

การวิเคราะห์อาร์เอพีดีเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน
ในไก่ฟ้าไก่ป่าและนกกระทา 5 ชนิด



นายสฤติย์ มาลาวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4861-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RAPD ANALYSIS FOR STUDYING GENETIC DIVERSITY IN FIVE DIFFERENT BREEDS
IN GALLOPHEASANTS AND PARTRIDGE

Mr. Sathit Malawong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Programme of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-4861-2

481785

สถิตย์ มาลาวงษ์ : การวิเคราะห์อาร์เอพีดีเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่าง
กันในไก่ฟ้าไก่ป่าและนกกระทา 5 ชนิด. (RAPD ANALYSIS FOR STUDYING GENETIC
DIVERSITY IN FIVE DIFFERENT BREEDS IN GALLOPHEASANTS AND PARTRIDGE)
อ.ที่ปรึกษา: รศ. วิณา เมฆวิชัย, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 133 หน้า.
ISBN 974-17-4861-2.

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่ฟ้าไก่ป่า และนกกระทา 5 ชนิด คือ
นกหว้า (*Argusianus argus argus*), ไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceous*), ไก่ฟ้าพญาลอ
(*Lophura diardi*), นกยูงไทย (*Pavo muticus imperator*) และไก่จุก (*Rollulus roulroul*) ด้วยไพรเมอร์ที่
คัดสรรได้และการวิเคราะห์อาร์เอพีดี พบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามีความแปรผันของยีนสูง ตัวอย่างที่
นำมาศึกษาส่วนใหญ่เป็นสัตว์ป่าหายากและใกล้สูญพันธุ์ของไทยเนื่องจากการถูกคุกคาม ดีเอ็นเอ
ต้นแบบที่นำมาใช้จากการสกัดจากหยดเลือดแห้งและปลายขนของไก่ฟ้าไก่ป่า และนกกระทา 5 ชนิด ที่
เก็บจากสถานีวิจัยและเพาะพันธุ์สัตว์ป่า และจากฟาร์มแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย การวิเคราะห์อาร์เอ
พีดีด้วยไพรเมอร์ที่คัดสรรได้ 5 ไพรเมอร์จาก 100 ไพรเมอร์ คือ OPA-18, OPC-02, OPP-03, UBC-133
และ UBC-135 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไก่ฟ้าไก่ป่า และนกกระทาทั้ง 5 ชนิดได้ พบ genetic
distance ระหว่างสปีชีส์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.2297 - 0.4519 และ ภายในสปีชีส์เดียวกัน คือ นกหว้า มีค่า
genetic distance อยู่ระหว่าง 0.0706-0.2599, ไก่ป่าตุ้มหูแดง 0.0889-0.2283, ไก่ฟ้าพญาลอ 0.0801-
0.4500, นกยูง 0.0710-0.5949 และ ไก่จุก 0.2376-0.3990 จากนั้นนำค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมมา
สร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการโดยวิธี neighbor-joining พบว่าสามารถหาลำดับ
ความสัมพันธ์ของไก่ฟ้าไก่ป่าและนกกระทาที่แตกต่างกันได้ จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม
ด้วย Exact test แบบ pairwise analysis พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์และภายใน
สปีชีส์เดียวกันไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) จากการศึกษาในครั้งนี้พบ candidate
population specific bands ทั้งในระดับระหว่างสปีชีส์และภายในสปีชีส์เดียวกันด้วย ซึ่งสามารถนำมา
จำแนกลักษณะเฉพาะของประชากรของนกหว้า นกยูงเขียวไทย และไก่จุกได้

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572520423 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: RAPD / GENETIC DIVERSITY / GALLOPHEASANTS / PARTRIDGE

SATHIT MALAWONG : RAPD ANALYSIS FOR STUDYING GENETIC DIVERSITY IN FIVE DIFFERENT BREEDS IN GALLOPHEASANTS AND PARTRIDGE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WINA MECHVICHAI, M. Sc., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. JESSADA DENDUANGBORIPANT, Ph.D., 133 pp. ISBN 974-17-4861-2.

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to examine genetic diversity in five different breeds in gallopheasants and partridge. Most of studying species are threatened birds of Thailand including Great Argus (*Argusianus argus argus*), Red Junglefowl (*Gallus gallus spadiceous*), Siamese Fireback (*Lophura diardi*), Green Peafowl (*Pavo muticus imperator*) and Crested Wood Partridge (*Rollulus roulroul*). DNA templates in this study were extracted from bloodstains and feather pulp from wildlife research and breeding stations and private farms in various parts of Thailand. Screening from five out of a hundred primers (OPA-18, OPC-02, OPP-03, UBC-133 and UBC-135) shown highly polymorphic amplified products. For this study, RAPD analysis is possibly to analyzed genetic diversity both in interspecies and intraspecies of gallopheasant. Genetic distance in interspecies were ranging from 0.2297-0.4519 and genetic distance in intraspecies for Great Argus, Red Junglefowl, Siamese Fireback, Green Peafowl and Crested Wood Partridge were ranging from 0.0706-0.2599, 0.0889-0.2283, 0.0801-0.4500, 0.0710-0.5949 and 0.2376-0.3990, respectively. Phylograms were constructed by using neighbor-joining, these unrooted trees can be described genetic relationships among interspecies and intraspecies. Genetic differences analysis by using pairwise exact test in all population are not significantly different in genetic distance ($P \leq 0.05$) among interspecies and intraspecies. In this study was found candidate population specific bands among interspecies and intraspecies and its can be used to characterize in some different population such as Great Argus, Green Peafowl and Crested Wood Partridge.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature.....

Academic year.....2005.....Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Sathit Malawong
Wina Mechvichai
Jessada Denduangboripant

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Wina Meckwichai for her guidance, supervision, encouragement and support throughout my study.

I am very grateful to my co-advisor, Assistant Professor Dr. Jessada Denduangboripant for his great helps, guidances and suggestions in laboratory.

My appreciation is also passed to Professor Dr. Siriwat Wongsiri, and Assistant Professor Dr. Supat Chareonpornwattana for serving as thesis committee, for their available comments and also suggestions.

This thesis would not have been complete without a good helpful from Dr. Sirawut Klinbunga, I would like to express my very appreciation to him for guidance, suggestions in laboratory, data computerized analysis, comment on my thesis.

The special thanks to Miss Waree Wutthivikaikan for her good helpful in laboratory techniques and friendly to me. Thanks are extended to Miss Kanokwan Sawang in helping my collection of all gallopheasants and partridge blood samples.

I am really thankful to Biology Department especially in CBCB laboratory Room 207. I would like to send my deeply gratitude to them for everything during this study.

This project was supported by Graduate School of Chulalongkorn University for financial support for all laboratory equipments and chemicals.

Finally, I would like to express my deepest to my parents and member of my family for their encouragement, unlimited love, care, and understanding extended throughout my study.

CONTENTS

	Page
Thai abstract.....	iv
English abstract.....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of tables.....	ix
List of figures.....	xi
List of abbreviations.....	xiv
Chapter I Introduction.....	1
1.1 Classification of five different species in four gallopheasants: Great Argus, Red Junglefowl, Siamese Fireback, Green Peafowl and a partridge: Crested Wood Partridge.....	2
1.2 Biology of five different species in gallopheasants and partridge.....	3
1.3 Molecular genetic markers as tools for genetic diversity studies in birds or in gallopheasants.....	15
1.4 Objective.....	21
Chapter II Materials and methods.....	22
2.1 Equipments.....	22
2.2 Chemicals.....	23
2.3 Enzymes.....	23
2.4 Oligonucleotide primers.....	23
2.5 Sample collection.....	27
2.6 DNA extraction.....	29
2.7 Quality determination of genomic DNA.....	30
2.8 Screening of primers used in this study.....	30
2.9 <i>In vitro</i> amplification of Randomly Amplified Polymorphic DNA primer using the polymerase chain reaction (PCR).....	31
2.10 Agarose gel electrophoresis analysis.....	32

2.11	Statistical procedures of determination of genetic variation by RAPD analysis.....	32
Chapter III	Results.....	34
3.1	Sample collections.....	34
3.2	DNA extraction.....	34
3.3	Determination of genetic variation in among intra- and inter-species of five gallopheasants and partridge.....	40
3.3	RAPD analysis.....	44
3.5	Genetic distance and Phylogenetic relationship.....	71
Chapter IV	Discussion.....	81
Chapter V	Conclusions.....	88
	References.....	89
	Appendices.....	96
	Biography.....	133

LIST OF TABLES

Table	Page
2.1 Sequence of oligonucleotide primers.....	24
2.2 Shown species, locations and number of specimens used in this studied....	28
3.1 Shown RAPD products of interspecies; Number of scorable bands, size range, total no. of monomorphic/polymorphic bands and Percentage of polymorphic bands of five primers	41
3.2 Shown candidate species specific bands of interspecies; primer, species, size of loci, total no. of monomorphic/polymorphic bands and Percentage of polymorphic bands.....	42
3.3 Shown primer, species, number of scorable bands, size range, number of monomorphic/polymorphic bands, percentage of polymorphic bands and candidate species specific bands. Resulting from RAPD analysis in intraspecies.....	43
3.4 Shown species, primer, population and size of loci that found candidate population specific bands. Resulting from RAPD analysis in intraspecies.....	44
3.5 Shown average genetic distance between interspecies which were analyzed by RAPD.....	71
3.6 Average genetic distance between population in intraspecies of Great Argus (<i>Argusianus argus argus</i>) which were analyzed by RAPD using primer OPA-18, OPC-02, OPP-03, UBC-133 and UBC-135.....	74
3.7 average genetic distances between population in intraspecies of Red Junglefowl (<i>Gallus gallus spadiceus</i>) which was analyzed by RAPD using primer OPA-18, OPC-02, OPP-03, UBC-133 and UBC-135.....	74
3.8 average genetic distances between population in intraspecies of Siamese Fireback (<i>Lophura diardi</i>) which was analyzed by RAPD using primer OPA-18, OPC-02, OPP-03, UBC-133 and UBC-135.....	74
3.9 average genetic distances between population in intraspecies of Green Peafowl (<i>Pavo muticus imperator</i>) which were analyzed by RAPD using primer OPA-18, OPC-02, OPP-03, UBC-133 and UBC-135.....	75

3.10 average genetic distances between population in intraspecies of Crested Wood Partridge (*Rollulus roulroul*) which were analyzed by RAPD using primer OPA-18, OPC-02, OPP-03, UBC-133 and UBC-135.....75

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Malay Great Argus (<i>Argusianus argus argus</i>).....	4
1.2 Red Junglefowl (<i>Gallus gallus spadiceous</i>).....	8
1.3 Siamese Fireback (<i>Lophura diardi</i>).....	9
1.4 Green Peafowl (<i>Pavo muticus imperator</i>).....	11
1.5 Crested wood Partridge (<i>Rolluluss roulroul</i>).....	13
2.1 Temperature profile for all RAPD primers.....	31
3.1 Extracted genomic DNAs from bloodstains of Great Argus (<i>Argusianus argus argus</i>) using QIAamp® kit method were electrophoresed with 0.8% agarose gel and stained with ethidium bromide.....	35
3.2 Extracted genomic DNAs from bloodstains of Red Junglefowl (<i>Gallus gallus spadiceous</i>) using QIAamp® kit method were electrophoresed with 0.8% agarose gel and stained with ethidium bromide.....	36
3.3 Extracted genomic DNAs from bloodstains of Siamese Fireback (<i>Lophura diardi</i>) using QIAamp® kit method were electrophoresed with 0.8 % agarose gel and stained with ethidium bromide.....	37
3.4 Extracted genomic DNAs from bloodstains of Green Peafowl (<i>Pavo muticus imperator</i>) using QIAamp® kit method were electrophoresed with 0.8 % agarose gel and stained with ethidium bromide.....	38
3.5 Extracted genomic DNAs from bloodstains of Crested wood Partridge (<i>Rolluluss roulroul</i>) using QIAamp® kit method were electrophoresed with 0.8 % agarose gel and stained with ethidium bromide.....	39
3.6 RAPD patterns of inter-specific species generated from primer OPA-18.....	44
3.7 RAPD patterns of inter-specific species generated from primer OPC-02.....	45
3.8 RAPD patterns of inter-specific species generated from primer OPP-03.....	45
3.9 RAPD patterns of inter-specific species generated from primer UBC-133.....	46
3.10 RAPD patterns of inter-specific species generated from primer UBC-135.....	46
3.11 RAPD patterns of Great Argus generated from primer OPA-18.....	49
3.12 RAPD patterns of Great Argus generated from primer OPC-02.....	49

3.13 RAPD patterns of Great Argus generated from primer OPP-03.....	50
3.14 RAPD patterns of Great Argus generated from primer UBC-133.....	50
3.15 RAPD patterns of Great Argus generated from primer UBC-135.....	51
3.16 RAPD patterns of Red Junglefowl generated from primer OPA-18.....	53
3.17 RAPD patterns of Red Junglefowl generated from primer OPC-02.....	53
3.18 RAPD patterns of Red Junglefowl generated from primer OPP-03.....	54
3.19 RAPD patterns of Red Junglefowl generated from primer UBC-133.....	54
3.20 RAPD patterns of Red Junglefowl generated from primer UBC-135.....	55
3.21 RAPD patterns of Siamese Fireback generated from primer OPA-18.....	57
3.22 RAPD patterns of Siamese Fireback generated from primer OPC-02.....	57
3.23 RAPD patterns of Siamese Fireback generated from primer OPP-03.....	58
3.24 RAPD patterns of Siamese Fireback generated from primer UBC-133.....	58
3.25 RAPD patterns of Siamese Fireback generated from primer UBC-135.....	59
3.26 RAPD patterns of Green Peafowl generated from primer OPA-18.....	61
3.27 RAPD patterns of Green Peafowl generated from primer OPC-02.....	62
3.28 RAPD patterns of Green Peafowl generated from primer OPP-03.....	63
3.29 RAPD patterns of Green Peafowl generated from primer UBC-133.....	64
3.30 RAPD patterns of Green Peafowl generated from primer UBC-135.....	65
3.31 RAPD patterns of Crested Wood Partridge generated from primer OPA-18...	67
3.32 RAPD patterns of Crested Wood Partridge generated from primer OPC-02...	68
3.33 RAPD patterns of Crested Wood Partridge generated from primer OPP-03...	68
3.34 RAPD patterns of Crested Wood Partridge generated from primer UBC-133.	69
3.35 RAPD patterns of Crested Wood Partridge generated from primer UBC-135.	69
3.36 A Neighbor-joining tree indicating relationship of interspecies based on genetic distance between pairs of each population by using RAPD-PCR analysis.....	72
3.37 A neighbor-joining tree indicating relationships of intraspecies of Great Argus (<i>Argusianus argus argus</i>) based on genetic distance between pairs of each location by using RAPD-PCR analysis.....	76
3.38 A neighbor-joining tree indicating relationship of intraspecies of Red Junglefowl (<i>Gallus gallus spadiceus</i>) based on genetic distance between pairs of each location by using RAPD-PCR analysis.....	77

3.39 A neighbor-joining tree indicating relationship of intraspecies of Siamese Fireback (<i>Lophura diardi</i>) based on genetic distance between pairs of each location by using RAPD-PCR analysis.....	78
3.40 A neighbor-joining tree indicating relationship of intraspecies of Green Peafowl (<i>Pavo muticus imperator</i>) based on genetic distance between pairs of each location by using RAPD-PCR analysis.....	79
3.41 A neighbor-joining tree indicating relationship of intra-species of crested wood partridge (<i>Rollulus roulroul</i>) based on genetic distance between pairs of each location by using RAPD-PCR analysis.....	80

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	Degree Celsius
bp	Base pair
μg	Microgram
μl	Microlitre
μM	Micromolar
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytosine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (disodium salt)
EtBr	Ethidium bromide
kb	Kilobase pair
MgCl ₂	Magnesium chloride
mg	Milligram
min	Minute
ml	Millilitre (10 ⁻³ litre)
mM	Millimolar
mmol	Millimole
ng	Nanogram
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
rpm	Revolutions per minute
s	Second
TBE	Tris-boric-ethylene diamine tetraacetic acid
Tris	Tris (hydroxy methyl) aminomethane