

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮือเขตร้อนในประเทศไทย โดย RAPD-PCR



นางสาวอาภรณ์ ไพธิพงษ์วิวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0038-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T ๒๐๓๐๔๑๕X

GENETIC DIVERSITY OF TROPICAL ABALONE IN THAILAND
USING RAPD-PCR

Ms. Aporn Popongviwat

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

Department of Marine Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0038-5

Thesis Title GENETIC DIVERSITY OF TROPICAL ABALONE IN THAILAND
 USING RAPD-PCR

By Ms. Aporn Popongviwat

Field of Study Marine Science

Thesis Advisor Associate Professor Padermsak Jarayabhand, Ph. D.

Thesis Co-advisor Sirawut Klinbunga, Ph. D.

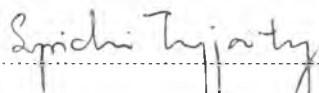
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in partial fulfillment of
the requirement for the Master's Degree



.....
(Associate Professor Pipat Karntiang, Ph. D.)

Deputy Dean for Administrative Affairs
Acting Dean, Faculty of Science

THESIS COMMITTEE



.....
(Supichai Tangjaitrong, Ph. D.)

Chairman



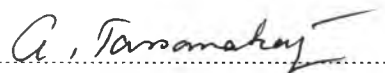
.....
(Associate Professor Padermsak Jarayabhand, Ph. D.)

Thesis Advisor



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

Thesis Co-advisor



.....
(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph. D.)

Member

อารมณ์ โพธิ์พงศวิวัฒน์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮือเซตร้อนในประเทศไทยโดย RAPD-PCR (GENETIC DIVERSITY OF TROPICAL ABALONE IN THAILAND USING RAPD-PCR) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. เสดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ศีราวุธ กลิ่นนุหงา, 149 หน้า. ISBN 974-17-0038-5.

ในการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อหอยเป่าฮือ 3 ชนิดที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Haliotis asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยการคัดเลือกไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 และ UBC271 นำมาใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของหอยเป่าฮือในประเทศไทย


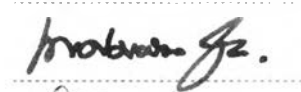

จากการศึกษาหอยเป่าฮือทั้งสามชนิดได้แก่ *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ด้วยไพรเมอร์ UBC101, OPB11 พบว่าสามารถให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนเดิมเมื่อทำซ้ำและให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ จำนวนทั้งสิ้น 72 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 320-2300 คู่เบส และพบเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 100% ในทั้งสองไพรเมอร์ ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างทั้งสามชนิดมีค่าสูง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *H. asinina* โดยเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 และ UBC271 พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 113 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 250-2300 คู่เบส ทุกไพรเมอร์ให้ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในหอยเป่าฮือชนิดนี้

เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอใน *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* พบว่ามีค่าเท่ากับ 84.91%, 94.74% และ 91.23% ตามลำดับ ค่าดัชนีความเหมือนเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมดจาก 5 ไพรเมอร์มีค่า 0.7715, 0.6830, 0.8002, 0.8444 และ 0.8396 ในไพรเมอร์ OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 และ UBC271 ตามลำดับ ค่าดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดมีค่าอยู่ในช่วง 0.7927-0.8496, 0.6010-0.7032 และ 0.5259-0.6102 ในชนิด *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ตามลำดับ ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยระหว่างหอยเป่าฮือ 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 0.2995, 0.4328 และ 0.4295 ในชนิด *H. asinina*, *H. ovina* และ *H. varia* ตามลำดับ ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยของ *H. asinina* ในอ่าวไทยมีค่าเท่ากับ 0.0243 ซึ่งแสดงถึงความคล้ายคลึงกันภายในกลุ่มประชากร *H. asinina* ในอ่าวไทยสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มประชากร *H. asinina* เกาะตะลิงบิงจากฝั่งอันดามันและจากประเทศฟิลิปปินส์

แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยระหว่างกลุ่มประชากรต่าง ๆ พบความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างหอยเป่าฮือทั้งสามชนิด (ข้อมูลจาก 2 ไพรเมอร์) และระหว่างกลุ่มประชากรของหอยเป่าฮือชนิด *H. asinina* (ข้อมูลจาก 5 ไพรเมอร์) ส่วน *H. ovina* พบความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มประชากรจากฝั่งทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

พบเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากไพรเมอร์ UBC101 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิด *H. asinina* (1700 คู่เบส) และจำเพาะต่อกลุ่มประชากรประเทศฟิลิปปินส์ (380 คู่เบส) ไพรเมอร์ UBC195 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิด *H. asinina* (1030 และ 650 คู่เบส) ไพรเมอร์ UBC197 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิด *H. asinina* (1450 และ 750 คู่เบส) นอกจากนี้ไพรเมอร์ UBC271 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิด *H. asinina* (680 คู่เบส) และกลุ่มประชากรจากเกาะลิงบิง (880 คู่เบส) โดยการศึกษาครั้งนี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *H. ovina* และ *H. varia*

ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....	ลายมือชื่อชนิด	
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2544.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

##4172542923 MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: TROPICAL ABALONE / *HALIOTIS ASININA* / *H. OVINA* / *H. VARIA* / RAPD-PCR / GENETIC DIVERSITY / POPULATION STRUCTURE

APORN POPONGVIWAT: GENETIC DIVERSITY OF TROPICAL ABALONE IN THAILAND USING RAPD-PCR. THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR PADERMSAK JARAYABHAND, PH. D., THESIS CO-ADVISOR: SIRAWUT KLINBUNGA, PH. D., 149 pp.
ISBN 974-17-0038-5.

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to identify species-specific genetic markers of three abalone species in Thailand; *Haliotis asinina*, *H. ovina*, *H. varia*. Five decanucleotide primers (UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 and UBC271) were selected for genetic analysis of abalone in Thailand.

Seventy-two reproducible and polymorphic RAPD fragments (320-2300 bp in length) were generated using primers UBC101 and OPB11. One hundred percent of polymorphic bands were found for both primers. High genetic diversity levels between *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* was observed

Genetic diversity of *H. asinina* were examined using 5 primers (UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 and UBC271). One hundred and thirteen reproducible and polymorphic fragments (250-2300 bp in length) were generated. All primers provided high polymorphic levels in this abalone.

The percentages of polymorphic bands of *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* were 84.91, 94.74 and 91.23, respectively. The average similarity index across overall samples resulted from primer UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 and UBC271 were 0.7715, 0.6830, 0.8002, 0.8444 and 0.8396, respectively. The average similarity index within samples of *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia* were 0.7927-0.8496, 0.6010-0.7032 and 0.5259-0.6102, respectively. Average genetic differences within species were 0.2995, 0.4328 and 0.4295 for *H. asinina*, *H. ovina* and *H. varia*, respectively. The average genetic distance of *H. asinina* in the Gulf of Thailand were 0.0243 implying genetically close relationship compared to Talibong Island from the Andaman Sea and the Philippines samples.

A neighbor-joining tree constructed from the average genetic distance between paired geographic samples indicated phylogenetically clear separation between investigated abalone species (using two primers) and geographic samples of *H. asinina* (using five primers). Phylogeography was obviously observed between *H. ovina* originating from the Andaman Sea and the Gulf of Thailand.

The primer UBC101 yielded a species-specific markers in *H. asinina* (1700 bp) and the Philippines sample (380 bp). The primer UBC195 showed species-specific nature in *H. asinina* (1030 and 650 bp). Primer UBC197 provided RAPD markers in *H. asinina* (1450 and 750 bp). Additional species-specific RAPD markers in *H. asinina* (680 bp) and *H. asinina* from Talibong Island (880 bp) were identified by the primer UBC271. No species-specific RAPD markers were observed in *H. ovina* and *H. varia*.

Department Marine Science Student's signature

Field of Study Marine Science Advisor's signature *P. Jarayabhand*

Academic year 2001 Co-advisor's signature *S. Klinbunga*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express sincere gratitude to my thesis advisor, Assoc. Prof. Dr. Padermsak Jarayabhand and my thesis co-advisor, Dr. Sirawut Klinbunga for their guidance and encouragement throughout this study. I would also like to thanks Dr. Supichai Tangjaitrong and Assoc. Prof. Dr. Anchalee Tassanakajon for their valuable recommendations.

I would also like to thank all of my teachers at the Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University and the Marine Biotechnology Research Unit (MBRU), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for providing the facilities, great opportunity and helpful hints.

I would like to thank the Angsila Marine Biological Research Station, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Marine National Park Division, the Royal Forestry Department, Ministry of Agriculture and the Phuket Abalone Farm for providing the abalone samples. I would like to thank Ms. Nontivich Tandavanitj for her help in my all field surveys and friendly suggestions. Lots of thanks to all of my friends at the Marine Biotechnology Research Unit, Department of Marine Science and other for their assistance and shelter.

Finally, I would like to thank my parents and my brothers for their understanding and great supports throughout my study and my life.

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) project RDG4320015 and the TRF/BIOTEC special program for Biodiversity Research and Training grant BRT542057.

CONTENTS

	Page
ENGLISH ABSTRACT	iv
THAI ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Introduction	1
1.2 Biology and Life history of Abalone	5
1.2.1 <i>Classification</i>	5
1.2.2 <i>Morphology and Anatomy</i>	6
1.2.3 <i>Reproduction</i>	7
1.2.4 <i>Food</i>	9
1.2.5 <i>Age and growth</i>	9
1.2.6 <i>Habitats</i>	10
1.2.7 <i>Distributions</i>	11
1.3 DNA Markers	15
1.3.1 <i>Hybridization - based (non-PCR) techniques</i>	15
1.3.1.1 <i>Restriction fragment length</i> <i>polymorphisms (RFLPs)</i>	15
1.3.1.2 <i>DNA fingerprinting with</i> <i>VNTR sequences</i>	16
1.3.1.2.1 <i>Multilocus DNA fingerprints</i>	16
1.3.1.2.2 <i>Single - locus minisatellite</i>	16

CONTENTS (cont.)

	Page
1.3.2 <i>PCR base techniques</i>	17
1.3.2.1 <i>PCR amplification of specific sequence and microsatellite primers</i>	18
1.3.2.2 <i>PCR - RFLP</i>	18
1.3.2.3 <i>DNA sequencing</i>	19
1.3.2.4 <i>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</i>	19
1.4 Genetic study in Abalone	20
1.5 Objectives	24
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	25
2.1 Materials	25
2.1.1 <i>Equipment</i>	25
2.1.2 <i>Chemicals</i>	26
2.1.3 <i>Enzymes</i>	27
2.2 Methods	27
2.2.1 <i>Choices for sample collection sites</i>	27
2.2.2 <i>Sources of specimens</i>	28
2.2.2.1 <i>Natural habitat</i>	28
2.2.2.2 <i>Abalone populations</i>	29
2.2.3 <i>DNA extraction</i>	32
2.2.4 <i>Measurement of DNA concentrations</i>	33
2.2.4.1 <i>Spectrophotometry</i>	33
2.2.4.2 <i>Mini-gel method</i>	33
2.2.5 <i>RAPD analysis</i>	34
2.2.6 <i>Agarose gel electrophoresis</i>	35
2.2.7 <i>Statistical analysis</i>	36

CONTENTS (cont.)

	Page
CHAPTER III RESULTS	39
3.1 DNA extraction	39
3.2 Primer screening	39
3.3 Genetic diversity of tropical abalone using RAPD	46
3.3.1 <i>Between species diversity</i>	46
3.3.2 <i>Genetic diversity of H. asinina</i>	47
3.4 Genetic relationships of tropical abalone	59
3.4.1 <i>Similarity index and Genetic distances</i>	59
3.4.2 <i>Phylogeography</i>	63
3.5 Species-specific genetic markers for tropical abalone found in Thailand	66
 CHAPTER IV DISCUSSION	 67
 CHAPTER V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	 75
 REFERENCES	 76
APPENDICES	83
BIOGRAPHY	149

LIST OF TABLES

		Page
Table 1.1	Commercially important abalone species.....	2
Table 2.1	Sample collection sites, code of populations and number of individuals (and number used in this study) for three species of abalone.....	31
Table 3.1	The amplification success of RAPD primers and their sequences initially screened by this study.....	41
Table 3.2	Sequences of RAPD primers, size-range, number of amplified bands, and the percentage of polymorphic and monomorphic bands resulted from RAPD analysis of three species of abalone; <i>H. asinina</i> , <i>H. ovina</i> and <i>H. varia</i> (A) and <i>H. asinina</i> (B).....	48
Table 3.3	Total number of bands, percentage of polymorphic and monomorphic bands within each abalone species revealed by RAPD analysis.....	49
Table 3.4	Estimated similarity indices (S) within geographic samples of abalone in Thailand using 5 selected RAPD primers.....	60
Table 3.5	The average genetic distance (D_{ij} , below diagonal) and similarity indices (S_{ij} , above diagonal) between and within species of 3 species of tropical abalone.....	61
Table 3.6	The average genetic distance (D_{aij} , below diagonal) and similarity indices (S_{aij} , above diagonal) within species of <i>H. asinina</i>	62
Table 3.7	Species - specific RAPD markers of tropical abalone in Thailand revealed by RAPD analysis.....	66

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1.1	Three species of abalone found in Thailand; <i>H. asinina</i> , <i>H. ovina</i> and <i>H. varia</i> in Thailand.....	4
Figure 1.2	Life cycle of abalone.....	8
Figure 1.3	Three biogeographical models proposing the origin of the <i>Haliotidae</i>	13
Figure 1.4	Worldwide distributions of abalone, <i>H. asinina</i> , <i>H. ovina</i> and <i>H. varia</i>	14
Figure 2.1	Map of Thailand indicating abalone collection sites in the Gulf of Thailand and Andaman Sea.....	30
Figure 3.1	A 0.8% ethidium bromide stained - agarose gel showing the quality of total DNA extracted from the foot tissue of abalone.....	40
Figure 3.2	RAPD patterns resulted from analysis of <i>H. asinina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 1-4), Cambodia (lanes 5-8), Libong Island, Trang (lanes 9-10), and Philippines (lanes 11-12) with the primer UBC101.....	50
Figure 3.3	RAPD patterns resulted from analysis of <i>H. asinina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 1), <i>H. ovina</i> from Khang Kao Island, Chon Buri (lanes 2-3), Samet Island, Rayong (lanes 4-5), Chuak Island, Trang (lanes 6-7), Similan Island, Phang-nga (lane 8), <i>H. varia</i> from Aeo Island, Phuket, (lanes 9-10), Similan Island, Phang-nga (lane 11-12) with the primer UBC101.....	51
Figure 3.4	RAPD patterns resulted from analysis of <i>H. asinina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 1-3), Cambodia (lanes 4-7), Libong Island, Trang (lanes 8-9), and Philippines (lanes 10-11) with the primer OPB11.....	52

LIST OF FIGURES (cont.)

		Page
Figure 3.5	RAPD patterns resulted from analysis of <i>H. asinina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 1), <i>H. ovina</i> from Khang Kao Island, Chon Buri (lanes 2-4), Samet Island, Rayong (lanes 5-6), Similan Island, Phang-nga (lane 7-9), Chuak Island, Trang (lanes 10-12) with the primer OPB11	53
Figure 3.6	RAPD patterns resulted from analysis of <i>H. asinina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 1), <i>H. ovina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 2-3), Similan Island, Phang-nga (lane 4), Chuak Island, Trang (lanes 5-6), <i>H. varia</i> from Aeo Island, Phuket, (lanes 7-10), Similan Island, Phang-nga (lane 11-12) with the primer OPB11	54
Figure 3.7	RAPD patterns resulted from analysis of <i>H. asinina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 1-4), Cambodia (lanes 5-8), and Philippines (lanes 9-12) with the primer UBC195	55
Figure 3.8	RAPD patterns resulted from analysis of <i>H. asinina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 1), Cambodia (lanes 2-7), and Libong Island, Trang (lanes 8-12) with the primer UBC195	56
Figure 3.9	RAPD patterns resulted from analysis of <i>H. asinina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 1-3), Libong Island, Trang (lanes 4-6), Cambodia (lanes 7-10), and Philippines (lanes 11-12) with the primer UBC197	57
Figure 3.10	RAPD patterns resulted from analysis of <i>H. asinina</i> from Samet Island, Rayong (lanes 1-4), Libong Island, Trang (lanes 5-7), Cambodia (lanes 8-11), and Philippines (lanes 12-13) with the primer UBC271	58
Figure 3.11	A neighbor-joining tree illustrating genetic relationships of tropical abalone in Thailand based on genetic distances resulted from RAPD analysis using two primers (UBC101 and OPB11)	64
Figure 3.12	A neighbor-joining tree illustrating genetic relationships of <i>H. asinina</i> based on genetic distances resulted from RAPD analysis using five primers (UBC101, OPB11, UBC195, UBC197 and UBC271)	65

LIST OF ABBREVIATIONS

A, C, G, T	=	nucleotide containing the base adenine, cytosine, guanine and thymine, respectively
bp	=	base pair
°C	=	degree Celsius
cm	=	centimetre
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	ethylene diamine tetracetic acid (disodium salt)
EtBr	=	ethidium bromide
HCl	=	hydrochloric acid
Kb	=	kilobase
KCl	=	potassium chloride
L	=	length
MgCl ₂	=	magnesium chloride
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
M	=	molar
MtDNA	=	mitochondrial DNA
ng	=	nanogram
OD	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
RAPD	=	randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RNase A	=	ribonuclease A
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
Tris	=	tris (hydroxy methyl) aminomethane
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar
UV	=	ultraviolet
W/V	=	weight by volume