ความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง (Apidae: Meliponinae) ในประเทศไทย ตรวจสอบโดย PCR-RFLP ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

นางสาวอรวรรณ พู่พิสุทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-7023-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEES (Apidae: Meliponinae) IN THAILAND DETECTED BY PCR-RFLP OF MITOCHONDRIAL DNA

Miss Orawan Phuphisut

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology
Department of Biology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-17-7023-5

Thesis Title	GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEES (Apidae: Meliponinae) IN THAILAND DETECTED BY PCR-RFLP OF MITOCHONDRIAL DNA
By	Miss Orawan Phuphisut
Field of Study	Zoology
Thesis Advisor	Sureerat Deowanish, D.Agr.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Sureerat Deowanish, D.Agr.)

.....Member
(Associate Professor Chariya Lekprayoon)

.....Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

อรวรรณ พู่พิสุทธิ์ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง (Apidae: Meliponinae) ในประเทศไทย ตรวจสอบโดย PCR-RFLP ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ. (GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEES (Apidae: Meliponinae) IN THAILAND DETECTED BY PCR-RFLP OF MITOCHONDRIAL DNA) อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. สุรีรัตน์ เตี่ยววาณิชย์ จำนวนหน้า 115 หน้า ISBN 974-17-7023-5

ชันโรง (*Trigona* spp.) เป็นแมลงสังคมขั้นสูงจำพวกผึ้งที่ไม่มีเหล็กในจัดอยู่ใน Subfamily Meliponinae มีบทบาทสำคัญในการช่วยผสมเกสรให้แก่พืชดอกต่าง ๆ และเป็นแมลงที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรชันโรง 5 ชนิดที่พบในประเทศไทย โดยใช้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 407 รัง (*T. collina* 224 รัง, *T. fuscobalteata* 18 รัง, *T. laeviceps* 131 รัง, *T. terminata* 28 รัง, และ *T. thoracica* 6 รัง) จากบริเวณพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย คือ ภาคเหนือ, ภาคอีสาน, ภาคตะวันออก, ภาคกลาง, และ ภาคใต้ โดยทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่บริเวณยีน 16S rRNA

หลังจากเพิ่มปริมาณไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่บริเวณยีน 16S rRNA แล้วผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 550 คู่เบส พบว่าเมื่อตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่บริเวณยีน 16S rRNA ด้วยเอ็นไซม์ *Dra* I, *Hpy*188 III, และ *Ssp* I สามารถพบความแปรผันของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอภายในกลุ่มประชากรของ *T. collina* และ *T. laeviceps* และสามารถพบความแปรผันของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่บริเวณยีน 16S rRNA ภายในกลุ่มประชากรของ *T. fuscobalteata*, *T. terminata*, และ *T. thoracica* เมื่อตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ *Dra* I แต่ไม่สามารถตรวจสอบความผันแปรของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่บริเวณยีน 16S rRNA ของชันโรงทั้ง 3 ชนิดด้วยเอ็นไซม์ *Hpy*188 III และ *Ssp* I

เมื่อตัดชิ้นดีเอ็นเอของชันโรงทั้ง 5 ชนิด (*T. collina*, *T. fuscobalteata*, *T. laeviceps*, *T. terminata*, และ *T. thoracica*) ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Dra* I, *Hpy*188 III, และ *Ssp* I พบว่าจะได้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอเป็น 3, 4, และ 4 รูปแบบ, 2, 1, และ 1 รูปแบบ, 4, 2, และ 3 รูปแบบ, 2, 1, และ 1 รูปแบบ, 2, 1, และ 1 รูปแบบ, ตามลำดับ

จากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด เมื่อนำไปวิเคราะห์โดยใช้ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มประชากรของ *T. collina*, *T. fuscobalteata*, *T. laeviceps*, *T. terminata*, และ *T. thoracica* ออกเป็น 3, 2, 2, 2, และ 2 กลุ่ม ตามลำดับ

ผลจากการศึกษาแสดงว่าประชากรชันโรงในประเทศไทยทั้ง 5 ชนิด มีความผันแปรทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างกลุ่มประชากรที่บริเวณยีน 16S rRNA ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ และสามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค PCR-RFLP

ภาควิชา.....ชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2547.....

##4572578923: MAJOR ZOOLOGY
KEY WORD: STINGLESS BEES / *Trigona* / mtDNA / PCR-RFLP / THAILAND

ORAWAN PHUPHISUT : GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEES (Apidae: Meliponinae) IN THAILAND DETECTED BY PCR-RFLP OF MITOCHONDRIAL DNA. THESIS ADVISOR: SUREERAT DEOWANISH, D.Agr., 115 pp. ISBN 974-17-7023-5

Stingless bees (*Trigona* spp.) are the highly eusocial insects belonging to subfamily Meliponinae. These bees have no sting which the honey bees use for defensive purposes. Genetic variation of five species of *Trigona* in a total of 407 colonies (*T. collina* (224 colonies), *T. fuscobalteata* (18 colonies), *T. laeviceps* (131 colonies), *T. terminata* (18 colonies), and *T. thoracica* (6 colonies)) from various parts of Thailand (North, North-East, East, Central, and South) were determined. PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis was used to detect variation at 16S rRNA gene of mitochondrial DNA.

The size of PCR product at 16S rRNA gene is about 550 bp. Variation in 16S rRNA gene of *T. collina* and *T. laeviceps* were found when digested with *Dra* I, *Hpy*188 III, and *Ssp* I. Variation in 16S rRNA gene of *T. fuscobalteata*, *T. terminata*, and *T. thoracica* were found when digested with *Dra* I but there were no variation with *Hpy*188 III and *Ssp* I digestion.

Digestion of these PCR products of five species (*T. collina*, *T. fuscobalteata*, *T. laeviceps*, *T. terminata*, and *T. thoracica*) with *Dra* I, *Hpy*188 III, and *Ssp* I revealed 3, 4, and 4 patterns, 2, 1, and 1 patterns, 4, 2, and 3 patterns, 2, 1, and 1 patterns, 2, 1, and 1 patterns, respectively.

Cluster analysis of *T. collina*, *T. fuscobalteata*, *T. laeviceps*, *T. terminata*, and *T. thoracica* populations (3 enzymes) by UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) could be separated into 3, 2, 2, 2, and 2 groups, respectively.

These results indicated that genetic variation of five species of *Trigona* in Thailand could be detected by using PCR-RFLP analysis at 16S rRNA gene of mitochondrial DNA.

Department.....Biology.....Student's signature Orawan Phuphisut

Field of study.....Zoology.....Advisor's signature Sureerat Deowanish

Academic year.....2004.....

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my deepest sense of gratitude to my thesis advisor, Dr. Sureerat Deowanish, for her care, encouragement, valuable suggestions and supports throughout my study.

I would like to express my grateful thanks to Professor Dr. Siriwat Wongsiri, chairman of the thesis committee.

My grateful thanks are extended to Associate Professor Chariya Lekprayoon and Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed for serving on my thesis committees.

The special thanks are also extend to Dr. Tosak Seelanan for his help in data computerized analysis and suggestion.

My thanks are also extended to Miss Sucheera Insuan, Miss Thadsanee Chaiyawong, Miss Piyamas Nanork, Miss Tipwan Suppasat, Miss Chayanee Odsup, Mrs Supaporn Keechinda, and all of the others that are not named here for their kindness in collecting samples and friendship in periods of this study.

I wish to express my thanks to Center of Excellence in Entomology: Bee Biology, Biodiversity of Insects and Mite, Chulalongkorn University for facilities and materials throughout my study.

This work was supported by Thailand Research Fund (TRF) For Senior Research Scholar RTA 4580012.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my parents and members of my family for their love, kindness and understanding throughout my study.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II LITERTURE REVIEW	6
2.1 Evolution of stingless bees (Meliponinae)	6
2.2 Morphological characters of five species of stingless bees	7
2.3 Biology of stingless bees	11
2.4 Mitochondrial DNA polymorphism in stingless bees	14
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	20
3.1 Instruments	20
3.2 Inventory supplies	21
3.3 Chemicals	21
3.4 Oligonucleotide primers	22
3.5 Enzymes	22
3.6 Samples collections	22
3.7 DNA extraction	23
3.8 PCR amplification	24

Page

3.9 Agarose gel electrophoresis..... 24
3.10 Restriction enzyme digestion..... 25
3.11 Data analysis..... 26
CHAPTER IV RESULTS..... 28
4.1 Total DNA extraction..... 28
4.2 PCR amplification and optimization of PCR condition.... 28
4.3 The PCR-RFLP in 16S rRNA gene of mtDNA of five species of stingless bees..... 30
4.3.1 The PCR-RFLP in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. collina*..... 31
4.3.2 The PCR-RFLP in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. fuscobalteata*..... 33
4.3.3 The PCR-RFLP in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. laeviceps*..... 35
4.3.4 The PCR-RFLP in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. terminata*..... 37
4.3.5 The PCR-RFLP in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. thoracica*..... 39
4.4 PCR-RFLP analysis of mtDNA of five species of stingless bees in Thailand..... 41
4.4.1 Genetic diversity among five species of *Trigona* in Thailand..... 41
4.4.2 Multidimensional scaling model (MDS)..... 55
CHAPTER V DISCUSSION..... 58
5.1 Genetic variations of five *Trigona* species..... 60

Page

5.1.1 MtDNA variation among *T. collina* populations..... 60
5.1.2 MtDNA variation among *T. fuscobalteata* populations..... 61
5.1.3 MtDNA variation among *T. laeviceps* populations..... 61
5.1.4 MtDNA variation among *T. terminata* populations..... 62
5.1.5 MtDNA variation among *T. thoracica* populations..... 62
5.2 Genetic variations of stingless bees in Thailand..... 63
CHAPTER VI CONCLUSIONS..... 65
REFERENCES..... 66
APPENDICES..... 76
APPENDIX I..... 77
APPENDIX II..... 81
APPENDIX III..... 88
BIOGRAPHY..... 115

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Species list of *Trigona* in Thailand	3
2. PCR condition for amplification of 16S rRNA gene of five *Trigona* species	24
3. List of restriction enzymes used to analyse mtDNA variation of five species of stingless bees.....	26
4. Geographic distribution of 25 haplotypes of five species of *Trigona* in Thailand.....	43
5. Genetic distance between pairs of haplotypes from digestion patterns of 16S rRNA gene with three restriction enzymes.....	57

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 *T. collina* and its nest entrance tube	9
2.2 *T. fuscobalteata* and its nest entrance tube	9
2.3 *T. laeviceps* and its nest entrance tube	10
2.4 *T. terminata* and its nest entrance tube	10
2.5 *T. thoracica* and its nest entrance tube	10
2.6 Stingless bee, *T. collina*	12
2.7 Nest of stingless bee, *M. interrupta*	13
2.8 Distribution map of stingless bees, Meliponinae	13
2.9 Map of circular mitochondrial genome of honey bee *A. mellifera ligustica*	15
3.1 Sampling areas of five species of *Trigona* in Thailand	27
4.1 High molecular weight DNA extracted from thorax of all species	29
4.2 PCR amplified products of 16S rRNA gene of mtDNA of all species	30
4.3 Restriction patterns in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. collina* after digested with *Dra* I	31
4.4 Restriction patterns in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. collina* after digested with *Hpy*188 III	32
4.5 Restriction patterns in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. collina* after digested with *Ssp* I	32
4.6 Restriction patterns in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. fuscobalteata* after digested with *Dra* I	33

Figure **Page**

4.7 Restriction pattern in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. fuscobalteata* after digested with *Hpy*188 III..... 34
4.8 Restriction pattern in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. fuscobalteata* after digested with *Ssp* I..... 34
4.9 Restriction patterns in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. laeviceps* after digested with *Dra* I..... 35
4.10 Restriction patterns in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. laeviceps* after digested with *Hpy*188 III..... 36
4.11 Restriction patterns in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. laeviceps* after digested with *Ssp* I..... 36
4.12 Restriction patterns in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. terminata* after digested with *Dra* I..... 37
4.13 Restriction pattern in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. terminata* after digested with *Hpy*188 III..... 38
4.14 Restriction pattern in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. terminata* after digested with *Ssp* I..... 38
4.15 Restriction patterns in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. thoracica* after digested with *Dra* I..... 39
4.16 Restriction pattern in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. thoracica* after digested with *Hpy*188 III..... 40
4.17 Restriction pattern in 16S rRNA gene of mtDNA of *T. thoracica* after digested with *Ssp* I..... 40

Figure **Page**

4.18 Dendrogram of relationships among five species of *Trigona* in Thailand using genetic distance data of PCR-RFLP (3 enzymes) at 16S rRNA gene of mtDNA..... 42

4.19 Dendrogram of relationships among *T. collina* populations in Thailand using genetic distance data of PCR-RFLP (3 enzymes) at 16S rRNA gene of mtDNA..... 45

4.20 Distribution of mtDNA haplotypes of *T. collina* in Thailand resulted from digestion of 16S rRNA gene with 3 restriction enzymes..... 46

4.21 Dendrogram of relationships among *T. fuscobalteata* populations in Thailand using genetic distance data of PCR-RFLP (3 enzymes) at 16S rRNA gene of mtDNA..... 47

4.22 Distribution of mtDNA haplotypes of *T. fuscobalteata* in Thailand resulted from digestion of 16S rRNA gene with 3 restriction enzymes..... 48

4.23 Dendrogram of relationships among *T. laeviceps* populations in Thailand using genetic distance data of PCR-RFLP (3 enzymes) at 16S rRNA gene of mtDNA..... 49

4.24 Distribution of mtDNA haplotypes of *T. laeviceps* in Thailand resulted from digestion of 16S rRNA gene with 3 restriction enzymes..... 50

4.25 Dendrogram of relationships among *T. terminata* populations in Thailand using genetic distance data of PCR-RFLP (3 enzymes) at 16S rRNA gene of mtDNA..... 51

Figure **Page**

4.26 Distribution of mtDNA haplotypes of *T. terminata* in Thailand resulted from digestion of 16S rRNA gene with 3 restriction enzymes..... 52

4.27 Dendrogram of relationships among *T. thoracica* populations in Thailand using genetic distance data of PCR-RFLP (3 enzymes) at 16S rRNA gene of mtDNA..... 53

4.28 Distribution of mtDNA haplotypes of *T. thoracica* in Thailand resulted from digestion of 16S rRNA gene with 3 restriction enzymes..... 54

4.29 Multidimensional scaling model (two dimensions)..... 55

4.30 Multidimensional scaling model (three dimensions)..... 56

LIST OF ABBREVIATIONS

A, T, C, and G	=	nucleotide containing the base Adenine, Thymine, Cytosine, and Guanine, respectively.
ATPase	=	adenosine triphosphatase
bp	=	base pair
°C	=	degree celsius
cm	=	centrimetre
COI	=	cytochrome oxidase I
COII	=	cytochrome oxidase II
Cytb I	=	cytochrome b I
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, and dCTP)	=	deoxyribonucleotide triphosphates
ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddGTP, and ddCTP)	=	dideoxyribonucleotide triphosphates
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
HCl	=	hydrochloric acid
Kb	=	kilobase
KCl	=	potassium chloride
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
ml	=	mililitre
mM	=	millimolar
MtDNA	=	mitochondrial DNA
mg	=	milligram
ng	=	nanogram

PCR	=	polymerase chain reaction
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	revolution per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
16S rRNA	=	large subunit ribosomal RNA
Tris	=	tris (hydroxy methyl) aminomethane
tRNA	=	transfer RNA
UV	=	ultraviolet
V	=	volt
W	=	watt
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar