

SEXUAL DIMORPHISM OF FALSE CLOWNFISH
(*Amphiprion ocellaris*) BASED ON MORPHOLOGY,
HISTOLOGY AND RAPD MARKER

LOKMAN NOR HAKIM BIN NORAZMI

MASTER OF SCIENCE
UNIVERSITI MALAYSIA TERENGGANU
MALAYSIA

2010

**SEXUAL DIMORPHISM OF FALSE CLOWNFISH
(*Amphiprion ocellaris*) BASED ON MORPHOLOGY,
HISTOLOGY AND RAPD MARKER**

LOKMAN NOR HAKIM BIN NORAZMI

**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 OF FALSE CLOWNFISH (*Amphiprion ocellaris*) BASED ON MORPHOLOGY, HISTOLOGY AND RAPD MARKER

LOKMAN NOR HAKIM BIN NORAZMI

January 2010

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

Member : Nur Asma Ariffin, Ph.D.

Institute : Institute of Tropical Aquaculture

One of the marine ornamental species that has been successfully cultured and reared in captivity is the False Clownfish (*Amphiprion ocellaris*). Nevertheless, the production of this species in captivity is still low since breeders failed to develop its broodstock in captivity. Since *A. ocellaris* needs to be paired for breeding, the information on its sexual dimorphism is critical for its sexing. Therefore the objectives of this project were; (i) To determine the sexual dimorphism of *A. ocellaris* based on morphometric characters. (ii) To determine the sexual dimorphism of *A. ocellaris* based on gonad histology and (iii) To determine the DNA profile between the sexes of *A. ocellaris* using RAPD markers.

For the first experiment, statistical analysis was conducted on 15 morphometric parameters and 18 Truss network variables measurements extracted from the body of *A. ocellaris* females and males. Two morphometric parameters and seven Truss-network variables showed a significant difference ($P < 0.05$) between the sexes. The two morphometric parameters were DALAV (direct distance between the anterior edge of the upper lip and the anterior insertion of the first pelvic fin) and DADPD (direct distance between the anterior insertion of the first dorsal fin and the posterior insertion of the last dorsal fin) while the 7 Truss network variables were particularly b (snout to end of mouth), e (above eye to origin of pelvic fin), f (end of mouth to origin of dorsal fin), h (origin of dorsal fin to origin of pelvic fin), l (origin of pelvic fin to end of anal fin), o (end of dorsal fin to end of the caudal fin) and p (end of anal fin to upper insertion of caudal fin).

In the second experiment, morphological observation and standard histological protocols were conducted on the gonad of *A. ocellaris*. The gonads of *A. ocellaris* can be differentiated based on size, shape, color and via histological examination. The non-breeders of *A. ocellaris* (size range: 3.5 to 5.8 cm (TL); 0.9 to 3.5 g) had small, flat and translucent ovotestis. The testicular and ovarian regions are intermixed without any clear boundaries and the later dominated the ovotestis. Male fish (size range: 5.3 to 6.9 cm (TL); 2.1 to 5.95 g) possesses ovotestis that was milky-white in color, flat and had an oval. The mixed ovotestes were dominated by testicular tissue at all developmental stages. The

testicular tissue was centrally located surrounded by peripheral ovarian tissues. In contrast, female fish (size range: 6.0 to 9.2 cm (TL); 5.5 to 13.5 g) possess ovary which consist of two connected sacs filled with orange-colored oocytes. The oocytes are at all developmental stages.

In the last experiment, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to determine the DNA profile between the sexes of *A. ocellaris*. From three set of primers chosen for analysis, namely OPA 2, OPA 4 and OPA 18, 57 clear and reproducible RAPD fragments were produced. The analysis of the DNA profile shows that all the individuals are closely related but they are separated into three different groups based on sex. The genetic similarity index of the three groups was defined at value of 96.2% (female population), 97.6% (male population) and 96.8% (non-breeders population). Three sex specific fragments were found in the PRC products generated by each primer; OPA 2 at 1090 bp (female specific fragment), OPA 4 at 878 bp (male and female specific fragment) and OPA 18 at 1114 bp (non-breeders specific fragments).

In conclusion, the sex of *A. ocellaris* can be distinguished and identified through its morphology, gonad histology and RAPD marker. However, the most appropriate, accurate, reliable and economical method to determine the sex is through DNA marker.

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

**DIMORFISME SEKS IKAN FALSE CLOWNFISH (*Amphiprion ocellaris*)
BERDASARKAN MORFOLOGI, HISTOLOGI DAN PENANDA RAPD**

LOKMAN NOR HAKIM BIN NORAZMI

Januari 2010

Pengerusi : Profesor Madya Abol Munafi Ambok Bolong, Ph.D.

Ahli : Nur Asma Ariffin, Ph.D.

Institut : Institut Akuakultur Tropika

Salah satu daripada spesies ikan hiasan marin yang telah berjaya dikultur dan ditenak dalam kurungan ialah ikan Clownfish (*Amphiprion ocellaris*). Bagaimanapun, pengeluaran *A. ocellaris* dalam kurungan adalah masih rendah kerana penternak masih gagal menghasilkan induk *A. ocellaris* dalam kurungan. Oleh kerana *A. ocellaris* perlu dipasangkan untuk pembiakan, maklumat perbezaan seks adalah amat penting untuk pengecaman seks. Untuk itu, objektif kajian ini adalah; (i) untuk menentukan dwimorfisme seks *A. ocellaris* melalui ciri morfometrik, (ii) untuk menentukan dwimorfisme seks *A. ocellaris* melalui histologi gonad dan (iii) untuk menentukan profil DNA antara seks *A. ocellaris* menggunakan penanda RAPD.

Untuk eksperimen pertama, analisis statistik dijalankan ke atas ukuran 15 parameter morfometrik dan 18 pemboleh-ubah Truss-network yang diambil

daripada *A. ocellaris* betina dan jantan. Dua parameter morfometrik dan tujuh pemboleh-ubah Truss menunjukkan perbezaan yang signifikan ($P < 0.05$) antara kedua-dua jantina. Dua parameter morfometrik itu adalah DALAV (jarak terus antara hujung anterior bibir atas dan kemasukan anterior sirip pelvic pertama) dan DADPD (jarak terus antara kemasukan pertama sirip dorsal dan kemasukan terakhir sirip dorsal) manakala tujuh pemboleh-ubah Truss network adalah b (muncung ke akhir mulut), e (atas mata ke permulaan sirip pelvic), f (hujung mulut ke permulaan sirip dorsal), h (permulaan sirip dorsal ke permulaan sirip pelvic), l (permulaan sirip pelvic ke hujung sirip anal), o (hujung sirip dorsal ke hujung sirip kaudal) and p (hujung sirip anal ke permulaan sirip kaudal).

Dalam eksperimen kedua, pemerhatian morfologi dan protokol histologi dijalankan ke atas gonad *A. ocellaris*. Gonad *A. ocellaris* boleh dibezakan berdasarkan saiz, bentuk, warna dan secara histologi. Ikan *A. ocellaris* bukan pembiak (julat saiz: 3.5 ke 5.8 cm (TL) dan 0.9 ke 3.5 g) mempunyai ovotestis yang kecil, rata dan jernih. Kawasan testicular dan ovary adalah bercampuran tanpa ada sempadan jelas ovotestis itu didominasi oleh tisu ovari. Ikan jantan (julat saiz: 5.3 ke 6.9 cm (TL) dan 2.1 ke 5.95 g) pula mempunyai ovotestis berwarna putih susu, rata dan berbentuk bujur. Ovotestis campuran ini didominasi oleh tisu testikular pada semua peringkat perkembangan. Tisu testicular terletak secara berpusat dengan dikelilingi oleh tisu ovari. Ini berbeza dengan ikan betina (julat saiz: 6.0 ke 9.2 cm (TL) dan 5.5 ke 13.5 g) yang mempunyai ovari yang terdiri daripada dua kantung yang bersambungan serta

dipenuhi oleh oosit berwarna oren. Oosit berada pada semua peringkat perkembangan.

Dalam eksperimen terakhir, Polimorfisme DNA Rawak Teramplifikasi (RAPD) telah digunakan untuk menentukan profil DNA antara seks *A. ocellaris*. Daripada tiga set pencetus yang dipilih untuk dianalisa, iaitu OPA 2, OPA 4 dan OPA 18, 57 fragmen RAPD yang jelas dan boleh dijana semula telah dihasilkan. Analisis profil DNA menunjukkan bahawa kesemua individu adalah saling berkait rapat namun mereka diasingkan kepada tiga kumpulan yg berasingan berdasarkan seks. Indeks persamaan genetik tiga kumpulan tersebut berada pada nilai 96.2% (populasi betina), 97.6% (populasi jantan) dan 96.8% (populasi ikan bukan pembiak). Tiga fragmen seks spesifik telah dijumpai pada produk PCR yang dijana oleh setiap pencetus; OPA 2 pada 1090 bp (fragmen spesifik betina), OPA 4 pada 878 bp (fragmen spesifik jantan dan betina) dan OPA 18 pada 1114 bp (fragmen spesifik ikan bukan pembiak).

Sebagai kesimpulanya, seks pada *A. ocellaris* boleh dibezakan dan dikenalpasti secara morfologi, histology gonad dan penanda RAPD. Namun, kaedah yang paling sesuai, tepat, dipercayai dan ekonomik adalah dengan menentukan seks menggunakan penanda DNA.