

SEXUAL DIMORPHISM, GONAD STRUCTURE AND
GENETIC DIFFERENCES OF PINK SKUNK
CLOWNFISH (*Amphiprion perideraion*)

SARMIZA BINTI SAPERI

MASTER OF SCIENCE
UNIVERSITI MALAYSIA TERENGGANU
MALAYSIA

2010

**SEXUAL DIMORPHISM, GONAD STRUCTURE AND
GENETIC DIFFERENCES OF PINK SKUNK
CLOWNFISH (*Amphiprion perideraion*)**

SARMIZA BINTI SAPERI

January 2010

Supervisor: Associate Professor Abdul Halim Abdul Wahid, PhD

Member: Associate Prof. Dr. M. Yusoff, PhD

SARMIZA BINTI SAPERI

**Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirement for the
Degree of Master of Science in the Institute of Tropical Aquaculture
Universiti Malaysia Terengganu**

January 2010

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science

SEXUAL DIMORPHISM, GONAD STRUCTURE AND GENETIC DIFFERENCES OF PINK SKUNK CLOWNFISH
(Amphiprion perideraion)

SARMIZA BINTI SAPERI

January 2010

Chairperson : Associate Professor Abol Munafi Ambok Bolong, Ph.D.

Member : Shahreza Md. Sheriff, Ph.D.

Institute : Institute of Tropical Aquaculture

Pink Skunk Clownfish, *Amphiprion perideraion*, is known as protandric hermaphrodite where it can change its sex from male to female. In order to breed clownfishes in captivity, they need to be paired which means the ability to identify the fish sex is crucial. This becomes the bottleneck for the production of *A. perideraion* in captivity since breeders have failed to differentiate the sex of the wild fish collected. The only sexing method usually used is by looking at its body size where the females are usually larger than the males. However this method is inaccurate. In order to identify the sex of any organism including fish, the information on its sexual dimorphism is crucial. Therefore, the aim of this study was to overcome the sex identification problems in *A. perideraion* through gathering informations on its gonad structure, morphometric characteristics and the identification of genetic

differences. The objectives are as follows: (1) To differentiate between the male and female of *A. perideraion* on the morphometric characteristics (2) To clarify sexual dimorphism on the gonad structure of *A. perideraion* and (3) To determine the genetic variation in *A. perideraion* population using RAPD.

Two procedures were used to analyze the morphometric characteristics of *A. perideraion*. Sixteen morphometric parameters (Park *et al.*, 2001) were measured for each individual fish and followed by 18 Truss network variables measurement. From the statistical analyses, the male and female of *A. perideraion* were significantly different ($P < 0.05$) at BD (body depth), DALPD (direct distance between the anterior edge of the upper lip and the posterior of the last dorsal fin), d (above eye to origin of dorsal fin), e (above eye to origin of pelvic fin), m (end of dorsal fin to end of anal fin), o (end of dorsal fin to end of caudal fin) and r (upper insertion of caudal fin to end of caudal fin). The results of both techniques showed that the functional female has greater size at the head and caudal peduncle area.

Standard histological procedures were conducted to observe the gonad structure and morphology of *A. perideraion*. Based on the observation, the non-breeders fish (TL: 2.5-6.9cm; 0.21-4.9g) and the functional male fish (TL: 5.8-8.2cm; 5.27-13.6g) possess ovotestes which look almost similar morphologically but obviously differ on their size and histological structure. Both ovotestes consist of testicular and ovarian tissue. However, the ovotestes of non-breeders were

smaller in size compared to the males' ovotestes. In non-breeders, ovarian tissue were dominating the ovotestes while in males, the ovotestes were dominated by the developing testicular tissue. In contrast with the functional female of *A. perideraion* (TL: 6.5-8.8cm; 5.27-13.6g) the ovary mostly consists of vitellogenic oocytes and no evidence of testicular tissue was found. The morphology and structure of the ovary observed in functional female were obviously different with both non-breeders and males' ovotestes of *A. perideraion*.

Finally, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was also used to analyze the genetic population of *A. perideraion*. Three primers (OPA 10, OPA 12 and OPA 20) were chosen for analyses. The amplification produced 42 fragments. Based on the results, proportions of polymorphic band were 19.10%, 26.32% and 29.73% for female, male and non-breeders respectively. The UPGMA dendrogram constructed three distinct groups where the male and non-breeders were in the same groups and separated from the female group. Female cluster shows 96.6% of similarity coefficient while cluster of male shows 95.4% and non-breeders represent 94.8% of similarity coefficient. Two sex specific fragments were identified generated by OPA 10 and OPA 20 where both of the fragments present in female samples. The fragments were found at 1646 bp in OPA 10 and 3265 bp in OPA 20.

In conclusions, *A. perideraion* the sexes can be distinguished between sexes based on their gonad structure and morphology, morphometric characteristic and their genetic profiles. However, the best method to differentiate the sexes of this species is by the genetic profiles because it is much more accurate and reliable since the analysis not requiring the sacrificing of the samples for the future studies.

January 2010

Pengantar : Profesor Madya Abel Mawati Ambek Belong, Ph.D
Abit : Nisrina M. Shari, Ph.D
Laman : Profesor Abubakhar Lempak

Prof. Samsul Alamiah, *Amphipoda perideraion*, adalah sangat berprestasi
perantara di mana ia boleh bertukar antara jantina kepada jantina.
Untuk membolehkan perubahan di dalam jantina, ia perlu dipaparkan di mana
kemungkinan untuk mengesan jantina dan ini adalah kritikal. Ini mungkin kerana
masalah kepada pengaliran di perantara di dalam jantina dimana
perubahan pada saat yang sama memberikan jantina pada ikan yang sama. Namun
satu masalah perantara jantina yang tidak dipaparkan adalah dengan melihat
pada saat yang sama dimana perubahan hanya lebih besar daripada jantina. Walau
lagipula, masalah ini adalah kurang tepat untuk pengaliran dimana pada
maka maka perubahan perantara ikan, masalah berkaitan dengan demografi
adalah sangat penting. Oleh itu, kajian kajian ini adalah untuk mengesan
masalah pengaliran jantina pada di perantara melalui pengaliran

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu
sebagai memenuhi keperluan untuk ijazah Sarjana Sains

**DIMORFISME SEKSUAL, STRUKTUR GONAD DAN PERBEZAAN
GENETIK PADA PINK SKUNK CLOWNFISH
(*Amphiprion perideraion*)**

SARMIZA BINTI SAPERI

Januari 2010

Pengerusi : Professor Madya Abol Munafi Ambok Bolong, Ph.D
Ahli : Shahreza Md. Sheriff, Ph.D
Institut : Institut Akuakultur Tropika

Pink Skunk Clownfish, *Amphiprion perideraion*, dikenali sebagai hermafrodit protandrik di mana ia boleh bertukar jantina daripada jantan kepada betina. Untuk membiakkan clownfish di dalam kurungan, ia perlu dipasangkan di mana keupayaan untuk mengecam jantina ikan ini adalah kritikal. Ini menjadi punca masalah kepada pengeluaran *A. perideraion* di dalam kurungan dimana pembiak baka telah gagal membezakan jantina pada ikan tangkapan liar. Hanya satu kaedah pembezaan jantina yang biasa digunakan adalah dengan melihat pada saiz badan dimana biasanya betina lebih besar daripada jantan. Walau bagaimanapun, kaedah ini adalah kurang tepat. Untuk mengecam jantina pada mana-mana organisma termasuk ikan, maklumat berkenaan dengan dimorfisme seksual adalah penting. Oleh itu, tujuan kajian ini adalah untuk mengatasi masalah pengecaman jantina pada *A. perideraion* melalui pengumpulan

informasi pada struktur gonad, ciri morfometrik dan pengecaman pada perbezaan genetik. Objektif adalah seperti berikut: (1) Untuk membezakan jantan dan betina *A. perideraion* pada ciri morfometrik (2) Untuk memperjelas dimorfisme seksual pada struktur gonad *A. perideraion*, dan (3) Untuk menentukan variasi genetic dalam populasi *A. perideraion* menggunakan RAPD.

Dua prosedur telah digunakan untuk menganalisis ciri morfometrik pada *A. perideraion*. Enam belas parameter morfometrik (Park *et. al.*, 2001) telah diukur pada setiap ikan dan diikuti dengan 18 ukuran pembolehubah Truss network. Dari analisis statistik, jantan dan betina *A. perideraion* mempunyai perbezaan yang signifikan ($P < 0.05$) pada BD (ketebalan badan), DALPD (jarak terus antara pinggir anterior pada bibir atas dan posterior pada sirip dorsal terakhir), d (atas mata ke punca sirip dorsal), e (atas mata ke punca sirip pelvik), m (hujung sirip dorsal ke hujung sirip anal), o (hujung sirip dorsal ke hujung sirip kaudal) dan r (penyisipan bahagian atas sirip kaudal ke hujung sirip kaudal). Keputusan daripada kedua-dua prosedur menunjukkan betina mempunyai saiz yang lebih besar pada bahagian kepala dan pedunkel kaudal.

Prosedur piawai histologi dikendalikan untuk memerhati struktur dan morfologi gonad pada *A. perideraion*. Berdasarkan pemerhatian, ikan bukan pembiak (TL: 2.5-6.9cm; 0.21-4.9g) dan ikan jantan (TL: 5.8-8.2cm; 5.27-13.6g) mempunyai ovotestis yang kelihatan hampir sama secara morfologi tetapi sangat jelas

berbeza pada saiz dan struktur histology. Kedua-dua ovotestis mengandungi tisu jantan dan tisu betina. Walau bagaimanapun, ovotestis pada ikan bukan pembiak lebih kecil saiznya berbanding dengan ovotestis jantan. Dalam ikan bukan pembiak, tisu betina mendominasi ovotestis manakala dalam ikan jantan, ovotestis didominasi oleh tisu jantan yang berkembang. Berbeza dengan ikan betina, *A. perideraion* (TL: 6.5-5.8cm; 5.27-13.6g) mempunyai ovari sebagai organ pembiakan dan mengandungi sebahagian besarnya adalah oosit vitelogenik dan tiada sebarang tisu jantan dijumpai. Morfologi dan struktur ovari yang diperhati di dalam betina sangat jelas berbeza dari kedua-dua ovotestis bukan pembiak dan jantan.

Akhir sekali, teknik Polimorfisme DNA Rawak Teramplifikasi (RAPD) telah digunakan untuk menganalisis populasi genetik pada *A. perideraion*. Tiga pencetus (OPA10, OPA12 dan OPA20) telah dipilih untuk dianalisa. Amplifikasi telah menghasilkan 42 fragmen. Berdasarkan keputusan, jumlah band polimorfik masing-masing adalah 19.10%, 26.32% dan 29.73% untuk betina, jantan dan bukan pembiak. Dendrogram menghasilkan tiga kumpulan yang berbeza di mana jantan dan bukan pembiak berada di dalam kumpulan yang sama dan terpisah daripada kumpulan betina. Kumpulan betina menunjukkan 96.6% pekali persamaan manakala kumpulan jantan 95.4% dan bukan pembiak mewakili 94.8% pekali persamaan. Dua fragmen seks spesifik telah dikenalpasti dihasilkan oleh OPA 10 dan OPA 20 di mana kedua-dua

fragmen hadir dalam sampel betina. Fragmen tersebut ditemui pada 1646 bp dalam OPA 10 dan 3265 bp dalam OPA 20.

Sebagai kesimpulan, *A. perideraion* boleh dibezakan antara jantina berdasarkan kepada struktur dan morfologi gonad, ciri morfometrik dan profil genetik. Walau bagaimanapun, kaedah yang paling baik untuk membezakan jantina pada spesies ini adalah dengan profil genetik kerana ia lebih tepat dan lebih konsisten di mana analisis tidak perlu mengorbankan sample pada masa akan datang.