ความแปรผันของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของไก่ป่าตุ้มหูแดง *Gallus gallus spadiceus* ในตอนเหนือและตอนใต้ของประเทศไทย

นายประมง เบกไธสง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-396-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19415527

MICROSATELLITE DNA VARIATION OF RED JUNGLEFOWLS *Gallus gallus spadiceus* IN NORTHERN AND SOUTHERN THAILAND

Mr.Pramong Begthaisong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechnology
Graduated School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998.

ISBN 974-332-396-1

Thesis Title	Microsatellite DNA variation of Red Junglefowls *Gallus gallus spadiceus* in northern and southern Thailand
By	Mr. Pramong Begthaisong
Program	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Wina Meckvichai

.....

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

..... Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

THESIS COMMITEE

..... Chairman

(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

.....Thesis advisor

(Associate. Profesor. Wina Meckvichai)

.....Member

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph. D.)

.....Member

(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

ประมง เบกไธสง : ความแปรผันของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของไก่ป่าตุ้มหูแดง *Gallus gallus spadiceus* ในตอนเหนือและตอนใต้ของประเทศไทย (MICROSATELLITE DNA VARIATION OF RED JUNGLEFOWL *Gallus gallus spadiceus* IN NORTHERN AND SOUTHERN THAILAND) อ.ที่ปรึกษา : รศ. วีณา เมฆวิชัย; 47 หน้า. ISBN 974-332-396-1.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้เพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA) ของไก่เลี้ยงมาใช้เพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอไก่ป่าตุ้มหูแดง *Gallus gallus spadiceus* และใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรทางตอนเหนือ (จังหวัดแพร่ และพะเยา) และทางตอนใต้ (จังหวัดชุมพร) จากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอทั้งหมด 6 ตำแหน่งคือ HUJ1 HUJ2 HUJ7 ADL37 LEI73 และ LEI92 โดยอาศัยกระบวนการลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) พบว่าไพรเมอร์จากไก่เลี้ยงทั้งหมดที่เลือกใช้สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ของไก่ป่าตุ้มหูแดงที่สกัดด้วย Chelex®100 ได้

จากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่เลือกใช้ทั้งหมดพบว่า 5 ตำแหน่ง คือ HUJ1, HUJ2, HUJ7, LEI73 และ LEI92 มีความหลากหลายสูง และพบว่ามีจำนวนอัลลีล (allele) แต่ละตำแหน่งเป็น 9, 13, 8, 10 และ 8 ตามลำดับ และพบว่าทุกตำแหน่งมีอัลลีลร่วม (shared allele) ระหว่าง 2 แหล่ง ความถี่อัลลีลที่ตำแหน่ง HUJ1, HUJ2, HUJ7 และ LEI92 ในประชากรทางตอนเหนือเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg แต่มีเพียง 2 ตำแหน่งคือ HUJ2 และ LEI92 ในประชากรจากจังหวัดชุมพรที่เป็นไปตามกฎนี้ จากการวิเคราะห์ geographic heterogeneity แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างประชากรทางตอนเหนือและจังหวัดชุมพรที่ตำแหน่ง HUJ1 ($P = 0.109$) HUJ2 ($P = 0.313$) HUJ7 ($P = 0.065$) และ LEI92 ($P = 0.465$) แต่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ตำแหน่ง LEI73 ($P = 0.013$) ระหว่างสองประชากร

ภาควิชา -	**ลายมือชื่อนิสิต**
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ	**ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**
ปีการศึกษา 2541	**ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม**

C827161 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD *Gallus gallus spadiceus* / RED JUNGLEFOWL / MICROSATELLITE DNA / GENETIC VARIATION

PRAMONG BEGTHAISONG : MICROSATELLITE DNA VARIATION OF RED JUNGLEFOWLS *Gallus gullus spadiceus* IN NORTHERN AND SOUTHERN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WINA MECKVICHAI. 47 pp. ISBN 974-332-396-1.

The purposes of this study were to validate possibility to using chicken microsatellite marker for investigation of microsatellite variation in Red Junglefowl genome and used these marker to determine genetic diversity of this chicken ancestor in northern and southern Thailand. Six available microsatellite-flanking PCR primers which developed from genomic libraries of domestic chicken were used to amplify microsatellite DNA from Chelex®100 extracts.

Five loci, HUJ1, HUJ2, HUJ7, LEI73 and LEI92 shown polymorphic amplified product (with number of allele at each locus of 9, 12, 8, 10 and 8 respectively) whereas ADL37 shown only two observed allele. Shared allele between northern (Phrae Prayao and Chaiyabhum province) and southern (Chumphon province) local were found at all loci. Conformity with Hardy-Weinberg expectation was found at almost loci (HUJ1, HUJ2, HUJ7 and LEI92) in northern local. Unlike, only HUJ2 and LEI92 loci in southern local conformed this expectation. Geographic heterogeneity analysis shown non significant difference between two populations at HUJ1 (P = 0.109), HUJ2 (P = 0.313), HUJ7 (P = 0.065) and LEI92 (P = 0.465) but significant difference at LEI73 (P = 0.013).

ภาควิชา.....	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2541	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgement

I would like to express my deepest gratititude to my advisor, Associate Professor Wina Meckvichai for her guidances, supervison, encouragement and support throughout my study.

I gratefully thanks Assistant Professer Dr. Vichien Rimphanitchayakit, chairman of the thesis committee, Associate Professor Dr.Siripom Sitipranit and Dr.Sirawut Klinbunga, for their precious advice

Very special thanks are due to Dr.Sukamol Srikwan for her kind suggestion in many aspects of microsatellite analysis

Thanks are also expressed to all my friends in Biochemistry and Biotechnology for their helps in laboratory. Many thanks are due to my friend in Biology and my junior colleague for their suggestions and assistances in many ways.

I am indepted in the Biodiversity Research and Training Program, a joint program supported by the Thailand Research Fund and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Also a scholarship awarded by the University Development Committee (UDC), Ministry of University Affairs, Graduate School, Chulalongkorn University are fully acknowledged.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parent and members of my family for their love, care, understanding and encouragement extended throughout my study.

Contents

	Page
Thai Abstract	iv
English Abstract	v
Acknowledgement	vi
Contents	vii
List of Tables	viii
List of Figures	ix
Chapter 1: Introduction	1
Chapter 2: Literature Review	4
Chapter 3: Materials and Methods	20
Chapter 4: Results and Discussion	29
Chapter 5: Conclusion and Recommendation	39
References	40
Biography	47

List of Tables

Table **Page**

3-1 Characteristic of selected microsatellite-flanking PCR primer..... **24**

4-1 Sample locality, Tissue Source, comcentration and absorbance ratios of sample used in this study..... **30**

4-2 Genotype of six microsatellite loci in *Gallus gallus spadiceus* from northern and southern Thailand..... **34**

4-3 Summarized allele frequencies of HUJ1, HUJ2, HUJ7, LEI73 and LEI92 locus from northern and southern localities of *Gallus gallus spadiceus*..... **35**

4-4 Estimation of Hardy-Weinberg expectation in northern and southern local for each microsatellite locus..... **35**

List of Figures

Figure **Page**

2-1 Photograph of various Junglefowl..... 5

2-2 Distribution map of Junglefowl..... 9

4-1 Autoradiography of PCR amplified microsatellite of the HUJ1 locus from 20 individual of *G. g. spadiceus*..... 31

4-2 Autoradiography of PCR amplified microsatellite of the HUJ2 locus from 20 individual of *G. g. spadiceus*..... 32

4-3 Autoradiography of PCR amplified microsatellite of the HUJ7 locus from 20 individual of *G. g. spadiceus*..... 32

4-4 Autoradiography of PCR amplified microsatellite of the LEI73 locus from 19 individual of *G. g. spadiceus*..... 33

4-5 Autoradiography of PCR amplified microsatellite of the LEI92 locus from 13 individual of *G. g. spadiceus*..... 33

4-7 Histogram showing allele frequencies of five microsatellite loci (HUJ1, HUJ2, HUJ7, LEI73 and LEI92) in northern (n = 8) and southern (n = 11) population of *G. g. spadiceus*..... 36