

หัวข้อวิทยานิพนธ์

โครงสร้างชุมชนชีพของแบคทีเรียในลำไส้ส่วนกลางของผึ้ง
เอเชียขนาดใหญ่และผึ้งเอเชียขนาดเล็กในประเทศไทย

ผู้เขียน

นางสาว ประกายมุกด์ สาหร่ายทอง

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต

(ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

รศ. ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

Prof. Dr. Yihong Li

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผศ. ดร. กนกพร แสนเพชร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ผึ้งพันธุ์พื้นเมืองขนาดใหญ่ (ผึ้งหลวง, *Apis dorsata*) และผึ้งพันธุ์พื้นเมืองขนาดเล็ก (ผึ้งมีม, *Apis florea*) เป็นผึ้งพันธุ์พื้นเมืองของภูมิภาคเอเชีย ผึ้งทั้งสองชนิดนี้เป็นนักผสมเกสรที่สำคัญต่อระบบนิเวศป่าฝนเขตร้อน เป็นที่ทราบดีว่าการอยู่รอดของผึ้งเกี่ยวข้องกับการคงอยู่ของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ในช่วงพัฒนาการระยะต่างๆ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจชุมชนชีพของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งหลวงและผึ้งมีม รายงานแรกนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชุมชนชีพของแบคทีเรียตลอดระยะการพัฒนาการของผึ้งหลวงและเปรียบเทียบแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ โดยวิธีปฏิบัติถูกโฆโพลีเมอร์เรสและการแยกความแตกต่างของลำดับเบสบนเจลที่มีความแตกต่างของตัวสลายพันธะของดีเอ็นเอ (PCR-DGGE) ตามด้วยการจำแนกลำดับเบสของยีน 16S rRNA ผลที่ได้พบว่าความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามระยะการพัฒนาการของผึ้งจากระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัย และระยะออกหาอาหาร ส่วนระยะดักแด้ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบได้แก่ ไฟลัม Proteobacteria และ Firmicutes คลาส Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacilli แต่ความถี่ในการพบเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกันในแต่ละระยะการพัฒนาการและแหล่งตัวอย่าง ส่วนคลาส Gammaproteobacteria และ Bacilli พบมากในสามระยะ

รายงานเรื่องที่สองเป็นการศึกษาลักษณะการคงอยู่และองค์ประกอบของเชื้อแบคทีเรียในระยะตัวอ่อนของผึ้งมีมและเปรียบเทียบความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ โดยวิธี

ปฏิกิริยาถูกโซ่โพลิเมอร์เรซชนิดสองรอบและการแยกความแตกต่างของลำดับเบสบนเจลที่มีความแตกต่างของตัวสลายพันธะของดีเอ็นเอ (Nested PCR-DGGE) แบคทีเรียที่พบได้แก่ ไฟลัม Proteobacteria และ Firmicutes คลาส Alpha proteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacilli และ Clostridia เจอในอัตรา 1 *Clostridium*, *Gilliamella*, *Melissococcus*, *Lactobacillus*, *Saccharibacter* และ *Snodgrassella* พบแบคทีเรียที่ไม่ระบุจำแนกได้แก่ uncultured bacterial species คลาสที่พบในความถี่สูงได้แก่ Alpha proteobacteria (34%), Bacilli (25%), Betaproteobacteria (11%), Gammaproteobacteria (10%) และ Clostridia (8%) นอกจากนี้ยังพบ uncultured bacterial species (12%)

การศึกษาพฤติกรรมการออกหาอาหารของผึ้งพันธุ์พื้นเมืองพบได้น้อยมาก รายงานที่สามนี้เป็นการศึกษารูปแบบพฤติกรรมประจำในการออกหาอาหารของผึ้งหลวง 4 รังในภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งการบินออกหาอาหารครั้งแรกเริ่มต้นเมื่อรุ่งสางและจำนวนของผึ้งที่ออกหาอาหารจะเพิ่มขึ้นอย่างเต็มที่ (18-20%) ในตอนเช้าตรู่ (dawn) ต่อมาจำนวนของผึ้งจะลดลง (5%) ในตอนสายและคงที่จนกระทั่งพลบค่ำ โดยผึ้งทุกรังที่ทำการศึกษารังนี้แสดงรูปแบบการหาอาหารที่คล้ายกัน ซึ่งรูปแบบการออกหาอาหารนี้ไม่ขึ้นกับอุณหภูมิ

รายงานทั้งหมดนี้มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของผึ้งพันธุ์พื้นเมืองโดยได้ทำการศึกษาชุมชนของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ส่วนกลางและพฤติกรรมการออกหาอาหาร ชุมชีพของเชื้อแบคทีเรียที่พบในผึ้งทั้งสองชนิดได้แก่ ไฟลัม Proteobacteria และ Firmicutes คลาส Alpha proteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria และ Bacilli รูปแบบของเชื้อแบคทีเรียที่พบมีความคล้ายกันในรังเดียวกัน แต่แตกต่างกันในต่างรังและต่างแหล่ง

คำสำคัญ: ผึ้งหลวง, ผึ้งมิม, เจลที่มีความแตกต่างของตัวสลายพันธะของดีเอ็นเอ, ชุมชีพแบคทีเรียในลำไส้, เชื้อแบคทีเรียในแมลง, ยีนส่วน 16S rRNA

Thesis Title	Bacterial Community Structure in the Midguts of Giant Asian Honey Bee (<i>Apis dorsata</i>) and Dwarf Asian Honey Bee (<i>Apis florea</i>) in Thailand	
Author	Ms. Prakaimuk Saraithong	
Degree	Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul	Advisor
	Prof. Dr. Yihong Li	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Kanokporn Saenphet	Co-advisor

ABSTRACT

Giant Asian honey bee (*Apis dorsata*) and dwarf Asian honey bee (*Apis florea*) are native bee species in tropical Asia. They are important pollinators for the rainforest ecosystem. Generally honey bee survival is correlated with bacterial colonization in the gut during the developmental stages. In this study we aimed to investigate the bacteria communities in *A. dorsata* and *A. florea* midguts.

The first study was to determine the dynamics of bacteria community structure across four *A. dorsata* life stages in different geographical locations by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis analysis (PCR-DGGE) and 16S rRNA sequencing. The results revealed that bacteria diversity increased as the bee progresses through larval stage to emerged bee and worker. In contrast to these three stages, the pupal stage did not show any bacteria. Two bacterial phyla (Proteobacteria and Firmicutes) and four classes (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, and Bacilli) were identified, but the frequency varied among the different stages and locations. The classes Gammaproteobacteria and Bacilli dominated in three stages of development.

The second study characterized the colonization and composition of bacterial flora in dwarf Asian honey bee (*Apis florea*) larvae and compared bacterial diversity and distribution among different sampling locations. Using nested PCR and denaturing gradient gel electrophoresis, the result revealed *A. florea* larvae harbored bacteria belonging to two phyla (Proteobacteria and Firmicutes), five classes (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacilli, and Clostridia), six genera (*Clostridium*, *Gilliamella*, *Melissococcus*, *Lactobacillus*, *Saccharibacter*, and *Snodgrassella*), and an unknown genus from uncultured bacterial species. The classes with the highest abundance of bacteria were Alphaproteobacteria (34%), Bacilli (25%), Betaproteobacteria (11%), Gammaproteobacteria (10%), and Clostridia (8%), respectively. Similarly, uncultured bacterial species were identified (12%).

The foraging phenology of the native Asian honey bee is one of the least studied aspects of colonial life history. The third study observed the circadian flight activities of four *A. dorsata* colonies in northern Thailand. After the first flight commenced at dawn, the number of foraging bees peaked (18-20%) in the early morning, decreased (5%) in the late morning and remained steady until dusk. The pattern of forager daily flight was similar with all colonies observed. Our study found that flight activity is independent of ambient temperature.

This thesis provides important clues on the survival of the native Asian honey bees by studying the bacteria in their midguts and foraging behavior. Bacterial communities in these two honey bees shared phylum Proteobacteria and Firmicutes including class Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacilli and uncultured bacterial species. Bacterial profiles were homogeneous among colonies, but heterogeneous within the different colonies and locations.

Keywords: *Apis dorsata*, *Apis florea*, Denaturing gradient gel electrophoresis, Gut bacteria community, Insect bacteria, 16S rRNA gene