การตรวจสอบความหลากหลายทางสายพันธุ์ของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทย โดยการหาลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน

นางสาวลินดา บุหงาเรือง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-764-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17259162

ANALYSIS OF GENETIC VARIATION OF *Apis cerana* IN THAILAND BY USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFIED MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCES

Miss Linda Bugharuang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-636-764-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบความหลากหลายทางสายพันธุ์ของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทย โดยการหาลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ที่เพิ่มจำนวนโดยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน
โดย	นางสาวลินดา บุหงาเรือง
หลักสูตร	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชรา วีระกะลัส
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต
	รองศาสตราจารย์ จริยา เล็กประยูร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชรา วีระกะลัส)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ จริยา เล็กประยูร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ วีณา เมฆวิชัย)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ลินดา บุหงาเรือง : การตรวจสอบความหลากหลายทางสายพันธุ์ของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทย โดยการหาลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ที่เพิ่มจำนวนโดยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน (ANALYSIS OF GENETIC VARIATION OF *Apis cerana* IN THAILAND BY USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFIED MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCES) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. พัชรา วีระกะลัส, อ. ที่ปรึกษาร่วม รศ. ดร. ศิริพร สิทธิประณีต, รศ. จริยา เล็กประยูร, 94 หน้า. ISBN 974-636-764-1

ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) เป็นผึ้งพื้นเมืองชนิดหนึ่งของประเทศไทยและประเทศในทวีปเอเชีย งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคการหาลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) ที่เพิ่มจำนวนจากการทำ polymerase chain reaction (PCR) มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของผึ้งโพรงที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆในประเทศไทยจำนวน 17 แหล่ง จาก 10 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ อุตรดิตถ์ สกลนคร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และภูเก็ต โดยนำดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ที่สกัดได้จากตัวอย่างผึ้งโพรงหนึ่งตัว มาเพิ่มจำนวนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอตรงบริเวณ noncoding intergenic region ที่อยู่ระหว่างยีนของ cytochrome oxidase I (COI) และ cytochrome oxidase II (COII) โดยการทำ PCR เมื่อนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มาหาลำดับเบส พบว่าบริเวณ noncoding intergenic region มีขนาดประมาณ 97 คู่เบส เมื่อนำลำดับเบสที่หาได้จาก 17 ตัวอย่างมาทำ multiple sequence alignment โดยโปรแกรม CLUSTAL พบว่ามีตำแหน่งของเบสที่มีความแปรผันอยู่ 9 ตำแหน่ง โดยส่วนใหญ่จะเป็นแบบ transition และเมื่อทำ phylogenetic analysis โดยวิธี parsimony ด้วยโปรแกรม PAUP จะได้ cladogram ที่สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างของผึ้งโพรงในประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มทางตอนเหนือ ซึ่งเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดเชียงใหม่จนถึงจังหวัดจันทบุรี และกลุ่มทางตอนใต้ ซึ่งเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์จนถึงจังหวัดภูเก็ต

ภาควิชา – ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C626721 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: *Apis cerana* / GENETIC VARIATION / MITOCHONDRIAL DNA / PCR / SEQUENCING

LINDA BUGHARUANG : ANALYSIS OF GENETIC VARIATION OF *Apis cerana* IN THAILAND BY USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFIED MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCES. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. PATCHARA VERAKALASA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., ASSO. PROF. CHARIYA LEKPRAYOON, 94 pp. ISBN 974-636-764-1

Apis cerana is a native honey bee of Thailand and many countries in Asia. The geographical variation among intraspecific species of *Apis cerana* collected from 17 locations in 10 provinces in Thailand, which included Chiangmai, Uttaradit, Sakonnakhon, Ubolratchathani, Burirum, Chanthaburi, Prachuapkhirikhan, Chumphon, Suratthani and Phuket, were studied based on the nucleotide sequence differences in the noncoding intergenic region of mitochondrial DNA which was flanked by the cytochrome oxidase I (COI) gene on the 5′ end and the cytochrome oxidase II gene (COII) on the 3′ end. The noncoding intergenic region was amplified using the polymerase chain reaction and sequenced. Among the 97 nucleotides, there were 9 variable sites and the nucleotide substitutions showed transitions bias. Phylogenetic analysis of the sequences resulted in a parsimony tree that could geographicaily divide *Apis cerana* in Thailand into two populations : the northern population (honey bees collected from Chiangmai to Chanthaburi) and the southern population (honey bees collected from Prachuapkhirikhan to Phuket).

ภาควิชา — ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชรา วีระกะรัส อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความรู้รวมทั้งคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ ณ สถาบันนี้

ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ที่กรุณาให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างมากในงานวิจัยนี้

ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จริยา เล็กประยูร ที่ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดจนดูแลเรื่องเงินทุนในงานวิจัยครั้งนี้

ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ วีณา เมฆวิชัย ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำงานวิจัยและสอนการวิเคราะห์ข้อมูล รวมทั้งกรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอบคุณฝ่ายวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและหน่วยปฏิบัติการวิจัยชีววิทยาของผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยนี้

ท้ายสุดนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ น้องและญาติที่ให้ความรักและความเข้าใจที่มีค่ายิ่งตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญรูป.....ฎ
คำย่อ.....ฐ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์
2.1 เครื่องมือ.....17
2.2 วัสดุภัณฑ์.....19
2.3 เคมีภัณฑ์.....19
2.4 เอนไซม์.....21
2.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....21
2.6 primer.....21
2.7 สารกัมมันตรังสี.....21
2.8 ชุดสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR.....21
2.9 ชุดสำหรับทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์.....22
2.10 ชุดสำหรับหาลำดับเบส.....22

3. วิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่างผึ้ง.....23

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งหนึ่งตัว

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งงานระยะตัวเต็มวัย.....23

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งงานระยะดักแด้.....24

3.3 การวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

3.3.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ.....25

3.3.2 agarose gel electrophoresis.....25

3.4 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

3.4.1 การทำ PCR เบื้องต้น.....28

3.4.2 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR

3.4.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ nucleotide ทั้ง 4 ชนิด...28

3.4.2.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primer.....29

3.4.2.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ magnesium ion.....29

3.4.3 การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสำหรับนำไปหาลำดับเบส.....29

3.4.4 การทำ PCR ในผึ้งชนิดต่างๆ.....30

3.4.5 การทดสอบ primer ที่ใช้หาลำดับเบส.....30

3.5 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย PCR.....30

3.6 การเตรียมดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย PCR สำหรับการหาลำดับเบส

3.6.1 การทำดีเอ็นเอให้เข้มข้นขึ้น.....31

3.6.2 การแยกดีเอ็นเอที่ต้องการหลังจากทำให้เข้มข้นขึ้น.....31

3.6.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

3.6.3.1 การใช้คอลัมน์.....32

3.6.3.2 การใช้ Geneclean.....32

3.7 การหาลำดับเบส

3.7.1 ปฏิกิริยาการหาลำดับเบส

3.7.1.1 การติดฉลากที่ primer 33

3.7.1.2 ปฏิกิริยา extension termination.....33

3.7.2 การเตรียมเจลสำหรับหาลำดับเบส.....34

3.7.3 การอ่านผลจากแผ่นฟิล์ม.....35

3.7.4 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส.....36

4 ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดจากผึ้งโพรงหนึ่งตัว.....37

4.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม.....37

4.3 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปหาลำดับเบส.....40

4.4 การหาลำดับเบส.....40

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส.....41

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....59

เอกสารอ้างอิง.....68

ภาคผนวก.....72

ประวัติผู้เขียน.....94

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบพื้นฐานของน้ำผึ้ง.....3
ตารางที่ 2 แสดงมูลค่าการนำเข้าและส่งออกน้ำผึ้งระหว่างปี 2523-2526.....5
ตารางที่ 3 แสดง primer ที่ใช้สำหรับทำ PCR.....27
ตารางที่ 4 รายชื่อสถานที่ต่างๆในประเทศไทยที่ทำการเก็บตัวอย่างผึ้งโพรง.....58
ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสที่มีความแปรผันของ noncoding intergenic region
ใน mtDNA ของผึ้งโพรงที่เก็บจากสถานที่ต่างๆในประเทศไทย.....56

สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงรูปแบบรังเลี้ยงผึ้งที่พบทั่วไปในประเทศไทย....4
รูปที่ 2 แสดงลักษณะรังเลี้ยงผึ้งโพรงที่ดัดแปลงมาจากรังเลี้ยงผึ้งพันธุ์....7
รูปที่ 3 แสดงบริเวณที่พบผึ้งโพรงแต่ละชนิด....9
รูปที่ 4 แสดงไมโตคอนเดรียจีโนมของผึ้งพันธุ์....14
รูปที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mtDNA ของผึ้งพันธุ์....15
รูปที่ 6 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผึ้งโพรง....42
รูปที่ 7 ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน mtDNA ของผึ้งโพรงซึ่งมีส่วน noncoding intergenic region ระหว่างยีน COI และ COII อยู่ด้วย....43
รูปที่ 8 ผลการหาความเข้มข้นของ nucleotide ที่เหมาะสมในการทำ PCR....44
รูปที่ 9 ผลการหาความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการทำ PCR....45
รูปที่ 10 ผลการหาความเข้มข้นของ Mg ion ที่เหมาะสมในการทำ PCR....46
รูปที่ 11 ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย....47
รูปที่ 12 ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของผึ้งชนิด (species) ต่าง ๆ....48
รูปที่ 13 ผลการทำ PCR โดยใช้ internal sequencing primer (primer 3) กับ amplification primer 2 เทียบกับการใช้ amplification primer 1 กับ 2 49
รูปที่ 14 การหาปริมาณดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วก่อนนำไปหาลำดับเบส โดยเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐาน....50
รูปที่ 15 แสดงผลการหาลำดับเบสของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงจากจัวหวัดภูเก็ต....51
รูปที่ 16 แสดงผลการหาลำดับเสของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงจากภาคใต้เปรียบเทียบกับผึ้งโพรงจากภาคเหนือ....52
รูปที่ 17 แผนที่แสดงตำแหน่งของจังหวัดที่เก็บตัวอย่างผึ้งโพรงในประเทศไทย....54

รูปที่ 18 แสดง multiple sequence alignment ของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทยโดยโปรแกรม CLUSTAL.....55
รูปที่ 19 ลำดับเบสของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงจากประเทศไทยเปรียบเทียบกับผึ้งโพรงจากสถานที่อื่นๆ.....57
รูปที่ 20 caldogram ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงจากแหล่งต่าง ๆ ที่วิเคราะห์โดยโปรแกรม PAUP.....58

คำย่อ

A	absorbance
APS	ammonium persulfate
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
COI	cytochrome oxidase I
COII	cytochrome oxidase II
dATP	2′ -deoxyadenosine 5′ -triphosphate
dCTP	2′ -deoxycytidine 5′ -triphosphate
dGTP	2′ -deoxyguanosine 5′ -triphosphate
dNTP	2′ -deoxynucleoside 5′-triphosphate
dTTP	2′ -deoxythymidine 5′-triphosphate
ddATP	2′ , 3′ -dideoxyadenosine 5′ -triphosphate
ddCTP	2′ , 3′-dideoxycytidine 5′ -triphosphate
ddGTP	2′ , 3′ –dideoxyguanosine 5′ -triphosphate
ddNTP	2′ , 3′ -dideoxynucleoside 5′ -triphosphate
ddTTP	2′ , 3′ -dideoxythymidine 5′ -triphosphate
DTT	dithiothreitol
HCl	hydrochloric acid
HPLC	high performance liquid chromatography
kb	kilobase
$MgCl_2$	magnesium chloride
mtDNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid
NaCl	sodium chloride
Na_2EDTA	disodium ethylene diamine tetraacetic acid
NaOH	sodium hydroxide

PCR	polymerase chain reaction
RNase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
Taq	*Thermus aquaticus*
TEMED	N,N,N′,N′-tetramethylethylenediamine
Tris	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
U	unit
UV	ultraviolet
µl	microlitre
µM	micromolar