

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46211

การระบุชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนไรโบ *Tetragonilla collina* ในประเทศไทย  
ใหม่โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอพีเอ็มและพีซีอาร์-เรลไทม์

นางสาวณชนก อธิษฐานกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2553  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



๐๐๐๒๕๕๙๘๓

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46211

การระบุสปีชีส์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง *Tetragonilla collina* ในประเทศไทย  
โดยการใช้การวิเคราะห์ด้วยเอเอฟแอลพีและพีซีอาร์-เอสเอสซีพี



นางสาว มณฑลธิ์ ชีรอภิศักดิ์กุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 7 7 3 8 2 9 8 2 3

SPECIES IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEE  
*Tetragonilla collina* IN THAILAND USING AFLP AND PCR-SSCP ANALYSES



Miss Montalee Theeraapisakkun

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title SPECIES IDENTIFICATION AND GENETIC  
DIVERSITY OF STINGLESS BEE *Tetragonilla collina* IN  
THAILAND USING AFLP AND PCR-SSCP ANALYSES

By Miss Montalee Theeraapisakkun

Field of Study Biochemistry

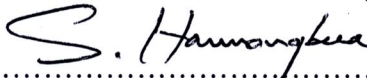
Thesis Advisor Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.

Thesis Co-Advisor Sirawut Klinbunga, Ph.D.

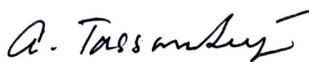
Thesis Co-Advisor Professor Deborah R. Smith, Ph.D.

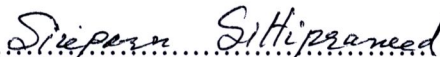
---


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

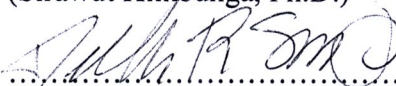
  
..... Dean of the Faculty of Science  
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

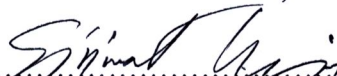
#### THESIS COMMITTEE

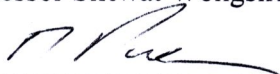
  
..... Chairman  
(Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)


  
..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-Advisor  
(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-Advisor  
(Professor Deborah R. Smith, Ph.D.)

  
..... Examiner  
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

  
..... Examiner  
(Assistant Professor Rath Pichyangkura, Ph.D.)

  
..... External Examiner  
(Bavornlak Khamnamtong, Ph.D.)

มณฑล ธีรภักดิ์กุล : การระบุชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง *Tetragonilla collina* ในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ด้วยเอฟแอลพีและพีซีอาร์-เอสเอสซีพี (SPECIES IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEE *Tetragonilla collina* IN THAILAND USING AFLP AND PCR-SSCP ANALYSES) อ. ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. ศิริพร สิทธิประณีต, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และ Professor Deborah R. Smith, Ph.D., 133 หน้า.

## E46211

การค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชนิดชันโรง *Tetragonilla collina* โดยเทคนิคเอฟแอลพี เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอของชันโรง 11 ชนิดด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ผสม พบแถบดีเอ็นเอขนาด 316 คู่เบสที่ปรากฏเฉพาะใน *T. collina* จึงทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อออกแบบคู่ไพรเมอร์ (CUTc1-F/R) และทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์กับชันโรง 15 ชนิด (239 รัง) พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสขนาด 259 คู่เบสปรากฏใน *T. collina* (134/134 รัง, 100%) และ *T. pagdeni* (43/51 รัง, 84.3%) แต่ไม่พบในชันโรงชนิดอื่น เมื่อนำเทคนิค SSCP มาใช้ค้นหาความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบรูปแบบ SSCP ของ *T. collina* ต่างจากรูปแบบของ *T. pagdeni* อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของชันโรง *T. collina* แสดงจีโนไทป์ 3 แบบ โดยจีโนไทป์แบบ AA (259/259 คู่เบส) พบในชันโรงทุกตัวจากภาคเหนือ (21 รัง) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (32 รัง) และพบในชันโรงจากภาคกลาง 23 รังจากทั้งหมด 28 รัง ขณะที่ชันโรงส่วนใหญ่จากภาคใต้ (42/53 รัง) พบจีโนไทป์แบบ BB (253/253 คู่เบส) ส่วนจีโนไทป์แบบผสม AB (259/253 คู่เบส) พบในชันโรงจากประจวบคีรีขันธ์ซึ่งอยู่ใกล้ Kra ecotone (แนวเปลี่ยนของสังคมพืชและสัตว์) จำนวน 5 รังจาก 28 รังและอีก 11 รังจาก 53 รังซึ่งอยู่ห่างจาก Kra ecotone ลงไปทางใต้ ผลจากการกระจายตัวของจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม CUTc1 สามารถจำแนกกลุ่มประชากรของชันโรง *T. collina* ในประเทศไทยได้อย่างชัดเจน เมื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง *T. collina* โดยเทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (TE-AFLP) พบความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงภายในแต่ละกลุ่มประชากรของ *T. collina* เมื่อใช้ AMOVA คำนวณค่า  $\Phi_{PT}$  เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรชันโรง พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรชันโรงภาคเหนือ กลาง ตะวันออกเฉียงเหนือ และใต้ของประเทศไทยอย่างมีนัยสำคัญ ( $\Phi_{PT} = 0.258, P = 0.001$ ) และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมที่น้อยกว่าแต่มีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มประชากรชันโรงทางตอนเหนือและตอนใต้ของ Kra ecotone ( $\Phi_{PT} = 0.207, P = 0.001$ ) นอกจากนี้เมื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง *T. collina* โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม TECU ซึ่งได้จากบริเวณหนึ่งของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (TE-AFLP) พบความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงระหว่างกลุ่มประชากรชันโรง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มประชากรซึ่งรวมชันโรงภาคเหนือ กลาง ตะวันออกเฉียงเหนือเข้าด้วยกัน กลุ่มประชากรจากประจวบคีรีขันธ์ กลุ่มประชากรจากชุมพร และกลุ่มประชากรภาคใต้ ( $\Phi_{PT} = 0.903, P = 0.001$ ) ในทำนองเดียวกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีน 16S rRNA, COI และ cytb โดยเทคนิค SSCP พบความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงภายในแต่ละกลุ่มประชากรของ *T. collina* เมื่อคำนวณค่า  $\Phi_{PT}$  ของแต่ละยีน (16S rRNA, COI และ cytb) โดย AMOVA พบความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงระหว่างกลุ่มประชากรชันโรงภาคเหนือ กลาง ตะวันออกเฉียงเหนือ ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และภาคใต้ของประเทศไทย ( $\Phi_{PT} = 0.563, \Phi_{PT} = 0.204$  และ  $\Phi_{PT} = 0.294, P = 0.001$  ตามลำดับ) ขณะที่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มประชากรชันโรงทางตอนเหนือและตอนใต้ของ Kra ecotone ( $\Phi_{PT} = 0.334, \Phi_{PT} = 0.106$  และ  $\Phi_{PT} = 0.133, P = 0.001$  ตามลำดับ) เช่นกัน

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิติศ.....มณฑล ธีรภักดิ์กุล.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....



# # 4773829823: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEYWORDS : STINGLESS BEES / *Tetragonilla collina* / SPECIES-SPECIFIC  
MARKER / GENETIC DIVERSITY / POPULATION DIFFERENTIATION

MONTALEE THEERAAPISAKKUN : SPECIES IDENTIFICATION  
AND GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEE *Tetragonilla collina*  
IN THAILAND USING AFLP AND PCR-SSCP ANALYSES. THESIS  
ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D.,  
THESIS CO-ADVISOR : SIRAWUT KLINBUNGA, Ph.D., PROF.  
DEBORAH R. SMITH, Ph.D., 133 pp.

**E46211**

A molecular marker for authenticating species origin of the stingless bee (*Tetragonilla collina*) was developed. Initially, amplified fragment length polymorphism analysis was made of 11 stingless bee species using 64 primer combinations. A 316-bp band found only in *T. collina* was cloned and sequenced. A primer pair (CUTc1-F/R) was designed and tested for specificity in 15 stingless bee species (239 nests). The expected 259-bp fragment was consistently amplified in all *T. collina* individuals (134/134 nests, 100%). Cross-species amplification was observed in *T. pagdeni* (43/51 nests; 84.3%), but not in other species. SSCP analysis of CUTc1 unambiguously differentiated *T. collina* from *T. pagdeni*. CUTc1 generated three genotypes in Thai *T. collina* (134 nests). An AA (259/259 bp) genotype was found in all stingless bees from the north (21 nests) and northeast (32 nests), and 23/28 nests from the Central region, whereas a BB (253/253 bp) genotype was observed in most samples from peninsular Thailand (42/53 nests). Heterozygotes exhibiting the AB (259/253 bp) genotype were observed in 5 of 28 nests from Prachuap Khiri Khan located slightly above the Kra ecotone and 11 of 53 nests originated further south of the Kra ecotone. Genotype distribution patterns of CUTc1 clearly indicated intraspecific population differentiation of Thai *T. collina*. The regional genetic variation of Thai *T. collina* was investigated using DNA fingerprinting technique, three-enzyme amplified fragment length polymorphisms (TE-AFLPs) and Analysis of Molecular Variance (AMOVA). High levels of genetic variation among individuals in each population were detected. AMOVA analysis indicated significant genetic differentiation among the four geographic regions; North, Central, Northeast, and Peninsular Thailand ( $\Phi_{PT} = 0.258$ ,  $P = 0.001$ ). The smaller but significant differentiation between samples from North and South of Isthmus of Kra was also detected ( $\Phi_{PT} = 0.207$ ,  $P = 0.001$ ). The genetic differentiation in *T. collina* was also analyzed by TE-AFLP derived SCAR marker (TECU marker) using SSCP analysis. The greatest differentiation was detected among 4 populations; North+Central+Northeast, Prachuap Khiri Khan, Chumphon, and Peninsular Thailand ( $\Phi_{PT} = 0.903$ ,  $P = 0.001$ ). The SSCP analysis of the 16S rRNA, COI, and cytb genes was also used to clarify the mtDNA diversity of *T. collina*. High levels of genetic variation among individuals within each population were observed. AMOVA analysis of the 16S rRNA, COI, and cytb genes showed high genetic differentiation among 6 populations; North, Central, Northeast, Prachuap Khiri Khan, Chumphon, and Peninsular Thailand ( $\Phi_{PT} = 0.563$ ,  $\Phi_{PT} = 0.204$ , and  $\Phi_{PT} = 0.294$ ,  $P = 0.001$ , respectively) while the significant genetic differentiations between samples from North and South of Isthmus of Kra were also found ( $\Phi_{PT} = 0.334$ ,  $\Phi_{PT} = 0.106$ , and  $\Phi_{PT} = 0.133$ ,  $P = 0.001$ , respectively).

Department : ..... Biochemistry .....  
Field of Study : ..... Biochemistry .....  
Academic Year : ..... 2010 .....

Student's Signature *Montalee Theerapisakkun*  
Advisor's Signature *Siriporn Sittipraneed*  
Co-Advisor's Signature *S. Klinbunga*  
Co-Advisor's Signature *Deborah R. Smith*

## ACKNOWLEDGEMENTS

I am very grateful to my supervisors Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed, Dr. Sirawut Klinbunga and Professor Dr. Deborah Smith for their valuable suggestions and support over the past 6.5 years at the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. A student grant is supported by the Royal Golden Jubilee Ph.D. program (Grant No. PHD/0004/2548), the Thailand Research Funds (TRF).

My gratitude is also extended to Professor Dr. Anchalee Tassanakajon, Professor Dr. Siritwat Wongsiri, Assistant Professor Dr. Rath Pichyangkura, and Dr. Bavornlak Khamnamtong for serving as thesis committee and for their available comments and useful suggestion.

During the sample collection processes, the contribution of people from Bee Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, is acknowledged. Likewise, this study could not have been done without the help of Kun Silprasit, who helped us collect stingless bees from many provinces in Thailand. We thank Professor Charles D. Michener and Dr. Natapot Warrit for developing our understanding of stingless bee taxonomy, the Entomology Program, Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Kansas, and Aquatic Molecular Genetics and Biotechnology, National Science Center for Genetic Engineering and Biotechnology (NSTDA) for providing facilities required by the experiments

Many thanks are also expressed to all my friends and colleagues in laboratory Rm 708 for their friendly assistances during the experimental, data analyses, and writing dissertation.

Finally, I wish to dedicate this dissertation to my parents for their love, care, understanding, encouragement, and doing whatever they can do for me throughout my study.

# CONTENTS

	<b>Page</b>
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Stingless bees biology.....	1
1.1.1 Division of labor.....	1
1.1.2 Nest architecture of stingless bees.....	1
1.1.3 Foundation of new colonies and mating.....	2
1.2 Distribution of stingless bees.....	2
1.3 Exploitation as native species.....	6
1.4 Stingless bees in Thailand.....	7
1.5 <i>Tetragonilla collina</i> Smith in Thailand .....	9
1.5.1 Identification of <i>T. collina</i> .....	11
1.5.2 Genetic diversity of <i>T. collina</i> in Thailand.....	12
1.6 Molecular marker .....	13
1.7 Objectives of this dissertation.....	16
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	19
2.1 Equipments.....	19
2.2 Chemicals.....	20
2.3 Oligonucleotide primers.....	21
2.4 Enzymes and Restriction enzymes.....	21
2.5 Radioactive.....	21
2.6 Samples.....	21



	<b>Page</b>
2.7 DNA preparation.....	22
2.7.1 DNA extraction.....	22
2.7.2 Measurement of DNA concentration / Agarose gel electrophoresis.....	22
2.8 Development of <i>T. collina</i> -specific marker using AFLP and SSCP analysis.....	23
2.8.1 AFLP analysis.....	23
2.8.2 Preparation of polyacrylamide gel and gel electrophoresis.....	25
2.8.3 Silver staining.....	26
2.8.4 Cloning of species-specific AFLP fragment.....	27
2.8.5 DNA sequencing and primer design.....	29
2.8.6 PCR amplification of candidate <i>T. collina</i> -specific AFLP marker and species-specific test.....	29
2.8.7 SSCP analysis.....	31
2.9 Genetic diversity and population structure analysis of <i>T. collina</i> using TE-AFLP and TE-AFLP derived markers.....	31
2.9.1 TE-AFLP analysis.....	31
2.9.2 Scoring TE-AFLP variation.....	32
2.9.3 Cloning of TE-AFLP derived marker.....	33
2.9.4 DNA sequencing and primer design.....	34
2.9.5 PCR amplification of TE-AFLP derived marker and SSCP analysis.....	34
2.9.6 Scoring SSCP variation.....	34
2.9.7 Data analysis.....	34
2.10 Mitochondrial DNA diversity of <i>T. collina</i> using PCR-SSCP.....	36
2.10.1 PCR amplification of the mtDNA gene segments and SSCP analysis.....	36

	<b>Page</b>
2.10.2 Scoring SSCP variation.....	38
2.10.3 Data analysis.....	38
CHAPTER III RESULT.....	39
3.1 DNA extraction.....	39
3.2 Development of <i>T. collina</i> -specific marker using AFLP and SSCP analysis.....	40
3.2.1 AFLP analysis.....	40
3.2.2 Cloning and characterization of a species-specific AFLP fragment.....	40
3.2.3 Development of species-diagnostic SCAR marker in <i>T.</i> <i>collina</i> .....	44
3.2.4 Characterization of the SCAR marker using SSCP analysis...	44
3.3 Genetic diversity and population structure analysis of <i>T. collina</i> using TE-AFLP and TE-AFLP derived markers.....	48
3.3.1 TE-AFLP analysis.....	48
3.3.2 Scoring TE-AFLP variation.....	48
3.3.3 Cloning and characterization of a TE-AFLP derived fragment in <i>T. collina</i> .....	53
3.3.4 Development and characterization of TE-AFLP derived SCAR marker using SSCP analysis.....	53
3.4 Mitochondrial DNA diversity of <i>T. collina</i> using PCR-SSCP.....	62
3.4.1 Analysis of 16S ribosomal RNA gene polymorphism.....	62
3.4.2 Analysis of cytochrome oxidase I gene polymorphism.....	68
3.4.3 Analysis of cytochrome b gene polymorphism.....	74
3.4.4 Analysis of geographic population structure based on all 3 mtDNA gene polymorphisms.....	84
CHAPTER IV DISCUSSION.....	88
CHAPTER V CONCLUSION.....	98



	<b>Page</b>
REFERENCES.....	100
APPENDICES.....	109
APPENDIX A : Sample collections.....	110
APPENDIX B : TE-AFLP and SSCP Haplotypes.....	119
BIOGRAPHY.....	133

## LIST OF TABLES

		<b>Page</b>
<b>Table 1.1</b>	Stingless bee species found in Thailand.....	8
<b>Table 2.1</b>	Adaptor and AFLP primers for the ligation and amplification...	24
<b>Table 2.2</b>	Primers from a candidate <i>T.collina</i> -specific AFLP marker.....	30
<b>Table 2.3</b>	Adaptor and TE-AFLP primers for the ligation and PCR amplification.....	33
<b>Table 2.4</b>	Primers of TE-AFLP derived marker.....	33
<b>Table 2.5</b>	Primers of the expected amplified product mtDNA segment.....	36
<b>Table 2.6</b>	PCR profile for amplification of mtDNA segment.....	37
<b>Table 3.1</b>	Comparision of TE-AFLP bands and $H_e$ .....	50
<b>Table 3.2</b>	$\Phi_{PT}$ values, Nei's genetic distance, and exact test from TE- AFLP analysis.....	51
<b>Table 3.3</b>	AMOVA of TE-AFLP analysis.....	52
<b>Table 3.4</b>	Comparision of SSCP bands and $H_e$ of TECU marker.....	59
<b>Table 3.5</b>	$\Phi_{PT}$ values, Nei's genetic distance, and exact test of TECU marker.....	60
<b>Table 3.6</b>	AMOVA of TECU marker.....	61
<b>Table 3.7</b>	Gene diversity of 16S rRNA gene.....	67
<b>Table 3.8</b>	$\Phi_{PT}$ values, Nei's genetic distance, and exact test of 16S rRNA gene.....	69
<b>Table 3.9</b>	AMOVA of 16S rRNA gene.....	70
<b>Table 3.10</b>	Gene diversity of COI gene.....	73
<b>Table 3.11</b>	$\Phi_{PT}$ values, Nei's genetic distance, and exact test of COI gene...	75
<b>Table 3.12</b>	AMOVA of COI gene.....	76
<b>Table 3.13</b>	Gene diversity of cytb gene.....	81
<b>Table 3.14</b>	$\Phi_{PT}$ values, Nei's genetic distance, and exact test of cytb gene...	82
<b>Table 3.15</b>	AMOVA of cytb gene.....	83
<b>Table 3.16</b>	Gene diversity of combined 16S rRNA, COI, and cytb gene.....	85



	<b>Page</b>
<b>Table 3.17</b> $\Phi_{PT}$ values, Nei's genetic distance, and exact test of combined 16S rRNA, COI, and cytb gene.....	86
<b>Table 3.18</b> AMOVA of combined 16S rRNA, COI, and cytb gene.....	87

## LIST OF FIGURES

		<b>Page</b>
<b>Figure 1.1</b>	Diagram of stingless bees nest.....	4
<b>Figure 1.2</b>	Nest of stingless bees .....	5
<b>Figure 1.3</b>	Distribution of stingless bees.....	5
<b>Figure 1.4</b>	Pictures of nest entrances of stingless bees .....	7
<b>Figure 1.5</b>	Morphological structures of stingless bees.....	10
<b>Figure 1.6</b>	Morphological structure of <i>T. collina</i> .....	10
<b>Figure 1.7</b>	AFLP procedures.....	17
<b>Figure 1.8</b>	Diagram shows the principal diagram of SSCP analysis.....	18
<b>Figure 3.1</b>	High molecular weight DNA of <i>T. collina</i> workers.....	39
<b>Figure 3.2</b>	The selective amplification products of each stingless bee species on agrose gel.....	41
<b>Figure 3.3</b>	AFLP patterns of various stingless bees.....	42
<b>Figure 3.4</b>	Reamplification of the species-specific marker of <i>T. collina</i> .....	43
<b>Figure 3.5</b>	Colony PCR product of the recombinant clone.....	43
<b>Figure 3.6</b>	Nucleotide sequences of a <i>T. collina</i> -specific AFLP fragment....	43
<b>Figure 3.7</b>	Amplification of species-diagnostic SCAR marker CUTc1.....	45
<b>Figure 3.8</b>	SSCP patterns and nucleotide sequence of CUTc1 in <i>Tetragonilla collina</i> and <i>Tetragonula pagdeni</i> .....	46
<b>Figure 3.9</b>	SSCP patterns and nucleotide sequence of CUTc1 in <i>T. collina</i> ..	47
<b>Figure 3.10</b>	Autoradiogram of TE-AFLP patterns.....	49
<b>Figure 3.11</b>	Reamplification of the TE-AFLP derived marker of <i>T. collina</i> ...	54
<b>Figure 3.12</b>	Nucleotide sequence of the TE-AFLP derived fragment.....	54
<b>Figure 3.13</b>	Amplification of TECU marker.....	54
<b>Figure 3.14</b>	SSCP pattern of the amplified TECU marker of <i>T. collina</i> .....	55
<b>Figure 3.15</b>	Alignment of nucleotide sequences of TECU marker.....	56
<b>Figure 3.16</b>	Phylogeographic pattern deduced from TECU marker.....	57



	<b>Page</b>
<b>Figure 3.17</b> SSCP pattern of the amplified 16S rRNA gene of <i>T. collina</i> .....	63
<b>Figure 3.18</b> Alignment of 6 patterns of 16S rRNA gene.....	64
<b>Figure 3.19</b> Phylogeographic pattern deduced from 16S rRNA gene haplotypes.....	66
<b>Figure 3.20</b> SSCP pattern of the amplified COI gene of <i>T. collina</i> .....	71
<b>Figure 3.21</b> Alignment of 4 patterns of COI gene.....	72
<b>Figure 3.22</b> SSCP pattern of the amplified cytb gene.....	77
<b>Figure 3.23</b> Alignment of 8 patterns of cytb gene.....	78
<b>Figure 3.24</b> Phylogeographic pattern deduced from cytb gene of <i>T. collina</i> ...	79

**LIST OF ABBREVIATIONS**

°C	degree celcius
°N	degree of north latitude
μl	microlitre
μM	micromolar
bp	base pair
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
mtDNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (disodium salt)
EtBr	ethidium bromide
IPTG	isopropyl-thiogalactoside
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
mmol	millimole
pmol	picomole
ng	nanogram
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RNase A	Ribonuclease A
SDS	Sodium dodecyl sulfata
TE	Tris EDTA
Tris	Tris(hydroxyl methyl) aminomethane