

Development and Genetic Diversity Analysis of Microsatellite Markers Using Next-generation Sequencing in *Seriola quinqueradiata*

Chun Mae Dong¹, Mi-Nan Lee¹, Eun-Mi Kim¹, Jung Youn Park¹, Gun-Do Kim² and Jae Koo Noh^{1*}

¹Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

²Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Received February 25, 2020 / Revised March 13, 2020 / Accepted March 16, 2020

This study was conducted to develop microsatellite markers in *Seriola quinqueradiata* using next-generation sequencing. A total of 28,873,374 reads were generated on an Illumina HiSeq2500 system, yielding 7,247,216,874 bp sequences. The de novo assembly resulted in 466,359 contigs. A total of 132 contigs (0.43%), including 60 microsatellite loci, were derived from 30,729 contigs longer than 518 bp. A total of 60 primer sets were designed from the 132 microsatellite loci. A total of 15 polymorphic nuclear microsatellite loci were chosen to evaluate population genetic parameters in the parents and offspring. The mean number of effective alleles was 18.5, ranging from 11 to 30. The observed heterozygosity (H_O) and expected heterozygosity (H_E) ranged between 0.431 and 0.972 with an average of 0.812 and from 0.782 to 0.949 with an average of 0.896, respectively. No significant linkage disequilibrium was observed after Bonferroni revision in any loci. The results show that the 15 polymorphic nuclear microsatellite markers can be used to study the population and conservation genetics of *S. quinqueradiata* in Korea. To ensure the success of artificial seedling production technology, genetic variations between the parent and offspring populations should be monitored, and inbreeding should be controlled.

Key words : Artificial reproduction, genetic variability, microsatellite loci, next generation sequencing, *Seriola quinqueradiata*

서 론

방어(*Seriola quinqueradiata*)는 농어목(Perciformes) 전갱이과(Carangidae)에 속하는 어종으로 우리나라를 비롯한 일본, 대만 등 북서태평양에 널리 분포하는 온대성 회유어종이다 [25]. 또한 우리나라와 일본 등에서 인기가 많은 고급어종으로 경제적 가치가 높고, 수요가 지속적으로 증가하고 있어 양식 생산을 위한 종묘생산 및 양성에 관한 연구들이 진행되고 있다 [13].

방어의 양식산업을 위한 인공종묘생산 연구는 일본의 경우 1960년대부터 시작되었지만 [27], 우리나라의 경우에는 자연에서 치어를 포획하여 양성하는 방법으로 종묘생산 및 중간양성 기술개발이 진행되고 있으나 아직까지 인공종묘생산 연구에 있어 미흡한 실정이다 [39]. 방어에 관한 국내 연구로는 제주도 주변해역을 중심으로 한 방어의 분포특성 [5, 21] 및 어획량 변

동과 산란을 위한 회유경로에 관한 연구 [24] 등 생태학적 특성에 대한 연구가 대부분이며, 유전학적 통계분석을 통해 방어의 어미집단과 이들로부터 태어난 치어집단을 보다 체계적으로 관리할 수 있는 연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 방어 어미집단의 유전적 관리가 중요한 이유는 소규모 양식집단에서 어미들의 유전자형을 고려하지 않은 교배로 극단적인 유전자형의 손실이 일어날 수 있으며 [34], 근교약세 (inbreeding depression)로 이어져 생산된 자손의 생존에 악영향을 미칠 수 있기 때문이다 [22]. 또한, 유전적 다양성의 부족으로 유전적 부동과 병목현상으로 인해 질병 저항성 감소, 기형 증가, 성장 저하, 집단 근친도의 증가 등의 부정적인 영향을 미칠 수 있다 [2, 9].

대표적 양식어종인 넙치와 전복의 경우에도 여러 세대에 걸쳐 한정된 어미로부터 종묘가 생산되어 왔기 때문에 자연집단에 비해 양식집단이 유전자 빈도 및 대립유전자 수가 크게 감소된다고 보고된 바 있다 [7, 14-16, 26, 28, 31, 35, 37, 40]. 따라서 우리나라 방어의 인공종묘생산에 있어 어미집단과 치어집단의 체계적인 관리를 위해 유전적 다양성 유지에 관한 연구가 필요한 실정이다.

이를 위해 최근에는 차세대 염기서열 (Next-Generation Sequencing, NGS) 분석법을 이용하여 대상어종의 염기서열 정보를 대량으로 확보하고, microsatellite 영역을 직접 탐색함으로써 microsatellite 마커를 개발하는 방법이 이용되고 있다

*Corresponding author

Tel : +82-51-720-2461, Fax : +82-51-720-2456

E-mail : jae9noh@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

[10, 39]. 참담치[17], 첫새우[18], 해양미생물[23] 등 다양한 해양생물에서 NGS법을 이용한 microsatellite 마커가 개발되고 있다.

본 연구에서는 방어의 유전적 다양성을 분석하기 위해 NGS법을 사용하여 microsatellite 마커를 개발하고, 개발된 microsatellite 마커를 이용하여 방어의 어미집단과 치어집단을 대상으로 유전적 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

시료 확보 및 DNA 추출

본 연구에 사용한 방어 시료는 국립수산물연구원 제주수산연구소에서 사육 중인 방어의 어미집단($n=72$)과 2017년에 종묘로 생산된 치어집단($n=157$)의 지느러미 조직을 채집하여 사용하였다. Genomic DNA의 순수분리와 정제는 자동화 DNA 추출 장비(MagExtractor MFX-6100, Toyobo, Japan)와 DNeasy® 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Germany)를 사용하였다[20]. 분석에 사용할 시료를 20 mg씩 E-tube로 옮겨 DNeasy® 96 Blood & Tissue Kit를 사용하여 제조사의 방법에 따라 ATL Buffer 200 μ l와 Proteinase K 10 μ l를 첨가한 후, 혼합하여 56°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 AL Buffer 200 μ l와 99% ethanol 200 μ l을 첨가하여 S-Blocks의 DNeasy 96 plates에 옮겨 4,000 rpm (3,000 \times g)으로 20분간 원심분리하였다. Column plates를 교체한 후, AW 1 Buffer 500 μ l 첨가하여 4,000 rpm (3,000 \times g)으로 20분간 원심분리하였다. 동일한 방법으로 column plates를 교체한 후, AW 2 Buffer 500 μ l 첨가하여 4,000 rpm (3,000 \times g)으로 40분간 원심분리하였다. Ethanol을 제거한 다음, AE Buffer 100 μ l에 녹여 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA는 1.8% (w/v) agarose gel을 이용하여 전기영동을 통해 밴드의 유무를 확인한 후, E-Graph Gel Documentation System (ATTO, Korea)을 사용하여 농도를 측정하였다.

Microsatellite 탐색

Microsatellite 마커 개발에 필요한 방어의 염기서열 정보를 얻기 위해 Illumina Hiseq2500 (Illumina, USA)을 이용하여 방어의 지느러미 조직으로부터 추출한 genomic DNA의 염기서열을 획득하였다. 생성된 raw sequence를 Quality value 20으로 cutoff하여 trimmed sequence를 구했으며, 서로 중첩되는 구간을 기반으로 paired-end sequence를 합쳐서 single reads를 생성하였다. 이어 생산된 single reads에 대해 CLC assembly Cell (v4.0)을 이용하여 draft assembly를 수행한 후, 생성된 contig에 single reads를 mapping하여 unmapped reads 서열들을 구하였다. Unmapped reads를 대상으로 NICEM_SSR_FINDER를 이용하여 8개 이상의 microsatellite 반복 영역을 포함하며 증폭산물의 크기가 150-400 bp 범위의

SSR 마커를 탐색하였다.

탐색된 microsatellite 영역을 증폭하기 위한 프라이머의 설계는 Primer3 [32] 프로그램을 이용하여 제작하였으며, 최적의 프라이머 길이는 18-22 bp 범위, 증폭 산물의 크기는 120-400 bp, T_m 값이 50°C-68°C로 설정하고, 프라이머의 위치와 반복되는 염기서열 등을 고려하여 프라이머를 제작하였다.

Microsatellite 유전자좌의 다형성 분석

염기서열 정보를 바탕으로 탐색한 microsatellite 영역을 증폭할 수 있는 프라이머를 선별하기 위해 방어($n=8$)를 대상으로 PCR 분석을 수행하였다. PCR 조성은 10 μ l당 10 ng 주형 DNA, 10X Taq PCR buffer 1 μ l, dNTP mixture (10 mM) 0.2 μ l, Hs Taq DNA polymerase (2.5 U/ μ l; TNTResearch, Korea) 0.1 μ l, forward와 reverse 프라이머 각각 0.4 μ l (10 mM), 주형 DNA 1 μ l로 조성하였다. 각 프라이머의 forward 서열 정방향에 형광물질인 HEX, 6-FAM 및 TAMRA를 합성하여 증폭산물 분획 시 결과물이 형광을 띄게 만듦으로써 Genetic Analyzer 3730XL (Applied Biosystems, USA)를 이용한 PCR 산물의 크기 측정을 가능하게 하였다.

PCR 증폭은 95°C에서 7분간 DNA를 사전변성(preincubation) 처리 후, 95°C에서 50초간 변성(denaturation)시켰다. 이어 58°C에서 50초간 프라이머를 annealing 시킨 후, 72°C에서 50초간 DNA 합성(extension) 과정을 총 35회 반복하였으며, 추가적으로 72°C에서 10분간 신장 과정을 수행하였다. 증폭된 PCR 생산물은 1.8%(w/v) agarose gel로 전기영동하여 밴드의 유무와 증폭된 단편 크기를 확인한 후 희석 배율을 결정하였다.

각각의 PCR 생산물은 형광물질 별로 생산물의 크기가 중첩되지 않도록 고려하여 GeneScan™ 400HD ROX (Applied Biosystems, USA) size standard와 Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, USA)를 혼합하여 95°C에서 3분간 변성시킨 후, ABI PRISM 3730XL를 사용하여 단편의 크기를 분석하였다[3].

Microsatellite 유전통계 분석

방어의 어미집단($n=72$)과 치어집단($n=157$)을 대상으로 다형성이 확인된 유전자좌에 대한 PCR 분석을 수행하였다. 유전적 다양성 분석을 위해 FSTAT version 2.9.3 [12]를 사용하여 대립유전자 수(number of alleles, N_A), 집단 크기를 보정한 대립유전자 수(allelic richness, A_R), 대립유전자 크기(size range, R)를 구하였으며, 집단 간 유전적 분화 정도, Pairwise F_{ST} [38] 수치를 측정하여 비교하였다. Arlequin version 3.1 software [8] 및 GENEPOP version 4.0 computer package [33]를 사용하여 집단 및 유전자좌위별 이형접합도(heterozygosity)의 관찰치 이형접합률(observed heterozygosity, H_o)과 Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)에서의 기대치 이형접합률(expected heterozygosity, H_e)을 계산하였다. 또한, GENEPOP

version 4.0 computer package [33]를 사용하여 집단 내 근친 교배계수(inbreeding coefficients, F_{IS})의 유의성을 확인하였다 [38]. 유전자좌의 다양성 정보량(polymorphic information content, PCI)은 Cervus ver. 3.0.7 [19]의 대립인자빈도 분석법을 적용하여 산출하였다. GeneAEx 6.4 program [30]을 사용하여 각각의 마커에 걸쳐 전체 집단과 각 개체군의 private allele 빈도 및 대립인자 빈도의 패턴을 살펴보았다. 또한, 유전적 변이 분포를 이용하여 개체 혹은 집단 간의 기하학적 관계를 2차적으로 보여주는 Principal Coordinates Analysis (PCoA)를 Codominant Genotypic Distance 바탕으로 분석하였다[30].

결과 및 고찰

염기서열 탐색 및 microsatellite 다형성 확인

국립수산물연구원 제주수산연구소에서 사육 중인 방어 1개체를 표준시료로 선정하여 차세대 염기서열 분석법인 Illumina HiSeq2500를 이용하여 다량의 염기서열을 획득하였다. 방어의 염기서열을 분석한 결과, 총 28,873,374개의 염기서열 read를 얻었으며, 총 길이의 합은 7,247,216,874 bp이었다. 총 28,873,374개 read의 assembly를 수행한 결과, 전체의 약 1.6%에 해당하는 466,359개의 read가 assembly에 사용되었으며, 이들 read의 총 길이는 602,570,785 bp로 확인되었다 (Table 1).

NICEM_SSR_FINDER를 이용하여 SSR (simple sequence repeat)을 포함하여 프라이머를 디자인할 수 있는 서열을 탐색한 결과, Di-nucleotide가 6번 이상 반복되는 $[CA]_n$, $[GA]_n$, $[AT]_n$, $[GC]_n$ 구간을 포함하는 서열의 총 수는 18,414개이었으며, 비율은 각각 71.3%, 18.7%, 9.8%, 0.2%로 $[CA]_n$ 의 반복이 가장 많이 확인되었다. Tri-nucleotide가 5번 이상 반복되는 구간은 총 10,246개이며, 이중 $[ATA]_n$ 이 12.3%로 가장 많았다. Tetra-nucleotide가 5번 이상 반복되는 서열은 총 2,069개로 $[AGAT]_n$ 의 반복이 40.5%로 가장 많이 확인되었다. Di-, Tri-, Tetra-nucleotide의 전체 비율은 각각 59.9%, 33.3%, 6.7%로 Di-nucleotide가 가장 높았으며, Tetra-nucleotide가 가장 낮게 나타났다(Table 2). 염기서열을 분석한 결과, 총 30,729개의 후보 서열 중 반복 염기의 종류, 반복 수, 프라이머의 위치, 증폭 산물의 크기 등을 고려하여 1차 선별한 후보서열 132개에 대해 PCR 증폭 여부 등을 확인하여 microsatellite 마커 60개의

Table 1. Summary of NGS sequencing results

Category	Number of reads (ea)	Read length (bp)
Total reads	28,873,374	7,247,216,874
Trimmed reads	24,229,768	5,697,842,461
Assembled contigs	466,359	602,570,785
Unmapped reads	959,876	289,657,783

후보를 2차 선별한 후, 형광표지 프라이머를 제작하였다. 유전자형 분석을 통해 대립유전자 수, 크기 등을 고려하여 최종적으로 microsatellite 마커 15개를 개발하였다(Table 3).

유전적 다양성 및 특성 분석

개발된 15개의 microsatellite 마커를 이용하여 방어 어미집단($n=72$)과 치어집단($n=157$)을 대상으로 유전적 다양성을 분석하였다. 마커의 다형성 정도를 나타내는 PIC값이 0.5 이상이면 충분한 개체식별력을 갖는 것으로 보고되었는데[4], 본 연구에서 개발된 microsatellite 마커 15개의 PIC값은 0.755-0.939 범위로 평균 0.881의 수치로 나타나, 개발된 마커가 상당히 높은 개체식별력을 나타내는 것으로 판단된다(Table 3). 또한 Ohara *et al.* (2003)가 보고한 microsatellite probe 기반의 microsatellite 마커를 개발하는 연구에 따르면 집단 내의 대립유전자 수(N_A)는 4-13개이며, H_E 값은 0.85-0.91으로 보고된 것과 비교해 볼 때 방어 어미집단의 대립유전자 수(11-30개)와 H_E

Table 2. Summary of characteristics of SSR

SSRs motif	Numbers	SSRs motif	Numbers
Dinucleotide (≥ 6)	18,414		
AT	1,805	CT	3,442
CA	13,134	GC	33
Trinucleotide (≥ 5)	10,246		
AAA	0	TAC	156
AAT	1,037	TTG	309
AAG	327	TTC	298
AAC	322	TGA	655
ATA	1,261	TGG	81
ATG	520	TGC	328
ATC	377	TCG	1
AGA	381	TCC	453
AGT	124	GAG	668
AGG	398	GAC	13
AGC	310	GTG	69
ACA	378	GGG	0
ACG	0	GGC	54
ACC	69	GCG	25
TAA	1,080	CAG	407
TAG	125	CGG	20
Tetranucleotide (≥ 5)	2,069		
AAAC	128	ACAT	41
AAAG	254	ACCT	9
AAAT	201	ACGC	47
AACG	0	ACGG	3
AACT	17	ACGT	0
AAGG	26	ACTC	58
AAGT	3	AGAT	837
AATC	52	AGCC	5
AATG	77	AGCT	8
AATT	15	AGGT	9
ACAG	151	AGTC	128

값(0.782-0.949)이 비슷하거나 높게 나타났으며, 평균 H_o 와 H_e 값이 각각 0.812, 0.896로 크게 차이가 나타나지 않고, 해산어의 평균 H_e 값인 0.79 이상의 수치를 나타내었다[6]. 따라서 15개의 microsatellite 마커는 집단의 유전적 다양성을 확인하는데 유용한 마커로 판단된다.

이에 반해 이들로부터 태어난 치어집단의 유전적 다양성은 크게 차이를 보이는데 치어집단의 평균 유효 대립유전자 수 (N_A)는 6.267개이며, 관측치 이형접합도(H_o)와 기대치 이형접합도(H_e)는 각각 평균 0.805와 0.651로 어미집단의 유전적 다양성보다 낮은 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 치어집단의 모든 유전자좌에서 Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) 이탈이 관찰($p < 0.0045$, Bonferroni correction) 되는 것으로 확인되었는데(Table 4), 이는 가계 생산 시 어미집단 중 일부 개체의 관여도가 높다는 것을 의미하며, 이에 따라 유전적 다양성이 감소하였음을 알 수 있다[10]. 양식집단과 같이 한정된 집단에서 유전적 다양성의 감소는 산란량의 감소와 생존율 및 성장률 저하의 원인으로 알려져 있어[1], 한정된 수의 어미로부터 세대를 거듭할수록 치어집단의 유전적 다양성 감소는 더욱더 심화될 것으로 사료된다[36]. 유전적 변이의 분포를 통해 집단 간의 기하학적 관계를 보여주는 주성분 분석 결과에서도 두 집단의 유전학적 구조는 명확한 차이를 나타내었으며, 각 개체들의 특성을 2차원 그래프로 표현했을 때, coord 1축은 전체 데이터 특징의 17.38%를 나타내고 coord 2축은 23.81%를 나타내었다. 이 또한 대부분이 한정된 어미 개체 간의 교배를 통해 출생된 개체로서 유전적 차이가 낮은 것으로 분석되었다(Fig. 1).

본 연구에서는 방어의 유전적 다양성 분석을 위해 microsatellite 마커를 개발하고자 차세대 염기서열 분석(NGS)을 수

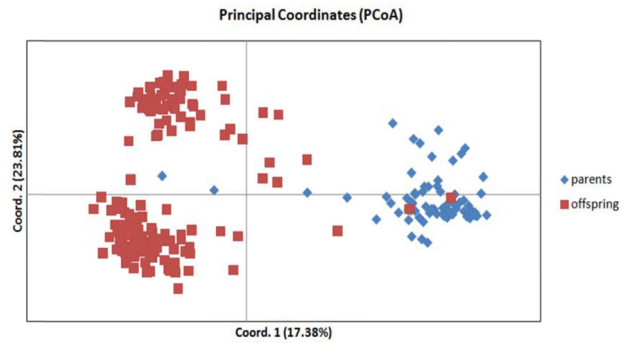


Fig. 1. Principal coordinate analyses (PCoA) of parents and offspring populations, *S. quinquerradiata* based on Nei's genetic distances.

행하여 염기서열을 확보하였다. 확보된 염기서열에서 직접 microsatellite를 추출하는 방법을 통하여 132개의 후보 microsatellite 마커를 선정 후, 유전자형의 분석을 통해 최종적으로 15개의 다형성 마커를 개발하였다. 개발된 마커로 방어의 어미집단과 치어집단을 대상으로 적용한 결과, 충분한 다형성이 나타났으며, 또한 연관불평형성이 나타나지 않아 방어집단의 유전적 다양성의 분석에 유용한 마커로 확인되었다. 방어에 대한 상업적 관심이 높아짐에도 불구하고, 유전적 정보의 분석이나 다양한 microsatellite 마커가 개발되지 않은 상황을 고려할 때 방어의 유전자원 보존을 위해 보다 많은 microsatellite 마커의 개발이 필요하며, 더 나아가 지속적인 방어의 어미집단과 치어집단의 유전학적 통계분석을 통해 한정된 수의 어미로부터 치어집단의 유전적 다양성의 결핍을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3. Characteristics of 15 microsatellite loci developed in *S. quinquerradiata*

Locus	Motif	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Dye	PIC	Observed Size range (bp)
ATCT-233F	(AGAT) ₁₈	ATTCITTTCTCCAAAGTCAATGC	CATTTTCATGAATTTCCCCTAGA	FAM	0.915	147-243
ATCT-16F	(AGAT) ₁₉	AATCGATACAAATGGAATGGAG	ATTATCCTTAACGAGGTGCAAA	FAM	0.899	256-320
AGG-05F	(AGG) ₁₅	CTGTAACACACAAATCACCCC	CACAGGTGACACGGTTTCT	HEX	0.939	98-128
ATCT-333F	(AGAT) ₂₁	CCCTGAACATCAGCTTAAACAT	CATATGGAGATGCTGTCACATT	HEX	0.858	146-202
AAT-26F	(AAT) ₂₃	ACACTTACACACTGTTCCACACA	AAACCATGTGCTTGTTATGTTG	HEX	0.925	204-261
AAT-74F	(AAT) ₂₀	ACCTGCCTACTCAGAAGAATCA	AAAATCAGCCAAAATGAAATTG	TAMRA	0.861	114-180
ATCT-19F	(AGAT) ₂₀	CAACAAAGCTGTTGTAGAGCAA	GGCATTCATTTTAGCCATTTA	TAMRA	0.913	205-329
ACA-23F	(TGT) ₂₃	TCGACTGTTTACACATCTCTGC	CCATGCACAAAAGCAACTATAA	FAM	0.888	122-191
ATG-13F	(CAT) ₂₃	GGAGTGGGTGAAAAGTGTGTTAT	CAGCGACAGCATTATAAGTGAG	FAM	0.755	201-261
TGA-55F	(TGA) ₁₉	TATGTGTTGTAAGTTCCTGCG	CAGTCAGGTGAGATGATGGAC	HEX	0.896	118-178
ATG-24F	(CAT) ₂₀	GAACCTTTCATCGAGAACAACC	CGACCTGCTCTACTTGATCT	HEX	0.86	186-216
ATG-33F	(CAT) ₁₈	TGCACCTCTGAGTTTTAAT	GAGACAGACGCCTCATGAGT	TAMRA	0.859	73-154
CA-139F	(CA) ₃₃	CTGCTCAAATGTCCTATCATCA	AGGGGAGACTGAGGATAGTTGT	TAMRA	0.811	206-260
ATCT-416F	(AGAT) ₂₆	AGATGTGGTAGCAAGTGAATC	ATTTGCCCTAGGGGATAAATAA	FAM	0.907	82-158
ATCT-291F	(ATCT) ₂₈	TGAGACTGAGATGCTGATCAAT	GAGCTATTGCTTTTTCTCGTTT	TAMRA	0.924	140-240

Annealing temperature was 58°C for all markers.

Table 4. Genetic variabilities at 15 microsatellite markers in the parents and offspring population of *S. quinqueradiata*

	Locus															Mean all loci
	ATCT-233	ATCT-16	AGG-05	ATCT-333	AAT-26	AAT-74	ATCT-19	ACA-23	ATG-13	TGA-55	ATG-24	ATG-33	CA-139	ATCT-416	ATCT-291	
Parents (N=72)	N _A	23	14	11	15	18	16	30	20	18	17	17	25	18	24	18.467
	A _R	23	14	11	15	18	16	30	20	18	17	17	25	18	24	18.467
Offspring (N=157)	R	147-243	256-320	98-128	146-202	204-261	144-180	205-329	122-191	201-261	118-178	186-216	206-260	82-158	140-240	0.812
	H _O	0.764	0.917	0.431	0.778	0.944	0.833	0.958	0.889	0.819	0.958	0.722	0.861	0.847	0.486	0.896
	H _E	0.925	0.879	0.877	0.913	0.902	0.782	0.949	0.91	0.835	0.92	0.879	0.935	0.927	0.935	0.093
	F _{IS}	0.175	-0.043	0.511	0.149	-0.047	-0.066	-0.01	0.024	0.018	-0.042	0.18	-0.04	0.087	0.482	0.182
	HW	0.000*	0.405	0.000*	0.034	0.28	0.449	0.352	0.36	0.021	0.397	0.001*	0.281	0.016	0.000*	0.000*
Offspring (N=157)	N _A	8	7	4	5	8	8	9	5	5	7	3	6	8	6	6.267
	A _R	6.747	5.218	3.831	4.915	6.363	7.253	6.81	4.374	4.662	5.612	4.836	4.91	6.278	4.601	5.294
Offspring (N=157)	R	147-219	276-304	101-122	154-198	210-252	117-180	217-325	140-164	201-225	130-160	192-210	210-240	94-146	152-212	0.805
	H _O	1	1	0.057	0.968	0.981	1	0.987	1	0.726	0.809	0.994	0.745	1	0.051	0.805
	H _E	0.761	0.638	0.343	0.74	0.765	0.776	0.765	0.639	0.625	0.654	0.628	0.639	0.666	0.498	0.651
	F _{IS}	-0.316	0.571	0.833	-0.31	-0.284	-0.29	-0.291	-0.568	-0.162	-0.238	-0.584	-0.167	-0.503	0.898	-0.108
	HW	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0

N_A=number of alleles per locus; A_R=allelic richness; R=size range of alleles; H_E=expected heterozygosity; H_O=observed heterozygosity; PIC=polyomorphic information content; F_{IS}=inbreeding coefficient.

*Not in conformity with Hardy-Weinberg Equilibrium (p<0.003, Bonferroni-corrected value).

감사의 글

이 논문은 2019년도 국립수산물과학원 수산과학연구소 수산생명자원의 확보, 분석 및 통합관리(R2019033)와 수산유전 자원의 탐색 및 활용(R2019030)의 지원으로 수행된 연구입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Allendorf, F. W. and Ryman, N. 1987. Genetic management of hatchery stocks. In: Ryman, N. Utter, F.W. (Eds.), Population genetics and fishery management. University of Washington Press, Seattle, pp. 141-159.
- Allendorf, F. W., Luikart, G. and Aitken, S. N. 2013. Conservation and the Genetics of Populations. Wiley-Blackwell, Oxford, U.K.
- Baek, S. H., Lee, J. W., Hong, K. N., Lee, S. W., Ahn, J. Y. and Lee, M. W. 2016. Identification and characterization of polymorphic microsatellite loci using next generation sequencing in *Quercus variabilis*. *J. Kor. For. Soc.* **105**, 186-192.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 314.
- Chang, D. S., Yoo, J. T., Kim, B. Y., Lee, S. J., Kwon, D. H., Koo, J. H., Ahn, G. M. and Oh, I. Y. 2010. A characteristics on the forming of fishing ground and population ecological study of Yellow tail, *Seriola quinqueradiata*, in the coastal waters off Gim-nyeong of Jeju Island, Korea. *J. Kor. Soc. Fish. Tech.* **46**, 406-415.
- DeWoody, J. A. and Avise, J. C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish. Biol.* **56**, 461-473.
- Evans, B., Bartlett, J., Sweijd, N., Cook, P. and Elliott, N. G. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture* **233**, 109-127.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin (ver. 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* **1**, 47-50.
- Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Fujio, Y., Sasaki, N., Sasaki, M. and Koganezawa, A. 1985. Genetic aspect of natural and released population of plaice. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* **47**, 51-57.
- Gardner, M. G., Fitch, A. J., Bertozzi, T. and Lowe, A. J. 2011. Rise of the machines - recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 1093-1101.

12. Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* **86**, 485-486.
13. Hara, N. 1990. An abundance index of yellow tail immigrating into the sea of Japan and its yearly variation. *Nip. Sui. Gak.* **56**, 25-30.
14. Hara, M. and Sekino, M. 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* **217**, 107-114.
15. Jeong, D. S., Kim, K. S. and Kim, K. K. 2006. Evaluation of effective breeders number (Ne) for stock enhancement in olive flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA markers. *Aquaculture* **19**, 205-209.
16. Jeong, D. S., Gonzalez, E. B., Morishima, K. Arai, K. and Umino, T. 2007. Parentage assignment of stocked black sea bream, *Acanthopagrus schlegeli* in Hiroshima Bay using microsatellite DNA markers. *Fish. Sci.* **73**, 823-830.
17. Kang, J. H., Kim, Y. K., Park, J. Y., Noh, E. S., Jeong, J. E., Lee, Y. S. and Choi, T. J. 2013. Development of microsatellite markers for a hard-shelled mussel, *Mytilus coruscus*, and cross-species transfer. *Gen. Mole. Res.* **12**, 4009-4017.
18. Kang, J. H., Kang, H. S., Noh, E. S., Park, J. Y. and An, C. M. 2014. Isolation and characterization of novel microsatellite markers for the northern mauxia shrimp, *Acetes chinensis*, using pyrosequencing. *Mar. Genomics* **18**, 67-69.
19. Kalinowski, S. T., Taper, M. L. and Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* **16**, 1099-1106.
20. Kim, E. M., Kang, H. S., Kang, J. H., Kim, D. G., An, C. M., Lee, H. W. and Park, J. Y. 2015. Genetic Relationships of Sandfish (*Arctoscopus japonicus*) from five different areas of Korea and Japan based on mitochondrial DNA and microsatellite analyses. *J. Life Sci.* **25**, 1204-1213.
21. Kim, J. T., Rho, H. K. and Kim, S. H. 2002. Studies on the forming mechanism of the fishing ground of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, in the adjacent sea of Jeju Island, *Bull. Kor. Soc. Fish. Tech.* **38**, 20-35.
22. Kim, K. S., Noh, C. H., Sade, A. and Bang, I. C. 2015. Effectiveness of microsatellite markers for parentage analysis of giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). *Kor. J. Ich.* **27**, 10-15.
23. Koh, H. W., Rani, S., Hwang, H. B. and Park, S. J. 2016. Microbial community structure analysis from Jeju marine sediment. *Kor. J. Micro.* **52**, 375-379.
24. Lee, S. J. and Go, Y. B. 2006. Winter warming and long-term variation in catch of Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) in the South Sea, Korea. *Kor. J. Ich.* **18**, 319-328.
25. Lee, S. K., Kim, Y. U., Myoung, J. G. and Kim, J. M. 2000. Dictionary of Korean fish names, pp. 222. Junginsa Pub. Co. Seoul.
26. Li, Q., Park, C., Endo, T. and Kijima, A. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Aquaculture* **235**, 207-222.
27. Nakada, M. 1999. Yellowtail and related species culture. Encyclopedia of Aquaculture.
28. Norris, A. T., Bradley, D. G. and Cunningham, E. P. 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* **182**, 73-83.
29. Ohara, E., Nishimura, T., Sakamoto, T., Nagakura, Y., Mushi- iake, K. and Okamoto, N. 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci from yellowtail *Seriola quinqueradiata* and cross species amplification within the genus *Seriola*. *Mol. Ecol.* **3**, 390-391.
30. Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol.* **6**, 288-295.
31. Perez-Enriquez, R., Takagi, M. and Taniguchi, N. 1999. Genetic change and pedigrees tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* **173**, 413-423.
32. Roche, S. and Skaletsky, H. 1998. Primer 3. Code available at <http://www.genome.wi.mit.edu/genome-software/other/primer3.html>.
33. Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* **8**, 103-106.
34. Rudnick, J. A. and Lacy, R. C. 2008. The impact of assumptions about founder relationships on the effectiveness of captive breeding strategies. *Conserv. Gen.* **9**, 1439-1450.
35. Sekino, M., Hara, M. and Taniguchi, N. 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **213**, 101-122.
36. Spencer, C. C., Neigel, J. E. and Leberg, P. L. 2000. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Mol. Ecol.* **9**, 1517-1528.
37. Sugaya, T., Ikeda, M. and Fujio, Y. 1999. Comparison for the genetic variabilities of natural and seed populations of Japanese flounder based on PCR-RFLP analysis of mtDNA D-loop. *Fish Gen. Breed. Sci.* **28**, 65-73.
38. Weir, B. S. and Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
39. Yang, S. G., Kim, J. H., Kim, H. W., An, C. M., Ji, S. C., Jeong, M. H., Myeong, J. I., Lee, Y. D. and Kim, D. J. 2018. Biological characterization for the seeding production of Yellowtail Kingfish. *Seriola lalandi*. *JFM. SE.* **30**, 1866-1875.
40. Yoshida, K., Takagi, M., Tanaka, M. and Taniguchi, N. 2000. Genetic variability and divergence of wild and artificially raised Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* inferred from microsatellite DNA analysis. *Fish Gen. Breed. Sci.* **29**, 93-102.
41. Zalapa, J. E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown, B., Harbut, R. and Simon, P. 2012. Using nextgeneration sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *Am. J. Bot.* **99**, 193-208.

초록 : 차세대 염기서열 분석법을 이용한 방어(*Seriola quinqueradiata*)의 microsatellite 마커의 개발 및 유전적 특성 분석

동춘매¹ · 이민란¹ · 김은미¹ · 박종연¹ · 김군도² · 노재구^{1*}

(¹국립수산과학원 생명공학과, ²국립부경대학교 미생물학과)

본 연구는 차세대 염기서열 분석법(NGS)을 이용하여 방어의 microsatellite 마커를 개발하고, 개발된 마커를 이용하여 방어 집단의 유전적 특성을 분석하기 위해 수행되었다. 차세대 염기서열 분석 장비인 Illumina HiSeq2500를 이용하여 총 28,873,374개의 read들을 얻어 assembly를 수행한 결과, 전체의 약 1.6%에 해당하는 466,359개의 read들이 assembly 되었으며, 이 read들의 총 길이는 7,247,216,874 bp로 확인되었다. 크기가 518 bp 이상이 되는 contig는 30.729개로 나타났으며, 이 중 microsatellite 영역을 포함하는 contig 132개(0.43%)를 1차로 선별하고, PCR 증폭 여부 및 유전자형 분석을 통해 microsatellite 후보 60개를 2차로 선별하였다. 그 중 방어집단의 마커로서 유용한 15개의 microsatellite 마커를 선택하였다. 방어집단을 대상으로 개발된 15개의 microsatellite 마커로 분석한 결과, 관찰된 유효 대립유전자수(N_A)는 평균 18.5(11~30)로 나타났다. 평균 관측치 이형접합도(H_O)와 평균 기대치 이형접합도(H_E)는 각각 0.812(0.431~0.972)와 0.896(0.782~0.949)으로 나타났다. 다형성이 관찰된 모든 microsatellite 마커 간의 연관불평형은 나타나지 않았으며, 해산어의 평균 H_E 값인 0.79 이상의 수치를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 개발된 15개의 microsatellite 마커는 방어 집단의 유전적 다양성 분석에 유용할 것으로 사료된다.