

# 大珠母贝两个野生群体遗传多样性的微卫星分析

谷龙春<sup>1,2</sup> 黄桂菊<sup>1</sup> 何毛贤<sup>3</sup> 喻达辉<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

(<sup>2</sup>上海海洋大学生命学院, 201306)

(<sup>3</sup>中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

**摘要** 利用 6 对微卫星 DNA 分子标记对三亚和北海的大珠母贝群体进行遗传多样性分析。结果表明, 两个群体的平均等位基因数  $A$  分别为 10.5 和 9.7, 平均有效等位基因数  $N_e$  为 7.0 和 6.3, 平均观察杂合度  $H_o$  为 0.588 和 0.445, 平均期望杂合度  $H_e$  为 0.859 和 0.828, 平均多态信息含量  $PIC$  为 0.853 和 0.796; 卡方检验发现只有位点 Pmx+022、Pmx16\_41 和 Pmx16\_23 在三亚种群中 Hardy-Weinberg 平衡偏离不显著 ( $P > 0.05$ ), 其他位点在两个种群都有不同程度的偏离。

**关键词** 大珠母贝 野生群体 遗传多样性 微卫星 DNA

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)04-0096-06

## Genetic diversity of two wild populations of pearl oyster *Pinctada maxima* as revealed by microsatellite DNA

GU Long-chun<sup>1,2</sup> HUANG Gui-ju<sup>1</sup> HE Mao-xian<sup>3</sup> YU Da-hui<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

(<sup>2</sup>College of Life Science and Technology, Shanghai Oceans University 201306)

(<sup>3</sup>South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301)

**ABSTRACT** Genetic variation between wild populations of *Pinctada maxima* from Sanya and Beihai was assessed by microsatellite DNA. The result showed that average number of alleles ( $A$ ) was 10.50 and 9.67, and average number of effective alleles ( $N_e$ ) was 7.01 and 6.33, respectively. The average observed heterozygosity ( $H_o$ ) was 0.588 and 0.445, and the expected average heterozygosity ( $H_e$ ) was 0.859 and 0.828, respectively. The average polymorphism information content ( $PIC$ ) was 0.853 and 0.796, respectively. Hardy-Weinberg equilibrium analysis revealed that these two populations showed some genetic disequilibria at the most loci except the loci of Pmx+022, Pmx16\_41 and Pmx16\_23 in Sanya population.

**KEY WORDS** *Pinctada maxima* Wild population Genetic diversity  
Microsatellite DNA

国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA10A415)和广东省科技兴海项目(A200701C02)共同资助

\* 通讯作者。E-mail:pearlydh@163.com

收稿日期:2007-12-22;接受日期:2008-07-20

作者简介:谷龙春(1982-),男,硕士研究生,主要从事海洋生物遗传育种研究。E-mail:gulongchun0502@163.com, Tel:13976095439

大珠母贝 *Pinctada maxima* Jameson 俗称白蝶贝,为国家二级保护动物(喻达辉等 2001),主要生活在热带、亚热带海区(蒙钊美等 1996;谢玉坎等 1990),最大个体壳高达 30 cm 以上,体重大于 5 kg(金启增 1992),是生产大型海水优质珍珠“南洋珠”最理想的母贝。我国大珠母贝的资源主要分布于雷州半岛、海南岛及西沙群岛沿海(谢玉坎等 1985),自 20 世纪 80 年代以来,大珠母贝野生资源日渐稀少,已濒临绝种的危险(林福申 1987)。因此为保护其种质资源及其合理利用,了解大珠母贝的遗传多样性信息十分必要而迫切。

微卫星 DNA 又称短串联重复(Short Tandem Repeat, STR)DNA,或简单序列重复(Simple Sequence Repeat, SSR)DNA,它广泛存在于真核生物及少数原核生物的基因组中(Hamada *et al.* 1982)。由于微卫星 DNA 具有分布广泛、多态性高、重复性好、符合孟德尔遗传模式和呈共显性等特点,是群体遗传多样性分析等最适遗传标记之一。目前,微卫星标记在水产领域特别是贝类种质资源和遗传育种方面的研究刚刚起步(刘芳等 2006;李莉好等 2006)。在大珠母贝方面,Smith 等(2003)和 Evans 等(2006)分别报道了 8 个和 6 个多态微卫星 DNA 标记。本研究利用 Smith 等(2003)报道的部分微卫星标记对海南三亚和广西北海两个野生大珠母贝地理群体进行遗传多样性分析,为进一步开展大珠母贝的群体遗传学分析、保护生物学研究和遗传育种等提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

本实验研究的大珠母贝两个群体分别于 2006 年 7 月采自海南三亚和广西北海,2 龄,各 30 个,剪取闭壳肌呈黄豆粒大小,固定于酒精中备用。

### 1.2 DNA 的提取

DNA 的提取按《分子克隆手册》(Sambrook *et al.* 1989)并略作修改(喻达辉等 2005)。基本过程包括:剪取闭壳肌约 100 mg,双蒸水漂洗两次,加 TEN9(50 mmol/L Tris · HCl, pH 9.0, 100 mmol/L EDTA, 200 mmol/L NaCl)裂解液 400  $\mu$ l,剪碎。再加入 TEN9 裂解液 100  $\mu$ l、10% SDS 150  $\mu$ l 和 10 mg/ml 蛋白酶 K 10  $\mu$ l, 56  $^{\circ}$ C 消化 2 h。分别用等体积饱和酚抽提 1 次,酚、氯仿和异戊醇(25:24:1)抽提两次,氯仿-异戊醇(24:1)抽提 1 次。加入两倍体积无水乙醇和 0.1 体积 3 mol/L NaAc(pH 5.2), -20  $^{\circ}$ C 沉淀 DNA 2 h。70%乙醇洗涤两次。干燥后,加 100  $\mu$ l 灭菌双蒸水溶解 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。提取的 DNA 放于 4  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.3 引物来源

按 Smith 等(2003)报道的大珠母贝 8 对微卫星引物序列进行合成,经过 PCR 筛选后挑选扩增较好的 6 对用于实验分析,其引物序列、退火温度和片段大小等信息见表 1。

表 1 大珠母贝微卫星引物序列及其特征

Table 1 Primers sequences and characteristics of *Pinctada maxima* microsatellite loci

位点 Locus	重复单元 Repeat unit	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	退火温度( $^{\circ}$ C) Annealing temperature	片断长度(bp) Size range(bp)	GenBank 注册号 GenBank registration no.
Pmx+014	(GA)18	F: GAA GAT TTG TCA AAG TTC AAG AC R: TAA GAT CAT AAT AGT CTC TCT TTC C	58 to 50	117~189	AY150171
Pmx+008	(TG)17(TCTG)6	F: CCT TAA GAT CGC TTG AAC R: TAG TTA TTC TTA CCG GCA G	58 to 50	118~302	AY150172
Pmx+022	(CT)17	F: ACA ATA AAG CGC CAT AGC R: TCA TCG TCT CAT CCT GAA C	58 to 50	139~197	AY150173
Pmx+020	(CT)16	F: TCA GAT GCC CAG AGT AAA C R: CTG GCA GTT ATC AAA TCA C	58 to 50	151~210	AY150174
Pmx16_23	(AC)10	F: AGT GAC CCT GAC CTT TGA CC R: GTC TGT AGA ATA TCG TAG GAG	58 to 50	219~285	AY150176
Pmx16_41	(GCAC)7	F: CAA TGA GTG TGG AAG TGG R: CAA AGA AGC GGA AAT TGA C	58 to 50	214~274	AY150177

## 1.4 PCR扩增及电泳检测

PCR反应体系参照Smith等(2003),包括10 mmol/L 10×buffer 2  $\mu$ l, 2 mmol/L dNTP 2  $\mu$ l, 25 mmol/L  $Mg^{2+}$  1.2  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L的引物各0.5  $\mu$ l, *Taq*酶1 U, 20 ng/ $\mu$ l DNA 1  $\mu$ l, 灭菌双蒸水12.7  $\mu$ l, 共20  $\mu$ l体系。反应程序为: 94  $^{\circ}$ C预变性3 min, 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 退火40 s, 72  $^{\circ}$ C延伸1.5 min, 退火温度采用58到50  $^{\circ}$ C梯度降落, 其中58、56、54和52  $^{\circ}$ C各5个循环, 50  $^{\circ}$ C 20个循环, 最后72  $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR产物在6%变性聚丙烯酰胺凝胶上恒功率(90 W)电泳约1 h, 银染检测。

## 1.5 数据分析

统计两个群体在6个微卫星位点上的等位基因组成、基因频率及其分布, 用POPGENE version 3.1(Yeh *et al.* 1999)计算各群体的平均等位基因数( $A$ )、平均有效等位基因数( $N_e$ )、平均观察杂合度( $H_o$ )、平均期望杂合度( $H_e$ )、Hardy-Weinberg平衡偏离指数( $d$ )和每个微卫星位点的多态信息含量( $PIC$ ), 用ARLEQUIN version 2.000(Schneider *et al.* 2000)分析两群体的遗传距离及遗传分化指数 $F_{ST}$ 等。

## 2 结果

### 2.1 遗传多样性

6个位点的等位基因数为6~18个不等, 其中位点Pmx+014获得18个等位基因, 等位基因数最多, 位点Pmx16\_23获得6个等位基因, 数量最少。6个位点在两群体中共获得65个等位基因, 其中三亚群体63个, 北海群体58个, 两群体共有的等位基因为56个, 三亚群体在位点Pmx+008、Pmx16\_23和Pmx+014分别有1个、2个和4个特有的等位基因, 北海群体仅在位点Pmx+014有两个特有的等位基因(表2)。三亚群体在6个位点的平均等位基因数为10.5个, 平均有效等位基因数为7.0个, 等位基因频率在0.033~0.333之间, 北海群体的平均等位基因数为9.7个, 平均有效等位基因数为6.3个, 等位基因频率在0.033~0.467之间。

6个位点在三亚群体的平均观测杂合度 $H_o$ 为0.583(0.300~0.833), 平均期望杂合度 $H_e$ 为0.859(0.785~0.915), 北海群体的平均观测杂合度为0.445(0.167~0.700), 平均期望杂合度为0.828(0.658~0.909)。位点Pmx16\_41在三亚群体中的观测杂合度大于期望杂合度, 偏离指数 $d>0$ , 其余位点在三亚群体中及6个位点在北海群体中 $d$ 值均小于0, 三亚群体的平均 $d$ 值偏离小于北海群体。三亚群体各位点的平均多态信息含量 $PIC$ 为0.826(0.740~0.892), 北海群体的平均多态信息含量 $PIC$ 为0.796(0.623~0.885)(表3)。

### 2.2 遗传距离与遗传分化

两群体间遗传一致性和遗传距离分别为0.8038和0.2184, 6个位点在两群体间的遗传分化指数 $F_{ST}$ 在0.0044~0.0642之间, 平均遗传分化指数 $F_{ST}$ 为0.0233(表3)。

## 3 讨论

遗传多样性(Genetic diversity)是指生物所携带遗传信息的总和, 它不仅指遗传变异高低, 也包括遗传变异分布格局, 即群体的遗传结构。一个物种的遗传变异愈丰富, 该物种对生存环境的适应能力便愈强, 它的进化潜力也愈大(张文静等 2003; O'Connell *et al.* 1997)。对遗传多样性的研究有助于人们更清楚地认识生物多样性的起源和进化, 为动植物的选择育种和遗传改良提供遗传背景信息。

### 3.1 遗传多样性和Hardy-Weinberg平衡

群体的遗传多样性通常用多态信息含量、等位基因数量和杂合度等指标来衡量。多态信息含量是反映群体多样性较好的指标, 一般认为, 在某一群体中, 当 $PIC>0.5$ 时该位点为高度多态, 当 $0.25<PIC<0.5$ 时,

表 2 大珠母贝两个群体 6 个微卫星位点的等位基因频率  
Table 2 Allelic frequencies at the six loci in the two *Pinctada maxima* populations

位点 Locus	等位基因 Allele	群体 Population		位点 Locus	等位基因 Allele	群体 Population		
		三亚 Sanya	北海 Beihai			三亚 Sanya	北海 Beihai	
Pmx+020	1	0.016 7	0.016 7	Pmx16_41	1	0.050 0	0.100 0	
	2	0.033 3	0.016 7		2	0.050 0	0.066 7	
	3	0.050 0	0.100 0		3	0.066 7	0.050 0	
	4	0.233 3	0.250 0		4	0.150 0	0.200 0	
	5	0.050 0	0.016 7		5	0.333 3	0.250 0	
	6	0.100 0	0.066 7		6	0.283 3	0.300 0	
	Pmx+022	7	0.033 3	0.050 0	Pmx16_23	7	0.066 7	0.033 3
		8	0.133 3	0.100 0		1	0.033 3	0.016 7
		9	0.133 3	0.066 7		2	0.116 7	—
		10	0.033 3	0.100 0		3	0.250 0	0.233 3
		11	0.133 3	0.166 7		4	0.183 3	0.466 7
		12	0.050 0	0.050 0		5	0.133 3	0.288 3
Pmx+008		1	0.033 3	0.050 0	Pmx+014	6	0.283 3	—
		2	0.050 0	0.050 0		1	0.033 3	0.033 3
		3	0.016 7	0.033 3		2	0.100 0	0.033 3
		4	0.166 7	0.116 7		3	0.066 7	0.133 3
		5	0.250 0	0.100 0		4	0.116 7	0.016 7
		6	0.100 0	0.133 3		5	0.050 0	0.150 0
	7	0.116 7	0.133 3	6		0.050 0	0.033 3	
	8	0.166 7	0.216 7	7		0.033 3	0.050 0	
	9	0.016 7	0.066 7	8		0.150 0	0.083 3	
	10	0.050 0	0.033 3	9		—	0.133 3	
	11	0.033 3	0.066 7	10		0.183 3	0.166 7	
	1	0.033 3	0.033 3	11		0.016 7	—	
2	0.016 7	0.033 3	12	0.016 7	0.050 0			
3	0.100 0	0.066 7	13	0.033 3	0.033 3			
4	0.100 0	0.050 0	14	0.066 7	—			
5	0.133 3	0.066 7	15	0.033 3	0.050 0			
6	0.066 7	0.183 3	16	0.033 3	—			
7	0.166 7	—	17	—	0.033 3			
8	0.050 0	0.350 0	18	0.016 7	—			
9	0.183 3	0.066 7						
10	0.066 7	0.050 0						
11	0.083 3	0.100 0						

表 3 大珠母贝三亚/北海群体 6 个位点的遗传多样性参数  
Table 3 Genetic diversity of Sanya/Beihai populations of *Pinctada maxima* at six loci

位点 Locus	等位基因数 A	有效等位基因数 $N_e$	观察杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	HW 平衡 偏离指数 $d$	HW 平衡检测 P 值	多态信息含量 PIC	分化指数 $F_{ST}$
Pmx+020	12/12	7.8/7.4	0.467/0.567	0.886/0.880	-0.474/-0.356	0.000/0.000	0.859/0.853	0.004 8
Pmx+022	11/11	6.7/8.2	0.733/0.700	0.865/0.893	-0.152/-0.216	0.475/0.000	0.834/0.860	0.009 6
Pmx+008	11/10	8.4/5.4	0.300/0.267	0.896/0.827	-0.665/-0.678	0.000/0.000	0.870/0.795	0.043 4
Pmx16_41	7/7	4.4/4.8	0.833/0.567	0.785/0.803	0.061/-0.294	0.165/0.001	0.740/0.759	0.004 4
Pmx16_23	6/4	4.8/2.8	0.600/0.167	0.805/0.658	-0.254/-0.747	0.198/0.000	0.760/0.623	0.064 2
Pmx+014	16/14	10.0/9.4	0.567/0.400	0.915/0.909	-0.381/-0.560	0.000/0.000	0.892/0.885	0.016 6
平均 Mean	10.5/9.7	7.0/6.3	0.583/0.445	0.859/0.828	-0.311/-0.475	0.140/0.000	0.826/0.796	0.023 3

该位点为中度多态,当  $PIC < 0.25$  时,该位点为低度多态(Nei 1972)。本研究中,大珠母贝三亚群体和北海群体6个位点的  $PIC$  值在  $0.623 \sim 0.892$  之间,表明这两个群体的遗传多样性高。但在等位基因数量方面,6个位点在两个群体中的等位基因数量(6~16个)仍然低于澳大利亚野生群体的等位基因数量(14~68个)(Smith *et al.* 2003),而本实验得到的观测杂合度( $0.167 \sim 0.833$ )和期望杂合度( $0.658 \sim 0.915$ )也相应的低于 Smith 等(2003)报道的  $0.479 \sim 0.891$  和  $0.872 \sim 0.972$ 。说明我国沿海大珠母贝的遗传多样性有一定的丢失,这可能与近年我国大珠母贝资源量降低有关。

微卫星 DNA 本身是选择中性的,不受选择压力影响,在一个理想群体中,各等位基因在群体中的分布频率应该是稳定的。Hardy-Weinberg 平衡遗传偏离指数( $d$ ),是反应群体在某位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡程度的参数; $d < 0$ ,表明某群体在该座位杂合子缺失,当  $d > 0$ ,则表明该群体在该座位杂合子过剩,数值大小则表明缺失或过剩的程度。本研究中只有位点 Pmx16\_41 在三亚群体中表现为杂合子过剩,其余位点均为杂合子缺失,6个位点在北海群体中均为杂合子缺失,有关报道已表明双壳类天然群体中杂合子缺失的现象较普遍(Zouros *et al.* 1980,1984),但对该现象还未取得一致的解释,其说法包括自然选择、选型交配和种群混杂等。

6个位点在三亚和北海群体中 Hardy-Weinberg 平衡的显著性检验表明,在三亚群体中,位点 Pmx+020、Pmx+008、Pmx+014 偏离不显著,位点 Pmx+022、Pmx16\_41 和 Pmx16\_23 偏离显著,在北海群体中6个位点都显著偏离平衡。这也反映了在这些位点上发生了一定程度的遗传信息的丢失。结合多态信息含量等信息,表明我国这两个地区大珠母贝的遗传多样性虽然较高,但已表现出一定程度的丧失,造成这种现象的主要原因可能是由于海区环境变化和人为捕捞等导致大珠母贝野生群体数量大量减少,致使遗传结构改变。此外,由于少量大珠母贝亲本可产生大量子代,因此后代群体可能由少量亲本产生,因而后代群体等位基因数量减少,产生遗传漂变和偏离 Hardy-Weinberg 平衡。这种情况在许多具有类似繁殖生物学特征的水生动物群体中均有发生,如栉孔扇贝(宋林生等 2002)、大菱鲆(Coughlan *et al.* 1998)、鲤鱼(Desvignes *et al.* 2001)和大西洋鲑(Norris *et al.* 1999)等。因此在保护大珠母贝种质资源时,首先应注重其生存海域的保护,最大限度的减少人为捕捞,必要时划定范围,重点保护,增加野生群体数量,防止野生种质资源的灭绝。同时应注意野生种质资源的人工繁育和优良品系的选育工作,减少对野生资源的压力,或采用引种措施,以增加我国大珠母贝群体的遗传多样性。

### 3.2 遗传距离与遗传分化

两群体间的分析表明,三亚群体的等位基因数、多态信息含量均高于北海群体,北海群体的杂合子缺失程度高于三亚群体。两群体的遗传一致性和遗传距离分别为  $0.8038$  和  $0.2184$ 。Nei(1987)总结了同工酶检测所得的遗传距离的研究资料,他指出:不同地理群体之间的遗传距离变化在  $0.00 \sim 0.05$  的范围内,亚种之间的变化范围则大于  $0.05$ 。本实验结果不符合这一规律,这与不同标记的检测差异有关,杜晓冬(2001)在合浦珠母贝遗传多样性的研究中也发现在 DNA 水平所测得的遗传距离值比同工酶检测的高约  $3.5$  倍;平均多态位点比例也比同工酶的数值高约两倍。

6个位点在两群体的遗传分化分析表明,群体间不同位点的分化程度不同。遗传分化指数是表示群体间遗传分化程度的重要参数,当该参数在  $0 \sim 0.05$  时,群体间遗传分化较弱,在  $0.05 \sim 0.15$  时,遗传分化中等,  $0.15 \sim 0.25$  时,遗传分化较大;当大于  $0.25$  时,表示群体间分化极大。在两群体间的总的遗传分化指数  $F_{ST}$  为  $0.0233$ ,表明有  $2.33\%$  的遗传变异来自于群体间; $97.67\%$  的遗传变异来自于群体内,两群体间的分化程度较弱。

## 参 考 文 献

- 刘芳,刘卫东,王强,刘晓慧,赫崇波,候林. 2006. 微卫星标记及其在贝类遗传选育研究中的应用. 水产科学, 25(5): 268~270  
李莉好,喻达辉. 2006. 基因组微卫星分离方法及其在水产动物中的应用. 南方水产, 2(5): 74~80

- 宋林生,李俊强,李红蕾,崔朝霞,李成华,胥炜,常亚青. 2002. 用 RAPD 技术对我国栉孔扇贝野生种群和养殖种群的遗传结构及其遗传分化的研究. 高技术通讯, 12(7):83~86
- 张文静,余育,沈韞芬. 2003. 微卫星 DNA 遗传分析在原生动生物学中的研究进展. 水生生物学报, 27(2):185~190
- 苏天风,朱彩艳,江世贵. 2005. 海南岛大珠母贝遗传多样性分析. 海洋科学, 29(8):20~22
- 杜晓冬. 2001. 合浦珠母贝两个野生种群遗传多样性的研究. 见:中国科学院海洋研究所学位论文:70~71
- 林福申. 1987. 中国名贵珍稀水生动物. 杭州:浙江科学技术出版社,9~10
- 金启增. 1992. 珍珠贝种苗生物学. 北京:海洋出版社,8~9
- 喻达辉,王小玉,郭奕惠,黄桂菊,王爱民. 2005. RAPD 标记在合浦珠母贝家系 F1 代的分离方式. 南方水产, 1(6):1~7
- 喻达辉,汪亚平,吴开畅,胡炜,朱传华. 2001. 大珠母贝基因转移的点击参数. 水产学报, 25(5):408~412
- 谢玉坎,林碧萍,张德. 1990. 大珠母贝及其养殖珍珠. 北京:海洋出版社,5~8
- 谢玉坎,林碧萍,胡亚平. 1985. 大珠母贝及其养殖珍珠. 北京:海洋出版社,46~47
- 蒙利美,李有宁,邢孔武. 1996. 珍珠养殖理论技术. 北京:科学技术出版社,34~35
- Coughlan, J. P., Imsland, A. K., and Galvin, P. T. 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: A preliminary study. Fish Biology, 52(5):916~922
- Desvignes, J. F., Laroche, J., Durand, J. D., and Bouvet, Y. 2001. Genetic variability in reared populations of common carp (*Cyprinus carpio*) based on allozymes and microsatellites. Aquaculture, 194:291~301
- Evans, S. B., Knauer, J., Taylor, U. J. J., and Jerry, D. R. 2006. Development and characterization of six new microsatellite markers for the silver-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima* (Pteriidae). Molecular Ecology Notes, 10:1~3
- Hamada, H., Petrino, M. G., and Kakunaga, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely unfound in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 79(21):6465~6469
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Animal Nature, 106:283~229
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York
- Norris A T., Bradley, D. G., and Cunningham, E. P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. Aquaculture, 180:247~264
- O'Connell, M., and Wright, J. M. 1997. Microsatellite DNA in fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 7:331~363
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (Second edition). Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 954~955
- Schneider, S., Roessli, D., and Excoffer, L. 2000. Arlequin Version 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland
- Smith, C., Benzie, J. A., and Wilson, K. J. 2003. Isolation and characterization of eight microsatellite loci from silver-lipped pearl oyster *Pinctada maxima*. Molecular Ecology Notes, 3:125~127
- Yeh, F. C., Yang, R., and Boyle, T. 1999. POPGENE Version 3.1: Microsoft Window based freeware for population genetics analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research
- Zouros, E., and Foltz, D. W. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. J. Malacologia, 25:583~291
- Zouros, E., Singh, S. M., and Miles, H. E. 1980. Growth rate in oysters: an over dominant phenotype and its possible explanations. J. Evolution, 34: 856~867