



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย

โครงการ: การศึกษาปัจจัยการอยู่รอดของผึ้งมัม ชันโรง และพืชอาศัยที่สัมพันธ์กับ
ความหลากหลายทางชีวภาพของถิ่นที่อยู่อาศัยในเขตร้อน

Maintaining Tropical Biodiversity: The Role of the Dwarf Honeybees,
Stinglessbees and Beeplants

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรรัตน์ เตียววานิชย์

รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร

รองศาสตราจารย์ ดร. นิรันดร์ จันทวงศ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี สวาสดีธรรม

Dr. Ratna Thapa

กันยายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาปัจจัยการอยู่รอดของผึ้งมีม ชันโรง และพืชอาศัยที่สัมพันธ์กับ
ความหลากหลายทางชีวภาพของดินที่อยู่อาศัยในเขตร้อน
Maintaining Tropical Biodiversity: The Role of the Dwarf Honeybees,
Stinglessbees and Beeplants

คณะผู้วิจัย

ศ. ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร. สุธีรัตน์ เตียววาทินิชย์	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ. ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. ดร. วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
ผศ. ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รศ. ดร. นิรันดร์ จันทวงศ์	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผศ. ดร. อัญชลี สวัสดิ์ธรรม	คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล
Dr. Ratna Thapa	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สรุปงานวิจัย

1. สำนวณพืชอาหารและพืชอาศัยของผึ้งและชันโรงชนิดต่าง ๆ

จากการสำรวจชนิดและจำนวนรังของผึ้งชันโรงและชนิดของพืชอาหารสำหรับผึ้งชันโรงบริเวณป่าผดัดใบ ในเขตพื้นที่สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ ระหว่างเดือนเมษายน 2546 ถึง เดือนมีนาคม 2547 พบผึ้งชันโรงจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Trigona apicalis* Smith, *T. collina* Smith, *T. fimbriata* Smith, *T. pagdeni* Schwarz, *T. terminata* Smith และ *T. ventralis* Smith โดยมีพืชที่ออกดอกทั้งสิ้นจำนวน 78 ชนิด และจากการศึกษาจากก้อนเรณูของผึ้งชันโรง *T. collina* Smith และ *T. ventralis* Smith โดยใช้วิธี acetolysis พบพืชที่เป็นอาหารจำนวน 19 และ 15 ชนิด ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์หลังคัมพัสบริเวณพื้นที่ศึกษาพบว่าพืชอาหารแต่ละชนิดของผึ้งชันโรงไม่ได้ขึ้นอยู่กับความหนาแน่น และความเด่นของพรรณไม้ชนิดนั้นในสังคมพืช ที่ผึ้งชันโรงอาศัยอยู่ แสดงถึงพฤติกรรมเลือกชอบในการหาอาหารของผึ้ง

จากการศึกษาการออกหาอาหารโดยนับจำนวนผึ้งมีม *Apis florea* และชันโรง 2 ชนิด คือ *Trigona laeviceps* และ *T. collina* ที่เข้าตอมดอกบัว พบว่า *T. laeviceps* จะเข้าตอมดอกบัวเข้าที่สูงสุด คือ เวลา 07.30 น. และพบมากที่สุดในเวลา 08.30-09.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่เริ่มพบ *T. collina* และ *A. florea* แต่จำนวนการเข้าตอมดอกบัวของ *T. laeviceps* ไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างช่วงเวลาของวัน ในขณะที่ *T. collina* และ *A. florea* จะพบมากเฉพาะในช่วงเวลา 09.30-11.00 น. หลังจากนั้นจะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบ *T. laeviceps* เข้าตอมดอกบัวตลอดทั้งปี และพบมากที่สุดในเดือนมิถุนายน ส่วน *T. collina* ไม่พบเข้าตอมในเดือนพฤษภาคม แต่จะพบมากในเดือนกรกฎาคม และ *A. florea* ไม่พบเข้าตอมในเดือนกรกฎาคม และสิงหาคม แต่จะพบมากที่สุดในเดือนพฤษภาคม แสดงว่าชันโรง โดยเฉพาะ *T. laeviceps* มีความสม่ำเสมอในการออกหาอาหารตลอดทั้งวัน คือพบจำนวนชันโรงเข้าตอมไม่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา ของวัน ซึ่งเป็นรายงานใหม่เพิ่มเติมจากรายงานวิจัยในปี พ.ศ. 2532 ส่วนผึ้งนั้นจะพบมากเฉพาะในช่วงเช้าและเย็นของวันเท่านั้น (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532) นอกจากนี้ พบ *T. laeviceps* และ *T. collina* เข้าตอมดอกบัวเร็วกว่าผึ้งมีม แสดงว่าชันโรงมีพฤติกรรมการออกหาอาหารเร็วกว่าผึ้ง คุณสมบัติเหล่านี้เหมาะแก่การใช้เป็นแมลงผสมเกสรอย่างยิ่ง เนื่องจากการเข้าเก็บอาหารตลอดทั้งวันจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการทำหน้าที่ผสมเกสรแก่พืชที่เราต้องการให้สูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามคุณลักษณะอื่นของชันโรงก็มีส่วนช่วยสนับสนุนประสิทธิภาพในการผสมเกสร เช่น ชันโรง *T. laeviceps* และ *T. collina* เป็นชันโรงที่พบได้ง่าย คือ มักจะทำรังตามบ้านเรือนหรือ

สิ่งก่อสร้างต่าง ๆ (Sakagami et al., 1983) ทำให้ง่ายต่อการย้ายมาเลี้ยงในกล่องหรือหีบเลี้ยง และสะดวกต่อการเคลื่อนย้ายเพื่อนำไปช่วยผสมเกสร

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

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 (Oldroyd and Wongsiri, 2006) ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวงจรชีวิตของการเจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ (ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ ไข่ถึงตัวเต็มวัย) ของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้ในผึ้งมิม และการสร้างผึ้งนางพญา เพื่อจะนำไปสู่ความรู้เบื้องต้นในการผสมเทียมผึ้งมิมเพื่อขยายพันธุ์ของผึ้งมิม

จากการศึกษาพบว่า 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 (ระยะดักแด้) และ 22.25 วัน (ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย) จากผลการทดลองพบว่า การสร้างนางพญาผึ้งมิมขึ้นมาใหม่เพื่อทดแทนนางพญาตัวเดิม มีค่าเฉลี่ย 7.8 ตัวต่อรัง สำหรับผึ้ง *A. andreniformis* มีระยะการเจริญเติบโตหรือวงจรชีวิตใกล้เคียงกับผึ้ง *A. florea*

ผึ้งงานของผึ้งมิมปกติจะไม่สามารถผสมพันธุ์ แต่รังไข่ยังมีอย่างปกติ เมื่อขาดนางพญารังไข่ของผึ้งงานจะเริ่มเจริญเช่นเดียวกับนางพญาพร้อมที่จะวางไข่ แต่ไข่ของผึ้งงานนั้นจะถูกกำจัดกันเอง (worker policing) โดยผึ้งงานตัวอื่น ๆ ในรัง จากงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเป็นเวลา 2 ปี พบว่าผึ้งมิม 40 รังที่ขาดนางพญา จะมีเพียง 2 รังเท่านั้นที่ไข่ของผึ้งงานออกมาเป็นตัวเต็มวัย แต่เป็นตัวผู้ทั้งหมด ส่วนอีก 38 รัง จะไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากถูกกำจัดและหนีรังไปทั้งหมด การพิสูจน์ในห้องปฏิบัติการโดยการผ่าตัด พบว่าผึ้งมิม 6% จะมีรังไข่เริ่มเจริญ หลังจากผึ้งนางพญาหายไป 4 วัน และ 33% ของผึ้งงานทั้งหมด จะเริ่มมีรังไข่เจริญภายใน 3 สัปดาห์ ผึ้งงาน

จะเริ่มวางไข่ภายใน 4 วัน ได้มีการศึกษาทางพันธุศาสตร์เพิ่มเติมโดย microsatellites พบว่าผึ้งงานที่เป็นพี่น้องกันโดยตรงจากพ่อเดียวกันจะกำจัดไข่พวกเดียวกันน้อยกว่าไข่ที่มาจากพี่น้องที่ต่างพ่อกัน การหนึ่งจึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากรังที่มีพฤติกรรมกาฝากเกิดขึ้นด้วย (Nanork, Wongsiri and Oldroyd, 2006)

ผึ้งมัม *A. florea* และผึ้งมัมเล็ก *A. andreniformis* สร้างรังเดี่ยวในที่โล่งบนกิ่งไม้ ซึ่งมีโอกาสรับแสงแดดในฤดูร้อนและรับฝนในฤดูฝน จากการศึกษาพฤติกรรมการควบคุมอุณหภูมิและป้องกันฝนของผึ้งทั้งสองชนิดนี้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าเมื่อรังผึ้งถูกแสงแดดโดยตรง ผึ้งมัมจะกระพือปีกจนสูญเสียการเรียงตัวแบบม่าน (curtain) และบินสั้น ๆ เพื่อลดอุณหภูมิให้กับหลอดรวงตัวอ่อน ส่วนผึ้งมัมเล็กก็กระพือปีก แต่ยังคงรักษาการเรียงตัวแบบม่านในบริเวณด้านล่างของรัง ในช่วงฤดูฝน ผึ้งมัมทุกตัวที่เรียงตัวแบบม่านจะขึ้นไปบนลานเต็นรำและกางปีกซ้อน ๆ กันเป็นร่มคล้ายหลังคาป้องกันรังจากฝน ส่วนผึ้งมัมเล็กที่เรียงตัวแบบม่านจะหันหัวขึ้นและยึดกันแน่นที่บริเวณหลอดรวงตัวอ่อน และกางปีกเป็นรูปตัววีหัวกลับ ซึ่งปีกจะวางทับอยู่บนปีกของผึ้งอีกตัวหนึ่ง ผึ้งทั้งสองชนิดนี้มีขนาดหลอดรวงน้ำผึ้งใหญ่เป็นสองเท่าของหลอดรวงตัวอ่อนราวกับเป็นหลังคาของรังผึ้ง (Oldroyd and Wongsiri, 2006)

3. ศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างผึ้งใน species ต่าง ๆ ในระดับแอกติวิตีของเอนไซม์ RNA และ DNA

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

ทำการศึกษาในผึ้งมัม จากการใช้ RT-PCR พบการแสดงออกสูงสุดของยีนแอลฟาไกลโคซิเดสในผึ้งระยะผึ้งหาออกอาหาร พบการแสดงออกบ้างในผึ้งระยะพยาบาล แต่ไม่พบการแสดงออกเลยในไข่ จากการใช้เทคนิคเดียวกันได้ลำดับ cDNA ของยีนดังกล่าวที่มีความยาว 1,739 bp ทำการ Align ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน (ความยาว 568 กรดอะมิโน) โดยใช้โปรแกรม Clustal W ผลที่ได้แสดงความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่มีต่อยีนดังกล่าวในผึ้งพันธุ์ถึง 95% สร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม UPGMA และ NJ ทำการสกัดบริสุทธิ์เอนไซม์ AG โดยใช้ DEAE-cellulose (0.17 u/ mg) และ Superdex 200 (0.5 และ 2.38 u/ mg) รวมทั้งใช้ Sephadex G-150 (1.355 u/ mg) ทำการหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค MALDI - TOF MS (Chanchao, Padoongsupalai and Sangvanich, 2007)

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

จากการศึกษาในผึ้งโพรง ได้ลำดับเบสของยีนแอลฟาไกลโคซิเดสขนาด 1,740 bp โดยใช้เทคนิค RT-PCR ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับยีนนี้ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ พบว่ามีความเหมือนสูงสุดถึง 96% กับยีนนี้ในผึ้งพันธุ์ จากการใช้โปรแกรม UPGMA และ NJ ของลำดับกรดอะมิโนพบสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันระหว่างผึ้งโพรงกับผึ้งพันธุ์ ทำการสกัดบริสุทธิ์เอนไซม์ AG โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบ DEAE-cellulose (2.171 u/ mg) และ Superdex 200 (1.804 u/ mg) หลังจากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว พบว่าอยู่ที่ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50°C และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มคือ 50 นาที ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (ซูโครส) ที่เหมาะสมคือ 60 mM ได้มวลโมเลกุลของ AG คือประมาณ 68 กิโลดาลตัน ได้ลำดับของกรดอะมิโนของ AG โดยใช้เทคนิค MALDI – TOF MS (Chanchao, Pilalam and Sangvanich, 2008)

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

4.1 การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริก และทางพันธุกรรมของผึ้งมีม *A. florea* Fabricius, 1787 ในประเทศไทย

ผึ้งมีม *Apis florea* Fabricius, 1787 เป็นผึ้งพื้นเมืองชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งมีการศึกษาทางด้านมอร์โฟเมตริกน้อยมาก การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความแตกต่างภายในชนิดของผึ้งมีม จึงสุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งงานจากรังผึ้งมีมที่อยู่ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยจำนวน 50 รัง ๆ ละ 15 ตัว จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์เพื่อรอการผ่าตัด โดยเลือกผ่าตัดส่วนต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษาลักษณะ 9 ชนิดได้แก่ โพรบอสซิส (proboscis) หนวด (antenna) ปีกหน้า (forewing) ปีกหลัง (hindwing) ขาหลัง (hind leg) สเตอไรต์ที่ 3 และ 6 (3rd and 6th sternites) และเทอร์ไรต์ที่ 3 และ 4 (3rd and 4th tergites) จากนั้นติดตัวอย่างบนสไลด์ เพื่อวัดขนาดความกว้าง ความยาวและมุมของลักษณะที่ศึกษา 22 ลักษณะ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและบันทึกลงในคอมพิวเตอร์

ผลการวิเคราะห์ปัจจัย (Factor Analysis) พบว่ามี 14 ลักษณะที่ถูกคัดเลือกเป็นปัจจัยใหม่ได้ 4 กลุ่ม คือ ปัจจัยที่ 1 ประกอบด้วยลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับความยาวของลำตัว ขาหลังและหนวด ปัจจัยที่ 2 มีความสัมพันธ์กับความยาวเส้นปีกหน้าและปีกหน้า ปัจจัยที่ 3 มีความสัมพันธ์กับจำนวนฮามูไลและขนาดมุมที่ 37 และปัจจัยที่ 4 มีความสัมพันธ์กับขนาดมุมที่ 34 ผลการ

วิเคราะห์ปัจจัยและการจำแนกกลุ่ม (Factor and Cluster Analysis) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 22 ลักษณะ พบว่าไม่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างผึ้งมัมได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยสถิติ Student-Newman-Keuls กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา 4 ลักษณะ ได้แก่ forewing radial cell length, metatarsus length, 3rd sternite length และ antenna length แสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกตัวอย่างผึ้งมัมที่อาศัยอยู่ในหมู่เกาะพะงันและสมุยออกจากแผ่นดินใหญ่ได้ ซึ่งอาจจะอธิบายได้จากเหตุผลที่ผึ้งมัมมีพฤติกรรมการอพยพตามฤดูกาล การแยกรังและการหนีรังค่อนข้างสูง ทำให้ผึ้งมัมมีการแพร่กระจายในธรรมชาติอย่างรวดเร็วและครอบคลุมทั่วทั้งประเทศมากกว่าการจำกัดอยู่ภายในท้องถิ่น (Chaiyawong et al., 2004)

ได้มีการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของผึ้งมัม (*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 เอ็นไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในบริเวณยีน 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 ด้วยเอ็นไซม์ *Ase* I สามารถจำแนกความแตกต่างออกเป็น 2 รูปแบบ ซึ่งรูปแบบที่แตกต่างจากประชากรทั้งหมดนั้นพบเพียง 1 รังเท่านั้น คือ ผึ้งมัมที่มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สำหรับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอในบริเวณยีน L-rRNA และ ยีน Cytb I-tRNA^{Ser} นั้น เมื่อวิเคราะห์ด้วยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะในบริเวณที่ต้องการแล้ว ไม่สามารถตรวจสอบความแปรผันของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอภายในสปีชีส์ของผึ้งมัมในประเทศไทยได้ เนื่องจากบริเวณระหว่าง CO I และ CO II ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของผึ้งมัม มีขนาดเล็กกว่าบริเวณเดียวกันในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ของผึ้งพันธุ์ *A. mellifera* และ ผึ้งโพรง *A. cerana* ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่พบความแตกต่างในผึ้งมัมได้น้อยกว่าในทั้งสองสปีชีส์ดังกล่าว

นอกจากนี้ พฤติกรรมการอพยพตามฤดูกาล การแยกรัง การหนีรัง รวมทั้งความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีของผึ้งมัม ทำให้ผึ้งชนิดนี้สามารถดำรงและแพร่กระจายในธรรมชาติได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอในกลุ่มประชากรของผึ้งมัมในประเทศไทยไม่มีความแตกต่างกันมากนัก

4.2 การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริก และทางพันธุกรรมของผึ้งมัมเล็ก *A. andreniformis* Smith, 1858 ในประเทศไทย

เก็บผึ้งมัมเล็กจำนวน 30 รังเพื่อใช้ศึกษาความแปรผันทางมอร์โฟเมตริกและเก็บจำนวน 37 รังเพื่อใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม ในส่วนของความแปรผันทางมอร์โฟเมตริก ทำการวัดและวิเคราะห์ลักษณะทางมอร์โฟเมตริกทั้งหมด 24 ลักษณะในผึ้งงาน จากการใช้ค่าเฉลี่ยของรังในการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 1 พบว่ามี 20 ลักษณะจากทั้งหมด 24 ลักษณะที่ถูกคัดเลือกไว้เป็นปัจจัยใหม่ และเมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2 สามารถจัดกลุ่มทั้ง 20 ลักษณะที่เลือกมาข้างต้นได้เป็น 4 กลุ่มปัจจัยใหม่ จากการนำคะแนนปัจจัยที่ได้มาสร้างกราฟ ผลที่ได้แสดงว่าผึ้งมัมเล็กจากประเทศไทย และจากเมืองทีนอม ประเทศมาเลเซียอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้จากการใช้เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แบบคลัสเตอร์ สามารถจัดกลุ่มผึ้งมัมเล็กดังกล่าวนี้เป็น 1 กลุ่มเช่นเดียวกัน แต่ผลจากการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นของค่าปัจจัยใหม่ทั้ง 4 ปัจจัย กับค่าละติจูด และลองจิจูด แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางมอร์โฟเมตริกของผึ้งมัมเล็กในประเทศไทย กล่าวคือขนาดของผึ้งมัมเล็กจากภาคใต้ไปยังภาคเหนือจะมีขนาดเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของผึ้งมัมเล็กจากภาคตะวันตกไปภาคตะวันออกจะมีขนาดเล็กลง

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดย 2 วิธี วิธีแรกโดยการดูรูปแบบของชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บางส่วนที่ยีน *Cytb* ที่ได้ (520 คู่เบส) ไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* และ *AluI* พบว่าไม่พบความแปรผันทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างผึ้งมัมเล็กจากบริเวณต่าง ๆ ในประเทศไทย แต่เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบหลังตัดของผึ้งมัมเล็กจากประเทศไทยและจากเมืองทีนอม ประเทศมาเลเซียก็ไม่พบความแตกต่างหลังจากตัดผลิตภัณฑ์ด้วย *AluI* แต่พบรูปแบบที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ หลังทำการตัดผลิตภัณฑ์ด้วย *DraI* วิธีที่ 2 ทำการหาลำดับเบสบางส่วนที่ยีน *Cytb* จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ พบว่าผึ้งมัมเล็กจากบริเวณแผ่นดินใหญ่ของประเทศไทยมีดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิซึมต่ำกว่าตัวอย่างผึ้งจากบริเวณเกาะภูเก็ตและเชียงใหม่ของประเทศไทย สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรมเอ็นเจและยูฟีจีเอ็มเอ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มผึ้งมัม

เล็กในประเทศไทย ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A ซึ่งพบได้ในตัวอย่างผึ้งมีเล็กจากแผ่นดินใหญ่ของประเทศไทย ส่วนกลุ่ม B พบในตัวอย่างผึ้งจากจังหวัดภูเก็ต และจังหวัดเชียงใหม่ (Rattanawanee, Chanchao and Wongsiri, 2007)

4.3 การวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกของชันโรง *Trigona collina* Smith, 1987 ในประเทศไทย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวน 19 ลักษณะของชันโรง *Trigona collina* Smith, 1857 ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริก โดยเก็บตัวอย่างชันโรงจาก 95 รัง จำนวน 1,900 ตัว ที่พบในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย จากการศึกษาพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชันโรง *T. collina* จำนวน 19 ลักษณะ นำมาคัดเลือกเพียง 17 ลักษณะ และจัดเป็นกลุ่มปัจจัยใหม่ได้ 3 กลุ่ม พบว่า ความยาวของขาหลัง ออก ปีกหน้า และปีกหลังมีแนวโน้มที่จะแสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างชันโรงที่พบทางภาคใต้มีความแตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างชันโรงที่พบในบริเวณอื่น ๆ แต่ไม่สามารถแยกออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน

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

5.1 การสำรวจสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยบนพื้นฐานความผันแปรทางพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* นำเข้าสู่ประเทศไทยเมื่อประมาณ 60 ปีก่อน ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์ของประชากรผึ้งพันธุ์ที่กระจายตัวในประเทศไทยยังไม่แน่ชัดนัก กระทั่งในปี 2547-2549 จึงเริ่มเก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์จากฟาร์มเลี้ยงผึ้งทั่วประเทศ จำนวน 476 รัง แบ่งเป็นกลุ่มประชากรผึ้งพันธุ์ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล PCR-RFLP และการหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ที่กระจายตัวอยู่ในปัจจุบัน จากการตรวจสอบผึ้งพบความแตกต่างของรูปแบบทางพันธุกรรม 8 แบบ โดยมี 3 รูปแบบทางพันธุกรรมที่พบจำนวนมากและ 5 รูปแบบพันธุกรรมที่พบจำนวนน้อย ซึ่งรูปแบบพันธุกรรมทั้งหมดสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม ThaiA1 พบประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม ThaiA2 พบประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสายวิวัฒนาการ C ของสายพันธุ์ผึ้งพันธุ์ที่พบการกระจายตัวในแถบยุโรป ซึ่งได้แก่ *A. m. ligustica* และ *A. m. carnica* ตามลำดับ ส่วนกลุ่ม ThaiB พบประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสายวิวัฒนาการ O ของสายพันธุ์ผึ้งพันธุ์ที่พบการกระจายในแถบตะวันออกกลาง และจากการตรวจสอบลำดับเบสที่บริเวณ non-coding ของผึ้งพันธุ์กลุ่ม ThaiB พบความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *A. m. syriaca* หรือ *A. m. lamarckii* จากการวิเคราะห์สถิติด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลแสดงว่าพบการ

ผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรของผึ้งพันธุ์ในฟาร์มเลี้ยงผึ้ง และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการรวมประชากรผึ้งพันธุ์ภาคเหนือ+ภาคกลาง และกลุ่มประชากรผึ้งพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ+ภาคใต้ (Suppasat et al., 2007)

5.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของชันโรงในประเทศไทย

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

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

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทย และบ่งชี้ว่าวิธีการวิเคราะห์ PCR - RFLP ในยีน 16S rRNA สามารถใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทยได้

6. ศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร propolis และ sticky band ของ *A. florea*, *A. andreniformis* และ *Trigona* spp.

6.1 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *Ascosphaera apis* ของพรอพอลิส จากรังชันโรง (Chemical compositions and anti-fungus *Ascosphaera apis* of propolis from the nest of stingless bee)

จากการศึกษาองค์ประกอบของพรอพอลิสจากรังชันโรง *Trigona laeviceps* ที่เก็บจากจังหวัดร้อยเอ็ด ประเทศไทย นำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascosphaera apis* ที่ก่อโรคซอกัลกับรูด พบว่า ที่ความเข้มข้น 190 ppm ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 250 ppm

ของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แยกสิ่งสกปรกไดคลอโรมีเทนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 7 ส่วนย่อย สารสกัดที่แยกได้ในส่วนที่ 3 และ 4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ascosphaera apis* ได้โดยใช้วิธี TLC autographic เมื่อนำพรอพอลิสมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วย 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 เป็นองค์ประกอบหลักในพรอพอลิส แต่ไม่มีข้อมูลตรงกับฐานข้อมูลของ Wiley ถึงแม้ว่า camphor ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แสดงให้เห็นว่า camphor ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascosphaera apis*

6.2 Effects of bioactive of Thai propolis against the pathogenic bacteria

พรอพอลิส เป็นสารที่ได้จากยางไม้ที่ผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* เก็บสะสมมาจากพืช มีสีแตกต่างกันตั้งแต่สีเขียวเหลืองถึงสีน้ำตาลเข้มขึ้นอยู่กับชนิดของพืชเช่นเดียวกับคุณสมบัติในการเป็นยา งานวิจัยในครั้งนี้ เพื่อหาการเกิดผลของสาร flavonoids ซึ่งเป็น bioactive compound ที่ยับยั้งเชื้อโรคจากแบคทีเรียที่ถูกแยกมาจากโรคผิวหนังของแมวและสุนัขจากโรงพยาบาลสัตว์ จังหวัดเชียงราย ด้วยวิธี swabbing technique โดยนำพรอพอลิสที่ถูกบดและละลายใน ethanol ที่ความเข้มข้น 5%, 20% และ 30% ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. aureus* และ *P. diminuta* พบว่าความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับแสดงผลยับยั้งเชื้อ *S. gallinarum* ได้มากที่สุด แต่ยับยั้งเชื้อ *S. felis* ได้น้อยที่สุด นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 20% และ 30% แสดงผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าความเข้มข้นของสาร 5% ดังนั้น พรอพอลิสของไทยมีสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดนี้ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผิวหนังในสัตว์เล็กได้ (Thapa, 2009)

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)

7. Bumble bees (Hymenoptera, apidae, bombinae) of the upperNorthern 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.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยโครงการ “การศึกษาปัจจัยในการอยู่รอดของผึ้งมัม ชันโรง และพืชอาศัยที่สัมพันธ์กับความหลากหลายทางชีวภาพของดินที่อยู่อาศัยในเขตร้อน” ขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ที่ให้ความร่วมมือ ความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและสถานที่ และการสนับสนุนในด้านต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ในการศึกษาและวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งทำให้โครงการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

รหัสโครงการ RTA 45800012

สารบัญ

	หน้า
สรุปงานวิจัย	ก
กิตติกรรมประกาศ	ฎ
สารบัญ	ฏ
สารบัญตาราง	ท
สารบัญภาพ	ณ
1. เนื้อหาผลงานวิจัย.....	1
1.1 สํารวจพืชอาหารและพืชอาศัยของผึ้งและชันโรงชนิดต่าง ๆ.....	1
1.2 ศึกษาเปรียบเทียบ natural history ของ <i>Apis florea</i> <i>A. andreniformis</i> และ <i>Trigona</i> spp.	10
1.2.1 การศึกษาวงจรชีวิตของการเจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ ของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้ของผึ้งมิม <i>A. florea</i>	10
1.2.2 The reproductive dilemmas of queenless red dwarf honeybee (<i>Apis</i> <i>florea</i>) workers.....	13
1.2.3 Ecology behavior of dwarf honeybee; <i>Apis florea</i> and <i>A. andreniformis</i> ...	13
1.3 ศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างผึ้งใน species ต่าง ๆ ในระดับแอดคิวิตีของเอนไซม์ RNA และ DNA.....	19
1.3.1 Purification of alpha-glucosidase (AG) in <i>Apis florea</i>	19
1.3.2 Purification of alpha-glucosidase (AG) in <i>Apis cerana</i>	53
1.4 การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทั้งภายในและระหว่างชนิดของ <i>A. florea</i> <i>A. andreniformis</i> และ <i>Trigona</i> spp.	95
1.4.1 การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริกและทางพันธุกรรมของผึ้งมิม <i>A. florea</i> Fabricius, 1787 ในประเทศไทย.....	95
1.4.2 การวิเคราะห์ความแปรผันทางมอร์โฟเมตริกและทางพันธุกรรมของผึ้งมิมเล็ก <i>A. andreniformis</i> Smith, 1787 ในประเทศไทย.....	99
1.4.3 การวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกของชันโรง <i>Trigona collina</i> Smith, 1987 ในประเทศไทย.....	99

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
1.5 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับอนุของ <i>Apis flore</i> , <i>A. andreniformis</i> , <i>A. mellifera</i> และ <i>Trigona</i> spp.	106
1.5.1 การสำรวจสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยบนพื้นฐานความผันแปรทางพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ.....	107
1.5.2 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทยโดยวิธี PCR – RFLP.....	125
1.6 ศึกษาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสาร propolis และ sticky band ของ <i>A. florea</i> <i>A. andreniformis</i> <i>A. mellifera</i> และ <i>Trigona</i> spp.	129
1.6.1 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา <i>Ascosphaera apis</i> ของพรอพอลิสจากรังชันโรง.....	129
1.6.2 Effects of bioactive of Thai propolis against the pathogenic bacteria.....	138
1.6.3 Reinforcing a barrier-a specific social defense of the dwarf honeybee (<i>Apis florea</i>) released by the weaver ant (<i>Oecophylla smaragdina</i>).....	144
1.7 Bumble bees (Hymenoptera, apidae, bombinae) of the upper Northern parts of Thailand.....	145
2. ผลงาน outstanding ที่ส่งไปลงตีพิมพ์และเสนอใน conference และ congress ต่าง ๆ.....	146
3. การจัดการประชุมวิชาการ.....	168
4. Output ที่ได้จากโครงการ.....	169
5. ชื่อวารสารระดับนานาชาติที่ได้ลงตีพิมพ์.....	170
ภาคผนวก	
ภาคผนวก 1.....	171
ภาคผนวก 2.....	202
ภาคผนวก 3.....	210
ภาคผนวก 4.....	218
ภาคผนวก 5.....	228

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ (Wilcoxon Rank Test) ของจำนวนผึ้ง มีม <i>A. florea</i> ชันโรง <i>T. laeviceps</i> และ <i>T. collina</i> ในแต่ละช่วงเวลา.....	6
2 แสดงจำนวนรังวันที่ผึ้งแต่ละวรรณะ (ผึ้งงาน ผึ้งตัวผู้ และผึ้งนางพญา) เจริญจากไข่ จนเป็นตัวเต็มวัยของผึ้งมีม <i>A. florea</i>	12
3 จำนวนผึ้งมีมนางพญาที่สร้างได้จากการนำเอาผึ้งนางพญาเดิมที่อยู่ในรังออก.....	12
4 Intensity of amplified product bands from Fig. 10.....	21
5 Similarity of the AG sequence in <i>A. florea</i> (1,773 bp) and that in other organisms.....	24
6 Summary of purification procedures of AG.....	44
7 Protein content in crude of HPGs and honey crop.....	72
8 Specific activity of AG after various AS saturation.....	74
9 Summary of purification procedures of AG.....	80
10 Purification procedures of unprecipitated crude.....	82
11 Peptide mass (Da) from MALDI – TOF analysis of trypsin – treated AG of <i>A.</i> <i>cerana</i> compared to tryptic fragments of AG in <i>A. mellifera</i> , +1 Da mass accuracy.....	93
12 ความสัมพันธ์ของกลุ่มปัจจัยใหม่ 3 กลุ่มปัจจัย ที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2....	102
13 สรุปขั้นตอนการเพิ่มปริมาณไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ 4 บริเวณ ที่ใช้ในการจำแนก ผึ้งพันธุ์ในประเทศไทย สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ M= West European lineage, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ C = East Mediterranean, สาย ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ A = African, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ แบบ O = Middle.....	115
14 การกระจายตามภูมิศาสตร์ของรูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างกัน 8 รูปแบบ จาก ตัวอย่างผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยจำนวน 476 รัง อักษร 7 ตัว แทนรูปแบบของ พันธุกรรมโดยใช้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	116

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ผลการวิเคราะห์ด้วย Molecular Analysis of Variance (AMOVA: Excoffier et al., 1992; Excoffier, 1995).....	119
16	แสดง primer ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ 16S rDNA ใน mtDNA ของชันโรง.....	125
17	ผลการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดไคคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	134
18	สารสกัดไคคลอโรมีเทนที่แยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ส่วนที่1-7.....	134
19	Bacterial species isolated from diseased skin of cats and dogs.....	140

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 พื้นที่ทำการศึกษ (ก) และการเข้าตอมดอกบัวเพื่อเก็บเกสรของผึ้งมัมและชันโรง (ข)....	3
2 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ <i>T. laeviceps</i> ที่เข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546.....	4
3 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ <i>T. collina</i> ที่เข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546.....	5
4 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ <i>A. florea</i> ที่เข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546.....	5
5 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของจำนวนผึ้งและชันโรงตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546 (ก) = <i>T. laeviceps</i> (ข) = <i>T. collina</i> (ค) = <i>A. florea</i>	7
6 Combs cover during rain (a) <i>Apis florea</i> without tail (b) <i>Apis andreniformis</i> with a tail.....	16
7 Rain proof curtain formation of <i>A. florea</i> (a). Abandon comb after heavy rain (b). Position of curtain formation bees.....	16
8 Top view during raindrops on the colony (a) dancing floor damaged by raindrops (b) curtain formation bees' position during rain.....	17
9 Total RNA extracted from different stages heads of <i>A. florea</i> on native agarose gel (A) and formaldehyde gel (B).....	20
10 Expression profile of AG.....	21
11 Control experiment by using primers from <i>EF</i> and <i>28S RNA</i> genes. Total RNA for all reactions were from forager bee.....	22
12 RT - PCR product amplified by 3 different pairs of primers.....	23
13 The multiple alignment of nucleotide sequences of AG in <i>A. florea</i> with other organisms. Common residues are indicated by asterisks below the sequences.....	28
14 The multiple alignment of amino acid sequences deduced from the cDNA sequences of AG in <i>A. florea</i> with other organisms. Common residues are indicated by asterisks below the sequences.....	30

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	A phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of AG in <i>A. florea</i> among other organisms by UPGMA method. A number on each branch indicate differential.....	31
16	A phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of AG in <i>A. florea</i> 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.....	32
17	Pattern of major proteins in crude of head and honey crop.	33
18	Specific activity of crude precipitation by various concentrations of ammonium sulfate.....	34
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.....	34
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.....	35
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.....	36
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.	37
23	CBB staining of SDS - PAGE.....	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
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.....
	39
25	SDS - PAGE of positive fractions from Sephadex G - 150. Lanes 1-7 contained fraction# 40 - 46 (100 µg), respectively.....
	40
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.....
	41
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.....
	42
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.....
	43
29	CBB staining (A) and activity staining (B) of fractions containing highest activity from DEAE - cellulose and Sephadex G - 150.....
	45
30	Relationship between R_f value and log MW of broad range protein MW marker. MW of AG from Fig. 21 was estimated.....
	46
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),

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
	ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and alpha - lactalbumin (14.4 kDa).....	46
32	The amino acid sequence of AG in <i>A. mellifera</i> (Q17958). Matched peptides are shown in bold and underline letter.....	47
33	Compare amino acid sequence between deduced amino acid sequence from cDNA (upper line) and amino acid from MALDI – TOF MS (lower line).....	48
34	Two - D electrophoresis of crude protein (2 mg). Lane M contained low MW marker.....	49
35	The optimum pH of partial purified AG in <i>A. florea</i> . Briton - Robinson buffer at various pHs ranging between 3.0 - 7.5 was used. The optimum pH is 5.0.....	50
36	The optimum temperature partial of purified AG of <i>A. florea</i> . 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.....	50
37	The optimum concentration of sucrose of partial purified AG in <i>A. florea</i> . 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.....	51
38	The optimum incubation time of purified AG in <i>A. florea</i> . 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.....	51
39	Total RNA extracted from HPGs of forager bees was electrophoresed on 1.2% (w/v) agarose gel (A) and formaldehyde gel (B).....	52
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).....	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
41	Control primers for RT - PCR amplification..... 55
42	The cDNA sequence of alpha – glucosidase obtained by RT – PCR..... 57
43	The amino acid sequence of alpha – glucosidase deduced from the cDNA sequence. The underline amino acid sequences were different from amino acid of AG in <i>A. mellifera</i> recorded in Genbank..... 58
44	The multiple alignment of the nucleotide sequences of AG in <i>A. cerana</i> and that in other organisms. ‘*’ Residues in that column are identical in all sequences in the alignment..... 66
45	The multiple alignments of amino acid sequences deduced from cDNA sequence of AG in <i>A. cerana</i> and that in other organisms..... 69
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 <i>A. mellifera</i> maltase 1 and <i>Lactobacillus sakei</i> were used as outgroups..... 70
47	UPGMA tree of the genetic relationship among amino acid sequences of various species. <i>Lactobacillus sakei</i> was used as an outgroup..... 71
48	SDS - PAGE of HPGs and honey crop..... 72
49	Renaturation of AG from HPGs and honey crops. Arrows indicate two major subunit bands..... 73
50	Specific activity of AG precipitated by a stepwise increase of AS concentration..... 74
51	SDS - PAGE of protein (50 µg/ lane) saturated by various concentrations of AS..... 75
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..... 76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
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.....	77
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.....	78
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.....	79
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.....	81
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.....	82
58	SDS - PAGE and CBB.....	83
59	Relationship between Log and R_f of standard MW of broad range protein marker.....	84
60	SDS - PAGE and CBB.....	85
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 alpha - lactalbumin (14.4 kDa).....	85
62	CBB (A) and activity stain (B) of SDS polyacrylamide (12.5%). An arrow indicates an activity band of AG after renaturation.....	86
63	CBB (A) and activity stain (B) of SDS polyacrylamide (10%). Arrows indicate AG bands in both condition.....	87

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
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.....	88
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.....	89
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.....	90
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.....	91
68	A 2 – D gel of AG by CBB – stained gel (12.5% T, 2.6% C, and pH 3 – 10).....	92
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.....	94
70	แสดงภาพถ่ายส่วนต่าง ๆ ของผึ้งมิมที่ใช้ศึกษาทางด้าน 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.....	96
71	แสดงภาพถ่ายส่วนต่าง ๆ ของผึ้งมิมที่ใช้ศึกษาทางด้าน morphometric I = hind basitarsus และ J = hind femur และ tibia.....	97
72	ส่วนต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชันโรงงาน <i>T. collina</i>	101
73	เดนไดรแกรมแสดงการรวมกลุ่มตัวอย่างชันโรงโดยแบ่งตามภูมิภาค.....	102

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
74	บริเวณที่ตั้งของฟาร์มผึ้งพันธุ์ <i>A. mellifera</i> ที่เก็บตัวอย่างในการศึกษารังนี้ อักษรภาษาอังกฤษแทนจังหวัดในประเทศไทยที่เก็บตัวอย่าง วงกลมแทนตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่เก็บจากศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพเกษตรผึ้งทั้ง 5 ศูนย์ สีเหลี่ยมแทนตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงผึ้ง ตัวเลขในวงกลมหรือสีเหลี่ยมแสดงจำนวนรังของผึ้งพันธุ์ที่เก็บในแต่ละตำแหน่ง..... 110
75	แผนภาพแสดงรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆใน 4 บริเวณที่ศึกษาตัวอย่างอ้างอิง (สัญลักษณ์ในภาพ) <i>A. m. ligustica</i> (lig), <i>A. m. carnica</i> (car), <i>A. m. mellifera</i> (mel), Turkish <i>A. m. syriaca</i> (mid) and <i>A. m. scutellata</i> (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. ขนาดของแถบอ้างอิงโดย 100 bp และ 25 bp ladder..... 114
76	แผนภาพ Neighbor-joining แสดงความเหมือนกันระหว่างรูปแบบพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจากรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ รูปแบบพันธุกรรมแสดงไว้ตารางที่ 14 C = สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้กับผึ้งพันธุ์ที่มีจุดกำเนิดจาก East European และ O = สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้กับผึ้งพันธุ์ที่มีจุดกำเนิดจาก Middle Eastern..... 117
77	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ non-coding region ระหว่าง tRNA ^{leu} - cytochrome oxidase II ในไมโทคอนเดรียของผึ้งพันธุ์ 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'') ใช้แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หนึ่ง ที่สองซึ่งเป็นซ้ำที่เกิดขึ้นในส่วนของ Q เป็นต้น ผึ้งพันธุ์ไทย (ThaiA1, ThaiA2 and ThaiB) จะเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับผึ้งพันธุ์ในสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ <i>A.m. intermissa</i> , <i>A. m. mellifera</i> , <i>A. m.</i>

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
	<i>lamarckii</i> , <i>A. m. syriaca</i> (Franck <i>et al.</i> , 2000), <i>A. m. ligustica</i> (GenBank accession # L-06178), and <i>A. m. carnica</i> อักษรใหญ่ในลำดับเบสส่วนแรกแทนสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการดังนี้ C = East Mediterranean; M = West European; A = African; O = Middle Eastern ตัวเลขและอักษรตัวเล็ก แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์จาก Franck <i>et al.</i> (2000) เช่น O-1c = Middle East sequence 1c จุด (.) แสดงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายแรกสุด ขีด (-) แสดงช่องว่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ สายวิวัฒนาการแบบ East Mediterranean or C ไม่พบส่วน P ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ non-coding.....	118
78	การกระจายของรูปแบบพันธุกรรมในไมโตรคอนเดรียของผึ้งพันธุ์ใน 4 ภาคของประเทศไทย กราฟแท่งแสดงความถี่ของจำนวนรังในแต่ละรูปแบบพันธุกรรมของผึ้งพันธุ์ (A) ความถี่ของรูปแบบพันธุกรรมที่พบบ่อย (B) ความถี่ของรูปแบบพันธุกรรม 3 แบบ ThaiA1 สัมพันธ์กับรูปแบบพันธุกรรมของ <i>A. m. ligustica</i> ThaiA2 สัมพันธ์กับรูปแบบพันธุกรรมของ <i>A. m. carnica</i> ThaiB สัมพันธ์กับรูปแบบพันธุกรรมของ Middle Eastern.....	120
79	แสดงผลการสกัดดีเอ็นเอของชันโรง.....	125
80	Neighbor-joining tree (bootstrap 1000 replications) by using Mega 3.0 program (Kumar <i>et al.</i> 1993).....	127
81	Heurestics test tree (bootstrap 1000 replications) by using Winclada program (Nixon, K. C., 1999).....	128
82	(A) รา <i>Ascosphaera apis</i> อายุ 3 วัน (B) อายุ 7 วัน (C) สปอร์และเส้นใยของรา <i>Ascosphaera apis</i> อายุ 7 วัน.....	131
83	แสดงการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา <i>Ascosphaera apis</i> โดยใช้การทดสอบบนแผ่น TLC.....	135
84	ผลการองค์ประกอบของสารส่วนที่ 3 (A) และสารส่วนที่ 4 (B) โดยใช้วิธี GC-MS.....	136

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

85	Effects of three different concentrations (% w/v) of ethanolic extraction of propolis against seven pathogenic bacteria. Zone of inhibition of <i>S. gallinarum</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. felis</i> , <i>S. schleiferi</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. aureus</i> and <i>P. diminuta</i> against 5, 20 and 30 percent of EEP are expressed in mean $\pm$ S.D.....	141
----	---	-----

สัญญาเลขที่ RTA4580012

โครงการ: การศึกษาปัจจัยการอยู่รอดของผึ้งมัม ชันโรง และพืชอาศัยที่สัมพันธ์กับ

ความหลากหลายทางชีวภาพของถิ่นที่อยู่อาศัยในเขตร้อน

ฉบับสมบูรณ์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ

1. เนื้อหาผลงานวิจัย

1.1 สำรวจพืชอาหารและพืชอาศัยของผึ้งและชันโรงชนิดต่าง ๆ

1.1.1 ศึกษาความหลากหลายของพืชอาหารของชันโรง (*Trigona* spp.) ในเขตพื้นที่
องค์การสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่

จากการสำรวจชนิดและจำนวนรังของผึ้งชันโรงและชนิดของพืชอาหารสำหรับผึ้งชันโรง บริเวณป่าผลัดใบ ในเขตพื้นที่สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ ระหว่างเดือนเมษายน 2546 ถึง เดือนมีนาคม 2547 พบผึ้งชันโรงจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Trigona apicalis* Smith, *T. collina* Smith, *T. fimbriata* Smith, *T. pagdeni* Schwarz, *T. terminata* Smith และ *T. ventralis* Smith โดยมีพืชที่ออกดอกทั้งสิ้นจำนวน 78 ชนิด และจากการศึกษาจากก้อนเรณูของผึ้งชันโรง *T. collina* Smith และ *T. ventralis* Smith โดยใช้วิธี acetolysis พบพืชที่เป็นอาหารจำนวน 19 และ 15 ชนิด ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์สังคมพืชบริเวณพื้นที่ศึกษาพบว่าพืชอาหารแต่ละชนิดของผึ้งชันโรง ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความหนาแน่น และความเด่นของพรรณไม้ชนิดนั้นในสังคมพืชที่ผึ้งชันโรงอาศัยอยู่ แสดงถึงพฤติกรรมเลือกชอบในการหาอาหารของผึ้ง

(ได้จัดทำ manuscript เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสาร (ภาคผนวก1))

1.1.2 การออกหาอาหารของผึ้งมัม *Apis florea* และชันโรง *Trigona laeviceps* และ *T. collina*

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการออกหาอาหารโดยนับจำนวนผึ้งมัม *Apis florea* และชันโรง 2 ชนิด คือ *Trigona laeviceps* และ *T. collina* ที่เข้าตอมดอกบัว พบว่า *T. laeviceps* จะเข้าตอมดอกบัว เข้าที่สุด คือ เวลา 07.30 น. และพบมากที่สุดในเวลา 08.30-09.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่เริ่มพบ *T. collina* และ *A. florea* แต่จำนวนการเข้าตอมดอกบัวของ *T. laeviceps* ไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างช่วงเวลาของวัน ในขณะที่ *T. collina* และ *A. florea* จะพบมากเฉพาะในช่วงเวลา 09.30–

11.00 น. หลังจากนั้นจะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบ *T. laeviceps* เข้าตอมดอกบัวตลอดทั้งปี และพบมากที่สุดในเดือนมิถุนายน ส่วน *T. collina* ไม่พบเข้าตอมในเดือนพฤษภาคม แต่จะพบมากในเดือนกรกฎาคม และ *A. florea* ไม่พบเข้าตอมในเดือนกรกฎาคมและสิงหาคม แต่จะพบมากที่สุดในเดือนพฤษภาคม

บทนำ

ผึ้ง (honey bee) และ ชันโรง (stingless bee) เป็นแมลงสังคมชั้นสูง (eusocial insect) คือ สมาชิกทั้งหมดภายในรังมีการแบ่งหน้าที่อย่างชัดเจน ซึ่งสามารถพบผึ้งและชันโรงกระจายตัวอยู่ทั่วไปในเขตร้อน (Michener, 2000) โดยปกติแล้วลักษณะสำคัญของชันโรงจะแตกต่างจากผึ้งให้น้ำหวาน คือ ชันโรงจะไม่มีเหล็กไน จึงไม่สามารถต่อยได้เหมือนผึ้ง ในธรรมชาติทั้งผึ้งและชันโรง มีความสำคัญในแง่เป็นแมลงที่ช่วยผสมเกสร (pollinator) ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากแมลงพวกผึ้งเข้าตอมดอกไม้เพื่อเก็บเกสรและน้ำหวานมากกว่าแมลงชนิดอื่น ๆ (ศิริพันธ์ เอี่ยมประภา และคณะ, 2543) นอกจากนี้ ผึ้งและชันโรงยังมีพฤติกรรมที่สามารถเป็นแมลงผสมเกสรที่ดี โดยมีอวัยวะพิเศษที่ใช้เก็บเกสร (pollen basket) และน้ำหวาน (honey sac) จากดอกไม้ชนิดใด ๆ ได้อย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณมากพอที่จะนำเข้าไปเก็บในรัง และจะมีการทำงานอย่างน้อย 3 หรือ 4 วัน หรืออาจจะเก็บน้ำหวานหรือเกสรจากดอกไม้ชนิดนั้นนานถึง 20 วันจนกระทั่งดอกไม้โรยหมดไป (ศิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532) ผึ้งแต่ละชนิดก็จะมีช่วงเวลาในการออกหาอาหารที่แตกต่างกัน (ศิริพันธ์ เอี่ยมประภา และคณะ, 2543; Oldroyd *et al.*, 1992) ทำให้ลดการแก่งแย่งอาหารกันและเพื่อให้ได้รับประโยชน์จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณอาหารของดอกไม้ในช่วงวันได้อย่างเต็มที่ (Real, 1981)

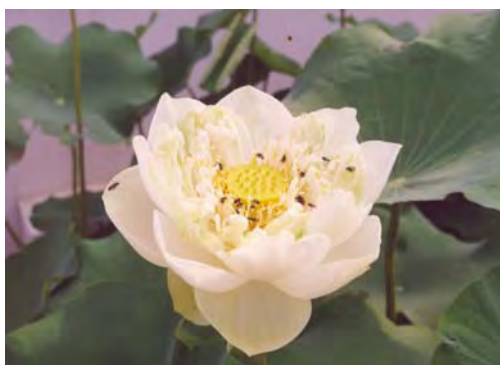
การศึกษาค้นคว้านี้ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณการเข้าตอมดอกบัวเพื่อเก็บเกสรของผึ้งมี *Apis florea* และชันโรง 2 ชนิด คือ *Trigona laeviceps* และ *T. collina* ในแต่ละช่วงเวลาของวัน เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดการอนุรักษ์และส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงผึ้งและชันโรง เพื่อใช้ในการผสมเกสรพืชสวนของเกษตรกรต่อไป

สถานที่และวิธีการศึกษา

1. สถานที่ทำการศึกษาและเก็บข้อมูล คือ กลุ่มอาคารเรือนกระจก สวนพฤกษศาสตร์ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ (ภาพ 1)



ก



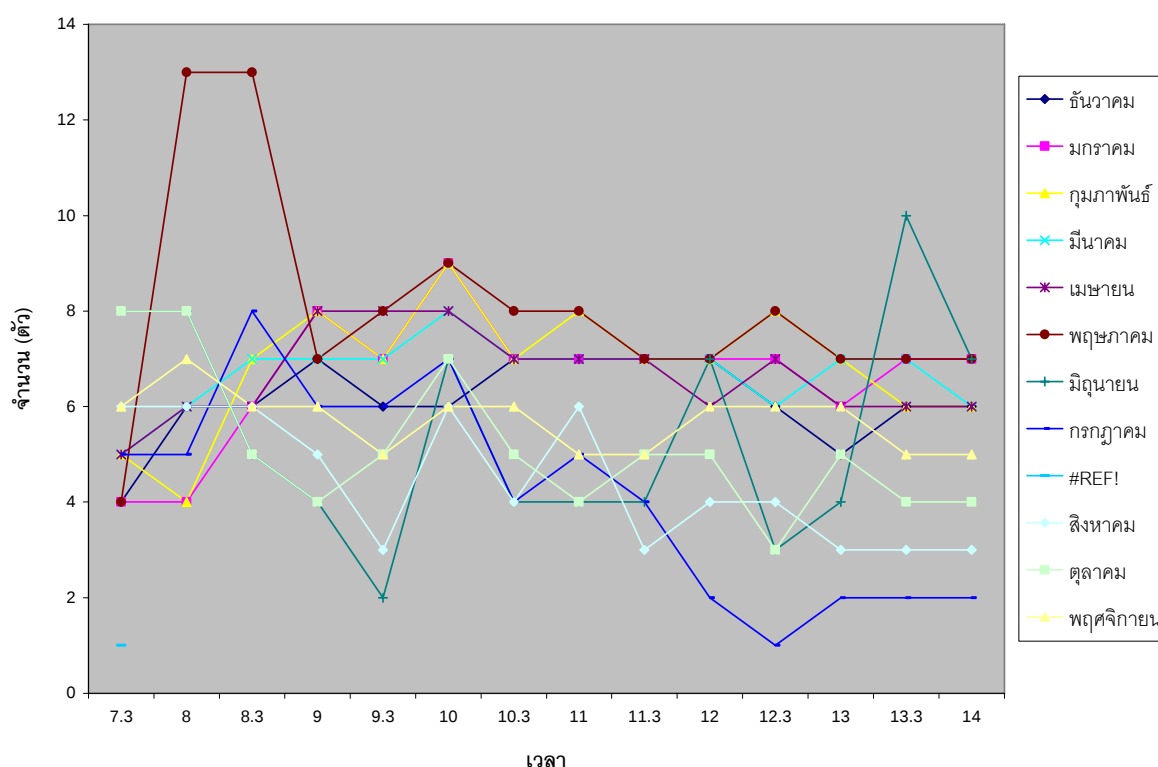
ข

ภาพที่ 1 พื้นที่ทำการศึกษา (ก) และการเข้าตอมดอกบัวเพื่อเก็บเกสรของผึ้งมัมและชันโรง (ข)

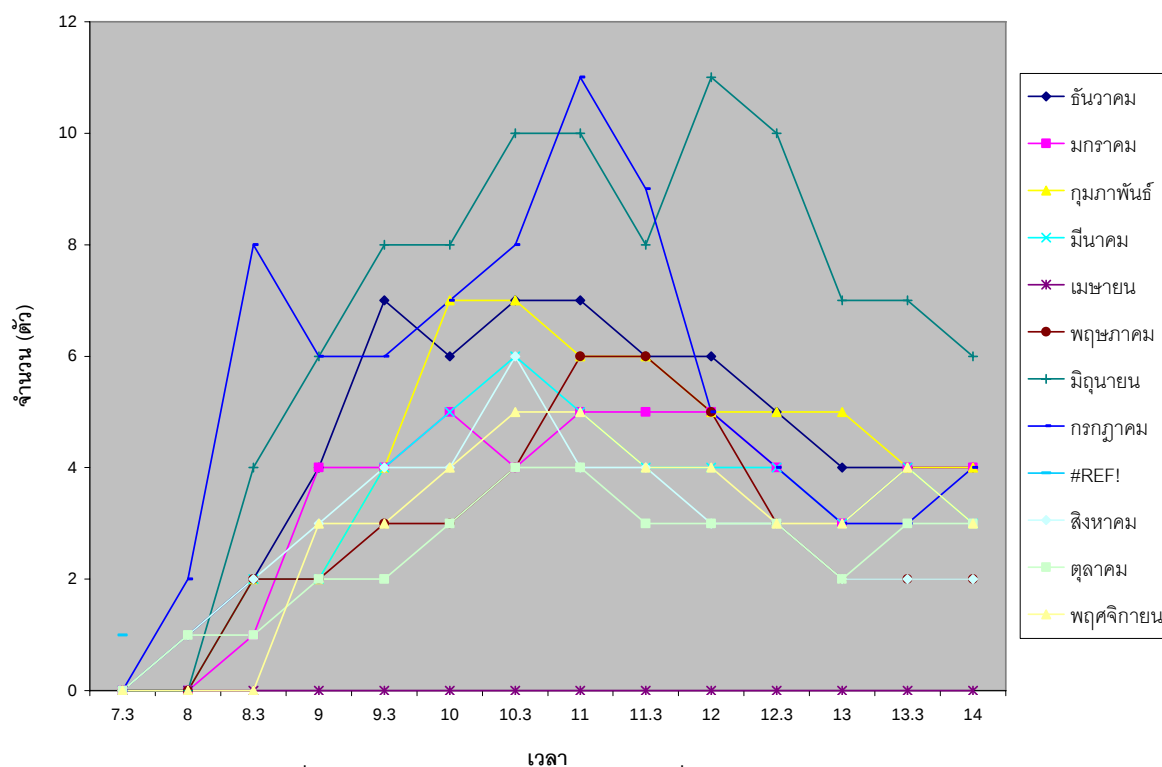
2. นับจำนวนผึ้งมัมและชันโรงทั้งสองชนิดที่เข้าตอมดอกบัวเพื่อเก็บเกสร ตั้งแต่เวลา 07.30-14.00 น. โดยทำการสังเกตและนับจำนวนทุก ๆ 30 นาที เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ทำการเก็บข้อมูลเดือนละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2546 รวม 12 ครั้ง
3. นำข้อมูลมาเปรียบเทียบความแตกต่างของจำนวนผึ้งและชันโรงการเข้าตอมดอกบัวในแต่ละช่วงเวลาของวัน ของผึ้งและชันโรงทั้ง 2 ชนิด

ผลการศึกษา

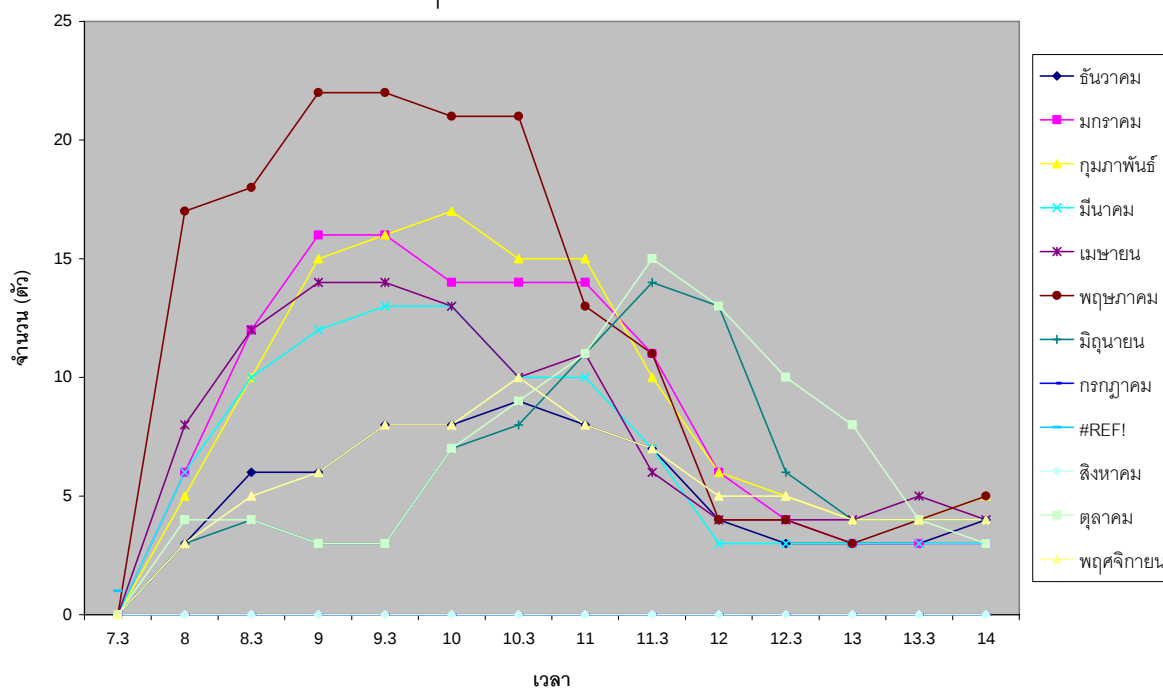
ดอกบัวที่ทำการทดลองเริ่มบานในเวลาประมาณ 07.00 น. และหุบในเวลา 14.00 น. โดยที่ทั้งฝั่งและชันโรงยังคงเข้าตอมดอกบัวเพื่อเก็บเกสร จากภาพที่ 2 แสดงให้เห็นว่า *T. laeviceps* จะเริ่มเข้าตอมดอกบัวเป็นพวกแรก คือ เข้าตอมในเวลา 07.30 น. แล้วปริมาณการเข้าตอมจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจะเพิ่มมากที่สุดในช่วงเวลา 08.30-09.00 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

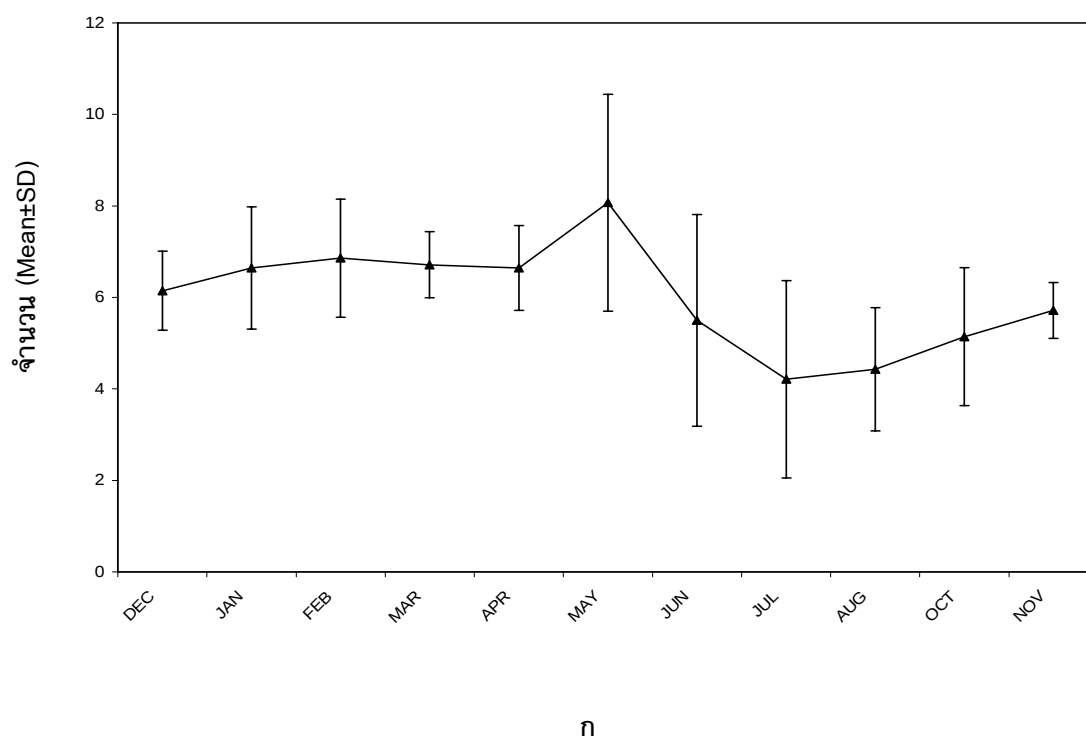
ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ (Wilcoxon Rank Test) ของจำนวนผึ้งมิม *A. florea* ขึ้นโรง *T. laeviceps* และ *T. collina* ในแต่ละช่วงเวลา (* = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, ns = no significance)

[illegible]

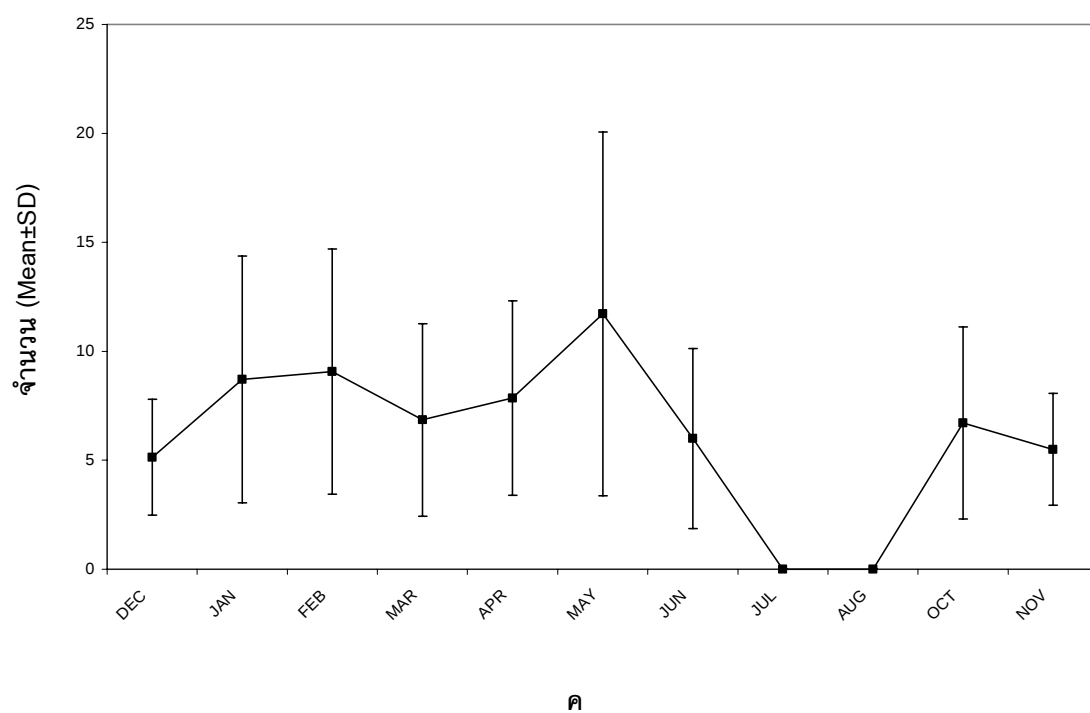
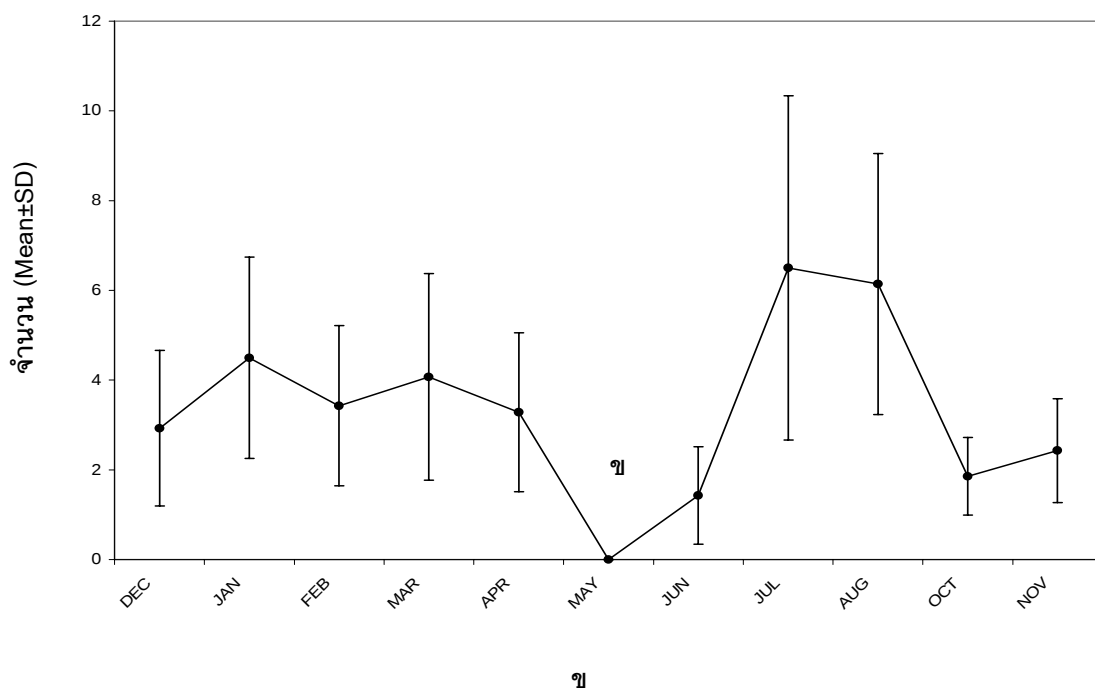
จากตารางที่ 1 พบว่าจำนวนของ *T. laeviceps* ที่เข้าตอมดอกบัวมีความแตกต่างกันระหว่างช่วงเวลาของวันไม่มากนัก โดยพบความแตกต่างในช่วงเวลา 09.00-10.00 น. ส่วน *T. collina* และ *A. florea* พบมีความแตกต่างทั้งในช่วงเวลา 07.30-08.30 น. และ 12.00-14.00 น. แสดงให้เห็นว่า *T. laeviceps* มีความสม่ำเสมอในการออกหาอาหารเกือบทุกช่วงเวลาของวัน

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*

สรุปผลการศึกษา

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 และประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคตัวผึ้งและโรคต่าง ๆ ในผึ้งพันธุ์ *A. mellifera* และปัญหาการหนีรังในผึ้งโพรง *A. cerana* ดังนั้นการเลี้ยงชันโรงเพื่อประโยชน์ในแง่เป็นแมลงช่วยผสมเกสร จึงเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

- สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2532. ชีววิทยาของผึ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัทต้นอ้อจำกัด.
- ศิริพันธ์ เอี่ยมประภา, สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, และสุรัชย์ ลิฬหพัชรรัตน์. 2543. การแบ่งช่วงเวลาในการเก็บน้ำหวานและเกสรในผึ้งชนิดต่าง ๆ ในลันจี้. 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 ไข่ถึงตัวเต็มวัย) ของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้ของผึ้งมีม *A. florea*

ผึ้งมีม *Apis florea* เป็นแมลงผสมเกสรซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรในประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม โดยเฉพาะไม้ผล เช่น มะม่วง ลำไย ลิ้นจี่ และเงาะ แต่นักล่าผึ้ง (bee hunters) ตีรังผึ้งมีมเพื่อนำตัวอ่อนและน้ำผึ้งมาเป็นอาหารและขายเป็นสินค้าเป็นจำนวนมาก โดยจะพบรังของผึ้งมีมวางขายตามตลาดทั่วไป เช่น ตลาดนัดสวนจตุจักร และบริเวณริมถนนจังหวัดนครสวรรค์ เป็นต้น เนื่องจากผึ้งมีมเป็นผึ้งขนาดเล็กและสร้างรังบนต้นไม้ที่ไม่สูงนัก ตลอดจนมีพฤติกรรมในการป้องกันตัวที่ไม่ดุร้าย ดังนั้นนักล่าผึ้งสามารถตีเอารังได้ง่าย ทำให้ประชากรผึ้งมีมลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว และส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวงจรชีวิตของการเจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ (ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ ไข่ถึงตัวเต็มวัย) ของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้ในผึ้งมีม และการสร้างผึ้งนางพญา ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ขั้นต้นเพื่อจะนำไปสู่ความรู้เบื้องต้นที่ได้นำไปใช้เป็นข้อมูลในการผสมเทียมผึ้งมีมเพื่อขยายพันธุ์ของผึ้งมีมซึ่งเป็นวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้

วิธีการศึกษา

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 เมื่อเซลล์นางพญาปิดจึงตัดเซลล์ออกจากรังผึ้งและนำมาใส่ไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 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) เจริญจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยของผึ้งมิม *A. florea*

วรรณะผึ้ง	ระยะการเจริญเติบโต			
	ระยะไข่	ระยะตัวหนอน	ระยะดักแด้	ไข่นจนถึงตัวเต็มวัย
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

การสร้างผึ้งมิมนางพญา จากการทดลองพบว่า การสร้างนางพญาผึ้งมิมขึ้นมาใหม่ทดแทนนางพญาผึ้งมิมเดิม มีค่าเฉลี่ย 7.8 ตัวต่อรัง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนผึ้งมิมนางพญาที่สร้างได้จากการนำเอาผึ้งนางพญาเดิมที่อยู่ในรังออก

รังผึ้งมิม	จำนวนผึ้งมิมนางพญาต่อรัง
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).

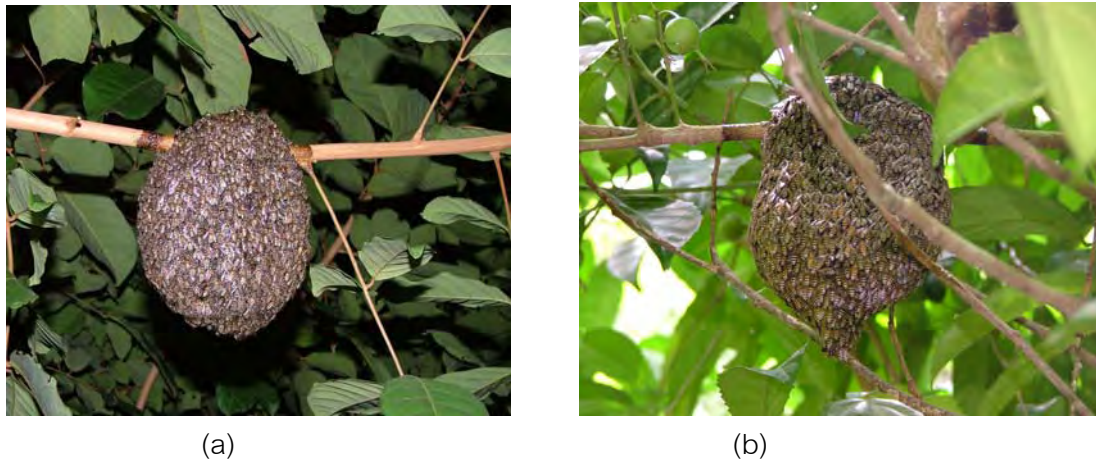


Figure 6 Combs cover during rain (a) *Apis florea* without tail (b) *Apis andreniformis* with a tail.

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).

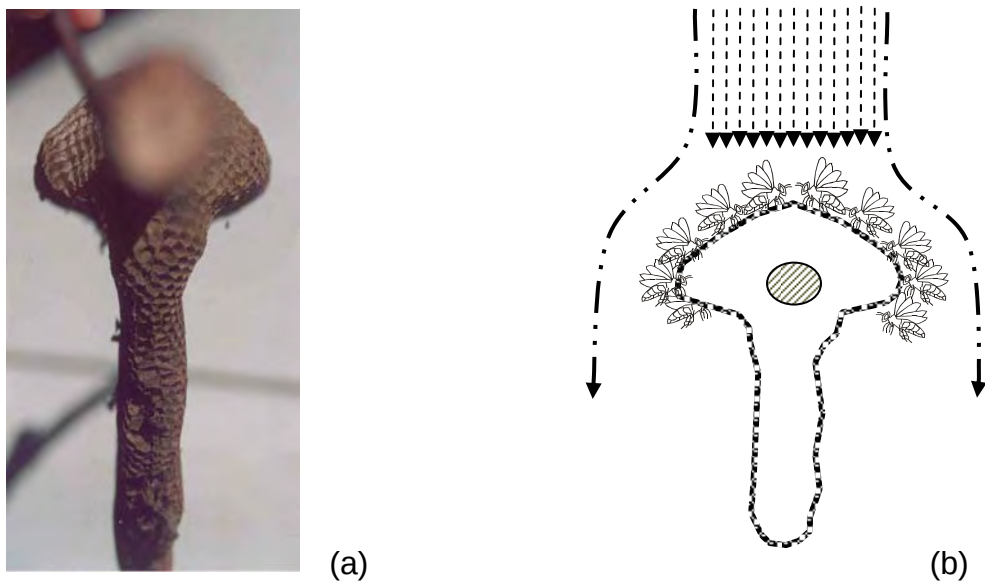


Figure 7 Rain proof curtain formation of *A. florea* (a). Abandon comb after heavy rain (b). Position of curtain formation bees

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° 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).

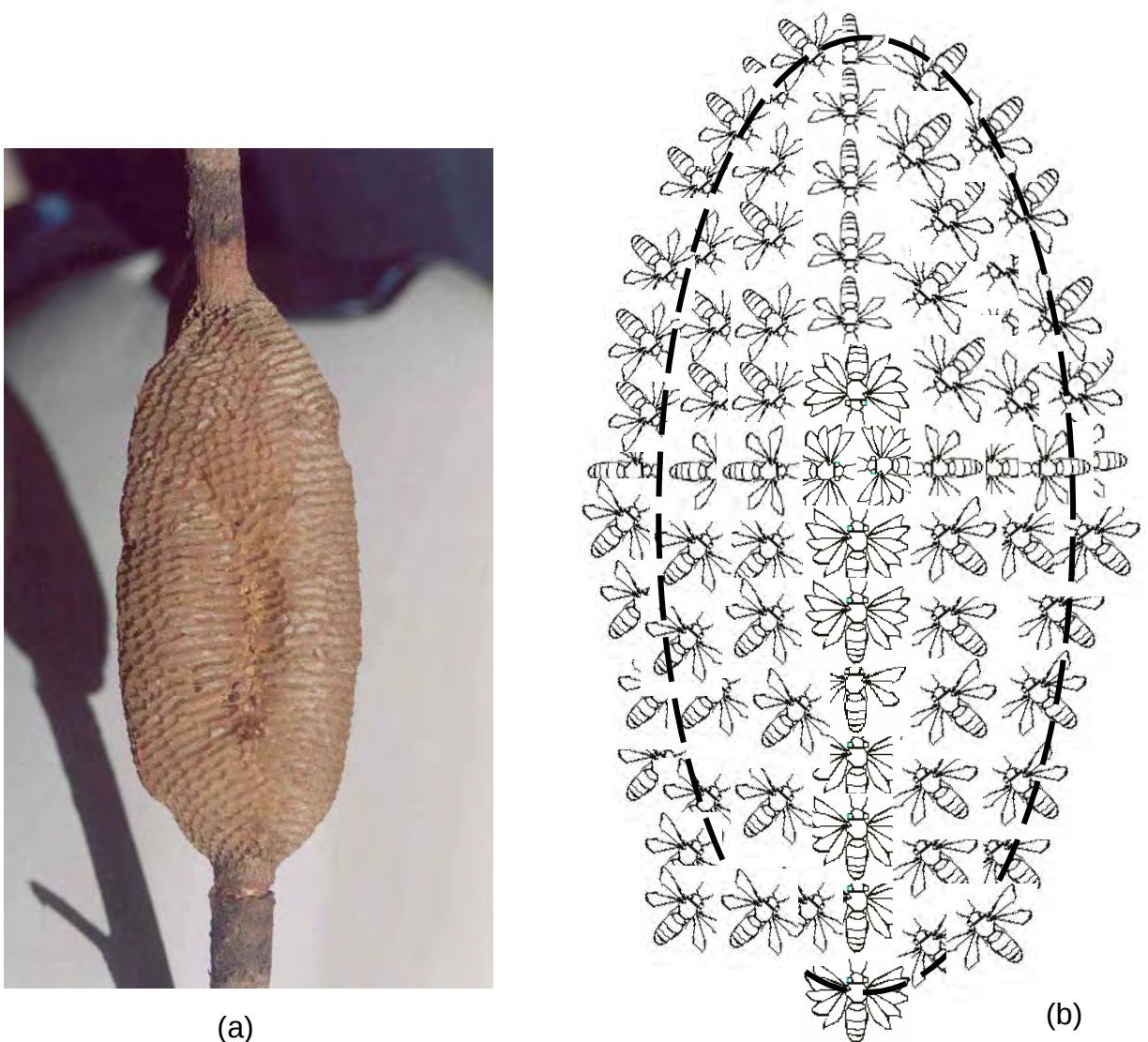


Figure 8 Top view during raindrops on the colony (a) dancing floor damaged by raindrops (b) curtain formation bees' position during rain

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 ในระดับแอกติวิตีของเอนไซม์ 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).

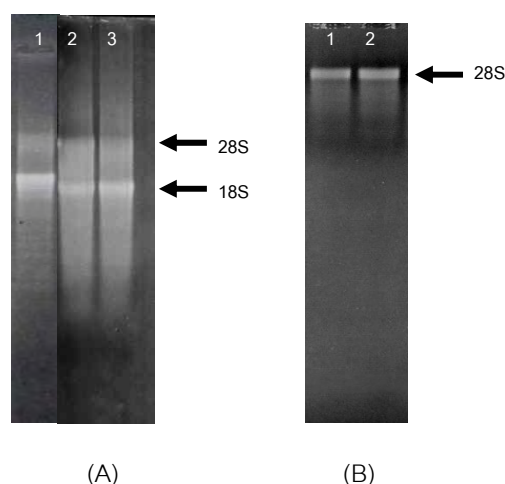


Figure 9. Total RNA extracted from [different stages](#) heads of *A. florea* on native agarose gel (A) and formaldehyde gel (B).

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).

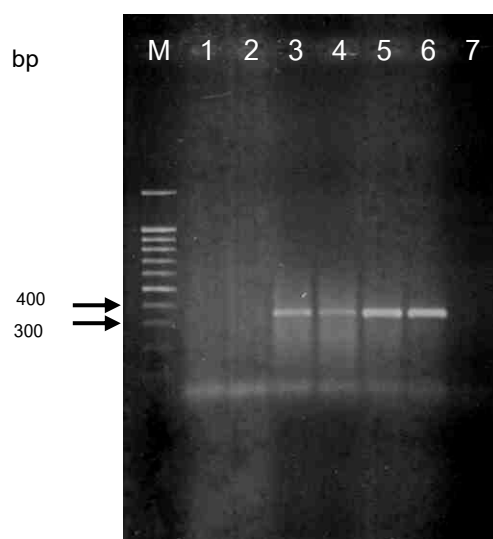


Figure 10. Expression profile of AG.

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).

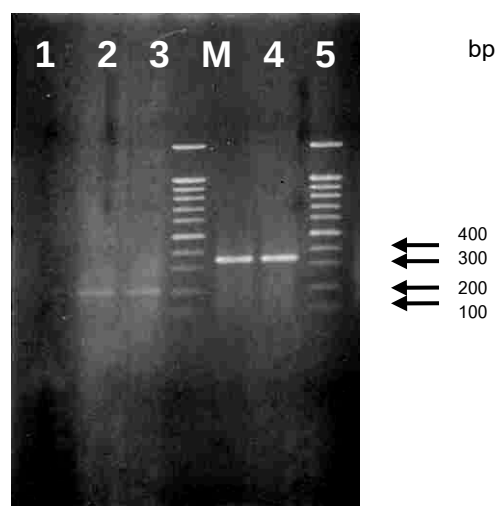


Figure 11. Control experiment by using primers from *EF* and 28S RNA genes. Total RNA for all reactions were from forager bee.

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).

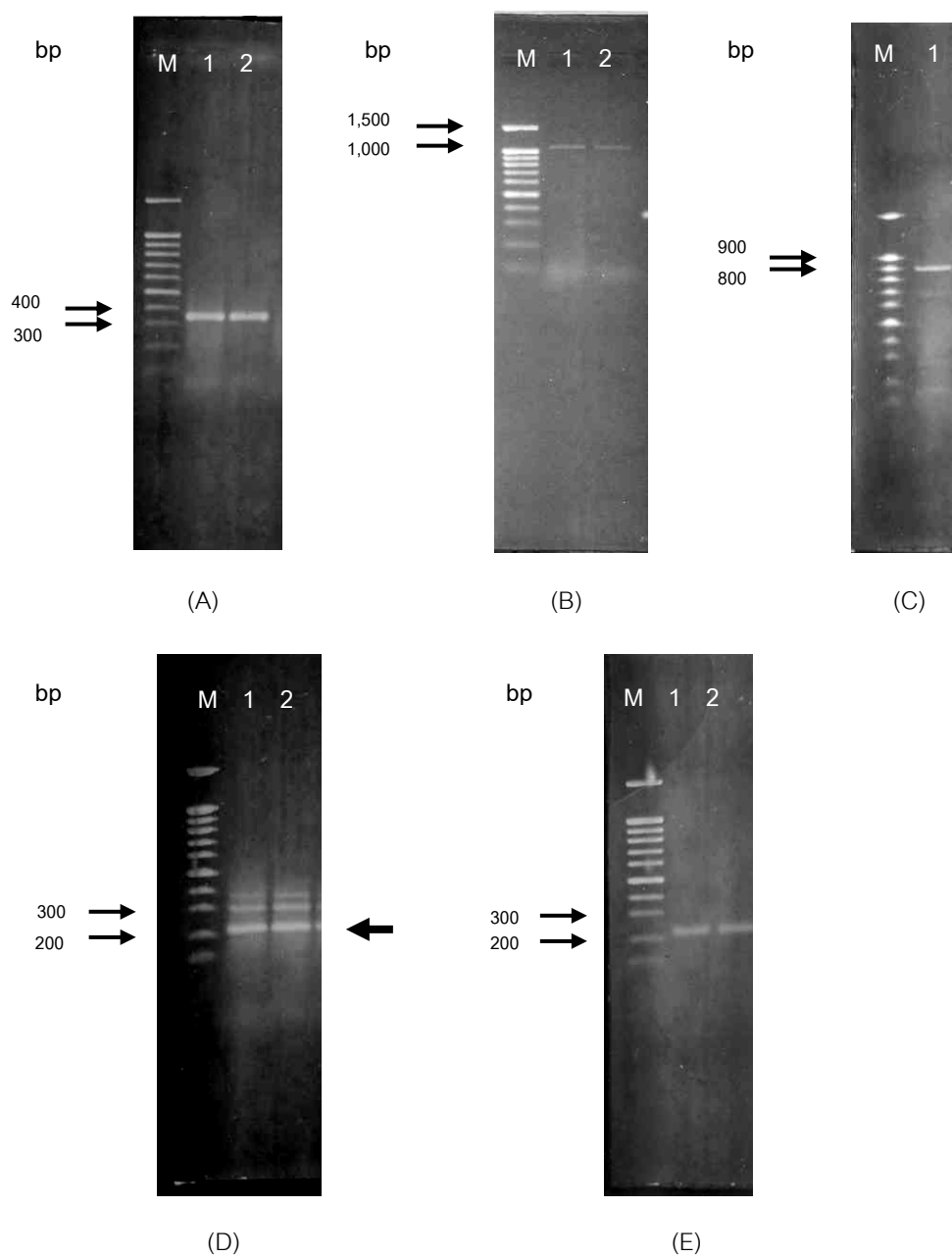


Figure 12. RT - PCR product amplified by 3 different pairs of primers.

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	TTCGACTTCTAGTTGGTAGCATGAAGGCGGTAATCGTGTGTTTGCCTT-ATGGCATTGTCC	59
Am. AG. nuc	TTCGACTTCTAGTTGGTAGCATGAAGGCGGTAATCGTGTGTTTGCCTT-ATGGCATTGTCC	59
Dm. CG. nuc	TTGTAGTGAAAATAGCTTTCATTTTGAGTGTGGGCCTAGTAGGCAT--ATTG----GCC	54
Cs. maltase. nuc	TATAAAAGAAAATGATTCCATTTAAAAAATTAACAATTTTACTATCAATTGCAT-GTTC	59
Am. maltase. nuc	-----ATGAAGAGCCTCGTCGTGGTCGTACTT-----CTGCTC	33
Ls. ScrA. nuc	GTTTAGTTTGGGCTTATCAAACGTTAGGTGCAGTCGGTATGGGATTTTTGGCCTGGGTT	60
	* * * *	
Af. AG. nuc	ATT-GTGGACGCAGCATGGAAGCCACTCCCTGAAA--ACTTGAAGGAGGACTTGATCTTG	116
Am. AG. nuc	ATT-GTGGACGCAGCATGGAAGCCGCTCCCTGAAA--ACTTGAAGGAGGACTTGATCGTG	116
Dm. CG. nuc	ATA-AGCACCAGTCAAAGGAGCTGGATGCGAAATATAATTGGTGGCAGCACGAGGTCTTC	113
Cs. maltase. nuc	TGT-ATTGGCAGCACCTGAAGGTGCACGTGAAAAA-GATTGGTGGGAAATTGGAACCTTT	117
Am. maltase. nuc	GCG-GTCGGCCTTG-GCGCCGGCCAAACCAACAAG-GGTTGGTGGAGAACGCGATCTTC	90
Ls. ScrA. nuc	ATTCAGCAATTGTCTTAAGTGGCTTACATCAAAGCTTCCCGCAATTGAAACGACACTTT	120
	* *	
Af. AG. nuc	TATCAGGTTTACCCGA----GGAGCTTCAAGGATAGCAATGGAGATGGTATTGGTGATAT	172
Am. AG. nuc	TATCAGGTCTACCCGA----GAAGCTTCAAGGATAGCAATGGAGATGGTATTGGTGATAT	172
Dm. CG. nuc	TATCAGATCTATCCGA----GATCCTTTCAGGACAGCAATGGTATGGTATTGGTGATCT	169
Cs. maltase. nuc	TATCAAGTCTATCCAC----GAAGTTTCATGGATTCTGATGGCGATGGTGTGGCGATT	173
Am. maltase. nuc	TATCAGGTATATCCC----GCAGTTTCATGGATTCCAATAGTATGGCATCGGGGATTT	146
Ls. ScrA. nuc	TGGCAGATATTGCCAAAAGTGGTGGATCGTTTATTTTCCCGTTGCAGCGATGGCAAATA	180
	* ** * * *	
Af. AG. nuc	CATAGGTATTAAGAAAAATTGGATCAT-TTCTCGAAATGGGCGTCGACATGTTTTGGT	231
Am. AG. nuc	CGAAGGTATTAAGAAAAATTGGATCAT-TTCTCGAAATGGGGTCGACATGTTTTGGT	231
Dm. CG. nuc	TCAAGGTATTACTTCTAGGCTACAGTAC-TTCAAGGATACGGGCATCAGTCCGTATGGT	228
Cs. maltase. nuc	GAAAGGAATTTAGAAAAAGTCGGTTAT-TTAAAGGAAATCGGCATGGATGGTGTGGC	232
Am. maltase. nuc	AAAAGGTATTAAGGATAAGCTTTACAC-TTCATCGAATCTGGAATAACAGCGATATGGT	205
Ls. ScrA. nuc	TTGCTCAAGGGGCTGCAACTTTGCTGTATTCTTCGTTACTAAGAATAAACACAAAAGT	240
	* * *	
Af. AG. nuc	TATCCCCTATTTATCCAAGCCCTATGGTCGATTTTGGTTACGACATTTCCAATTACACCG	291
Am. AG. nuc	TATCCCCTATTTATCCAAGCCCTATGGTCGATTTTGGTTACGACATTTCCAATTACACCG	291
Dm. CG. nuc	TGAGTCCCATTATGAGTCACCAATGGTAGACTTTGGATACGATATATCTAATATACAA	288
Cs. maltase. nuc	TTTCACCGATTTTGTATTCACCTATGGCAGATTTTGGTTATGACATTTCAAATTCACCA	292
Am. maltase. nuc	TATCACCATAATCGAAGTCTATGGTAGATTTTGGATACGATATATCTGACTTTAAAG	265
Ls. ScrA. nuc	CATTAACGACTTCTGCTGGGATTTCTGC-GATGTTGGGAATTACTGAACGACATTATT	299
	* * * *	
Af. AG. nuc	ACGTTTCATCCCATATTTGGCACCATATCAGATTTAGATGACCTAGTCAGTGCTGCACATG	351
Am. AG. nuc	ACGTTTCATCCCATATTTGGCACCATATCAGACTTAGATAATCTAGTCAGTGCTGCACATG	351
Dm. CG. nuc	ATATACAGCCGGAATATGGCACCCTTGAGGACTTTGACGCTTGATAGCCAAGGCCAATG	348
Cs. maltase. nuc	AAGTCTTCCCTCAATTCGGAGACTTGTCTTCAATTGATGAACCTGTAGCGGAATTCAATA	352
Am. maltase. nuc	ATGTAGATCCAATATTTGGTACTATAAAAGATCTTGAAGATCTCACTGCAGAAGCGAAGA	325
Ls. ScrA. nuc	GGGGTTAATTTAAAATTGAAGTTTC--CATTCTTTATTGGTTTAATTGCATCAGGAATCT	357
	* *	
Af. AG. nuc	AGAAAGGACTGA--AGATAATCTTGGATTTGTTCCGAATCATACATCTGATCAACACAA	409
Am. AG. nuc	AGAAAGGATTGA--AGATAATCTTGGATTTGTTCCCGAATCATACATCTGATCAACACGA	409
Dm. CG. nuc	AACTGGGCGTGA--AAGTATTTTGGACTTTGTTCCCAATCACAGCTCAAATAAGCATCC	406
Cs. maltase. nuc	AAAAAGATATGA--AACTCATTCTGGACTTTGTTCCAAATCATACAAGTGACCAATGTGA	410
Am. maltase. nuc	AACAGAATTTAA--AGGTTATTCTAGATCTTGTCCCTAATCATACTTCTGATCAACATAA	383
Ls. ScrA. nuc	CATCGTTTATTATTGGTTTATTACATGTTTTATCAGTATCAATGGGACCTGCAGGAATTA	417
	* * * *	
Af. AG. nuc	ATGG-TTCCAGTTGAGTTTGAAAAACGTTGAACCT-----TATAACAA	451
Am. AG. nuc	ATGG-TTCCAGTTGAGTTTGAAAAACATTGAACCT-----TATAACAA	451
Dm. CG. nuc	CTGG-TTC--ATAAAGTCAGTAGCCGA-GAGCCAGG-----GTACGAGGA	448
Cs. maltase. nuc	GTGG-TTC--AAAAATCAATTAGCGT-GATCCTGA-----GTACAATGA	452
Am. maltase. nuc	ATGG-TTCCAAATGAGTATAAATAATACTAATAATAATAATAC--TAATAATATAAAGA	440
Ls. ScrA. nuc	TTGGGTTTATTGCGATTGACCTAAGAGCATCCCTAGTTTTATGATGGGAGCTATTATTA	477
	*** ** *	
Af. AG. nuc	CTATTATATTTGGC--ATCCAGGAAAAAT-----TGTAAT--GGTAAACGTGTTCC	499
Am. AG. nuc	CTATTACATTTGGC--ATCCAGGAAAAAT-----TGTAAT--GGCAAACGTGTTCC	499
Dm. CG. nuc	TTTCTATGTGTGGG--AGGATGGTATTCT--CCTGGAGAAC--GGAACCTGTTGTC	499
Cs. maltase. nuc	TTACTATATTTGGC--ATCCGGGTAAAGCCAAATCCTGATGGT--GGTCGAAATTTACC	506
Am. maltase. nuc	TTATTACATATGGGTTGATCCTGTCAAAGACGATAAAGGAAATCCAATTAAAGACAAATA	500

Figure 13. (continued)

Ls.ScrA.nuc	GTTTCGTAATTGCCTTTGTGGGGACATACTTATACGGTAAAAAGGCAATGAAGACAAC TG 537
	* ** * *
Af.AG.nuc	ACCAAATAATTGGGTAGGCGTATTTGGTGGATCAGCTTGGTCATGGCGGGAAGAACGACA 559
Am.AG.nuc	ACCAACTAATTGGGTAGGCGTGTGGTGGATCAGCTTGGTCGTGGCGGGAAGAACGACA 559
Dm.CG.nuc	GCCCAACAATTGGCTGTCGGTGTCTCCGGATCCGCTTGGATGTGGAACGATGAGAGGCA 559
Cs.maltase.nuc	CCCAACTAATTGGGTAAGTGCCCTTCAGAAAGTAGTGCTGGGAATGGAACGAAGACGTGG 566
Am.maltase.nuc	TCCTAATAATTGGCTTAGTGATTCAATGGTACAGGATGGACTTTCCACGAGGGTAGGAA 560
Ls.ScrA.nuc	AAGAAGAAATAATCAATGAAGCACCAGTACCCAGAGTACCTAGTGGAGAGATTACAAGAT 596
	* *** * *
Af.AG.nuc	GGCATATTATCTGCACCAATTTGCACCAGAACAACCAGATTTAAATTACTA--TAATCCA 617
Am.AG.nuc	GGCATATTATCTGCATCAATTTGCACCAGAACAACCAGATCTAAATTACTA--TAATCCA 617
Dm.CG.nuc	GCAGTACTATCTCAGGCAGTTCACTTATGGACAACCCGATTTGAATACCG--AAATCCC 617
Cs.maltase.nuc	CGAATATTATTTACATCAATTTTGGCAACAACAACCCGATTTGAATACCG--CAATCCA 624
Am.maltase.nuc	ACAATTTTATTTCCATCAATTTTATAAGCAACAACCAGACTTGAATACAG--AAACTCG 618
Ls.ScrA.nuc	GAAAAGATTAGTGACCAAGTTACCGACGAATTGTTGACTTAGCATCAGTACCTGATCCA 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--GTGGTTGAAACATGA-AAAACGTTTTAAGATTCTGGCTTAG-CAAAGGTATGA 679
Am.maltase.nuc	GAT--GTGAGAGAAGAGATGA-AGAATATAATGAAATTTTGGTTGGA-TAAAGGAATCG 673
Ls.ScrA.nuc	GTTTTTGCAAGTGAAGCAATGGGAAAAGGCATTGCGATTATGCCAACTTCTCAGGATGTA 716
	* * *** * *
Af.AG.nuc	ATGGTTTCAGA-GTAGATGCTCTGCCTTAC--ATTTGCGAAGATATGCGAT-TCTTAGAC 728
Am.AG.nuc	ATGGTTTCAGA-GTAGATGCTCTGCCTTAC--ATTTGCGAAGACATGCGAT-TCTTAGAC 728
Dm.CG.nuc	CCGGCTTCCGC-ATCGATGC--CATTATATATATTACGAGGATGCTCAAC-TGAGGGAT 728
Cs.maltase.nuc	ATGGATTCAGA-ATTGATGCGGTACCATATTTGTTTGAAGTGGGACCAGATGCGAATGGA 738
Am.maltase.nuc	ATGGATTCCGC-ATAGATGCTGTACCACATTTATTCGAAAGCGCTAACATATCGTTAGAT 732
Ls.ScrA.nuc	CTTGACCAAGTTACCGGTGTGATAACAATTGCGGCTAATACTGGTCACGCA-TACGGGAT 775
	* * * ** *
Af.AG.nuc	GAACCCCTATCAGG--TGAAACAAATG--ATCCC-AACAA--AACTGAG--TACAC 775
Am.AG.nuc	GAACCTCTATCAGG--TGAAACAAATG--ATCCC-AATAA--AACCGAG--TACAC 775
Dm.CG.nuc	GAGCCTCCGAGTGGCACT--ACCGATG--ATCCA-AATAATGAGGCC-----TACTT 775
Cs.maltase.nuc	AATTATCCAGATGAAATTGAAACCCATGCTGCTCA-GATCCTTTATCTCAATGTTACT 797
Am.maltase.nuc	GAACCACCTTTGGG--TAAAAATCTCA--ACTTA-AGTCTCCACGCT-----TCTTT 779
Ls.ScrA.nuc	AAAATCGGATGATGGTGCAGAAGTGCTA--ATTCATATTGGTTTAGATACAGTTAATTT 832
	* *
Af.AG.nuc	TCTCAAGATCTACACTCAGATAT-CCCAGAAACCTACAATGTAGTT----- 821
Am.AG.nuc	TCTCAAGATCTACACTCAGATAT-CCCAGAAACCTACAATGTAGTT----- 821
Dm.CG.nuc	GAGCCACATCTATACCAGAAATCA-GCCTGAGGATTACGGTCTACTT-CAGC----ATTG 829
Cs.maltase.nuc	GTATCACGATTACACTCAAAACAG-GCCTGAAACTTTTGAATGGTCAAGGA----ATGG 852
Am.maltase.nuc	AAATCAACCTTTTAAACGAAAGATCA-ACCCGAGACTTACGAATTGGTAAAGA----AT-G 833
Ls.ScrA.nuc	AAATGGTATAGGTTTTGAAAAGATTGTCCAACAGGGACAACATGTTAGCGAAGGCGATTT 892
	* * *
Af.AG.nuc	--CGCAAATTTAGAGATGTGTTAGACGAATTCCCG-----CAACCAAAACACATGCTTA- 873
Am.AG.nuc	--CGCAAATTTAGAGATGTGTTAGACGAATTCCCG-----CAACCAAAACACATGCTTA- 873
Dm.CG.nuc	GCGGCAACTTCTGGATAATTATACAGTAAACCACGATGGGCCATTGAGGATAATGATGA- 888
Cs.maltase.nuc	AGAGCGACTTTGGAGGAATT-TAAACAAAAGAAATGGAGGACCAACAAGAGTTTTAATGG- 910
Am.maltase.nuc	GCGAGATTTTGTGGACAACATATGCAGAAGAAAATAAGCGGGATGAAATAGTACTTTTGA- 892
Ls.ScrA.nuc	ATTAGTCATTTTGATATTGATAAGATTAAACAAGCCGGGCTAACACCGCTACAATGAC 952
	* *
Af.AG.nuc	--TCGAGGCATACACGAA----TTTGTCCATGACGATGAAATATTACGAT----- 917
Am.AG.nuc	--TCGAGGCATACACGAA----TTTATCGATGACGATGAAATATTACGAT----- 917
Dm.CG.nuc	--CCGAGGGTTATGCTTC----GGTGTGCGAACTAATGGAATACTATGAA-GATTGCAAT 941
Cs.maltase.nuc	--TAGAAGCTTATGCTCC----ATTAACAAAAGTAATTCAAATTTATGGTCAAAATGGAG 964
Am.maltase.nuc	--CAGAGCGTATTCTTC----TTTAGAGAACACTCTCAAATATTACGAA----- 936
Ls.ScrA.nuc	TATTGTGACGAATACAGCGGGATATGCACAAGTTGATCCGCTTTTAAACAGTCGACAAGGC 1012
	* * * *
Af.AG.nuc	-----TACGGAGCAGATTTTCCCTTCAATTTTGCATTTCATCAAGA--ACGTCTCTAGGA 969
Am.AG.nuc	-----TACGGAGCAGATTTTCCCTTCAATTTTGCATTTCATCAAGA--ATGTTTCTAGGG 969
Dm.CG.nuc	GGTGTACAGGGCCCCAGTTTCCCTTCACTTTGACTTCATCACCG--AACTGAATGCCA 999
Cs.maltase.nuc	AGC-TAAATGGAGCTCAAATTCATTTAATTTTCGAGTTCTTGAATA--ATTTGGGAGCCG 1021

Figure 13. (continued)

Am.maltase.nuc	-----GTTGGTTCAAATGTTCCCTTCAATTTTAAATTTATAACAG--ATGCAAATTCAT	988
Ls.ScrA.nuc	TGC-TATGCAAGGCGAAGAAATTATTTCAATTACACGCTAAAAAGGATTAAGGGGTAGTTA	1071
	* * * * *	
Af.AG.nuc	ATTCAAATTCATCAGACTTCAAAA--AATTGGTCGATAATTGGATGACGTACATGCCAC	1026
Am.AG.nuc	ATTCAAATTCATCAGACTTCAAAA--AATTGGTCGATAATTGGATGACGTACATGCCAC	1026
Dm.CG.nuc	ATTCGACAGCTGCGGACTTTGTCT--TCTATATCTCCAGGTGGCTCATCTATATGCCAC	1056
Cs.maltase.nuc	TAAGTAATGCTCGTGATTTCAAAG--ACGTAATTGACAATTATCTCAGCACAATCCCAG	1078
Am.maltase.nuc	CTTCCACGCCAGAACAAATTTAAAG--TAATTATAGACAATTGGATAAAAGGAACGCCCC	1045
Ls.ScrA.nuc	CATGCAAACTAACTGGTGGCAAAATGCAGTATTTTATCAAGTCTATCCAAGAAGT-TTTC	1130
	* * * * *	
Af.AG.nuc	CAANTGGTATTCCTAACTGGGTGCCCGGAAACCANGACCNATTGAGATNGGTGTGCGAGAT	1086
Am.AG.nuc	CAAGTGGTATTCTAACTGGGTGCCCGGAAATCACGATCAATTGAGATTGGTGTGCGAGAT	1086
Dm.CG.nuc	ATGGTCATGTGGCCAACCTGGGTGATGGGAAATCACGACAATCCTCGAGTGGCATCACGAT	1116
Cs.maltase.nuc	AAGGAGCAACACCAAATTTGGGTTCAGGAAATCACGATCAACATCGATCAGCATCACGAC	1138
Am.maltase.nuc	AAAATAATGTTCCAAATTTGGGTGATGGGAAACCATGATCGAGTTTCGTGTGCGGTACACGTT	1105
Ls.ScrA.nuc	AAGATAGTAATGGAGATTGGATTGGTGATTTTCAAGGTATTATTCAAAGATTAGATTACC	1190
	* * * * *	
Af.AG.nuc	TTGGAGAAGAGAAGGGCCGTATGATCACCACGATGTCGCTTTTGC--TGCCAGGTGTTT	1143
Am.AG.nuc	TTGGAGAGGAGAAGGCCGTATGATCACCACGATGTCGCTTTTGC--TGCCAGGTGTTG	1143
Dm.CG.nuc	TCGGTGAGAAATCTGTGGACGCCATGAATATGCTGCTGATGACAT--TGCCAGGAATTG	1173
Cs.maltase.nuc	TCGGTCCACAAAAGCTGATGCAGTTAATATGTTACTTCAAGTTC--TTCCCGGAGCTG	1195
Am.maltase.nuc	ATCCTGGTAGGGCGGATCACATGATAA--TGTTGGAGATGATTT--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	CAGTCACTTATTATGGTGAAGA--ACTTGCAA--TG--GAAGACGTTTTTCGTTCCATGG	1248
Am.maltase.nuc	CGGTCACGTATTATGGAGAAGA--AATCGGTA--TGGT-----G	1194
Ls.ScrA.nuc	ATAATGGCTATGATATTTTCAGATTATCAGGCAATTAATCCGGAATATGTTTCTATGGTGG	1310
	* * * * *	
Af.AG.nuc	G-AGGACACGCAGGATCCACAGGGATGCGGTGCCGGTAAAGAAAATATCAAACAAT-GT	1254
Am.AG.nuc	G-AGGATACGCAGGATCCGACGGGATGCGGCGCGGTAAAGAAAATATCAAACGAT-GT	1254
Dm.CG.nuc	A-GCGATACGGTGGATCAGCCGCTTGTGAGGCTGGAATCGACAACACTACAAGACGAT-TT	1287
Cs.maltase.nuc	T-CTCGTACTGTCGATCCACAAGCATGTACAACAGATCCAAATATTTCCATGCCAA-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-----AACGCCATTCCAATGGGACGACTCACTTTCTGCTGGATT	1309
Dm.CG.nuc	CTAGAGATCCTGAGCG-----AACTCCCATGCAATGGAGTAGTGATGTGAATGCAGGATT	1342
Cs.maltase.nuc	CACGTGATCCCGCAAG-----AACACCCATGATTTGGACTTACAAAAAACGCGAGGATT	1361
Am.maltase.nuc	TCCAA-----TGGGAT-----AACTCCATTAAATGCAGGCTTTAGTAA-AATCGCTGAAAA	1295
Ls.ScrA.nuc	TTGTTAATCATACAAGTGACCAACATCCATGGTTTTTAGAAGCACGAAAAATCAAAAGATA	1430
	* * * * *	
Af.AG.nuc	TTCC----TCAAGCTCTAATACGTGGCTTCGTGTCAATGAAAATTACAAGAC---TGTCA	1362
Am.AG.nuc	TTCC----TCAAGCTCTAATACGTGGCTTCGTGTCAACGAAAATTACAAGAC---TGTCA	1362
Dm.CG.nuc	CTCC----TCCGCGGATCGCACTTGCTTGGCTGTCAATCCGAATTATAAGGA---ACTTA	1395
Cs.maltase.nuc	TTCA----AGTTCAAATTACACATGGCTTCCAACCTGGACCAGATTATCGCAA---AAATA	1414
Am.maltase.nuc	TTTG----CTTGAAAAGAAT---TGGCTACCTGTTTATACATCGTACAAAAGTGGACTAA	1348
Ls.ScrA.nuc	ATCCGTATCGTGATTTTTATATTTGGCGAGACCCTGCAACCGATGGTAGTGTTCCGAATG	1490
	* * * * *	
Af.AG.nuc	ATCTAGCTGCTGAAA--AGAAGGACAA--GAACTCGTTCTTCAATATGTACAAGAAATT	1417
Am.AG.nuc	ATCTAGCTGCTGAAA--AGAAGGACAA--GAACTCGTTCTTCAATATGTTCAAGAAATT	1417
Dm.CG.nuc	ATCTTCGGAATCAGC--AGCAGGCGAG--GCGAAGTCATTACAAGATCTATCAGTCCCT	1450
Cs.maltase.nuc	ATGTTGAAGTGCAGC--GTAGTCAGAG--AGGCAGTCACTTGAATATCTTTAAAAAGTT	1469
Am.maltase.nuc	ATTTGGAGCAAGAGA--AAAAAGATAG--TATTTCTCATTATCATCTTTATACCAACTT	1403
Ls.ScrA.nuc	ATTTACAAAGTAATTTTAAAGGATCAGCTTGGCGGTTTGATGCGGTTACTGGGCAATATT	1550
	* * * * *	

Figure 13. (continued)

Af. AG. nuc	CGCGTTGCT-----GAAAAAATCGCCATATTTTAAAGAGGCCAATTTAAGTACGAGGA	1470
Am. AG. nuc	TGCGTCGCT-----GAAAAAATCGCCATATTTTAAAGAGGCCAATTTAAATACGAGGA	1470
Dm. CG. nuc	TCTGAAGCT-----CAGACAACCTGCCAGTTCTGAAGAACGGATCCTTTGTTCCAGAAG	1503
Cs. maltase. nuc	GACTCAACT-----TCGTAAGCAAGACATTTTGATGTATGGCACTTATGATAGTTACT	1522
Am. maltase. nuc	GACCGCTTT-----AAGAAAGAGAGATGTGTTGAAAAAGGAACTTTACTATAGAAA	1456
Ls. ScrA. nuc	ATTACATTTTATGCGAAAGAACAACCGGATTAAATTGGCAAAATCCTAAAGTTAGAG	1610
	* * * *	
Af. AG. nuc	TGCTGAACGACAATGTTTTCGCNTTCTCTAGG-GAAACCGAAGACAATGGATCTCTTTAC	1529
Am. AG. nuc	TGCTGAACGACAATGTTTTCGCATTTCTCTAGG-GAAACCGAAGATAAATGGATCTCTTTAC	1529
Dm. CG. nuc	TGGTTAATCGCAGGGTCTTCGCTTTCAAGCGA-GAACTGAAGAACGAGCACACTCTGCTG	1562
Cs. maltase. nuc	TGGCAAAATGATGACGTTTTGGTGATTAAACGT-GAAATTGAGAATAATCGAACTTTGATT	1581
Am. maltase. nuc	TTTTAAACAAACTGTTCTGGCTGTCTGTCGACAAAGCGAAGAAGAAGCGGTATCTCTTT	1516
Ls. ScrA. nuc	AAGCTGTCTACCAGATGATGACTTGGTGGCTT-CAAAAAGGGATTGGTGGTTTTAGGATG	1669
	* * ** *	
Af. AG. nuc	GTAATAATGAACCTCTCGAA--CGAGGAACAAATCGTGGATTTGAAAGCGTTTTG----	1581
Am. AG. nuc	GCAATATTGAACCTCTCGAA--CGAGGAACAAATCGTGGATTTGAAAGCGTTTCA-----	1581
Dm. CG. nuc	ACCATTGTGAACGTGAGCAACCGCACTGAACTGGTTGACATCGCGGACTTTA-----	1614
Cs. maltase. nuc	GCTGTCTTAACCTGGGT---TTCACTGAACAAGTCGTCAATTTGAATTTAAATGACCGA	1638
Am. maltase. nuc	----TGATCAACTTCTCTAAAAATAATACTATCGTGGATATATCAAAGTTGGT-----	1565
Ls. ScrA. nuc	GACGTTATTGATTTGATAGG--GAAGGAACCTGACCGCAAAATTAAGGAAAACGGACCGC	1727
	* * * *	
Af. AG. nuc	----ATC-----ACGTGCCGAAGA-GATTGAATATGTTTTACAACAATTTTAACTC----	1627
Am. AG. nuc	----ATA-----ACGTGCCGAAAA-AATTGAATATGTTTTACAACAATTTTAACTC----	1627
Dm. CG. nuc	---TAGA-----ACAGCCCA-ATC-GATTGAGTGTCTTGTGGCGGGAGTGGACTCGCAA	1664
Cs. maltase. nuc	GATTGGA-----AAGTTCAGAGA-GAATGGAAGTTGCAACAGCTTCAGTTAACGCAGGA	1692
Am. maltase. nuc	-----GA-----ACAAAAGAAATA-ATGCTAAAATTTACACAAGCAGCGTAAACTCCAA-	1613
Ls. ScrA. nuc	AATTACATGCGTATCTTCAAGAGATGAACGCAAGGGTACTTTTACAGTATGATGTAGTAA	1787
	* * *	
Af. AG. nuc	----TGATATAAAATCCATCTCCAACAACGAGAAAAATAAA-AGTTCCTGCTTTAAGATTT	1682
Am. AG. nuc	----TGATATAAAGTCCATCTCCAACAATGAACAAGTAAA-AGTTCCTGCTTTAAGGATTT	1682
Dm. CG. nuc	CACCGGGTGGGGGATCGACTTAAGGCCGAGACAATTGAATTGGCGCCCAACGAGGGATTA	1724
Cs. maltase. nuc	ATGTTTCGAGAGACAACCCGTTGTGACAAGTGAAGTCTACGTATCAGCTGGCGTTGGAGTT	1752
Am. maltase. nuc	--TTTGACAGTAAATCAAACGTAAATCCAGTGGCTATCAATATTCCTGGAGATACATCT	1671
Ls. ScrA. nuc	CGGTTGGAGAGACAT-GGGGGGCAACACCCGAAATTGGCCAGATG--TACAGTAATCCTA	1844
Af. AG. nuc	NTAATCTTAATCTCTCA--AGATGCTAAATTTGAAAACATTTAATTTCTTCTTGAACATG	1740
Am. AG. nuc	TTCATCTTAATTTCTCA--AGATGCTAAATTTGAAAACATTTAATTTCTTCTTGAATATG	1740
Dm. CG. nuc	GTTATTCACTGAATAAGCGAAAGTAA-----	1751
Cs. maltase. nuc	GTT-CTCGATTATCAAGTAGGGCGTCAATTCCCGAACCAAGAGGTGACGATCCAGGACT	1811
Am. maltase. nuc	ATAATTGTAGATTCATC---CACTTCAGGCGCTACTATAGTCAATTATTCAATCATGAT-	1727
Ls. ScrA. nuc	ATCGCCACGAACATATCGATGATCTTTCAATTTGAACAAATTAATTTAGATAAACAAATCAG	1904
	*	
Af. AG. nuc	TCTATNCTTTGAAGCGGCGA-----	1760
Am. AG. nuc	TCTATTCCTTTGAAGCGGCGA-----	1760
Dm. CG. nuc	-----	
Cs. maltase. nuc	ATACGAATAAGAAATATTCC-----	1831
Am. maltase. nuc	TTTCTTATCCGCAGTGTTTCATATCTTTTTTCCAACGG-----	1764
Ls. ScrA. nuc	GGATGACTCGCTGGGATTTAAACCACCTTATTCAGCAGAGT	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.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10      20      30      40      50      60      70
Af.AG.nuc  ---MKAVIVF CLMALSI VDA AWKPLPEN-- --LKEDLILY QVYPRSFKDS NGDGIGDIIIG IKEKLDHFLE
Am.AG.nuc  ---MKAVIVF CLMALSI VDA AWKPLPEN-- --LKEDLIVY QVYPRSFKDS NGDGIGDIEG IKEKLDHFLE
Dm.CG.nuc  MVVVKIAFIL SVGLVGILAH KHQSKELDAK YNWWQHEVFY QIYPRSFQDS NGDGIGDLQG ITSRLQYFKD
Cs.maltase MIPFKKLITL LSIACSVLAA PEGAREKD-- --WWEIGNFY QVYPRSFMD S DGDGVGDLKG ISEKVGYLKE
Am.maltase ---MKSLVVV VLLLAVGLGA GQN--NKG-- --WKNNAIFY QVYPRSFMD S NSDGIGDLKG IKDKLSHFIE
Ls.ScrA.nu ----FVFLIP ALTAGGLLMA INNVLGTGG-- --LFGAQSI V QMFP----- ----QWKG FAEIVNMMS
Clustal Co      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          80      90      100     110     120     130     140
Af.AG.nuc  MGVDMFWLSP IYPSPMVDFG YDISNYTDVH PIFGTISDLD DLVSAAEKGS LKIIILDFVPN HTSDQHKWFQ
Am.AG.nuc  MGVDMFWLSP IYPSPMVDFG YDISNYTDVH PIFGTISDLD NLVSAAEKGS LKIIILDFVPN HTSDQHEWFQ
Dm.CG.nuc  MGTSVWLSP IYESPMVDFG YDISNYTNIQ PEYGTLED F ALIAKANELG VKVILDFVPN HSSNKHWF I
Cs.maltase IGMGCVWLSP IFDSPMADF G YDISNFTKV F PQFGDLSSID ELVAEFNKKD MKLILDFVPN HTSDQCEWFK
Am.maltase SGITAIWLSP INRSPMDFG YDISDFDKVD PIFGTIKDLE DLTAEAQKQN LKVILDLVPN HTSDQHKWFQ
Ls.ScrA.nu APFTFLP--- ----ILIA FSATKRFGGN PYLGAAAGMM LVMPNLVN-G YGVAESIATG HMT---YWHV
Clustal Co      .      .      : : : :      * * : : : : : : : : : : * : *

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          150     160     170     180     190     200     210
Af.AG.nuc  LSLK-----N VEPYNNYYIW HPG-KIVNGK R---VPPNNW VGVFGGSAWS WREERQAYYL HQFAPEQPD L
Am.AG.nuc  LSLK-----N IEPYNNYYIW HPG-KIVNGK R---VPPTNW VGVFGGSAWS WREERQAYYL HQFAPEQPD L
Dm.CG.nuc  KVA-----R EPGYEDFYVW EDGILLENGT R---VPPNNW LSVFSGSAWM WNDERQQYYL RQFTYGGPD L
Cs.maltase KSIQ-----R DPEYNDYYIW HPGKPNPDGG RN--LPPTNW VSAFRSSAW E WNEERGEYLL HQFLAQQPD L
Am.maltase MSINNTNNNN TNKYKDYI WDPVKDDKGN PIKDKYPNNW LSVFNGTGWT FHEGRKQFYF HQFYKQQPD L
Ls.ScrA.nu FGLN----IA QAGYQGQVIP VIGVAFILAN LE--KFFHKH LNDAVDFTFT PMSIIITGF LTFTLVGPAL
Clustal Co      . :      * : : :      : : : : : : : : : : : : * * *

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          220     230     240     250     260     270     280
Af.AG.nuc  NYYNPAVLDE MQNVLRFWLK RGLDGFVRDA LPYICED--- --MRFLDEPL SGETNDPNKT EYTLKIYTHD
Am.AG.nuc  NYYNPVVLD MQNVLRFWLR RGLDGFVRDA LPYICED--- --MRFLDEPL SGETNDPNKT EYTLKIYTHD
Dm.CG.nuc  NYRNPAVIKA MDDVMLFWLN KGIAGFRIDA I IYIYED--- --AQLRDEPP SGTDDPNNE AYLSHIYTRN
Cs.maltase NYRNPKVVET MKNVLRFWLS KGINGFRIDA VPYLFEVGPD ANGNYPDEIE THACSDPLSQ CYLYHDYTNQ
Am.maltase NYRNSDVREE MKNIMKFWLD KGIDGFRIDA VPHLFES--- --ANISLDEPP LGKNLNLSLH ASLNHTLT KD
Ls.ScrA.nu RIVSNGVTD S LVWAYQTLGA VGMGIFGLGY SAIVLTG--- ----LHQSFP AIETTL LADI AKTGGSFIFP
Clustal Co      . : * : : : * : : : : : : : : : : : : : : : :

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          290     300     310     320     330     340     350
Af.AG.nuc  IPETYNVVRK FRDVLDFEPQ -----PKHML IEAYTNLSMT MKYYD----- YGADFPFNFA FIKNVSRNSN
Am.AG.nuc  IPETYNVVRK FRDVLDFEPQ -----PKHML IEAYTNLSMT MKYYD----- YGADFPFNFA FIKNVSRDSN
Dm.CG.nuc  QPEDYGLLQH WRQLLDNYTA NHDGPLRIMM TEGYASVSQL MEYEDSNGV QGPQFPFNFD FITELNANST
Cs.maltase RPETFEMVTE WRATLEEFKQ KNGGPTRVLM VEAYAPLTKV IQIYGQNGQL NGAQIPFNFE FLNLGAVSN
Am.maltase QPETYELVKE WRDFVDNYAE ENKRDEIVLL TEAYSSLENT LKYYE----- VGSNVPFNFK FITDANSST
Ls.ScrA.nu VAAMANIAQG AATFAVFVFT KN---KQKQS LTTSAGISAM LGITEP--AL FGVNLKLKFP FFIGLIASGI
Clustal Co      . : : : : : : : : : : : : * : : : * : :

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360     370     380     390     400     410     420
Af.AG.nuc  SSDFKKLVDN WMTYMPXGI PNWVPGNXDX LRVSRFGEE KGRMITTMSL LLPGVSVNYY GDEIGMSDT-
Am.AG.nuc  SSDFKKLVDN WMTYMPXGI PNWVPGNHDQ LRLVSRFGEE KARMITTMSL LLPGVAVNYY GDEIGMSDT-
Dm.CG.nuc  AADFVFYISR WLIYMPGHV ANWVMGNHDN PRVASRFGEK SVDAMNMLLM TLPGIGITYN GEELGMTDYR
Cs.maltase ARDFKDVIDN YLSTIPEGAT PNWVQGNHDQ HRSASRLGPQ KADAVNMLLQ VLPGAAVTYY GEELAMEDV-
Am.maltase PEQFKVIIDN WIKGTPQNNV PNWVMGNHDR VRVGTRY-PG RADHMIMLEM ILPGVAVTYY GEEIGMVDN-
Ls.ScrA.nu SSFIIGLLHV LSVSMGPAGI IGFIAIAPKS IP----- SFMMGAIISF VIAFVGTYLY GKAMKMTTEE
Clustal Co      . : : : : : : : : : : : : : : : :

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          430     440     450     460     470     480     490
Af.AG.nuc  YISWEDTQDP QGCGAGKENY QTM SRDPART PFQWDDSLSA GFSSSSN--- --TWLRVNEN YKT-VNLAAE
Am.AG.nuc  YISWEDTQDP QGCGAGKENY QTM SRDPART PFQWDDSVSA GFSSSSN--- --TWLRVNEN YKT-VNLAAE
Dm.CG.nuc  DISWSDTVDP PACEAGIDNY KTISRDPERT PMQWSSDVNA GFSSADR--- --TWLPVNP N YKE-LNLRNQ
Cs.maltase FVPWSRTVDP QACTTDPNIF HAKSRDPART PMIWTSQKNA GFSSSNY--- --TWLPTGPD YRK-NNVEVQ
Am.maltase -----TTIY KYDVRDGCRT PFQWDNSINA GFSKIAENLL EKNWLPVHTS YKSLGNLEQE
Ls.ScrA.nu EIINEAPATP EVVERLQDEK ISAPVTG--R IVDLASVPDP VFASEAMG-- --KGIAIMPT SQDVLAPVTG
Clustal Co      : : : : : : : : : : : : : : : :

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          500     510     520     530     540     550     560
Af.AG.nuc  KKDKNSFFNM YKKFALLKKS PYFKEANLST RMLNDNVFAF SRETEDNGSL YVIMNFSNEE QIVDLKAFDH
Am.AG.nuc  KKDKNSFFNM FKKFASLKKS PYFKEANLST RMLNDNVFAF SRETEDNGSL YAILNFSNEE QIVDLKAFNM
Dm.CG.nuc  QQARRSHYKI YQSLKLRLQ PVLKNGSFVP EVVNRVFAF KRELKNEHTL LTVINVSNRT ELVDIAOFIE
Cs.maltase RSQRGSHLNI FKKLTQLRKQ DILMYGTYS YLANDDVLVI KREIENNRTL IAVLNLGFTE QVNLNLNDR
Am.maltase KKDSISHYHL YTNLTALRKR DVLKGNFTI EILNKTVLAV VRQSEEE-AV SLLINFSKNN TIVDISKLVN
Ls.ScrA.nu VITIAANTGH AYGIKSDOGA EVLTHIGLDT VNLNGIGFEK IVQGGQHVSE GDLLGHFDID KIKQAGLTPL
Clustal Co      : : : : * : : : : : : : : : :

```

Figure 14. (continued)

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
      570      580      590      600      610      620
Af.AG.nuc V---PKRLNM FYNNFNSDIK SIS--NNEKI KVPALRFXIL ISQDAKFENI F-----
Am.AG.nuc V---PKKLMN FYNNFNSDIK SIS--NNEQV KVSALGFFIL ISQDAKFGNF -----
Dm.CG.nuc Q---PNRLSV LVAGVDSQHR VGDRLKAETI ELAPNEGLVI QLNKRK----
Cs.maltase DWKVPERMEV ATASVNAGMF ERQPVVTSEV YVSAGVGVLV DYQVGRQIPE PRGDDPGLYE -----
Am.maltase K---RNNAKI YTSSVNSNLT VNQTVNPVAI NIPGDTSIIV DSSTSGATIV NYSIMIFLSA VFISFFQR
Ls.ScrA.nu T-----MT IVTNTAGYAQ VDPLLTVDKA AMQGEEIIQL 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

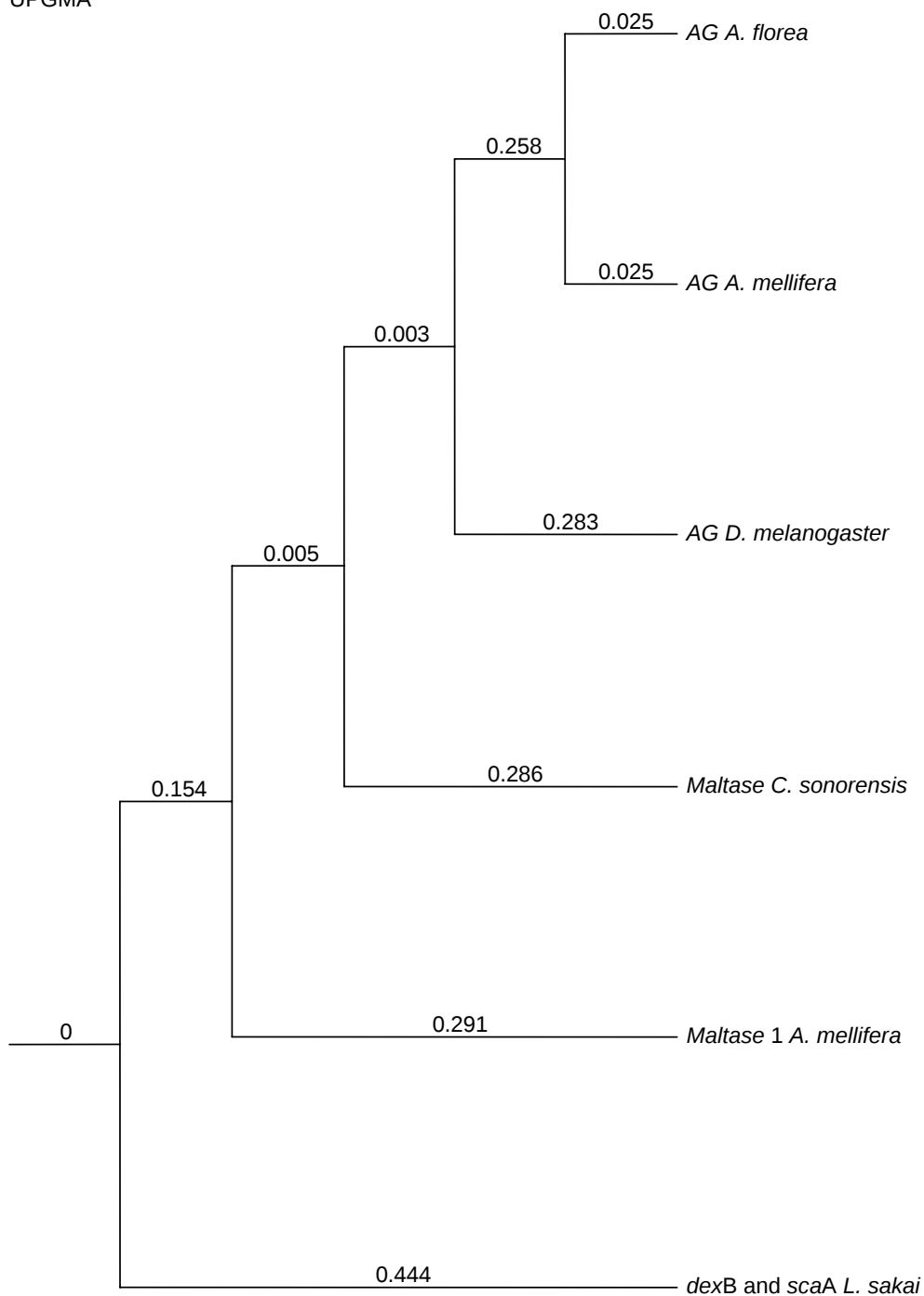


Figure 15. A phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of AG in *A. florea* among other organisms by UPGMA method. A number on each branch indicate differential.

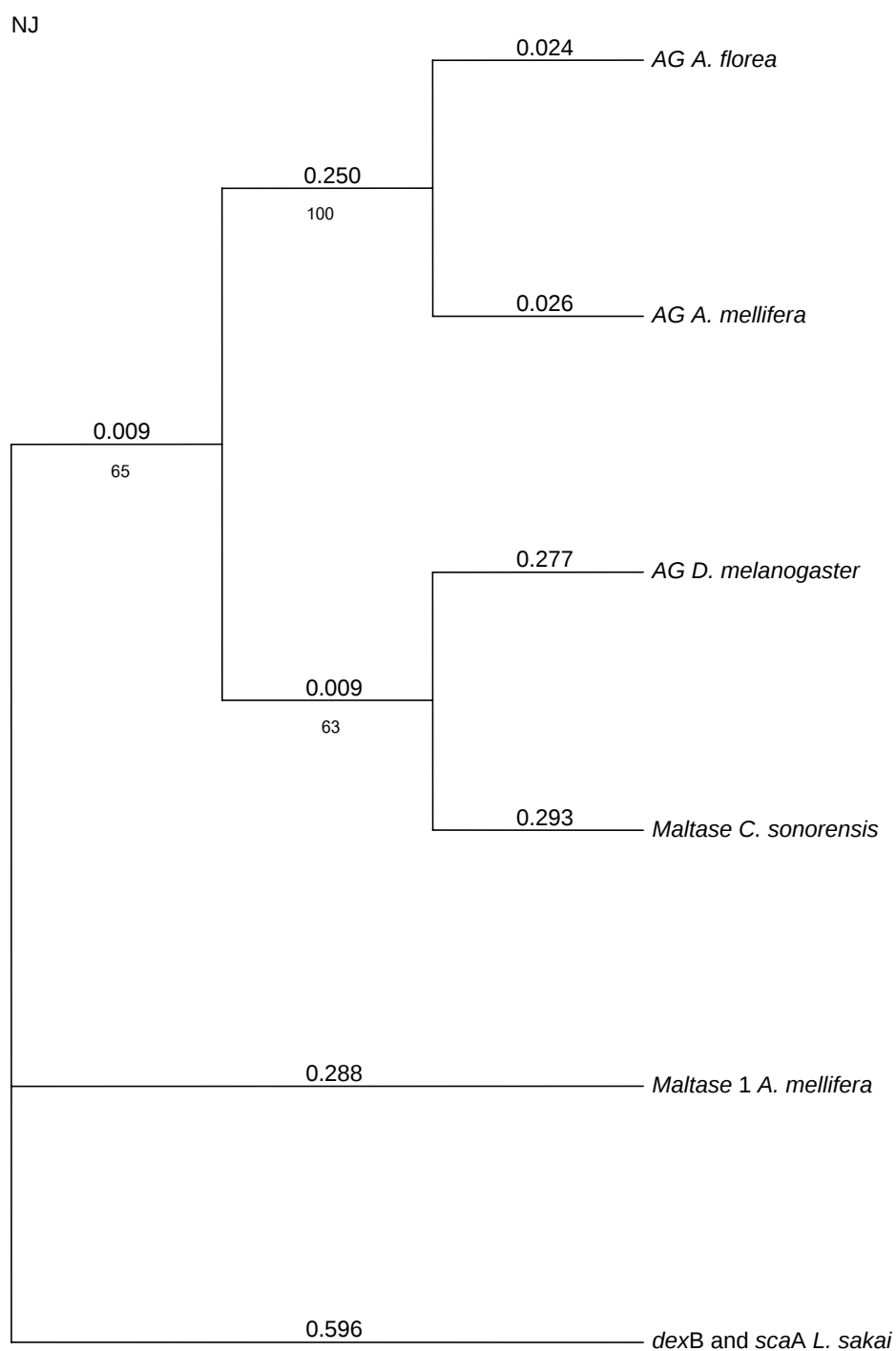


Figure 16. A phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of AG in *A. florea* among that in other organisms by NJ method. The upper numbers on each branch indicate the differential between genes. The lower numbers (in bold type) were the full heuristic bootstrap percentages of 1,000 replicates.

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.

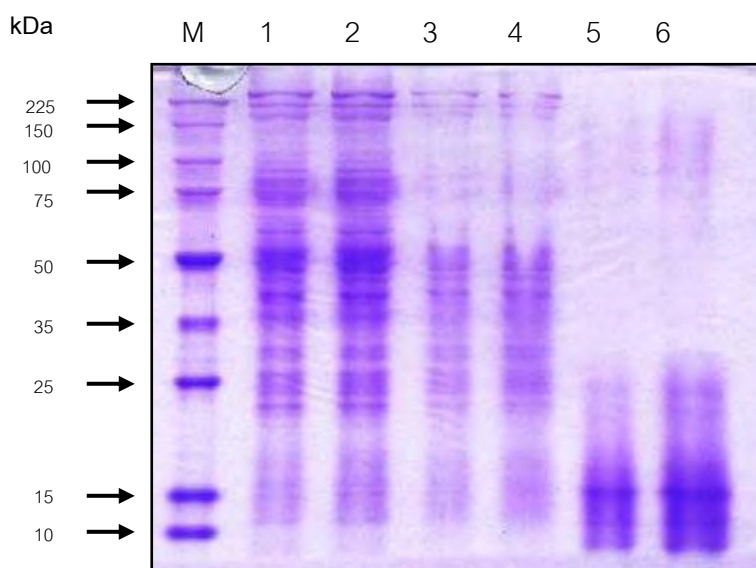


Figure 17. Pattern of major proteins in crude of head and honey crop.

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).

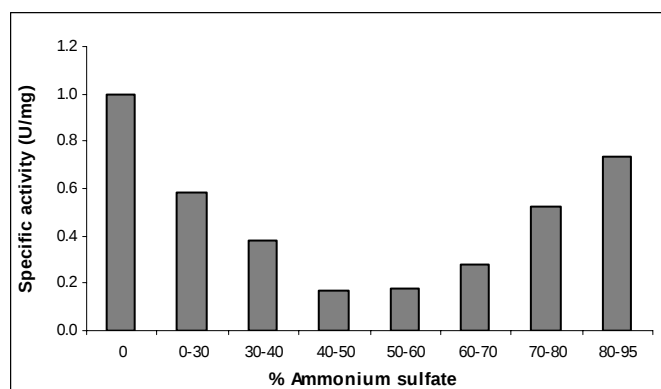


Figure 18. Specific activity of crude precipitation by various concentrations of ammonium sulfate.

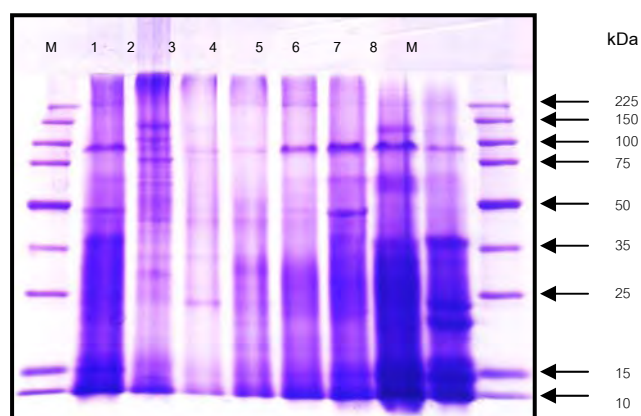


Figure 19. Protein profile of precipitate from various concentrations of ammonium sulfate (AS). Protein (20 μ g) of all precipitates were electrophoresed by SDS polyacrylamide gel and CBB stained.

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.

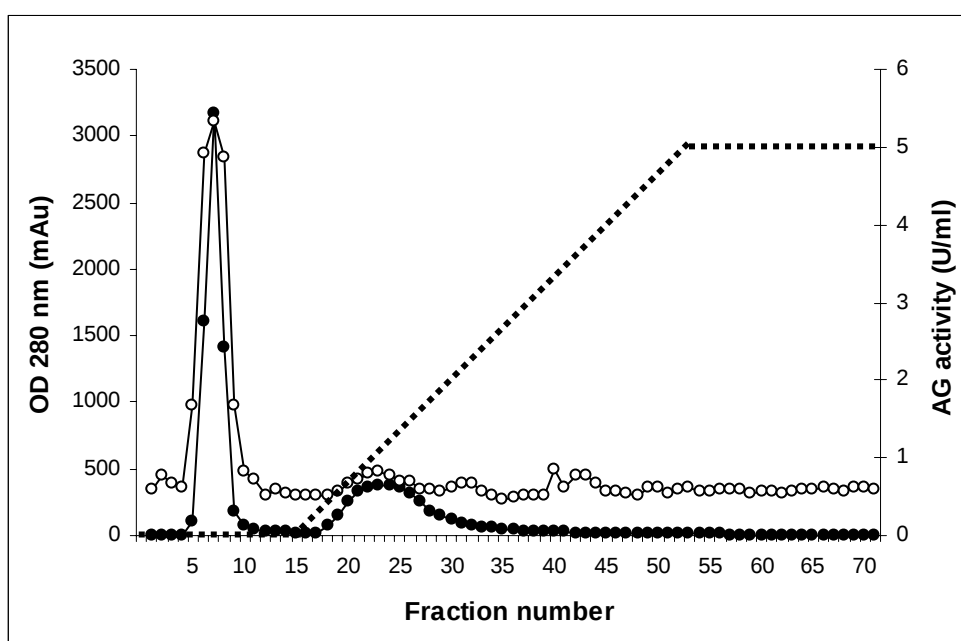


Figure 20. AG on a DEAE-cellulose column. Crude protein, 300 mg; column, 1.6 x 13 cm; equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— OD at 280 nm; —○— , alpha glucosidase activity; , molarity of NaCl.

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).

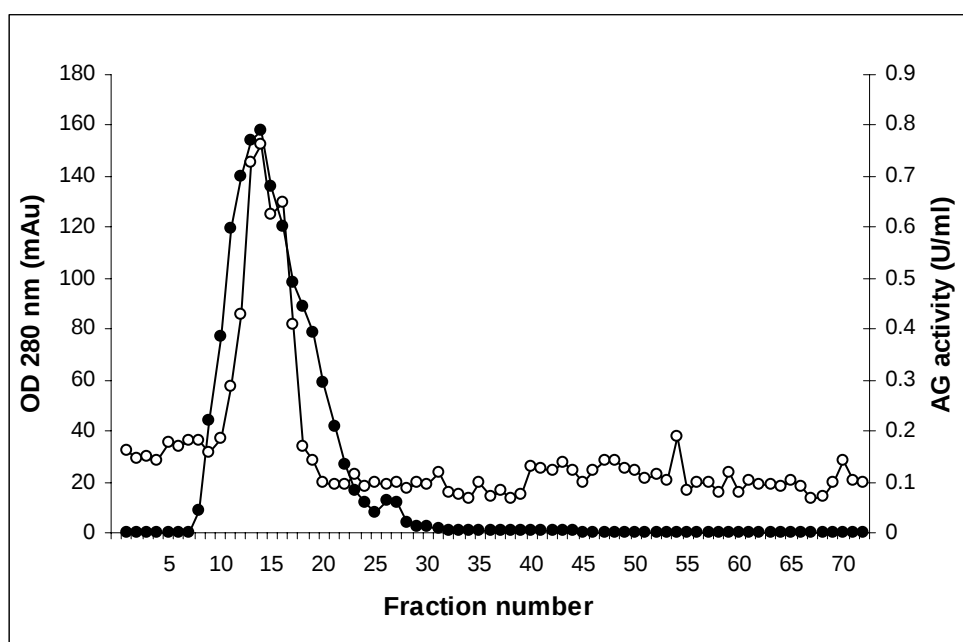


Figure 21. AG on a gel filtration (Superdex 200) column. Bound peak solution of DEAE, 10 mg protein; column, 1.6 x 51 cm; equilibrium and elution, 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 mM NaCl (pH 6.3); flow rate, 30 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— , OD at 280 nm; —○— , AG activity.

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).

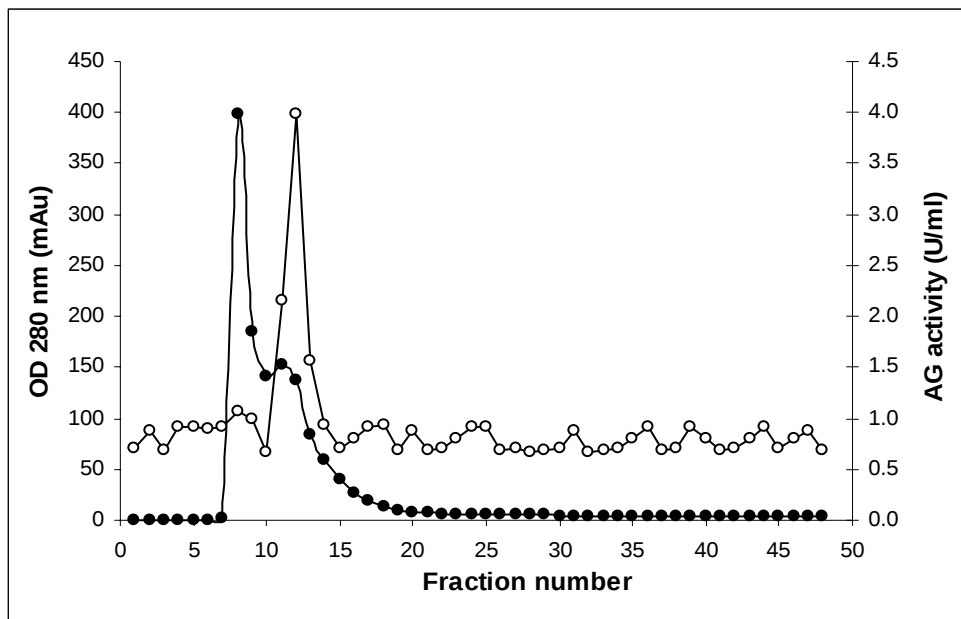


Figure 22. AG on a gel filtration (Superdex 200) column. Unbound peak sample of DEAE - cellulose, 18 mg protein; column, 1.6 x 38 cm; equilibrium and elution, 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 mM NaCl (pH 6.3); flow rate, 30 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— , OD at 280 nm; —○— , AG activity.

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.

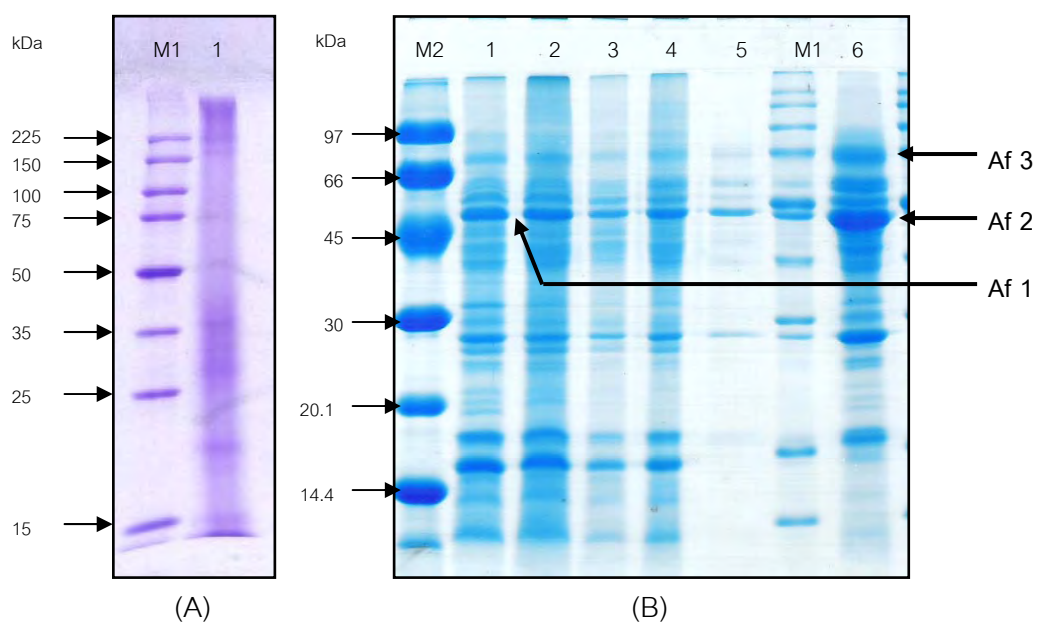


Figure 23. CBB staining of SDS - PAGE.

Lane 1 (A): filtered sample (40 µg) 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.

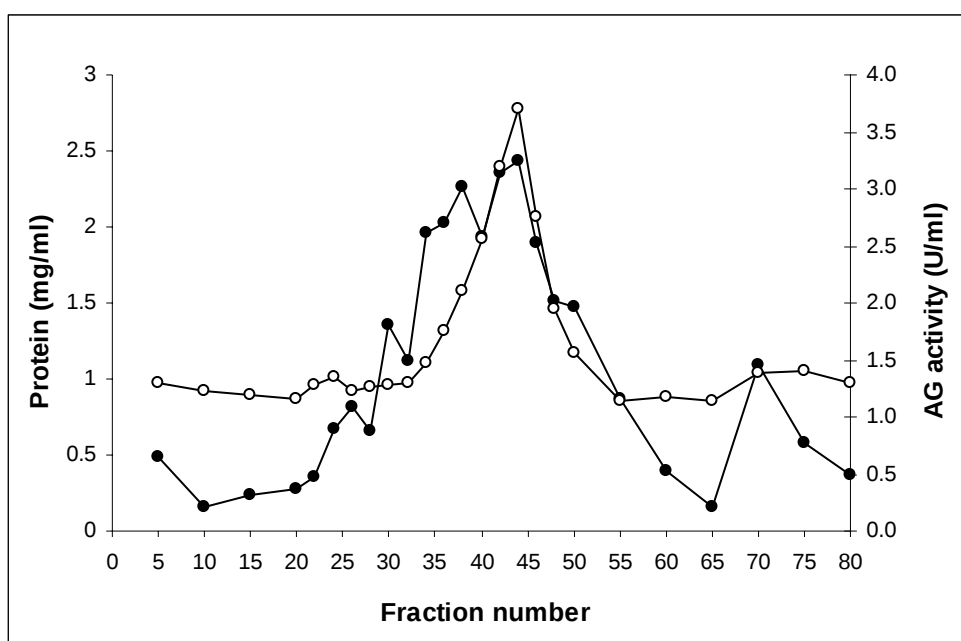


Figure 24. AG on a gel filtration (Sephadex G - 150) column. Unbound peak sample of DEAE, 10 mg protein; column, 1.5 x 87 cm; equilibrium and elution, 30 mM sodium phosphate buffer containing 100 M NaCl (pH 6.3); flow rate, 15 ml/ h; fraction size, 3 ml; —●— , protein concentration (Bradford's assay);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

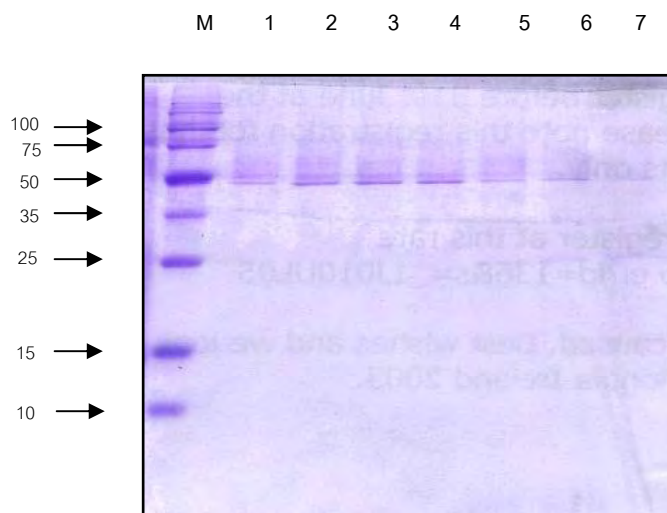


Figure 25. SDS - PAGE of positive fractions from Sephadex G - 150. Lanes 1-7 contained fraction# 40 – 46 (100 µg), respectively.

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).

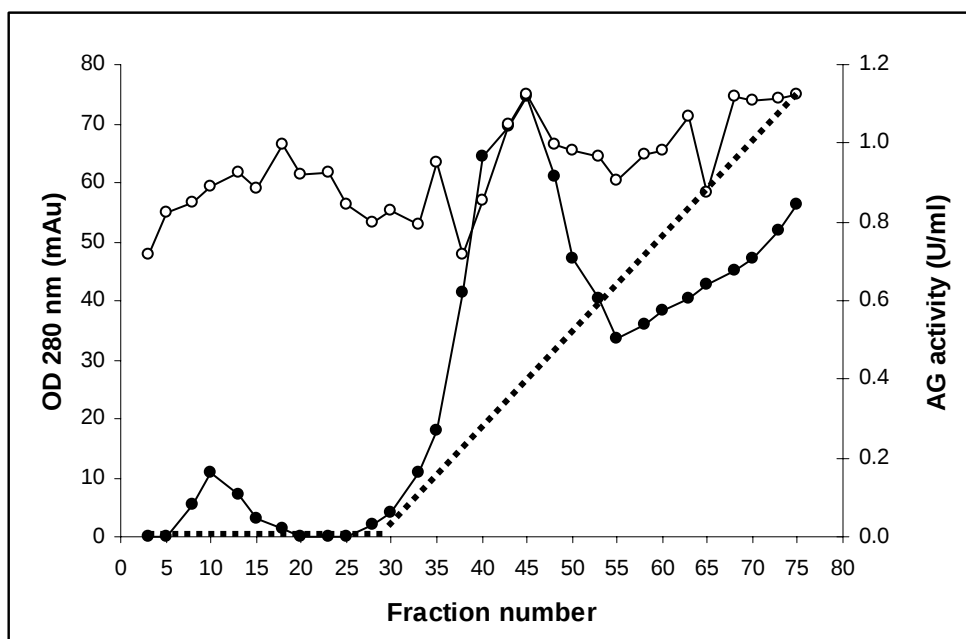


Figure 26. AG on CM cellulose. Unbound peak sample of DEAE, 100 mg protein; column, 1.6 x 13 cm; equilibrium, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— OD at 280 nm; —○— , AG activity; , molarity of NaCl

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).

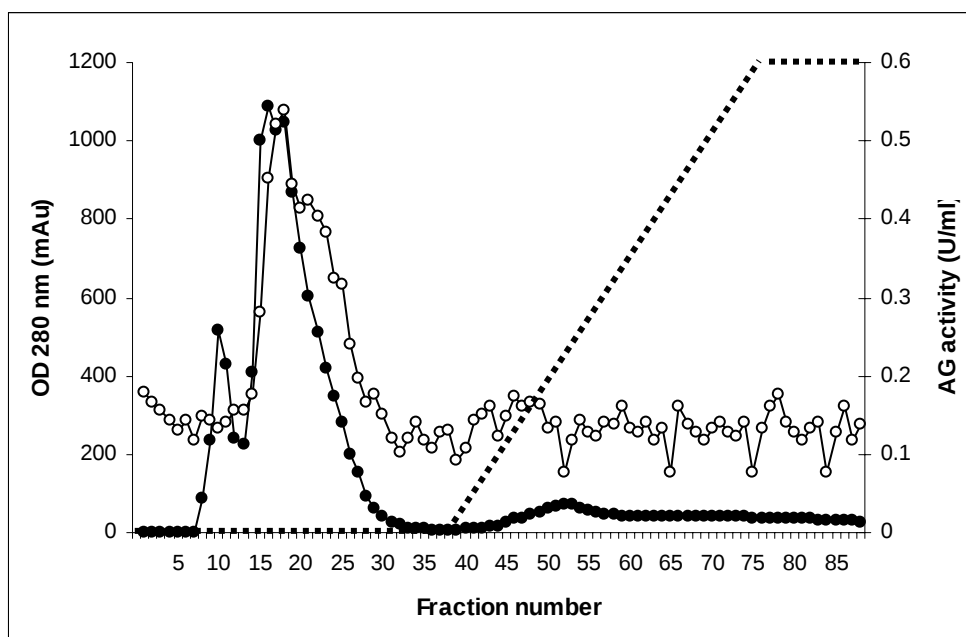


Figure 27. AG on CM cellulose. Crude protein, 300 mg; column, 1.6 x 13 cm equilibrium, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— OD at 280 nm; —○— , AG activity; , molarity of NaCl.

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.

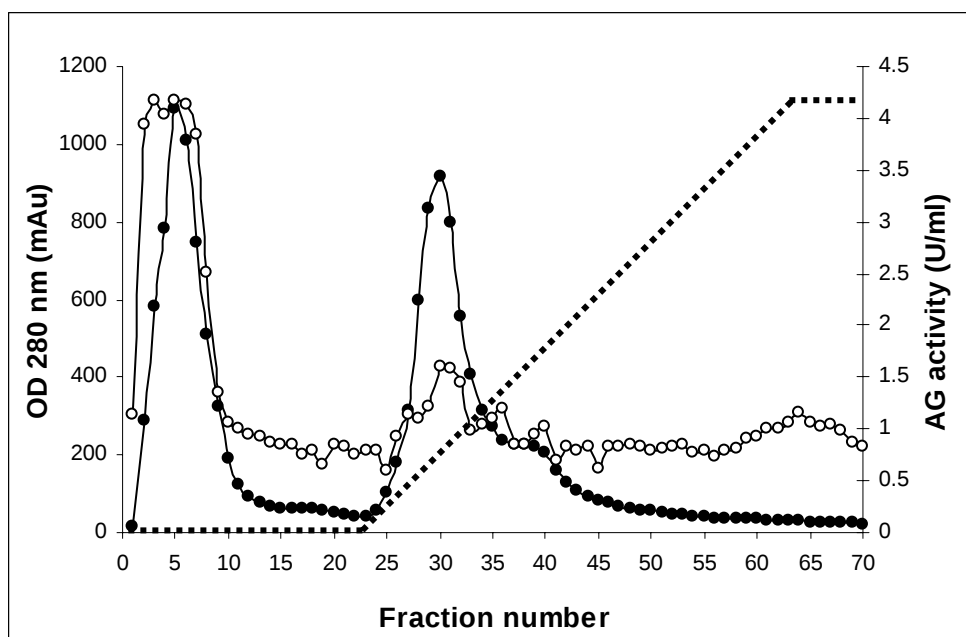


Figure 28. Unprecipitated AG on DEAE cellulose. Crude protein without precipitation with ammonium persulfate, 250 mg; column, 1.6 x 13 cm; equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 0 - 1 M NaCl; flow rate, 60 ml/ h; fraction size, 10 ml; —●— , OD at 280 nm; —○— , AG activity; ······,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

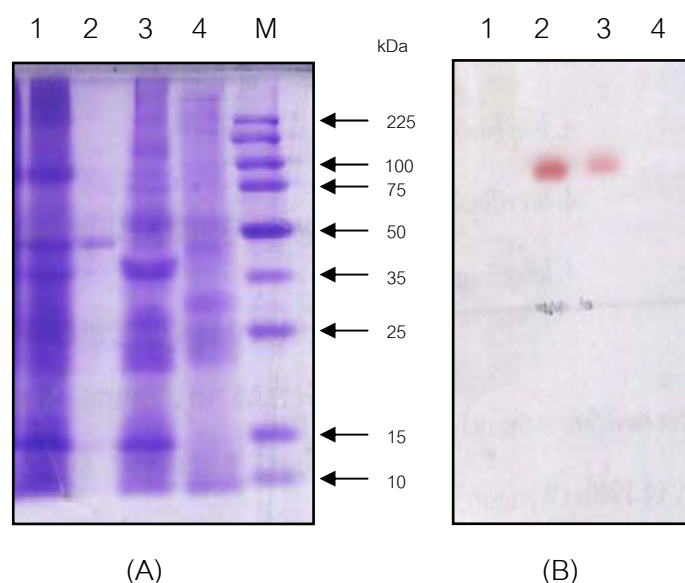


Figure 29. CBB staining (A) and activity staining (B) of fractions containing highest activity from DEAE – cellulose and Sephadex G – 150.

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.

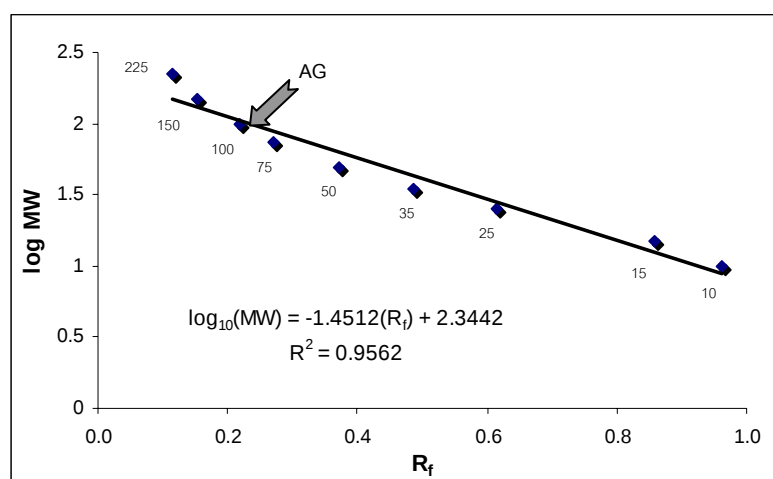


Figure 30. Relationship between R_f value and log MW of broad range protein MW marker. MW of AG from Fig. 21 was estimated.

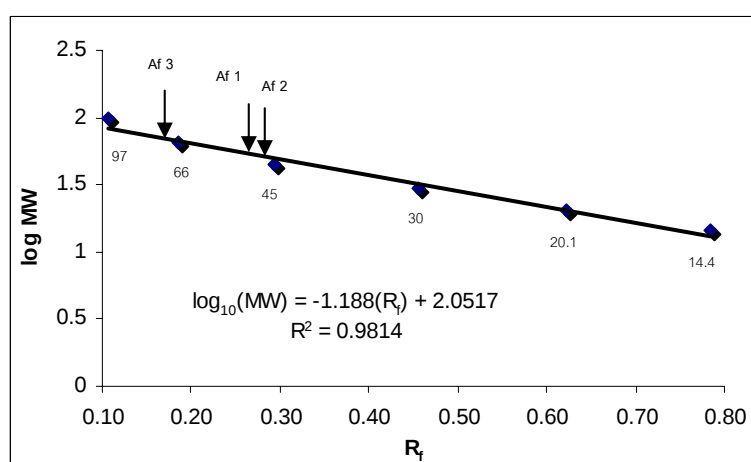


Figure 31. Relationship between R_f value and log MW of low MW marker. MW of Af1, Af2, and Af3 from Fig. 15 was calculated. The LMW standard marker contains phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and alpha - 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	PLPENLK <u>EDL</u>	<u>IVYQVYPRSF</u>	<u>KDSNGDGIGD</u>	50
51	IEGIKEKLDH	FLEMGVDMFW	LSPIYPSPMV	DFGYDISNYT	DVHPIFGTIS	100
101	DLDNLVSAAH	EKGLKIILDF	VPNHTSDQHE	WFQLSLKNIE	PYNNYYIWHP	150
151	GKIVNGKRVP	PTNWVGVFVG	SAWSWREERQ	AYYLHQFAPE	QPDNLNYPNV	200
201	VLDDMQNVLR	FWLRRGFDGF	RVDALPYICE	DMRFLDEPLS	GETNDPNKTE	250
251	YTLK <u>IYTHDI</u>	<u>PETYNVVRKF</u>	RDVLDEFPPQ	KHMLIEAYTN	LSMTMK <u>YYDY</u>	300
301	<u>GADFPFNFAF</u>	<u>IKNVS</u> RDSNS	SDFKKLVDNW	MTYMPPSGIP	NWVPGNHDQL	350
351	RLVSRFGEEK	ARMITTMSLL	LPGVAVNYYG	DEIGMSDTYI	SWEDTQDPQG	400
401	CGAGKENYQT	MSRDPARTPF	QWDDSVSAGF	SSSSNTWLRV	NENYKTVNLA	450
451	AEKKDK <u>NSFF</u>	<u>NMFKK</u> FASLK	KSPYFK <u>EANL</u>	<u>NTRMLNDNVF</u>	<u>AFSRE</u> TEDNG	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	DLDNLVSAAH	EKGLKIILDF	VPNHTSDQHE	WFQLSLKNIE	PYNYYYIWHP	150
151	GKIVNGKRVP	PTNWVGVFEG	SAWSWREERQ	AYYLHQFAPE	QPDLYNNPV	200
201	VLDDMQNVLR	FWLRRGFDGF	RVDALPYICE	DMRFLDEPLS	GETNDPNKTE	250
251	YTLKI IYTHDI	PETYNVVRKF	RDVLDEFQPP	KHMLIEAYTN	LSMTMKYYDY	300
	IYTHDI	PETYNVVR			YYDY	
301	GADFPFNFAF	IKNVSRDSNS	SDFKKLVDNW	MTYMPPSGIP	NWVPGNHDQL	350
	GADFPFNFAF	IK				
351	RLVSRFGEEK	ARMITTMSLL	LPGVAVNYYG	DEIGMSDTYI	SWEDTQDPQG	400
401	CGAGKENYQT	MSRDPARTPF	QWDDSVSAGF	SSSSNTWLRV	NENYKTVNLA	450
451	AEKKDKNSFF	NMFKKFASLK	KSPYFKEANL	NTRMLNDNVF	AFSRETEDNG	500
	NSFF	NMFKK	EANL	NTRMLNDNVF	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.

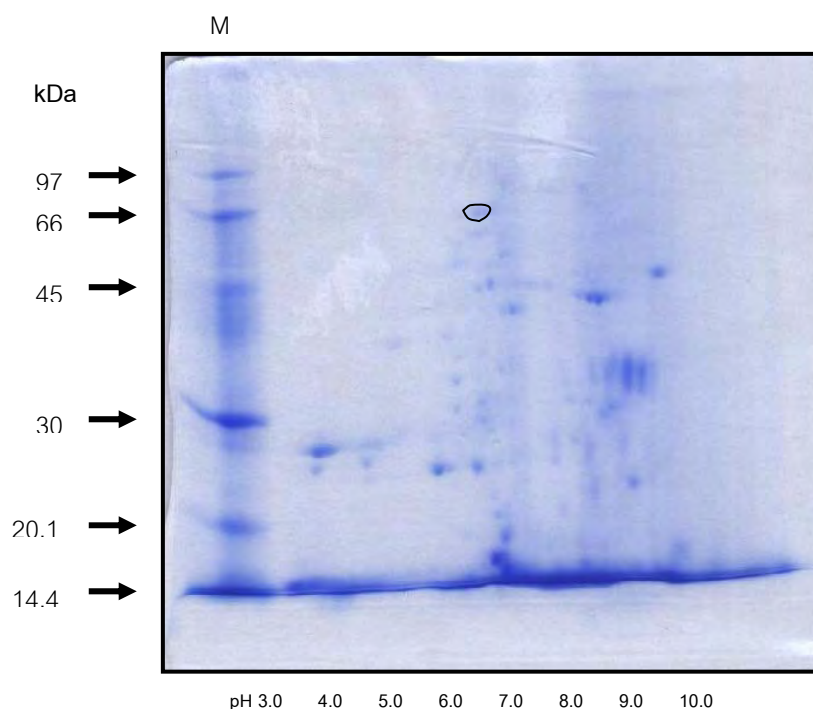


Figure 34. Two - D electrophoresis of crude protein (2 mg). Lane M contained low MW marker.

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

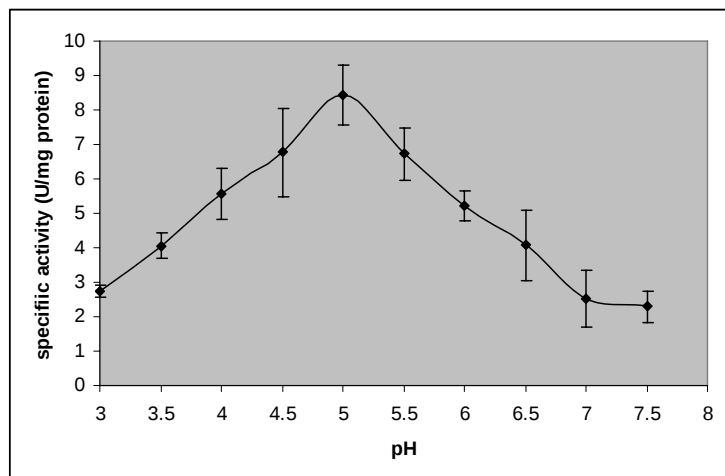


Figure 35. The optimum pH of partial purified AG in *A. florea*. Briton - Robinson buffer at various pHs ranging between 3.0 - 7.5 was used. The optimum pH is 5.0.

9.2 Optimum temperature

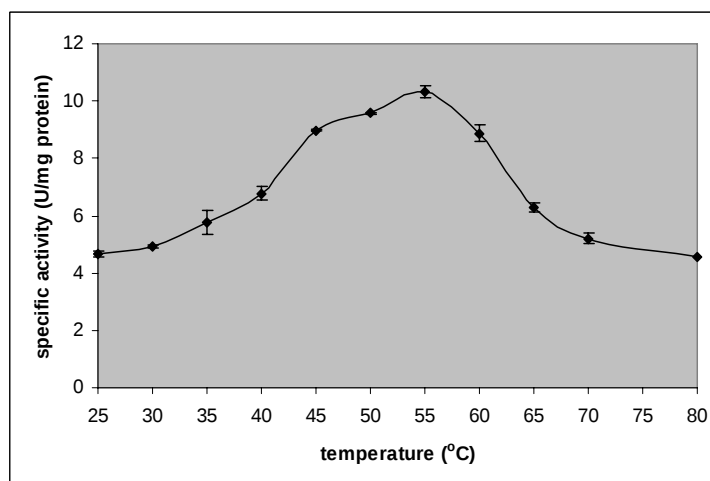


Figure 36. The optimum temperature partial of purified AG of *A. florea*. The reaction mixture in acetate buffer (pH 5.0) containing 0.1 M sucrose was incubated at various temperatures ranging among 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, and 80°C for 10 min. The optimum temperature is 55°C.

9.3 Selective concentration of substrate for partial purified AG

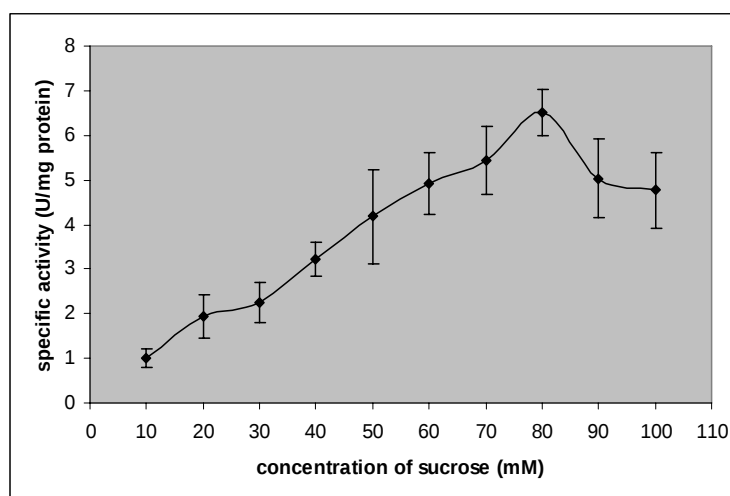


Figure 37. The optimum concentration of sucrose of partial purified AG in *A. florea*. The reaction mixture was incubated with sucrose at various concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 mM, respectively. The optimum concentration of sucrose is 80 mM.

9.4 Optimum incubation time of partial purified AG

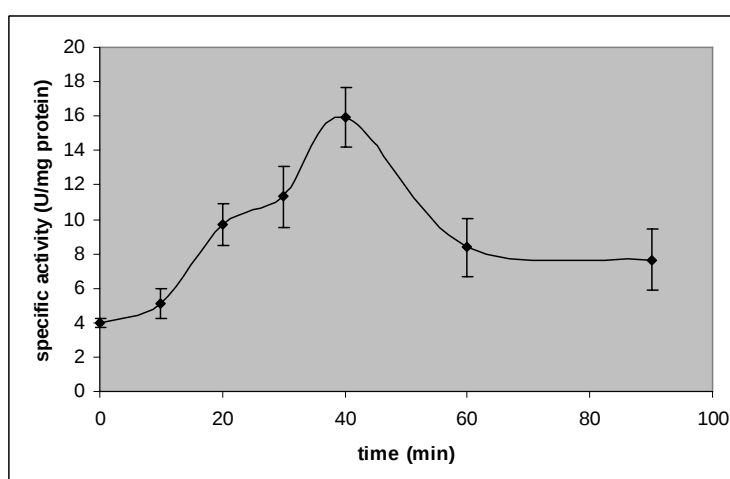


Figure 38. The optimum incubation time of purified AG in *A. florea*. The reaction mixture was incubated at 55 °C for 10, 20, 30, 40, 60, and 90 min, respectively. The optimum incubation time is 40 min.

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).

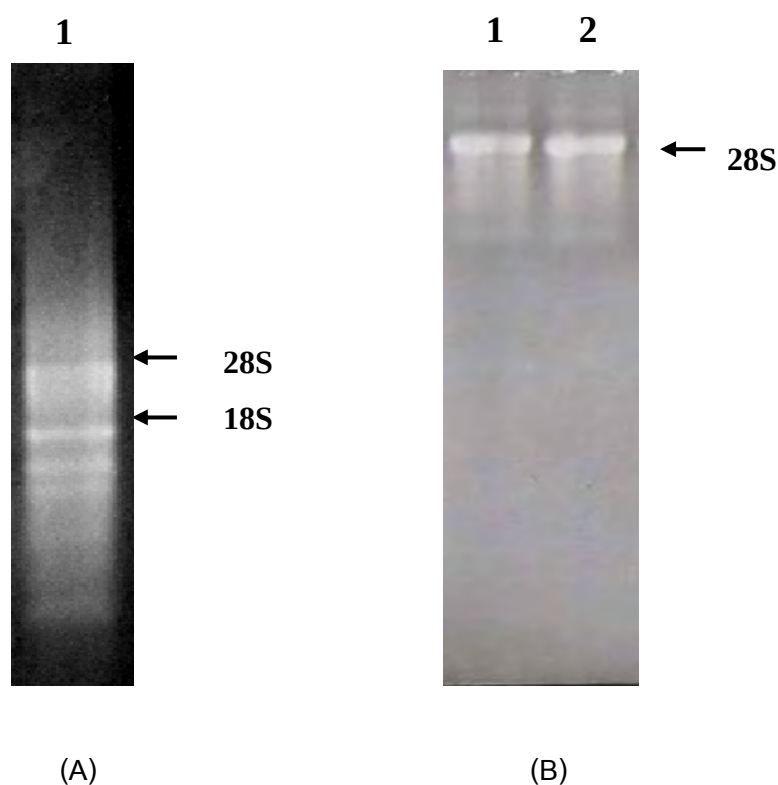


Figure 39. Total RNA extracted from HPGs of forager bees was electrophoresed on 1.2% (w/v) agarose gel (A) and formaldehyde gel (B).

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.

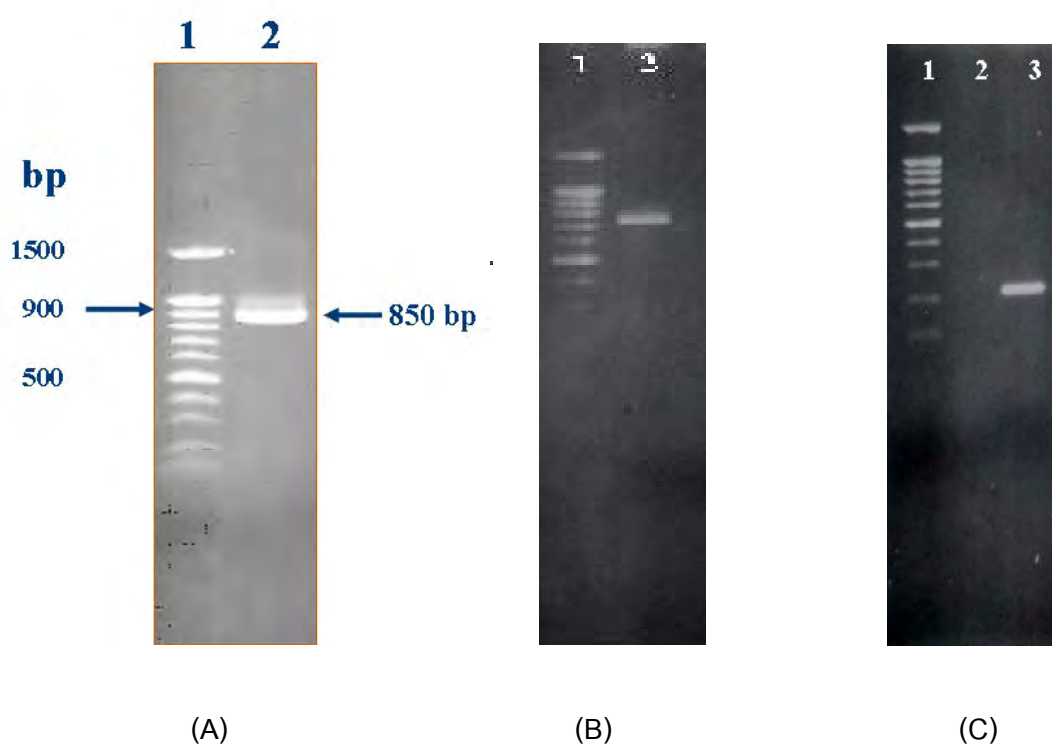


Figure 40. The RT - PCR product of AG from HPGs. Lanes 1 in all figures contained 100 bp ladder marker. Lane 2 contained product by FW2 and R3 primers (A) and product by FW2 and oligo dT primers (B). Lane 3 contained product by FW3 and R3 primers (C).

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).

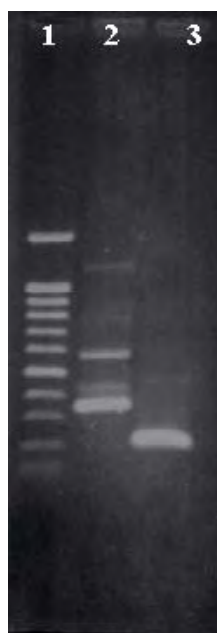


Figure 41. Control primers for RT - PCR amplification.

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
CCAATAATT 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 TACACTCTCA 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 TTTTGCATTG ATCAAGAATG TCTCTAAGGA TTCAAATTCA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      970      980      990     1000     1010     1020
TCAGACTTCA AGAAATTGGT CGATAATTGG ATGATATACA TGCCAGCAGA TGGTATTCTT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     1030     1040     1050     1060     1070     1080
AACTGGGTGC CCGGAAATCA CGATCAATTG AGATTGGTGT CGAGATTTGG AGAGGAGAAG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     1090     1100     1110     1120     1130     1140
GCCCGTATGA TCACCGCGAT GTCGCTTTTG CTGCCAGGTG TTGCCGTGAA TTACTIONGCT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     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 CAGTGTTTTT 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.

```

-----+-----+-----+-----+-----+
MKAVIVFCLM ALSIVDAWK PLPENLKEDL IVYQVYPRSF KDSNGDGIGD  50
IEGIKEKLDH FLEMGVDMFW LSPIYSPMV DFGYDISNYT DVHPIFGTIS 100
DLNLVNAAH EKGLKIILDF VPNHTSDQHE WFQLSLKNIE PYNYYYIWHP 150
GKIVNGKRVP PTNWVGVFEGG SAWSWREERQ AYYLHQFAPE QPDLNYYNPV 200
VLDDMQNVLR FWLRRGLDGF RVDALPYICE DMRFLDEPLS GETNDPNKTE 250
YTLKIYTHDI PETYNIVRKF RDVLDEFPQP KHMLIEAYTN LSMTMKYYDY 300
GADFPFNFAF IKNVSRDSNS SDFKKLVNDW MTYMPPSGIP NWVPADHDQL 350
RLVSRFGEEK ARMITAMSLL LPGVAVNYYG DEIGMSDTYI SWEDTQDPQG 400
CGAGKENYQT MSRDPARTPF QWDDSVSAGF SSSSNTWLRV NENYKTINLA 450
AEKKDKNSFF NMFKKFMLK KSPYFKEANL NTRMLNDSVF AFSRETEENG 500
SLYAILNFSN EEQIVDLKAF NNVPKKLNMF YTIFNSDIKS ISNNEQIKVS 550
ALGFFLLISQ DAKFGNF                                     567

```

Figure 43. The amino acid sequence of alpha – glucosidase deduced from the cDNA sequence. The underline amino acid sequences were different from amino acid of AG in *A. mellifera* recorded in Genbank.

3. Sequence homology and phylogenetic trees

The cDNA sequences alignment were compared with the sequences of AG in *A. mellifera* (D79208), maltase 1 in *A. mellifera* (XM_393379), *Drosophila melanogaster* CG1493 _ 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). As shown in Fig. 44, the multiple alignments were sequenced and compared for homology. The deduced amino acid sequences of AG were aligned with other organism (Fig. 45). The consensus sequences are obtained.

```

      ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
              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	TTGCATGTTC	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	AACAAG-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	TTTATTTTTTC	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	GTCGGTTAT-	TTAAAGGAAA	
Dm.CG.nuc	ATTGGTGATC	TTCAAGGTAT	TACTTCTAGG	CTACAGTAC-	TTCAAGGATA	
Am.maltase1	ATCGGGGATT	TAAAAGGTAT	TAAGGATAAG	CTTTCACAC-	TTTCATCGAAT	
Ls.ScrA.nu	GATGGCAAAT	ATTGCTCAAG	GGGCTGCAAC	TTTCGCTGTA	TTCTTCGTTA	
Clustal Co	** *	*	*	*	** *	
						
		210	220	230	240	250
Am.AG.nuc	TGGGGGTCGA	CATGTTTTGG	TTATCCCCTA	TTTATCCAAG	CCCTATGGTC	
AC.AG	TGGGCGTCGA	TATGTTTTGG	TTATCTCCTA	TTTATCCAAG	TCCTATGGTC	
Cs.Maltase	TCGGCATGGA	TGGTGTGGT	CTTTCACCGA	TTTTTGATTG	ACCTATGGCA	
Dm.CG.nuc	CGGGCATCAC	GTCCGTATGG	TTGAGTCCCA	TTTATGAGTC	ACCAATGGTA	
Am.maltase1	CTGGAATAAC	AGCGATATGG	TTATCACCAA	TTAATCGAAG	TCCTATGGTA	
Ls.ScrA.nu	CTAAGAATAA	ACAACAAAAG	TCATTAACGA	CTTCTGCTGG	GATTTCTGCT	
Clustal Co		*	*	*	*	

Figure 44. (continued)

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

	260	270	280	290	300
Am.AG.nuc	GATTTTGGTT	ACGACATTTTC	GAATTACACC	GACGTTTCATC	CCATATTTTGG
AC.AG	GATTTTGGTT	ATGACATTTTC	GAATTACACC	GATGTTTCATC	CCATATTTTGG
Cs.Maltase	GATTTTGGTT	ATGACATTTTC	AAATTTTCACC	AAAGTCTTCC	CTCAATTCGG
Dm.CG.nuc	GACTTTGGAT	ACGATATATC	TAAGTATACA	AATATACAGC	CGGAATATGG
Am.maltase1	GATTTTGGAT	ACGATATATC	TGACTTTTAAA	GATGTAGATC	CAATATTTTGG
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	AACTTGATAG	GGAATTCAAT	AAAAAAGATA
Dm.CG.nuc	CACCTTGAG	GACTTTGACG	CCTTGATAGC	CAAGGCCAAT	GAAGTGGGCG
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	TCGTTCCGAA	TCATACATCT	GATCAACATG
Cs.Maltase	TGA--AACTC	ATTCTGGACT	TTGTTCCAAA	TCATACAAGT	GACCAATGTG
Dm.CG.nuc	TGA--AAGTT	ATTTTGGACT	TTGTTCCCAA	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	** *	* *	**	* *	
					
	510	520	530	540	550

Figure 44. (continued)

```

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 TTGGCTGTGC GTGTTCTCCG
Am.maltase1  AAATCCAATT AAAGACAAAT ATCCTAATAA TTGGCTTAGT GTATTCAATG
Ls.ScrA.nu   AAAAGGCAAT GAAGACAAC  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.maltase1  GTACAGGATG GACTTTCCAC GAGGGTAGGA AACAATTTTA TTTCCATCAA
Ls.ScrA.nu   ACCCCAGA-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   TTTTGGCAC AACAACCCGA TTTGAATTAC CG--CAATCC AAAA---GTG
Dm.CG.nuc    TTCATTATG GACAACCCGA TTTGAATTAC CG--AAATCC CGCC---GTG
Am.maltase1  TTTTATAAGC AACAACCAGA CTTGAATTAC AG--AAATCC GGAT---GTG
Ls.ScrA.nu   TTACCGGACG AATTGTTGAC TTAGCATCAG TACCTGATCC AGTTTTTGA
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.maltase1  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 CCGTACCATA TTTGTTTGAA GTGGGACC--
Dm.CG.nuc    TGCCGGCTTC CGCATCGATG CCATTATATA TATTACGAG  GATGCTCA--
Am.maltase1  CGATGGATTG CGCATAGATG CTGTACCACA TTTATTCGAA AGCGCTAACA
Ls.ScrA.nu   ACTTGCACCA GTTACCGGTG TGATAACAAT TGCGGCTAAT ACTGGTCACG
Clustal Co
              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              760      770      780      790      800
Am.AG.nuc    -ATTCTTAGA CGAACCTCTA TCAGGT--GA AACAAATGAT CCCAATAAAA

```

Figure 44. (continued)

AC.AG	-ATTCTTAGA	CGAACCCTA	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	TTACTTGTAT	CACGATTACA	CTCAAAACAG
Dm.CG.nuc	TGAGGCCTAC	TTGAGCCACA	TC-----	-----TATA	CCAGAAATCA
Am.maltase1	CCACGCTTCT	TTAAATCACA	CT-----	-----TTAA	CGAAAGATCA
Ls.ScrA.nu	TTAGATACAG	TTAATTTAAA	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	GGTCACGG--	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	TCATTTTGAT
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	AGAGTTTTTA	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	TGACTATTGT
Clustal Co		*			*
					
	960	970	980	990	1000
Am.AG.nuc	GGCATAACAG	AA----TTTA	TCGATGACGA	TGAAATATTA	CGATTA----
AC.AG	GGCATAACAG	AA----TTTA	TCGATGACGA	TGAAATATTA	CGATTA----
Cs.Maltase	AGCTTATGCT	CC----ATTA	ACAAAAGTAA	TTCAAATTTA	TGGTCAAAAT
Dm.CG.nuc	GGGTTATGCT	TC----GGTG	TCGCAACTAA	TGGAATACTA	TGAAGATTCT
Am.maltase1	GGCGTATTCT	TC----TTTA	GAGAACACTC	TCAAATATTA	CGAAGT----
Ls.ScrA.nu	GACGAATACA	GCGGGATATG	CACAAGTTGA	TCCGCTTTTA	ACAGTCGACA
Clustal Co	*	*	*	*	**
					
	1010	1020	1030	1040	1050
Am.AG.nuc	-----	-CGGAGCAGA	TTTTCCCTTC	AATTTTGCAT	TCATCAAGA-

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 GTTTCCTTC 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- --TTGGTTCGA
AC.AG      -ATGTCTCTA AGGATTCAAA TTCATCAGAC TTCAAGAAA- --TTGGTTCGA
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 GGCAAAATGC 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 AGCACAATCC CAGAAGGAGC AACACCAAAT TGGGTTC AAG
Dm.CG.nuc  CAGGTGGCTC ATCTATATGC CACATGGTCA TGTGGCCAAC TGGGTGATGG
Am.maltase1 CAATTGGATA AAAGGAACGC CCAAAAATAA TGTTCCAAAT TGGGTGATGG
Ls.ScrA.nu CAAGTCTATC CAAGAAGT-T TTCAAGATAG TAATGGAGAT GGAATTGGTG
Clustal Co      * * *               * * * *

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          1160      1170      1180      1190      1200
Am.AG.nuc  GAAATCACGA TC----- AATTGAGATT GGTGTCGAGA TTTGGAGAGG
AC.AG      GAAATCACGA TC----- AATTGAGATT GGTGTCGAGA TTTGGAGAGG
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  AGAAGGCCCG TATGATCACC ACGATGTCGC TTTTGC--TG CCAGGTGTTG
AC.AG      AGAAGGCCCG TATGATCACC GCGATGTCGC TTTTGC--TG CCAGGTGTTG
Cs.Maltase AAAAAAGCTGA 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          * *           *               *

          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          1260      1270      1280      1290      1300
Am.AG.nuc  CCGTGAATTA CTA--CGGTG ATGAAATTGG TATGTCGGAT ---ACTTATA
AC.AG      CCGTGAATTA CTA--CGGTG ATGAAATTGG TATGTCGGAT ---ACTTATA

```

Figure 44. (continued)

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	GGTTCTATGG
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	AGATTCGTAA	--GATTAAAA
Clustal Co			*	*	*
					
	1360	1370	1380	1390	1400
Am.AG.nuc	AAACTATCAA	ACGATGTCGA	GAGATCCCGC	GAGA--ACG	CCATTCCAAT
AC.AG	AAACTATCAA	ACGATGTCGA	GAGATCCCGC	GAGA--ACG	CCATTCCAAT
Cs.Maltase	TATTTTCCAT	GCCAAGTCAC	GTGATCCCGC	AAGA--ACA	CCCATGATTT
Dm.CG.nuc	CAACTACAAG	ACGATTTCTA	GAGATCCTGA	GCGA--ACT	CCCATGCAAT
Am.maltase1	TGGTTGTCGT	ACACCATTCC	AA-----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	GGACTTCACA	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	GAAAATCAAA	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	GGACTAAATT	TGGAGCAAGA
Ls.ScrA.nu	GCGAGACCCT	GCAACCGATG	GTAGTGTTCC	GAATGATTTA	CAAAGTAATT
Clustal Co	*	*	**	* *	
					
	1510	1520	1530	1540	1550
Am.AG.nuc	AAAGAAGGAC	AA---GAAGT	CGTTCTTCAA	TATGTTCAAG	AAATTTGCGT
AC.AG	AAAGAAGGAC	AA---GAAGT	CGTTCTTCAA	TATGTTCAAG	AAATTTGCAA
Cs.Maltase	GTAGTCAGAG	AG---GCAGT	CA--CTTGAA	TATCTTTAAA	AAGTTGACTC

Figure 44. (continued)

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	GCCA-GTTCT	GAAGAACGGA	TCCTTTGT--	
Am.maltase1	CTTT-----	-AAGAAAG-A	GAGATGTGTT	GAAAAAAGGA	AACTTTAC--	
Ls.ScrA.nu	CATTTTATG	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	GGTTGACATC	GCGGACTT-T	ATAGAACAGC	CCAATCGATT	
Am.maltase1	ATAATACTAT	CGTGGATATA	TCAAAGTT-G	GTGAACAAAA	GAAAT-----	
Ls.ScrA.nu	GCAAAATTAA	GGAAAACGGA	CCGCAATTAC	ATGCGTATCT	TCAAGAGATG	
Clustal Co		*	*		**	

Figure 44. (continued)

Am.maltase1	AATGCTAAAA	TT-TACACAA	GCAGCGT---	-AAACT-CCA	ATTTGACAGT
Ls.ScrA.nu	AACGCAAGGG	TACTTTTACA	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--	TCAAATTCCC	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	GAAACTTTT	ATTTCTTCCT	GAATATGTC-	TATTCTTTGA	AGCGGCGA..
AC.AG	GAAATTTT	ATATCTCCCT	GAATATGTC-	TATTCTTTGA	AGCGGCGA..
Cs.Maltase	GTGACGATCC	AGGACTATAC	GAATAAGAAA	TATTCCTCAA	ATCTTTGA..
Dm.CG.nuc	-----	-----	-----	-----	-----
Am.maltase1	ATCATGATTT	TCTTATCCGC	AGTGTTTATA	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	AREKD---W	WEIGNFYQVY	PRSFMDSDGD
Dm.	VKIAFILSVG	LVGILAHKHQ	SKELDAKYNW	WQHEVFYQIY	PRSFQDSNGD
A.m.maltas	MKSLVVVLL	LAVGLGAGQN	--NKG---W	WKNAIFYQVY	PRSFMDSNSD
Ls.	-FVPLIPALT	AGGLMAINN	VLTGQG---L	FGAQSIQVMF	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 DGWLSPIFD SPMADFGYDI SNFTKVFPQF
Dm.	GIGDLQGITS RLQYFKDTGI TSVWLSPIYE SPMVDFGYDI SNYTNIQPEY
A.m.maltas	GIGDLKGIKD KLSHFIESGI TAIWLSPINR SPMVDFGYDI SDFKDVDPHF
Ls.	---QWKGFAE IVNMMSSAPF TFLP----- ---ILIAFSA TKRFGGNPYL
	
	110 120 130 140 150
A.c.AG	GTLSLDLNLV NAAHEKGLKI ILDFVPNHTS DQHEWFQLSL K-----NIEP
A.m.AG	GTISLDLNLV SAAHEKGLKI ILDFVPNHTS DQHEWFQLSL K-----NIEP
Cs.	GDLSSIDELV AEFNKKDMKL ILDFVPNHTS DQCEWFKKSI Q-----RDPE
Dm.	GTLEDFDALI AKANELGVKV ILDFVPNHSS NKHPWFIKSV A-----REPG
A.m.maltas	GTIKDLEDLT AEAKKQNLKV 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	APEQPDLNYY NPVVLDDMQN VLRFWLRRGL DGFRVDALPY ICED-----M
A.m.AG	APEQPDLNYY NPVVLDDMQN VLRFWLRRGF DGFRVDALPY ICED-----M
Cs.	LAQQPDLNYY NPKVVETMKN VLRFWLSKGI NGFRIDAVPY LFEVGPDANG
Dm.	TYGQPDLNYY NPAVIKAMDD VMLFWLNKGI AGFRIDAIY IYED-----A
A.m.maltas	YKQPDLNYY NSDVREEMKN IMKFWLDKGI DGFRIDAVPH LFES----AN
Ls.	TLVGPALRIV SNGVTDSLWV AYQTLGAVGM GIFGLGYSAI VLTG-----

Figure 45. (continued)

	
	260 270 280 290 300
A.c.AG	RFLDEPLSGE TNDPNKTEYT LKIYTHDIPE TYNIVRKFRD VLDEFQ---
A.m.AG	RFLDEPLSGE TNDPNKTEYT LKIYTHDIPE TYNVVRKFRD VLDEFQ---
Cs.	NYPDEIETHA CSDPLSQCYL YHDTYQNRPE TFEMVTEWRA TLEEFKQKNG
Dm.	QLRDEPPSGT TDDPNNEAYL SHIYTRNQPE DYGLLQHWQR LLDNYTANHD
A.m.maltas	ISLDEPPLGK NLNLSLHASL NHTLTQDQPE TYELVKEWRD FVDNYAEENK

Ls.	-LHQSFPAIE	TTLLADI	AKT	GGSFIFP	VAA	MANIAQGAAT	FAVFFVT	KNK
								
		310	320	330	340	350		
A.c.AG	--PKHMLIEA	YTNLSMTMKY	YD-----YGA	DFPFNF	FAFIK	NVSKDS	NSSD	
A.m.AG	--PKHMLIEA	YTNLSMTMKY	YD-----YGA	DFPFNF	FAFIK	NVSRDS	NSSD	
Cs.	GPTRVLMVEA	YAPLTKVIQI	YGQNGQLNGA	QIPNF	EFLN	NLGAVS	NARD	
Dm.	GPLRIMMTEG	YASVSQLMEY	YEDSNGVQGP	QFPNF	DFIT	ELNAN	STAAD	
A.m.maltas	RDEIVLLTEA	YSSLENTLKY	YE-----VGS	NVPNF	NKFIT	DANSS	SSTPEQ	
Ls.	QQKSLTTSAG	ISAMLGITEP	AL-----FGV	NLKLK	FFFFI	GLIAS	GSISS	
								
		360	370	380	390	400		
A.c.AG	FKKLVDN	WMI	YMPADGIPNW	VPGNHDQLRL	VSRFG	EELKAR	MITAMS	LLLLP
A.m.AG	FKKLVDN	WMT	YMPPSGIPNW	VPGNHDQLRL	VSRFG	EELKAR	MITTMS	LLLLP
Cs.	FKDVIDN	YLS	TIPEGATPNW	VQGNHDQHRS	ASRLG	PQKAD	AVNMLL	QVLP
Dm.	FVFYISR	WLI	YMPHGHVANW	VMGNHDNPRV	ASRFGE	KSVD	AMNMLL	MTLP
A.m.maltas	FKVIIDN	WIK	GTPQNNVPNW	VMGNHDRVVR	GTRY-P	GRAD	HMIMLE	MILP
Ls.	IIGLLHV	LSV	SMGPAGIIGF	IAIAPKS---	-----	IPSFM	MGAIIS	FVIA
								
		410	420	430	440	450		
A.c.AG	GVAVNYYGDE	IGMSDT-YIS	WEDTQDPQGC	GAGKENYQTM	SRDPART	PFQ		
A.m.AG	GVAVNYYGDE	IGMSDT-YIS	WEDTQDPQGC	GAGKENYQTM	SRDPART	PFQ		
Cs.	GAAVTYYGEE	LAMEDV-FVP	WSRTVDPQAC	TTDPNIFHAK	SRDPART	PMI		
Dm.	GIGITYNGEE	LGMTDYRDIS	WSDTVDPQAC	EAGIDNYKTI	SRDPERT	PMQ		
A.m.maltas	GVAVTYYGEE	IGMVDN----	-----	---TTIYKYD	VRDGCRT	PFQ		
Ls.	FVGTYLYGKK	AMKTTEEEII	NEAPATPEVV	ERLQDEKISA	PVTG--	RIVD		
								
		460	470	480	490	500		
A.c.AG	WDDSVSAGFS	SSSD-----T	WLRVNENYKT	-INLAAEKKD	KNSFFNM	FKK		
A.m.AG	WDDSVSAGFS	SSSN-----T	WLRVNENYKT	-VNLAAEKKD	KNSFFNM	FKK		
Cs.	WTSQKNAGFS	SSNY-----T	WLPTGPDYRK	-NNVEVQRSQ	RGSHLN	IFKK		
Dm.	WSSDVNAGFS	SADR-----T	WLPVNPNYKE	-LNLRNQQQA	RRSHYKI	YQS		
A.m.maltas	WDNSINAGFS	KIAENLLEKN	WLPVHTSYKS	GLNLEQEKKD	SISHYHL	YTN		
Ls.	LASVPDPVFA	SEAMG----K	GIAIMPTSOD	VLAPVTGVIT	IAANTGH	AYG		

Figure 45. (continued)

						
		510	520	530	540	550
A.c.AG	FAMLKKSPHF	KEANLNTRML	NDSVFAFSRE	TEENGSLYAI	LNFS-NEEQI	
A.m.AG	FASLKKSPYF	KEANLNTRML	NDNVFAFSRE	TEDNGSLYAI	LNFS-NEEQI	
Cs.	LTQLRKQDIL	MYGTYSYLA	NDDVLVIKRE	IENNRTLIAV	LNLG-FTEQV	
Dm.	LLKLRQLPVL	KNGSFVPEVV	NRRVFAFKRE	LKNEHTLLTI	VNVS-NRTEL	
A.m.maltas	LTALRKRDVL	KKGNFTIEIL	NKTVLAVVRQ	SEEE-AVSLI	INFS-KNNTI	
Ls.	IKSDDGAEVL	IHIGLDTVNL	NG--IGFEKI	VQQGQHVSEG	DLLG--HFDI	

	
	560 570 580 590 600
A.c.AG	VDLKAFNN-- -----VPKKL NMFYTIFNSD IKS---ISNN EQIKVSALGF
A.m.AG	VDLKAFNN-- -----VPKKL NMFYNNFNSD IKS---ISNN EQVKVSALGF
Cs.	VNLNLNDRDW K----VPERM EVATASVNAG MFERQPVVTS EVYVSAGVGV
Dm.	VDIADFIEQ- -----PNRL SVLVAGVDSQ HRVGDRKAE TIELAPNEGL
A.m.maltas	VDISKLVNK- -----RNNA KIYTSSVNSN LTVNQTVNPV AINIPGDTSI
Ls.	DKIKQAG--- -----LTPL TMTIVTNTAG YAQVDPLLTV DKAAMQGEEI

	
	610
A.c.AG	LILISQDAKF GNF
A.m.AG	FILISQDAKF GNF
Cs.	VL DYQVGRQI PEP
Dm.	VIQLNKRK-- ---
A.m.maltas	IVDSSTSGAT IVN
Ls.	IQLHAKKD-- ---

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*.

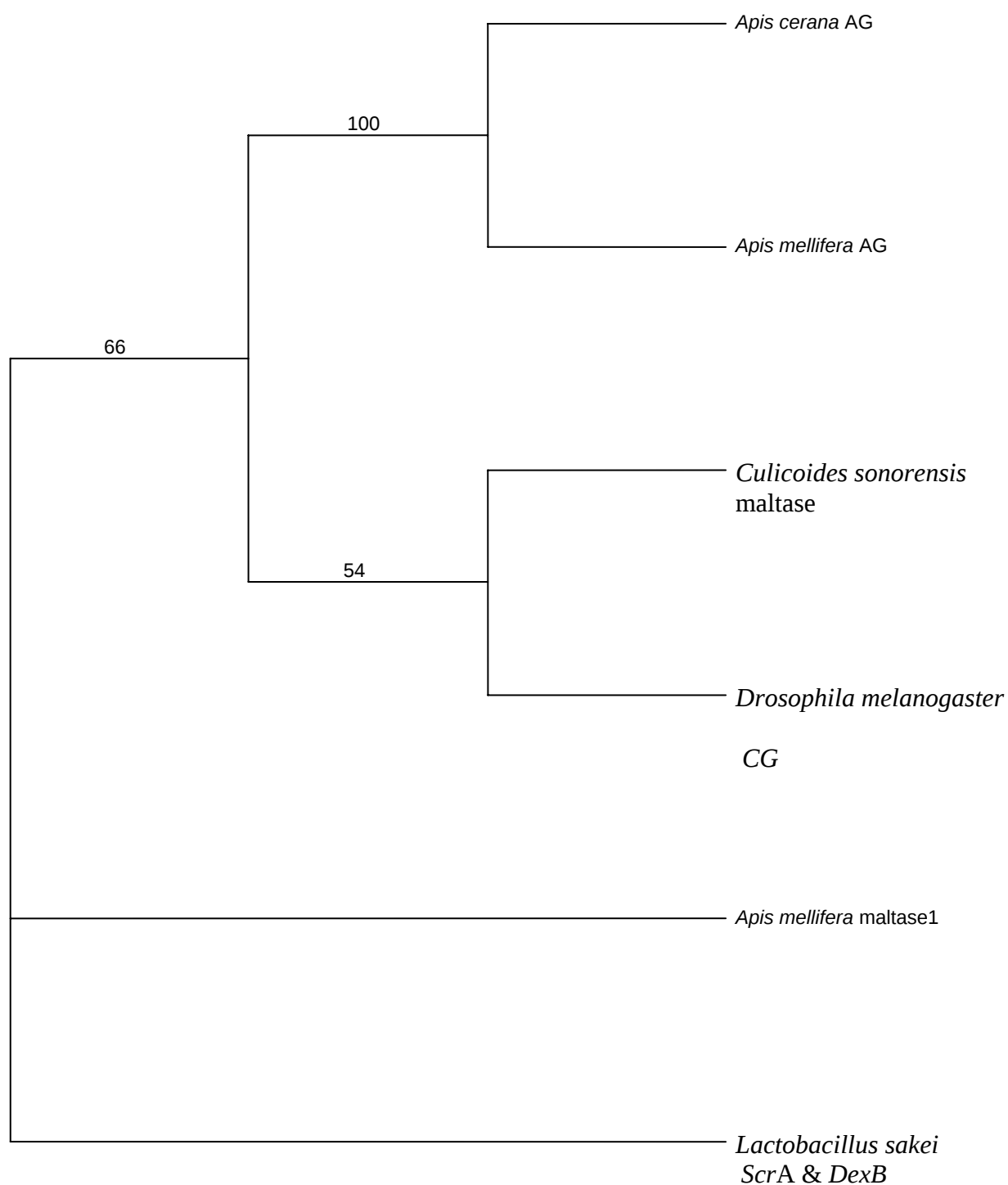


Figure 46. Phylogenetic trees illustrating the genetic relationship among amino acid sequences of various species by Neighbor - joining. Numbers above branches indicate bootstrap support percentage over 50% in 1000 replicates. Amino acid sequences of AG from *A. mellifera* maltase 1 and *Lactobacillus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

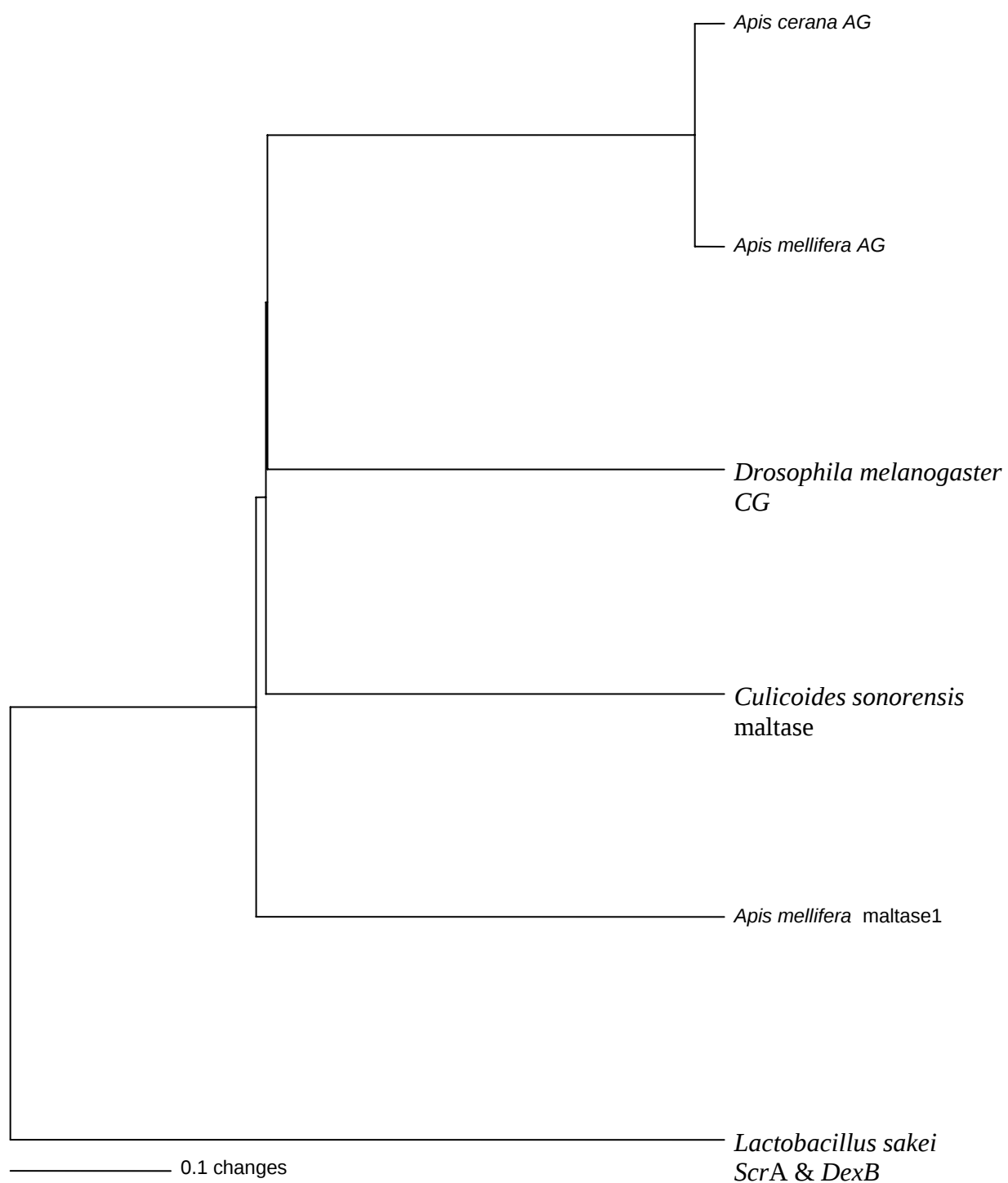


Figure 47. UPGMA tree of the genetic relationship among amino acid sequences of various species. *Lactobacillus sakei* was used as an outgroup.

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.

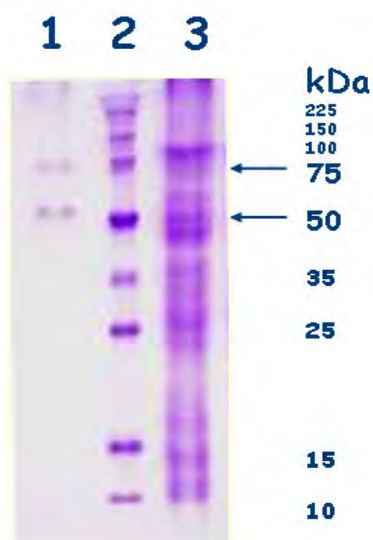


Figure 48. SDS - PAGE of HPGs and honey crop.

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).

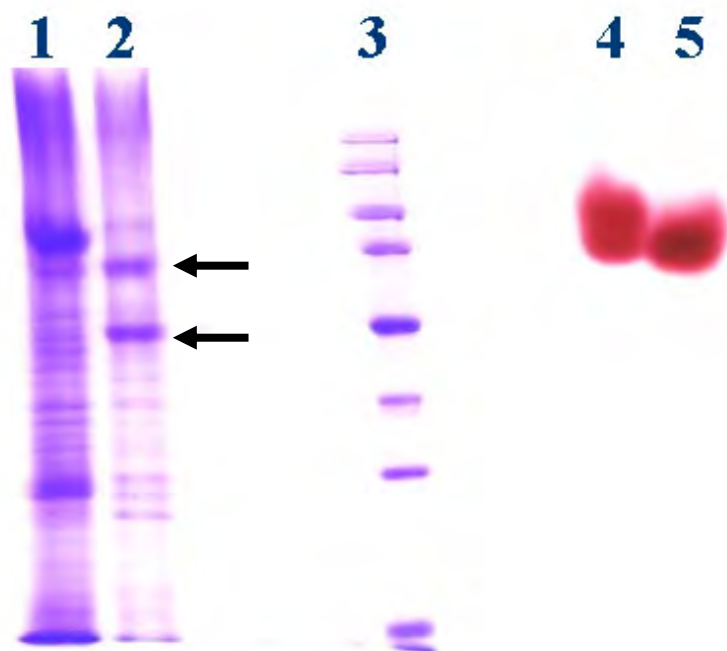


Figure 49. Renaturation of AG from HPGs and honey crops. Arrows indicate two major subunit bands.

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

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

Lane 3: protein marker

Lane 4: renatured crude of HPGs (50 μ g)

Lane 5: renatured crude of honey crops (50 μ g)

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

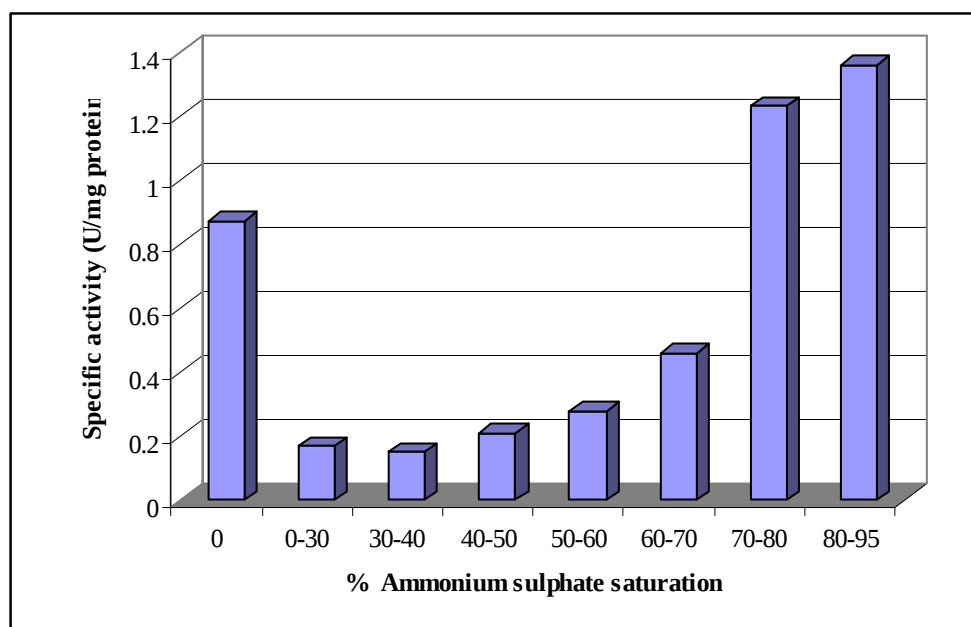


Figure 50. Specific activity of AG precipitated by a stepwise increase of AS concentration.

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).

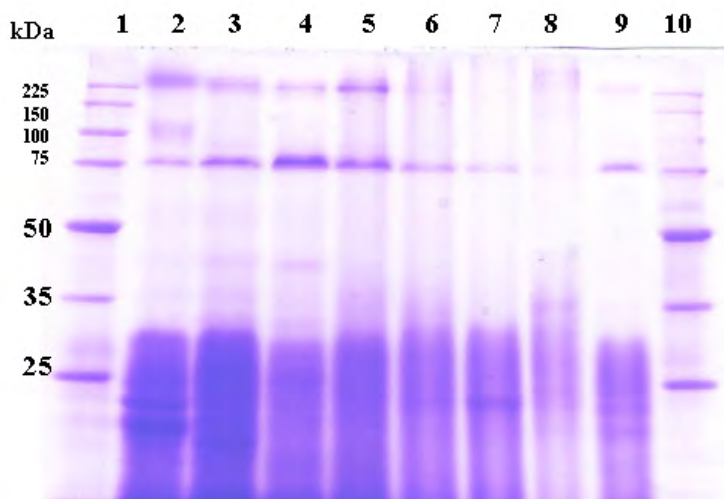


Figure 51. SDS - PAGE of protein (50 µg/ lane) saturated by various concentrations of AS.

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).

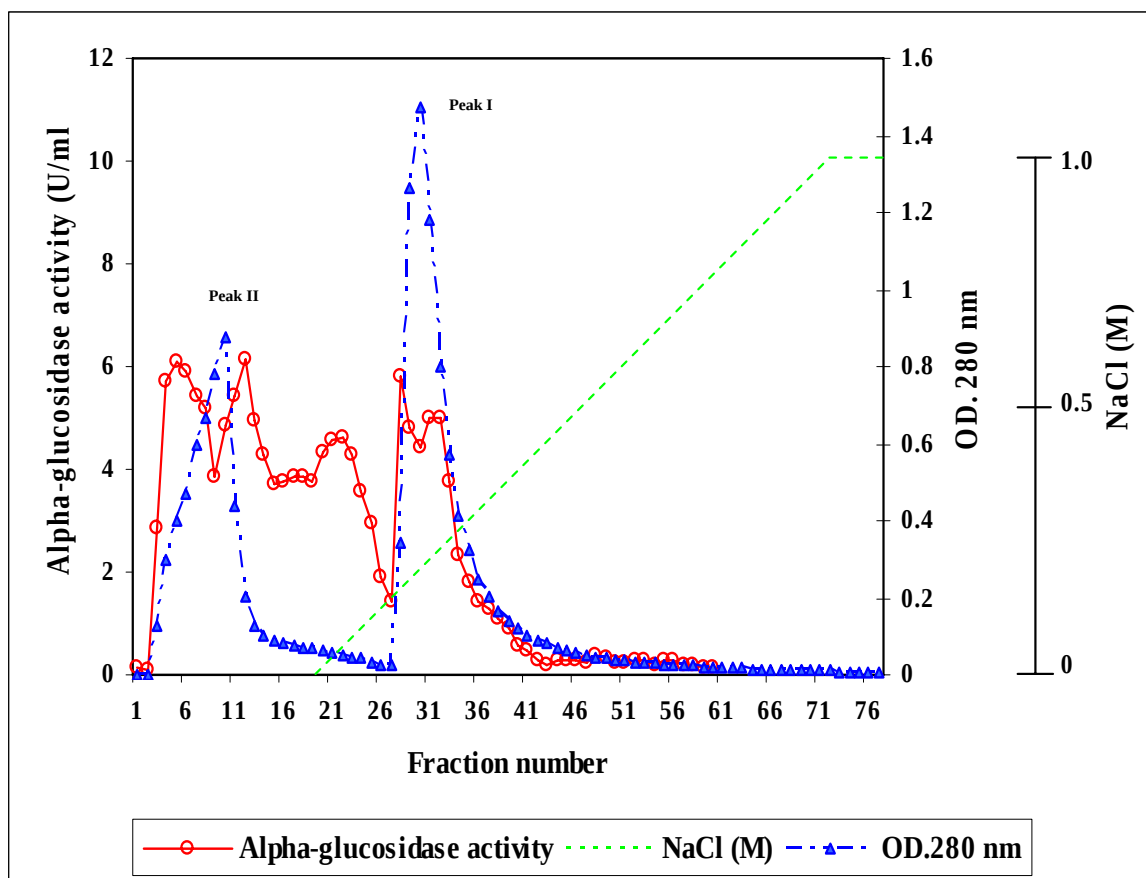


Figure 52. Purification of AG on DEAE - cellulose. Equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 1 M NaCl; flow rate 60 ml/ h; fraction size 10 ml/ fraction.

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.

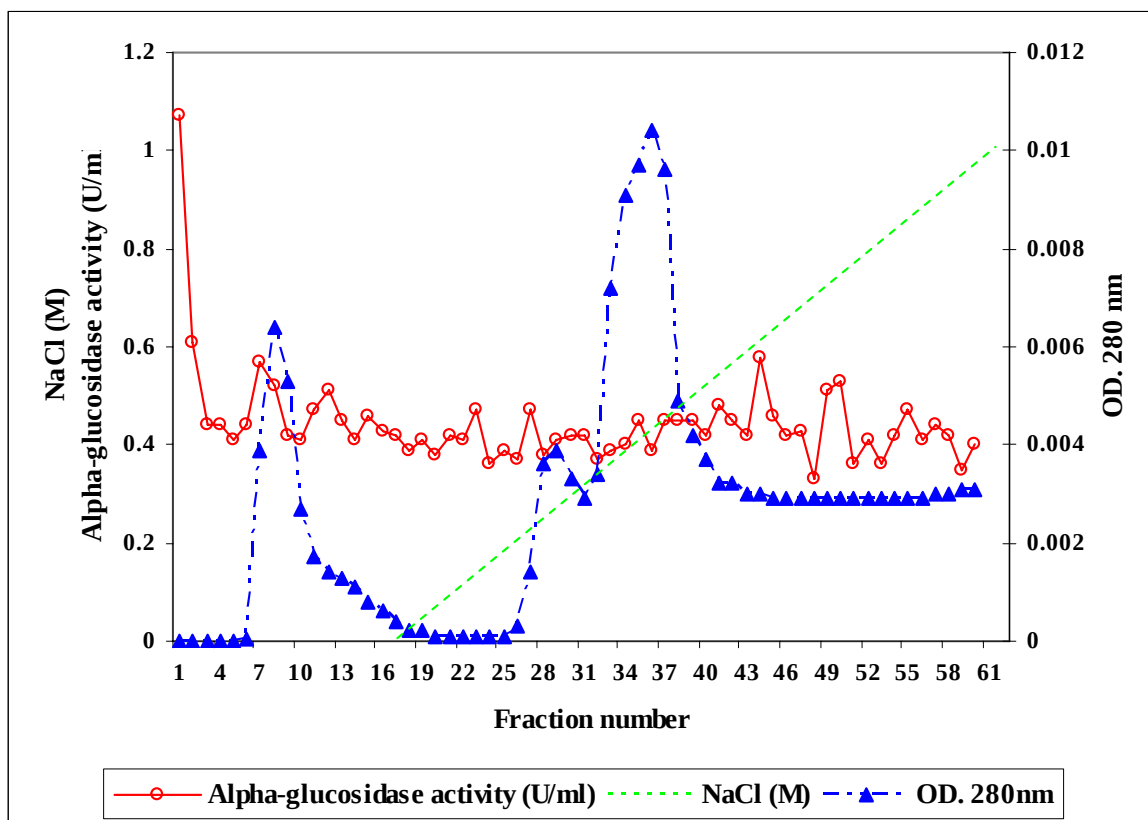


Figure 53. Purification of AG on CM - cellulose. Equilibrium, 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 1 M NaCl; flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.

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.

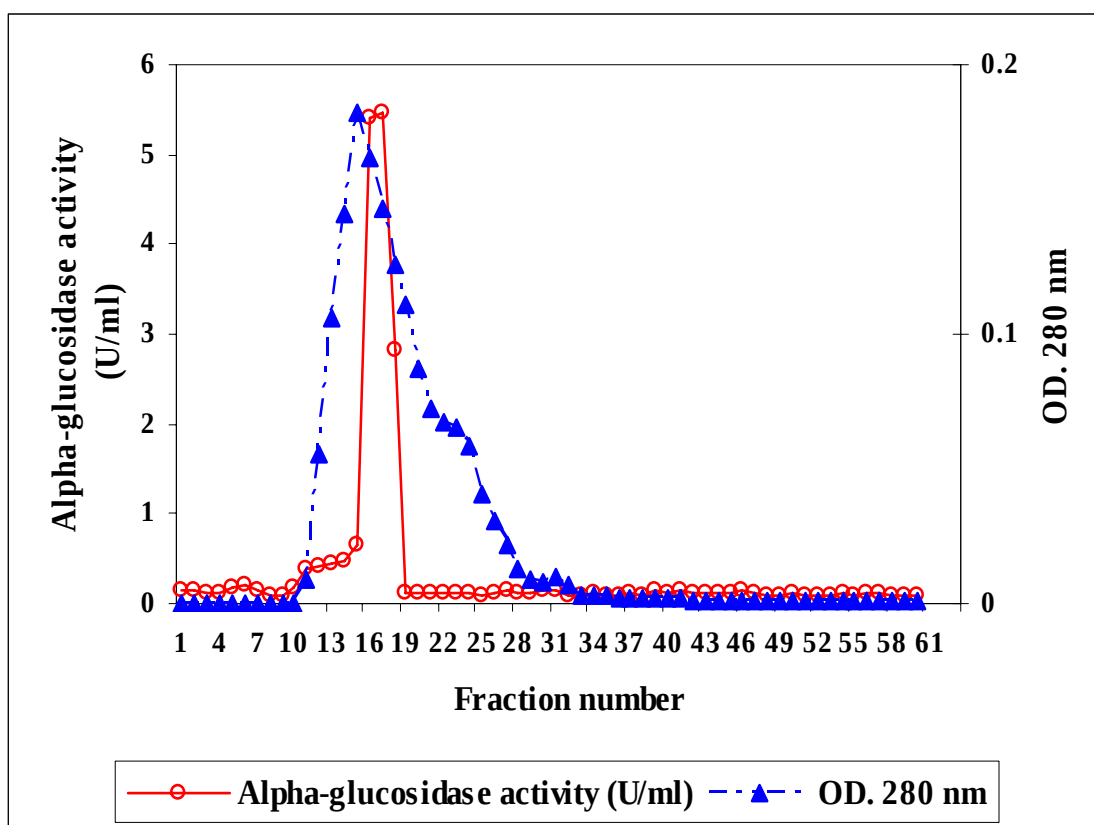


Figure 54. Pooled bound fractions containing AG activity were applied to gel filtration Sephadex 200 column. Equilibration and elution, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.

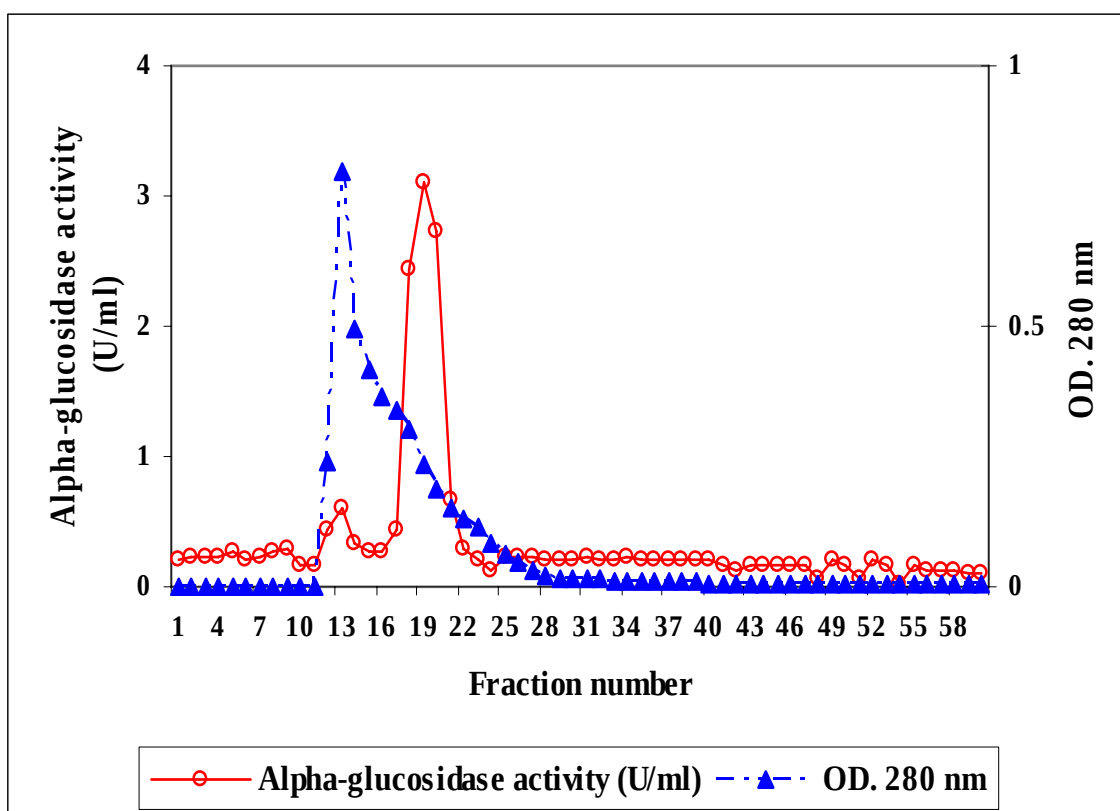


Figure 55. Pooled unbound fractions containing AG activity was applied to a gel filtration Sephadex 200 column. Equilibration and elution, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.

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 $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ 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.

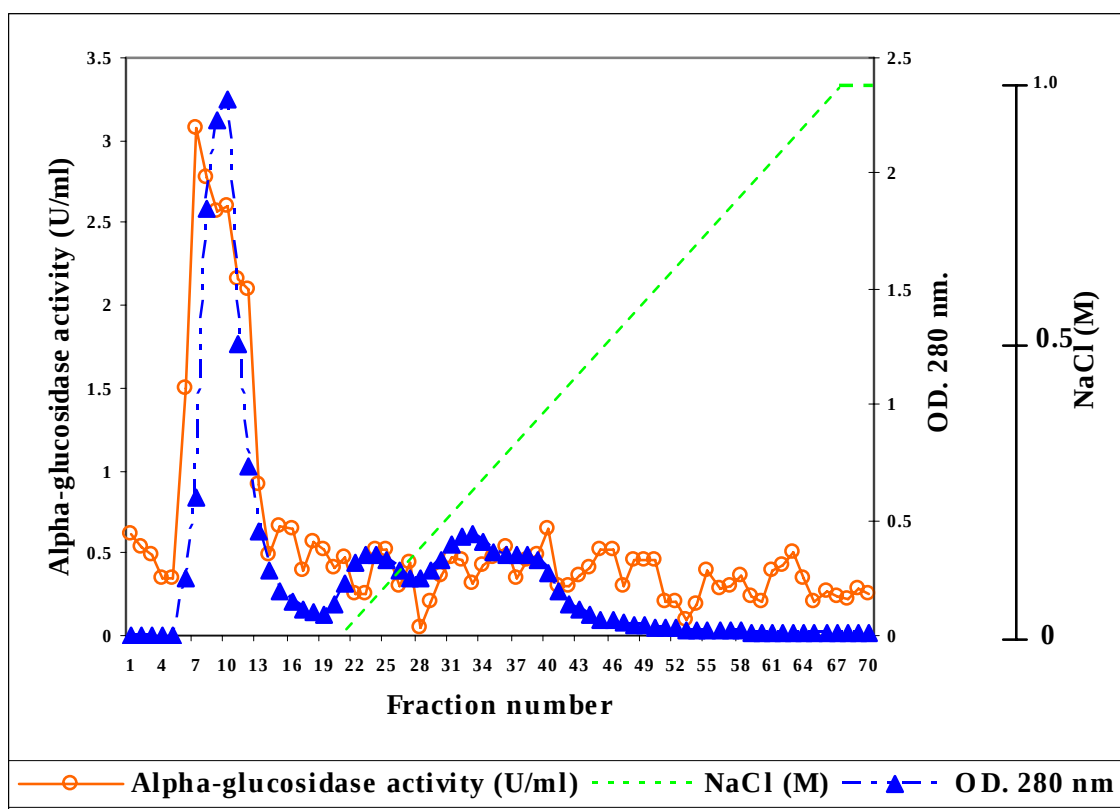


Figure 56. Chromatography of AG on DEAE – cellulose. Equilibrium, 30 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3); elution, 1 M NaCl; flow rate 60 ml/ h; fraction size 10 ml/ fraction.

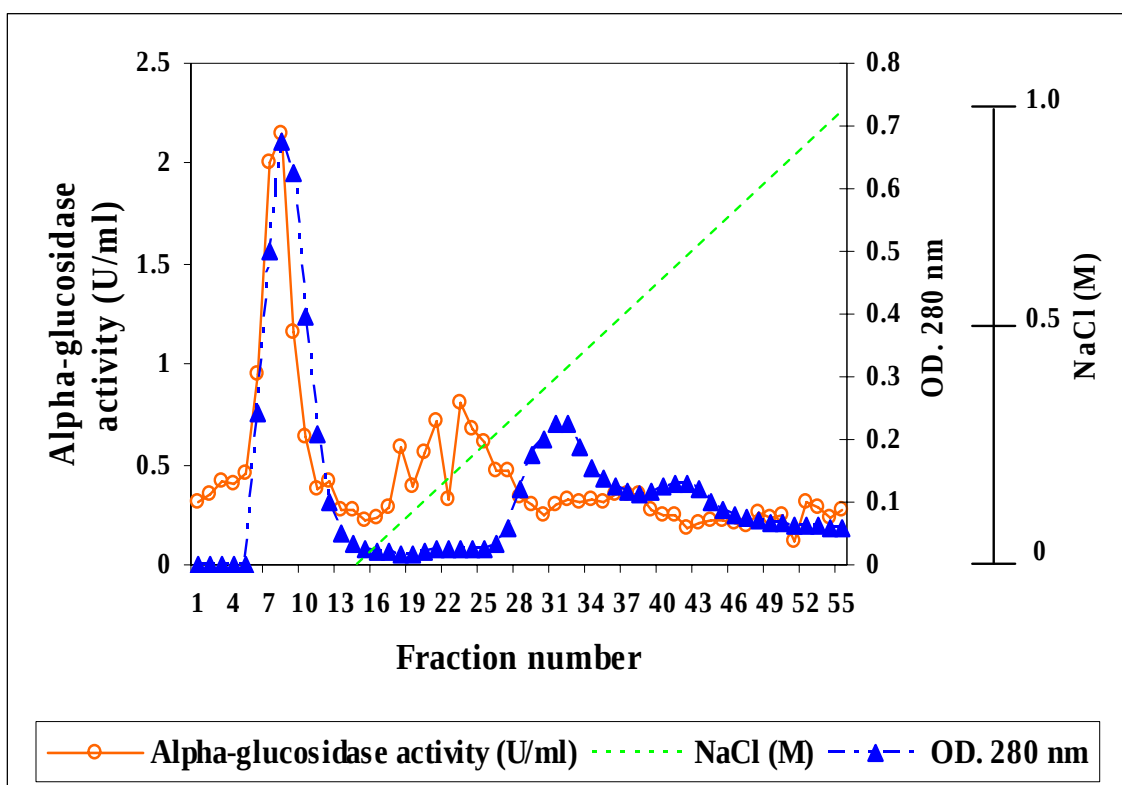


Figure 57. Chromatography of AG on CM - cellulose. Equilibrium, 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.7); elution, 1 M NaCl; flow rate 30 ml/ h; fraction size 5 ml/ fraction.

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 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 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.

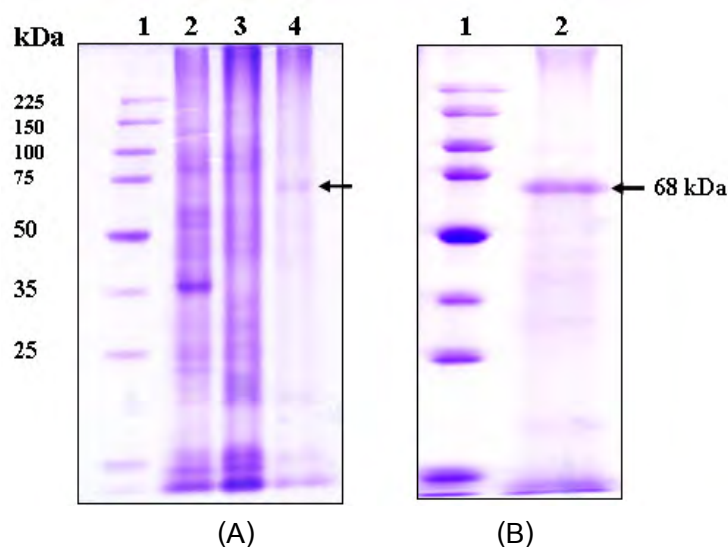


Figure 58. SDS - PAGE and CBB.

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)

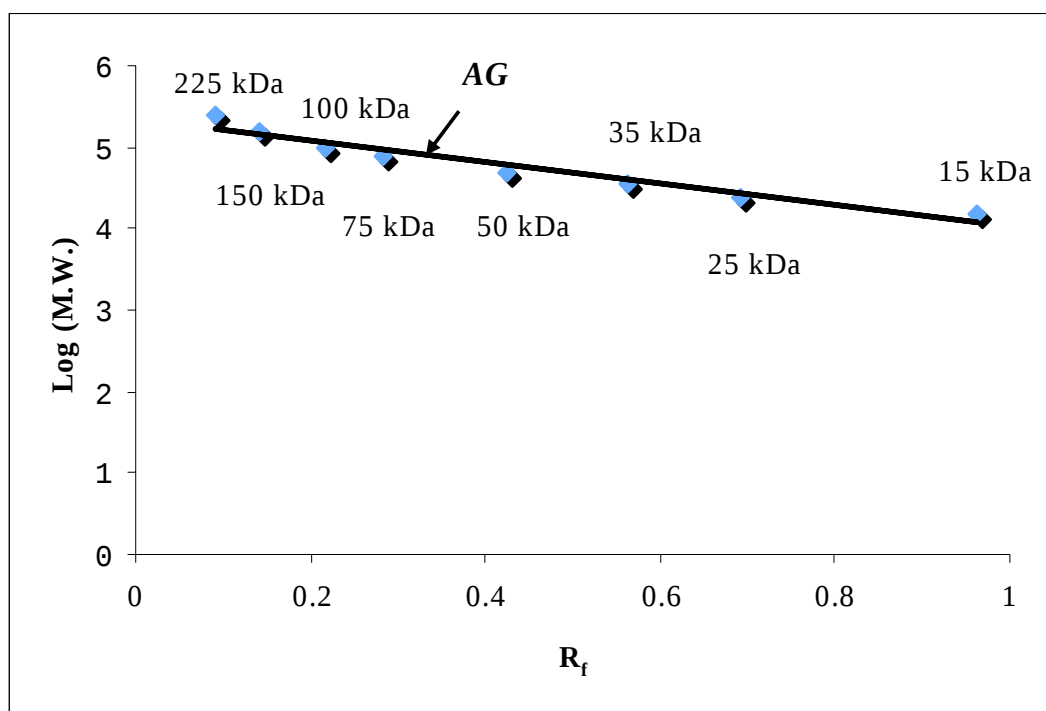


Figure 59. Relationship between Log and R_f of standard MW of broad range protein marker.

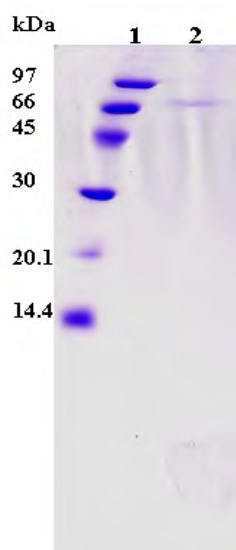


Figure 60. SDS - PAGE and CBB.

Lane 1: low molecular weight (LMW) marker

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

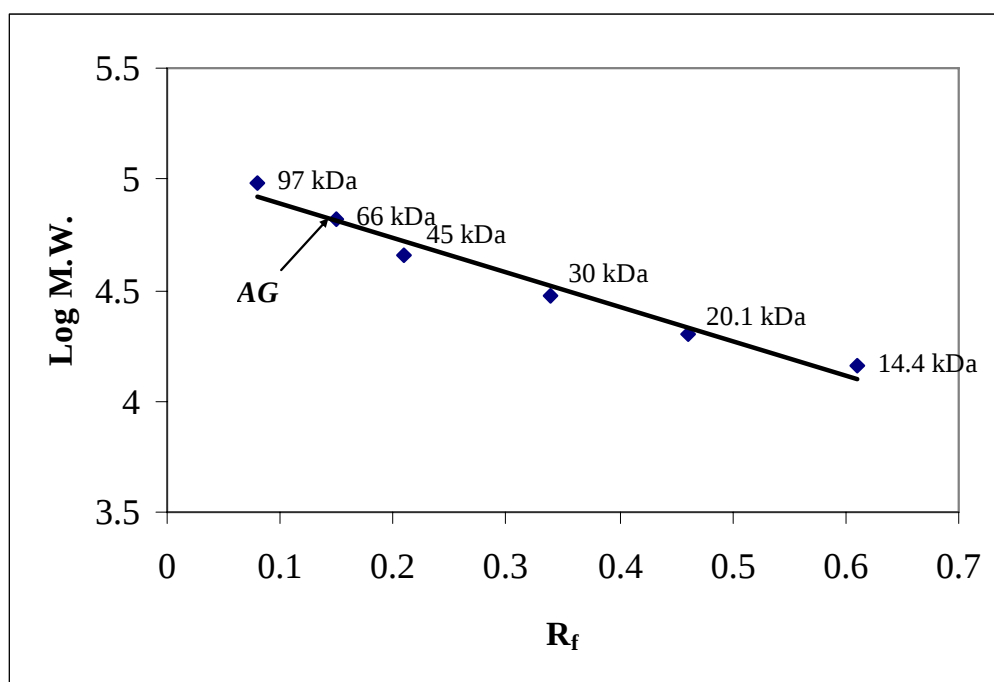


Figure 61. Relationship between Log and R_f of low molecular weight (LMW). The LMW standard containing phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and alpha - lactalbumin (14.4 kDa).

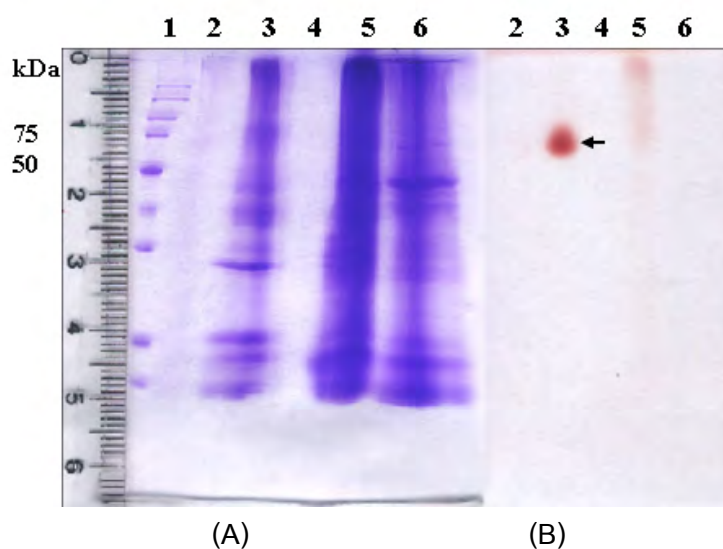


Figure 62. CBB (A) and activity stain (B) of SDS polyacrylamide (12.5%). An arrow indicates an activity band of AG after renaturation.

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

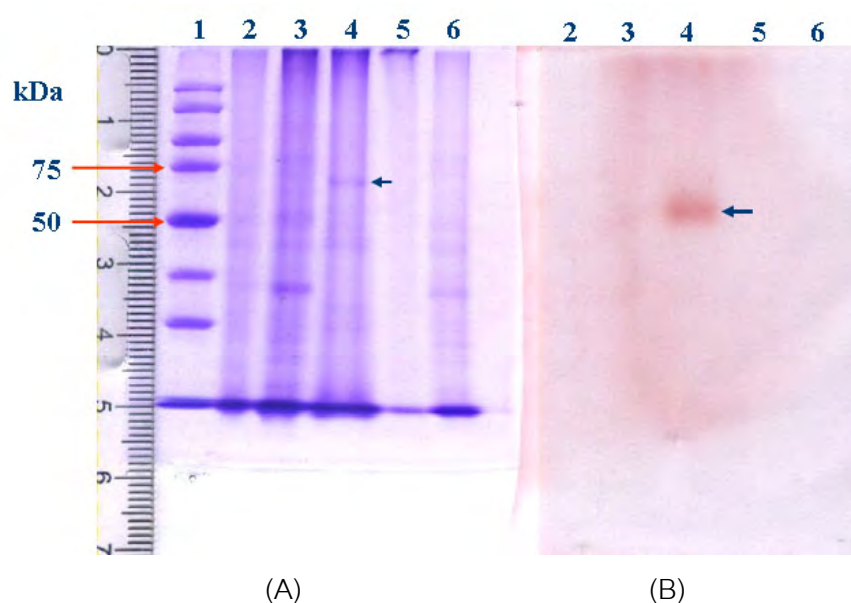


Figure 63. CBB (A) and activity stain (B) of SDS polyacrylamide (10%). Arrows indicate AG bands in both conditions.

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. Briton-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.

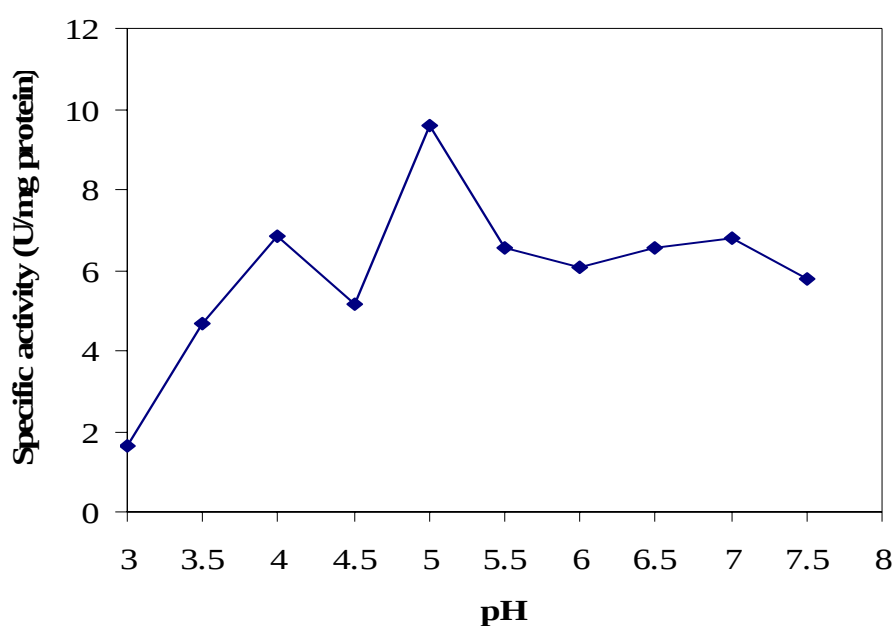


Figure 64. The optimum pH of purified AG. Briton - Robinson buffer at various pHs ranging between 3.0 - 7.5 was used. The optimum pH was 5.0.

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.

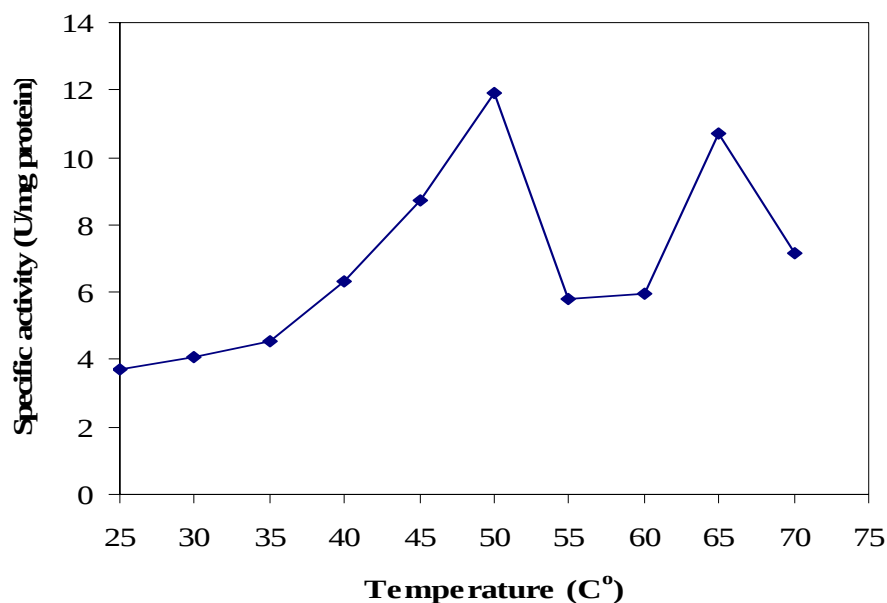


Figure 65. The optimum temperature of purified AG. The reaction mixture in acetate buffer (pH 5.0) containing 0.1 M sucrose was incubated at various temperatures ranging between 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, and 70°C for 10 min. The optimum temperature was 50°C.

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).

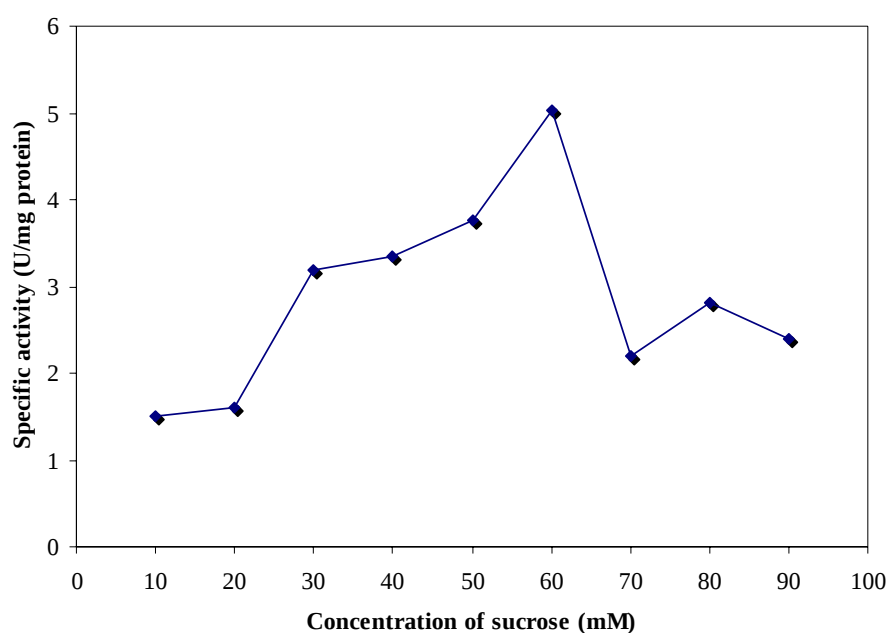


Figure 66. The optimum concentration of sucrose as substrate. The reaction mixture was incubated with sucrose at various concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 mM, respectively. The optimum concentration of sucrose was 60 mM.

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).

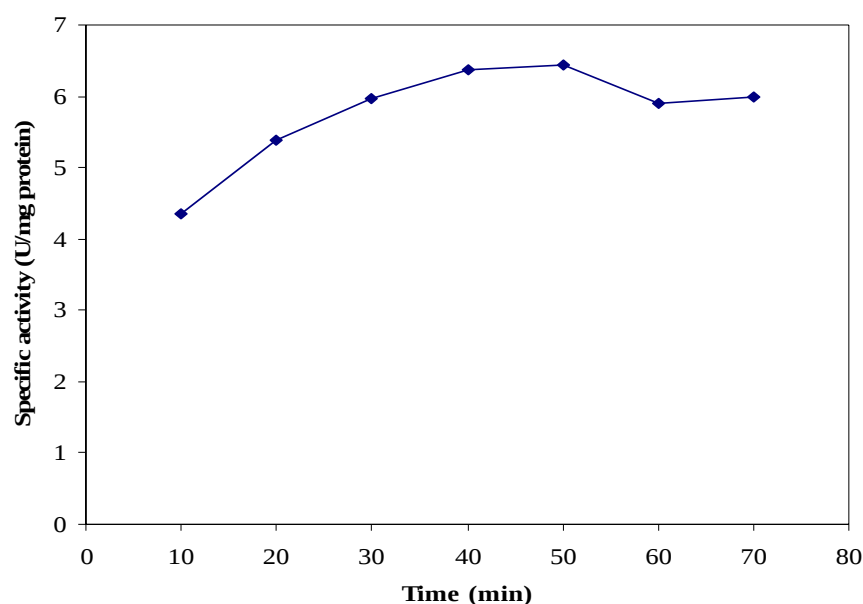


Figure 67. The optimum incubation time of purified AG. The reaction mixture was incubated for 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70 min, respectively. The optimum incubation time was 50 min.

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.

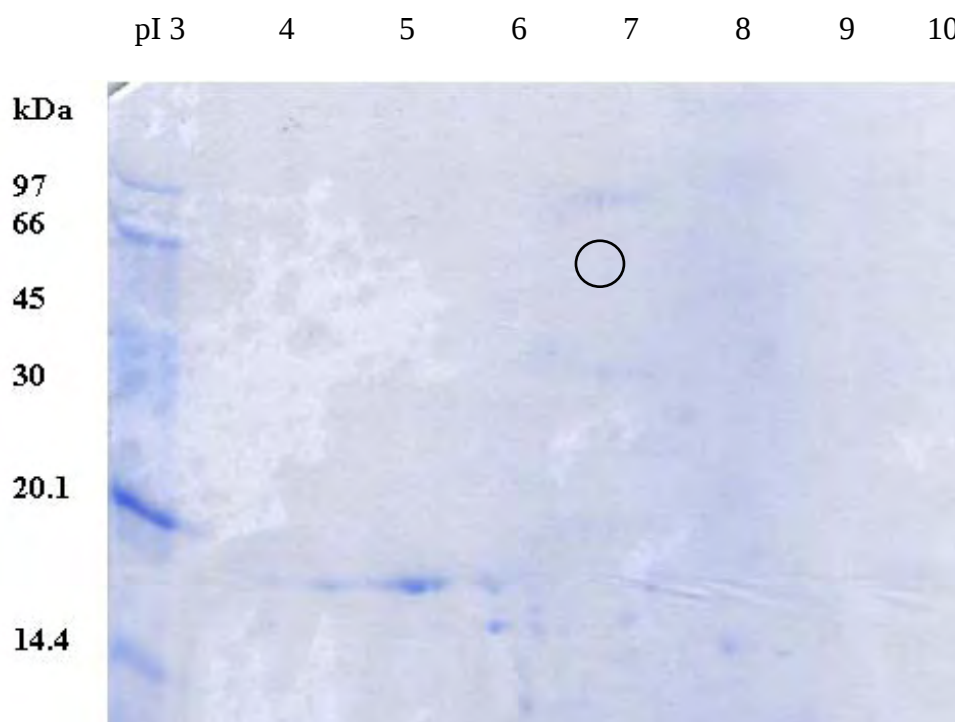


Figure 68. A 2 – D gel of AG by CBB – stained gel (12.5% T, 2.6% C, and pH 3 – 10).

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	350.97 641.87 686.56 845.71	530.59	IVNGK
609.29		608.36	FGEEK
641.33			SPYFK
686.43		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			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 LSPIYPSPMV DFGYDISNYT DVHPIFGTIS
 101 DLNLSVSAH EKGLKIILDF VPNHTSDQHE WFQLSLKNIE PYNYYYIWHF
 151 GK**IVNGKR**VPTNWGVFGG SAWSWREERQ AYYLHQFAPE QPDLNYYNPV
 201 VLDDMQNVLR FWLRRGFDGF RVDALPYICE DMRFLDEPLS GETNDPNKTE
 251 YTLKIYTHDI PETYNVVRKF RDVLDEFQKP KHMLIEAYTN LSMTMKYYDY
 301 GADFPFNFAF IKNVSRDSNS SDFKKLVNDW MTYMPPSGIP NWVPGNHDQL
 351 RLVSRFGEEK ARMITTMSLL LPGVAVNYYG DEIGMSDTYI SWEDTQDPQG
 401 CGAGKENYQT MSRDPAFTPF QWDDSVSAGF SSSSNTWLRV NENYKTVNLA
 451 AEKKDKNSFF NMFKKFASLK KSPYFKEANL NTRMLNDNVF AFSRETEDNG
 501 SLYAILNFSN EEQIVDLKAF NNVPKKNMF 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.

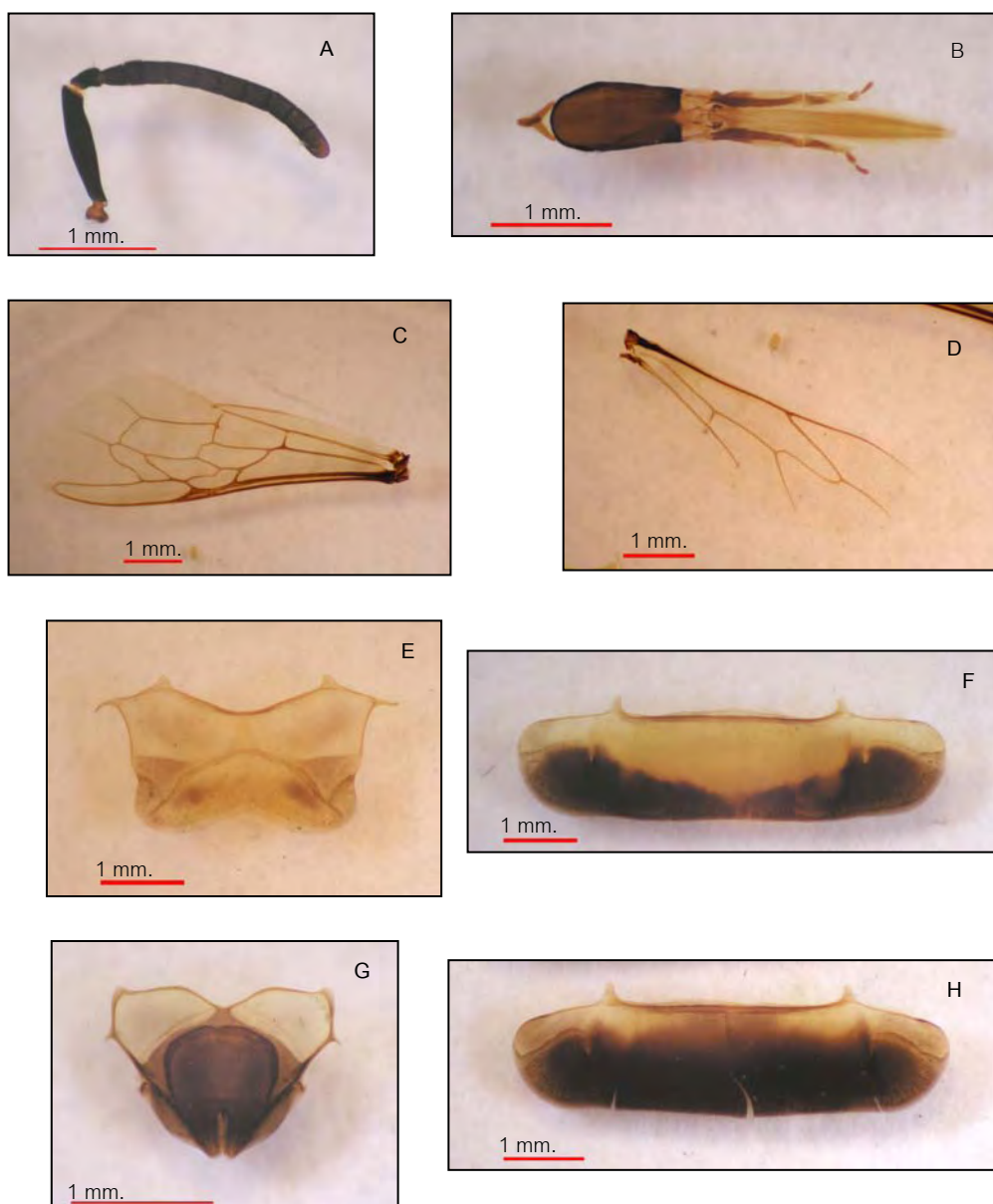
9) AG was analyzed by in – gel and in – solution digestions (or trypsin digestion) and peptide analysed by MALDI/ TOF MS. The peptide masses showed that there are at least 4 matching masses with 4% coverage matched to AG in NCBI blast search (score of 37). Furthermore, there are at least 18 matching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

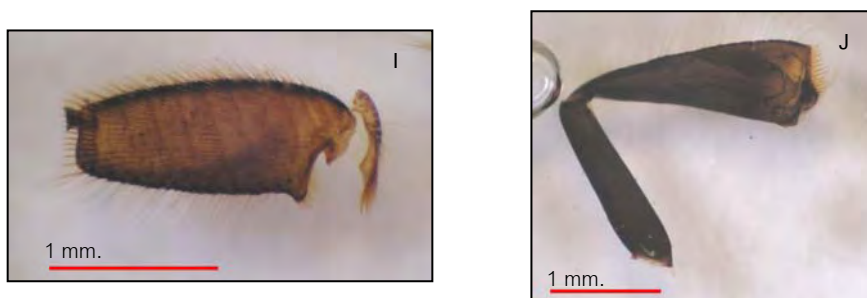
(proboscis) หนวด (antenna) ปีกหน้า (forewing) ปีกหลัง (hindwing) ขาหลัง (hind leg) สเตอริไนต์ที่ 3 และ 6 (3rd and 6th sternites) และเทอร์โกไต์ที่ 3 และ 4 (3rd and 4th tergites) (ภาพที่ 70 และ 71) จากนั้นติดตัวอย่างบนสไลด์ เพื่อวัดขนาดความกว้าง ความยาวและมุมของลักษณะที่ศึกษา 22 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและบันทึกลงในคอมพิวเตอร์



ภาพที่ 70 แสดงภาพถ่ายส่วนต่าง ๆ ของผึ้งมิมที่ใช้ศึกษาทางด้าน 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 ลักษณะที่ถูกคัดเลือกเป็นปัจจัยใหม่ได้ 4 กลุ่ม คือ ปัจจัยที่ 1 ประกอบด้วยลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับความยาวของลำตัว ขาหลังและหนวด ปัจจัยที่ 2 มีความสัมพันธ์กับความยาวเส้นปีกหน้าและปีกหน้า ปัจจัยที่ 3 มีความสัมพันธ์กับจำนวนขนตามลำตัวและขนาดมุมที่ 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} ซึ่งตัวอย่างผึ้งที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 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 นอกจากนี้จากการใช้แผนโคโรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แบบคลัสเตอร์ สามารถจัดกลุ่มผึ้งมีมเล็กดังกล่าวนี้เป็น 1 กลุ่มเช่นเดียวกัน แต่ผลจากการวิเคราะห์ความถดถอยเชิงเส้นของค่าปัจจัยใหม่ทั้ง 4 ปัจจัย กับค่าละติจูด และลองจิจูด แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางมอร์โฟเมตริกของผึ้งมีมเล็กในประเทศไทย กล่าวคือขนาดของผึ้งมีมเล็กจากภาคใต้ไปยังภาคเหนือจะมีขนาดเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของผึ้งมีมเล็กจากภาคตะวันตกไปภาคตะวันออกจะมีขนาดเล็กลง

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดย 2 วิธี วิธีแรกโดยการดูรูปแบบของชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสหลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 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 สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรมเอ็นเจและยูพีจีเอ็มเอ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มผึ้งมีมเล็กในประเทศไทย ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A ซึ่งพบได้ในตัวอย่างผึ้งมีมเล็กจากแผ่นดินใหญ่ของประเทศไทย ส่วนกลุ่ม B พบในตัวอย่างผึ้งจากจังหวัดภูเก็ต และจังหวัดเชียงใหม่

1.4.3 การวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกของชันโรง *Trigona collina* Smith, 1987 ในประเทศไทย

ชันโรง (stingless bee) เป็นแมลงสังคมขั้นสูง (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* ที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในระบบนิเวศหรือสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน อาจจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน และเนื่องจากยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความแตกต่างของชันโรงด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริก ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามาวิเคราะห์รวมกับการวิเคราะห์ทางสถิติ และสามารถนำมาใช้จัดจำแนกสายพันธุ์หรือจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่กระจายตัวอยู่ในถิ่นที่อยู่อาศัยต่าง ๆ และจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาล้ำคลึงกันหรือมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันได้ จึงควรมีการศึกษาวิจัยในด้านดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชันโรงต่อไป

วิธีการศึกษา

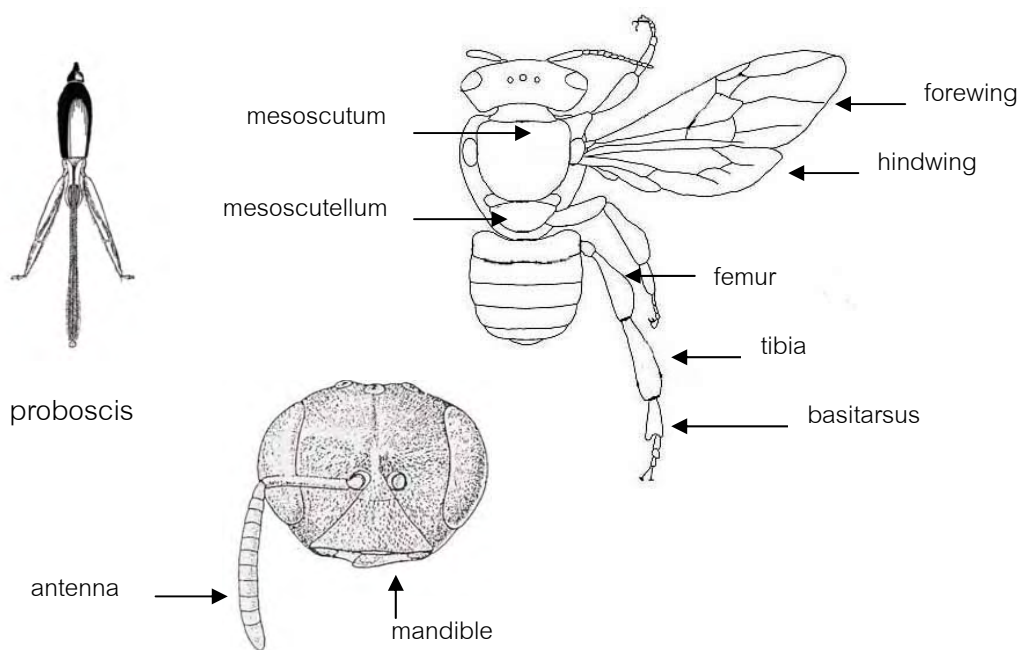
1. การเก็บตัวอย่าง

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

2. การผ่าตัดและการทำสไลด์ตัวอย่าง

1. นำชันโรงงาน *T. collina* วางบนภาดผ่าตัดที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้น 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

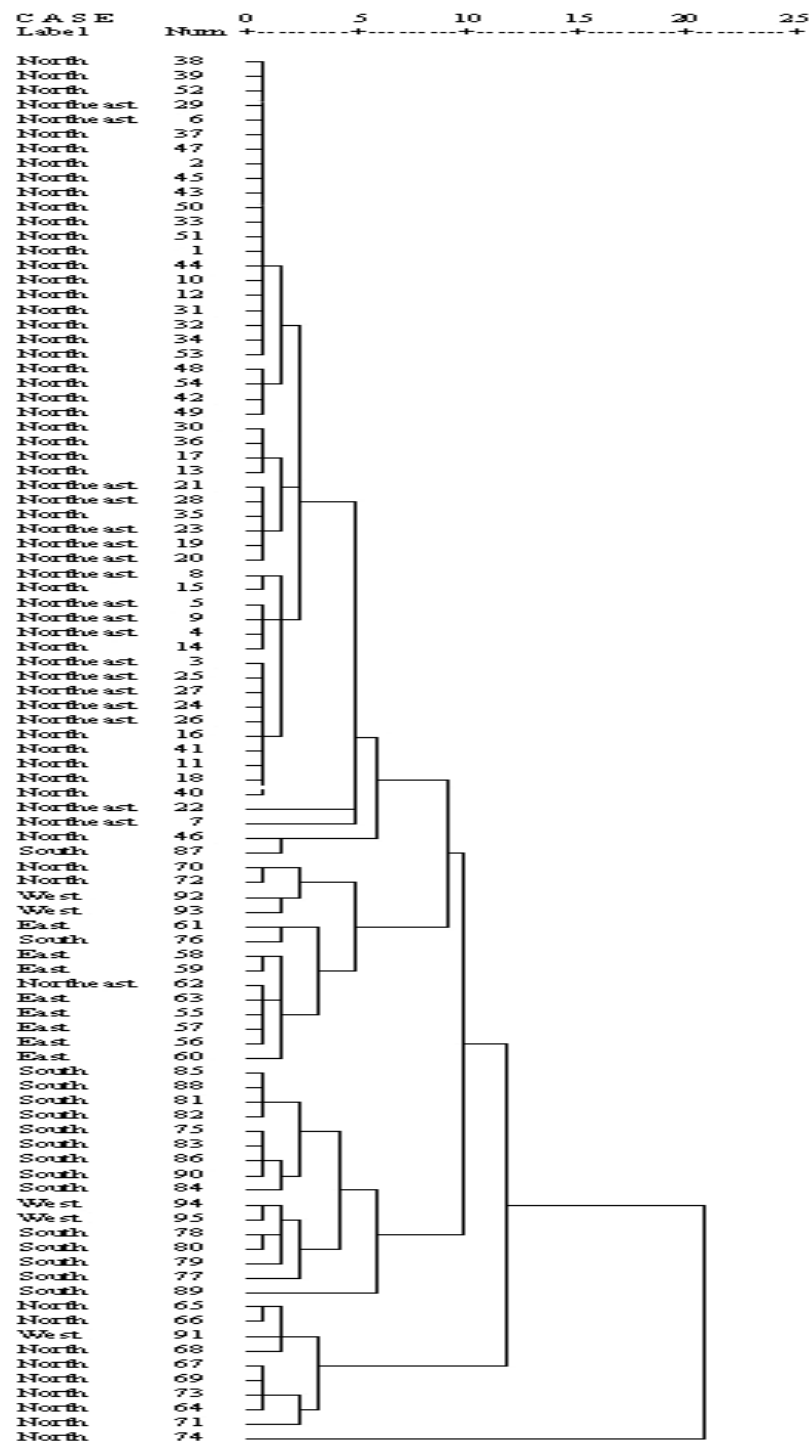
ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ของกลุ่มปัจจัยใหม่ 3 กลุ่มปัจจัย ที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยครั้งที่ 2

	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 เดนไดรแกรมแสดงการรวมกลุ่มตัวอย่างชั้นโรงโดยแบ่งตามภูมิภาค

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

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

ผึ้งพันธุ์นำเข้าสู่ประเทศไทยในช่วงต้นคริสต์ศตวรรษ 1940 (Wongsiri, 1988) และศตวรรษ 1950 (Akratanakul, 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 หรือสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตภัณฑ์ต่างๆ (Ruttner, 1988) การจัดจำแนกประชากรของสายพันธุ์ผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยมีความน่าสนใจอย่างยิ่งเพื่อการดูแลปรับปรุงผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยต่อไป

ในปัจจุบันรายงานจุดกำเนิดของสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ในแถบยุโรป แอฟริกา และตะวันออกกลาง ด้วยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาพบอย่างน้อยประมาณ 24 สายพันธุ์ (Ruttner, 1988; Engel, 1999) การศึกษาด้วยไมโทรคอนเดรียดีเอ็นเอพบว่าจากสายพันธุ์ทั้งหมดที่ค้นพบนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 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 ในไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในส่วน of P, Po และ Q ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมแพร่หลายในการแยกสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในผึ้งพันธุ์ (Cornuet et al., 1991; Garnery et al., 1992; Palmer et al., 2000)

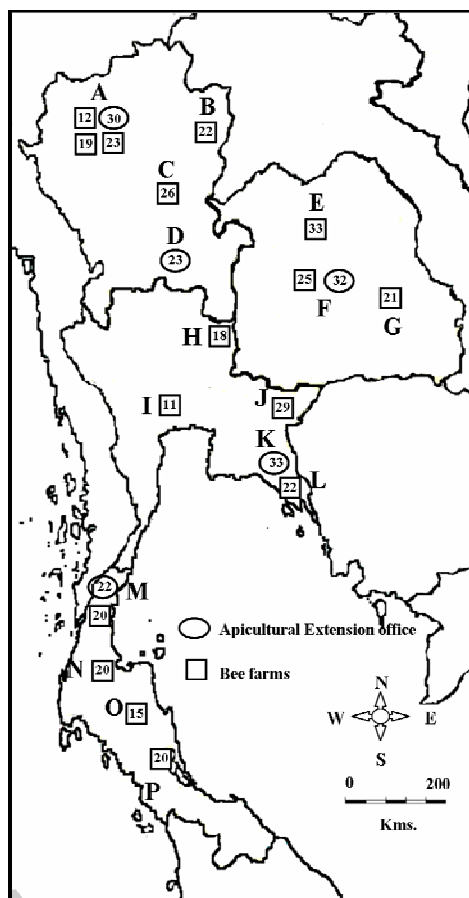
เพื่อความชัดเจนของจุดเริ่มต้นของประชากรผึ้งพันธุ์ในประเทศไทยโดยอาศัยการตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะจากทางแม่ในประชากรผึ้งพันธุ์โดยอาศัยการศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLP ใน 4 บริเวณของไมโตรคอนเดรีย และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 6 เบส *Dra* I, *Bgl* II, *Eco*R I, *Hinc* II และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 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 สัดดีเอ็นเอจากส่วนของฝั่งพันธุจากตัวอย่างทั้งหมด 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 หากำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ non-coding region ระหว่าง tRNA^{leu} และ COII โดยเลือกสุ่มจากตัวอย่างที่มีพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียแตกต่างกันจากการตรวจสอบข้างต้นผลของการหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล 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 ส่วนข้อมูลลำดับเบสนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบด้วยตาและใช้โปรแกรม 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 สรุปไว้ในตารางที่ 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]

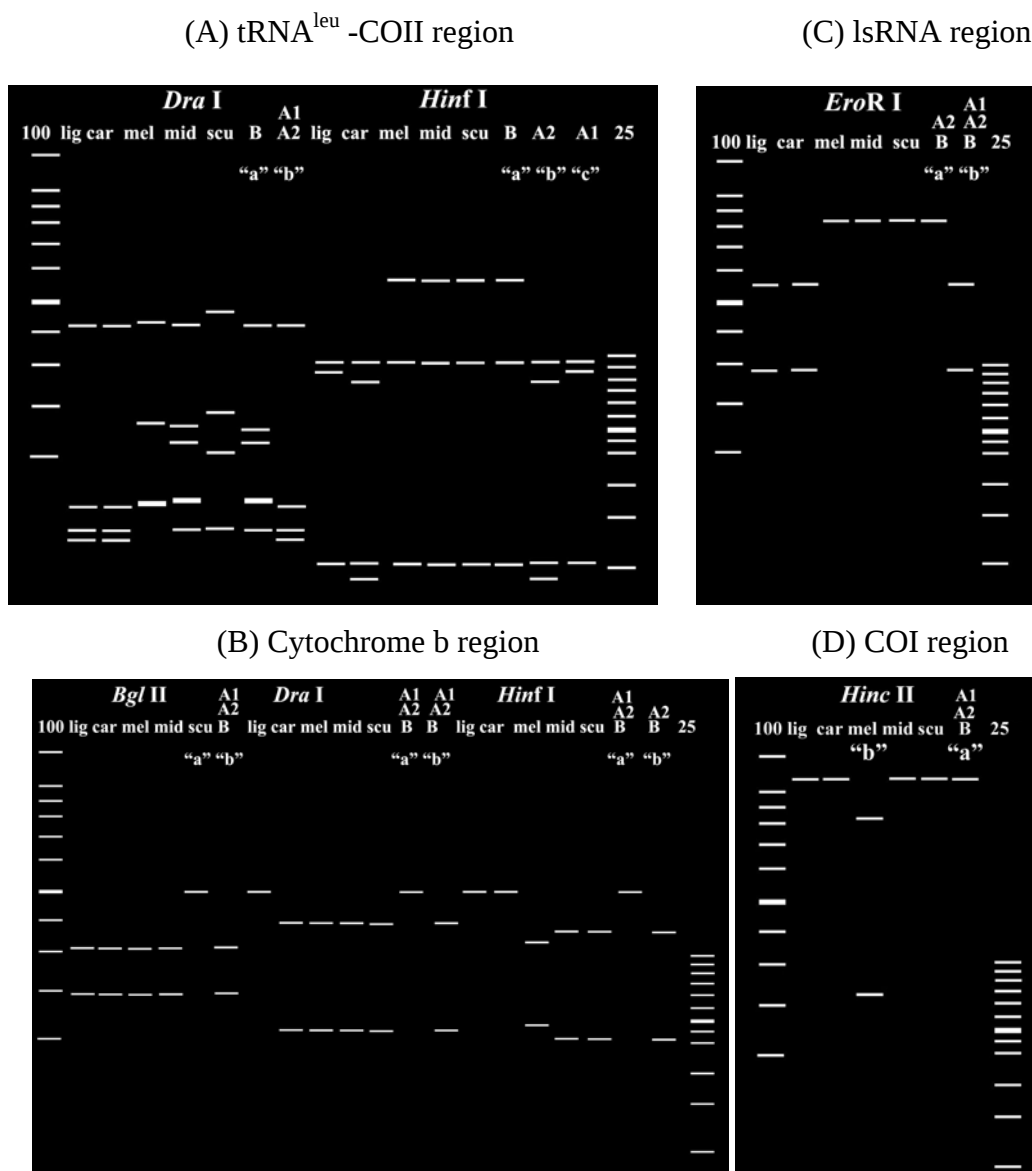
8 รูปแบบพันธุกรรมที่แตกต่างกันในตัวอย่างของฝั่งพันธุ์ในประเทศไทยจำนวน 476 รั้ง รูปแบบพันธุกรรมกลุ่ม ThaiA1 รวมรูปแบบของพันธุกรรมแบบ bcb-aba (- อาจจะเป็น a หรือ b) รูปแบบพันธุกรรมกลุ่ม ThaiA2 ได้แก่รูปแบบพันธุกรรมแบบ bbb---a และ รูปแบบพันธุกรรมกลุ่ม ThaiB ได้แก่รูปแบบพันธุกรรมแบบ aab---a (ตารางที่ 14) 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 ตัวอย่างจากออสเตรเลียและเยอรมัน ส่วนกลุ่มรูปแบบพันธุกรรม ThaiA1.2 (bcbbaba) ซึ่งคล้ายกับ 3 ตัวอย่างของ *A. m. carnica* จากประเทศออสเตรเลียและสโลวาเนีย 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 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 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 แตกต่างจากผึ้งพันธุ์สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ M เพราะว่าในส่วน 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 และการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 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 รั้ง จาก 476 รั้ง จัดอยู่ในกลุ่มรูปแบบพันธุกรรมที่พบมากเป็นส่วนใหญ่ 3 รูปแบบดังผลข้างต้น ซึ่งคิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด รูปแบบพันธุกรรมแบบ ThaiA2.1 bbbaba พบได้ในทุกพื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง 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 อย่างไรก็ตามในประชากรของผึ้งพันธุ์ในไทยในฟาร์มต่างๆมีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมสูงภายในฟาร์มฝั่งเดียวกัน



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.

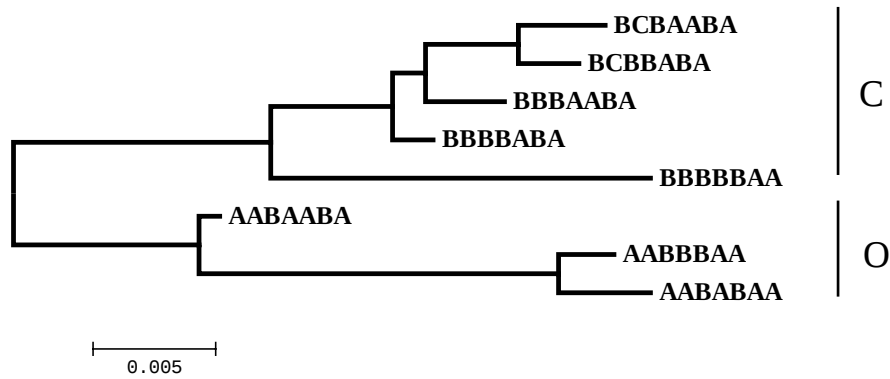
ตารางที่ 13. สรุปขั้นตอนการเพิ่มปริมาณไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ 4 บริเวณ ที่ใช้ในการจำแนกพืชพันธุ์ในประเทศไทย สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ M= West European lineage, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ C = East Mediterranean, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ A = African, สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ O = Middle

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

+ แทนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ – แทนไม่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ +^A, +^B, +^C, +^D และ +^E แทนรูปแบบการตัดที่แตกต่างกันของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

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 bbbbbaa	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
	Nakornsrihammarat (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 แสดงความเหมือนกันระหว่างรูปแบบพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจากรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ รูปแบบพันธุกรรมแสดงไว้ตารางที่ 14 C = สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้กับฝั่งพันธุ์ที่มีจุดกำเนิดจาก East European และ O = สายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้กับฝั่งพันธุ์ที่มีจุดกำเนิดจาก Middle Eastern

P or Po

<i>intermissa</i> (A-8)	TTAATAAATTAATATAAAATAAAACAAAATATAACAAAATATATTTATTAATAATTTATTAATAA-
<i>mellifera</i> (M-6)	-T...T.....
<i>lamarckii</i> (O-1c)	T...T.....G.....C.....
<i>syriaca</i> (O-3)	T-----G.....C.....
ThaiB	T.....G.....C.....
<i>carnica</i> (C)	-----
ThaiA2	-----
<i>ligustica</i> (C)	-----
ThaiA1	-----
Q1	-----

<i>intermissa</i>	-TTCCCCACTTAATTCATATTAATTTAAGAATAAATTAA-TAACAA-
<i>mellifera</i>	T.....T.....A.....A.....T
<i>lamarckii</i>	T.....A.....A.....T
<i>syriaca</i>	T.....A.....A.....T
ThaiBQ1'	T.....A.....A.....T
ThaiBQ1''	-.....A.....A.....T
<i>carnica</i>	T.....A.....T
ThaiA2	T.....A.....T
<i>ligustica</i>	T.....A.....T
ThaiA1	T.....A.....T
Q2	

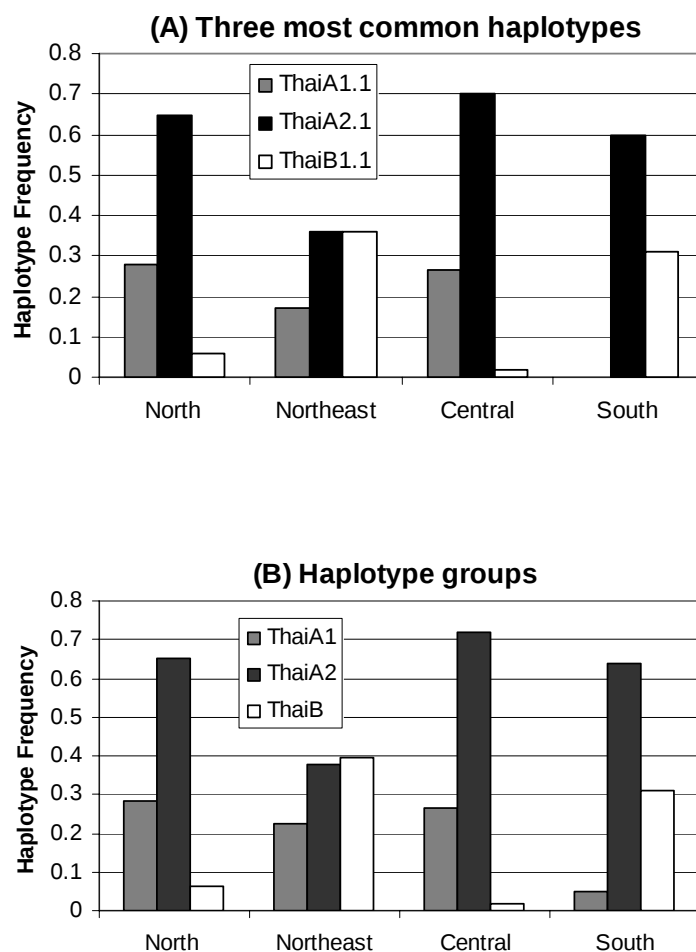
<i>Intermissa</i>	TTTTAATAAAATAAATAA---TTAATTTTATTTTATATTGAATTTTAAATTCAATCTTAAAGATTTAATCTTTTATTA
<i>mellifera</i>	A.....
<i>lamarckii</i>	TAA.....A.....
<i>syriaca</i>	TAA.....A.....
ThaiBQ2	TAA.....A.....
ThaiBQ2''	TAA.....A.....
<i>carnica</i>	A.....
ThaiA2	A.....
<i>ligustica</i>	A.....
ThaiA1	A.....
Q3	

<i>intermissa</i>	ATTAATAAATTAATATAAAA--TAAACAAAATATAACAGAATATATTTATTAATAATTTATTAATAA-
<i>mellifera</i>	AA.....A.....
<i>lamarckii</i>	T.....C.....
<i>syriaca</i>	T.....A.....C.....
ThaiBQ3'	T.....A.....C.....
ThaiBQ3''	T.....A.....C.....
<i>carnica</i>	A.....
ThaiA2	A.....
<i>ligustica</i>	
ThaiA1	

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'') ใช้แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หนึ่ง ที่สองซึ่งเป็นซ้ำที่เกิดขึ้นในส่วนของ Q เป็นต้น ผึ้งพันธุ์ไทย (ThaiA1, ThaiA2 and ThaiB) จะเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับผึ้งพันธุ์ในสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *A.m. intermissa*, *A. m. mellifera*, *A. m. lamarckii*, *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 ขีด (-) 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 ภาคเหนือรวมภาคกลาง 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) การศึกษานี้ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ฝั้วพันธุ์ที่เคยรายงานในฐานะข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ThaiB เป็นเรื่องน่าสนใจอย่างมากที่มีความคล้ายกับฝั้วที่มีสายวิวัฒนาการแบบ O ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน และยังคงต้องการตัวอย่างของฝั้วพันธุ์ให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามในประเทศไทยไม่พบหลักฐานของไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอจากสายความสัมพันธ์วิวัฒนาการแบบ A และ M ในประชากรฝั้วพันธุ์ที่ได้ทำการศึกษาครั้งนี้

การเปรียบเทียบกับฝั้วพื้นเมืองมีความสัมพันธ์ เล็กน้อยกับลักษณะโครงสร้างทางภูมิศาสตร์เกี่ยวกับการกระจายตัวของพันธุ์กรรมจากแม่ของฝั้วพันธุ์ในประเทศไทย 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 พิชญ์โลก 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 ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นวิธีที่รวดเร็วสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจากแม่ของประชากรผึ้ง และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นวิธีที่ช่วยในการยืนยันสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงอาศัยวิธีการศึกษาทั้งสองวิธีนี้เพื่อใช้ในการตรวจสอบจุดกำเนิดและลักษณะพันธุกรรมของประชากรผึ้งพันธุ์ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นที่เข้ามามีบทบาทกระจายอยู่ทั่วไปและเป็นแมลงเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

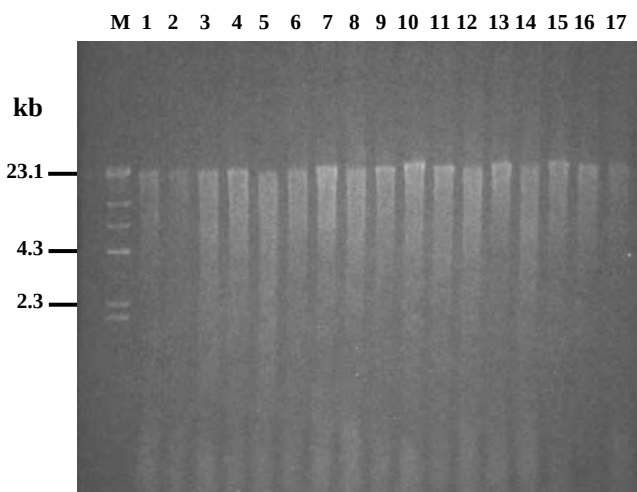
- Akratanakul P. (2000) Apiculture development in Thailand, pp. 395-398 in: Anonymous (Ed.), Proceedings of the Seventh International Conference on Tropical Bees: Management and diversity, and Fifth Asian Apicultural Association Conference, Chiang Mai, Thailand, IBRA
- Arias M. C., Sheppard W. S. (1996) 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., Koulouanos 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 สกัดดีเอ็นเอจากชันโรงโดยนำตัวอย่างส่วนนอกของชันโรง 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

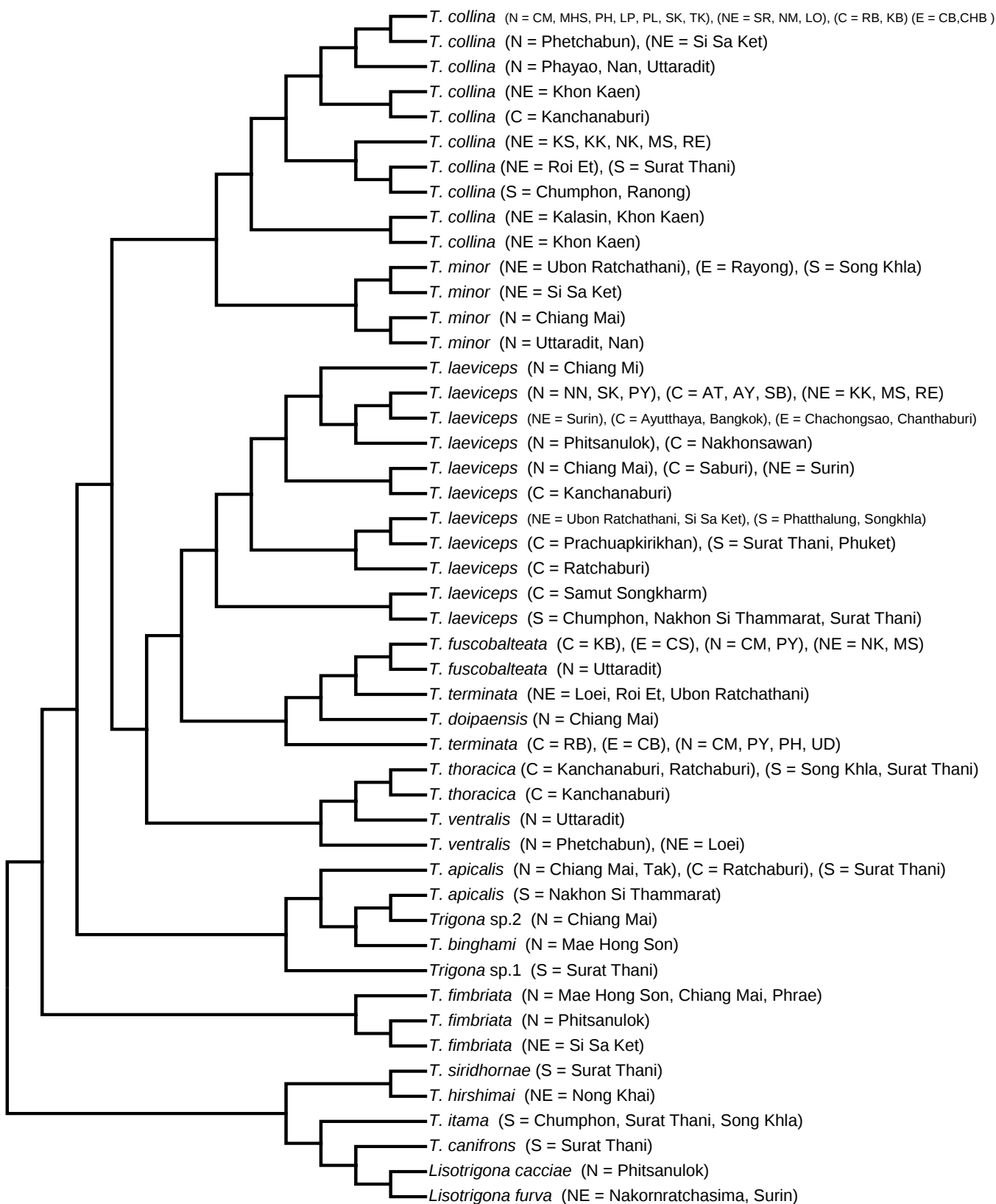
ตารางที่ 16 แสดง primer ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ 16S rDNA ใน mtDNA ของชันโรง

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 และทำการบันทึกผล

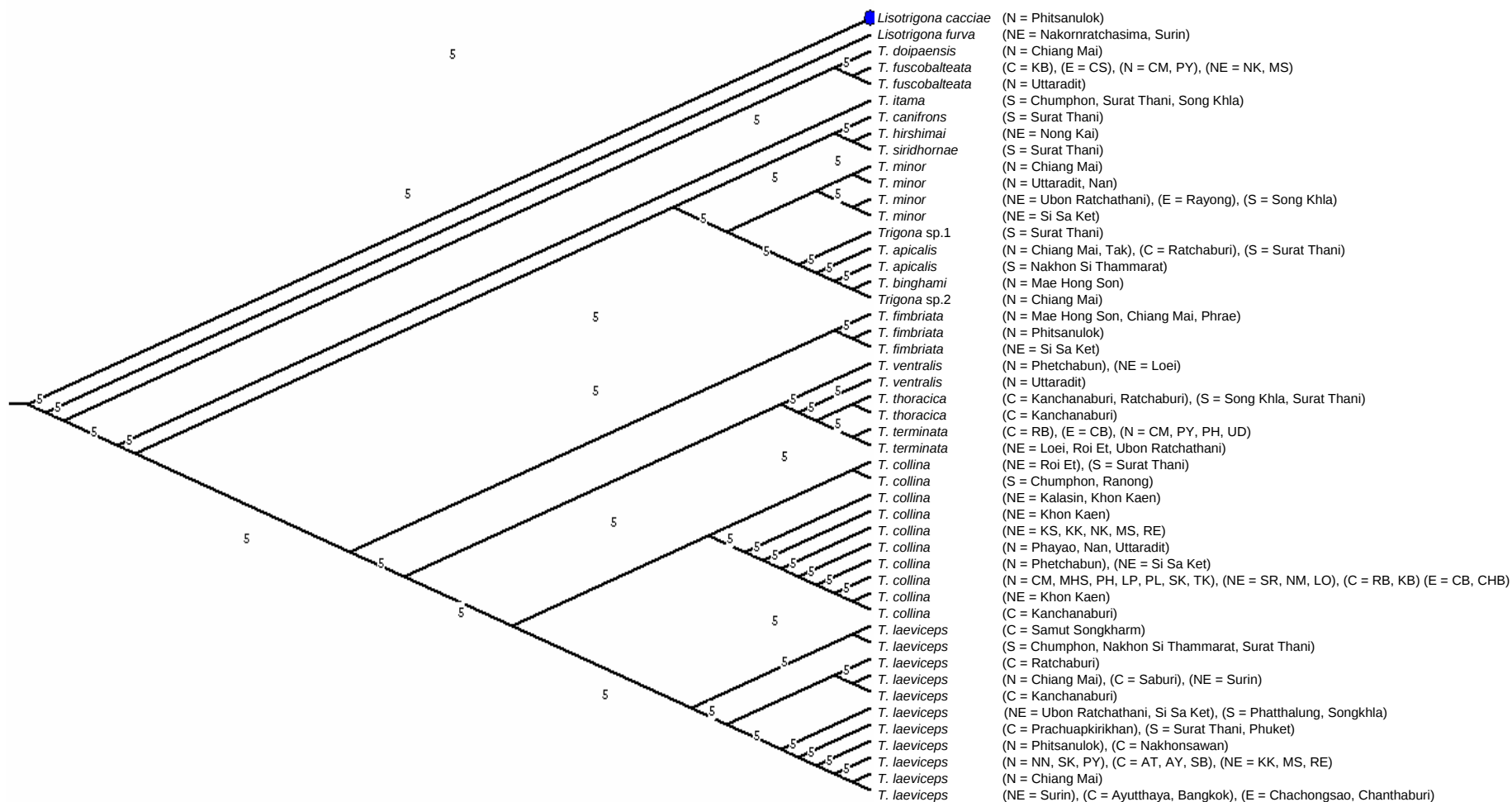
ผลการศึกษา

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 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 550 bp มีการแปรผันในยีนส่วน 16S rRNA ของชันโรง โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Dra* I, *Hpy*188 III, *Ssp* I, และ *Pac* I 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

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทย และบ่งชี้ว่าวิธีการวิเคราะห์ PCR - RFLP ในยีน 16S rRNA สามารถใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทยได้

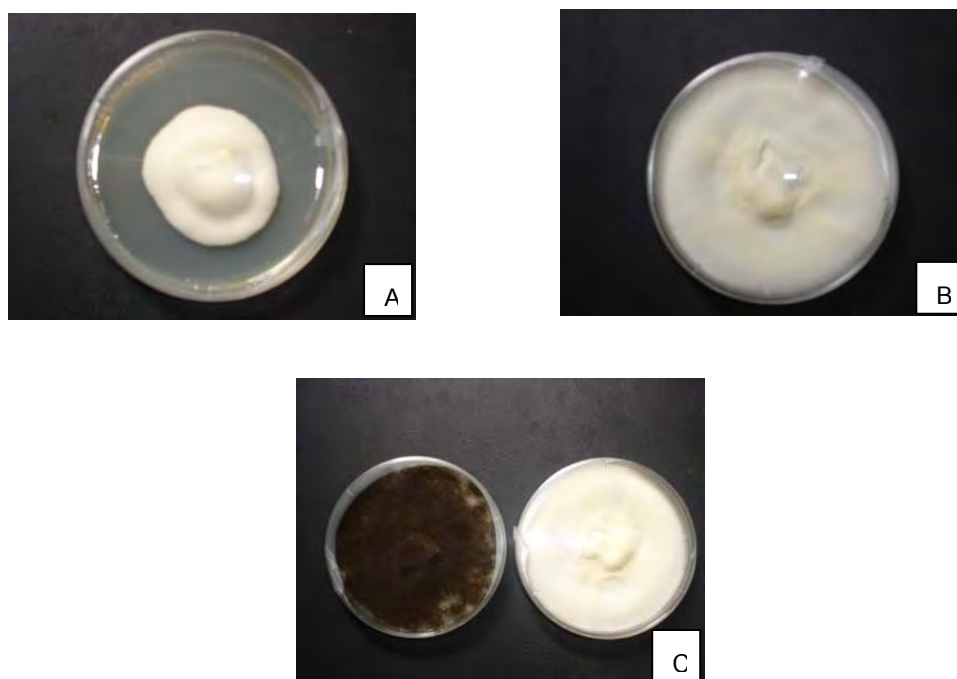
1.6 ศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร propolis และ sticky band ของ *A. florea*, *andreniformis* และชันโรง

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

มนุษย์มีการนำผลิตภัณฑ์ต่างๆ ของผึ้งมาใช้ประโยชน์อย่างมากมายพรอพอลิสหรือยางไม้ นับเป็นผลิตภัณฑ์จากผึ้งชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมและเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 300 ปีก่อนคริสตกาลในรูปแบบของยาแผนโบราณ โดยแหล่งที่มาที่สำคัญของพรอพอลิส คือ ยางไม้เนื้ออ่อน 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 โพรงจมูกอักเสบ เนื้อเยื่อในช่องปาก และคออักเสบ เจ็บคอ ลมหายใจมีกลิ่น ภูมิแพ้ ภูมิ-ต้านทานอ่อนแอ ในปัจจุบันพบว่ามียาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีส่วนผสมของพรอพอลิสจำหน่ายอย่างแพร่หลายในท้องตลาด เช่น เครื่องสำอาง ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก ครีมทาผิว รวมถึงยาทาแผลต่างๆ (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 พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้น 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 ชั้นโรงเป็นแมลงสังคมกลุ่มเดียวกับผึ้ง 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) ในการวิจัยนี้ใช้ชั้นโรงใน Genus Trigona, Species *Trigona laeviceps* (Smith, 1857) ซึ่งเป็นชนิดที่มีทั่วไปและสามารถเลี้ยงได้ โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ลักษณะที่สำคัญแตกต่างกันไปจากผึ้งคือ ชั้นโรงเป็นผึ้งที่

ไม่มีเหล็กใน สร้างรังปกปิดทางช่องโพรงดิน โพรงไม้ หรือตามอาคารบ้านเรือน รังชั้นโรงแตกต่างกับผึ้งตรงที่ผึ้งใช้พอรพอลิสเพียงรอบนอกรังเท่านั้น ส่วนชั้นโรงจะใช้ขี้ผึ้งบริสุทธิ์และเซอรูเมน ซึ่งเป็นขี้ผึ้งผสมพอรพอลิสที่มีอยู่มากมายดังนั้นการนำรังชั้นโรงมาสกัดพอรพอลิสจึงได้ปริมาณมากกว่าพอรพอลิสจากรังผึ้ง (ADVANCED THAILAND GEOGRAPHIC, 2546) และเนื่องจากในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งได้รับความนิยมทั่วโลก การเลี้ยงผึ้ง เกิดจากสาเหตุที่น้ำผึ้งจากธรรมชาติเริ่มหายาก เนื่องจากป่าไม้ถูกทำลาย ผึ้งและสัตว์ป่าขาดที่อยู่อาศัย แต่ผึ้งประสบปัญหาการแพร่กระจายโรคเน่าของตัวอ่อนที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์มาก เช่น โรคชอล์กบรูด (Chalkbrood, CB) สาเหตุ เกิดจากรา *Ascosphaera apis* ทำให้ตัวอ่อนผึ้งที่ตายถูกปกคลุมด้วยเส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะคล้ายแท่งชอล์กสีขาว โดยปกติสปอร์จะไม่ทำให้เกิดโรคจนกว่าจะมีการเติบโตเป็นเส้นใย ซึ่งจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิปกติในรังผึ้ง อาการของผึ้งที่ถูกเชื้อเข้าทำลายมีทั้งตัวอ่อนและดักแด้ ตัวอ่อนอายุ 3-4 วันเมื่อมีอาการระบดอย่างรุนแรง จะมีตัวอ่อนที่ปิดฝาตายและแห้งอยู่ภายในหลอดรวง รังที่เป็นโรคนี้นี้ในระดับที่รุนแรง จะพบว่ามิตัวอ่อนที่เป็นโรคแห้งตายตกอยู่ที่พื้นรังเป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถตรวจพบโรคนี้ได้ง่าย



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

(C) สปอร์และเส้นใยของรา *Ascosphaera apis* อายุ 7 วัน

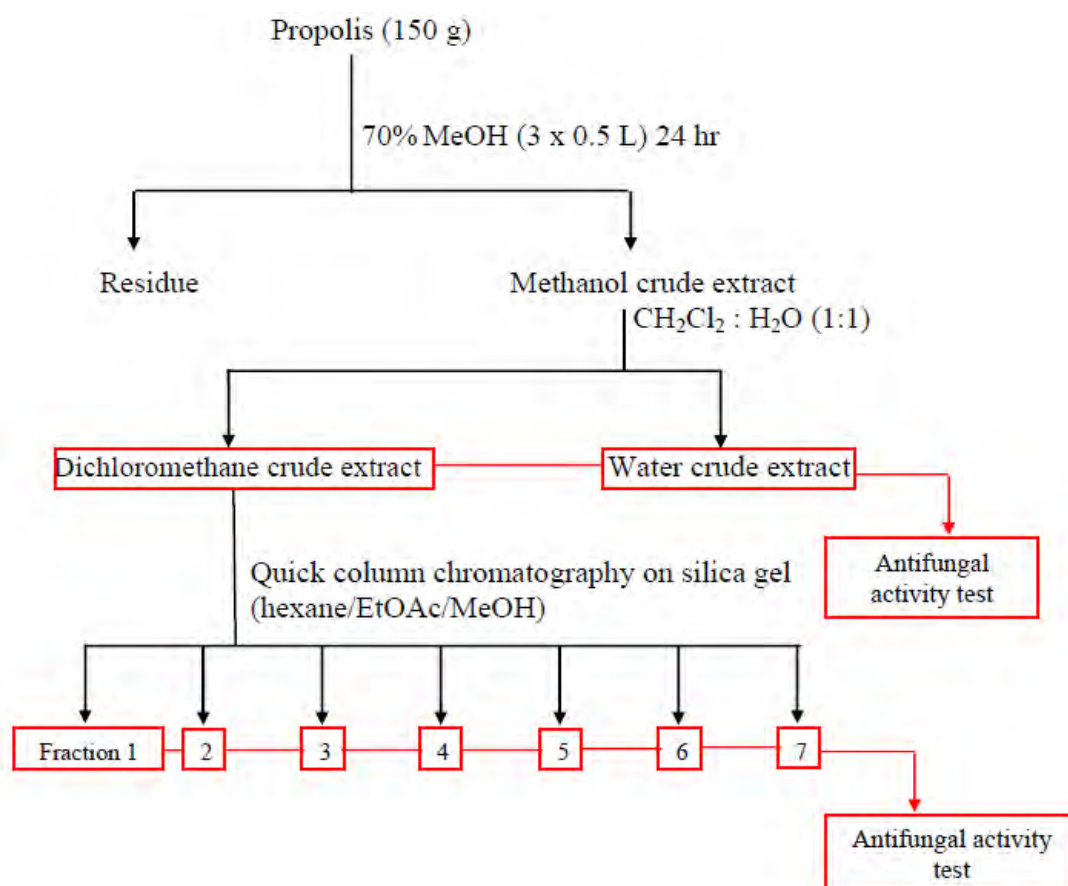
การป้องกันกำจัด ยังไม่มีวิธีการควบคุมที่เชื่อถือได้ แต่ก็มีหลายวิธีที่ส่งผลในการป้องกัน ด้วยการรักษาผึ้งไว้ให้ปลอดภัยจากเชื้อโรคนี้ การทำให้รังผึ้งมีประชากรที่แข็งแรง ระบายอากาศที่ดี ไม่ให้ความชื้นภายในรังสูง มีการเพิ่มตัวเต็มวัยที่เพิ่มออกจากหลอดรวงใหม่ ๆ ให้กับรังที่เพิ่งเริ่มเป็นโรคนี้ เพื่อช่วยทำความสะอาดรัง

งานวิจัยนี้คาดว่า การแยกสารประกอบของพรอพอลิสและนำมาทดสอบคุณสมบัติของสารประกอบในพรอพอลิสที่ได้จากรังชันโรง (*Trigona laeviceps*) จากในประเทศน่าจะมีผลในการยับยั้งเชื้อรา (*Ascosphaera apis*) ที่ก่อโรคซอกัลบรูตได้

วิธีการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างรังชันโรง โดยเลือกใช้สปีส *Trigona laeviceps* ในการวิจัยเนื่องจากเป็นชันโรงที่พบได้ทั่วไปและมีการเพาะเลี้ยงได้ และตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เก็บได้จาก ต้นยางใต้หรือ ต้นสะแบง 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. ทำการแยกสารสกัดพหุพลิส โดยวิธีโครมาโทกราฟี (Valcic *et al.*, 1999)
 - 4.1 แยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี
 - 4.2 แยกละเอียดอีกครั้งโดยใช้วิธี HPLC
 5. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทำการทดสอบฤทธิ์การฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Ascosphaera apis* ที่ละชนิดโดยใช้วิธีเดียวกับข้อที่ 3
 6. วิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ได้ระหว่างสารสกัดพหุพลิส และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จากรังชันโรง *T. laeviceps*

ผลการศึกษา

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

ตารางที่ 17 ผลการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้นต่างๆ

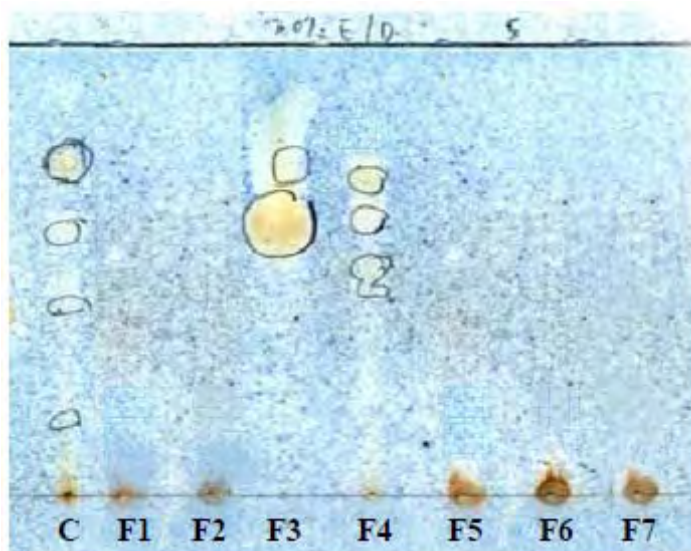
Concentration of dichloromethane crude extract (ppm)	Inhibition (%)	SD	IC ₅₀ (ppm)
0	0.0	±0.00	190.0
150	3.3	±0.23	
170	20.7	±0.32	
190	51.3	±0.23	
200	74.3	±0.51	
230	83.3	±0.29	
250	98.3	±0.29	
500	100.0	±0.00	
1000	100.0	±0.00	

- การสกัดไดคลอโรมีเทนปริมาณ 20 กรัม สามารถแยกสารโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ออกมาเป็น 7 ส่วน

ตารางที่ 18 สารสกัดไดคลอโรมีเทนที่แยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ส่วนที่1-7

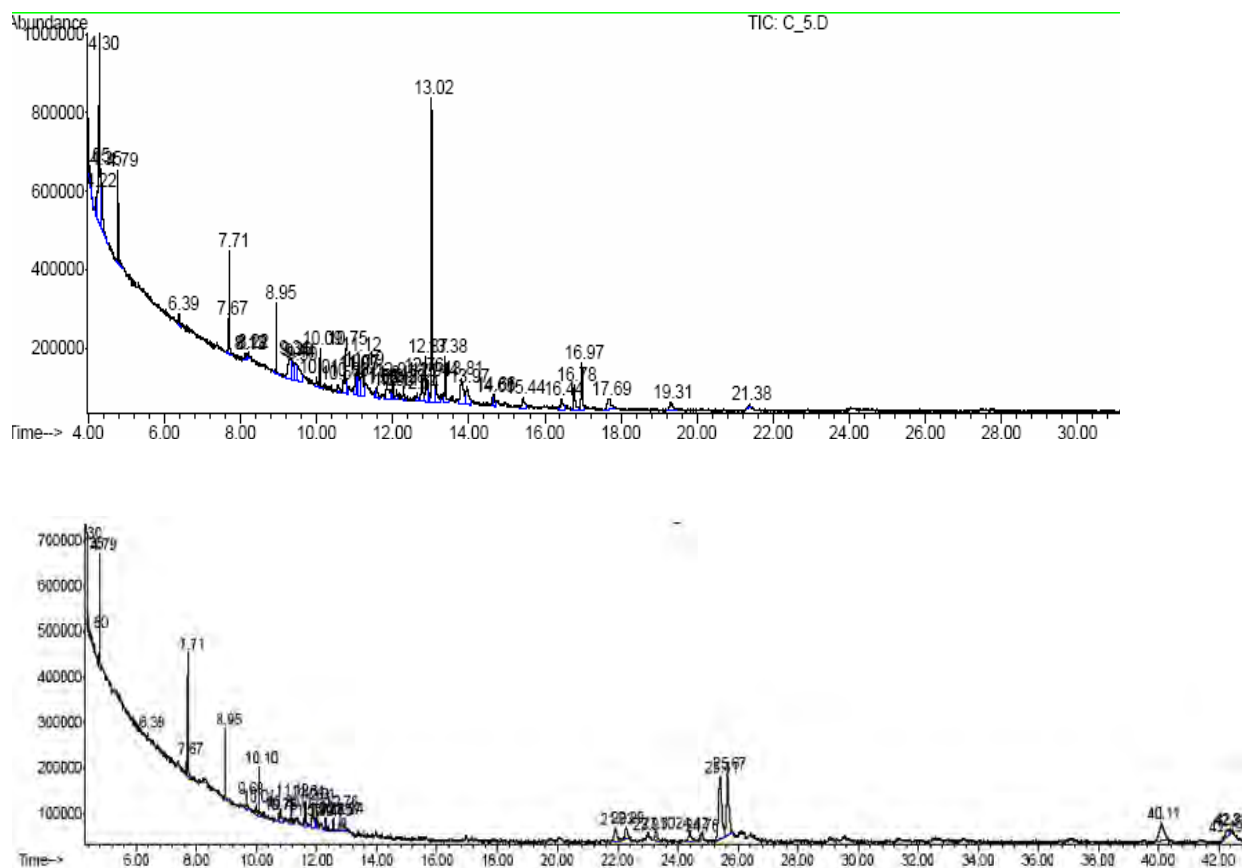
Fraction number	Eluent	Remarks	Weight (g)
1	Hexane – 1:9 EtOAc/Hexane	yellow	0.14
2	2:8 EtOAc/ Hexane	pale yellow	5.43
3	3:7EtOAc/Hexane	yellow viscous	2.72
4	4:6 EtOAc/Hexane	orange	2.68
5	6:4 EtOAc/Hexane	light brown	1.92
6	8:2 EtOAc/Hexane	brown	0.55
7	EtOAc – 1:9 MeOH/EtOAc	dark brown	0.98

- 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

พรอพอลิสจากรังชันโรง *Trigona laeviceps* ที่เก็บจากร้อยเอ็ด ประเทศไทย ได้ถูกนำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascosphaera apis* ที่ก่อโรคซอล์กบรูต 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 เมื่อนำพรอพอลิสมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วย 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 เป็นองค์ประกอบหลักในพรอพอลิส แต่ไม่มีข้อมูลตรงกับฐานข้อมูลของ Wiley ถึงแม้ว่า camphor ซึ่งเป็น

ส่วนประกอบหลักของส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แสดงให้เห็นว่า camphor ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Ascosphaera apis*

เอกสารอ้างอิง

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

ศูนย์อนุรักษ์และขยายพันธุ์ผึ้งที่ 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., sigh, P. M., Maiese, M. W., and Timmer ann, 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), antibacteria (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) ($p<0.05$).

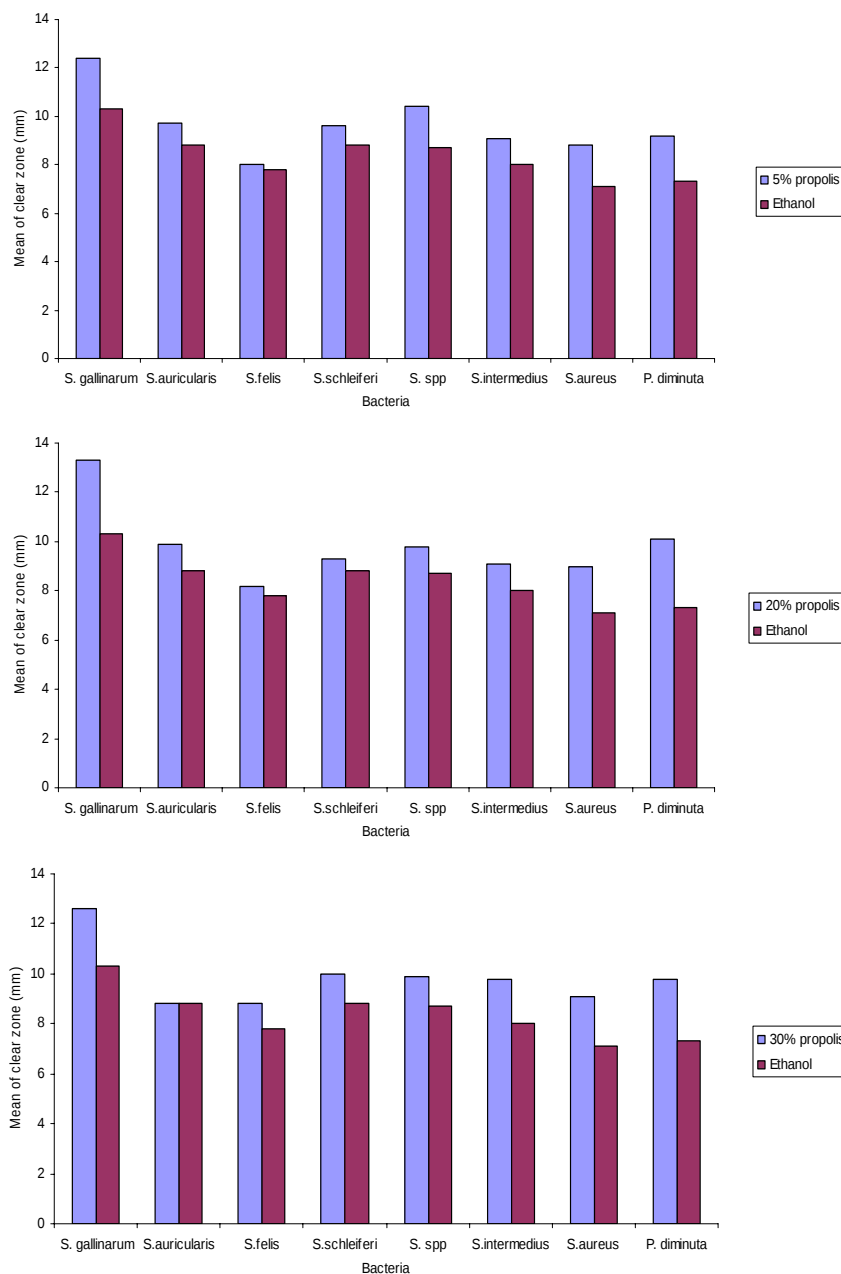


Figure 85. Effects of three different concentrations (% w/v) of ethanolic extraction of propolis against seven pathogenic bacteria. Zone of inhibition of *S. gallinarum*, *S. auricularis*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *S. aureus* and *P. diminuta* against 5, 20 and 30 percent of EEP are expressed in mean $\pm$ 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 (Sforzin *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 (Tucuma N , 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. เฟอโรโมนผึ้ง (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, มาลี ศรีพรมมา, มาลี เรืองฤดี และแสงจันทร์ ชุตติยรัตน์. 2547. ความหลากหลายชนิดและแหล่งอาศัยของชันโรงในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา จังหวัดลพบุรี. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร 1(1): 63-74.
4. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และทรรศนีย์ ไชยวงศ์. 2547. น้ำผึ้งโครงการพระราชดำริ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ. วารสารราชบัณฑิตยสถาน 29 (ฉบับพิเศษ) :170-179.
5. กมลภรณ์ บุญถาวร, ธัชคณิน จงจิตวิมล, วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ และ สุรวิรัตน์ เตียววณิชย์. 2548. การวิเคราะห์ทางมอร์โฟเมตริกของชันโรง *Trigona collina* Smith ที่พบบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร 2(1): 59-71.
6. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, สุรวิรัตน์ เตียววณิชย์ และปิยมาศ นานอก. 2549. ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) กับคนกรุงเทพมหานคร. วารสารราชบัณฑิตยสถาน 31(2): 508-515.
7. Chanchao, C. and Rattanawanee, A. 2006. มารู้จักผึ้งมีมเล็กกันเถอะ (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. แม่ริม 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. แม่ริม จ. เชียงใหม่
 4. Dathong, P., and Deowanish, S. เสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง “ความหลากหลายของแมลงในสวนสุขภาพเทิดพระเกียรติสมเด็จพระย่า 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.แม่ริม จ.เชียงใหม่
 6. Juntawong, N., Sawatum, A., Dejtisak, 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. แม่ริม 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 อาคารวิจัยและพัฒนาอํานวน 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 เดือน มีนาคม 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 เดือน มีนาคม 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 เดือน มีนาคม 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 เดือน มีนาคม 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 สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ 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 สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ 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 จันทวรรณกูร และ สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง “การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรในห้องปฏิบัติการต่อการเจริญของเชื้อก่อโรค ซอดด์บรูตและยูโรเปียนฟาวบรูตในผึ้ง (*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* Linneaus, 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, สุมน 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 สวาสดีธรรม, 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
โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
38. Nanork, P., Chapman, N. C., Oldroyd, B. P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทาง
วิชาการเรื่อง “Worker reproduction in *Apis cerana* colonies” ในการประชุม Bee
Biology, Bee Products and Their Applications วันที่ 9-11 มิถุนายน 2549 ณ ห้อง
ประชุม โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัย
มหาสารคาม
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 โครงการจัดตั้ง
พิพิธภัณฑ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
40. Rattanawanee, A., Chanchao, C. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทางวิชาการ
เรื่อง “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 โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
41. Suppasat, T., Deowanish, S., Smith, D. R. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทาง
วิชาการเรื่อง “Survey of *Apis mellifera* subspecies in Thailand” ในการประชุม
Bee Biology, Bee Products and Their Applications วันที่ 9-11 มิถุนายน 2549
ณ ห้องประชุม โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัย
มหาสารคาม
42. Wattanachaiyingcharoen, W., Oldroyd, B. P. and Wongsiri, S. เสนอผลงานทาง
วิชาการเรื่อง “Genetic structure of aggregations of *Apis florea*” ในการประชุม
Bee Biology, Bee Products and Their Applications วันที่ 9-11 มิถุนายน 2549 ณ
ห้องประชุม โครงการจัดตั้งพิพิธภัณฑ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาวิทยาลัย
มหาสารคาม

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 IUSI, 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. Chaiharu, 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., Chaiharn, 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. เสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าเรื่อง “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 IUSSI 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 สอนพฤษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่

3.3 ศ. ดร. ม.ร.ว. ชีษณุสรณ์ สวัสดิวัตน์ ศ. นพ. สุทัศน์ พุฒิชัย 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. จำนวนนักวิจัยรุ่นใหม่ที่สร้างจากโครงการ							
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

Palynological Analysis of Stingless Bee (*Trigona collina* Smith) Pollen Loads for Botanical Origin Determination in Relation to Floristic Composition in Northern Thailand

NIRAN JUNTAWONG^{1,*}, WIPAWEE DEJTISAKDI¹, SUMON MASUTHON¹, ANCHALEE SAWATUM², JUTHATIP YOOYEN³, HERMANN PECHHACKER⁴ and SIRIWAT WONGSIRI⁵

¹Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, THAILAND

²Faculty of Plant Science, Rajamongkol University, Phatumthani, THAILAND

³Department of Pollution Control, Ministry of Science and Technology, Phatumthani, THAILAND

⁴Institut fuer Bienenkunde, A-3293 Lunz am See, AUSTRIA

⁵Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10900, THAILAND

(*author for correspondence, e-mail : fscinrj@ku.ac.th)

ABSTRACT – Stingless bee (*Trigona* sp.) need pollen as food source for growth of colony. The number of colony depends on available supply of melliferous species. We studied morphology of pollen from hive-returning stingless bee pollen load and analyzed the plant community in the deciduous forest of Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai province, Thailand. The *Trigona collina* Smith. visited 18 from 70 flowering species around the year. These pollen floras were Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.), Tin tukkae (*Tridax procumbens* L.), Plao yai (*Croton roxburghii* N.P. Balakr.), Rok faa (*Terminalia alata* Heyne ex Roth), Phang rae yai (*Trema orientalis* (L.) Blume), Chaa paen (*Callicarpa arborea* Roxb.), Kamlung suea khong (*Betula alnoides* Buch.-Ham. ex G. Don), Phrik (*Capsicum frutescens* L.), Arang (*Peltophorum dasyrachis* (Miq.) Kurz), Thalo (*Schima wallichii* (DC.) Korth.), Maiyarap ton (*Mimosa pigra* L.), Po lom pom (*Thespesia lampas* (Cav.) Dalz. & Gibs.), Khaa hot (*Engelhardtia serrata* Blume), Ya yung (*Capillipedium parviflorum* (R.Br.) Stapf), Sieo dok khaao (*Bauhinia variegata* L.), Kaafaak (*Scurrula* sp.), Graminae and Verbenaceae. The flora species visited by the stingless bees was not related with the importance value index (IVI) and density of the given species. The result suggests that there is the preference behavior of pollen collection for the stingless bee. This information is useful for monitoring and conservation management of this bee species.

Key words : Stingless bee, *Trigona collina*, melliferous plants, palynology, pollen load, importance value index

1. Introduction

Stingless bee is important for crop pollinations in Thailand, beside other bee pollinators such as asian bee (*Apis cerana* F.), giant bee (*Apis dorsata*) and european bee (*Apis mellifera*). Twenty four *Trigona* species are recorded in Thailand (Saiboon, 1996), including *Trigona collina* Smith. In the past, the stingless bees were widely distributed around the country. However, due to an increase of human being population and modernization, the reduction of forest fragments largely spreads throughout the country, the number of the bee colony rapidly undergoes an extinction process (Pechhacker *et. al*, 1991, Pechhacker and Juntawong, 1994) and the beekeeper preferred to keep the domesticated european honey bee more than the asian honey bee (Wongsiri and Chen (1995).

Nowadays, stingless bee species in Thailand can be apparently found in protected national park such as Queen Sirikit Botanic Garden (QSBG), Chiangmai province because of the tremendous availability of pollen and nectar sources. The QSBG located in Doi Pui-Suthep national park between 19-20 °N latitude and 91-92 °N longitude and covered with common species of Dipterocarpaceae. However, the melliferous plant species for the stingless bee have never been surveyed in the QSBG area.

Vorwohl (1954) used the pollen-honey analysis to identify the botanical and geographical origin of nectar plants. Juntawong and Pechhacker (1991) analyzed the pollen in honey sac of european bee (*Apis mellifera*) to determine the nectar plant source whereas the pollen from hair body of the bee was observed by Cotmee (1999). Bastos *et al.* (2004) determined 14 honey bee (*Apis* sp.) pollen loads in the states of Sao Paulo and Minas Gerais, Brazil and several pollen types were identified. Eucalyptus (Myrtaceae) and Eupatorium (Asteraceae) pollen types were the most common among those sampled. The nondestructive analysis of honey by Raman spectroscopy is alternatively used to identify the floral origin of honey (Good *et al.*, 2002). Nevertheless, this highly specialized mellisopalynological technique costs expensively. Sriputachat (1972) reared *Apis cerana* Far. at Sakaerat forest, Nakorn Ratchasima Province, Thailand and found that the majority of the pollen collected came from *Pterocarpus macrocarpus* Kurz (Family Leguminosae).

In this paper we analyzed pollen loads from hive-returning stingless bee to survey and identify plants which the bee used pollen as food source. It also aims to identify the relationship among the available plant species and its relative importance. This study focused on the assessment of pollen plants in Queen Sirikit Botanic Garden in northern Thailand as a case study. The inventory directory of melliferous plant species is illustrated. This information will be useful for the future improvement of cultural practice and management of stingless bees in Thailand.

2. Materials and Methods

Study area : The deciduous forest at Queen Sirikit Botanic Garden (QSBG), Chiangmai was selected as a model site for the study. The forest is still virgin, located between 18 54 57 °N, 98 51 11 °S and 18 55 43 °N, 98 48 47 °S and the elevation between 750-1,030 m from mean sea level (MSL) (Figure 1), never fired.

Stingless bee species : The *Trigona collina* Smith stingless bee colony was selected for the study. The bee hive located at 18 54 55 °N and 98 51 13 °S and at the elevation 1,000 m from mean sea level.

Pollen load study : Ten pollen loads from the stingless bees were collected monthly during 9-11.00h around the year by trapping the hive-returning bees in front of the hive with small plastic bags. The pollen loads were then transferred to a small glass vial and kept in refrigerator for further analysis. In the laboratory, the pollen were acetolyzed according to the method of Erdtmann (1961). The triplicates of permanent slides were prepared by the paraffin method (Johannsen, 1942) for Olympus light microscopic observation. The sculpturing structures of the pollen were studied with JACSCO scanning electron microscope.

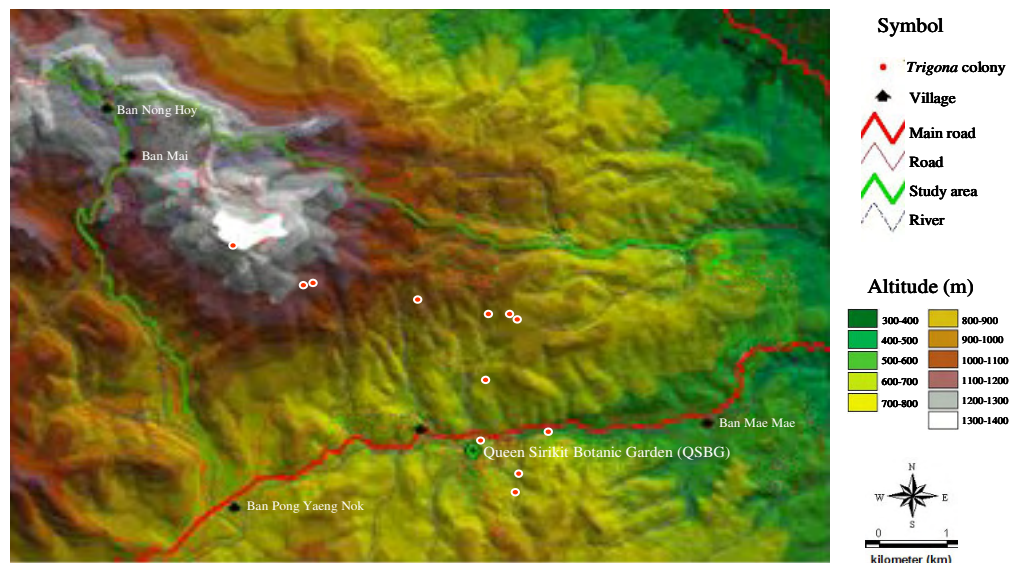
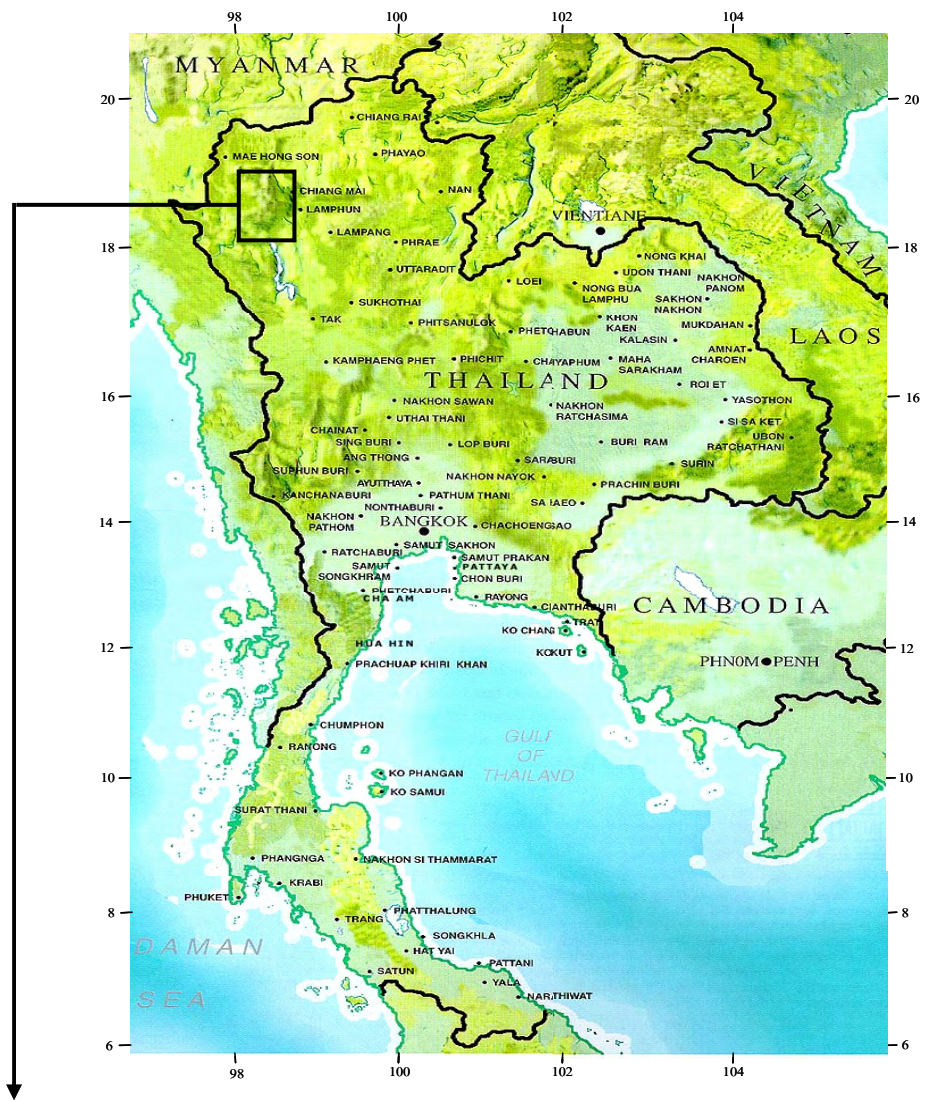


Figure 1. Study area in deciduous forest, Queen Sirikit Botanic Garden (QSBG), Chiangmai province between 18 54 57-18 55 43 °N and 98 48 47-98 51 11 °S, altitude at 750-1,030 m from mean sea level.



Figure 2. Trigona collina Smith stingless bee hive under termite hive in the study area



Figure 2. *Trigona collina* Smtih stingless bee hive under termite hive in study area

Flowering plant collection : An inventory of blooming plant was carried out along the walking way from the base (750 MSL) to the hill direction (1,030 MSL) at ca. 2 km distance, 50 m widely apart from each sides. Blooming was recorded every months. Plant specimens with flower and pollen were collected as the same time as the collection of pollen load from the hive-returning stingless bees. Herbariums and permanent slides of the pollen from these plants were prepared, as described above, to compare the morphology with the stingless bee pollen's load. This will answer the question, among the inventoried species which are the most reported species as pollen source for stingless bee.

Plant community analysis : Three 20x50 m² quadrates in the study area were randomly selected for floristic compositional study according to Shimwell (1971). Each quadrate was divided into ten sub-quadrates of 10x10 m, were measured the diameter of all trees at 1.3 m from the ground (DCH-diameter at chest height). Only the trees with DCH from 15 cm up were considered. Density (D), Frequency (F), Dominance (Do) and Importance Value Index (IVI) of the trees were calculated using Microsoft Excel (Version 2002) from the following equations :

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1) Density, D | = Total number of individuals/area sampled |
| Relative Density, RD | = (Density of a given species/sum of densities of all species)x100 |
| 2) Frequency of a species, F | = Total number of quadrats in which a species occurs/total number of quadrats examined |
| Relative Frequency, RF | = (Frequency of a given species/sum of frequency of all species)x100 |
| 3) Dominance of a species, Do | = Total percent cover of a species/total area sampled |
| Relative Dominance, RDo | = Dominance of a species/sum of the dominance of all species |
| 4) Importance Value Index, IVI | = RD + RF + RDo |

The structural parameters of the plant community were correlated with the pollen plants for stingless bee to obtain answers whether there is a relationship between pollen plants and the dominance, density and frequency and importance value index of the species or not.

A linear regression analysis was applied to identify the correlation between the number of pollen plants and number of flowering species and its dominance, density and frequency and importance value index.

3. Results

Flowering plant collection

A total amount of 70 accessions of flowering plants were inventoried around the year in QSBG and classified into 33 families, 57 genus and 70 species (Table I).

Pollen load study

Of the 70 inventoried flowering species, by comparing to the morphology of pollen, 18 species were found from the pollen load (Table II and Figure 3-21). Among the known species, the Thalo (*Schima wallichii* (DC.) Korth.) and Arang (*Peltophorum dasyrachis* (Miq.) Kurz) were frequently observed in the samples from March, April and June. Interestingly, no pollen was collected between July-September. In October, 80.5% of pollen came from Maiyarap ton (*Mimosa pigra* L.). In November 2003, the Gramineae pollen was predominantly found in pollen load. Khaa hot (*Engelhardtia spicata* Blume) was a dominant species in December. The number of pollen species in the pollen load increased during December-January. The most important pollen source in February came from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). The number of pollen species (y) did not correlate with the number of flowering species (x) ($y = 0.0181x + 1.9063$, $R^2 = 0.006$, $p > 0.05$) (Table II).

Plant community analysis

Thirty six tree species with DCH > 15 cm were recorded in 20x50 m² quadrates area (Table III). Only four species of pollen plants for stingless bee, Rok faa (*Terminalia alata* Heyne ex Roth), Chaa paen (*Callicarpa arborea* Roxb.), Thalo (*Schima wallichii* (DC.) Korth.) and Khaa hot (*Engelhardtia serrata* Blume), were observed in the quadrates area with the density of 0.3, 0.1, 0.07 and 0.03 plants/m², respectively. Families that presented higher value for density, frequency, dominance and importance value index were not the same one found in pollen load. The importance value index did not correlate with the percent of pollen of the same species in pollen load ($p > 0.05$) (Figure 22).

4. Discussion

In the study area the blooming species were found around the year (Table I, II) even in July, August and September. However, during July-September, there was not much flights activity and no pollen load was found on the hive-returning stingless bee. This is because it is in rainy season in Thailand. As reported, high humidity and lower temperature outside the hive obstructs foraging activity of the bees. No correlation between the number of pollen species found in pollen load and the number of blooming species (Table II). This indicates that the preferential behavior of pollen collection exists in the bee.

Among the inventoried species, Thalo (*Schima wallichii* (DC.) Korth.), Phrik (*Capsicum frutescens* L.), Maiyaraap ton (*Mimosa pigra* L.), Khaa hot (*Engelhardtia spicata* Blume), Rok faa (*Terminalia alata* Heyne ex Roth) and Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) are the most reported species as pollen source for stingless bee.

Although the number of melliferous species is limited (18 species), compared to the total blooming species (70 species), we expect that the number of pollen plants should

be more than observed. Three reasons can be implied the result. Firstly, because the pollen morphology is closely similar to each others, this makes the difficulty for the

identification. Second, due to the line transect sampling method, not all flowered species in the area were collected. Some species locates in the deep valley area where we could not go through. Thirdly, because the pollen load was collected from hive-returning stingless bee between 9.00-11.00h, however, various plant species bloomed in the afternoon.

In the study area the forest type was dipterocarp which consisting mainly of Ko phae (*Quercus kerrii* Craib), Teng (*Shorea obtusa* Miq.), Yaang hiang (*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. ex Miq.), Yaang phluang (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.), Mueat lot (*Aporosa villosa* (Wall. ex Lindl.) Baill.) and Kwaao (*Haldina cordifolia* (Roxb.) Ridsdale). These predominant species present the greatest number of dominance, density, frequency and importance value index (Table III). However, there is no correlation between these species and the species of pollen collected by the *Trigona collina* Smith stingless bee.

5. Acknowledgement

The authors would like to thank the Thai Research Fund (TRF) for providing the grant to carry out this research project. Dr. Weerachai Nanakorn, director of QSBG who provided facilities to carry out the field works including transportation and accommodation.

6. References

- Andrianarivo, J.: 1993, 'Using GIS to evaluate the crown-line intersect sampling method in forest survey', *Forest Ecology and Management* **59**, 87-103.
- Bastose, D.H.M., Barth, O.M., Rocha, C.I., da Silva Cunha, I.B., de Oliveira Carvalho, P., Torres, E.A.S. and Michelan, M.: 2004, 'Fatty acid composition and palynological analysis of Bee (*Apis*) pollen loads in the states of Sao Paulo and Minas Gerais, Brazil', *Journal of Apicultural Research* **43** (2), 35-39.
- Boonithee, A., Juntawong, N., Pechhacker, H. and Hutteringer, E.: 1991, 'Floral visits to select crops by four *Apis* species and *Trigona* spp. In Thailand', pp. 73-80. In Heemert, C. and Ruijter, A. (eds.). The Sixth International Symposium on Pollination, 27-31 August, 1990, Tilburg, Netherlands.
- Boonyamalik, K.: 1969, 'The Palynological Study of Thai Dipterocarpaceae', M.S. Thesis, Chulalongkorn University.
- Brow, C. A.: 1960, 'Palynological Techniques', Louisiana State University, Baton Rouge La.
- Cotmee, S.: 1999, 'Bestäubungswert Verschiedener Bienenarten : Vergleich zwischen der asiatischen Honigbiene *Apis cerana* Fabr. und der europäischen *Apis mellifera* L., einigen Hummel und Solitärbienearten', Dissertation an der Universität fuer Bodenkultur, Wien.
- Cunha, L.F.V.C. and Albuquerque, U.P.: 2006, 'Quantitative ethnobotany in an atlantic forest fragment of northeastern Brazil. – Implications to conservation', *Environmental Monitoring and Assessment* **114**, 1-25.

- Erdtman, C.: 1952, 'Angiosperm, Pollen Morphology and Plant Taxonomy I', Stockholm and Waltham, Man.
- Erdtman, C.: 1966, 'Angiosperm (An Introduction to Palynology I)- Pollen Morphology and Plant Taxonomy', 3rd ed. Hafner Publishing, New York.
- Gibbert, W. M.: 1973, 'Foraging behavior of *Trigona fulviventris* in Costa Rica (Hymenoptera: Apidae)', *Pan-Pacific Entomologist* **41** (1), 21-25.
- Goodacre, R., Radovic, S. and Anklam, E.: 2002, 'Progress toward the rapid nondestructive assessment of the floral origin of European honey using dispersive Raman spectroscopy', *Applied Spectroscopy* **56**(4), 521-527.
- Juntawong N. and Pechhacker, H.: 1991, 'Passage of pollens through proventriculus in honey sacs of european bee (*Apis mellifera carnica* L.)', *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* **25**, 369-372.
- Jim, C.Y.: 2005, 'Floristics, performance and prognosis of historical trees in the urban forest of Guangzhou city (China)', *Environmental Monitoring and Assessment* **102**, 285-308.
- Jim, C.Y.: 2003, 'Protection of urban trees from trenching damage in compact city environments', *Cities* **20**, 87-94.
- Pechhacker, H. and Juntawong, N.: 1994, '*Apis mellifera* versus *Apis cerana* in the north of Thailand', *Beekeeping&development* **30**, 6
- Ringvall., A. and Ståhl, G.: 1998, 'Field aspects of line intersect sampling for assessing coars woody debris', *Forest Ecology and Management* **119**, 163-170.
- Saksuwan, S.: 1975, 'Pollen Morphology of Thai species of *Bauhinia* (Caesalpiniaceae)', *Grana* **14**, 131-141.
- Saupe, S. G., Hoffman, B. and Zenzen, M.: 2004, 'Technical Dichotomous Key: A Scientific Guide for Pollen Identification', Center for pollen studies, Available source:[http://www.csbsju.edu/biology/pollen/ Links/ technical_key.htm](http://www.csbsju.edu/biology/pollen/Links/technical_key.htm), September 20, 2004.
- Santisuk, T.: 1979, 'A palynological study of the tribe Ranunculaceae', Opera Botanica, Chulalongkorn University, Bangkok.
- Saiboon, S.: 1996, 'Biology and Ecology of Stingless bees', M.Sc. Thesis, Prince Songkhla Nakarin University.
- Wille, A.: 1983, 'Biology of the Stringless bee', *Annual Review of Entomology* **28**, 4-64.
- Sriputachart, J.: 1972, 'Pollen source for bees in Sakearach wild', Seminar document in Bio-forestry 597, Faculty of Biological Forestry, Kasetsart University. Bangkok.
- Shimwell, D.W.: 1971, 'The Description and Classification of Vegetation', Sidgwick & Jackson Inc., London.
- Torre-Cuadros, M.D. and Isbele, G.A.: 2003, 'Traditional ecological knowledge and use of vegetation in southeastern Mexico: A case study from Solferino, Quintana Roo', *Biodiversity Conservation* **2**(12), 2455-2476.

Table I

Lists plant species which flowered around the year in the deciduous forest, Doi Monrong, Queen Sirikit Botanic Garden. The pollens were collected and analyzed to compare with the pollens in pollen loads of *Trigona collina* Smith stingless

Acc. no.	Family	Genus/species	Local name	Flowering period	Habitat	Reference
191	Anacardiaceae	<i>Buchanania lanzan</i> Spreng.	Mamuang hua maeng wan	Dec-Mar	T	BKF 067647
194	Anacardiaceae	<i>Gluta usitata</i> (Wall.) Ding Hou	Rak yai	Nov-Mar	T	BKF 049231
200	Anacardiaceae	<i>Spondias pinnata</i> (L.f.) Kurz	Ma kok	Dec-May	T	BKF 026355
377	Apocynaceae	<i>Holarrhena pubescens</i> Wall. ex G. Don	Mok yai	Mar-May	T	BKF 037046
233	Burseraceae	<i>Garuga pinnata</i> Roxb.	Ta khram	Feb-Apr	T	BKF 017689
287	Burseraceae	<i>Protium serratum</i> Engl.	Ma faen	Jan-Apr	T	BKF 063802
351	Caesalpiniaceae	<i>Peltophorum dasyrachis</i> (Miq.) Kurz	Arang	Mar-Apr	T	BKF 037998
620	Celastraceae	<i>Lophopetalum duperreanum</i> Pierre	Song salueng	Jun-Aug	T	BKF 040639
380	Combretaceae	<i>Quisqualis indica</i> L.	Lep mue naang	Mar-May	T	BKF 009984
283	Combretaceae	<i>Terminalia bellirica</i> (Gaertn.) Roxb.	Samo phi phek	Feb-Apr	T	BKF 008511
436	Combretaceae	<i>Terminalia alata</i> Heyne ex Roth	Rok faa	Jan-Jun	T	BKF 003696
627	Compositae	<i>Tridax procumbens</i> L.	Teen tukkae	Dec-Feb	H	BKF 008520
633	Compositae	<i>Mikania cordata</i> (Burm.f.) B.L.Rob.	Khee kai yaan	Oct-May	H	BKF 052790
634	Compositae	<i>Ageretum conyzoides</i> L.	Saapraeng saapkaa	Dec-Feb	H	BKF 037342
601	Convolvulaceae	<i>Argyrea kerrii</i> Kerrii	Khruea phuu muang	Sep-Nov	C	BKF 112016
193	Dilleniaceae	<i>Dillenia ovata</i> Wall. ex Hook.f & Thom.	Saan bai lek	Feb-May	T	BKF 133514
250	Dilleniaceae	<i>Dillenia pentagyna</i> Roxb.	Saan naa	Jan-May	T	BKF 063766
211	Dipterocarpaceae	<i>Shorea roxburghii</i> G.Don	Phayom	Dec-Mar	T	BKF 003802
251	Dipterocarpaceae	<i>Shorea siamensis</i> Miq.	Rang	Jan-Mar	T	BKF 016287
248	Dipterocarpaceae	<i>Dipterocarpus tuberculatus</i> Roxb.	Phluang	Dec-Apr	T	BKF 063671
549	Ericaceae	<i>Craibiodendron stellatum</i> (Pierre) W.Sm.	Taa-chee-khoei	Aug-Nov	T	BKF 045840
106	Euphorbiaceae	<i>Croton roxburghii</i> N.P.Balakr	Plao yai	Nov-Feb	T	BKF 042315
192	Euphorbiaceae	<i>Aporosa villosa</i> (Wall. ex Lindl.) Baill.	Mueat lot	Jan-Mar	T	BKF 033217
357	Euphorbiaceae	<i>Antidesma acidum</i> Retz.	Mamao	Apr-Jul	S	BKF 045834
364	Euphorbiaceae	<i>Antidesma buniis</i> (L.) Spreng.	Mamao dong	Mar-May	S	BKF 009595
478	Euphorbiaceae	<i>Antidesma sootepense</i> Craib	Mamao saai	May-Jul	S	BKF 002176
441	Euphorbiaceae	<i>Flueggea virosa</i> (Roxb. ex Willd.) Voigt	Kaangplaa khaao	May-Jun	S	BKF 069888
600	Euphorbiaceae	<i>Bridelia tomentosa</i> Blume	Seefan krabue	May-Dec	S	BKF 009098
252	Fabaceae	<i>Dalbergia oliveri</i> Gamble	Chingchan	Jan-May	T	BKF 010691
378	Fabaceae	<i>Butea superba</i> Roxb.	Kwaao khruea	Mar-May	C	BKF 116415
555	Fabaceae	<i>Codariocalyx motorius</i> (Houtt.) Ohashi	Choi naang ram	Aug-Sep	H	BKF 067679
612	Fabaceae	<i>Dunbaria bella</i> Prain	Khaang khrang	Sep-Jan	C	BKF 055792
190	Fagaceae	<i>Lithocarpus lindleyanus</i> (Wall.) A.Camus	Ko daang	Apr-May	T	BKF 004488
210	Fagaceae	<i>Castanopsis indica</i> L.	Ko lim	Jan-Mar	T	BKF 011684
284	Fagaceae	<i>Castanopsis diversifolia</i> (Kurz) King	Ko paen	Jan-May	T	BKF 005860
404	Fagaceae	<i>Castanopsis hystrix</i> A.DC.	Ko daeng	Jan-May	T	BKF 093266
411	Fagaceae	<i>Castanopsis ferox</i> (Roxb.) Spach	Ko lame	Jan-May	T	BKF 104865
244	Fagaceae	<i>Quercus ramsbottomii</i> A.Camus	Ko talab	Mar-Apr	T	BKF 010740
425	Fagaceae	<i>Quercus vestita</i> Rehder & Wills.	Ko aep	Dec-Feb	T	BKF 102667
550	Fagaceae	<i>Quercus kingiana</i> Craib	Ko daeng	Nov-Jan	T	BKF 002428
613	Gentianaceae	<i>Exacum tetragonum</i> Roxb.	Yaa liam	Nov-Dec	H	BKF 005045
199	Gramineae	<i>Dendrocalamus strictus</i> (Roxb.) Nees	Phai saang	Feb-Mar	H	BKF 019206
621	Gramineae	<i>Capillipedium parviflorum</i> (R.Br.) Stapf	Yaa yung	Nov-Dec	H	BKF 034131
383	Guttiferae	<i>Cratoxylum formosum</i> (Jack) Dyer	Tiu khon	Jan-May	T	BKF 004357
206	Juglandaceae	<i>Engelhardtia spicata</i> Blume	Khaa hot	Dec-Jan	T	BKF 092498
526	Labiatae	<i>Tectona grandis</i> L.f.	Sak	Jun-Oct	T	BKF 005997
350	Labiatae	<i>Callicarpa arborea</i> Roxb.	Chaa paen	Jan-Jul	S	BKF 002014
247	Malpighiaceae	<i>Hiptage benghalensis</i> (L.) Kurz	Kamlang chaang phueak	Jan-Feb	S	BKF 029889
438	Malvaceae	<i>Abelmoschus moschatus</i> Medic.	Som chabaa	Mar-Apr	H	BKF 046795
22	Mimosaceae	<i>Mimosa pudica</i> L.	Maiyaraap	Jan-Dec	H	BKF 070326
51	Mimosaceae	<i>Mimosa pigra</i> L.	Maiyaraap ton	Nov-Jun	S	BKF 059406
217	Mimosaceae	<i>Xylia xylocarpa</i> (Roxb.) Taub.	Daeng	Feb-Apr	T	BKF 016289
196	Myrtaceae	<i>Syzygium glaucum</i> Chantar & J.Parn.	Daeng	Feb-Apr	T	BKF 068467
445	Myrtaceae	<i>Syzygium fruticosum</i> DC.	Waa khee kwaang	Feb-Apr	T	BKF 001118
602	Orobanchaceae	<i>Aeginetia indica</i> Roxb.	Dok din daeng	Aug-Oct	H	BKF 122305
209	Palmae	<i>Phoenix acaulis</i> Roxb.	Peng bok	Feb-Mar	T	BKF 071998
434	Proteaceae	<i>Helicia nilagirica</i> Bedd.	Mueat khon tua phuu	Jan-Feb	S	BKF 048140
215	Rhamnaceae	<i>Ziziphus rugosa</i> Lam.	Ma khwat	Feb-Apr	S	BKF 017573
373	Rhamnaceae	<i>Gardenia sootepensis</i> Hutch.	Kham mok luang	Mar-Jul	T	BKF 017513
440	Rhamnaceae	<i>Pavetta petiolaris</i> Wall. ex Craib	Khem phae	May-Jun	S	BKF 024758
282	Sapindaceae	<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Oken	Ta khro	Jan-Apr	T	BKF 007671
222	Sapindaceae	<i>Litchi chinensis</i> Sonn.	Linchee	Feb-Apr	T	BKF 080768
557	Stemonaceae	<i>Stemona collinsae</i> Craib	Non taai yaak	Aug-Sep	C	BKF 077197

245	Sterculiaceae	<i>Firmiana colorata</i> (Roxb.) R.Br.	Po huu chaang	Feb-Apr	T	BKF 017242
376	Strychnaceae	<i>Strychnos nux-blanda</i> A.W. Hill	Salaeng chai	Feb-Mar	S	BKF 001750
249	Symplocaceae	<i>Symplocos racemosa</i> Roxb.	Mueat hom	Nov-Feb	T	BKF 024912
348	Theaceae	<i>Schima wallichii</i> (DC.) Korth.	Tha lo	Jan-Apr	T	BKF 000267
198	Theaceae	<i>Anneslea fragrans</i> Wall.	Saaraphee paa	Nov-Feb	T	BKF 047588
435	Tiliaceae	<i>Grewia lacei</i> Drumm. ex Craib	Naat nok	May-Jun	S	BKF 003869
360	Tiliaceae	<i>Grewia eriocarpa</i> Juss.	Po yaap	Jul-Sep	T	BKF 005912

Abbreviations : C = climber, S = shrub, T = tree, H = herb, BKF = Bangkok Royal Forestry Department Herbariums

Table II

Number of plant species which supplied pollen as food source for *Trigona collina* Smith and percent of pollen of each species in pollen loads between April 2003-March 2004

Month	Year	Flowering species*	No. species in pollen load	Plant species	Pollen (%)
April	2003	30	2	Thalo (<i>Schima wallichii</i> (DC.) Korth. : TC10 **)	89.9
				Arang (<i>Peltophorum dasyrachis</i> (Miq.) Kurz : TC9)	10.1
May	2003	21	1	Phrik (<i>Capsicum frutescens</i> L. : TC8)	100.0
June	2003	14	2	Thalo (<i>Schima wallichii</i> (DC.) Korth. : TC10)	90.8
				Arang (<i>Peltophorum dasyrachis</i> (Miq.) Kurz : TC9)	9.2
July	2003	13	-	No pollen load	-
August	2003	18	-	No pollen load	-
September	2003	5	-	No pollen load	-
October	2003	8	3	Maiyaraap ton (<i>Mimosa pigra</i> L. : TC11)	80.5
				Po lom pom (<i>Thespesia lampas</i> (Cav.) Dalz. & Gibs. : TC12)	12.8
				Verbenaceae (TC18)	6.7
November	2003	14	2	Gramineae (TC17)	97.8
				Po lom pom (<i>Thespesia lampas</i> (Cav.) Dalz. & Gibs. : TC12)	2.2
December	2003	12	4	Khaa hot (<i>Engelhardtia spicata</i> Blume : TC13)	77.8
				Ya Yung (<i>Capillipedium parviflorum</i> (R.Br.) Stapf : TC14)	12.0
				Kaafaak (<i>Scurrula</i> sp. : TC16)	8.9
				Sieo dok khao-like (<i>Bauhinia variegata</i> L. : TC15)	1.3
January	2004	20	9	Rok faa (<i>Terminalia alata</i> Heyne ex Roth : TC4)	23.1
				Gramineae (TC17)	15.7
				Cha paen (<i>Callicarpa arborea</i> Roxb. : TC6)	15.4
				Tin Tukkae (<i>Tridax procumbens</i> L. : TC2)	12.9
				Kamlung suea Khong-like (<i>Betula alnoides</i> Buch.-Ham. ex G.Don : TC7)	10.7
				Phang rae yai (<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume : TC5)	10.0
				Phrik (<i>Capsicum frutescens</i> L. : TC8)	8.1
				Litchi (<i>Litchi chinensis</i> Sonn. : TC1)	2.2
				Plao yai (<i>Croton roxburghii</i> N.P.Balakr. : TC3)	1.9
February	2004	40	2	Litchi (<i>Litchi chinensis</i> Sonn. : TC10)	99.9
				Plao yai (<i>Croton roxburghii</i> N.P.Balakr. : TC3)	0.1
March	2004	33	2	Thalo (<i>Schima wallichii</i> (DC.) Korth. : TC10)	85.9
				Arang (<i>Peltophorum dasyrachis</i> (Miq.) Kurz : TC9)	14.1
		228	27		

* Due to the overlapping of flowering period, some flowering species were repeatedly counted to give the total summary of 228 instead of 70 actual flowering species (Table I) and 27 instead of 18 actual species in pollen load.

** TC10 means pollen from *Trigona collina* Smith, code no. 10

Table III

Plant species with DCH > 15 cm in the deciduous forest at Doi Mon Rong, Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai province.

Plant species	Local name	D	F	Do	RD	RF	RDo	IVI
<i>Quercus kerrii</i> Craib	Ko phae	1.83	0.73	0.000524	15.49	11.06	20.25	46.80
<i>Shorea obtusa</i> Miq.	Teng	1.97	0.70	0.000391	16.62	10.55	15.11	42.28
<i>Dipterocarpus obtusifolius</i> Teijsm. ex Miq.	Yaang hiang	0.97	0.50	0.000428	8.17	7.54	16.53	32.24
<i>Dipterocarpus tuberculatus</i> Roxb.	Yaang phluang	0.93	0.40	0.000328	7.89	6.03	12.66	26.58
<i>Aporosa villosa</i> (Wall. ex Lindl.) Baill.	Mueat lot	1.27	0.70	0.000081	10.70	10.55	3.13	24.38
<i>Haldina cordifolia</i> (Roxb.) Ridsdale	Kwaao	0.83	0.43	0.000215	7.04	6.53	8.31	21.88
<i>Wendlandia tinctoria</i> (Roxb.) DC.	Khaeng kwaang	0.60	0.40	0.000034	5.07	6.03	1.30	12.40
<i>Terminalia alata</i> Heyne ex Roth	Rok faa	0.30	0.27	0.000104	2.54	4.02	4.02	10.58*
<i>Anneslea fragrans</i> Wall.	Saapaphee paa	0.37	0.20	0.000063	3.10	3.02	2.44	8.56
<i>Craibiodendron stellatum</i> (Pierre) W.Sm.	Taa-chee-khoei	0.33	0.23	0.000039	2.82	3.52	1.49	7.83
<i>Lithocarpus sootepensis</i> (Wall.) A.Camus	Ko hua muu	0.23	0.23	0.000038	1.97	3.52	1.47	6.96
<i>Shorea siamensis</i> Miq	Rang	0.20	0.17	0.000043	1.69	2.51	1.65	5.85
<i>Xylia xylocarpa</i> Taub.	Daeng	0.17	0.17	0.000043	1.41	2.51	1.66	5.58
<i>Colona flagrocarpa</i> (C.B.Clarke) Craib	Po yaap	0.23	0.17	0.000028	1.97	2.51	1.06	5.54
<i>Gluta usitata</i> (Wall.) Ding Hou	Rak yai	0.17	0.17	0.000033	1.41	2.51	1.27	5.19
<i>Flemingia sootepensis</i> Li	Kaa saam peek	0.13	0.13	0.000010	1.13	2.01	0.40	3.54
<i>Bombax anceps</i> Pierre var. <i>anceps</i>	Ngiu paa	0.07	0.07	0.000049	0.56	1.01	1.90	3.47
<i>Diospyros ehretioides</i> Wall. ex G.Don	Ruean kwaang	0.13	0.10	0.000012	1.13	1.51	0.44	3.08
<i>Schima wallichii</i> (DC.) Korth.	Tha lo	0.10	0.07	0.000027	0.85	1.01	1.06	2.92*
<i>Dalbergia cultrata</i> Grah. ex Benth.	Kraphee khao khwai	0.10	0.10	0.000012	0.85	1.51	0.46	2.82
<i>Terminalia chebula</i> Retz.	Samo Thai	0.10	0.10	0.000010	0.85	1.51	0.40	2.76
<i>Vaccinium sprengelii</i> (G.Don) Sleumer	Som pae	0.10	0.07	0.000016	0.85	1.01	0.64	2.50
<i>Gardenia sootepensis</i> Hutch.	Kham mok luang	0.10	0.07	0.000006	0.85	1.01	0.23	2.09
<i>Dillenia pentagyna</i> Roxb.	Saan chaang	0.07	0.07	0.000004	0.56	1.01	0.17	1.74
<i>Engelhardtia spicata</i> Blume	Khaa hot	0.07	0.07	0.000004	0.56	1.01	0.16	1.73*
<i>Dalbergia oliveri</i> Gamble	Chingchan	0.10	0.03	0.000007	0.85	0.50	0.28	1.63
<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	Tiu klian	0.07	0.03	0.000009	0.56	0.50	0.34	1.40
<i>Careya sphaerica</i> Roxb.	Kradon	0.03	0.03	0.000015	0.28	0.50	0.58	1.36
<i>Callicarpa arborea</i> Roxb.	Chaa paen	0.03	0.03	0.000004	0.28	0.50	0.16	0.94*
<i>Shorea roxburghii</i> G. Don	Phayom	0.03	0.03	0.000003	0.28	0.50	0.13	0.91
<i>Markhamia stipulata</i> Seem.	Khae haang khaang	0.03	0.03	0.000002	0.28	0.50	0.06	0.84
<i>Strychnos nux-blanda</i> A.W. Hill	Tuumkaa khao	0.03	0.03	0.000002	0.28	0.50	0.06	0.84
<i>Castanopsis hystrix</i> A. DC.	Ko daeng	0.03	0.03	0.000001	0.28	0.50	0.05	0.83
<i>Phyllanthus emblica</i> L.	Makhaam pom	0.03	0.03	0.000001	0.28	0.50	0.03	0.81
<i>Buchanania lanzan</i> Spreng.	Mamuang hua maeng wan	0.03	0.03	0.000001	0.28	0.50	0.02	0.80
<i>Ziziphus rugosa</i> Lamk.	Ma khwat	0.03	0.00	0.000002	0.28	0.00	0.06	0.34
Total	36	11.83	6.63	0.0026	100.00	100.00	100.00	300.00

Use categories : D = Density, F = Frequency, Do = Dominance, RD = Relative Density, RF = Relative Frequency, RDo = Relative Dominance and IVI = Importance Value Index.

* = Visited by *T. collina* Smith

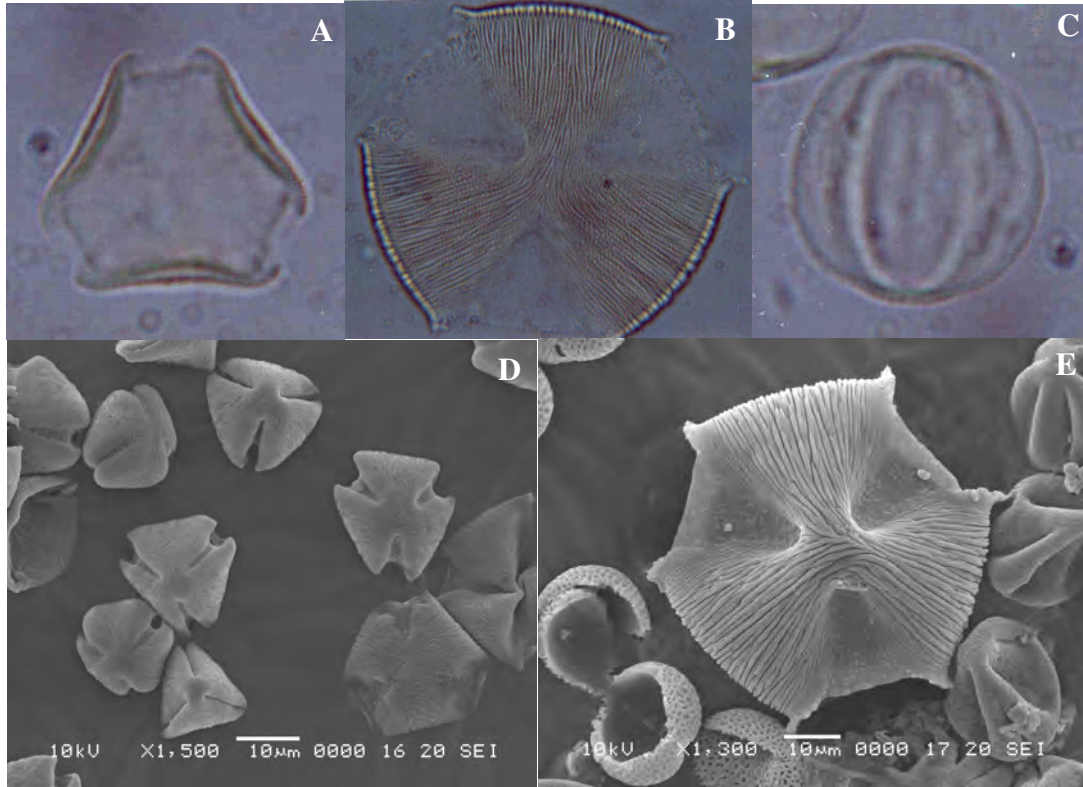


Figure 3. Litchi (*Litchi chinensis* Sonn) pollen (Code TC1), Sapindaceae , LM : A) polar view, 40x, B) polar view, 100x, C) equatorial view, 40x, SEM : D) tricolporate pollen (500x) and E) striate exine sculpturing (1,300x). **Pollen descriptions** : Monad, tricolporate, isopolar, radial symmetry, polar view : peroblate, equatorial view : circular, large grain; equatorial axis 55 – 70 μm , exine thickness 3 μm , sexine 2 μm , nexine 1 μm , striate exine sculpturing

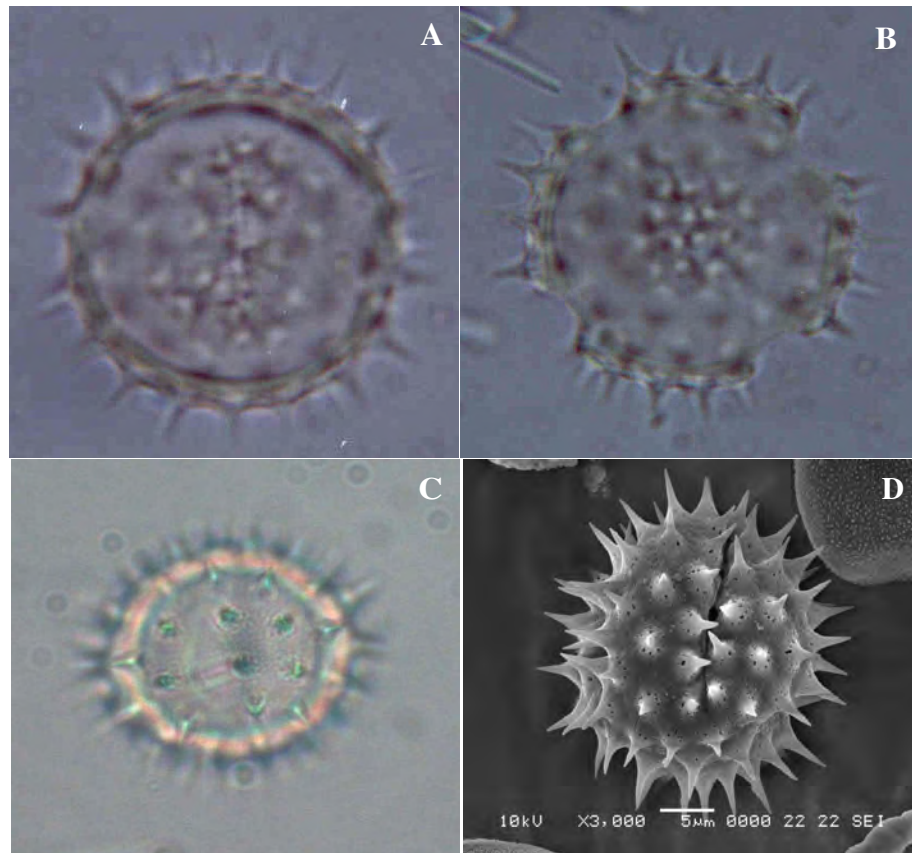


Figure 4. Tin Tukkae (*Tridax procumbens* L.) pollen (Code TC2), Compositae, LM 100x : A) polar view, B) equatorial view, C) tricolporate aperture, SEM 3,000x : D) aperture and echinate sculpturing. **Pollen descriptions** : Monad, stephanocolporate aperture, isopolar, radial symmetry, oblate-spheroidal to suboblate in polar view, circular in equatorial view, medium grain, polar axis 21.88 - 23.67 μm in length, equatorial axis 26.81 – 29.65 μm , exine thickness 2 μm , sexine and nexine 1 μm , scabrate exine sculpturing (<1 μm) and eclinate (2.5 – 3 μm x 4 -5 μm)

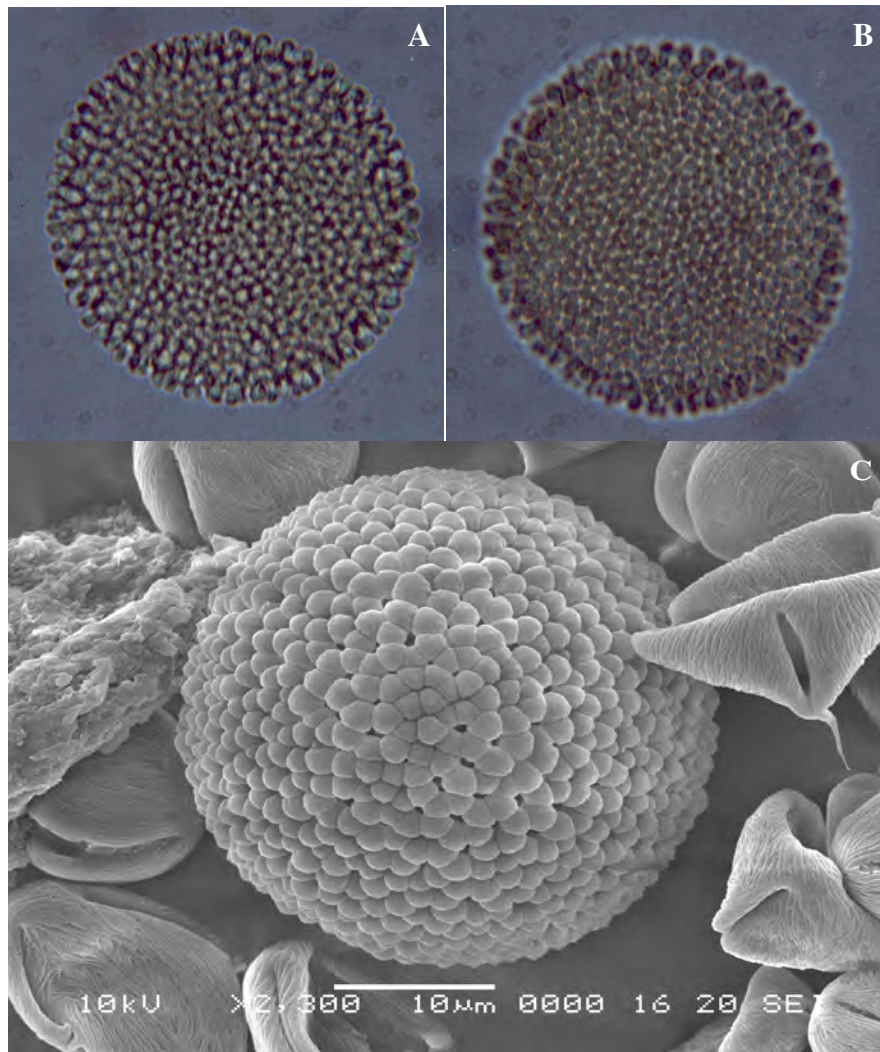


Figure 5. Plao yai (*Croton roxburghii* N.P. Balakr.) pollen (Code TC3), Euphorbiaceae, LM 40x : A, B) spheroidal, SEM 2,300x : C) exine sculpturing. **Pollen descriptions** : Monad, inaperturate, apolar, radial symmetry, spheroidal, large grain, diameter 60-70 μm , croton type exine sculpturing

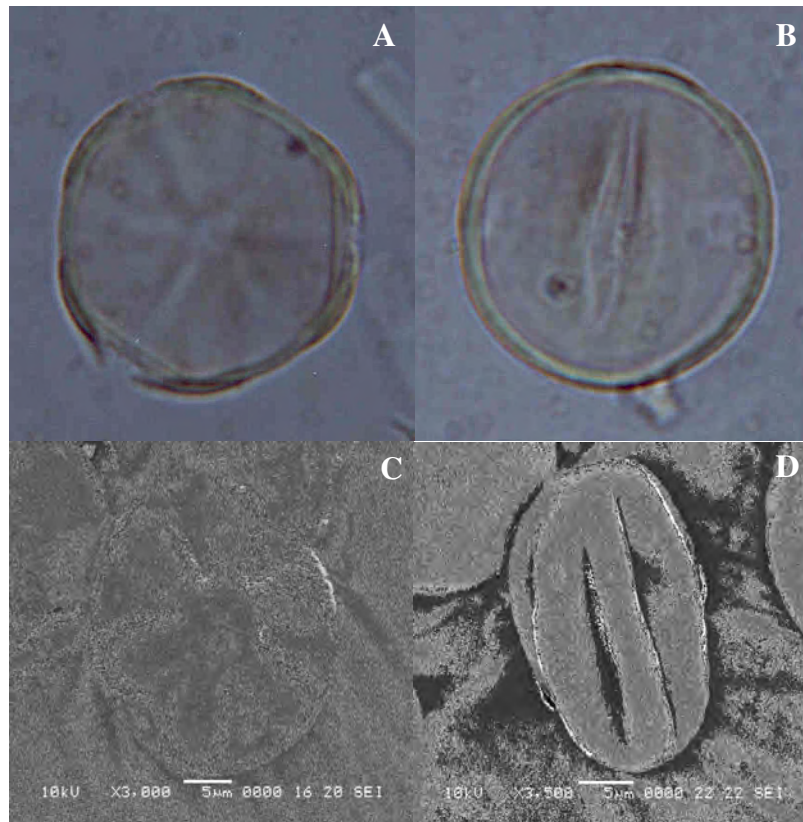


Figure 6. Rok Pha (*Terminalia alata* Heyne ex Roth) pollen (code TC4), Combretaceae, LM 100x : A) equatorial view, B) polar view, SEM : C) polar view (3,000x) and D) equatorial view (3,500x) **Pollen descriptions** : Monad, heterocolpate, isopolar, radial symmetry, polar axis : prolate-spheroidal, equatorial axis : (amb.) semiangular, medium grain, polar axis 26.2-29.3 μm , equatorial axis 24.4-29.2 μm , exine thickness 2 μm , striato-reticulate exine sculpturing

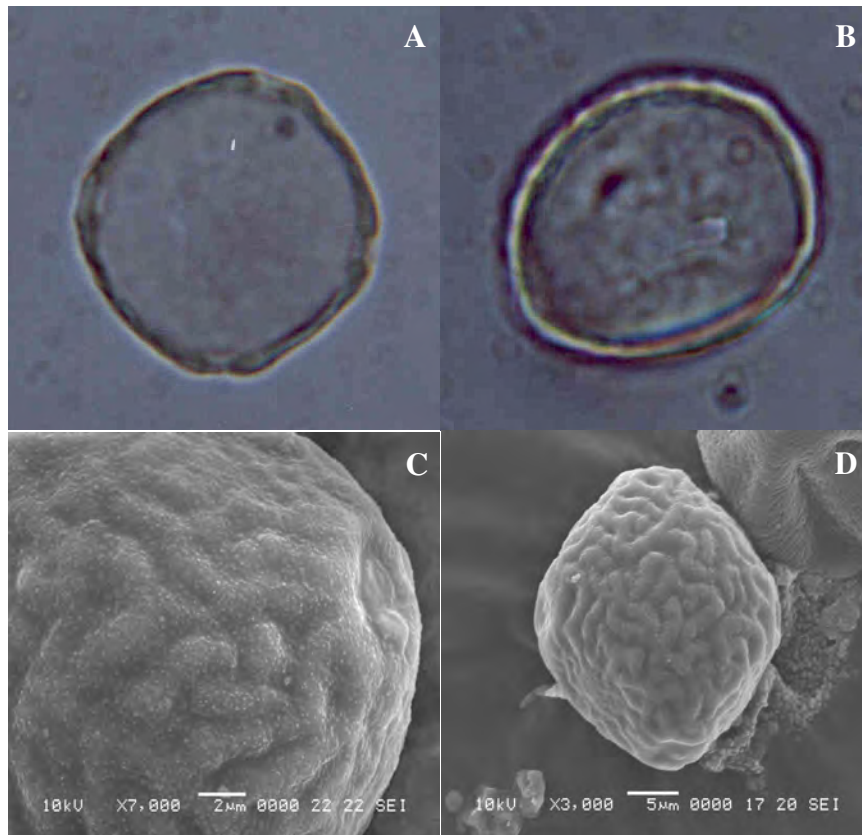


Figure 7. Pang lae yai (Trema orientalis (L.) Blume) pollen (code TC5), Ulmaceae, LM 100x : A) equatorial view, B) polar view, SEM : C) polar view (7,000x) and D) equatorial view (3,000x).
Pollen descriptions : Monad, stephanoporate, isopolar, radial symmetry, polar view : oblate – spheroidal, equatorial view : (amb.) rectangular, small grain, polar axis 22.1 μm in length, equatorial axis 24.0 μm , exine thickness 1 μm , regular exine sculpturing

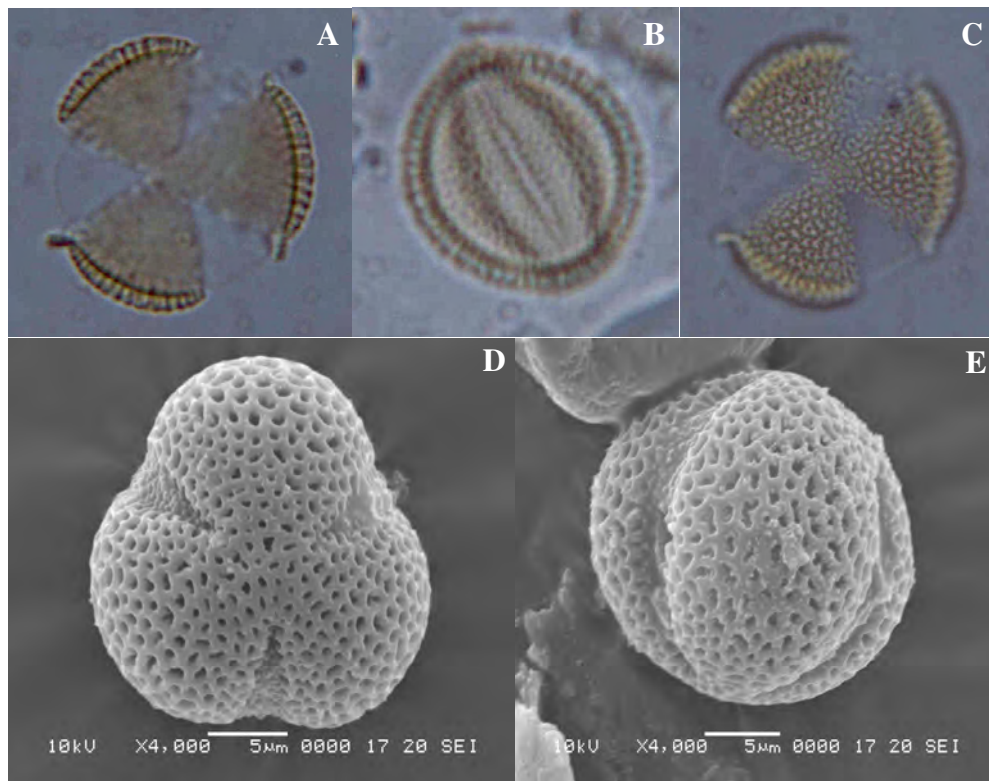


Figure. 8 Cha paen (*Callicarpa arborea* Roxb.) pollen (code TC6), Labiatae, LM 100x : A) equatorial view, B) polar view, C) reticulate sculpture, SEM 4,000x : D) polar view and E) equatorial view. **Pollen descriptions** : Monad, tricolpate, isopolar, radial symmetry, polar view : spheroidal, equatorial view : (amb.) inter – semiangular, small grain, polar axis length 24.1 µm, equatorial axis 24.5 µm ; exine thickness 2.5 µm, sexine $\frac{3}{4}$ of exine and nexine $\frac{1}{4}$ of exine, finely reticulate exine sculpturing

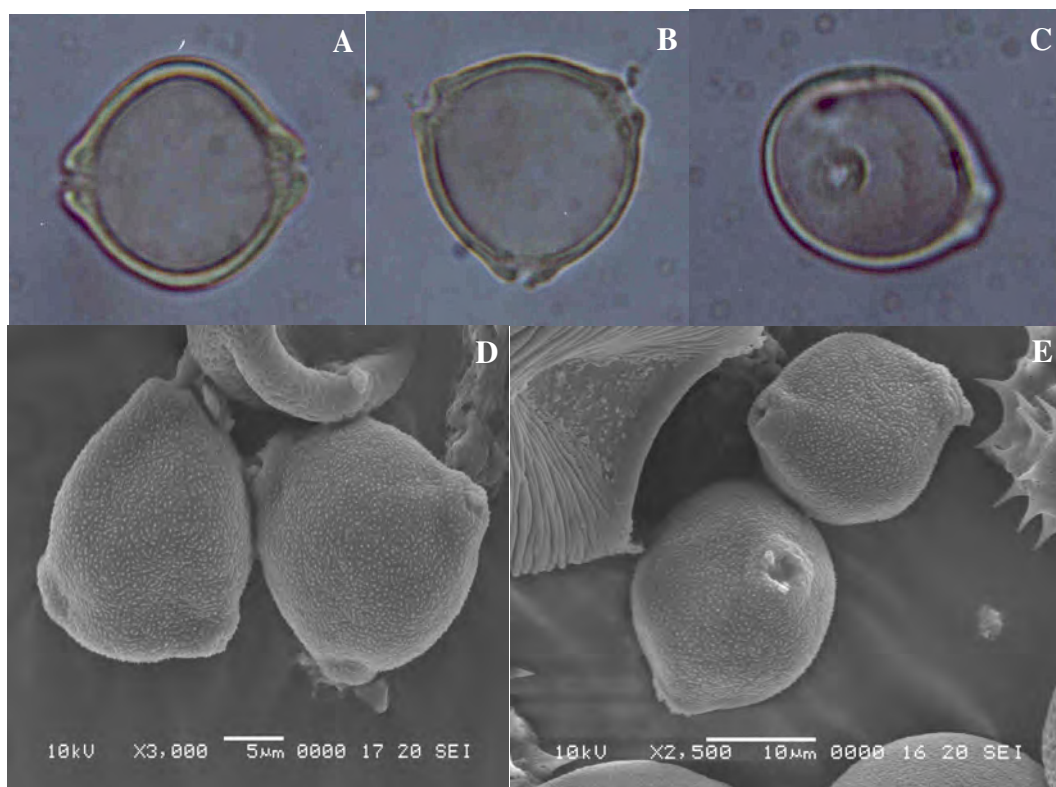


Figure 9. Kamlung suea Khrong (*Betula alnoides* Buch. – Ham. ex G.Don) pollen (code TC7), Betulaceae, LM 100x : A) equatorial view, B) polar view, C) triporate aperture, SEM : D) exine sculpturing (3,000x) and E) aperture (2,500x). **Pollen descriptions** : Monad, triporate, isopolar, radial symmetry, polar view : oblate – spheroidal, equatorial view : [amb.] semiangular, small grain, polar axis length 20.6 μm and equatorial axis 21.1 μm , exine thickness 1 μm .

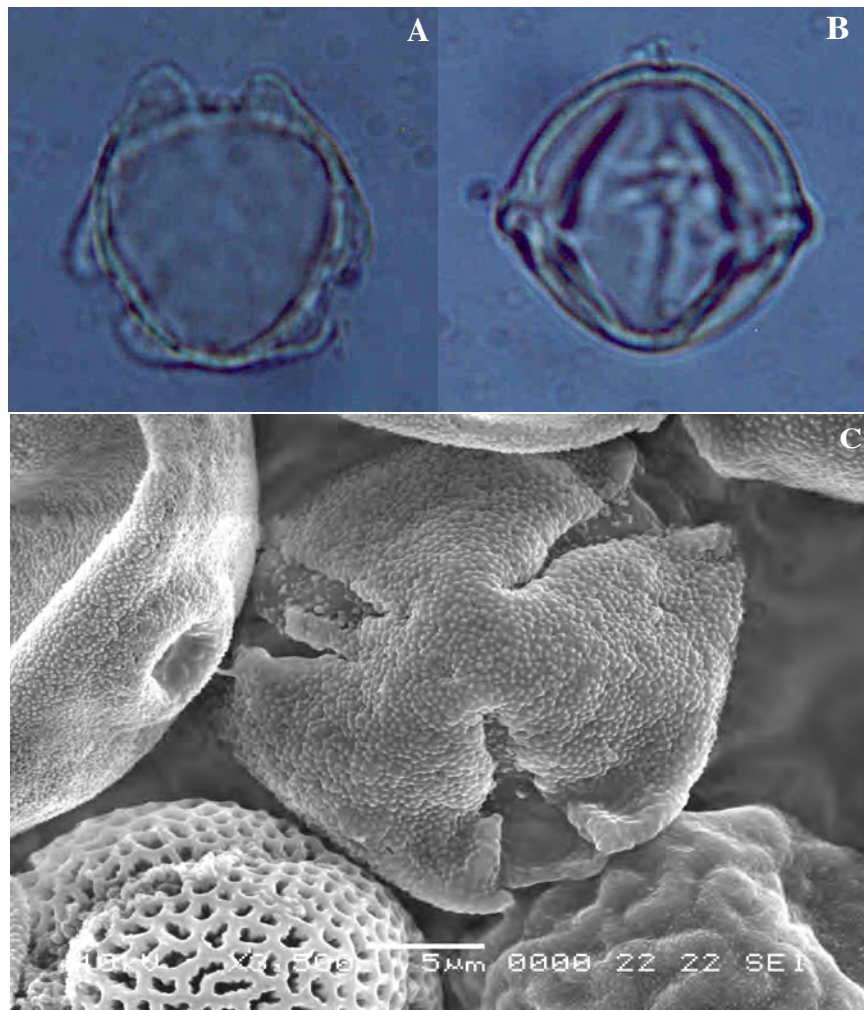


Figure 10. Prik (*Capsicum frutescens* L.) pollen (code TC8), Solanaceae, LM 100x : A) equatorial view, B) polar view, SEM 3,500x : c) tricolporate aperture and exine sculpture. **Pollen descriptions** : Monad, tricolporate; isopolar, radial symmetry, polar view : prolate-spheroidal or spheroidal, equatorial view : (amb.) semiangular, small grain, polar axis 21.2-24.9 μm , equatorial axis 18.9-22.4 μm , exine thickness 1.6 μm

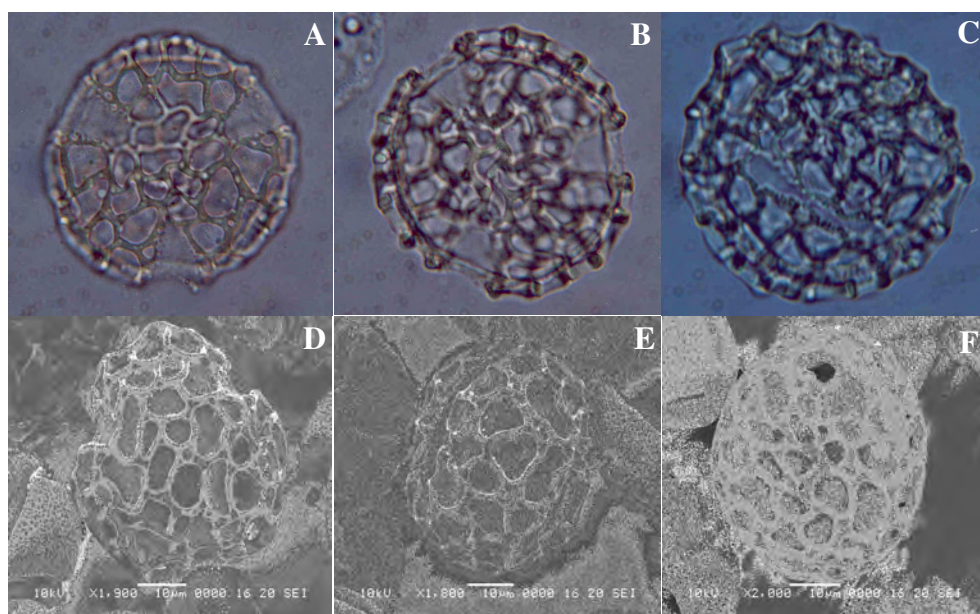


Figure. 12 Arang (*Peltophorum dasyrachis* (Miq.) Kurz) pollen (code TC9), Caesalpiniaceae, LM 100x : A, B) polar view, C) equatorial view, SEM : D) polar view (1,900x), E) equatorial view (1,800x) and F) lopho-reticulate exine sculpture (2,000x). **Pollen descriptions** : Monad, tricolporate, isopolar, radial symmetry, polar view : spheroidal, equatorial view : (amb.) circular, medium grain, polar axis 50.1 μm , equatorial axis 49.9 μm , exine structure not clear, lopho-reticulate exine sculpturing

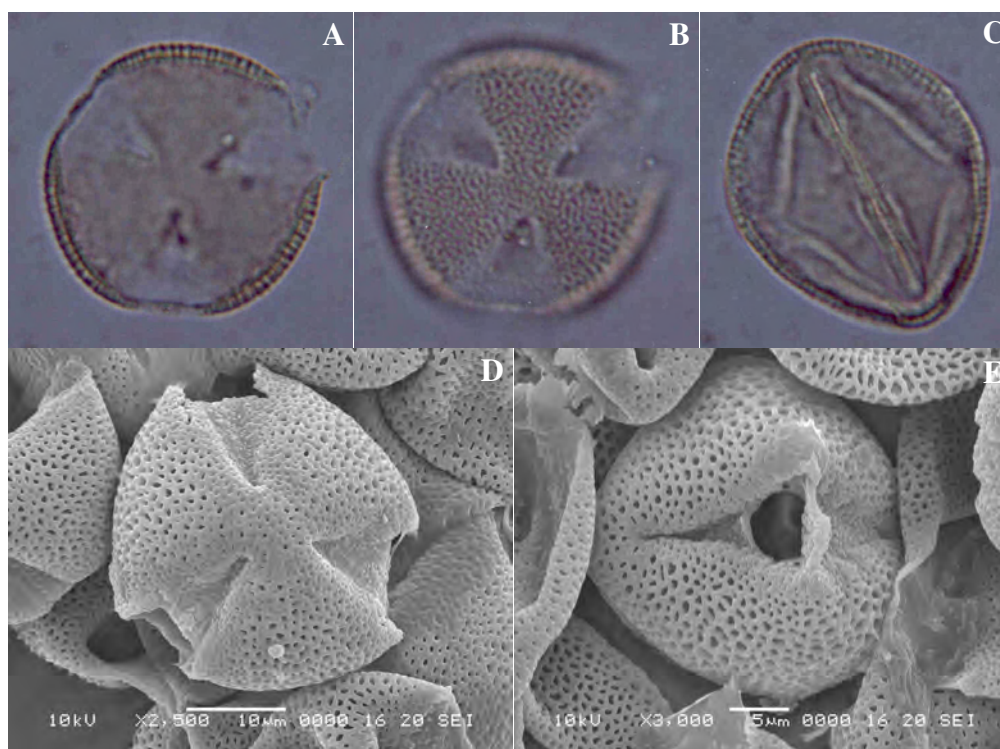


Figure 13. Thalo (*Schima wallichii* (DC.) Korth.) pollen (code TC10), Theaceae, LM 100x : A, B) polar view, C) equatorial view, SEM : D) polar view (2,500x) and E) equatorial view (3,000x) with finely reticulate exine sculpturing. **Pollen descriptions** : Monad, tricolpate, isopolar, radial symmetry, polar view : spheroidal or oblate-spheroidal, equatorial view : (amb.) circular, medium grain, polar axis 28.1-35.1 μm , equatorial axis 32.1-39.7 μm , exine thickness 2 μm , sexine 1.5 μm , nexine 0.5 μm , finely reticulate exine sculpturing

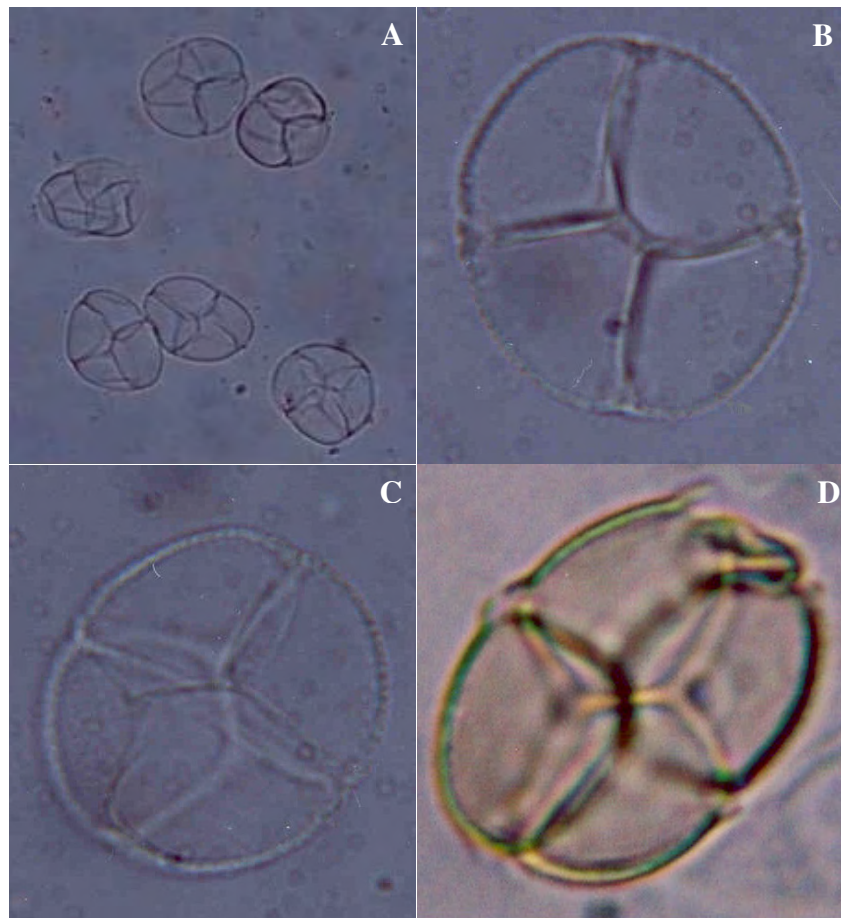


Figure 14. Maiyarap (*Mimosa pigra* L.) pollen (code TC11), Mimosaceae, LM : A) tetrad pollen (40x), B, C) apolar and asymmetry (100x) and D) rhomboidal shape (100x). **Pollen descriptions :** Tetrads, apolar and asymetry, rhomboidal shape, medium grain, 29x37 μm in size, exine thickness 1 μm , scrubate exine sculpturing

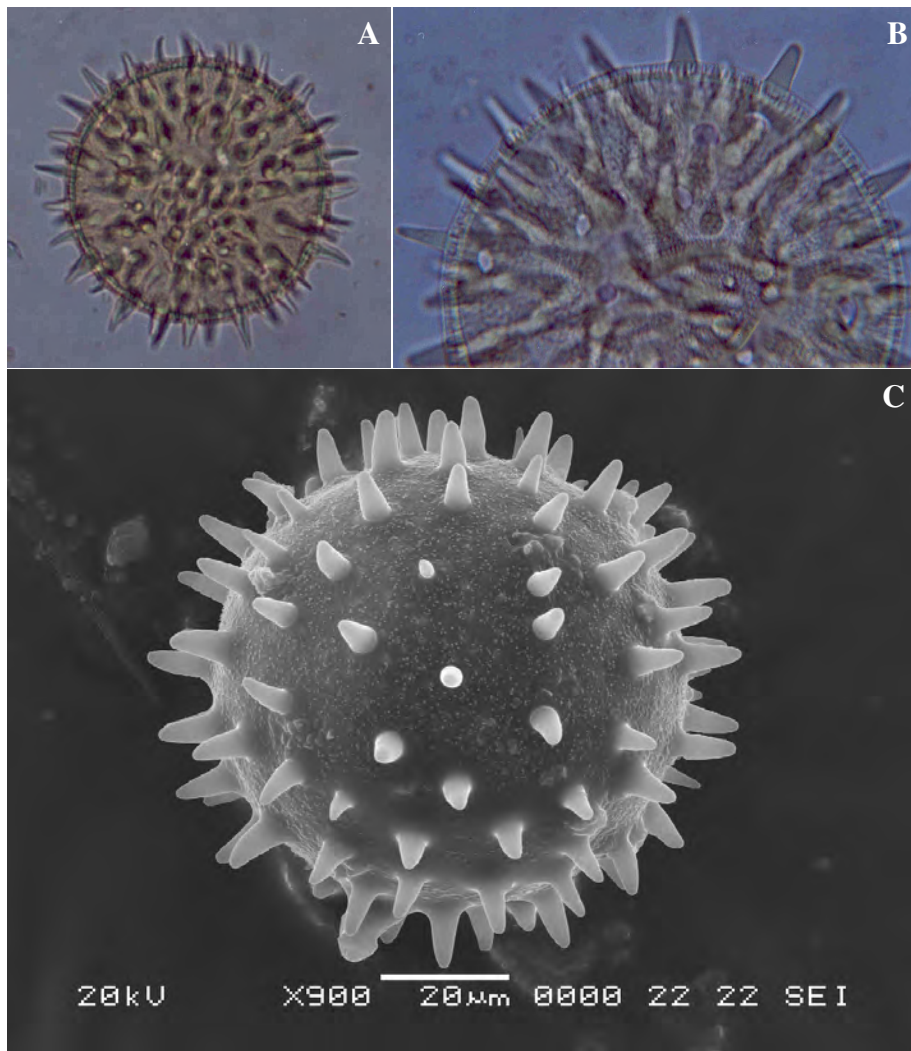


Figure 15. Po lom pom (*Thespesia lampas* (Cav.) Dalz. & Gibs.) pollen (code TC12), Malvaceae, LM : A) spheroidal shape (40x), B) periporate aperture (100x), SEM : C) , scabrate and baculate exine sculpturing (900x). **Pollen descriptions** : Monad, periporate, apolar, radial symmetry, spheroidal and circular, large grain, 80-90 μm diameter, exine thickness 4 μm , scabrate and baculate (4.1x9.2 μm) exine sculpturing

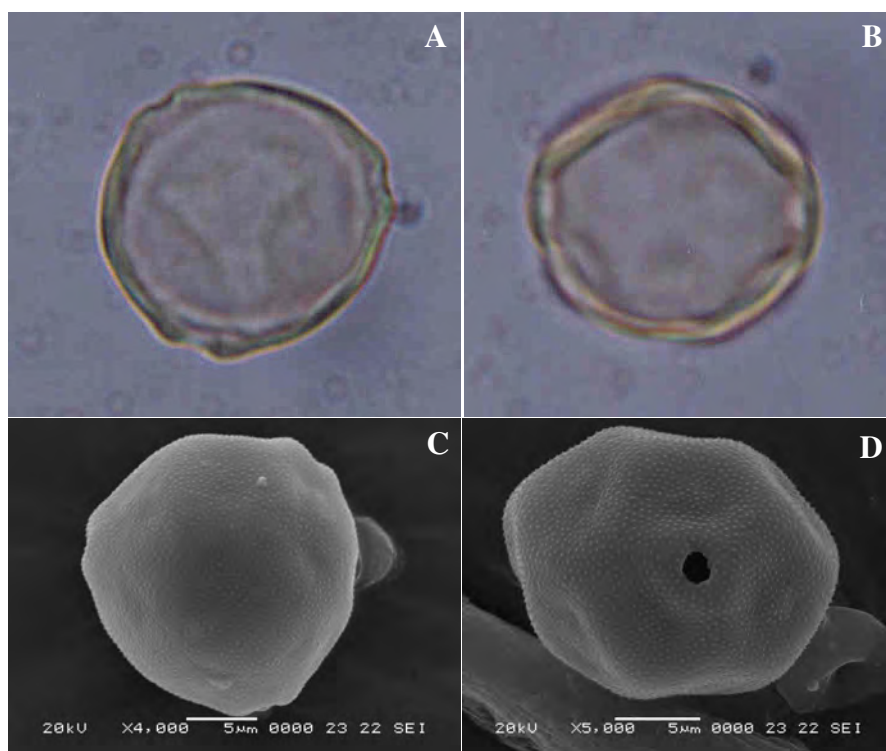
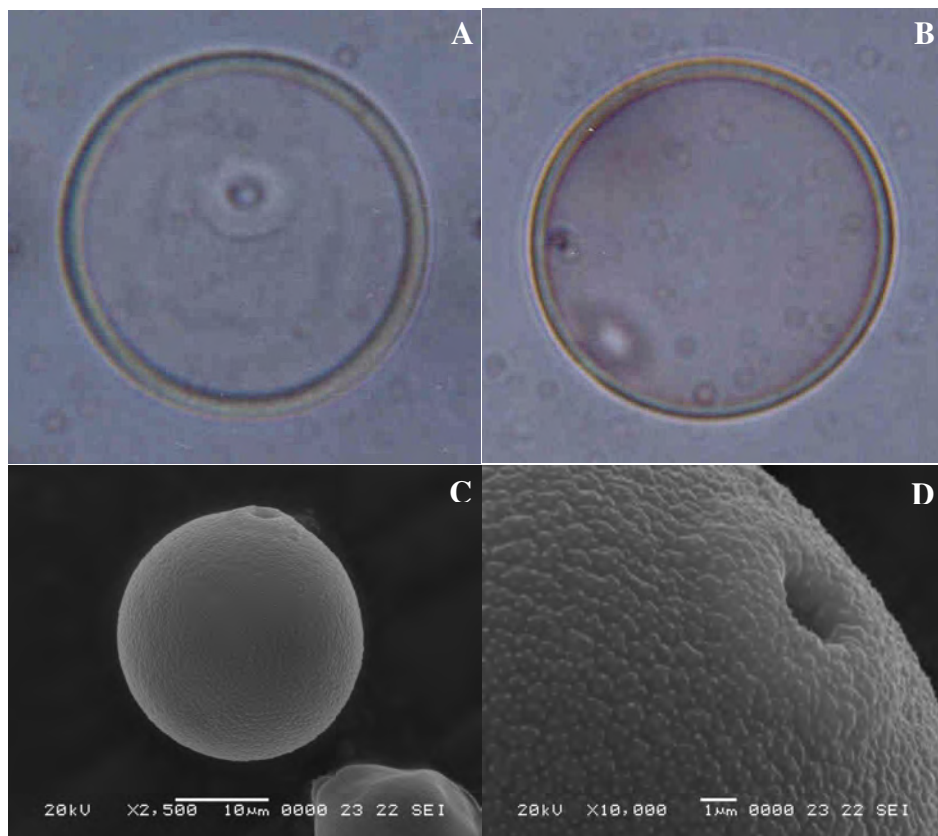


Figure. 16 Kha hot (*Engelhardtia spicata* Blume) pollen (code TC13), Juglandaceae, LM 100x : A) equatorial view, B) polar view, SEM : C) triporate aperture (4,000x) and D) scabrate exine sculpturing (5,000x). **Pollen descriptions** : Monad, triporate, isopolar and radial symmetry, polar view : oblate-spheroidal, equatorial view : (amb.) circular, small grain, polar axis 17.5 μm , equatorial axis 19.6 μm , exine thickness 1.5 μm and scabrate exine sculpturing



*Figure 17. Ya yung (Capillipedium parviflorum (R.Br.) Stapf.) pollen (code TC14), Gramineae, LM 100x : A) equatorial view, B) polar view, SEM : C) monoporate aperture (2,500x) and D) scabrate exine sculpturing with annulus (10,000x). **Pollen descriptions** : Monad, monoporate, heteropolar and bilateral symmetry, polar view : spheroidal, equatorial view : (amb.)circular, medium grain, polar axis 26.4-27.9 μm , equatorial axis 26.6-28.6 μm , annulus 3 μm , exine thickness 2 μm , scabrate exine sculpturing*

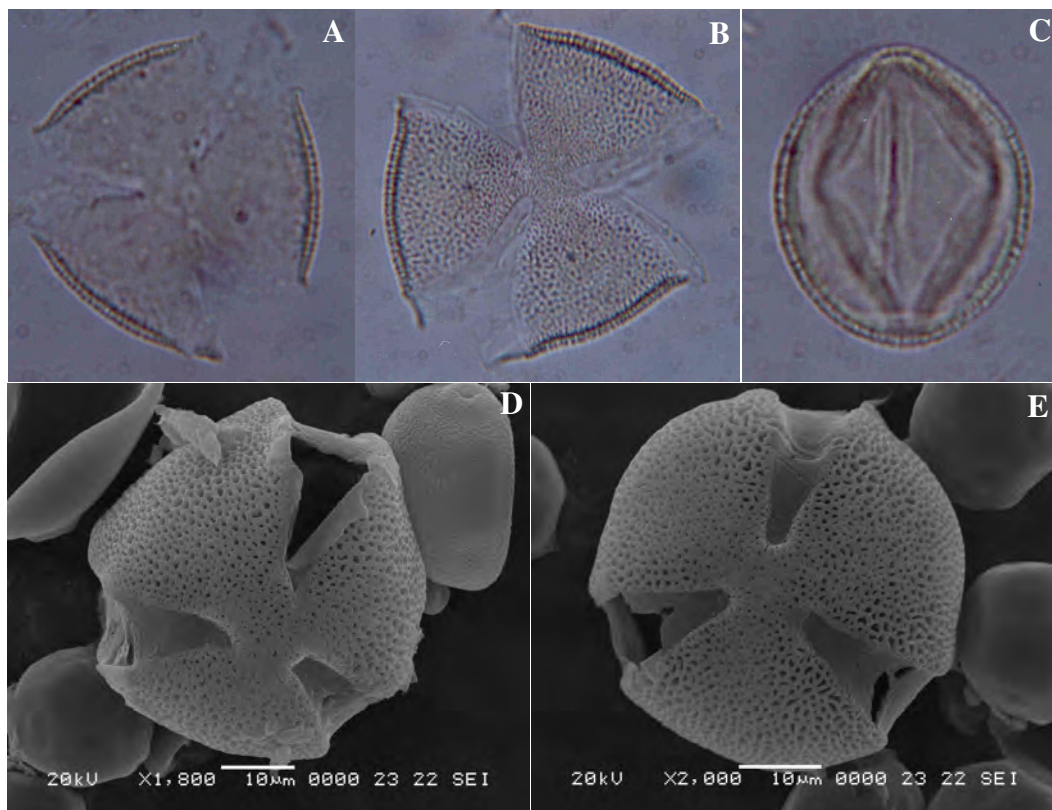


Figure. 19 Sieo dok khaao (*Bauhinia variegata* L.) pollen (code TC15), Caesalpinaceae, LM 100x : A) polar view, B) tricolpate aperture, C) equatorial view, SEM : D) polar view (1,800x) and E) apocolpium and mesocolpium exine sculpturing (2,000x). **Pollen Description** : Monad, tricolporate ; isopolar and radial symmetry, polar view : spheroidal, equatorial view : (amb.) circular, large grain, polar axis 50x55 μm , equatorial axis 50 – 55 μm , exine thickness 2 μm , exine sculpturing apocolpium and mesocolpium

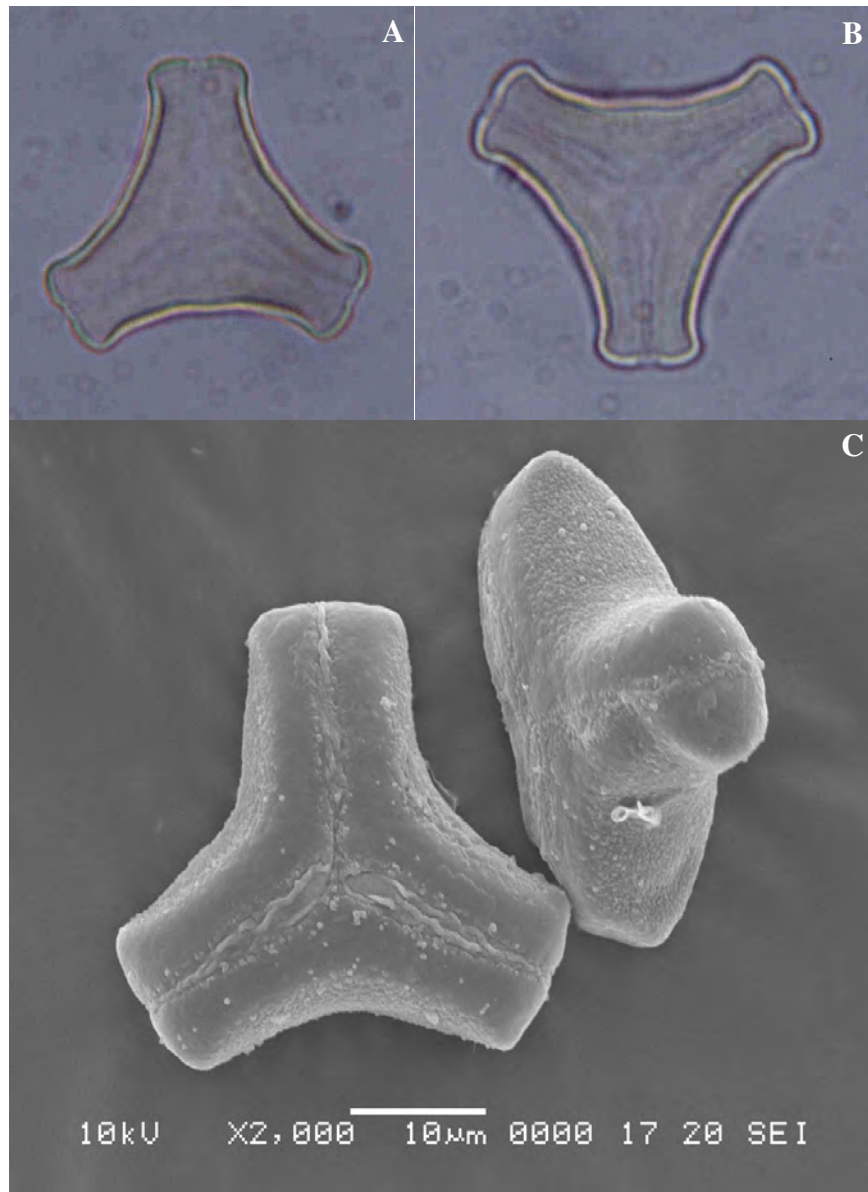


Figure. 18 Kaafaak-like (*Scurrula sp.*) pollen (TC16), Loranthaceae, LM 100x : A) equatorial view, B) tricolpate aperture, SEM 2,000x : C) polar and equatorial view. **Pollen description** : Monad, tricolpate ; isopolar and radial symmetry, polar view : peroblate, equatorial view : (amb.) lobate, small grain, polar axis 12.0-15.2 μm , equatorial axis 23.3 μm , exine thickness 3 μm

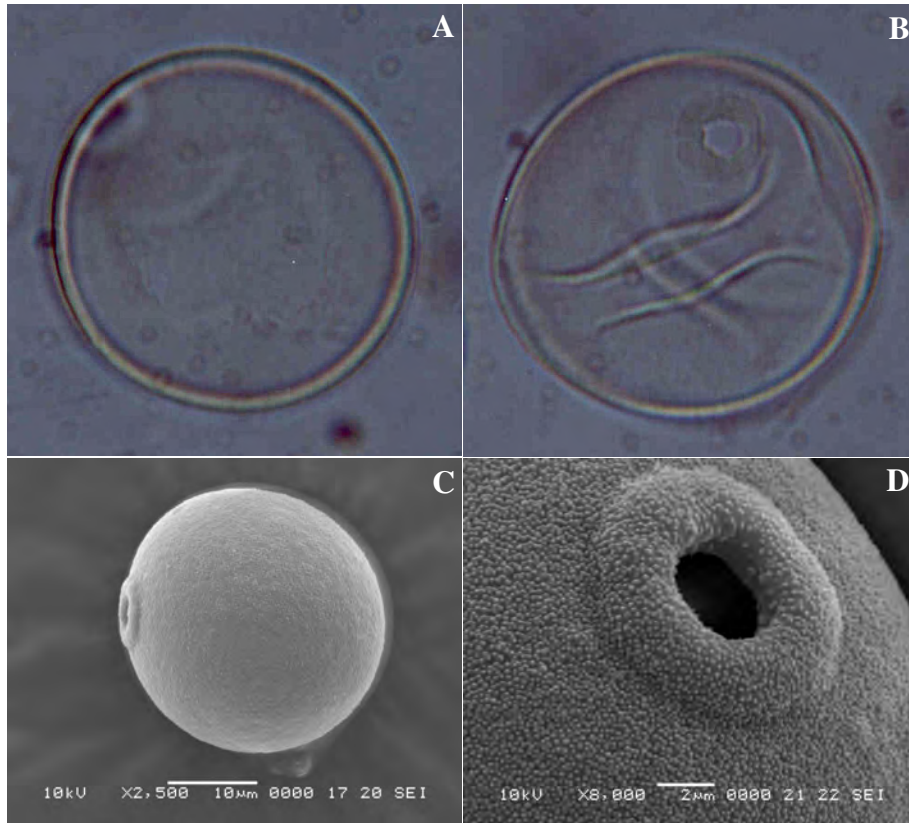


Figure 20. Gramineae pollen (code TC17), LM 100x : A) polar view, B) equatorial view, SEM : C) monoporate aperture (2,500x) and D) scabrate exine sculpturing with annulus (8,000x). **Pollen descriptions** : Monad, monoporate, heteropolar, bilateral symmetry, polar view : prolate-spheroidal, equatorial view : (amb.) circular, medium grain, polar axis 32.9 μm , equatorial axis 29.4 μm , exine thickness 1.5 μm , scabrate exine sculpturing

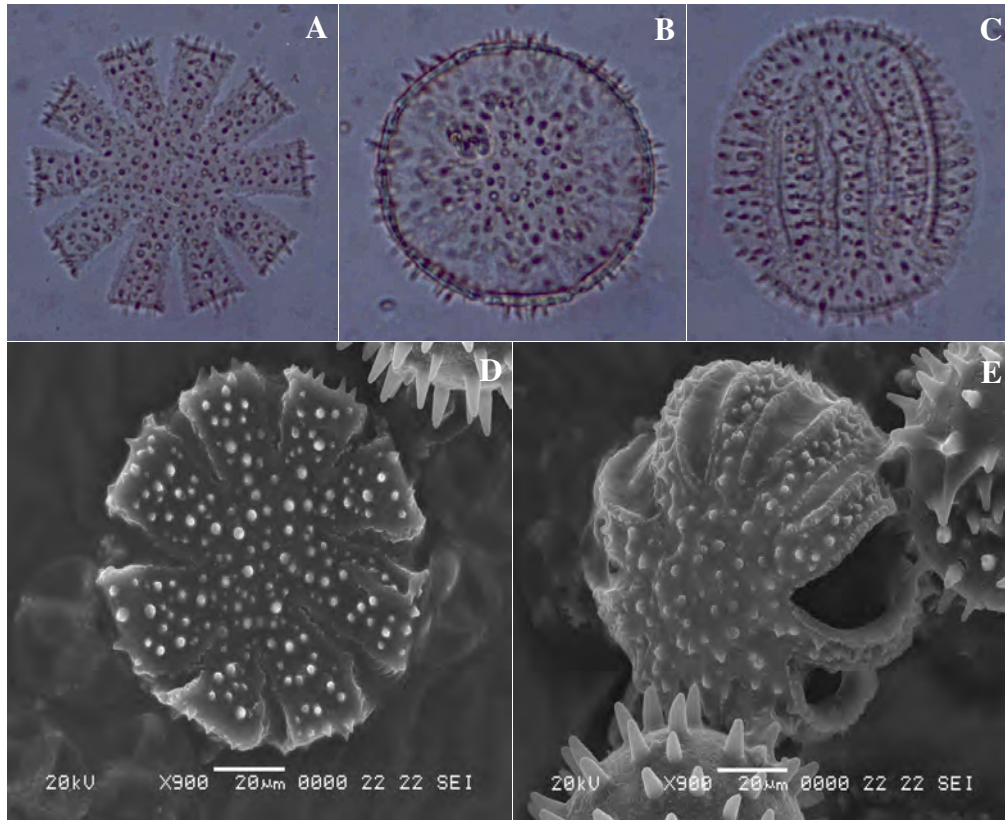


Figure. 21 Verbenaceae pollen (code TC18), LM 40x : A, B) polar view, C) equatorial view, SEM 900x : D, E) stephanocolpate aperture and echinate exine sculpturing. **Pollen descriptions** : Monad, stephanocolpate, isopolar, radial symmetry, polar view :spheroidal, equatorial view : (amb.) circular, large grain, polar axis 50.1 μm , equatorial 49.9 μm , exine thickness 2 μm , exine sculpturing echinate (1.8x4.1 μm)

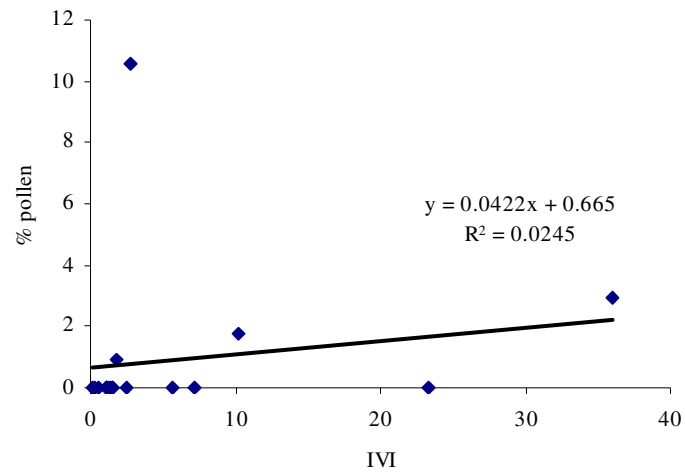


Figure 22. Correlation between Importance value index (IVI) and percent of pollen of the same species from 18 plant species found in pollen load of *Trigona collina* Smith stingless bee

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

Piyamas Nanork · Siriwat Wongsiri ·
Benjamin P. Oldroyd

Received: 11 April 2006 / Revised: 31 May 2006 / Accepted: 31 May 2006 / Published online: 2 August 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract 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.

Keywords Reproductive competition · *Apis florea* · Red dwarf honeybee · Social parasitism

Introduction

Honeybee (*Apis*) colonies have been described as being “superorganisms,” in which reproduction is channeled exclusively through the queen and selection on workers is restricted to maximizing their efficiency as part of a coordinated whole (Seeley 1989; Moritz and Southwick 1992). Yet, workers have ovaries that are capable of producing male-producing eggs via parthenogenesis (Dzierzon 1845). In the presence of a queen, however, any eggs that workers do lay will almost certainly be removed (“policed”) by other workers (Ratnieks 1988; Ratnieks and Visscher 1989).

Worker policing is an adaptive conflict-reducing strategy of many social insect species in which colonies are headed by a single, multiply mated queen (Ratnieks 1988; Barron et al. 2001; Ratnieks et al. 2006). All workers are equally related to the male-destined eggs laid by the queen [relatedness (r)=0.25], but each individual worker is variably related to eggs laid by herself (r =0.5), her full

Communicated by R.F.A. Moritz

P. Nanork · S. Wongsiri
Department of Biology, Faculty of Science,
Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand

Present address:

P. Nanork
Department of Biology, Faculty of Science,
Mahasarakham University,
Mahasarakham 44150, Thailand

S. Wongsiri
Faculty of Technology, Mahasarakham University,
Mahasarakham 44150, Thailand

B. P. Oldroyd (✉)
Behavior and Genetics of Social Insects Laboratory,
School of Biological Sciences A12, University of Sydney,
N.S.W. 2006,
Sydney, Australia
e-mail: boldroyd@bio.usyd.edu.au

sisters ($r=0.375$), and her half sisters ($r=0.125$) (Ratnieks 1988). This means that the only stable evolutionary compromise for workers is to raise the eggs laid by the queen and to remove all eggs laid by workers. Because worker policing is effective, the benefits of personal reproduction by workers are minimal (Wenseleers et al. 2004a,b; Ratnieks et al. 2006). This probably explains why, in most *Apis* species, the ovaries of workers in queenright colonies are inactive (*Apis mellifera*, Ratnieks 1993; *Apis florea*, Halling et al. 2001; *Apis dorsata*, Wattanachaiyingcharoen et al. 2001), a curious and unexplained exception being *Apis cerana*, where 2–5% of queenright workers have ovaries containing eggs (Blanford 1923; Bai and Reddy 1975; Oldroyd et al. 2001).

Despite functional sterility when colonies are queenright, when a colony becomes queenless many of the workers that have not yet begun foraging begin to activate their ovaries (Lin et al. 1999) and lay eggs and may produce a final batch of males before the colony perishes (Page and Erickson 1988; Robinson et al. 1990; Halling et al. 2001; Oldroyd et al. 2001). To rear the eggs, the colony must undergo a fundamental behavioral shift and cease worker policing (Miller and Ratnieks 2001; Châline et al. 2004; Martin et al. 2005), for without successful worker reproduction, the fitness of a queenless colony is zero (Page and Erickson 1988; Barron et al. 2001; Miller and Ratnieks 2001).

In contrast to queenright nests, when colonies become queenless, the egalitarian queen-laid eggs are no longer present, leading to the prediction of overt reproductive conflict among queenless laying workers (Robinson et al. 1990; Martin et al. 2004), and to two alternative reproductive strategies.

In the first strategy, a worker can remain with the natal nest, cease worker policing, attempt to lay her own eggs, and help rear both her own eggs and those of other workers. This strategy appears to be the usual one in *A. mellifera* (Page and Erickson 1988; Miller and Ratnieks 2001; Martin et al. 2004; Martin et al. 2005). In queenless colonies, each worker would “prefer” that the colony’s nurturing effort were directed at her own sons or to the sons of her full sisters than to the sons of her half sisters. Thus, competition is predicted among subfamilies over their relative share of the drones that the queenless colony is able to rear. As predicted, strongly unequal reproductive success has been observed in queenless colonies of *A. mellifera* (Page and Erickson 1988; Martin et al. 2004). Differential reproductive success probably arises from workers preferentially rearing or cannibalizing eggs and from different rates of ovary activation among workers (Robinson et al. 1990; Martin et al. 2004).

In the second strategy, a worker in a queenless colony can abandon her natal nest and attempt to be accepted by another colony. If a worker is successful in being adopted,

she will be completely unrelated to the resident workers, and is predicted to parasitize her host colony with her eggs if she can. However, this strategy is only likely to be fruitful if she can be adopted by a queenless colony, for queenright colonies should police worker-laid eggs.

Although workers with activated ovaries are very rare in queenright *A. florea* colonies (Halling et al. 2001), workers activate their ovaries after only a few days of queenlessness (Nanork et al. 2005). This contrasts with temperate ecotypes of *A. mellifera*, in which ovary activation and successful oviposition does not occur for about 3 weeks after dequeening (Page and Erickson 1988; Miller and Ratnieks 2001). A colony of *A. florea* comprises multiple subfamilies (Palmer and Oldroyd 2001), and so, reproductive competition among workers from different subfamilies is predicted as in *A. mellifera* (Martin et al. 2004).

The cessation of worker policing in a queenless colony renders it vulnerable to parasitism by egg-laying workers from other colonies, and such parasitism has now been documented in *A. mellifera capensis* (Neumann et al. 2001b) and *A. florea* (Nanork et al. 2005). Honeybee workers may actively seek queenless colonies to parasitize with their eggs, and similar phenomena have been seen in bumblebees (Birmingham et al. 2004; Lopez-Vaamonde et al. 2004).

Here we examine patterns of absconding (which may be associated with parasitism) and the appearance of eggs and larvae in 40 queenless colonies of *A. florea* with a view to understanding how such colonies respond to the twin necessity of ceasing worker policing so that eggs can be reared and minimizing parasitism by workers from other colonies. We also report on the probable existence of reproductive competition among subfamilies within two queenless colonies. This report extends our findings of reproductive parasitism in *A. florea* (Nanork et al. 2005).

Materials and methods

Experimental colonies and sample collection

Between December 2002 and October 2004, we relocated 40 colonies of wild *A. florea* from coconut plantations in Samutsongkram province, Thailand, to the grounds of Chulalongkorn University, Bangkok. We tied the translocated colonies (usually 4–5 at a time) in convenient locations on the branches of small trees, at least 5 m apart from each other. For each relocated nest we collected approximately 100 adult workers and then removed the queen to induce ovary activation in the workers. Any queen cells that subsequently developed were removed. One hundred workers were collected again after 4 days, 1 week, and 4 weeks of queenlessness. Samples were kept at -20°C .

From a subset of eight randomly selected colonies, we dissected adult workers ($n=100$ per colony) according to Oldroyd et al. (2001) to determine the level of ovary activation from various sampling times. We classified ovaries as either inactive (ovarioles not discernable or no eggs present) or active (eggs present) (we find this to be a more objective measure of ovary activation than various gradations that have been used by some authors). For the two colonies that successfully reared pupae, we used microsatellite loci to determine the parentage of the dissected workers. We did not genotype early-appearing larvae because there were insufficient numbers for an adequate sample, and we wished to allow them to develop to pupae.

As part of another experiment (Duangphakdee 2006), eight additional colonies were translocated and these were left queenright. These colonies were used to determine if absconding rates differ between queenright and queenless nests.

Paternity analysis of dissected workers

DNA was extracted by boiling the crushed hind leg of a bee in 500 μ l Chelex® 100 solution (5% w/v in TE_{0.1}) (Walsh et al. 1991; Estoup et al. 1997). Samples were boiled for 15 min and then centrifuged at 1,200 rpm for 15 min. The supernatants were diluted 1:2 with sterile distilled water and stored at 4°C.

Six microsatellite loci (Table 1) were used to determine the subfamily of workers. Diluted DNA (1 μ l) was used in 5- μ l PCR reactions [1 $\times$ PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.625 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate, 0.4 mM of forward and reverse primer (reverse primer Hex labeled), and 0.25 units of *Taq* polymerase; see also Table 1]. PCR products were electrophoresed in 5% urea/polyacrylamide on an automated DNA fragment analyzer (Corbett Research, Sydney, Australia) at 1,400 V and 38°C.

Lengths of microsatellite alleles were determined in base pairs using the software package OneDscan (Scanalytics, Fairfax, VT, USA).

For each sample we compared rates of ovary activation among worker subfamilies using *G* tests (Zar 1996). Where a large number of cells of a contingency table have expected values <5, the *G* test can produce levels of significance that deviate from the actual. Therefore, a sampling modification of Fisher's exact test (Lewontin and Felsenstein 1965) was also performed using the program Monte Carlo RxC (W. Engels, University of Wisconsin).

Results

Because not all colonies were observed every day (but always more than twice a week), all time-dependent data in this section are approximate by up to ± 3.5 days.

About a quarter of the queenless colonies absconded within 2 weeks of being made queenless, and all but two queenless colonies absconded within 1 month (Fig. 1). Absconding was not a gradual process over several days or weeks; most workers left together as a group. In all but two cases, absconding occurred before pupae appeared. The mean number of days to absconding was 20.4 (SE=3.6) days. Although the mean time to absconding in queenright nests (24.2 $\pm$ 2.9 days) was similar (Mann–Whitney $U=152.0$, $P=0.82$) to that of queenless nests, absconding was much more bimodal; colonies either left as soon as the last brood emerged (five colonies) or remained for 34, 46, or 67 days.

In the queenless nests the proportion of workers with activated ovaries was 6.0% (SE=1.6%) after 4 days. The proportion of workers with activated ovaries increased across time, so that after 3 weeks, about 33.7% (SE=3.2%) of workers had activated ovaries (Fig. 2). In the 32 colonies in which eggs were produced, eggs were first observed an

Table 1 Primer sequences and PCR conditions for six microsatellite loci used to detect paternity in *A. florea*

Locus	Primer sequences	MgCl ₂ conc. (mM)	Annealing temp. (°C)	Number of cycles	References
A8	5'CGAAGGTAAGGTAAATGGAAC 5'GGCGGTAAAGTTCTGG	1.5	55	35	Estoup et al. 1994
A76	5'GCCAATACTCTCGAACAATCG 5'GTCCAATTCACATGTCGACATC	1.5	55	35	
A88	5'CGAATTAACCGATTGTGTCG 5'GATCGCAATTATTGAAGGAG	1.5	55	35	
A107	5'CCGTGGGAGGTTTATTGTGTCG 5'GGTTCGTAACGGATGACACC	1.5	55	35	
B124	5'GCAACAGGTCGGGTTAGAG 5'CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG	1.5	55	35	
Ap249	5'CGCGCGACGACGAAATGT 5'CAGTCCTTTGATTCGCGCTACC	1.5	57 55 52 49	9 9 9 15	Solignac et al. 2003

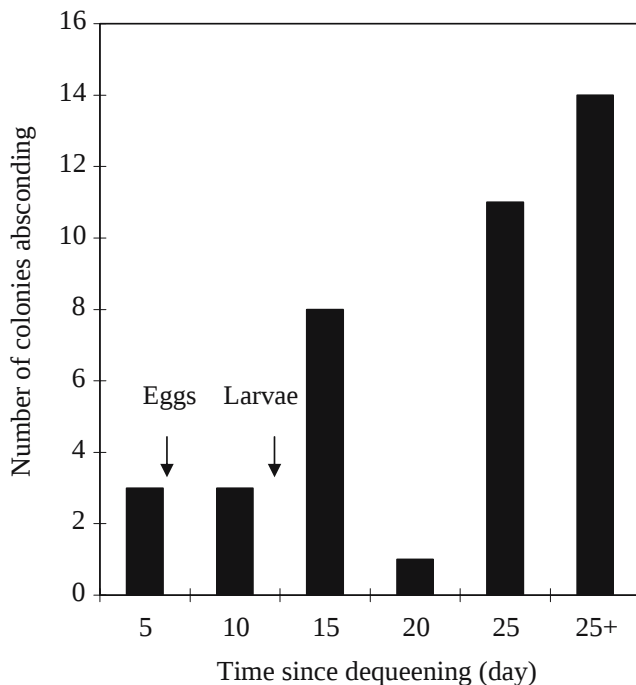


Fig. 1 The numbers of *A. florea* colonies absconding per 5-day period after dequeening. The figure also shows the average time of the first appearance of eggs and larvae

average of 6.1 (SE=0.3) days after dequeening. The shortest period to the appearance of eggs was 3 days, and the longest was 8 days. Only 14 colonies produced larvae. In these colonies, larvae appeared 12.1 (SE=0.9) days after queen removal. The shortest period for larvae to appear was 3 days after eggs appeared and 7 days after dequeening. As the development time of an egg is 3 days in *A. florea* (reviewed in Oldroyd and Wongsiri 2006), this suggests that policing behavior was curtailed as soon as oviposition commenced. In another colony, larvae did not appear until

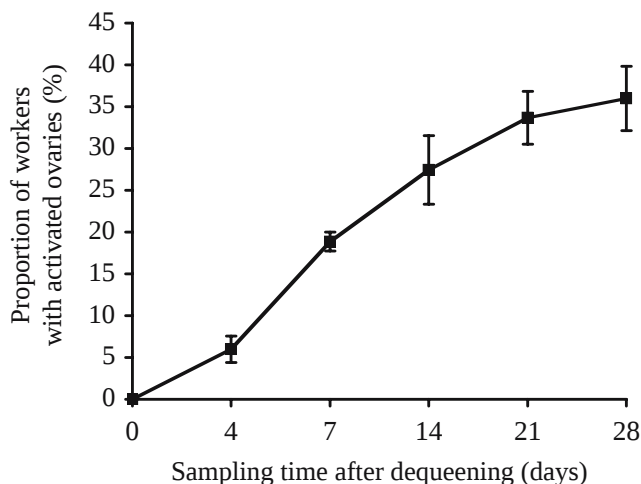


Fig. 2 Average proportion (%) of *A. florea* workers with activated ovaries ($n=8$ colonies) following queen removal (including nonnatal workers). The bars indicate SEs of the mean

16 days after eggs first appeared, suggesting that policing behavior in this colony continued long after eggs were being laid. There was no significant correlation between the time to the appearance of the first eggs and the time before larvae appeared ($r=-0.18$, $n=14$ colonies $P=0.54$).

Only two colonies (hereafter 1 and 2, and the same colonies as in Nanork et al. 2005) remained long enough to rear pupae. Microsatellite analysis based on 299 and 282 workers from colonies 1 and 2, respectively, indicated that there were 20 subfamilies in colony 1 and 24 subfamilies in colony 2.

As previously reported, after colonies were made queenless, they showed high rates of reproductive parasitism, with an average 4.5% of workers coming from other colonies (Nanork et al. 2005). Excluding nonnatal workers, there was no significant difference in the proportion of workers with activated ovaries among subfamilies 1 week after dequeening (Table 2, Figs. 2 and 3). However, after 4 weeks, some subfamilies had a much higher proportion of workers with activated ovaries than others (Table 2, Figs. 2 and 3). In colony 2, the subfamilies with activated ovaries were different between the two sample times (significant heterogeneity, Table 2), whereas in colony 1 the reproductively dominant subfamilies did not change over time. The microsatellite loci available were not sufficiently variable to be able to assign the maternity of offspring males to different worker patriline, but were sufficient to demonstrate whether males arose from natal or nonnatal workers.

Discussion

This study has shown that the reproductive behaviors of queenless *A. florea* workers are complex and variable. In all colonies workers begin to activate their ovaries within 4 days of queen loss, even while female larvae (from which

Table 2 Contingency table analyses of the proportions of adult workers with activated ovaries among different subfamilies in *A. florea* colonies

Colony	Sampling time	<i>G</i>	<i>df</i>	<i>P</i>	<i>P</i> _{Fisher}
1	Week 1	12.55	12	0.4	0.778
	Week 4	33.92	13	0.001	0.002
	Totals	32.26	15	0.006	0.012
	Heterogeneity	32.26	10	0.161	
2	Week 1	20.45	18	0.308	0.491
	Week 4	37.69	19	0.006	0.015
	Totals	58.14	21	0.112	0.163
	Heterogeneity	20.07	16	0.023	

*P*_{Fisher} is the *P* value from a Monte Carlo approximation of the Fisher's exact test and *P* is the probability associated with the presented *G* test. The table is based on 100 bees per colony per sample period

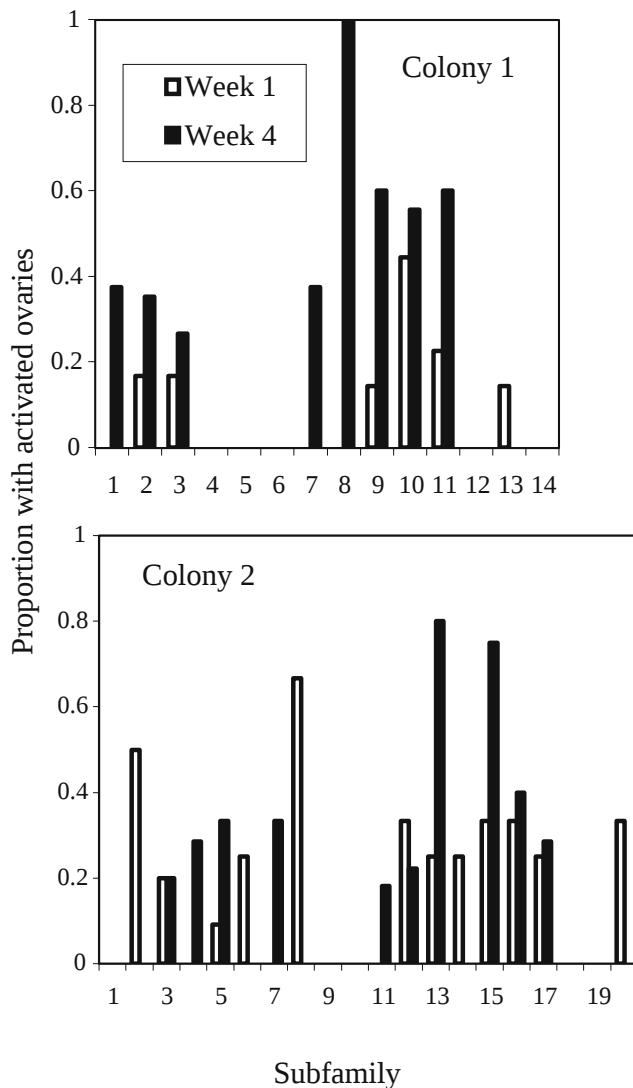


Fig. 3 Proportion of workers of *A. florea* with activated ovaries among different subfamilies after 1 and 4 weeks of dequeening

a replacement queen could be reared) are still present. Worker oviposition occurs soon after ovary activation, as worker-laid larvae can be present within 7 days of dequeening. However, in some colonies, larvae do not appear for at least 2 weeks after the first worker oviposition. This suggests that in these colonies worker policing continues well after oviposition begins, as it does in *A. cerana* (Oldroyd et al. 2001) and temperate *A. mellifera* (Miller and Ratnieks 2001; Martin et al. 2005). After policing stops and larvae appear, almost all colonies abscond before drone pupae appear.

In the first 3 weeks after transfer, queenless and queenright nests have similar rates of absconding. After 3 weeks, however, queenright nests may remain in situ for several months, whereas all queenless colonies abandon their nests within a month. We suggest that nest relocation per se is not a factor in absconding after 3 weeks and that, therefore, queenlessness is a

causal factor in absconding. If a queenright nest does abscond, it does so in an orderly fashion, waiting until all brood has emerged (Woyke 1976; Akatanakul 1977; Seeley 1985). This contrasts with the behavior of queenless nests, which often abandon their brood when they abscond.

Queenless *A. mellifera* colonies of temperate subspecies rarely abscond, and this seems an adaptive strategy. If a queenless colony reestablishes at another site, it must first build a new comb before it can commence brood rearing anew, wasting the inherited comb and male pupae that are the orphaned workers' sole heirs. Why, then, should *A. florea* colonies that are about to produce male pupae commonly abscond? We can think of four plausible explanations, but none of these are completely satisfactory, and we do not advocate any one of them at this time.

First, the orphaned workers might benefit from a comb comprising solely of drone cells (Page and Erickson 1988; Neumann et al. 2000; Halling and Oldroyd 2003). We have previously reported a small colony of queenless *A. florea* workers that had built a comb comprised entirely of drone cells (Oldroyd and Wongsiri 2006). However, it would seem that abandoning a comb just to build a new one would reduce the average reproductive success of an orphaned colony, and that it would be more efficient to remodel the existing comb to include more drone cells. Furthermore, if comb remodeling is the goal of absconding, it is difficult to understand why it does not occur more or less immediately after queen loss and before ovary activation.

Second, an absconding swarm may attempt to combine with a queenright colony, as has been observed in *A. m. capensis* (Hepburn et al. 1999; Neumann et al. 2001a). However, because *A. florea* have strong nestmate recognition, and reject nonnestmates that are introduced to their colony (Free and Williams 1979), it seems unlikely that an entire swarm of orphaned workers would be accepted by another colony. There is an obvious reason why a queenright colony should not adopt orphaned workers: such workers are unrelated to the queenright nest, and because so many of the orphaned workers have activated ovaries, they have both the motive and ability to parasitize their adoptive hosts.

Third, absconding swarms might attempt to combine with another queenless nest, but again, there is no obvious advantage to the host colony, which is highly vulnerable to parasitism (Nanork et al. 2005) because policing is no longer effective. Thus, the host colony is predicted to reject the immigrants.

Fourth, the high rates of parasitism by workers from other colonies (Nanork et al. 2005) may drive orphaned *A. florea* colonies to abscond. Workers that continue to contribute to the welfare of a queenless colony may be committing the Concorde fallacy (Dawkins and Carlisle 1976)—further investment in a colony in which reproductive returns are very low due to high rates of parasitism. We

speculate that the open nest that characterizes *A. florea* means that queenless colonies are more vulnerable to worker parasitism than cavity nesting species such as *A. mellifera*, and it is for this reason that queenless *A. florea* are likely to abscond in response to high rates of parasitism, whereas European *A. mellifera* subspecies are less likely to.

Although only two of our 40 dequeened colonies produced male pupae, this study provides evidence for overt reproductive competition among subfamilies. As with queenless *A. mellifera* colonies (Martin et al. 2004), workers of some subfamilies have a significantly higher proportion of individuals with activated ovaries than others. Thus, it seems likely that certain subfamilies have the ability to respond to the lack of queen and brood pheromones earlier than others (Moritz et al. 2000) and to activate their ovaries.

We conclude that queenless *A. florea* nests are highly unstable and vulnerable to reproductive parasitism. Many workers from queenless nests may join other nests. Host nests are vulnerable to reproductive parasitism by such workers, and worker policing may be an important defense against such parasitism.

Acknowledgements This work was supported by the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Project (No. PHD/0144/2544) and the Australian Research Council. We acknowledge the technical assistance of Julie Lim and Yon Nuanchan. We also thank the members of the Centre of Excellence in Entomology: Bee Biology, Biodiversity of Insects and Mites, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand and the Behavior and Genetics of Social Insects Lab, School of Biological Sciences, University of Sydney, and particularly Madeleine Beekman, who gave helpful comments on this manuscript.

References

- Akratanakul P (1977) The natural history of the dwarf honey bee, *Apis florea* F. in Thailand. Ph.D. thesis, Cornell University, p 88
- Bai ARK, Reddy CC (1975) Ovary development and egg laying in *Apis cerana indica* workers. J Apic Res 14:149–152
- Barron AB, Oldroyd BP, Ratnieks FLW (2001) Worker reproduction in honey-bees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. Behav Ecol Sociobiol 50:199–208
- Birmingham AL, Hoover SE, Winston ML, Ydenberg RC (2004) Drifting bumble bee (Hymenoptera: Apidae) workers in commercial greenhouses may be social parasites. Can J Zool 82:1843–1853
- Blanford EJ (1923) Chinese bees as we find them. Bee World 5:104–106
- Châline N, Martin SJ, Ratnieks FLW (2004) Worker policing persists in a hopelessly queenless honey bee colony (*Apis mellifera*). Insectes Soc 51:113–116
- Dawkins R, Carlisle TR (1976) Parental investment, mate desertion, and a fallacy. Nature 262:131–133
- Duangphakdee O (2006) Biological active compounds used by worker bees to repel ants. Ph.D. thesis, Chulalongkorn University
- Dzierzon J (1845) Gutachten über die von Herrn Direktor Stöhr im ersten und zweiten Kapitel des General-Gutachtens aufgestellten Fragen. Eichstädter Bienenzeitung 1:109–113, 119–121
- Estoup A, Solignac M, Cornuet J-M (1994) Precise assessment of the number of patrines and of genetic relatedness in honey bee colonies. Proc R Soc Lond B 258:1–7
- Estoup A, Largiadier CR, Perrot E, Chourrout D (1997) Rapid one tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. Mol Mar Biol Biotechnol 5:205–208
- Free JB, Williams IH (1979) Communication by pheromones and other means in *Apis florea* colonies. J Apic Res 18:16–25
- Halling LA, Oldroyd BP (2003) Do policing honeybee workers target eggs in drone comb? Insectes Soc 50:59–61
- Halling LA, Oldroyd BP, Wattanachaiyingcharoen W, Barron AB, Nanork P, Wongsiri S (2001) Worker policing in the bee *Apis florea*. Behav Ecol Sociobiol 49:509–513
- Hepburn HR, Reece SL, Neumann P, Moritz RFA, Radloff SE (1999) Abscending in honeybees (*Apis mellifera*) in relation to queen status and mode of worker reproduction. Insectes Soc 46:323–326
- Lewontin RC, Felsenstein J (1965) The robustness of homogeneity tests in 2 x N tables. Biometrics 21:19–33
- Lin H, Winston ML, Haunerland NH, Slessor KN (1999) Influence of age and population size on ovarian development, and of trophallaxis on ovarian development and vitellogenin titres of queenless worker honey bee (Hymenoptera: Apidae). Can Entomol 131:695–706
- Lopez-Vaamonde C, Koning JW, Brown RM, Jordan WC, Bourke AFG (2004) Social parasitism by male-producing reproductive workers in a eusocial insect. Nature 430:557–560
- Martin CJ, Oldroyd BP, Beekman M (2004) Differential reproductive success among subfamilies in queenless honey bee colonies (*Apis mellifera* L.). Behav Ecol Sociobiol 56:42–49
- Martin S, Châline N, Drijfhout F, Jones G (2005) Role of esters in egg removal behaviour in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. Behav Ecol Sociobiol 59:24–29
- Miller DG, Ratnieks FLW (2001) The timing of worker reproduction and breakdown of policing behaviour in queenless honey bee (*Apis mellifera* L.) societies. Insectes Soc 48:178–184
- Moritz RFA, Southwick EE (1992) Bees as superorganisms. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Moritz RFA, Simon UE, Crewe RM (2000) Pheromonal contest between honeybee workers (*Apis mellifera capensis*). Naturwissenschaften 87:395–397
- Nanork P, Paar J, Chapman NC, Wongsiri S, Oldroyd BP (2005) Asian honey bees parasitize the future dead. Nature 437:829
- Neumann P, Hepburn HR, Radloff SE (2000) Modes of worker reproduction, reproductive dominance and brood cell construction in queenless honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. Apidologie 31:479–486
- Neumann P, Pirk CWW, Hepburn R, Radloff SE (2001a) A scientific note on the natural merger of two honeybee colonies (*Apis mellifera capensis*). Apidologie 32:113–114
- Neumann P, Radloff SE, Moritz RFA, Hepburn HR, Reece SL (2001b) Social parasitism by honeybee workers (*Apis mellifera capensis* Escholtz): host finding and resistance of hybrid host colonies. Behav Ecol 12:419–428
- Oldroyd BP, Wongsiri S (2006) Asian honey bees. Biology, conservation and human interactions. Harvard University Press, Cambridge
- Oldroyd BP, Halling LA, Good G, Wattanachaiyingchareon W, Barron AB, Nanork P, Wongsiri S, Ratnieks FLW (2001) Worker policing and worker reproduction in *Apis cerana*. Behav Ecol Sociobiol 50:371–377
- Page RE, Erickson EH (1988) Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera*). Behav Ecol Sociobiol 23:117–126
- Palmer KA, Oldroyd BP (2001) Mating frequency in *Apis florea* revisited (Hymenoptera: Apidae). Insectes Soc 48:40–43

- Ratnieks FLW (1988) Reproductive harmony via mutual policing by workers in eusocial Hymenoptera. *Am Nat* 132: 217–236
- Ratnieks FLW (1993) Egg-laying, egg-removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 32:191–198
- Ratnieks FLW, Visscher PK (1989) Worker policing in honeybees. *Nature* 342:796–797
- Ratnieks FLW, Foster KR, Wenseleers T (2006) Conflict resolution in insect societies. *Annu Rev Entomol* 51:581–608
- Robinson GE, Page RE, Fondrk MK (1990) Intracolony behavioural variation in worker oviposition, oophagy and larval care in queenless honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 26:315–323
- Seeley TD (1985) Honeybee ecology. Princeton University Press, Princeton
- Seeley TD (1989) The honey bee colony as a superorganism. *Am Sci* 77:546–553
- Solignac M, Vautrin D, Loiseau A, Mougél F, Baudry E, Estoup A, Garnery L, Haberl M, Cornuet J-M (2003) Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Mol Ecol Notes* 3:307–311
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex (R)100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:507
- Wattanachaiyingcharoen W, Oldroyd BP, Good G, Halling LA, Ratnieks FLW, Wongsiri S (2001) Lack of worker reproduction in *Apis dorsata*. *Insectes Soc* 49:80–85
- Wenseleers T, Hart AG, Ratnieks FLW (2004a) When resistance is useless: policing and the evolution of reproductive acquiescence in insect societies. *Am Nat* 164:E154–E167
- Wenseleers T, Helanterä H, Hart A, Ratnieks FLW (2004b) Worker reproduction and policing in insect societies: an ESS analysis. *J Evol Biol* 17:1035–1047
- Woyke J (1976) Brood-rearing efficiency and absconding in Indian honeybees. *J Apic Res* 15:133–143
- Zar JH (1996) Biostatistical analysis, 3rd edn. Prentice-Hall, Upper Saddle River

Original article

Reinforcing a barrier – a specific social defense of the dwarf honeybee (*Apis florea*) released by the weaver ant (*Oecophylla smaragdina*)¹

Orawan DUANGPHAKDEE^a, Nikolaus KOENIGER^{b*}, Gudrun KOENIGER^b,
Siriwat WONGSIRI^a, Sureerat DEOWANISH^a

^a Center of Excellence in Entomology: Bee Biology, Biodiversity of Insects and Mites, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b Institut für Bienenkunde (*Polytechnische Gesellschaft*), Fachbereich Biologie und Informatik der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main, Karl-von-Frisch-Weg 2, 61440 Oberursel, Germany

Received 23 November 2004 – revised 17 January 2005 – accepted 17 January 2005

Published online 13 September 2005

Abstract – 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 a 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*.

Apis florea* / *Oecophylla smaragdina* / colony defense / predator-prey relationship / *Crematogaster rogenhoferi

1. INTRODUCTION

Apis florea Fabricius is widespread throughout Asia, where it builds its single comb around small branches of bushes and shrubs (Akranakul, 1977). The exposed position of the comb with the honey storage, bees and brood attracts a range of predatory species, so it is not surprising that *A. florea* possesses a wide array of specific social defence mechanisms among which shimmering (Butler, 1954; Pirk et al., 2002) and hissing are most conspicuous. Shimmering behaviour is released by optical stimuli and for example a butterfly – apparently attracted by the odour of honey – releases “shimmering behaviour” (a specific movement) of a few bees hanging in

the curtain and which otherwise does not interfere with colony activities. Hissing behaviour is released by mechanical stimuli or by “piping” of forager bees disturbed on their return to the nest (Sen Sarma et al., 2002). Hissing alerts the whole colony and results in steep decrease of foraging activities. The hissing sound per se may repel mammals and even large Asian bears (Koeniger and Fuchs, 1973) or initiate a full stinging defence of the colony (Koeniger and Fuchs, 1975).

A different permanent threat in the arboreal habitat of *A. florea* is posed by the weaver ant *Oecophylla smaragdina* (Hölldobler and Wilson, 1983), which ranks among the most important predators of *A. florea* (Seeley, 1983).

* Corresponding author: bienenkunde@em.uni-frankfurt.de

¹ Manuscript editor: Stan Schneider

In direct fighting, the *A. florea* workers, because of their diminutive size, are no match for the large weaver ants. Colonies rely instead on sticky bands of plant resins plastered around the branch carrying the nest. Thus the comb with the brood, the honey storage and the bees are sealed off completely by sticky barriers on all structures connecting to other parts of the canopy. In a survey in northern Thailand, Seeley et al. (1982) examined 76 *A. florea* colonies. Only 28 of them had sticky bands, but 24 of those were under ant attack. This indicated a strong correlation between sticky bands and the presence of ants. Experimental data on the question how the presence of *Oecophylla smaragdina* ants is related to *A. florea*'s construction of sticky bands are not yet available.

In our experiments we provoked *A. florea* colonies by exposing a weaver ant on the top of the colony and observed the reaction of the bees in regard to the sticky band. In comparison to the weaver ant the reaction after presentation of an empty forceps, a *Tenebrio molitor* larva and another arboreal ant species (*Crematogaster rogenhoferi* Mayr) was recorded. Our aim was to assess whether the presence of a weaver ant inside the barriers of the sticky bands causes an immediate and specific social response of *A. florea* colonies.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. The bees

Observations and experiments were conducted at the campus of Chulalongkorn University (Bangkok) in March to August, 2003 and in January to April 2004.

Eighteen colonies of *A. florea* were collected in a coconut estate near Maeklong, Samut Songkram Province. The *A. florea* nests were detected in shrubs and trees at heights of 3 m to 5 m. Climbing up smoothly during day time the colony was gently smoked and afterwards sprayed with water. Surrounding leaves and twigs were carefully removed. Finally both sides of the nest branch were smoothly removed by sharp garden cutter. The colony was hung at one end of the nest branch and was brought down avoiding accelerations and jerks. Both ends of the nesting branch were tightly fixed in a wooden box for transportation to Bangkok. There, the colonies were hung on small trees in front of the entomology laboratory (in CU campus) maintaining the vertical position of the comb. The bees started for-

aging pollen and nectar at the new location. Additionally, we offered 50 g candy (icing sugar mixed with honey) daily on the top of the comb.

2.2. The ants

O. smaragdina was also collected at Maeklong. We selected a fairly large (40 cm × 30 cm) leaf nest in a Mango tree and carefully clipped the surrounding twigs leaving only the branch with the nest. After the ants had calmed down and the main force of them had returned into the nest again (15 min) we cut the nesting branch and swiftly put the nest into a transport box which was closed immediately. In front of the entomology laboratory we fixed the *O. smaragdina* nest to a small potted Mango tree. The pot of this tree was kept in container filled with detergent water to prevent ants from escaping. The ants were fed with 10 g of *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae, 5 g of tinned mackerel fish and 10 mL of honey syrup per day.

Presentation of different objects to the *A. florea* colony

An *O. smaragdina* forager was collected from the feeding dish of the ant nest. A *C. rogenhoferi* worker was caught from a foraging path at a nearby tree. We held the ant by a forceps at its petiolus and put it for 1 min at the center of the top of the *A. florea* comb. Further a *T. molitor* larva of about 1.5 cm length was presented to the colony at a similar position also for 1 min. As a control we took an empty forceps and left it also for 1 min on the *florea* comb.

2.3. Number of bees in sticky band zone

As a parameter for the colony reaction we counted the bees present in the sticky band zone, which was the surface of the nest branch extending from where the branch protruded from the comb to a distance of 4 cm. We counted the number of bees at each colony 5 minutes before the presentation of the ant (see below), directly after (within 2 minutes), 1 hour after and 2 hours later each count was repeated 5 times at each of the sticky bands. We took the mean of the counts for further analysis. Our observation position was 50 cm away and was maintained constant for every colony.

2.4. Deposition of material in sticky band zone

A double layer of plastic bands (Prihimo, made in Japan) of known weight were fixed in the sticky zone. After 2 hours they were carefully removed. Because of the inner layer's contamination by some

sticky materials that were present before the experiment, only the outer layers were used to calculate the weight of the newly deposited materials from increased weight of the band, determined by an 0.001 mg accuracy balance (Sartorius CP2245).

3. RESULTS

3.1. Behavior of bees towards different objects presented on the upper side of the comb

The reaction of the bees towards the *O. smaragdina* worker held in the forceps happened without delay. The bees shied away from the ant and formed – head towards the ant – a multi layered wall around it. The distance to the ant was 4–7 cm. At the same time, many bees from the comb rushed on the upper side joining the group of defending workers. After half a minute some worker bees launched counter attacks against the ant. The attacking bee seized the antenna or a leg of the ant by mandibles and tried to fly off with it. Since the ant was held by the forceps the bee did not succeed at carrying the ant away. In some cases at the end of the 1 min exposure period more bees joined the attack and stinging behavior occurred. Regularly, when we removed the ant, a few bees were attached by their mandibles to the ant so tightly that they were removed together with the ant from the comb. At the end, after we had released the ant from the forceps at the ant arena the bees let the ant go and flew back to the colony which was about 2 m away.

The reaction of the bees to a worker of *C. rogenhoferi* or a larva of *T. molitor* were limited to the group of bees which came into direct contact or which happened to be within a narrow range of it. The bees turned the head toward to the ant or mealworm immediately. With 3 to 5 s after presentation, a few bees attacked by biting and stinging. In comparison to the behavior released by a weaver ant, the reaction was different. While at least 20–50 bees responded to *O. smaragdina* not more than 5–15 bees attacked *C. rogenhoferi* or *T. molitor* larva. In addition, we did not notice bees from the comb rushing up and joining the defense. In summary, the reaction of the *A. florea* colony to presentation of *C. rogenhoferi* or *T. molitor* remained locally restricted while the

response released by an *O. smaragdina* worker spread over the whole colony or at least a large part of it.

An “empty” forceps did not increase the activity level on the comb. The bees moved towards to forceps and started “head-pushing” behavior (Sen Sarma et al., 2000). In a few experiments one or two bees bit the tip of the forceps with the mandibles. The relatively low level of activity caused by the empty forceps was strikingly different from the “excitement” and fast movements released by an *O. smaragdina* worker.

3.2. Number of bees at the sticky band zone

Under our experimental conditions *O. smaragdina* workers had no access to the *A. florea* colonies and we did not observe much activity at sticky band zones. In several scans not even a single bee was detected. On average we found 2.3 ± 1.3 bees ($n = 24$ observations). The bees remained motionless facing outside for a few minutes until they turned around and disappeared in curtain covering the comb. One minute after presenting a *O. smaragdina* worker on the comb the number of bees at the sticky band zone increased by a factor of 15.2 ± 7.5 . The relative increase of bees was 7.5 after 1 h and 5.6 2 h after the presentation of *O. smaragdina*. The difference compared to the control (empty forceps) was highly significant (Wilcoxon, $P < 0.0005$) after one minute (Fig. 1). Even after 2 h the relative increase was still significant (Wilcoxon, $P < 0.001$). However the number of bees decreased significantly between 1 min and 1 h after the ant stimulus was presented (Wilcoxon, $P < 0.002$). The difference between 1 h and 2 h was not significant (Wilcoxon, $P < 0.122$).

In control colonies, 1 min after presentation of a *Crematogaster* worker, a *Tenebrio* larva or of an empty forceps on the comb, we did not observe an increase of bees in the sticky band zone (Fig. 1). Apparently the increase of bees was a specific reaction to *O. smaragdina*.

3.3. Behavior at sticky band after presentation of *O. smaragdina*

Ant presentation on the comb resulted first in enforcement of the guard bees at the comb

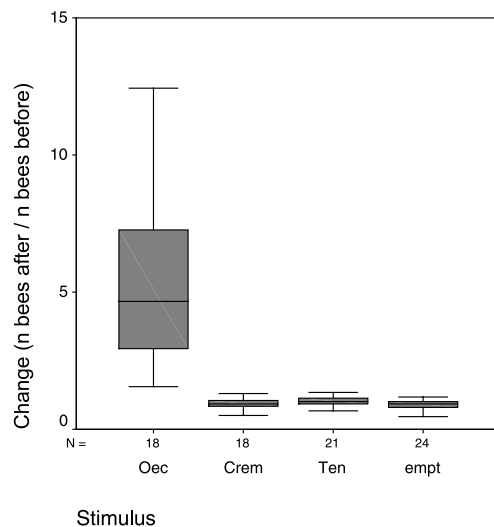


Figure 1. Increase of bees at the sticky band zone 1 minute after stimulation.
Y axis: boxplot of bee numbers divided by number of bees before the experiment.
X axis: Stimulus = presentation of
Oec = *Oecophylla smaragdina* forager,
Crem = *Crematogaster* r.,
Ten = *Tenebrio molitor* larva,
empt = empty forceps,
on the top of *Apis florea* comb.

side of the sticky bands. A large group of densely packed bees ($n = 12\text{--}25$) settled with their heads towards the sticky band in a 2 or 3 fold layer. Looking along the branch over the sticky band towards the comb we saw two or three rows of worker bee heads, comparable to bricks in a wall. A small number of bees went beyond these guard bees and started to “work” on the sticky band. These bees continuously scraped the surface of the branch by their mandibles. The antennae were constantly moving back and forth. The tips of both antennae touched the surface and/or the mandibles and then swung back. The movements looked similar to the behavior of *A. mellifera* workers sealing wooden surfaces inside the hive with propolis (Meyer, 1954). The work on the sticky band went on for 3 to 10 min. Then the bees (when we succeeded in keeping track of them) moved on to the comb and returned within 1 or 2 min and to continue working at the sticky band.

We did not see bees carrying material in the pollen baskets to the sticky band. Further, we

did not notice that any larger particles were brought by the mandibles. However, we could not watch the head of these bees constantly during their excursions on the combs. As soon as the bee reached the nest it dived into the layer of bees. So we can not exclude that the bees did collect some smaller parts of material from the comb and fixed this to the sticky band.

3.4. Depositions in sticky band zone

On average the increased weight of deposits on the plastic band after ant exposure was 2.7 mg with a standard deviation of ± 2.73 (6 colonies, 18 experiments). In the control colonies (without ant presentation) we measured a mean of $1.4 \text{ mg} \pm 0.91 \text{ mg}$. The difference was highly significant (Mann-Whitney; $P = 0.0005$) while there was no difference within the control group. So the presentation of an *O. smaragdina* worker on the colony resulted not only increasing numbers of bees but also in a larger amount of deposited material.

4. DISCUSSION

The use of sticky or repellent barriers to protect colonies against ants is wide spread among different taxonomic groups of social insects. In several species of social wasps (Polistinae and Stenogastrinae) the pedicel, by which the nest is fixed to substrate, is regularly impregnated by repellent pheromones from sternal glands (Espelie et al., 1994). The nest entrance of many species of Meliponinae consists of a tube built out of plant resins and sticky materials (Wilson, 1971). So the “invention” of barriers against crawling arthropods has arisen independently several times during evolution.

Generally, the nest branch is the only surface connection of the *A. florea* comb to the “outside world” and it disembogues just under the platform into the comb. This platform serves as location of the bee dances and functions as an information center of the foragers (Lindauer, 1956; Koeniger et al., 1982; Seeley, 1985; Dyer, 1985).

At the platform the bees must deal with mainly two different kind of interferences. Old leaves or debris from the higher portion of the vegetation will fall on the platform and are

removed by the recently described "head pushing" (Sen Sarma et al., 2000). We observed this behavior when we put the empty forceps on the platform. So bees "classified" the forceps alone as "debris". Afterwards we did not notice any increase of activity at the sticky bands.

The second kind of interferences which must be expected at the upper side of comb comes from crawling arthropods or other intruders which succeed in surpassing the sticky band. When we presented the forceps with the *O. smaragdina* worker we saw the latter kind of defensive behavior. The direct reactions of the bees to the ant were aimed to expel the intruder. Though the reactions to *C. rogenhoferi* or *T. molitor* involved fewer bees their intention to remove the presented insects was obvious. Presentation of *C. rogenhoferi* or *T. molitor* did not result in increasing numbers of bees working at the sticky bands. Interestingly, the significant long term effects were restricted to the presentation *O. smaragdina*: The "effect" of this behavior is clear. Increasing the number of guard bees and reinforcing the sticky band were means of precaution and would enable the colony to more effectively repel further intruders.

The weaver ant *O. smaragdina* is a dominant species in areas where *A. florea* occurs (Hölldobler and Wilson, 1990). Their efficient recruitment system enables weaver ants to fast communal foraging and to large prey items (Hölldobler, 1983). Therefore the existence and survival of an *A. florea* colony within the territory of *O. smaragdina* depends on an effective protective system. A main requirement of such defense against *O. smaragdina* is to prevent any foraging success of a weaver ant scout. As we have witnessed several times, an odor trail of a successful scout ant can recruit larger numbers of ants which will overpower defending bees and cause absconding of the colony (Wongsiri, 1989). At the end of such raids, the honey storage, the brood and quite a number of worker bees will be lost to the weaver ants.

The reinforcement of the sticky barriers seems to be a specific behavioral response of *A. florea* to its most prominent predator *O. smaragdina*. A comparable phenomenon termed enemy specification (Wilson, 1975) is known to operate between several ant species. These species recognize their most dangerous adversary species and fight against them without

delay by specific mass attacks (Hölldobler, 1983).

The question of how *A. florea* recognizes the weaver ant remains open. The experiments, however, with *C. rogenhoferi* and larvae of *Tenebrio* point to possible cues or semiochemicals specific to *O. smaragdina*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Chariya Lekprayoon (head of entomology laboratory, Chulalongkorn Univ) shared her facilities during several weeks with Gudrun Koeniger and Nikolaus Koeniger and supported us generously. We acknowledge her significant assistance. We thank the Thailand Research Fund for financial support through Royal Golden Jubilee project. Thanks to Mr. Yhon Nonchan for collecting *A. florea* and *O. smaragdina* nests and Miss Mananya Phiancharoen for her kind help. We thank Ulrich Maschwitz and Stefan Fuchs for valuable suggestions and improvements of earlier versions of the manuscript.

Résumé – Renforcement d'une barrière – une défense sociale spécifique de l'Abeille naine (*Apis florea*) déclenchée par la Fourmi tisserande *Oecophylla smaragdina*. L'Abeille naine, *Apis florea* Fabricius, largement répandue en Asie, construit son unique rayon à l'air libre, suspendu dans des buissons, des arbustes ou des arbres. Dans cet habitat le principal prédateur insectivore est la Fourmi tisserande *Oecophylla smaragdina* Fabricius. Confrontées individuellement à cette fourmi de grande taille, les petites ouvrières d'*A. florea* ont le dessous. Par contre les colonies se protègent par des bandes collantes, à base de résines de plantes, qui entourent la branche à laquelle est accroché le nid. Le rayon est ainsi complètement barricadé par ces ceintures-pièges et isolé de toutes les structures qui le relient aux autres parties de la canopée. Lors d'une étude dans le nord du Vietnam, Seeley et al. (1982) examinèrent 76 colonies d'*A. florea*. Seules 28 d'entre elles possédaient des ceintures-pièges, mais 24 de celles-ci étaient attaquées par les fourmis, ce qui indique une forte corrélation entre les ceintures-pièges et la présence de fourmis. On ne sait pas à l'heure actuelle de quelle façon la présence d'*O. smaragdina* agit sur la construction de ceintures-pièges par *A. florea*. Nos expériences ont consisté à provoquer une colonie d'*A. florea* en présentant une fourmi tisserande maintenue dans une pince au-dessus d'elle et en observant les réactions des abeilles. Le nombre d'abeilles présentes près des ceintures-pièges et l'augmentation du poids de résine ont été déterminés. Les mêmes observations ont été faites avec un ver de farine (larve de *Tenebrio molitor*) et une autre espèce de fourmi arboricole (*Crematogaster rogenhoferi*) à titre de témoin.

Suite à la présentation d'une ouvrière vivante d'*O. smaragdina* au sommet du rayon d'*A. florea*, le nombre d'abeilles près de la ceinture-piège a augmenté de façon significative par rapport aux témoins (Fig. 1). Il est resté à ce niveau élevé durant 2 h. Le matériel collant a lui aussi augmenté significativement. Le renforcement des ceintures-pièges semble être une réaction comportementale spécifique d'*A. florea* à son prédateur principal. Des comportements comparables, désignés par Wilson (1975) par le terme de spécification de l'ennemi, ont été décrits pour plusieurs espèces de fourmis. Ces espèces reconnaissent leur adversaire le plus dangereux et déclenchent immédiatement leur défense par des attaques massives spécifiques contre lui (Hölldobler, 1983). La question de savoir comment *A. florea* reconnaît la Fourmi tisserande reste ouverte. Les expériences avec *C. rogenhoferi* et les larves de *T. molitor* laissent supposer qu'il s'agit de composés chémiochimiques spécifiques à *O. smaragdina*.

Apis florea* / *Oecophylla smaragdina* / défense de la colonie / relation prédateur-proie / *Crematogaster rogenhoferi

Zusammenfassung – Verstärkung einer Barriere, – eine spezifische soziale Verteidigung der Zwerg-honigbiene (*Apis florea*), ausgelöst durch die Weberameise (*Oecophylla smaragdina*). Die Zwerg-honigbiene *Apis florea* Fabricius ist in Südasiens weit verbreitet, wo sie ihre einzige Wabe frei hängend an Ästen von Büschen, Unterholz und Bäumen baut. In diesem Lebensraum ist die Weberameise *Oecophylla smaragdina* Fabricius ein dominanter Räuber von Insekten. In einer direkten Konfrontation mit dieser großen räuberischen Ameise ist die einzelne *Apis florea* Biene unterlegen. Die Bienen-völker dagegen schützen sich mit Leimringen aus Pflanzenharzen. Auf diese Weise wird die Wabe vollständig verbarrikadiert und alle Strukturen abgesichert, die das Nest mit anderen Zweigen verbindet. In einer Untersuchung in Nordthailand überprüfte Seeley et al. (1982) 76 *A. florea* Nester. Nur 28 von ihnen hatten einen Leimring, bei 24 von ihnen bestand eine Bedrohung durch *Oecophylla smaragdina*. Das deutet auf eine enge Verknüpfung zwischen der Bedrohung durch die Ameisen und den Klebringen hin. Bisher ist nicht bekannt, wie sich die Präsenz von *O. smaragdina* Ameisen auf die Anlage und den Bau von Leimringen durch *A. florea* auswirkt. In unseren Versuchen wurde eine Weberameise mit einer Pinzette oben auf das *A. florea* Volk gehalten. Dann wurde die Reaktionen der Bienen auf den Leimring beobachtet. Die Änderung der Bienenzahl an den Ringen und die Gewichtszunahme des Klebharzes wurden bestimmt. Als Kontrolle wurde die Reaktion der Bienen auf eine leere Pinzette, einen Mehlwurm (Larve von *Tenebrio molitor*) und eine andere baumbewohnende Ameisenart (*Crematogaster rogenhoferi*) beobachtet.

Wurde eine lebende *O. smaragdina* Arbeiterin dicht über die Wabe von *A. florea* gehalten, war die Zunahme der Anzahl der Bienen im Bereich der Leimringe im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant (Abb. 1). Die Zahl der Bienen blieb für 2 Stunden auf einem höheren Niveau. Auch wurde hoch signifikant mehr klebriges Material aufgetragen. Die Verstärkung der Leimringe scheint eine spezifische Verhaltensreaktion von *A. florea* auf ihren bedeutendsten Räuber *O. smaragdina* zu sein. Vergleichbare Verhaltensweisen wurden von Wilson (1975) als Feindspezifikation bezeichnet und für mehrere Ameisenarten beschrieben. Diese Arten erkennen ihre gefährlichsten Feinde und beginnen sofort mit spezifischen Massenangriffen gegen sie zu kämpfen (Hölldobler, 1983). Die Frage über den Erkennungsmechanismus der Weberameisen durch *A. florea* ist nicht geklärt. Versuche mit *C. rogenhoferi* und den Larven von *Tenebrio* weisen auf Auslöser hin, die spezifisch für *O. smaragdina* sind.

Apis florea* / *Oecophylla smaragdina* / Volksverteidigung / Räuber-Beute-Beziehung / *Crematogaster rogenhoferi

REFERENCES

- Akratanakul P. (1977) The natural history of the dwarf honeybee, *Apis florea* F., in Thailand, PhD Thesis, Cornell Univ. Ithaca, NY.
- Butler C.G. (1954) The world of the honeybee, Collins, London.
- Dyer F.C. (1985) Mechanisms of dance orientation in the Asian honeybee *Apis florea*, J. Comp. Physiol. A 157, 183–198.
- Espelie K.E., Gamboa G.J., Grudzien T.A., Bura E.A. (1994) Cuticular hydrocarbons of the paper wasp, *Polistes fuscatus* – a search for recognition pheromones, J. Chem. Ecol. 20, 1677–1687.
- Hölldobler B. (1983) Chemical manipulation, enemy specification and inter-colony communication in ant communities, in: Huber F., Markl H. (Eds.), Neuroethology and Behavioral Physiology, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 354–365.
- Hölldobler B., Wilson E.O. (1983) The evolution of communal nest weaving in ants, Am. Sci. 71, 490–499.
- Hölldobler B., Wilson E.O. (1990) The Ants, Springer Verlag, Berlin.
- Koeniger N., Fuchs S. (1973) Sound production as colony defense in *Apis cerana* Fabr., Proc. VII Congr. IUSSI, London, pp. 199–203.
- Koeniger N., Fuchs S. (1975) Zur Kolonieverteidigung der asiatischen Honigbienen, Z. Tierpsychol. 37, 99–106.

- Koeniger N., Koeniger G., Punchihewa R.K.W., Fabritius Mo., Fabritius Mi. (1982) Observations and experiments on dance communication in *Apis florea* in Sri Lanka, J. Apic. Res. 21, 45–52.
- Lindauer M. (1956) Über die Verständigung bei indischen Bienen, Z. Vgl. Physiol. 34, 299–345.
- Meyer W. (1954) Die “Kittharzbienen” und ihre Tätigkeiten, Z. Bienenforsch. 5, 185–200.
- Pirk C.W.W., Hepburn R., Radloff S.E., Erlandsson J. (2002) Defense posture in the dwarf honeybee, *Apis florea*, Apidologie 33, 289–294.
- Seeley T.D. (1983) The ecology of temperate and tropical honeybee societies, Am. Sci. 71, 264–272.
- Seeley T.D. (1985) Honeybee ecology. A study of adaptation in social life. Monographs in Behavior and Ecology, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Seeley T.D., Seeley R., Akwatanakul P. (1982) Colony defense strategies of the honeybees in Thailand, Ecol. Monogr. 52, 43–63.
- Sen Sarma M., Fuchs S., Tautz J. (2000) Debris removal by head pushing in *Apis florea* F. honeybees, Naturwissenschaften 87, 241–243.
- Sen Sarma M., Fuchs S., Werber C., Tautz J. (2002) Worker piping triggers hissing for coordinated colony defence in the dwarf honeybee *Apis florea*, Zoology 105, 215–223.
- Wilson E.O. (1971) The Insect Societies, Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Wilson E.O. (1975) Enemy specification in the alarm-recruitment system of an ant, Science 190, 798–800.
- Wongsiri S. (1989) The effects of the import of *Apis mellifera* L. to Thailand, Proc. 4th Int. Conf. Apic. Tropical Climates, Cairo 1988, pp. 162–167.

**BUMBLE BEES (HYMENOPTERA, APIDAE, BOMBINAE) OF THE UPPER
NORTHERN PARTS OF THAILAND**

Ratna Thapa
School of Science,
Mae Fah Luang University,
Thailand

ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful to TRF (RTA 4580012) for providing me the valuable references, and funds to conduct the survey of bumblebees in the upper northern parts of Thailand.

CONTENTS

ABSTRACT	4
INTRODUCTION	4
OBJECTIVE	5
METHODOLOGY	5
Sites of collection	5
Sample collection	6
RESULTS	6
DISCUSSION.....	8
CONCLUSION	8
RECOMMENDATION FOR CONSERVATION	8
REFERENCES	9

ABSTRACT

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.

Key words: Hymenoptera, long-tongued bumblebees, *B. haemorrhoidalis*, *B. trifasciatus*, and *B. breviceps*

INTRODUCTION

Bumblebees, (genus *Bombus*), classified as “long-tongued” bees (Michener, 2000), are large roundest bees sporting coats of bright combinations of yellow, orange, red, or white fur on black (Free and Butler, 1959). Bumblebees are among the most diverse and successful pollinators known. Worldwide (Free and Butler, 1959) over 239 species are known, and in North America at least 50 species are present (Krombein *et al.*, 1979; Williams 1998). They range from the frigid arctic coast to tropical rainforests in Amazonia. They are particularly cold hardy, being able to survive arctic winters. Bumblebees have long life spans and flight seasons, and in their selection of flowers to visit (Heinrich 1979). Bumblebees are capable of pollinating many varieties of flower types, and as pollinators, they have several advantages over honey bees, and sting less bees. Bumblebees, in particular, are among the most important pollinators of temperate zone plants (Proctor *et al.*, 1996). Declines of bumblebee populations have been documented in several parts of the world. There is no such record of bumblebees of Thailand existed. Still it does not know how many species are existed in the northern parts of Thailand. How many species of bumblebees are known in Thailand?

Generally, bumblebees are used to pollinate tomato in greenhouse (Heinrich, 1979). Almost one million colonies of *Bombus terrestris* and *B. impatiens* are reared

annually in commercial facilities and are distributed throughout the world (Velthuis and Doorn, 2006). *B. terrestris* colonies are imported to Japan from Europe (Ono 1997, Thorp, 2003), and Russia (Berezin and Beiko, 1996). In 2004, 99,000 acres of greenhouse tomato production were pollinated worldwide by bumblebees.

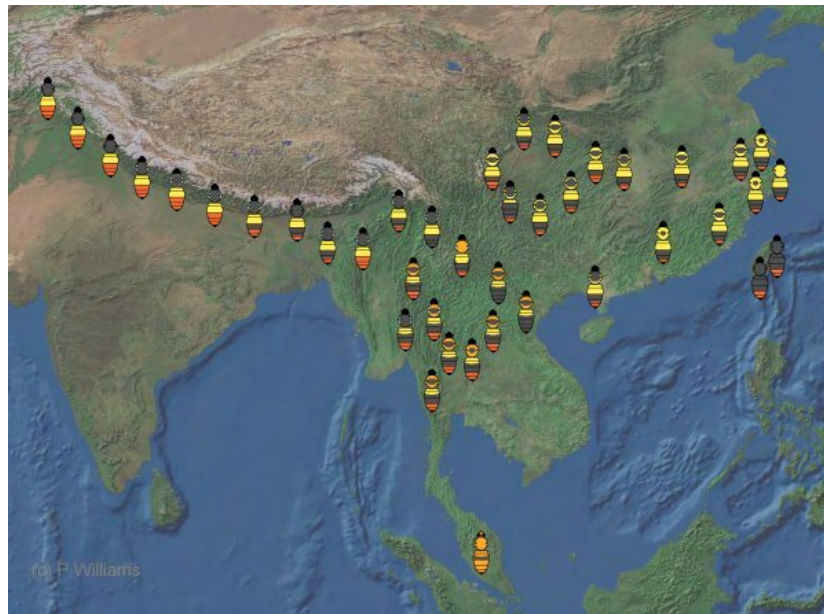


FIGURE 1. Geographical distribution of bumblebees based on color pattern (Source: Williams, 1988).

OBJECTIVE

The main objective of this research was to:-

- collect and record from the upper northern parts of Thailand.

METHODOLOGY

Sites of collection

Chiang Mai, Chiang Rai, and Nan provinces were monthly visited to collect bumblebees (Figure 2).

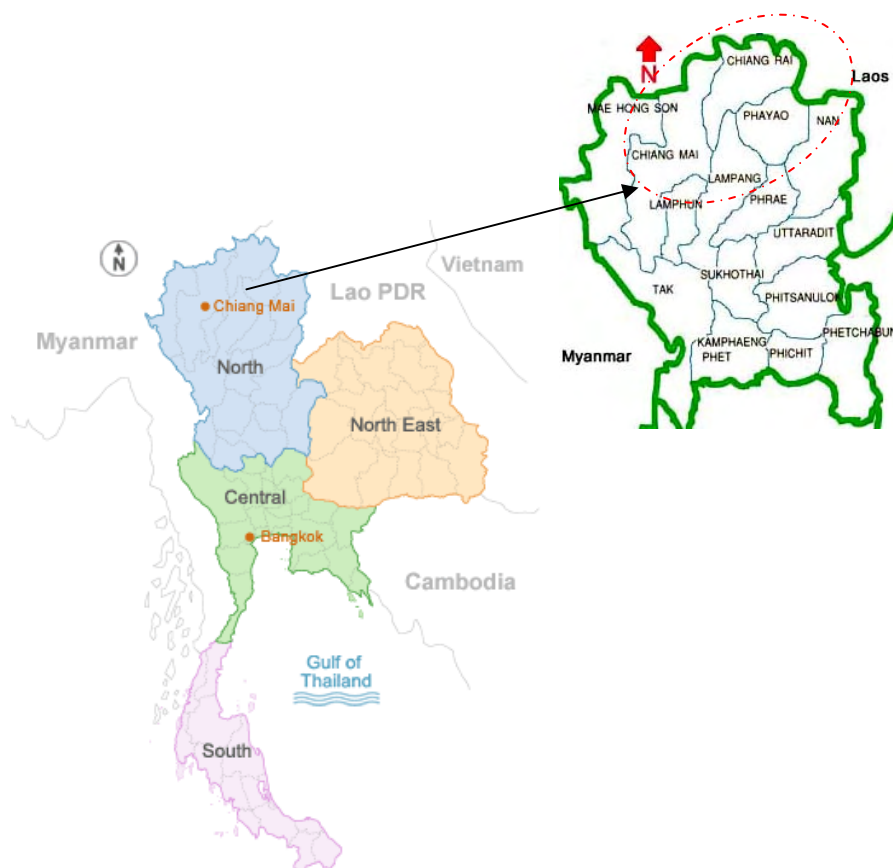


FIGURE 2. Locations of bumblebees collection in the northern Thailand.

Samples collection

The bumblebees were directly collected from the flowers and chilled in an ice box for 20 minutes. The chilled specimens were examined. Firstly, the collected species were killed in a killing jar and preserved for further identification in the Mae Fah Luang Entomology Museum.

RESULTS

The species of bumblebees were recorded from the three provinces are listed in Table

1. All three species of bumble bees were long tongued and buff-tailed bumblebees.

Table 1. List of bumblebees species observed in the northern parts of Thailand.

Species		Location	Altitude (m)
<i>B. haemorrhoidalis</i>	long-tongued species	Doi An Khang, Doi Inthanon, Doi Suthep Doin Tung	900-1476
<i>B. trifasciatus</i>	long-tongued species	Doi An Khang, Doi Inthanon, Doi Suthep Doin Tung	900-1476
<i>B. breviceps</i>	long-tongued species	Doi An Khang, Doi Inthanon, Doi Suthep Doin Tung	900-1476

Figure 3. Long tongued bumblebee, *B. haemorrhoidalis* collected from Doi An Khang, Chiang Mai. 13, March, 2008.

DISCUSSION

The results show that three species of bumblebees; *B. haemorrhoidalis*, *B. trifasciatus*, and *B. breviceps* were found in the mountainous areas of the upper northern Thailand. Three species; *B. haemorrhoidalis*, *B. trifasciatus*, and *B. breviceps* were found between 900-2100 m in Doi Ankang, Doi Suthep, Doi Inthanon (Chiang Mai Province) and Doi Tung (Chiang Rai Province). However, these species were not observed below 850 m. *B. haemorrhoidalis*, and *B. trifasciatus* were observed flying after 10:00 PM. Before 10:00 PM, none of them were observed. All three species were observed foraging on cultivated varieties of spring flowers. *B. haemorrhoidalis* queens emerged in the mid of March. The workers were observed in April and May. *B. breviceps* was observed in June in Doi Tung, Chiang Rai. This species was also foraged on cultivated plants. Previous report indicated that there are six species of bumblebees that exist in Thailand. However, only three species, *B. haemorrhoidalis*, *B. trifasciatus*, and *B. breviceps* were found in the northern parts of Thailand. It may be due to the limited geographic distribution in Thailand (Williams, 1998). Probably, the other species of bumblebees that exist in the middle and southern parts of Thailand, or are already declined or extinct from Thailand is still unclear issue.

CONCLUSION

Three species of long-tongued bumblebees; *B. haemorrhoidalis*, *B. trifasciatus*, and *B. breviceps* exist in 900-2100 m of the northern parts of Thailand. Bumblebees are increasingly cultured for agricultural use as pollinators because they can pollinate plant species that other pollinators cannot by using a technique known as buzz pollination. Urgent study and conservation in order to protect the native plant species.

RECOMMENDATIONS FOR CONSERVATION

- (i) Bumblebees habitat should be protected. Habitat should include plentiful food (pollen and nectar resources), abandoned rodent burrows in which to nest, and probably proximity to water sources (lakes, rivers, and streams) for prolongation of flowering plants as food sources for bumblebees.

- (ii) Development of checklist of Thai bumblebees.
- (iii) Development of quick guide for Thai bumblebee fauna (genus *Bombus*).

REFERENCES

- Berezin, M. V. and Beiko, V. B. (1996). Bumblebee keeping in Russia-new problems and prospects. P. 121 In Programme Abstracts, 4th International Colloquium Social Insects. August 18-24, 1996. Russian Basic Research Foundation. Saint Petersburg, Russia.
- Free, J. B. and Butler, C. G. (1959). Bumblebees. Collins Publishing, London.
- Heinrich, B. (1979). Bumblebee economics. Cambridge, MA: Harvard University Press. 245 p.
- Krombein, K. V.; Hurd, P. D.; Smith, D. R. and Burks, B. D. (1979). Catalog of Hymenoptera in America north of Mexico. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. 2735 p.
- Michener, C. D. (1990). Classification of the Apidae (Hymenoptera). Univ. Kans. Sci. Bull. 54:75-164.
- Ono, M. (1997). Ecological implications of introduced *Bombus terrestris*, and significance of domestication of Japanese native bumblebees (*Bombus* spp.). pp. 244-252 In Proceedings, International Workshop Biological Invasions of Ecosystem by Pests and Beneficial Organisms. February 25-27, 1997. National Institute of Agro-Environmental Sciences, Ministry of Agriculture, Forestry, Fisheries. Tsukuba, Japan.
- Proctor, M.; Yeo, P. and Lack, A. (1996). Bumble bees, 387-388, In The natural history of pollination. Timber Press Inc. Portland.
- Thorp, R. W. (2003). Bumble bees (Hymenoptera: Apidae): commercial use and environmental concerns. Pp. 21-40 In K. Strickler and J.H. Cane (Eds.) For Non-native Crops, Whence Pollinators of the Future? Proceedings of Thomas Say Publications in Entomology. Entomol. Society of America. Lanham, MD.
- Velthuis, H. H. W. and Doorn, A. (2006). A century of advances in bumble bee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination Apidologie. (In press).
- Williams, P. H. (1998). An annotated checklist of bumble bees with an analysis of

patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). Bulletin of the Natural History Museum of London (Entomology). 67(1): 79-152.

ภาพกิจกรรมในการจัดการประชุม



ผู้เข้าร่วมประชุมและเสนอผลงาน



ประธานมอบของที่ระลึกให้ผู้เข้าร่วมเสวนาผลงาน



อบรมการผลิตนางพญาให้กลุ่มชาวบ้านผู้สนใจ



ติดถ้วยพะนางพญาบนคอน



ตรวจหาตัวอ่อน



ย้ายตัวหนอนใส่ในถ้วยเพาะนางพญา



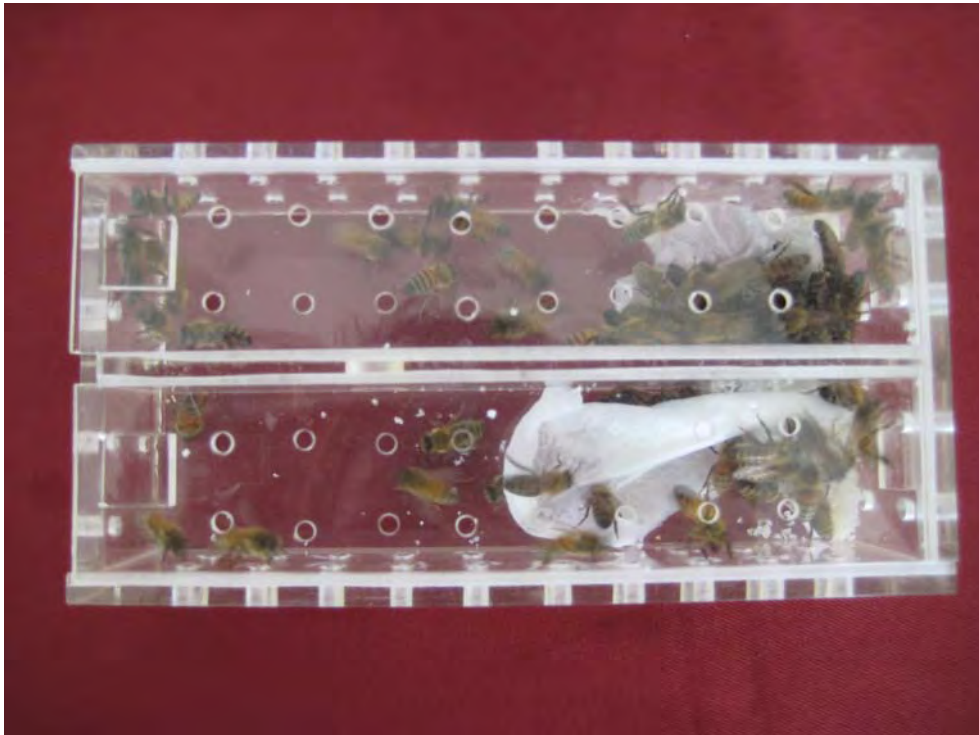
หลอดรวงนางพญาที่ได้



ผู้เข้าร่วมอบรมการผลิตผึ้งนางพญา



การประชุมนานาชาติ 9th International Conference on Apitherapy Health Care



ผึ้งพันธุ์สำหรับ venom apitherapy



ใช้ผึ้งพันธุ์ในการรักษาโรค