ความแตกต่างทางพันธุกรรมในผึ้งโพรงไทย *Apis cerana* โดยใช้ความแปรผันของไมโครแซทเทลไลท์และนิวเคลียไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอจีน

นางสาว สุภัค เล้าอรุณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-184-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18902492

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

MISS SUPAK LAOAROON

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 Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

..... Member

(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

สุภัค เล้าอรุณ : ความแตกต่างทางพันธุกรรมในผึ้งโพรงไทย *Apis cerana* โดยใช้ความแปรผันของไมโครแซทเทลไลท์ 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.

ได้ตรวจสอบระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของผึ้งโพรง *A. cerana* ในประเทศไทย จากบริเวณ 5 พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ คือ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ และเกาะสมุย โดยการใช้ลำดับเบสในบริเวณอินเทอร์นอลทรานสไครบสเปเซอร์ (ITS) ของนิวเคลียร์ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (nrDNA) และความแปรผันของ microsatellite DNA การศึกษาลำดับเบสของ ITS ที่เพิ่มปริมาณโดย PCR จากผึ้งโพรง 21 ตัวอย่าง พบว่ามี G และ C เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 52.1% และลำดับเบสมีความแตกต่างกันน้อย มี point mutation เกิดขึ้นเพียง 4 ตำแหน่ง โดยเป็น transversion 1 ตำแหน่ง และ transition 3 ตำแหน่ง จากข้อมูลของ point mutation ที่เกิดขึ้นในบริเวณ ITS สามารถแบ่งผึ้งโพรงได้เป็น กลุ่มทางตอนเหนือ (ภาคเหนือ ภาคกลาง และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) กลุ่มภาคใต้ และกลุ่มเกาะสมุย

การวิเคราะห์ด้วย microsatellite DNA ในตัวอย่าง 265 ตัว ครอบคลุม 5 พื้นที่ภูมิศาสตร์ทั่วประเทศ โดยใช้ microsatellite primer ของ *A. mellifera* 13 คู่ พบว่าตำแหน่งของ microsatellite A28, A107 และ A113 มีความหลากหลาย โดยมีจำนวนอัลลีล (allele) ต่อตำแหน่งเป็น 24, 10 และ 3 อัลลีล ตามลำดับ มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้ (Heterozygosity) เฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.18 ถึง 0.46 การวิเคราะห์ geographic heterogeneity และนำมาแสดงความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ โดยใช้วิธีของ Neighbor - joining สามารถแบ่งกลุ่มผึ้งโพรงในประเทศไทยออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มตอนเหนือ (ภาคเหนือ ภาคกลาง และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) กลุ่มภาคใต้ และกลุ่มเกาะสมุย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต สุภัค เล้าอรุณ

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

C826243 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: honeybees / *Apis cerana* / ITS region / microsatellite / genetic variation

SUPAK LAOAROON : 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 ลายมือชื่อนิสิต ศุภาศ เลาอรุณ

สาขาวิชา Biochemistry ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed for her guidance, encouragement, suggestion and discussion thoughout 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 $MgCl_2$ concentration for amplification of the ITS region in *A. cerana* 31

3.3 Characterization of the ITS amplified product 34

3.4 DNA sequencing 34

3.5 Optimization of $MgCl_2$ concentration for amplification of microsatellite loci in *A. cerana* 45

3.6 Characterization of the amplified product of eight microsatellite loci in *A. cerana* 48

3.7 Genetic variation in Thai *A. cerana* 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 *A. cerana*..... 21

2.2 Primer sequences and PCR conditions for the 13 *A. mellifera* microsatellite loci used to screen for polymorphic loci in *A. cerana*..... 24

3.1 The size of ITS amplified products of *A. cerana* 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 *A. cerana*..... 47

3.3 Allele frequncies, number of allele, observed and expected heterozygosity of Three microsatellite loci in five samples of *A. cerana* 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 *A. cerana* in Thailand..... 61

3.6 Geographic heterogeneity analysis of five geographic samples of *A. cerana* in Thailand 63

3.7 *F*-statistics for microsatellite analysis of each pair of five geographic samples of *A. cerana*..... 64

3.8 *F*-statistics for microsatellite analysis of five geographic samples of *A. cerana*..... 64

LIST OF FIGURES

Figure Page

1.1 Beekeeping of *Apis cerana* in Thailand 3

1.2 Dotted lines indicate the approximate geographic ranges of *A. cerana* subspecies 6

1.3 Number of *A. cerana* and *A. mellifera* colonies in northern Thailand 8

1.4 Schematic representation of an insect ribosomal DNA repeat unit 12

3.1 High molecular weight DNA of *A. cerana* extracted from the thorax of each *A. cerana* worker 32

3.2 Optimization of MgCl2 concentration used for amplification of ITS region in ribosomal RNA gene of *A. cerana* 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 *A. cerana* in ITS region of nuclear Ribosomal RNA gene of 21 honeybee samples using ClustalX (1.64b) 40

3.6 The optimal MgCl2 concentration for microsatellite loci (A8 and A113) 46

3.7 Microsatellite patterns of *A. cerana* individuals at locus A28 49

3.8 Microsatellite patterns of *A. cerana* individuals at locus A107 50

3.9 Microsatellite patterns of *A. cerana* 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 *A. cerana* in Thailand 62

LIST OF ABBREVIATIONS

A, T, G, C	=	nucleotide containing the base adenine, thymine, guanine and cytosine, respectively
bp	=	base pair
^{o}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
$MgCl_2$	=	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 sulfate
TEMED	=	*N, N, N′, N′*–tetramethylethy lenediamine

Tris	=	tris (hydroxy methyl) aminomethane
UV	=	ultraviolet
v	=	volume
V	=	volt
W	=	watt
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar