

ความแตกต่างทางพันธุกรรมในผึ้งโพรงไทย *Apis cerana*  
โดยใช้ความแปรผันของไมโครแซทเทลไลท์และนิวเคลียไรโบโซมอัลอาร์เอ็นเอจีน



นางสาว สุภัค เล้าอรุณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-184-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**GENETIC DIFFERENTIATION AMONG THAI HONEYBEES *Apis cerana***  
**USING MICROSATELLITE VARIATION AND**  
**NUCLEAR RIBOSOMAL RNA GENES**

**MISS SUPAK LAOARON**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements**  
**for the Degree of Master of Science in Biochemistry**

**Department of Biochemistry**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

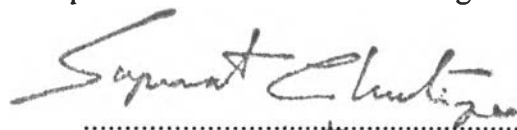
**Academic Year 1998**

**ISBN 974-332-184-5**

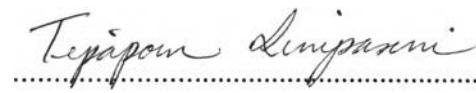
Thesis Title      Genetic differentiation among Thai honeybees *Apis cerana* using  
microsatellite variation and nuclear ribosomal RNA genes  
By                      Miss Supak Laoaroon  
Department        Biochemistry  
Thesis Advisor    Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.

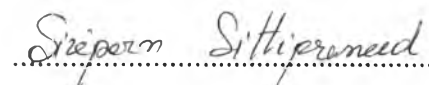
---


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

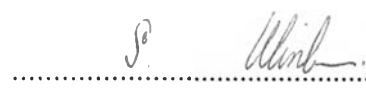
  
..... Dean of Graduate School  
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

  
..... Chairman  
(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

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

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

  
..... Member  
(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

สุภัท เล้าอรุณ : ความแตกต่างทางพันธุกรรมในผึ้งโพรงไทย *Apis cerana* โดยใช้ ความแปรผัน  
ของไมโครแซทเทลไลท์ และนิวเคลียไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอจีน (Genetic differentiation among  
Thai honeybees *Apis cerana* using microsatellite variation and nuclear ribosomal RNA genes)  
อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ศิริพร สิทธิประณีต ; 107 หน้า. ISBN 974-332-184-5.

ได้ตรวจสอบระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของผึ้ง โพรง *A. cerana*  
ในประเทศไทย จากบริเวณ 5 พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ คือ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ  
ภาคใต้ และเกาะสมุย โดยการใช้ลำดับเบสในบริเวณอินเทอร์นอลทรานสไคริปชันเซอร์ (ITS) ของนิวเคลียส  
ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (nrDNA) และความแปรผันของ microsatellite DNA การศึกษาลำดับเบสของ ITS ที่  
เพิ่มปริมาณโดย PCR จากผึ้งโพรง 21 ตัวอย่าง พบว่ามี G และ C เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 52.1% และ  
ลำดับเบสมีความแตกต่างกันน้อย มี point mutation เกิดขึ้นเพียง 4 ตำแหน่ง โดยเป็น transversion 1  
ตำแหน่ง และ transition 3 ตำแหน่ง จากข้อมูลของ point mutation ที่เกิดขึ้นในบริเวณ ITS สามารถแบ่ง  
ผึ้งโพรงได้เป็น กลุ่มทางตอนเหนือ (ภาคเหนือ ภาคกลาง และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) กลุ่มภาคใต้  
และกลุ่มเกาะสมุย

การวิเคราะห์ด้วย microsatellite DNA ในตัวอย่าง 265 ตัว ครอบคลุม 5 พื้นที่ภูมิศาสตร์ทั่ว  
ประเทศ โดยใช้ microsatellite primer ของ *A. mellifera* 13 คู่ พบว่าตำแหน่งของ microsatellite A28,  
A107 และ A113 มีความหลากหลาย โดยมีจำนวนอัลลีล (allele) ต่อตำแหน่ง เป็น 24, 10 และ 3 อัลลีล  
ตามลำดับ มีค่าเฮเทอโรไซโกซิติ (Heterozygosity) เฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.18 ถึง 0.46 การวิเคราะห์ geographic  
heterogeneity และนำมาแสดงความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ โดยใช้วิธีของ Neighbor - joining สามารถแบ่ง  
กลุ่มผึ้งโพรงในประเทศไทยออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มตอนเหนือ (ภาคเหนือ ภาคกลาง และ ภาคตะวันออกเฉียง  
เหนือ) กลุ่มภาคใต้ และกลุ่มเกาะสมุย

ภาควิชา ..... ชีวเคมี  
สาขาวิชา ..... ชีวเคมี  
ปีการศึกษา ..... 2541

ลายมือชื่อนิติต ..... สุภัท เล้าอรุณ  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... ศิริพร สิทธิประณีต  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## C826243 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: honeybees / *Apis cerana* / ITS region / microsatellite / genetic variation

SUPAK LAOARON : GENETIC DIFFERENTIATION AMONG THAI HONEYBEES' *Apis cerana* USING MICROSATELLITE VARIATION AND NUCLEAR RIBOSOMAL RNA GENES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D.  
107 pp. ISBN 974-332-184-5.

Level of genetic differentiation and populating structure of Thai honeybees *A. cerana* from five different geographic locations (North, Central, North-East, South and Samui Island) was investigated using sequencing of PCR-amplified internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA and variation of microsatellite DNA. The GC content of amplified ITS region in *A. cerana* was 52.1%. Low sequence polymorphisms in the amplified ITS region were observed among 21 investigated sequences covering five geographic samples. Only 4 point mutations were found constituting of 1 transversion and 3 transition. Using the information on the point mutation, the origin of *A. cerana* from the Northern group (North, Central and North-East), Southern and Samui Island could be unambiguously traced.

Microsatellite DNA analysis in 5 geographic samples included 265 colonies by 13 *A. mellifera* microsatellite loci using Polymerase Chain Reaction (PCR). Three microsatellite loci (A28, A107 and A113) were shown to be polymorphic with number of alleles at each locus of 24, 10 and 3 alleles, respectively. The average heterozygosities of Thai *A. cerana* estimated from these microsatellite loci was 0.18-0.46. The analysis of geographic heterogeneity and phylogenetic reconstruction using the Neighbor-joining approach divided 5 geographic *A. cerana* samples to 3 different groups consisting of 1) Northern (North, Central and North-East), 2) South and 3) Samui Island.

ภาควิชา..... Biochemistry  
สาขาวิชา..... Biochemistry  
ปีการศึกษา..... 2541

ลายมือชื่อนิสิต..... ศุภาค เลิศอน  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... Siriporn Sittipraneed  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... -

## ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Siripom Sittipraneed for her guidance, encouragement, suggestion and discussion throughout my study.

The special thanks are also extend to Dr. Sirawut Klinbunga for this help in data computerized analysis, suggestions, discussion and serving as thesis committee.

My appreciation is also express to Assistant Professor Dr. Tipaporn Limpaseni and Professor Dr. Siriwat Wongsiri for serving on my thesis committee.

Thanks are also express to all teachers and all friends in the Department of Biochemistry and Biotechnology for their help in the laboratory and friendship.

I would like to thanks National Science an Technology Development Agency (NSTDA) for financial supports.

Finally, I wish to extend my deepest gratitude to my family and my friends for their love and understanding.

## CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLELS.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS .....	xi
CHEPTER I INTRODUCTION.....	1
CHEPTER II MATERIALS AND METHODS.....	15
2.1 Instruments.....	15
2.2 Inventory supplies.....	16
2.3 Chemicals.....	16
2.4 Oligonucleotide primers.....	17
2.5 Enzymes.....	17
2.6 Radioactive.....	18
2.7 Samples.....	18
2.8 DNA extraction.....	18
2.9 Measurement of DNA concentration.....	19
2.10 PCR amplification.....	20
2.11 Preparation of DNA template for DNA sequencing.....	23
2.12 DNA sequencing.....	25
2.13 Preparation of the polyacrylamide gel and gel electrophoresis.....	26
2.14 Autoradiography.....	27
2.15 Data analysis.....	28
CHEPTER III RESULT.....	31
3.1 DNA extraction.....	31

	Page
3.2 Optimization of MgCl <sub>2</sub> concentration for amplification of the ITS region in <i>A. cerana</i> .....	31
3.3 Characterization of the ITS amplified product.....	34
3.4 DNA sequencing.....	34
3.5 Optimization of MgCl <sub>2</sub> concentration for amplification of microsatellite loci in <i>A. cerana</i> .....	45
3.6 Characterization of the amplified product of eight microsatellite loci in <i>A. cerana</i> .....	48
3.7 Genetic variation in Thai <i>A. cerana</i> .....	48
CHEPTEr IV DISCUSSION.....	65
CHEPTEr V CONCLUSION.....	72
REFERENCES.....	73
APPENDICES.....	80
BIOGRAPHY.....	107



## LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 The imports and exports of natural honey of Thailand in 1986-1998.....	2
2.1 Primer sequences used for PCR amplification and sequencing of ITS region in <i>A. cerana</i> .....	21
2.2 Primer sequences and PCR conditions for the 13 <i>A. mellifera</i> microsatellite loci used to screen for polymorphic loci in <i>A. cerana</i> .....	24
3.1 The size of ITS amplified products of <i>A. cerana</i> from North (N), Central (C), North-East (NE), South (S) and Samui Island.....	37
3.2 PCR condition of microsatellite primer used to screen polymorphic loci in <i>A. cerana</i> .....	47
3.3 Allele frequencies, number of allele, observed and expected heterozygosity of Three microsatellite loci in five samples of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	56
3.4 The number of allele per locus and heterozygosity averaged overall loci.....	58
3.5 Cavalli-Sforza and Edwards chord distance between the five geographic samples of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	61
3.6 Geographic heterogeneity analysis of five geographic samples of <i>A. cerana</i> in Thailand .....	63
3.7 <i>F</i> -statistics for microsatellite analysis of each pair of five geographic samples of <i>A. cerana</i> .....	64
3.8 <i>F</i> -statistics for microsatellite analysis of five geographic samples of <i>A. cerana</i> .....	64

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Beekeeping of <i>Apis cerana</i> in Thailand.....	3
1.2 Dotted lines indicate the approximate geographic ranges of <i>A. cerana</i> subspecies .....	6
1.3 Number of <i>A. cerana</i> and <i>A. mellifera</i> colonies in northern Thailand.....	8
1.4 Schematic representation of an insect ribosomal DNA repeat unit .....	12
3.1 High molecular weight DNA of <i>A. cerana</i> extracted from the thorax of each <i>A. cerana</i> worker .....	32
3.2 Optimization of MgCl <sub>2</sub> concentration used for amplification of ITS region in ribosomal RNA gene of <i>A. cerana</i> .....	33
3.3 The ITS amplified products were electrophoresed though a 1.5% agarose gel at 120 V for 1 hours.....	36
3.4 An autoradiogram of partial ITS sequence derived from primer ITS3.....	39
3.5 Alignment of nucleotide sequences of <i>A. cerana</i> in ITS region of nuclear Ribosomal RNA gene of 21 honeybee samples using ClustalX (1.64b).....	40
3.6 The optimal MgCl <sub>2</sub> concentration for microsatellite loci (A8 and A113).....	46
3.7 Microsatellite patterns of <i>A. cerana</i> individuals at locus A28.....	49
3.8 Microsatellite patterns of <i>A. cerana</i> individuals at locus A107.....	50
3.9 Microsatellite patterns of <i>A. cerana</i> individuals at locus A113.....	51
3.10 Allele frequency distributions at the microsatellite locus A28 .....	53
3.11 Allele frequency distributions at the microsatellite locus A107 .....	54
3.12 Allele frequency distributions at the microsatellite locus A113 .....	55
3.13 A neighbor-joining tree illustrating relationships among 5 geographic populations of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	62

## LIST OF ABBREVIATIONS

A, T, G, C	=	nucleotide containing the base adenine, thymine, guanine and cytosine, respectively
bp	=	base pair
°C	=	degree celcius
Ci	=	curie
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphates(dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
ddNTPS	=	dideoxyribonucleotide triphosphates(ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
HCl	=	hydrochloric acid
ITS	=	internal transcribed spacer
Kb	=	kilobase
KCl	=	potassium chloride
MgCl <sub>2</sub>	=	megnesium chloride
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
mtDNA	=	mitochondrial DNA
ng	=	nanagram
PCR	=	polymerase chain reaction
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	revolution per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfat
TEMED	=	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethy lenediamine

Tris	=	tris (hydroxy methyl) aminomethane
UV	=	ultraviolet
v	=	volume
V	=	volt
W	=	watt
$\mu\text{g}$	=	microgram
$\mu\text{l}$	=	microlitre
$\mu\text{M}$	=	micromolar