

การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของผึ้งโพรงไทย *Apis cerana*
โดยใช้บริเวณควบคุมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

นาย สุรเทพ ภูทอง



สถาบันวิทยบริการ
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-430-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INVESTIGATION OF GENETIC VARIATION
AMONG THAI HONEYBEE *Apis cerana*
USING MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION



Mr. Suratep Pootong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Biochemistry

Graduate School

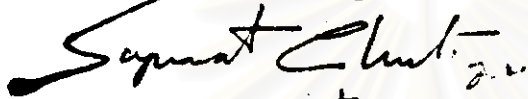
Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-332-430-5

Thesis Title Investigation of genetic variation among Thai honeybee
Apis cerana using mitochondrial DNA control region
By Mr. Suratep Pootong
Department Biochemistry
Thesis Advisor Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.
Thesis Co-advisor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.

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

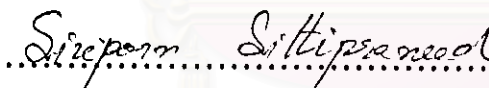


..... Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

THESIS COMMITTEE

 Chairman

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

 Thesis Advisor

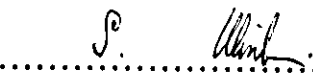
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

 Thesis Co-advisor

..... Thesis Co-advisor
(Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

 Member

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

 Member

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

สรุปบท กู้ทอง : การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของผึ้งโพรงไทย
Apis cerana โดยใช้บริเวณควบคุมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

(INVESTIGATION OF GENETIC VARIATION AMONG THAI HONEYBEE
Apis cerana USING MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION)

อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. ศิริพร สิริพิริยะพันธ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: อ. ดร. กนกทิพย์
ภักดีบำรุง, 104 หน้า. ISBN 974-332-430-5.

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของผึ้ง
โพรงไทย *A. cerana* โดยใช้ PCR-RFLP บริเวณ control region ของตัวอย่างผึ้งโพรง 125 รัง
จาก 6 กลุ่มประชากร ได้แก่ 1) ภาคเหนือ, 2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 3) ภาคกลาง,
4) ภาคใต้, 5) เกาะสมุย และ 6) เกาะภูเก็ต การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวด้วย PCR
ทำโดยใช้ไพรเมอร์ AM8 และ AM11 ซึ่งออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอของผึ้งพันธุ์ *A. mellifera*
ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ของผึ้งโพรงขนาด 2,750 คู่เบส เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI*, *RsaI*
และ *HinfI* ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจำนวน 2, 3 และ 10 รูปแบบตามลำดับ และมีรูปแบบ
รวมที่แตกต่างกัน 11 รูปแบบ จากค่า genetic distance และ nucleotide divergence นำมาสร้าง
ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างผึ้งโพรงได้ 2 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่มทางตอน
เหนือ (ภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง) และกลุ่มทางตอนใต้ (ภาคใต้, เกาะ
สมุย และเกาะภูเก็ต) โดยมีค่า nucleotide divergence ระหว่างกลุ่มเป็น 3.8% เมื่อวิเคราะห์ความ
แตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรด้วย Monte Carlo simulation (Chi-square) และค่า F_{st} พบว่า
สามารถแยกกลุ่มผึ้งโพรงจากเกาะสมุยออกจากกลุ่มตอนใต้ได้

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

ลายมือชื่อนิติกร.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

** 3972246623 MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: GENETIC VARIATION/ HONEYBEES/ *Apis cerana* MITOCHONDRIAL DNA/ CONTROL REGION

SURATEP POOTONG : INVESTIGATION OF GENETIC VARIATION AMONG THAI HONEYBEE *Apis cerana* USING MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph.D. 104 pp. ISBN 974-332-430-5.

PCR-RFLP of control region of mtDNA was used to analyze genetic variation and population structure of 125 *Apis cerana* colonies from 6 geographically locations in Thailand : 1) North, 2) North/East, 3) Central, 4) South, 5) Samui Island and 6) Phuket Island. Primer AM8 and AM11, designed from *A. mellifera* mtDNA sequence, produced PCR product of 2,750 bp. Two, three and ten haplotypes were obtained from *TaqI*, *RsaI* and *HinfI* digestion of amplified control region, respectively. Eleven different composite haplotypes were generated. A UPGMA phenogram based on genetic distance among different composite haplotypes and nucleotide divergence between six populations predominately separated *A. cerana* into two evolutionary lineages, Northern area (North, North/East and Central) and Southern area (South, Samui Island and Phuket Island). The nucleotide divergence between the two evolutionary lineages were 3.8%. Geographic heterogeneity analysis based on a Monte Carlo simulation (Chi-square) and F-statistic could divide *A. cerana* in Thailand into three groups by further separated the Samui Island from Southern area.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....

ปีการศึกษา..... 2541.....

ลายมือชื่อนิสิต..... สุนทร อภอ.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... สิริพร สิตประณีต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... Kanoktip Packdibamrung.....

ACKNOWLEDGEMENT



I would like to express my deep gratitude and appreciation to Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed, my advisor and Dr. Kanoktip Packdibamrung, my coadvisor for her encouragement, suggestions, discussion, and helpful guidance throughout this research.

My appreciation is also expressed to Asst. Prof. Dr. Tipaporn Limpaseni and Prof. Dr. Siriwat Wongsiri for serving as thesis committee.

I am especially indebted to Dr. Sirawut Klinbunga for serving on my thesis committee, helpful discussion and interpretation, and also for valuable suggestions about the data analysis in this study.

I wish to extend my deepest gratitude to my mother, father and my sister who always give me warmest, love, understanding and support financial.

Particularly, I wish to acknowledge to Reseach Foundation under the programe of Biodiversity Research and Training (BRT) for supporting my finance.

Finally, I wish to express my sincere thanks to all teachers and friends in Department of Biochemistry and Biotechnology for encouragement and friendship.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
ENGLISH ABSTRACT	iv
THAI ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS	13
2.1 Instruments	13
2.2 Chemicals.....	13
2.3 Inventory supplies	14
2.4 Standard markers	14
2.5 Enzymes.....	15
2.6 Honeybees samples (<i>A. mellifera</i> and <i>A. cerana</i>) and tissues preparation	15
2.7 Honeybees DNA extraction.....	15
2.8 Measurement of DNA concentration	16
2.9 PCR amplification of control region.....	17
2.10 Amplification of control region of <i>A. cerana</i> DNA samples.....	19
2.11 Characterization of PCR product by sequencing	20
2.12 Analysis mtDNA control region polymorphism	24
2.13 Data analysis.....	25
CHAPTER 3 RESULTS	28

	Page
3.1 Honeybees total DNA extraction	28
3.2 Screening of appropriate primers for PCR amplification.....	28
3.3 Optimization of PCR conditions	32
3.4 Characterization of PCR product	35
3.5 Analysis PCR products of control region by PCR-RFLP	39
3.6 PCR-RFLP of amplified control region using <i>TaqI</i> , <i>RsaI</i> and <i>HinfI</i>	43
3.7 Distribution frequency of composite haplotype among six population	54
3.8 Data analysis.....	57
CHAPTER 4 DISCUSSION.....	68
CHAPTER 5 CONCLUSIONS	77
REFERENCES.....	78
APPENDICES.....	85
BIOGRAPHY	104

LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 The import and export of natural honey of Thailand during 1986-Sept. 1998	2
2.1 The oligonucleotide primers used for PCR amplification of mtDNA in control region	18
3.1 Results for amplification of the control region using various combinations of primers listed in Table 2.1	31
3.2 Restriction profiles resulted from digestion of amplified control region of Thai <i>A. cerana</i> by <i>TaqI</i> , <i>RsaI</i> and <i>HinfI</i>	52
3.3 Haplotype distribution frequencies of digested control region of <i>A. cerana</i> with three restriction endonucleases (<i>TaqI</i> , <i>RsaI</i> and <i>HinfI</i>)	56
3.4 Composite haplotype distribution of digested control region of <i>A. cerana</i> among different geographic samples.....	58
3.5 Pairwise comparisons illustrating genetic distance substitution (the number of nucleotide substitution per site) between pairs of composite haplotypes found in Thai <i>A. cerana</i>	59
3.6 Haplotype and nucleotide diversity with six geographic samples of <i>A. cerana</i> in Thailand resulted from digestion of the control region with three restriction enzymes (<i>TaqI</i> , <i>RsaI</i> and <i>HinfI</i>)	62
3.7 Percentage of nucleotide diversity (above diagonal) and nucleotide divergence (below diagonal) between of six conspecific samples of <i>A. cerana</i> in Thailand based on digestion of amplified control region with three restriction enzymes (<i>TaqI</i> , <i>RsaI</i> and <i>HinfI</i>).....	62

Table	Page
3.8A Analysis of geographic heterogeneity using a Monte Carlo simulation in composite haplotype distribution frequency between six population honeybee <i>A. cerana</i> in Thailand.....	65
3.8B Analysis of geographic heterogeneity using a Monte Carlo simulation in composite haplotype distribution frequency between pooled samples Northern (North-Central-North/East), Southern (South-Phuket Island) and Samui Island of honeybee <i>A. cerana</i> in Thailand.....	65
3.9A Population differentiation analysis of six geographic samples using F-statistics	67
3.9B Population differentiation analysis of pooled samples Northern (North-Central and North/East), Southern (South-Phuket Island) and Samui Island using F-statistics.....	67

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Beekeeping of <i>Apis cerana</i> in Thailand	4
2.1 Location of Oligonucleotide primers in <i>A. mellifera</i> . Descriptions of the primers are as in Table 2.1	18
3.1 Total DNA extracted from <i>A. mellifera</i> and six <i>A. cerana</i> individuals.....	29
3.2 The resulting PCR products amplified from <i>A. mellifera</i> total DNA using different combining primers.....	30
3.3 Optimization of MgCl ₂ concentration used for amplification of the control region of <i>A. cerana</i>	33
3.4 Optimization quantity of total DNA template used for amplification of the control region of <i>A. cerana</i>	34
3.5 Optimization of primers concentration used for amplification of the control region of <i>A. cerana</i>	36
3.6 Control region from <i>A. mellifera</i> and <i>A. cerana</i> from six population in Thailand	37
3.7 Nucleotide sequence in amplified control region of <i>A. mellifera</i> and <i>A. cerana</i>	38
3.8 Comparisons of DNA sequence obtained from PCR amplified control region in this study with that from previously report using Clustal X.....	40
3.9 Agarose gel electrophoresis showing restriction fragment size of amplified control region of <i>A. cerana</i> digested with <i>Bfr</i> I. The results showed no restriction site for this restriction endonuclease	41

Figure	Page
3.10 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns of the amplified control region of <i>A. mellifera</i> and <i>A. cerana</i> restricted with <i>HindIII</i>	42
3.11 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns generated by digestion of control region of <i>A. cerana</i> with <i>AseI</i>	44
3.12 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns of amplified control region of <i>A. mellifera</i> and <i>A. cerana</i> digested with <i>DraI</i>	45
3.13 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns of amplified control region of <i>A. mellifera</i> , S60 and <i>A. cerana</i> digested with <i>SspI</i>	46
3.14 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns of amplified control region of <i>A.mellifera</i> and <i>A.cerana</i> digested with <i>SwaI</i>	47
3.15 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns of amplified control region of <i>A.mellifera</i> and <i>A.cerana</i> digested with <i>NdeI</i>	48
3.16 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns of amplified control region of <i>A.mellifera</i> and <i>A.cerana</i> digested with <i>AluI</i>	49
3.17 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns of amplified control region of <i>A.mellifera</i> and <i>A.cerana</i> digested with <i>TaqI</i>	50
3.18 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns of amplified control region of <i>A.mellifera</i> and <i>A.cerana</i> digested with <i>RsaI</i>	51

Figure	Page
3.19 Agarose gel electrophoresis showing restriction patterns of amplified control region of <i>A.mellifera</i> and <i>A.cerana</i> digested with <i>Hinf</i> I	55
3.20 UPGMA phenogram showing relationship between 11 composite haplotypes of digested control region of <i>A.cerana</i> in Thailand based on nucleotide diversity listed in Table 3.5	61
3.21 UPGMA phenogram showing relationship of six conspecific samples of <i>A. cerana</i> in Thailand based on percentage of nucleotide divergence	64

ABBREVIATIONS

bp	Base pair
°C	Degree celcius
cm	Centrimeter
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
hr	Hour
µg	Microgram
µl	Microliter
ml	Milliliter
µM	Micromolar
mM	Millimolar
min	Minute
ng	Nanogram
rpm	Revolution per minute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TBE	Tris/borate/EDTA buffer
TE	Tris/EDTA buffer
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> - tetramethylethylenediamine
Tris-HCl	Tris hydrochloride buffer
UV	Ultraviolet