ความแปรปรวนทางพันธุกรรมและลักษณะสีเปลือกของหอยหวาน *Babylonia areolata* ในอ่าวไทย

นางสาว ขวัญพิสุทธิ์ สังข์ศิลป์เลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC VARIATIONS AND SHELL COLOR PATTERNS OF SPOTTED BABYLON *Babylonia areolata* IN THE GULF OF THAILAND

Miss Kwanpisut Sungsinleart

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

500459

Thesis Title	GENETIC VARIATIONS AND SHELL COLOR PATTERNS OF SPOTTED BABYLON *Babylonia areolata* IN THE GULF OF THAILAND
By	Miss Kwanpisut Sungsinleart
Field of Study	Marine Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Sanit Piyapattanakorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Nilnaj Chaitanawisuti, 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

(Associate Professor Charoen Nitithamyong, Ph.D.)

Sanit Piyapattanakorn..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Sanit Piyapattanakorn, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Nilnaj Chaitanawisuti, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D.)

ขวัญพิสุทธิ์ สังข์ศิลป์เลิศ : ความแปรปรวนทางพันธุกรรมและลักษณะสีเปลือกของหอยหวาน *Babylonia areolata* ในอ่าวไทย (GENETIC VARIATIONS AND SHELL COLOR PATTERNS OF SPOTTED BABYLON, *Babylonia areolata* IN GULF OF THAILAND) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ดร. นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์, 65 หน้า.

ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมและลักษณะสีเปลือกของหอยหวาน *Babylonia areolata* ในอ่าวไทยที่มีความแตกต่างของลักษณะสีเปลือกอยู่ 5 รูปแบบคือ สีน้ำตาล ส้ม ขาว สนิม และลายแถบน้ำตาลเข้มโดยใช้เทคนิค ISSR-PCR และ DNA sequencing โดยเก็บตัวอย่างจาก 8 จังหวัดคือ จันทบุรี ระยอง ตราด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สงขลา และปัตตานี ในการทดสอบ ISSR primer ทั้งหมด 48 primer ผลการศึกษาพบว่า มี 4 primer คือ UBC841, UBC845, 814 และ T8707 ที่ให้ผลดีและมีความหลากสภาวะรูปแบบ (polymorphism) สูง เมื่อนำมาทดสอบกับหอยหวานทั้ง 5 รูปแบบ จำนวน 48 ตัวอย่าง มีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 21 แถบ (band) ประกอบด้วย polymorphic 14 แถบ และ monomorphic 7 แถบ ค่าความหลากหลายของดีเอ็นเอคิดเป็น 66.67% เมื่อนำข้อมูลมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า ไม่มีการแยกกลุ่มในแต่ละสี เมื่อศึกษา DNA sequencing ที่ใช้หอยหวาน 20 ตัวและใช้หอยหมาก*(Babylonia spirata)* เป็นตัวควบคุม เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนที่ได้ของยีน16S rRNA ซึ่งมีความยาว 435 คู่เบส และยีน COI 460 คู่เบส พบว่ายีน COI มีอัตราการวิวัฒนาการสูงกว่ายีน 16S rRNA และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยีน COI ที่มีผลต่อรูปแบบสีเปลือกทั้ง 5 แบบมีค่าน้อยมาก (0.00-0.64%) เมื่อเปรียบเทียบกับหอยหมากพบว่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจน (12.72-13.56%) นอกจากนี้การทดสอบผสมพ่อแม่พันธุ์หอยหวานที่มีสีเปลือกแตกต่างกัน 3 รูปแบบรวม 9 การทดลองโดยใช้อัตราส่วนเพศผู้ : เพศเมีย 1:1 เพื่อใช้ลักษณะสีเปลือกในรุ่นลูกนำไปสนับสนุนผลการทดลองทางโมเลกุลเทคนิค ผลการศึกษาพบว่าพ่อแม่พันธุ์หอยหวานในทุกการทดลองไม่มีการผสมพันธุ์และวางไข่ตลอดระยะเวลาการทดลอง 11 เดือน ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าหอยหวานที่มีสีเปลือกแตกต่างกันทั้ง 5 รูปแบบอาจเป็นชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าความแตกต่างของลักษณะสีเปลือกหอยหวานนี้เป็นผลมาจากพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อม

ภาควิชา...วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่อนิสิต.....ขวัญพิสุทธิ์ สังข์ศิลป์เลิศ.....

สาขาวิชา...วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772231223 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: GENETIC VARIATION / *Babylonia areolata* / DNA SEQUENCING / ISSR

KWANPISUT SUNGSINLEART: GENETIC VARIATIONS AND SHELL COLOR PATTERNS OF SPOTTED BABYLON, *Babylonia aerolata* IN THE GULF OF THAILAND THESIS ADVISOR: ASIST.PROF. SANIT PIYAPATTANAKORN, Ph.D., COADVISOR: NILNAJ CHAITANAWISUTI, Ph.D., 65 pp.

This study aimed to determine genetic variations of spotted babylon, *Babylonia aerolata*, Link 1807 in the Gulf of Thailand which have five shell color patterns ;1) brown patches on white basal shell 2) orange patches on white basal shell 3) white basal shell without patches 4) rust basal shell without patches 5) continuous dark brown patches on white basal shell. Spotted babylon was collected from Chanthaburi, Rayong, Trad, Phetchaburi, Prachuap Khiri khun, Nakhorn Si Thammarat, Songkhla and Pattani.Two molecular techniques, ISSR and DNA sequencing, were employed to examine the genetic variation of the spotted babylon samples. Forty eight ISSR primers were screened and four reliable and polymorphic primers (UBC 841, UBC845, 814 and T8707) were obtained. By screening forty-eight samples of spotted babylon (Five shell color patterns), twenty-one DNA bands were obtained, which 14 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic loci is 66.67. These data sets were used to produce the dendrogram which showed no separation on each shell color patterns. For DNA sequencing technique, 20 specimens of *B. aerolata* were used and *B. spirata* was used as control. The analysis of partial sequences of mtDNA (16S rRNA 435 bp and COI 460 bp). The result of COI gene showed low genetic variation among the five color patterns variations (0.00-0.64 %) compared with the variation of those with *B. spirata* (12.72-13.56%). Beside from preliminary cross breeding of three color patterns broodstocks in 9 experiments to support the result of the molecular technique, there was no spawning of eggs occurred throughout 11 months. Therefore, it is possible to conclude that the snail different in shell color patterns are the same species, but the cause of shell color variation is still unclear whether it is the effect of environment or genetics.

Department...Marine Science.....Student's signature.....

Field of study...Marine Science.....Advisor's signature.....

Academic year...2007.....Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful to my advisor Assisistant Professor Sanit Piyapattanakorn, Ph.D. for suggestions and improvements recommended to the manuscript and valuable advice of molecular techniques, and my co-advisor Nilnaj Chaitanawisuti, Ph.D. for field assistance and collection of samples, for offering information of spotted babylon cultivation and for all kind assisistance such as place, travel, materials, continual advice etc. I would like to thank Assisistant Professor Sirusa Kritsanapuntu for her support and encouragement during my study and Associate Professor Somkiat Piyatiratitivarakul, Ph.D. who provided a financial support from Center of Excellence For Marine Biotechnology, in the fiscal year 2006.

For consistent interest in my research I am fully indebted to Mr. Teeraraks Srinuanklai, Mr. Anuson Pansuke and Mr. Parawee Pomchote for help in the laboratory, analytical data's and sometime being counselors. I am also thank to Ms. Wananee Santaweesuke , Mr. Sarawute Sangswangchote, Ms. Boobpha Srisamrid , my Marine Science Department friends of Chulalongkorn University and the 4 younger employees of Research unit, Chulalongkorn University which is Hoy Wan farm for their advice, support and encouragement. Finally, I express my gratitude to my parents who support me in every thing and every time if they could afford, with deep concern and pure love.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
LIST OF ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	3
2.1 Biology of spotted babylon	3
2.2 Shell color polymorphism	6
2.3 Method of determining genetic variation	7
2.4 The previous studied of *Babylonia* sp	11
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	13
3.1 Sampling site and collection	13
3.2 DNA Extraction	13
3.3 ISSR-PCR	14
3.4 mtDNA PCR and DNA Sequencing	15
3.5 Preliminary cross breeding of spotted babylon	17
CHAPTER IV RESULTS	24
4.1 Distribution and shell color variation of *B*abylonia *areolata*	24

4.2 DNA extraction..... 26

4.3 ISSR–PCR..... 27

4.4 DNA sequencing..... 30

4.5 Genetic variation of 16srRNA and COI sequence..... 31

4.6 Cross breeding..... 35

CHAPTER V DISCUSSIONS AND CONCLUSIONS..... 36

REFERENCES..... 42

APPENDICES..... 51

Appendix A..... 52

Appendix B..... 54

Appendix C..... 55

Appendix D..... 57

Appendix E..... 61

BIOGRAPHY..... 65

LIST OF TABLES

Table		Page
3.1	Primers used to amplify fragments of mitochondrial.....	16
4.1	Sampling sites and number of samples.....	24
4.2	Number and location of samples collections.....	25
4.3	Primers sequences used in the ISSR amplification, concentration of $MgCl_2$, annealing temperature (Tm), number of bands, number of polymorphic bands and size range of fragments.....	28
4.4	Selection of specimens used in DNA sequencing.....	31
4.5	Percentages of nitrogenous base composition of sequences of *B. areolata*.....	32
4.6	Percentage differences of 16S rRNA sequences among five shell color patterns of snails.....	33
4.7	Percentage differences of cytochrome oxidase I sequences among five shell color patterns of snails.....	34

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	*Babylonia areolata* (right) snail varieties of color patterns found in the Gulf of Thailand.....	4
2.2	Life cycle of *Babylonia areolata*	5
3.1	Sampling sites for samples collections. (1= Trad 2= Rayong 3= Chonburi 4= Samut Songkhram 5= Phetchaburi 6= Prachuap Khiri Khan 7= Surat Thani 8= Nakhorn Si Thammarat 9= Songkhla 10= Satun 11= Krabi 12= Ranong).....	13
3.2	Sex identification of Babylonia by observing a penis (indicated by an arrow).	18
3.3	Male and female breeders at the same size of shell length.	18
3.4	Cross breeding in 9 trials of male and female broodstocks with different color patterns in shell morphology.....	19
3.5	Spawning tanks with bottom area of 1.42 m^2 equipped with running ambient seawater system (a, b) and 5-cm layer of coarse sand used as substratum (c).....	20
3.6	Showing tanks with bottom areas of 0.25 m^2 equipped with running seawater system.....	21
3.7	Eggs capsules were collected and rinsed with filtered 1 µm seawater (a) and then placed in hatching tanks of 1 cm mesh size (b).....	22
4.1	Various shell color patterns of *Babylonia areolata*. (a) brown (b) orange (c) white (d) rust and (e) dark brown stripe.....	25

4.2	Distribution map indicating approximate sampling locations of *Babylonia* within the Gulf of Thailand.....	26
4.3	Extracted genomic DNA on 0.8% agarose gel stained with EtBr, Lane M: λ Hind III as DNA marker, lane1-10: samples from Songkhla.	27
4.4	ISSR profiles of 19 samples using primer (a) UBC841 (b) UBC845 (c) 814 and (d) T8707.....	29
4.5	The dendrogram of ISSR profile showing relationships within the *Babylonia* each color based on Penny Branch.....	30
4.6	The PCR products of 16s rRNA (lane 1-5) and COI genes (lane 6-9) were assessed by 1.0% agarose gel and compared to 100 bp DNA ladder.....	31

LIST OF ABBREVIATIONS

A, T, G, C	cleotides containing the bases adenine, thymine, guanine, and cytosine, respectively
bp	base pair
°C	degree Celsius
$CaCo_3$	calcium carbonate
cm^2	square-centrinetre
COI	cytochrome oxidase subunit I
CTAB	hexadecyl trimethylamonium bromide
dATP	deoxyadenosine triphoshate
dCTP	deoxycytosine triphoshate
dGTP	deoxyguanosine triphoshate
dTTP	deoxycythymidine triphoshate
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene diamine tetra-acetic acid
EtBr	ethidium bromide
$MgCl_2$	magnesium chloride
ml	millititre
mM	millimolar

mg	milligram
NaCl	sodium chloride
ng	nanogram
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomolar
ppm	part per million
ppt	part per thousand
rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
TE	tris-HCl-and EDTA buffer
TBE	tris-HCl / EDTA sodium chloride buffer
Taq	thermus aquticus DNA (polymerase)
UV	ultraviolet
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
µg	microgram
µl	microlitre
µM	micromolar