทั่วไปมีความหลากหลายมากทั้งทางด้าน สี ความหนืด และสารประกอบของพรอพอลิส กล่าวคือ แหล่งที่มาของยางไม้รังผึ้งนำมาทำเป็นพรอพอลิส มีผลต่อความหลากหลายของพรอพอลิสมาก (Johnson *et al.*, 1994) รายงานการแยกองค์ประกอบของพรอพอลิสที่เก็บมาจากรังผึ้งทางมลรัฐโอไฮโอ ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้กระดาษโครมาโทกราฟีในการแยกพบว่ามียาองค์ประกอบมากกว่า 30 ชนิด และเมื่อเทียบกับพรอพอลิสที่เก็บมาจากกรุงวอร์ซอว์ ประเทศโปแลนด์ พบว่ามียาองค์ประกอบที่ต่างกัน 10 ชนิด (Johnson *et al.*, 1994) Ikeno *et al.*, 1991 พบว่าสารสกัดของพรอพอลิสสามารถยับยั้งกระบวนการไกลโคซิทรานเฟอร์เรสของ *staphylococci* ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในช่องปาก ในการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์นั้น โดยใช้สารสกัด พรอพอลิสจากเอธานอล และนำมาทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้ที่มีความเข้มข้น 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Spiridonov *et al.*, 1992) และในปี 1995 มีงานวิจัยว่า Clerodane diterpenoid ซึ่งเป็นสารประกอบที่ได้จากพรอพอลิส เมื่อทดสอบกับเซลล์ไตของกระต่ายพบว่า เซลล์สามารถอยู่รอดได้ 75% ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Matsuno, 1995) Valcic *et al.* (1999) สามารถแยกองค์ประกอบของพรอพอลิสได้เป็น สารประกอบฟีนอลิก 17 ชนิด ตัวอย่างเช่น Viscidone, Viscidone-14-acetate, Trementone, 14-hydroxytrementone, 14-acetoxytrementone, 2,2dimethyl-6-acetyl-2H-chromen, Coniferyl-9-O-acetate, Ferulic acid ethyl ester, Coniferyl aldehyde, Vanillin, 9,9'-bisacetyl-olivil และองค์ประกอบเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ทั้งแบคทีเรีย ไวรัส ราที่ก่อโรคได้ ปัญหาที่เกิดขึ้นคือพรอพอลิสที่ใช้ในปัจจุบันมีราคาแพง เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากผึ้งมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการในท้องตลาด ดังนั้นการหาแหล่งพรอพอลิสที่มีปริมาณมากกว่าและให้คุณสมบัติทางชีวภาพที่ใกล้เคียงจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ ชันโรงเป็นแมลงสังคมกลุ่มเดียวกับผึ้ง จัดอยู่ใน Kingdom Animalia, Phylum Arthropoda, Class Insecta, Order Hymenoptera, Family Apidae, Subfamily Meliponinae ซึ่งสามารถแยกได้เป็น 5 Genera : (1) Melipona; (2) Meliponula; (3) Trigona; (4) Dactylurina; (5) Lestrimelitta (Thomas, 1986 ; Michener, 1974 ; Eva, 1999) ในการวิจัยนี้ใช้ชันโรงใน Genus Trigona, Species *Trigona laeviceps* (Smith, 1857) ซึ่งเป็นชนิดที่มีทั่วไปและสามารถเลี้ยงได้ โดยเฉพาะในภาคตะวันออกของประเทศไทย ลักษณะที่สำคัญแตกต่างกันไปจากผึ้งคือ ชันโรงเป็นผึ้งที่

ไม่มีเหล็กใน สร้างรังปกปิดทางช่องโพรงดิน โพรงไม้ หรือตามอาคารบ้านเรือน รังชั้นโรงแตกต่างกับผึ้งตรงที่ผึ้งใช้พรอพอลิสเพียงรอบนอกรังเท่านั้น ส่วนชั้นโรงจะใช้ขี้ผึ้งบริสุทธิ์และเชอร์แมน ซึ่งเป็นขี้ผึ้งผสมพรอพอลิสที่มีอยู่มากมายดังนั้นการนำรังชั้นโรงมาสกัดพรอพอลิสจึงได้ปริมาณมากกว่าพรอพอลิสจากรังผึ้ง (ADVANCED THAILAND GEOGRAPHIC, 2546) และเนื่องจากในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งได้รับความนิยมทั่วโลก การเลี้ยงผึ้ง เกิดจากสาเหตุที่น้ำผึ้งจากธรรมชาติเริ่มหายาก เนื่องจากป่าไม้ถูกทำลาย ผึ้งและสัตว์ป่าขาดที่อยู่อาศัย แต่ผึ้งประสบปัญหาการแพร่กระจายโรคเน่าของตัวอ่อนที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์มาก เช่น โรคชอล์กบรูต (Chalkbrood, CB) สาเหตุ เกิดจากรา *Ascosphaera apis* ทำให้ตัวอ่อนผึ้งที่ตายถูกปกคลุมด้วยเส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะคล้ายแท่งชอล์กสีขาว โดยปกติสปอร์จะไม่ทำให้เกิดโรคจนกว่าจะมีการเติบโตเป็นเส้นใย ซึ่งจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิปกติในรังผึ้ง อาการของผึ้งที่ถูกเชื้อเข้าทำลายมีทั้งตัวอ่อนและดักแด้ ตัวอ่อนอายุ 3-4 วันเมื่อมีอาการระบดอย่างรุนแรง จะมีตัวอ่อนที่ปิดฝาดายและแห้งอยู่ภายในหลอดรวง รังที่เป็นโรคนี้นี้ในระดับที่รุนแรง จะพบว่าตัวอ่อนที่เป็นโรคแห้งตายตกอยู่ที่พื้นรังเป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถตรวจพบโรคนี้ได้ง่าย



ภาพที่ 82 (A) รา *Ascosphaera apis* อายุ 3 วัน (B) อายุ 7 วัน

(C) สปอร์และเส้นใยของรา *Ascosphaera apis* อายุ 7 วัน

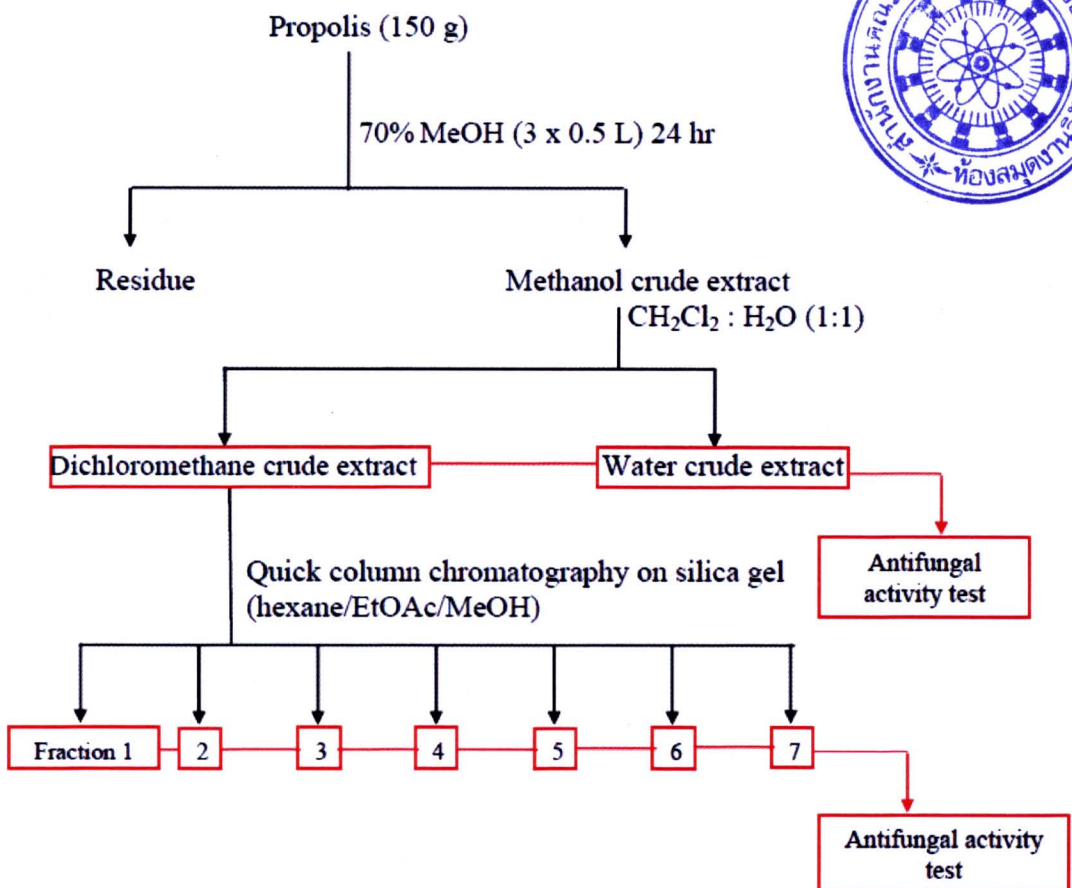
การป้องกันกำจัด ยังไม่มีวิธีการควบคุมที่เชื่อถือได้ แต่ก็มีหลายวิธีที่ส่งผลในการป้องกัน ด้วยการรักษาผึ้งไว้ให้ปลอดภัยจากเชื้อโรคนี้ การทำให้รังผึ้งมีประชากรที่แข็งแรง ระบายอากาศที่ดี ไม่ให้ความชื้นภายในรังสูง มีการเพิ่มตัวเต็มวัยที่เพิ่มออกจากหลอดรวงใหม่ ๆ ให้กับรังที่เพิ่งเริ่มเป็นโรคนี้ เพื่อช่วยทำความสะอาดรัง

งานวิจัยนี้คาดว่าจะการแยกสารประกอบของพรอพอลิสและนำมาทดสอบคุณสมบัติของสารประกอบในพรอพอลิสที่ได้จากรังชันโรง (*Trigona laeviceps*) จากในประเทศน่าจะมีผลในการยับยั้งเชื้อรา (*Ascosphaera apis*) ที่ก่อโรคซอล์กับรูดได้

วิธีการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างรังชันโรง โดยเลือกใช้สปีชีส์ *Trigona laeviceps* ในการวิจัยเนื่องจากเป็นชันโรงที่พบได้ทั่วไปและมีการเพาะเลี้ยงได้ และตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เก็บได้จาก ต้นยางใต้หรือต้นสะแบง บ้านข่าน้อย ต. หนองผือ อ. จตุรพักตรพิมาน จ. ร้อยเอ็ด

2. ขั้นตอนการสกัด



- 2.1 นำตัวอย่างรังชันโรง (150 กรัม) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆก่อนนำมา
- 2.2 สกัดด้วย 70% เมทานอล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2.3 กรองด้วยกระดาษกรอง
- 2.4 ระเหยเมทานอลออก
- 2.5 สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและน้ำ
- 2.6 ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Ascosphaera apis*
 - 3.1 นำสารสกัดเมทานอลที่ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของ

Ascosphaera apis

3.2 วัดการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ascosphaera apis* โดยวัดจากเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่ที่สามารถยับยั้งได้ หลังการใส่สารสกัดและเลี้ยงไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4. ทำการแยกสารสกัดพรอพอลิส โดยวิธีโครมาโทกราฟี (Valcic et al., 1999)
 - 4.1 แยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี
 - 4.2 แยกละเอียดอีกครั้งโดยใช้วิธี HPLC
5. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของ

Ascosphaera apis ที่ละชนิดโดยใช้วิธีเดียวกับข้อที่ 3

6. วิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ได้ระหว่างสารสกัดพรอพอลิส และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จากรังชันโรง *T. laeviceps*

ผลการศึกษา

- สารสกัดไดคลอโรมีเทนความเข้มข้น 190 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ascosphaera apis* ได้ 50% และที่ความเข้มข้น 250 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ascosphaera apis* ได้ 100%

ตารางที่ 17 ผลการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ

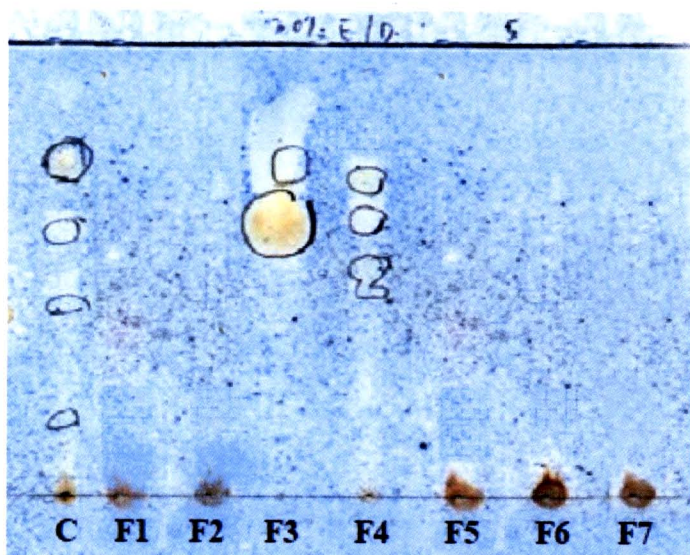
Concentration of dichloromethane crude extract (ppm)	Inhibition (%)	SD	IC ₅₀ (ppm)
0	0.0	±0.00	190.0
150	3.3	±0.23	
170	20.7	±0.32	
190	51.3	±0.23	
200	74.3	±0.51	
230	83.3	±0.29	
250	98.3	±0.29	
500	100.0	±0.00	
1000	100.0	±0.00	

- การสกัดไดคลอโรมีเทนปริมาณ 20 กรัม สามารถแยกสารโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ออกมาเป็น 7 ส่วน

ตารางที่ 18 สารสกัดไดคลอโรมีเทนที่แยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ส่วนที่ 1-7

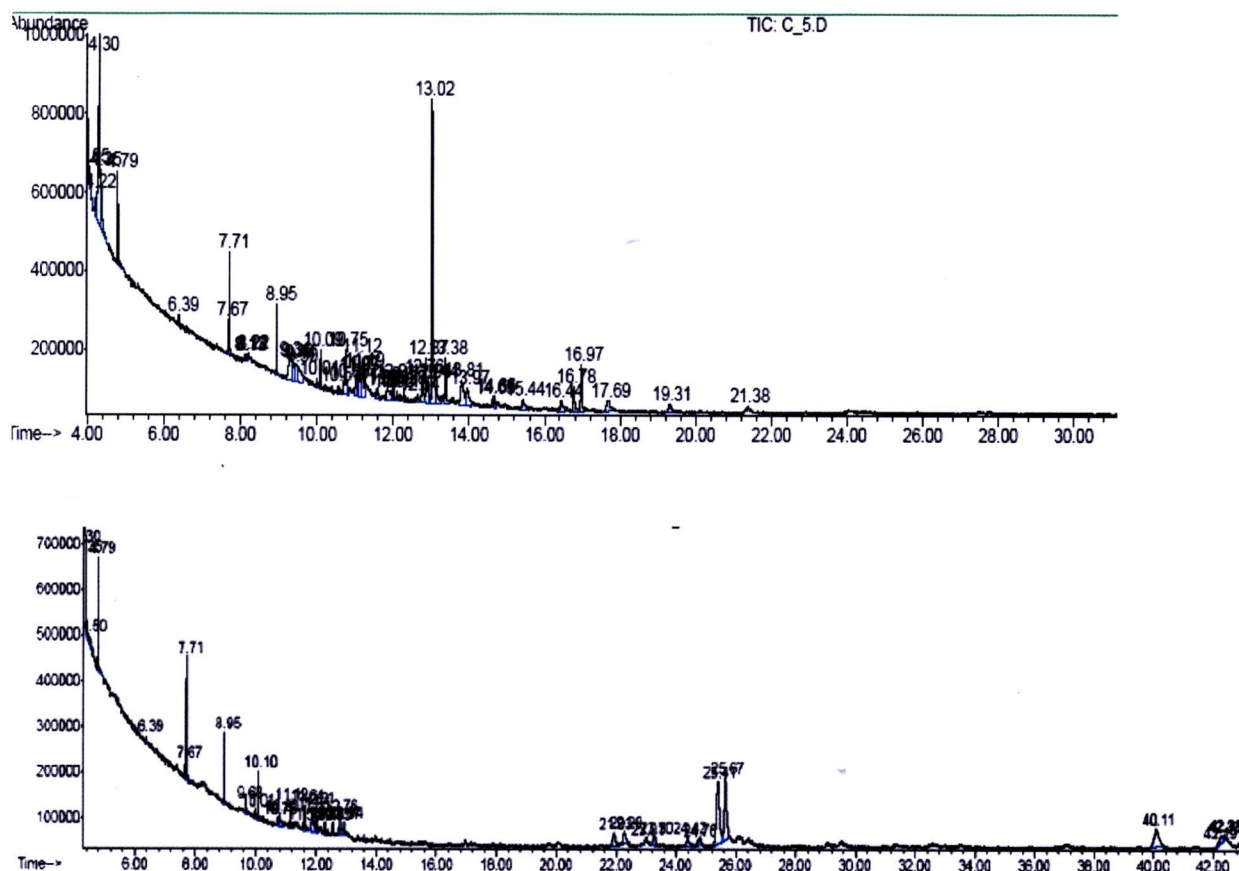
Fraction number	Eluent	Remarks	Weight (g)
1	Hexane – 1:9 EtOAc/Hexane	yellow	0.14
2	2:8 EtOAc/ Hexane	pale yellow	5.43
3	3:7EtOAc/Hexane	yellow viscous	2.72
4	4:6 EtOAc/Hexane	orange	2.68
5	6:4 EtOAc/Hexane	light brown	1.92
6	8:2 EtOAc/Hexane	brown	0.55
7	EtOAc – 1:9 MeOH/EtOAc	dark brown	0.98

- แต่ละส่วนกำลังดำเนินงานในขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Ascosphaera apis* พบว่าสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสปอร์ได้คือ สารประกอบในส่วนที่ 3 และ 4



ภาพที่ 83 แสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Ascosphaera apis* โดยใช้การทดสอบบนแผ่น TLC

- เมื่อได้ส่วนที่ 3 และ 4 ซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของ *Ascosphaera apis* แล้ว จะทำการแยกละเอียดอีกครั้งโดยใช้วิธี GC-MS (ภาพที่ 84)



ภาพที่ 84 ผลการองค์ประกอบของสารส่วนที่ 3 (A) และสารส่วนที่ 4 (B) โดยใช้วิธี GC-MS

สรุปผลการศึกษา

พหุพอลิสจากรังชันโรง *Trigona laeviceps* ที่เก็บจากร้อยเอ็ด ประเทศไทย ได้ถูกนำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascosphaera apis* ที่ก่อโรคขอลักบรูด พบว่า ที่ความเข้มข้น 190 ppm ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 250 ppm ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แยกสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 7 ส่วนย่อย สารสกัดที่แยกได้ในส่วนที่ 3 และ 4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ascosphaera apis* ได้โดยใช้วิธี TLC autographic เมื่อนำพหุพอลิสมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วย 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 เป็นองค์ประกอบหลักในพหุพอลิส แต่ไม่มีข้อมูลตรงกับฐานข้อมูลของ Wiley ถึงแม้ว่า camphor ซึ่งเป็น

ส่วนประกอบหลักของส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แสดงให้เห็นว่า camphor ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascosphaera apis*

เอกสารอ้างอิง

สิริวัฒน์ วงศ์ศิริ. 2532. ชีววิทยาของผึ้ง. ครั้งที่2. กรุงเทพฯ: บริษัทต้นอ้อจำกัด.

ศุภยอนุรักษ์และขยายพันธุ์ผึ้งที่ 4 จันทบุรี. 2542. ชันโรง (stingless bee).

Ayala, F., Lembo, G., Nappa, P., and Balato, N., 1985. Contact dermatitis from propolis.

Contact Dermatitis. 12: 181–182.

Bankova, V. S., Popov, S. S. and Marekov, N. L., 1983. A study on flavonoids of propolis.

Journal of Natural Products 46: 471–474.

Burdock, A. G. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis

(propolis). Food and Chemical Toxicology. 36: 347-363.

Ghisalberti, E. L., 1979. Propolis: a review. Bee World 60: 59–84.

Ikeno, K., Ikeno, T. and Miyazawa, C., 1991. Effects of propolis on dental caries in rats.

Caries Research. 25: 347–351.

Johnson, K. S., Eischen, F. A. and Giannasi, D. E., 1994. Chemical composition of North

American bee propolis and biological activity towards larvae of greater wax moth

(Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Chemical Ecology. 20: 1783–1792.

Kartal, M., Kaya, S., and Kurucu, S. 2002. GC-MS analysis of propolis samples from two

different regions of Turkey. Z. Naturforsch. 57c: 905-909.

Spiridonov, N. A., Arkhipov, V. V., Narimanov, A. A., Shabalina, S. A., Zverkova, L. A.,

Shvirst, E. M. and Kondrashova, M. N., 1992. Effect of *Galleria mellonella* larvae

preparation and honeybee products on cell cultures. Comparative Biochemistry

and Physiology Comparative Pharmacology and Toxicology. 102: 205–208.

Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, M. A., Avila, G., Franzblau, S., Singh, P. M., Maiese, M.

W., and Timmermann, N. B. 1999. Phytochemical, morphological, and biological

investigations of propolis from Central Chile. Z. Naturforsch. 54c: 406-416.

Wang, J. B., Lien, H.Y., and Yu, R. Z. 2004. Supercritical fluid extractive fractionation-study

of the antioxidant activities of propolis. Food chemistry. 86: 237-243.

1.6.2 Effects of bioactive of Thai propolis against the pathogenic bacteria

Abstract

Propolis is a resinous substance collected by the honeybee: *Apis mellifera* from the plants, has different color from yellow green to dark brown depending on the plants as well as pharmacological properties. The objective of this research was to determine effects of bioactive compound (flavonoids) against the pathogenic bacteria isolated from the skin disease of cats and dogs. Bacteria were collected from the skin diseases of cats and dogs from Veterinary Hospital, Chiang Rai by swabbing technique. The three different concentrations; 5, 20 and 30 (% w/v) of ethanolic extraction of propolis were prepared. These different concentrations (5, 20 and 30%) of propolis against *Staphylococcus gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, and *S. aureus* and *P. diminuta* were tested in *in-vitro*. The results show that *S. gallinarum* was highly sensitive to all three different concentrations whereas *S. felis* was found less sensitive to 5, 20 and 30% of EEP. The results show that 20 and 30 percentage has high zone of inhibition compared to 5 percentages. In conclusion, Thai propolis has antibacterial effect against seven species of bacteria that cause skin diseased in small animals.

Introduction

Propolis is a resinous substance collected by the honeybee: *Apis mellifera* from the plants, particularly from flowers and leaf buds. The propolis has different color from yellow green to dark brown depending on the plants. More than 300 constituents have been identified in different propolis samples (Bankova, et al., 2000). Generally, the propolis contains 45-55% flavonoids, 25-35% waxes and fatty acids, 5% other organics and minerals (Bankova, et al., 1987; Papay, et al., 1987). The propolis is commonly used in dermatological and cosmetic (Lejeune et al., 1988). The propolis is also used as medicines for anticancer (Marcucci, 1995), antiinflammatory (Wang, et al., 1993), antibiotic (Koo et al., 2000), antioxidative (Basnet, et al., 1997; Moreno, et al., 2000), antiviral (Kujumgiev et al., 1999; Marcucci, 1995), antifungal (Kujumgiev, et al., 1999; Thapa and Wongsiri, 2004), antibacterial (Moreno, et al., 1999; Sforcin, et al., 2000). Skin diseases are usually caused

by bacteria; *Staphylococcus aureus* and *Streptococci* species. Previous studies show that the propolis can kill: *S. aureus* and *Streptococci* species (Chernyak, 1973; Dimov, *et al.*, 1991). Bacterial skin infection in dogs and cats is called Pyoderma, which is mainly caused by *Staphylococci* species, can be controlled but not cured, and require frequent treatment. There has been no research conducted to test the bioactive (antibacterial) effects of Thai propolis against the skin diseases caused bacteria. It is an important to know that whether Thai propolis has as antibacterial effect against the skin disease of dogs and cats.

Objective

The main objective of this research was to -

- determine antibacterial effect of Thai propolis against of the pathogenic skin disease of cats and dogs.

Methods

1. Propolis

Propolis samples were collected from Chiangsen, Chiang Rai, northern part of Thailand.

2. Preparation of ethanolic extraction of propolis

Three different concentrations; 5, 20, and 30 (% w/v) of ethanolic extraction of propolis (EEP) was prepared using 95% ethanol alcohol according to the guideline of a FAO bulletin (Krell, 1996).

3. Collection of bacteria

Bacteria were collected by swabbing the infected skin of three dogs and cats from veterinary hospital, Rajabhat University, Chiang Rai.

4. *In vitro* antimicrobial activity test

Bacteria isolated from skin diseases were cultured at 37°C for 18-20 hour in the nutrient broth. The sterile paper discs (6mm diameter) were impregnated in three different concentrations 5, 20, and 30% of propolis and placed on the agar plates. The ethanol alcohol (95%) and distilled water were used as control solvents. The plates were

incubated at 37°C for overnight. The zone of inhibition (ZI) of bacterial growth was measured by using a vernier caliper and photographed.

5. Statistical analysis

The ZI of each bacterial species was subjected to Analysis of variance (ANOVA). Different among the samples, between samples and controls were determined by LSD. A level of $p<0.05$ was used as criteria for statistical significance.

Results

1. Isolation and identification of bacteria

Seven types of pathogenic bacteria from skin diseases of dogs and cats isolated is presented in Table 19. Six out of seven; *Staphylococcus gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, and *S. aureus* were gram-positive bacteria and *P. diminuta* was a gram-negative bacteria. *P. diminuta* was occurred in both cats and dogs.

Table19. Bacterial species isolated from diseased skin of cats and dogs.

Small animals	Sampling sites	Bacterial species
Cats	skin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
	skin	<i>S. auricularis</i>
	skin	<i>S. felis</i>
	skin	<i>S. schleiferi</i>
Dogs	skin	<i>S. intermedius</i>
	skin	<i>S. aureus</i>
Cats and Dogs	skin	<i>P. diminuta</i>

2. Antimicrobial activity of ethanolic extraction of propolis

The antimicrobial activity of 5, 20, and 30 percent of EEP against seven species of pathogenic bacteria; *S. gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. aureus* and *P. diminuta* is presented in Figure 85. *S. gallinarum* was found highly activate (12.4mm) against three different tested concentrations than six other species of bacteria; *S. auricularis* (9.7mm), *S. felis* (8mm), *S. schleiferi* (9.6mm),

S.intermedius (9.1mm), *S. aureus* (8.8mm) and *P. diminuta* (9.2mm). However, there is significant differences among the treatments ($p>0.05$), but significant different between treatments and control (ethanol) ($p<0.05$).

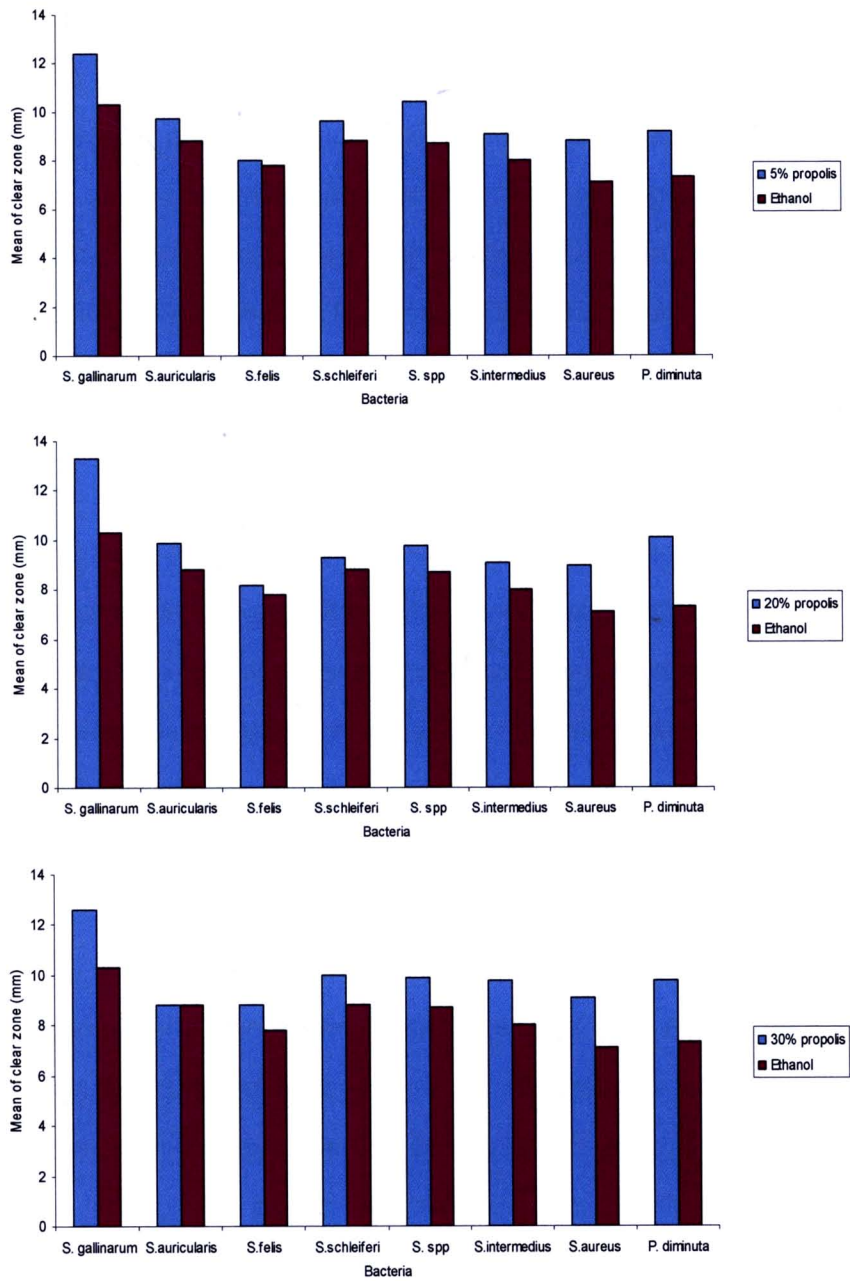


Figure 85. Effects of three different concentrations (% w/v) of ethanolic extraction of propolis against seven pathogenic bacteria. Zone of inhibition of *S. gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. aureus* and *P. diminuta* against 5, 20 and 30 percent of EEP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

Discussion

This is a first report that Thai propolis has been tested against the pathogenic bacteria of skin diseases of cats and dogs. The results show that the Thai propolis can inhibit the growth of pathogenic bacteria; *S. gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. aureus* and *P. diminuta* those caused skin diseases in cats and dogs.

The results show that Thai propolis inhibited both gram-positive and gram-negative bacteria. The gram-positive bacteria are highly susceptible than gram-negative bacteria, whereas the gram-negative bacteria is less susceptible. The results of this research support the previous reports reported by several researchers (Marcucci, 1995; Kujumgiev, *et al.*, 1999) and weak activity against gram-negative bacteria (Sforcin *et al.*, 2000).

One of the most interesting findings of this research is that Thai propolis can successfully inhibit the growth of *S. aureus*. *S. aureus*, which is highly resistance to several drugs, has shown sensitive to even to the lowest concentration (5%) of propolis. The zone of inhibition of *S. aureus* (8.7mm) was however less than previous report reported from Kazan (11mm) and Marmaris (8mm) (Kartal, *et al.*, 2003). The most plausible explanation for the difference between Thai propolis and Turkey is that the propolis from Kazan (Turkey) might have different species of plant sources for propolis, so do the chemical composition than the propolis from Chiangsen, Chiang Rai, Thailand. Even though, the propolis from the same location in different seasons might have different chemical composition as a consequence different zone of inhibition (Bankova, *et al.*, 2000). Another different reason is that (Kartal, *et al.*, (2003) used 5 days ethanolic extraction of propolis whereas in this research 24 hours ethanolic extraction of propolis was used. That's means, 24 hours extraction is not enough to extract all biological activity hydrophobic components. Resulting, Thai propolis shows less qualitatively and/or quantitatively bioactive compounds than Turkey propolis. *S. aureus*, however, had large zone of inhibition than Marmaris propolis.

Conclusion

Thai propolis has shown antibacterial effect against seven pathogenic bacteria; *S. gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. aureus* and *P. diminuta* isolated from skin diseases of cats and dogs. One species of bacterium; *S. gallinarum* has found highly sensitive to the lowest test concentration (%w/v), whereas *S. felis* out of seven has found more resistance to all three different concentrations.

References

- Bankova .; De·Castro, S. L.; and Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 31: 3-15
- Basnet, P.; Matsuno ,T. and Neidlein, R. (1997). Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. Naturforschung, 52C: 828–833.
- Chernyak, N. F. (1973). On synergistic effect of propolis and some anti-bacterial drugs. Antibiotiki, 18: 259-261.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Manolova, N., Bankova, V., Nikolov, N., popov, S., (1991). Immunomodulatory action of propolis; influence on anti- infectious protection and macrophage function. Apido. 22: 155-162.
- Kartal, M., and *et al.*, (2003). Antimicrobial activity of propolis sample from two different regions of Anatolia, Turkey. Jr. of Ethnopharma. 86: 69-73.
- Koo, M. H.; Gomes, B. P.; Rosalen, P. L.; Ambrosano , G.; Park, Y. and Cury, J. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Archives of Oral Bio. 45: 141–148.
- Krell, P. (1996). Values added products from beekeeping. FAO bulletin 157-184 pp
- Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankov A, V.; Christov, R. and Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Jr. of Ethnopharm. 64: 235-240.
- Lejeune, B.; Pourrat, A. and Dehmouche, H. (1988). Propolis utilization on rmocosmetologie. Parfums, Cosmetiques, Aromes, 82:73-77
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apido. 26: 83–99.

- Moreno, M. I. N.; Isla, M. I.; Cudmani, N. G.; Vattuone, M. A., and Sampietro, A. R. (1999). Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. Jr. of Ethnopharm. 68: 97-102.
- Moreno, M. I. N.; Isla, M. I.; Sampietro, A. R. and Vattunon, M. A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Jr. of Ethnopharm. 71:109–114.
- P'apay, V. (1987). Chemical and pharmacological study of propolis from various locations. Acta Pharmac. 57:143-151
- Sforcin, J. M.; Frenandes Jr., A.; Lopes, C. A. M.; Bankova, V.; Funari, S. R. C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. Jr. of Ethnopharm. 73:243-249.
- Thapa, R. and Wongsiri, S. (2004). Many use of propolis. Jr. of American Apitherapy Societies, 13-15.
- Wang, L.; Mineshita, S. and Ga, I. (1993). Antiinflammatory effects of propolis. Japanese Jr. of Pharmacological Therapeutics, 24: 223–226.

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 its most important predator *O. smaragdina*. (Duangphakdee et al., 2005)

1.7 Bumble bees (hymenoptera, apidae, bombinae) of the upper northern 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 number of 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. (ภาคผนวก 3)

2. ผลงาน outstanding ที่ส่งไปลงตีพิมพ์และเสนอใน conference และ congress ต่างๆ

2.1 หนังสือ

Oldroyd, B. and Wongsiri, S. 2006. Asian Honey Bees: Biology, Conservation and Human Interactions. Harvard University Press.

2.2 ผลงานตีพิมพ์ในหนังสือ / วารสารวิชาการระดับชาติ

1. กันทิมา สุวรรณพงศ์ และสิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2547. เฟโรโมนผึ้ง (Honeybee Pheromones). วารสารวิทยาศาสตร์ 58(1): 6 -12.
2. ธัชคณิน จงจิตวิมล, กมลภรณ์ บุญถาวร, วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ และสว่าง สีตะวัน. 2547. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมการหาอาหารของชันโรง *Trigona collina* Smith. (Apidae, Meliponinae) ในป่าเบญจพรรณ. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร 1(1): 75-86.
3. วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ, ธัชคณิน จงจิตวิมล, กมลภรณ์ บุญถาวร, มาลินี ศรีพรมา, มาลี เรืองฤดี และแสงจันทร์ ชุตติยรัตน์. 2547. ความหลากหลายชนิดและแหล่งอาศัยของชันโรงในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา จังหวัดลพบุรี. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร 1(1): 63-74.
4. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และทรรคนีย์ ไชยวงศ์. 2547. น้ำผึ้งโครงการพระราชดำริ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ. วารสารราชบัณฑิตยสถาน 29 (ฉบับพิเศษ) :170-179.
5. กมลภรณ์ บุญถาวร, ธัชคณิน จงจิตวิมล, วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ และ สุวีรัตน์ เตียววณิชย์. 2548. การวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกของชันโรง *Trigona collina* Smith ที่พบบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร 2(1): 59-71.
6. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, สุวีรัตน์ เตียววณิชย์ และปิยมาศ นานอก. 2549. ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) กับคนกรุงเทพมหานคร. วารสารราชบัณฑิตยสถาน 31(2): 508-515.
7. Chanchao, C. and Rattanawanee, A. 2006. มา รู้จัก ผึ้ง มิม เล็ก กันเถอะ (Let's know *Apis andreniformis*). Booklet of Plant Genetics Conservation Project Under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn: 2nd year, 2/2549, online (http://www.dongdib.com/rspg_club/newslet03-5.htm)

8. Pilalum, S., Padoongsupalai, R., Chanchao, C. and Wongsiri, S. 2007. Growth inhibition of *Escherichia coli* and alpha-glucosidase enzyme from honey. Thai Science 1: 74-80.

2.3 ผลงานตีพิมพ์ในหนังสือ / วารสารวิชาการระดับนานาชาติ

2003

1. Chanchao, C., Srimawong, P. and Wongsiri, S. 2003. Alpha-glucosidase gene in *Apis cerana*: cDNA sequence and enzyme activity. The Proceedings of Apimondia International Conference, Ljubljana, Slovenia, 477: 1-10.
2. Srisuparbh, D., Klinbunga, S., Wongsiri, S. and Sittipraneed, S. 2003. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*). Journal of Biochemistry and Molecular Biology 36(6): 572-579.
3. Thapa, R. and Wongsiri, S. 2003. Flying predators of the giant honey bees; *Apis dorsata* and *Apis laboriosa* in Nepal. American Bee Journal 143(7): 540-542

2004

4. Chaiyawong, T., Deowanish, S., Wongsiri, S., Sylvester, H. A., Rinderer, T. E. and De Guzman L. I. 2004. Multivariate morphometric study of *Apis florea* in Thailand. Journal of Apicultural Research 43(3): 123-127.
5. Chanchao, C., Srimawong, P. and Wongsiri, S. 2004. Expression of Alpha-glucosidase gene and foraging behavior of *Apis cerana*. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 121-130. Philippines.
6. Chanchao, C., Sukeethammarak, N. and Wongsiri, S. 2004. Comparison of egg sizes in *Apis dorsata* and *A. andreniformis*. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association



- Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 143-148. Philippines.
7. Chantawannakul, P., Peterson, S. and Wongsiri, S. 2004. Conservation of honey bee species in South East Asia: *Apis mellifera* or native bees? Biodiversity 5(2): 25-28.
 8. Deowanish, S. 2004. Queen rearing of *Apis cerana* in Thailand. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 137-142. Philippines.
 9. Deowanish, S., Chaiyawong, T. and Wongsiri, S. 2004. Variation of dwarf honey bee *Apis florea* Fabricius, 1787 in Thailand revealed by morphometric analysis. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 235-237. Philippines.
 10. Deowanish, S. 2004. Thailand: Country report. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 379-388. Philippines.
 11. Duangphakdee, O., Koeniger, N., Koeniger, G., Wongsiri, S. and Deowanish, S. 2004. Social defense of dwarf honeybee *Apis florea* against weaver ant *Oecophylla smaragdina*. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 364. Philippines. (abstract)
 12. Kavinseksan, B., Wongsiri, S., De Guzman, L. I. and Rinderer, T. E. 2004. Absence of *Tropilaelaps* infestation from recent swarms of *Apis dorsata* in Thailand. Journal of Apicultural Research 42(3): 49-50.
 13. Kavinseksan, B., Wongsiri, S., Rinderer, T. E. and de Guzman, L. I. 2004. Comparison of the hygienic behavior of ARS Russian and commercial honey bees in Thailand. American Bee Journal 144: 870-872.

14. Munshaw, S., Cutler, R. W., Wongsiri, S. and Chantawannakul, P. 2004. A genomic-wide analysis of *Apis mellifera*: Insights into diverse high copy number ORFs. Journal of Apicultural Research . 43(4): 172-175.
15. Oldroyd, B. and Wongsiri, S. 2004. The biology of Asian honey bees: Gaps in our knowledge. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 1-11. Philippines.
16. Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N. and Koeniger, G. 2004. Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens with hetero- and conspecific spermatozoa results in different sperm survival. Apidologie 35: 1-9.
17. Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N. and Koeniger, G. 2004. Instrumental insemination of *Apis mellifera* L. queens with hetero- and conspecific spermatozoa results in different sperm survival. Apidologie 35:503 -511.
18. Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N. and Koeniger, G. 2004. Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens with hetero- and conspecific spermatozoa results in different sperm survival. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 362. Philippines. (abstract)
19. Suppasat, T., Deowanish, S. and Wongsiri, S. 2004. Variation in mitochondrial DNA of *Apis mellifera* in Thailand. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 365. Philippines. (abstract)
20. Suwannapong, G., Seanbualuang, P. and Wongsiri, S. 2004. A histological study of the hypopharyngeal glands of *Apis andreniformis* Smith, 1858 and *Apis florea* Fabricius, 1787 workers. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia

(eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 131-135. Philippines.

21. Suwannapong, G. and Wongsiri, S. 2004. Scanning electron microscopic study of antennal sensillae of the giant honeybee workers, *Apis dorsata* Fabricius, 1793. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 149-154. Philippines.
22. Thapa, R., Wongsiri, S., Singh, M. M. and Kafle, B. P. 2004. Absconding behavior of the Himalayan honeybee (*Apis cerana* F.) in mid hill of Nepal. In E. N. Camaya and C. R. Cervancia (eds.), Proceedings of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora, pp. 111-116. Philippines.

2005

23. Chantawannakul, P., Puchanichanthranon, T. and Wongsiri, S. 2005. Inhibitory effects of some medicinal plant extracts on the growth of *Ascosphaera apis*. Acta Hort. (ISHS) 678:183-189.
24. Duangphakdee, O., Koeniger, N., Koeniger, G., Wongsiri, S. and Deowanish, S. 2005. Reinforcing a barrier - social defense of the dwarf honeybee (*Apis florea*) released by the weaver ant (*Oecophylla smaragdina*). Apidologie 36(3): 505 - 511.
25. Hepburn, R. H., Radloff, S. E., Otis, G. W., Fuchs, S., Verma, L. R., Ken. T., Chaiyawong, T., Tahmasebi, G., Ebadi, R., and Wongsiri, S., 2005. *Apis Florea*: Morphometrics, classification and biogeography. Apidologie 36(3): 359 – 376.
26. Klakasikorn, A., Wongsiri, S., Deowanish, S. and Duangphakdee, O. 2005. New record of stingless bees (Meliponini: *Trigona*) in Thailand. The Natural History Journal of Chulalongkorn University 5(1): 1 – 7.
27. Koeniger, G., Koeniger, N., Tingek, S. and Phiancharoen, M. 2005. Variance in spermatozoa number among *Apis dorsata* and *A. mellifera* drones. Apidologie 36(2): 279 – 284.

28. Nanork, P., Parr, J., Chapman, N. C., Wongsiri, S., and Oldroyd, B. P. 2005. Aisan honeybees parasitize the future dead. Nature. 437: 829.
29. Wongsiri, S., Thapa, R., Chantawannakul, P., Chaiyawong, T., Thirakhupt, K. and Meckvichai, W. 2005. Bee eating birds and honey bees predation in Thailand. American Bee Journal. 145 (5) 419 – 422

2006

30. Chanchao, C., Srimawong, P. and Wongsiri S. 2006. Expression of alpha-glucosidase gene in hypopharyngeal glands of worker honeybee *Apis cerana indica*. Journal of Apicultural Science. 50: 35–42.
31. Chanchao, C., Sintara, K. and Wongsiri, S. 2006. Comparison of antibiotic and organoleptic property of honey from various plant sources in Thailand. Journal of Apicultural Science. 50: 59–64.
32. Chanchao, C., Teethakaew, T. and Wongsiri, S. 2006. Alpha-glucosidase activity in honey of *Apis* spp. in Thailand. Laos Journal on Applied Science 1(1): 276-281.
33. Nanork, P., Wongsiri, S. and Oldroyd, B. P. 2006. The reproductive dilemmas of queenless red dwarf honeybee (*Apis florea*) workers. Behavioral Ecology Sociobiology 61:91-97.
34. Wongchawalit, J., Yamamoto, T., Nakai, H., Kim, Y.M., Sato, N., Nishimoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Saji, O., Chanchao, C., Wongsiri, S., Surarit, R., Svasti, J., Chiba, S., and Kimura, A. 2006. Purification and characterization of alpha-glucosidase I from Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*) and molecular cloning of its cDNA. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 70(12): 2889-2898.

2007

35. Chanchao, C., Padoongsupalai, R., and Sangvanich, P. 2007. Expression and characterization of alpha-glucosidase III in the dwarf honeybee, *Apis florea* (Hymenoptera : Apoidea : Apidae). Insect Science. 14(4): 283-293
36. Insuan, S., Deowanish, S., Klinbunga, S., Sittipraneed, S., Sylvester, H. A. and Wongsiri, S. 2007. Genetic differentiation of the giant honey bee (*Apis*

dorsata) in Thailand analyzed by mitochondrial genes and microsatellites.

Biochemical Genetics 45(3-4): 345-361.

37. Nanork, P., Chapman, N. C., Wongsiri, S., Lim, J., Gloag, R. S. and Oldroyd, B. P. 2007. Social parasitism by workers in queenless and queenright *Apis cerana* colonies. Molecular Ecology 16(5): 1107-1114.
38. Rattanawanee, A., Chanchao, C. and Wongsiri, S. 2007. Morphometric and genetic variation of small dwarf honeybees *Apis andreniformis* Smith, 1858 in Thailand. Insect Science 14(6): 451-460.
39. Suppasat, T., Smith, D. B., Deowanish, S. and Wongsiri, S. 2007. Matrilineal origins of *Apis mellifera* in Thailand. Apidologies 38: 323-334.
40. Takahashi, J., Yoshida, T., (Yoshida, Takagi, T., Akimoto, S., Woo, K. S., Deowanish, S., Hepburn, R., Nakamura, J. and Matsuka, M. 2007. Geographic variation in the Japanese islands of *Apis cerana japonica* and in *A. cerana* populations bordering its geographic range. Apidologie 38(4): 335-340.

2008

41. Chanchao, C., Pilalam, S., and Sangvanich, P. 2008. Purification and characterization of alpha - glucosidase in *Apis cerana indica*. Insect Science. 15(3): 217-224.

2.4 การเสนอผลงานทางวิชาการในระดับชาติ

2545

1. Chaiyawong, T., Wongsiri, S. and Deowanish, S. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง "Morphometric analysis of the dwarf honey bee *Apis florea* Fabricius, 1787 in Thailand." ในการประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 6 วันที่ 9-12 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2545 ณ โรงแรมทวินโลดส์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

2546

2. Chanchao, C. Sukeethammarak, N. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Comparison of eggs of *Apis* spp. in Thailand." ในการประชุมวิชาการ

- Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products เมื่อวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ.เชียงใหม่
3. Chantawannakul, P. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Bees and microbes: Past to present." ในการประชุมวิชาการ Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products เมื่อวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ. เชียงใหม่
 4. Dathong, P., and Deowanish, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "ความหลากหลายของแมลงในส่วนสุขภาพเทิดพระเกียรติสมเด็จพระย่า อําเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์" (Diversity of insects at The King's Mother Park, Maung District, Surin Province" ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546 วันที่ 18-19 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2546 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 5. Deowanish, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Queen production." ในการประชุมวิชาการ Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products เมื่อวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ.เชียงใหม่
 6. Juntawong, N., Sawatum, A., Dejitsak, W., Boonpa, K., Khaewkaow, R. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Diversity of stingless bee (*Trigona* spp.) flora in Queen Sirikit Botanic garden, Chiang Mai province." ในการประชุมวิชาการ Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products เมื่อวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ. เชียงใหม่
 7. Mendum, M., Denduangboripant, J., Christie, F. and Cronk, Q.C.B. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง "Evolutionary history of the genus *Aeschynanthus* (Gesneriaceae) suggested by morphological, molecular phylogenetic and geographical data" ในงานประชุมวิชาการชมรมนักสัตววิทยาโครงการ BRT ครั้งที่ 1 ในระหว่างวันที่ 14-15 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2546 ณ อาคารวิจัยและพัฒนาอํญมณี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 8. Munrien, K., Denduangboripan, J. and Lerdthusnee, K. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "การศึกษาความสัมพันธ์ของ spermatophore ที่ปล่อยโดยตัวผู้ต่อการเก็บ spermatophore ของตัวเมียใน *Leptotrombidium imphalum* และ

- Leptotrombidium chiangraiensis*" (The relationship between spermatophore releasing and taking up of *Leptotrombidium imphalum* and *Leptotrombidium chiangraiensis*" ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546 วันที่ 18-19 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2546 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
9. Ounanan, J. and Denduangboripan, J. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "การวิเคราะห์ระบบวิวัฒนาการเชิงคลาดิสติกส์ของพืชสกุล *Agalmyla* (Gesneriaceae) โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา" (Morphological cladistic analysis of the plant genus *Agalmyla* (Gesneriaceae)) ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546 วันที่ 18-19 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2546 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 10. Piliyavinit, P., Deowanish, S. and Lerdthusnee, K. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "การทดสอบโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของไรแดงระยะตัวอ่อน" (Testing the computerized program for identification of chigger-mites (Trombiculidae : Acariformes)) ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546 วันที่ 18-19 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2546 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 11. Ponsane, N., Chanchao, C. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "ลำดับเบสบางส่วนของยีนส์ alkaline phosphatase ในผึ้งที่พบในประเทศไทย" (Partial DNA sequence of Alkaline Phosphatase gene of honeybee in Thailand) ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546 วันที่ 18-19 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2546 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 12. Sawatpon, P., Deowanish, S. and Lerdthusnee, K. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "งานพัฒนาเทคนิคในการทดสอบสารขับไล่แมลงต่อตัวอ่อนไรแดงกลุ่ม *Leptotrombidium*" (Development of method for testing repellent compounds against *Leptotrombidium*) ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546 วันที่ 18-19 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2546 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 13. Sittipraneed, S., Laoaroon, S., Klinbunga, S. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Genetic differentiation of the honey bee (*Apis cerana*) in Thailand: Evidence from microsatellite polymorphism." ในการประชุมวิชาการ Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products เมื่อวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ. เชียงใหม่

14. Suppasat, T., Chanchao, C. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง "Some properties of Alkaline phosphatase in *Apis mellifera*." ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 6 วันที่ 3-7 เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
15. Suwansatien, B., Wattanasirmit, K. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "ความเป็นพิษของสารสกัดกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*, กวาวเครือดำ *Mucuna macrocarpa*, กวาวเครือแดง *Butea superba* ต่อลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* และลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus*" (Toxicity of Kwao Khrua extract, *Pueraria mirifica*, *Mucuna macrocarpa*, *Butea superba* to *Aedes aegypti* larvae and *Culex quinquefasciatus* larvae) ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546 วันที่ 18-19 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2546 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
16. Thapa, R. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Himalayan honeybees & beekeeping in Nepal." ในการประชุมวิชาการ Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products เมื่อวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่
17. Thapa, R. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Apitherapy: An alternative treatment for all ailments." ในการประชุมวิชาการ Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products เมื่อวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่
18. Wongsiri, S. บรรยายพิเศษเรื่อง "Behavior diversity of *Apis dorsata*, *Apis florea* and *Apis andreniformis*" ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546 วันที่ 18-19 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2546 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
19. Wannaprasert, T., Wongsiri, S. and Chanchao, C. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "ความแตกต่างของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในนมผึ้งของผึ้งสกุล *Apis* ในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE" (Comparison of royal jelly proteins in *Apis* species in Thailand by SDS-PAGE technique) ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 ประจำปี 2546 วันที่ 18-19 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2546 ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



20. Wattanachaiyingcharoen, W., Oldroyd, B. P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Reproductive genetic in giant honey bee, *Apis dorsata*." ในการประชุมวิชาการ Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products เมื่อวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่
 21. Wongsiri, S. บรรยายพิเศษเรื่อง "Biodiversity of Asian honey bees" ในการประชุมวิชาการ Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products เมื่อวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่
 22. Wongsiri, S., Deowanish, S., Chaiyawong, T. and Sylvester, A. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง "Morphometric and behaviour diversity of *Apis florea* and *A. andreniformis*" ในงานประชุมวิชาการชมรมนักสัตววิทยาโครงการ BRT ครั้งที่ 1 ในระหว่างวันที่ 14-15 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2546 ณ อาคารวิจัยและพัฒนาอัญมณี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 23. Padoongsupalai, R., Chanchao, C. and Wongsiri, S. 2004. Alpha-glucosidase in *Apis florea*. The Proceeding of 30th Congress on Science and Technology of Thailand, Muang Thong Thani, Thailand. Number B0148, p 1-3.
 24. Pilalum, S., Chanchao, C. and Wongsiri, S. 2004. Alpha-glucosidase in *Apis cerana*. The Proceeding of 30th Congress on Science and Technology of Thailand, Muang Thong Thani, Thailand. Number B0149, p 1-3.
- 2547
25. ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล และ สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค ขอล์คบริดและยุโรปเบียนฟาวบริดในผึ้ง (*Apis mellifera*). " (In vitro antimicrobial effects of herbal extracts on pathogens causing Chalkbrood and European foulbrood diseases in honey bee (*Apis mellifera*).) ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 9-11 มกราคม 2547 ณ โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี
 26. Chantawannakul, P เสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายเรื่อง "Role of microbial proteases in bee diseases" ในการประชุม Integration of Biological Sciences,

- Protein Chemistry, and Medicine วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
27. Deowanish, S., Nanork, P., Chaiyawong, T., Insuan, S., Phuphisut, O. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายเรื่อง "Variation of dwarf honeybees in Thailand" ในการประชุม Integration of Biological Sciences, Protein Chemistry, and Medicine วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
 28. Kavinseksan, B., Wongsiri, S., Rinderer, T. E. and de Guzman, L. I. เสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายเรื่อง "Comparison of the hygienic behavior of ARS Russian and commercial honeybees in Thailand" ในการประชุม Integration of Biological Sciences, Protein Chemistry, and Medicine วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
 29. Munshaw, S., Cutler, R. W., Wongsiri, S. and Chantawannakul, P. เสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายเรื่อง "Genomic-wide analysis of *Apis mellifera*: Insights into diverse high copy number ORFs" ในการประชุม Integration of Biological Sciences, Protein Chemistry, and Medicine วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
 30. Nanork, P., Oldroyd, B. P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายเรื่อง "Worker reproduction and reproductive competition among queenless honey bee" ในการประชุม Integration of Biological Sciences, Protein Chemistry, and Medicine วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
 31. Sintara, K., Chanchao, C. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายเรื่อง "Bee products and anti-microbial activity" ในการประชุม Integration of Biological Sciences, Protein Chemistry, and Medicine วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
 32. Suppasat, T., Deowanish, S. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายเรื่อง "Genetic variation of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 in Thailand" ในการประชุม Integration of Biological Sciences, Protein Chemistry, and Medicine วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

33. Swasdipan, N. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายเรื่อง "Insect pheromone binding protein" ในการประชุม Integration of Biological Sciences, Protein Chemistry, and Medicine วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
34. Thapa, R. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายเรื่อง "Propolis against fungal disease" ในการประชุม Integration of Biological Sciences, Protein Chemistry, and Medicine วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2548

35. วิภาวี เดชดีศักดิ์, วัลลภ อารีรบ, สุมณ มาสุธน, ธวัชชัย สันติสุข, สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และ นิรันดร์ จันทวงศ์ เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบบรรยายเรื่อง "พืชอาหารของชันโรง (*Trigona collina* Smith) บริเวณป่าผลัดใบในเขตพื้นที่องค์การสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่" (Melliferous plants for the stingless bees (*Trigona collina* Smith) in deciduous forest of Queen Sirikit Botanic Garden, Mae Rim, Chiang Mai Province) ในการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2548 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
36. เรวดี แก้วขาว, วิชาญ เอียดทอง, อัญชลี สวัสดิ์ธรรม, สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และ นิรันดร์ จันทวงศ์ เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบบรรยายเรื่อง "การจัดกลุ่มเรณูพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานเพื่อใช้ในการจำแนกพืชอาหารของชันโรง (*Trigona* sp.) ในเขตพื้นที่ป่าดิบเขาบนดอยม่อนล่อง องค์การสวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่" (Morphological cluster of pollen for the study of melliferous plants of stingless bee (*Trigona* spp.) in hill evergreen forest at Doi Mon Long, Queen Sirikit Botanic Garden, Maerim, Chiangmai Province) ในการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2548 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

2549

37. Juntawong, N., Dejitsakdi, W., Masuthon, S., Sawatum, A., Pechhacker, H. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง "Floristic composition and palynological analysis of stingless bee (*Trigona collina* Smith) pollen loads for

- botanical origin determination in northern Thailand” ในการประชุม Bee Biology, Bee Products and Their Applications วันที่ 9-11 มิถุนายน 2549 ณ ห้องประชุม โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑสถานมหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
38. Nanork, P., Chapman, N. C., Oldroyd, B. P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง “Worker reproduction in *Apis cerana* colonies” ในการประชุม Bee Biology, Bee Products and Their Applications วันที่ 9-11 มิถุนายน 2549 ณ ห้องประชุม โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑสถานมหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
39. Pilalam, S., Padoongsupalai, R., Teethakaew, T., Chanchao, C., Sangvanich, P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง “Characterization of alpha-glucosidase in honeybees” ในการประชุม Bee Biology, Bee Products and Their Applications วันที่ 9-11 มิถุนายน 2549 ณ ห้องประชุม โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑสถานมหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
40. Rattanawanee, A., Chanchao, C. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง “Genetic variation of small dwarf honeybee *Apis andreniformis* in Thailand and Tenom, Malaysia revealed by polymorphism of Cytochrome b” ในการประชุม Bee Biology, Bee Products and Their Applications วันที่ 9-11 มิถุนายน 2549 ณ ห้องประชุม โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑสถานมหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
41. Suppasat, T., Deowanish, S., Smith, D. R. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง “Survey of *Apis mellifera* subspecies in Thailand” ในการประชุม Bee Biology, Bee Products and Their Applications วันที่ 9-11 มิถุนายน 2549 ณ ห้องประชุม โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑสถานมหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
42. Wattanachaiyingcharoen, W., Oldroyd, B. P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง “Genetic structure of aggregations of *Apis florea*” ในการประชุม Bee Biology, Bee Products and Their Applications วันที่ 9-11 มิถุนายน 2549 ณ ห้องประชุม โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑสถานมหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2550

43. Juntawong, N., Kaewkaw, R., Eaidthong, W., Sawatthum, A. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง "Floral species diversity from pollen load of *Ventralis* stingless bee (*Trigona ventralis* Smith) in lower montane evergreen forest at Doi Mon Long, Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai Province" ในการประชุม Honey bee biology: Bee breeding, queen rearing and artificial insemination วันที่ 28-30 มิถุนายน 2550 ณ อาคารบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2.5 การเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ

2002

1. Chaiyawong, T., Deowanish, S. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Morphometric analysis of the dwarf honey bee *Apis florea* Fabricius, 1787 in Thailand." ในการประชุม 7th Biological Science Graduate Congress 9-11 December 2002, Chulalongkorn University, Bangkok
2. Deowanish, S., Insuan, S., Sittipraneed, S. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง "Genetic diversity of giant honeybees *Apis dorsata* Fabricius, 1793 in Thailand." ในการประชุม XIV International Congress of IUSSI, 27 July – 3 August 2002, Hokkaido University, Sapporo ประเทศญี่ปุ่น
3. Duangphakdee, O. and Deowanish, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "The relationship between honeybee *Apis florea* Fabricius, 1787 and flora." ในการประชุม 7th Biological Science Graduate Congress 9-11 December 2002, Chulalongkorn University, Bangkok
4. Kavinseksan, B., Wongsiri, S., De Guzman, L. and Rinderer, T. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง "Population and sex ratio of *Tropilaelaps clareae* in debris and on adult bees of *Apis dorsata*." ในการประชุม 7th Biological Science Graduate Congress, 9-11 December 2002, Chulalongkorn University, Bangkok
5. Nanork, P., Wongsiri, S., Deowanish, S. and Oldroyd, B. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง "Variation in mitochondrial DNA of dwarf honey *Apis florea* Fabricius, 1787 in Thailand revealed by PCR-RFLP technique." ในการประชุม 7th Biological

- Science Graduate Congress 9-11 December 2002, Chulalongkorn University, Bangkok
6. Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N. and Koeniger, G. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง "Cross insemination of *Apis koschevnikovi* and *Apis mellifera*." ในการประชุม 7th Biological Science Graduate Congress 9-11 December 2002, Chulalongkorn University, Bangkok
 7. Srimawong, P. and Chanchao, C. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Partial cDNA sequence of α -Glucosidase gene by RT-PCR." ในการประชุม 7th Biological Science Graduate Congress 9-11 December 2002, Chulalongkorn University, Bangkok
 8. Suppasat, T., Chanchao, C. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Alkaline phosphatase in *Apis mellifera*: enzyme activity and localization." ในการประชุม 7th Biological Science Graduate Congress 9-11 December 2002, Chulalongkorn University, Bangkok
 9. Wongsiri, S., Deowanish, S. and Thapa, R. เสนอผลงานวิจัยเรื่อง "Some behavior diversity of *Apis dorsata*, *Apis florea*, and *Apis andreniformis*." ในการประชุม XIV International Congress of IUSSI, 27 July – 3 August 2002, Hokkaido University, Sapporo ประเทศญี่ปุ่น
- 2003
10. Chanchao, C., Srimawong, P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Alpha-glucosidase gene in *Apis cerana*: cDNA sequence and enzyme activity." ในการประชุม XXXVIII Apimondia International Apiculture, Congress, Ljubljana, Slovenia, August 24-29, 2003.
 11. Chaiharn, M., Chantawannakul, P. Kanekumchorn, W. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Antimicrobial substances from Thai royal jelly and propolis." ในการประชุม XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress, Ljubljana, Slovenia, August 24-29, 2003
 12. Chanchao, C., Srimawong, P. and Wongsiri, S. ได้รับเชิญให้พูดสัมมนาในเรื่อง "Alpha-glucosidase in *Apis cerana*." ใน Seminar on Industrial Use of Biotechnology, Tehran, Iran September 27 – October 1, 2003.

13. Chanchao, C., Suppasat, T. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Alkaline phosphatase in developmental stages of *Apis mellifera*." ในการประชุม XXXVIII Apimondia International Apiculture, Congress, Ljubljana, Slovenia, August 24-29, 2003.
14. Chantawannakul, P., Chaihar, M., Nandakwang, P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Microbial diseases of honey bee larvae in Thailand." ในการประชุม XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress, Ljubljana, Slovenia, August 24-29, 2003.
15. Duangphakdee, O., Koeniger, N. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Defense against predator of dwarf honeybee *Apis florea* in particularly weaver ant *Oecophylla smaragdina*." ในการประชุม 8th Biological Science Graduate Congress, NUS, Singapore, December 3-5, 2003.
16. Klakasikorn, A., Michener, C. D., Wongsiri, S., Deowanish, S. and Duangphakdee, O. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Biodiversity of stingless bees in Thailand: New record of stingless bees (Meliponinae: *Trigona*)." ในการประชุม 8th Biological Science Graduate Congress, NUS, Singapore, December 3-5, 2003.
17. Nanork, P., Oldroyd, B. P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า "Reproductive competition in queenless workers of the dwarf honey bee *Apis florea*." ในการประชุม 8th Biological Science Graduate Congress, NUS, Singapore, December 3-5, 2003.
18. Srimawong, P., Chanchao, C. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Alpha-glucosidase gene of *Apis cerana* in Thailand: Partial DNA sequence and enzyme activity." ในการประชุม 8th Biological Science Graduate Congress, NUS, Singapore, December 3-5, 2003.
19. Wongsiri, S. ได้รับเชิญบรรยายพิเศษเรื่อง "Behavior diversity of *Apis dorsata*, *Apis florea* and *Apis andreniformis*." ในการประชุม 8th Biological Science Graduate Congress, NUS, Singapore, December 3-5, 2003.

2004

20. Boonthaworn, K., Jongjitvimol, T., Wattanachaiyingchareon, W. and Deowanish, S. เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Notes on Morphometric analysis of *Trigona collina* Smith." ในการประชุม The 9th Biological Science Graduate Congress, 16-18 December 2004, Chulalongkorn University, Bangkok
21. Chanchao, C., Srimawong, P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Expression of Alpha-glucosidase gene and foraging behavior of *Apis cerana*." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.
22. Chanchao, C., Sukeethammarak, N. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Comparison of egg sizes in *Apis dorsata* and *A. andreniformis*." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.
23. Deowanish, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Queen rearing of *Apis cerana* in Thailand." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.
24. Deowanish, S., Chaiyawong, T. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Variation of dwarf honey bee *Apis florea* Fabricius, 1787 in Thailand revealed by morphometric analysis." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.
25. Duangphakdee, O., Koeniger, N., Koeniger, G., Wongsiri, S. and Deowanish, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Social defense of dwarf honeybee *Apis florea* against weaver ant *Oecophylla smaragdina*." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.

26. Oldroyd, B. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "The biology of Asian honey bees: Gaps in our knowledge." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.
27. Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N. and Koeniger, G. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens with hetero- and conspecific spermatozoa results in different sperm survival" ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.
28. Phuphisut, O. and Deowanish, S. เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Genetic Diversity of Stingless bee *Trigona laeviceps* Smith, 1857 in Thailand" ในการประชุม The 9th Biological Science Graduate Congress, 16-18 December 2004, Chulalongkorn University, Bangkok
29. Suppasat, T., Deowanish, S. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Variation in mitochondrial DNA of *Apis mellifera* in Thailand." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.
30. Suppasat, T., Deowanish, S. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Variation of *Apis mellifera* Linneaus, 1753 subspecies in Thailand base on COI-COII intergenic region at mitochondrial DNA" ในการประชุม The 9th Biological Science Graduate Congress, 16-18 December 2004, Chulalongkorn University, Bangkok
31. Suwannapong, G., Seanbualuang, P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "A histological study of the hypopharyngeal glands of *Apis andreniformis* Smith, 1858 and *Apis florea* Fabricius, 1787 workers." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.
32. Suwannapong, G. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Scanning electron microscopic study of antennal sensillae of the giant

honeybee workers, *Apis dorsata* Fabricius, 1793." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004.

33. Thapa, R., Wongsiri, S., Singh, M. M. and Kafle, B. P. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Absconding behavior of the Himalayan honeybee (*Apis cerana* F.) in mid hill of Nepal." ในการประชุม 7th Asian Apicultural Association Conference ที่ University of the Philippines Los Banos, College, Laguna, Philippines, February 23-27, 2004

2005

34. Chanchao, C., Suwannapong, G., Amano, K. and Wongsiri, S. 2005. *In situ* hybridization of alpha glucosidase in stingless bees, *Scaptotrigona bipunctata*. 39th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland, August 21-26, 2005. No. 244, p. 100. (abstract).
35. Chanchao, C., Wongchawalit, J., Svasti, J., Wongsiri, S. and Kimura, A. 2005. Alpha glucosidase from honey of *Apis dorsata*. 39th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland, August 21-26, 2005. No. 245, p. 100-101. (abstract).
36. Duangphakdee, O., Koeniger, N., Wongsiri, S. and Deowanish, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Repellency of bee propolis against weaver ants, *Oecophylla smaragdina*" ในการประชุม 10th Biological Sciences Graduate Congress, National University, Singapore, November 30 –December 2, 2005.
37. Klakasikorn, A., Chanchao, C. and Wongsiri, S., เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Biodiversity of stingless bee (*Trigona* spp.) and dwarf honeybee (*Apis andreniformis*) in Thailand." ในการประชุม 10th Biological Sciences Graduate Congress, National University, Singapore, November 30 – December 2, 2005.
38. Nanork, P., Paar, J., Chapman, N. C., Wongsiri, S. and Oldroyd, B. P. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Parasitizing queenless red dwarf honey bee colonies" ในการประชุม 10th Biological Sciences Graduate Congress, National University, Singapore, November 30 – December 2, 2005.

39. Nanok, P., Parr. J., Chapman, N., C., Wongsiri, S. and Oldroyd, B. P. 2005. Reproductive competition among queenless workers of dwarf honey bee *Apis florea*. 3th European Congress on Social Insects, St. Petersburg, Russia, August 22-27, 2005. No 37, p. 163. (abstract).
40. Padoongsupalai, R., Chanchao, C., Sangvanith. P. and Wongsiri. S. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Purification of alpha – glucosidase in *Apis florea*" ในการประชุม 10th Biological Sciences Graduate Congress, National University, Singapore, November 30 – December 2, 2005.
41. Padoongsupalai, R., Pilalum S., Chanchao, C., Sangvanich, P., Svasti, J. and Wongsiri, S. 2004. Phylogeny of Alpha glucosidase in *Apis* spp. Among others. 39th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland, August 21-26, 2005. No. 246, p. 101. (abstract).
42. Pilalum, S., Chanchao, C., Sangvanich. P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เรื่อง "Purification of alpha – glucosidase in *Apis cerana*" ในการประชุม 10th Biological Sciences Graduate Congress, National University Singapore, November 30 – December 2, 2005.
43. Sintara, K., Chanchao, C. and Wongsiri, S. 2005. Comparison of antibiotic property of honey from various food sources in Thailand. 39th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland, August 21-26, 2005. No. 318, p. 125. (abstract).
44. Suwannapong, G., Chaiwongwattanakul, S. and Wongsiri, S. 2005. The histological and histochemical structure of the hypopharyngeal glands of the Asiatic and the European hive honeybees. 39th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland, August 21-26, 2005. No. 217, p. 89-90. (abstract).
45. Suwannapong, G. and Wongsiri, S. 2005. Pheromonal activities of the mandibular gland pheromones on foraging activity of dwarf honeybees. 39th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland, August 21-26, 2005. No. 216, p. 90. (abstract).

46. Suppasat, T., Deowanish, S., Smith, D.R., Warrit, N. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Genetic variation of *Varroa* mites infesting on honeybees in Thailand" ในการประชุม 10th Biological Sciences Graduate Congress, National University, Singapore, November 30 – December 2, 2005
47. Wongsiri, S. and Thapa, R. 2005. Behavior diversity of *Apis florea* and *Apis andreniformis*: Temperature controls by fanning and rain proofs behavior. 39th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland, August 21-26, 2005. No. 247, p. 101. (abstract).

2006

48. ศ. ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ ได้รับเชิญไปบรรยายพิเศษเรื่อง Behavior diversity of dwarf honey bee: Temperature control by fanning and rain proofs behavior ในการประชุม 3rd Life Sciences Postgraduate Conference, 24 – 27 May 2006, University Sains Malaysia, Penang
49. Chanchao, C., Pilalum, S. Padoongsupalai, R., Sangvanich, P., Wongsiri, S. and Svasti, M. J. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Purification and characterization of alpha-glucosidase in *Apis cerana*" ในการประชุม IUSI Congress XV, 30 July-4 August, 2006 ณ Washington, DC USA
50. Klakasikorn, A., Chanchao, C. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Genetic variation of small dwarf honeybee (*Apis andreniformis* Smith, 1858) in Thailand and Tenom, Malasia by using PCR-RFLP technique" ในการประชุม KMITL International Conference on Science and Applied Science, 8-10 March 2006, Swissôtel LE Concorde, Bangkok, Thailand
51. Ot-sup, C., Deowanish, S. and Chavasiri, W. เสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Chemical composition and anti-fungal activity of propolis from the nest of stingless bee." ในการประชุม 11th Biological Sciences Graduate Congress, Chulalongkorn University, 15-17 December, 2006
52. Padoongsupalai, R., Chanchao, C., Sangvanich, P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Purification of alpha-glucosidase in *Apis florea*" ในการประชุม KMITL International Conference on Science and Applied Science, 8-10 March 2006, Swissôtel LE Concorde, Bangkok, Thailand

53. Pilalum, S., Chanchao, C., Sangvanich, P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "Purification of alpha-glucosidase in *Apis cerana*" ในการประชุม KMITL International Conference on Science and Applied Science, 8-10 March 2006, Swissôtel LE Concorde, Bangkok, Thailand
54. Rattanawanee, A., Chanchao, C. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Genetic variation of *Apis andreniformis* in Thailand" ในการประชุม IUSSI Congress XV, 30 July-4 August, 2006 ณ Washington, DC USA
55. Suppasat, T., Smith, D.R., Deowanish, S. and Wongsiri, S. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Analysis of *Apis mellifera* mitochondrial DNA variation in Thailand" ในการประชุม IUSSI Congress XV, 30 July-4 August, 2006 ณ Washington, DC USA
56. Wongsiri, S., Suwannapong, G., Srisook, N. and Hepburn, R. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Pheromones of Asian honeybees (*Apis andreniformis*, *Apis cerana*, *Apis dosata* and *Apis florea*)" ในการประชุม IUSSI Congress XV, 30 July-4 August, 2006 ณ Washington, DC USA

2008

57. Ot-sup, C., Deowanish, S. and Chavasiri, W. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Atifungus *ascosphaera apis* of propolis from nest of stingless bee" ในการประชุม The 9th Asian Apicultural Association Conference & Exhibition, 1 – 4 Nov. 2008 ณ Hangzhou , Zhejiang , China

2009

58. Thapa, R. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง "Antibacterial effect of propolis against the pathogenic bacteria caused pyoderma in dogs" ในการประชุม The 9th International Conference on Apitherapy Health Care and International Forum of Apitherapy and Bee Products", 11-14 November 2009, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand

3. การจัดการประชุมวิชาการ

- 3.1 จัดโครงการอบรมการเลี้ยงผึ้งและชันโรง (Beekeeping for Development) วันที่ 20 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2546 - 4 มีนาคม พ.ศ. 2546

3.2 จัดการประชุมวิชาการ Symposium on Biodiversity of Honey Bees and Bee Products ในระหว่างวันที่ 9-10 สิงหาคม 2546 ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่

3.3 ศ. ดร. ม.ร.ว. ชีษณุสร สวัสดิวัตน์ ศ. นพ. สุทัศน์ พุฒเจริญ และ ศ. ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ ร่วมกันจัดการประชุมวิชาการ "Integration of Biological Sciences, Protein Chemistry, and Medicine" วันที่ 14-15 กันยายน 2547 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.4 จัดการประชุมวิชาการ "Bee Biology, Bee Products and Their Applications" วันที่ 9 - 11 มิถุนายน 2549 ณ ห้องประชุมโครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.5 จัดการประชุมวิชาการและการจัดอบรมการทำผสมเทียมผึ้ง "Honey bee Biology: Bee breeding, Queen rearing and Artificial Insemination" วันที่ 28 – 30 มิถุนายน 2550 ณ อาคารบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.6 จัดการประชุมวิชาการนานาชาติ "The 9th International Conference on Apitherapy Health Care and International Forum of Apitherapy and Bee Products", 11-14 November 2009, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand

4. Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงาน	ปีที่ 1	ปีที่ 2	ปีที่ 3	ปีที่ 4	ปีที่ 5	ปีที่ 6	ปีที่ 7
1.ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ	-	3	19	7	6	6	1
2.ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ	-	-	4	1	2	1	-
3.เสนอผลงานระดับนานาชาติ	9	10	14	14	9	-	1
4.เสนอผลงานระดับชาติ	1	23	10	2	6	1	-
5. หนังสือ	-	-	-	-	1	-	-
6. จำนวนผลงานการจดสิทธิบัตร	-	-	-	-	-	-	-
7. จำนวนนักวิจัยรุ่นใหม่ที่เกิดจากโครงการ							
7.1 สถาบันเดียวกัน	-	3	4	4	3	-	-
7.2 ต่างสถาบัน	-	1	2	2	3	-	-
8. จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาเอก	-	4	5	5	2	-	-
9. จำนวนนักศึกษาระดับปริญญาโท	-	2	4	4	3	-	-



5. ชื่อวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่ได้ลงตีพิมพ์

ชื่อวารสาร	Impact factor 2009
Apidologie	1.493
American Bee Journal	0.232
Behav. Ecol. Sociobiol.	2.749
Biochemical Genetics	0.878
Bioscience Biotechnology and Biochemistry	1.326
Insect Science	1.118
Insectes Sociaux	1.48
Journal of Apicultural Research	0.694
Journal of Biochemistry and Molecular Biology	2.021
Molecular Ecology	5.96
Nature	34.48