บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดรูปร่างของผึ้งจิ๋วกับความสามารถในการเก็บน้ำผึ้ง เกสรและชันผึ้ง
2. เพื่อเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของผึ้งจิ๋วชนิดเดียวกันในแต่ละวรรณะ
3. เพื่อเปรียบเทียบ DNA ของผึ้งจิ๋วชนิดเดียวกันที่อาศัยในแต่ละภาคของประเทศไทย
4. เพื่อรวบรวมผึ้งจิ๋ว ชันโรงป่า ทุกชนิดในประเทศไทยจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์

วิธีการเก็บตัวอย่าง

1. ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง
2. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา และนครพนม
3. ภาคตะวันออก ได้แก่ จัดหวัดจันทบุรี และตราด
4. ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี และนครปฐม
5. ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดระนอง และสุราษฎร์ธานี

การเก็บตัวอย่างจากรังชันโรงหลังลายนั้น จะต้องมีจำนวนรังปรากฏในละแวกนั้นไม่ต่ำกว่า 2 รัง แต่ละรังอยู่ห่างกันไม่เกิน 50-100 เมตร เก็บผึ้งงานที่บินออกมานอกรังๆ ละ 40 ตัว ประมาณ 20 ตัว ดองในแอลกอฮอล์ 95% ทันที เพื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และอีก 20 ตัว นำไปเซท เพื่อนำมาวัดขนาดความกว้างของหัว ความยาวของปีกหน้ารวมเทกูลาด้วย และความยาวของทีเบียขาหลัง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดขนาดด้วย eyepiece micrometer เพื่อหาค่าเฉลี่ย เปรียบเทียบชันโรงหลังลายในแต่ละภาค ซึ่งเก็บตัวอย่างได้เฉพาะชันโรงงานเท่านั้น ส่วนนางพญาและตัวผู้ ไม่สามารถเก็บได้ เพราะเปิดรังไม่ได้ เป็นรังในธรรมชาติ ที่ชันโรงอาศัยในโพรงที่เคลื่อนที่ไม่ได้

จากวัตถุประสงค์ข้อ 3 ถูกปรับวิธีการศึกษาเล็กน้อย ทั้งนี้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการดำเนินงานวิจัย โดยนำชันโรงหลังลายจากจังหวัดพัทลุง มาผสมกับชันโรงหลังลายจากจังหวัดจันทบุรีได้ลูกผสม “จันท์xพัทลุง” จากนั้น นำไปวิเคราะห์ ดีเอ็นเอ ทั้งพ่อแม่ลูก ว่ามี genome DNA เป็นอย่างไร แตกต่างกับชันโรงทั่วไปที่เก็บในภาคใต้ และตะวันออก หรือไม่

การวางแผนงานวิจัย

1. ศึกษาและรวบรวมเอกสารด้าน morphometric และ DNA
2. ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างผึ้งจิ๋ว
3. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของผึ้งจิ๋ว โดยการถ่ายภาพ และนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ DNA
4. วิเคราะห์และแปรผลข้อมูล และเก็บข้อมูล

สมมติฐานการวิจัย (hypotheses)

ความผันแปรในผึ้งจิ๋ว อาจจะปรากฏออกมาให้เห็นทางสัณฐานวิทยา หรือถ้าไม่ปรากฏออกมาอาจจะมีขนาดของตัวที่ไม่เท่ากัน อีกทั้งมีความแตกต่างทางลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ขอบเขตงานวิจัย (scope of research)

ทำการศึกษาในผึ้งจิ๋วหลังลายหรือชันโรงหลังลาย (*Tetragonula fuscobalteata*) เป็นตัวแทนผึ้งจิ๋วชนิดอื่นๆ เพราะเป็นชันโรงที่แพร่กระจายพันธุ์อาศัยอยู่ในทุกจังหวัดของประเทศไทย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทำวิจัย (output and benefit)

1. ได้ข้อมูลทางวิชาการของผึ้งจิ๋วเพิ่มมากขึ้น สามารถนำข้อมูลไปต่อยอดได้
2. สามารถแก้ไขปัญหาการผสมสายเลือดชิดของผึ้งจิ๋วได้
3. ได้แนวทางการอนุรักษ์ชันโรงแบบยั่งยืนต่อไป

วิธีดำเนินงานทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดรูปร่างของผึ้งจิ๋วกับความสามารถในการเก็บน้ำผึ้ง เกสรและชันผึ้ง ด้วยการสุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละภาคโดยเลือกเก็บจากรังในธรรมชาติที่พบทั่วไป แต่เน้นสองจังหวัดเพื่อบันทึกสถานที่ในจังหวัดนั้นเป็นหลัก จากนั้นนำมาเซท ตามกรรมวิธีศึกษาอนุกรมวิธาน จำนวนตัวอย่างที่สุ่มเก็บได้ทั้งหมด จะเลือกเอาตัวที่สมบูรณ์และอยู่ในลักษณะที่ง่ายแก่การวัดขนาดใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วย eyepiece micrometer ใช้กำลังขยายเดียวคือ 10 เท่า จำนวนตัวอย่างที่นำมาวัดขนาดของความกว้างของหัว ความยาวของปีกหน้ารวมแผ่นหุ้มปีกหรือเทกูลา และความยาวของตะกร้าเก็บเกสรหรือชันผึ้ง จำนวน 258 ตัว/ภาค โดยใช้ทศนิยม 2 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์สถิติเพื่อวิเคราะห์อวัยวะแต่ละอย่างนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละภาคหรือไม่อย่างไร

การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของผึ้งจิ๋วชนิดเดียวกันแต่ต่างวรรณะกันนั้น ไม่สามารถเก็บตัวอย่างนางพญาแม่รังในแต่ละรังออกมาได้ จึงไม่มีตัวอย่างให้ศึกษาในสภาพความเป็นจริง จึงมุ่งศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลและแปรผลข้อมูลเฉพาะชันโรงงาน ก็น่าจะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาชันโรงชนิดนี้ต่อไป

การศึกษาเปรียบเทียบ DNA ของผึ้งจิ๋วชนิดเดียวกันที่อาศัยในแต่ละภาคของประเทศไทย เนื่องจากสถานการณ์การเพาะเลี้ยงชันโรงก้าวหน้าไปในระยะสองสามปีที่ผ่านมา งานที่คิดว่าจะทำในช่วงนั้นกลับมีคนทำและตีพิมพ์ไปเรียบร้อยแล้วคือการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมของชันโรงขนเงิน แต่รายงานมิได้กล่าวถึงชันโรงในภาคใต้หรือภาคอื่นๆ นั้น มีความหลากหลายทางพันธุกรรมร่วม หมายความว่าชันโรงในภาคใต้ มี alleles ที่เหมือนกัน อันเกิดจากการรวมกลุ่มเพ่อผสมพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อการคัดเลือกเอาแต่สายพันธุ์ที่มี alleles กันหรือไม่อยู่ใกล้กันเมื่อจัด phylogenetic tree เสร็จเรียบร้อยแล้ว โดยศึกษากลุ่มชันโรงที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งเป็นต้นทางลงสู่ภาคใต้ และตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร เป็นต้น แต่ข้อมูลที่ได้ก็ไม่มีประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงชันโรงมากเท่ากับการศึกษาความเป็นพ่อแม่ลูกกัน และการทดลองผสมพันธุ์ระหว่างชันโรงในภาคใต้กับภาคตะวันออก และนำลูกผสมที่เกิดจากพ่อแม่ดังกล่าว มาวิเคราะห์ดีเอ็นเอเช่นเดียวกับดีเอ็นเอของพ่อแม่ เพื่อเป็นตัวอย่างกรณีศึกษาชันโรงหลังลาย เปรียบเทียบดีเอ็นเอกับรังในธรรมชาติที่มีมากกว่า 3 รัง และเปรียบเทียบดีเอ็นเอ ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ได้ดีพอสมควร

งานเก็บรวบรวมผึ้งจิ๋ว ชันโรงป่า ทุกชนิดในประเทศไทยจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์ ได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องต่อไป เพื่อรวบรวมและจัดแบ่งเป็นหมวดหมู่แยก ชันโรงบ้านออกจากชันโรงป่าที่อยู่ในสกุลเดียวกัน เป็นต้น

การดำเนินงานวิจัยในส่วนของการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ จำเป็นที่จะต้องแยกอธิบายโดยละเอียด เพราะวิธีการสกัด แยก วิเคราะห์มีหลากหลาย แต่จะเลือกใช้วิธีที่คิดว่าดีที่สุด ดังนี้

เก็บตัวอย่างชันโรง *Tetragonula fuscobalteata* (Cameron) จำนวนทั้งหมด 9 รัง รังละ 8 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 72 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาการสกัด DNA ด้วยวิธีความเข้มข้นของเกลือสูง นำ DNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้เทคนิค PCR กับ primer ชนิด SSR 3 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปแยกความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเป็นลูกผสม และวิเคราะห์ Phylogenic tree รายละเอียดการดำเนินงานทดลองมีดังนี้

1. ชันโรงที่ใช้ในการศึกษา
2. การสกัด DNA ชันโรง
3. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR
4. แยกความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA
5. วิเคราะห์ความเป็นลูกผสม
6. การวิเคราะห์ Phylogenetic tree

1. ชันโรงที่ใช้ในการศึกษา

เก็บตัวอย่างชันโรง *Tetragonula fuscobalteata* (Cameron) จำนวนทั้งหมด 9 รัง รังละ 8 ตัวอย่าง รวมเป็นทั้งหมด 72 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. แสดงตัวอย่างชันโรงหลังลาย (*Tetragonlua fuscobalteata*) ที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงและจากการเก็บรวบรวมจากรังในธรรมชาติ โดยรังธรรมชาติสร้างรังห่างกันไม่เกิน 200 เมตร ส่วนรังผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง และควบคุมการผสมพันธุ์แบบประชากรปิด (close population breeding) ดำเนินการในเดือนกุมภาพันธ์ 2553 ที่กรุงเทพมหานคร

จำนวนและรหัส	แหล่งที่มา	หมายเหตุ
1-8	พัทลุง	รังผลิต
9-16	จันทบุรี	รังผลิต
17-24	พัทลุง x จันทบุรี	รังผลิต
25-32	M1อ.สวี จ.ชุมพร	รังธรรมชาติ
33-40	M2 อ.สวี จ.ชุมพร	รังธรรมชาติ
41-48	M3 อ.สวี จ.ชุมพร	รังธรรมชาติ
49-56	M4 อ.สวี จ.ชุมพร	รังธรรมชาติ
57-64	M5 อ.สวี จ.ชุมพร	รังธรรมชาติ
65-72	M6 อ.ทับสะแก จ.ประจวบคีรีขันธ์	รังธรรมชาติ

2. การสกัด DNA ชันโรง

สกัด genomic DNA ของชันโรงทั้งหมดจำนวน 72 ตัวอย่างจากจำนวน 9 รังๆ ละ 8 ตัว ด้วยความเข้มข้นของเกลือสูงตามวิธีของ Paxton, (1996) โดยนำตัวอย่างชันโรงมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด Retsch รุ่น MM301 (Retsch GmbH & Co., Germany) เมื่อบดตัวอย่างละเอียดแล้วเติม digestion buffer 350 µl (0.15M NaCl, 0.02M Tris, 1.0 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS (w/v)) และเติม proteinase K (20 mg/mL) ผสมให้เข้ากัน จากนั้น incubate ที่ 55°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 6M NaCl 300 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นใน microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติม 100% ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ เพื่อตกตะกอน DNA พลิกหลอดไปมา แล้วแช่ที่ -20°C ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้น นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm 10 นาที

เทสารละลายทั้งหมดทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน DNA ที่ก้นหลอด ล้างตะกอน DNA 2 ครั้งด้วย 70% ethanol ปริมาตร 200 µl นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที เท 70% ethanol ทิ้ง รอให้ DNA แห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50 µl นำสารละลาย DNA ที่ได้เก็บไว้ที่ -20°C

วัดความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของ DNA โดยวิธี spectrophotometry วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) และความยาวคลื่น 280 nm (A_{280}) โดยใช้เครื่อง uv/vis spectrophotometer รุ่น NanoDrop8000 (Thermo scientific, USA) ความบริสุทธิ์ของ DNA ควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 (A_{260}/A_{280}) (Sambrook and Russell, 2001)

3. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

เลือกใช้เทคนิค SSR ที่มีเป้าหมายของการเพิ่มปริมาณ DNA อยู่ที่ตำแหน่ง microsatellite ของชันโรง จำนวน 3 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) ซึ่งได้จากการศึกษาของ Green *et al.* (2001)

ปฏิกิริยา PCR แต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ต้นแบบปริมาณ 20 ng, 1 µM ของแต่ละ primer, 0.5 unit ของ DNA polymerase, 0.2 mM dNTPs, 2 mM ของ $MgCl_2$ และ 1x ของ buffer โดยที่ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 7 µl ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Whatman Biometra, Germany) โดยกำหนดอุณหภูมิ และรอบของการทำปฏิกิริยา ดังนี้ predenature ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที DNA denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที annealing 65°C เป็นเวลา 40 วินาที extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ final extension 72°C เป็นเวลา 5 นาที หลักจากเสร็จปฏิกิริยา PCR นำ PCR products ไปตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis หากเกิดปฏิกิริยา PCR สมบูรณ์ จึงนำ PCR products ที่เหลือไปแยกความแตกต่างของ DNA ด้วย 4.5% (w/v) Polyacrylamide gel electrophoresis

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 17 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 248657
เลขเรียกหนังสือ

ตารางที่ 2. แสดงลำดับเบสของ primer ชนิด Simple Sequence Repeats (SSR) 3 ตำแหน่ง (Green et al., 2001) ที่เข้าจับกับลำดับเบสซ้ำ $(TC)_{12}$ $(GAA)_9$ และ $(CAA)_{12}$ กับชันโรงหลังลาย (Tetragonula fuscobalteata)

primer	ลำดับเบสซ้ำ	ขนาด (bp)	ลำดับเบสของ Primer (5'-3')
Tc3.155	$(TC)_{12}$	153-165	F: AGAATCACGTCGGCATCCGGA
			R: CTTGAAATCCAGCGCAGAGTG
Tc4.287	$(GAA)_9$	179-188	F: TCCACCGCGATACGATGGTAC
			R: GTAATACAACGCGGCTTCCTC
Tc7.13	$(CAA)_{12}$	139-154	F: GTAACGTGCCACCAGCTTTCG
			R: GAGCGATCAAAGTGACCAGTC

4. แยกความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA

4.1 แยกความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เจือจาง PCR products ด้วย gel-loading buffer (0.25% (w/v) Bromophenol blue, 0.25% (w/v) Xylene cyanol FF, 30% (v/v) Glycerol) ปริมาตร 6 เท่า จากนั้นแยกความแตกต่างของ DNA ด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis (BIORAD, USA) ใน 1x Tris-acetate (TAE buffer) (90 mM Tris-borate, 0.2mM EDTA, pH 8.0) หลังจากแยกขนาด DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 200 volt 20 นาที แล้วย้อม DNA ด้วย 1 μg/ml ethidium bromide และถ่ายรูปแถบ DNA โดยใช้ gel documentation system รุ่น TCX-20 (Vilber Lourmat, France)

4.2 แยกความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis

เจือจาง PCR products ด้วย formamide-loading buffer (80% (w/v) Deionised formamide, 10 mM EDTA, 10% (w/v) Xylene cyanol FF, 10% (w/v) Bromophenol blue) ปริมาตร 8 เท่า และแยกความแตกต่างของ DNA ด้วย 4.5% acrylamide gel (40% acrylamide 19:1, urea, 5x TBE buffer) ใน 1x TBE buffer (90 mM Tris-borate, 0.2mM EDTA, pH 8.0) หลังจากแยกขนาดของ DNA ย้อม DNA ด้วย silver nitrate (0.2% silver nitrate (w/v); 0.15% formaldehyde) เป็นเวลา 30 นาที แล้ว develop สีด้วย developer (3% sodium carbonate anhydrous (w/v); 0.2% sodium thiosulfate; 0.15% formaldehyde)

5. วิเคราะห์ความเป็นลูกผสม

โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2006) ซึ่ง CERVUS ไม่เพียงแค่วิเคราะห์หาโอกาสความเป็นพ่อและแม่ของลูกผสมเท่านั้น แต่สามารถวิเคราะห์หาพ่อแม่ที่แท้จริงของลูกผสมได้ โดยใช้ค่าทางสถิติบอกความถูกต้องว่าลูกผสมนั้นมีใครเป็นพ่อและแม่ เนื่องจากระยะเวลาที่เปลี่ยนไป หรือการไม่เข้าคู่กันของอัลลีล การกลายพันธุ์อาจเกิดความผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามอัลลีลที่เหลืออยู่ในรุ่นลูกทำให้เราสามารถใช้หาความน่าจะเป็นของพ่อแม่ที่แท้จริงได้ นอกจากนี้ CERVUS ยังใช้ในการวิเคราะห์หาค่า polymorphism information content (PIC) และค่า heterozygosity ได้

6. การวิเคราะห์ Phylogenetic tree

โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ DARwin5 (Perrier *et al.*, 2003) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรชันโรงทั้งหมด ซึ่งโปรแกรมจะวิเคราะห์บนพื้นฐานของ genetic distance โดยนำจำนวนของอัลลีลที่สัมพันธ์กันมาจัดกลุ่มเข้าด้วยกัน ตามวิธีของ Weighted Neighbour Joining และใช้ bootstrap วิเคราะห์ 100 ซ้ำ เพื่อหาค่าความน่าเชื่อถือว่าประชากรนั้นๆ มีความใกล้ชิดกันจริง