



การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และอัตราการเกิดเลือดชิดของกลุ่มชันโรงบ้าน (*Tetragonula fuscobalteata*) ในประเทศไทย

Genetic Diversity and Inbreeding Depression of Domestic Group of Stingless Bees (*Tetragonula fuscobalteata*) in Thailand

นิภา ชื่นป้อม^{1,2}, Hugo Volkaert^{1,2,3}, สมนึก บุญเกิด⁴

Nipha Chuenpom^{1,2}, Hugo Volkaert^{1,2,3}, Somnuk Boongird⁴

บทคัดย่อ

ชันโรง จัดอยู่ในวงศ์ผึ้งแต่ไม่มีเหล็กใน สามารถช่วยผสมเกสรดอกไม้ในธรรมชาติได้เป็นอย่างดี จัดเป็นแมลงที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศวิทยา ปัจจุบันสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีผลกระทบต่อประชากร และการดำรงชีวิตของชันโรงในประเทศไทยอย่างยิ่ง เห็นได้ชัดจากการจำกัดพื้นที่ในการสร้างรัง ตลอดจนแหล่งอาหารของชันโรงลดน้อยลง ซึ่งอาจทำให้ชันโรงสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ดังนั้นในการวิจัยเบื้องต้นครั้งนี้ต้องการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงในประเทศไทย และอัตราการเกิดเลือดชิดของชันโรง โดยนำตัวอย่างชันโรงจากเขตภาคใต้ และภาคตะวันออก ทั้งหมด 9 รัง มาแยกความแตกต่างในระดับโมเลกุล หรือ DNA ด้วยเทคนิค SSR (Simple Sequence Repeat) จำนวน 3 ตำแหน่ง ซึ่งพบว่าชันโรงที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกันจะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมาก มีอัตราการเกิดเลือดชิดสูง เช่น ชันโรงจากจังหวัดชุมพร รังที่ 3 (CP3) กับชุมพร รังที่ 4 (CP4) พบว่ามีอัตราเลือดชิดสูงถึง 91.79% ส่วนชันโรงที่อยู่จังหวัดใกล้เคียงกัน เช่น จังหวัดชุมพร (CP1 และ CP2) กับจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มีอัตราเลือดชิด 45.59%

คำสำคัญ: ชันโรง ความหลากหลายทางพันธุกรรม อัตราการเกิดเลือดชิด SSR

Abstract

Stingless bees (*Tetragonula* spp.) are in the same family as honey bees but without a sting. They can be a perfect pollinator in the nature as same as bees. Stingless bee is one of the important insect for the forest ecosystem. The rapid changes of environment are the major impact on population and the way of living of stingless bee in Thailand. Limitation of place for livelihood and decrease in food sources caused the extinction of stingless bee. Therefore, this research aim to study on the genetic diversity and inbreeding coefficient of domestic group of stingless bees in Thailand. Total 9 beehives of stingless bees were collected from southern and western of Thailand. Three SSR (Simple Sequence Repeat) primers were used to

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

² Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus

³ สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ

⁴ Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE)

⁵ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย

⁶ National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park

⁷ สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

⁸ Department of Agriculture Technology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University



identify DNA polymorphism. The results showed that the samples collected from nearby areas of the same province had closely relationship at 91.97%. Whereas stingless bee from neighboring province Chumphon and Prachuap Khiri Khan had inbreeding coefficient 45.59%.

Keywords: Stingless bee, Genetic diversity, Inbreeding coefficient, SSR

บทนำ

ชันโรง (*Tetragonula* spp.) มีถิ่นกำเนิดและแพร่กระจายอยู่ในทวีปอเมริกาใต้รวมถึงอเมริกากลาง (center of origin) (Moure, 1961) ในประเทศไทยพบว่ามี 3 สกุล (Schwarz, 1939) คือ *Trigona*, *Lisotrigona* และ *Pariotrigona* แต่ปัจจุบันมีจำนวนทั้งสิ้น 13 สกุล (Rasmussen & Cameron, 2007) นอกจากนี้ชันโรงในประเทศไทย สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ชันโรงป่า (wild types) กึ่งป่ากึ่งบ้าน (intermediate types) และชันโรงบ้าน (domestic types) (Boongird, 2009)

ชันโรงเป็นแมลงสังคมชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศวิทยา ช่วยสร้างป่าให้มีความหลากหลายอุดมสมบูรณ์ ชันโรงสามารถอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีความหนาแน่นของดอกไม้้น้อยได้ มีพฤติกรรมการเก็บเกสรมากกว่าพฤติกรรมเก็บน้ำต้อย และมีพฤติกรรมที่ไม่เลือกชอบต่อดอกไม้บางชนิด จึงทำให้เกิดการผสมเกสรได้หลากหลายในธรรมชาติ (Boongird, 2009)

ปัจจุบันสภาพแวดล้อม และระบบนิเวศของป่าที่ถูกทำลายอย่างรวดเร็ว มีผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของชันโรงเป็นอย่างมาก เนื่องจากอิทธิพลของความร้อน และทำให้มีปัญหาเรื่องการหาโพรงอาศัย และที่สำคัญคืออาจทำให้แหล่งพันธุกรรมของชันโรงนั้นลดลง เมื่อมีการทำลายป่าไม้ รังที่อยู่เป็นเอกเทศจะไม่มีชันโรงต่างสายพันธุ์รวมอาศัยอยู่ด้วย ซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหาต่อระบบนิเวศวิทยาในอนาคต (Roubik, 1989) จากการสำรวจชันโรงในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554-2556 โดยสมนึก บุญเกิด, 2553 พบว่าชันโรงในประเทศไทยมีจำนวนลดลง อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงต้องการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง และอัตราการเกิดสายเลือดชิดของชันโรง เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการอนุรักษ์ และอาจมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ชันโรงให้ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ในอนาคต

การศึกษาอัตราการเกิดเลือดชิดของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความแตกต่างของ DNA ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความนิยมในปัจจุบัน เช่น เทคนิค Simple Sequence Repeats (SSR) เคยนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง (Green, Franck & Oldroyd, 2001; Cameron, Franck & Oldroyd, 2004; Ronfort et al., 2006) และ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Tavares et al., 2007) นอกจากนี้จากรายงานในประเทศไทยมีการนำเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) มาใช้ในการจำแนก *Trigona collina* ของชันโรงด้วย (Theeraapisakun & Klinbunga, 2010) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้เทคนิค SSR มาใช้ในการศึกษาอัตราการเกิดเลือดชิด เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลที่เป็น Homozygous และ Heterozygous ได้ (co-dominant marker)

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และอัตราการเกิดเลือดชิดของชันโรงบ้านในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างชันโรงในการศึกษา

เก็บตัวอย่างชันโรงงาน (Workers) *Tetragonula fuscobalteata* จำนวนทั้งหมด 9 รัง รังละ 7-8 ตัว รวมทั้งสิ้น 70 ตัวอย่าง โดยมีชันโรงจากเขตภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดพัทลุง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวนจังหวัดละ 1 รัง จังหวัดชุมพร จำนวน 5 รัง (CP1-CP5) ซึ่งแต่ละรังจะอยู่ห่างกันอย่างน้อยประมาณ 100 เมตร และชันโรงในเขตภาคตะวันออก คือจังหวัดจันทบุรี จำนวน 1 รัง นอกจากนี้ยังมีชันโรงลูกผสม F1 อีก 1 รัง ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างชันโรงจากจังหวัดพัทลุง กับจันทบุรี

2. การวิเคราะห์ DNA ของชั้นโรง

สกัด Genomic DNA ของชั้นโรง โดยใช้ความเข้มข้นเกลือที่สูงมาก ตามวิธีของ Paxton, Thoren, Tengo, Estoup & Pamilo (1996) นำชั้นโรงมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด Retsch รุ่น MM301 (Retsch GmbH & Co., Germany) เมื่อบดละเอียดแล้วเติม Digestion buffer 350 μ l (0.15M NaCl, 0.02M Tris, 1.0 mM EDTA pH 8.0, SDS 1% (w/v)) และ Proteinase K (20 mg/mL) ผสมให้เข้ากัน นำไป Incubate ที่ 55°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม 6M NaCl 300 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงใน Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที ดูดสารละลายใส่หลอด 1.5 ml ใหม่ เติม 100% Ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ เพื่อตกตะกอน DNA พลิกหลอดไปมา แล้วแช่ที่ -20°C ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm 10 นาที เติสสารละลายทั้งหมดทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน DNA ที่ก้นหลอด ล้างตะกอน DNA 2 ครั้งด้วย Ethanol 70% ปริมาตร 200 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที เติ Ethanol 70% ทิ้ง รอให้ DNA แห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50 μ l นำสารละลาย DNA ที่ได้เก็บไว้ที่ -20°C

แยกความแตกต่างของ DNA บริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำ โดยใช้เทคนิค SSR จำนวน 3 โพรเมอร์ ซึ่งได้จากการศึกษาของ Green, Franck & Oldroyd, (2001) (ตารางที่ 1) โดยปฏิกิริยา PCR แต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ต้นแบบเข้มข้น 20 ng, โพรเมอร์แต่ละชนิดปริมาตร 1 μ M, ความเข้มข้นของ DNA polymerase 0.5 unit, dNTPs เข้มข้น 0.2 mM, $MgCl_2$ เข้มข้น 2 mM และ buffer เข้มข้น 1X โดยที่ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 7 μ l ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Whatman Biometra, Germany) โดยกำหนดอุณหภูมิและรอบของการทำปฏิกิริยา ดังนี้ Predenature ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที DNA Denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที Annealing ที่ 65°C เป็นเวลา 40 วินาที Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ Final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกความแตกต่างของ PCR product ด้วย 4.5% (w/v) Polyacrylamide gel electrophoresis และให้คะแนนแถบ DNA ที่ปรากฏ โดยใช้หลักการแบบ co-dominant marker และนำไปวิเคราะห์ค่าความถี่ย่อยโดยใช้โปรแกรม CERVUS 3.0 (Kalinowski, Taper & Marshall, 2007)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวน SSR 3 ตำแหน่ง ที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของชั้นโรง (Green et al., 2001)

ตำแหน่ง SSR	ลำดับเบสซ้ำ	ขนาด (bp)	ลำดับเบสของ Primer (5'-3')
Tc3.155	(TC) ₁₂	153-165	F: AGAATCACGTCGGCATCCGGA R: CTTGAAATCCAGCGCAGAGTG
Tc4.287	(GAA) ₉	179-188	F: TCCACCGCGATACGATGGTAC R: GTAATACAACGCGGCTTCTC
Tc7.13	(CAA) ₁₂	139-154	F: GTAACGTGCCACCAGCTTTCG R: GAGCGATCAAAGTGACCAGTC

3. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของชั้นโรงทั้งหมดจำนวน 70 ตัวอย่าง จาก 9 ไร่ โดยใช้โปรแกรม DARwin6 (Perrier, Flori & Bonnot, 2003) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตจากความแตกต่างของ DNA ตามระดับความเหมือน หรือแตกต่างกันของอัลลีลที่ปรากฏ และสามารถวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากโมเลกุลเครื่องหมายแบบ Co-dominant ได้ โดยกำหนดการสร้างความสัมพันธ์ Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbour Joining และกำหนดค่า bootstrap จำนวน 100 ซ้ำ

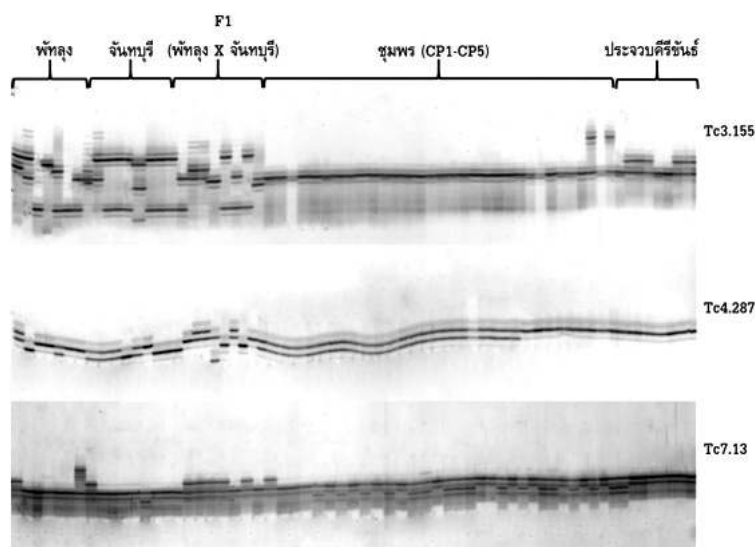


4. วิเคราะห์อัตราการเกิดเลือดชิด

วิเคราะห์อัตราการเกิดเลือดชิด (Inbreeding coefficient) ด้วยโปรแกรม SPAGeDi1.4 (Olivier, Hardy & Vekemans, 2002) โดยนำค่าความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละตัวอย่าง (Relationship coefficient) ที่คำนวณได้จากความเหมือนหรือแตกต่างกันของอัลลีลที่พบ จากทั้งหมด 70 ตัวอย่าง

ผลการวิจัย

การทดสอบความแตกต่างของชั้นโรงทั้ง 9 รัง จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Tc3.155 Tc4.287 และ Tc7.13 (ภาพที่ 1) และเมื่อวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของอัลลีล ด้วยโปรแกรม CERVUS พบว่า SSR ทั้ง 3 ตำแหน่ง มีจำนวนอัลลีลอยู่ในช่วง 4-9 อัลลีล โดยที่ตำแหน่ง Tc3.155 สามารถแยกความแตกต่างได้ดีที่สุด มีจำนวนอัลลีลมากที่สุด 9 อัลลีล และพบค่าสังเกตของ heterozygosity (HObs) ค่าคาดหวังของ heterozygosity (HExp) และค่า Polymorphism Information Content (PIC) อยู่ในช่วงระหว่าง 0.375-0.486, 0.323-0.598 และ 0.296-0.563 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 1 การแยกความแตกต่าง DNA ของชั้นโรง 70 ตัวอย่างจาก 9 รัง ด้วยเทคนิค SSR จำนวน 3 ตำแหน่ง

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความถี่อัลลีลของชั้นโรง จำนวน 70 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบด้วย SSR 3 ตำแหน่ง

ตำแหน่งของ SSR	k	N	HObs	HExp	PIC
Tc3.155	9	70	0.479	0.598	0.563
Tc4.287	4	70	0.486	0.474	0.388
Tc7.13	4	70	0.375	0.323	0.296

k: จำนวนอัลลีลของ SSR แต่ละตำแหน่ง

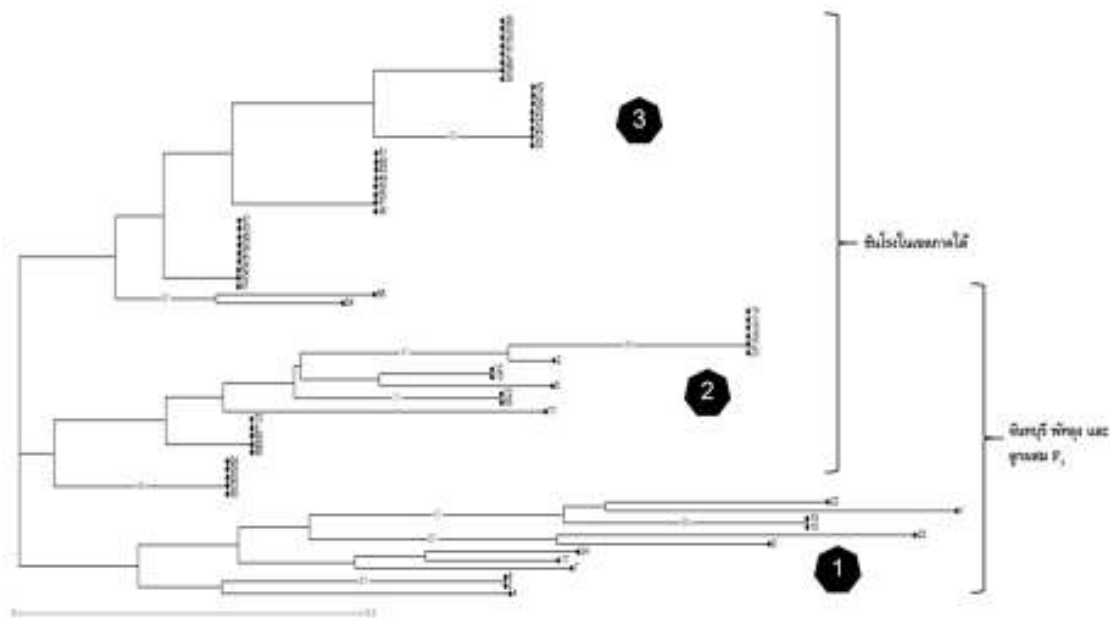
N: จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ

HObs: ค่าสังเกตของ heterozygosity

HExp: ค่าคาดหวังของ heterozygosity

PIC: Polymorphic information content

จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของชันโรงทั้ง 9 รัง รวม 70 ตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ DARwin6 พบว่าภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชันโรงสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มของชันโรงจากจังหวัดจันทบุรี และชันโรงลูกผสม F_1 (พัทลุง x จันทบุรี) กลุ่มที่สองเป็นชันโรงจากจังหวัดพัทลุง ชันโรงลูกผสม F_1 และชันโรงในเขตภาคใต้บางตัวอย่าง ซึ่งชันโรงลูกผสม F_1 จะพบปะปนอยู่ในกลุ่มที่หนึ่ง และสอง ส่วนกลุ่มที่สามเป็นชันโรงในเขตภาคใต้ทั้งหมดจากจังหวัดชุมพร (CP1-CP5) และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แผนภาพ Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของชันโรงจำนวน 70 ตัวอย่าง 9 รัง จาก 4 จังหวัดของประเทศไทย

ผลการวิเคราะห์อัตราการเกิดเลือดชิด ด้วยโปรแกรม SPAGeDi1.4 (Olivier, Hardy & Vekemans, 2002) พบว่า ชันโรงที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกัน หรือในจังหวัดเดียวกันจะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมาก มีอัตราการเกิดเลือดชิดสูง เช่น ชันโรงจากจังหวัดชุมพร รังที่ 3 (CP3) กับจังหวัดชุมพร รังที่ 4 (CP4) ซึ่งรังมีระยะทางห่างกันประมาณ 100 เมตร พบว่ามีอัตราเลือดชิดสูงถึง 91.79% และเมื่อเปรียบเทียบอัตราเลือดชิดระหว่างชันโรงจากจังหวัดชุมพร รังที่ 3 รังที่ 4 กับรังที่ 5 (CP5) จะเห็นว่าอัตราการเกิดเลือดชิดต่ำ 24.21% เนื่องจากรังที่ 3 และรังที่ 4 มีระยะทางห่างจากรังที่ 5 มากกว่า 200 เมตร จึงทำให้มีความสัมพันธ์กันน้อย ส่วนชันโรงที่อยู่ต่างจังหวัดกัน เช่นจังหวัดชุมพร (CP1 และ CP2) กับจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มีอัตราเลือดชิด 45.59% เมื่อพิจารณาชันโรงลูกผสม F_1 พบว่ามีความสัมพันธ์กับรังแม่จังหวัดพัทลุง และรังพ่อจังหวัดจันทบุรี มีค่าอัตราเลือดชิดที่ 33.72% กับ 40.91% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่าชันโรงจากจังหวัดจันทบุรีไม่มีความสัมพันธ์กับชันโรงในเขตภาคใต้ ไม่มีอัตราการเกิดเลือดชิดต่อกัน ส่วนผลการทดลองของตัวอย่างชันโรงที่ไม่พบอัตราเลือดชิดต่อกัน ไม่ได้นำมาแสดงในตารางครั้งนี้ เนื่องจากมีผลอัตราการเกิดเลือดชิดเป็น 0% ทั้งหมด



ตารางที่ 3 สรุปผลการวิเคราะห์ชั้นโรงที่พบอัตราการเกิดเลือดชิด จาก 4 จังหวัด ในเขตภาคใต้ ภาคตะวันออก และลุ่มผสม F₁ (พัทลุง X จันทบุรี)

สถานที่ 1	สถานที่ 2	อัตราการเกิดเลือดชิด (%)
จันทบุรี	ลุ่มผสม F1	40.91%
พัทลุง	ลุ่มผสม F1	33.72%
	ชุมพร (CP1)	3.16%
	ชุมพร (CP2)	3.16%
	ประจวบคีรีขันธ์	45.59%
ลุ่มผสม F1	ชุมพร (CP3)	7.24%
	ชุมพร (CP4)	2.09%
	ชุมพร (CP5)	22.69%
ชุมพร (CP1)	ชุมพร (CP2)	31.72%
	ประจวบคีรีขันธ์	45.59%
ชุมพร (CP2)	ประจวบคีรีขันธ์	45.59%
ชุมพร (CP3)	ชุมพร (CP4)	91.79%
	ชุมพร (CP5)	24.21%
ชุมพร (CP4)	ชุมพร (CP5)	24.21%

อภิปรายผล

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชั้นโรงที่ผ่านมาในประเทศไทย พบว่ามีเพียงการศึกษาในชั้นโรง *Trigona collina* จำนวน 134 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค AFLP จำนวน 64 ไพรมอร์ (Theeraapisakkun & Klinbunga, 2010) ซึ่งแตกต่างจากการวิจัยครั้งนี้ที่ต้องการศึกษาชั้นโรง *Tetragonula fuscobalteata* โดยเลือกใช้เทคนิค SSR เนื่องจากเป็นเครื่องหมายแบบ Co-dominant สามารถแยกความแตกต่างของ DNA ได้ดี และสามารถแยกอัลลีลแบบ Homozygous และ Heterozygous ได้ จากการศึกษาของ Green et al. (2001) ได้นำ SSR จำนวน 10 ตำแหน่ง ทดสอบกับชั้นโรง *Trigona carbonaria* จำนวน 20 ตัวอย่างที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ามีค่า PIC ระหว่าง 0.168-0.800 เมื่อเราได้นำ SSR ชนิดเดียวกันจำนวน 3 ตำแหน่ง มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีค่า PIC ระหว่าง 0.296-0.563 ซึ่งจะเห็นได้ว่า SSR เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้

การวิจัยครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการศึกษาอัตราการเกิดเลือดชิดของชั้นโรงในประเทศไทย ซึ่งจำนวนตัวอย่างชั้นโรงที่นำมาใช้ในการวิจัย ถึงแม้จะมีเพียง 70 ตัวอย่าง (9 รัง) จาก 4 จังหวัด และส่วนใหญ่มาจากเขตภาคใต้ของประเทศไทย อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์สามารถอธิบายความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชั้นโรงได้เป็นอย่างดี และยังแสดงให้เห็นได้ชัดว่าชั้นโรงมีโอกาสลดลง และสูญพันธุ์ได้ในอนาคต เมื่อพิจารณาจากอัตราการเกิดเลือดชิดของชั้นโรงที่มีรังอาศัยอยู่ใกล้ชิดกัน ยกเว้นตัวอย่างชั้นโรงจากจังหวัดพัทลุง กับจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งมีระยะทางอยู่ห่างกัน แต่กลับพบว่ามีค่าอัตราเลือดชิดค่อนข้างสูง (45.59%) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนเครื่องหมาย SSR 3 ตำแหน่งนั้นยังไม่มากพอ ดังนั้นการศึกษาในอนาคตควรมีการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายให้มากขึ้น เพื่อความถูกต้อง และแม่นยำ

สรุป

ชันโรงในประเทศไทยมีอัตราการเกิดเลือดชิดอยู่ระหว่าง 30-90% โดยชันโรงที่อยู่ใกล้เคียงกันจะมีความสัมพันธ์กันมาก มีอัตราการเกิดเลือดชิดสูง เช่น ชุมพรรังที่ 3 (CP3) และรังที่ 4 (CP4) มีอัตราการเกิดเลือดชิดสูง 91.79% ซึ่งส่งผลให้ประชากรชันโรงมีโอกาสลดลง และสูญพันธุ์ได้ในอนาคต การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรงจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการอนุรักษ์ชันโรงในประเทศไทย นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลเบื้องต้นจากการทดลองไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ชันโรงให้มีความแข็งแรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ย่ำแย่ในปัจจุบัน และเพิ่มประสิทธิภาพในการผสมเกสรให้มากขึ้นได้ โดยการพัฒนาศายพันธุ์จากชันโรงคู่ที่มีอัตราการเกิดเลือดชิดต่ำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ เพื่อสร้างลูกผสมที่มีความแข็งแรงต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยต่อไปในอนาคตจะมีการเพิ่มจำนวนรังของชันโรงตัวอย่างให้มากขึ้นจากทั่วทุกภาคของประเทศไทย เช่น ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคกลาง นอกจากนั้นจะเพิ่มจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายให้มากขึ้น และมีความหลากหลาย เพื่อความถูกต้องแม่นยำ และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่กว้างขึ้นในการศึกษาชันโรงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนสำหรับสถานที่ปฏิบัติงานการวิจัยทางด้าน DNA

รายการอ้างอิง (Reference)

- Boongird, S. (2009). *Bees and Stingless bees Keeping*. Bangkok: Ramkhamhaeng University Press, Hua Mak. (in Thai)
- Cameron, E.C., Franck, P. & Oldroyd, B.P. (2004). Genetic Structure of Nest Aggregations and Drone Congregations of the Southeast Asian Stingless Bee *Trigona collina*. *Molecular Ecology*, 13, 2357-2364.
- Green, L.C., Franck, P. & Oldroyd, B.P. (2001). Characterization of Microsatellite Loci for *Trigona carbonaria*, a Stingless Bee Endemic to Australia. *Molecular Ecology Notes*. DOI: 10.1046/j.1471-8278.2001.00041.x.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099-1106.
- Moure, J.S. (1961). A Preliminary Supra Specific Classification of the Old World Meliponine Bees (Hymenoptera Apidae). *Studia Entomologica*, 4, 181-242.
- Olivier, J., Hardy, J. & Vekemans, X. (2002). Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618-620.



- Paxton, J.R., Thoren, P.A., Tengo, J., Estoup, A. & Pamilo, P. (1996). Mating Structure and Nestmate Relatedness in a Communal Bee, *Andrena Jacobi* (Hymenoptera, Andrenidae), Using Microsatellites. *Molecular Ecology*, 5, 511-519.
- Perrier, X., Flori, A. & Bonnot, F. (2003). Leadership and social exchange process. In Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X. & Glaszmann, J.C. (Eds.). *Data analysis Methods*. pp. 43-76 Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants. Montpellier: Enfield, Science Publishers.
- Rasmussen, C. & Cameron, A.S. (2007). A Molecular Phylogeny of the Old World Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the Non-Monophyly of the Large Genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32, 26-39.
- Roubik, D.W. (1989). *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. New York, USA: Cambridge University Press.
- Ronfort, J., Bataillon, T., Santoni, S., Delalande, M., David, J.L. & Prosperi, J.M. (2006). Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*. DOI: 10.1186/1471-2229-6-28.
- Schwarz, H.F. (1939). *The Indo-Malayan Species of Trigona*. Bulletin of The American Museum of Natural History Vol. LXXVI, Art. III, New York, U.S.A.
- Tavares, M.G., Dias, L.A., Borges, A.A., Lopes, D.M., Busse, A.H.P. & Costa, R.G., et al. (2007). Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): Is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais?. *Genetics and Molecular Biology*, 30(3), 667-675.
- Theeraapisakkun, M. & Klinbunga, S. (2010). Development of a species-diagnostic marker and its application for population genetics studies of the stingless bee *Trigona collina* in Thailand. *Genetics and Molecular Research*, 9(2), 919-930.