บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของผึ้งโพรงในประเทศไทย โดยทำการศึกษาความแปรผันของลำดับเบสของดีเอ็นเอ ในส่วน noncoding intergenic region ที่อยู่ระหว่างยีน COI และ COII ใน mtDNA เพื่อนำผลที่ได้มาใช้แบ่งกลุ่มผึ้งโพรงในประเทศไทย โดยนำเทคนิค PCR มาใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและหาลำดับเบสจากดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มา alignment โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL และทำ phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม PAUP

ในการเตรียมดีเอ็นเอก่อนที่จะนำมาเพิ่มปริมาณของ mtDNA ตรงบริเวณ noncoding intergenic region โดยเทคนิค PCR เป็นการเตรียมดีเอ็นเอจากผึ้งงานซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ในแต่ละรัง การเก็บตัวอย่างผึ้งในระยะตัวเต็มวัยทำได้สะดวก โดยดักผึ้งจากปากรัง จึงไม่รบกวนผึ้งหรือทำลายตัวอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บผึ้งในระยะตัวอ่อนหรือดักแด้ ซึ่งต้องตัดเอารวงผึ้งออกมาบางส่วน หากรบกวนรังผึ้งมากๆ อาจทำให้ผึ้งหนีรังได้ สำหรับเทคนิค PCR ที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการนั้นเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มาก เพราะจะใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจำนวนเพียงเล็กน้อยและดีเอ็นเอนั้นไม่จำเป็นต้องอยู่ในรูป high molecular weight เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำ RFLP ดังนั้นจึงสามารถเก็บตัวอย่างผึ้งในเอทธานอลได้ ทำให้การเก็บตัวอย่างสะดวกและง่ายขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมไนโตรเจนเหลวขณะออกภาคสนาม หรือไม่จำเป็นต้องเตรียมอุปกรณ์และสารเคมีเพื่อสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งขณะที่ผึ้งยังมีชีวิต เพื่อให้ได้ high molecular weight DNA อีกทั้งใช้ตัวอย่างผึ้งเพียง 1 ตัวจากแต่ละรังมาทำการทดลองได้ครบทุกขั้นตอน ในขณะที่การทำ RFLP ของ mtDNA โดยตรงจะต้องใช้ดีเอ็นเอจำนวนมาก จึงต้องใช้ตัวอย่างผึ้งงานระยะตัวเต็มวัยจำนวน 50-200 ตัวต่อ 1 รัง จึงจะได้ mtDNA ที่เพียงพอสำหรับการนำดีเอ็นเอนั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Smith and Brown,1988 ;Smith and Brown, 1990) การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ (total DNA) จากส่วนหน้าอกของผึ้ง ตามการทดลองข้อ 3.2.1 เนื่องจากส่วนหน้าอกของผึ้งมีกล้ามเนื้อที่ใช้ใน

การบิน ซึ่งต้องการพลังงานมากจึงมีไมโตคอนเดรียจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามสามารถสกัด mtDNA จากผึ้งระยะดักแด้หรือตัวอ่อนได้ ซึ่งในระยะดังกล่าวดีเอ็นเอจะมีอาร์เอ็นเอปนมาก จึงต้องใช้ RNase เพื่อย่อยอาร์เอ็นเอ (Moritz, et al., 1986) เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากส่วนหน้าอกของผึ้งงานในระยะตัวเต็มวัยมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผึ้งทั้งตัวที่อยู่ในระยะดักแด้ (รูปที่ 6) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผึ้งในระยะดักแด้จะมีโปรตีนปนอยู่ในปริมาณมากกว่า โดยสังเกตจากส่วนบนของเจลซึ่งมีแถบเรืองแสงเกิดขึ้น ดังนั้นผึ้งในระยะตัวเต็มวัยจึงเป็นระยะที่เหมาะสมในการนำมาเตรียมดีเอ็นเอ เพราะมี mtDNA ปริมาณมาก และมีอาร์เอ็นเอและโปรตีนเจือปนอยู่น้อย ทำให้ดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีคุณภาพดี สำหรับการสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำไปทำ PCR ดังกล่าวนั้น ไม่จำเป็นต้องแยก mtDNA ออกจาก nuclear DNA แต่ถ้าทำ RFLP ของ mtDNA โดยตรงจะต้องทำ mtDNA ให้บริสุทธิ์โดยการแยก mtDNA ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ ดังนั้นการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อนำไปทำ PCR จึงง่ายและสะดวกรวมทั้งผ่านขั้นตอนน้อยกว่าการเตรียม mtDNA ให้บริสุทธิ์ จึงประหยัดเวลาในการเตรียมดีเอ็นเอลงได้มาก

สามารถวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่เตรียมจากผึ้งโพรงได้ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ตามการทดลองข้อ 3.3.1 ดีเอ็นเอที่เตรียมจากส่วนหน้าอกของผึ้งที่เก็บในเอทธานอลหนึ่งตัวมีปริมาณ 1-1.5 ไมโครกรัม ในขณะที่ดีเอ็นเอที่เตรียมจากผึ้งทั้งตัวมีปริมาณ 5-6 ไมโครกรัม วิธีที่ 2 เป็นการวัดความเข้มของการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอที่ถูกย้อมด้วย ethidium bromide ตามการทดลองข้อ 3.3.2 วิธีนี้ใช้ในกรณีที่ดีเอ็นเอมีปริมาณน้อยกว่า 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เนื่องจากการวัดค่า A_{260} ของสารละลายดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยด้วยเครื่อง spectrophotometer จะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่ถูกต้องเพราะอาจถูกรบกวนจากสารอื่นๆที่ปนอยู่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีหาปริมาณดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบการเรืองแสงกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน ภายหลังจากแยกดีเอ็นเอออกตามน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำ agarose gel electrophoresis

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มากในงานวิจัยทางอนุพันธุ์ศาสตร์ในปัจจุบัน เพราะเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีปริมาณสูงกว่าเดิมหลายล้านเท่าด้วยขั้นตอนที่ง่ายและรวดเร็ว การวิจัยนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณ mtDNA ตรงส่วนที่เป็น noncoding

intergenic region ซึ่งอยู่ระหว่างยีน COI และ COII โดยใช้ดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ปฏิกิริยา PCR ใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerare ซึ่งสกัดจากแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในน้ำพุร้อน (*Thermus aquaticus*) มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิสูง ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 คือ denaturation เป็นการให้ความร้อนแก่สารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิสูง คือที่ 95°ซ เพื่อให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่คลายเกลียวออกเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนที่ 2 annealing เป็นการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50°ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับกันระหว่าง primer กับดีเอ็นเอต้นแบบ primer ที่ใช้เป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับบริเวณในยีน COI และ COII ที่คลอบคลุมบริเวณ noncoding intergenic region อยู่ ขั้นตอนที่ 3 extension เป็นขั้นตอนที่ปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase โดยใช้อุณหภูมิที่ 72°ซ ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอขึ้นใหม่ โดยเชื่อมโมเลกุลของ deoxyribonucleotides เข้าที่ปลาย $3'$ ของ primer ครั้งละ 1 โมเลกุล ปฏิกิริยาจึงต้องการ deoxyribonucleoside triphosphate ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) โดยมี magnesium ion (Mg^{2+}) เป็น cofactor ของเอนไซม์ ทำให้มีการเพิ่มความยาวของดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทาง $5'$ ไป $3'$

การนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยแต่ละเรื่องนั้นมีความจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) เพื่อให้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาเกิดขึ้นสูงสุด คือให้ได้ผลิตผลปริมาณมากพอและมีความจำเพาะ (specific) สูง ในการวิจัยนี้ได้ปรับสภาวะต่างๆที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ noncoding intergenic region ของ mtDNA โดยใช้ primer 1 คู่ ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับลำดับเบสที่อยู่บริเวณปลาย $3'$ ของยีน COI และ COII ใน mtDNA โดยเลือกใช้ primer ที่ไม่สามารถจับกับปริเวณอื่นใน mtDNA หรือจับกับ nuclear DNA ตลอดจนไม่จับกับตนเอง (self dimer) รวมทั้งไม่จับกับ primer อีกสาย (heterodimer) ทำปฏิกิริยา PCR ในเบื้องต้นตามการทดลองที่ 3.4.1 พบว่าผึ้งโพรงจะให้ PCR product ขนาดประมาณ 750 คู่เบส และไม่มี primer dimer เกิดขึ้น (รูปที่ 7) แสดงว่าปฏิกิริยามีความจำเพาะ จึงได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำให้ PCR product ที่ได้มีปริมาณสูงที่สุดต่อไป

การปรับความเข้มข้นของ nucleotide ทั้ง 4 ชนิด ในปฏิกริยา PCR ทั่วไปมีความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดควรอยู่ระหว่าง 50-200 ไมโครโมลาร์ โดย dNTP ทั้ง 4 ชนิดในปฏิกิริยาต้องมีความเข้มข้นของแต่ละชนิดที่สมดุลย์กัน เพื่อทำให้ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นอย่างจำเพาะและได้ผลผลิตสูง ถ้ามีความเข้มข้นของ dNTP สูงเกินไปอาจจะเร่งให้เกิดการต่อลำดับเบสคู่สมผิดพลาดได้ การทดลองที่ 3.4.2.1 ปรับความเข้มข้นของ dNTP เป็น 0, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 8 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ให้ PCR product ใกล้เคียงกับ 200 ไมโครโมลาร์ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 100 ไมโครโมลาร์ในการทำ PCR

ความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสม โดยทั่วไปควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 ไมโครโมลาร์ ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปจะส่งเสริมให้เกิดการจับคู่ผิดพลาด(mispriming) และมีการสะสมของผลิตผลที่ไม่จำเพาะ (nonspecific products) มากขึ้น และอาจช่วยเพิ่มโอกาสการเกิด primer-dimer ซึ่งจะแย่งใช้เอนไซม์ dNTP และ primer ทำให้ผลิตผลที่ต้องการลดลง จากการทดลองที่ 3.4.2.2 โดยปรับความเข้มข้นของ primer เป็น 0, 0.02, 0.04, 0.06 ,..., 0.20 ไมโครโมลาร์ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 9 ที่ความเข้มข้น 0.04 ไมโครโมลาร์ เริ่มให้ PCR product แต่ยังมีปริมาณน้อยในขณะที่ความเข้มข้นเป็น 0.14 ไมโครโมลาร์ ให้ PCR product ปริมาณมากและเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ให้ PCR product ในปริมาณสูงใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ noncoding intergenic region เพื่อเตรียมดีเอ็นเอสำหรับนำไปหาลำดับเบสจึงใช้ primer ที่ความเข้มข้น 0.14 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้นของ magnesium ion (Mg^{2+}) เนื่องจากความเข้มข้นของ Mg^{2+} มีผลต่อการเกิดความจำเพาะของ PCR product ความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์การจับ primer กับดีเอ็นเอต้นพิมพ์ และอุณหภูมิที่ทำให้แยกออกจากกันของดีเอ็นเอต้นแบบ ถ้ามีความเข้มข้นของ Mg^{2+} สูงทำให้การเพิ่มขยายผลผลิตที่ไม่จำเพาะสะสมมาก แต่ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะได้ผลิตผลที่ต้องการในปริมาณที่ต่ำ จากการทดลองที่ 3.4.2.3 โดยปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5, ... , 4.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 10 ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ noncoding intergenic region เพื่อเตรียมดีเอ็นเอสำหรับนำไปหาลำดับเบส จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เป็น 2.5 มิลลิโมลาร์

เมื่อทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมขององค์ประกอบต่างๆที่ใช้ในการทำ PCR ได้แล้ว จึงใช้สภาวะดังกล่าวข้างต้นสำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ noncoding intergenic region ของ mtDNA ที่อยู่ระหว่างยีน COI และ COII จากดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ของผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย

การทดลองทำ PCR โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่หาได้กับผึ้งโพรงและผึ้งชนิดอื่นที่พบในประเทศไทยอีก 4 ชนิด ดังการทดลองที่ 3.4.4 พบว่าผึ้งโพรงจะให้ PCR product ขนาด 750 คู่เบส ผึ้งมิ้มเล็ก ผึ้งมิ้มและผึ้งหลวงให้ PCR product ขนาดใกล้เคียงกัน คือ ขนาดประมาณ 700 คู่เบส ในขณะที่ผึ้งพันธุ์ให้ PCR product ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ดังรูปที่ 12 แสดงว่าผึ้งพันธุ์มีดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน COI และ COII ที่มีขนาดแตกต่างไปจากผึ้งพื้นเมืองของไทยชนิดอื่นๆมาก

สำหรับดีเอ็นเอที่จะนำไปหาลำดับเบส ต้องทำให้บริสุทธิ์ปราศจาก amplification primer, dNTP และเกลือ เนื่องจาก amplification primer อาจไปแข่งกับ sequencing primer ในการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาการหาลำดับเบสลดลง ส่วน dNTP จะต้องกำจัดออกไปเพราะ dNTP เป็นสารตั้งต้นในขั้นตอน extension termination ซึ่งจะทำให้สัดส่วนของ dNTP/ddNTP ในปฏิกิริยาการหาลำดับเบสผิดพลาดและส่งผลต่อการหาลำดับเบส นอกจากนี้ต้องเตรียมดีเอ็นเอให้ปราศจาก nonspecific PCR product เพราะถ้ามีปนอยู่อาจทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาการหาลำดับเบส ทำให้รบกวนการหาลำดับเบสจากสายดีเอ็นเอที่ต้องการ การหาลำดับเบสจาก PCR product โดยใช้ internal sequencing primer จะช่วยเพิ่มความจำเพาะในปฏิกิริยาเนื่องจาก internal sequencing primer จะเข้าจับกับดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับเบสโดยจะไม่จับกับ nonspecific PCR product ทำให้ปฏิกิริยามีความจำเพาะขึ้น จากการทดสอบ internal sequencing primer ที่ใช้ในงานวิจัยคือ primer 3 นั้น เป็น primer สามารถจับกับ mtDNA ของผึ้งโพรง โดยมีลำดับเบสที่อยู่ถัดเข้ามาด้านในของ amplification primer ในส่วนของยีน COI (primer 1) ประมาณ 250 คู่เบส (รูปที่13) ซึ่งอยู่ในส่วนของ leucine tRNA (Crozier and Crozier, 1993)

ปฏิกิริยาการหาลำดับเบสแบบ thermal clycle sequencing ตามการทดลองข้อ 3.7.1 ใช้หลักการเดียวกันกับการทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิสูงถึง 90°ซ ในการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวก่อน เพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบให้ sequencing primer เข้าจับ

โดยลดอุณหภูมิลงเป็น 47°ซ จากนั้นปรับอุณหภูมิเป็น 70°ซ ให้เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ OmniBase sequencing และเมื่อเกิดปฏิกิริยาในรอบต่อไปดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในรอบแรกๆ จะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป ทำให้การหาลำดับเบสโดยวิธีนี้สามารถใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณที่น้อยได้ จากการทดลองสามารถใช้ดีเอ็นเอต้นแบบประมาณ 2 นาโนกรัมในการหาลำดับเบสแต่ละครั้ง

ลำดับเบสของ noncoding intergenic region ที่อ่านจากแผ่นฟิล์ม (รูปที่ 15) มีความยาวทั้งหมด 96-97 คู่เบส และเมื่อนำลำดับเบสจากผึ้ง 17 ตัวอย่างมาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL (รูปที่ 18) พบว่ามีตำแหน่งของลำดับเบสที่มีความแปรผันอยู่ 9 ตำแหน่ง คือ 16, 17, 30, 32, 34, 43, 49, 56 และ 57 ผึ้งจากจังหวัดในภาคเหนือและอีสานมีลำดับเบสที่เหมือนกันทั้งหมด ยกเว้นผึ้งจากจังหวัดสกลนครและจันทบุรี โดยผึ้งจากสกลนครจะมีเบสต่างไป 1 เบส ในตำแหน่งที่ 30 ส่วนผึ้งจากจังหวัดจันทบุรีจะมีเบส A หายไป 1 เบส ในตำแหน่งที่ 56 ผึ้งโพรงจากจังหวัดในภาคใต้และเกาะสมุยมีลำดับเบสคล้ายคลึงกัน โดยผึ้งจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานีและเกาะสมุยรังที่ 1-3 มีลำดับเบสที่เหมือนกันทุกเบส ผึ้งจากจังหวัดภูเก็ตมีเบสที่ต่างจากเบสของกลุ่มจังหวัดในภาคใต้ 1 เบสในตำแหน่งที่ 30 ส่วนผึ้งจากเกาะสมุยรังที่ 4 และ 5 มีเบสที่ต่างไป 2 เบส ในตำแหน่งที่ 34 และ 56 โดยจะเป็นเบส A และ C ในขณะที่ของกลุ่มจังหวัดทางภาคใต้ดังกล่าวจะเป็นเบส G และ T ตามลำดับ และเพื่อเป็นการเปรียบเทียบสายพันธุ์ของผึ้งโพรงในประเทศไทยกับสายพันธุ์ของผึ้งโพรงในประเทศอื่นๆในแถบเอเชียด้วยกัน ได้นำข้อมูลของลำดับเบสของผึ้งโพรงในประเทศไทยที่ทำการศึกษาได้ในครั้งนี้มาเปรียบเทียบลำดับเบสของผึ้งโพรงจากประเทศมาเลย์เซีย อินโดนิเซีย (เกาะบอร์เนียว) ฟิลิปปินส์ (แกะมินดาเนา) และอินเดีย ซึ่งทำการศึกษาโดย Smith (personal communication) โดยนำมาทำ phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม PAUP ด้วยวิธี heuristic search และทำ bootstrapping เพื่อคำนวณค่า bootstrap value โดยใช้ number of reaplication ในการทำ bootstrap เท่ากับ 100 ครั้ง cladogram ที่ได้สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างของผึ้งโพรงในประเทศไทยออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ 1) กลุ่มทางตอนเหนือ ซึ่งเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บมาจากจังหวัดอุตรดิตถ์ สกลนคร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ และจันทบุรี และ 2) กลุ่มทางตอนใต้ ซึ่งเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และภูเก็ต ส่วนผึ้งโพรงจากประเทศมาเลย์เซีย และเกาะบอร์เนียวในประเทศอินโดนิเซีย จะรวม

อยู่ในกลุ่มทางตอนใต้ของประเทศไทย แต่ผึ้งโพรงจากเกาะมินดาเนาในประเทศฟิลิปปินส์จะแยกกลุ่มออกต่างหากจากผึ้งโพรงในประเทศไทย

จะเห็นว่าลำดับเบสของ noncoding intergenic region ที่อยู่ระหว่างยีน COI และ COII ใน mtDNA สามารถใช้แบ่งกลุ่มผึ้งโพรงในประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ และสามารถแยกผึ้งโพรงจากเกาะมินดาเนาในประเทศฟิลิปปินส์ออกต่างหากจากผึ้งโพรงกลุ่มทางภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งรวมผึ้งโพรงจากประเทศมาเลย์เซียและอินโดนิเซียเข้าไว้ในกลุ่มนี้ด้วย ดังนั้นความแปรผันของลำดับเบสของ noncoding intergenic region ที่มีความยาวทั้งหมด 97 เบสนี้ สามารถนำมาใช้แบ่งกลุ่มผึ้งโพรงที่มีที่อยู่อาศัยที่ค่อนข้างจะห่างไกลกันได้ เช่น ผึ้งโพรงจากภาคเหนือออกจากผึ้งโพรงจากภาคใต้ และผึ้งโพรงจากเกาะมินดาเนาในประเทศฟิลิปปินส์ ออกจากผึ้งโพรงจากภาคใต้ของไทย ดังนั้นลำดับเบสของ noncoding intergenic region จึงเหมาะสมที่จะใช้ศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของผึ้งโพรงที่มีแหล่งที่อยู่ค่อนข้างห่างไกลกัน สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์เพื่อแบ่งกลุ่มผึ้งโพรงในประเทศไทยให้เป็นกลุ่มย่อยๆลงไปอีกนั้น ควรจะใช้ mtDNA ส่วนที่มีความยาวมากกว่านี้ และมีความแปรผันของดีเอ็นเอสูง เพื่อให้ได้ informative sites ที่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการแบ่งกลุ่มผึ้งโพรงในประเทศไทยให้ย่อยลงไปได้อีก

สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ที่สกัดได้จากตัวอย่างผึ้งโพรงหนึ่งตัวมาเพิ่มจำนวนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอตรงบริเวณ noncoding intergenic region ที่อยู่ระหว่างยีนของ cytochrome oxidase I (COI) และ cytochrome oxidase II (COII) โดยการทำ PCR และนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มาหาลำดับเบส เมื่อนำลำดับเบสที่หาได้จาก 17 ตัวอย่างมาทำ multiple sequence alignment โดยโปรแกรม CLUSTAL พบว่ามีตำแหน่งของเบสที่มีความแปรผันอยู่ 9 ตำแหน่ง และเมื่อทำ phylogenetic analysis โดยวิธี parsimony ด้วยโปรแกรม PAUP จะได้ cladogram ที่สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างของผึ้งโพรงในประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มทางตอนเหนือ ซึ่งเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดเชียงใหม่จนถึงจังหวัดจันทบุรี และกลุ่มทางตอนใต้ ซึ่งเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์จนถึงจังหวัดภูเก็ต