ความแปรผันทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของเต่าตนุ *Chelonia mydas* ในประเทศไทย

นางสาว ธนาพร วีระประดิษฐ์ศิลป

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-639-073-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 6 มิ.ย. 2544

I17956167

MICROSATELLITE DNA VARIATION IN GREEN TURTLES *Chelonia mydas* OF THAILAND

Miss Thanaporn Veerapraditsin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Program of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974-639-073-2

Thesis Title Microsatellite DNA Variation in Green turtles *Chelonia mydas* of Thailand

By Miss Thanaporn Veerapraditsin

Program Biotechnology

Thesis Advisor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.

Thesis Co-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

(Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

.....Member

(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

ธนาพร วีระประดิษฐ์ศิลป : ความแปรผันทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของเต่าตนุ *Chelonia mydas* ในประเทศไทย (MICROSATELLITE DNA VARIATION IN GREEN TURTLES *Chelonia mydas* OF THAILAND) อ.ที่ปรึกษา : อ. ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. ศิริพร สิทธิประณีต, 100 หน้า. ISBN 974-639-073-2

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ของเต่าตนุ *Chelonia mydas* 90 ตัว จากทะเลอันดามันและอ่าวไทยด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 3 บริเวณ (Cm3, Cm72 และ Cc117) พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากในสัตว์คุ้มครองชนิดนี้ จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วย PCR จะได้จำนวนอัลลีลเป็น 31, 40 และ 19 อัลลีล เมื่อใช้ไพรเมอร์ของไมโครแซทเทลไลท์บริเวณ Cm3, Cm72 และ Cc117 ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ย heterozygosity ที่คำนวนได้จากบริเวณ Cm3, Cm72และ Cc117 มีค่าเท่ากับ 0.87, 0.85และ 0.74 ตามลำดับ genetic distance ของกลุ่มประชากรเต่าตนุจากทะเลอันดามันและอ่าวไทยมีค่าเป็น 0.2693 สำหรับค่า F_{ST} ของเต่าตนุที่คำนวนได้จากข้อมูลของไมโครแซทเทลไลท์แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าระดับ gene flow ในสปีชีส์นี้มีค่าสูง (Nm = 40) การทดสอบ geographic heterogeneity ชี้ให้เห็นว่ามีความแตกต่างของการกระจายตัวของ allele frequency ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.0012) ทั้งค่า F_{ST} และการทดสอบ geographic heterogeneity ให้ผลที่สอดคล้องกันว่ากลุ่มประชากรของเต่าตนุในทะเลอันดามันกับอ่าวไทยมีพันธุกรรมต่างกัน

นอกจากนี้จากการใช้ combined exclusion ability ของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอทั้ง 3 บริเวณพบว่าเต่าตนุเพศเมียจะมีการผสมพันธุ์กับเพศผู้มากกว่า 1 ครั้งในการวางไข่ 1 รัง จากผลการทดลองที่ได้จากลูกเต่าตนุ 6 ตัวที่มาจากรังเดียวแสดงให้เห็นว่าเกิดจากแม่เต่าที่ได้รับการผสมจากตัวผู้อย่างน้อย 2 ตัว

จากข้อมูลพื้นฐานที่แสดงว่ามีกลุ่มประชากรของเต่าตนุในประเทศไทยโดยการพิจารณาจากพันธุกรรม และการที่พบว่าแม่เต่าตนุมีการผสมพันธุ์มากกว่าหนึ่งครั้งต่อการวางไข่ 1 รังนี้จะเป็นข้อมูลที่นำไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนงานการอนุรักษ์เต่าตนุและเต่าทะเลชนิดอื่นได้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... เทคโนโลยีชีวภาพ .....
สาขาวิชา .....
ปีการศึกษา ..... 2540 .....

ลายมือชื่อนิสิต ..... ธนาพร วีระประดิษฐ์ศิลป์ .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

KEY WORD: C 827279 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
Chelonia mydas / MICROSATELLITE DNA / GENETIC VARIATION THANAPORN VEERAPRADITSIN : MICROSATELLITE DNA VARIATION IN GREEN TURTLES *Chelonia mydas* OF THAILAND. THESIS ADVISOR : KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC.PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D. 100 pp.
ISBN 974-639-073-2

Intraspecific genetic diversity of 90 individuals of *Chelonia mydas* collected from the Andaman Sea and the Gulf of Thailand was analysed using 3 microsatellite loci (Cm3, Cm72 and Cc117). Surprisingly, high genetic polymorphism in this endangered species was found. Thirty-one, 40 and 19 alleles were examined from PCR-amplification of *C. mydas* DNA with microsatellite primers Cm3, Cm72 and Cc117, respectively.

The average heterozygosity was 0.87, 0.85 and 0.74 for Cm3, Cm72 and Cc117, respectively. Genetic distance between *C. mydas* population of the Andaman Sea and the Gulf of Thailand was 0.2693. The F_{ST} value calculated from microsatellite data indicated significance in population differentiation. Gene flow level of this species was high ($Nm = 40$). Geographic heterozygosity test showed significant difference in allele frequency distribution ($p = 0.0012$). This coupling with the F_{ST} analysis in juveniles illustrated that genetic population structure does exist in this species.

Multiple paternity was found in this study using combined exclusion ability of all three investigated microsatellite loci. Based on six offspring, it was found that at least two males multiple-copulate with the female.

The basic information for genetic population structure of *C. mydas* in Thailand and multiple-paternity of were very important for understanding their biological behaviour. These knowledge can be applied to construct sensible conservation programmes of this *C. mydas* and the others.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต ธนาพร วีระประดิษฐ์ศิลป์

สาขาวิชา biotechnology ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Acknowledgement

I would like to express my extremely gratitude to my major advisors, Dr. Kanoktip Packdibamrung, and my co-advisor, Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed for their useful guidance and carefulness.

I am very appreciate to Dr. Sirawut Klinbunga for his kindness in helping of data analysis. The special thanks are also expressed to Captain Vinai Gromin R.N. in a good support for collection of the samples. Thanks are also extend to anonymous people in helping to collect specimens from both Sattahip and Phangnga marine turtle conservation stations and to members of the Biochemistry and Biotechnology department especially in R707, 708 and 709. I would like to keep in mind for my best freinds, Miss Varisa Tangjingjai, Miss Rungnapha Phasuk, Miss Chuanchom muanprasitporn and Mr. Surachai Leepitakrat. I wish to acknowledge the contribution of the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for partial financial support.

Last but not least, I would like to express my deepest gratitude to my beloved mother and all members of my family for their unlimited love and encouragement. Without their inspiration, this thesis could not be finished.

TABLE OF CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

TABLE OF CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES.....ix

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I INTRODUCTION..... .1

II MATERIALS AND METHODS.....24

III RESULTS.....42

IV DISCUSSION.....67

V CONCLUSION.....82

BIBLIOGRAPHY.....83

APPENDIX.....91

BIOGRAPHY.....100

LIST OF TABLES

Table **Page**

2.1 Five primer sequences used in amplified microsatellite DNA.....31

3.1 Allele frequencies distribution of *C. mydas* analysed at locus Cm3 in the Andaman Sae and the Gulf of Thailand samples..... 51

3.2 Allele frequencies distribution of *C. mydas* analysed at locus Cm72 in the Andaman Sae and the Gulf of Thailand samples.....53

3.3 Allele frequencies distribution of *C. mydas* analysed at locus Cm72 in the Andaman Sae and the Gulf of Thailand samples.....54

3.4 Samples size (N), number of alleles per locus (A), observed heterozygosity (H_o), fixation indices (F) at three loci for two *C. mydas* populations.....57

3.5 Hardy-Weinberg expectation of *C. mydas* from the Andaman Sea and the Gulf of Thailand samples.....57

3.6 Genetic Distance between the Andaman Sea and the Gulf of Thailand samples computed from one, two or overall loci of *C. mydas*.....59

3.7 F_{ST} and gene flow for *C. mydas* between the Andaman Sea and the Gulf of Thailand 59

3.8 Pairwise comparisons of genotypic disequilibrium between Cm3, Cm72 and Cc117 loci observed in *C. mydas*.....61

3.9 Geographic heterogeneity test using a Monte Carlo simulation for 10,000 times.....61

3.10 Determination of genotypes from three non-relative and six relative newly hatching *C. mydas* individuals using three microsatellite loci (Cm3, Cm72 and Cc117).....66

LIST OF FIGURES

Table **Page**

1.1 Distribution of *C. mydas* in Thailand. 4

1.2 The external morphology of *C. mydas*.....5

3.1 Agarose gel electrophoresis showing DNA quality extracted from *C. mydas* ..... .43

3.2 The optimal annealing temperature and Mg^{2+} concentration for microsatellite locus Cm72 detected by agarose gel electrophoresis.....45

3.3 A 6% silver-stained denaturing polyacrylamide gel illustrating amplified microsatellite products of locus Cm84.....47

3.4 A 6% silver-stained denaturing polyacrylamide gel illustrating amplified microsatellite products of locus Cm3.....48

3.5 A 6% silver-stained denaturing polyacrylamide gel illustrating amplified microsatellite products of locus Cm72.....49

3.6 A 6% silver-stained denaturing polyacrylamide gel illustrating amplified microsatellite products of locus Cc117.....50

3.7 Histogram showing allele frequencies of three microsatellite loci (Cm3, Cm72 and Cc117) in two populations (the Gulf of Thailand and the Andaman Sea) of *C. mydas*.....55

3.8 A 6% silver-stained denaturing polyacrylamide gel of microsatellite products of locus Cm3 used to determine multiple-paternity in *C. mydas*.....63

3.9 A 6% silver-stained denaturing polyacrylamide gel of microsatellite products of locus Cm72 used to determine multiple-paternity in *C. mydas*.....64

3.10 A 6% silver-stained denaturing polyacrylamide gel of microsatellite products of locus Cc117 used to determine multiple-paternity in *C. mydas*.....65

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

bp	=	base pair
° C	=	degree Celcius
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
ddATP	=	dideoxyadenosine triphosphate
ddCTP	=	dideoxycytosine triphosphate
ddNTP	=	dideoxynucleotide triphosphate
ddGTP	=	dideoxyguanosine triphosphate
ddTTP	=	dideoxythymidine triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
ng	=	nanogramme
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย