

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรฝุ่น *Tropilaelaps* spp. ที่ศึกษาโดยการหาลำดับเบสของบริเวณ  
ITS และโดยการวิเคราะห์ด้วย RAPD

นางสาว วริษา ตั้งจริงใจ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-716-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC VARIATION IN THE BEE MITE *Tropilaelaps* spp. REVEALED  
BY SEQUENCING THE ITS REGION AND BY RAPD ANALYSIS.

Miss Warisa Tangjingjai

A Thesis Submitted In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-639-716-8

Thesis Title Genetic variation in the Bee Mite, *Tropilaelaps* spp. Revealed by sequencing the ITS Region and by RAPD analysis.

By Miss Warisa Tangjingjai

Program Biotechnology


Thesis Advisor Asst. Prof. Patchara Verakalasa, Ph.D.

Thesis Co-advisor Assoc. Prof. Chariya Lekprayoon

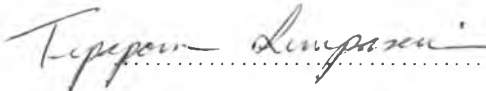
Assoc. Prof. Siriporn Sittipraneed, Ph.D.


---

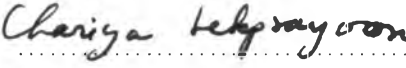
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirement for The Master's Degree.

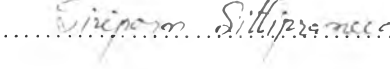
  
..... Dean of Graduate School  
(Prof. Supawat Chutivongse, M.D.)

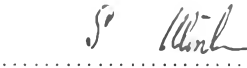
Thesis Committee

  
..... Chairman  
(Asst. Prof. Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

  
..... Thesis Advisor  
(Asst. Prof. Patchara Verakalasa, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-advisor  
(Assoc. Prof. Chariya Lekprayoon)

  
..... Thesis Co-advisor  
(Assoc. Prof. Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

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

วริษา ตั้งจริงใจ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรผึ้ง *Tropilaelaps* spp. ที่ศึกษาโดยการหาลำดับเบสของบริเวณ ITS และโดยการวิเคราะห์ด้วย RAPD (GENETIC VARIATION IN THE BEE MITE *Tropilaelaps* spp. REVEALED BY SEQUENCING THE ITS REGION AND BY RAPD ANALYSIS.) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. พัชรา วีระกะลัส: อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ. จริญญา เล็กประยูร, รศ. ดร. ศิริพร สิทธิประณีต 116 หน้า.  
ISBN 974-639-716-8

ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของไรผึ้งในจีนัส *Tropilaelaps* ซึ่งมี 2 สปีชีส์ คือ *T. clareae* และ *T. koenigerum* ในประเทศไทยได้ถูกตรวจสอบด้วยการหาลำดับเบสตรงบริเวณ อินเทอร์นอลทรานส์คริปสเปเซอร์ (ITS) ของนิวเคลียร์ไรโบโซมดีเอ็นเอ (nrDNA) และการใช้เทคนิค PCR-RAPD จากการหาลำดับเบสของ ITS ที่เพิ่มปริมาณโดย PCR ของตัวอย่างไรผึ้งทั้งสองสปีชีส์ซึ่งอยู่ตามภูมิภาคต่างๆ โดยในไร *T. clareae* ได้หาลำดับเบสของ ITS จากไร 20 ตัวอย่างซึ่งมีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 519 เบส ส่วนในไร *T. koenigerum* ได้หาลำดับเบสของ ITS จากไร 5 ตัวอย่างซึ่งมีความยาวของนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 520 เบส พบว่าไรที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันไม่มีความแตกต่างของลำดับเบสดังกล่าว แต่เมื่อนำลำดับเบสของ ITS จากไร *T. clareae* มาเรียงเปรียบเทียบกับลำดับที่ได้จากไร *T. koenigerum* พบว่ามีความแตกต่างกันของลำดับเบส โดยมี point mutation เกิดขึ้น 19 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังมี gap อีก 7 ตำแหน่งที่เกิดจากการลบหรือการเพิ่ม และจากการใช้โปรแกรม Kimura's two parameter วิเคราะห์ข้อมูลของการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างไรทั้งสองสปีชีส์ พบว่ามีความแตกต่างของลำดับเบสเท่ากับ 3.79 % นอกจากนี้พบว่าลำดับเบสของ ITS ของไร *T. koenigerum* เท่านั้นที่มีนิวคลีโอไทด์จำนวน 5 เบสเพิ่มเข้ามา และในไร *T. clareae* มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *RsaI* 2 ตำแหน่งในขณะที่ในไร *T. koenigerum* มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *RsaI* เพียง 1 ตำแหน่ง จากข้อมูลนี้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีแยกไรสองสปีชีส์ออกจากกันได้

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RAPD ใน 16 กลุ่มตัวอย่าง ของไร *T. clareae* ซึ่งแบ่งเป็นไรปรสิตในผึ้งหลวง (*A. dorsata*) 8 กลุ่ม และปรสิตในผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) 8 กลุ่ม จากแหล่งต่าง ๆ และ 2 กลุ่มตัวอย่างของไร *T. koenigerum* จากสมุทรสาครและจันทบุรี โดยเลือกใช้ 3 primer คือ OPA07, OPA11 และ OPA12 ซึ่งจะให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจำนวน 60, 58 และ 35 รูปแบบตามลำดับ เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยของ genetic distance ที่ได้จาก 3 primer แล้วนำมาสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยวิธี UPGMA สามารถแยกไร 2 สปีชีส์ออกจากกันได้ อย่างชัดเจน ในขณะเดียวกันสามารถแยกไร *T. clareae* ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยแบ่งเป็นกลุ่มไรปรสิตในผึ้งพันธุ์ และ 2 ตัวอย่างที่เป็นปรสิตในผึ้งหลวง (E2D และ N2D) ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเป็นปรสิตในผึ้งหลวงทั้งหมด

ภาควิชา .....  
สาขาวิชา ..... หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ  
ปีการศึกษา ..... 2541

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

# # C827322 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Tropilaelaps* spp., RAPD-PCR/GENETIC VARIATION/ ITS SEQUENCING

WARISA TANGJINGJAI: GENETIC VARIATION IN THE BEE MITE *Tropilaelaps* spp. REVEALED BY SEQUENCING THE ITS REGION AND BY RAPD ANALYSIS.

THESIS ADVISOR: ASST. PROF. PATCHARA VERAKALASA Ph.D.

THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. CHARIYA LEKPRAYOON

ASSOC. PROF. SIRIPORN SITIPRANEED Ph.D. 116 pp. ISBN 974-639-716-8

Level of genetic variation of sibling mite species, *Tropilaelaps clareae* and *T. koenigerum* in Thailand was investigated by sequencing of PCR-amplified internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA and RAPD-PCR analysis.

No sequence polymorphisms in the amplified ITS region were observed among twenty individuals of *T. clareae* and among five representatives of *T. koenigerum*. At an interspecific level, nineteen point mutations constituting of ten transitions and nine transversions were found. Moreover, seven gaps resulted from insertions/deletions were observed. The estimated sequence divergence between *T. clareae* and *T. koenigerum* was 3.79 %. A 5 bp insertion found in *T. clareae* could be used to dissociate this species from *T. koenigerum*. Nevertheless, restriction analysis of an amplified ITS region with *Rsa* I can also rapidly detected this interspecific variation.

RAPD analysis of one hundred and twenty-five of *T. clareae* (16 samples) and sixteen individuals of *T. koenigerum* (2 samples) using primers OPA07, OPA11 and OPA12 indicated high genetic polymorphisms in these two species. A total of 153 genotypes was found from all three RAPD primers (60, 58, and 35 patterns from OPA7, OPA11, and OPA12, respectively). The genetic distance among pairs of *T. clareae* samples was 0.081-0.2314 while that of *T. koenigerum* was 0.0289. Using RAPD analysis, the genetic distance between these species was estimated to be 0.8464. No evidences of interspecific hybridization were observed.

A UPGMA phylogeny indicated large distance between *T. clareae* and *T. koenigerum* and monophyletic status of both taxa. For *T. clareae*, all investigated samples could be allocated into two different groups, consisting of that contained all *T. clareae* from *A. mellifera* host and two samples from *A. dorsata* (E2D and N1D) and another group consisted of all remaining *T. clareae* from *A. dorsata* host.

ภาควิชา.....

สาขาวิชา..... หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

ปีการศึกษา..... 2541

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## Acknowledgements

This thesis would not have been completed without a good gesture from many persons. I would like to express my very appreciation to my advisor Asst. Prof. Dr. Patchara Verakalasa and Co-advisor Assoc. Prof. Chariya Lekprayoon and Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed for their helpful guidance and care.

Together with this, I am very grateful to Dr. Sirawut Klinbunga who helps me very kindly with data analysis, suggestion and comments on the manuscript. I am also very thankful to Asst. Prof. Dr. Tipaporn Limpaseni for her recommendation, Prof. Dr. Siriwat Wongsiri for his guidance and his bee research facilities (Bee biology research unit). Thanks are also extended to Anartngam, Phasuk and Pechpom families and anonymous people in helping my collection of specimens and to members of the Biochemistry department and Biotechnology department especially in room 707, 708 and 709. I would like to keep in mind for my best friends, Miss Chuanchom Muanprasitporn, Miss Dungporn Sihanuntavong, Miss Tanaporn Veerapraditsin and Miss Nattanan Pusri.

I am grateful to Research affairs, Chulalongkorn University (Bee Biology Research Unit), the National Science and Technology Development Agency of Thailand (NSTDA), Thailand Research Foundation under the program of Biodiversity Research and Training (BRT) and Graduate School Chulalongkorn University for financial support.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my mother, father, all members of my family and Mr. Surachai Leephitakrat for their unlimited love, care, understanding and encouragement extended throughout my study.

**CONTENTS**

|                               | Page |
|-------------------------------|------|
| THAI ABSTRACT.....            | iv   |
| ENGLISH ABSTRACT.....         | v    |
| ACKNOWLEDGEMENTS.....         | vi   |
| CONTENTS.....                 | vii  |
| LIST OF TABLES.....           | viii |
| LIST OF FIGURES.....          | ix   |
| LIST OF ABBREVIATIONS.....    | xii  |
| CHAPTER                       |      |
| I  INTRODUCTIONS.....         | 1    |
| II MATERIALS AND METHODS..... | 24   |
| III RESULTS.....              | 41   |
| IV DISCUSSIONS.....           | 86   |
| V  CONCLUSIONS.....           | 95   |
| REFERENCES.....               | 96   |
| APPENDIX.....                 | 105  |
| BIOGRAPHY.....                | 116  |

## LIST OF TABLES

| Table  | Page |
|--|------|
| 1.1 Honey bee mites and host associations.....   | 2    |
| 2.1 Primer sequences used in PCR and sequencing of the amplified ITS<br>region of ribosomal DNA.....   | 29   |
| 2.2 The sequences of all random primers primarily used for screening of<br>informative primers for <i>T. clareae</i> and <i>T. koenigerum</i> .....  | 30   |
| 2.3 The number of specimens being sequenced and the geographic<br>origin of specimens used in this study.....  | 31   |
| 3.1 Number of amplified bands in RAPD analysis of <i>T. clareae</i> and<br><i>T. koenigerum</i> .....  | 65   |
| 3.2 Total number of bands, percentage of polymorphic and<br>monomorphic bands found in <i>T. clareae</i> and <i>T. koenigerum</i> .....  | 66   |
| 3.3 The percentage of RAPD fragments (in base pairs) within each<br>colony (n=8 except C2D, n=7 and C1M, n=6) of <i>T. clareae</i> and<br><i>T. koenigerum</i> .....   | 67   |
| 3.4 Genotype distribution frequencies of RAPD patterns of<br><i>T. clareae</i> and <i>T. koenigerum</i> .....  | 70   |
| 3.5 Within colony similarity of sixteen and two of <i>T. clareae</i> and<br><i>T. koenigerum</i> .....   | 77   |
| 3.6 Similarity index with a correction of within-colony similarity<br>effect (upper diagonal) and genetic distance(below diagonal)<br>for each pairwise comparison of <i>T. clareae</i> and <i>T. koenigerum</i><br>samples..... | 78   |



## LIST OF FIGURES

| Figure   | Page |
|--|------|
| 1.1 General morphology of gamasid mites (ventral view).....  | 5    |
| 1.2 <i>T. koenigerum</i> : (1) female venter, (2) male venter, (5) male<br>gnathosoma and close-up of movable chela-spermatodactyl ;<br><i>T. clareae</i> : (3) female venter, (4) male venter, (6) male gnathosoma<br>showing movable chela-spermatodactyl..... | 7    |
| 1.3 Life cycle of <i>T. clareae</i> .....  | 9    |
| 1.4 Worldwide distribution of <i>Tropilaelaps</i> .....  | 11   |
| 1.5 Large pre- rRNA genes and their spacer.....  | 16   |
| 3.1 Agarose gel electrophoresis showing the quality of DNA extracted<br>from <i>Tropilaelaps</i> mites.....  | 42   |
| 3.2 Agarose gel electrophoresis showing the PCR-amplified ITS product<br>(600bp) using different amount of the DNA template at a constant<br>MgCl <sub>2</sub> (3.5 mM) and primer concentration (0.10 μM).....  | 43   |
| 3.3 Agarose gel electrophoresis showing the results from optimization<br>of MgCl <sub>2</sub> concentration used for amplification of the ITS region<br>at a constant primer concentration of 0.2 μM.....  | 45   |
| 3.4 Agarose gel electrophoresis showing the results from optimization<br>of primer concentration used for amplification of the ITS<br>region at 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> concentration.....  | 46   |
| 3.5 The ITS DNA region amplified by PCR and electrophoresed<br>through a 1.5% agarose gel.....   | 48   |

| Figs  | Page |
|---|------|
| 3.6 Five microliters of the PCR products from each individual of <i>T. clareae</i> or <i>T. koenigerum</i> was electrophoretically size-fractionated through a 1.5% agarose gel. The purified ITS DNA was recovered using GeneCleanII Kit.....                | 49   |
| 3.7 An autoradiogram showing partial ITS sequences obtained from using the primer inITS4.....   | 50   |
| 3.8 An autoradiogram illustrating interspecific polymorphisms of an amplified ITS region of <i>T. clareae</i> (a) and <i>T. koenigerum</i> (b)....  | 51   |
| 3.9 Sequence alignment for ITS from <i>T. clareae</i> and <i>T. koenigerum</i> .....  | 52   |
| 3.10 Ten microliters of each RAPD reaction was electrophoretically separated through 1.8% Metaphor agarose gel.....   | 54   |
| 3.11 Optimization of MgCl <sub>2</sub> concentration for RPAD assay using the primer OPA07 (at 0.4 μM primer concentration).....  | 55   |
| 3.12 RAPD patterns of <i>T. clareae</i> generated from OPA07. Ten microliters of the PCR products was electrophoretically separated through 1.8% Metaphor agarose gel.....  | 59   |
| 3.13 Interspecific different RAPD banding patterns between <i>T. clareae</i> and <i>T. koenigerum</i> were observed. Ten microliters of RAPD-amplified products using OPA07 was loaded into a 1.8% Metaphor agarose gel and electrophoretically analyzed..... | 60   |
| 3.14 RAPD patterns of <i>T. clareae</i> generated from OPA11. Ten microliters of the resulting product were loaded into a 1.8 % Metaphor agarose gel and electrophoretically analyzed.....  | 61   |

| Figure  | Page |
|---|------|
| 3.15 Interspecifically different RAPD banding patterns between <i>T. clareae</i> and <i>T. koenigerum</i> were observed. Ten microliters of RAPD-amplified products using OPA11 was loaded into a 1.8% Metaphor agarose gel and electrophoretically analyzed..... | 62   |
| 3.16 RAPD banding patterns of <i>T. clareae</i> generated from OPA12. Ten microliters of the resulting product were loaded into a 1.8 % Metaphor agarose gel and electrophoretically analyzed.....  | 63   |
| 3.17 Interspecific different RAPD patterns between <i>T. clareae</i> and <i>T. koenigerum</i> were observed. Ten microliters of RAPD-amplified products using OPA12 was loaded into a 1.8% Metaphor agarose gel and electrophoretically analyzed.....             | 64   |
| 3.18 UPGMA dendrogram showing relationships among 16 groups of <i>T. clareae</i> and 2 groups of <i>T. koenigerum</i> based on genetic distance shown in Table 3.5 D.....   | 83   |
| 3.19 UPGMA dendrogram showing relationships among 8 groups of <i>T. clareae</i> having <i>A. dorsata</i> host.....  | 84   |
| 3.20 UPGMA dendrogram showing relationships among 8 groups of <i>T. clareae</i> having <i>A. mellifera</i> host.....  | 85   |

## LIST OF ABBREVIATIONS

|                   |   |
|-------------------|---|
| A, T, G, C        | = nucleotide containing the bases adenine, thymine, guanine, and cytosine, respectively |
| bp                | = base pair   |
| °C                | = degree Celsius  |
| cm                | = centimetre  |
| DNA               | = deoxyribonucleic acid   |
| dNTPs             | = deoxyribonucleoside triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)                            |
| ddNTPs            | = dideoxyribonucleoside triphosphates (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)                      |
| EDTA              | = ethylenediamine tetra acetic acid   |
| HCl               | = hydrochloric acid   |
| kb                | = kilobase  |
| KCl               | = potassium chloride  |
| 1rRNA             | = large subunit ribosomal RNA   |
| MgCl <sub>2</sub> | = magnesium chloride  |
| ml                | = millilitre  |
| mM                | = millimolar  |
| mt DNA            | = mitochondrial DNA   |
| ng                | = nanogram  |
| PCR               | = polymerase chain reaction   |
| RFLP              | = restriction fragment length polymorphism  |
| SDS               | = sodium dodecyl sulfate  |
| srRNA             | = small subunit ribosomal RNA   |

|               |   |                                      |
|---------------|---|--------------------------------------|
| TEMED         | = | N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine |
| Tris          | = | tris(hydroxy methyl) aminomethane    |
| $\mu\text{g}$ | = | microgram                            |
| $\mu\text{l}$ | = | microlitre                           |
| $\mu\text{M}$ | = | micromolar                           |
| UV            | = | ultraviolet                          |
| V             | = | volt                                 |
| W             | = | watt                                 |