

ความแปรผันทางพันธุกรรมของนกยูง *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ในภาคเหนือ  
และภาคตะวันตกของประเทศไทย โดยไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอ

นายไพรัช ถาวรวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2551  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 9 7 2 4 2 8 8 2 3

GENETIC VARIATION OF GREEN PEAFOWLS *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 IN NORTHERN  
AND WESTERN THAILAND BASED ON MICROSATELLITE DNA

Mister Pirach Thawonwan

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

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008


Copyright of Chulalongkorn University

512112

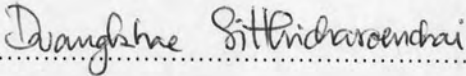
Thesis Title	GENETIC VARIATION OF GREEN PEAFOWLS <i>Pavo muticus</i> Linnaeus, 1766 IN NORTHERN AND WESTERN THAILAND BASED ON MICROSATELLITE DNA
By	Mister Pirach Thawonwan
Field of study	Zoology
Advisor	Associate Professor Wina Meckvichai
Co-Advisor	Pataradawn Pinyopich, Ph.D.


---

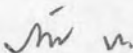
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree


.....Dean of Faculty of Science  
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

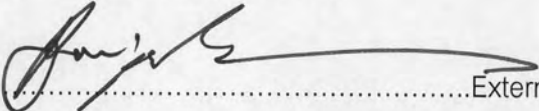
THESIS COMMITTEE

.....Chairman  
(Assistant Professor Duangkhae Sitticharoenchai, Ph.D.)

.....Advisor  
(Associate Professor Wina Meckvichai)

.....Co-Advisor  
(Pataradawn Pinyopich, Ph.D.)

.....Examiner  
(Supawin Watcharamul, Ph.D.)

.....External Examiner  
(Boripat S iriaroonrat, Ph.D.)

ไพรัช ถาวรวรรณ : ความแปรผันทางพันธุกรรมของนกยูง *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ในภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทยโดยไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอ. (GENETIC VARIATION OF GREEN PEAFOWLS *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 IN NORTHERN AND WESTERN THAILAND BASED ON MICROSATELLITE DNA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. วิณา เมฆวิชัย, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ. ดร. ภัทรธร ภิญโญพิชญ์, 76 หน้า.

การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรนกยูง (*Pavo muticus*) จาก 2 แหล่งในประเทศไทย คือ ภาคเหนือที่บริเวณลุ่มแม่น้ำปิงและภาคตะวันตกบริเวณลุ่มน้ำห้วยขาแข้งและพื้นที่ใกล้เคียง จำนวน 25 ตัวต่อพื้นที่ โดยการใช้ไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจีโนมของนกยูงด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) เมื่อใช้ไพรเมอร์ของไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอ 8 ตำแหน่ง คือ HUI002, LEI166, MCW034, MCW069, MCW080, MCW098, MCW295 และ MCW330 ผลการศึกษาพบว่าจำนวนอัลลีลในแต่ละตำแหน่งเป็น 2, 2, 4, 2, 3, 2, 4 และ 2 ตามลำดับ ในประชากรนกยูงภาคเหนือและภาคตะวันตกมีค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเป็น 2.13 และ 2.25 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย expected heterozygosity ( $H_e$ ) ของนกยูงจากภาคเหนือและภาคตะวันตกมีค่าเท่ากับ 0.40 และ 0.42 ตามลำดับ ซึ่งระหว่างนกยูงทั้งสองภาคพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

นกยูงในภาคเหนือและภาคตะวันตกมีประชากรขนาดเล็กและใหญ่ตามลำดับ มีการผสมพันธุ์แบบกลุ่ม เนื่องจากการทดสอบกฎของ Hardy-Weinberg พบว่าทุกบริเวณของไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอไม่มีการเบี่ยงเบนไปจากกฎดังกล่าว อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่า นกยูงมีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของประชากรมากแต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรทั้งสองภาคน้อย และเมื่อคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมพบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของนกยูงภาคเหนือและภาคตะวันตกมีค่าเท่ากับ 0.1956

ภาควิชา.....ชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....ไพรัช ถาวรวรรณ.....  
 สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....วิณา เมฆวิชัย.....  
 ปีการศึกษา.....2551.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....ภัทรธร ภิญโญพิชญ์.....

4972428823 : MAJOR ZOOLOGY

KEYWORDS : *Pavo muticus* / Microsatellite DNA / Genetic variation

PIRACH THAWONWAN : GENETIC VARIATION OF GREEN PEAFOWLS  
*Pavo muticus* Linnaeus, 1766 IN NORTHERN AND WESTERN THAILAND BASED  
ON MICROSATELLITE DNA. ADVISOR : ASSOC. PROF. WINA MECKVICHAI,  
CO-ADVISOR : PATARADAWN PINYOPICH, Ph.D., 76 pp.

Genetic variation of Green Peafowl (*Pavo muticus*) between northern and western part of Thailand (northern population is from Ping basin and western population is from Huai Kha Khaeng basin) were analyzed by using 8 microsatellite loci of 25 individual per site. Genomic DNA was extracted from feather tip and was amplified by polymerase chain reaction (PCR). Amplification with 8 microsatellite primers of HUU002, LEI166, MCW034, MCW069, MCW080, MCW068, MCW295, and MCW330, the results showed that the total allelic numbers per locus were 2, 2, 4, 2, 3, 2, 4, and 2, respectively. Mean number of alleles per locus of Green Peafowl from northern and western part of Thailand were 2.13 and 2.25, respectively. The mean of expected heterozygosity ( $H_e$ ) of Green Peafowl population from northern part and western part were 0.40 and 0.42, respectively and it was not significantly different between populations.

Green Peafowl from northern part and western part were small and large population, respectively and had random mating because from Hardy-Weinberg assumption, Green Peafowl from northern part and western part at all loci no deviated from this assumption. Genetic differentiation within both populations of Green Peafowl was higher than genetic differentiation between populations. The genetic distance of Green Peafowl between northern and western populations were 0.1956.

Department :.....Biology.....Student's Signature : *Pirach Thawonwan*  
Field of study :.....Zoology..... Advisor's Signature : *Wina Meckvichai*  
Academic year :.....2008..... Co-advisor's Signature : *P. P.*

## Acknowledgments

I would like to express my deep gratitude and appreciation to my thesis advisor, Assoc. Prof. Wina Meckvichai, and my thesis co-advisor, Dr. Pataradawn Pinyopich for their kindness, guidance and helpful to understand molecular genetic throughout my thesis.

I am especially thanks to all my teachers in Program Zoology, Department of Biology for every suggestion.

I am especially thanks to Dr. Supawin Watcharamul, Department of General Science for helpful in this study and my thesis committee.

I am especially thanks to Dr. Boripat Siriaroonrat, veterinarian of The Zoological Park Organization under the Royal Patronage of H.M. the King, my thesis committee for comment and helpful in my thesis.

I wish to thank Mr. Sathit Malawong and Ms. Waree Wutthivikaikan for helpful to instruct everything about Molecular Biology Lab. to me.

I wish to thank my colleagues in Ornithology Research Laboratory for their help and keeping feather specimens of Green Peafowl, my friends in Dept. of Biology in CU., and my friend in KMITL for their friendliness and helpfulness.

This project was supported by the Thai government budget 2007, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity and the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University, CEB\_M\_38\_2007. Also I thank Graduate School for financial support.

I am especially thankful to my family for their love, encouragement and financial support during my study in Chulalongkorn University.

## Contents

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures.....	x
List of Abbreviations.....	xii
Chapter I: Introduction.....	1
Objective and Anticipated benefits.....	4
Chapter II: Literature Review.....	5
The characteristics of Green Peafowl.....	5
Distribution of Green Peafowl.....	6
Biology of Green Peafowl.....	6
Study areas.....	7
Genetic variation.....	8
Genetics in the conservation of biodiversity.....	8
Molecular genetic methods to study Green Peafowl genome.....	9
Method for determining genetic variations.....	9
Microsatellite DNA marker.....	10
Utilization of microsatellite genotyping in Green Peafowl.....	13
Chapter III: Methodology.....	14
Material.....	14
Specimen used in the study.....	15
Method.....	16
Chapter IV: Result.....	26
Chapter V: Discussion.....	51
Chapter VI: Conclusion.....	56
References.....	57

	Page
Appendices.....	62
Appendix I: DNA extraction protocol.....	63
Appendix II: Quality determination and size estimation can be calculated of extracted DNA.....	65
Appendix III: Reagent preparation protocol.....	67
Appendix IV: Silver nitrate staining method.....	72
Appendix V: Wilcoxon sign rank test.....	74
Biography.....	76



## List of Tables

Table	Page
3.1 The characteristics of selected microsatellite flanking PCR primer.....	18
3.2 The optimal annealing temperature and reaction mixture for PCR amplification of Green Peafowl by eight microsatellite loci.....	19
4.1 The allele number and allele frequency of Green Peafowl from northern and western were analyzed by eight microsatellite loci.....	28
4.2 The sample sizes, number of alleles, effective number of alleles ( $n_e$ ), observed ( $h_{obs}$ ) heterozygosity and expected from Hardy-Wienberg assumption ( $h_{exp}$ ) of two investigated populations were analyzed using eight microsatellite loci.....	45
4.3 The mean number of sample size (N), mean number of alleles per locus (A), mean effective number of alleles per locus ( $a_e$ ), mean observed Heterozygosity ( $H_o$ ) and expected Hardy-Wienberg assumption ( $H_e$ ) of Green Peafowl from northern and western were analyzed by eight microsatellite loci.....	46
4.4 The estimation under Hardy-Wienberg assumption of Green Peafowl from northern and western were analyzed by eight microsatellite loci (HUJ002, LEI166, MCW034, MCW069, MCW080, MCW098, MCW295 and MCW330).....	47
4.5 The pair wise comparison of genetic linkage disequilibrium between eight microsatellite loci of HUJ002, LEI166, MCW034, MCW069, MCW080, MCW098, MCW295 and MCW330 of two investigated populations.....	48
4.6 The pair wise comparison of contingency tests of differentiation among Green Peafowl population from northern and western by eight microsatellite loci.....	49
4.7 The pair wise comparison of genetic distance between Green Peafowl population from northern and western.....	50

## List of Figures

Figure	Page
1.1 Distribution of Green Peafowl.....	2
2.1 Green Peafowl.....	5
4.1 Ethidium bromide staining of 1% agarose gel showing extracted DNA from the feather of Green Peafowl ( <i>Pavo muticus</i> ).....	26
4.2 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of HUJ002 locus from 25 individual of Green Peafowl from northern and western (lens 1-25).....	31
4.3 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of LEI166 locus from 25 individual of Green Peafowl from northern and western (lens 1-25).....	32
4.4 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of MCW034 locus from 25 individual of Green Peafowl from northern and western (lens 1-25).....	33
4.5 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of MCW069 locus from 25 individual of Green Peafowl from northern and western (lens 1-25).....	34
4.6 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of MCW080 locus from 25 individual of Green Peafowl from northern and western (lens 1-25).....	35
4.7 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of MCW098 locus from 25 individual of Green Peafowl from northern and western (lens 1-25).....	36
4.8 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of MCW295 locus from 25 individual of green peafowl from northern and western (lens 1-25).....	37
4.9 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of MCW330 locus from 25 individual of Green Peafowl from northern and western (lens 1-25).....	38

Figure	Page
4.10 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of HUJ002, LEI166, MCW034 and MCW069 locus from 25 individual of Red Jungle Fowl (lens 1-12).....	39
4.11 Silver staining of 8% polyacrylamide gel showing alleles distribution of MCW080, MCW098, MCW295 and MCW330 locus from 25 individual of Red Jungle Fowl (lens 1-12).....	40
4.12 Histogram of allele frequency and number of allele of Green Peafowl from northern and western and Red Jungle Fowl at HUJ002 and LEI166 locus.....	41
4.13 Histogram of allele frequency and number of allele of Green Peafowl from northern and western and Red Jungle Fowl at MCW034 and MCW069 locus.....	42
4.14 Histogram of allele frequency and number of allele of Green Peafowl from northern and western and Red Jungle Fowl at MCW080 and MCW098 locus.....	43
4.15 Histogram of allele frequency and number of allele of Green Peafowl from northern and western and Red Jungle Fowl at MCW295 and MCW330 locus.....	44
4.16 Phylogenetic tree of Green Peafowl ( <i>Pavo muticus</i> ) and out group Red Jungle Fowl ( <i>G. g. spadiceus</i> ) by Neighbor-joining method.....	50

## List of Abbreviations

AgNO <sub>3</sub>	silver nitrate
APS	ammonium persulfate
A T C G	nucleotide containing the base adenine, thymine, cytosine and guanine, respectively
bp	base pairs
°C	degree celcius
dNTP	deoxyribonucleotide containing the base adenine, thymine, cytosine and guanine, respectively.
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
Kb	kilobase
mg	milligram
mL	millilitre
mM	millimolar
MgCl <sub>2</sub>	magnesium chloride
ng	nanogram
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	sodium carbonate
rpm	round per minute
SDS	sodium dodecyl sulphate
TE	tris-ethylene diamine tetraacetic acid
TBE	tris-boric-ethylene diamine tetraacetic acid
TEMED	N, N, N', N' -tetramethylethylenediamine
μL	microlitre
μM	micromolar