การจำแนกประเภทหอยนางรมสกุล CRASSOSTREA สกุล SACCOSTREA และสกุล STRIOSTREA ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

ว่าที่ ร.ต. ปิติ อ่ำพายัพ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-682-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19236979 15 พ.ค. 2545

CLASSIFICATION OF OYSTERS GENERA CRASSOSTREA, SACCOSTREA AND STRIOSTREA IN THAILAND UTILIZING RAPD MARKERS

Action 2LT. Piti Amparyup

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 1999
ISBN 974-334-682-1

Thesis Title	CLASSIFICATION OF OYSTERS GENERA CRASSOSTREA, SACCOSTREA AND STRIOSTREA IN THAILAND UTILIZING RAPD MARKERS
By	Action 2LT. Piti Amparyup
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Sirawut Klinbunga, Ph.D.

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

..... Dean of Faculty of Science

(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Siripom Sittipraneed, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Padermsak Jarayabhand, Ph.D.)

ปิติ อ่ำพายัพ : การจำแนกประเภทหอยนางรมสกุล CRASSOSTREA สกุล SACCOSTREA และสกุล STRIOSTREA ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี (CLASSIFICATION OF OYSTERS GENERA CRASSOSTREA, SACCOSTREA AND STRIOSTREA IN THAILAND UTILIZING RAPD MARKERS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อัญชลี ทัศนาขจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา 148 หน้า. ISBN 974-334-682-1.

ในการวิเคราะห์ความหลากหลาย และการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม ที่จำเพาะกับหอยนางรมในประเทศไทย 5 ชนิด คือ *Crassostrea belcheri* (Sowerby, 1871) *C. iredalei* (Faustino, 1932) *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) *S. forskali* (Gmelin, 1791) และ *Striostrea* (*Parastriostrea*) *mytiloides* (Lamarck, 1819) ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยการคัดเลือกไพรเมอร์ซึ่งมีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 103 ไพรเมอร์ พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ คือ OPA09 OPB01 OPB08 UBC210 และ UBC220 ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของหอยนางรมในประเทศไทย จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ 5 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนเดิมเมื่อทำซ้ำ และให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ จำนวนทั้งหมด 254 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 200 - 2500 คู่เบส โดยแต่ละไพรเมอร์สามารถให้รูปแบบของจีโนไทป์ทั้งหมดเป็น 193 192 174 192 และ 181 จีโนไทป์ ตามลำดับ เมื่อคำนวณเปอร์เซนต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอใน *C. belcheri* *C. iredalei* *S. cucullata* *S. forskali* และ *S. mytiloides* พบว่า มีเปอร์เซนต์ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ เท่ากับ 52.23% 74.67% 97.69% 99.40% และ 98.50% ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม พบว่าค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์มีค่าสูงกว่าภายในสปีชีส์เดียวกัน และจากการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ โดยใช้วิธี neighbor-joining พบว่าสามารถแยกหอยนางรมในสกุล *Crassostrea* และ *Saccostrea* ออกจากกัน และพบว่าภายในหอยนางรมสกุลเดียวกันจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน

จากการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม ที่จำเพาะกับหอยนางรม 5 ชนิดในประเทศไทย พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *C. belcheri* จำนวน 10 แถบ ต่อ *C. iredalei* จำนวน 5 แถบ และต่อ *S. cucullata* จำนวน 2 แถบ และได้คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ *C. belcheri* จำนวน 3 แถบ เพื่อนำมาโคลน และหาลำดับเบส (pPACB1, pPACB2 และ pPACB3) จากนั้นได้ทำการออกแบบแต่ละคู่ของไพรเมอร์ จำนวน 3 คู่ ที่ได้จากแต่ละโคลน เพื่อที่จะนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้ มีขนาด 536 คู่เบส 600 คู่เบส และ 506 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบความไวจากแต่ละคู่ของไพรเมอร์ พบว่าสามารถตรวจดีเอ็นเอของ *C. belcheri* ที่มีความเข้มข้นได้น้อยถึง 30 พิโคกรัม จากนั้นได้คัดเลือกไพรเมอร์ pPACB-1F/R มาใช้ตรวจสอบความจำเพาะกับ *C. belcheri* กับตัวอย่างทั้งหมด จำนวน 203 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยหอยนางรมในประเทศไทยทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ หอยนางรม *S. commercialis* จากประเทศออสเตรเลีย และหอยแมลงภู่ *Perna viridis* จากผลการทดลอง พบว่าคู่ของไพรเมอร์ pPACB-1F/R สามารถให้เครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะต่อ *C. belcheri* ในประเทศไทย

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต .....ปิติ อ่ำพายัพ.....
สาขาวิชา .....ชีวเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....อัญชลี ทัศนาขจร.....
ปีการศึกษา.....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....ศิราวุธ กลิ่นบุหงา.....

##407231823 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : OYSTERS / RAPD / GENETIC DIVERSITY / SPECIES-SPECIFIC MARKERS / CRASSOSTREA / SACCOSTREA / STRIOSTREA

PITI AMPARYUP : CLASSIFICATION OF OYSTERS GENERA CRASSOSTREA, SACCOSTREA AND STRIOSTREA IN THAILAND UTILIZING RAPD MARKERS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph. D., THESIS CO-ADVISOR : SIRAWUT KLINBUNGA, Ph.D. 148 pp. ISBN 974-334-682-1.

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to determine levels of genetic diversity and to identify species-specific markers of five oyster species in Thailand; *Crassostrea belcheri* (Sowerby, 1871), *C. iredalei* (Faustino, 1932), *Saccostrea cucullata* (Born, 1778), *S. forskali* (Gmelin, 1791) and *Striostrea* (*Parastriostrea*) *mytiloides* (Lamarck, 1819). Five of 103 screened decanucleotide primers (OPA09, OPB01, OPB08, UBC210 and UBC220), were selected for the genetic analysis of oysters in Thailand. Two hundred and fifty-four reproducible and polymorphic fragments (200 - 2500 bp in length) were generated across investigated species. A total of 193, 192, 174, 192 and 181 genotypes was observed from each respective primer. The percentages of polymorphic bands were 52.23%, 74.67%, 97.69%, 99.40% and 98.50% for *C. belcheri*, *C. iredalei*, *S. cucullata*, *S. forskali* and *S. mytiloides*, respectively. Genetic differences between samples from different species were higher than those within the same species. A neighbor-joining tree indicated distant relationships between *Crassostrea* and *Saccostrea* oysters but closer relationships were observed within each genus.

Ten, five and two species-specific markers were found in *C. belcheri*, *C. iredalei*, and *S. cucullata*, respectively. Three *C. belcheri*-specific RAPD fragments were cloned and sequenced. A pair of primer set was designed from each recombinant clones (pPACB1, pPACB2 and pPACB3). The PCR products showed expected product sizes of 536 bp, 600 bp and 506 bp, respectively. The sensitivity of detection using pPACB-1F/R, pPACB-2F/R and pPACB-3F/R primers reached approximately 30 pg of *C. belcheri* total DNA template. Specificity of pPACB1F/R primers was examined against 203 individuals of indigenous oyster species in Thailand, an ingroup (*S. commercialis*) and an outgroup (*Perna viridis*) references. Results indicated species-specific nature of pPACB1F/R primers to *C. belcheri* in Thailand.

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....ปิติ อำพาภูพ.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2542.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest sense of gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Anchalee Tassanakajon and my co-advisor, Dr. Sirawut Klinbunga for their guidances, encouragement, valuable suggestion and supports throughout my study.

I am also very thankful to Assoc. Prof. Dr. Padermsak Jarayabhand for recommendations and kindness. My sincere thanks go to Assist. Prof. Wantana Yoosukh, Department of Marine Science, Faculty of Fisheries, Kasetsart University for her help in supporting the samples. I would also like to thank Mr. Somchai Bussarawit, Mr. Piyapong Chotipuntu, Mr. Teerapong Duangdee and several others who cannot be named here for helping us to collect specimens used in this study.

Many thanks are also expressed to all of my friends in my laboratory R707, R708 and R709 for their friendly assistance as well.

I thank the Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for providing some facilities. I wish to acknowledge to Thailand Research Fund (TRF) for my financial support.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents and my sisters for their love, care, understanding and encouragement extended throughout my study.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT....IV
ENGLISH ABSTRACT....V
ACKNOWLEDGEMENT....VI
CONTENTS....VII
LIST OF TABLES....IX
LIST OF FIGURES....X
LIST OF ABBREVIATIONS....XIII

CHAPTER I INTRODUCTION....1
1.1 Taxonomy of oysters....5
1.2 Shell morphology....5
1.3 Biology of oysters....9
1.4 Life cycle of oysters....13
1.5 Distributions of oysters....15
1.6 Molecular genetic markers....15
1.7 Genetic studies in oysters....21

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS
2.1 Materials....25
2.2 Sampling....27
2.3 DNA extraction....30
2.4 Measuring DNA concentration using spectrophotometry and electrophoresis....30
2.5 RAPD analysis....31
2.6 Agarose gel electrophoresis....32
2.7 Statistical analysis....32
2.8 Preparation of RAPD products for cloning....33
2.9 Ligation of PCR products to plasmids....35
2.10 Tranformation of ligation products to *E. coli* host cells by electroporation....35
2.11 Electrotranformation....36
2.12 Isolation of recombinant plasmid DNA....36
2.13 Detection recombinant plasmids....37
2.14 DNA sequencing....38
2.15 Primer desingn, sensitivity and species-specific tests....38

CHAPTER III RESULTS
3.1 DNA extraction....39
3.2 Primer screening....39
3.3 Determination of genetic variation of Thai oysters using RAPD analysis....43
3.4 Genetic relationships of Thai oysters....60
3.5 Species-diagnostic markers of Thai oysters....63
3.6 Cloning of *C. belcheri*-specific RAPD fragments....63
3.7 DNA sequence analysis and primer desingn....64
3.8 Sensitivity and species-specific tests....72

Page

CHAPTER IV DISCUSSION.....75
CHAPTER V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....88
REFERENCES.....89
APPENDICES
Appendix A.....98
Appendix B.....104
Appendix C.....119
Appendix D.....129
Appendix E.....140
Appendix F.....146
BIOGRAPHY.....148

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Tables **Page**

Table 1.1 Production and value of oysters in Thailand between 1986-1996.....2

Table 1.2. Cultured area, production and values of oysters from aquaculture section in 1996.....3

Table 2.1 Sample collection sites and sample sizes of oyster specimens used in this study..... 28

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, sizes and number of amplified bands, and the percentage of polymorphic bands resulted from RAPD analysis of oysters in Thailand.....44

Table 3.3 Total number of bands, percentage of polymorphic and monomorphic bands within each oyster species and the green mussel (*P. viridis*) revealed by RAPD analysis using primers OPA09, OPB01, OPB08, UBC210 and UBC220.....45

Table 3.4 Estimated similarity indices (S) within geographic samples of Thai oysters, *S. commercialis* and *P. viridis* using 5 selected RAPD primers.....61

Table 3.5 The average genetic distances (below diagonal) and similarity index (S_{ij}, above diagonal) between and within species of Thai oysters, the Australian, *S. commercialis* and the mussel, *P. viridis*....65

Table 3.6 Species-specific RAPD markers of commercial oysters in Thailand revealed by RAPD analysis.....68

Table 3.7 Sequences of oligonucleotide primers designed from each recombinant clone carrying a species-specific fragment of *C. belcheri*.....71

LIST OF FIGURES

Figures		Page
Figure 1.1	General shell morphology of oysters	6
Figure 1.2	External shell morphology of *Crassostrea* oysters	10
Figure 1.3	External shell morphology of *Saccostrea* oysters	11
Figure 1.4	Dimension terms applied to oysters	12
Figure 1.5	Anatomy of oysters	14
Figure 1.6	Life cycle of oysters	14
Figure 2.1	Map of Thailand indicating sample collection sites of oysters (*C. belcheri*, *C. iredalei*, *S. cucullata*, *S. mytiloides*, *S. forskalii*, *Crassostrea sp.*, *Saccostrea sp.* group 1, *Saccostrea sp.* group 2 and *Saccostrea sp.* group 3) used in this study	29
Figure 3.1	A 0.8 % ethidium bromide stained - agarose gel showing the quality of total DNA extracted from the adductor muscle of oysters	40
Figure 3.2	RAPD patterns resulted from analysis of *C. belcheri* originating from Suratthani (Lanes 1-10, A), Songkhla (Lanes 1-4, B), Ranong (Lanes 5-7, B), and Krabi (Lanes 8-10, B) with the primer OPA09	47
Figure 3.3	RAPD patterns resulted from analysis of *C. iredalei* (and *C. iredalei* – like) originating from Chonburi (Lanes 1-6, A), Prachuapkririkhan (Lanes 7-9 and 11, A), Songkhla (Lanes 1-6, B), Ranong (Lane 7, B), and Phangnga (Lanes 9-12, B) with the primer OPA09	48
Figure 3.4	RAPD patterns resulted from analysis of *C. belcheri* originating From Suratthani (Lanes 1-10, A), Songkhla (Lanes 1-4, B), Ranong (Lanes 5-7, B), and Krabi (Lanes 8-10, B) with the primer OPB01	49
Figure 3.5	RAPD patterns resulted from analysis of *C. iredalei* (and *C. iredalei* – like) originating from Chonburi (Lanes 1-6, A), Prachuapkririkhan (Lanes 7-9 and 11, A), Songkhla (Lanes 1-6, B), Ranong (Lane 7, B), and Phangnga (Lanes 9-12, B) with the primer OPB01	50

Figures Page

Figure 3.6 RAPD patterns resulted from analysis of *C. belcheri* originating from Suratthani (Lanes 1-10, A), Songkhla (Lanes 1-4, B), Ranong (Lanes 5-7, B), and Krabi (Lanes 8-10, B) with the primer OPB08.....51

Figure 3.7 RAPD patterns resulted from analysis of *C. iredalei* (and *C. iredalei* – like) originating from Chonburi (Lanes 1-6, A), Prachuapkririkhan (Lanes 7-9 and 11, A), Songkhla (Lanes 1-6, B), Ranong (Lane 7, B), and Phangnga (Lanes 9-12, B) with the primer OPB08.....52

Figure 3.8 RAPD patterns resulted from analysis of *S. cucullata* originating from Trad (Lanes 1-5, A), Ranong (Lanes 6-12, A), Phuket (Lanes 1-6, B), and Chantraburi(Lanes 7-8 and 10-12, B) with the primer OPB08.....53

Figure 3.9 RAPD patterns resulted from analysis of *C. iredalei* (and *C. iredalei* – like) originating from Chonburi (Lanes 1-6, A), Prachuapkririkhan (Lanes 7-9 and 11, A), Songkhla (Lanes 1-6, B), Ranong (Lane 7, B), and Phangnga (Lanes 9-12, B) with the primer UBC210.....54

Figure 3.10 RAPD patterns resulted from analysis of *S. forskalii* (A) originating from Satun (Lanes1-6) and Ranong (Lanes 7-12) and *S. mytiloides* (B) originating from Ranong (Lanes 1-6) and Samut Sakhon (Lanes 7-12) with the primer UBC210.....55

Figure 3.11 RAPD patterns resulted from analysis of *C. belcheri* originating from Suratthani (Lanes 1-10, A), Songkhla (Lanes 1-4, B), Ranong (Lanes 5-7, B), and Krabi (Lanes 8-10, B) with the primer UBC220.....56

Figure 3.12 RAPD patterns resulted from analysis of *S. cucullata* originating from Trad (Lanes 1-5, A), Ranong (Lanes 6-12, A), Phuket (Lanes 1-6, B), and Chantraburi(Lanes 7-8 and 10-12, B) with the primer UBC220.....57

Figures **Page**

Figure 3.13 A neighbor-joining tree illustrating genetic relationships of oyster species locally found in Thailand based on genetic distances resulted from RAPD analysis using five primers (OPA09, OPB01, OPB08, UBC210 and UBC220).....67

Figure 3.14 Reamplification of the 835 bp and 600 bp fragments specifically found in *C. belcheri*.....68

Figure 3.15 Characterization of inserted fragment of three recombinant clones (pPACB1, pPACB2 and pPACB3) on 1.0% agarose gel.....69

Figure 3.16 Nucleotide sequences of pPACB1 (A), pPACB2 (B) and pPACB3 (C).....71

Figure 3.17 Sensitivity of pPACB1 (A), pPACB2 (B) and pPACB (C) primer sets was examined.....73

Figure 3.18 Agarose gel electrophoresis illustrating species-specific nature of a 536 bp PCR product of pPACB1 primers.....74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ATP	=	adenosine triphosphate
bp	=	base pair
°C	=	degree celcius
cm	=	centimetre
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
HCl	=	hydrochloric acid
IPTG	=	isopropyl-thiogalactoside
Kb	=	kilobase
KCl	=	potassium chloride
L	=	length
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
M	=	molar
mtDNA	=	mitochondrial DNA
ng	=	nanogram
OD	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
pg	=	picogram
RAPD	=	randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RNase A	=	ribonuclease A
rpm	=	revolution per minute
scnDNA	=	single copy nuclear DNA
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
Tris	=	tris (hydroxy methyl) aminomethane
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar
U	=	unit
UV	=	ultraviolet
W/V	=	weight / volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย