การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์สำหรับปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*)

Development of Microsatellite Primers for Walking Catfish (*Clarias macrocephalus*)

ศรีจรรยา สุขมโนมนต์[1] และ สุภาวดี พุ่มพวง[1]

Srijanya Sukmanomon[1] and Supawadee Poompuang[1]

บทคัดย่อ

จากการสร้างห้องสมุดจีโนมของปลาดุกอุยและคัดเลือกด้วยโพรบ $(GT)_{15}$ ได้พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอปลาดุกอุยจำนวน 2,841 โคลน ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 173 โคลน พบว่า 41 โคลน มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยสามารถจำแนกประเภทของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอได้เป็น perfect, imperfect และ compound repeat ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะพบไมโครแซทเทลไลท์ประเภท perfect repeat (61.36%) และมีเบสซ้ำชนิด di-nucleotide มากที่สุด และสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 23 คู่ ซึ่งพบว่าไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยมีจำนวนอัลลิลอยู่ระหว่าง 2-13 อัลลิล และมีค่า observed heterozygosity อยู่ในช่วง 0.10-0.80 ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำไปใช้ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและสร้างแผนที่โครโมโซมของปลาดุกอุยต่อไปได้

ABSTRACT

Microsatellite loci were characterized in walking catfish random clones from a small genomic library using a $(GT)_{15}$ probe. Of 2,841 positive clones, 173 clones were sequenced and 41 of which contained microsatellites. They were characterized as perfect, imperfect and compound repeats. Most of the *C. macrocephalus* microsatellites isolated in this study contained dinucleotide core sequences with perfect repeats (63.36%). Primers for DNA amplifications using PCR were designed and synthesized for 23 loci. Twelve loci were polymorphic with the number of alleles ranging from 2-13 alleles per locus and the observed heterozygosity ranging from 0.10 to 0.80. Developed microsatellite primers will be useful for population studies and genetic mapping of walking catfish.

คำนำ

พันธุกรรมของปลาดุกอุยซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกำลังถูกคุกคามเนื่องจากการขนย้ายแม่พันธุ์ปลาดุกอุยต่างถิ่นไปผสมกับพ่อพันธุ์ปลาดุกยักษ์ เพื่อผลิตปลาดุกลูกผสมหรือปลาดุกบิ๊กอุย ลูกผสมที่ได้นี้บางส่วนไม่เป็นหมัน หากเล็ดลอดลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติอาจผสมกลับกับปลาดุกอุยได้ ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนทางพันธุกรรมและอาจนำไปสู่การสูญพันธุ์ของปลาดุกอุยในที่สุด การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาดุกอุยธรรมชาติมีความจำเป็นสำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้การเพาะเลี้ยงปลาดุกอุยทำได้อย่างยั่งยืน

[1] ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำ ไมโครแซทเทลไลท์เป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ โดยการซ้ำติดต่อกันไปเรื่อยๆ เป็นช่วงยาว โดยเบสซ้ำชนิดนี้พบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆ ของจีโนม และมีความผันแปรสูง ไมโครแซทเทลไลท์มีการแสดงผลแบบลักษณะข่มร่วม (co-dominant) จึงสามารถแปรผลเป็นลักษณะยีโนไทพ์คล้ายข้อมูลของไอโซไซม์ทำให้ข้อมูลที่ได้เหมาะสมในการวิเคราะห์ประชากรหรือชนิดพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกัน (O'Reilly และ Wright, 1995)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไพรเมอร์สำหรับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในปลาดุกอุย เพื่อใช้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมในปลาดุกอุยธรรมชาติจากแหล่งน้ำต่างๆ หรือเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากรพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟัก การวางแผนการจัดการพ่อแม่พันธุ์ หรือใช้ตรวจสอบพันธุ์ประวัติในปลาต่างครอบครัว และใช้สร้างแผนที่โครโมโซมของปลาดุกอุยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์แบบ Marker-Assisted selection

อุปกรณ์และวิธีการ

การสร้างห้องสมุดจีโนมและการคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจากห้องสมุดจีโนม

สกัดดีเอ็นเอจากเลือดปลาดุกอุย 1 ตัว ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Taggard และคณะ (1992) ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I, *Rsa*I และ *Hinc*II เชื่อมต่อดีเอ็นเอขนาด 300-1,000 คู่เบส เข้ากับพลาสมิด pUC18SmaI/BAP และนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* XL1-Blue ด้วยวิธี electrotransformation ตรวจสอบโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาแอมพิซิลิน, X-gal และ IPTG โดยโคโลนีที่มีสีขาวจะเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปลาดุกอุย คัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยโพรบ $(GT)_{15}$ โดยวิธี Colony hybridization ที่ดัดแปลงจาก Grunstein และ Hogness (1975)

การหาลำดับเบสและการออกแบบไพรเมอร์

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามหลักการ dideoxynucleotide chain termination โดยการใช้ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit และวิเคราะห์ผลด้วย ABI Prism® 377 DNA Sequencer ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสที่อยู่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Primer 3 (Rozen และ Skaletsky, 1998) และ OLIGO™ (National Bioscience Inc.)

การทดสอบไพรเมอร์และความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

ทดสอบระดับความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งในปลาดุกอุยจากแหล่งต่างๆ 10 ตัว โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ ดังนี้ 1) 94 °C 3 นาที จำนวน 1 รอบ 2) 94 °C 30 วินาที, annealing temperature (ตารางที่ 1) 30 วินาที, 72 °C 1 นาที จำนวน 35-40 รอบ และ 3) 72 °C 5 นาที จำนวน 1 รอบ แยกดีเอ็นเอบน denatured polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4.5% โดยใช้ sequencing gel apparatus (BioRad) ขนาด 30 x 40 เซนติเมตร ผ่านกระแสไฟฟ้า 60 W นานประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยวิธี silver staining ซึ่งขนาดของอัลลิลจะเทียบกับ M13 sequence ladder

ผลการทดลอง

จากการสร้างห้องสมุดจีโนมได้พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปลาดุกอุย จำนวน 2,841 โคลน และคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ได้จำนวน 302 โคลน ซึ่งในจำนวนนี้มี 173 โคลน ที่มีขนาดและความเข้มข้นของชิ้นส่วนดีเอ็นเอปลาดุกอุยเหมาะสมในการนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และพบว่ามีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 44 ตำแหน่ง จาก positive clones จำนวน 41 โคลน โดยแต่ละตำแหน่งจะต้องมีจำนวนชุดของเบสซ้ำมากกว่าหรือเท่ากับ 6 ชุด สำหรับ di-nucleotide repeat มากกว่าหรือเท่ากับ 4 ชุด สำหรับ tri-nucleotide repeat และมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ชุด สำหรับ tetra-, penta-, hexa-nucleotide repeat (Stalling และคณะ, 1991)

สามารถจำแนกไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอได้ 3 ประเภท คือ perfect repeat, imperfect repeat และ compound repeat ตามหลักการของ Weber (1990) โดยพบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอประเภท perfect repeat ที่มีเบสซ้ำชนิดเดียวกันไปเรื่อยๆ จำนวน 27 ตำแหน่ง (61.36%) ประเภท imperfect repeat ที่มีเบสอื่น 1-3 เบสเข้าแทรกในลำดับเบสซ้ำ จำนวน 15 ตำแหน่ง (34.09%) และประเภท compound repeat ที่มีเบสซ้ำหลายชนิดติดต่อกัน จำนวน 2 ตำแหน่ง (4.55%) และสามารถแบ่งออกเป็นไมโครแซทเทลไลท์แบบ di-nucleotide 35 ตำแหน่ง โดยมี core sequence เป็น $(CA)_n$, $(GT)_n$,$(CT)_n$, $(GA)_n$ และ $(TA)_n$, แบบ tri-nucleotide 5 ตำแหน่ง โดยมี core sequence เป็น $(TTA)_n$, $(ATT)_n$, $(CAT)_n$,$(TAA)_n$ และ $(AAT)_n$, แบบ tetra-nucleotide 2 ตำแหน่ง โดยมี core sequence เป็น $(TAAA)_n$ และ $(AAAG)_n$ และ แบบ penta-nucletide 2 ตำแหน่ง โดยมี core sequence เป็น $(TTGAA)_n$ จำนวนชุดซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์อยู่ระหว่าง 3-42 ชุด

จาก 41 โคลน ที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 44 ตำแหน่ง สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 23 คู่ พบไพรเมอร์ที่มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (polymorphic) จำนวน 12 คู่ และไพรเมอร์ที่ไม่มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (monomorphic) จำนวน 4 คู่ ส่วนอีก 7 คู่ไพรเมอร์ไม่เกิด PCR product ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์, ขนาดของอัลลิล, จำนวนอัลลิล และค่า observed heterozygosity ในแต่ละตำแหน่งนั้นแสดงรายละเอียดไว้ใน Table 1 ส่วนรูปแบบของอัลลิล (band pattern) ในบางตำแหน่งแสดงไว้ใน Figure 1

Table 1 Primer sequences, core sequences, annealing temperature, sizes of PCR products, number of alleles, observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E) and GenBank Accession Number for 16 microsatellite loci.

Locus	Primer sequences (5'-3')	Core sequences	T (ann.) (°C)	Size of PCR products (bp)	No. of allele	H_O	H_E*	GenBank Accession
*Cma-5**	TTT AGT CAA CGT GGC ACT GG TTA TCG GGT TTC GCA ACA AT	$(CA)_{26}$	55	248-286	11	0.70	0.93	AY 185606
*Cma-6**	GGG CAC TAA GGG GTC GCT CTC GGG GCT TCT GGG ACA TCC TCT	$(GT)_5(GA)_8$	50	232-239	3	0.30	0.28	AY 185607
*Cma-8**	CCG TGA TAC AAC TGT GAC T CGG TGC ACT GAA AGG	$(CA)_{26}$	55	212-286	12	0.40	0.95	AY185608
*Cma-12**	ATG ACC CTG TAA ATC TCC CTA CAT TCT CTC CGT CTC T	$(GT)_2AT(GT)_6(AT)_2(GT)_3$	50	108	1	0.00	0.00	AY 185609
*Cma-13**	TGA GGG GAG GCA GGA G TGT TTC TCA CTC TTG GCA TTT	$(CA)_{42}$	55	224-248	9	0.60	0.91	AY 185610
*Cma-14**	TAG AGA CAT TTA CGC TTC A TGC AAA GGC TAA TCA A	$(GT)_{34}$	50	178-212	10	0.50	0.87	AY 185611
*Cma-17**	CGC CAT TGT TGT GAT AAA G GAT GAA GAT AAA AGC GAA GGA	$(CA)_{27}$	55	184-250	13	0.70	0.94	AY 185612
*Cma-19**	ATC AGA GCC CTT TCA TCA CC CGT GCG AGT TCC CAG AG	$(GA)_8$	50	131-136	2	0.10	0.10	AY 185613

* Nei's (1978) unbiased heterozygosity were computed using Yeh *et.al* (1999)

Table 1 (continue)

Locus	Primer sequences (5'-3')	Core sequences	T (ann.) (°C)	Size of PCR products (bp)	No. of allele	H_O	H_E*	GenBank Accession
*Cma-20**	TGT AAA CCA GGG CTG ATT TGT TG AAA CGG TGG GGA CAA ACT GTA TC	$(GT)_{26}$	60	213-255	10	0.50	0.93	AY 185614
*Cma-21**	CTC GCT TAA AGG CAA GTT CAC TC CGC CAT ATA GCC ATA GAG GTG TG	$(CT)_9$	60	178-200	10	0.80	0.89	AY 185615
*Cma-22**	TGT GTA CGA GTG TGT TTC TCA GTG CAG TTA CAC ACT CAC GCA AAT CAG	$(GT)_{10}$	50	184-216	6	0.50	0.67	AY 185616
*Cma-23**	GCA ACC CAA CAA TGT GTT TAC AG TAT GAA AAA TAA CGT GCC TAC CG	$(AAT)_6GAG(AAT)_5N_{13}(CA)_3GC(CA)_3$	55	262-278	2	0.20	0.19	AY 185617
*Cma-24**	GCC TCT AAT CCG TCG TAA AAA TG TCA TGG GTA AAT CTG GCA GAA AG	$(CA)_5CG(CA)_2CG(CA)_7CG(CA)_4$	55	236-254	3	0.30	0.28	AY 185618
*Cma-25**	TCA CAA GAG TTG TTT CAT TTG CTG GGC TCT ACT CGA CAG GAA GTC AG	$(AAAG)_2AAGC(AAAG)_4$	55	198	1	0.00	0.00	AY 185619
*Cma-26**	TTT CAA AAT CTG GCT ATT CCA AGC TCA GCC AGT CAA ATT CAA TGT AGC	$(TTA)_7$	55	376	1	0.00	0.00	AY 185620
*Cma-27**	GGA AAC ATG TTG CGG TTA GTT TAG GTA AGC AGC CAG ACA AAA TGA CG	$(ATT)_2C(ATT)_3C(ATT)_2C(ATT)_4$	65	288	1	0.00	0.00	AY 185621

* Nei's (1978) unbiased heterozygosity were computed using Yeh *et.al* (1999)

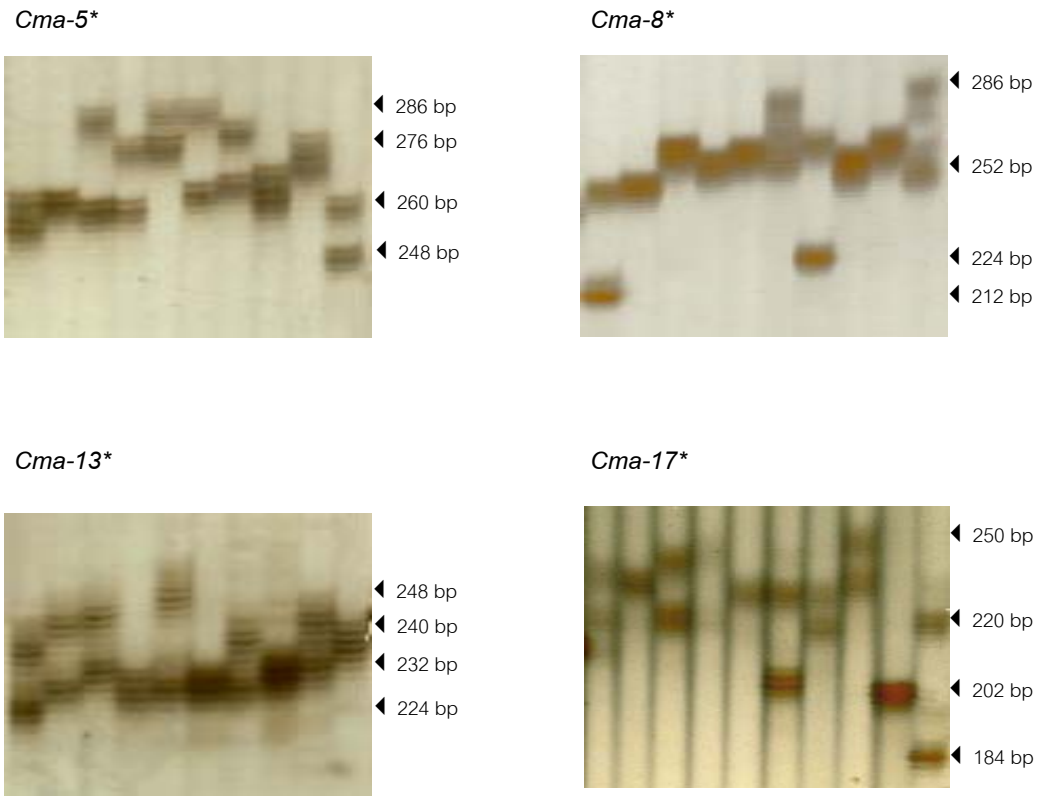

Figure 1 Banding patterns of *Cma-5**, *Cma-8**, *Cma-13** and *Cma-17**

วิจารณ์ผล

จากการสร้างห้องสมุดจีโนมปลาดุกอุยในครั้งนี้พบ positive clones ประมาณ 10% (302/2,841) ซึ่งมีค่าสูงกว่า 1.33% (32/2,400) ตามรายงานของ Na-Nakorn และคณะ (1999) แต่เปอร์เซ็นต์ positive clones ที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีค่าเพียง 23.6% (41/173) ซึ่งมีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับค่า 75% จากการศึกษาของ Na-Nakorn และคณะ (1999) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการคัดเลือก false positive clones หรือได้โคลนที่มีสัญญาณไม่ชัดเจนติดมาด้วย ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยนำ positive clones ไปทำ hybridization ซ้ำ เพื่อคัดเลือก clones ที่มีสัญญาณชัดเจนอีกครั้งหนึ่งก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Miller และ Kapuscinski, 1996) หรือเพิ่มขั้นตอนการทำ enrichment ก่อน colony hybridization ซึ่งจะทำให้ได้ positive clones สูงประมาณ 20-90% ในขณะที่การสร้างห้องสมุดจีโนมแบบดั้งเดิมส่วนใหญ่จะได้ positive clones ประมาณ 0.5-10% เท่านั้น (Billotte และคณะ, 1999) ซึ่งในปลา channel catfish พบว่าในการทำ enrichment ได้ positive clones 50 โคลน ที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอทั้งหมด และในจำนวนนี้มี positive clones จำนวน 36 โคลน ที่มี flanking region เพียงพอในการออกแบบไพรเมอร์ (Waldbieser และ Bosworth, 1997)

เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการพัฒนาไพรเมอร์จาก positive clones ที่นำไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในครั้งนี้ เท่ากับ 13.29% (23/173) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จ 12.5% (4/32) ที่ Na-Nakorn และคณะ (1999) ได้รายงาน ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการพัฒนาไพรเมอร์ในปลาดุกอุยทั้งสองครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับในปลาชนิดอื่นๆ เช่น African catfish (Galbusera และคณะ, 1996), common carp (Aliah และคณะ, 1999) และ brown trout (Estoup และคณะ, 1993), แต่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จต่ำกว่าเมื่อเทียบกับปลา channel catfish ที่มีเปอร์เซ็นค์ความสำเร็จในการพัฒนาไพรเมอร์ เท่ากับ 25% (Waldbieser และ Bosworth, 1997) เหตุผลที่ทำให้ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ในทุก positive clones เนื่องจากลำดับของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเออยู่ติดกับ vector มากเกินไป หรือการที่มีจำนวนชุดซ้ำน้อยเกินกว่าจะนับเป็นไมโคร-แซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หรือจากการที่ core sequence เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีจำนวนชุดซ้ำสูงมากจนทำให้มี flanking region ไม่เพียงพอในการออกแบบไพรเมอร์

จำนวนอัลลิลที่พบมีค่าอยู่ระหว่าง 2-13 อัลลิลต่อตำแหน่งนั้นมีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับค่า 5-30 อัลลิลต่อตำแหน่ง จากรายงานของ Na-Nakorn และคณะ (1999) สาเหตุอาจเนื่องมาจากการใช้ปลาดุกอุยเพียง 10 ตัวในการทดสอบความหลากหลาย การใช้ปลาดุกอุยจำนวนมากขึ้นในการทดสอบน่าจะพบจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งมากขึ้น พบว่าจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าใกล้เคียงกับปลา African catfish (5-14) (Galbusera และคณะ, 1996) และ channel catfish (3-17) (Waldbieser และ Bosworth, 1997) แต่จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งในปลาดุกอุยต่ำกว่า ปลา whiting (14-23) (Rico และคณะ, 1997) และปลา red sea bream (16-32) (Takagi และคณะ,1997) และสูงกว่าปลา common carp (5-9) (Aliah และคณะ, 1999) และปลา brown trout (5-6) (Estoup และคณะ,1993)

ไพรเมอร์ของปลาดุกอุยที่ได้พัฒนาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชากรธรรมชาติเพื่อวางแผนการอนุรักษ์ การจัดการพ่อแม่พันธุ์ การติดตามการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของประชากรโรงเพาะฟัก การตรวจสอบพันธุประวัติ การสร้างแผนที่โครโมโซมของปลาดุกอุย หรือใช้กับปลากลุ่ม clariid ชนิดอื่นที่มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการได้เช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

Aliah, R.S., M. Takagi, S. Dong, C.T. Teoh, and N. Taniguchi. 1999. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio*. Fisheries Science. 65: 235-239.

Billotte, N., P.J.L. Lagoda, Ange-M. Risterucci, and Franc-C. Baurens. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits. 54: 277-288.

Estoup, A. P. Presa, F. Krieg, D. Vaiman, and R. Guyomard. 1993. $(CT)_n$ and $(GT)_n$ microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). Heredity. 71: 488-496.

Galbusera, P., F.A. Volckaert, B. Hellemans, and F. Ollevier. 1996. Isolation and characterization of microsatllite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Molecular Ecology. 5: 703-705.

Grunstein, M. and D.S. Hogness. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs which contain a specific gene. Proc. Natl. Acid. Sci. USA. 72: 3961.

Miller, L.M. and A.R. Kapuscinski. 1996. Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in Northern Pike. Trans. Amer. Fish. Soc. 125: 971-977.

Na-Nakorn, U., N. Taniguchi, E. Nugroho, S. Seki, and W. Kamonrat. 1999. Isolation and characterization of microsatellite loci of *Clarias macrocephalus* and their application to genetic diversity study. Fisheries Scicence. 65: 520-526.

O'Reilly, P. and J.M. Wrigth. 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. J. Fish. Biol. 47 (suppl.A): 29-55.

Rico, C., K.M. Ibrahim, I. Rico, and G.M. Hewitt. 1997. Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers. J. Fish. Biol. 51: 462-475.

Rozen, S. and H.J. Skaletsky. 1998. Primer 3. Code available at http://www.genome.wi.mit.Edu/ genome-software/other/primer3.htm/

Stallings, R. L.,A.F. Ford, D. Nelson, D.C. Torney, C.E. Hildebrand, and R.K. Moyzis. 1991. Evolution and distribution of $(GT)_n$ repetitive sequences in mammalian genomes. Genomics, 10: 807-815.

Taggard, J.B., R.A. Hynes, P.A. Prodohl, and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. J. Fish. Biol. 40: 963-965.

Takagi, M., N. Taniguchi, D. Cook, and R.W. Doyle. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream, Pagrus major and detection in closely related species. Fisheries Science. 63: 199-204.

Waldbieser, G.C. and B.G. Bosworth. 1997. Cloning and characterization of microsatellite loci in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Animal Genetics. 28: 295-298.

Weber, J.L. 1990. Informativeness of human $(dC\text{-}dA)_n$ $(dG\text{-}dT)_n$ polymorphism. Genomics. 7: 524-530.

Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE VERSION 1.31 Microsoft windows-based software for population genetics analysis, University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada.