

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและรูปแบบไมโครแซเทลไลต์ของหอยเป่าฮื้อไทย *Haliotis asinina*  
ในโรงเพาะเลี้ยง

นางสาว ชีราภรณ์ รุ่งพิทักษ์มานะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC DIVERSITY AND MICROSATELLITE PATTERNS IN  
HATCHERY-PRODUCED THAI ABALONE *Haliotis asinina*

Miss Teeraporn Rungpituckmana

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

500413

Thesis Title                    GENETIC DIVERSITY AND MICROSATELLITE  
   PATTERNS IN HATCHERY-PRODUCED THAI  
   ABALONE *Haliotis asinina*

By                                    Miss Teeraporn Rungpituckmana


Field of study                    Marine Science

Thesis Advisor                 Associate Professor Padermsak Jarayabhand, Ph.D.

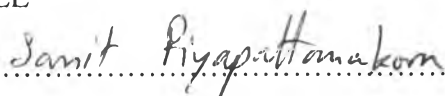
Thesis Co-advisor             Sirawut Klinbunga, Ph.D.

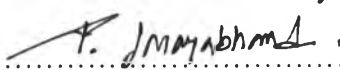
---


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

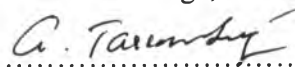
  
.....Dean of the Faculty of Science  
(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

  
.....Chairman  
(Assistant Professor Sanit Piyapattanakorn, Ph.D.)

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

  
.....Thesis Co-advisor  
(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

  
.....Member  
(Professor Anchalee Tassankajon, Ph.D.)

ธีรภรณ์ รุ่งพิทักษ์มานะ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมและรูปแบบไมโครแซเทลไลท์ของหอยเป่าอื้อไทย *Haliotis asinina* ในโรงเพาะเลี้ยง (GENETIC DIVERSITY AND MICROSATELLITE PATTERNS IN HATCHERY-PRODUCED THAI ABALONE *Haliotis asinina*) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.เผด็จศักดิ์ จารยะพันธุ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ดร.ศิวารุช กลิ่นบุหงา 87 หน้า

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าอื้อไทย *Haliotis asinina* ในโรงเพาะเลี้ยงจำนวน 2 กลุ่ม (G8 และ B;  $N=102$  และ  $N=120$ ) และหอยเป่าอื้อธรรมชาติจากเกาะตะลิ่ง จังหวัดตรัง ( $N=14-25$ ) โดยการวิเคราะห์ไมโครแซเทลไลท์จำนวน 5 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลที่ตำแหน่ง *CUHas2*, *CUHas3*, *CUHas8*, *Haμ2J* และ *Haμ13* ในตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 9, 14, 14, 7 และ 6 อัลลีล ตามลำดับ มีขนาดของอัลลีลอยู่ในช่วง 310-352, 155-183, 144-220, 228-240 และ 124-135 คู่เบส โดยพบจำนวนอัลลีลในทุกตำแหน่ง ยกเว้นอัลลีลที่ตำแหน่ง *Haμ2J* ในหอยเป่าอื้อจากโรงเพาะเลี้ยงมีจำนวนมากกว่าหอยเป่าอื้อจากเกาะตะลิ่ง ทั้งนี้ค่า discrimination capacity ในหอยเป่าอื้อโรงเพาะเลี้ยงกลุ่ม G8, B และหอยเป่าอื้อจากเกาะตะลิ่ง มีค่าเท่ากับ  $0.175 \pm 0.096$ ,  $0.216 \pm 0.133$  และ  $0.349 \pm 0.201$  ตามลำดับ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (observed heterozygosity) ของหอยเป่าอื้อจากโรงเพาะเลี้ยงกลุ่ม G8 และ B อยู่ในช่วง  $0.69 \pm 0.308$  และ  $0.56 \pm 0.241$  ซึ่งมีค่าสูงกว่าหอยเป่าอื้อจากเกาะตะลิ่ง ( $0.52 \pm 0.180$ ) ค่า power of discrimination, power of exclusion และ matching probability ของไมโครแซเทลไลท์ที่ใช้ในการศึกษา ในหอยเป่าอื้อจากโรงเพาะเลี้ยงกลุ่ม G8 (0.99989445, 0.9936054 และ 0.0001055), B (0.9999898, 0.9137856 และ 0.0000102), โรงเพาะเลี้ยงทั้งสองกลุ่ม (0.9999961, 0.9606105 และ 0.0000039) และหอยเป่าอื้อจากเกาะตะลิ่ง (0.9994288, 0.7894797 และ 0.0005712) มีค่าใกล้เคียงกัน จากข้อมูลไมโครแซเทลไลท์ที่ได้สามารถคำนวณหาจำนวนพ่อแม่ของหอยเป่าอื้อที่ใช้ทำการผลิตหอยเป่าอื้อในโรงเพาะเลี้ยงทั้งสองกลุ่มจากจีโนไทป์ของลูก โดยพบพ่อแม่และแม่รุ่นก่อนที่ใช้ในการผลิตแต่ละกลุ่มอย่างละ 10 ตัว จึงมีค่า effective number of population size ( $N_e$ ) และสัมประสิทธิ์การผสมเลือดชิด (inbreeding coefficient) ของหอยเป่าอื้อจากโรงเพาะเลี้ยงแต่ละกลุ่มเท่ากับ 20 ตัว และ 2.5% ต่อรุ่น ผลจากการศึกษานี้พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยเป่าอื้อ *H. asinina* มีค่าค่อนข้างสูง แต่จำนวนพ่อแม่ที่ใช้ในการผลิตลูกในโรงเพาะเลี้ยงมีจำนวนน้อย

เมื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของไมโครแซเทลไลท์กับน้ำหนักตัวของหอยเป่าอื้อในโรงเพาะเลี้ยงกลุ่ม B โดยการวิเคราะห์ simple linear regression พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ตำแหน่ง *Haμ13* ( $P < 0.05$ ) แต่ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ตำแหน่งอื่นๆ ( $P > 0.05$ ) โดยหอยเป่าอื้อที่มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซโกซิตีและเฮเทอโรไซโกซิตีที่อัลลีล 128 จะมีน้ำหนักตัว ( $3.477 \pm 0.735 - 7.430 \pm 0.099$ ) ซึ่งต่ำกว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมดของกลุ่ม B ( $7.60 \pm 2.758$ ,  $N = 280$ ) นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างระหว่างน้ำหนักตัวของหอยเป่าอื้อในโรงเพาะเลี้ยงกลุ่ม B กับจีโนไทป์ (เช่น ความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกซิตีและเฮเทอโรไซโกซิตีที่อัลลีล 124 กับอัลลีล 128) เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย ANOVA และ Duncan's new multiple range test ( $P < 0.05$ )

ข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของไมโครแซเทลไลท์กับฟีโนไทป์ (น้ำหนักตัว) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์ในหอยเป่าอื้อที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดนี้ได้

ภาควิชา.....วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่อ.....ผู้กล่าว  
สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4872320523 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: *Haliotis asinina* / MICROSATELLITE / GENETIC DIVERSITY

TEERAPORN RUNGPITUCKMANA: GENETIC DIVERSITY AND  
MICROSATELLITE PATTERNS IN HATCHERY-PRODUCED THAI ABALONE  
*Haliotis asinina*. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PADERMSAK  
JARAYABHAND, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: SIRAWUT KLINBUNGA, Ph.D., 87  
pp.

Genetic diversity of hatchery-propagated stocks (G8,  $N = 102$  and B,  $N = 120$ ) and a wild sample originating from Talibong Island ( $N = 14 - 25$ ) of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) were examined at 5 microsatellites loci. A total number of alleles per locus at *CUHas2*, *CUHas3*, *CUHas8*, *Hap2J* and *Hap13* across all samples were 9, 14, 14, 7 and 6 alleles, respectively. Sizes of allele distribution were 310 - 352, 155 - 183, 144 - 220, 228 - 240 and 124 - 135 bp, respectively. The number of *CUHas2*, *CUHas3*, *CUHas8* and *Hap13* alleles in the hatchery-propagated abalone was greater than that of the Talibong sample. In contrast, that of the *Hap2J* locus in the wild sample (6 alleles) was greater than the hatchery samples (4 alleles). The discrimination capacity was  $0.175 \pm 0.096$ ,  $0.216 \pm 0.133$  and  $0.349 \pm 0.201$  for G8, B hatchery samples and the Talibong sample, respectively. Observed heterozygosity in the respective hatchery samples was  $0.69 \pm 0.308$  and  $0.56 \pm 0.241$  which is slightly greater than that of the Talibong sample ( $0.52 \pm 0.180$ ). The power of discrimination, power of exclusion and matching probability of this set of microsatellites in G8 (0.99989445, 0.9936054 and 0.0001055), B (0.9999898, 0.9137856 and 0.0000102), combined hatchery samples (0.9999961, 0.9606105 and 0.0000039) and Talibong (0.9994288, 0.7894797 and 0.0005712) samples were comparable. The number of contributed founders of the previous generation was inferred from offspring genotypes and found that 10 males and 10 females contributed for each hatchery sample. The estimated effective number of population size ( $N_e$ ) and inbreeding coefficient of each hatchery stock was 20 individuals and 2.5% per generation. Results from this study indicated relatively high levels of genetic diversity but limited numbers of contributed founders from the previous generation of the hatchery stock of *H. asinina*.

In addition, preliminary association analysis between microsatellite genotypes and the body weight of the hatchery B sample was examined. A simple linear regression indicated significant correlation between those factors at the locus *Hap13* ( $P < 0.05$ ) but not other loci ( $P > 0.05$ ). Interestingly, abalone carrying homo- and heterozygotic status of the 128 allele had a lower body weight ( $3.477 \pm 0.735 - 7.430 \pm 0.099$ ) than the average weight of the B sample ( $7.60 \pm 2.758$ ,  $N = 280$ ). Significant differences between the body weight of the B sample having different genotypes (e.g. between homozygotes and heterozygotes carrying the 124 alleles and those carrying the 128 allele) were found when analyzed by ANOVA and the *post hoc* Duncan's new multiple range test ( $P < 0.05$ ). The possible correlation between microsatellite genotype and phenotype (the body weight) was preliminary illustrated. Results on genetic diversity and possible correlation between genotypes and a phenotype (body weight) can be applied to promote the efficiency of breeding programs of this economically important species.

Department : ..... Marine Science ..... Student's signature : Teeraporn Rungpituckmana  
Field of study : ..... Marine Science ..... Advisor's signature : P. Jarayabhand  
Academic year : ..... 2007 ..... Co-advisor's signature : S. Klinbunga

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest sense of gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Padermsak Jarayabhand for his guidance, suggestions, encouragement and support throughout my thesis and my co-advisor, Dr. Sirawut Klinbunga for his great helps, guidance, encouragement, valuable suggestion and supports throughout my study.

I would like to acknowledge the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for laboratory facilities.

In addition, I would also like to extend my special thanks to Dr. Bavornlak Khamnamtong, and Miss Ratchanimuk Preechapol for their great suggestion about my works. I also thank Miss Kanchana Sittikhankeaw Miss Natechanok Thamniemdee and Miss Sirikan Prasertlux for best friendship and great help during my research in our laboratory.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my beloved parents, family and relative for their love, care, understanding and encouragement extended throughout my live.

# CONTENTS

	<b>Page</b>
ABSTRACT (THAI).....	<b>iv</b>
ABSTRACT (ENGLISH).....	<b>v</b>
ACKNOWLEDGMENTS.....	<b>vi</b>
CONTENTS.....	<b>vii</b>
LIST OF TABLES.....	<b>xi</b>
LIST OF FIGURES.....	<b>xiii</b>
LIST OF ABBREVIATIONS.....	<b>xvi</b>
CHAPTER I INTRODUCTION.....	<b>1</b>
1.1 General introduction.....	<b>1</b>
1.2 Objectives .....	<b>4</b>
1.3 Beneficial .....	<b>4</b>
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	<b>5</b>
2.1 Taxonomy of <i>Haliotis asinina</i> .....	<b>5</b>
2.2 Morphology and anatomy.....	<b>5</b>
2.3 Life cycle .....	<b>8</b>
2.4 Habitat and distributions .....	<b>10</b>
2.5 Molecular genetic techniques used in the thesis.....	<b>11</b>
2.5.1 Polymerase chain reaction (PCR).....	<b>11</b>
2.5.2 Microsatellites .....	<b>12</b>
2.6 Application of microsatellite .....	<b>14</b>

	<b>Page</b>
2.6.1 Application of microsatellites for genetics and fisheries management.....	14
2.6.2 Application of microsatellite for domestication and breeding programs.....	15
2.6.3 Genetic studies of abalone using microsatellites.....	17
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	21
3.1 Samples .....	21
3.2 DNA extraction.....	22
3.3 Measuring DNA concentrations using electrophoresis and spectrophotometer .....	23
3.3.1 Estimation of DNA and RNA concentration by spectrophotometry.....	23
3.3.2 Estimation of the amount of DNA by mini-gel electrophoresis.....	24
3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) using homospecific microsatellite primers of <i>H. asinina</i> .....	24
3.5 Agarose gel electrophoresis .....	26
3.6 Polyacrylamide gel electrophoresis.....	26
3.6.1 Preparation of glass plates .....	26
3.6.2 Preparation of denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.....	27
3.6.3 Electrophoresis.....	27
3.6.4 Silver staining.....	28
3.7 Scoring of microsatellite alleles.....	28
3.8 Data analysis.....	29
3.8.1 Genetic variation and heterozygosity.....	29



	<b>Page</b>
3.8.2 Discrimination capacity (DC) .....	29
3.8.3 Hardy-Weinberg equilibrium.....	29
3.8.4 Parameters to indicate the ability to carry out individuality and parentage analysis of each microsatellite locus was calculated .....	30
3.8.4.1 Matching probability (MP).....	30
3.8.4.2 Power of discrimination (PD) .....	30
3.8.4.3 Power of exclusion (PE).....	30
3.8.5 The effective population size and inbreeding coefficient.....	31
3.8.6 Genetic heterogeneity between subgroups of the hatchery- propagated <i>H. asinina</i> .....	31
3.8.7 Association analysis of microsatellite genotypes and the body weight in the hatchery sample (B) of <i>H. asinina</i> .....	32
CHAPTER IV RESULTS.....	33
4.1 DNA extraction.....	33
4.2 Genetic diversity of hatchery-produced and wild of <i>H. asinina</i> .....	34
4.2.1 Genetic variation within sample.....	39
4.2.2 Hardy-Weinberg disequilibrium of <i>H. asinina</i> microsatellites in Talibong samples.....	46
4.2.3 The effective number population size and inbreeding coefficient of hatchery stocks.....	49
4.3 The use of microsatellite polymorphism to predict association between genotypes and the body weight of the hatchery (B) sample .....	51
4.3.1 Allele distribution patterns in subgroups of the B sample.....	51
4.3.2 Genetic heterogeneity between subgroups of the hatchery <i>H.</i> <i>asinina</i> .....	54

	<b>Page</b>
4.3.3 Association analysis of microsatellite genotypes and the body weight in the hatchery sample (B) of <i>H. asinina</i> .....	<b>57</b>
CHAPTER V DISCUSSION.....	<b>59</b>
CHAPTER VI CONCLUSIONS .....	<b>67</b>
REFERENCES.....	<b>68</b>
APPENDIX.....	<b>74</b>
BIOGRAPHY.....	<b>87</b>

## LIST OF TABLES

		<b>Page</b>
<b>Table 1.1</b>	Commercial important abalone species .....	2
<b>Table 3.1</b>	Date of culture, collection date and age at the collection date of samples used in this thesis.....	22
<b>Table 3.2</b>	Nucleotide sequence and melting temperature of microsatellite primers for <i>H. asinina</i> .....	24
<b>Table 3.3</b>	PCR condition used for amplification of genomic DNA of <i>H. asinina</i> .....	25
<b>Table 4.1</b>	Amplification success of 9 microsatellites ( <i>CUHas1</i> , <i>CUHas2</i> , <i>CUHas3</i> , <i>CUHas5</i> , <i>CUHas8</i> , <i>Haμ2J</i> , <i>Haμ3C</i> , <i>Haμ10</i> and <i>Haμ13</i> ) initially screened against genomic DNA of representative <i>H. asinina</i> individuals.....	36
<b>Table 4.2</b>	Genetic heterogeneity analysis in 2 groups (G8; 4 months and G8; 8 months) of hatchery <i>H. asinina</i> based on five microsatellite loci ( <i>CUHas2</i> , <i>CUHas3</i> , <i>CUHas8</i> , <i>Haμ2J</i> and <i>Haμ13</i> ) .....	39
<b>Table 4.3</b>	Allele size (in base pairs) at the <i>CUHas2</i> , <i>CUHas3</i> , <i>CUHas8</i> , <i>Haμ2J</i> and <i>Haμ13</i> loci and its frequency distribution in G8 and B (hatchery) and Talibong Island (wild) samples.....	44
<b>Table 4.4</b>	Sample size, size ranges, number of alleles, observed and expected herterozygosity at <i>CUHas2</i> , <i>CUHas3</i> , <i>CUHas8</i> , <i>Haμ2J</i> and <i>Haμ13</i> loci of G8 and B (hatchery) and Talibong Island (wild) samples of <i>H. asinina</i> .....	46
<b>Table 4.5</b>	The number of alleles per locus, discrimination capacity and mean heterozygosity of investigated samples .....	47

	<b>Page</b>
<b>Table 4.6</b> Hardy-Weinberg expectations at five microsatellite loci of the Talibong sample.....	47
<b>Table 4.7</b> Parameter showing the discrimination ability of microsatellite loci for parentage assignment of <i>H. asinina</i> in this study .....	48
<b>Table 4.8</b> Number of fathers and mothers, number of mutations, mutation rate and calculated parameters of the G8 sample (only data from 17 sampling times are shown).....	49
<b>Table 4.9</b> Number of fathers and mothers, number of mutations, mutation rate and calculated parameters of the B sample (only data from 21 sampling times are shown).....	50
<b>Table 4.10</b> Allele sizes (in base pairs) at the <i>CUHas2</i> , <i>CUHas3</i> , <i>CUHas8</i> , <i>Hap2J</i> and <i>Hap13</i> loci and its frequency distribution in 3 groups (BL, BM and BS) of hatchery (B) <i>H. asinina</i> .....	55
<b>Table 4.11</b> Genetic heterogeneity analysis in 3 groups (BL, BM and BS) of hatchery (B) <i>H. asinina</i> based on five microsatellite loci ( <i>CUHas2</i> , <i>CUHas3</i> , <i>CUHas8</i> , <i>Hap2J</i> and <i>Hap13</i> ).....	56
<b>Table 4.12</b> Correlation between genotype and the body weight in the hatchery sample (B) of <i>H. asinina</i> based on five microsatellite loci .....	58
<b>Table 4.13</b> Statistical analysis to indicate differences in body weight of the hatchery sample (B) of <i>H. asinina</i> carrying different <i>Hap13</i> genotypes.....	58

## LIST OF FIGURES

		<b>Page</b>
<b>Figure 2.1</b>	Tropical abalone <i>Haliotis asinina</i> .....	6
<b>Figure 2.2</b>	Ventral view of anatomy of abalone .....	8
<b>Figure 2.3</b>	Life Cycle of abalone .....	9
<b>Figure 2.4</b>	General illustration of PCR .....	12
<b>Figure 3.1</b>	Epipodial tentacles (arrow) of abalone .....	21
<b>Figure 3.2</b>	Diagram showing the sampling collection scheme of the group B sample used for association analysis between microsatellite genotype and the body weight of abalone...	22
<b>Figure 4.1</b>	Genomic DNA extracted from the epipodial tentacles tissue of <i>H. asinina</i> . The extracted DNA was electrophoresed through 1.0 % agarose gel and stained with ethidium bromide.....	33
<b>Figure 4.2</b>	A 1.0% ethidium bromide stained agarose gel showing the amplification products resulted at <i>CUHas1</i> (a), <i>CUHas5</i> (b), <i>Haμ3C</i> (c) and <i>Haμ10</i> (d) loci against genomic DNA of <i>H. asinina</i> (Lanes 1-4). Lanes M and N are a 100 bp DNA ladder and the negative control (without the DNA template). respectively.....	34
<b>Figure 4.3</b>	A 1.0% ethidium bromide stained agarose gel showing the amplification products resulted from <i>CUHas2</i> (a), <i>CUHas3</i> (b), <i>CUHas8</i> (c), <i>Haμ2J</i> (d) and <i>Haμ13</i> (e) primers against genomic DNA of <i>H. asinina</i> (Lanes 1-5. 7). Lanes M and N are a 100 bp DNA ladder and the negative control (without the DNA template), respectively.....	35

	<b>Page</b>
<b>Figure 4.4</b> Microsatellite patterns at the locus <i>CUHas2</i> of hatchery (A) and wild (B) <i>H. asinina</i> . Sizes of microsatellite alleles were determined by comparing with the M13 sequencing ladder .....	36
<b>Figure 4.5</b> Microsatellite patterns at the locus <i>CUHas3</i> (lanes 1-10) of hatchery (A) and wild (B) <i>H. asinina</i> . Sizes of microsatellite alleles were determined by comparing with the M13 sequencing ladder.....	37
<b>Figure 4.6</b> Microsatellite patterns at the locus <i>CUHas8</i> of wild (lanes 1-9) and hatchery (lanes 10-17) <i>H. asinina</i> . Sizes of microsatellite alleles were determined by comparing with the M13 sequencing ladder.....	37
<b>Figure 4.7</b> Microsatellite patterns at the locus <i>Hap2J</i> of wild (lanes 1-7) and hatchery (lanes 8-17) of <i>H. asinina</i> . Sizes of microsatellite alleles were determined by comparing with the M13 sequencing ladder.....	38
<b>Figure 4.8</b> Microsatellite patterns at the locus <i>Hap13</i> of wild (lanes 1-6) and hatchery (lanes 7-16) <i>H. asinine</i> . Sizes of microsatellite alleles were determined by comparing with the M13 sequencing ladder.....	38
<b>Figure 4.9</b> Alleles distribution frequencies at the <i>CUHas2</i> locus of <i>H. asinina</i> from G8 (hatchery, $N = 100$ ), B (hatchery, $N = 117$ ) and Talibong Island ( $N = 14$ ).....	41
<b>Figure 4.10</b> Alleles distribution frequencies at the <i>CUHas3</i> locus of <i>H. asinina</i> from G8 (hatchery, $N = 102$ ), B (hatchery, $N = 120$ ) and Talibong Island ( $N = 23$ ).....	41
<b>Figure 4.11</b> Alleles distribution frequencies at the <i>CUHas8</i> locus of <i>H. asinina</i> from G8 (hatchery, $N = 102$ ), B (hatchery, $N = 120$ ) and Talibong Island ( $N = 25$ ).....	42

	<b>Page</b>
<b>Figure 4.12</b> Alleles distribution frequencies at the <i>Hap2J</i> locus of <i>H. asinina</i> from G8 (hatchery, $N = 102$ ), B (hatchery, $N = 120$ ) and Talibong Island ( $N = 25$ ) .....	42
<b>Figure 4.13</b> Alleles distribution frequencies at the <i>Hap13</i> locus of <i>H. asinina</i> from G8 (hatchery, $N = 102$ ), B (hatchery, $N = 120$ ) and Talibong Island ( $N = 25$ ).....	43
<b>Figure 4.14</b> Alleles distribution frequencies at the <i>CUHas2</i> locus of 3 groups (BL, BM and BS) of hatchery (B) <i>H. asinine</i> .....	52
<b>Figure 4.15</b> Alleles distribution frequencies at the <i>CUHas3</i> locus of 3 groups (BL, BM and BS) of hatchery (B) <i>H. asinina</i> .....	52
<b>Figure 4.16</b> Alleles distribution frequencies at the <i>CUHas8</i> locus of 3 groups (BL, BM and BS) of hatchery (B) <i>H. asinina</i> .....	53
<b>Figure 4.17</b> Alleles distribution frequencies at the <i>Hap2J</i> locus of 3 groups (BL, BM and BS) of hatchery (B) <i>H. asinina</i> .....	53
<b>Figure 4.18</b> Alleles distribution frequencies at the <i>Hap13</i> locus of 3 groups (BL, BM and BS) of hatchery (B) <i>H. asinina</i> .....	54

## LIST OF ABBREVIATIONS

bp	base pair
°C	degree Celcius
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
HCl	hydrochloric acid
Kb	kilobase
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	magnesium chloride
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
NaCl	sodium chloride
ng	nanogram
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
rpm	revolution per minute
RNA	ribonucleic acid
RNase A	ribonuclease A
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tris	tris (hydroxyl methyl) aminomathane
µg	microgram



$\mu\text{l}$	microlitre
$\mu\text{M}$	micromolar
UV	ultraviolet