18249

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอสำหรับผึ้งมิ้ม (Dwarf honeybee, *Apis florea* Fabricius. Hymenoptera : Apidae)

DNA Extraction Protocols in dwarf honeybee, *Apis florea* Fabricius. (Hymenoptera : Apidae)

T099158

โดย

นายสิทธิพงษ์ ชีวันสิริสุข
นายวสันต์ มรกตจินดา
นายพลกฤษณ์ พูลสวัสดิ์

ว/ท.
ต 792 ท
2544

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....99158
วัน.เดือน.ปี.....15 JUN 2009

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอสำหรับผึ้งมิ้ม (Dwarf honeybee, *Apis florea* Fabricius. Hymenoptera : Apidae)

DNA Extraction Protocols in dwarf honeybee, *Apis florea* Fabricius. (Hymenoptera : Apidae)

โดย

นายสิทธิพงษ์ ชีวันสิริสุข

นายวสันต์ มรกตจินดา

นายพลกฤษณ์ พูลสวัสดิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.....

(รศ.ดร. วรเดช จันทรสร)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร. วรเดช จันทรสร)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอสำหรับผึ้งมิ้ม (Dwarf honeybee, *Apis florea* Fabricius. Hymenoptera : Apidae)

โดย : สิทธิพงษ์ ชีวันสิริสุข

วสันต์ มรกตจินดา

พลกฤษณ์ พูลสวัสดิ์

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา : ๒/๐๔/๔๕

(รศ.ดร. วรเดช จันทรสร)

จากการศึกษาถึงเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอของผึ้งมิ้ม โดยการดัดแปลงเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งเป็น 4 วิธีการ ได้แก่ 1)ใช้เวลาในการ incubate 60^0 c 30 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด 2) ใช้เวลาในการ incubate 60^0 c 30 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่ง 3) ใช้เวลาในการ incubate 60^0 c 60 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด และ 4) ใช้เวลาในการ incubate 60^0 c 60 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่ง ตามลำดับ โดยมีวิธีการสกัดตามขั้นตอนการสกัด เป็นตัวควบคุม พบว่า เทคนิควิธีการสกัดตามขั้นตอนการสกัด ซึ่งจะใช้เวลาในการ incubate 60^0 c 120 นาที และใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด สามารถให้ปริมาณดีเอ็นเอก้อน (Raw volume) ได้มากที่สุด จากนั้นให้นำมาเปรียบเทียบกับเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ ซึ่งใน buffer มีน้ำตาล sucrose ส่วนเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งนั้นใน buffer จะไม่มีน้ำตาล sucrose พบว่าปริมาณดีเอ็นเอก้อนที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธีนั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Title : DNA Extraction Protocols in dwarf honeybee, *Apis florea* Fabricius. (Hymenoptera : Apidae)

By : Sittipong Chwansirisuk
Wasan Morakotjinda
Ponkrit Poonsawat

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Major field : Plant Pest Management Technology

Advisor 2/04/02
(Assoc. Prof. Dr. Warlardej Chantrasorn)

The objectives of this study were to find the DNA extraction methods that suitable to dwarf honeybee (*Apis florea* Fabricius.). By modified DNA extraction of honeybee techniques including 1) incubated samples for 30 minutes at 60°c and used equal DNA extraction solutions 2) incubated samples for 30 minutes at 60° c and used half DNA extraction solutions 3) incubated samples for 60 minutes at 60°c and used equal DNA extraction solutions 4) incubated samples for 60 minutes at 60° c and used half DNA extraction solutions, respectively. DNA extraction techniques on time incubate for 120 minutes at 60° c and used solution the equal DNA extractions as control. The result in extraction of honeybee for maximum DNA quantity (raw volume) was in control technique. This technique was compared with DNA extraction of thrips composed of sucrose as buffer and DNA extraction of honeybee without sucrose. The result showed that DNA extraction for DNA quantity form both techniques did not statistical differences.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้ ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ทั้งนี้เพราะด้วยคำแนะนำ ข้อชี้แนะต่าง ๆ ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น ซึ่งต้องกราบขอบพระคุณ อาจารย์ รศ.ดร. วรเดช จันทรสร อาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ รศ.ดร. สุวรินทร์ บำรุงสุข เป็นอย่างยิ่ง ในระหว่างการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้นี้ ผู้ที่คอยให้คำแนะนำ คอยดูแล คอยช่วยเหลือ ข้อผิดพลาดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น นั้นคือ รุ่นพี่ ปริญญาโท นายฉัตรชัย สุภิมารส และนางสาว สุดารัตน์ สัปสาร จึงต้องขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

สุดท้ายนี้ต้องขอขอบคุณครอบครัวที่ได้ อบรมสั่งสอน ทั้งกาย วาจา ใจ ดูแลเอาใจใส่ ในด้านปัจจัย 4 ให้กำลังใจในยามสิ้นหวัง ความช่วยเหลือของเพื่อน ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช รุ่นที่ 14 และสิ่งศักดิ์สิทธ์ทั้งหลายทั้งปวงที่ทำให้ ณ วันนี้ ปัญหาพิเศษฉบับนี้ได้สำเร็จเสร็จสมบูรณ์ตามที่ใจปรารถนา

สิทธิพงษ์ ชีวันสิริสุข
วสันต์ มรกตจินดา
พลกฤษณ์ พูลสวัสดิ์
มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ii
คำนิยม.....iii
สารบัญ.....iv
สารบัญภาพ.....v
คำนำ.....1
วัตถุประสงค์.....2
การตรวจเอกสาร.....3
อุปกรณ์และวิธีการ.....20
ผลการทดลอง.....41
สรุปผลการทดลอง.....49
เอกสารอ้างอิง.....50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. แสดงรูปร่างลักษณะผึ้งงานของผึ้งมิ้ม จะมีขนาดของตัวผึ้งและรังเล็กที่สุด.....6
2. แสดงรูปร่างลักษณะผึ้งงานของผึ้งหลวง จะมีขนาดของตัวผึ้งและรังใหญ่ที่สุด.....7
3. แสดงรูปร่างลักษณะผึ้งงานของผึ้งโพรง จะมีขนาดของตัวผึ้งใหญ่กว่าผึ้งมิ้มแต่ เล็กกว่าผึ้งหลวง.....8
4. แสดงรูปร่างลักษณะผึ้งงานของผึ้งพันธุ์เมอริเฟอรา จะมีขนาดของตัวผึ้งใหญ่กว่า ผึ้งโพรงแต่เล็กกว่า ผึ้งหลวง.....9
5. แสดงสารเคมีที่ใช้ในการสกัด.....30
6. แสดงเครื่องชั่งสารยี่ห้อ precisa รุ่น XT 220A ทศนิยม 4 ตำแหน่ง.....31
7. แสดงเครื่อง pH meter ยี่ห้อ accumet รุ่น AR 15.....32
8. แสดงอุปกรณ์ micropipete และ microtube.....33
9. แสดงเครื่อง vortex gennie 2.....34
10. แสดงเครื่อง incubate ยี่ห้อ memmert รุ่น WBU 45.....35
11. แสดงเครื่อง centrifuge ยี่ห้อ hermle รุ่น Z 323.....36
12. แสดงเครื่องอบตะกอน digital dry bath incubator ยี่ห้อ boekel 37
13. แสดงเครื่อง gelmate รุ่น 2000.....38
14. แสดงเครื่อง gel photodocumentation system รุ่น UP-D895.....39
15. แสดงเครื่อง autuclave.....40
16. แสดง band ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง ได้แก่ วิธีcontrol, treatment1, treatment2, treatment3 และ treatment4 (ซ้ำที่ 1).....44
17. แสดง band ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง ได้แก่ วิธีcontrol, treatment1, treatment2, treatment3 และ treatment4 (ซ้ำที่ 2).....45
18. แสดง band ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง ได้แก่ วิธีcontrol, treatment1, treatment2, treatment3 และ treatment4 (ซ้ำที่ 3).....46
19. แสดง band ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ treatment5.....47
20. แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอก้อนที่สกัดได้จากแต่ละวิธี.....48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ผึ้งจัดอยู่ในอันดับ Hymenoptera วงศ์ Apidae ทั่วโลกมีแมลงจำพวกผึ้งประมาณ 30,000 ชนิด ซึ่งกินอาหารอยู่ 2 ประเภทคือ น้ำหวาน และเกสรดอกไม้ จากจำนวนทั้งหมดของผึ้งที่พบ จะมีผึ้งอยู่กลุ่มหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตแบบสัตว์สังคม มีการแบ่งชั้นวรรณะ สัตว์แต่ละตัวจะทำหน้าที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับวรรณะของสัตว์นั้น ๆ ทำให้มีการจัดสรรหน้าที่การทำงานและพฤติกรรมแตกต่างกันไป ซึ่งพฤติกรรมดังกล่าวจะถูกควบคุมโดยลักษณะทางพันธุกรรม อีกทั้งยังมีกรรมวิธีในการเก็บสะสมอาหารเพื่อใช้ในยามขาดแคลนในรัง โดยการดูดน้ำหวานแล้วบ่มให้ข้นจนกลายเป็นน้ำผึ้ง และเก็บเกสรดอกไม้แยกไว้อีกที่หนึ่ง ผึ้งในกลุ่มนี้รู้จักกันดี ได้แก่ ชันโรง (stingless bee) และผึ้งน้ำหวานสกุล เอพิส (Apis)

ในประเทศไทยจะมีผึ้งสกุลเอพิสอยู่ 4 ชนิดได้แก่ ผึ้งมิ้ม (*Apis florea*) ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) ผึ้งโพรงไทย (*Apis cerana*) และผึ้งพันธุ์เมอริเฟอรา (*Apis mellifera*) ตามลำดับ โดยที่ผึ้งสกุลเอพิสจัดเป็นผึ้งที่เก็บสะสมน้ำหวานไว้ในปริมาณค่อนข้างมากภายในรัง ผลผลิตที่ได้จากผึ้งจึงทำประโยชน์ให้กับมนุษย์มากมาย เช่น การนำน้ำผึ้งมาทำอาหาร ทำเป็นส่วนประกอบของยา เครื่องสำอาง เครื่องดื่ม เป็นต้น (พงศ์เทพ, 2534) นอกจากนี้พฤติกรรมของผึ้งจะมีความสัมพันธ์กับเกษตรกร โดยที่ทั้ง 2 ฝ่ายจะได้รับประโยชน์ร่วมกัน ผึ้งจะได้รับน้ำหวาน และเกสรดอกไม้จากพืนที่เพาะปลูกของเกษตรกร ส่วนเกษตรกรเจ้าของพื้นที่จะได้รับผลผลิตเพิ่มขึ้นมากกว่าเดิมด้วยการที่มีผึ้งไปช่วยผสมเกสรพืชอย่างพอเพียง และถูกจังหวะเวลา ในทางกลับกันพื้นที่เพาะปลูกของเกษตรกรอาจก่อให้เกิดโทษต่อผึ้งได้เช่นกัน คือถ้าในพื้นที่เพาะปลูกของเกษตรกรมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในช่วงที่พืชกำลังออกดอก จะทำให้ผึ้งงานที่กำลังบินออกหาอาหาร โดยการเก็บน้ำหวานและเกสรดอกไม้จากพืชปลูกนั้นได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชด้วยซึ่งจะเป็นพิษต่อผึ้ง โดยที่ผึ้งที่ได้รับสารพิษในปริมาณสูงจะตายทันที ส่วนผึ้งที่ได้รับสารพิษในปริมาณเพียงเล็กน้อย และเป็นระยะเวลายาวนานจะไม่ตายทันที แต่จะส่งผลต่อผึ้งรุ่นถัดไป โดยอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในระดับเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้ผึ้งมีรูปแบบของพันธุกรรมผิดปกติไป จากปัญหาดังกล่าวจึงทำให้ผึ้งซึ่งมีประโยชน์ต่อการเกษตรลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. **เพื่อศึกษาหา protocols ที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอของผึ้งมิ้ม**
2. **ศึกษาระยะเวลาในการ incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และปริมาณสารที่ใช้ในเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง เพื่อพิจารณาว่า จะมีผลต่อปริมาณดีเอ็นเอก้อนอย่างไร**
3. **เพื่อทำการศึกษาเทคนิคในการสกัดให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอก้อนสูงสุด โดยพิจารณาจากสาร buffer ที่ใช้ซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งในสาร buffer จะไม่มีสาร sucrose ส่วนวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟในสาร buffer จะมีสาร sucrose โดยทำการเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธี**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

ในประเทศไทยมีผึ้งสกุลเอพิส (Apis) อยู่ 4 ชนิดซึ่งมีพฤติกรรม และคุณสมบัติทางชีววิทยาบางประการที่แตกต่างกัน ดังนี้

ผึ้งมิ้ม (*Apis florea*)

สร้างรังเป็นรวงผึ้งเพียงรวงเดียวแขวนอยู่กับกิ่งไม้ เป็นผึ้งที่มีพฤติกรรมทำรังในที่โล่งแจ้งตามพุ่มไม้ธรรมชาติ ขนาดรังไม่ใหญ่มากนัก มีเส้นผ่าศูนย์กลางรวงรังส่วนใหญ่ไม่เกิน 20 เซนติเมตร รูปทรงกลมหรือรี ผึ้งงานประมาณร้อยละ 70 - 80 จะทำหน้าที่ป้องกันรังด้วยการแขวนตัวมันเองติดกันเป็นม่านปกคลุมรวงผึ้ง ดังนั้นจึงมีผึ้งงานในอัตราส่วนน้อยเท่านั้นที่ออกไปหาอาหาร ทำให้ผลผลิตน้ำผึ้งต่อรังมีน้อย ส่วนใหญ่จะไม่เกิน 400 กรัมต่อรัง พฤติกรรมในการส่งข่าวสารหรือตำแหน่งของอาหารทำโดย ผึ้งงานจะเต้นรำบนพื้นผิวส่วนบนสุดของรวงที่สร้างล้อมรอบกิ่งไม้ที่รังมันแขวนอยู่ ในส่วนนี้จะเป็นที่เก็บสะสมน้ำผึ้ง ในการเต้นรำเพื่อส่งข่าวสารนั้นจะทำได้อย่างแม่นยำก็ต่อเมื่อผึ้งมิ้มได้เห็นดวงอาทิตย์ หรือส่วนหนึ่งของท้องฟ้าในยามกลางวัน

ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*)

เป็นผึ้งที่มีการดำรงชีวิตคล้ายคลึงกับผึ้งมิ้ม คือรังผึ้งหลวงประกอบด้วยรวงรังเพียงรวงเดียวห้อยจากกิ่งไม้ ชายคาบ้านเรือน รวงผึ้งมีขนาดใหญ่ประมาณ 1 เมตร หรือในบางครั้งอาจมากกว่านี้ ประชากรส่วนใหญ่ของผึ้งงานจะเกาะเรียงตัวเป็นม่านปกคลุมรวงผึ้งเช่นเดียวกับผึ้งมิ้ม การส่งข่าวสารและตำแหน่งของอาหารทำโดยผึ้งงานจะเต้นรำในระนาบแนวตั้งของรวงผึ้ง เพื่อความแม่นยำในการส่งข่าวสารมันจำเป็นต้องเห็นดวงอาทิตย์ หรือท้องฟ้าในขณะที่มันเต้นรำ

ผึ้งโพรงไทย (*Apis cerana*)

เป็นผึ้งที่มีวิวัฒนาการที่แตกต่างไปจาก ผึ้งมิ้ม และผึ้งหลวง ในสภาพธรรมชาติผึ้งโพรงจะทำรังอยู่ในที่มืดตามซอกหิน โพรงหิน หรือโพรงไม้ โดยการสร้างรังประกอบไปด้วยรวงหลายรวงซ้อนกันเป็นหลืบ ขนาดรวงรังมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 เซนติเมตร ผึ้งโพรงเป็นผึ้งที่มีอัตราการแยกรังค่อนข้างบ่อยครั้ง โดยมีพฤติกรรมทิ้งรังเก่าไปหาที่อยู่อาศัยใหม่ เนื่องจากรังเก่ามีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต เช่น ขาดแคลนอาหาร มีศัตรูรบกวน มีโรคระบาด ซึ่งพฤติกรรมดังกล่าวจะถูกควบคุมโดยกรรมพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผึ้งพันธุ์เมอริเฟอรา (*Apis mellifera*)

เป็นผึ้งพื้นเมืองของทวีปยุโรป และแอฟริกา ในสภาพธรรมชาติผึ้งพันธุ์จะสร้างรวงรังซ้อนกันเป็นหลืบๆเช่นเดียวกับผึ้งโพรง ต่างกันตรงที่ขนาดซึ่งจะมีขนาดรังใหญ่กว่า และยังมีจำนวนประชากรผึ้งงานมากกว่าด้วย จึงทำให้ภายในรังผึ้งพันธุ์มีปริมาณอาหารสะสมมากกว่าในรังผึ้งโพรง ผึ้งหลวง และผึ้งมิ้ม ตามลำดับ

ชีวิตในสังคมผึ้งประกอบไปด้วยผึ้ง 3 วรรณะ ได้แก่ (สิริวัฒน์ และคณะ, 2528; พงศ์เทพ, 2534)

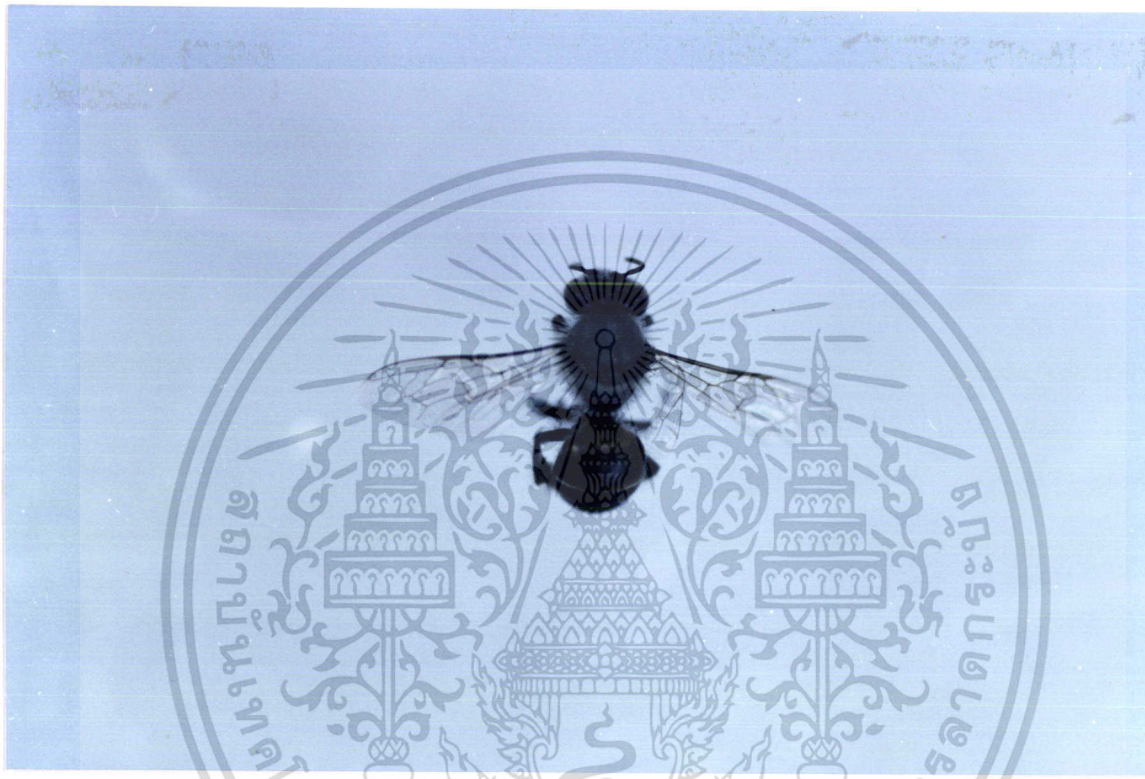
ผึ้งแม่รัง (Queen)

เจริญมาจากไข่ที่ถูกผสมมีโครโมโซม 2n เป็นผึ้งเพศเมีย มีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างจากผึ้งงานอย่างชัดเจน โดยจะมีขนาดลำตัวโตกว่า และมีปล้องท้องยาวกว่าผึ้งงาน ความยาวปีกคลุมส่วนท้องได้ประมาณกึ่งหนึ่ง ลำตัวผึ้งยาวรีมีขนอ่อนปกคลุมอยู่ทั่วไป ส่วนผึ้งแม่รังที่มีอายุมากเส้นขนจะหลุดลร่วงทำให้เห็นลำตังเลี่ยนมัน ในรังผึ้งรังหนึ่ง หรือสังคมผึ้งหนึ่ง จำเป็นจะต้องมีผึ้งแม่รังเพียงตัวเดียวเท่านั้น ซึ่งมีหน้าที่สำคัญคือ เป็นศูนย์กลางของรังโดยเป็นตัวผลิตสาร เฟอโรโมนส์ (queen pheromone) ซึ่งสารนี้จะเป็นตัวควบคุมกลไกต่างๆภายในรัง ทำให้สมาชิกผึ้งทุกตัวภายในรังทำหน้าที่ของมันอย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เพื่อเป็นการรักษาสมดุลของสังคมไว้ และหน้าที่ที่สำคัญยิ่งอีกประการของผึ้งแม่รัง คือการเพิ่มจำนวนประชากรผึ้งภายในรังด้วยการวางไข่ ซึ่งจะฝักออกเป็นตัวผึ้งรุ่นใหม่เพื่อสืบต่อผึ้งรุ่นเก่าที่ทยอยกันตายจากไป ในสภาวะที่อุดมสมบูรณ์ พบว่าผึ้งแม่รังอาจวางไข่ได้ถึงวันละ 1,500 ฟอง ช่วงชีวิตของผึ้งแม่รังสามารถอยู่ได้เป็นปี ๆ ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร

ผึ้งงาน (Worker)

เจริญมาจากไข่ที่ถูกผสม และมีโครโมโซม 2n เป็นผึ้งเพศเมียเช่นเดียวกับผึ้งแม่รัง ผึ้งงานมีขนาดเล็กที่สุดในบรรดาผึ้งทั้ง 3 วรรณะ การที่ผึ้งงานซึ่งมีพัฒนาการที่ผิดแปลกออกไปจากผึ้งแม่รังโดยสิ้นเชิงทั้ง ๆ ที่เจริญจากไข่ที่ถูกผสม และมีโครโมโซม 2n เช่นเดียวกันนั้น สาเหตุเกิดจากปริมาณอาหารที่ได้รับ โดยที่ตัวอ่อนผึ้งงานที่มีอายุไม่เกิน 36 ชั่วโมง ถ้าได้รับอาหารจากผึ้งพี่เลี้ยงซึ่งจะผลิตรอยัลเยลลี่ออกมาให้เป็นอาหารอย่างมากเกินพอ และเจริญอยู่ในหลอดรวงรูปถ้วยคว่ำ ก็จะพัฒนาออกไปเป็นผึ้งแม่รังได้ ส่วนตัวอ่อนผึ้งงานที่ไม่ได้รับอาหารรอยัลเยลลี่อย่างพอเพียงก็จะเจริญเป็นผึ้งงานในที่สุด สิ่งที่ควบคุมการทำงานของผึ้งงาน คือสารเฟอโรโมนส์ (queen pheromone) ที่ผลิตมาจากผึ้งแม่รัง โดยที่สารนี้จะแพร่กระจายไปทั่วรังได้โดยการที่ผึ้งแม่รังปล่อยสารนี้ให้กับผึ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1. แสดงรูปร่างลักษณะผึ้งงานของผึ้งมิ้ม จะมีขนาดของตัวผึ้งและรังเล็กที่สุด
(ภาพขยาย 4 เท่า)

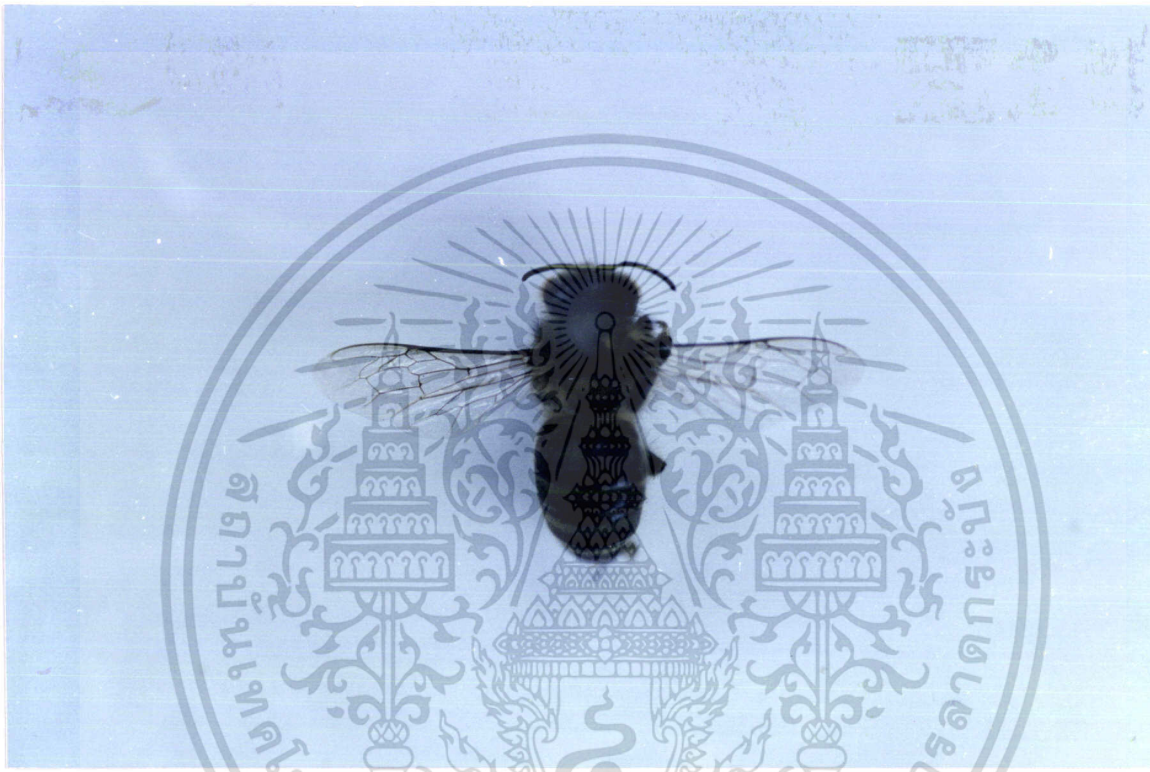
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2. แสดงรูปร่างลักษณะผึ้งงานของผึ้งหลวง จะมีขนาดของตัวผึ้งและรังใหญ่ที่สุด (ภาพขยาย 4 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3. แสดงรูปร่างลักษณะผึ้งงานของผึ้งโพรง จะมีขนาดของตัวผึ้งใหญ่กว่าผึ้งมิ้มแต่ เล็กกว่าผึ้งหลวง (ภาพขยาย 4 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4. แสดงรูปร่างลักษณะผึ้งงานของผึ้งพันธุ์เมอริเฟอรา จะมีขนาดของตัวผึ้งใหญ่กว่าผึ้งโพรง แต่เล็กกว่าผึ้งหลวง (ภาพขยาย 4 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีผลกับผึ้ง

ปัจจุบันสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมีมากกว่า 400 ชนิด ได้ถูกผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ในด้านการเกษตร และด้านสาธารณสุข ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ 1) สารเคมีกำจัดแมลง 2)สารเคมีกำจัดโรคพืช 3)สารเคมีกำจัดวัชพืช และ 4)สารเคมีกำจัดสัตว์ศัตรูพืช ตามลำดับ ในบรรดาสารเคมีกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวนี้ จะพบว่าสารเคมีกำจัดแมลงจะเป็นพิษต่อผึ้งมากที่สุด สำหรับสารเคมีกำจัดโรคพืชจะมีผลกระทบต่อผึ้งน้อยมาก ส่วนสารเคมีกำจัดวัชพืชโดยมากพบว่าไม่เป็นอันตรายโดยตรงต่อผึ้ง แต่จะทำให้แหล่งอาหารของผึ้งซึ่งเป็นวัชพืชบางชนิดลดจำนวนลง ก็เท่ากับว่ามีผลไปลดปริมาณอาหารของผึ้งในธรรมชาติ (พงศ์เทพ , 2534)

ชนิดของดอกไม้บานที่ผึ้งอาจได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชแบ่งได้ 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

1. ดอกไม้บานที่พบว่ามีความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมาก ได้แก่ ดอกฝ้าย ดอกข้าวโพด ดอกสตรอเบอรี ดอกถั่วเหลือง ดอกพืชตระกูลแตงต่าง ๆ ดอกกาแฟ ดอกลิ้นจี่ ดอกส้ม ดอกทุเรียน ดอกเงาะ และดอกลำไย
2. ดอกวัชพืช เช่น ดอกไมยราพ ดอกหญ้าและดอกพืชตระกูลถั่ว
3. ดอกไม้บานที่พบว่ามีความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชน้อยมากและปลอดภัยต่อผึ้งได้แก่ ดอกสาบเสือ ดอกแคฝรั่ง ดอกพะยอม ดอกพิกุล ดอกยางพารา ดอกมะพร้าว ดอกกระถิน ดอกสารภี ดอกบุนนาค ดอกเปล้าใหญ่ เป็นต้น

อย่างไรก็ตามดอกไม้ที่พบว่ามีความเป็นพิษในระดับอันตรายต่อผึ้งนั้น ถ้าได้รับความร่วมมือจากเกษตรกรให้งดการพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในช่วงระยะดอกไม้บานก็จะปลอดภัยต่อผึ้ง โดยที่ผึ้งจะได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้ 3 ทางดังนี้ (แอนเดอร์สัน และคณะ, 1971)

1. โดยการสัมผัส ซึ่งสารพิษจะถูกดูดซึมผ่านผนังลำตัว โดยที่ผึ้งอาจสัมผัสกับสารเคมีโดยตรงขณะทำการบินเพื่อหาอาหารในระหว่างที่เกษตรกรกำลังฉีดพ่นสารเคมีอยู่ หรืออาจไปสัมผัสกับอนุภาคของสารเคมีที่ตกค้างอยู่บนเกสรดอกไม้
2. โดยการหายใจ สารพิษจะเข้าไปในระบบหายใจของผึ้ง โดยผ่านทางรูหายใจ เนื่องจากในปัจจุบันมีสารเคมีประเภทพ่นหมอกควันซึ่งนิยมใช้กันมากทางด้านการเกษตร และทางด้านสาธารณสุข โดยเฉพาะการพ่นสารป้องกันยุงตามอาคารบ้านเรือน ซึ่งรังผึ้งที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงจะได้รับสารเคมีชนิดนี้ด้วย ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อผึ้ง
3. โดยการกิน เมื่อเกษตรกรฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในช่วงที่ดอกบานจะทำให้มีสารพิษตกค้างที่ละอองเกสร และน้ำหวานซึ่งเป็นอาหารของผึ้ง เมื่อผึ้งกินอาหารเหล่านี้โดยที่มีสารพิษเจือปนอยู่ จะส่งผลทำให้ผึ้งได้รับอันตราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืช

สารเคมีกำจัดศัตรูพืชอาจแสดงความเป็นพิษต่อผึ้งในทางใดทางหนึ่งดังที่ได้กล่าวไปแล้ว หรืออาจจะเกิดความเป็นพิษรวมกัน 2 ถึง 3 ทางพร้อมกันเลยก็ได้ นอกจากนี้ความเป็นพิษที่จะเกิดกับผึ้งมากหรือน้อย ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลทำให้ผึ้งได้รับสารพิษจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ได้แก่

1. อุณหภูมิ ในสารเคมีทั่ว ๆ ไปเมื่ออุณหภูมิสูงจะทำให้ความเป็นพิษของสารเคมีเพิ่มขึ้นด้วย ยกเว้นสารบางชนิดเช่น mevinphos ซึ่งจะเพิ่มความเป็นพิษเมื่อมีอุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้อุณหภูมิยังเป็นตัวบอกถึงการคงสภาพอยู่ในธรรมชาติของสารเคมีอีกด้วย คือเมื่ออุณหภูมิสูงจะทำให้สารเคมีเกิดการสลายตัวได้เร็วขึ้น ส่วนอุณหภูมิต่ำจะทำให้สารเคมีสลายตัวได้ช้าลง ดังนั้นจึงยังตกค้างอยู่ในสภาพแวดล้อมเป็นเวลานาน
2. เวลาในการพ่นสารเคมี เกษตรกรไม่ควรทำการพ่นสารเคมีในช่วงที่ดอกบาน เนื่องจากในช่วงนี้ผึ้งจะออกหาอาหาร ดังนั้นควรทำการฉีดพ่นสารเคมีในช่วงก่อนดอกบาน ทั้งนี้เพื่อไม่ให้ผึ้งได้รับอันตรายจากสารเคมี
3. จำนวนประชากรภายในรังผึ้ง ในรังผึ้งที่มีความหนาแน่นมากจะได้รับความเสียหาย หรือถูกทำลายมากกว่ารังผึ้งที่มีความหนาแน่นน้อย เพราะในรังผึ้งที่มีความหนาแน่นมากย่อมจะมีผึ้งงานในจำนวนมากด้วย ดังนั้นโอกาสที่จะไปสัมผัสกับสารพิษก็ย่อมมีมากขึ้นด้วย
4. ชนิดของสารเคมี พบว่าสารเคมีกำจัดแมลงชนิดผง (dust) จะมีความเป็นพิษต่อผึ้งสูงสุด รองลงมาคือชนิดผงละลายน้ำ (WP) ชนิดน้ำมันละลายน้ำ (EC) และชนิดเม็ด (granular) ตามลำดับ
5. อายุผึ้ง พบว่าผึ้งที่มีอายุต่างกันจะมีความทนทานต่อสารเคมีต่างกันด้วย โดยที่ผึ้งที่เป็นตัวเต็มวัยใหม่ ๆ จะอ่อนแอต่อ ดีดีที (DDT), ดิลดริน และคาร์บาริล มากที่สุด ส่วนผึ้งที่มีอายุมากจะอ่อนแอต่อ มาลาไธออน และเม็ทธิลพาราไธออน
6. ขนาดลำตัวผึ้ง ผึ้งที่มีขนาดเล็กจะมีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีได้มากกว่าผึ้งที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากผึ้งขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวมากกว่าผึ้งขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับน้ำหนักตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีในการกำจัดแมลงโดยมากจะมีความเป็นพิษต่อผึ้ง ในปัจจุบันนี้พบว่าการใช้สารเคมีของเกษตรกรมีความหลากหลายมากขึ้น ซึ่ง (แอนเดอร์สัน และคณะ,1971) ได้แบ่งออกเป็นกลุ่มดังนี้

พวกที่มีพิษสูง ความเสียหายจะเกิดรุนแรงต่อผึ้งรัง ถ้ามีการใช้ยากำจัดแมลงเหล่านี้ในขณะที่ผึ้งหาอาหาร อีกทั้งยังคงมีพิษตกค้างรุนแรงภายในวันต่อมาหลังทำการฉีดพ่นยา

อัลดริน(aldrin)	การ์โดนา(Gardona)®
อาร์เซนิค(arsenicals)	กูไธออน(Guthion)®
อะโซดริน(Azodrin)®	เฮปตาคลอร์(heptachlor)
ไบกอน(Baygon)®	อิมิแดน(Imidan)®
ไบเทกซ์(Baytex)®	แลนเนท(Lannate)®
บีเอ็ชซี(BHC)	ลินเดน(lindane)
ไบดริน(Bidrin)®	มาราไธออน(malathion)
บักซ์(Bux)®	เมทาซิล(Metacil)®
คลอร์ไธออน(Chlorthion)®	เมซูรอล(Mesurol)®
ดาซานิท(Dasanit)®	เมทาไซด์(metacide)
ดีดีวีพี(DDVP,dichlorvos)	เม็ทธิลพาราไธออน(methylparathion)
ไดอะซินอน(diazinon)	โมแบม(Mobam)®
ไดเม็ทโธเอท(dimethoate)	โมนิเตอร์(Monitor)®
ไดบรอม(Diborm)®	พาราไธออน(parathion)
ดีลดริน(dieldrin)	ฟอสดริน(Phosdrin)®
ไดเมครอน(Dimecron)®	เซฟวิน(Sevin)®
เดอร์สแบน(Dursban)®	ซูมิไธออน(Sumithion)®
อีพีเอ็น(EPN)	เทมมิค(Temik)®
เอ็ทธิลกูไธออน(Ethyl Guthion)®	ทีอีพีพี(TEPP)
ฟาโมฟอส(Famophos)®	เซคทราน(Zectran)®
ฟูราดาน(Furadan)®	ซินโนฟอส(Zinophos)®

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พวกที่มีพิษปานกลาง ยากำจัดแมลงประเภทนี้อาจนำไปใช้ได้ ถ้าใช้ภายในช่วงเวลาและมีวิธีการใช้ที่ถูกต้องเหมาะสม แต่ห้ามฉีดพ่นโดยตรงบนตัวผึ้ง หรือบริเวณรังผึ้ง

อะเบน(Abate)®	เอ็นดริน(endrin)
อากริท๊อกซ์(Agritox)®	เม็ทตา-ซิสท๊อกซ์(Meta-Systox)®
บานอล(Banol)®	ไมเร็กซ์(mirex)
คาร์ซอล(Caezol)®	เพอเธน(Pertane)®
คลอเดน(chlordane)	ฟอสเวล(phosvel)
ดีดีที(DDT)	ไพราแมท(Pyramat)®
ไดซัลโฟตอน(disulfoton)	รอนเนล(ronnel)
เอ็นโดไธออน(endothion)	ไธเม็ท(Thimet)®
เอ็นโดซัลแฟน(endosulfan)	ไตรไธออน(Trithion)®

พวกที่ไม่มีพิษ ยากำจัดแมลงประเภทนี้สามารถฉีดพ่นได้รอบๆบริเวณที่มีรังผึ้งโดยผึ้งจะได้รับอันตรายน้อยที่สุด

อัลลีทริน(allethrin)	อีราเดกซ์(Eradex)®
อะราไมท์(Aramite)®	ไวรัส(Heliothis virus)
แบคทีเรีย(*Bacillus thuringiensis*)	เคนเธน(Kelthane)®
คลอโรเบนซิเลท(chlorobenzilate)	คีโพน(Kepone)®
ครีโอไลท์(cryolite)	มีนาซอน(menazon)
เดลเนฟ(Delnev)®	เม็ทธ๊อกซีคลอ(methoxychlor)
เดซซิน(Dessin)®	ไมทอกซ์(Mitox)®
ไดลาน(Dilan)®	เนมากอน(Nemagon)®
ไดล็อกซ์(Dylox)®	นิโคติน(nicotine)
โอไมท์(Omite)®	ซาราแดน(schradan)
โอเวกซ์(ovex)	ไรยาเนีย(ryania)
ไพรีทริน(pyrethrin)	เท็ทตระไดฟอน(tetradifon)
โล่ติน(rotenone)	ทอกซาฟีน(toxaphene)
ซาบาดิลลา(sabadilla)	ไตรคลอฟอน(trichlofon)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารเคมีที่ไม่เป็นพิษต่อผึ้งอีก 2 ประเภท ดังนี้

ยากำจัดเชื้อรา

อะราแซน(Arasan)®
บอร์โดซ์ มิกซ์เจอร์(bordeaux mixture)
แคปแตน(captan)
คอปเปอร์ ซัลเฟต(copper sulfate)
คิวปรัสออกไซด์(cuprous oxide)
ไซเพรกส์(Cyprex)®
เด็กซ์ซอน(Dexon)®
ไดโคลน(dichlone)
ไกลออกไซด์(Glyoxide)®
คาราเธน(Karathane)®
แมนเซท(Manzate)®
ไมโลน(Mylone)®
นาแบม(nabam)
โพรีแรม(Polyram)®
กำมะถัน(sulfur)
ไธนอน(Thynon)®
เซอร์เลท(Zerlate)®
เบนเลท(Benlate)®

ยากำจัดวัชพืช

อาทราซีน(atrazine)
อามิทรอล(amitrol)
แบนเวล(Banvel)®
คาพาโรล(Caparol)®
ดาลาพอน(dalapon)
เฮอร์บิแซน(Herbisan)®
เคิร์บ(Kerb)®
แลสโซ(Lasso)®
ลินรอน(linuron)
โมนูรอน(monuron)
พาราควอท(paraquat)
โพรพานิล(propanil)
ดีอีเอฟ(DEF)®
ไดควอท(diquat)
โดยรอน(diuron)
อีพีทีซี(EPTC)
โฟเลกซ์(Folex)®
ไอพีซี(IPC)
ซิมาซีน(simazine)
ซินบาร์(Sinbar)®
ทริสเบ็น(Trysben)®
เวจเจเดกซ์(Vegedex)®
ทู โฟ ดี(2,4-D)
ทู โฟ ไฟว์ ที(2,4,5,-T)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจัดกลุ่มของยากำจัดแมลงสามารถแบ่งตามลักษณะพิษตกค้างและเวลาที่ใช้ได้ 4 กลุ่ม ดังนี้ (แซนด์เลอร์, 1976)

1. พิษปานกลาง – สูง จะมีพิษตกค้างภายใน 10 ชั่วโมงหรือมากกว่า ข้อควรระวังคือห้ามใช้ในระหว่างที่ดอกบาน
2. พิษต่ำ – ปานกลาง จะมีพิษตกค้างภายใน 10 ชั่วโมง สามารถใช้ได้ในช่วงเย็นหลังจากที่ผึ้งเลิกบินออกหาอาหาร
3. พิษต่ำ – ปานกลาง จะมีพิษตกค้างภายใน 3 ชั่วโมง ทำการฉีดพ่นได้เมื่อผึ้งไม่ได้บินออกหาอาหาร
4. ไม่มีพิษตกค้าง – ต่ำ จะมีพิษตกค้างในขณะที่ทำการฉีดพ่นยาเท่านั้น สามารถฉีดได้ทุกเวลาโดยจะมีอันตรายต่อผึ้งน้อยมาก

ระดับความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (แอนเดอร์สัน และคณะ, 1971)

1. สารที่มีพิษสูง (highly toxic) มีค่า LD_{50} น้อยกว่า 2 μ g ต่อผึ้ง 1 ตัว
2. สารที่มีพิษปานกลาง (moderately toxic) มีค่า LD_{50} 2 – 10 μ g ต่อผึ้ง 1 ตัว
3. สารที่ไม่มีพิษ (relatively non – toxic) มีค่า LD_{50} มากกว่า 10 μ g ต่อผึ้ง 1 ตัว

สุรเทพ และคณะ(2542) การตรวจสอบโครงสร้างทางพันธุ์กรรมของประชากรผึ้งโพรงไทยโดยใช้บริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) และใช้ไพเมอร์ AM8 กับ AM11 ซึ่งออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอของผึ้งพันธุ์ mellifera วิธีการทดลองทำโดยการเก็บตัวอย่างผึ้งโพรงไทยตัวเต็มวัย จาก 6 พื้นที่ทางภูมิศาสตร์คือ 1) ภาคเหนือ 2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3) ภาคกลาง 4) ภาคใต้ 5) เกาะสมุยและ 6) เกาะภูเก็ต นำผึ้งที่ได้มาเก็บใน ethanol ที่แช่ในห้องเย็นหรือที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อรอการนำมาวิเคราะห์ภายหลัง ตัดเนื้อเยื่อบริเวณคอและกระเพาะอาหารของผึ้งเพื่อที่จะสกัดดีเอ็นเอจากส่วนนี้ (โดยวิธีของ Garnery et al., 1993) จากนั้นใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ในบริเวณควบคุมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยใช้ ไพเมอร์ AM8 (1439 - CTA TGA TAT ATA TAT TTA TTA TCT TTA TC-1411) และ AM11 (15369 – ACA ATT AAT CTA AAA AAC TAC AAC ATG – 15495) ซึ่งออกแบบจากลำดับ ดีเอ็นเอของผึ้งพันธุ์ mellifera (Crozier et al.,1992) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ TaqI , RsaI หรือ HinfI ในการตัดดีเอ็นเอบริเวณควบคุมที่เพิ่มปริมาณ โดยที่ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว จะสามารถแพร่ไปโดย electrophoresed ใน 1.5 %, 1.8 % agarose gel และ 2.0 % metaphor gel ตามลำดับ นำแผ่น gel ทั้งสองดังกล่าวที่มีดีเอ็นเออยู่มาแช่ใน ethidium bromide แล้วนำไปถ่ายรูปโดย photographed ภายใต้แสง UV

ผลที่ได้คือ จะได้คู่เบสจำนวน 2,750 และ 2,560 คู่เบสตามลำดับ หลังจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวในตัวอย่างผึ้งโพรงไทยจำนวน 125 รัง เมื่อตัดดีเอ็นเอบริเวณควบคุมที่เพิ่มปริมาณได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ TaqI, RsaI หรือ HinfI จะได้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอเป็น 2 , 3 และ 10 รูปแบบตามลำดับ เมื่อทำการรวมรูปแบบแถบดีเอ็นเอ จากการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะทั้ง 3 ชนิด จะได้รูปแบบรวมที่แตกต่างกันถึง 11 กลุ่ม เมื่อคำนวณค่า haplotype และ nucleotide diversity ระหว่าง 6 กลุ่มประชากรพบว่า กลุ่มประชากรผึ้งโพรงไทยทางตอนใต้ (ภาคใต้ เกาะสมุย และ เกาะภูเก็ต) มีค่าเฉลี่ย haplotype และ nucleotide diversity ต่ำ ส่วนกลุ่มประชากรผึ้งโพรงไทยทางตอนเหนือ (ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ ภาคกลาง) จะมีค่าเฉลี่ยทั้ง 2 ค่าสูง และค่าเฉลี่ยใน 6 พื้นที่คือ 0.425 % และ 0.58 % ตามลำดับ โดยมีค่า nucleotide diversity ระหว่างกลุ่มเป็น 3.8 %

จากการวิเคราะห์สร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการตามแบบ UPGMA ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มวิวัฒนาการ คือ กลุ่มผึ้งโพรงไทยทางตอนเหนือ (ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ ภาคกลาง) และกลุ่มผึ้งโพรงไทยทางตอนใต้ (ภาคใต้ เกาะสมุย และ เกาะภูเก็ต) เมื่อทำการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างผึ้งทุกกลุ่มพื้นที่ด้วย Monte Carlo Simulation (Chi-sQuare) และค่า Fst จะพบว่าสามารถแยกกลุ่มผึ้งโพรงไทยบนเกาะสมุยออกจากผึ้งโพรงไทยทางตอนใต้ ได้อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.0001)

ศิริพร และคณะ(2542) จากการวิจัยความหลากหลายของจีโนไทป์ ของผึ้งโพรงไทยในประเทศไทย ซึ่งแสดงโดยพอลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ ใน 5 พื้นที่ทั่วภูมิภาคของประเทศ ได้แก่ 1) ภาคเหนือ 2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3) ภาคกลาง 4) ภาคใต้ และ 5) เกาะสมุยตามลำดับ จากการวิเคราะห์บริเวณยีน ATPase 6 และ ATPase 8 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ 3 ชนิดคือ SspI, TaqI และ VspI ตามลำดับซึ่งทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction,PCR) ด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ เรียกเทคนิคนี้ว่า PCR-RFLP

เมื่อทำการคำนวณค่า haplotype และ nucleotide diversity จากตัวอย่างประชากรผึ้งทั้ง 5 พื้นที่แล้ว จะพบว่าประชากรผึ้งภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง มีค่าทั้ง 2 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประชากรผึ้ง ภาคใต้ เกาะสมุย และ (ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง) จะมีค่าทั้ง 2 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.0001)

ผลของการศึกษาดังกล่าว จึงทำให้สามารถแบ่งกลุ่มผึ้งโพรงไทยในประเทศไทย ได้เป็น 3 กลุ่มได้แก่ 1) กลุ่มผึ้งโพรงไทยทางภาคเหนือ (ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง) 2) กลุ่มผึ้งโพรงไทยทางตอนใต้ 3) กลุ่มผึ้งโพรงไทยเกาะสมุย ตามลำดับ

Hall และ Mcmichael(2001) ได้ศึกษาความใกล้เคียงทางภายภาพ (RFLPs) ที่ศึกษาโดยใช้ตำแหน่งภายในนิวเคลียสของประชากรผึ้ง Old และ New world Honeybee. สรุปได้ว่ามี *Apis mellifera mellifera* L. (west European), *A. m. ligustica* spinola, *A. m. caucasica* Garbacheu (East European) และ *A. m. scutellata* Lepelefier (African) แต่การศึกษาในที่นี้เพื่อที่จะศึกษาถึงบรรพบุรุษของ New world bee โดยศึกษาจากแถบของดีเอ็นเอที่สกัดจากไมโตรคอนเดรีย (mtDNA) ข้อมูลของผึ้งจาก USA. ก่อนที่จะมีการอพยพเข้ามาของผึ้ง African, east European bee. และ west European

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bee. มีค่าความถี่ 83 % และ 17 % ตามลำดับ และทำการศึกษาใหม่โดยจับผึ้งจากประเทศทางแถบเขตร้อนของทวีปอเมริกา คือประเทศเม็กซิโกและฮอนดูรัส จากผลการทดลองโดยใช้แถบ mtDNA สรุปว่าผึ้งโดยส่วนใหญ่เป็น African bee แต่ข้อมูลที่ถูกค้นพบก่อนหน้านั้นกล่าวว่าจะไม่พบ east European หรือพบน้อยมากในพื้นที่นี้ ถึงอย่างไรก็ตามยังสามารถพบผึ้ง west European ได้ 26 % - 31 % เนื่องจากลูกหลานที่เป็นราชินีของผึ้ง African ได้ทำการผสมพันธุ์กับผึ้งตัวผู้ของ west European ทำให้มีประชากรผึ้ง African สามารถกระจายตัวได้อย่างกว้างขวาง จากผลการทดลองนี้จึงเป็นจุดที่ชี้ให้เห็นว่า ผึ้ง east European เพศผู้เป็นตัวควบคุมการกกระจายตัวของผึ้ง African bee ในเขตร้อนของทวีปอเมริกา

Hall และ Smith(1991) ได้รายงานว่า ก่อนที่การศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอ จะถูกเผยแพร่มาใช้ในการศึกษาประชากรผึ้งแอฟริกัน (*Apis mellifera*) ในเขตร้อนของทวีปอเมริกาให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ดังนั้นเขาจึงต้องทำการทดสอบดีเอ็นเอเพื่อเป็นการยืนยันข้อมูล ที่ได้ทำการทดสอบไปแล้วเพื่อติดตามผลการแพร่กระจายตัวของผึ้งแอฟริกันในทวีปอเมริกา โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ช่วยในการสกัด mtDNA ของผึ้งแอฟริกันและผึ้งยุโรป เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการจำแนกตามความแตกต่างของผึ้งทั้งสองชนิดนี้ โดยเขาทำการสุ่มพับผึ้งทั้งสองชนิดจากพื้นที่ในทวีปอเมริกา และทางตอนเหนือของเม็กซิโก โดยผลที่ได้จากการสกัด mtDNA จะสามารถแบ่งตัวอย่างผึ้ง จากฝั่งยุโรปออกได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ ผึ้งยุโรปตะวันออก และผึ้งยุโรปตะวันตก และผึ้งทางเขตร้อนของทวีปอเมริกา มีถึง 12 พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่เป็นสายพันธุ์แอฟริกัน และมี 4 พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่เป็นสายพันธุ์ยุโรเพราะฉะนั้น ผลการทดลองที่ได้จึงเป็นการสนับสนุน ข้อสรุปเบื้องต้นว่า ผึ้งในแถบเขตร้อนของทวีปอเมริกาเป็นผึ้งแอฟริกันที่อพยพกระจายตัวเข้ามาอาศัยอยู่ และจากการวิเคราะห์ผลของการสกัด mtDNA ทางสถิติแสดงให้เห็นว่า ผึ้งแอฟริกันสายพันธุ์เก่า และสายพันธุ์ใหม่มีความแตกต่างกัน

Meixner และคณะ(2000) รายงานว่าจาก 34 ตัวอย่างของผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera monticola* และ *A. m. scutellata* จาก 3 รัฐของประเทศเคนยา นำมาใช้วิเคราะห์ความแปรผัน mtDNA โดยมี 6 – base และ 4 – base เป็นเอนไซม์ที่ใช้ควบคุมกับ Hpaii และ Alui ซึ่งได้ผลรูปแบบ halotype ที่มีความแตกต่างกัน 3 รูปแบบ ขณะที่ halotypes ชนิดที่ 2 และ 3 เป็นตัวอย่างที่นำมาจากป่าภูเขา และ halotype ที่ 1 ถูกค้นพบใน *A. m. scutellata* โดยตัวอย่างทั้งหมดนำมาจาก Ngong Hills โดยเราจะไม่พบ mtDNA ของผึ้งพันธุ์ *A. m. scutellata* ในสภาพแวดล้อมแบบภูเขา และพบตัวอย่าง mtDNA ของผึ้งพันธุ์ *A. m. monticola* เพียงเล็กน้อยในสภาพแวดล้อมของทุ่งหญ้า Savanna สิ่งเหล่านี้จึงเป็นเหตุผลที่ใช้สนับสนุนทฤษฎีที่ว่า *A. m. monticola* เป็น subspecies และอยู่ในสภาพแวดล้อมคนละแบบกับผึ้งพันธุ์ *A. m. scutellata* ดังนั้นจึงมีการควบคุมลักษณะทางกายภาพนำมากำหนดลงบนแผนที่ส่วนอีก 10 ตัวอย่าง คือ *A. m. litorea* นำมาจากแถบชายฝั่งของประเทศเคนยา โดยใช้การวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
99158

แบบ PCR หลังจากที่ทำการวิเคราะห์ได้ผลสรุปว่าตัวอย่างทั้งหมดเป็นผึ้งพันธุ์ที่ผสมกันระหว่างพันธุ์ *A. m. litorea* (n) และ *A. m. scutellata* (n)

Franck และคณะ(2000) รายงานว่าจากการศึกษา mtDNA จากผึ้ง 75 พื้นที่ของประเทศเลบานอน โดยใช้การทดลองวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) ใช้ COI - COII เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากการสังเกตว่า haplotypes ตำแหน่งที่ 7 มีความแตกต่างจึงทำให้ทราบว่า เป็นผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* อันดับของ nucleotide ของเบสคู่ที่ 380 ซึ่งเป็นส่วนของ $NADH_2$ ที่ได้จาก halotype ที่ 2 แสดงค่าใกล้เคียงกันมากกับผึ้งพันธุ์ *A. m. lamarkii* และ *A. m. meda* จากการสุ่มตัวอย่างประชากร ชี้ว่าประชากรผึ้งแถบตะวันออกที่ตำแหน่ง นิวเคลียสก่อนตัวแหน่งที่ 3 มีความแตกต่าง จึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นผึ้งในสายพันธุ์ *A. mellifera*

Hall(2000) กล่าวว่าเมื่อ 7 ปีที่แล้วทางตอนใต้ของประเทศ USA เริ่มมีการศึกษาประชากรผึ้งแอฟริกา โดยศึกษาจากตัวอย่างเหล็กไน และคุณลักษณะที่ไม่ดีอื่น ๆ ภายในแถบเขตร้อนของทวีปอเมริกา เนื่องจากฝั่งแอฟริกา กำลังอพยพย้ายเข้ามาแทนที่ ประชากรผึ้งยุโรปที่มีอยู่เดิมซึ่งก็ได้ทำให้เกิดปัญหากับธุรกิจเลี้ยงผึ้ง โดยในประเทศสหรัฐอเมริกาทำให้หน่วยงานด้านธุรกิจทางการเกษตรด้านการเพาะเลี้ยงผึ้ง เพื่อผลิตน้ำผึ้งนั้นประสบปัญหา จากรายงานข้อมูลการศึกษาดีเอ็นเอในแถบเขตร้อนของทวีปอเมริกา ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า การกระจายตัวของผึ้งแอฟริกาสายพันธุ์ที่พบนั้นยังไม่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์แม่เนื่องจากยังไม่มีการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ (hybrid) กับผึ้งยุโรปเพศผู้ ซึ่งจากการที่ผึ้งแอฟริกา ได้มีการผสมข้ามสายพันธุ์จึงทำให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมทางแถบเขตร้อนของทวีปอเมริกาได้ดี จากข้อมูลนี้ก็ยังไม่สามารถยืนยันแน่นอนได้ ดังนั้นเราจึงจำเป็นต้องลดการผสมข้ามสายพันธุ์ของผึ้ง โดยก่อนหน้านี้ได้มีการค้นพบว่าการผสมข้ามสายพันธุ์นั้นจะขึ้นกับขบวนการเมตาบอลิซึม ดังนั้นเราจึงจำเป็นต้องมีความเข้าใจในปัจจัยที่มีผลต่อการผสมข้ามสายพันธุ์ เพราะว่าจากการศึกษาคุณลักษณะของผึ้งแอฟริกาในประเทศสหรัฐอเมริกาและการอพยพของผึ้งทางตอนเหนือของแอฟริกา พบว่าปัจจัยที่เป็นปัจจัยหลักที่จะใช้ควบคุมคือขบวนการ hybridization ร่วมกับการทำการสกัดดีเอ็นเอจะได้ใช้เป็นข้อมูลเอกสารให้กับประเทศเม็กซิโกและรัฐเท็กซัสถึงข้อมูลทางสถิติทางฝ่ายตัวเมียและตัวผู้ที่มีผลต่อขบวนการผสมข้ามสายพันธุ์ในแถบเขตร้อนของประเทศเม็กซิโกผึ้งแอฟริกามีการปรับตัวได้ดีมาก แต่ในแถบใต้ของรัฐเท็กซัสผึ้งแอฟริกาและยุโรปอาจจะมีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับพื้นที่ได้ดีพอ ๆ กับที่นั้นเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงขอยืนยันว่าได้มีการผสมข้ามสายพันธุ์กันในผึ้งในท้องที่เดิมเพราะถ้าหากว่าไม่มีการผสมพันธุ์ก็จะมีผลต่อการอยู่รอดของผึ้งได้

Smith และคณะ(2000) รายงานว่า จากการศึกษาข้อมูลใหม่เพิ่มเติมจากประเทศเกาหลี และประเทศฟิลิปินส์ โดยวิธีสกัดดีเอ็นเอจากไมโตรคอนเดรีย (mtDNA) ซึ่งเป็นการศึกษาพื้นฐาน Phylogeography ของผึ้งแถบทวีปเอเชีย โดยพบว่าจะไม่มีแถบรหัสระหว่างกรดอะมิโนลิวซีน (Leucine) บนตำแหน่ง tRNA และตำแหน่ง OxidaseII ของ Cytochrome ในไมโตรคอนเดีย เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดที่ผึ้งที่จับมาจาก 153 พื้นที่ เป็นพันธุ์ *Apis cerana* และ *A. nigrocincta* จากรายงานมี 41 ชนิด ชนิดที่มีความแตกต่างเป็นพวก haplotypes (มีโครโมโซม n เดียว) มี 5 ชนิดที่ไม่สามารถจัดให้เข้าพวกกับชนิดอื่น ๆ ได้ โดย 2 ชนิด (จากประเทศอินเดีย และศรีลังกา) เพราะแถบดีเอ็นเอมีความผิดปกติ เกิดที่ตำแหน่ง A + Trich และอีก 3 ชนิด (จากประเทศไตหวัน ,ฟิลิปินส์ และพันธุ์ *A. nigrocincta)* เพราะจากการทดลองทั้งหมดไม่มีแถบรหัสปรากฏ และอีก 36 ชนิดที่เหลือมีแถบดีเอ็นเอ จัดอยู่ในแนวเดียวกัน จึงใช้เป็นตัววิเคราะห์ทาง Polygenetic พื้นฐานของประชากรผึ้งในพันธุ์ *Apis cerana* และ *A. nigrocincta* โดยผลของทั้งคู่มีความคล้ายคลึงกันและสามารถจำมาใช้ยึดถือในการวิเคราะห์ของข้อมูลได้ พวกเราสามารถพบ 5 กลุ่มหลัก ในกลุ่มพวกมีโครโมโซม n เดียว ได้แก่ กลุ่มหมู่เกาะเอเชียแผ่นดินใหญ่, กลุ่มหมู่เกาะซันดาแลนด์, หมู่เกาะพาลากวัน, กลุ่ม Luzon – Mindanao และพันธุ์ *A. nigrocincta* การแพร่กระจายเหล่านี้จะปรากฏใน mtDNA ของพวกที่มีโครโมโซม n เดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และสารที่ใช้ในวิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง

อุปกรณ์

1. pH meter ยี่ห้อ accumet รุ่น AR 15
2. เครื่องชั่งสาร ยี่ห้อ precisa รุ่น XT 220A
3. เครื่อง incubate ยี่ห้อ memmert รุ่น WBU 45
4. เครื่อง vortex gennie 2
5. centrifuge ยี่ห้อ hermle รุ่น Z 323
6. micropipete
7. microtube
8. เครื่องอบตะกอน digital dry bath incubator ยี่ห้อ bockel

สาร

1. STE buffer (50mM Tris - HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, 100mM NaCl)
2. 20 % SDS
3. 10 mg/ml proteinase k
4. phenol
5. phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1)
6. chloroform:isoamyl (24:1)
7. 3M sodium acetate pH 5.0
8. absolute ethanol
9. 70 % ethanol
10. TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารที่ใช้ในวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ

1. buffer (0.2M sucrose, 0.1M Tris, 0.1M NaCl, 0.05M EDTA, 0.5 % SDS, pH 9.2)
2. 20 % SDS
3. 10 mg/ml proteinase k
4. 3M potassium acetate
5. Isopropanol
6. 70 % ethanol
7. TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)

อุปกรณ์และสารที่ใช้ในวิธีการ electrophoresis

อุปกรณ์

1. เครื่อง gelmate รุ่น 2000
2. gel photodocumentation system รุ่น UP-D895
3. เครื่องฉายแสง UV ยี่ห้อ bio imaging systems

สาร

1. agarose
2. TBE 1X
3. ethidiumbromide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

วิธีการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ ผู้ทดลองจะใช้ผึ้งมิ้มในการสกัดหาปริมาณดีเอ็นเอก้อน ทั้งนี้เพื่อการศึกษาถึงเทคนิควิธีการต่างๆ และหาข้อสรุปว่าเทคนิคไหนที่สามารถให้ปริมาณดีเอ็นเอก้อนสูงสุด โดยสามารถแบ่งการทดลองได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ ประกอบด้วยส่วนที่1 เทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง (control treatment1 treatment2 treatment3 treatment4) และ ส่วนที่2 เทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ (treatment5)

การทดลองส่วนที่ 1 เทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง

วิธีการสกัดของ control

1. นำผึ้งมิ้มตัวเต็มวัยมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
2. นำผึ้งที่เก็บไว้มาแช่ในแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนท้อง ขาและปีกออก คงเหลือแต่ส่วนหัวและอกเท่านั้น
3. นำชิ้นส่วนผึ้งที่ได้ใส่ใน microtube ตัวอย่างละหลอด
4. เติมสาร STE buffer 500 $\mu\ell$ ใน 1.5 ml ลงในแต่ละ microtube
5. ใช้กรรไกรตัดชิ้นส่วนของผึ้งในหลอดให้ละเอียดที่สุด
6. เติม 25 $\mu\ell$ 20 % SDS และ 25 $\mu\ell$ 10 mg/ml proteinase k
7. เขย่าด้วยเครื่อง vortex genie 2 นาน 1 นาที
8. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที
9. เติม 500 $\mu\ell$ phenol
10. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
11. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
12. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
13. เติม 500 $\mu\ell$ phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1)
14. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
15. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
16. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
17. เติม 500 $\mu\ell$ chloroform:isoamyl (24:1)
18. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
19. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
20. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
21. เติม 50 $\mu\ell$ 3M sodium acetate และ 1,000 $\mu\ell$ absolute ethanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

22. เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส 1 คืน
23. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
24. ในขั้นตอนนี้จะได้ตะกอนที่ก้นหลอด ให้เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือไว้แต่ตะกอน
25. เติม 500 $\mu\ell$ 70 % ethanol
26. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
27. เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือแต่ตะกอน
28. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 25 - 27
29. เข้าเครื่อง digital dry bath incubator เป็นเวลา 45 นาที
30. เมื่อได้ตะกอนที่แห้งแล้ว ให้เติม 50 $\mu\ell$ TE buffer จากนั้นเขย่าเบาๆ ด้วยมือเพื่อให้ตะกอนละลายหมด
31. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
32. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
33. นำดีเอ็นเอที่เก็บไว้มา electrophoresis เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอก้อน

วิธีการสกัดของ treatment1

1. นำผึ้งมิ้มตัวเต็มวัยมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
2. นำผึ้งที่เก็บไว้มาแช่ในแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนท้อง ขาและปีกออก คงเหลือแต่ส่วนหัวและอกเท่านั้น
3. นำชิ้นส่วนผึ้งที่ได้ใส่ใน microtube ตัวอย่างละหลอด
4. เติมสาร STE buffer 500 $\mu\ell$ ใน 1.5 ml ลงในแต่ละ microtube
5. ใช้กรรไกรตัดชิ้นส่วนของผึ้งในหลอดให้ละเอียดที่สุด
6. เติม 25 $\mu\ell$ 20 % SDS และ 25 $\mu\ell$ 10 mg/ml proteinase k
7. เขย่าด้วยเครื่อง vortex genie 2 นาน 1 นาที
8. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
9. เติม 500 $\mu\ell$ phenol
10. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
11. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
12. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
13. เติม 500 $\mu\ell$ phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1)
14. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
15. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
16. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. เติม 500 $\mu \ell$ chloroform:isoamyl (24:1)
18. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
19. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
20. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
21. เติม 50 $\mu \ell$ 3M sodium acetate และ 1,000 $\mu \ell$ absolute ethanol
22. เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส 1 คืน
23. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
24. ในขั้นตอนนี้จะได้ตะกอนที่ก้นหลอด ให้เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือไว้แต่ตะกอน
25. เติม 500 $\mu \ell$ 70% ethanol
26. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
27. เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือแต่ตะกอน
28. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 25 - 27
29. เข้าเครื่อง digital dry bath incubator เป็นเวลา 45 นาที
30. เมื่อได้ตะกอนที่แห้งแล้ว ให้เติม 50 $\mu \ell$ TE buffer จากนั้นเขย่าเบาๆ ด้วยมือเพื่อให้ตะกอนละลายหมด
31. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
32. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
33. นำดีเอ็นเอที่เก็บไว้มา electrophoresis เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอก้อน

วิธีการสกัดของ treatment2

1. นำผึ้งมิ้มตัวเต็มวัยมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
2. นำผึ้งที่เก็บไว้มาแช่ในแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนท้อง ขาและปีกออก คงเหลือแต่ส่วนหัวและอกเท่านั้น
3. นำชิ้นส่วนผึ้งที่ได้ใส่ใน microtube ตัวอย่างละหลอด
4. เติมสาร STE buffer 250 $\mu \ell$ ใน 1.5 ml ลงในแต่ละ microtube
5. ใช้กรรไกรตัดชิ้นส่วนของผึ้งในหลอดให้ละเอียดที่สุด
6. เติม 12.5 $\mu \ell$ 20 % SDS และ 12.5 $\mu \ell$ 10mg/ml proteinase k
7. เขย่าด้วยเครื่อง vortex genie 2 นาน 1 นาที
8. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
9. เติม 250 $\mu \ell$ phenol
10. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
11. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
13. เติม 250 $\mu \ell$ phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1)
14. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
15. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
16. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
17. เติม 250 $\mu \ell$ chloroform:isoamyl (24:1)
18. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
19. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
20. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
21. เติม 25 $\mu \ell$ 3M sodium acetate และ 500 $\mu \ell$ absolute ethanol
22. เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส 1 คืน
23. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
24. ในขั้นตอนนี้จะได้ตะกอนที่ก้นหลอด ให้เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือไว้แต่ตะกอน
25. เติม 250 $\mu \ell$ 70 % ethanol
26. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
27. เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือแต่ตะกอน
28. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 25 - 27
29. เข้าเครื่อง digital dry bath incubator เป็นเวลา 45 นาที
30. เมื่อได้ตะกอนที่แห้งแล้ว ให้เติม 25 $\mu \ell$ TE buffer จากนั้นเขย่าเบาๆ ด้วยมือเพื่อให้ตะกอนละลายหมด
31. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
32. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
33. นำดีเอ็นเอที่เก็บไว้มา electrophoresis เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอก้อน

วิธีการสกัดของ treatment3

1. นำผึ้งมิ้มตัวเต็มวัยมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
2. นำผึ้งที่เก็บไว้มาแช่ในแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนท้อง ขาและปีกออก คงเหลือแต่ส่วนหัวและอกเท่านั้น
3. นำชิ้นส่วนผึ้งที่ได้ใส่ใน microtube ตัวอย่างละหลอด
4. เติมสาร STE buffer 500 $\mu \ell$ ใน 1.5 ml ลงในแต่ละ microtube
5. ใช้กรรไกรตัดชิ้นส่วนของผึ้งในหลอดให้ละเอียดที่สุด
6. เติม 25 $\mu \ell$ 20 % SDS และ 25 $\mu \ell$ 10mg/ml proteinase k

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เขย่าด้วยเครื่อง vortex genie 2 นาน 1 นาที
8. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
9. เติม 500 $\mu\ \ell$ phenol
10. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
11. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
12. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
13. เติม 500 $\mu\ \ell$ phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1)
14. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
15. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
16. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
17. เติม 500 $\mu\ \ell$ chloroform:isoamyl (24:1)
18. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
19. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
20. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
21. เติม 50 $\mu\ \ell$ 3M sodium acetate และ 1,000 $\mu\ \ell$ absolute ethanol
22. เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส 1 คืน
23. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
24. ในขั้นตอนนี้จะได้ตะกอนที่ก้นหลอด ให้เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือไว้แต่ตะกอน
25. เติม 500 $\mu\ \ell$ 70 % ethanol
26. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
27. เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือแต่ตะกอน
28. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 25 – 27
29. เข้าเครื่อง digital dry bath incubator เป็นเวลา 45 นาที
30. เมื่อได้ตะกอนที่แห้งแล้ว ให้เติม 50 $\mu\ \ell$ TE buffer จากนั้นเขย่าเบาๆ ด้วยมือเพื่อให้ตะกอนละลายหมด
31. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
32. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
33. นำดีเอ็นเอที่เก็บไว้มา electrophoresis เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอก้อน

วิธีการสกัดของ treatment4

1. นำผึ้งมิ้มตัวเต็มวัยมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. นำผึ้งที่เก็บไว้มาแช่ในแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนท้อง ขาและปีกออก คงเหลือแต่ส่วนหัวและอกเท่านั้น
3. นำชิ้นส่วนผึ้งที่ได้ใส่ใน microtube ตัวอย่างละหลอด
4. เติมสาร STE buffer 250 $\mu\ell$ ใน 1.5 ml ลงในแต่ละ microtube
5. ใช้กรรไกรตัดชิ้นส่วนของผึ้งในหลอดให้ละเอียดที่สุด
6. เติม 12.5 $\mu\ell$ 20 % SDS และ 12.5 $\mu\ell$ 10 mg/ml proteinase k
7. เขย่าด้วยเครื่อง vortex genie 2 นาน 1 นาที
8. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
9. เติม 250 $\mu\ell$ phenol
10. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
11. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
12. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
13. เติม 250 $\mu\ell$ phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1)
14. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
15. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
16. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
17. เติม 250 $\mu\ell$ chloroform:isoamyl (24:1)
18. เขย่าให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 2 นาที
19. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 rpm 10 นาที
20. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
21. เติม 25 $\mu\ell$ 3M sodium acetate และ 500 $\mu\ell$ absolute ethanol
22. เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส 1 คืน
23. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
24. ในขั้นตอนนี้จะได้ตะกอนที่ก้นหลอด ให้เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือไว้แต่ตะกอน
25. เติม 250 $\mu\ell$ 70 % ethanol
26. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
27. เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือแต่ตะกอน
28. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 25 - 27
29. เข้าเครื่อง digital dry bath incubator เป็นเวลา 45 นาที
30. เมื่อได้ตะกอนที่แห้งแล้ว ให้เติม 25 $\mu\ell$ TE buffer จากนั้นเขย่าเบาๆ ด้วยมือเพื่อให้ตะกอนละลายหมด
31. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

32. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
33. นำดีเอ็นเอที่เก็บไว้มา electrophoresis เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอก้อน

การทดลองส่วนที่ 2 เทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ

วิธีการสกัดของ treatment 5

1. นำผึ้งมิ้มตัวเต็มวัยมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
2. นำผึ้งที่เก็บไว้มาแช่ในแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนท้อง ขาและปีกออก คงเหลือแต่ส่วนหัวและอกเท่านั้น
3. นำชิ้นส่วนผึ้งที่ได้ใส่ใน microtube ตัวอย่างละหลอด
4. เติมสาร buffer 500 $\mu\ell$ ลงในแต่ละ microtube
5. ใช้กรรไกรตัดชิ้นส่วนของผึ้งในหลอดให้ละเอียดที่สุด
6. เติม 25 $\mu\ell$ 20 % SDS และ 25 $\mu\ell$ 10mg/ml proteinase k
7. เขย่าด้วยเครื่อง vortex genie 2 นาน 1 นาที
8. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
9. เติม 75 $\mu\ell$ 8M potassium acetate
10. นำไป incubate บนน้ำแข็ง 60 นาที
11. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 rpm 15 นาที
12. ย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่ microtube หลอดใหม่
13. เติม Isopropanol ในปริมาณที่เท่ากันกับสารละลายใสที่มีอยู่ใน microtube
14. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 rpm 15 นาที
15. ในขั้นตอนนี้จะได้ตะกอนที่ก้นหลอด ให้เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือแต่ตะกอน
16. เติม 500 $\mu\ell$ 70 % ethanol
17. เข้าเครื่อง centrifuge ที่ 12,000 rpm 10 นาที
18. เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คงเหลือแต่ตะกอน
19. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 16-18
20. เข้าเครื่อง digital dry bath incubator เป็นเวลา 45 นาที
21. เมื่อได้ตะกอนที่แห้งแล้ว ให้เติม 50 $\mu\ell$ TE buffer จากนั้นเขย่าเบาๆ ด้วยมือเพื่อให้ตะกอนละลายหมด
22. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
23. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
24. นำดีเอ็นเอที่เก็บไว้มา electrophoresis เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอก้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

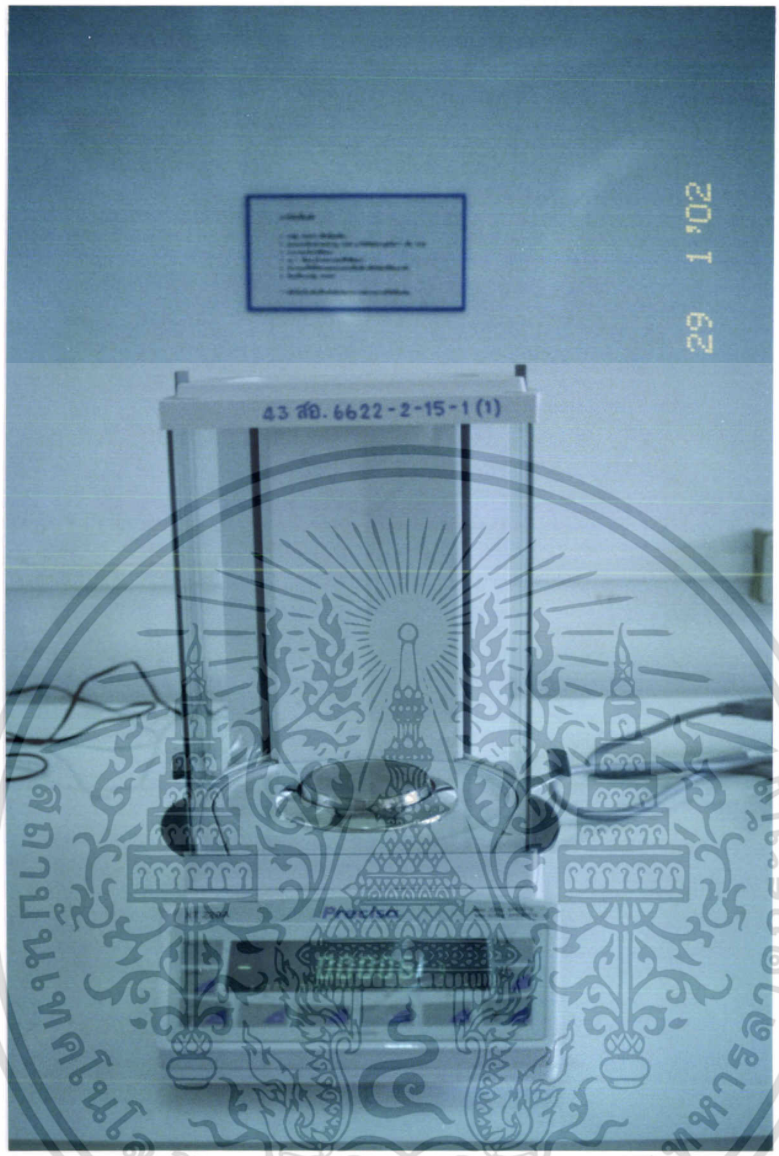
วิธีการ electrophoresis

1. เตรียม 0.3 g agarose ใน TBE1X 50ml
2. นำไปอุ่น 1 นาที เพื่อให้ gel ละลาย
3. เท gel ลง บล็อกพิมพ์
4. ทิ้งไว้ 45 นาทีเพื่อให้ gel แข็งตัว จากนั้นทำการหยอดดีเอ็นเอลงหลุม โดยใช้ดีเอ็นเอ 8 $\mu\ell$ ผสมกับสี 2 $\mu\ell$
5. เปิดเครื่อง gelmate โดยใช้กระแสไฟ 50V เป็นเวลา 50 นาที
6. เมื่อเสร็จแล้วให้นำ gel ไปแช่ใน ethidium bromide 15 นาที จากนั้นแช่ในน้ำกลั่นอีก 5 นาที
7. นำแผ่น gel ไปถ่ายรูปภายใต้แสง UV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

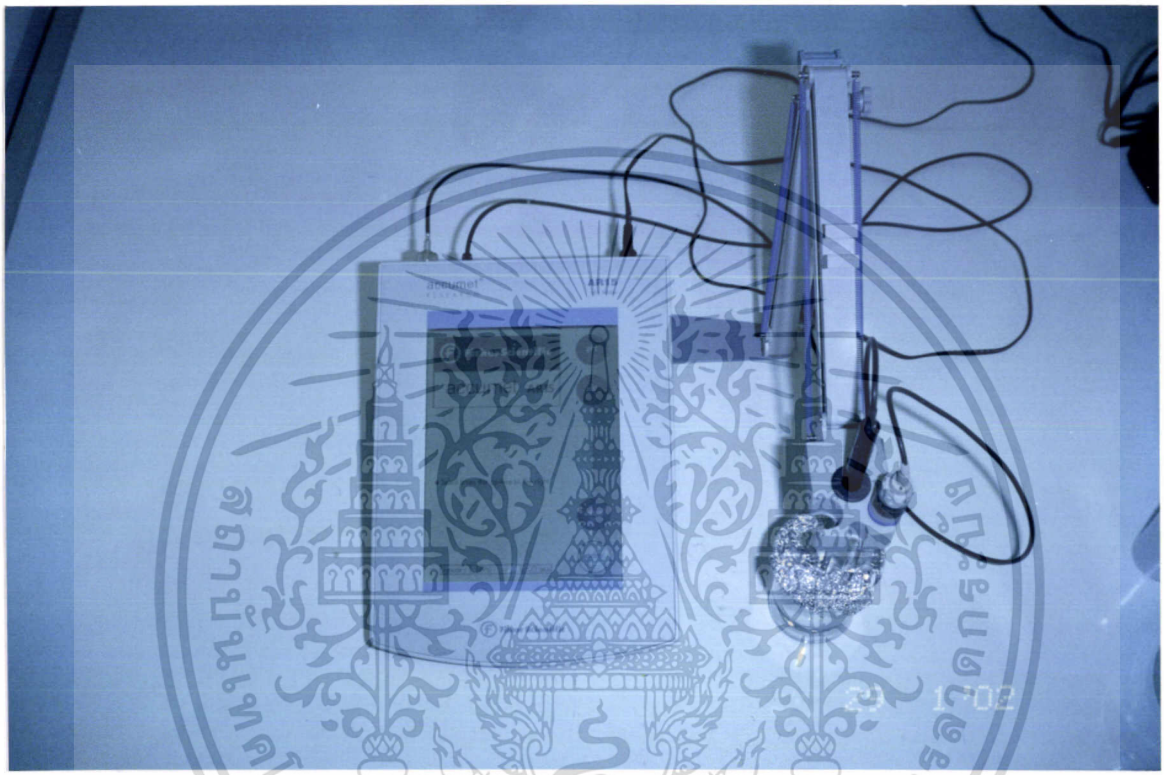
ภาพที่ 5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



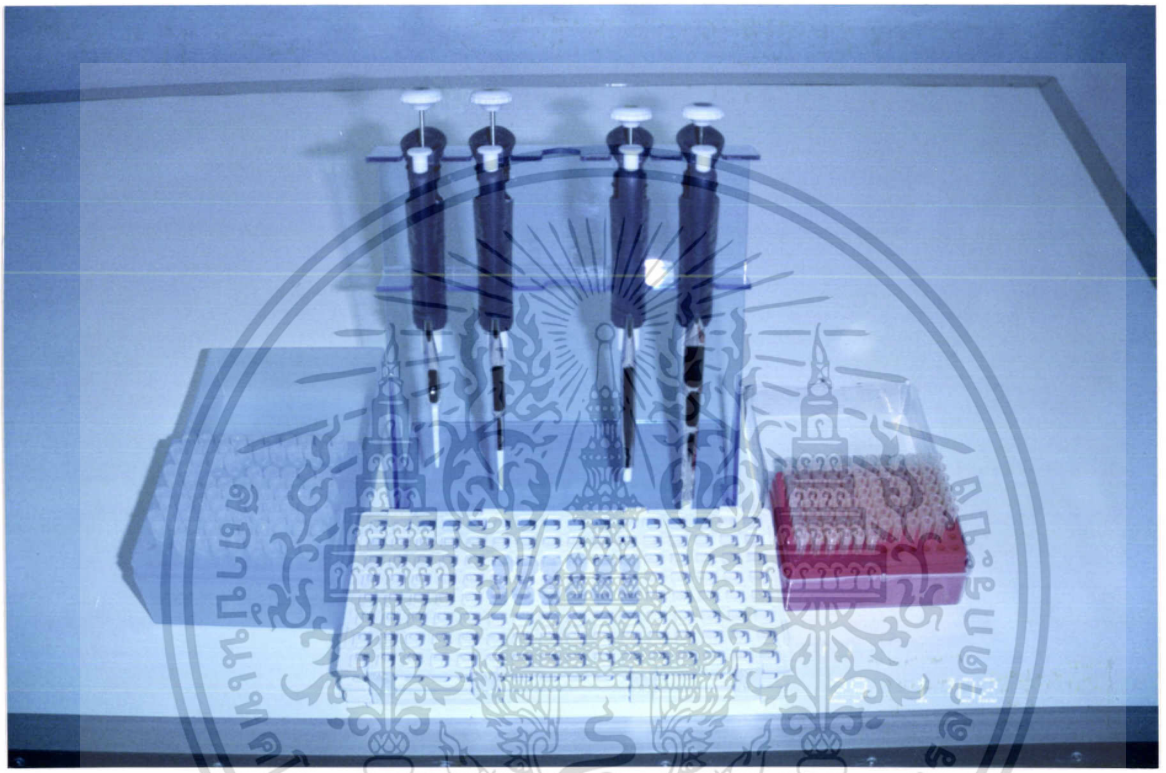
ภาพที่ 6. แสดงเครื่องชั่งสาร ยี่ห้อ precisa รุ่น XT 220A ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7. แสดงเครื่อง pH meter ยี่ห้อ accumet รุ่น AR 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

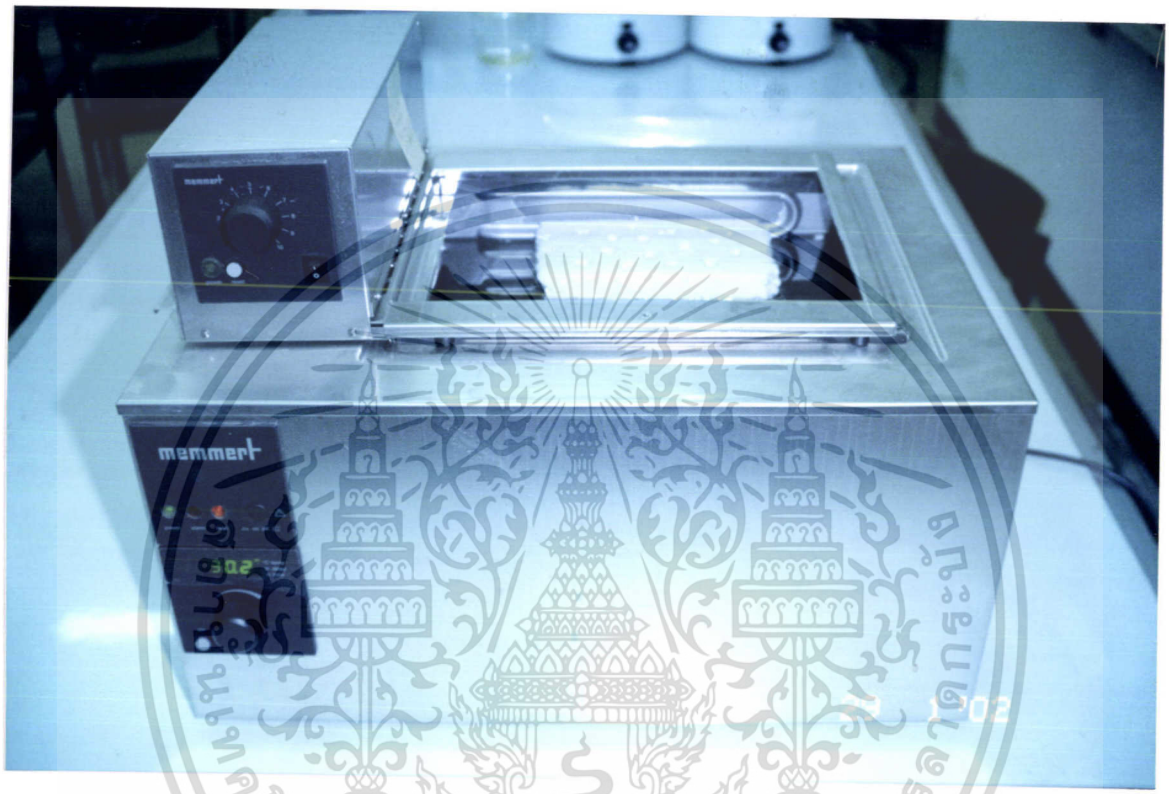


ภาพที่ 8. แสดงอุปกรณ์ micropipete และ microtube

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

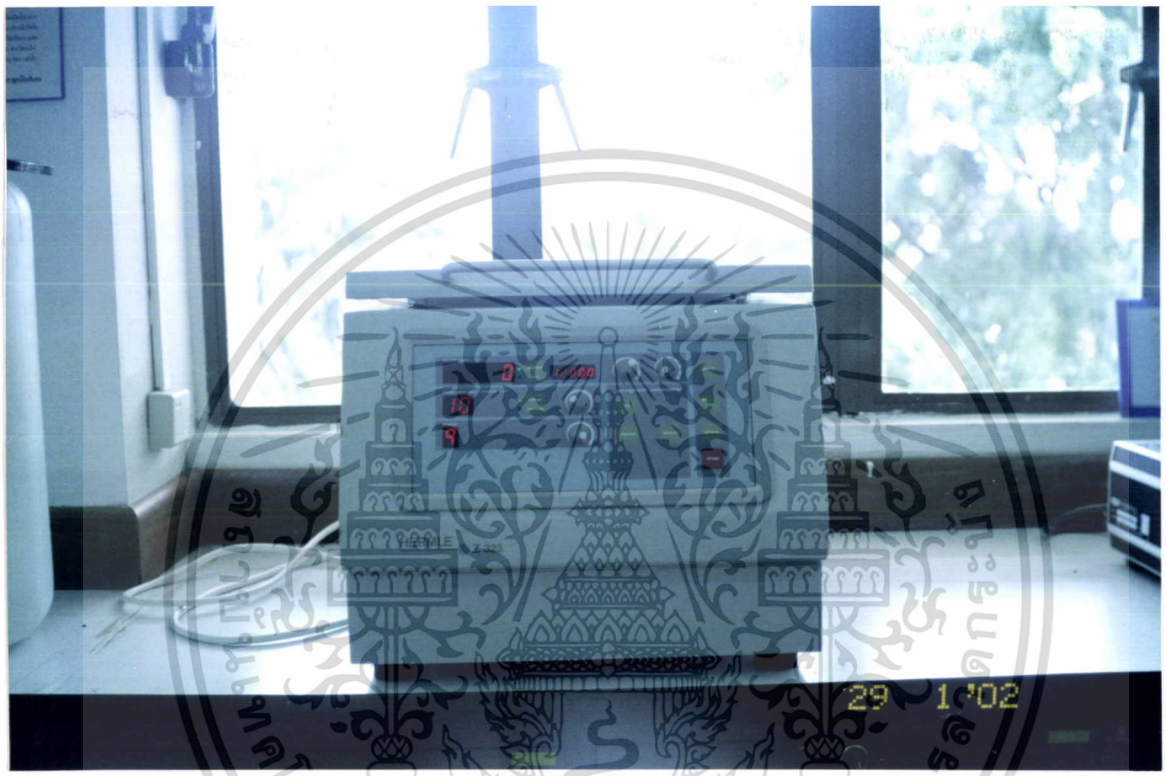
ภาพที่ 9. แสดงเครื่อง vortex gennie 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



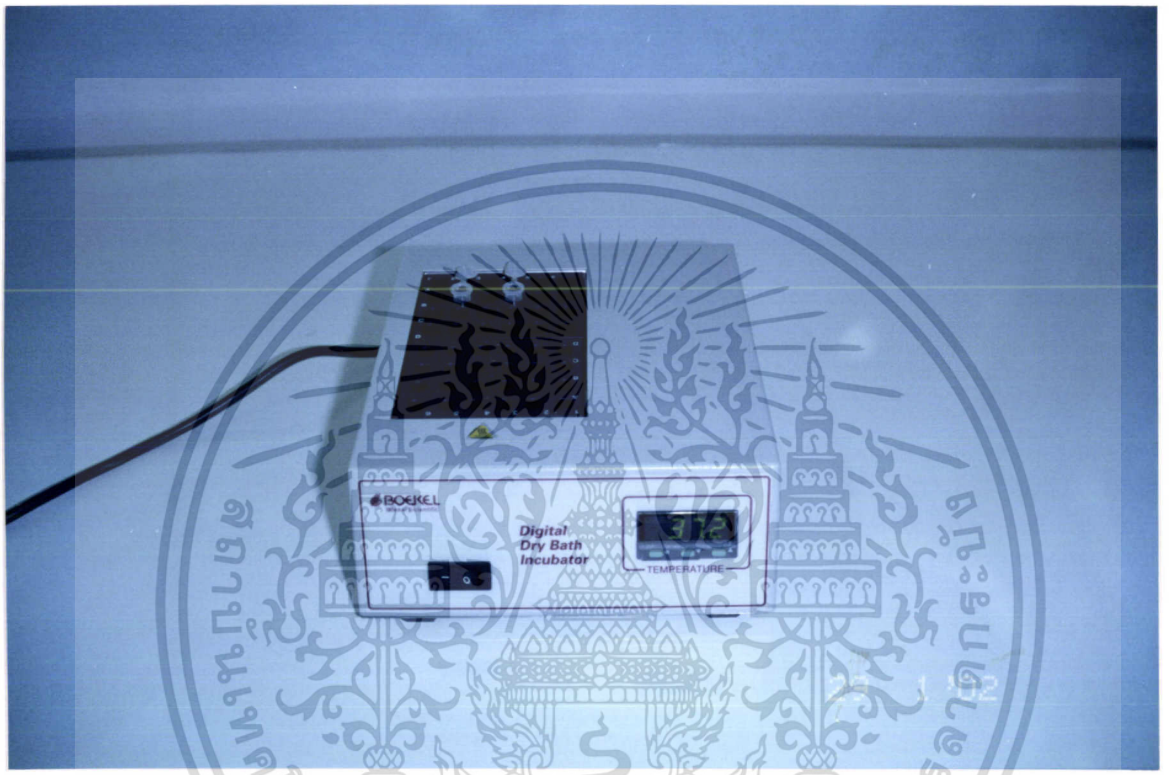
ภาพที่ 10. แสดงเครื่อง incubate ยี่ห้อ memmert รุ่น WBU 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



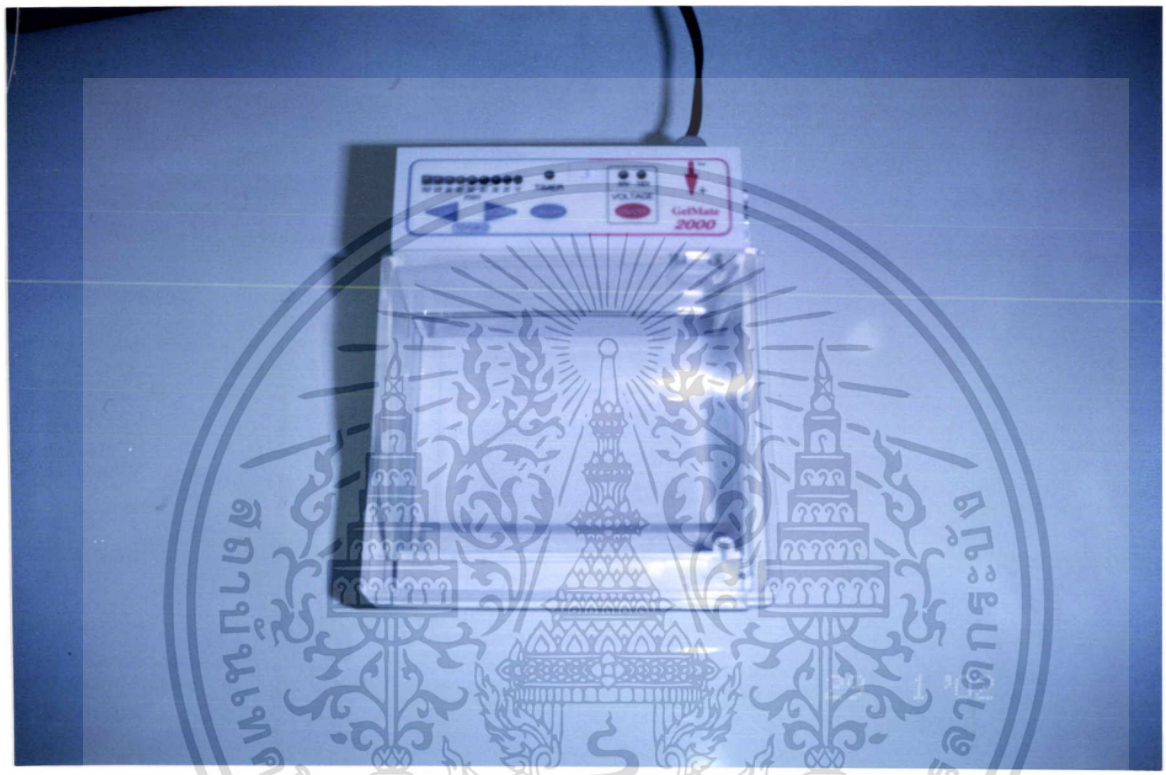
ภาพที่ 11. แสดงเครื่อง centrifuge ยี่ห้อ hermle รุ่น Z 323

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



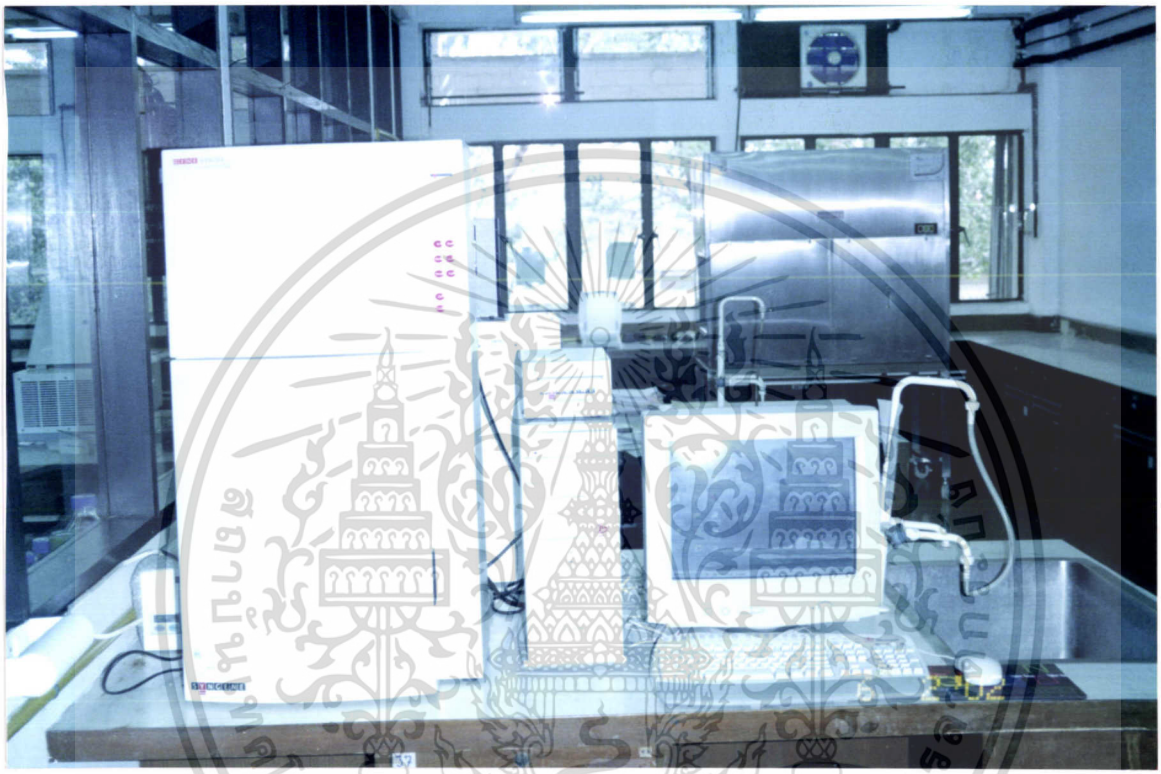
ภาพที่ 12. แสดงเครื่องอบตะกอน digital dry bath incubator ยี่ห้อ boekel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



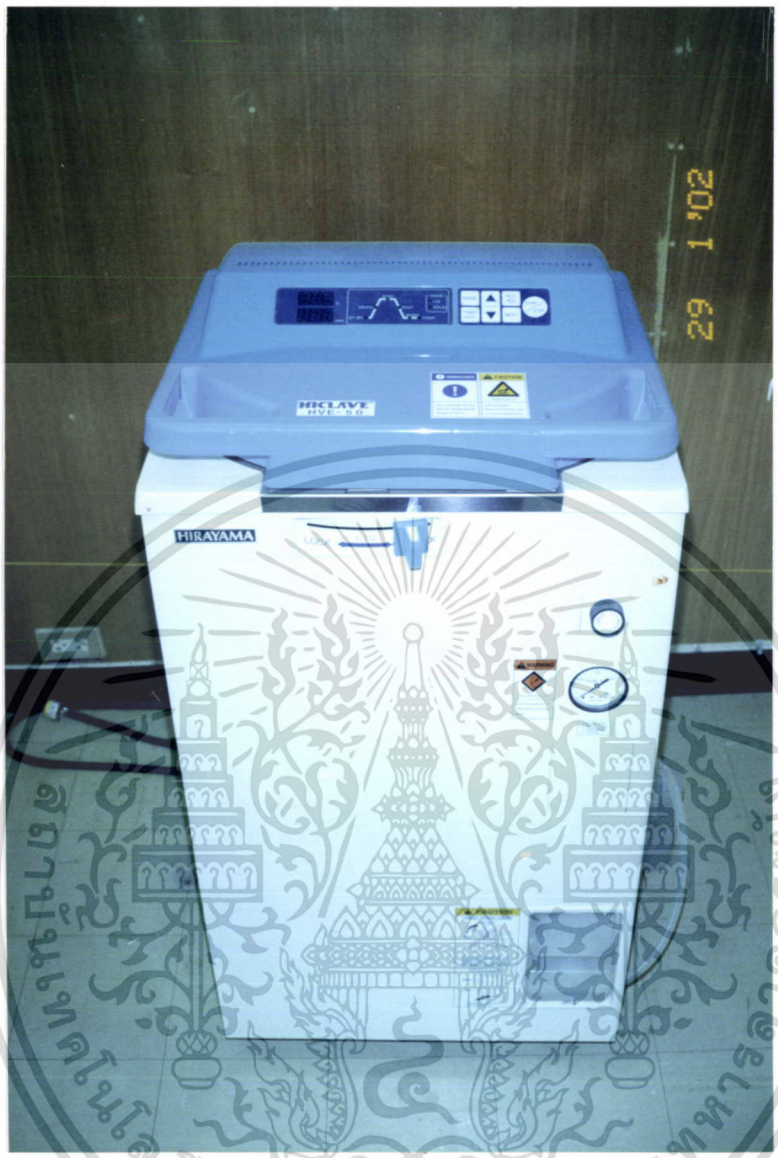
ภาพที่ 13. แสดงเครื่อง gelmate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14. แสดงเครื่อง gel photodocumentation system รุ่น UP-D895

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 15. แสดงเครื่อง autoclave

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 เทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง

ในการทดลองส่วนนี้สามารถแบ่งเทคนิควิธีการสกัดได้เป็น 5 วิธี โดยที่ในแต่ละวิธีจะมีความแตกต่างกันในเรื่องของระยะเวลา และปริมาณสารสกัดที่ใช้ดังนี้ วิธี control จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 120 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด วิธี treatment1 จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 30 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด วิธี treatment2 จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 30 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่ง วิธี treatment3 จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 60 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด และ treatment4 จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 60 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่ง ตามลำดับ จุดมุ่งหมายในการทดลองก็เพื่อหาเทคนิควิธีการที่จะได้มาซึ่งปริมาณดีเอ็นเอก้อนมากสุด โดยที่จากการทดลองปรากฏว่าระยะเวลาที่ใช้ในการ incubate 60 องศาเซลเซียส กับปริมาณสารสกัดที่ใช้จะส่งผลต่อปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผึ้งมิ้ม ซึ่งค่าที่ได้จะมากหรือน้อยนั้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละวิธีดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. การศึกษาถึงระยะเวลาในการ incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และปริมาณสารที่ใช้ในเทคนิควิธีสกัดดีเอ็นเอผึ้ง โดยทำการวัดออกมาเป็นค่าดีเอ็นเอก้อน (raw volume) จากโปรแกรม GENE SNAP บริษัท LAB FOCUS CO.,LTD.

วิธีการสกัด	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย	
control	26116.99	14824.67	21755.97	20899.21	a
treatment1	12837.05	6726.58	4198.09	7920.57	c
treatment2	10284.32	1238.71	3886.77	5136.6	c
treatment3	14924.52	18270.62	1169.38	11454.84	b
treatment4	3557.89	7978.50	8730.07	6755.48	c

ทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วยวิธีการของ Duncan Multiple Range Test (DMRT) และสามารถสรุปได้ว่า เทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งวิธี control จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับวิธี treatment1, treatment2, treatment3 และ treatment4 ในขณะที่วิธี treatment1, treatment2 และ treatment4 ไม่แตกต่างกัน และวิธี treatment3 ก็แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธี control, treatment1, treatment2 และ treatment4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง

source	df	ss	ms	F.05
treatment	4	475421859.591	118855464.898	3.629*
EX.error	10	327471778.897	32747177.890	
Total	14	802893638.488		
CV(%)	54.8			

ผลการวิเคราะห์ออกมาว่ามีอย่างน้อย 1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนที่ 2 เทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ

ในการทดลองส่วนนี้จะทำการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งกับเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ โดยการนำเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอก้อนมากสุดในที่นี้ได้แก่วิธี control ที่ได้จากการทดลองส่วนที่1 มาทำการเปรียบเทียบ ซึ่งในแต่ละวิธีการจะมีความแตกต่างกันในเรื่องของชนิดสารสกัด และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ดังนี้ วิธี control ในสาร buffer ไม่มี sucrose และใช้เวลาในการสกัด 2 วัน ส่วนวิธี treatment5 ซึ่งเป็นเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ ในสาร buffer จะมี sucrose และใช้เวลาในการสกัด 1 วัน โดยที่ผลการทดลองปรากฏดังตาราวที่ 3

ตารางที่ 3. แสดงการเปรียบเทียบโดยพิจารณาจาก buffer ที่ใช้ซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งใน buffer จะไม่มี sucrose ส่วนวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟใน buffer จะมี sucrose โดยการนำเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งที่ให้ค่าดีเอ็นเอก้อนสูงสุดมาทำการเปรียบเทียบ และทำการวัดออกมาเป็นค่าดีเอ็นเอก้อน

วิธีการสกัด	ซ้ำ 1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	เฉลี่ย
control (C)	26116.99	14824.67	21755.97	20899.21
treatment5 (T5)	2702.68	32703.57	44551.54	26652.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

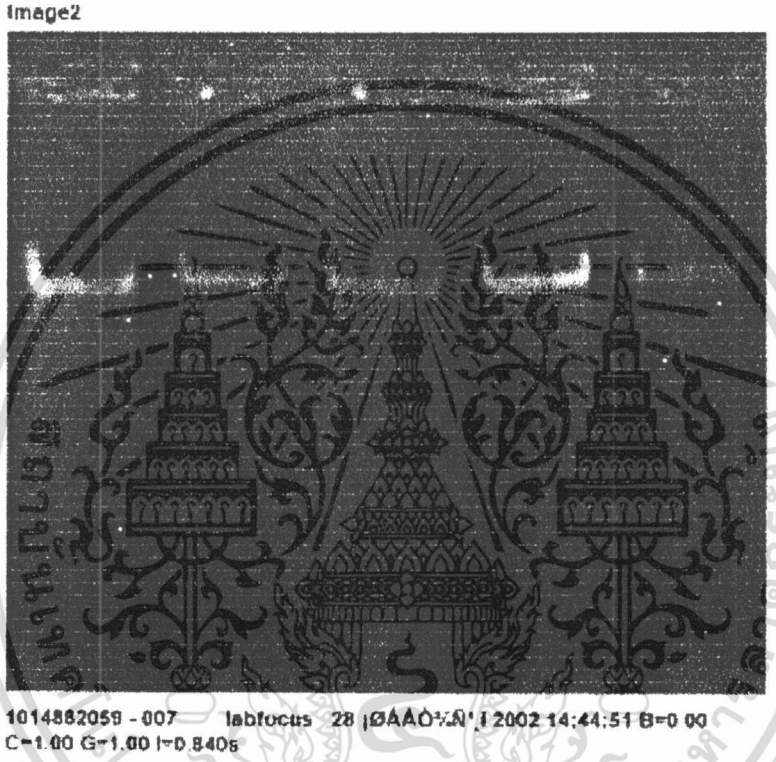
ตารางที่ 4. การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งที่ให้ค่าดีเอ็นเอก้อนสูงสุด กับเทคนิควิธีสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ

source	df	ss	ms	F.05
treatment	1	346457711.549	346457711.549	1.266 ns
Ex.error	4	1094869182.8	273717295.698	
Total	5	1441326894.3		
CV(%)	84.1			

ns = non significant

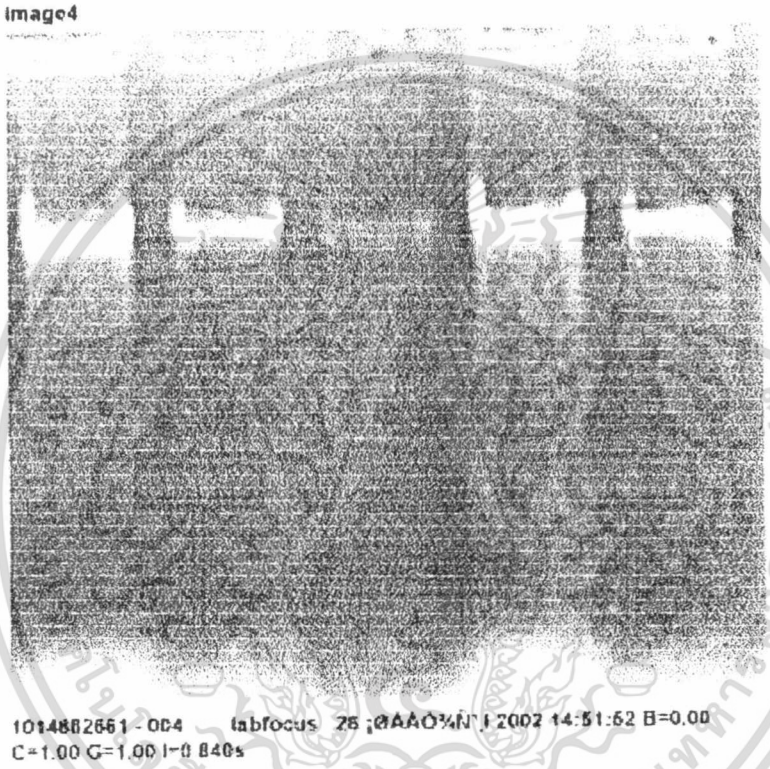
ผลวิเคราะห์ออกมาว่า เทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอของทั้ง 2 วิธีการนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงไม่ต้องทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



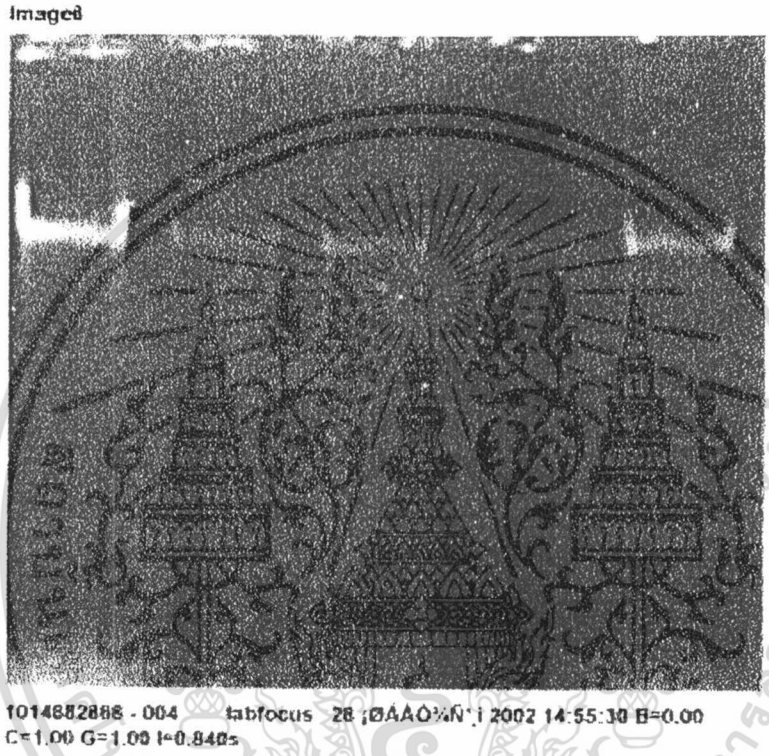
ภาพที่ 16. แสดง band ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง ได้แก่ วิธี control, treatment1, treatment2, treatment3 และ treatment4 (ซ้ำที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



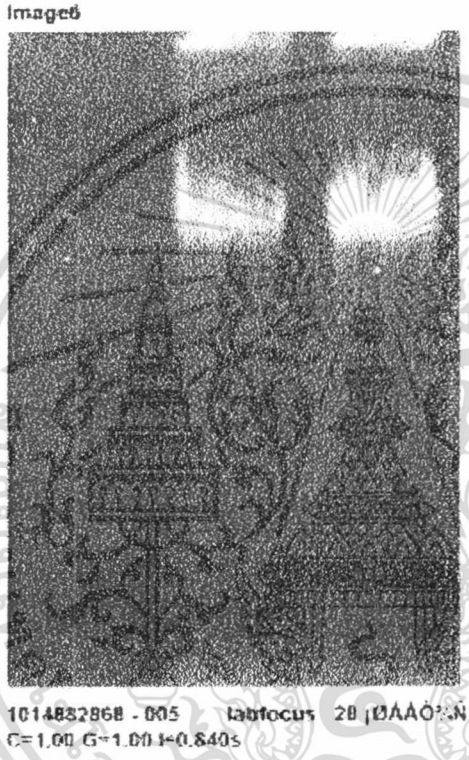
ภาพที่ 17. แสดง band ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง ได้แก่ วิธี control, treatment1, treatment2, treatment3 และ treatment4 (ซ้ำที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



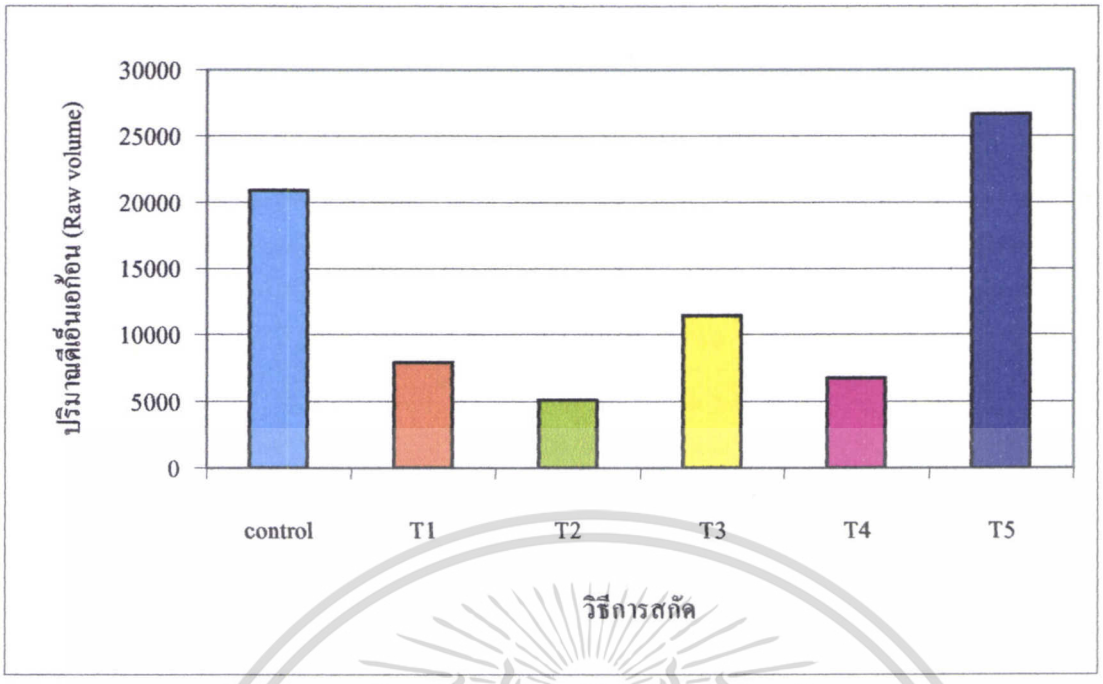
ภาพที่ 18. แสดง band ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง ได้แก่ วิธี control, treatment1, treatment2, treatment3 และ treatment4 (ซ้ำที่ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 19. แสดง band ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ treatment5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 20. แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอก้อนที่สกัดได้จากแต่ละวิธี

control จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 120 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด

treatment1 (T1) จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 30 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด

treatment2 (T2) จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 30 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่ง

treatment3 (T3) จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 60 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด

treatment4 (T4) จะใช้เวลาในการ incubate 60 องศาเซลเซียส 60 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่ง

treatment5 (T5) เป็นเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองส่วนที่ 1 เทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งที่เหมาะสมสำหรับผึ้งมิ้ม โดยจะให้ปริมาณดีเอ็นเอก้อนสูงสุด ได้แก่ วิธีการ incubate 60 องศาเซลเซียส 120 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด รองลงมาคือ วิธีการ incubate 60 องศาเซลเซียส 60 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด วิธีการ incubate 60 องศาเซลเซียส 30นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด วิธีการ incubate 60 องศาเซลเซียส 60 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่ง และวิธีการ incubate 60 องศาเซลเซียส 30 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดลดลงครึ่งหนึ่ง ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า วิธีการสกัดโดยการ incubate 60 องศาเซลเซียส 120 นาทีและใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด เป็นเทคนิควิธีการสกัดที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอก้อนมากที่สุด

ในการทดลองส่วนที่ 2 โดยการนำเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้งซึ่งใน buffer ไม่มี sucrose ที่เหมาะสมกับผึ้งมิ้มมากสุด ในที่นี้ได้แก่ วิธีการสกัดโดยการ incubate 60 องศาเซลเซียส 120 นาที และใช้ปริมาณสารสกัดตามขั้นตอนการสกัด และให้นำมาเปรียบเทียบกับเทคนิควิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟซึ่งใน buffer มี sucrose เพื่อทดสอบว่า sucrose จะมีผลต่อปริมาณดีเอ็นเอก้อนที่สกัดหรือไม่ จากผลการทดลองปรากฏว่า ปริมาณดีเอ็นเอก้อนที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธี ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นในการพิจารณาว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับผึ้งมิ้มควรเป็นวิธีไหนจะมาดูตรงที่ระยะเวลา และจำนวนสารที่ใช้ โดยที่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอผึ้ง ใช้เวลาในการสกัดมากถึง 2 วัน และใช้สารสกัดจำนวน 10 สาร ส่วน วิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ ใช้เวลาในการสกัด 1 วัน และใช้สารสกัดจำนวน 7 สาร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพลี้ยไฟ ซึ่งใช้เวลาในการสกัดและจำนวนสารน้อยกว่านั้น จะใช้ได้ดีและเหมาะสมกับผึ้งมิ้มมากที่สุด

Andrew(2001) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของผีเสื้อ *Heliconius* (Lepidoptera:Nymphalidae) ที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศโคลัมเบียโดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอ (Harrison,1980) buffer ที่ใช้ในการสกัดได้แก่ lifton buffer (0.2 M sucrose, 0.05 M EDTA, 0.1 M Tris, 0.5 % SDS, pH 9.0) ซึ่งมี sucrose อยู่ใน buffer ด้วยผลจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่นำมาใช้ในการสกัด DNA เป็น holotype ของสปีชีส์ที่เขาได้ทำการทดลองไว้ในปี 1996

Hall และ Smith(1991) ได้ศึกษาประชากรของผึ้งแอฟริกันในเขตร้อนของทวีปอเมริกาโดยการทดสอบดีเอ็นเอ ซึ่งมีการเติม STE buffer (50 mM Tris – HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.8, 100 mM NaCl) ซึ่งเป็น buffer ที่มีเกลือ NaCl เป็นส่วนประกอบ ผลจากการศึกษาพบว่าผึ้งในเขตร้อนของอเมริกาเป็นผึ้งแอฟริกันที่อพยพเข้ามาอาศัยอยู่และจากการวิเคราะห์ผลของการสกัด mtDNA ทางสถิติแสดงให้เห็นว่าผึ้งแอฟริกันสายพันธุ์เก่า และสายพันธุ์ใหม่มีความแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

พงศ์เทพ อัครธนกุล. 2534. ว่าด้วยการเลี้ยงผึ้ง และการเลี้ยงผึ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กทม. 150 หน้า.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, ยงยุทธ ไวคกุล และแสนนัด หงษ์ทรงเกียรติ. 2528. หลักการเลี้ยงและขยายพันธุ์ผึ้งในประเทศไทย. สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปภัมถ์. 159 หน้า.

สุรเทพ ภู่ทอง, กนกทิพย์ ภักดีบำรุง และศิริพร สิทธิประณีต. 2542. การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของผึ้งโพรงไทย (*Apis cerana*) โดยใช้บริเวณควบคุมของไมโทคอนเดียลดีเอ็นเอ. หน้า 624 – 629. ใน : รายงานผลการวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย, การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 3. 11 – 14 ตุลาคม 2542. โรงแรม เจ.บี. หาดใหญ่ สงขลา. Work Press Printing, กทม.

ศิริพร สิทธิประณีต, อรอุมา ซ้องรัมย์, นภา ศิวรังสรรค์, กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, สิรวุฒิ กลิ่นบุหงา และสิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2542. ความหลากหลายของจิโนไทป์ของผึ้งโพรงในประเทศไทยซึ่งแสดงโดยพอลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ. หน้า 630 – 635. ใน : รายงานผลการวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย, การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 3. 11 – 14 ตุลาคม 2542. โรงแรม เจ.บี. หาดใหญ่ สงขลา. Work Press Printing, กทม.

Anderson, L.D. 1968. Pesticide Usage in Relation to Bee keeping. Annual Review of Entomology. 13 : 213 – 238.

Anderson, L.D. ; E.L. Atkins ; H. Nokakihara and E.A. Greywood. 1971. Toxicity of Pesticide and Other Agricultural Chemicals to Honey Bees. Field Study. University of California Agricultural Extension. AXT – 257, Rev. 8pp.

Andrew V. Z. Brower. 2001. [Online] Available: http://www.ent.orst.edu/browera/

Atkins, E.L. 1975. Injury to Honey Bee by Poisoning in the Hive and the Honey Bee. Hamilton, Illinois : Dadant & Sons Inc.

Frank, P.,L. Garnery, M. Solignac and J.M. Cornuet. 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. [Online] Available: http://www.edpsciences.org/articles/inra-apido/abs/2000/02/m0201/m0201.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hall, H.G. and M.A. Mcmichael. 2001. Frequencies of Restriction Fragment – Length Polymorphisms Indicate That Neotropical Honey Bee (Hymenoptera:Apidae) Populations Have African and West European Origins. Entomological Society of America. 94(5) : 670 – 675.

Hall, H.G. and R.R. Smith. 1991. Distinguishing African and European honeybee matrilines using amplified mitochondrial DNA. Population Biology. 88 : 4548 – 4552.

Meixner, M.D., M.C. Arias and W.S. Sheppard. 2000. Mitochondrial DNA polymorphisms in honeybee subspecies from Kenya. [Online] Available: http://www.edpsciences.org/articles/inra-apido/abs/2000/02/m0204/m0204.html

Smith, D.R., L. villafuerte, G. Otis and M.R. Palmer. 2000. Biogeography of *Apis cerana* F. and *A. nigrocincta* Smith: insights from mtDNA studies. [Online] Available: http://www.edpsciences.org/articles/inra-apido/abs/2000/02/m0209/m0209.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้