

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทย  
ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณจีน ATPase6-ATPase8

นางสาว อรอุมา ชองรัมย์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-639-071-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**GENETIC VARIATION OF *Apis cerana* IN THAILAND  
INFERRED BY PCR-RFLP ANALYSIS OF THE  
MITOCHONDRIAL ATPase6-ATPase8 GENE**



**Miss Onuma Songram**

**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 1997**

**ISBN 974-639-071-6**


Thesis Title            Genetic variation of *Apis cerana* in Thailand inferred  
by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial  
ATPase6-ATPase8 gene  
By                         Miss Onuma Songram  
Department            Biochemistry  
Thesis Advisor        Associate Professor 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  
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

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

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

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

  
..... Member  
(Sureerat Deowanish, Ph.D.)

อรุมา ชองรัมย์ : การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทยด้วยเทคนิค PCR-RFLP ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณจีน ATPase6-ATPase8 (GENETIC VARIATION OF *Apis cerana* IN THAILAND INFERRED BY PCR-RFLP ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL ATPase6-ATPase8 GENE).

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. ศิริพร ลิทธิประณีต, 121 หน้า, ISBN 974-639-071-6

ได้ทำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างของกลุ่มประชากรผึ้งโพรงไทย *Apis cerana* โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ของจีนดีเอ็นเอขนาด 825 คู่เบสที่เพิ่มปริมาณด้วย PCR จากจีน ATPase6-ATPase8 ของไมโทคอนเดรียล ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดังกล่าวในตัวอย่าง 181 รัง ครอบคลุม 5 พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ คือ 1) ภาคเหนือ 2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3) ภาคกลาง 4) ภาคใต้ และ 5) เกาะสมุย พบว่าเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ TaqI, SspI และ VspI จะให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอเป็น 2, 5 และ 6 รูปแบบตามลำดับ เมื่อรวมรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวเข้าด้วยกันจะให้รูปแบบรวมเป็น 10 รูปแบบ ซึ่งมีเพียงรูปแบบ C จากการตัดด้วยเอนไซม์ VspI ที่มีความจำเพาะสำหรับกลุ่มตัวอย่างบนเกาะสมุย เมื่อคำนวณค่า genetic distance และสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการตามแบบ UPGMA จะสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มวิวัฒนาการ คือ กลุ่มผึ้งโพรงทางตอนเหนือ (ภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง) และกลุ่มผึ้งโพรงทางตอนใต้ (ภาคใต้ และเกาะสมุย) โดยมีค่า nucleotide divergence ระหว่างสองกลุ่มเท่ากับ 1.58 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างผึ้งทุกกลุ่มพื้นที่ด้วย Monte Carlo simulation พบว่าสามารถแยกกลุ่มผึ้งโพรงบนเกาะสมุย ออกจากกลุ่มผึ้งโพรงทางตอนใต้ได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.0001$ ) นำสังเกตว่าพบ ATPase6-ATPase8 หลายขนาดในผึ้ง 39% ของตัวอย่างผึ้งทั้งหมด โดยจะพบเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างภาคใต้ (83%) และเกาะสมุย (60%) เท่านั้น จากปรากฏการณ์นี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่ากลุ่มผึ้งโพรงทางตอนเหนือ และกลุ่มผึ้งโพรงทางตอนใต้เป็นกลุ่มวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน

จากการพบรูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดยมีรูปแบบรวมเป็น ABE และ AEF ในตัวอย่างผึ้ง 2 รังจากภาคใต้ ซึ่งมีความแตกต่างจากตัวอย่างผึ้งโพรงอื่น ๆ อย่างมาก ซึ่งน่าสงสัยว่าจะเป็นผึ้งต่างสปีชีส์กัน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อทราบสถานะทางอนุกรมวิธานที่แน่ชัดต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... ชื่อเดิม .....  
สาขาวิชา ..... ชื่อเดิม .....  
ปีการศึกษา ..... 2540 .....

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

# #C726125 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: GENETIC VARIATION/ POPULATION STRUCTURE/ HONEYBEES/ *Apis cerana*  
ATPase6-ATPase8

ONUMA SONGRAM: GENETIC VARIATION OF *Apis cerana* IN THAILAND INFERRED  
BY PCR-RFLP ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL ATPase6-ATPase8 GENE.

THESIS ADVISOR: ASSOCI. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D.,  
121 pp.ISBN 974-639-071-6

Genetic variability and population structure of Thai honeybees *Apis cerana* was investigated using PCR-RFLP of an amplified 825 bp ATPase6-ATPase8 mtDNA gene. A total of 181 colonies comprising 5 geographic locations (North, North-East, Central, South and Samui Island) were surveyed with three restriction endonucleases (*TaqI*, *SspI* and *VspI*) revealed two, five and six haplotypes, respectively. Ten composite haplotypes were then generated. Only haplotype C of *VspI* digestion was a population specific genotype for the Samui Island *A. cerana*. A UPGMA phenogram based on genetic distance among populations clearly allocated 5 geographic samples of *A. cerana* into 2 distinct groups: Northern (North, North-East and Central), Southern (South and Samui Island) with a nucleotide divergence of 1.58%. Furthermore, on the basis of a Monte carlo simulation for geographic heterogeneity, the South and the Samui Island could be separated from each other ( $P < 0.0001$ ). Thirty-nine per cent of investigated samples showed length heteroplasmy. It should be note, however that all heteroplasmic samples were from the South (83%) and the Samui Island (60%). This strong evidences that the Northern and the Southern *A. cerana* are evolutionary different lineages.

Private haplotype from three restriction enzymes digest were found from two colonies in the South. Their composite haplotypes, AEE and AEF, were quite different from all samples of *A. cerana*. It was suspected to be different species. Further study need to be carried out to clarify their actual taxonomic status.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....

ปีการศึกษา.....2540.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## ACKNOWLEDGEMENT

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

My appreciation is also expressed to Asst. Prof. Dr. Tipaporn Limpaseni and Dr. Sureerat Deowanish 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 would like to special thanks to Dr. Suchart Chanama for helping me to design primers.

I would like to thanks National Research Council for financial supports.

I wish to extend my deepest gratitude to my grand-mother and grand-father, Miss Jarunee Vanichtanankul who always give me warmest love, understanding and friendship.

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

# CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT .....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES .....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER 1 INTRODUCTION .....	1
1.1 The honeybees in Thailand.....	3
1.2 <i>Apis cerana</i> .....	3
1.3 The morphology of honeybees .....	7
1.4 The previous studied of <i>A. cerana</i> .....	10
1.5 Molecular markers for population genetic analysis	12
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS.....	19
2.1 Instruments .....	19
2.2 Inventory suppliers .....	20
2.3 Chemicals.....	20
2.4 Molecular weight standard .....	21
2.5 Enzymes.....	21
2.6 Biological material .....	22

	PAGE
2.7 DNA isolation.....	22
2.8 Measurement of DNA concentration .....	23
2.9 Amplification of a DNA segment using the polymerase chain reaction (PCR).....	24
2.10 Optimization in the amplification conditions .....	25
2.11 Characterization of the amplification product .....	26
2.12 Analysis of the amplification product by restriction fragment length polymorphism (RFLP).....	27
2.13 DNA sequencing .....	28
2.14 Data analysis.....	33
<b>CHAPTER 3 RESULTS .....</b>	<b>39</b>
3.1 DNA isolation.....	39
3.2 Optimization in the PCR conditions .....	39
3.3 Characterization of the amplification product .....	43
3.4 Analysis of the amplification product by restriction fragment length polymorphism (RFLP).....	51
3.5 Digestion of the amplification product of <i>A. cerana</i> by <i>VspI</i> , <i>SspI</i> and <i>TaqI</i> .....	58
3.6 Geographic distributions of composite haplotypes in <i>A. cerana</i> .....	68
3.7 Data analysis.....	72
<b>CHAPTER 4 DISCUSSION.....</b>	<b>82</b>
4.1 Methodology in this study.....	83
4.2 Heteroplasmy.....	86



4.3 DNA divergence within and among <i>A. cerana</i> populations.....	88
4.4 Geographic heterogeneity frequencies distribution	89
4.5 Do the two specimens from the South are different species? .....	90
CHAPTER 5 CONCLUSION.....	92
BIBIOGRAPHYS .....	93
APPENDIX 1.....	107
APPENDIX 2.....	108
APPENDIX 3.....	114
APPENDIX 4.....	118
APPENDIX 5.....	120
BIOGRAPHY.....	121

## LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1.1	The imports and exports of natural honey of Thailand in 1992-1997 ..... 2
3.1	Geographic distribution of heteroplasmic individuals in ATPase6-ATPase8 of <i>A. cerana</i> ..... 45
3.2	Restricted fragment size (in base pairs) generated from digestion of amplified ATPase6-ATPase8 gene of <i>A. cerana</i> with <i>TaqI</i> , <i>SspI</i> and <i>VspI</i> ..... 64
3.3	Summary of single enzyme haplotype frequencies generated from 3 restriction endonuclease in five geographic areas of <i>A. cerana</i> samples ..... 67
3.4	Geographic distribution frequency of 10 composite haplotypes among five geographic locations of Thai honeybee <i>A. cerana</i> .. 69
3.5	Analysis of geographic heterogeneity in haplotype frequency distributions generated from Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of <i>A. cerana</i> using a Monte Carlo simulation for ten thousand times..... 71
3.6	Genetic distance among 10 composite haplotypes of <i>A. cerana</i> and one composite haplotype of <i>A. mellifera</i> ..... 73
3.7	Haplotype and nucleotide diversity of <i>A. cerana</i> from five geographic locations in Thailand ..... 75

TABLE	PAGE
3.8	Pairwise comparison between population nucleotide diversity (in per cent) among 5 geographic locations of <i>A. cerana</i> Nucleotide diversity from <i>A. mellifera</i> is also illustrated ..... 77
3.9	Pairwise comparison of estimated nucleotide divergence (in per cent) among the 5 geographic locations of <i>A. cerana</i> in Thailand. Nucleotide divergence from <i>A. mellifera</i> is also illustrated..... 77
3.10	Pairwise comparisons of nucleotide divergence (in per cent) among the 5 geographic locations of <i>A. cerana</i> in Thailand ..... 80

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1.1	The natural colony (a) and the variant domestic hives (b-e) of <i>A. cerana</i> in Thailand..... 4
1.2	Side view of a generalized bee's body to show the main structures ..... 8
1.3	Side view of the sting apparatus of a worker honeybee ..... 9
1.4	The tongue of a worker honeybee, <i>A. mellifera</i> (Apidae), to show its constituent parts..... 9
1.5	Dotted lines indicate the approximate ranges of <i>A. cerana</i> subspecies as recognized by Ruttner (1988) ..... 11
1.6	Distance phenogram calculated from percent sequence divergence estimates among <i>A. cerana</i> mitochondrial haplotypes using UPGMA ..... 11
2.1	Showing the primers and their orientation (5'→3') used in PCR for ATPase6-ATPase8 gene of honeybees mtDNA amplification. .... 25
3.1	Ethidium bromide staining of 0.7% agarose gel showing the quality of individual extracted DNA ..... 38
3.2	Effect of DNA template concentration in PCR amplification ... 39
3.3	Optimization of Mg <sup>2+</sup> concentration in PCR amplified ATPase6-ATPase8 gene region..... 41

FIGURE	PAGE
3.4	Optimization of ATPase6-ATPase8 primer concentration ..... 42
3.5	Comparison on amplification of ATPase6-ATPase8 from homo and heterospecific individuals ..... 44
3.6	Heteroplasmy in ATPase6-ATPase8 gene of <i>A. cerana</i> ..... 47
3.7	Comparisons of DNA sequences identified from 4 heteroplasmic bands observed in South and the Samui Island <i>A. cerana</i> ..... 48
3.8	DNA sequences of amplified 825 bp ATPase6-ATPase8 of a representative of normal (1) and a heteroplasmic specimens (2) ..... 49
3.9	The multiple sequence alignment using CLUSTAL X (1.64b) . 50
3.10	A 6% metaphor agarose gel illustrating the resulting restriction patterns obtained from digestion of amplified ATPase6-ATPase8 with <i>AcsI</i> ..... 52
3.11	A 3% metaphor agarose gel illustrating the resulting restriction patterns obtained from digestion of amplified ATPase6-ATPase8 gene with <i>AluI</i> ..... 53
3.12	A 3% metaphor agarose gel illustrating the resulting restriction patterns obtained from digestion of amplified ATPase6-ATPase8 gene with <i>DraI</i> ..... 54
3.13	A 3% metaphor agarose gel illustrating the resulting restriction patterns obtained from digestion of amplified ATPase6-ATPase8 gene with <i>EcoRI</i> ..... 55

FIGURE	PAGE
3.14 A 3% metaphor agarose gel illustrating the resulting restriction patterns obtained from digestion of amplified ATPase6-ATPase8 gene with <i>Sau3AI</i> .....	56
3.15 A 3% metaphor agarose gel illustrating the resulting restriction patterns obtained from digestion of amplified ATPase6-ATPase8 gene with <i>HinfI</i> .....	57
3.16 A 3% metaphor agarose gel showing restriction patterns of amplified ATPase6-ATPase8 gene with <i>TaqI</i> .....	61
3.17 A 3% metaphor agarose gel showing restriction patterns of amplified ATPase6-ATPase8 gene with <i>SspI</i> .....	62
3.18 A 4% metaphor agarose gel showing restriction patterns of amplified ATPase6-ATPase8 gene with <i>VspI</i> .....	63
3.19 The most parsimonious network illustrating relationship between two haplotypes of <i>TaqI</i> digested ATPase6-ATPase8 gene in <i>A. cerana</i> mtDNA .....	65
3.20 The most parsimonious network illustrating relationship between two haplotypes of <i>SspI</i> digested ATPase6-ATPase8 gene in <i>A. cerana</i> mtDNA .....	65
3.21 The most parsimonious network illustrating relationship between two haplotypes of <i>VspI</i> digested ATPase6-ATPase8 gene in <i>A. cerana</i> mtDNA .....	66
3.22 A UPGMA dendrogram showing relationships of composite haplotype calculated from genetic distance.....	74

FIGURE	PAGE
3.23 A UPGMA phenogram of the five geographic locations of <i>A. cerana</i> based on nucleotide divergence .....	78
3.24 A UPGMA phenogram of the five geographic locations of <i>A. cerana</i> and SSouth based on nucleotide divergence.....	81



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBREVIATION

A	Adenine or adenosine
Amel	<i>Apis mellifera</i>
bp	Base pair
C	Cytosine or cytidine, one-letter code for Central
°C	Degree celsius
Ci	Curie
cm	Centrimetre
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
ddATP	Dideoxyadenosine triphosphate
ddCTP	Dideoxycytidine triphosphate
ddGTP	Dideoxyguanosine triphosphate
ddNTP	Dideoxynucleoside triphosphate
ddTTP	Dideoxythymidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
f	frequency
fmol	femtomole
G	Guanine or guanosine
I	Samui Island
kb	Kilobase



km	Kilometre
m	Metre
min	Minute
µg	Microgram
µl	Microlitre
µm	Micrometre
µM	Micromolar
ml	Millilitre
mmol	Millimole
mM	Millimolar
M	Molar
N	North
NE	North-East
NEast	North-East
ng	Nanogram
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SDS	Sodium dodecyl sulfate
S	South
SSouth	Some of South (S02 and S60)
T	Thymine or Thymidine
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> DNA (polymerase)
TBE	Tris/borate electrophoresis (buffer)
TE	Tris/EDTA (buffer)
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylenediamine
Tris-HCl	Tris hydrochloride buffer

U	Unit
UV	Ultraviolet
V	Volume
W	Weight



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย