

ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ภายในและระหว่างไก่ป่า

Gallus gallus gallus และ *Gallus gallus spadiceus* ในประเทศไทย

นายบริพัตร ศิริอรุณรัตน์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-876-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17938016

**MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCE VARIATION
WITHIN AND BETWEEN RED JUNGLEFOWL
(*Gallus gallus gallus* AND *Gallus gallus spadiceus*)
IN THAILAND**



Mr. Boripat Siriaroonrat

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

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

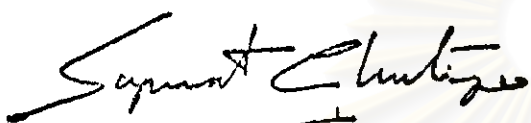
Academic Year 1997

ISBN 974-638-876-2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis title Mitochondrial DNA sequence variation within and between Red
Junglefowl *Gallus gallus gallus* and *Gallus gallus spadiceus* in
Thailand
By Mr. Boripat Siriaroonrat
Department Biological Science
Thesis advisor Associate Professor Wina Meckvichai
Thesis co-advisor Dr. Thaweesak Tirawatnapong

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial
fulfillment of the requirement for the master degree.

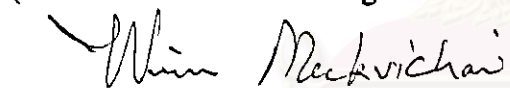


..... (Dean of Graduate School)
(Professor Dr. Supawat Chutivongse, M.D.)

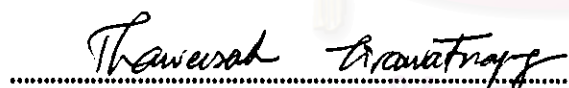
Thesis committee



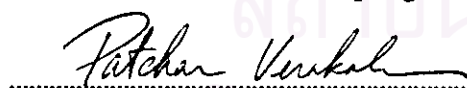
..... Chairman
(Associate Professor Dr. Kingkaew Wattanasirmit, Ph.D.)



..... Advisor
(Associate Professor Wina Meckvichai, M.Sc.)



..... Co-advisor
(Dr. Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.)



..... Member
(Assistant Professor Dr. Patchara Verakalasa, Ph.D.)

ฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อแจกจ่ายให้แก่นักวิจัยในแวดวงที่เกี่ยวข้องเท่านั้น

บรรณาธิการ : ศิริอรุณรัตน์ : ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอภายในและระหว่างไก่ป่า *Gallus gallus gallus* และ *Gallus gallus spadiceus* ในประเทศไทย

(MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCE VARIATION WITHIN AND BETWEEN RED JUNGLEFOWL *Gallus gallus gallus* AND *Gallus gallus spadiceus* IN THAILAND)

อ.ที่ปรึกษา : รศ.วีณา เมฆวิชัย , อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์, 80 หน้า. ISBN 974-638-876-2.

ไก่ป่า 2 ชนิดย่อยในประเทศไทยได้แก่ ไก่ป่าตุ้มหูขาว (*Gallus gallus gallus*) และไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spadiceus*) ถูกแบ่งตามความแตกต่างของสีที่ปรากฏบนแผ่นหนังด้านข้างแก้ม เก็บตัวอย่างจำนวน 10 ตัวจากแต่ละชนิดย่อย มาเจาะเลือดเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ทำการเพิ่มปริมาณยีนในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนส่วน control region ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และทำการวัดขนาดความยาวเชิง ความยาวของนิวที่สาม ความยาวจงอยปาก ความยาวปีก ความยาวจากโคนปากถึงท้ายทอย ชั่งน้ำหนัก และ ดูเพศ

ผลการวิเคราะห์พบว่ามีเพียงความยาวจงอยปากเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบนส่วนของ control region (D-loop) ความยาว 225 เบส พบว่าสามารถระบุความแตกต่างของตัวอย่างทั้งสองกลุ่มได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยค่า genetic distance โดยที่ค่าความแปรผันของนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดย่อยมีค่าระหว่าง 0 ถึง 6.54 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ค่าดังกล่าวมีค่า ระหว่าง 1.34 ถึง 8.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสองชนิดย่อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา

สาขาวิชา

ปีการศึกษา

ลายมือชื่อนิติ 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

c725534 : MAJOR ZOOLOGY

KEY WORD: : RED JUNGLEFOWL/ *Gallus gallus gallus*/ *Gallus gallus spadiceus*/ MITOCHONDRIAL CONTROL REGION/ DNA SEQUENCE ANALYSIS
BORIPAT SIRIROONRAT : MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCE VARIATION WITHIN AND BETWEEN RED JUNGLEFOWL (*Gallus gallus gallus* and *G. g. spadiceus*) IN THAILAND ADVISOR : ASSOC. PROF. WINA MECKVICHAI, MSc THESIS CO-ADVISOR : DR. THAWEESSAK TIRAWATNAPONG, Ph.D. 80 pp. ISBN 974-638-876-2.

Two subspecies of red junglefowl are described using the difference in their earlobe color. *Gallus gallus gallus* carries a white earlobe while that of *G. g. spadiceus* is red.

10 animals from each subspecies were measured for 5 morphometric parameters. The analysis found that 4 out of 5 showed nonsignificant differences but one character, the beak length, showed significant difference between two subspecies using the analysis of variance (ANOVA).

DNA sequence analysis of 225 base pairs in the mitochondrial control region (D-loop) showed phylogenetic branching of the two subspecies using genetic distance analysis. Sequence divergence within the subspecies ranged from 0 to 6.54 %, while the divergence between the two subspecies ranged from 1.34 % to 8.0 %.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

Acknowledgement



I would like to express my heartfelt special thanks to Associate Professor Wina Meckvichai, my thesis advisor, who kindly open the world of molecular systematic to me and kindly being a very good guide along these 4 years.

I appreciate the kindness of Professor Susumu Ohno from Beckman Institute, California and Dr.Tetsuo Miyake, Japan, the Prince Akishinonomiya of Japan's co-researchers for gallus D-loop primers and lots of useful laboratory strategies.

Assistant Professor Ryuichi Masuda, Chromosome Research Unit, Faculty of Science, Hokkaido University was a very good trainer in PCR and DNA sequencing techniques. I am extremely grateful for the use and courtesy of this lab.

Khao Soidao and Phu Khieo Wildlife Breeding Station for providing specimens and your merit for keeping a good stocks of wild Red Junglefowls.

Mr.Sawai Wanghongsa, Head of Khao Ang-Rue-Nai Wildlife Research Station, for your help in life trapping trials and hosted my field observations.

Dr.Suchinda Malaiwjitnond for her helps in sample collection and providing a working place as well as many suggestions and encouragement.

I am in detped to Dr.Piyasak Chaumpluk, Department of Botany and Dr.Sirawut Klinbunga, Marine Research Unit, NCGEB, for your help and comments on DNA sequence analysis.

Duangjai Ngamsom and Pramong Becktaisong, junior colleagues, for your helps during my busy life. Noppadol Kittana and Wichase Khonsue, for your help in my master degrre of Zoology life. Wish you a good success. Varisa Tangjingjai and Duangporn Sihanantawong for many help.

Yongchai Utara, Somchai Chodapisidkul and Rattapan Pattanarangsana, for helping me collecting some zoo specimens even they are not used in this study.

Assist. Prof. Dr. Kumthorn Teerakupt, Sakchai Topanurak (CU Vet Husbandry) and Varanya Aranyawalai for morphometric analysis.

Peter Paul van Dijk and Jonathan Murray, for your encouragement, useful comments and editing my English.

Dr.Thaweesak Tirawattanapong, a professional birder, for your kindness in using ABI^R sequencer, comments on my work, and for being my thesis co-advisor.

Assist. Prof. Dr. Patchara Verakalasa, for your kindness in participating my presentation as a thesis committee member.

Biodiversity Research and Training Program for the supporting grant.

IVF-ET Project, Mahidol University Salaya, for let me complete this thesis before starting new life.

Pravina Kitikoon for your care and assistance in every way.

Mom and Dad for four years of patience till I have this day. I love you.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xi
CHAPTER	
1 INTRODUCTION.....	1
2 LITERATURE REVIEW.....	8
3 METHODOLOGY.....	16
4 RESULTS AND DISCUSSION.....	28
5 CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS.....	44
REFERENCES.....	46
APPENDIX I.....	52
APPENDIX II.....	71
BIOGRAPHY.....	80

List of Tables

Tables	Page
1 Morphometric data of two subspecies.....	29
2 Estimated genetic distances among 16 samples, published sequence (1994) and out group (<i>Japqu, Coturnix coturnix</i> <i>japonica</i>) obtained from 225 bp of D-loop sequence.....	41



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure	Page
1.1 Distribution map of Red Junglefowl.....	4
1.2 Distribution map of <i>Gallus gallus gallus</i> and <i>G. g. spadiceus</i> in Thailand.....	5
1.3 The photographs of two subspecies of Red Junglefowl in Thailand.....	6
2.1 Chicken mitochondrial DNA; its genes and gene organization.....	13
2.2 A linear presentation of the chicken mitochondrial DNA molecule showing the localization of the genes for cytochrome oxidase subunit I,II and III, (CO I, COII and COIII), ATPase subunit 6 and 8, apocytochrome b (cyt-b), NADH dehydrogenase 1-6 (ND1,2,3,4,4L,5,6), the small (12S) and large (16S) ribosomal DNA subunit, 22 tRNAs (narrow boxes) and the control region (D-loop).....	14
2.3 Gene order in birds compared to mammals and <i>Xenopus</i>	15
3.1 Morphometric measurement of basement of upper peak to occipital, beak length, tarsometatarsus length and third digit length.....	18
3.2 Morphometric measurement of wing length.....	19
4.1 Ethidium bromide stained agarose gel (1.5%) show the DNA extracted from Chelex compare to phenol-chloroform extracted product.....	32

4.2 Ethidium bromide stained gel showing the positive PCR signal of amplified Chicken D-loop gene product	
(a) <i>Gallus gallus gallus</i> samples.....	33
(b) <i>G. g. spadiceus</i> samples.....	33
4.3 The exposed X-ray film from ³² P - labelled chicken D - loop DNA sequence.....	34
4.4 L-chain sequences of 225 bases of the mitochondrial control region from <i>G. g. gallus</i> and <i>G. g. spadiceus</i>	37
4.5 The phylogenetic tree inferred from genetic distance data using neighbor-joining method (PHYLIP version 3.7c.).....	42
4.6 The most parsimonious tree drawn from PAUP version 3.0 shows the separation of two groups with some polytomies which are not support by 50% bootstrapping criteria.....	43

LIST OF ABBREVIATIONS

A, T, C, G	= nucleotide containing the base adinine, thymine, cytosine and guanine respectively
bp	= base pair
CO I	= cytochrome oxidase subunit I
CO II	= cytochrome oxidase subunit II
CO III	= cytochrome oxidase subunit III
dNTPs	= deoxyribonucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
ddNTPS	= dideoxyribonucleotide triphosphates (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)
DNA	= deoxyribonucleic acid
EDTA	= ethylenediamine tetraacetic acid
hr	= hour
Kb	= kilobase
min	= minute
M	= molar
mM	= millimolar
mg	= milligram
MgCl ₂	= magnesium chloride
ml	= milliliter
mtDNA	= mitochondrial DNA
PCR	= polymerase chain reaction
rpm	= round per minute

sec	= second
TEMED	= N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TRIS	= tris (hydroxy methyl) aminomethane
μ l	= microliter
μ g	= microgram



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย