

การแยกและวิเคราะห์ไมโครเซเทลไลต์ที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำสามและสี่
เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบพันธุกรรมกิ้งกูดำ

นางสาว สิริพร พงษ์สมบูรณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1312-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20473072

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION
OF TRI- AND TETRANUCLEOTIDE MICROSATELLITE SEQUENCES
FOR APPLICATION TO DNA TYPING IN THE BLACK TIGER PRAWN**

Penaeus monodon

Miss Siriporn Pongsomboon

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy of Science in Biochemistry**

Department of Biochemistry

Faculty of Science

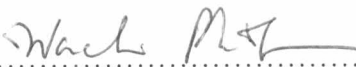
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1312-6


Thesis Title Isolation and characterization of tri- and tetranucleotide
microsatellite sequences for application to DNA typing in
the black tiger prawn *Penaeus monodon*
By Miss Siriporn Pongsomboon
Field of Study 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 Doctor's Degree.

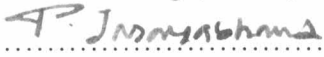
 Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)


Thesis Committee


 Chairman
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

 Thesis Advisor
(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

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

 Member
(Associate Professor Padermsak Jarayabhand, Ph.D.)

 Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

 Member
(Assistant Professor Chainarong Wongteerasupaya, Ph.D.)

สิริพร พงษ์สมบุญ : การแยกและวิเคราะห์ไมโครแซเทลไลต์ที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำสามและสี่เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบพันธุกรรมกุ้งกุลาดำ (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TRI- AND TETRANUCLEOTIDE MICROSATELLITE SEQUENCES FOR APPLICATION TO DNA TYPING IN THE BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon*.) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อัญชลี ทศนาขจร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา, 192 หน้า. ISBN 974-17-1312-6

ไมโครแซเทลไลต์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความสำคัญและสามารถนำมาประยุกต์ให้เกิดประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการประมง ในการศึกษาทำการแยกไมโครแซเทลไลต์ที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำสามและสี่จากห้องสมุดยีน ของกุ้งกุลาดำ 2 แบบคือ ห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นโดยวิธี convention และ enrichment ทำการแยกไมโครแซเทลไลต์จากห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นแบบ convention โดยการไฮบริดซ์ห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นด้วยตัวติดตามได้แก่ (GAA)_n, (GATA)_n, (GGAT)_n, (GGAA)_n, (CACC)_n, (CATA)_n, (TCAG)_n, (ATG)_n, (CAT)_n จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลอนที่ได้จากห้องสมุดยีนแบบ convention จำนวน 152 โคลอน พบไมโครแซเทลไลต์จำนวน 225 ตำแหน่ง เมื่อทำการเปรียบเทียบไมโครแซเทลไลต์ 9 ชนิด ที่ใช้ไฮบริดซ์ห้องสมุดยีน พบไมโครแซเทลไลต์ชนิด (GAA)_n และ (GATA)_n เป็นจำนวนมาก จากนั้นทำการสร้างห้องสมุดยีนแบบ enrichment เพื่อคัดเลือกไมโครแซเทลไลต์ชนิด (GAA)_n และ (GATA)_n จากการหาลำดับเบสของโคลอนที่ได้จากห้องสมุดยีนแบบ enrichment จำนวน 136 โคลอน พบไมโครแซเทลไลต์จำนวน 169 ตำแหน่ง ชนิดของไมโครแซเทลไลต์ที่พบมากที่สุดเป็นแบบ perfect ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่ขนาบข้างไมโครแซเทลไลต์ พบว่าไพรเมอร์ 18 คู่จากห้องสมุดยีนแบบ convention และ 3 คู่จากห้องสมุดยีนแบบ enrichment เมื่อนำมาตรวจสอบยีนในไทป์ของกุ้งกุลาดำ ให้ผลผลิต PCR ที่มีความหลากหลายและมีขนาดอยู่ในช่วงที่คาดหมาย โดยทั่วไปไมโครแซเทลไลต์ที่แยกได้มีความหลากหลายในระดับสูง พบอัลลีลเฉลี่ยเท่ากับ 17.8 อัลลีล polymorphic information content (PIC) เฉลี่ยเท่ากับ 0.82 ค่า observed และ expected heterozygosity เท่ากับ 0.70 และ 0.84 ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ไมโครแซเทลไลต์แบบมัลติเพล็กซ์ ซึ่งช่วยให้สามารถตรวจสอบยีนในไทป์ของกุ้งได้พร้อมกันที่หลายตำแหน่ง มัลติเพล็กซ์จำนวน 4 ชุดที่สามารถพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบยีนในไทป์ของกุ้งกุลาดำได้ ประกอบด้วย tetraplex 1 ชุด triplex 2 ชุด และ duplex 1 ชุด ทำการตรวจสอบไมโครแซเทลไลต์อัลลีลโดยไม่ใช้สารรังสี โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกขนาดด้วย 8% denaturing polyacrylamide sequencing gel และนำมาข้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ ซึ่งการตรวจสอบไมโครแซเทลไลต์ด้วยการข้อมซิลเวอร์สามารถใช้แทนสารรังสีในการตรวจสอบยีนในไทป์ของกุ้งกุลาดำได้ นอกจากนี้ได้นำเครื่องหมายพันธุกรรมจำนวน 10 ตำแหน่งตรวจสอบพันธุกรรมของครอบครัวกุ้งกุลาดำที่ใช้ในการสร้างแผนที่จีโนม ข้อมูลผลการตรวจสอบพันธุกรรมที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ทางสถิติร่วมกับผลการตรวจสอบพันธุกรรมของเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด AFLPs เพื่อวิเคราะห์ตำแหน่งบนแผนที่จีโนมของเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 10 ตำแหน่งนี้ จากการวิเคราะห์พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมจำนวน 7 ตำแหน่งสามารถวางบนแผนที่จีโนมได้

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....
ปีการศึกษา.....2545.....

ลายมือชื่อนิสิต *Yiwan Pongponboon*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *A. Pasaneke*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม *P. Uth...*

4073808023 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : *Penaeus monodon* / black tiger prawn / microsatellite / multiplex PCR

SIRIPORN PONGSOMBOON : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TRI- AND TETRANUCLEOTIDE MICROSATELLITE SEQUENCES FOR APPLICATION TO DNA TYPING IN THE BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANCHALEE TASSANAKAJON, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : SIRAWUT KLINBUNGA, Ph.D. 192 pp. ISBN 974-17-1312-6

Microsatellites are useful genetic markers for numerous applications in aquaculture and fisheries research. In this study, microsatellite sequences were isolated and characterized from the black tiger prawn, *P. monodon*. Small insert genomic libraries of *P. monodon* were constructed using two methods, a conventional and an enrichment method. The conventional genomic libraries were constructed to identify the prevalent tri- and tetranucleotide repeats in the prawn genome. These libraries were probed for the microsatellite motifs (GATA)_n, (GAA)_n, (GGAT)_n, (GGAA)_n, (CACC)_n, (CATA)_n, (TCAG)_n, (ATG)_n and (CAT)_n. Sequence analysis of 152 clones yielded 225 microsatellite loci. Among 9 microsatellite motifs used to screen libraries, (GAA)_n and (GATA)_n repeats were abundant. The enrichment libraries were then constructed for (GAA)_n and (GATA)_n repeat isolation. Sequence analysis of 136 clones yielded 169 microsatellite loci. Perfect microsatellites were predominant in this species. Eighteen and three pairs of microsatellite primers from conventional and enrichment libraries, respectively produced polymorphic products in the expected size range. Generally, the microsatellite markers showed high levels of genetic polymorphism with the average of 17.8 alleles per locus and the average of polymorphic information content (PIC) of 0.82. The average of observed and expected heterozygosities across all investigated samples were 0.70 and 0.84, respectively. Multiplex analysis was developed to provide rapid amplification of multiple loci simultaneously. Four multiplex sets were successfully developed for genotyping. These four multiplex sets include 1 tetraplex, 2 triplex and 1 duplex sets. Non-isotopic method was used to detect amplified alleles by separating in 8% denaturing polyacrylamide sequencing gels and visualization of amplified alleles using silver staining. Silver staining detection could be used as an alternative method to a radioisotopic detection for genotyping of *P. monodon*. Ten microsatellite loci were used to genotype a reference family for international genetic mapping of *P. monodon*. The genotypic data was analyzed with AFLP primer combination. Seven microsatellite markers were placed on the *P. monodon* map.

Department ...Biochemistry.....

Field of study....Biochemistry.....

Academic year....2002.....

Student's signature.....*Siriporn Pongsomboon*.....

Advisor's signature.....*A. Tassanakajon*.....

Co- advisor's signature.....*S. Klinbunga*.....

Acknowledgements

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon and my co-advisor, Dr. Sirawut Klinbunga for their guidance, supervision, encouragement and supports throughout my study.

My gratitude is also extended to Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Associate Professor Padermsak Jarayabhand, Associate Professor Siriporn Sittipraneed and Assistant Professor Chainarong Wongteerasupaya for serving as thesis committee, for their available comments and also useful suggestions.

My appreciation is also expressed to Dr. Stephen Moore and Vicki Whan for their help and suggestion during my stay in Australia.

Thanks are also expressed to all my friends of the Biochemistry Department especially in R707 for their helps in the laboratory and friendships that help me enjoy and happy through out my study.

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

I wish to acknowledge to contributions of Graduate Research and Education Consortium (GREC), the National Science and Technology Development Agency, NSTDA for my financial support.

Contents

vii

	Page
Thai Abstract.....	iv
English Abstract.....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	xii
List of Figures.....	xiv
List of Abbreviations.....	xix
Chapter I Introduction.....	1
1.1 General introduction	1
1.2 Taxonomy of <i>P. monodon</i>	5
1.3 Morphology.....	5
1.4 Life cycle	6
1.5 Distribution	9
1.6 Exploitation.....	9
1.7 Genetic markers.....	11
1.7.1 Isozymes	12
1.7.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPS).....	14
1.7.3 mt-RFLPs.....	15
1.7.4 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers.....	15

Contents (cont.)

	Page
1.7.5 <i>Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPS)</i>	17
1.7.6 <i>Variable Number of Tandem Repeats (VNTRS)</i> ...	18
1.7.6.1 <i>Satellites</i>	19
1.7.6.2 <i>Minisatellites</i>	19
1.7.6.3 <i>Microsatellites</i>	20
1.8 <i>Genetic markers in penaeid prawns</i>	22
1.9 <i>Objective of the thesis</i>	24
Chapter II <i>Materials and Methods</i>	25
2.1 <i>Equipment</i>	25
2.2 <i>Chemicals and Reagents</i>	26
2.3 <i>Prawn samples</i>	28
2.4 <i>DNA extraction</i>	29
2.4.1 <i>The black tiger prawn broodstock</i>	29
2.4.2 <i>The reference family</i>	30
2.5 <i>Agarose gel electrophoresis</i>	31
2.6 <i>Spectrophotometric measuring of DNA concentration</i>	32
2.7 <i>Genomic library construction and microsatellite isolation</i>	32
2.7.1 <i>Construction of conventional genomic library</i>	32
2.7.1.1 <i>Preparation of P. monodon DNA</i>	33
2.7.1.2 <i>Ligation</i>	37
2.7.1.3 <i>Transformation</i>	37

Contents (cont.)

	Page
<i>2.7.1.4 Partial genomic library screening of microsatellite-containing clones.....</i>	39
2.7.2 Construction of enrichment genomic libraries.....	43
<i>2.7.2.1 Enrichment of microsatellites based on selection of clones from genomic library.....</i>	43
<i>2.7.2.2 Enrichment of microsatellite based on selection from genomic DNA fragments.....</i>	47
2.8 Preparation of plasmid DNA for sequencing.....	50
<i>2.8.1 Plasmid DNA extraction.....</i>	50
<i>2.8.2 Restriction digestion of plasmid DNA.....</i>	51
2.9 DNA sequencing.....	51
<i>2.9.1 Sequencing reaction.....</i>	51
<i>2.9.2 Sequencing product separation and detection.....</i>	52
2.10 Design and synthesis of PCR primer pairs.....	53
2.11 Microsatellite analysis.....	53
<i>2.11.1 PCR amplification of microsatellites.....</i>	53
<i>2.11.2 DNA standard for estimation of microsatellite alleles.....</i>	55
<i>2.11.3 PCR product separation and detection.....</i>	56
2.12 Polymorphism analysis of microsatellite loci.....	56
<i>2.12.1 Allele number and frequency.....</i>	57
<i>2.12.2 Observed heterozygosity.....</i>	57

Contents (cont.)

	Page
2.12.3 <i>Expected heterozygosity</i>	57
2.12.4 <i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>	58
2.12.5 <i>Polymorphic information content</i>	58
2.13 Multiplex analysis of microsatellite loci.....	58
2.14 Silver staining detection of microsatellite amplification...	60
2.15 Application in prawn genome mapping.....	61
 Chapter III Results.....	 63
3.1 Prawn DNA samples.....	63
3.2 Preparation of prawn DNA for partial genomic library construction.....	63
3.3 Construction of partial genomic libraries and isolation of microsatellites.....	66
3.3.1 <i>Construction of conventional genomic libraries</i> ...	66
3.3.2 <i>Construction of enriched genomic libraries of P. monodon</i>	69
3.4 Determination of nucleotide sequences of clones isolated from <i>P. monodon</i> partial genomic libraries.....	78
3.4.1 <i>Conventional libraries</i>	78
3.4.2 <i>Enriched libraries of P. monodon</i>	80
3.5 Characteristics of microsatellite sequences of <i>P. monodon</i>	81
3.5.1 <i>Conventional libraries</i>	81

Contents (cont.)

	Page
<i>3.5.2 Enrichment genomic libraries</i>	89
3.6 Primer design and primer testing.....	93
<i>3.6.1 Conventional genomic libraries</i>	93
<i>3.6.2 Enrichment libraries</i>	97
3.7 Polymorphism of investigated microsatellites.....	101
3.8 Multiplex analysis of microsatellite loci.....	117
3.9 Silver staining detection of microsatellite amplification....	130
3.10 Application in shrimp genome mapping.....	133
 Chapter IV Discussion.....	 142
4.1 Microsatellite isolation.....	142
4.2 Characteristic of microsatellite loci.....	147
4.3 Efficiency of marker development.....	150
4.4 Polymorphism analysis of microsatellite loci.....	153
4.5 Multiplex analysis of microsatellite loci.....	158
4.6 Silver staining detection of microsatellite amplification....	161
4.7 Application in shrimp genome mapping.....	162
 Chapter V Conclusions.....	 165
References.....	167
Appendix.....	182
Biography.....	192

List of Tables

		Page
Table 1.1	Cultured prawn production in Thailand in the year 1998-2001.....	3
Table 1.2	Statistics illustrating the United State of America's import of prawn in the year 2000-2001.....	4
Table 2.1	Annealing temperature for each microsatellite locus.....	55
Table 2.2	PCR reaction components of 4 multiplex systems.....	59
Table 2.3	PCR thermal profile for 4 multiplex PCR of microsatellites of <i>P. monodon</i>	60
Table 3.1	The number of colonies screened with different types of microsatellite probes and the percentages of positive clones obtained from conventional libraries.....	70
Table 3.2	The number of clones sequenced and the percentages of microsatellite-containing clones found from various conventional libraries.....	79
Table 3.3	The number of clones sequenced and the percentages of microsatellite-containing clones found in enriched libraries.	81
Table 3.4	Characteristics of microsatellite sequences in conventional libraries.....	84
Table 3.5	Characteristics of compound microsatellite sequences in conventional libraries.....	88
Table 3.6	Characteristics of microsatellite sequences in enriched libraries.....	91

List of Tables (cont.)

		Page
Table 3.7	Characteristics of compound microsatellite sequences in enriched libraries.....	94
Table 3.8	Efficiency of microsatellite marker isolated from conventional libraries.....	95
Table 3.9	Efficiency of microsatellite marker isolated from the enriched libraries.....	98
Table 3.10	Repeat sequences and annealing temperature of <i>P. monodon</i> microsatellite primers from various genomic libraries.....	104
Table 3.11	Polymorphism of 26 microsatellites loci of <i>P. monodon</i>	105
Table 3.12	Estimation of Hardy-Weinberg expectations for each polymorphic microsatellite locus.....	106
Table 3.13	Polymorphism characteristics of 21 polymorphic markers for different microsatellite types of <i>P. monodon</i>	107
Table 3.14	Genotypes of <i>P. monodon</i> pedigree samples for 10 microsatellite loci.....	136
Table 3.15	Summary of common linkage map using AFLP and microsatellite data.....	138
Table 3.16	Linkage map data for each of microsatellite loci.....	139

List of Figures

	Page
Figure 1.1 Lateral view of <i>P. monodon</i> showing important parts.....	8
Figure 1.2 The life cycle of the black tiger prawn, <i>P. monodon</i> , with stages in different habitats.....	8
Figure 1.3 Geographic distributions of <i>P. monodon</i> in the Indo-West Pacific regions	10
Figure 2.1 Schematic representation of three different protocols for library construction and microsatellite isolation in <i>P. monodon</i>	34
Figure 3.1 Ethidium bromide stained gel showing genomic DNA extracted from <i>P. monodon</i> pleopods.....	64
Figure 3.2 Ethidium bromide stained gels showing <i>P. monodon</i> DNA fragments used for library constructions.....	65
Figure 3.3 Autoradiograms of colonies hybridized with [γ - ³² P]ATP labeled (GAA) ₈ +(GATA) ₆ oligonucleotide probes.....	71
Figure 3.4 Agarose gel electrophoresis showing <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I digested recombinant plasmids from the library D	72
Figure 3.5 Agarose gel electrophoresis showing <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I digested recombinant plasmid DNA from (GATA) _n enriched library selected from the genomic library.....	74
Figure 3.6 PCR amplification products of selected ssDNA fragments for microsatellite enrichment selected from DNA fragments.....	76

List of Figures (cont.)

	Page
Figure 3.7 Agarose gel electrophoresis showing <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I digested recombinant plasmid from (GATA) _n enriched library selected from DNA fragments	77
Figure 3.8 The percentages of various repeat types of microsatellite loci isolated from conventional genomic libraries of <i>P. monodon</i>	86
Figure 3.9 Autoradiograms showing sequences of different of microsatellite classes.....	87
Figure 3.10 The percentages of various repeat types of microsatellite loci isolated from the enriched libraries of <i>P. monodon</i>	92
Figure 3.11 Autoradiogram of sequencing gels showing flanking regions of a microsatellite-containing clone.....	96
Figure 3.12 Autoradiogram of sequencing gels of microsatellite clones of (GATA) _n selected from DNA fragments.....	99
Figure 3.13 Genotype patterns at the CUPmo 1 locus of 15 individuals (lanes 1-15) of <i>P. monodon</i>	108
Figure 3.14 Genotype patterns at the CUPmo 2 locus of 15 individuals (lanes 1-15) of <i>P. monodon</i>	108
Figure 3.15 Genotype patterns at the CUPmo 12 locus of 15 individuals (lanes 1-15) of <i>P. monodon</i>	109
Figure 3.16 Genotype patterns at the CUPmo 13 locus of 15 individuals (lanes 1-15) of <i>P. monodon</i>	109

List of Figures (cont.)

	Page
Figure 3.17 Genotype patterns at the CUPmo 15 locus of 15 individuals (lanes 1-15) of <i>P. monodon</i>	110
Figure 3.18 Genotype patterns at the CUPmo 16 locus of 15 individuals (lanes 1-15) of <i>P. monodon</i>	110
Figure 3.19 Genotype patterns at the CUPmo 19 locus of 15 individuals (lanes 1-15) of <i>P. monodon</i>	111
Figure 3.20 Genotype patterns at the CUPmo 23 locus of 15 individuals (lanes 1-15) of <i>P. monodon</i>	111
Figure 3.21 Genotype patterns at the CUPmo 7 locus of 12 individuals (lanes 1-12) of <i>P. monodon</i>	112
Figure 3.22 Allele distribution frequencies of <i>P. monodon</i> from Trad (Gulf of Thailand) at 21 microsatellite loci.....	113
Figure 3.23 Optimization of multiplex PCR reactions with co- amplification of loci CUPmo 15(a)+CUPmo 16(b).....	121
Figure 3.24 Optimization of multiplex PCR reactions with co- amplification of loci CUPmo15(a)+CUPmo16(b)+CUPmo 11(c).....	122
Figure 3.25 Optimization of multiplex PCR reactions with co- amplification of loci CUPmo15(a)+CUPmo16 (b)+CUPmo2(c) and CUPmo11(d).....	123

List of Figures (cont.)

	Page
Figure 3.26 Comparison of microsatellite patterns between the multiplex PCR set A (CUPmo 15+16+2+11) and their single locus PCR (a, b, c and d, respectively).....	124
Figure 3.27 Optimization of multiplex PCR reactions with co-amplification of multiplex set B (CUPmo 19+13+4).....	125
Figure 3.28 Comparison of microsatellite patterns between the multiplex PCR set B (CUPmo 19+13+4) and their single locus PCR (a, b and c, respectively).....	126
Figure 3.29 Optimization of multiplex PCR reactions with co-amplification of the multiplex set C (CUPmo 14+21+23)...	127
Figure 3.30 Comparison of microsatellite patterns between the multiplex PCR set C (CUPmo 23+21+14) and their single locus PCR (a, b and c, respectively).....	128
Figure 3.31 Comparison of microsatellite patterns between the multiplex PCR set D (CUPmo 22+24) and their single locus PCR (a and b, respectively).....	129
Figure 3.32 Comparison of microsatellite patterns of the multiplex PCR set B (CUPmo 19(a)+13(b)+4(c) between radioisotope and silver staining detection methods.....	132
Figure 3.33 Allelic inheritance of CUPmo 15 for mapping analysis of <i>P. monodon</i> family.....	135

List of Figures (cont.)

	Page
Figure 3.34 Allelic inheritance of multiplex set B (CUPmo 19+13+4) for mapping analysis of <i>P. monodon</i>	135
Figure 3.35 Linkage groups of 7 microsatellite loci derived from analyzing the data with AFLP.....	141

List of Abbreviations

°C	degree celsius
μCi	microcurie
μl	microlitre
μM	micromolar
bp	base pair
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dTTP	deoxythymidine triphosphate
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (disodium salt)
EtBt	ethidium bromide
PIC	polymorphic information content
h_{obs}	observed heterozygosity
IPTG	isopropyl-thiogalactoside
kb	kilobase pair
mCi	millicurie
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
mmol	millimole
mtDNA	mitochondrial DNA
cM	centiMorgan
θ	recombination fraction
ng	nanogram
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
pg	picogram
RAPD	random amplified polymorphic DNA

RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNase	ribonuclease
rpm	revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	second
T_m	melting temperature
TE	tris EDTA
Tris	tris(hydroxy methyl)aminomethane
U	unit
V	volt
VNTR	variable number of tandem repeats
w/v	weight/volume