

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ *Noctiluca scintillans* บริเวณอ่าวไทยตอนใน

นางสาว กตัญญูพี นามปักษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC VARIATION OF *Noctiluca scintillans* IN THE INNER GULF OF THAILAND

Miss Katanchalee Nampuksa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Marine Science

Department of Marine Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University


Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

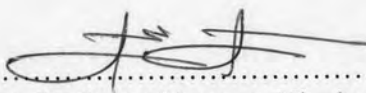
501256

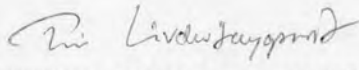
Thesis Title GENETIC VARIATION OF *Noctiluca scintillans* IN THE INNER GULF OF THAILAND
By Miss. Katanchalee Nampuksa
Field of Study Marine Science
Thesis Advisor Associate Professor Thaithaworn Lirdwitayaprasit, Ph. D.
Thesis Co-advisor Assistant Professor Sanit Piyapattanakorn, Ph. D.

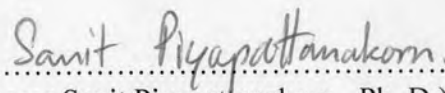
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

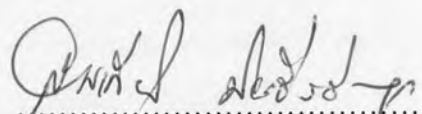

..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Ph. D.)

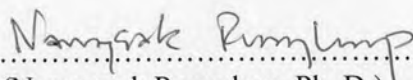
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Assistant. Professor Voranop Viyakarn, Ph. D.)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Thaithaworn Lirdwitayaprasit, Ph. D.)


..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Sanit Piyapattanakorn, Ph. D.)


..... Member
(Associate Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph. D.)


..... Member
(Narongsak Puanglarp, Ph. D.)

กัตัญชพี นามปึกษา : ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ *Noctiluca scintillans* บริเวณอ่าวไทยตอนใน. (GENETIC VARIATION OF *Noctiluca scintillans* IN THE INNER GULF OF THAILAND) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. ศานิต ปิยพัฒน์นกร, 107 หน้า.

Noctiluca scintillans เป็นแพลงก์ตอนพืชทะเลที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดน้ำเปลี่ยนสี (red tide) บริเวณอ่าวไทยตอนใน โดยทั่วไปจะพบการเกิดน้ำเปลี่ยนสีที่มีสาเหตุมาจาก *N. scintillans* บริเวณปากแม่น้ำต่างๆ รวมไปถึงบริเวณชายฝั่งของจังหวัดชลบุรี และเพชรบุรี อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรของ *N. scintillans* ที่กระจายอยู่ในอ่าวไทยตอนใน การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics) เพื่อประยุกต์ใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร *N. scintillans* บริเวณอ่าวไทยตอนใน โดยเก็บตัวอย่างจากบริเวณอ่าวไทยตอนใน 3 สถานี (เพชรบุรี สมุทรปราการ และชลบุรี) บริเวณอ่าวไทยตอนนอก 2 สถานี (จันทบุรี และชุมพร) รวมทั้งตัวอย่างจากต่างประเทศ 2 สถานี คือฟิลิปปินส์ และ อินโดนีเซีย ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *N. scintillans* ในอาหารสูตร ESM และให้ *Dunaliella* เป็นอาหาร และทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วยเกลือ (salting out) เพื่อใช้ในการศึกษาเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ ในเทคนิค ISSR ได้ทำการทดสอบ primer ทั้งหมด 48 primers และได้ 5 primers (814, SAS 3, 17898A, HB15 and 844A) ที่ให้รูปแบบที่มีความหลากหลายพร้อมทั้งให้ข้อมูลที่เชื่อถือได้ ในส่วนของการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ด้วย COX I ได้ทำการเพิ่มปริมาณลำดับเบสในบริเวณดังกล่าวโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งทำให้ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ที่มีความยาว 450 เบสแพร์ ซึ่งการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าประชากร *N. scintillans* ทั้ง 2 กลุ่มบริเวณอ่าวไทยและกลุ่มของต่างประเทศไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในส่วนของ ITS ได้ทำการเพิ่มปริมาณลำดับเบสในบริเวณดังกล่าวโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งทำให้ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ที่มีความยาว 800 เบสแพร์ ด้วยการให้ ITS_F1 primer โดยลำดับเบสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลมีความยาว 489 เบสแพร์ ซึ่งลำดับเบสเหล่านี้จะประกอบด้วยส่วนของ 18srRNA (471 เบส) และบางส่วนของบริเวณ ITS (27 เบส) ส่วนของการใช้ reversed primers ITS_R2 จะให้ลำดับเบสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลมีความยาว 56 เบสแพร์ ซึ่งลำดับเบสเหล่านี้จะอยู่ในส่วนของ 5.8srRNA (41 เบส) และอยู่ในบางส่วนของ ITS (15 เบส) ในการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จาก ITS_F1 primer (489 เบส) ไม่มีความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างจากบริเวณต่างๆที่เราทำการศึกษา พบปัญหาในการลำดับเบสที่ตำแหน่ง ITS I ของ *N. scintillans* ซึ่งอาจเกิดจากความแปรปรวนระหว่าง multiple copies ของยีนในแต่ละตัวอย่าง

ภาควิชา...วิทยาศาสตร์ทางทะเล... ลายมือชื่อนิติ..... กัตัญชพี นามปึกษา
 สาขาวิชา...วิทยาศาสตร์ทางทะเล... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา...2550..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

#4772201423: MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: *Noctiluca scintillans*/ GENETIC VARIATION/ COXI/ ITS

KATANCHALEE NAMPUKSA: GENETIC VARIATION OF *Noctiluca scintillans* IN THE INNER GULF OF THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. THAITHAWORN LIRDWITAYAPRASIT, Ph. D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. SANIT PIYAPATTANAKORN, Ph. D., 107 pp.

Noctiluca scintillans is the main causative red tide organisms in the inner Gulf of Thailand. Generally, this red tide could be observed around the river mouth areas including Chonburi and Petchburi coastal areas. However, the relationship between groups of *N. scintillans* in the inner Gulf of Thailand has not been known. Therefore, this study aimed to use the application of the molecular genetic technique to investigate genetic variation of *N. scintillans*. The samples were collected from 3 different locations in the inner Gulf of Thailand (Petchburi, Samotprakarn and Chonburi province), 2 locations from the eastern and southern part of the Gulf of Thailand (Chanthaburi and Chumpron province) and 2 sites from The Philippines and Indonesia. *N. scintillans* was cultured in ESM-culture medium, fed with *Dunaliella*. The DNA was extracted by salting out method for molecular genetic study. 48 ISSR primers were screened and 5 primers produced clear, polymorphic, and reliable ISSR profiles (814, SAS 3, 17898A, HB15 and 844A). The PCR product of COX I gene was about 450 bp in size. The analysis of the COX I sequences showed that there was no genetic variation among green *N. scintillans* samples. For ITS I region, the amplified PCR product was approximately 800 bp in size. The primer ITS_F1 was used to carry out sequencing reaction, 489 bp of DNA sequence were obtained, the sequence consisted of partial sequence of 18s rRNA (471 bases) and some part ITS region (27 bases). The sequence of PCR product of 56 bases were obtained by reversed primers ITS_R2. and contained part of 5.8s rRNA (41 bases) and part of ITS1 region (15 bases). The analysis of sequence obtained from ITS_F1 primers (489 bases) showed no differences among the samples collected from all stations. There was a problem to get the whole sequence of ITS I region of *N. scintillans* in this study. This might be caused by the variation between multiple copies of the gene within each sample since this gene has been reported that the multiple copies could be occurred.

Department...Marine Science.....

Field of study...Marine Science...

Academic year...2007.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Acknowledgments

I would like to express my most sincere thanks to (Thesis Advisor) Associate Professor Dr. Thaithawon Lirdwittayaprasit, Department of marine science, Faculty of Science, Chulalongkorn University for sharing the ideas and encouragement throughout this study.

I would like to express my deeply grateful thank to Assistant Professor Dr. Sanit Piyapattanakr (Thesis Co-advisor), Department of marine science, Faculty of Science, Chulalongkorn University who gave me much more supervision, including his kindly valuable guidance and discussion.

I gave very special thanks to Dr. Somkiat Piyatiratitivorakul Associate Professor, Department of marine science, Faculty of Science, Chulalongkorn University and Dr. Narongsak puanglarp, Center of Excellence for Marine Biotechnology, Chulalongkorn University for their excellent advice and for their help in correcting the manuscript (my thesis committee).

A special thanks to Assistant Professor Dr. Voranop Viyakarn, Department of marine science, Faculty of Science, Chulalongkorn University for his helpful comments in my thesis (my thesis chairman).

I am indebted to Associate Professor Dr. Charoen Nitithamyong Department of marine science, Faculty of Science, Chulalongkorn University for his helpful and encouragement during throughout study.

I feel thank you so much to Mr. Theerarak Srinualkrai and Mr. Anusorn Pansook for their helpful comments some parts of my thesis.

Sincere thanks to Miss Ingon Thongkomdee for her helpful and encouragement during throughout study.

Finally, a very special thanks to my family and my friends, for their love support understanding and encouragement during throughout study.

This project was granted by THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

Contents

	Page
Abstract (Thai)	iv
Abstract (English)	v
Acknowledgements	vi
Contents	vii
List of Tables	x
List of Figures	xi
List of Abbreviation	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	2
2.1 <i>Noctiluca scintillans</i>	2
Life history.....	2
Taxonomic Description.....	3
Morphology and Structure.....	5
Size.....	5
Movement.....	5
Diet.....	5
Reproduction.....	5
Habitat and Locality.....	6
Blooms.....	6
Phylogenetic of <i>N. scintillans</i>	7
2.2 Common molecular techniques used in population studies	8
2.2.1 DNA markers	9
2.2.1.1 Random markers.....	10
Inter simple sequence repeat (ISSR).....	10
2.2.2 Animal mitochondrial DNA (mtDNA).....	11
2.2.3 Nuclear marker (Internal transcribed spacer (ITS)).....	12
2.3 Population genetics of phytoplankton	13
2.4 Why we should study the genetic variation in the inner gulf of Thailand ?.....	15

	Page
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	17
3.1 Field sites and sampling	17
3.2 Culture of <i>N. scintillans</i>	19
3.3 DNA extraction	20
3.4 Checking the quality and quantity of extracted DNA	20
3.5 ISSR-PCR	21
3.5.1 ISSR-PCR condition.....	21
3.5.2 Gel electrophoresis of ISSR-PCR.....	21
3.6 The amplification of cytochrome c oxidase subunit I (COX I) and Inter transcribed spacer (ITS I) region	22
3.6.1 PCR condition for COX I gene.....	22
3.6.2 PCR condition for ITS I region.....	23
3.6.3 Gel electrophoresis of PCR product of COX I and ITS regions.....	24
3.6.4 The PCR product purification of COX I and ITS I regions.....	24
3.6.5 The sequencing of PCR products of COX I and ITS I regions.....	25
3.6.5.1 COX I and ITS I sequences.....	25
3.6.5.2 The sequencing analysis.....	26
CHAPTER IV RESULTS	27
4.1 Collecting and Sampling	27
4.2 Culture cells of <i>N. scintillans</i>	28
4.3 Part genetic variation	31
4.3.1 DNA extraction.....	31
4.3.2 PCR amplification.....	31
4.3.2.1 ISSR.....	31
4.3.2.2 Cytochrome Oxidase subunit I (COXI).....	34
4.3.2.3 ITS (Inter transcribed spacer region).....	41
CHAPTER V DISCUSSIONS	49
5.1 Problem in the management of cells culture and the use of ISSR technique....	49

	Page
5.2 Lack of genetic variation in Cytochrome Oxidase subunit I (COX I) and 18s rRNA genes.....	50
5.3 Putative multiple copies of ITS (Inter transcribed spacer).....	51
CHAPTER VI GENERAL CONCLUSION.....	53
Cultured cells and genetic variation of <i>N. scintillans</i> in the inner gulf of Thailand.....	53
APPENDICES.....	54
APPENDIX1.....	55
APPENDIX2.....	56
APPENDIX3.....	59
APPENDIX4.....	77
APPENDIX5.....	90
REFERENCE.....	97
BIOGRAPHY.....	107

List of Table

	Page
Table. 1 The sampling sites and clonal cultures of <i>N. scintillans</i> for used to COX I and ITS in this study.....	18
Table2 The sampling sites and number of clones.....	27
Table. 3 Some observations of <i>N. scintillans</i> in culture method (1) and method (2).....	30
Table. 4 Primers sequences used in the ISSR amplification, concentration of MgCl ₂ , annealing temperature (T _m), size range of fragments and number of samples.....	32

List of figure

	Page
Fig.1. Schematic representation of the complete life cycle of <i>Noctiluca scintillans</i> , including both asexual binary fission and sexual reproduction.....	3
Fig. 2. Cell of <i>Noctiluca scintillans</i>	4
Fig. 3. ISSR technique.....	10
Fig. 4. Schematic diagram of the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region. There are two <i>EcoRI</i> sites (GAATTC; denoted by E) located outside the ITS region amplified by the 'universal' primers of White <i>et al.</i> (1990).....	13
Fig. 5. Seasonal circulations due to seasonal wind fields (Buranapratheprat and Yanagi, 2003).....	15
Fig. 6. Sampling sites;1. Petchburi province, 2. Chaophraya river mouth, 3. Chonburi province, 4. Chumpron province and 5. Chanthaburi province...	17
Fig. 7. Cell of pink <i>N. scintillans</i> in ESM medium.....	28
Fig. 8. The high cell concentration of <i>N. scintillans</i> for DNA extraction.....	29
Fig. 9. Cells of <i>N. scintillans</i> before starvation, <i>Dunaliella</i> could be observed in the food vacuoles.....	29
Fig. 10. Starved cells of <i>N. scintillans</i> for 4 days and no any <i>Dunaliella</i> have been found in food vacuoles.....	29
Fig. 11. Genomic DNA samples of <i>N. scintillans</i> on 0.8% agarose gel stained with EtBr (Lane M represents λ <i>Hind</i> III as DNA marker. Lane 1-8 show individual genomic DNA from 1PB 3ASL 5CPY 7 CHP 9JB 11MB and 13ID respectively).....	31
Fig. 12-16. PCR product of ISSR primer were screened for successful amplification. Lane M represents 100 pb DNA marker. Lane1-6 show individual DNA bands from 1PB 2PB 3ASL 4ASL 5CPY and 6CPY respectively.....	32

	Page
Fig. 17. COX_F2 and COX_R2 of these 3 sets primers on 1% agarose gel stained with EtBr, it was screened for successful amplification (Lane M represents 100 pb DNA marker. Lane 1-3 show individual PCR products from 1PB 3ASL and 5CPY respectively).....	34
Fig. 18. The PCR products of COX_F2 and COX_R2 primer on 1% agarose gel stained with EtBr, before they were purified by using a MACHEREY-NAGEL PCR clean-up, Gel extraction kit. Lane M represents 100 pb DNA marker and lane 1-4 show the products from 5CPY respectively.....	35
Fig. 19. The result from Chromas Lite program, electropherogram of COXI sequence of <i>N. scintillans</i> from Chonburi province. Green colors show Adenine (A). Blue colors indicate Cytocine (C), and Black colors express Guanine (G). Red colors present Thymine (T).....	35
Fig. 20. The sample of result alignment from ClustalX program of COX1 sequence of <i>N. scintillans</i> in the inner gulf of Thailand (1-2PB, 3-4ASL and 5-6CPY) and outing group from Philippine (11-12MB) and Indonesia (13-14ID). Red colors show Adenine (A). Blue colors indicate Cytocine (C), Orange colors express Guanine (G) and Green colors present Thymine (T). Asterisks symbols (*) expressed that all samples appear nitrogenous base (A, C, G, and T) identity.....	36
Fig. 21. The result from BioEdit program of COX1 sequence of <i>N. scintillans</i> in the inner gulf of Thailand (1-2PB, 3-4ASL and 5-6CPY) and outing group from Indonesia (11-12MB) and Philippine (13-14ID). Asterisks symbols (*) expressed that all samples appear nitrogenous base (A, C, G, and T) identity. Green label showed outing group from Indonesia (11-12MB) and Philippine (13-14ID).....	37

- Fig. 22.** The PCR products of ITS primer (ITS_F1) on 1% agarose gel stained with EtBr, (lane M represents 100 bp DNA marker and lane 1-7 show the products from 1PB, 2PB, 3ASL, 4ASL, 5CPY, 6CPY, and 11MB, respectively)..... 41
- Fig. 23.** The position of sequence of PCR product; ITS forward primer, which were in overlapping position of terminal of 18srRNA and some part of ITS region (compared with *Pfiesteria*-like dinoflagellate position)..... 42
- Fig. 24.** The position of sequence of PCR product; ITS reverse primer, which were in overlapping position of terminal of ITS1 region and some part of 5.8srRNA (compared with *Pfiesteria*-like dinoflagellate position)..... 42
- Fig. 25.** The position of sequences of amplified by new forward primers, set 3 and set 4 (compared with *Pfiesteria*-like dinoflagellate position)..... 43
- Fig. 26.** The result from BioEdit program of ITS forward sequence of *N. scintillans* in the inner gulf of Thailand (1-2PB, 3-4ASL and 5-6CPY) and outing group from Indonesia (11-12MB) and Philippine (13-14ID). Asterisks symbols (*) expressed that all samples appear nitrogenous base (A, C, G, and T) identity 44

Abbreviation

AFLP	amplified fragment length polymorphism
AMOVA	analysis of molecular variance
ATP	adenosine triphosphate
°C	degree Celsius
cells/L	cells per liter
cells/ml	cells per millilitre
COX I	cytochrome c oxidase 1
CTAB	hexadecyl trimethylammonium bromide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxyribonucleoside triphosphates
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethedumbromide
g.	gram
hrs.	hours
Hsp90	heat shock protein 90
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeats
ITS	internal transcribed spacer
MgCl ₂	magnesium chloride
mg/ml	milligram per millilitre
mM	millimolar
MNaCl	molar sodiumchloride
m/sec	meter per second
mtDNA	mitochondrial DNA
nDNA	nuclear DNA
pb	bases pairs
PCR	polymerase chain reaction
RAPD	random amplified polymorphic DNA
rpm	round per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate

SSR	simple sequence repeat
TBE buffer	tris-HCL, boric acid and EDTA buffer
TEN buffer	tris-HCL, EDTA and sodium chloride buffer
tRNA	transfer RNA
w/v	weight per volume
V	volt
UV	ultraviolet
μ g	microgram
μ l	microlitre
μ m	micrometer
μ mol	micromole