Example of Summary report of species identification and evolutionary history of Lutrinae from Ing River, Chiang Rai

CEG - Conservation Genetics (Worata Klinsawat and Wanlop Chutipong), Mekong Community Institute and Living River Association

Objective:

(1) To identify species from noninvasive samples including feces and natural history specimen using molecular techniques optimized for ancient DNA

(2) To infer evolutionary history and historical factors influencing spatial genetic variation and dispersal patterns of otter species from subfamily Lutrinae (Carnivora, Mustelidae)

Methods:

Biological sampling. The total of 7 samples (2 skin biopsy samples from natural history specimens and 5 fecal samples) were collected from the bank of Ing River, Chiang Rai Province, Thailand by Mr. Teerapong Pomun, a director of Mekong Community Institute (MCI) and Living River Association (LRA).

DNA extraction. Genomic DNA was extracted using the modified ancient DNA method (Klinsawat, unpublished) based on DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germany) for skin biopsy and QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) for fecal samples.

Mitochondrial DNA PCR amplification. For species identification and evolutionary history inference, we applied the reported primers (Moretti et al. 2017) and newly developed primers targeted two overlapping fragments of the complete 1140bp *Cytochrome B* (*CytB*) gene in Lutrinae (Klinsawat, unpublished). All PCR products were purified and sent for sequencing in both forward and reverse direction at Apical scientific Sequencing Company (Malaysia).

Phylogenetic analyses for species delineation and evolutionary patterns. We checked for quality control and visually inspected 1140bp nucleotide sequences in BioEdit (Hall 1999). Sequence alignment using our sequences and the reported *CytB* fragments from GenBank were performed in MAFFT (Katoh et al. 2002). We performed phylogenetic analyses based on maximum likelihood approach and estimation of nucleotide substitution in IQ-TREE (Trifinopoulos et al. 2016). The best-fitted nucleotide substitution model according to Bayesian Information Criteria (BIC) was TN+F+I.

Result:

Of the total 7 samples collected from the bank of Ing River in Chiang Rai, we successfully amplified the complete *CytB* gene (1,140 bp) from 6 samples (86% PCR success) using two primer pairs (Moretti et al. 2017; Klinsawat, unpublished). Based on phylogenetic analysis (Figure 1), we identified 5 samples (4 fecal and 1 skin specimen) as Eurasian Otter (*Lutra lutra*) and 1 fecal sample as Smooth-coated Otter (*Lutrogale perspicillata*).

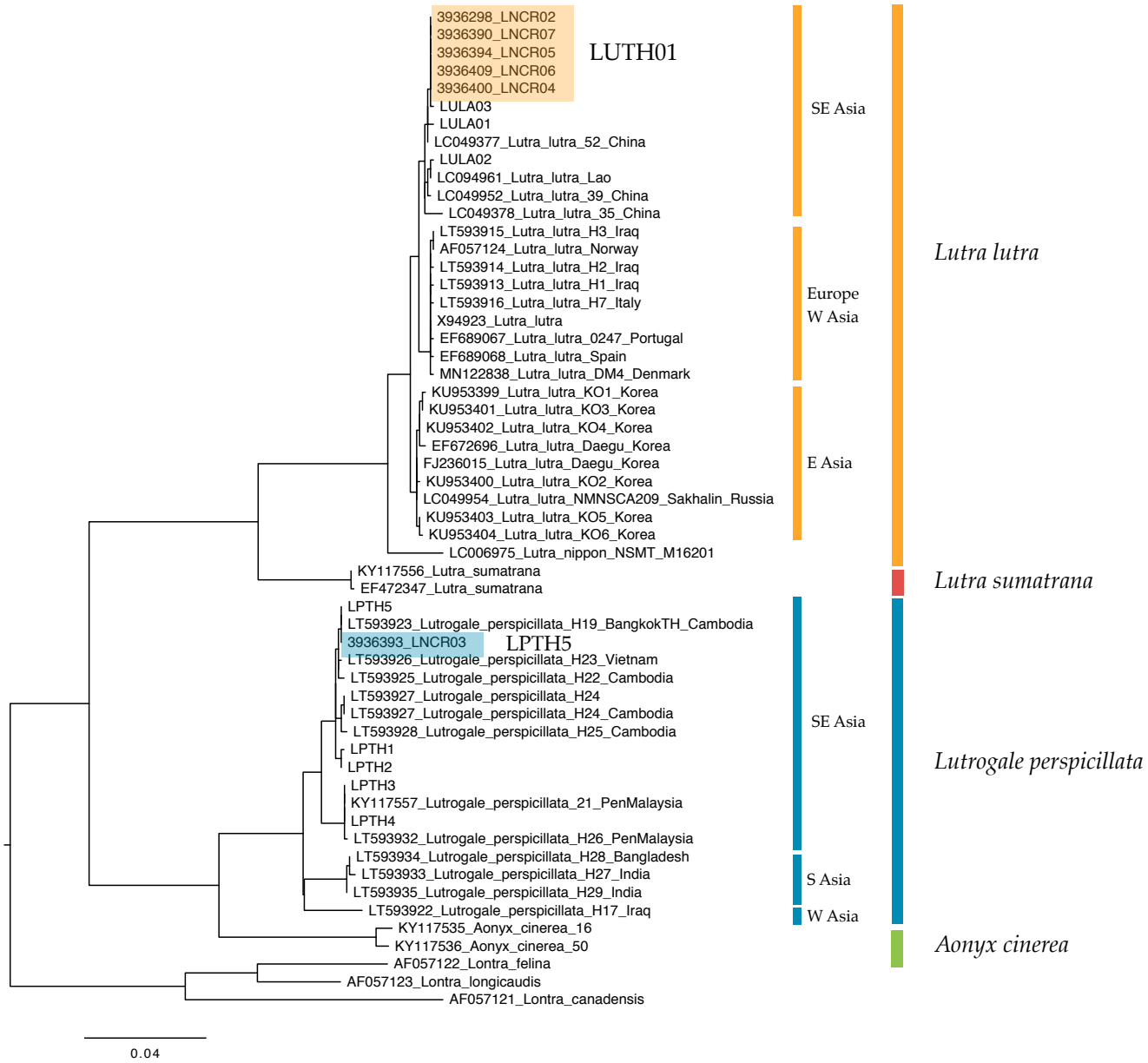

Figure 1. Phylogenetic relationships based on maximum-likelihood method and the complete *CytB* sequences (1140 bp) among otter species in Lutrinae subfamily. Marine Otter (*Lontra felina*), Neotropical River Otter (*Lontra longicaudis*) and North American River Otter were used as outgroups (*Lontra canadensis*). Eurasian Otters from this study were highlighted in orange (LUTH01) and Smooth-coated Otter in blue (LPTH5). Genetic partitioning corresponded to geographic isolation into three major regions for both Eurasian Otter and Smooth-coated Otter.

We did not detect the third species of otter that might plausibly inhabit the study area, Asian small-clawed Otter (*Aonyx cinereus*), but given the relatively limited sampling, this does not mean that it might not also be present.

In addition to species identification, we newly discovered a single maternal evolutionary lineage (LUTH01 haplotype) from 5 samples of Eurasian Otter. This haplotype differed from LULA03 haplotype from Nakai-Nam Theun National Protected Area in Lao PDR by one nucleotide. The close evolutionary relationships between otter populations in northern Thailand and northern Lao in the Southeast Asia clade suggested historical dispersal between both areas. Genetic partitioning of Eurasian Otter corresponded to geographic isolation into 3 major regions: Southeast Asia vs. Europe/West Asia vs. East Asia (Figure 1).

For Smooth-coated Otter, the fecal sample LNCR03 had the same sequence as LPTH5 haplotype (or H19 haplotype in Moretti et al. 2017) found in Bang Khun Thian District, Bangkok, Thailand. The shared haplotype between northern and central Thailand indicated that there was no historic barrier disrupting dispersal and gene flow between both areas. This long-range dispersal capability to recolonize unoccupied habitats had previously been observed in Eurasian Otter in the UK and western Europe. Similar to regional genetic isolation observed in Eurasian Otter, 3 subclades corresponding to Southeast, South and West Asia were detected (Figure 1).

A more extensive geographic coverage of Eurasian Otter in Indochina biogeographic region will further provide an insight into the past environmental barriers that might have shaped dispersal patterns and gene flow in this region. In addition, screening of multiple loci with higher mutation rate compared to that of mitochondrial DNA will allow us to assess a more recent impact of human activities and land use changes on population genetic diversity and connectivity. Integration among genetic, ecological and demographic data into management plan will enable a more effective land use zoning to alleviate genetic threat, promote connectivity and adaptability over the landscape scale.

References

Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, 95-98. In. UK.

Moretti B, Al-Sheikhly OF, Guerrini M, Theng M, Gupta BK, Haba MK, Khan WA, Khan AA, Barbanera F. 2017. Phylogeography of the smooth-coated otter (*Lutrogale perspicillata*): distinct evolutionary lineages and hybridization with the Asian small-clawed otter (*Aonyx cinereus*). Scientific reports. 7(1):1-3.

Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic acids research. 30(14): 3059–3066.

Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucleic acids research. 44(W1): W232–W235.

Executive summary in Thai

การยืนยันการปรากฏของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่หายาก (elusive) มีความหนาแน่นต่ำ และประชากรมีการกระจายตัวกว้างนั้นจำเป็นต้องอาศัยการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล (Molecular techniques) เพื่อเพิ่มความรวดเร็วและน่าเชื่อถือของการจำแนกชนิดพันธุ์ (species identification) ตลอดจนการประเมินการกระจายตัวในระดับประเทศและระดับภูมิภาค ในการศึกษาครั้งนี้ คณะวิจัยประยุกต์ใช้เทคนิค DNA barcoding เพื่อระบุชนิดพันธุ์จากนากลุ่มน้ำอิง 7 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยมูล 5 ตัวอย่าง และหนัง (skin biopsy) 2 ตัวอย่าง ผลการวิจัยพบว่าสามารถสกัด DNA และเพิ่มปริมาณยีน Cytochrome B (*CytB,* 1140 bp) ด้วยเทคนิค PCR ได้สำเร็จ 6 ตัวอย่าง (PCR sucess 86 %) เมื่อลำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequences) จากตัวอย่างดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมยีน (*CytB*) ใน GenBank และฐานข้อมูลจากห้องปฏิบัติการ Conservation Ecology Group (CEG) นั้นสามารถระบุได้ว่าเป็นตัวอย่างนากใหญ่ธรรมดา *Lutra lutra* (N=5; มูล 4 ตัวอย่าง หนัง 1 ตัวอย่าง) และนากใหญ่ขนเรียบ *Lutrogale perspicillata* (N=1)

จากตัวอย่างนากใหญ่ธรรมดา ทั้ง 5 ตัวอย่างนั้น คณะวิจัยพบลักษณะทางวิวัฒนาการสายแม่ 1 haplotype (LUTH01) ซึ่งซึ่งแตกต่างจาก haplotype ที่พบในประชากร Nakai Nam Theun ประเทศลาว 1 nucleotide ซึ่งการมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันมากระหว่างประชากรนากใหญ่ธรรมดาในภาคเหนือของไทยและลาวนั้น บ่งบอกว่าประชากรในอดีต (สองร้อยปีขึ้นไป) เคยมีการอพยพเคลื่อนย้าย (historical dispersal) สูง อาจมี ancestral populations ที่มี haplotype เดียวกันกระจายอยู่ในทั้งสองพื้นที่ และเมื่อเวลาผ่านไป เมื่อมี gene flow disruption อันเนื่องมาจากสภาพทางภูมิศาสตร์หรือกิจกรรมมนุษย์ ประชากรเชียงรายเผชิญกับ genetic drift pressure ที่ต่างกับประชากรลาวเหนือ ทำให้ในปัจจุบันพบลักษณะทางพันธุกรรมสายแม่ที่แตกต่างกันออกไป แต่ยังคงมีความใกล้เคียงกันและจัดอยู่ใน clade SE Asia ซึ่งเป็น 1 ใน 3 clade ใหญ่ของนากใหญ่ธรรมดา (SE Asia vs. Europe/W Asia vs. E Asia) ซึ่งรูปแบบการแบ่งประชากรทางพันธุศาสตร์ในระดับภูมิภาคนี้ (regional-scale genetic partition) สามารถพบได้ในนากใหญ่ขนเรียบเช่นกัน โดย LPTH5 haplotype ที่พบจากประชากรลุ่มน้ำอิงนี้ เป็นลักษณะทางพันธุกรรมเดียวกันกับที่พบในประชากรนากบางขุนเทียน-ทุ่งครุ กรุงเทพฯ) ซึ่งรูปแบบการกระขายตัวทางพันธุกรรมนี้บ่งบอกว่านากใหญ่ขนเรียบในอดีตสามารถกระจายตัวตามลุ่มน้ำจากภาคเหนือลงมาภาคกลางของไทยโดยไม่มี physical barrier หรือภัยคุกคามจากมนุษย์ที่มาแบ่งแยกประชากรออกจากกันแต่อย่างใด

ทั้งนี้การศึกษาในอนาคตที่มีเป้าหมายเพื่อประเมินภัยคุกคามจากการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์พื้นที่ในปัจจุบันต่อโครงสร้างและความต่อเนื่องของประชากร (population connectivity) นั้นจำเป็นต้องอาศัยเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลที่มีการแปรผันสูง (high mutation rate) และเป็นตัวแทนจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของพ่อและแม่ (biparental markers) เช่น autosomal microsatellite loci ตลอดจนการวางแผนเก็บตัวอย่างที่เป็นระบบ (fine-scale landscape genetic sampling) เพื่อตอบโจทย์วิจัยดังกล่าว เพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ในการนำผลวิจัยที่ได้มาประยุกต์ในการวางแผนจัดการพื้นที่ชุ่มน้ำและเพิ่มโอกาสในการอยู่รอดของประชาการนากในระยะยาว