

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ  
ของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทย



นางสาว ดวงพร สีนันทวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-010-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC VARIATION IN MITOCHONDRIAL GENES  
OF HONEY BEE *Apis cerana* IN THAILAND

Miss Duangporn Sihanuntavong

A Thesis Submitted In Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

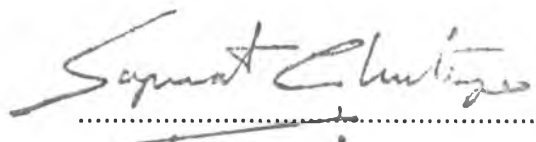
Academic Year 1997

ISBN 974-638-010-9

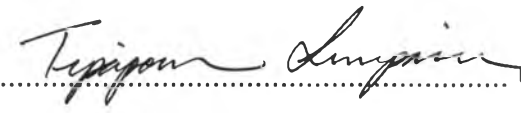
Thesis Title      Genetic Variation in Mitochondrial Genes of Honey bee  
*Apis cerana* in Thailand  
By                      Miss Duangporn Sihanuntavong  
Programme        Biotechnology  
Thesis Advisor   Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.

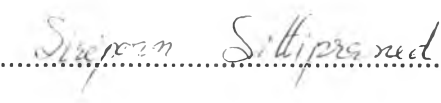
---

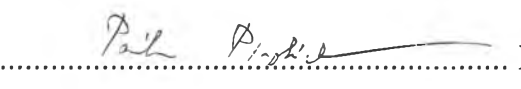
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.


  
..... 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  
(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)

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

ดวงพร สีนันทวงศ์ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทย (GENETIC VARIATION IN MITOCHONDRIAL GENES OF HONEY BEE *Apis cerana* IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ศิริพร สิริพิริยะพัฒน์, 109 หน้า. ISBN 974-638-010-9.

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างของกลุ่มประชากรผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทยได้ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-RFLP ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ 3 บริเวณ ( ยีน sRNA, ยีน IrRNA และ บริเวณระหว่างยีน CO I-CO II) และการหาลำดับเบสบางส่วนของยีน IrRNA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในตัวอย่าง 172 รัง ครอบคลุม 5 พื้นที่ทางภูมิศาสตร์คือ 1)ภาคเหนือ 2)ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3)ภาคกลาง 4)ภาคใต้ และ 5)เกาะสมุย พบว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ของยีน sRNA, ยีน IrRNA และ บริเวณระหว่างยีน CO I-CO II มีขนาด 400, 750 และ 1710 คู่เบส ตามลำดับ หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Dra* I จะให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอเป็น 3, 5 และ 8 รูปแบบตามลำดับ เมื่อรวมรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 บริเวณของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเข้าด้วยกันจะให้รูปแบบรวม 13 รูปแบบ เมื่อดำเนินการคำนวณค่า genetic distance และสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการตามแบบ UPGMA จะสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มวิวัฒนาการ คือ กลุ่มผึ้งโพรงทางตอนเหนือ (ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง) และกลุ่มผึ้งโพรงทางตอนใต้ (ภาคใต้และเกาะสมุย) โดยมีค่า nucleotide sequence divergence ระหว่างสองกลุ่มเท่ากับ 1.245 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอเฉพาะเกิดขึ้นในกลุ่มตัวอย่างบนเกาะสมุยคือ รูปแบบ C ของยีน IrRNA โดยการวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างผึ้งจากทุกพื้นที่ด้วย Monte Carlo Simulation พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่มประชากร อย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.0000$ ) โดยแยกกลุ่มผึ้งโพรงจากเกาะสมุยออกจากกลุ่มผึ้งโพรงทางตอนใต้

การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากยีน IrRNA ของตัวอย่างที่แสดง genotype ที่แตกต่างกันทั้ง 5 รูปแบบจากการตัดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเอนไซม์ *Dra* I หลังการจัดเรียงลำดับเบสโดยการเปรียบเทียบชนิดของเบสแล้วจะได้นิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 659 เบส ประกอบด้วยเบส A และ T เป็นส่วนใหญ่มากถึง 84.47 เปอร์เซ็นต์ มีการเปลี่ยนแปลงเบส 71 ตำแหน่ง โดยเป็นการลบหรือเพิ่มเบส จำนวน 14 ตำแหน่ง และเป็นการแทนที่เบสจำนวน 57 ตำแหน่ง ทรานสเวอร์ชันมีมากกว่าทรานซิชัน 2 เท่า เมื่อดำเนินการคำนวณค่า genetic distance และสร้างความสัมพันธ์ตามแบบ UPGMA พบว่าการจัดกลุ่มประชากรสอดคล้องกับผลที่ได้จาก PCR-RFLP

จากการสังเกตได้พบรูปแบบแถบดีเอ็นเอเฉพาะในผึ้งโพรง 2 ตัวอย่างจากภาคใต้ โดยมีรูปแบบรวมของทั้ง 3 บริเวณเป็น CED ซึ่งมีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ อย่างมากทั้ง ๆ ที่มีพื้นฐานคล้ายคลึงกัน น่าสงสัยว่าเป็นผึ้งต่าง species ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อทราบสถานะทางอนุกรมวิธานที่แน่ชัดต่อไป

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....  
 สาขาวิชา.....  
 2540  
 ปีการศึกษา.....

ลายมือชื่อนิติศ.....  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# #C827029 : MAJOR Biotechnology

KEY WORD: honey bee/*Apis cerana*/mitochondrial genes/population structure/PCR-RFLP/  
sequencing

DUANGPORN SIHANUNTA VONG : GENETIC VARIATION IN  
MITOCHONDRIAL GENES OF HONEY BEE *Apis cerana* IN THAILAND.  
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D  
109 pp. ISBN 974-638-010-9.

PCR-RFLP of three mtDNA regions (sRNA gene, lrRNA gene and inter CO I - CO II region) and partial sequences of mitochondrial lrRNA gene were used to investigate for genetic variation and population structure of honey bee *Apis cerana* in Thailand. Samples used for PCR-RFLP analysis included 172 colonies covering five geographic locations which were 1)North 2)North-East 3)Central 4)South and 5)Samui Island. Three, five and eight haplotypes were obtained from *Dra* I digestion of PCR-amplified 400 bp sRNA gene, 750 bp lrRNA gene and 1710 bp inter CO I-CO II region, respectively. These three mtDNA regions employed in this study generated thirteen composite haplotypes. Genetic distance among populations were then calculated and used for phylogenetic reconstruct using UPGMA approach. Two genetically distinctive groups : Northern (North, North-East and Central ) and Southern (South and Samui Island ) *A. cerana* were clearly separated. Estimated nucleotide sequence divergence between these two groups was 1.245 %. However, only haplotype C of lrRNA gene was specifically found in Samui Island. When geographic heterogeneity was analysed with a Monte Carlo Simulation, the results showed three distinctive groups where the Samui *A. cerana* could be further separated from the South (p=0.0000).

Moreover, individuals previously analysed and showed all detected lrRNA-*Dra* I genotypes were sequenced after amplification. Six hundred and fifty nine nucleotides were then obtained after alignment of all sequences. An AT bias was found at 84.47% resulted in two times higher of transversions than transitions. Seventy-one mutation steps were found that contained fourteen deletions or insertions and fifty-seven point mutations. Genetic distance calculated from DNA sequence data was subjected to UPGMA approach. The sequence analysis was corrected with the results from PCR-RFLP.

Notably, private haplotype of all amplified regions were found from two samples in the South. The composite haplotype, CED, was extremely different from all samples having morphological similarity. It was suspected to be the other species. Therefore, further study is needed to be carried out to clarify their actual taxonomic status.

ภาควิชา.....  
สาขาวิชา Biotechnology.....  
2540.....  
ปีการศึกษา.....

ลายมือชื่อนิสิต *Duangporn Sihanuntavong*.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *Siriporn Sittipraneed*.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would not have been completed without a good gesture from many persons. I would like to express my deepest sense of gratitude to my advisor, Associate Professor Dr.Siriporn Sittipraneed, who advises, promotes, supports and encourages me very closely throughout the period of my study.

Together with this, I am very grateful to Dr. Sirawut Klinbunga who helps me very kindly with computerized data analysis, suggestions and comments on the manuscript. I am also very thankful to Assistant Professor Dr.Tipaporn Limpaseni and Associate Professor Dr. Pairoh Pinphanichakarn for their recommendations.

Likewise, I would like to express my thanks to Mr. Surachai Leepitakrat, Miss Warisa Tungchingchai, Mr. Suwan Sukko, as well as all of others that are not named in this who help me collect honey bee samples. Special thank is sent to Mr. Rattapole Pornpipit who willingly provides me with a convenient service. Many thanks are also expressed to all my friends in my laboratory R707, R708 and R709 for their friendly assistances as well. Particularly, I wish to acknowledge to National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and Thailand Research Fundation under the programme of Biodiversity Research and Training (BRT) for supporting my finance.

Finally, I feel very indebted to my parents and my sisters for their love, care, understanding, encouragement, and doing whatever they can do for me throughout my study.

## CONTENTS

	<b>Page</b>
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OR ABBREVIATIONS.....	xiii
<b>CHAPTER</b>	
I INTRODUCTIONS.....	1
II MATERIALS AND METHODS.....	17
III RESULTS.....	35
IV DISCUSSIONS.....	79
V CONCLUSIONS.....	88
REFERENCES.....	89
APPENDIX .....	101
BIOGRAPHY.....	109

## LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 The imports and exports of natural honey during 1980-1997.....	2
2.1 Primer sequences, annealing temperature, concentration of primers and MgCl <sub>2</sub> used for PCR amplification of <i>A. cerana</i> mtDNA genes.....	25
2.2 Optimal concentration of agarose in 1x TBE buffer used for separation of double stranded DNA in this study.....	26
3.1 Distribution of single enzyme haplotype observed from <i>Dra</i> I digestion of sRNA gene, lrRNA gene and inter CO I-CO II region of five geographic locations of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	45
3.2 Summary of restriction patterns of <i>Dra</i> I digested amplified DNA from three regions in mitochondrial genome of <i>A. cerana</i> .....	51
3.3 Geographic distribution of 13 composite haplotypes resulted from <i>Dra</i> I digestion of sRNA gene, lrRNA gene and inter CO I-CO II region.....	55
3.4 Estimated genetic distances among 13 composite haplotypes obtained from <i>Dra</i> I digested amplified DNA fragment of sRNA gene, lrRNA gene and inter CO I-CO II region in <i>A. cerana</i> mitochondrial genome.....	58
3.5 Haplotype and nucleotide diversity within population for five geographic locations of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	61
3.6 Nucleotide diversity (above diagonal) and divergence (below diagonal) between populations for five geographic locations of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	63
3.7 (a) Geographic heterogeneity analysis in distribution frequency of composite haplotype among 5 <i>A. cerana</i> locations based on <i>Dra</i> I digestion of sRNA gene, lrRNA gene and inter CO I-CO II region.....	67
(b) Geographic heterogeneity analysis in distribution frequency of composite	



haplotype between pooled samples (North, North-East and Central) versus South and Samui Island based on <i>Dra</i> I digestion of sRNA gene, lrRNA gene and inter CO I-CO II region.....	67
3.8 Percentage of homology among lrRNA gene sequences.....	74
3.9 Estimated genetic distances among haplotypes derived from lrRNA gene sequences of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	76

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Beekeeping of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	4
1.2 Dotted lines indicated the approximate geographic ranges of <i>A. cerana</i> subspecies as recognized by Ruttner (1988).....	6
1.3 Map of mitochondrial genome of the honey bee, <i>A. mellifera</i> .....	11
1.4 A restriction enzyme cleavage map for mitochondrial DNA of <i>A. mellifera</i> subspecies.....	13
2.1 Map of Thailand showing five geographic locations of <i>A. cerana</i> used in this study.....	22
3.1 High molecular weight DNA extracted from thorax of <i>A. cerana</i> .....	36
3.2 Agarose gel electrophoresis showing an optimization of MgCl <sub>2</sub> concentration used for sRNA gene amplified at a constant primer concentration (0.5μM).....	38
3.3 Agarose gel electrophoresis showing an optimization of primer concentration used for sRNA gene amplified at a constant MgCl <sub>2</sub> concentration (3.0mM).....	38
3.4 Agarose gel electrophoresis showing an optimization of MgCl <sub>2</sub> concentration used for lrRNA gene amplified at a constant primer concentration (0.1μM).....	40
3.5 Agarose gel electrophoresis showing an optimization of primer concentration used for lrRNA gene amplified at a constant MgCl <sub>2</sub> concentration (3.0mM).....	40
3.6 Agarose gel electrophoresis showing an optimization of MgCl <sub>2</sub> concentration used for inter CO I-CO II region amplified at a constant primer concentration (0.1μM).....	41
3.7 Agarose gel electrophoresis showing an optimization of primer concentration used for inter CO I-CO II region amplification at a constant MgCl <sub>2</sub> concentration (2.5mM).....	41

3.8	Undigested PCR amplified DNA from each individual was electrophoresed.....	42
3.9	Restriction patterns were screened from <i>EcoR</i> I, <i>Hind</i> II and <i>Hinf</i> I digestion of sRNA gene, lrRNA gene and inter CO I-CO II region.....	44
3.10	Three different haplotypes were observed from <i>Dra</i> I digestion of amplified mitochondrial sRNA gene of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	47
3.11	Five different haplotypes were observed from <i>Dra</i> I digestion of amplified mitochondrial lrRNA gene of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	48
3.12	Eight different haplotypes were observed from <i>Dra</i> I digestion of amplified mitochondrial inter CO I-CO II region of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	50
3.13	The most parsimonious network among single enzyme haplotypes based on <i>Dra</i> I digestion of PCR-amplified DNA of sRNA gene, lrRNA gene and inter CO I-CO II region of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	53
3.14	Distribution of mtDNA composite haplotypes within each sampling location of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	56
3.15	Phylogeographic pattern deduced from mtDNA composite haplotypes of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	57
3.16	A UPGMA dendrogram showing the relationship among thirteen composite haplotypes based on <i>Dra</i> I digestion of PCR-amplified DNA of sRNA gene, lrRNA gene and inter CO I-CO II region of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	60
3.17	A UPGMA dendrogram showing the relationship among 5 geographic locations of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	64
3.18	A consensus tree of five <i>A. cerana</i> locations in Thailand.....	65
3.19	Amplified lrRNA gene was electrophoresed through a 1.2 % agarose gel and recovered for sequencing using GeneClean II Kit (Bio 101).....	68
3.20	(a) Diagram of five primers used for amplified lrRNA gene sequencing.....	69
	(b) Agarose gel electrophoresis illustrating of PCR-amplified lrRNA gene	

portion using designed primers (primer L3, L4 and L5).....	69
3.21 An autoradiography of partial lrRNA gene sequence derived from primer L 3....	70
3.22 Alingment of lrRNA gene nucleotide sequences of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	72
3.23 A UPGMA dendrogram showing relationship among 5 haplotypes derived from lrRNA gene sequences of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	77
3.24 The most parsimonious tree showing relationship among 5 haplotypes derived from lrRNA gene sequences of <i>A. cerana</i> in Thailand.....	78

## LIST OF ABBREVIATIONS

A, T, G, C	= nucleotide containing the bases adenine, thymine, guanine and cytosine, respectively
bp	= base pair
°C	= degree celcius
cm	= centimetre
CO I	= cytochrome c oxidase subunit I
CO II	= cytochrome c oxidase subunit II
DNA	= deoxyribonucleic acid
dNTPs	= deoxyribonucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
ddNTPs	= dideoxyribonucleotide triphosphates (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)
EDTA	= ethylenediamine tetraacetic acid
HCl	= hydrochloric acid
Kb	= kilobase
KCl	= potassium cholride
lrRNA	= large subunit ribosomal RNA
MgCl <sub>2</sub>	= magnesium chloride
ml	= millilitre
mM	= millimolar
mtDNA	= mitochondrial DNA
ng	= nanogram
PCR	= polymerase chain reaction

RFLP	= restriction fragment length polymorphism
SDS	= sodium dodecyl sulfate
sRNA	= 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