บทที่ 1

บทนำ

ผึ้งเป็นแมลงในสกุลเอปิส (Genus *Apis*) ซึ่งอยู่รวมกันเป็นแมลงสังคมชั้นสูงที่สุดในบรรดาวงศ์เอปิดี (Family Apidae) ด้วยกัน (Sydney, 1991) ในรังหนึ่งๆประกอบด้วยผึ้ง 3 วรรณะคือ ผึ้งนางพญา (queen) ผึ้งงาน (worker) และผึ้งตัวผู้ (drone) ผึ้งนางพญาและผึ้งงานเป็นผึ้งเพศเมียมีโครโมโซม 2 ชุด (2n) ส่วนผึ้งตัวผู้เจริญมาจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจึงมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด (1n) ผึ้งนางพญาเป็นผึ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผึ้งวรรณะอื่น มีอวัยวะเพศที่สมบูรณ์และมีเพียงหนึ่งตัวภายในรังหนึ่งๆ ทำหน้าที่วางไข่และควบคุมกลไกภายในรังโดยการปล่อยสารเคมี ผึ้งงานเป็นผึ้งเพศเมียที่มีรังไข่ที่ไม่เจริญทำหน้าที่หาอาหารมาเลี้ยงดูตัวอ่อน สร้างรวงรัง ทำความสะอาดรัง ควบคุมอุณหภูมิภายในรังและป้องกันรัง ผึ้งตัวผู้ทำหน้าที่ผสมพันธุ์กับผึ้งนางพญา จะพบได้ในช่วงฤดูผสมพันธุ์เท่านั้น (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532) จากความหลากหลายทางชีววิทยาของผึ้งสามารถแบ่งผึ้งตามที่อยู่อาศัยและสภาพภูมิศาสตร์เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) ผึ้งขนาดเล็ก ได้แก่ ผึ้งมิ้มเล็ก (*Apis andreniformis*) และผึ้งมิ้ม (*Apis florea*) 2) ผึ้งขนาดใหญ่ ได้แก่ ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) 3) ผึ้งที่ทำรังอยู่ในโพรง ได้แก่ ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ผึ้งจากเกาะบอร์เนียวและสุมาตรา (*Apis koschevnikovi*) และผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ผึ้งพันธุ์เป็นผึ้งพื้นเมืองของทวีปยุโรปและทวีปอาฟริกา ส่วนผึ้งชนิดอื่นๆเป็นผึ้งพื้นเมืองของทวีปเอเชีย (Byron, 1991)

ในประเทศไทยพบว่ามีผึ้ง 5 ชนิด คือ 1) ผึ้งมิ้มเล็ก เป็นผึ้งซึ่งทำรังขนาดเล็กที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผึ้งชนิดอื่นโดยทำรังอยู่ในที่โล่ง รังประกอบด้วยรวงเพียงรวงเดียวลักษณะทรงกลมหรือรี พบผึ้งชนิดนี้ในบางจังหวัด เช่น เชียงราย เชียงใหม่ พิษณุโลก อุทัยธานี เพชรบูรณ์ และจันทบุรี เป็นต้น 2) ผึ้งมิ้ม เป็นผึ้งซึ่งทำรังในที่โล่งโดยมีขนาดของรังประมาณ 20 เซนติเมตร ลักษณะรังคล้ายกับผึ้งมิ้มเล็ก สามารถพบผึ้งมิ้มได้ทุกภาคของประเทศไทย 3) ผึ้งหลวง มีขนาดตัวและรังใหญ่ที่สุด ขนาดรังประมาณ 0.5-1 เมตร รังประกอบด้วยรวงเพียงรวงเดียวซึ่งสร้างไว้ในที่โล่ง 4) ผึ้งโพรง ในธรรมชาติ

จะทำรังด้วยการสร้างรวงซ้อนกันอยู่ในโพรงไม้หรือโพรงหินซึ่งมีทางเข้าออกค่อนข้างเล็ก ขนาดรังประมาณ 30 เซนติเมตร สามารถพบผึ้งโพรงได้ทุกภาคของประเทศไทย 5) ผึ้งพันธุ์ มีขนาดใหญ่กว่าผึ้งโพรงแต่เล็กกว่าผึ้งหลวง มีพฤติกรรมการทำรังเช่นเดียวกับผึ้งโพรง (Wongsiri, Rinderer and Sylvester, 1991)

ผึ้งเป็นแมลงที่มีประโยชน์ทั้งในด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม ผึ้งช่วยผสมเกสรดอกไม้ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผึ้งยังให้ผลผลิตที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจหลายชนิด ได้แก่ น้ำผึ้ง นมผึ้ง ไขผึ้ง เกสรผึ้ง ยางไม้ และพิษของผึ้ง เป็นต้น มนุษย์รู้จักใช้ประโยชน์จากผึ้งมานานแล้ว โดยเฉพาะการเก็บน้ำผึ้งซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆมากมาย เช่น ใช้ประกอบอาหาร ผสมในยาและสมุนไพร หรือทำเครื่องสำอาง เป็นต้น (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532) น้ำผึ้งประกอบด้วยสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ คาร์โบไฮเดรท โปรตีนและวิตามิน (ตารางที่ 1) เนื่องจากผึ้งโพรงและผึ้งพันธุ์มีพฤติกรรมการทำรังในที่มืดและมิดชิด จึงสามารถนำผึ้งทั้งสองชนิดมาเลี้ยงในหีบเลี้ยงผึ้งได้ คนไทยมีความสามารถนำผึ้งโพรงจากธรรมชาติมาเลี้ยงในโพรงของต้นมะพร้าวเป็นเวลากว่า 100 ปีมาแล้ว และมีการสร้างรังเลี้ยงผึ้งรูปแบบง่ายๆ (รูปที่ 1) เพื่อย้ายผึ้งจากธรรมชาติมาเลี้ยงและเก็บน้ำผึ้งมาใช้ประโยชน์ ซึ่งสามารถเก็บน้ำผึ้งจากรังหนึ่งๆได้ประมาณ 5-10 กิโลกรัมต่อปี (Wongsiri and Tangkanasing, 1986) ต่อมาได้มีการนำผึ้งพันธุ์จากทวีปยุโรปมาเลี้ยงในประเทศไทย เนื่องจากผึ้งพันธุ์มีพฤติกรรมที่ไม่ดุและไม่ทิ้งรังง่าย มีขนาดรังเหมาะสมกับการนำมาเลี้ยงในหีบมาตรฐาน โดยบังคับให้ผึ้งสร้างรวงในกรอบไม้วางเรียงกันเป็นคอนๆ จึงสะดวกในการดูแลและเก็บน้ำผึ้ง อีกทั้งสามารถเพิ่มขยายจำนวนรังผึ้งได้ (พงศ์เทพ อัครธนกุล, 2528) การเลี้ยงผึ้งพันธุ์มีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว จากการสำรวจจำนวนรังผึ้งทั่วประเทศในปี 2529 พบว่าเป็นรังของผึ้งพันธุ์จำนวน 38,320 รัง และเป็นรังของผึ้งโพรงเพียง 7,951 รังเท่านั้น (Wongsiri, Tangkanasing and Sylvester, 1987) ผลิตภัณฑ์ของผึ้งสามารถทำรายได้ให้กับประเทศ จากตารางที่ 2 แสดงข้อมูลการนำเข้าและส่งออกน้ำผึ้งตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523-2526 ซึ่งหลังจากปี พ.ศ. 2527 มูลค่าการส่งออกมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมาก แต่การเลี้ยงผึ้งพันธุ์ต้องประสบปัญหาด้านศัตรูผึ้งโดยเฉพาะไรศัตรูผึ้ง ไรที่ทำความเสียหายแก่ผึ้งพันธุ์ ได้แก่ ไรวาร์รัว (*Varroa jacobsoni*) และไรทรอพิลีแลปส์ (*Tropilaelaps clareae*) โดยไรจะเข้าทำลายผึ้งในระยะตัวอ่อนและดักแด้ ไรจะเกาะบริเวณข้อต่อตามปล้องท้องและหน้าอก และดูดกินของเหลวภายในตัวผึ้ง ทำให้ผึ้งอ่อนแอหรือ

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบพื้นฐานของน้ำผึ้ง

(สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, ยงยุทธ และ แสนนัด, 2528)

องค์ประกอบพื้นฐาน	จำนวนเปอร์เซนต์	จำนวนกรัม
น้ำ (ความชื้น)	17.20	78.0
ลีวูโรส	38.19	173.2
เด็กซ์โทรส	31.28	141.9
ซูโครส	1.31	5.9
มอลโทส	7.31	33.2
น้ำตาลอื่นๆ	1.50	6.8
รวมปริมาณน้ำตาล	79.59	361.0
กรด	0.57	2.6
โปรตีน	0.26	0.2
เถ้าต่างๆ	0.17	0.8
อื่นๆ	2.21	10.0
รวม	100.00	453.6

รูปที่ 1 แสดงรูปแบบรังเลี้ยงผึ้งโพรงที่พบทั่วไปในประเทศไทย

ตารางที่ 2 แสดงมูลค่าการนำเข้าและส่งออกน้ำผึ้งระหว่างปี พ.ศ. 2523 - 2536

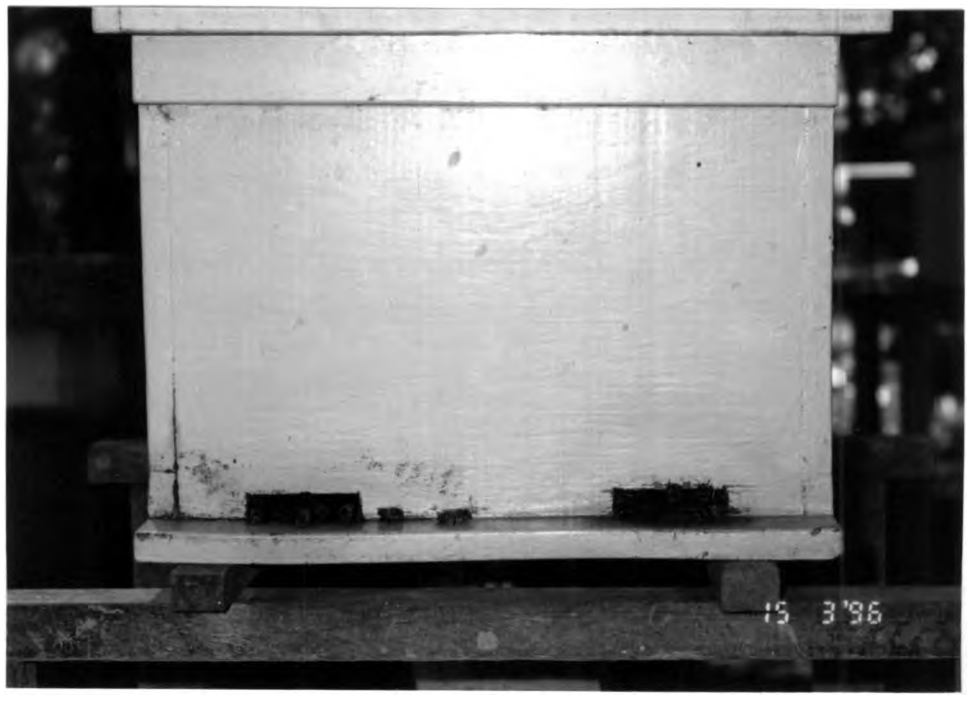
ปี พ.ศ.	การนำเข้า		การส่งออก	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2523	46.428	1.297	0.012	0.002
2524	70.772	2.162	0.010	0.004
2525	108.634	2.951	12.142	0.234
2526	171.819	4.413	69.829	1.105
2527	114.432	3.264	160.424	2.302
2529	132.217	4.031	1221.836	21.015
2530	129.929	3.842	744.763	11.111
2531	124.883	4.421	1749.546	24.533
2532	145.640	5.586	703.510	9.290
2533	166.266	6.190	2431.646	31.114
2534	231.525	8.794	1205.772	16.966
2535	171.664	7.301	2406.569	32.392
2536	182.314	8.544	2108.149	28.233

ที่มา: ข้อมูลสถิติการค้าระหว่างประเทศ กรมศุลกากร กระทรวงการคลัง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำให้ผึ้งตายก่อนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย เมื่อรังผึ้งที่ถูกไรเข้าทำลายมากๆจำทำให้ผลผลิตลดลง เพราะประชากรในรังลดลงอย่างรวดเร็ว (สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 2532) ผึ้งโพรงเป็นผู้ให้อาศัย (host) โดยธรรมชาติของไรวาร์รัว (Koeniger, 1985) จากการศึกษาพฤติกรรมของผึ้งโพรงในการกำจัดไรวาร์รัว พบว่าผึ้งงานมีพฤติกรรมการทำความสะอาดตัวเอง (self-cleaning behavior) โดยใช้ขาหน้าและขาหลังปัดไรบริเวณส่วนหัว หน้าอก และท้อง เพื่อเอาสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย (Wongsiri, Tangkanasing and Sylvester, 1987) ผึ้งโพรงยังสามารถเรียกผึ้งตัวอื่นภายในรังมากกว่า 6 ตัว มาช่วยทำความสะอาดร่างกาย โดยอาศัยพฤติกรรมการเต้น (grooming dance) และพฤติกรรมการเคลื่อนย้ายตัวอ่อนที่ถูกไรทำลายออกจากรัง (removal behavior) ผึ้งโพรงจึงสามารถกำจัดไรได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าผึ้งพันธุ์ โดยกำจัดไรออกจากตัวได้ 99.6 เปอร์เซนต์ ภายในเวลา 15 นาที ในขณะที่ผึ้งพันธุ์กำจัดไรได้เพียง 16.6 เปอร์เซนต์ (Boecking, Rath and Drescher, 1993) เนื่องจากผึ้งโพรงเป็นผึ้งพื้นเมืองของไทยซึ่งสามารถพบได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ การปรับปรุงการเลี้ยงผึ้งโพรงให้มีประสิทธิภาพจะช่วยเสริมรายได้ให้เกษตรกรทั้งทางตรงและทางอ้อม คือ ได้ผลิตภัณฑ์จากผึ้งและช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งสามารถลดต้นทุนในการนำผึ้งพันธุ์จากต่างประเทศเข้ามาเลี้ยง และลดปริมาณสารเคมีที่ใช้กำจัดศัตรูของผึ้งพันธุ์ ได้มีการปรับปรุงการเลี้ยงผึ้งโพรงโดยหน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการดัดแปลงหีบเลี้ยงผึ้งพันธุ์มาใช้กับผึ้งโพรง คือ ทำคอนผึ้งที่มีแผ่นรังเทียม (รูปที่ 2) ซึ่งสามารถดูแลและควบคุมได้ดีขึ้น รวมทั้งสามารถเพิ่มขยายจำนวนรังโดยการเพาะเลี้ยงผึ้งนางพญา (Wongsiri, You-Sheng and Sylvester, 1990) การศึกษาสายพันธุ์ผึ้งโพรงเพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เป็นวิธีสำคัญวิธีหนึ่งที่จะทำให้การเลี้ยงผึ้งมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในปัจจุบันมีวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์อยู่หลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความเหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มแตกต่างกันไป

การศึกษาสายพันธุ์ของผึ้งโพรงโดยใช้วิธีทางมอร์โฟเมตริก (morphometric) โดย Ruttner (1988) สามารถแบ่งผึ้งโพรงได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ 1) ผึ้งโพรงจีน (*Apis cerana cerana*) พบในประเทศจีน อาฟกานิสถาน ปากีสถาน ทางเหนือของอินเดีย และเวียตนาม 2) ผึ้งโพรงอินเดีย (*Apis cerana indica*) พบที่อินเดีย ศรีลังกา บังคลาเทศ พม่า ไทย มาเลย์เซีย อินโดนิเซียและฟิลิปปินส์ 3) ผึ้งโพรงญี่ปุ่น (*Apis cerana japonica*) พบที่ญี่ปุ่นและทะเลจีนเหนือ 4) ผึ้งโพรงฮิมาลายัน (*Apis cerana himalaya*) พบแถบ

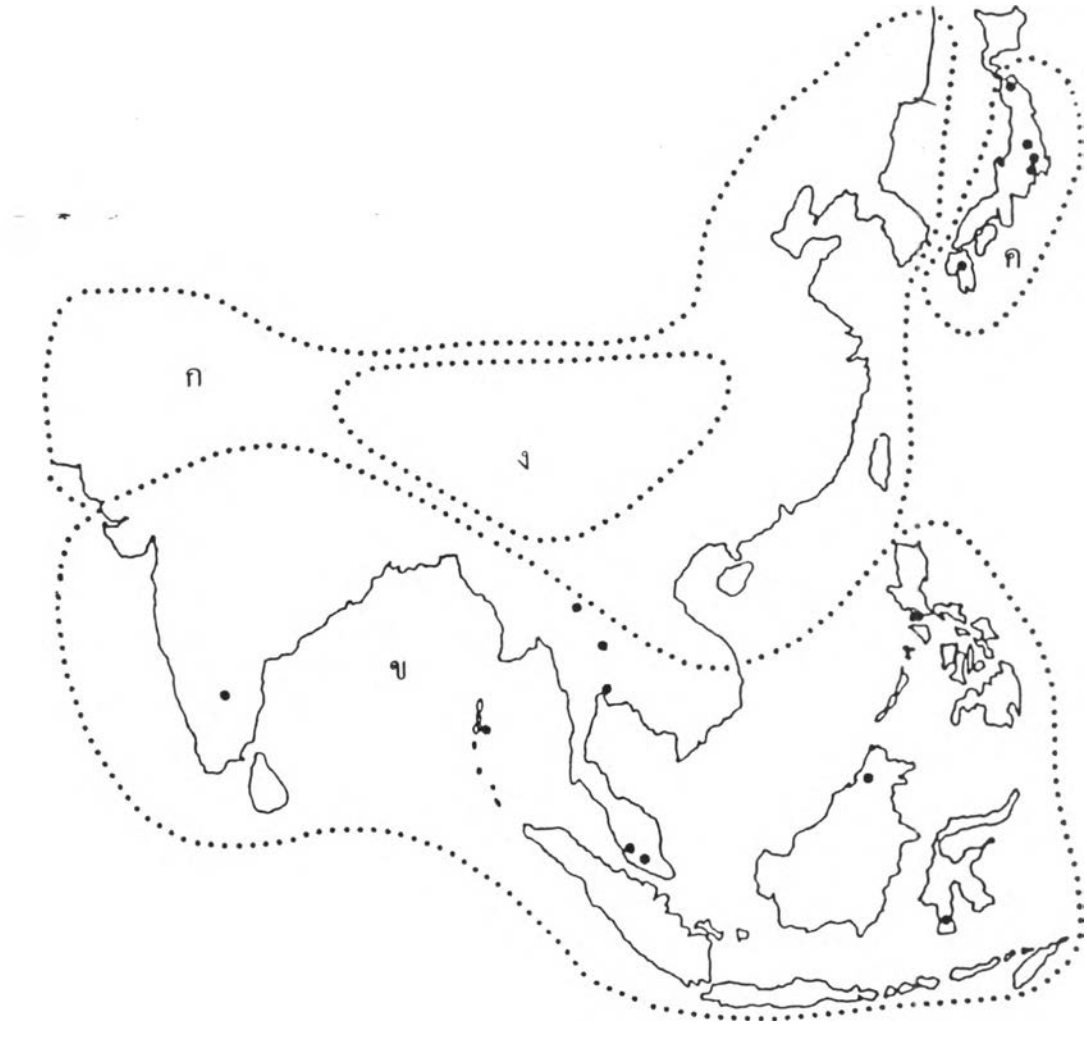


รูปที่ 2 แสดงลักษณะรังเลี้ยงผึ้งโพรงที่ดัดแปลงมาจากรังเลี้ยงผึ้งพันธุ์

เทือกเขาฮิมาลายา (รูปที่ 3) การศึกษาสายพันธุ์ของผึ้งโพรงในประเทศไทย Limbipichai (1990) ได้ศึกษาจากลักษณะทางมอร์โฟเมตริก โดยการวัดความกว้างและความยาวของปีกคู่หน้า คู่หลัง หน้าอก และขา แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ (Statistical Analysis Software : SAS) 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 Clustering Analysis โดยใช้ FASTCLUS procedure แยกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มละติจูดเหนือ (ครอบคลุมพื้นที่ภาคเหนือและภาคกลาง) กลุ่มละติจูดใต้ (ครอบคลุมพื้นที่ตั้งแต่ชุมพรลงมารวมทั้งเกาะสมุย) วิธีที่ 2 Canonical Discriminant Analysis แบบ CANDISC procedure ซึ่งสามารถแยกผึ้งโพรงเพิ่มขึ้นอีก 1 กลุ่ม คือกลุ่มเกาะสมุย การแยกสายพันธุ์วิธีดังกล่าวเป็นวิธีทางสถิติ ซึ่งต้องใช้ตัวอย่างของประชากรผึ้งจำนวนมากในการวิเคราะห์ผล ทำให้ต้องใช้เวลามากและผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญและเป็นบุคคลเดียวกันจึงจะได้ผลที่มีมาตรฐาน (Rinderer, 1986) ในสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมากการศึกษาโดยวิธีนี้จะทำได้ยาก นอกจากนี้ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ที่ปรากฏจะไม่สามารถบ่งถึงลักษณะทางจีโนไทป์ (genotype) ได้ จึงได้มีการนำวิธีอื่นมาใช้ในการแยกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

การแบ่งสายพันธุ์ของผึ้งโพรงโดยพิจารณาจากความแตกต่างของโปรตีน (protein polymorphism) โดยศึกษาจาก allozyme banding pattern ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis ซึ่งแยกโปรตีนที่มีประจุ ขนาด และรูปร่างออกจากกัน ได้มีการนำเทคนิคนี้มาศึกษาสายพันธุ์ของผึ้งโพรงเปรียบเทียบกับผึ้งชนิดอื่นๆที่พบในทวีปเอเชีย โดยศึกษาจากเอนไซม์ 12 ชนิด (Gan, et al., 1991) และใช้วิธีนี้ศึกษาผึ้งโพรงในประเทศอินเดีย จีนและเกาหลี เป็นต้น (Myeong, 1993) แต่การใช้เทคนิคนี้อาจมีข้อผิดพลาดได้เนื่องจากกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนนั้นจะได้มาจากการแปลรหัสของ codon ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว กรดอะมิโนชนิดหนึ่งอาจมี codon ได้มากกว่า 1 แบบ เมื่อนิวคลีโอไทด์บางตัวของ codon เปลี่ยนไปจะยังคงทำให้ codon ใหม่นี้แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนตัวเดิม ซึ่งมีผลทำให้กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไม่เปลี่ยนแปลงทั้งๆที่ลำดับเบสของยีนนั้นได้มีการเปลี่ยนแปลงไปแล้ว

ในปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตนิยมใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetic technique) ซึ่งเป็นการศึกษาความแปรผันของดีเอ็นเอ (DNA variation) โดยตรง เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์มีอยู่หลายวิธี เช่น เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)



รูปที่ 3 แสดงบริเวณที่พบผึ้งโพรงแต่ละชนิด (Rutter, 1988)

ก. ผึ้งโพรงจีน (*Apis cerana cerana*)

ข. ผึ้งโพรงอินเดีย (*Apis cerana indica*)

ค. ผึ้งโพรงญี่ปุ่น (*Apis cerana japonica*)

ง. ผึ้งโพรงฮิมาลายัน (*Apis cerana himalaya*)

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และเทคนิคการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) จึงมีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาสายพันธุ์ของผึ้งชนิดต่างๆรวมทั้งผึ้งโพรงโดยมีรายละเอียดดังนี้

เทคนิค RFLP เป็นการนำเอาดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งมีชีวิตมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสม ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆกันโดยขึ้นกับจำนวนและตำแหน่งของบริเวณจดจำ (recognition site) ที่มีอยู่ในดีเอ็นเอซึ่งนำมาใช้ตัดนั้น ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเหล่านี้ นำมาแยกออกจากกันโดยการทำ agarose gel electrophoresis แล้วทำการเคลื่อนย้ายแถบของดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปยังเมมเบรน โดยให้อยู่ในสภาพของดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) นำดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ซึ่งเป็น repetitive sequence มาติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ติดอยู่บนเมมเบรน จากนั้นนำเมมเบรนที่ได้ไปทำ autoradiography เพื่อให้เห็น banding pattern ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว การมี banding pattern ที่แตกต่างกันระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวนี้เองที่เรียกว่า Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) RFLP นี้เกิดขึ้นเพราะมีการสร้างบริเวณจดจำใหม่ขึ้นมาหรือมีการทำให้บริเวณจดจำที่มีอยู่หายไป ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิด deletion, insertion หรือ genome rearrangement (Bernatzky, 1988) วิธีการนี้ได้นำมาใช้ในการศึกษาสายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์จากอาฟริกาและยุโรป (Hall, 1986; Hall, 1988) สำหรับในผึ้งโพรงได้มีการทำ RFLP โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากผึ้งพันธุ์ (Sylvester and Wongsiri, 1993) และต่อมามีการเตรียมดีเอ็นเอติดตามจากผึ้งโพรงเพื่อใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ของผึ้งโพรงในประเทศไทย (วัลยา อุทัยสาง, 2537)

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้เป็นล้านๆเท่าในเวลาอันสั้น โดยใช้ primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ จำนวน 2 สายที่จับอย่างจำเพาะกับเบสคู่สมบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยที่ครอบคลุมบริเวณสายดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หลังจากนั้นจะใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase สร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยการโดยเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลายด้าน $3'$ ของ primer ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 3 ระดับคือ 1) denaturation temperature เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ ที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบถูกแยกเป็นเส้นเดี่ยว 2) annealing temperature เป็นอุณหภูมิที่ primer สามารถจับกับเบสคู่สมของสายดีเอ็นเอต้นแบบ และ

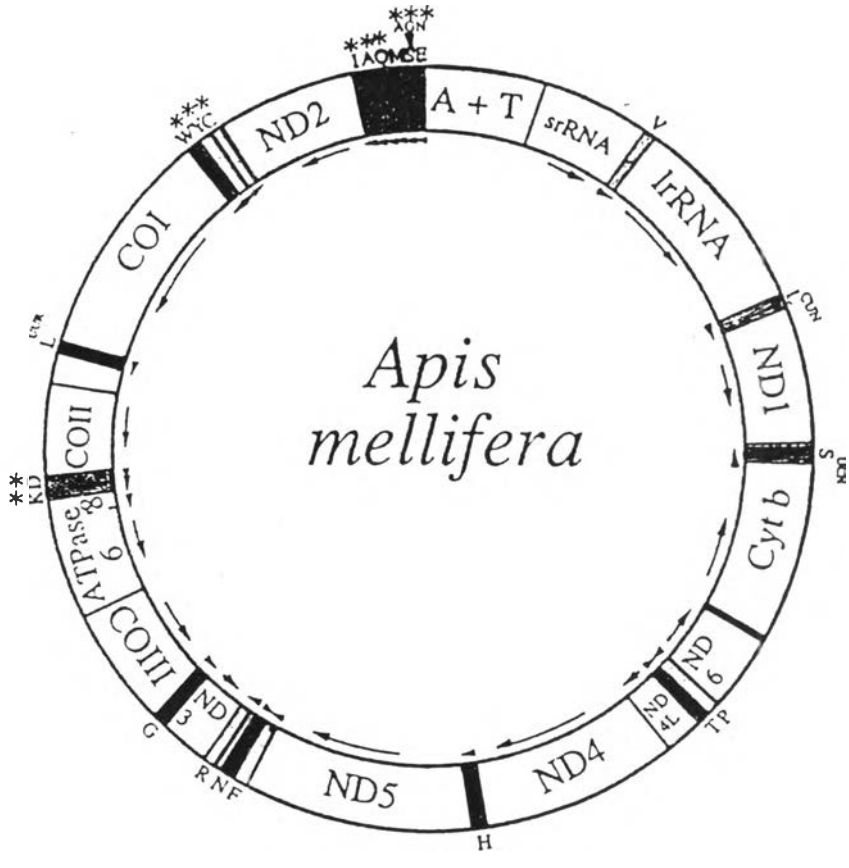
3) extension temperature เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์ Taq DNA polymerase สามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ได้ดีที่สุด เนื่องจากสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่ถูกสังเคราะห์ในปฏิกิริยารอบแรกๆสามารถทำหน้าที่เป็นสายดีเอ็นเอต้นแบบของปฏิกิริยาในรอบถัดไปได้ ดังนั้นเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปหลายรอบจะได้ดีเอ็นเอที่สนใจในปริมาณที่มากขึ้นเป็นทวีคูณ (Mullis and Faloona, 1987; Saiki, et al., 1985; Innis and Gelfand, 1990) ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR สามารถนำมาศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้หลายวิธี เช่น การทำ PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการตัดสายดีเอ็นเอของ PCR product และแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis สำหรับกรณีที่ไม่ทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต ที่ต้องการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์มาก่อน มักจะใช้เทคนิค RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA method of the PCR) โดยใช้ primer ชนิดเดียวกันในการทำ PCR แต่ละครั้ง โดย primer มีขนาดประมาณ 9-10 นิวคลีโอไทด์ และมีลำดับเบสแบบใดก็ได้ แต่ควรมี G+C ประมาณ 50-80 เปอร์เซนต์ และไม่มี palindromic sequences ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจะถูกนำมาแยกออกจากกันตามขนาดโดยการทำ agarose gel electrophoresis แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ทำให้เห็น banding pattern ซึ่งนำมาใช้วิเคราะห์หาความหลากหลายทางสายพันธุ์ต่อไป (Cabb and Clarkson, 1993) และอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจากการทำ PCR (sequencing PCR-amplified DNA)

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอมี 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี (chemical method) และวิธีทางเอนไซม์ (enzymatic method) วิธีทางเคมีจะติดฉลากที่ปลายด้าน 5′-phosphate แล้วผ่านขั้นตอนการทำ strand separation จากนั้นจึงนำไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆที่มีความจำเพาะกับเบสทั้ง 4 ชนิด และแยกดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำ denaturing gel electrophoresis (Maxam and Gilbert, 1977) การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยวิธีทางเอนไซม์ วิธีการคือนำดีเอ็นเอสายคู่ที่จะหาลำดับเบสมาแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวก่อน จากนั้นจึงใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยมี primer ที่มีความจำเพาะต่อปลายด้าน 3′-hydroxy และเริ่มปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสคู่ผสมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ดีเอ็นเอสายใหม่จะถูกหยุดการสร้างเมื่อมีการเติมสารตั้งต้น (substrate) ที่เป็น dideoxynucleotide (ddNTP) 4 ชนิดคือ ddATP, ddCTP, ddGTP และ ddTTP ดีเอ็นเอสายใหม่มีขนาดแตกต่าง

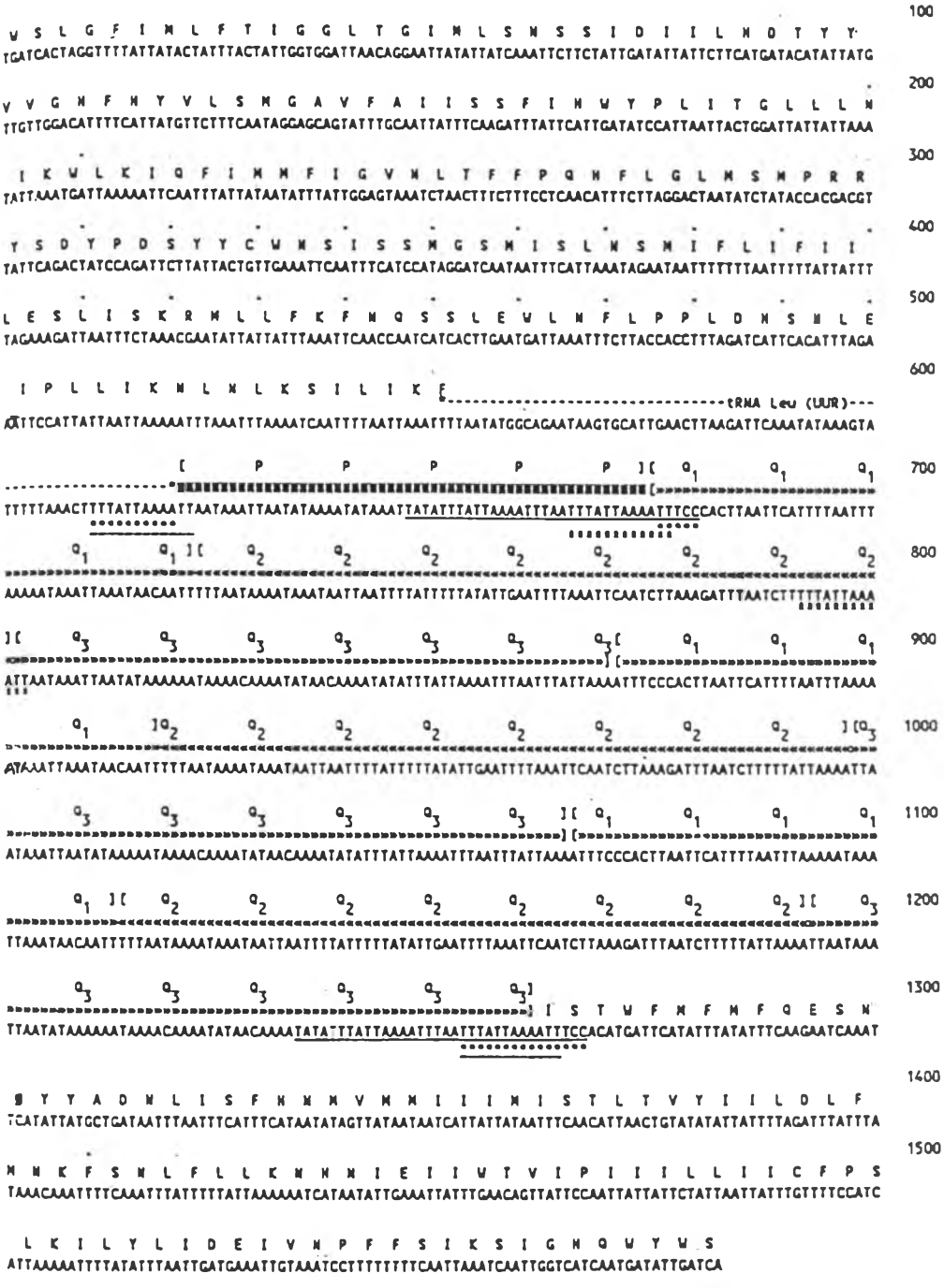
กันตามจำนวนของนิวคลีโอไทด์ที่ใส่ลงในปฏิกิริยาทั้ง 4 ปฏิกิริยา สายดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันเหล่านี้จะถูกนำมาแยกออกจากกันโดยการทำ denaturing gel electrophoresis วิธีการหาลำดับเบสโดยใช้เอนไซม์สามารถติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีได้ 2 แบบ คือ การติดฉลากที่ปลายด้าน 5′-phosphate ของ primer และการติดฉลากดีเอ็นเอที่กำลังถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยา การใช้สารตั้งต้นจึงแตกต่างกัน โดยการติดฉลากที่ปลายด้าน 5′-phosphate ของ primer จะใช้สารตั้งต้นที่เป็น [γ-^{32}P]ATP ส่วนการติดฉลากบนสายดีเอ็นเอที่กำลังถูกสังเคราะห์ขึ้นจะใช้สารตั้งต้นที่เป็น [α-^{32}P]dATP หรือ [α-^{32}P]dCTP สำหรับชนิดของกัมมันตรังสีที่ใช้นอกจากจะมี ^{32}P แล้วยังใช้ ^{33}P หรือ ^{35}S ได้ สารกัมมันตรังสีทั้ง 3 ชนิดให้พลังงานที่ปล่อยออกมาในรูป β-particle แต่ต่างกันที่ค่าพลังงานที่ปล่อยออกมา (Brown, 1994) ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องมือเพื่อใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยอัตโนมัติที่เรียกว่า Automated DNA sequencer ซึ่งเป็นการหาลำดับเบสโดยใช้เอนไซม์และใช้สารเรืองแสงแทนการใช้สารกัมมันตรังสี ใช้การติดสารดังกล่าวที่ปลายด้าน 5′-phosphate ของ primer ที่ใช้หาลำดับเบส (dye-primer sequencing) หรือการใช้ dideoxynucleotide ที่มีสารเรืองแสงแต่ละแบบในการหยุดปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ (dye-termination sequencing) วิเคราะห์ผลโดยการตรวจจับช่วงคลื่นของสารเรืองแสงและรายงานผ่านคอมพิวเตอร์ (Nopparatana, et al.,1994; Perkin Elmer, 1995)

สารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตมี 2 แบบ คือ chromosomal DNA ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียส และ extrachromosomal DNA เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในออแกเนลล์ (organell) ได้แก่ ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA; mtDNA) หรือในคลอโรพลาส (chloroplast DNA; ctDNA) ซึ่งมีการถอดรหัสและแปลรหัสเพื่อสร้างโปรตีนขึ้นภายในออแกเนลล์ (Lewin, 1990) mtDNA เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่รูปวงแหวนปลายปิด ในสัตว์มีขนาดประมาณ 16-20 กิโลเบส และมีจำนวนหลายชุดใน 1 เซลล์ (อาจมีมากกว่า 1000 ชุด) mtDNA ไม่มีส่วนของ intron โดยทั่วไปประกอบด้วยยีนที่ถอดรหัสและแปลรหัสเป็นโปรตีน 13 ชนิด ได้แก่ หน่วยย่อย (subunit) ของ NADH dehydrogenase (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 และ ND6), cytochrome b (cyt b), หน่วยย่อยของ cytochrome oxidase (COI, COII และ COIII) และหน่วยย่อยของ ATP synthetase (ATPase6 และ ATPase8) มียีนที่แปลรหัสเป็น ribosomal RNA ได้แก่ 12S ribosomal RNA (srRNA) และ 16S ribosomal RNA (lrRNA) และมียีนที่แปลรหัสเป็น transfer RNA 22 ชนิด มีส่วนที่

ควบคุม (control region หรือ origin of replication) อยู่ในส่วน noncoding region สำหรับ mtDNA ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera ligustica*) มีขนาด 16,343 เบส และประกอบด้วยยีนต่างๆเรียงกันแสดงในรูปที่ 4 (Crozier and Crozier, 1993) การใช้ mtDNA ในการแบ่งสายพันธุ์ผึ้ง มีการศึกษากันมากในผึ้งพันธุ์โดยทำการสกัด mtDNA แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อหา RFLP ในแต่ละสายพันธุ์ (Moritz, et al., 1986; Smith and Brown, 1988; Hall and Muralidharan, 1989; Sheppard, et al., 1991) และมีการศึกษาแผนที่ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction map) ของผึ้งพันธุ์แต่ละสายพันธุ์ (Smith, Taylor and Brown, 1989; Smith and Brown, 1990) ได้มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการศึกษาโดยใช้เพิ่มจำนวน mtDNA ตรงบริเวณที่สนใจ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำให้สามารถแบ่งผึ้งพันธุ์สายพันธุ์อาฟริกาออกจากสายพันธุ์อื่น โดยใช้เอนไซม์ BglII ตัด mtDNA ตรงส่วนที่เป็นยีนของ Cyt b ผึ้งสายพันธุ์อาฟริกาจะไม่มีตำแหน่งที่เอนไซม์นี้ตัดได้ (Crozier, Koulianos and Crozier, 1991) การใช้เอนไซม์ตัดในส่วนของ lrRNA, COI หรือตรง noncoding intergenic region บริเวณที่อยู่ระหว่าง COI และ COII เพื่อแบ่งสายพันธุ์ระหว่างผึ้งอาฟริกากับผึ้งยุโรป (Hall and Smith, 1991) สำหรับบริเวณ noncoding intergenig region ที่อยู่ระหว่างยีนของ COI และ COII ในระหว่างผึ้งพันธุ์ ที่ต่าง subspecies หรือภายใน subspecies เดียวกัน เช่นใน *Apis mellifera mellifera* จะมีขนาด noncoding intergenic region แตกต่างกันไป จากการศึกษาผึ้งพันธุ์จำนวน 63 ตัวอย่าง พบว่ามี noncoding intergenic region ที่มีความยาวแตกต่างกันอยู่ 4 ขนาด คือ 200, 250, 450 และ 650 คู่เบส เมื่อนำ noncoding intergenic region ขนาดที่มีความยาวมากที่สุดมาวิเคราะห์พบว่าประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อยที่มีลำดับเบสที่แตกต่างกัน 2 แบบ คือลำดับเบสแบบหน่วยย่อย P (มี 54 คู่เบส, เป็น A+T 100 เปอร์เซนต์) และลำดับเบสแบบหน่วยย่อย Q (มี 196 คู่เบส, เป็น A+T 93.4 เปอร์เซนต์) และสาเหตุที่ noncoding intergenic region มีความยาวแตกต่างกันก็เพราะมีจำนวนซ้ำและการเรียงตัวของหน่วยย่อย P และ Q แตกต่างกันออกไป เช่นการเรียงตัวอยู่ในรูป Q, PQ, PQQ และ PQQQ นอกจากนี้พบว่าลำดับเบสในหน่วยย่อย Q นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ Q1, Q2 และ Q3 โดย Q1 มีลำดับเบสคล้ายกับลำดับเบสทางด้านปลาย 3′ ของยีน COI ส่วน Q2 มีลำดับเบสคล้ายกับลำดับเบสของยีน leucine tRNA และส่วน Q3 มีลำดับเบสคล้ายลำดับเบสของ P เป็นอย่างมาก (รูปที่ 5) สำหรับขนาดของ noncoding intergenic region ในผึ้งชนิดอื่นจะมีขนาดสั้นกว่าและมีความ



รูปที่ 4 แสดงไมโตคอนเดรียจีโนมของผึ้งพันธุ์ (Crozier and Crozier, 1993)



รูปที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mtDNA ของผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera mellifera* จากประเทศฝรั่งเศส: 1-555 เป็นปลายด้าน 3′ ของยีน COI, 551-620 เป็นยีนของ leucine tRNA, 621-674 เป็น noncoding intergenic sequence ที่ประกอบด้วย motif P, 675-1261 เป็น noncoding intergenic sequence ที่ประกอบด้วย direct repeat ของ motif Q จำนวน 3 repeat (Q1+Q2+Q3), 1262-1582 เป็นปลายด้าน 5′ ของยีน COII (Cornuet, Garnery and Solignac, 1991)

ซับซ้อนน้อยกว่าในผึ้งพันธุ์ โดยในผึ้งหลวงมีขนาด 24 คู่เบส ผึ้งมิ้มมีขนาด 32 คู่เบส และในผึ้งโพรงมีขนาด 89 คู่เบส (Cornuet, Garnery and Solignac, 1991) สำหรับลำดับเบสของ noncoding intergenic region ในผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera ligustica* ที่ศึกษาโดย Crozier และ Crozier (1993) มีความยาว 193 คู่เบส ต่อมามีการศึกษาดีเอ็นเอในส่วนนี้เพิ่มเติม โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ สามารถจำแนก noncoding intergenic region ได้อย่างน้อย 7 ขนาด (Garnery, et al., 1993)

การแบ่งสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตมีการศึกษาใน mtDNA เนื่องจากมีขนาดเล็ก มีจำนวนชุดสูง (high copy number) และมีอัตราเร็วของการเปลี่ยนแปลงของเบสในสายดีเอ็นเอสูงกว่า nuclear DNA (Graven, et al, 1991; Crozier and Crozier, 1991) โดยเฉพาะดีเอ็นเอในส่วน noncoding intergenic region ซึ่งมีความแปรผันทั้งในด้านความยาวและลำดับเบสสูงกว่า coding region (Smith, personal communication) จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการแบ่งกลุ่มสิ่งมีชีวิตภายในสปีชีส์เดียวกัน (intraspecific)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของผึ้งโพรงในประเทศไทยโดยนำเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มาใช้ การวิจัยเป็นการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียบริเวณ noncoding intergenic region ที่อยู่ระหว่างยีน COI และ COII เพื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบและแบ่งกลุ่มผึ้งโพรงในประเทศไทย