

유전적 다양성이 고려되지 않은 어미 관리에 의한 양식 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 유전적 다양성의 변화

노재구* · 김현철 · 박철지 · 이정호 · 김종현 · 이미숙 · 김우진¹ · 김경길¹ · 명정인

국립수산과학원 육종연구센터, ¹국립수산과학원 생명공학연구소

Genetic Variability of Farmed Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Populations Managed with no Consideration of Genetic Diversity by Jae Koo Noh*, Hyun Chul Kim, Choul Ji Park, Jeong-Ho Lee, Jong-Hyun Kim, Mi-Sug Lee, Woo-Jin Kim¹, Kyung-Kil Kim¹ and Jeong-In Myeong (Genetics and Breeding Research Center, NFRDI, Gyeongsangnamdo 656-842, Korea; ¹Biotechnology Research Center, NFRDI, Busan 619-902, Korea)

ABSTRACT Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) is one of the most popular farmed fish in Korea. Genetic variability of the fish was investigated by means of microsatellite DNA markers. All of the 8 microsatellite loci were analyzed in this study. For the confirmation of genetic variation during a shift in generation, microsatellite variability was compared within the same hatchery strains but produced in different spawning years. When genetic variability of farmed flounders produced in 2006 and 2007 was compared with that of 2003, a marked reduction of genetic variability was observed in the 2006 and 2007 populations. Mean number of alleles per locus and expected mean heterozygosity decreased from 9.75 and 0.796 (in 2003 population) to 7.78 and 0.785 (in 2006 population), respectively. Moreover, we have observed the distortion of allele frequency. These results show that reduced genetic variability of farmed olive flounder in processed generation has lower numbers of alleles and genetic variability than these of wild fish. Our results suggest that to have a sustainable aquaculture of this species, there is need for scientific broodstock management based on genetic variation and more intensive breeding practices to improve genetic diversity and to avoid detrimental inbreeding effects.

Key words : *Paralichthys olivaceus*, olive flounder, genetic variability, microsatellite

서 론

넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 우리나라의 중요한 연안 어족 자원일 뿐 아니라, 전체 어류 생산량의 48%를 차지하는 대표적인 양식 어종이다. 넙치 양식 생산량은 2000년 14,127톤이던 것이 2006년에는 43,852톤으로 증가하여, 금액으로는 4,589억원에 이르는 우리나라 양식 산업의 근간이지만(해양수산부, 2006), 점차 생산성의 하락으로 양식 어가가 많은 어려움에 처해 있다. 이러한 양식 생산성 하락은 사료비, 인건비 등 생산단가 상승의 외적 요인뿐 아니라 성장률 저하, 기형 발생률 증가, 생존율 감소 등 양식 넙치 자체의 문제점이 원인으로 지적되고 있다. 특히 새로운 병원

체에 대한 반응 능력의 감소(O'Brien and Evermann, 1989)와 환경에 대한 적응력이 줄어드는(Carvalho and Haeser, 1994) 등의 내적 요인들은 집단의 유전적인 조성과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.

유전적 다양성은 집단의 효과적인 크기와 관련이 있어, 집단 크기의 감소는 유전적 흐름(genetic drift)을 변화시키게 되므로 이러한 유전적 흐름의 변화는 대립유전자의 빈도의 변화를 일으키게 하며, 일부 대립유전자의 소실 또는 고정화를 초래하게 된다(Garza and Williamson, 2001). 특히 양식 넙치와 같은 한정된 어미 집단은 다음 세대에 기여하는 어미의 수, 부모의 성비의 불균형, 가계의 크기 등과 같은 요소들에 영향을 받아 전형적으로 유전적 다양성이 감소되는 것으로 알려져 있다(Sekino *et al.*, 2003). 집단 크기의 감소 여부는 집단의 유전적인 자료를 이용하여 분석하

*교신저자: 노재구 Tel: 82-55-633-1272, Fax: 82-55-633-0891, E-mail: jknoh@nfrdi.go.kr

는 방법들이 제시되고 있는데, 계놈 내 DNA 염기 서열 중 에서 2~5개의 염기가 특징적으로 반복되는 특징을 갖는 microsatellite는 반복 정도에 따라 다양한 대립유전자가 존재하여 집단 및 개체의 유전적 특성 규정 및 어미 집단의 관리 등에 매우 유용하게 이용된다(Sekino *et al.*, 2004).

우리나라 넙치 양식 산업의 구조는 수정란 생산업체와 수정란으로부터 부화 및 종묘를 만드는 종묘 생산업체, 그리고 이들 종묘를 상품 크기까지 키우는 양성업체로 크게 3단계로 구성되어 있다. 따라서 우리나라 양식 넙치의 다양성은 이들 수정란 생산업체의 어미들에 의해 결정된다. 수정란 생산업체의 산란 어미들은 자체적인 어미 관리 프로그램에 의해 관리되어지는데, 이때 민간 양식업체에서 선발하는 어미들은 집단 내에서 성장이 우수한 선두그룹으로 주로 외형적인 형질만이 고려될 뿐, 어미 집단의 유전적 조성에 대한 분석을 통해 가입시키기는 어려운 실정이다.

따라서 본 연구에서는 유전적인 조성을 고려하지 못하고 한정된 어미 집단 내에서 외형적인 형질만으로 어미를 선발 관리하고 있는 민간 넙치 양식장의 어미 관리 시스템 하에서의 어미 세대의 변화에 따른 유전적 다양성의 변화 정도를 알아보고자 하였다. 이에 동일한 수정란 생산업체에서 각기 다른 년도에 산란된 수정란으로부터 생산된 넙치의 유전적 다양성의 변화를 microsatellite DNA marker를 이용하여 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험어

실험어는 유전적인 조성에 대한 고려없이 관리되고 있는

어미로부터 수정란을 생산하고 있는 수정란 생산업체에서 수정란을 구입하여 국립수산물과학원 육종연구센터에서 부화시킨 넙치를 이용하였다. 분석에 사용된 넙치는 2003년 산란된 수정란으로부터 부화한 치어 중 94마리와, 2006년 산란된 수정란으로부터 부화한 치어 중 156마리, 그리고 2007년 산란된 수정란에서 부화된 치어 중 151마리였다.

2. 어미관리

실험에 사용된 수정란을 구입한 생산업체에서의 산란어미 관리는 약 1,000여 마리의 어미를 보유하며, 계대 사육 중인 넙치 집단 내에서 외형적으로 성장이 우수한 선두그룹을 선발하여 3년산 어미에서 이후 3년간 수정란을 생산하고 있었으며, 매년 전체 어미의 1/3에 해당하는 어미들을 새로이 가입시키고 오래된 어미들을 차례로 폐기하는 방식으로 3년을 주기로 어미 그룹 전체가 바뀌도록 관리하고 있었다.

3. Microsatellite 분석

유전적 다양성 분석은 *KOP2*, *KOP3*, *KOP9*, *KOP18* (Kim *et al.*, 2003), *PoliRC47*, *Poli9-8* (Coimbra *et al.*, 2001) 및 *Po89*, *Pol* (Sekino and Hara, 2000), 등 8개의 microsatellite 좌위를 이용하였다(Table 1). 실험어로부터의 DNA 추출은 chelating resin method (Walsh *et al.*, 1991; Suenaga and Nakamura, 2005)를 이용하여 추출하였다. 0.1 mg 이하의 치어 조직을 5% chelex 100 (Bio-Rad, USA) 200 μ L와 proteinase K가 최종 농도 100 μ g/mL로 포함된 용액에 넣고 50°C에서 20분, 이어 100°C에서 5분간 반응시키고, 교반 후 6,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액 내의 DNA를

Table 1. Characterization of microsatellite markers used in this study

Locus	Primer sequences (5' → 3')	Repeat motif	GenBank accession No.
<i>KOP2</i>	GCGACTCTCAAAAATCCGTCAG GGACTTTGTGGGGTTTCAGGA	(CA) ₆ CG(CA) ₁₄	AY328958
<i>KOP3</i>	AGAGGATATCGAGGGGAGG CAGCAGTAGCCGATCTTAGTG	(GACA) ₂ (CA) ₁₀	AY328959
<i>KOP9</i>	ATCAGGAACGGGAGAGACTC GAGTTCGTCTTCGTCTTCA	(AC) ₅ AA(CA) ₁₇ AT(AC) ₂ TC(TG) ₂ TTT(TG) ₉	AY328965
<i>KOP18</i>	GAAGGATCTGGACTCATGGTGAC CAGCAGCAAAGGCAGAAAGAG	(TC) ₂₄	AY328973
<i>PoliRC47</i>	TGACCAGACGCACTGAGTTC TCTGCTTCACTGACAAAAACA	(CA) ₁₆ (GA)(CA)(GA)(CA) ₆	AB030938
<i>Poli9-8</i>	GAGAGACAGAAGGTCGTCACGGTA ACAAAGACCACGATGCAAAGTGAC	(GA) ₂ (CT)(CC)(GA) ₂ (CA) ₁₄	AB037989
<i>Po89</i>	ATCAGAAGTCATCCATGCACTGGCAC AGCTACTTATCCACAGGTGTCGACGG	(TA) ₃ (CA) ₇	AB046760
<i>Pol</i>	GCCTTTTGTGAGCCATTAACAGAGC CTGAGGCCAGACATGACATTACCTT	(TG) ₅ T ₂ (TG) ₈	AB046745

PCR 반응에 이용하였다.

PCR 반응 용액은 주형 DNA 50 ng, 10X buffer, 5X band doctor, 10 mM dNTP, f-Taq DNA polymerase (Solgent, Korea), 그리고 각 10 pmol에서 20 pmol의 primer 쌍이 혼합된 총 반응액 15 µL로 multiplex PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 10분의 초기변성 (initial denaturation) 1회 이후, 95°C에서 20초, 60°C에서 40초, 72°C에서 1분의 과정을 35회 반복 수행 후, 72°C에서 10분의 최종신장 (final extension) 과정을 Dyad thermal cyler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 수행하였다.

Multiplex PCR 반응을 통하여 증폭된 넙치 microsatellite 좌위는 size standard로 GeneScan 400HD ROX (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 유전자형 분석기 (3100 genetic analyzer; Applied Biosystems, USA)를 통하여 나타난 형광 피크를 GeneMapper v3.7 software를 이용하여 유전자형을 분석하였다.

4. 통계학적 분석

넙치 집단들의 유전학적 다양성 분석을 위해 유전자좌단

Table 2. Genetic variability within the studied hatchery strains: sample size (n), numbers of alleles observed (A) and allelic richness (A_R), expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity, significance of the probability test for deviation from expected Hardy-Weinberg proportions (P_{HW}), inbreeding coefficient (F_{IS}), and polymorphism information content (PIC)

Locus	Spawning year			Locus	Spawning year				
	2003	2006	2007		2003	2006	2007		
KOP2	n	94	154	151	PoliRC47	n	94	155	151
	A	12	11	11		A	11	10	9
	A_R	12.00	10.93	10.97		A_R	11.00	9.42	9.00
	H_O	0.872	0.870	0.861		H_O	0.851	0.729	0.821
	H_E	0.821	0.823	0.826		H_E	0.833	0.802	0.803
	P_{HW}	0.343	0.069	0.373		P_{HW}	0.233	0.002*	0.137
	F_{IS}	-0.063	-0.058	-0.043		F_{IS}	-0.022	0.091	-0.023
	PIC	0.801	0.799	0.805		PIC	0.806	0.770	0.773
KOP3	n	94	156	151	Poli9-8	n	94	155	151
	A	5	5	5		A	8	8	7
	A_R	5.00	5.00	4.99		A_R	8.00	7.63	7.00
	H_O	0.564	0.699	0.642		H_O	0.809	0.761	0.781
	H_E	0.567	0.699	0.625		H_E	0.790	0.725	0.741
	P_{HW}	0.195	0.981	0.000*		P_{HW}	0.261	0.573	0.642
	F_{IS}	0.005	0.001	-0.028		F_{IS}	-0.024	-0.050	-0.054
	PIC	0.515	0.645	0.571		PIC	0.753	0.681	0.698
KOP9	n	94	147	151	Po89	n	94	155	151
	A	10	9	10		A	10	9	9
	A_R	10.00	8.59	9.96		A_R	10.00	8.99	9.00
	H_O	0.819	0.762	0.815		H_O	0.830	0.826	0.841
	H_E	0.830	0.745	0.770		H_E	0.824	0.827	0.832
	P_{HW}	0.112	0.230	0.115		P_{HW}	0.024	0.184	0.013*
	F_{IS}	0.013	-0.023	-0.058		F_{IS}	-0.007	0.001	-0.011
	PIC	0.806	0.713	0.742		PIC	0.796	0.801	0.809
KOP18	n	94	153	151	Pol	n	94	151	151
	A	15	13	15		A	7	7	6
	A_R	15.00	12.95	14.91		A_R	7.00	6.72	6.00
	H_O	0.872	0.928	0.874		H_O	0.777	0.762	0.636
	H_E	0.905	0.894	0.896		H_E	0.798	0.761	0.732
	P_{HW}	0.556	0.004*	0.002*		P_{HW}	0.011*	0.832	0.001*
	F_{IS}	0.036	-0.038	0.025		F_{IS}	0.027	-0.001	0.132
	PIC	0.892	0.881	0.884		PIC	0.763	0.719	0.692
Mean	n	94	156	151	Mean	n	94	156	151
	A	9.75	9.13	9.00		A	9.75	9.13	9.00
	A_R	9.75	7.78	8.98		A_R	9.75	7.78	8.98
	H_O	0.799	0.792	0.784		H_O	0.799	0.792	0.784
	H_E	0.796	0.785	0.778		H_E	0.796	0.785	0.778
	F_{IS}	-0.004	-0.010	-0.008		F_{IS}	-0.004	-0.010	-0.008
	PIC	0.767	0.751	0.747		PIC	0.767	0.751	0.747

*P>0.05

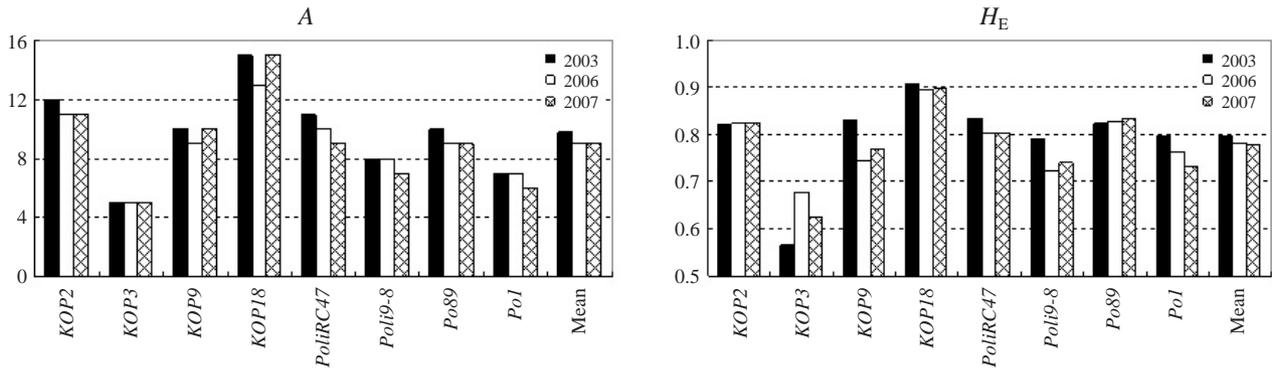


Fig. 1. Average number of alleles (A) and expected heterozygosity (H_E) compared within same hatchery strains of *P. olivaceus* hatched in 2003, 2006 and 2007.

대립유전자수 (allele number per locus), 대립유전자 빈도 (allele frequencies), 관찰치 이형접합률 (observed heterozygosities: H_o), 기대치 이형접합률 (expected heterozygosities: H_e) 및 PIC (polymorphism information content) 등을 Cervus 2.0 프로그램 (Marshall *et al.*, 1998)을 이용하여 분석하였다. 또한 Markov-chain method에 의한 Fisher's exact test를 하여 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 유의성 검증은 GENEPOP version 3.4 software (Raymond and Rousset, 1995)를 이용하였다. FSTAT (Goudet, 1995) 프로그램을 이용하여 HWE에서 벌어지는 정도를 파악하기 위해서 F_{IS} 값을 구한 후 유의성 검증을 하였으며, 최소 샘플수를 기준으로 대립유전자수를 보정하는 allelic richness를 구하였다.

결 과

민간 양식산 넙치 집단에서 세대의 경과에 따른 유전적 다양성의 변화 여부를 확인하고자 동일한 수정란 생산업체에서 2003년 및 2006년, 2007년 산란된 수정란으로부터 각각 생산된 넙치를 총 8개의 microsatellite DNA marker로 분석하였다 (Table 2).

대립유전자 수는 microsatellite marker에 따라 5개에서 15개까지 다양하게 나타났으며, 평균 대립유전자 수는 2003년 9.75개에 비해 2006년 9.13개, 2007년 9.00개로 약간 감소하는 경향으로 나타났다 (Fig. 1). 집단 크기에 따른 대립유전자 수의 차이를 보정하여 최소 시료수인 2003년 94마리를 기준으로 한 대립유전자 보정치 (allelic richness)는 2003년 9.75개에 비해 2006년이 7.78개로 가장 낮게 나타났으나, 유의적인 수준에서의 급격한 유전적 다양성의 감소로는 나타나지 않았다 (Kruskal-Wallis test, $df=2$, Chi-square 0.97, $P<0.05$).

이형접합률은 0.905부터 0.657까지 microsatellite marker

에 따라 다양하였으나, 2003년 평균 기대치이형접합률 0.796에 비해 2006년, 2007년 각각 0.785와 0.778로 낮게 나타났으나 (Fig. 1), 유의적인 수준에서의 유전적 다양성의 감소로는 나타나지 않았다 (Kruskal-Wallis test, $df=2$, Chi-square 1.00, $P<0.05$).

대립유전자 빈도에 있어서는 연도 별로 변동이 심하여 특정 대립유전자에 편중되어 나타나거나, 일부 대립유전자가 소실 또는 새로이 나타나는 등 왜곡된 모습을 나타내었다 (Fig. 2). 그러나 KOP2에서 대립유전자 104가 새롭게 나타난 반면 96, 110 등 2개의 대립유전자가 소실된 것과 같이 KOP9, PoliRC47, Poli9-8, Po89 및 Pol 등 6개의 marker에서 총 4개의 대립유전자가 새로이 나타남에 비해 10개의 대립유전자가 소실된 것으로 나타나 대립유전자의 감소 경향을 보여주었다.

집단내 유전적 다형성 정도를 보여주는 근교계수인 F_{IS} 값은 2003년에 -0.004 , 2006년에 -0.010 , 그리고 2007년에 -0.008 로 유의적인 수치를 나타내었다.

고 찰

양식 집단의 유전적 다양성 축소는 질병에 대한 저항력을 약화시키고 환경에 대한 적응력을 감소시키는데, 이러한 양식 집단의 유전적 다양성 축소 원인은 양식 어미 집단의 크기가 작을 경우 일어나는 것으로 알려져 있다 (Carvalho and Haeser, 1994). 집단 크기가 감소하면 적은 빈도로 나타나는 대립유전자의 소실이 일어나게 되게 되며, 드문 빈도의 대립유전자는 이형접합기대치에 비교적 적게 기여를 함으로써 이형접합관찰치가 평형의 집단에 비해 높게 나오게 된다 (Cornuet and Luikart, 1996). 본 결과에서는 2003년에 비해 2006년과 2007년의 경우 관찰치이형접합률이 높은 marker가 많이 보여짐으로써, 어느 집단이 HWE에 따르는

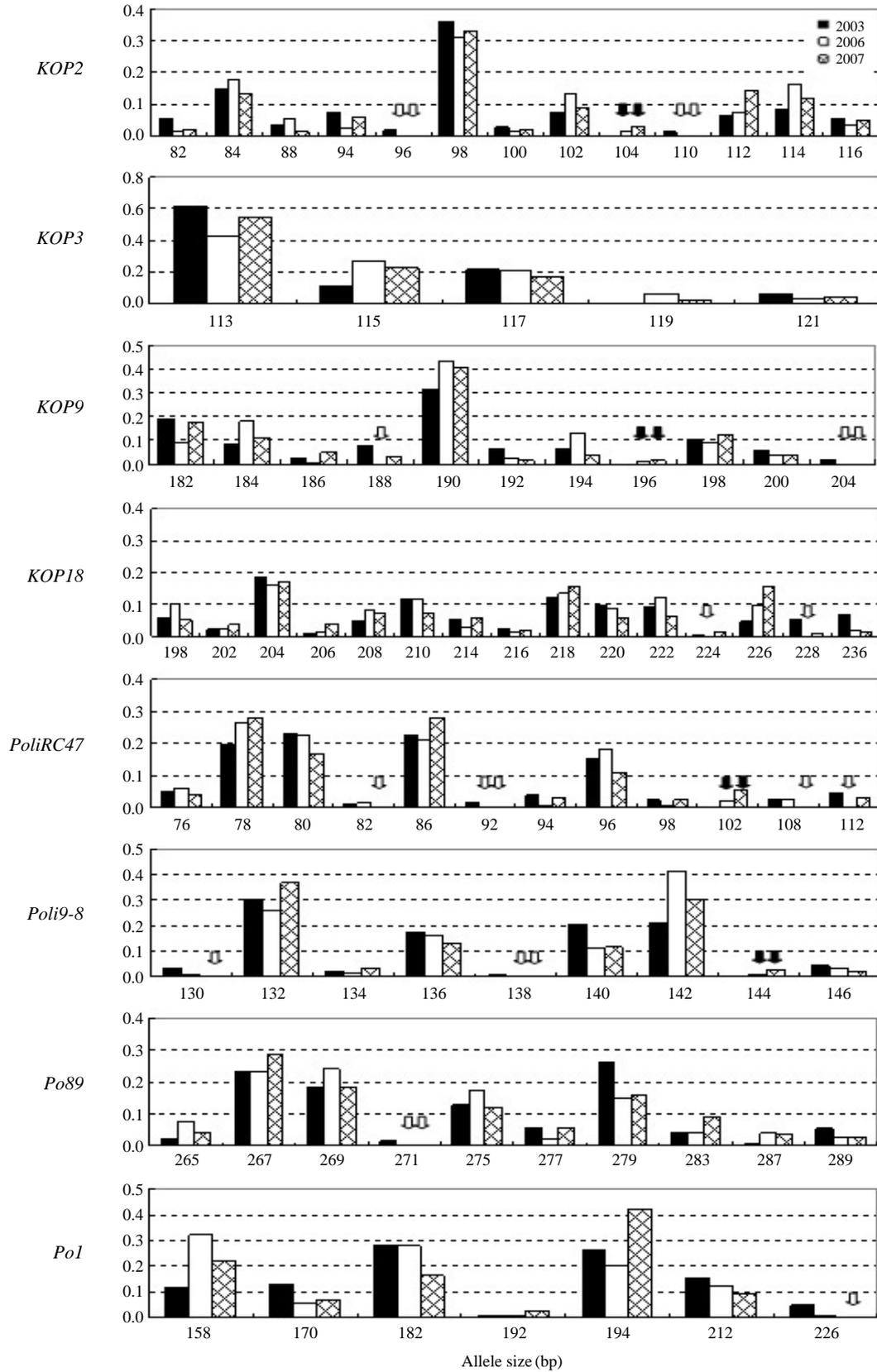


Fig. 2. Allele frequency of 8 microsatellite loci compared within farmed flounders hatched in 2003, 2006 and 2007. Some alleles shown distorted frequency as vanished (blank arrows) and appeared (filled arrows).

경우 H_o 와 H_e 가 동일한 값을 나타내야 함에 미세하게나마 어긋나고 있음을 알 수 있다(Table 2).

대립유전자 수의 비교에 있어 본 연구에 사용된 microsatellite marker 중 하나인 *Poli RC47*과 *Poli 9-8*로 분석된 우리나라 넙치 집단의 경우(Kang *et al.*, 2006), *Poli RC47*의 대립유전자 수가 자연산 집단에서 15개, 타 양식산 집단이 13개, 12개인 것과 비교하여 본 실험 집단의 경우 11개에서 9개로 적게 나타났으며, *Poli 9-8*도 자연산 집단 10개보다는 적은 수치를 나타내어 대립유전자의 감소 경향을 확인할 수 있었다.

대립유전자의 소실은 드문 빈도로 나타났던 대립유전자를 갖는 어미들이 선발되지 못했거나 또는 선발되었다라도 산란에 가입하지 못함으로써 일어나며, 새로운 대립유전자의 출현은 2003년에 구입한 수정란을 생산한 어미조합과는 다른 교배조합에서 생산된 수정란으로부터 선발된 어미들에 존재하던 것으로 보여진다.

양식 넙치 집단의 경우 한정된 어미 집단의 크기로 인해 자연 집단에 비해 다양성이 낮은 것으로 나타나고 있으며(Kang *et al.*, 2006), 어미 집단의 한정은 근친교배로 이어져 성장, 생존, 생식, 유전적 결합 또는 유전적 다양성에 부정적인 영향을 미치게 된다(Kincaid, 1983). 이 때문에 양식 현장에서는 자연산 넙치를 어미 집단에 가입시키기 위해 노력하지만 실내사육 생존율이 낮을 뿐더러 양식산과의 경쟁 및 산란 시기 등의 부조화로 실제 산란 가입률이 극히 적어 유전적 다양성 회복에 효과를 보지 못하고 있다. 뿐만 아니라 한정된 어미 집단의 크기를 극복하고자 산란 수조 내 많은 수의 어미를 수용하지만, 하루 밤 사이의 실제 산란에 가입하는 어미는 제한적인 것으로 알려져 있다. Sekino *et al.* (2003)이 넙치 양식에 따른 다양성의 변화를 조사하기 위해 6마리의 수컷과 12마리의 성숙한 암컷으로부터 하룻밤에 받은 100만 개의 수정란을 부화시켜 키우며 무작위 분석한 결과, 1마리의 수컷과 6마리의 암컷에 의한 6가계의 한정된 어미만이 다음 세대 생산에 기여하게 됨으로써, 양식 집단에서의 다양성은 세대를 지날수록 축소되는 결과를 가져오게 된다고 하였다.

따라서 아무리 어미 집단의 유전적인 조성이 고려된다 하더라도 산란 수조 내에서 일어나는 교배에 대한 통제를 할 수 없기 때문에, 산란에 기여하는 어미의 수, 부모 성비의 불균형 등으로 1세대만 지나도 유전적 다양성이 줄어들게 되며, 양식 집단의 경우 유전적 다양성이 10% 감소할 경우, 산란량이 줄어들고, 생존률이 낮아지며, 성장률이 저하되는 것으로 알려져 있어(Allendorf and Ryman, 1987), 양식 넙치 집단의 유전적 다양성에 대한 관심이 높아지고 있다.

본 연구에서 2003년에 생산된 양식 넙치와 그로부터 순차적으로 어미들이 교체되어 새롭게 구성된 어미 집단으로

부터의 2006년 및 2007년에 생산된 넙치들과의 유전적 다양성을 비교해 본 결과는 여러 가지 다양성 지표들에서 유의적인 수준에서 차이는 없었으나 점차적인 유전적 다양성의 축소가 일어나고 있는 경향이였다. 또한 양식 넙치 집단 자체로 Hardy-Weinberg의 평형에서 어긋나 있어 향후 세대가 진행될수록 양식 넙치 집단의 유전적 다양성 감소는 더욱 심화될 수 있을 것으로 생각되므로 양식 생산성 유지를 통한 지속 가능한 양식 산업의 발전을 위해서는 양식 어미 집단의 유전적 조성에 대한 세심한 고려와 아울러 많은 어미들이 산란에 가입하도록 하는 교배시스템 등 과학적인 어미 관리 프로그램이 개발되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

우리나라의 주요 양식 대상종인 넙치에 있어 유전적 조성에 대한 고려없이 구성된 양식 넙치 어미 집단에서 세대의 경과에 따른 집단의 유전적 다양성의 변화를 알아보기 위하여 총 8개의 microsatellite DNA markers를 이용하여 분석하였다. 동일한 수정란 생산업체에서 2003년에 생산된 양식 넙치와, 동일한 집단내에서 생산된 넙치로 어미 그룹이 완전히 교체된 2006년 및 2007년에 생산된 넙치 집단을 비교한 결과, 대립유전자 수와 이형접합기대치의 비교에서 2003년산 집단의 경우 9.75개와 0.796에서 2006년 7.78개와 0.785로 유전적 다양성이 다소 감소되는 경향이였다. 또한 대립유전자의 빈도에 있어서도 몇몇 대립유전자의 경우 소실되거나 빈도에 변화를 보이는 등 왜곡되어 나타났다. 그러나 여러 가지 다양성 지표들에서 수치상 감소를 나타내고 있는 이러한 결과들은 비록 유의적인 수준에서 유전적 다양성의 축소라고는 판단되지 않지만 양식 넙치 집단이 HWE에 어긋나 있어 세대가 진행될수록 집단의 유전적 다양성은 감소될 것으로 예상되었다.

사 사

이 연구는 국립수산물연구원(육종기술개발, RP-2008-AQ-075)의 지원에 의해 수행되었습니다.

인 용 문 헌

- 해양수산부. 2006. 어류양식현황조사.
Allendorf, F.W. and N. Ryman. 1987. Genetic management of hatchery stocks. In: Ryman, N. and F. Utter (eds), Population Genetics and Fishery Management. University of Washing-

- ton Press, Seattle, pp. 141-159.
- Carvalho, G.R. and L. Hauser. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4: 326-350.
- Coimbra, M.R. M.O. Hasegawa, K. Kobayashi, S. Koretsugu, E. Ohara and N. Okamoto. 2001. Twenty microsatellites for the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish. Sci.*, 67: 358-360.
- Cornuet, J.M. and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
- Garza, J.C. and E.G. Williamson. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite. *Mol. Ecol.*, 10: 305-318.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity*, 86: 485-486.
- Kang, J.H., J.K. Noh, J.H. Kim, J.H. Lee, H.C. Kim, K.K. Kim, B.K. Kim and W.J. Lee. 2006. Genetic relationship between broodstocks of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. *Aquacul. Res.*, 37: 701-707.
- Kim, W.J., K.K. Kim, J.H. Lee, D.W. Park, J.Y. Park and J.Y. Lee. 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Ecol. Notes*, 3: 491-493.
- Kincaid, H.L. 1983. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture*, 33: 215-227.
- Marshall, T.C., J. Slate, L. Kruuk and J.M. Pemberton. 1998. Statistics confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *J. Mol. Ecol.*, 7: 639-655.
- O'Brien, S. and J. Evermann. 1989. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends Ecol. Evol.*, 3: 254-259.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86: 248-249.
- Sekino, M. and M. Hara. 2000. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* (Pleuronectiformes, Pleuronectoidei, Paralichthyidae). *Mol. Ecol.*, 9: 2200-2202.
- Sekino, M., K. Saitoh, T. Yamada, A. Kumagai, M. Hara and Y. Yamashit. 2003. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, 221: 255-263.
- Sekino, M., T. Sugaya, M. Hara and N. Taniguchi. 2004. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as tool for broodstock management of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 233: 163-172.
- Suenaga, E. and H. Nakamura. 2005. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *J. Chroma. B.*, 820: 137-141.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10: 506-513.