

การระบุปีชีส์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง *Trigona pagdeni*  
ในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ด้วยเอเอฟแอลพีและลำดับไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ



นางสาว ศิริกุล ธรรมจิตรสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2551  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



F604P6061

**SPECIES IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS  
BEES *Trigona pagdeni* IN THAILAND USING AFLP ANALYSIS AND  
MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCE**

**Miss Sirikul Thummajitsakul**

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biochemistry**

**Department of Biochemistry**

**Faculty of Science**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 2008**

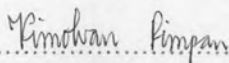
**Copyright of Chulalongkorn University**

**512108**

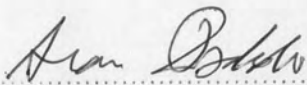
Thesis Title SPECIES IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEES *Trigona pagdeni* IN THAILAND USING AFLP ANALYSIS AND MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCE  
By Miss Sirikul Thummajitsakul  
Field of study Biochemistry  
Thesis advisor Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.  
Thesis Co-advisor Sirawut Krinbunga, Ph.D.  
Thesis Co-advisor Associate Professor Deborah R. Smith, Ph.D.

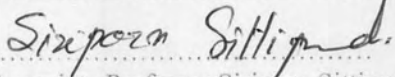
---


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

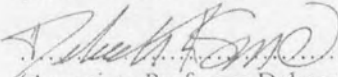
 Deputy Dean for Administrative Affairs,  
..... Acting Dean, The Faculty of Science  
(Associate Professor Vimolvan Pimpan, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE

 Chairman  
.....  
(Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

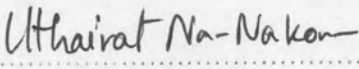
 Thesis Advisor  
.....  
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

 Thesis Co-advisor  
.....  
(Sirawut Krinbunga, Ph.D.)

 Thesis Co-advisor  
.....  
(Associate Professor Deborah R. Smith, Ph.D.)

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

 Member  
.....  
(Associate Professor Vichai Rimphanitchayakit, Ph.D.)

 Member  
.....  
(Professor Uthairat Na-nakorn, Ph.D.)

**ศิริกุล ธรรมจิตรสกุล:** การระบุชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของชันโรง *Trigona pagdeni* ในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยเอเอฟแอลพีและลำดับไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (SPECIES IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEES *Trigona pagdeni* IN THAILAND USING AFLP ANALYSIS AND MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCE) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. ศิริพร สิทธิประณีต, อ. ที่ปรึกษาร่วม: อ. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา และ Assoc. Prof. Deborah R. Smith, Ph.D., 257 หน้า.

ค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชนิดของชันโรง *T. pagdeni* ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี จากการวิเคราะห์ไพรมอร์ 64 คู่ผสม กับตัวอย่างดีเอ็นเอของชันโรง 12 ชนิด พบ เครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่จำเพาะต่อ *T. pagdeni* จำนวน 1 เครื่องหมาย ขนาด 284 คู่เบส ทำการโคลนและออกแบบไพรมอร์จากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่จำเพาะต่อ *T. pagdeni* พบว่าคู่ไพรมอร์(CUTPTP1-F/R) ที่พัฒนาจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีโมเรสขนาด 163 คู่เบส ซึ่งพบใน *T. pagdeni* (129/129; 100%) และพบใน *T. fimbriata* (1/3; 33.3%), *T. collina* (11/112; 9.8%), *T. laeviceps* (1/12; 8.3%) และ *T. fuscobalteata* (15/15; 100%) แต่ไม่พบในชนิดอื่น เมื่อนำเทคนิค SSCP มาใช้ในการค้นหาความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีโมเรสขนาด 163 คู่เบส พบรูปแบบ SSCP ของ *T. pagdeni* ให้ความแตกต่างจากรูปแบบ SSCP ของ *T. fuscobalteata* และ *T. collina* แต่ไม่สามารถให้ความแตกต่างจาก *T. fimbriata* และ *T. laeviceps* อย่างไรก็ตาม *T. pagdeni*, *T. fimbriata* และ *T. laeviceps* นี้สามารถแย่งแยกชนิดได้จากลักษณะภายนอก การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของชันโรง *T. pagdeni* ด้วยเทคนิค TE-AFLP ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงภายในแต่ละกลุ่มประชากรของ *T. pagdeni* โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมพบสูงสุดในกลุ่มประชากรภาคอีสาน เมื่อใช้ AMOVA คำนวณค่า  $\Phi_{PT}$  เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรชันโรง พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรอย่างมีนัยสำคัญ ( $\Phi_{PT} = 0.18, p = 0.001$ ) และระหว่างกลุ่มประชากรชันโรงทางตอนเหนือและตอนใต้ของบริเวณคอคอคดกระของประเทศไทย ( $\Phi_{PT} = 0.13, p = 0.001$ ) ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมพบสูงสุดในระหว่างกลุ่มประชากรชันโรงภาคอีสานและกลุ่มประชากรอื่นๆ ( $\Phi_{PT} = 0.21, p = 0.001$ ) ในทำนองเดียวกันความหลากหลายของรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP ในยีน cytb, ATPase(6, 8) และ 16S rRNA ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในแต่ละกลุ่มประชากร *T. pagdeni* โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงสุดในกลุ่มประชากรทางภาคกลาง ผลของการคำนวณค่า  $\Phi_{PT}$  ของแต่ละยีน (cytb, ATPase (6, 8) และ 16S rRNA) ด้วย AMOVA พบ ความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงระหว่างกลุ่มประชากรชันโรง ( $\Phi_{PT} = 0.35, \Phi_{PT} = 0.27$  และ  $\Phi_{PT} = 0.28, P = 0.001$  ตามลำดับ) และระหว่างกลุ่มประชากรชันโรงทางตอนเหนือและตอนใต้ของบริเวณคอคอคดกระของประเทศไทย ( $\Phi_{PT} = 0.15, 0.20$  และ  $0.18, P = 0.001$  ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามรูปแบบ SSCP ในยีน cytb, ATPase(6, 8) และ 16S rRNA ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่สูงมากระหว่างชันโรงจากภาคอีสานและกลุ่มประชากรบริเวณอื่น นอกจากนี้ค้นพบลำดับเบสบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเทคนิค long PCR ประมาณ 69% ของจีโนมไมโทคอนเดรียล ประกอบด้วย ยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีนจำนวน 12 ตัว (ND4L, ND4, ND5, ND6, cytb, ND1, ND3, COIII, ATPase 6, ATPase 8, COII และลำดับบางส่วนของ COI), ยีน tRNA จำนวน 12 ตัว และ ยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (12S และ 16S rRNA) ยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีนมีองค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ A และ T สูง ซึ่งเริ่มต้นด้วยรหัส ATT, ATA, ATC และ ATG และหยุดที่ TAA และ TAG สายไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งสองสายมีบริเวณที่ถอดรหัสให้โปรตีน และไม่พบบริเวณที่ไม่ถอดรหัส (non-coding region) ระหว่างยีน COI และ COII ในชันโรง *T. pagdeni* ซึ่งสอดคล้องกับชันโรงชนิดอื่น นอกจากนั้น ลำดับยีนบนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของ *T. pagdeni* แตกต่างจากลำดับยีนบนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของชันโรง *Melipona bicolor* และ ผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera*

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....ศิริกุล ธรรมจิตรสกุล  
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ศิริพร สิทธิประณีต  
ปีการศึกษา.....2551.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....ศิริพร สิทธิประณีต



##4673831923: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: STINGLESS BEES / *Trigona pagdeni* / SPECIES-SPECIFIC MARKER / GENETIC DIVERSITY/ POPULATION DIFFERENTIATION /

SIRIKUL THUMMAJITSAKUL: SPECIES IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF STINGLESS BEES *Trigona pagdeni* IN THAILAND USING AFLP ANALYSIS AND MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCE, THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: SIRIWUT KLINBUNGA, Ph.D., ASSOC. PROF. DEBORAH R. SMITH, Ph.D., 257 pp.

Species diagnostic marker for identification of the stingless bees (*Trigona pagdeni*) was successfully developed. Initially, amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis was carried out across representatives of 12 stingless bees species using 64 primer combinations. A 284 bp band restrictively found in *T. pagdeni* was cloned and sequenced. A primer pair (CUTPTP1-F/R) was designed and tested for specificity. In total, 100% (129/129 individuals) of *T. pagdeni* provided a 163 bp expected product. Nevertheless, the amplified CUTPTP was also found in *T. fimbriata* (1/3, 33.3%), *T. collina* (11/112, 9.8%), *T. laeviceps* (1/12, 8.3%) and *T. fuscobalteata* (15/15, 100%) but not the remaining species. The SSCP analysis, single strand conformational polymorphism, of the CUTPTP fragment could successfully differentiate *T. fuscobalteata* and *T. collina* from *T. pagdeni*. Although, no successful discrimination of *T. laeviceps* and *T. fimbriata* from *T. pagdeni* was obtained by using polymorphisms of the CUTPTP fragment, *T. pagdeni*, *T. laeviceps* and *T. fimbriata* can be easily differentiated using their morphology. Genetic variation and population structure of *T. pagdeni* in Thailand were further investigated using TE-AFLP, and Analysis of Molecular Variance (AMOVA). We found high levels of genetic variation among individuals in each population. We used AMOVA to calculate  $\Phi_{PT}$  to compare genetic differentiation among populations. This revealed significant genetic differentiation among populations ( $\Phi_{PT} = 0.18$ ,  $p = 0.001$ ). We also detected differentiation ( $\Phi_{PT} = 0.13$ ,  $p = 0.001$ ) between samples from north and south of Isthmus of Kra. The greatest differentiation was detected between samples from the northeast and the other locations combined ( $\Phi_{PT} = 0.21$ ,  $p = 0.001$ ). The SSCP analysis of the cytb, ATPase(6, 8) and 16S rRNA genes, was also used to clarify the genetic diversity and population structure of *T. pagdeni*. High levels of genetic variation among individuals in each population were detected. AMOVA analysis of the cytb, ATPase(6, 8) and 16S rRNA genes indicated high genetic differentiation among populations ( $\Phi_{PT} = 0.35$ ,  $\Phi_{PT} = 0.27$  and  $\Phi_{PT} = 0.28$ ,  $P = 0.001$ , respectively), and between samples from north and south of Isthmus of Kra ( $\Phi_{PT} = 0.15$ , 0.20 and 0.18,  $P = 0.001$  respectively). Likewise, about 69% of the mitochondrial genome of *T. pagdeni* was determined by long PCR technique. It included the 12 mitochondrial protein-coding genes (ND4L, ND4, ND5, ND6, cytb, ND1, ND3, COIII, ATPase 6, ATPase 8, COII and partial sequence of COI), 12 of 22 tRNA genes, and both rRNA genes. The protein-coding genes had a bias towards AT-rich codons. The protein-encoding genes were initiated with ATT, ATA, ATC and ATG codons and ended with TAA or TAG. Both mtDNA strands contained coding regions. The sequenced mtDNA of *T. pagdeni* lacked the COI-COII intergenic region, and the mitochondrial gene order in *T. pagdeni* differed significantly from other stingless bees *Melipona bicolor* and honey bees *Apis mellifera*.

Department.....Biochemistry.....Student's signature.....Sirikul Thummajitsakul  
 Field of study.....Biochemistry.....Advisor's signature.....Siriporn Sittipraneed  
 Academic year.....2008.....Co-advisor's signature.....P. Klinbunga

## ACKNOWLEDGEMENTS

I am very grateful to my supervisors Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed, Dr. Sirawut Klinbunga and Associate Professor Dr. Deborah Smith for their valuable suggestions and support over the past 5.5 years at the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. A student grant is supported by the Royal Gloden Jubilee Ph.D. program (Grant No. PHD/0075/2546), the Thailand Research Funds (TRF). During the sample collection processes, the contribution of people from Bee Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, is acknowledged. Likewise, this study could not have been done without the help of Kun Silprasit, who helped us collect stingless bees from many provinces in Thailand. We thank Professor Charles D. Michener, Dr. Natapot Warrit and Dr. Victor Gonzalez for developing our understanding of stingless bee taxonomy, the Entomology Program, Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Kansas, and Aquatic Molecular Genetics and Biotechnology, National Science Center for Genetic Engineering and Biotechnology (NSTDA) for providing facilities required by the experiments. My gratitude is also extended to Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Associate Professor Dr. Vichein Rimpanichayakit, Professor Dr. Siritwat Wongsiri and Professor Dr. Uthiarat Nana-korn for serving as thesis committee, for their available comments and useful suggestion. During the experimental, data analyses, and writing thesis at Department of Biochemistry Chulalongkorn University, P' Tip, Puen, Nok, Bong, Kook, Pond, Tent, Ople, Nan, Jiab, Gift, Yui, Amm, Noknad, B, Nuree, P'Ying, P' Ann, Earn, Taum, Chao, Ae, Ake, Tipachai, P' Yui, P'Chai, P' Ohm, P' Cell, P' Kung, P' Neng, and at Center of Excellence for Marine Biotechnology, Fai, Add, Due, Arun, P' Kai, P' Poy and P' Tum, I would like to thank those people who provided warm assistance and friendship, which are sincerely appreciated.

Finally, I wish to dedicate this thesis to my family for a valuable source of love and care. Those are inspiration of mine.

## CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (IN THAI).....	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xviii
CHAPTER I: LITTERATURE REVIEWS.....	1
1.1 STINGLESS BEES BIOLOGY.....	1
1.1.1 Division of labor.....	1
1.1.2 Nest architecture .....	1
1.1.3 Foundation of new colonies and mating.....	2
1.2 DISTRIBUTION OF STINGLESS BEES .....	3
1.3 EXPLOITATION AS NATIVE SPECIES.....	6
1.4 STINGLESS BEES IN THAILAND.....	7
1.5 <i>Trigona (Tetragonula) pagdeni</i> Schwarz IN THAILAND.....	9
1.5.1 Identification of <i>T. pagdeni</i> .....	13
1.5.2 Genetic diversity of <i>T. pagdeni</i> in Thailand.....	14
1.6 GENETIC MARKERS.....	15
1.7 OBJECTIVES OF THIS DISSERTATION.....	31

	<b>PAGE</b>
CHAPTER II: DEVELOPMENT OF SPECIES-DIAGNOSTIC MARKERS FOR IDENTIFICATION OF THE STINGLESS BEE <i>(Trigona pagdeni</i> Schwarz) IN THAILAND.....	32
CHAPTER III: GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF <i>Trigona pagdeni</i> Schwarz IN THAILAND.....	50
CHAPTER IV: GENETIC DIVERISTY AND POPULATION STRUCTURE OF STINGLESS BEES ( <i>Trigona pagdeni</i> Schwarz) IN THAILAND DETERMINED BY MITOCHONDRIAL POLYMORPHISMS.....	64
CHAPTER V: PARTIAL MITOCHONDRIAL SEQUENCE OF THE STINGLESS BEES ( <i>Trigona pagdeni</i> Schwarz) IN THAILAND.....	86
CHAPTER VI: DISCUSSION AND CONCLUSION.....	135
REFERENCES.....	140
APPENDICES.....	162
APPENDIX A: MOLECULAR METHODS.....	163
APPENDIX B: SAMPLE COLLECTIONS.....	209



	<b>PAGE</b>
APPENDIX C: LURIA-BERTANI MEDIUM.....	220
APPENDIX D: REAGENTS FOR ALKALINE LYSIS.....	221
APPENDIX E: CHEMICALS FOR PREPARATION OF POLYACRYLAMIDE GEL AND SILVER STAINING.....	222
APPENDIX F: RESTRICTION MAPPING OF pGEM <sup>®</sup> -T EASY VECTOR.....	223
APPENDIX G: TE-AFLP AND SSCP HAPLOTYPES.....	224
APPENDIX H: MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISMS.....	240
APPENDIX I: PERSONAL INFORMATION.....	255
BIOGRAPHY.....	257

## LIST OF TABLES

	PAGE
<b>Table 1.1</b> <i>Trigona</i> species found in Thailand.....	11
<b>Table 2.1</b> Sampling locations and sample sizes of stingless bees used in the species-specific test using CUTPTP primers.....	35
<b>Table 2.2</b> Sample sizes of stingless bees used in the species-specific test of the CUTPTP primers.....	45
<b>Table 3.1</b> Collection sites, populations, map abbreviation and sample sizes of <i>Trigona pagdeni</i> used in this study.....	52
<b>Table 3.2</b> Comparison of TE-AFLP bands generated by primer pairs <i>Bam</i> HI-C and <i>Xba</i> I-CC, and <i>Bam</i> HI-C and <i>Xba</i> I-AC.....	59
<b>Table 3.3</b> Pair-wise genetic distances among populations of <i>Trigona pagdeni</i> in Thailand, as estimated in GenAlEx V6.....	60
<b>Table 3.4</b> Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of TE-AFLP banding patterns.....	60
<b>Table 3.5</b> Regional differentiation: AMOVA of TE-AFLP banding patterns generated by two primer pairs in 117 <i>T. pagdeni</i> .....	61
<b>Table 4.1</b> Summary of comparison of genetic diversity in six populations of the <i>cytb</i> gene (600 bp) in <i>T. pagdeni</i> in Thailand computed from SSCP binary data.....	73

## PAGE

<b>Table 4.2</b> Summary of comparison of genetic diversity in six populations of the ATPase(6, 8) gene (500 bp) in <i>T. pagdeni</i> in Thailand computed from SSCP binary data.....	74
<b>Table 4.3</b> Summary of comparison of genetic diversity in six populations of the 16S rRNA gene (500 bp) in <i>T. pagdeni</i> in Thailand computed from SSCP binary data.....	75
<b>Table 4.4</b> Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of polymorphisms of the cytb , ATPase(6,8) and 16S rRNA gene in each individual of <i>T. pagdeni</i> from 6 population groupings.....	77
<b>Table 4.5</b> Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of polymorphisms of the cytb, ATPase (6,8) and 16S rRNA gene in each individual of <i>T. pagdeni</i> .....	78
<b>Table 4.6</b> $\Phi_{PT}$ values and Nm (number of migrants) analysis between paired geographic samples of <i>T. pagdeni</i> .....	80
<b>Table 4.7</b> Pair-wise genetic distance of the cytb, ATPase(6, 8) and 16S rRNA genes.....	81

	PAGE
<b>Table 5.1</b> The total number of occurrences of codons on the 11 protein-coding genes in <i>T. pagdeni</i> mtDNA.....	106
<b>Table 5.2</b> Presentation of base compositions (%) in each gene of <i>T. pagdeni</i> mtDNA.....	108
<b>Table 5.3</b> A/T compositions (%) observed in the first, second and third codon position on each protein-coding gene.....	110
<b>Table 5.4</b> Overlapping regions between mitochondrial genes of <i>T. pagdeni</i> : involved genes, overlap size (bp) and coding strand.....	110
<b>Table 5.5</b> Non-coding regions between mitochondrial genes of <i>T. pagdeni</i> .....	111
<b>Table 5.6</b> Size, start codon and stop codon comparisons of protein-coding genes between <i>T. pagdeni</i> (Tp), <i>M. bicolor</i> (Mb) and <i>A. mellifera</i> (Am).....	111
<b>Table A.1</b> Collection sites, population, map abbreviation and sample sizes of Stingless bees used in this study.....	165
<b>Table A.2</b> AFLP primers and their sequences used for the PCR amplification and ligation procedure.....	170
<b>Table A.3</b> Primers designed from a candidate species-specific AFLP marker of <i>T. pagdeni</i> .....	180
<b>Table A.4</b> PCR profiles and composition for specificity test of a SCAR marker derived from the candidate species-specific AFLP marker of <i>T. pagdeni</i> .....	180



	<b>PAGE</b>
<b>Table A.5</b> TE-AFLP primers and their sequences used for the PCR amplification and ligation procedure.....	185
<b>Table A.6</b> Pairs of primers used to amplify mtDNA regions of <i>T. pagdeni</i> .....	186
<b>Table A.7</b> PCR conditions used for amplification of mtDNA gene of <i>T. pagdeni</i> .....	187
<b>Table A.8</b> Recognition sites of restriction enzymes for inverse PCR.....	190
<b>Table A.9</b> Recognition sites of restriction enzymes for Genome walking.....	194
<b>Table A.10</b> Sequences of primers, expected size amplified using each primer pair based on genome walking technique.....	195
<b>Table A.11</b> Sequences, melting temperature of primers and size of the expected amplification products of mtDNA in <i>T. pagdeni</i> .....	196
<b>Table A.12</b> PCR conditions used for amplification of mitochondrial DNA gene of <i>T. pagdeni</i> .....	197
<b>Table A.13</b> Long PCR primer sequences and size of the expected amplification product of the mtDNA in <i>T. pagdeni</i> .....	201
<b>Table A.14</b> PCR conditions used for long PCR amplification of mitochondrial DNA gene of <i>T. pagdeni</i> .....	203
<b>Table A.15</b> Primer sequences and melting temperature used to sequence the long PCR amplification products of <i>T. pagdeni</i> .....	208

## LIST OF FIGURES

	<b>PAGE</b>
<b>Figure 1.1</b> Pictures of nest entrances of stingless bees.....	5
<b>Figure 1.2</b> Queen rearing method in stingless bees .....	5
<b>Figure 1.3</b> Distribution of stingless bees.....	8
<b>Figure 1.4</b> Nest of stingless bees.....	8
<b>Figure 1.5</b> The artificial hives of <i>Trigona pagdeni</i> in the orchard of Thailand.....	8
<b>Figure 1.6</b> Morphological structures of stingless bees.....	12
<b>Figure 1.7</b> Morphological structures of <i>Trigona pagdeni</i> (A) and <i>Trigona laeviceps</i> (B).....	12
<b>Figure 1.8</b> Complete mitochondrial genome of <i>Apis mellifera</i> .....	19
<b>Figure 1.9</b> Geographic map of Thailand.....	19
<b>Figure 1.10</b> Mitochondrial tRNA gene order between <i>Apis mellifera</i> and <i>Melipona bicolor</i> .....	23
<b>Figure 1.11</b> Meliponini phylogeny (strict consensus of 6 trees) estimated from parsimony consensus analysis of 16S rRNA based on sequence data.....	24
<b>Figure 1.12</b> Meliponini phylogeny (strict consensus of 12 trees) estimated from maximum parsimony (MP) analysis of four gene fragments.....	25
<b>Figure 1.13</b> Steps of the polymerase chain reaction for amplifying DNA.....	28
<b>Figure 1.14</b> AFLP procedures.....	29
<b>Figure 1.15</b> Diagram shows the principal diagram of SSCP analysis.....	30

	PAGE
<b>Figure 2.1</b> A 0.8% ethidium bromide stained agarose gel showing the quality of the extracted DNA of each bee.....	39
<b>Figure 2.2</b> A 1.8% agarose gel electrophoresis of preamplification products of genomic DNA of each <i>Trigona</i> species.....	39
<b>Figure 2.3</b> A 1.8% agarose gel electrophoresis of selective amplification products of genomic DNA of each <i>Trigona</i> species using two primer combinations.....	40
<b>Figure 2.4</b> AFLP patterns of stingless bees.....	41
<b>Figure 2.5</b> Reamplification of the species-specific marker of <i>T. pagdeni</i> .....	42
<b>Figure 2.6</b> Colony PCR product of recombinant clone containing the targeted insert.....	42
<b>Figure 2.7</b> Nucleotide sequence of a candidate species-specific AFLP fragment in <i>T. pagdeni</i> .....	42
<b>Figure 2.8</b> A 1.5% agarose gel electrophoresis showing the PCR products of the SCAR marker derived from the species-specific AFLP marker in <i>T. pagdeni</i> .....	44
<b>Figure 2.9</b> SSCP patterns obtained after amplification of <i>Trigona</i> DNA with CUTLTP primers.....	45
<b>Figure 3.1</b> Collection sites of <i>T. pagdeni</i> Schwarz in Thailand.....	53
<b>Figure 3.2</b> Autoradiogram of some TE-AFLP patterns .....	58

	PAGE
<b>Figure 4.1</b> The SSCP pattern of the amplified cyt b gene of <i>T. pagdeni</i> from different geographic regions in Thailand.....	71
<b>Figure 4.2</b> The SSCP pattern of the amplified ATPase(6, 8) gene of <i>T. pagdeni</i> from different geographic regions in Thailand.....	71
<b>Figure 4.3</b> The SSCP pattern of the amplified 16S rRNA gene of <i>T. pagdeni</i> from different geographic regions in Thailand.....	72
<b>Figure 4.4</b> A neighbor-joining tree summarizing genetic relationships between each geographic samples of <i>T. pagdeni</i> in Thailand analyzed by polymorphism of the cyt b gene.....	82
<b>Figure 4.5</b> A neighbor-joining tree summarizing genetic relationships between each geographic samples of <i>T. pagdeni</i> in Thailand analyzed by polymorphism of the ATPase(6, 8) gene.....	82
<b>Figure 4.6</b> A neighbor-joining tree summarizing genetic relationships between each geographic samples of <i>T. pagdeni</i> in Thailand analyzed by polymorphism of the 16S rRNA gene.....	82
<b>Figure 5.1</b> The PCR products amplified using primer pairs LR12647-R+COI2494, LR12677+ cyt b10729 and COIII9821+cyt b5031.....	91
<b>Figure 5.2</b> Overlapping the three sequenced fragments.....	91



	PAGE
<b>Figure 5.3</b> The positions of ten internal primer pairs on the overlapped fragment used for verifying the gene order.....	92
<b>Figure 5.4</b> The PCR products amplified using ten internal primer pairs.....	93
<b>Figure 5.5</b> The partial mtDNA sequence of <i>T. pagdeni</i> .....	104
<b>Figure 5.6</b> A presentation for the protein-coding genes of the mtDNA sequence of <i>T. pagdeni</i> .....	122
<b>Figure 5.7</b> A neighbor-joining tree summarizing genetic relationships between insect species analyzed from each gene sequence.....	124
<b>Figure 5.8</b> Alignment of the mitochondrial tRNA genes from <i>T. pagdeni</i> .....	128
<b>Figure 5.9</b> Genetic organization of the <i>T. pagdeni</i> mtDNA .....	129
<b>Figure A.1</b> Collection sites of <i>Trigona pagdeni</i> Schwarz in Thailand.....	164
<b>Figure A.2</b> Automated DNA sequencing.....	178
<b>Figure A.3</b> A flow chart of the inverse PCR procedure.....	190
<b>Figure A.4</b> Flow chart of genome walking protocol.....	193
<b>Figure A.5</b> Gene organization and positions of ten internal primer pairs.....	207

## LIST OF ABBREVIATIONS

°C	degree celcius
°N	degree of north latitude
µl	microlitre
µM	micromolar
bp	base pair
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	depxyguanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
mtDNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (disodium salt)
EtBr	ethidium bromide
IPTG	isopropyl-thiogalactoside
kb	kilobase pair
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
mmol	millimole
pmol	picomole
ng	nanogram
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RNase A	ribonuclease A
SDS	sodium dodecyl sulfate
TE	tris EDTA
Tris	tris(hydroxyl methyl) aminomethane