

수 산 학 박사 학 위 논 문

국내 해삼(*Apostichopus japonicus*)의  
집단유전학분석과 혈연관계 조사 연구



2022년 02월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

한 지 성

수 산 학 박사 학 위 논문

국내 해삼(*Apostichopus japonicus*)의  
집단유전학분석과 혈연관계 조사 연구

지도교수 남 윤 권

이 논문을 수산학박사 학위논문으로 제출함.



2022년 02월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

한 지 성

한지성의 수산학박사 학위논문을 인준함.

2022년 02월 25일



주 심 이학박사 김 현 우 (인)

위 원 이학박사 이 혁 제 (인)

위 원 농학박사 공 승 표 (인)

위 원 공학박사 김 찬 희 (인)

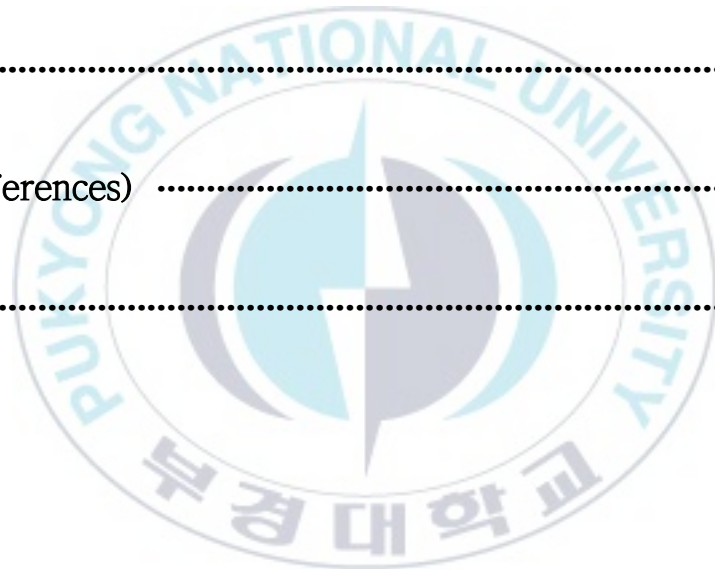
위 원 수산학박사 남 윤 권 (인)

# 목차

표 목차 .....	iv
그림 목차.....	vi
영문요약 .....	vii
Chapter I	
종합 서론.....	1
Chapter II	
국내 해삼의 유전적 다양성 분석 및 집단유전학적 분석 .....	5
I. 서론.....	5
II. 재료 및 방법 .....	8
2.1. 시료의 확보.....	8
2.2. Microsatellite 마커를 이용한 집단유전학적 분석 .....	11
2.2.1 Genomic extraction.....	11
2.2.2 Microsatellite multiplex PCR set.....	11
2.2.3 유전형 데이터 분석.....	13
2.2.4 유전적 다양성 통계 분석.....	13
2.2.5 유전적 집단구조 분석 .....	18
III. 결과 .....	19
3.1. Microsatellite 마커를 이용한 집단유전학적 분석 .....	19
3.1.1 유전자형 분석.....	19

3.1.2 유전적 다양성 분석 .....	20
3.1.2.1 강원도 양양.....	25
3.1.2.2 경북 경주.....	27
3.1.2.3 경남 거제.....	29
3.1.2.4 전남 완도.....	31
3.1.2.5 강원 동해.....	33
3.1.2.6 강원 고성.....	35
3.1.3 대립유전자 빈도 분석 .....	37
3.1.4 집단구조 분석 .....	51
<b>IV. 고찰 .....</b>	<b>59</b>
<b>Chapter III</b>	
<b>방류효과 및 가계 검증을 위한 혈연관계 분석 기법 연구 .....</b>	<b>62</b>
<b>I. 서론.....</b>	<b>62</b>
<b>II. 재료 및 방법 .....</b>	<b>65</b>
2.1. 어미 및 종자 시료의 확보 .....	65
2.2. 혈연관계 분석 .....	67
2.2.1 마커의 유용성 검증 .....	67
2.2.2 친자확인 및 통계적 판정 기준 설정 .....	68
2.2.2.1 친자확인 및 가계 선발.....	68
2.2.2.2 통계적 판정 기준 설정.....	68
2.2.3 형매관계 확인 및 통계적 판정 기준 설정.....	71
2.2.3.1 형매관계 확인 및 가계 선발.....	71
2.2.3.2 통계적 판정 기준 설정.....	71

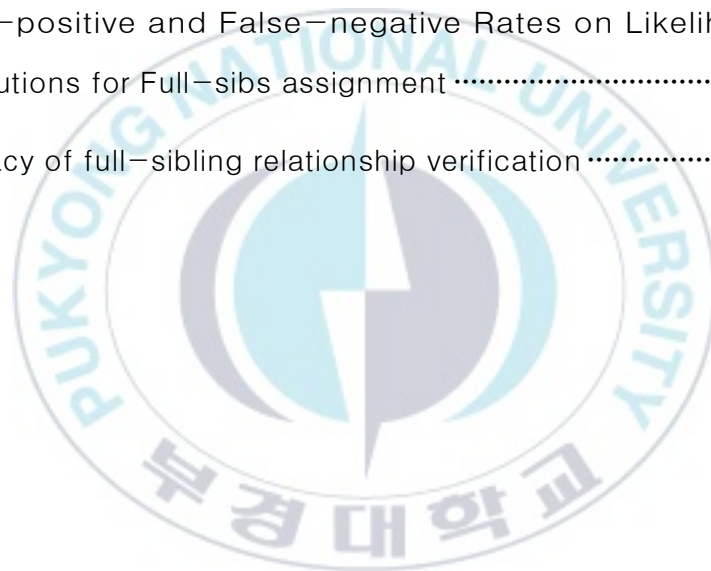
<b>Ⅲ. 결과</b> .....	<b>75</b>
3.1. 친자 및 형매관계 확인을 위한 통계적 판정 기준 확립 .....	75
3.1.1 마커 유용성 검증 .....	75
3.1.2 실제 친자관계 그룹 확보 .....	78
3.1.3 우도비 산정 .....	81
3.1.4 친자관계 판정을 위한 우도비 임계 값 설정 .....	82
3.1.5 실제 형매관계 그룹 확보 .....	85
3.1.6 우도비 산정 .....	85
3.1.7 형매관계 판정을 위한 우도비 임계 값 설정 .....	88
3.1.8 형매관계 판정을 위한 임계 값 검증 .....	90
<b>Ⅳ. 고찰</b> .....	<b>93</b>
<b>참고 문헌(References)</b> .....	<b>96</b>
<b>감사의 글</b> .....	<b>111</b>



## 표 목 차(List of Tables)

Table 1. Details of <i>Apostichopus japonicus</i> samples examined in this study .....	9
Table 2. Information of <i>Apostichopus japonicus</i> microsatellite multiplex set primers .....	12
Table 3. Genetic Diversity Analysis Tool .....	17
Table 4. Summary of genetic diversity indices in six populations of <i>Apostichopus japonicus</i> .....	22
Table 5. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of YY population .....	26
Table 6. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of KJ population .....	28
Table 7. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of GJ population .....	30
Table 8. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of WD population .....	32
Table 9. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of DH population .....	34
Table 10. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of KS population .....	36
Table 11. Pairwise $F_{ST}$ and genetic distance for six population of <i>Apostichopus japonicus</i> .....	53
Table 12. Selected Delta K value using the Structure Harvester .....	56
Table 13. Proportion of membership of each pre-defined population in each of the 2 clusters .....	58
Table 14. Details of <i>Apostichopus japonicus</i> samples examined in this study .....	66
Table 15. Kinship Formulas for parentage analysis .....	70
Table 16. The likelihood ratios about two competing hypotheses .....	73
Table 17. Relatedness coefficients( $k_0, 2k_1k_2$ ) for some common relationships	

between two individuals .....	74
Table 18. Forensic parameters of 13 microsatellite markers in <i>Apostichopus japonicus</i> .....	76
Table 19. Combined non-exclusion probability for parent of microsatellites .....	77
Table 20. Parentage verification of some sample .....	80
Table 21. False-positive and False-negative Rates on Likelihood ratio (LR) Distributions for Parentage assignment .....	84
Table 22. Likelihood ratio of distributions for Full-sibs assignment .....	86
Table 23. False-positive and False-negative Rates on Likelihood ratio (LR) Distributions for Full-sibs assignment .....	84
Table 24. Accuracy of full-sibling relationship verification .....	92





## 그림 목 차(List of Figures)

Fig. 1. Map showing locations and abbreviated names for Seven <i>Apostichopus japonicus</i> samples in Korea .....	10
Fig. 2. Comparison of allele frequency distribution and Genotypes of 13 locus in six population .....	38
Fig. 3. Neighbor-joining tree of six population based on the Nei's standard genetic distance with sample size correction .....	54
Fig. 4. Principal coordinates analysis (PCoA) of genetic variation in <i>Apostichopus japonicus</i> populations based on microsatellite data .....	55
Fig. 5. Structure results in <i>Apostichopus japonicus</i> .....	57
Fig. 6. Principle of paternity verification .....	79
Fig. 7. Likelihood ratio distributions for parent/child relationship with 13 loci .....	83
Fig. 8. Likelihood ratio distributions for Full-sib relationship with 13 loci .....	87
Fig. 9. Verification of LR values produced by all full-sibling relationships .....	91

Population genetic analysis and genetic kinship investigation of  
domestic sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

Han Ji Sung

Department of Fisheries Biology, The graduate School,  
Pukyong National University

### Abstract

Marine biological resources are economic resources as an important component of natural ecosystems. In addition, The genetic diversity of living things creates various values in the ecosystem. Marine biological resources are managed worldwide for diversity management and conservation. In 1992, the Convention on Biological Diversity (CBD) was signed and has the right to biological resources. Recently, although the Access to genetic resources and Benefit-Sharing (ABS) agreement was signed, most of the studies related to the ecological characteristics, habitat, and seed production of marine organisms are conducted, and there are few studies for population structure and characteristics and kinship analysis. In this study, genetic diversity and population structure analysis, and kinship analysis were conducted on sea cucumbers. Genetic diversity and population structure analysis were performed using the developed 13 Microsatellite marker for sea cucumber. As a result of analyzing the genetic diversity of sea cucumbers by region in Korea, the average number of alleles was highest in KJ(13.92). The observed heterozygosity( $H_o$ ) was highest in YY(0.660). The  $F_{IS}$  was the lowest in the YY(0.104) and the highest in the KS(0.231). The high inbreeding coefficients are likely to genetic decline and rapid change in the genetic characteristics. In the genetic distance analysis, YY was found to be relatively far from GJ(0.101) and KJ(0.099). The  $F_{st}$  was 0.006 to 0.034 in all groups, which is within the low level (0.000 to

0.050) suggested by Wright (1978). In the STRUCTURE analysis, It was divided into the YY and other groups(KJ, GJ, WD, DH, KS). This result was similar to that of genetic distance and PCoA. PIC and Exclusion power were calculated using the genotyping results of 943 sea cucumbers. The Power of discrimination was  $6.886 \times 10^{-16}$ , the Power of exclusion was  $3.468 \times 10^{-10}$ , and the Power of sibling discrimination was  $5.21 \times 10^{-06}$ . And we calculated false-positive and false-negative error rates. In the parent/child, the relationship could be identified in likelihood ratio '1'. In sibling relationships, the relationship could be identified in likelihood ratio of '10'. Taken together, this study can be used as basic data on releasing effect and genetic management for conservation by confirming the genetic diversity, current status, and genetic structure of sea cucumbers designated as endangered by IUCN.



# Chapter I

## 종합 서론

생물자원은 인류의 중요한 경제적 자원인 동시에 지구 환경을 구성하는 생태계 요소로서 각 생물 종(및 생물집단)은 고유의 가치를 지닌다. 전 지구적 생물 다양성 감소 및 멸종에 대응하기 위해서 1992년 생물다양성협약(Convention on Biological Diversity, CBD) 체결 이후 생물다양성 손실률 감소를 목표로 하고 있으나 생물 다양성은 남획, 기후변화, 멸종 위협, 환경오염, 외래종 유입, 자원 소비 등의 원인으로 지속적인 감소를 하고 있다(Butchart, 2010). 특히 해양생태계의 경우 상기 원인 이외에도 바다 사막화 등과 같은 서식지 상실, 인류의 해양생물 소비량 증가에 따른 특정 수산품종들의 빠른 생물 다양성 손실이 빈번히 야기된다(Duncan and Lockwood, 2001).

전 세계적으로 해양생태계의 보전 및 수산생물자원의 복원을 위한 서식지 보전, 남획 방지, 환경오염 관리 등이 있으며(Bruton, 1995), 유전적 다양성 관리와 집단구조분석 및 인공 종자 방류를 통한 유전학적 보전 연구가 진행되고 있다. 그러나 대부분 생물에서는 자연생태계에서 생존에 위협을 받기 때문에 인공증식을 통한 종 보전방법이 필요하며(Ralls and Ballou, 1986), 인공종자 방류의 목적은 유전적 다양성이 확보 및 관리가 이루어진 종자를 생산하고 이를 다시 자연환경으로 방류함으로써 자연집단의 다양성 유지 및 증대와 동시에 개체 수를 확보하는데 있다(Ford, 2002).

우리나라도 예외는 아니어서 현재 수산자원관리법 및 기본계획 수립을 토대로 방류종자인증제, 보전유전학적 관리, 방류사업, 인공어초사업, 바다목장조성 등 수산자원의 회복을 위해 여러 노력을 기울이고 있는 중이며, 65종 이상의 해수면 또는 내수면 방류 품종이 관리되고 있다(한국수산자원관리공단, 2019). 해양수산 품종의 방류에서는 무엇보다

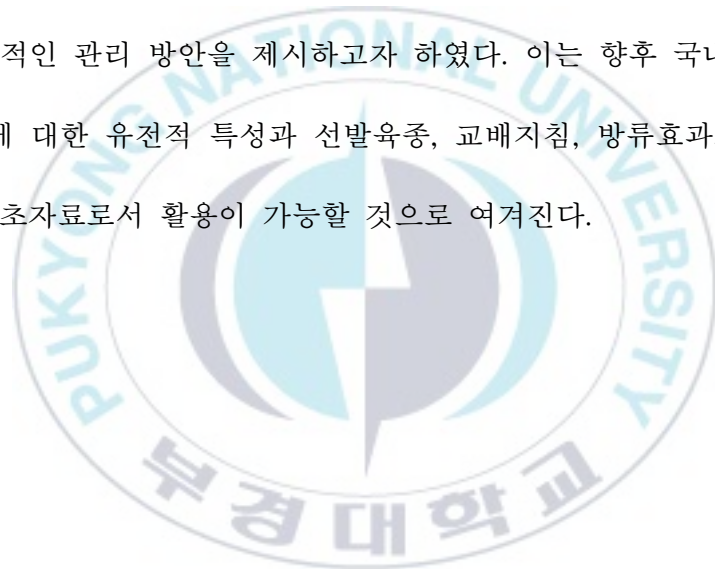
다도 유전적 다양성 관리가 매우 중요시되는데, 제한된 어미에서 생산한 인공종자(민간 양식 종자 등)는 자연집단에 비해 적은 유전자원(gene pool)과 낮은 다양성을 갖는 것이 일반적이며, 특히 여러 세대가 한정된 어미로부터 생산된 경우 근친교배, 비계획적 교배 및 인위적 선발 등의 원인으로 자연집단뿐만 아니라 생산에 이용한 어미 집단보다도 유전적 다양성이 감소한다고 알려져 있다(Jeong *et al.*, 2006, 2007; Kim *et al.*, 2007).

이에 방류종자에 대한 오랜 관리 경험을 가진 외국의 경우 방류 종자의 유전적 다양성 유지를 위하여 기술적 지침을 제시하고 유전적 관리를 추진하고 있으며(일본 수산 종합연구센터 및 수산청, 2015), 열성화, 폐사, 근친약세를 예방하기 위한 유전학적 연구와 선발육종, 친자확인 등을 통해 종 보전을 위한 연구를 시행하고 있다(Puebla O, *et al.*, 2008; Fukuan Du1 *et al.*, 2017; Srivastava *et al.*, 2016; Ismail *et al.*, 2018; Kashiri *et al.*, 2018). 국내에서도 최근 빠르게 발전하고 있는 분자생물학적인 방법들을 이용하여 다양한 어패류에서 유전자 마커(genetic marker)의 개발을 통한 유전적 특성 규명, 집단구조분석, 유전적 다양성 조사, 개체식별 및 친자확인, 선발육종 등 유전적 다양성 소실을 예방하기 위한 노력들이 이루어지고 있으며 환경부에서는 2002년부터 멸종위기 어류의 보전 및 생물다양성 확보를 목적으로 인공증식 및 방류 연구를 추진해 오고 있다(13종 인공증식 후 자연방류 효과 조사 등; 환경부 2018; 국립수산과학원, 2011). 또한 국립수산과학원은 2009년 넙치의 자연집단과 양식집단의 유전적 다양성 비교를 통해서 효율적인 선발육종과 근교약세 방지를 위한 연구와 우리나라에 수입되는 중국산 젓새우(*Acetes chinensis*)의 원산지 판별을 위한 유전학적 연구를 수행한 바 있다(Kang *et al.*, 2014). 한국수산자원공단에서는 자원량이 감소하고 있는 해삼(*Apostichopus japonicus*)에 대해 2012년 유전적다양성 모니터링 대상품종 지정 이후 2017년도 21,448,848마리, 2019년도 20,042,246마리, 2020년도 19,940,256마리 방류를 해오고 있으며(<https://seed.fira.or.kr>, 2021년 한국수산자원공단 방류통계) 인공종자 방류사업

의 효과 평가와 모니터링 전략을 수립하고 있다(한국수산자원공단, 2017). 이에 대한 유전적 평가를 위해 다양한 DNA 분자 마커들이 활용되었으나(Song *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2010) 현재까지 대부분 Microsatellite 마커가 실효성 및 활용성 측면에서 가장 활발히 이용되고 있다. 이러한 Microsatellite 마커는 게놈상 짧은 반복 염기서열로 대부분 non-coding 영역에 존재하며 실험이 간단하고 재현성이 뛰어난 장점으로 인해 국내외에서 집단 유연관계, 유전적 다양성(Kanno *et al.*, 2005; Chen and Li, 2007; Kang *et al.*, 2011), 근교약세 등 종 보존 연구 뿐만 아니라(Brown *et al.*, 2003; Kim, 2011; Limei Chen *et al.*, 2012; Hong, 2014; Zhiguo Dong *et al.* 2018), 친자 검증(Herbinger *et al.*, 1995; Estoup *et al.*, 1998; Beheregaray *et al.*, 2000; Gheyas *et al.*, 2007), 생존율(McGinnity *et al.*, 2003), 어류의 기원 확인(Glover *et al.*, 2010) 연구에서도 유용하게 활용되고 있다. 그러나 마커의 유효성을 위해서는 집단유전학에서 유전다양성지수인 기대치 이형접합율(expected heterozygosity; HE), 무효대립유전자(null allele), 하디·바인베르크 평형(HWE)에 대한 검증이 필요하며(Dakin *et al.*, 2004; Wordley *et al.*, 2011), 친자확인에서는 마커의 높은 PIC(Polymorphism information, 다형성정보지수)와 우수한 누적개체식별력(combined power of discrimination)과 누적부권배제력(combined power of exclusion)이 필수적이다(Turrina *et al.*, 2014). 또한, 마커의 식별력에 대한 과대평가는 매우 빈번하게 일어나기 때문에(Vandeputte *et al.*, 2011), stuttering 또는 size shift(사이즈 밀림현상) 등의 유전형 오류(Yue *et al.*, 2014)에 대한 추가 검증도 필요하다. 이러한 오류의 가능성을 보완하기 위해서 개인식별이나 혈연관계 확인에서 통계적 확률 값을 산출하고 평가하는데, 이때 짝확률(match probability)과 우도비(likelihood ratio; LR)를 사용하여 임계값(Threshold values)을 설정하는 것이다(양 *et al.*, 2013). 현재 해양생물에서의 친자확인률은 넙치에서 86%(Seikino *et al.*, 2003), 멸치에서 93%로 보고되고(Borell *et al.*, 2011), 국내 일부 방류

대상종에서도 혈연관계확인을 통해 효과조사를 진행 중이긴 하나 이는 우도비의 임계 값이 고려되지 않아 판정 오류의 가능성이 높다. 따라서 신뢰도 높은 혈연관계 검증 기법 연구와 유전적 다양성 비교 연구(Kanno *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011)이외에도 국내 해삼 집단에 대한 집단구조적 특성과 관리 방안에 대한 세부적인 연구가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내 13마커를 활용하여 해삼(*Apostichopus japonicus*)에 대한 유전적 다양성 및 집단구조분석을 통해 국내 해삼의 유전적 특성과 현황을 파악하고 방류인증제의 친자확인과 방류효과조사에서의 정확한 혈연관계 검증을 위한 통계적 기준 연구를 통해 종합적인 관리 방안을 제시하고자 하였다. 이는 향후 국내 해삼뿐만 아니라 다양한 해양생물에 대한 유전적 특성과 선발육종, 교배지침, 방류효과조사 등 종 보존을 위한 유전학적 기초자료로서 활용이 가능할 것으로 여겨진다.



## Chapter II

### 국내 해삼의 유전적 다양성 분석 및 집단유전학적 분석

#### I. 서론

해삼(*Apostichopus japonicus*)은 극피동물문 해삼강 (Holothuroidea)에 속하는 무척추 동물로 전세계적으로 외부 형태와 지리적 분포 특성에 따라 1,714종으로 분류되며(Paulay 2014), 우리나라에는 돌기해삼(*Apostichopus japonicus*)을 포함하여 홍해삼(*Stichopus japonicus*), 가시뺏해삼(*Protankyra bidentata*), 개해삼(*Holothuria manacaria*), 흰해삼 (*Paracaudina chilensis*), 오각광삼(*Eupentacha chronhjelmi*) 등 29종이 서식하고 있으나 (Lee *et al.*, 1999) 청해삼, 홍해삼, 흑해삼의 명칭은 일본에서 구분하는 이름으로 모두 돌기해삼이다(수산기술지 해삼종묘생산, 2004). 해삼은 수온이 8~10° C에서 성장이 빠르고 먹이활동이 활발한 최적 수온이며 17~18°C 이상에서는 먹이 활동을 중지하고, 25° C 이상 고수온일 경우 활동을 멈추고 하면(夏眠, aestivation)이라는 생태적 특성을 갖는다(Lee *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2006). 산란 시작 수온범위는 13~16°C이며 18~22°C에서 산란을 거의 종료한다. 성장과 관련하여, 자연에서 유생 부착 후 1년째 5.9cm(15.5g), 2년 13.3cm(122.5g), 3년 17.6cm(307.0g), 그리고 4년에 20.8cm(472.5g)의 크기와 무게에 도달한다고 보고된 바 있다(수산기술지 해삼종묘생산, 2004). 또한 체중 2~3g의 어린 해삼은 주로 부착성 미세조류 등을 섭이하고 성장함에 따라 해조류와 유기물, 원생동물 및 갑각류, 연체동물의 유생, 분해과정에 있는 어류의 사체 등을 섭이한다. 생활사는 수정란, 난할기, 포배기, 낭배기의 초기 발생단계와, 초기, 중기, 후기 유생기를 거쳐 저서생활로 들어가



약 3~4일후에 백색 반투명한 새끼해삼으로 7~12개월 이후에 약 50mm(5cm)의 해삼 종자 상태로 성장한다(수산기술지 해삼종묘생산, 2004).

해삼은 전세계적으로 널리 분포하며 주된 상업적 소비는 중국·대만·싱가포르·홍콩 등 일부 아시아 국가들에서 이루어지고 있으나 지속적인 수요증가로 인해 여러 국가들에서 무분별한 남획과 포획으로 자연집단 크기 축소 및 자원량의 감소가 야기되고 있는 실정이다. 이에 중국과 일본 등 주요 아시아 국가에서는 1980년대 이후부터 해삼 종자생산을 시작하고 있으며(Zhang *et al.*, 1998), 우리나라에서는 1990년대부터 양식산업 및 종자생산기술 개발로 인해 매년 종자생산과 연안지역에 방류를 해오고 있어(해양수산부 2005) 생산량은 2010년 3,110,634톤, 2015년 3,337,383톤, 그리고 2020년 3,711,412톤으로 점차 증가하고 있는 추세이다(<https://kosis.kr>, 2021년 어업 품종별 생산량). 이러한 인공종자방류 및 양식생산의 노력에도 불구하고 아직까지 유전적 열성화 예방, 다양성 확보 등 유전적 관리의 중요성에 대한 인식은 상대적으로 미미한 실정으로 인공 방류종자에서 생식력 감소, 생존율 저하, 난 크기 감소, 유효집단 크기 감소, 유전적 다양성이 감소한 사례가 보고되었다(Araki *et al.*, 2007; Heath *et al.*, 2003; Tessier *et al.* 1997; Prez Enrique *et al.*, 1999, Hara *et al.*, 2003, Lindrigan *et al.*, 2005; Sugaya *et al.*, 1999; Norris *et al.*, 2000). 따라서 현재 FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1981)에서는 해양생물의 유전적다양성을 보호하고 근친교배를 방지하기 위해 인공종자생산 시 유효어미 개체 수(Effective number of population size)와 근교계수(inbreeding coefficient)를 각각 50개체와 0.10을 기준으로 정하였으며 자연집단의 유전적 다양성 감소 및 영향을 최소화할 수 있는 가장 중요한 방법이라고 하였다(Sekino *et al.*, 2002).

해삼을 대상으로 한 집단유전학적 연구 또는 인공증식 방류종자의 분석의 경우 국내에서는 2012년 이후 한국수산자원공단에서 유전적 다양성 저하의 우려로 자연집단, 종

자 방류에 따른 자연집단, 인공종자에 대한 유전적 다양성 모니터링을 수행하고 있으며 (한국수산자원공단, 2017), Kanno *et al.*, (2005)의 마커를 활용한 다양성 비교 연구도 진행하였다(Kim *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011). 또한 해외에서는 해삼에 대한 인공종자 방류에 있어 유전적 연구의 필요성을 언급하였으며(Purcell *et al.*, 2012), 인공종자와 자연산에 대한 유전적 다양성 비교 연구도 진행하였다(Kanno *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Dong *et al.* 2018). 그러나 현재까지는 유전적 다양성 모니터링 측면에서의 연구가 대부분이며 이는 다양성 확보에 집중되어 있어 유전적 특성과 집단구조적 분석에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 향후 해삼에 대한 지속적인 이용과 경제적 효과를 유지하기 위해서는 유전적 다양성 뿐만 아니라 각 집단에 대한 구조적 특성과 산출된 유전변수를 연계하여 원인을 예측하고 이에 대해 향후 연구 방안과 사업 계획을 수립할 필요성이 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라의 경제성 품종인 해삼의 종 보존학적 연구를 위해 유전적 다양성 및 집단유전학적 분석을 진행하고 동해, 남해, 전남에 서식하는 해삼에 대한 유전적 특성 및 집단구조적 특성에 대한 종합적인 결과를 도출하여 원인 예측과 향후 관리 방안을 제시하고자 하였으며 국내 해삼의 지역적 차이를 통해 향후 국내 해삼의 방류 계획수립 시 유전적 현황에 대한 기초자료로서 제공하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 2.1. 시료의 확보

본 연구에 사용된 시료의 경우 한국수산자원관리공단과 올인원진택에서 수집한 동해, 전남과 경남 지역의 해삼을 활용하였으며 2020년 자연에서 채집된 강원 양양(YY) 220개체, 경북 경주(KJ) 181개체, 경남 거제(GJ) 75개체, 전남 완도(WD) 155개체, 강원 동해(DH) 230개체, 강원 고성(KS) 93개체에 대한 총 954개체(6 그룹)를 분석하였다(Table 1, Fig 1).



Table 1 Details of *Apostichopus japonicus* samples examined in this study.

Sampling site	Abbreviation	Sample size	Date sampled
Yangyang	YY	220	2020
Kyongju	KJ	181	2020
Geoje	GJ	75	2020
Wando	WD	155	2020
Donghae	DH	230	2020
Koseong	KS	93	2020

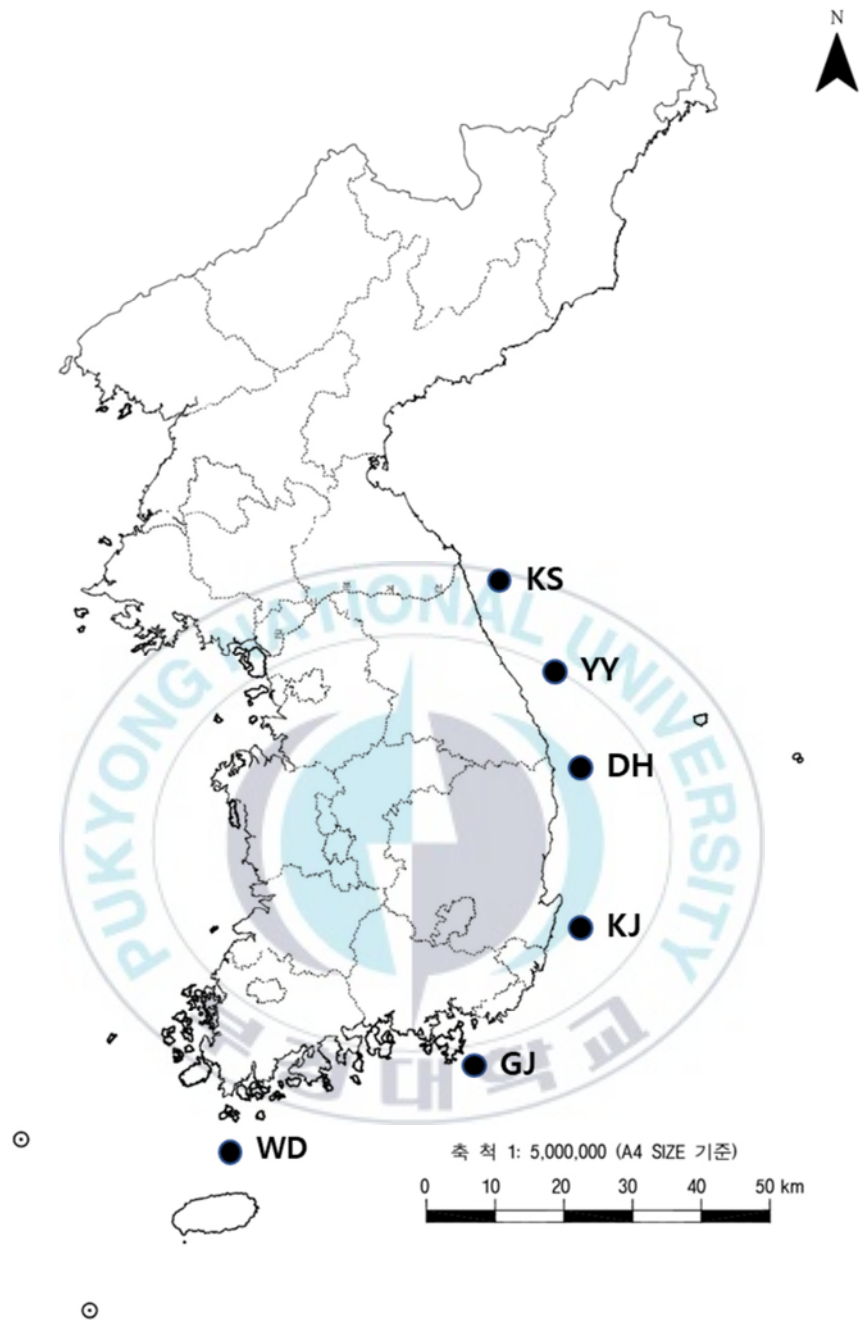


Fig. 1. Map showing locations and abbreviated names for Seven *Apostichopus japonicus* samples in Korea. (For population abbreviations see Table 1)

## 2.2. Microsatellite DNA marker를 이용한 집단유전학적 분석

### 2.2.1 Genomic DNA extraction

DNA 추출 시약의 경우, E.Z.N.A. mollusc DNA kit (Omega, USA) 또는 Genomic DNA Extraction Kit (Promega, USA)를 이용하였다. High quality DNA를 추출하기 위해 샘플 수령 후 채취된 조직의 약 1 cm<sup>2</sup> 내외로 절단하고 멸균 3차 증류수로 세정 후 Proteinase K (20mg/ml)와 lysis buffer에 조직을 60° C에서 4시간 이상 완전히 녹이고 OMEGA 사의 E.Z.N.A mollusc kit 추출 메뉴얼에 따라 추출하였다. 추출한 DNA는 Spectrophotometer (Nano-400A)을 이용하여 QC(Quality control) 확인하였다.

### 2.2.2 Microsatellite multiplex PCR set

Microsatellite multiplex PCR set은 기 개발된 해삼의 13쌍 multiplex PCR set 정보를 이용하였으며 Applied Biosystems사의 DS-33 Matrix Standard Set(FAM, NED, VIC, PET)의 형광물질을 표지한 Microsatellite 증폭용 Primer를 이용하였고 라벨링 형광 물질 정보 및 각 마커에 대한 repeat motif, sequence 정보는 표 2에 나타내었다. PCR 조건은 Pre-Denaturation step은 95°C 10min, 1<sup>st</sup> step(5cycle)의 경우 94°C 60sec, 59°C 60sec, 72°C 60sec, 2<sup>nd</sup> step(5cycle)의 경우 94°C 60sec, 58°C 60sec, 72°C 60sec, 3<sup>rd</sup> step(25cycle)의 경우 94°C 60sec, 57°C 60sec, 72°C 60sec, Final step은 65°C 10min 후 4°C에 보관하였다.

Table 2. Information of *Apostichopus japonicus* microsatellite multiplex set primers

Dye	Locus	Repeat Motif	Size range (bp)
FAM	AJ19640	(CAG) <sub>6</sub>	100–160
	AH132	CA	240–380
VIC	AH076	GA	100–170
	Contig21099	(AG) <sub>11</sub>	230–250
NED	AJ17	(CTGT) <sub>12</sub>	130–230
	C70	CT	230–330
PET	AJ91732	(AT) <sub>6</sub>	200–300
FAM	HG26I	(AT) <sub>13</sub>	100–150
VIC	HC416	(CA) <sub>12</sub>	250–310
	4S02	(AG) <sub>10</sub> GTG(GA) <sub>22</sub>	120–220
NED	ACaj052	CT	260–360
	Contig36873	(TG) <sub>10</sub>	210–230
PET	DKO7S	(AT) <sub>10</sub>	260–280

### 2.2.3 유전형 데이터 분석

국내 해삼 954개체의 Microsatellite multiplex PCR을 위해 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient 장비를 이용하여 유전자를 증폭하고, 증폭이 완료된 PCR 산물은 30X dilution 시킨 후, 증폭산물 1ul와 Standard size standard GeneScan LIZ 500(Applied Biosystems, USA) 및 Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, USA) 혼합물을 1:9로 희석하고 95°C 에서 5분간 변성시킨 후 분석을 위한 시료로 사용하였다. 각 시료에 맞춰 판독력이 우수한 자동염기서열분석기 AB3730XL(Applied Biosystems, USA)을 사용하여 크기별로 분류되도록 하고 데이터를 생산하였다. 생산된 Raw data는 GeneMapper version 4.0(Applied Biosystems, USA) 분석프로그램을 이용하여 Labeling 별 allele scoring 분석하였다.

### 2.2.4 유전적 다양성 통계 분석

유전적 다양성 분석 및 통계 분석의 경우는 각 유전자 좌위(locus)에 대한 대립유전자 빈도(allele frequency), 다형성정보지수(PIC; Polymorphic Information Content), 관측치 및 기대치 이형접합체율( $H_o$ ,  $H_e$ )은 Cervus 3.07 software (Marshall *et al.*, 1998)를 통해 확인하였으며 FSTAT ver2.93 software (Goudet, 1995)에서는 최소 샘플 수를 기준으로 대립유전자 수를 보정하는 allelic richness(대립유전자수)와 gene diversity(유전적 다양성),  $F_{is}$ (근교계수)값을 구하였다. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)에 대한 유의성 검증은 adjusted p 값인 Bonferroni correction을 적용하도록 하였다. (Table 3.) 각 대립유전자의 실제 빈도를 구간 추정해 보면 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$p_i = P_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{j \neq i} P_{ij}$$



여기서  $P_{ii}$ 는 대립유전자  $i$  두 개로 이루어진 동형접합자 유전자형의 관측빈도를,  $P_{ij}$ 는 대립유전자  $i$ 를 하나 포함하는 이형접합자 유전자형 관측빈도를 나타낸다. 대립유전자 빈도 추정치  $P_i$ 에 대한 표준오차는 분산  $\text{Var}(p_i)$ 을 이용하여 구할 수 있다.

이형접합체(Heterozygosity)은 분석 집단 내에 나타나는 유전형 및 대립유전자에 대한 변이 및 다양성 정도를 측정하기 위한 기본적인 지수이다. 그 중 집단에서 실제로 관측되는 이형 접합자의 발현 빈도인 이형접합체관측치(observed heterozygosity)과 대립유전자 빈도를 이용하여 집단에서 추정하는 이형접합체기대치(expected heterozygosity)로 구분한다(Nei 와 Roychoudhury, 1974). 이는  $n$ 을 관측된 표본 수,  $k$ 를 대립유전자 개수,  $p$ 를 대립유전자 빈도라고 할 때, 이형접합체율(obs-H) = (이형접합자 관측 수)/ $n$ 의 식으로 추정한다. 이는 특정 마커에 대하여 집단에서 그 마커에 대해 나타난 이형접합체체의 비율을 나타내며 그 값은 0~1사이의 값을 나타낸다. 이형접합체율 값이 클수록 마커의 다형성이 크고 마커의 유용성이 높다고 말할 수 있다. 이형접합체율은 다음 같이 정의된다.

$$H_{etE} = 1 - \left( \sum_{i=1}^k P_i^2 \right)$$

$H_{etE}$  : 기대 이형접합률 (expected heterozygosity)

$P_i$  =  $i$ 번째 대립 유전자로부터의 측정된 빈도 값

유전적 다양성분석에서 사용되는 PIC 값은 특정 집단의 유전적 다형성을 나타내는 각 마커의 일반적인 지표로 사용되며 계산식은 다음과 같다.

$$PIC \text{ value} = 1 - \left( \sum_{i=1}^k P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2P_i^2 P_j^2$$

k: 대립유전자의 수

P<sub>i</sub>, P<sub>j</sub>: I 번째와 j 번째의 대립유전자의 빈도

PIC: 다형성 정보량(polymorphism information content)

다양성 정보량(PIC, Polymorphism information content)은 부모로부터 자손에 전달되는 대립유전자를 정확히 구별해 낼 수 있는 확률이며 이는 다시 말하면 유전자형을 이용하여 부모, 자식 관계를 확인하는 것으로 여기서 마커의 다양성 정보력이란 개체식별의 측면에서 보았을 때 다양성 값이라고 할 수 있다. 따라서 마커 연구에서의 다양성 정보량은 정보력의 척도로서 활용하며 유용한 marker를 선별 기준으로 사용할 수 있다.

하디-와인버그 평형(Hardy-Weinberg Equilibrium)은 다음과 같이 설명할 수 있다. 두 개의 대립유전자 A, a로만 이루어진 유전자좌의 경우 Aa의 유전 자형을 가지고 있는 부모에게서 나올 수 있는 자식의 유전자형은 AA, Aa, aa 의 3가지로 각각 1 : 2 : 1의 분리 비를 가진다. 여기에 집단의 개념을 도입하여 부모 집단에서 대립유전자 A의 빈도를 p, a의 빈도를 q라 가정하였을 때, 단지 두 개의 대립 유전자로 이루어진 유전자 좌이므로 p + q = 1 이라는 등식이 성립하게 된다. 이때 AA의 유전자형을 지니는 자손은 p<sup>2</sup>의 빈도로 존재할 것이고 Aa의 유전자형을 지니는 자손 은 2pq의 빈도로 존재할 것이기 때문에 A 대립유전자의 빈도는 p<sup>2</sup> + 2pq / 2가 된다.

따라서 자손집단에서 A 대립유전자의 빈도는  $p^2 + pq = p(p+q) = p$  로 정리가 된다( $p+q=1$ ). 결국 자손집단에서 A 대립유전자의 빈도는  $p$ 가 되며 이것은 부모 집단의 빈도와 동일한 값이다. 마찬가지로 자손집단에서의 a대립유전자의 빈도는  $q$ 로 결론지어진다. 즉, 특정 유전자좌에 대한 대립유전자의 빈도는 세대에 관계없이 늘 일정한 값을 유지한다는 하디-와인버그 평형이론은 외적인 요인 또는 환경적 요인이 배제될 경우 유전자와 유전자형 빈도가 변하지 않고 평형상태에 있다는 것을 말하며 유전자좌 내에서의 독립성 검정(Chi-square)은 각 유전자형 빈도에 대한 실제 관측빈도와 기대빈도와의 비교를 통해 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{관측빈도} - \text{기대빈도})^2}{\text{기대빈도}}$$

$F_{is}$ (Inbreeding coefficient)는 각 개체들의 근친도를 나타내는 것으로 집단의 크기에 영향을 받는 대립유전자 빈도가 특정 집단에서 고정되는 정도를 나타내며, 특정 집단 내에서 개체 간의 근친도가 높으면 그 집단은 다른 집단과 유전적 차이가 급속도로 빨리 고정되고 이형접합도(heterozygosity)값이 낮아진다. 이는 유전적으로 다른 집단으로 변해갈 뿐만 아니라 열성화, 근교약세(inbreeding depression) 등이 일어나게 되어 집단의 유전적 상태를 유추해 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 생태계 다양성을 유지하기 위한 가장 기본적인 구성요소인(Spielman *et al.*, 2004) 유전적 다양성 및 집단 구조분석을 통해 유전 변이 정도를 파악하고 유전적 다양성 보존을 위한 효율적인 전략을 제시하고자 하였다 (Hughes *et al.*, 2008).

Table 3. Genetic Diversity Analysis Tool

구분	분석 내용
Cervus 3.07 (Marshall <i>et al.</i> , 1998)	Allele frequency, Allele No, observed heterozygosity, expected heterozygosity, PIC(Polymorphic Information Content), Hardy-Weinberg equilibrium(HWE)
FSTAT ver2.93 (Goudet, 1995)	Allelic richness, Gene Diversity, FIS
POPGENE	Hardy-Weinberg equilibrium(HWE), Genetic Distance, UPGMA
GenAlEx 6.501	PCoA(Principal Coordinates Analysis)
POPTREE	<i>Fst</i> (Latter 1972), Genetic Distance(Nei <i>et al.</i> , 1983)
Structure 2.3.4 (Pritchard <i>et al.</i> , 2000)	Analysis of genetic population structure

## 2.2.5 유전적 집단구조 분석

각 집단 간 유전적 분화도 (genetic differentiation,  $F_{ST}$ )는 Genepop 3.4 software를 이용하며 (Raymond and Rousset, 1995) 유전적 거리((Nei's Genetic distance) 수준 및 유사도 matrix를 도출하도록 하며 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean(Sneath and Sokal 1973), Bootstrap tests(Felsenstein, 1985)의 경우 POPTREE를 이용하여 유전적 거리를 그림으로 나타내어 분석하고 PCoA 분석의 경우 GenAlEx (Ver.6.501)을 이용하여 도출한다. 각각을 군집화(clustering) 및 유전적 거리를 측정함에 있어 두 개의 유전자형을 비교하고 이 두 서열 간의 거리를 측정한다.

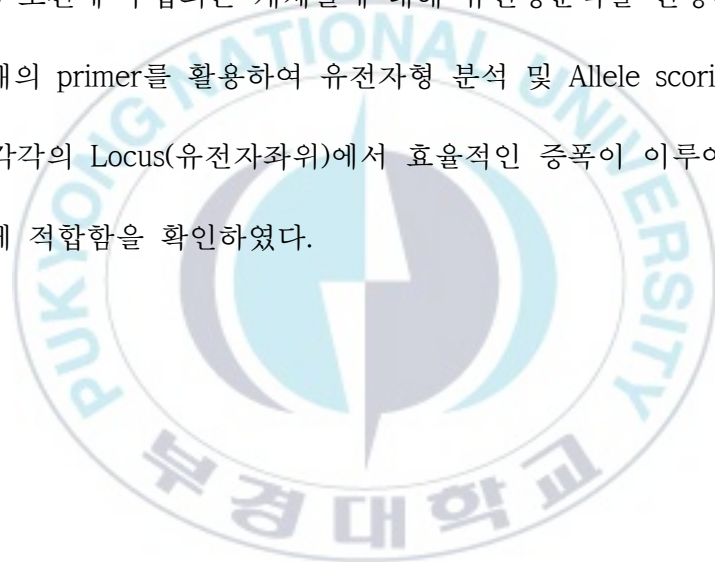
유전적 구조 분석 및 집단 별 distribution analysis 위해 집단의 유전적 균일도는 STRUCTURE software (Pritchard *et al.*, 2000)을 이용하였다. 각 집단의 모수를 추정하기 위해 'model-based clustering method' 클러스터링기법을 이용하며 구분 가능한 집단 수 ( $K$ 값)을 추정하기 위해서  $K$ 를 최소 1부터 6까지 설정하고, 각 값에 대한 평균 추정치  $Pr(X | K)$ 와 표준편차를 계산하여 데이터 수집하기 전 시뮬레이션 횟수인 burn-in 5000회, 정확한 모수추정을 위한 burn-in 후 시뮬레이션 횟수인 MCMC(Markov Chain Monte Carlo) 반복 수 50,000회를 적용하여 계산된 결과를 STRUCTURE HARVESTER(Earl and von-Holdt, 2012)를 사용하여  $\Delta K$  값 산정 및 최적의  $K$ 값을 결정하였다. 도출된 최적의  $K$ 값에 대한 cluster별 유전적 균일도를 계산하고 CLUMMP(Jakobsson and Rosengerg, 2007)를 이용해 3회 반복하여 나온 cluster에 대한 집단의 실제 분포를 DISTRUCT(Rosenberg, 2004)를 이용하여 도식화하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 3.1. Microsatellite 마커를 이용한 집단유전학적 분석

##### 3.1.1 유전자형 분석 (Genotype analysis)

99% 에탄올이 들어있는 해삼의 조직을 통해 추출한 DNA의 경우, 흡광도 (Spectrophotometer)를 통해 DNA의 QC(Quality control) 확인하였으며 260/280nm에서 순도 1.8 ~ 2.1 ratio 조건에 부합되는 개체들에 대해 유전형분석을 진행하였다. 유전형분석은 기 개발된 13개의 primer를 활용하여 유전자형 분석 및 Allele scoring을 실시하였으며 최종 분석 결과 각각의 Locus(유전자좌위)에서 효율적인 증폭이 이루어졌으며 동시 다중 분석을 수행하기에 적합함을 확인하였다.



### 3.1.2 유전적 다양성 분석

해삼 집단 954개체에 대한 분석 시료 수(N), 대립유전자수(A), 보정 대립유전자수(Ar; allelic richness), 이형접합율관측치(Ho; observed heterozygosity), 이형접합율관측치(He; expected heterozygosity), 다형성정보지수(PIC; polymorphism information contents), 하디-와인베르크 평형 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) tests 과 이에 대한 유의성 검증(Bonferroni correction (p))(NS : not significant, \* : significant at the 5% level, \*\* : significant at the 1% level, \*\*\* : significant at the 0.1% level, ND : not done), inbreeding coefficient (FIS), 유전자 다양성(Gene diversity) 등 유전적 변수에 대한 결과는 아래의 표에 나타내었다(Table 4~10).

DNA상 반복되는 염기서열 횟수에 대한 변이를 확인하는 대립유전자 수는 양양(YY)집단에서 6~23개로 평균 12.54개, 경주(KJ)는 7~25개로 평균 13.92개, 거제(GJ)는 6~18개로 평균 10.69개, 완도(WD)는 6~24개로 평균 13.00개, 동해(DH)는 8~22개로 평균 12.69개, 고성(KS)은 7~20개로 평균 11.85개가 산출되었으며 전체적으로 높은 값을 나타내었으나 고성과 거제의 경우는 소규모 집단에 대한 분석으로 비교적 낮은 값을 나타내었다.

각 마커에 대한 개체수의 편차에 따른 대립유전자 수 보정치(allele richness)를 적용하여 분석한 결과는 양양(YY)집단에서 6~22.84개로 평균 12.49개, 경주(KJ)는 7~24.64개로 평균 13.92개, 거제(GJ)는 5.92~17.93개로 평균 10.55개, 완도(WD)는 6~23.72개로 평균 12.83개, 동해(DH)는 5.99~21.98개로 평균 12.62개, 고성(KS)은 7.87~19.72개로 평균 11.68개가 산출되어 대립유전자 수 결과와 유사하게 나타났다.

한 개체의 Loci에서 두 개의 대립유전자가 서로 다르게 나타나는 비율에 대한 예상 기대값인 이형접합체율기대치(He)는 양양(YY)집단에서 평균 0.735, 경주(KJ)는 평균 0.750, 거제(GJ)는 평균 0.733, 완도(WD)는 평균 0.733, 동해(DH)는 평균 0.741, 고성(KS)은 평균 0.756으로 모든 집단에서 높은 값을 나타내었다. 한 개체의 Loci에서 두 개의 대립

유전자가 서로 다르게 나타나는 비율에 대한 실제 관측값인 이형접합체율관측치( $H_o$ )는 양양(YY)집단에서 평균 0.660, 경주(KJ)는 평균 0.621, 거제(GJ)는 평균 0.600, 완도(WD)는 평균 0.567, 동해(DH)는 평균 0.576, 고성(KS)은 평균 0.576으로 모든 집단에서 이형접합체 율기대치와 관측치 값의 차이를 확인할 수 있었으며 이는 근친교배(Inbreeding), 인위적인 교배(non-random mating) 및 왈룬드(Wahlund) 효과, 특정집단에 대한 분석 등 여러가지 원인을 예상해 볼 수 있다. 유전적 다형성정보지수(PIC)는 양양(YY)집단에서 평균 0.7032, 경주(KJ)는 평균 0.7252, 거제(GJ)는 평균 0.7002, 완도(WD)는 평균 0.7075, 동해(DH)는 평균 0.7128, 고성(KS)은 평균 0.7254로 모든 집단에서 높은 값을 나타내었다.

유전적 평형상태에 관한 HWEp(하디와인버그) 평균값은 adjusted p 값인 Bonferroni correction을 적용하였으며 양양집단에서 최소 0.0717 ~ 거제집단에서 최대 0.1643으로 모든 집단 수준에서는 통계적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다( $p > 0.05$ ). 그러나 대부분 집단에서 세부적으로 각 마커 유의성검정 결과를 보면 유의적 차이가 있는 것으로 확인되었다( $p < 0.05$ ).

집단 내 유전적 변화를 알 수 있는 근교계수( $F_b$ )는 양양집단에서 최소 0.104, 고성집단에서 최대 0.231로 양양집단을 제외하고 대부분 집단에서 다소 높은 값을 나타내었다. 이는 양양집단을 제외한 나머지 집단의 경우 유전적으로 불안정한 상태로 유전적 감소 및 특징이 급변할 가능성이 있다고 볼 수 있다.



Table 4. Summary of genetic diversity indices in six populations of *Apostichopus japonicus*

Population	Microsatellite locus														
	4S0	ACaj05	AH07	AH13	AJ1	AJ1964	AJ9173	C7	Contig2109	Contig3687	DKO7	HC41	HG26	Mean	
A	12	23	9	15	16	6	13	12	10	7	11	15	14	12.54	
Ar	11.91	22.84	8.90	15.00	16.00	6.00	13.00	11.96	9.93	7.00	10.94	15.00	13.85	12.49	
YY (N=220)	<i>Ho</i>	0.859	0.811	0.593	0.886	0.633	0.620	0.736	0.560	0.468	0.709	0.472	0.810	0.421	0.660
	<i>He</i>	0.795	0.883	0.592	0.861	0.861	0.630	0.734	0.801	0.563	0.812	0.645	0.865	0.509	0.735
	<i>Fis</i>	0.080	0.082	0.001	0.029	0.265	0.016	0.002	0.302	0.169	0.127	0.268	0.065	0.174	0.104
	<i>p</i>	0.000 ***	0.000 ***	0.271	0.000 ***	0.000 ***	0.646	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.015 *
A	12.00	25.00	11.00	16.00	18.00	9.00	12.00	12.00	8.00	7.00	12.00	16.00	23.00	13.92	
Ar	11.714	24.643	10.759	15.695	18.000	8.646	11.885	11.970	7.979	7.000	11.770	15.868	22.081	13.693	
KJ (N=181)	<i>Ho</i>	0.750	0.847	0.705	0.740	0.462	0.670	0.569	0.764	0.178	0.636	0.429	0.834	0.492	0.621
	<i>He</i>	0.790	0.917	0.676	0.825	0.905	0.645	0.816	0.835	0.291	0.803	0.682	0.892	0.671	0.750
	<i>Fis</i>	0.051	0.076	0.043	0.104	0.491	-0.039	0.303	0.086	0.389	0.208	0.372	0.065	0.268	0.179
	<i>p</i>	0.488	0.442	0.728	0.000 ***	0.000 ***	0.309	0.000 ***	0.016	0.000 ***	0.001 **	0.000 ***	0.010	0.000 ***	-
A	8.00	18.00	9.00	12.00	15.00	6.00	10.00	13.00	7.00	7.00	8.00	15.00	11.00	10.69	
Ar	7.912	17.935	8.707	11.880	15.000	5.926	9.787	12.786	6.747	6.997	7.930	14.926	10.613	10.550	
GJ (N=75)	<i>Ho</i>	0.781	0.732	0.662	0.865	0.433	0.708	0.444	0.689	0.233	0.437	0.375	0.833	0.608	0.600
	<i>He</i>	0.722	0.915	0.641	0.816	0.904	0.647	0.817	0.843	0.295	0.739	0.736	0.856	0.597	0.733
	<i>Fis</i>	0.083	0.200	0.033	0.060	0.523	0.096	0.457	0.184	0.211	0.411	0.493	0.026	0.018	0.170
	<i>p</i>	0.072	0.004 **	0.532	0.242	0.000 ***	0.555	0.000 ***	0.002 **	0.151	0.000 ***	0.000 ***	0.101	0.479	-

Table 4-1. (Continued)

Population	Microsatellite locus														
	4S0	ACaj05	AH07	AH13	AJ1	AJ1964	AJ9173	C7	Contig2109	Contig3687	DKO7	HC41	HG26	Mean	
WD (N=155)	A	10.00	24.00	10.00	15.00	19.00	6.00	14.00	15.00	6.00	7.00	10.00	14.00	19.00	13.00
	Ar	9.851	23.721	9.753	14.780	19.000	5.990	13.536	14.755	6.000	7.000	9.964	13.998	18.501	12.835
	Ho	0.642	0.538	0.619	0.830	0.504	0.592	0.444	0.708	0.149	0.569	0.451	0.813	0.510	0.567
	He	0.747	0.921	0.621	0.824	0.910	0.594	0.787	0.856	0.236	0.812	0.668	0.903	0.652	0.733
	Fis	0.141	0.417	0.002	0.008	0.448	0.004	0.437	0.173	0.369	0.300	0.326	0.101	0.218	0.225
	p	0.001 **	0.000 ***	0.716	0.665	0.000 ***	0.041 *	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***
DH (N=230)	A	11.00	22.00	9.00	13.00	18.00	6.00	12.00	13.00	9.00	8.00	10.00	18.00	16.00	12.69
	Ar	10.855	21.981	8.860	12.994	18.000	5.999	11.930	12.920	8.961	7.934	10.000	17.854	15.803	12.622
	Ho	0.732	0.607	0.583	0.809	0.458	0.659	0.478	0.754	0.177	0.529	0.408	0.782	0.518	0.576
	He	0.766	0.921	0.597	0.815	0.904	0.646	0.801	0.854	0.353	0.774	0.684	0.900	0.619	0.741
	Fis	0.043	0.341	0.023	0.008	0.494	0.021	0.404	0.117	0.498	0.317	0.404	0.131	0.164	0.225
	p	0.149	0.000 ***	0.747	0.908	0.000 ***	0.240	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.001 **	0.002 *	-
KS (N=93)	A	10.00	20.00	8.00	13.00	16.00	7.00	10.00	12.00	8.00	9.00	11.00	14.00	16.00	11.85
	Ar	9.848	19.722	7.870	12.870	16.000	6.987	9.861	11.785	7.916	8.870	10.937	13.893	15.289	11.681
	Ho	0.796	0.573	0.677	0.806	0.434	0.624	0.393	0.645	0.267	0.591	0.420	0.750	0.511	0.576
	He	0.782	0.920	0.647	0.855	0.920	0.676	0.796	0.851	0.472	0.807	0.695	0.880	0.521	0.756
	Fis	0.017	0.379	0.048	0.057	0.53	0.078	0.507	0.243	0.436	0.268	0.396	0.148	0.02	0.231
	p	0.153	0.010	0.826	0.283	0.000 ***	0.621	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 **	0.000 ***	0.004	0.175	-

Table 4–2. (Continued)

Population	Microsatellite locus														
	4S0	ACaj05	AH07	AH13	AJ1	AJ1964	AJ9173	C7	Contig2109	Contig3687	DKO7	HC41	HG26	Mean	
A	10.50	22.00	9.33	14.00	17.00	6.67	11.83	12.83	8.00	7.50	10.33	15.33	16.50	12.53	
Ar	10.35	21.81	9.14	13.87	17.00	6.59	11.67	12.70	7.92	7.47	10.26	15.26	16.02	12.31	
Mean	<i>Ho</i>	0.760	0.685	0.640	0.823	0.487	0.646	0.511	0.687	0.245	0.579	0.426	0.510	0.600	
	<i>He</i>	0.767	0.913	0.629	0.833	0.901	0.640	0.792	0.840	0.368	0.791	0.685	0.883	0.595	0.741
	<i>Fis</i>	0.069	0.249	0.025	0.044	0.459	0.042	0.352	0.184	0.345	0.272	0.377	0.089	0.144	0.189
	p	0.144	0.076	0.637	0.350	0.000	0.402	0.000	0.003	0.025	0.000	0.000	0.019	0.112	-

A, allele No; Ar, allelic richness; He, expected heterozygosity; Ho, observed heterozygosity; Fis, inbreeding coefficient; P, probability of significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium.

### 3.1.2.1 강원도 양양

양양 해삼 집단 220개체에 대한 분석결과 대립유전자수는 6~23개로 평균 12.54로 나타났으며, 보정대립유전자수(allelic richness)도 평균 12.49로 높은 유전형 분석율로 대립유전자수와 유사하게 나타났다. 두 개의 대립유전자가 서로 다른 이형접합개체의 비율로 계산되어지는 이형접합체율관측치( $H_o$ )의 평균은 0.6598로 나타났으며, 이형접합체율기대치( $H_e$ )의 경우 평균 0.7347로 나타났다. 다형성정보지수(PIC)의 경우 평균 0.7032로 나타났으며, 유전적 다양성(gene diversity)도 평균 0.7348로 높은 값을 나타내었다. 집단 내 근친도(Inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ))는 높을수록 열성화 및 유전자 소실로 이어지게 되는데 양양집단에서는 0.1043로 낮은 값을 나타내어 유전적 열성화 및 특성이 변화될 가능성이 낮다는 것을 알 수 있었다. Hardy-Weinberg 평형(HWE)에 대한 Bonferroni correction 검증결과 집단 수준에서는 통계적으로 유의하지 않았으나 ( $p>0.05$ ), 일부 마커의 경우 Hardy-Weinberg 평형에 벗어난 결과를 보였다( $p<0.05$ ).

Table 5. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of *Apostichopus japonicus* population

Locus	N	A	Ar	HObs	HExp	PIC	HW	FIS	Gene diversity	
4S0	220	12	11.91	0.859	0.795	0.764	0.000	***	-0.080	0.795
ACaj05	217	23	22.84	0.811	0.883	0.872	0.000	***	0.082	0.883
AH07	221	9	8.90	0.593	0.592	0.520	0.271	NS	-0.001	0.592
AH13	211	15	15.00	0.886	0.861	0.844	0.000	***	-0.029	0.861
AJ1	210	16	16.00	0.633	0.861	0.844	0.000	***	0.265	0.861
AJ1964	221	6	6.00	0.620	0.630	0.572	0.646	NS	0.016	0.630
AJ9173	212	13	13.00	0.736	0.734	0.698	0.000	***	-0.002	0.734
C7	218	12	11.96	0.560	0.801	0.776	0.000	***	0.302	0.802
Contig2109	218	10	9.93	0.468	0.563	0.516	0.000	***	0.169	0.563
Contig3687	220	7	7.00	0.709	0.812	0.785	0.000	***	0.127	0.813
DKO7	216	11	10.94	0.472	0.645	0.607	0.000	***	0.268	0.645
HC41	210	15	15.00	0.810	0.865	0.850	0.000	***	0.065	0.865
HG26	221	14	13.85	0.421	0.509	0.493	0.015	*	0.174	0.509
Average	216.54	12.54	12.49	0.6598	0.7347	0.7032	0.0717	-	0.1043	0.7348

※시료 수(N), 대립유전자수(A), 집단 크기를 보정한 대립유전자수(Ar; allelic richness), 이형접합체율관찰치(Ho; observed heterozygosity), 이형접합체율기대치(He; expected heterozygosity), 다형성 정보지수(PIC; polymorphism information contents), probability of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) tests with Bonferroni correction (p)(NS : not significant, \* : significant at the 5% level, \*\* : significant at the 1% level, \*\*\* : significant at the 0.1% level, ND : not done), inbreeding coefficient (FIS), 유전자 다양성(Gene diversity)

### 3.1.2.2 경북 경주

경북 경주 해삼 집단 181개체에 대한 분석결과 대립유전자수는 7~25개로 평균 13.92로 나타났으며, 보정대립유전자수(allelic richness)도 평균 13.69로 높은 유전형 분석율로 대립유전자수와 유사하게 나타났다. 두 개의 대립유전자가 서로 다른 이형접합개체의 비율로 계산되어지는 이형접합체율관측치( $H_o$ )의 평균은 0.6212로 나타났으며, 이형접합체율기대치( $H_e$ )의 경우 평균 0.7498로 나타났다. 다형성정보지수(PIC)의 경우 평균 0.7252로 나타났으며, 유전적 다양성(gene diversity)도 평균 0.7503으로 높은 값을 나타내었다. 집단 내 근친도(Inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ))는 높을수록 열성화 및 유전자 소실로 이어지게 되는데 0.1793으로 다소 높은 값을 나타내어 유전적 열성화 및 특성이 변화될 가능성이 있는 것으로 여겨진다(Table 6). Hardy-Weinberg 평형(HWE)에 대한 Bonferroni correction 검증결과 집단 수준에서는 통계적으로 유의하지 않았으나 ( $p > 0.05$ ), 일부 마커의 경우 Hardy-Weinberg 평형에 벗어난 결과를 보였다( $p < 0.05$ ).

Table 6. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of *Apostichopus japonicus* population

Locus	N	A	Ar	HObs	HExp	PIC	HW	FIS	Gene diversity	
4S0	180	12	11.71	0.750	0.790	0.761	0.488	NS	0.051	0.790
ACaj05	170	25	24.64	0.847	0.917	0.908	0.442	NS	0.076	0.917
AH07	176	11	10.76	0.705	0.676	0.633	0.728	NS	-0.043	0.675
AH13	173	16	15.70	0.740	0.825	0.804	0.000	***	0.104	0.825
AJ1	156	18	18.00	0.462	0.905	0.894	0.000	***	0.491	0.907
AJ1964	176	9	8.65	0.670	0.645	0.600	0.309	NS	-0.039	0.645
AJ9173	174	12	11.89	0.569	0.816	0.790	0.000	***	0.303	0.817
C7	178	12	11.97	0.764	0.835	0.813	0.016	NS	0.086	0.836
Contig2109	174	8	7.98	0.178	0.291	0.283	0.000	***	0.389	0.292
Contig3687	176	7	7.00	0.636	0.803	0.772	0.001	**	0.208	0.803
DKO7	175	12	11.77	0.429	0.682	0.647	0.000	***	0.372	0.683
HC41	175	16	15.87	0.834	0.892	0.880	0.010	NS	0.065	0.892
HG26	177	23	22.08	0.492	0.671	0.642	0.000	***	0.268	0.672
Average	173.85	13.92	13.69	0.6212	0.7498	0.7252	0.1532	-	0.1793	0.7503

※시료 수(N), 대립유전자수(A), 집단 크기를 보정한 대립유전자수(Ar; allelic richness), 이형접합체율관찰치(Ho; observed heterozygosity), 이형접합체율기대치(He; expected heterozygosity), 다형성 정보지수(PIC; polymorphism information contents), probability of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) tests with Bonferroni correction (p)(NS : not significant, \* : significant at the 5% level, \*\* : significant at the 1% level, \*\*\* : significant at the 0.1% level, ND : not done), inbreeding coefficient (FIS), 유전자 다양성(Gene diversity)

### 3.1.2.3 경남 거제

경남 거제 해삼 집단 75개체에 대한 분석결과 대립유전자수는 7~18개로 평균 10.69로 나타났으며, 보정대립유전자수(allelic richness)도 평균 10.55로 대립유전자수와 유사하게 나타났다. 두 개의 대립유전자가 서로 다른 이형접합개체의 비율로 계산되어지는 이형접합체율관측치( $H_o$ )의 평균은 0.6000로 나타났으며, 이형접합체율기대치( $H_e$ )의 경우 평균 0.7329으로 나타났다. 다형성정보지수(PIC)의 경우 평균 0.7002로 나타났으며, 유전적 다양성(gene diversity)도 평균 0.7338으로 높은 값을 나타내었다. 집단 내 근친도(Inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ))는 높을수록 열성화 및 유전자 소실로 이어지게 되는데 0.1704로 다소 높은 값을 나타내어 유전적 열성화 및 특성이 변화될 가능성이 있다(Table 7). Hardy-Weinberg 평형(HWE)에 대한 Bonferroni correction 검정결과 집단 수준에서는 통계적으로 유의하지 않았으나 ( $p>0.05$ ), 일부 마커의 경우 Hardy-Weinberg 평형에 벗어난 결과를 보였다( $p<0.05$ ).



Table 7. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of *Apostichopus japonicus* population

Locus	N	A	Ar	HObs	HExp	PIC	HW	FIS	Gene diversity	
4S0	73	8	7.91	0.781	0.722	0.681	0.072	NS	-0.083	0.721
ACaj05	71	18	17.94	0.732	0.915	0.901	0.004	**	0.200	0.916
AH07	74	9	8.71	0.662	0.641	0.582	0.532	NS	-0.033	0.641
AH13	74	12	11.88	0.865	0.816	0.787	0.242	NS	-0.060	0.816
AJ1	67	15	15.00	0.433	0.904	0.888	0.000	***	0.523	0.907
AJ1964	72	6	5.93	0.708	0.647	0.602	0.555	NS	-0.096	0.647
AJ9173	72	10	9.79	0.444	0.817	0.785	0.000	***	0.457	0.819
C7	74	13	12.79	0.689	0.843	0.818	0.002	**	0.184	0.844
Contig2109	73	7	6.75	0.233	0.295	0.280	0.151	NS	0.211	0.295
Contig3687	71	7	7.00	0.437	0.739	0.693	0.000	***	0.411	0.741
DKO7	72	8	7.93	0.375	0.736	0.697	0.000	***	0.493	0.739
HC41	72	15	14.93	0.833	0.856	0.839	0.101	NS	0.026	0.856
HG26	74	11	10.61	0.608	0.597	0.550	0.479	NS	-0.018	0.597
Average	72.23	10.69	10.55	0.6000	0.7329	0.7002	0.1643	-	0.1704	0.7338

※시료 수(N), 대립유전자수(A), 집단 크기를 보정한 대립유전자수(Ar; allelic richness), 이형접합체유관측치(Ho; observed heterozygosity), 이형접합체유기대치(He; expected heterozygosity), 다형성 정보지수(PIC; polymorphism information contents), probability of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) tests with Bonferroni correction (p)(NS : not significant, \* : significant at the 5% level, \*\* : significant at the 1% level, \*\*\* : significant at the 0.1% level, ND : not done), inbreeding coefficient (FIS), 유전자 다양성(Gene diversity)

### 3.1.2.4 전남 완도

전남 완도 해삼 집단 155개체에 대한 분석결과 대립유전자수는 6~24개로 평균 13.00로 나타났으며, 보정대립유전자수(allelic richness)도 평균 12.83으로 대립유전자수와 유사하게 나타났다. 두 개의 대립유전자가 서로 다른 이형접합개체의 비율로 계산되어지는 이형접합체율관측치( $H_o$ )의 평균은 0.5668로 나타났으며, 이형접합체율기대치( $H_e$ )의 경우 평균 0.7332로 나타났다. 다형성정보지수(PIC)의 경우 평균 0.7075로 나타났으며, 유전적 다양성(gene diversity)도 평균 0.7338로 높은 값을 나타내었다. 집단 내 근친도(Inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ))는 높을수록 열성화 및 유전자 소실로 이어지게 되는데 0.2252로 높은 값을 나타내어 열성화 및 특성이 변화될 가능성이 나타났다(Table 8). Hardy-Weinberg 평형(HWE)에 대한 Bonferroni correction 검증결과 집단 수준에서는 통계적으로 유의하지 않았으나 ( $p>0.05$ ), 대부분의 마커에서 Hardy-Weinberg 평형에 벗어난 결과를 보였다( $p<0.05$ ).

Table 8. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of *Apostichopus japonicus* population

Locus	N	A	Ar	HObs	HExp	PIC	HW	FIS	Gene diversity	
4S0	148	10	9.85	0.642	0.747	0.716	0.001	**	0.141	0.747
ACaj05	145	24	23.72	0.538	0.921	0.912	0.000	***	0.417	0.923
AH07	155	10	9.75	0.619	0.621	0.566	0.716	NS	0.002	0.621
AH13	153	15	14.78	0.830	0.824	0.805	0.665	NS	-0.008	0.824
AJ1	137	19	19.00	0.504	0.910	0.900	0.000	***	0.448	0.912
AJ1964	152	6	5.99	0.592	0.594	0.555	0.041	*	0.004	0.594
AJ9173	151	14	13.54	0.444	0.787	0.756	0.000	***	0.437	0.788
C7	154	15	14.76	0.708	0.856	0.836	0.000	***	0.173	0.856
Contig2109	141	6	6.00	0.149	0.236	0.228	0.000	***	0.369	0.236
Contig3687	144	7	7.00	0.569	0.812	0.784	0.000	***	0.300	0.813
DKO7	142	10	9.96	0.451	0.668	0.628	0.000	***	0.326	0.669
HC41	144	14	14.00	0.813	0.903	0.892	0.000	***	0.101	0.904
HG26	151	19	18.50	0.510	0.652	0.620	0.000	***	0.218	0.652
Average	147.46	13.00	12.83	0.5668	0.7332	0.7075	0.1095	-	0.2252	0.7338

※시료 수(N), 대립유전자수(A), 집단 크기를 보정한 대립유전자수(Ar; allelic richness), 이형접합체유관측치(Ho; observed heterozygosity), 이형접합체유기대치(He; expected heterozygosity), 다형성 정보지수(PIC; polymorphism information contents), probability of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) tests with Bonferroni correction (p)(NS : not significant, \* : significant at the 5% level, \*\* : significant at the 1% level, \*\*\* : significant at the 0.1% level, ND : not done), inbreeding coefficient (FIS), 유전자 다양성(Gene diversity)

### 3.1.2.5 강원 동해

강원 동해 해삼 집단 230개체에 대한 분석결과 대립유전자수는 6~22개로 평균 12.69로 나타났으며, 보정대립유전자수(allelic richness)도 평균 12.62로 대립유전자수와 유사하게 나타났다. 두 개의 대립유전자가 서로 다른 이형접합개체의 비율로 계산되어지는 이형접합체율관측치( $H_o$ )의 평균은 0.5765로 나타났으며, 이형접합체율기대치( $H_e$ )의 경우 평균 0.7411로 나타났다. 다형성정보지수(PIC)의 경우 평균 0.7128로 나타났으며, 유전적 다양성(gene diversity)도 평균 0.7413으로 높은 값을 나타내었다. 집단 내 근친도(Inbreeding coefficient ( $F_{is}$ ))는 높을수록 열성화 및 유전자 소실로 이어지게 되는데 0.2248로 높은 값을 나타내어 열성화로 인한 유전적 특성이 급변화될 가능성이 있었다(Table 9). Hardy-Weinberg 평형(HWE)에 대한 Bonferroni correction 검증결과 집단 수준에서는 통계적으로 유의하지 않았으나 ( $p>0.05$ ), 대부분의 마커에서 Hardy-Weinberg 평형에 벗어난 결과를 보였다( $p<0.05$ ).

Table 9. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of *Apostichopus japonicus* population

Locus	N	A	Ar	HObs	HExp	PIC	HW	FIS	Gene diversity	
4S0	228	11	10.86	0.732	0.766	0.733	0.149	NS	0.043	0.766
ACaj05	214	22	21.98	0.607	0.921	0.914	0.000	***	0.341	0.922
AH07	228	9	8.86	0.583	0.597	0.520	0.747	NS	0.023	0.597
AH13	225	13	12.99	0.809	0.815	0.794	0.908	NS	0.008	0.815
AJ1	212	18	18.00	0.458	0.904	0.894	0.000	***	0.494	0.905
AJ1964	220	6	6.00	0.659	0.646	0.606	0.240	NS	-0.021	0.645
AJ9173	226	12	11.93	0.478	0.801	0.773	0.000	***	0.404	0.801
C7	228	13	12.92	0.754	0.854	0.835	0.000	***	0.117	0.855
Contig2109	220	9	8.96	0.177	0.353	0.337	0.000	***	0.498	0.353
Contig3687	227	8	7.93	0.529	0.774	0.741	0.000	***	0.317	0.774
DKO7	213	10	10.00	0.408	0.684	0.642	0.000	***	0.404	0.685
HC41	220	18	17.85	0.782	0.900	0.889	0.001	**	0.131	0.900
HG26	226	16	15.80	0.518	0.619	0.588	0.002	*	0.164	0.619
Average	222.08	12.69	12.62	0.5765	0.7411	0.7128	0.1575	-	0.2248	0.7413

※시료 수(N), 대립유전자수(A), 집단 크기를 보정한 대립유전자수(Ar; allelic richness), 이형접합체율관측치(Ho; observed heterozygosity), 이형접합체율기대치(He; expected heterozygosity), 다형성 정보지수(PIC; polymorphism information contents), probability of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) tests with Bonferroni correction (p)(NS : not significant, \* : significant at the 5% level, \*\* : significant at the 1% level, \*\*\* : significant at the 0.1% level, ND : not done), inbreeding coefficient (FIS), 유전자 다양성(Gene diversity)

### 3.1.2.6 강원 고성

강원 고성 해삼 집단 93개체에 대한 분석결과 대립유전자수는 7~20개로 평균 11.85로 나타났으며, 보정대립유전자수(allelic richness)도 평균 11.68로 대립유전자수와 유사하게 나타났다. 두 개의 대립유전자가 서로 다른 이형접합개체의 비율로 계산되어지는 이형접합체율관측치( $H_o$ )의 평균은 0.5759로 나타났으며, 이형접합체율기대치( $H_e$ )의 경우 평균 0.7555로 나타났다. 다형성정보지수(PIC)의 경우 평균 0.7254로 나타났으며, 유전적 다양성(gene diversity)도 평균 0.7565로 높은 값을 나타내었다. 집단 내 근친도(Inbreeding coefficient( $F_{is}$ ))는 높을수록 열성화 및 유전자 소실로 이어지게 되는데 0.2305로 높은 값을 나타내어 열성화로 인한 유전적 특성이 급변화 할 가능성이 있었다(Table 10). Hardy-Weinberg 평형(HWE)에 대한 Bonferroni correction 검증결과 집단 수준에서는 통계적으로 유의하지 않았으나 ( $p>0.05$ ), 일부 마커에서 Hardy-Weinberg 평형에 벗어난 결과를 보였다( $p<0.05$ ).

Table 10. Genetic diversity indices in 13 microsatellite loci of *Apostichopus japonicus* population

Locus	N	A	Ar	HObs	HExp	PIC	HW	FIS	Gene diversity	
4S0	93	10	9.85	0.796	0.782	0.747	0.153	NS	-0.017	0.782
ACaj05	89	20	19.72	0.573	0.920	0.909	0.010	NS	0.379	0.922
AH07	93	8	7.87	0.677	0.647	0.584	0.826	NS	-0.048	0.647
AH13	93	13	12.87	0.806	0.855	0.835	0.283	NS	0.057	0.855
AJ1	83	16	16.00	0.434	0.920	0.908	0.000	***	0.530	0.923
AJ1964	93	7	6.99	0.624	0.676	0.624	0.621	NS	0.078	0.676
AJ9173	89	10	9.86	0.393	0.796	0.762	0.000	***	0.507	0.798
C7	93	12	11.79	0.645	0.851	0.830	0.000	***	0.243	0.853
Contig2109	90	8	7.92	0.267	0.472	0.443	0.000	***	0.436	0.473
Contig3687	93	9	8.87	0.591	0.807	0.776	0.000	**	0.268	0.808
DKO7	88	11	10.94	0.420	0.695	0.658	0.000	***	0.396	0.696
HC41	92	14	13.89	0.750	0.880	0.863	0.004	NS	0.148	0.880
HG26	90	16	15.29	0.511	0.521	0.491	0.175	NS	0.020	0.521
Average	90.69	11.85	11.68	0.5759	0.7555	0.7254	0.1594	-	0.2305	0.7565

※시료 수(N), 대립유전자수(A), 집단 크기를 보정한 대립유전자수(Ar; allelic richness), 이형접합체율관측치(Ho; observed heterozygosity), 이형접합체율기대치(He; expected heterozygosity), 다형성 정보지수(PIC; polymorphism information contents), probability of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) tests with Bonferroni correction (p)(NS : not significant, \* : significant at the 5% level, \*\* : significant at the 1% level, \*\*\* : significant at the 0.1% level, ND : not done), inbreeding coefficient (FIS), 유전자 다양성(Gene diversity)

### 3.1.3. 대립유전자 빈도 분석

해삼 지역별 6 집단에 대한 대립유전자빈도를 비교 분석하였으며 모든 집단에서 대립유전자형이 고루 분포하고 있었다. 그 중 양양집단에서 ACaj052(283, 333), AH132(286), AJ17(140), C70(241), Contig36873(217), DKO7S(262)마커의 대립유전형빈도 (Allele frequency)가 두드러지는 양상을 보였으며, 거제 집단에서는 AH132(344), AJ91732(254), C70(267), Contig21099(255), 경주 집단의 경우 AJ19640(137, 161), 고성집단의 경우는 Contig36873(231), DKO7S(290) 유전형이 유일하게 발견되었다(Fig 2).





### 4S02

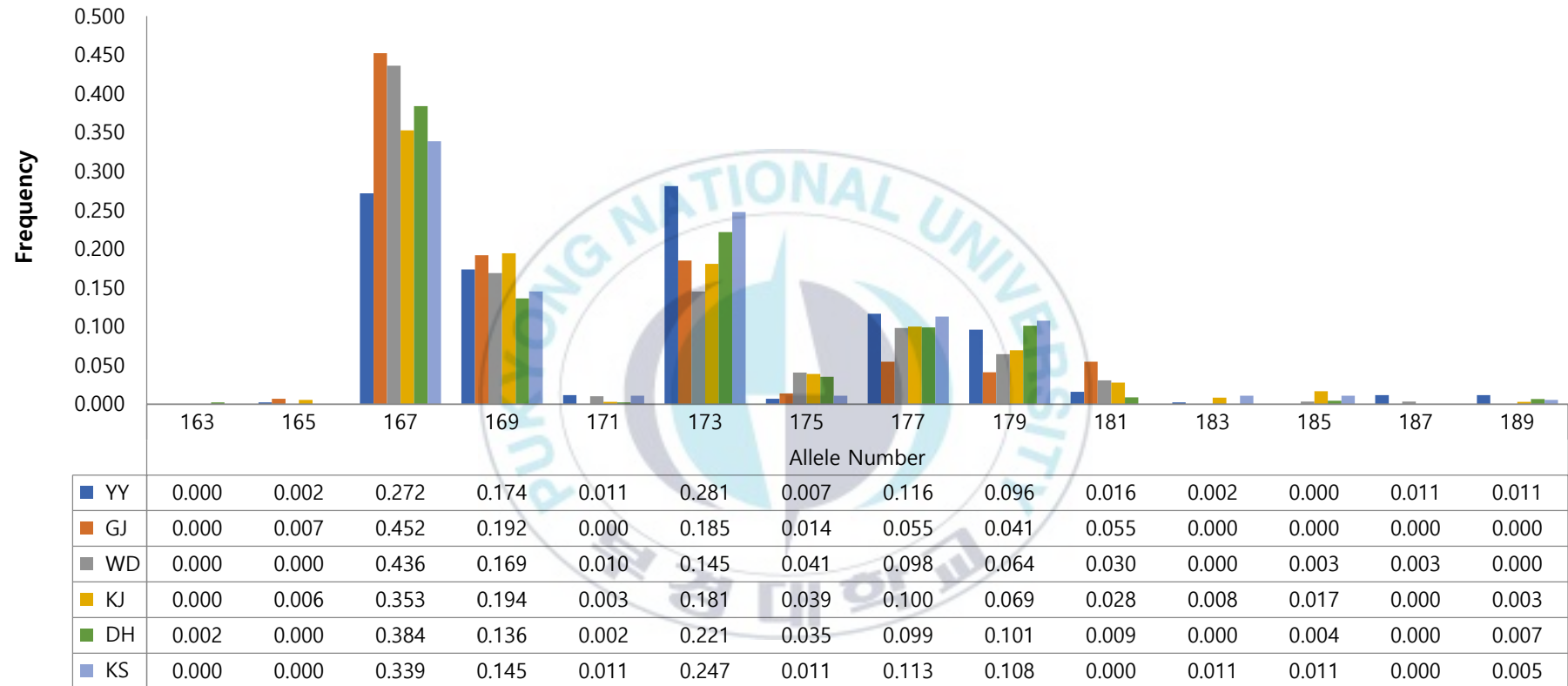


Fig. 2. Comparison of allele frequency distribution and Genotypes of 13 locus in six population. X axis: allele numbers, Y axis: allele frequencies.

### ACaj052

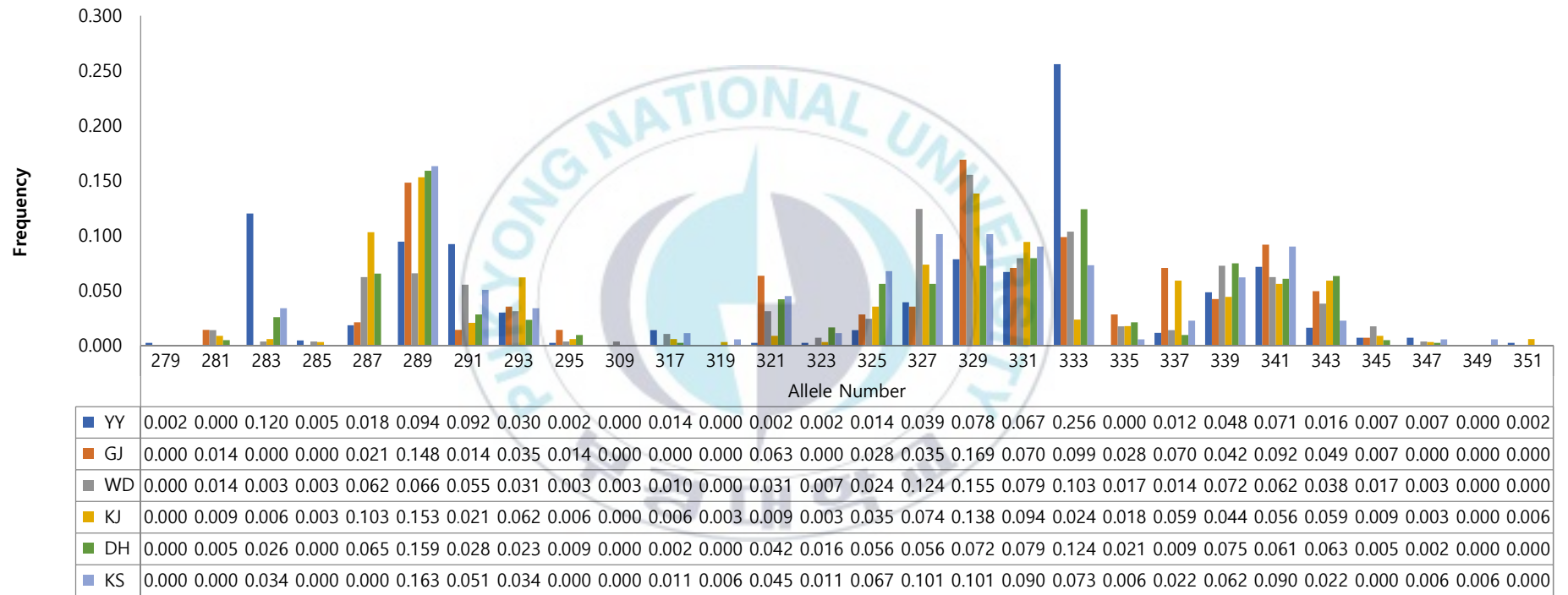


Fig. 2-1. (Continued)

### AH076

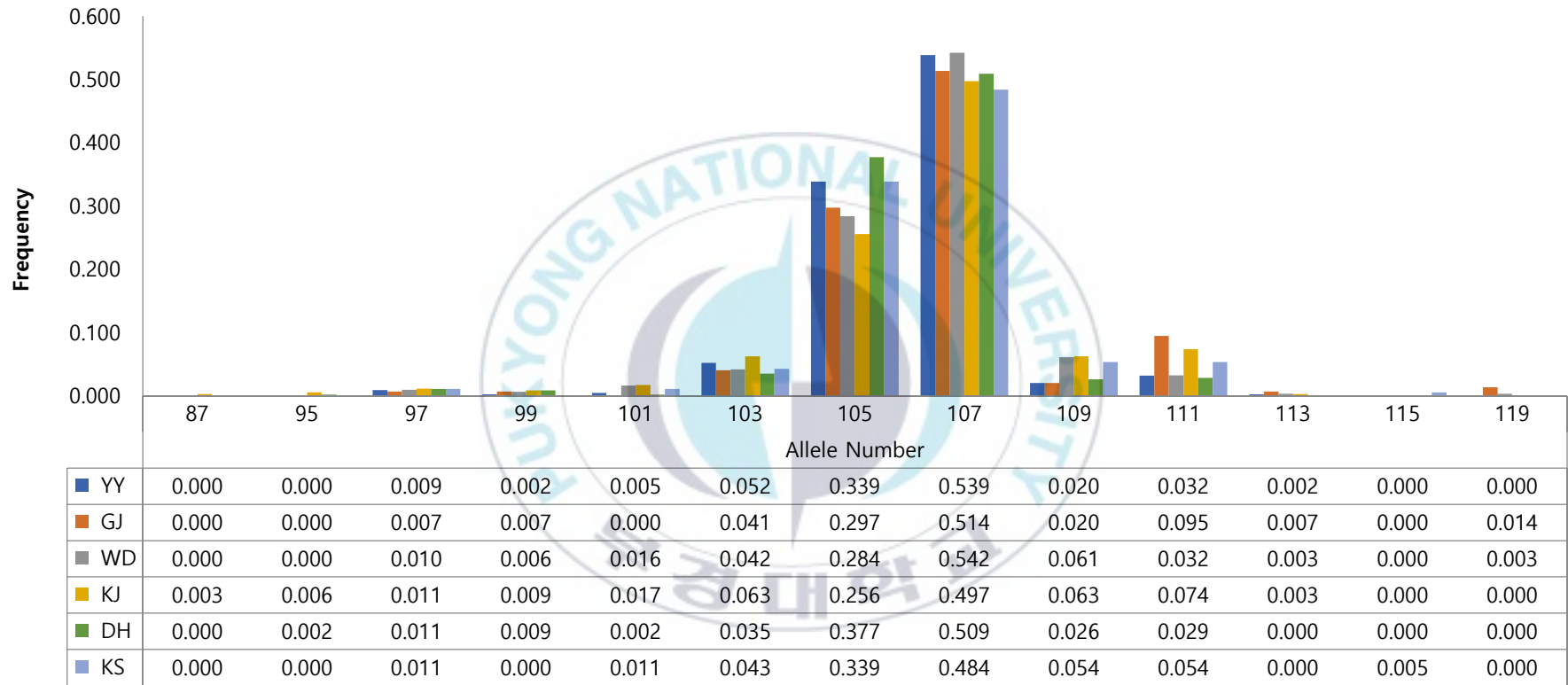


Fig. 2-2. Continued)

### AH132

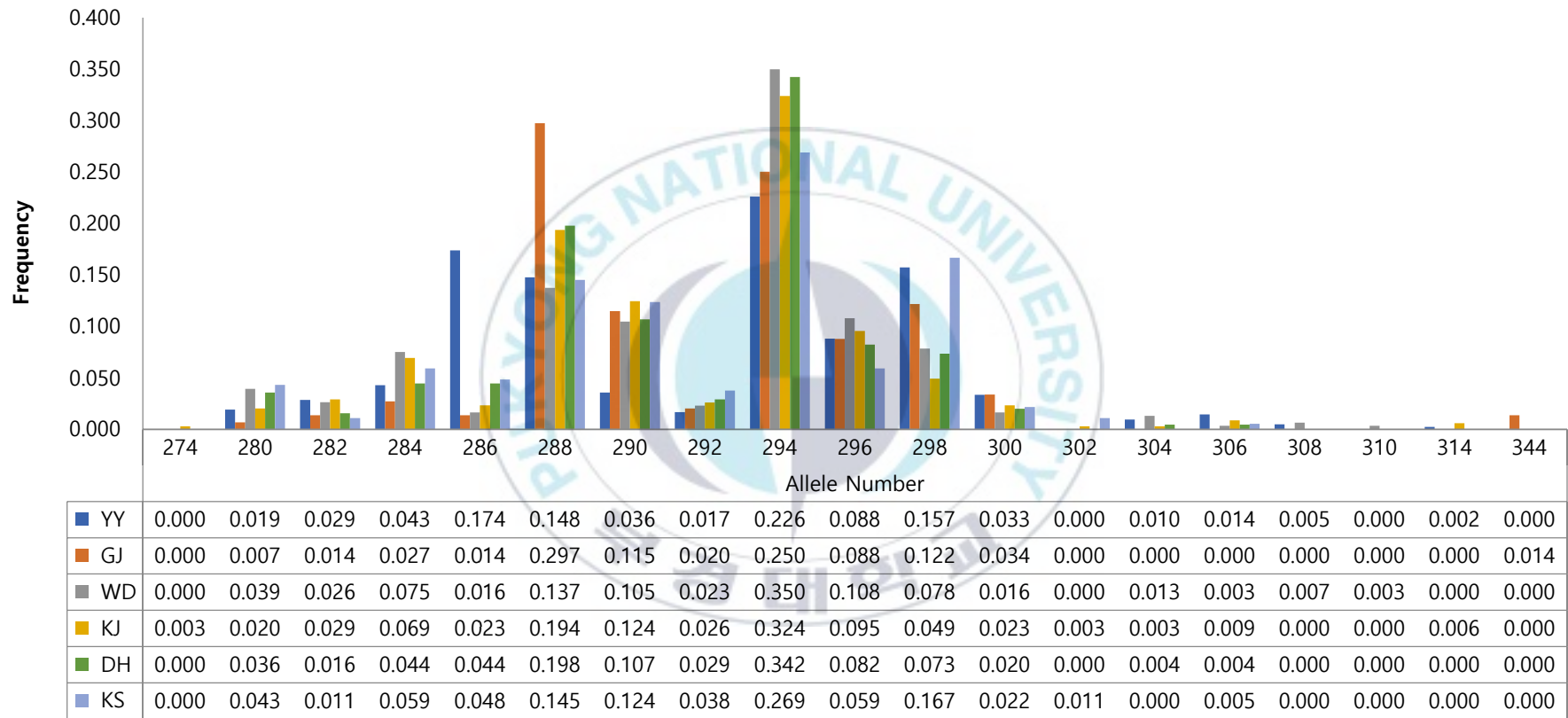


Fig. 2-3. (Continued)

### AJ17

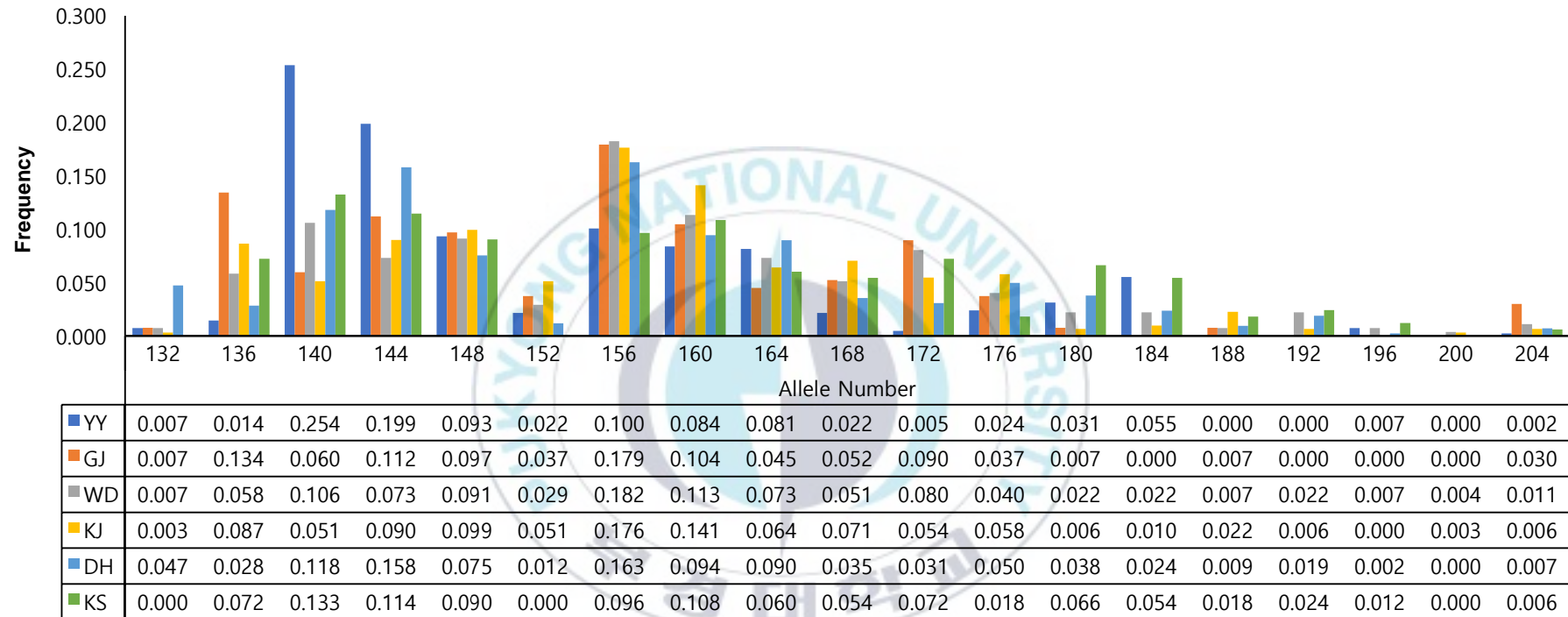


Fig. 2-4. (Continued)

### AJ19640

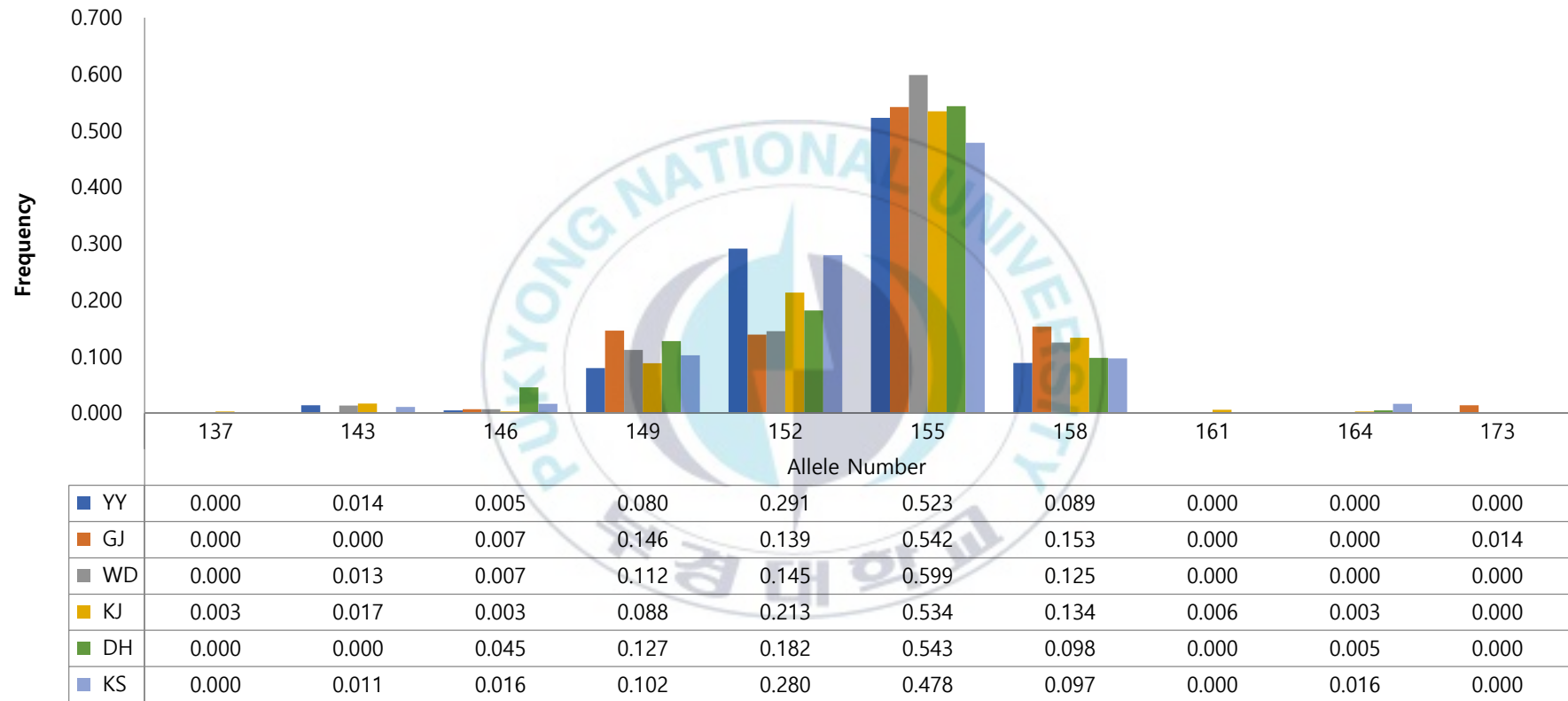


Fig. 2-5. (Continued)

### AJ91732

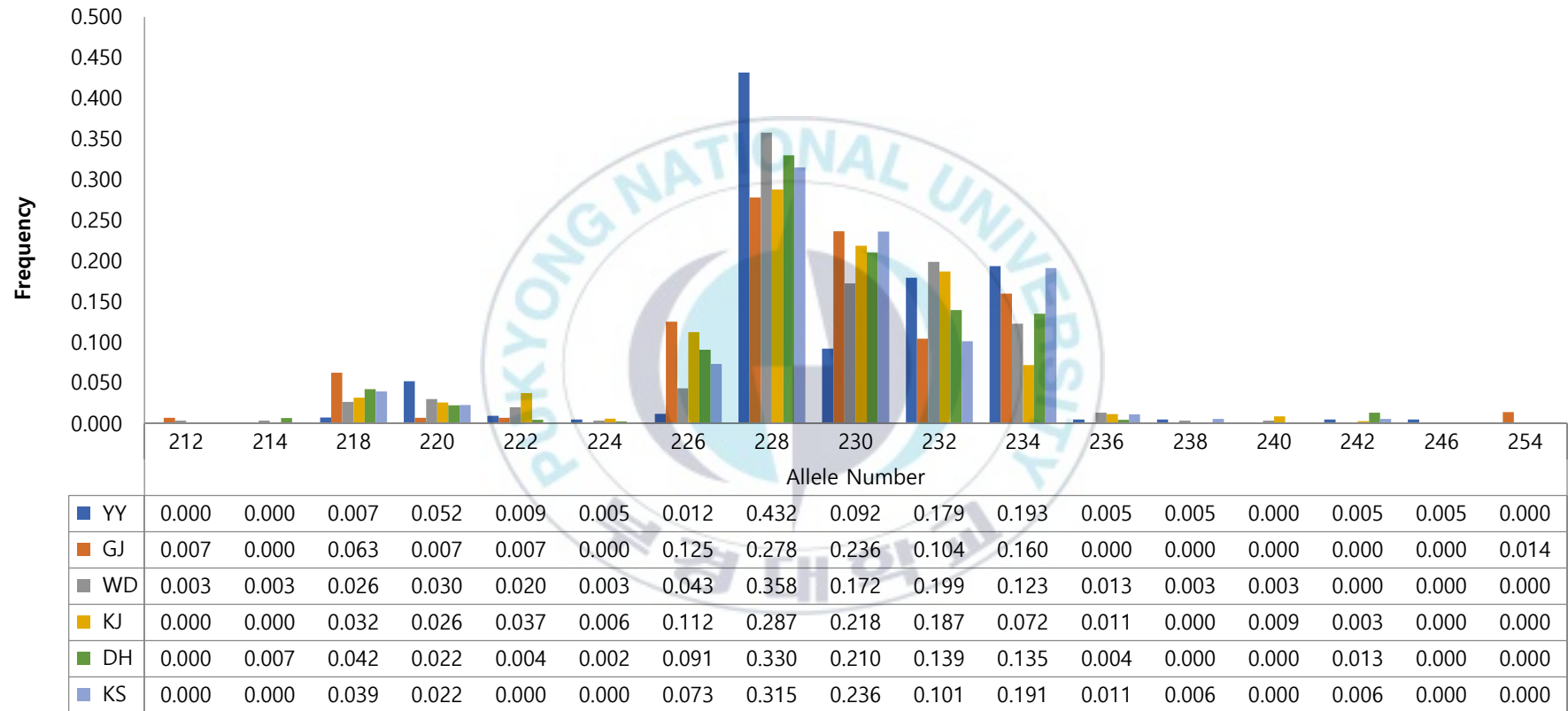


Fig. 2-6. (Continued)

**C70**

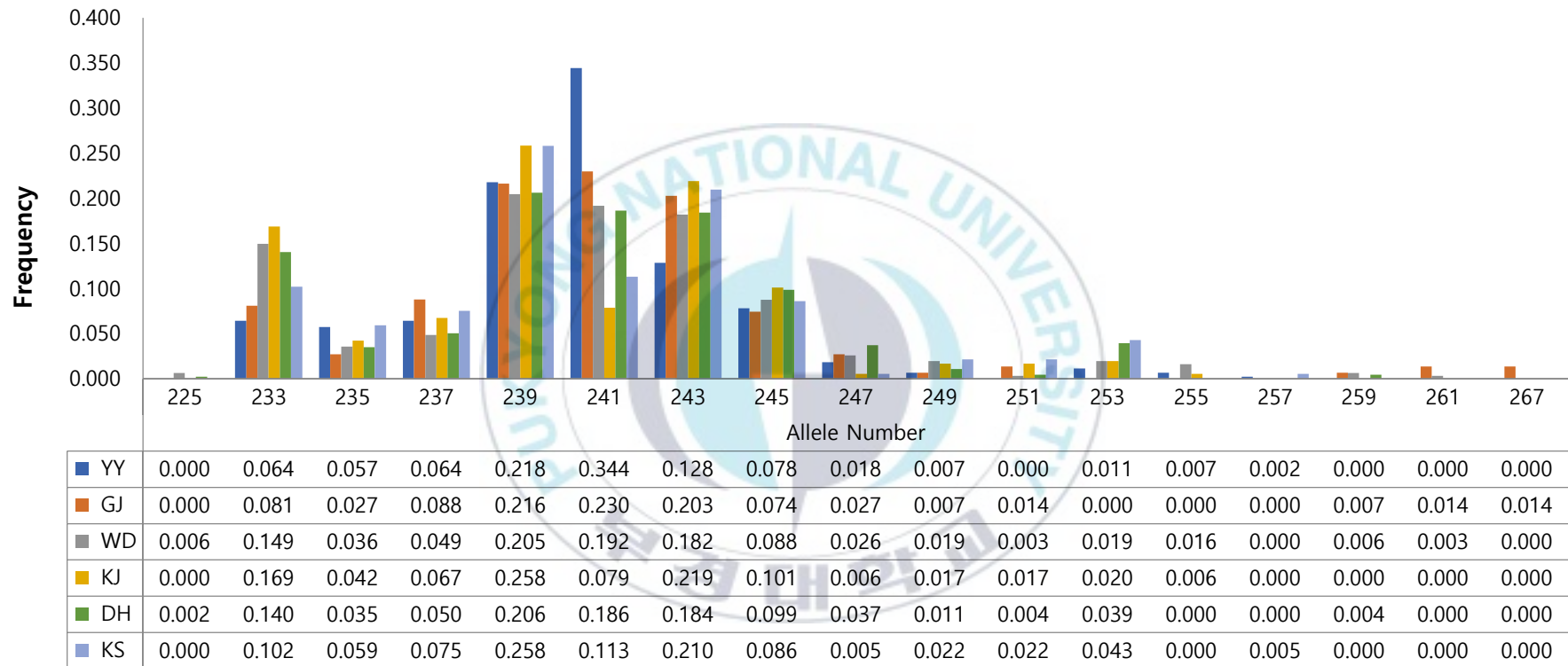


Fig. 2-7. (Continued)



### Contig21099

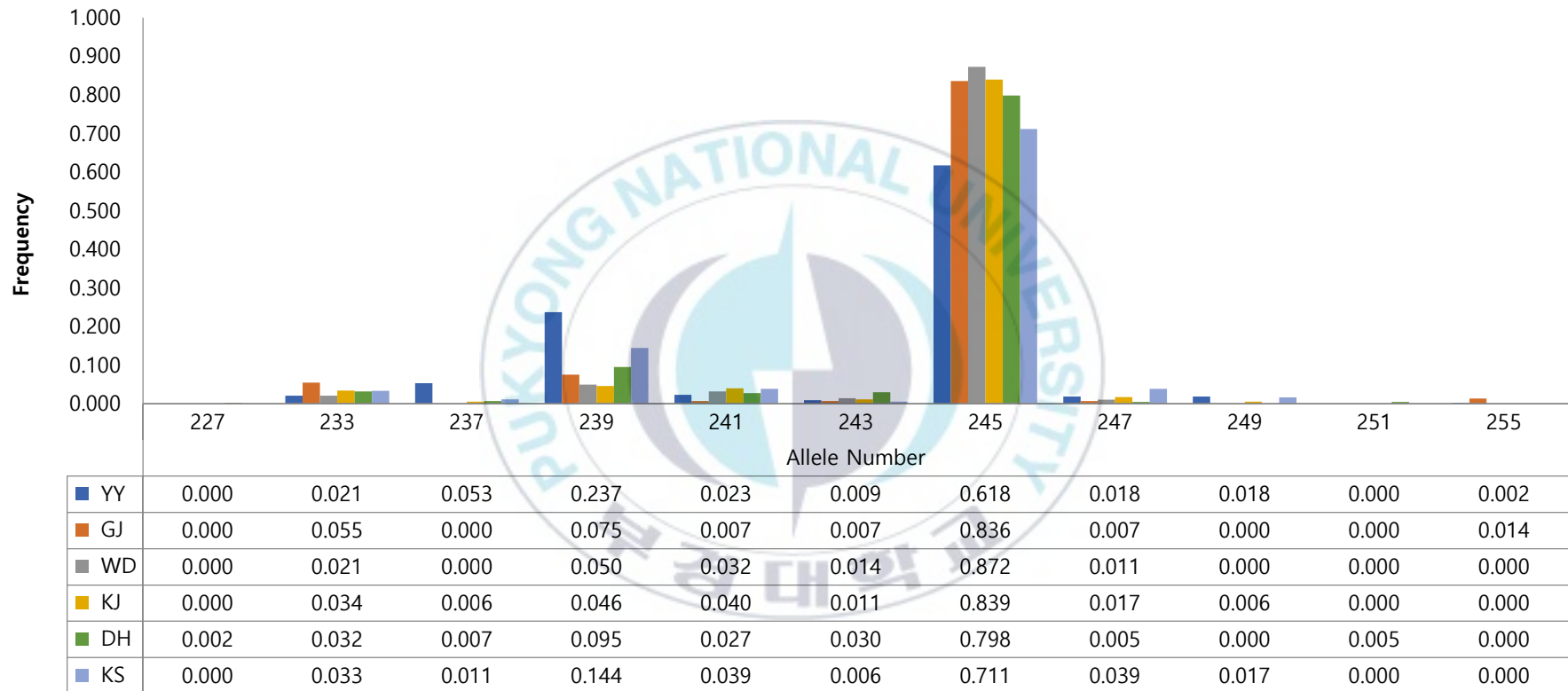


Fig. 2-8. (Continued)

### Contig36873

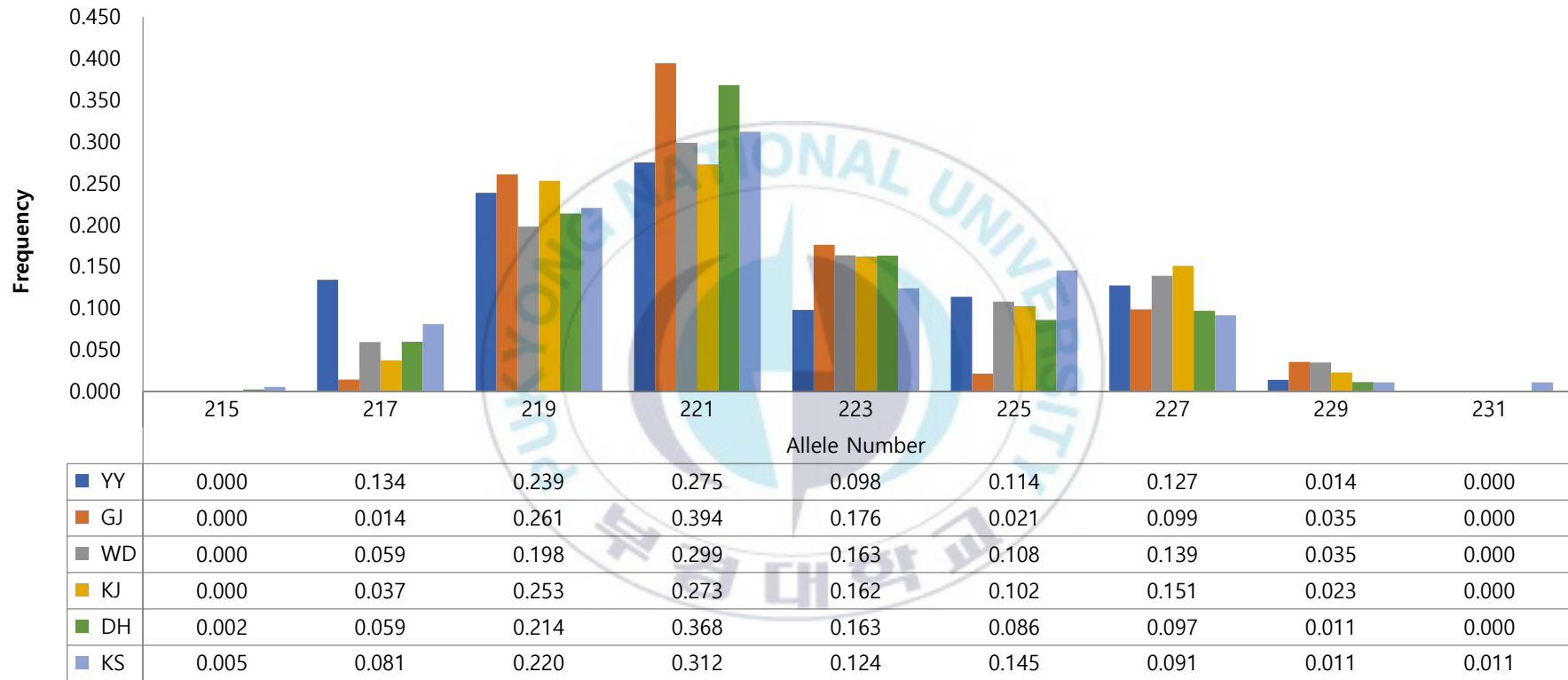


Fig. 2-9. (Continued)

### DKO7S

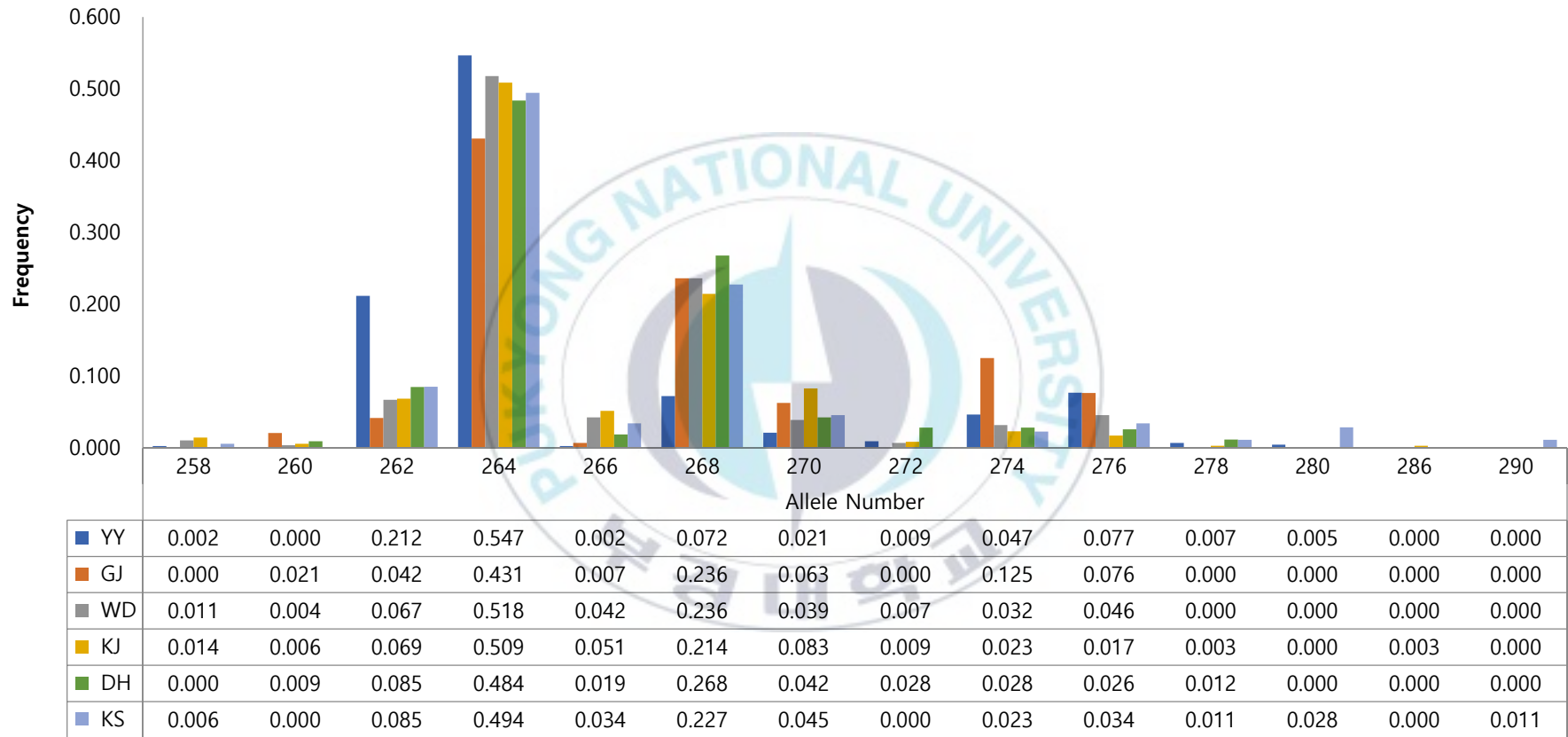


Fig. 2-10. (Continued)

### HC416

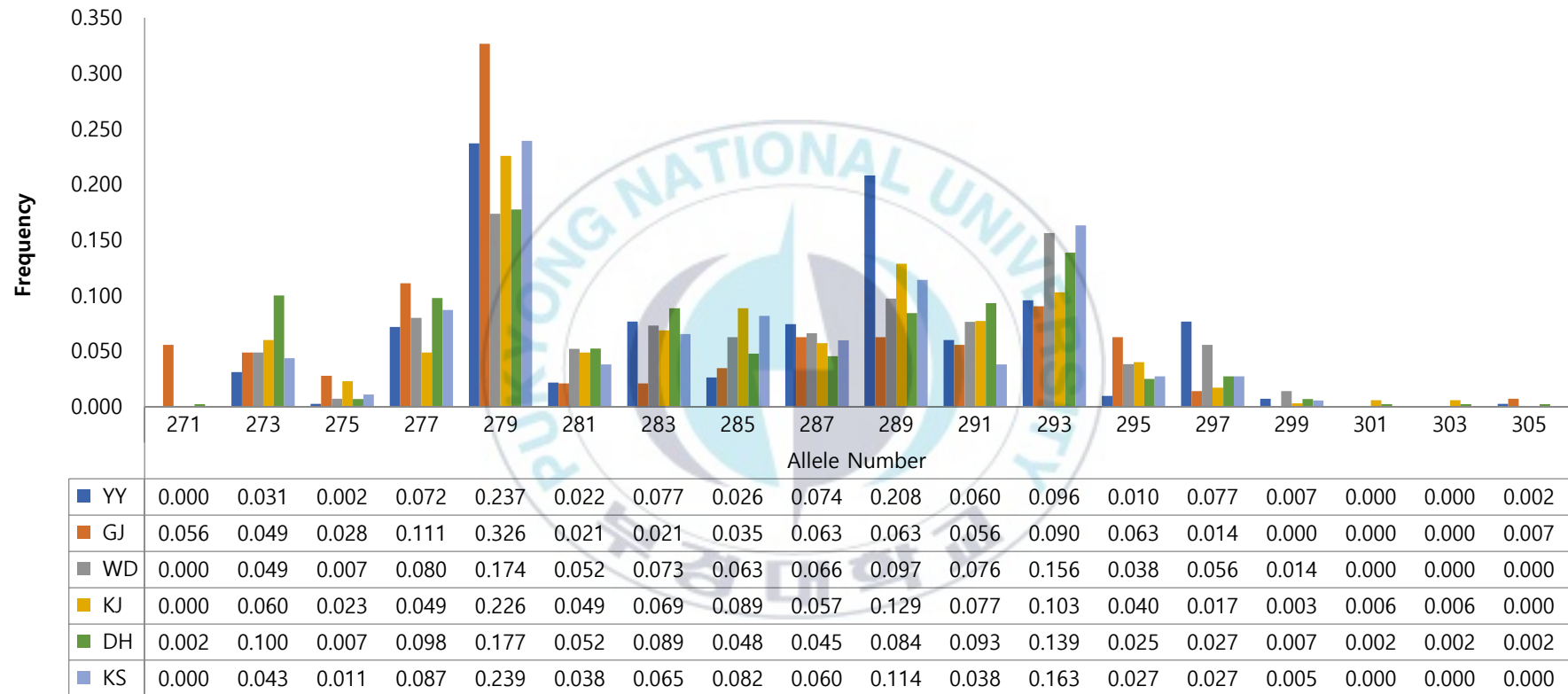


Fig. 2-11. (Continued)

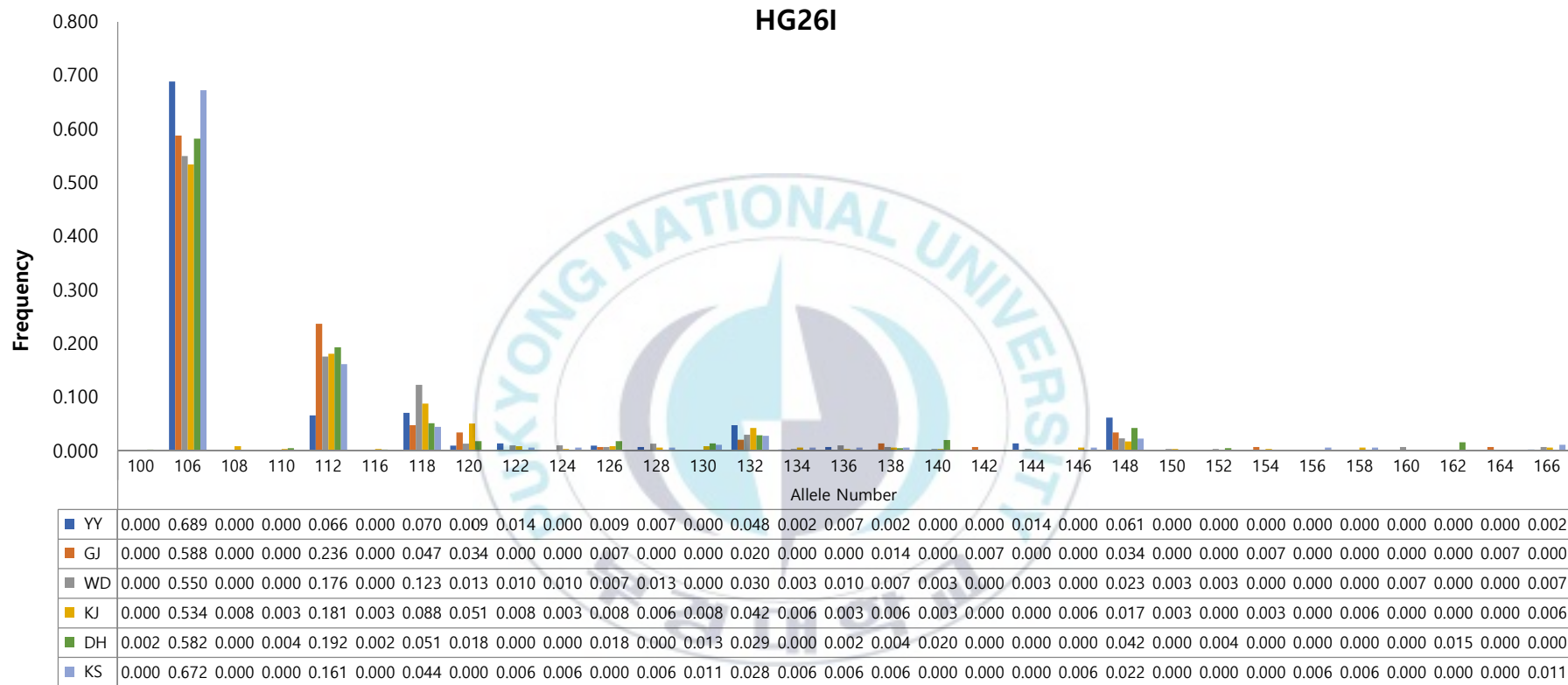


Fig. 2-12. (Continued)

### 3.1.4. 집단구조 분석

해삼 6집단에 대하여 집단 별 유전적 거리(Nei's Genetic distance)를 산출하고 해당 결과 값에 대한 NJ tree, PCoA 분석을 실시하였으며 유전적 거리(Genetic distance) 및 유전적 분화도( $F_{ST}$ )는 Fig. 3 과 Table 11에 나타내었다. 해삼 집단의 유전적 거리를 보았을 때 양양과 거제(0.101), 양양과 경주(0.099)에서 상대적으로 거리가 먼 것으로 나타났으며 고성과 동해 집단(0.021), 거제와 완도(0.035), 완도와 경주(0.017) 집단 사이의 유전적 거리는 가까운 것으로 나타났다.

유전적 분화도는 보았을 때 모든 집단에서 0.006~0.034로 Wright (1978)가 제안한 낮은 수준(0.000~0.050)내에 위치하였으며 이는 유전적으로 집단간의 유전자형과 대립유전자 빈도의 차이가 많지 않다는 것으로 가까운 지리적 위치, 원활한 유전적 교류가 원인일 가능성이 있다. 개체 및 집단 간의 유전적 관계를 scatter diagram으로 확인하기 위해 principal coordinate analysis (PCoA) 분석한 결과 집단 비교 시 PC1 (56.64%)에 의해 강원도 고성 및 양양 집단과 경남, 전남 집단으로 분리되었으며, PC2(17.36%)에 의해 양양, 고성, 거제 집단과 동해, 완도, 경주 집단이 분리되어 나타나 전체 유전적 변이 (genetic variance)의 73.97%를 설명하였다(Fig 4).

STRUCTURE 분석에서는 6개의 집단에서 실제 유전적으로 몇 개의 집단으로 구분하는 것이 적절한지를 추론하기 위해 Bayesian clustering법이 적용된 Structure 분석을 수행하였다. 최적의 Delta K값을 산출하기 위해 1부터 6까지 설정하여 분석한 결과를 바탕으로 STRUCTURE HARVESTER를 이용하여 Evanno *et al.*(2005)이 적용된 최적의 K값( $\Delta K$ )을 계산한 결과 K=2에서 가장 높은  $\Delta K$ (317.0443)이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며 (Table 12) 이는 본 연구에서 사용된 6개 집단의 해삼을 크게 2그룹으로 구분할 수 있음을 의미하며 CLUMMP(Jakobsson and Rosengerg, 2007)를 이용해 집단의 실제 분포를

DISTRUCT(Rosenberg, 2004)를 이용하여 도출된 bar plot을 보면 양양 집단과 나머지 집단(KJ, GJ, WD, DH, KS)으로 나누어지는 것을 알 수 있었다(Fig 5).

유전적 균일도 분석결과에서도 양양의 경우 1, 2 번 클러스터에서 각각 43.1%, 56.9%로 균등한 분포를 하고 있었으며 고성외의 경우 2번 클러스터에서 24.6%로 일부 분포하고 있었으나 대부분 1번 클러스터에서 75.4 ~ 91.8%로 높은 균일도로 분포하고 있었다. 이는 유전적 거리 및 PCOA 결과와 유사한 패턴을 보였다(Table 13).



Table 11. Pairwise  $F_{ST}$  (below diagonal) and genetic distance (above the diagonal) for six population of *Apostichopus japonicus* (for population abbreviations see Table 1. Bold text: P value 0.05)

Population	YY	GJ	WD	KJ	DH	KS
YY	*****	0.101	0.079	0.099	0.065	0.054
GJ	<b>0.034</b>	*****	0.035	0.033	0.029	0.042
WD	<b>0.027</b>	<b>0.012</b>	*****	0.017	0.017	0.035
KJ	<b>0.032</b>	<b>0.012</b>	0.006	*****	0.024	0.032
DH	<b>0.022</b>	<b>0.010</b>	0.006	<b>0.008</b>	*****	0.021
KS	<b>0.018</b>	<b>0.015</b>	<b>0.012</b>	<b>0.011</b>	0.007	*****



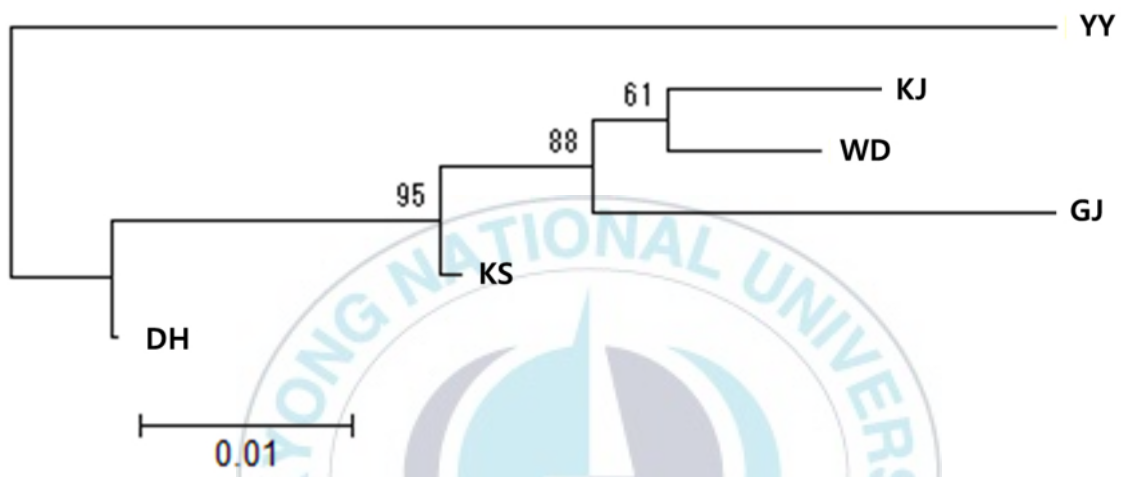


Fig. 3. Neighbor-joining tree of six population based on the Nei's standard genetic distance with sample size correction (Dst, Nei 1978). Numbers on branches represent bootstrap value obtained from 1000 replicates (For population abbreviations see Table 1)

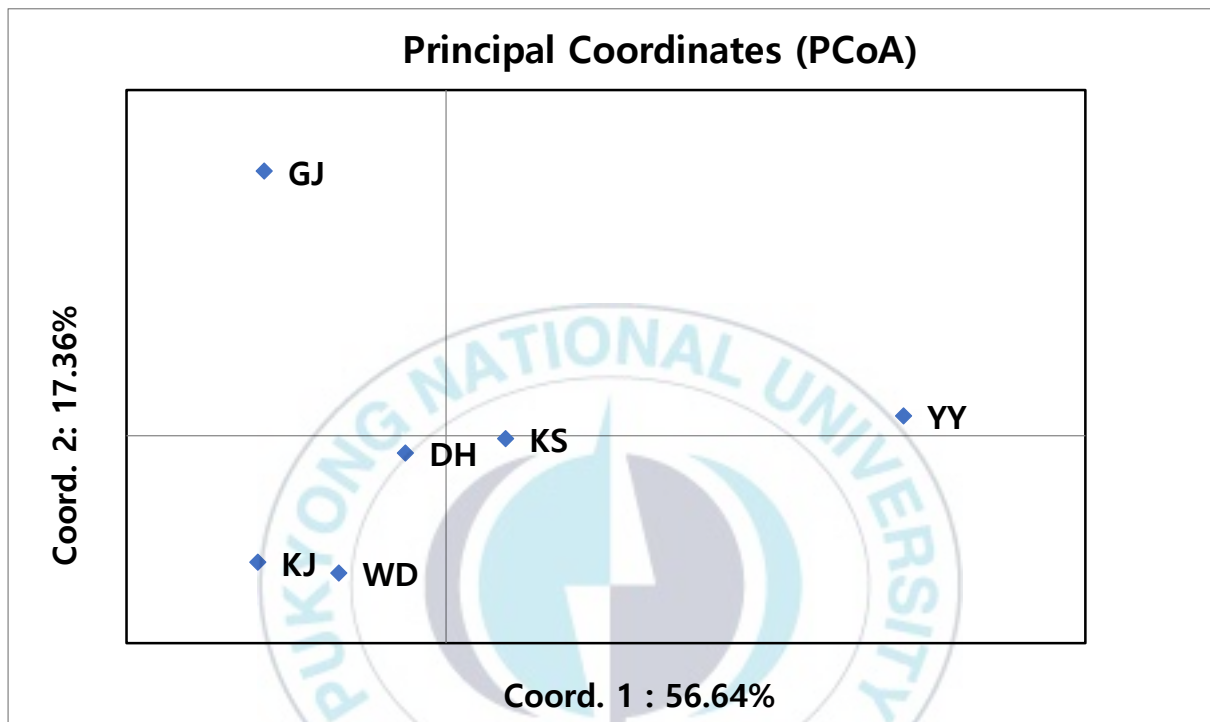
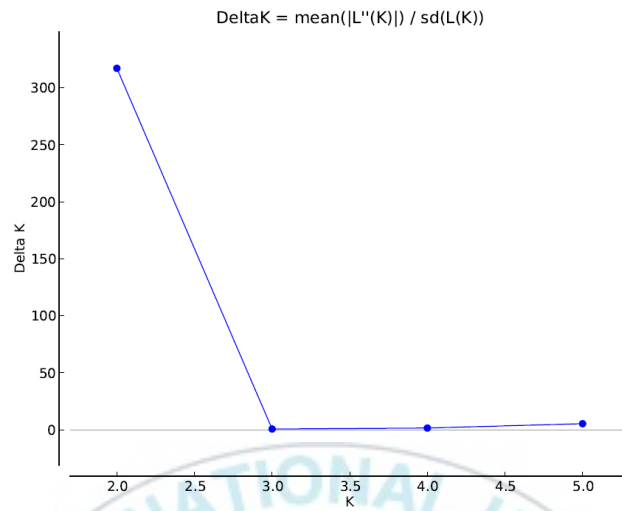


Fig. 4. Principal coordinates analysis (PCoA) of genetic variation in *Apostichopus japonicus* populations based on microsatellite data.

Table 12. Selected Delta K value using the Structure Harvester

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	3	-44307.7	0.6245	—	—	—
2	3	-42912.9	3.459769	1394.8	1096.9	317.0443
3	3	-42615	63.64252	297.9	48	0.754213
4	3	-42365.1	34.23989	249.9	55.4	1.617996
5	3	-42059.8	156.3243	305.3	846.825	5.417104
6	4	-42601.325	1740.972	-541.525	—	—

(A)



(B) K = 2

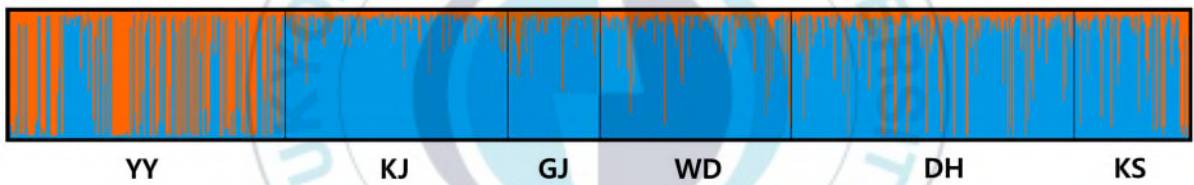
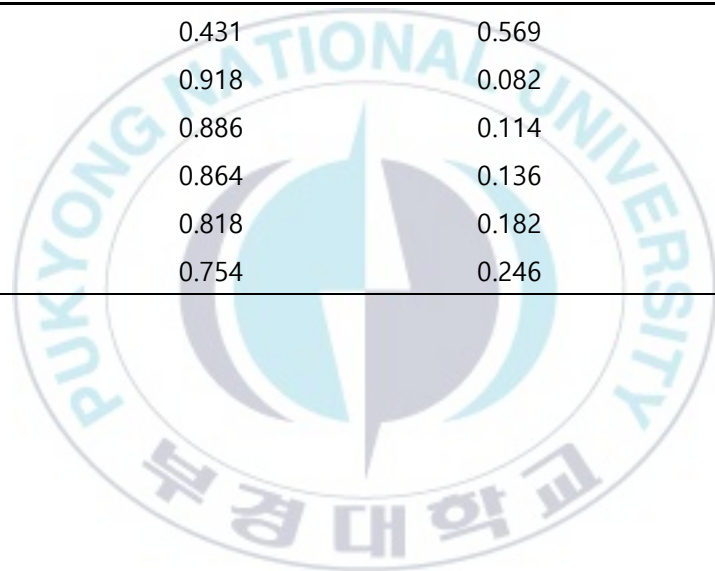


Fig. 5. STRUCTURE results for nine polymorphic MS loci in *Apostichopus japonicus*.

(A) Population structure inferred by Bayesian clustering at  $K = 2$ . (B) The three colors in the column represent differences among clusters

Table 13. Proportion of membership of each pre-defined population in each of the 2 clusters

population	Inferred Clusters		Number of Individuals
	1	2	
YY	0.431	0.569	224
KJ	0.918	0.082	181
GJ	0.886	0.114	75
WD	0.864	0.136	155
DH	0.818	0.182	230
KS	0.754	0.246	93



## IV. 고찰

Microsatellite는 고도의 개체 및 집단의 다양성 및 고유성을 쉽게 관찰할 수 있는 장점으로 인하여 주로 인간을 포함한 여러 동물, 식물 및 어류 등의 유전적 유연관계분석에 효과적임이 확인되었으며(Jeffreys *et al.*, 1985; Wright and Bentzen, 1994; Powell *et al.*, 1996; Blott *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Bjornstad *et al.*, 2003) 실제 양식 산업(Goldstein and Schlatterer, 1999)에서의 유전다양성 및 집단구조 분석(Lee *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014), 어류의 다양성 보존 연구(Kim, 2012; Hong, 2012)등에 효과적으로 적용되고 있다. 국내에서는 바지락과 대구, 점농어의 유전적 관리를 위한 다양성 분석과(Kim *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2010; An *et al.*, 2013) 해양 연체동물에서는 유전적 차이에 대한 원인도 규명하였으며(Nam *et al.*, 2021) 경제성 품종인 해삼의 경우도 국립수산물과학원, 한국수산자원공단, 지자체 등 국가기관에서 다양성 모니터링과 국내 해삼이 일본(Kanno, Li *et al.* 2005)보다는 낮고 중국(Chen & Li 2007)보다는 높은 수준인 것도 확인하였다(Kim *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011).

따라서 본 연구에서는 국내에서 개발된 13개의 MS 마커를 활용하여 국내 해삼 6 집단에 대한 유전적 다양성 및 집단유전학적 분석을 진행하였으며 대립유전자수가 6~25개로 평균 12.53개로 높은 값을 나타내 이는 Kang *et al.*, (2011)의 연구에서 보다 대립유전자수가 많고 유전적 다형성정보지수(PIC)도 높은 값을 나타내어 마커의 다형성이 우수한 것으로 확인되었다. 또한 이형접합체율관측치( $H_o$ )는 양양(YY)집단에서 평균 0.660, 경주(KJ)는 평균 0.621, 거제(GJ)는 평균 0.600, 완도(WD)는 평균 0.567, 동해(DH)는 평균 0.576, 고성(KS)은 평균 0.576으로 모든 집단에서 이형접합체율기대치와 관측치 값의 차이를 확인

할 수 있었으며 이러한 이유는 일반적으로 표본 추출 오류(Lee *et al.*, 2011) 및 왈런드(Wahlund) 효과, Allele drop 등이 주요 원인이긴 하나 본 연구에서는 일부 마커에서 제한적으로 나타난 것으로 보아 근교 약세, 왈런드효과 등의 가능성은 아닐 것으로 예상된다. 이는 해삼의 다른 연구에서도 이형접합체율 기대치와 관측치 사이에 차이가 나타난 결과와 유사하였다(Kim *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011). 그러나 전체적인 유전적 다양성 측면에서 볼 때 2008년 이후 다양성이 지속적으로 유지되고 있어 다양성 관리가 잘 이루어지고 있는 것으로 판단되었다.

근교계수( $F_{IS}$ )에서는 양양집단을 제외하고 대부분 집단에서 다소 높은 값을 나타내었다. 이는 양양의 경우 타 집단에 비해 상대적으로 다양한 집단에 대한 포획 가능성이 있는 것으로 사료되며 근친 또는 열성화에 대한 유전적 소실 가능성 보다는 일부 마커에서의 이형접합체 결핍(heterozygosity deficiency)에 의한 것으로 보여 졌다. 집단 간 유전적 거리의 경우 양양을 제외하고는 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며 이는 2017년 한국수산자원공단의 결과와 유사한 패턴을 보였다.

유전적분화도 분석에서는 양양집단을 포함한 모든 집단에서 0.006~0.034로 Wright (1978)가 제안한 낮은 수준(0.000~0.050)내에 위치하였고 이는 유전적으로 집단간의 유전자형과 대립유전자 빈도의 차이가 많지 않다는 것으로 가까운 지리적 위치, 원활한 유전적 교류가 원인일 가능성이 있다(kim *et al.*, 2006). PCoA(Principal coordinate analysis) 분석 결과에서도 유전적 거리, 분화도 결과와 동일한 패턴을 보였으며 이러한 원인은 크게 세 가지로 유추해 볼 수 있었다. 첫째, 해삼의 방류량이 많은 지역 간 포획된 집단 사이에 유전적 특성 차이가 거의 나타나지 않을 가능성이 있다. 둘째, 해삼의 발생 및 초기생활사에서 수정란은 펜탁툴라 유생상태로 변화 후 저서생활로 들어가는데 해삼 유생의 초기 부유 유생기에 동해안의 해안의 조석과 조류에 의해 확산되었을 가능성이 있다

(Kim *et al.*, 2017). 이는 다시 말하면 동해지역 내(YY, KS, DH, KJ)에서 생태 및 발생학적 특성으로 인해 지리적으로 유전적 교류의 영향이 있을 수 있다는 것이다. 그러나 동해와 남해 또는 동해와 전남 사이의 경우는 지리적 차이가 있어 조류에 의한 확산의 원인(Kim *et al.*, 2017)보다는 1) 한정된 어미집단에서 인위적 교배를 통한 방류 가능성, 2) 방류량이 많은 지역에서의 포획 가능성, 3) 해삼의 경우 서식지를 크게 벗어나지 않고(김 *et al.*, 2012), 수온 상승 시 하면(夏眠, aestivation)을 하는 특성이 있어(김 *et al.*, 2007) 방류 초기와 수온이 상승하는 시기에 방류지점의 일정 반경 내에서 시료 확보가 이루어졌을 가능성을 유추해 볼 수 있었다.

STRUCTURE 결과에서는 양양에서 유전적 특성이 혼재되어 있는 양상을 보였으며 대립유전자빈도에서도 양양에서 특정 유전형의 빈도가 높거나 새로운 유전형이 발견되었는데 이는 2017년 한국수산자원공단의 결과와 유사하게 나타난 것으로 보아 지역의 방류량에 대한 차이와 방류 이후 샘플링 시점 등이 주요 원인인 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 Kim *et al.*, (2008)과 Kang *et al.*, (2011)의 다양성과 비교해 볼 때, 지속적으로 국내 해삼 집단에 대한 다양성 관리가 잘 이루어지고 있긴 하나 상기 언급한 바와 같이 현장조사 측면에서 광범위한 시료 확보, 방류량 및 샘플링 시점 등이 고려된 조사와 보전유전학적 측면에서의 집단구조 분석, 계획교배 및 친자 검증을 거친 종자 방류, 어미에 대한 유전적 관리(Linløkken *et al.*, 2021), 정확한 혈연관계 검증, 생물학적 요소가 우수한 지역에서의 조사 등에 다양한 측면에서의 후속 연구가 반드시 필요할 것으로 사료된다.



## Chapter III

### 방류효과 및 가계 검증을 위한 혈연관계 분석 기법 연구

#### I. 서론

현재 DNA 마커를 이용한 수산생물의 유전자 분석기법은 경제성, 정확성, 신속성이 우수하고 혈연관계 확인이 가능하여 수산방류종자의 식별, 인증, 평가 등을 위한 일반화된 방법론으로 활용되고 있다(Liu *et al.*, 2004). 또한 다양한 유형의 DNA 마커 분석법들이 많은 어패류 중에서 적용되고 그 효과가 입증된 바 있음은 물론, 더 나아가 최근의 분자생물학 기술의 발전에 따라 보다 정밀하고 더욱 실효성이 높은 세부 방법론들과 신규 조건들이 수산동물의 유전적 분석을 위해 개발되고 있다. 특히 NGS(Next-Generation Sequencing, 차세대염기서열분석법)를 이용한 분석으로 계통 내의 특정 염기서열의 유전자 마커(genetic marker)는 각 개체의 유전적 특성을 규명하고 집단구조분석, 유전적다양성 조사, 개체식별 및 친자확인, 선발육종 등에 많은 응용을 하고 있으며 유전적감소 및 소실을 예방하기 위한 유전적 개량 및 집단유지를 위한 기초자료로도 활용이 되고 있다.

우리나라에서는 Song *et al.*, (2009)에 의해 볼락 종자 방류 후 유전자 분석을 통해 친자검정 및 혼획률 조사가 이루어진 바 있으며, 2010년 국립수산과학원에서 시행된 넙치 종자방류사업의 경제적 효과분석에서는 시장조사법을 적용하여 전국의 해역 별 넙치 방류사업에 대한 혼획률, 회수율, 투자효과 등이 연구된 바 있고 남해권 해역의 경우 방류산 넙치의 혼획률이 50%가 넘어 방류사업이 어업 소득에 미치는 영향이 크다는

보고도 있다(Seo *et al.*, 2010).

2015년 해양수산부의 수산종자 관리사업에 따르면 대상어종 65종(해면 50종, 내수면 15종)으로 감소된 어업자원의 증강을 위한 방류와 유전적 조성 및 지역별 다양성 비교, 혼획률 및 재포획률 등에 대한 유전학적 조사를 진행하고 있으며 2012년부터 지속적으로 한국수산자원공단에서는 참돔, 넙치, 민어, 참조기, 말쥐치, 꽃게, 대하, 해삼 등 국내 방류집단에 대한 어미 유전적 데이터 구축과 친자확인을 통해 방류효과조사를 시행하고 있다. 이 중 경제성 품종인 해삼(*Apostichopus japonicus*)은 어업인 소득 증대 및 부가가치가 상승하고 있어 종자생산 및 방류사업이 활발히 진행되고 있다(Park *et al.*, 2013). 그러나 일부 중국산 해삼 종자가 불법적으로 국내 연안에 방류되는 사례가 보고되고 있는데(Kim *et al.*, 2016), 이는 외래 질병 및 기생충 전파의 원인 뿐만 아니라 국내 해삼의 유전적 다양성 소실과 열성화 등의 원인이 될 수 있어(Purcell *et al.*, 2016), 효과적인 해삼 종자 방류사업을 위해서는 기술적 생태, 환경, 경제적 타당성은 반드시 검증되어야 한다(Park *et al.*, 2013).

이 중 기술적, 경제적 타당성 검증을 위해 현재 유전자 데이터베이스(Database)구축과 함께 친자검증을 진행하고 있긴 하나((McConnel *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1998) 신뢰도 확보를 위한 통계적 판정 기준에 대한 연구는 전무하여 이를 위한 연구가 절실히 요구된다.

따라서 본 연구에서는 국내해삼의 혈연관계 분석 시 사용되는 마커에 대한 다형성 정보지수(Polymorphism information content; PIC), 이형접합체율(Heterozygosity)과 법과학적 지표((Gill *et al.*, 1994; DeWoody *et al.*, 2000)를 상세하게 분석함으로써 마커의 우수성에 대한 통계적 검증뿐만 아니라 해삼에서의 신뢰도 기반의 혈연관계 판정을 위해 우도비(Likelihood Ratio, LR)를 산출하여 통계적 기준 값(Threshold values, 임계값)을 설정하

고 최종적으로는 확립된 판정기준에 대한 정확성을 평가하였다.



## II. 재료 및 방법

### 2.1. 어미 및 종자 시료의 확보

본 연구에 사용된 시료의 경우 한국수산자원관리공단 및 올인원진텍의 2019년, 2020년에 자연 채집 집단, 방류 종자 집단, 어미 집단을 분석에 활용하였으며 19년 강원 양양(19YY) 220개체, 20년 강원 양양(20YY) 221개체, 강원 동해(DH) 230개체, 강원 고성(KS) 93개체, 19년 어미집단 221개체, 20년 어미집단 643개체에 대한 유전형 분석(Genotyping)을 실시하고 친자확인 및 형매관계 분석을 수행하였다(Table 14).



Table 14. Details of *Apostichopus japonicus* samples examined in this study

Sampling site	Abbreviation	Sample size	Date sampled
Yangyang	19 YY	220	2019
Yangyang	20 YY	221	2020
Donghae	DH	230	2020
Koseong	KS	93	2020
-	19 P	221	2019
-	20 P	643	2020

## 2.2. 혈연관계 분석 (친자 및 형매관계)

### 2.2.1 마커 유용성 검증

친자확인 및 형매관계 분석을 위해 기 개발된 마커에 대한 통계 분석을 진행하였다. 마커에 유전적 다형성 정보량(polymorphism information content)을 Cervus Ver.3.0.7 Program(Marshall *et al.*, 1998-2014)을 이용하여 산출하였다. 개발 마커의 배제력(Exclusion power)분석은 유전자좌의 식별력을 측정한 값으로 대립유전자가 다양하고 빈도가 그 집단 내에 고르게 분포할 때 그 유전자좌의 식별력이 우수한 것으로 나타나기 때문에 (Evet *et al.*, 1998) 높은 식별력을 가지는 정확한 마커를 사용해야 한다. 따라서 배제력 (Exclusion power)분석을 통해 식별력을 산출하며 공식은 하기와 같다.

$$P = 1 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^6 - 8 (\sum_{i=1}^n p_i^2)^2 + 8 (\sum_{i=1}^n p_i^2) (\sum_{i=1}^n p_i^3) + 2 (\sum_{i=1}^n p_i^3)^2 \quad (\text{Jamieson \& Taylor 1997})$$

마커 전체의 배제력은 높은 변별력을 나타낼 시 신뢰수준이 매우 높은 마커 세트라는 것을 말한다. 하지만 추가 개체에 대한 분석이 이루어질 경우 어느 정도의 오차는 생길 가능성이 있기 때문에 초기에 다양한 집단을 확보하는 과정이 필요하다. 또한 전체적으로 각 마커들이 특정 유전형에 편중이 되어서는 안 되므로 본 연구에서는 해삼의 혈연관계 분석에 사용되는 마커에 대한 배제력 및 변별력을 확인하고 검증하였다.

## 2.2.2 친자확인 및 통계적 판정 기준 설정

### 2.2.2.1 친자확인 및 가계 선별

일반적으로 어미와 자식 간의 친자확인을 parentage analysis (=친자확인) 라고 말한다. 통상적으로 친자확인 분석에서 사용되는 친자확인 방법은 휴먼에러(Human error)를 허용하여 통계적으로 접근하는 최대우도비(Maximum likelihood ratio)방법과 유전형이 상이한 경우 친자관계에서 제외하는 배제법(exclusion method)을 사용한다. 일반적으로 Maximum Log of likelihood ratio를 이용하는 방법은 수산생물의 특성상 사람보다는 많은 variation과 돌연변이들이 존재하기 때문에 통계적인 처리를 통하여 가장 높은 확률을 가진 부모와 친자확인을 하는 최대우도비(Jones and Adren, 2003)방법을 사용한다. 그러나 본 연구에서는 정확한 친자관계의 개체를 확인하기 위해 법의학에서 사용되는 보다 엄격한 배제법(Exclusion method)를 활용하고 Cervus 3.07 software (Marshall *et al.*, 1998)를 사용하여 친자관계를 판정하였다.

### 2.2.2.2 통계적 판정 기준 설정

과학적이고 체계적인 결과를 도출하기 위해 기 개발된 마커에 대해 실제 부모-자식 관계의 가계를 이용한 마커의 정확성을 1차적으로 확인하고 추가적으로는 신뢰도 및 정확성을 높이기 위해 통계적 기준을 설정하였다. 일반적으로 해양생물을 이용한 유전형 분석에서는 human error 또는 실제 마커에서의 null allele, mutation, allele drop 등이 빈번하게 발생하기 때문에 본 연구에서는 모든 locus(유전자좌위)에서 100% 일치하는 부모-자식 개체를 선별하여 Likelihood ratio(우도비)를 추출하고 관계가 성립되지 않는 부모-자식 개체의 경우도 시뮬레이션분석을 하여 우도비를 추출하였다. 추출된 우도비를 활용하여 분포를 비교 평가하고 친자확인 시 발생 가능한 위양성(False positive) 및 위음성

(False negative) 에러율을 최소화되는 임계 값(Threshold value)을 구하였다. 이는 혈연관계 검증에서 단순한 대립유전자형의 mismatch 여부와 가능성이 높은 부모를 확인하는 것이 아닌 친자관계를 검증을 위한 통계적 판정 기준을 마련하였다.





Table 15. kinship Formulas for parentage analysis (P, Parent; C, Child)

	Allele type (P)	Allele type (C)	Frequency
case 1	AB	AB	$\Phi_2 + 0.5\Phi_1(P_A + P_B) + 2\Phi_0P_AP_B$
case 2	AA	AA	$\Phi_2 + \Phi_1P_A + \Phi_0P_A^2$
case 3	AA	AB	$\Phi_1P_B + 2\Phi_0P_AP_B$
case 4	AB	AA	$0.5\Phi_1P_A + \Phi_0P_A^2$
case 5	AB	AC	$0.5\Phi_1P_C + 2\Phi_0P_AP_C$
case 6	AB	CD	$2\Phi_0P_CP_D$
case 7	AA	BB	$\Phi_0P_B^2$
case 8	AA	BC	$2\Phi_0P_BP_C$

## 2.2.3 형태관계 확인 및 통계적 판정 기준 설정

### 2.2.3.1 형태관계 확인 및 가계 선발

본 발명 소프트웨어에 대한 검증을 위해 동일 부모에서 생산된 것으로 확인된 F1 해삼 종자개체에 대한 유전형 분석을 진행하였으며, 각 개체 간 산출되는 우도비(Likelihood ratio, LR)를 이용하여 실제 F1 개체 사이에 전형태관계가 성립하는지 확인하였다. 여기서 상기의 혈연관계 확인 검증에 필요한 알고리즘은 아래의 수식을 이용하며, 계산은 서로 특정 혈연관계에 있는 경우(related,  $H_p$ )와 서로 혈연관계가 없는 경우(unrelated,  $H_0$ )의 두 가지 상반되는 가정 하에 특정 집단에서 주어진 유전자형이 나타날 확률의 비로 최종 혈연관계지수를 계산하였다. 지수계산을 위해 우선적으로 각 마커에 대한 대립유전자 빈도를 추출하고 개체 간 대립유전자 비교를 통해 산출된 Identity by descent(IBD) 상수에 적용하여 각 마커에 대한 혈연관계지수를 산출하였다.

### 2.2.3.2 통계적 판정 기준 설정

모든 개체에 대한 1:1 matching 다중 분석을 통해 산출되는 우도비(likelihood ratio)를 산정하였다. 여기서 다중 분석의 경우는 예를 들면 A집단 5개체와 B집단 5개체가 있을 경우 5X5로 총 25번의 분석을 진행하는 것을 말한다. 다중분석을 통해 산출되는 우도비를 로그 중앙값[Log10 (median LR)]에 대한 평균 값과 표준편차를 Micro Excel로 계산하였으며, 혈연관계에서의 1~100000 범위의 우도비(likelihood ratio)를 기준으로 위양성률(false-positive rate)과 위음성률(false-negative rate)을 조사하고 에러율이 최소화되는 지점을 판정 기준 값으로 설정하였다.

$H_p$  : 두 개체가 서로 혈연관계에 있는 경우

$H_d$  : 두 개체가 서로 혈연관계 없는 경우

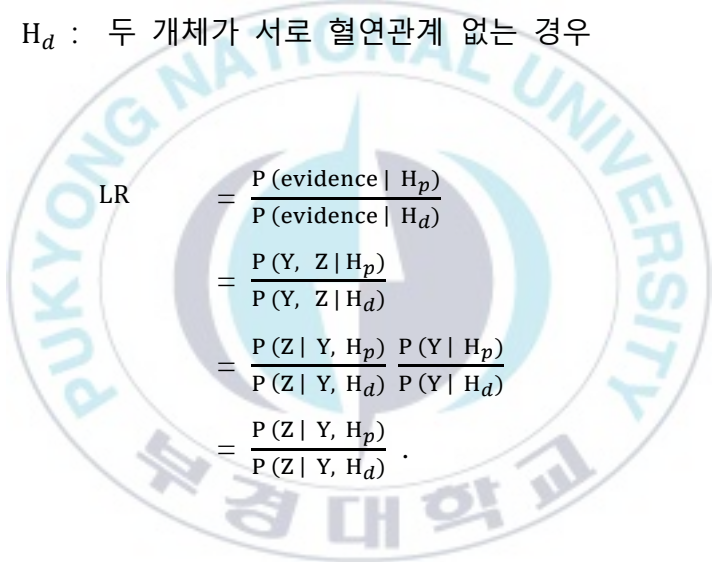

$$\begin{aligned} LR &= \frac{P(\text{evidence} | H_p)}{P(\text{evidence} | H_d)} \\ &= \frac{P(Y, Z | H_p)}{P(Y, Z | H_d)} \\ &= \frac{P(Z | Y, H_p) P(Y | H_p)}{P(Z | Y, H_d) P(Y | H_d)} \\ &= \frac{P(Z | Y, H_p)}{P(Z | Y, H_d)} \end{aligned}$$

Table 16. The likelihood ratios about two competing hypotheses  $H_p: (Y, Z) \sim (k_0, 2k_1, k_2)$  versus  $H_d: (Y, Z) \sim (1, 0, 0)$

Y	Z	Likelihood ratio
$A_i A_i$	$A_i A_i$	$k_0 + 2k_1/p_i + k_2/p_i^2$
$A_i A_i$	$A_i A_j$	$k_0 + k_1/p_i$
$A_i A_i$	$A_j A_j$	$k_0$
$A_i A_i$	$A_j A_k$	$k_0$
$A_i A_j$	$A_i A_j$	$k_0 + k_1(p_i + p_j)/(2p_i p_j) + k_2/(2p_i p_j)$
$A_i A_j$	$A_i A_k$	$k_0 + k_1/(2p_i)$
$A_i A_j$	$A_k A_l$	$k_0$

Table 17. Relatedness coefficients ( $k_0, 2k_1, k_2$ ) for some common relationships between two individuals.

Relationship	$k_0$	$2k_1$	$k_2$
Parent-child	0	1	0
Full siblings	1/4	1/2	1/4
Half siblings	1/2	1/2	0
Grandparent-	1/2	1/2	0
Uncle-nephew	1/2	1/2	0
First cousins	3/4	1/4	0
Second cousins	15/16	1/16	0

### Ⅲ. 결 과

#### 3.1. 친자 및 형매관계 확인을 위한 통계적 판정 기준 설정

##### 3.1.1 마커 유용성 검증

확보된 13개의 마커를 해삼 943개체에 대한 유전형 분석 결과를 활용하여 2개의 multiplex PCR set의 PIC(polymorphic information content, 다형성정보지수)와 배재력(exclusion power)를 도출하였다. 이 중 ACaj05 마커의 경우는 유전자 다형성 정보력 0.92, 식별력 0.99, 부권배제력 0.96으로 13개 마커 중에서 법과학적 지표들이 가장 높게 나타났다(Table 18). 반면 Contig2109 좌위는 유전자 정보력 0.38, 식별력 0.615, 부권배제력 0.390으로 13개 좌위 중에서 가장 낮은 법과학적 지표 값을 나타냈다. 그러나 13 마커 set 전체에 대한 PIC 값은 0.7244로 높은 값으로 나타났으며 Power of discrimination(식별력)은  $6.886 \times 10^{-16}$ , Power of exclusion(배제력)은  $3.468 \times 10^{-10}$ , Power of sibling discrimination(형매 식별력)은  $5.21 \times 10^{-06}$ 으로 높은 식별력을 나타내었다(Table 19). 이는 쉽게 말하면 혈연관계 확인이 99.999999 % 이상의 정확성으로 multiplex PCR 시스템이 생물학적 부모개체를 정확히 찾아낼 수 있는 능력이 우수하다는 것을 의미하며(심 & 이, 2017), 이는 다시 말하면 친자관계 및 형매관계 판정에서 적용 가능한 우수한 마커 세트라는 것으로 예상해 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 우수한 식별력으로 검증된 해삼의 13마커와 실제 친자 및 형매관계에 있는 개체 확보를 통해 통계적 신뢰도 기반의 혈연관계 판정 기준(임계값) 확립을 위한 연구를 진행하였다.

Table 18. Forensic parameters of 13 microsatellite markers in *Apostichopus japonicus* ( $n=943$ )

Locus	PE	PD	PE(S)
4S0	0.771	0.921	0.619
ACaj05	0.961	0.989	0.709
AH07	0.549	0.799	0.512
AH13	0.873	0.960	0.661
AJ1	0.943	0.984	0.699
AJ1964	0.597	0.828	0.528
AJ9173	0.798	0.932	0.630
C7	0.866	0.959	0.663
Contig2109	0.390	0.615	0.351
Contig3687	0.794	0.932	0.632
DKO7	0.685	0.87	0.561
HC41	0.928	0.979	0.69
HG26	0.618	0.818	0.507

PD, Power of discrimination; PE, Power of exclusion; PE(S), Power of sibling exclusion

Table 19. Combined non-exclusion probability for parent of microsatellites.

<b>Loci N</b>	<b>NE-PP</b>	<b>NE-2P</b>	<b>NE-I</b>	<b>NE-SI</b>
1	0.6100	0.419	0.3850	0.6490
2	0.2751	0.0641	0.0774	0.3167
3	0.1109	0.0402	0.0133	0.1495
4	0.0424	0.0121	$2.42 \times 10^{-3}$	0.0737
5	0.0133	$2.29 \times 10^{-3}$	$3.15 \times 10^{-4}$	0.0324
6	$3.07 \times 10^{-3}$	$1.36 \times 10^{-3}$	$2.49 \times 10^{-5}$	0.0123
7	$6.32 \times 10^{-4}$	$5.27 \times 10^{-4}$	$1.69 \times 10^{-6}$	$4.54 \times 10^{-3}$
8	$1.28 \times 10^{-4}$	$1.60 \times 10^{-4}$	$1.15 \times 10^{-7}$	$1.68 \times 10^{-3}$
9	$1.71 \times 10^{-5}$	$9.75 \times 10^{-5}$	$4.72 \times 10^{-9}$	$5.66 \times 10^{-4}$
10	$2.17 \times 10^{-6}$	$2.01 \times 10^{-5}$	$1.89 \times 10^{-10}$	$1.92 \times 10^{-4}$
11	$1.56 \times 10^{-7}$	$6.33 \times 10^{-6}$	$3.96 \times 10^{-12}$	$5.94 \times 10^{-5}$
12	$8.92 \times 10^{-9}$	$4.55 \times 10^{-7}$	$6.34 \times 10^{-14}$	$1.79 \times 10^{-5}$
13	$3.48 \times 10^{-10}$	$1.74 \times 10^{-7}$	$6.97 \times 10^{-16}$	$5.21 \times 10^{-6}$

NE-PP, average non-exclusion probability for a candidate parent pairs when both parents were known; NE-2P, average non-exclusion probability for a candidate parent pair when both parents were unknown; NE-I, average non-exclusion probability for identification; NE-SI, average non-exclusion probability for sibling identification



### 3.1.2 실제 친자 관계 그룹 확보

부모집단은 개발된 13개 마커에 대한 친자관계에 있는 개체를 선별하기 위해 부모 집단 864개체와 임의의 종자집단 764개체를 분석하였다. 현재 해삼의 경우는 개체간 많은 변이로 인해 마커 2개 불일치까지 친자관계로 판정으로 하고 있으나 이는 통계적인 접근법이 배제되어 신뢰도를 나타내기 어려운 부분이 있다.

따라서 본 연구에서는 정확한 통계적인 판정 기준을 확립하기 위해 실제 친자관계의 개체와 친자관계가 아닌 개체의 우도비(Likelihood ratio, LR)를 산출하였다. 친자관계 정보는 13개의 마커 모두 일치할 경우 친자관계로 분류하고, 1개라도 불일치하는 경우는 친자관계가 아닌 것으로 분류하여 사용하였다. 그 결과 종자집단 764개체 중에서 부모 유전정보와 모두 일치하는 101개체를 선별하였으며 교배에 참여한 부모는 73개체였다. Table 20은 친자 확인 방법을 제시한 것으로 (A)의 경우는 13개의 마커에서 모두 멘델의 유전법칙을 따르므로 부모-자식관계가 성립하는 것으로 판정하였으며 (B)의 경우는 13개의 마커 중 4S02, AJ17, C70, Contig36873, DKO7S에서 멘델의 유전법칙(Fig. 7)에 어긋나기 때문에 부모-자식 관계가 성립하지 않는 것으로 판정하였다.

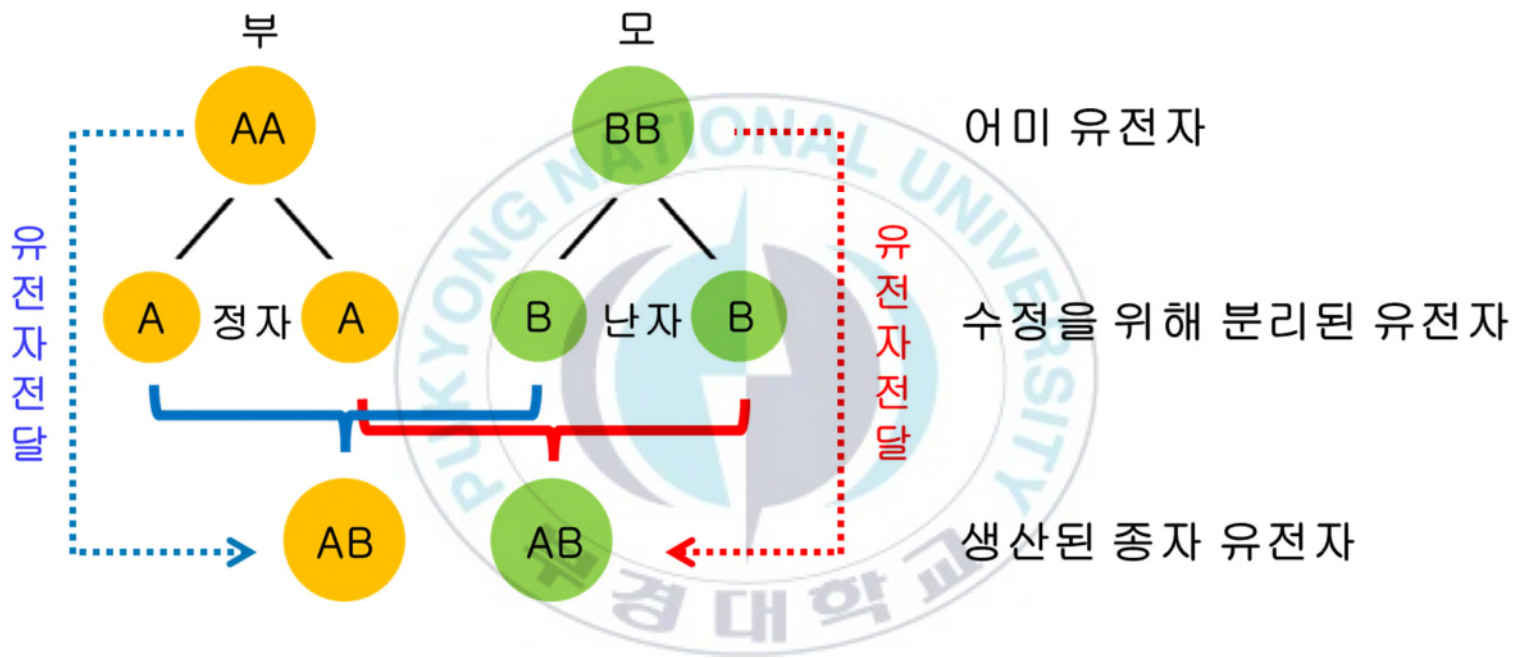


Fig. 6. Principle of paternity verification

Table 20. Parentage verification of some sample

(A) Parentage verification inclusion

Pedgree	4S02	ACaj052	AH076	AH132	AJ17	AJ19640	AJ91732	C70	Contig21099	Contig36873	DKO7S	HC416	HG26I
P1	167 173	335 339	105 105	294 294	156 156	155 155	232 232	233 243	241 245	219 221	278 278	289 293	106 120
P2	167 167	291 327	105 107	290 294	160 168	149 155	228 228	245 261	245 245	221 221	264 268	275 295	106 112
C1	167 173	291 335	105 107	294 294	156 168	155 155	228 232	243 245	241 245	221 221	268 278	275 289	112 120

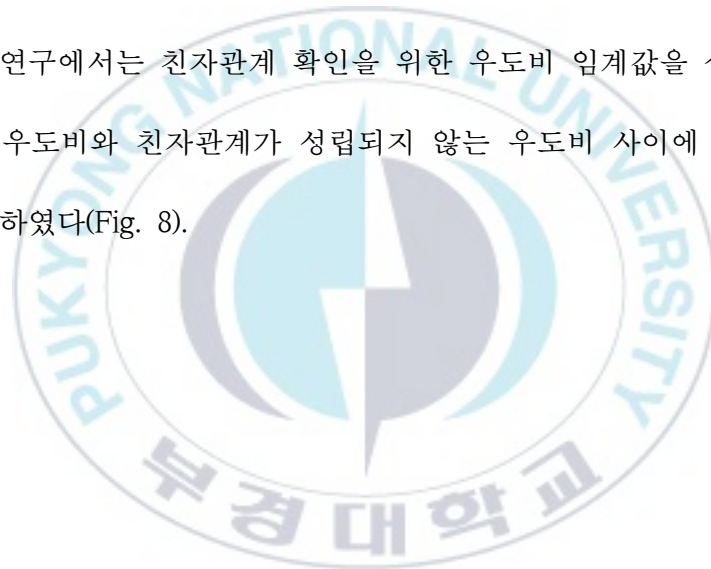
(B) Parentage verification exclusion

Pedgree	4S02	ACaj052	AH076	AH132	AJ17	AJ19640	AJ91732	C70	Contig21099	Contig36873	DKO7S	HC416	HG26I
P	167 169	289 341	107 107	288 296	156 156	143 152	230 230	241 245	245 245	223 225	266 266	279 293	106 112
C	<b>177 177</b>	289 327	107 111	294 296	156 156	152 155	230 232	239 241	245 245	221 225	<b>264 264</b>	283 293	106 112
P	167 183	287 331	107 107	288 288	148 176	155 158	226 226	243 249	245 247	223 227	264 264	289 293	106 118
C	167 173	287 289	107 107	288 288	<b>164 164</b>	152 158	226 232	<b>241 245</b>	245 245	<b>219 219</b>	262 264	273 289	106 106

### 3.1.3 우도비(Likelihood ratio) 산정

Cervus 3.07 software (Marshall *et al.*, 1998)와 kinship formulas (Table 16)를 통해 우도비를 산출하였으며 친자관계가 성립되는 101개체에 대한 우도비(Likelihood ratio, LR)를 산정하였다. 또한 친자관계가 성립되지 않는 개체들을 수집 후 1600개의 우도비 값을 확보하여 정규분포표를 도출하였다(Fig. 8). 현재 국내의 방류효과조사에서는 일부 품종 이외에는 최대우도비(Maximum likelihood ratio) 방법을 활용하여 친자관계를 분석하고 있다. 이는 과학적인 접근을 통해 신뢰도 높은 결과를 설명하기에는 다소 부족한 부분이 있다.

따라서 본 연구에서는 친자관계 확인을 위한 우도비 임계값을 설정하기 위해 친자관계가 성립되는 우도비와 친자관계가 성립되지 않는 우도비 사이에 정규분포를 아래의 그림과 같이 산출하였다(Fig. 8).



### 3.1.4 친자관계 판정을 위한 우도비 임계값(Threshold values) 설정

친자관계 판정을 위한 임계값을 설정하기 위해 우도비 1~100,000까지의 범위를 기준으로 위양성률(False-positive rate)과 위음성률(False-negative rate)을 조사하였다 (Table 21). Table 21에서 친자관계 확인을 위한 우도비 값이 '1' 일 경우 위양성률은 0.062%, 과 위음성률은 3.595%로 나타났으며 위양성율의 경우는 10,000,000 까지도 큰 차이를 보이지 않았으나 위음성률의 경우는 우도비 10,000이상에서 10%이상으로 증가하기 시작하였다.

따라서 임계 값은 '1'로 설정하고 이에 대한 정확성 평가를 위해 실제 부모-자식에 적용하여 확인한 결과 100%의 정확도로 친자를 확인 가능하였다. 이는 부모-자식 관계에서 일치되는 결과에 대해 우도비를 산정하고 분석하여 정확도가 높게 나타난 것으로 예상되었다.

결론적으로 해삼에서의 신뢰성 기반의 친자확인을 위해서는 우도비 '1' 이상이 적합할 것으로 사료되며 이는 임계 값을 '1'을 기준으로 하였을 때 특이도 99.9% 이상, 정확도 96% 이상으로 부모/자식 관계 판정이 가능하다는 것을 말한다. 그러나 이에 대한 후속 연구에서는 좀 더 많은 부모 가계 확보를 통한 임계 값의 정확성에 대한 추가 검증도 필요할 것으로 판단된다.

## Parentage assignment

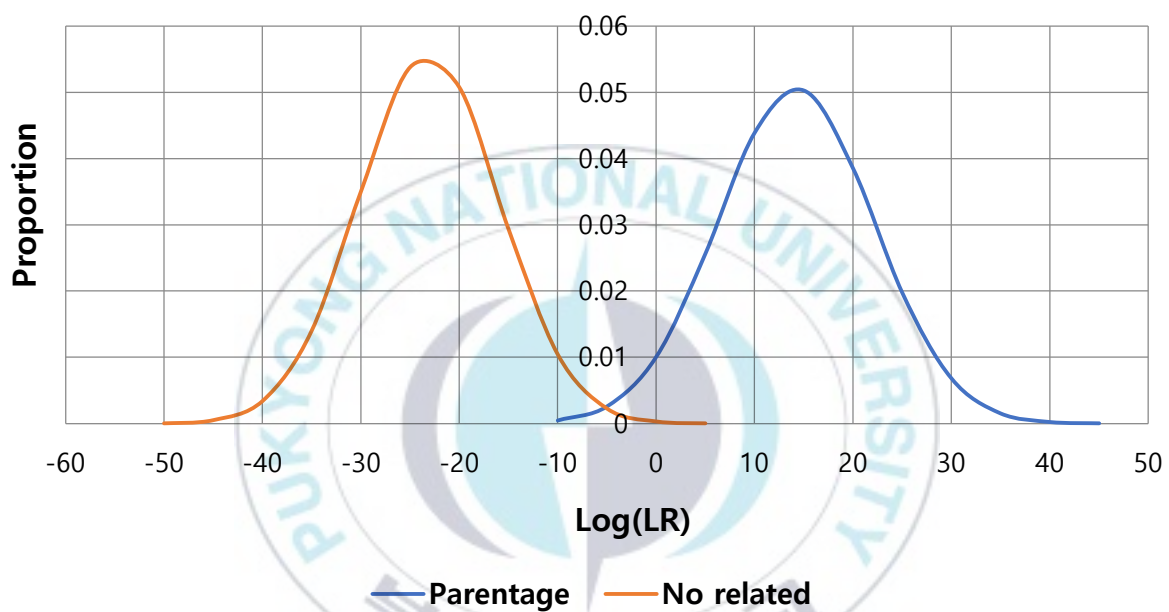


Fig. 7. Likelihood ratio distributions for parent/child relationship with 13 loci. Blue line represents related distributions. orange lines indicate unrelated distributions

Table 21. False-positive and False-negative Rates on Likelihood ratio (LR) Distributions for Parentage assignment

Threshold LR	False-positive rate (%)	False negative rate (%)
1	0.062	3.595
10	0.038	4.717
100	0.023	6.104
1000	0.013	7.791
10000	0.008	9.810
100000	0.004	12.188
1000000	0.002	14.945
10000000	0.001	18.089

### 3.1.5 실제 형매관계 그룹 확보

형매관계 확인을 위해 친자관계가 검증된 종자 총 101개체에 대한 부모 정보를 확인하였으며 공통 부모를 가지는 개체에 대해 형제관계인 것으로 그룹화 하였다. 이후 우도비를 대량 확보하고 이에 대한 신뢰성을 높이기 위해 한 부모에서 자식이 최소 5개체 이상인 그룹을 선발하였다.

### 3.1.6 우도비(Likelihood ratio) 산정

Table 15, 16의 알고리즘을 활용하여 8가계에 대한 형매관계 우도비 값을 산출하였다. 1번 가계의 경우 우도비  $0.18 \sim 7.305 \times 10^9$ , 2번 가계의 경우  $2.309 \times 10^7 \sim 2.265 \times 10^{13}$ , 3번 가계의 경우  $5.034 \sim 1.343 \times 10^{11}$ , 4번 가계의 경우  $8.905 \times 10 \sim 1.157 \times 10^{12}$ , 5번가계의 경우  $0.567 \sim 3.118 \times 10^7$ , 6번 가계의 경우  $0.259 \sim 3.250 \times 10^{15}$ , 7번 가계의 경우  $0.050 \sim 1.019 \times 10^9$ , 8번 가계의 경우  $3.112 \times 10^5 \sim 9.772 \times 10^{13}$  로 높은 값을 나타내었다. 실제 형제관계인 896개의 우도비(Likelihood ratio, LR)를 산정하고 성립되지 않는 관계의 400개의 우도비(Likelihood ratio, LR)를 산출하여 통계적 신뢰구간과 정규분포표를 도출하였다(Fig 8).

따라서 본 연구에서는 형매관계 확인을 위한 통계적 기준인 우도비 임계 값을 설정하기 위해 형매관계가 성립되는 우도비 분포와 형매관계가 성립되지 않는 우도비 분포 사이에 정규분포를 아래의 그림과 같이 산출하였다(Fig. 8).



Table 22. Likelihood ratio of distributions for Full-sibs assignment

Group	Sample size	Likelihood ratio range	Log(Likelihood ratio) range
1	5	0.18 ~ 7.305×10 <sup>9</sup>	-0.736 ~ 9.863
2	5	2.309×10 <sup>7</sup> ~ 2.265×10 <sup>13</sup>	7.363 ~ 13.355
3	6	5.034 ~ 1.343 ×10 <sup>11</sup>	0.701 ~ 11.128
4	5	8.905×10 ~ 1.157×10 <sup>12</sup>	1.949 ~ 12.063
5	8	0.567 ~ 3.118×10 <sup>7</sup>	-0.246 ~ 7.493
6	27	0.259 ~ 3.250×10 <sup>15</sup>	-0.586 ~ 15.512
7	5	0.050 ~ 1.019×10 <sup>9</sup>	-1.30 ~ 9.008
8	7	3.112×10 <sup>5</sup> ~ 9.772×10 <sup>13</sup>	5.493 ~ 13.990
Total	68	0.050 ~ 3.250×10 <sup>15</sup>	-1.30 ~ 15.512

## Full-sibs assignment

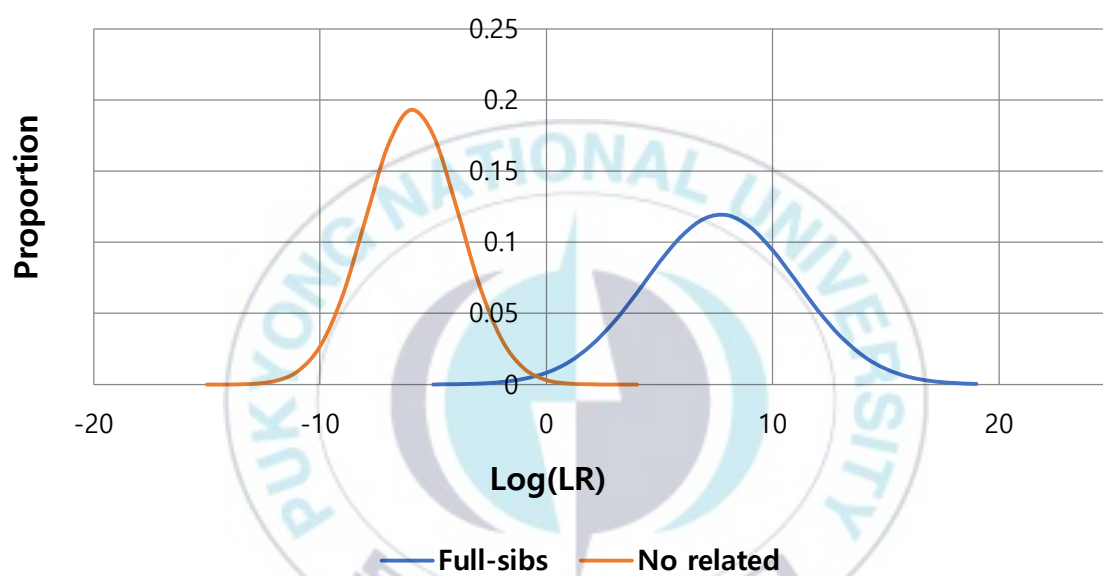


Fig. 8. Likelihood ratio distributions for Full-sib relationship with 13 loci. Blue line represents related distributions. orange lines indicate unrelated distributions

### 3.1.7 형매관계 판정을 위한 우도비 임계 값(Threshold LR) 설정

형매관계 판정을 위한 임계 값을 설정하기 위해 우도비 1~1,000,000까지의 범위를 기준으로 위양성률(False-positive rate) 및 위음성률(False-negative rate)을 조사하였다. Table 23에서 형매관계 확인을 위한 우도비 임계 값이 '10' 일 경우 위양성률은 0.21%, 위음성률은 1.06%로 나타났으며 위양성률의 경우는 10,000,000 까지도 큰 차이를 보이지 않았으나 위음성률의 경우에는 1,000이상에서 10% 이상으로 증가하기 시작하였다.

따라서 해삼에서의 신뢰성 기반의 형매관계 확인을 위해서는 우도비 '10' 이상이 적합할 것으로 사료되며 이는 임계 값을 10을 기준으로 하였을 때 특이도 99.9% 이상, 정확도 97% 이상으로 형매관계 판정이 가능하다는 것으로 말할 수 있다.



Table 23. False-positive and False-negative Rates on Likelihood ratio (LR) Distributions for Full-sibs assignment

Threshold LR	False-positive rate (%)	False negative rate (%)
1	0.21	1.06
10	0.04	2.24
100	0.01	4.39
1000	0.00	7.97
10000	0.00	13.40
100000	0.00	20.95
1000000	0.00	30.55
10000000	0.00	41.71

### 3.1.7 형매관계 판정을 위한 임계 값 검증

실제 형매가계 8그룹에 설정된 임계 값을 적용하여 정확성을 검증하였다. 임계 값 '10'을 기준으로 형매관계 판정 시 1번 가계에서는 90%, 2번 가계의 경우 100%, 3번 가계의 경우 94%, 4번 가계 100%, 5번 가계 93%, 6번 가계 99.4%, 7번 가계 95%, 8번 가계 100%의 정확도로 확인이 가능하였으며 이는 전체적으로 평균 96%의 정확도를 보였다. 이는 앞서 위양성 및 위음성 결과(민감도 99.9%, 정확도 97%)에서와 매우 유사한 결과를 나타내어 해삼에서의 형매관계 판정 시 우도비 임계 값 '10'을 기준으로 할 경우 높은 정확성과 신뢰도로 판정이 가능하다는 것을 의미한다.

그러나 이 결과는 확보된 유전형을 기반으로 산출되므로 통계적 신뢰도를 높이기 위한 데이터베이스구축은 가장 중요한 요소로서(양 *et al.*, 2013) 데이터가 누적될수록 정확도는 증가한다. 따라서 향후 지속적인 유전자형 데이터베이스 구축을 통해 해양생물에서의 혈연관계 분석 기반 구축에 관한 후속 연구도 필요할 것으로 사료된다.

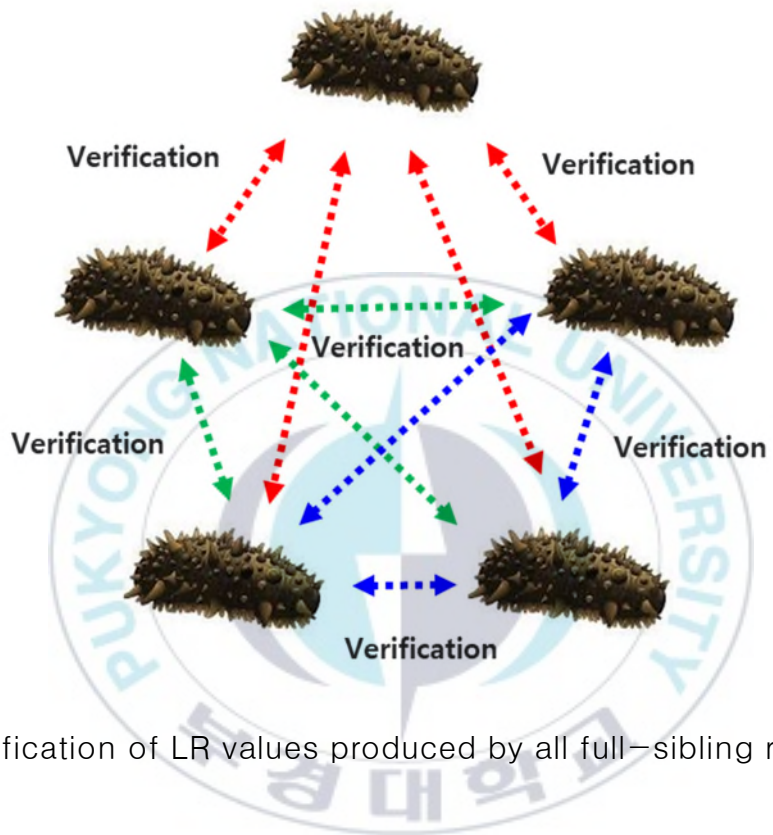


Fig. 9. Verification of LR values produced by all full-sibling relationships

Table 23. False-positive and False-negative Rates on Likelihood ratio (LR) Distributions for Full-sibs assignment

<b>Group</b>	<b>Sample size</b>	<b>Accuracy rate</b>
1	20	<b>90%</b>
2	20	<b>100%</b>
3	30	<b>94%</b>
4	20	<b>100%</b>
5	56	<b>93%</b>
6	702	<b>99.4%</b>
7	20	<b>95%</b>
8	42	<b>100%</b>
<b>Total</b>	<b>910</b>	<b>96%</b>

## IV. 고찰

어류에 있어서 microsatellite marker를 활용한 친자확인 시 약 2% 전후의 실패율은 일반적이라는 보고가 있으며(Bonin *et al.*, 2004) 넙치의 경우는 86%만이 친자확인에 성공하였다(Seikino *et al.*, 2003), 멸치의 경우도 7개의 마커에서 93%만 친자확인이 되었다는 보고가 있다(Borell *et al.*, 2011). 여기서 친자확인(Parentage analysis)이란 어미와 시료 간의 친자확인 하는 것을 말한다. 통상적으로 친자확인 분석에서 사용되는 통계적인 친자확인 방법은 휴먼에러를 허용하여 통계적으로 접근하는 최대우도비(Maximum likelihood ratio)방법과 1개의 allele 에서라도 상이한 경우 친자관계에서 제외하는 배제(Exclusion)법을 사용한다. 그러나 수산생물의 특성상 사람보다는 많은 variation과 돌연변이들이 존재하기 때문에 가장 높은 통계적 확률을 가진 부모에게로 친자확인을 하는 방법인 최대우도비법을 적용한다(Jones and Adren, 2003). 이것은 많은 데이터를 분석해야 하는 집단의 경우에 유리하여 수산생물과 같은 친자확인 분석에는 사용되고 있다. 그러나 이 방법은 정확한 통계적 기준이 없고 단순히 가장 가능성이 높은 개체를 검증(matching)하는 것에만 의존하기 때문에 관계가 없는 집단과 비교 시 오류를 범할 가능성이 높다고 말할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 친자관계 및 형매관계 확인을 위한 정확한 기준을 마련하고자 하였으며 우선적으로 마커에 대한 검증을 위해 해삼 954개체 유전형 분석 결과를 활용하여 PIC(polymorphic information content, 다형성정보지수)와 배제력(exclusion power)를 도출하였다. 이 중 ACaj05 마커의 경우는 유전자 다형성 정보력 0.92, 식별력 0.99, 부권배제력 0.96으로 13개 마커 중에서 법과학적 지표들이 가장 높게 나타났으며 13 마커 set 전체에 대한 PIC 값은 0.7244 로 높게 나타났으며, Power of discrimination(식별력)은  $6.886 \times 10^{-16}$ ,



Power of exclusion(배제력)은  $3.468 \times 10^{-10}$ , Power of sibling discrimination(형제식별력)은  $5.21 \times 10^{-6}$ 으로 높은 식별력을 나타내었다. 이는 쉽게 말하면 개체와 부모관계 확인이 99.999999 % 이상의 정확성으로 multiplex PCR 시스템이 생물학적 부모개체를 정확히 찾아낼 수 있는 능력을 가지고 있음을 의미하는 것이다(심 & 이, 2017). 따라서 마커의 분석 시스템이 가지는 고도의 개체 식별력과 높은 배제력은 본 연구에서 해삼의 개체식별과 친자확인, 형제관계 확인에서 매우 높은 정확성을 가진다고 말할 수 있다(심 & 이, 2017).

이렇게 검증된 마커를 활용하여 친자확인을 위한 우도비 분포를 분석하고 통계적 판정 기준을 확립하기 위해 실제 부모 자식 관계의 개체를 선발하였으며 임의의 종자집단 764개체 중 총 101개체를 선발하였다. 부모/자식 관계에서는 서로 관계가 성립되는 경우와 관계가 성립되지 않는 경우의 우도비 분포는 잘 분리되었으며(Fig. 7) 이는 결과적으로 향후 해삼의 친자관계검정에서 우도비 값 1을 기준으로 판정하였을 때 낮은 수준의 위양성률과 위음성률로 관계를 어렵지 않게 구분할 수 있는 것이다(Table 21). 또한 형제관계검정에서도 마찬가지로 서로 관계가 성립되는 경우와 관계가 성립되지 않는 경우의 우도비 분포는 잘 분리되었으며(Fig. 8), 이는 결과적으로 향후 해삼의 형제관계 검정에서도 우도비 값 10을 기준으로 판정하였을 때 낮은 수준의 위양성률과 위음성률로 관계를 어렵지 않게 구분이 가능한 것이다(Table 23). 그러나 일반적으로 모든 혈연관계 분석에서 마커에 대한 연관불균형을 무시하고 우도비를 계산하는 경우에는 평균적으로 과소평가되는 현상을 보이지만, 일부 특이한 경우에 우도비가 3-7배 정도 과대평가되기도 한다(O' Connor KL *et al.*, 2012).

따라서 향후 추가적인 연구와 해양생물에 대한 DB구축을 통해 통계적인 신뢰성을 높여갈 필요가 있으며 본 연구에서 조사한 우도비의 분포는 해삼뿐만 아니라 타 어종 및

해양생물에 대한 가계확인, 선발육중, 방류효과조사 등을 분석하는데 기초 연구 자료로도 활용할 수 있을 것이다.



## V. 참고 문헌

- 김경일, 강호승, 장진욱, 오무환, & 김태호. (2012). 수온 변화에 따른 해삼 (*StiHolothuria monacaria*)의 행동 특성. 어업기술연구소보고, 5(1), 9-17.
- 김병기. (2007). 통발형 해삼 양성기구 개발에 관한 연구-1. 해삼의 형태 측정
- 김은미. (2014). Genetic diversity and population structure of manila clam, *Ruditapes philippinarum* based on SNP and MS DNA markers (Doctoral dissertation, 부경대학교).
- 동춘매, 강정하, 변순규, 박기영, 박중연, 공희정, ... & 김은미. (2016). Microsatellite marker 분석을 이용한 명태 (*Theragra chalcogramma*) 5 집단 유전적 다양성 및 유연관계 분석. 생명과학회지, 26(11), 1237-1244.
- 박경일, 김영준, & 김도훈. (2013). 경북지역 해삼 종묘방류사업의 경제적 효과 분석. 수산경영론집, 44(1), 81-90.
- 심용택, & 이철상. (2017). 해삼 (*Stichopus japonicus*)의 microsatellite 유전자형 분석을 위한 multiplex PCR 시스템 개발. 한국수산과학회지, 50(6), 806-811.
- 이진왕, 길현우, 이도현, 김주경, & 허준욱. (2018). 서식 환경에 따른 방류 돌기해삼 (*Stichopus japonicus*)의 크기 및 서식밀도 변화. Ocean and Polar Research, 40(2), 69-75.
- 양인석, 이환영, 박수정, 양우익, & 신경진. (2013). 상염색체 STR 유전자형 시뮬레이션을 이용한 한국인에서의 혈연지수 분포 분석.
- An, H. S., Lee, J. W., Kim, H. Y., Kim, J. B., Chang, D. S., Park, J. Y., ... & An, C. M. (2013). Genetic differences between wild and hatchery populations of Korean spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) inferred from microsatellite markers. *Genes & Genomics*, 35(5), 671-680.

- Araki, H., Ardren, W. R., Olsen, E., Cooper, B., & Blouin, M. S. (2007). Reproductive success of captive-bred steelhead trout in the wild: evaluation of three hatchery programs in the Hood River. *Conservation Biology*, 21(1), 181-190.
- Barker, G. C. (2002). Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, S21-S24.
- Barker, J. S. F., Moore, S. S., Hetzel, D. J. S., Evans, D., Byrne, K., & Tan, S. G. (1997). Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Animal genetics*, 28(2), 103-115.
- Beheregaray, L. B., & Sunnucks, P. (2000). Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. perugiae* species group and their use in other South American silverside fish. *Molecular Ecology*, 9(5), 629-631.
- Bjørnstad, G., Gunby, E., & Røed, K. H. (2000). Genetic structure of Norwegian horse breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 117(5), 307-317.
- Blott, S. C., Williams, J. L., & Haley, C. S. (1999). Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity*, 82(6), 613-619.
- Borrell, Y. J., Alvarez, J., Blanco, G., de Murguía, A. M., Lee, D., Fernández, C., ... & Prado, J. A. S. (2011). A parentage study using microsatellite loci in a pilot project for aquaculture of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* L. *Aquaculture*, 310(3-4), 305-311.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Brooker, A. L., Cook, D., Bentzen, P., Wright, J. M., & Doyle, R. W. (1994). Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(9), 1959-1966.

- Bruton, M. N. (1995). Have fishes had their chips? The dilemma of threatened fishes. *Environmental biology of Fishes*, 43(1), 1-27.
- Bryan, G. J., Collins, A. J., Stephenson, P., Orry, A., Smith, J. B., & Gale, M. D. (1997). Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(5), 557-563.
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., Nguyen, P. N., & Thomas, C. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids research*, 16(23), 11141-11156.
- Chang, Y., Feng, Z., Yu, J., & Ding, J. (2009). Genetic variability analysis in five populations of the sea cucumber *Stichopus (Apostichopus) japonicus* from China, Russia, South Korea and Japan as revealed by microsatellite markers. *Marine Ecology*, 30(4), 455-461.
- Chen, L., & Li, Q. (2007). Identification and characterization of microsatellite markers derived from expressed sequence tags of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 1057-1059.
- Chen, L., Li, Q., & Yang, J. (2008). Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) from northern China. *Aquaculture Research*, 39(14), 1541-1549.
- Chen, M., Gao, L., Zhang, W., You, H., Sun, Q., & Chang, Y. (2016). Identification of forty-five gene-derived polymorphic microsatellite loci for the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Journal of genetics*, 93(2), 31-35.
- Christie, M. R., Johnson, D. W., Stallings, C. D., & Hixon, M. A. (2010). Self-recruitment and sweepstakes reproduction amid extensive gene flow in a coral-reef fish. *Molecular ecology*, 19(5), 1042-1057.
- Crooijmans, R. P. M. A., Poel, J. V. D., Groenen, M. A. M., Bierbooms, V. A. F., & Komen, J. (1997). Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal genetics*, 28(2), 129-134.

- Dai, G., Li, Z. B., Shangguan, J. B., Ning, Y. F., Deng, H. W., Yuan, Y., ... & Lu, J. (2015). Development and characterization of polymorphic microsatellite loci in the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 538-541.
- Dakin, E. E., & Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(5), 504-509.
- DeWoody, J. A., & Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of fish biology*, 56(3), 461-473.
- Dong, Z., Chen, Y., Xu, G., Kang, C., Fu, G., Chen, B., & Li, J. (2018). Twenty-one microsatellite loci from sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867), an endangered species on the IUCN Red List. *3 Biotech*, 8(8), 1-4.
- Du, F., Li, Y., Wen, Z., Chen, R., & Xu, P. (2017). Development of simple sequence repeats (SSR) by transcriptome in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards). *Pakistan Journal of Zoology*, 49(2).
- Duncan, J. R., & Lockwood, J. L. (2001). Extinction in a field of bullets: a search for causes in the decline of the world's freshwater fishes. *Biological conservation*, 102(1), 97-105.
- Ellegren, Hans. "Microsatellites: simple sequences with complex evolution." *Nature reviews genetics* 5.6 (2004): 435-445.
- Estoup, A., Jarne, P., & Cornuet, J. M. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular ecology*, 11(9), 1591-1604.
- Fillatre, E. K., Etherton, P., & Heath, D. D. (2003). Bimodal run distribution in a northern population of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*): life history and genetic analysis on a temporal scale. *Molecular Ecology*, 12(7), 1793-1805.

- Ford, M. J. (2002). Selection in captivity during supportive breeding may reduce fitness in the wild. *Conservation Biology*, 16(3), 815-825.
- Fregeau, C. J., & Fourney, R. M. (1993). DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. *Biotechniques*, 15(1), 100-119.
- Fu, J., Shen, Y., Xu, X., Chen, Y., Li, D., & Li, J. (2013). Multiplex microsatellite PCR sets for parentage assignment of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture international*, 21(6), 1195-1207.
- Fujio, Y., Nakajima, M., & Showa, H. (1997). Selection and inbreeding depression in maintenance of a stock population of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Fisheries science*, 63(3), 368-371.
- Gheyas, A. A., Woolliams, J. A., Taggart, J. B., Sattar, M. A., Das, T. K., McAndrew, B. J., & Penman, D. J. (2009). Heritability estimation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) harvest traits using microsatellite based parentage assignment. *Aquaculture*, 294(3-4), 187-193.
- Gill, P., Ivanov, P. L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., ... & Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature genetics*, 6(2), 130-135.
- Gill, P. (2001). Application of low copy number DNA profiling. *Croatian medical journal*, 42(3), 229-232.
- Glover, K. A. (2010). Forensic identification of fish farm escapees: the Norwegian experience. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 1-10.
- Hara, M., & Sekino, M. (2003). Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture*, 217(1-4), 107-114.

- Harrison, H. B., Feldheim, K. A., Jones, G. P., Ma, K., Mansour, H., Perumal, S., ... & Berumen, M. L. (2014). Validation of microsatellite multiplexes for parentage analysis and species discrimination in two hybridizing species of coral reef fish (*Plectropomus* spp., Serranidae). *Ecology and evolution*, 4(11), 2046–2057.
- Hauser, L., Baird, M., Hilborn, R. A. Y., Seeb, L. W., & Seeb, J. E. (2011). An empirical comparison of SNPs and microsatellites for parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population. *Molecular ecology resources*, 11, 150–161.
- Hedgecock, D., Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., & Ribes, V. (2004). Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 23(2), 379–386.
- Herbinger, C. M., Doyle, R. W., Pitman, E. R., Paquet, D., Mesa, K. A., Morris, D. B., ... & Cook, D. (1995). DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture*, 137(1-4), 245–256.
- Hill, C. R., Butler, J. M., & Vallone, P. M. (2009). A 26plex autosomal STR assay to aid human identity testing. *Journal of Forensic Sciences*, 54(5), 1008–1015.
- Ismail, S., Vineesh, N., Mohitha, C., Vijayagopal, P., & Gopalakrishnan, A. (2018). Development and validation of microsatellite markers in a protandrous fish species *Eleutheronema tetradactylum* (Shaw, 1804) through cross-species amplification. *Indian Journal of Fisheries*, 65(3), 47–51.
- Ismail, S., Vineesh, N., Peter, R., Vijayagopal, P., & Gopalakrishnan, A. *Ecological Genetics and Genomics*.
- Jamieson, A., & CS Taylor, S. (1997). Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal genetics*, 28(6), 397–400.
- Jarne, P., & Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 11(10), 424–429.



- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006), 67-73.
- Jobling, M. A., & Gill, P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*, 5(10), 739-751.
- Jones, A. G., & Ardren, W. R. (2003). Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular ecology*, 12(10), 2511-2523.
- Kang, J. H., Kim, Y. K., Kim, M. J., Park, J. Y., An, C. M., Kim, B. S., ... & Kim, S. K. (2011). Genetic differentiation among populations and color variants of sea cucumbers (*Stichopus japonicus*) from Korea and China. *International journal of biological sciences*, 7(3), 323.
- Kang, J.-H., Y.-K. Kim, et al. (2012). "Development of microsatellite markers to genetically differentiate populations of Octopus minor from Korea and China." *Molecular biology reports* 39(8): 8277-8286.
- Kang, J. H., Kang, H. S., Noh, E. S., Park, J. Y., & An, C. M. (2014). Isolation and characterization of novel microsatellite markers for the northern mauxia shrimp, *Acetes chinensis*, using pyrosequencing. *Marine genomics*, 18, 67-69.
- Kanno, Manami, Qi Li, and Akihiro Kijima. "Isolation and characterization of twenty microsatellite loci in Japanese sea cucumber (*Stichopus japonicus*)." *Marine Biotechnology* 7.3 (2005): 179-183.
- Kashiri, H., Shabani, A., Gorgin, S., Rezaii, M., & Jabale, A. R. (2018). Microsatellite DNA Marker Analysis of Genetic Variation in Wild and Hatchery Populations of Caspian Kutum (*Rutilus kutum*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(9), 1101-1111.
- Kim, M. J., Choi, T. J., & An, H. S. (2008). Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicus* in Korea using microsatellite markers. *Aquaculture Research*, 39(10), 1038-1045.

- Kim, Mi-Jung, Hye Suck An, and Kwang-Ho Choi. "Genetic characteristics of Pacific cod populations in Korea based on microsatellite markers." *Fisheries Science* 76.4 (2010): 595-603.
- Kim, S. G., Morishima, K., Satoh, N., Fujioka, T., Saito, S., & Arai, K. (2007). Parentage assignment in hatchery population of brown sole *Pleuronectes herzensteini* by microsatellite DNA markers. *Fisheries Science*, 73(5), 1087-1093.
- Kim, S. J., Park, S. Y., Hong, S. M., Kwon, E. H., & Lee, T. K. (2016). Skin whitening and anti-corrugation activities of glycoprotein fractions from liquid extracts of boiled sea cucumber. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(10), 1002-1006.
- Kincaid, H. L. (1983). Inbreeding in fish populations used for aquaculture. *Aquaculture*, 33(1-4), 215-227.
- Lee, C. H., Lee, D. H., Kwak, S. N., & Kim, H. W. (2013). A preliminary study in habitat characteristics and settlement of released sea cucumber, *Stichopus japonicus* in the coastal waters of Korean peninsula. *J Fish Resour Manag*, 3, 113-127.
- Lee, C. S., & Park, Y. J. (1999). Influence of food and density on the growth and survival of sea cucumber, *Stichopus japonicus*. *Journal of Aquaculture*, 12, 39-45.
- Linløkken, A. N., Johnsen, S. I., & Johansen, W. (2021). Genetic Diversity of Hatchery-Bred Brown Trout (*Salmo trutta*) Compared with the Wild Population: Potential Effects of Stocking on the Indigenous Gene Pool of a Norwegian Reservoir. *Diversity*, 13(9), 414.
- Liu, J., Liu, D., Tao, W., Li, W., Wang, S., Chen, P., ... & Gao, D. (2000). Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. *Plant Breeding*, 119(1), 21-24.
- Li, J., Geng, X., Chen, L., & Sun, J. (2016). Identification and characterization of thirty novel microsatellite DNA markers from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* expressed sequence tags. *BMC research notes*, 9(1), 1-5.

- Liu, P., Xia, J. H., Lin, G., Sun, F., Liu, F., Lim, H. S., ... & Yue, G. H. (2012). Molecular parentage analysis is essential in breeding Asian seabass. *PloS one*, 7(12), e51142.
- Liu, Z. J. and J. F. Cordes. "DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics." *Aquaculture* 238.1-4 (2004): 1-37.
- Lundrigan, T. A., Reist, J. D., & Ferguson, M. M. (2005). Microsatellite genetic variation within and among Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from aquaculture and natural populations in North America. *Aquaculture*, 244(1-4), 63-75.
- Masi, P., Zeuli, P. S., & Donini, P. (2003). Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 11(4), 303-313.
- Matson, S. E., Camara, M. D., Eichert, W., & Banks, M. A. (2008). P-LOCI: a computer program for choosing the most efficient set of loci for parentage assignment. *Molecular ecology resources*, 8(4), 765-768.
- Maudet, C., Luikart, G., & Taberlet, P. (2002). Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science*, 80(4), 942-950.
- McConnell, S. K., O'Reilly, P., Hamilton, L., Wright, J. M., & Bentzen, P. (1995). Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(9), 1863-1872.
- McConnell, S. K. J., Ruzzante, D. E., O'reilly, P. T., Hamilton, L., & Wright, J. M. (1997). Microsatellite loci reveal highly significant genetic differentiation among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks from the east coast of Canada. *Molecular Ecology*, 6(11), 1075-1089.
- McGinnity, P., Prodöhl, P., Ferguson, A., Hynes, R., Maoiléidigh, N. O., Baker, N., ... & Cross, T. (2003). Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon.

- Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1532), 2443-2450.
- Moazami-Goudarzi, K., Furet, J. P., Grosclaude, F., & Laloë, D. (1997). Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal genetics*, 28(5), 338-345.
- Moges, A. D., B. Admassu, et al. (2016). "Development of microsatellite markers and analysis of genetic diversity and population structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia." *PloS one* 11(3): e0151257.
- Nam, Bo-Hye, et al. "Genotyping-by-Sequencing of the regional Pacific abalone (*Haliotis discus*) genomes reveals population structures and patterns of gene flow." *PloS one* 16.4 (2021): e0247815.
- Norris, A. T., Bradley, D. G., & Cunningham, E. P. (2000). Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, 182(1-2), 73-83.
- O' Connor, K. L., & Tillmar, A. O. (2012). Effect of linkage between vWA and D12S391 in kinship analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 6(6), 840-844.
- O'Reilly, P., & Wright, J. M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of Fish Biology*, 47, 29-55.
- O'Reilly, P. T., Hamilton, L. C., McConnell, S. K., & Wright, J. M. (1996). Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(10), 2292-2298.
- Park, K. I., Kim, Y. J., & Kim, D. H. (2013). Analyzing economic effectiveness of the sea cucumber seed releasing program in Gyeongsangbuk-do region. *The Journal of Fisheries Business Administration*, 44(1), 81-90.

- Park, K. J., Ryu, S. O., Baek, Y. S., Kim, Y. S., Kang, H. W., & Han, H. S. (2013). Substrate characteristics of sea cucumber *Stichopus japonicus* habitats in the west coast of Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(6), 886–891.
- Park, Y. J. (2006). Development of culture technique of sea cucumber, *Stichopus japonicus*. 147pp. Final report of KIMST, MOMAF.
- Perez-Enriquez, R., & Taniguchi, N. (1999). Genetic structure of red sea bream (*Pagrus major*) population off Japan and the Southwest Pacific, using microsatellite DNA markers. *Fisheries science*, 65(1), 23–30.
- Perez-Enriquez, R., Takagi, M., & Taniguchi, N. (1999). Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 173(1–4), 413–423.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*, 2(3), 225–238.
- Puebla, O., Bermingham, E., & Guichard, F. (2008). Population genetic analyses of *Hypoplectrus* coral reef fishes provide evidence that local processes are operating during the early stages of marine adaptive radiations. *Molecular Ecology*, 17(6), 1405–1415.
- Purcell, S. W., Hair, C. A., & Mills, D. J. (2012). Sea cucumber culture, farming and sea ranching in the tropics: Progress, problems and opportunities. *Aquaculture*, 368, 68–81.
- Purcell, S. W., Eriksson, H., & Byrne, M. (2016). Rotational zoning systems in multi-species sea cucumber fisheries.
- Purcell, S. W., Ngaluafu, P., Foale, S. J., Cocks, N., Cullis, B. R., & Lalavanua, W. (2016). Multiple factors affect socioeconomics and wellbeing of artisanal sea cucumber fishers. *PloS one*, 11(12), e0165633.

- Ralls, K., & Ballou, J. (1986). Captive breeding programs for populations with a small number of founders. *Trends in Ecology & Evolution*, 1(1), 19-22.
- Schnell, R. J., Brown, J. S., Olano, C. T., Power, E. J., Krol, C. A., Kuhn, D. N., & Motamayor, J. C. (2003). Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(6), 881-889.
- Sekino, M., Hara, M., & Taniguchi, N. (2002). Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 213(1-4), 101-122.
- Sekino, M., Saitoh, K., Yamada, T., Kumagai, A., Hara, M., & Yamashita, Y. (2003). Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, 221(1-4), 255-263.
- Sellars, Melony J., et al. "Comparison of microsatellite and SNP DNA markers for pedigree assignment in B lack Tiger shrimp, *Penaeus monodon*." *Aquaculture Research* 45.3 (2014): 417-426.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Ndjioudjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African journal of biotechnology*, 5(25).
- Shrimpton, J. M., & Heath, D. D. (2003). Census vs. effective population size in chinook salmon: large-and small-scale environmental perturbation effects. *Molecular Ecology*, 12(10), 2571-2583.
- Song, H. Y., Kim, K. Y., Yoon, M., Nam, Y. K., Kim, D. S., & Bang, I. C. (2010). Genetic variation of *Coreoleuciscus splendidus* populations (Teleostei; Cypriniformes) from four major river drainage systems in South Korea as assessed by AFLP markers. *Genes & Genomics*, 32(3), 199-205.

- Song, H. Y., & Bang, I. C. (2009). Genetic variation of *Coreoleuciscus splendidus* populations from four major rivers in Korea as assessed by RAPD PCR. *Korean Journal of Ichthyology*, 21(2), 129–133.
- Song, J. H., & Hong, J. B. (2009). The current status and tasks of rockfish restocking project based on economic performance evaluation. *The Journal of Fisheries Business Administration*, 40(3), 69–88.
- Srivastava, S., Kushwaha, B., Prakash, J., Kumar, R., Nagpure, N. S., Agarwal, S., ... & Jena, J. K. (2016). Development and characterization of genic SSR markers from low depth genome sequence of *Clarias batrachus* (magur). *Journal of genetics*, 95(3), 603–609.
- Sun, D., H. Li, et al. (2012). “Development of microsatellite markers for the small yellow croaker *Larimichthys polyactis* (Sciaenidae) by cross-species amplification.” *Genetics and Molecular Research* 11(2): 1469–1474.
- Taggart, J. B. (2007). FAP: an exclusion-based parental assignment program with enhanced predictive functions. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 412–415.
- Turrina, S., Ferriani, M., Caratti, S., & De Leo, D. (2014). Evaluation of genetic parameters of 22 autosomal STR loci (PowerPlex® Fusion System) in a population sample from Northern Italy. *International journal of legal medicine*, 128(2), 281–283.
- Urquhart, A., Kimpton, C. P., Downes, T. J., & Gill, P. (1994). Variation in short tandem repeat sequences—a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International journal of legal medicine*, 107(1), 13–20.
- Vandeputte, M., Rossignol, M. N., & Pincet, C. (2011). From theory to practice: empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding. *Aquaculture*, 314(1–4), 80–86.
- Vandeputte, M. (2012). An accurate formula to calculate exclusion power of marker sets in parentage assignment. *Genetics Selection Evolution*, 44(1), 1–4.

- Vandeputte, M., & Haffray, P. (2014). Parentage assignment with genomic markers: a major advance for understanding and exploiting genetic variation of quantitative traits in farmed aquatic animals. *Frontiers in Genetics*, 5, 432.
- Vieira, M. L. C., L. Santini, et al. (2016). "Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful." *Genetics and molecular biology* 39(3): 312-328.
- Wang, M. L., Barkley, N. A., & Jenkins, T. M. (2009). Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of biotechnology.
- Wang, X. W., Trigiano, R. N., Windham, M. T., DeVries, R. E., Scheffler, B. E., Rinehart, T. A., & Spiers, J. M. (2007). A simple PCR procedure for discovering microsatellites from small insert libraries. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 558-561.
- Wang, X., Hua, Q., Wu, L., Weng, Z., Huang, W., & Meng, Z. (2021). Development of a multiplex microsatellite assay for parentage assignment in orange-spotted groupers (*Epinephelus coioides*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 52(2), 435-444.
- Wordley, C., Slate, J., & Stapley, J. (2011). Mining online genomic resources in *Anolis carolinensis* facilitates rapid and inexpensive development of cross-species microsatellite markers for the *Anolis* lizard genus. *Molecular ecology resources*, 11(1), 126-133.
- Yue, G. H., & Xia, J. H. (2014). Practical considerations of molecular parentage analysis in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(2), 89-103.
- Zhan, A., Bao, Z., Lu, W., Hu, X., Peng, W. E. I., Wang, M., & Hu, J. (2007). Development and characterization of 45 novel microsatellite markers for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 1345-1348.
- Zhang, Q., & Liu, Y. H. (1998). Aquaculture techniques of sea cucumber and sea urchin. The Press of Ocean University of Qingdao, Qingdao (119 pp.).



Zimmerman, Shawna J., Cameron L. Aldridge, and Sara J. Oyler-McCance. “An empirical comparison of population genetic analyses using microsatellite and SNP data for a species of conservation concern.” *BMC genomics* 21 (2020): 1-16.

Zuo Z, Zheng X, Yuan Y, Li Q (2011) Development and characterization of 12 polymorphic microsatellite loci in *Octopus minor* (Sasaki, 1920). *Conserv Genet Resour* 3:489-491



## 감사의 글

2018년 처음 박사과정 입학 이후 어느덧 4년이라는 시간이 흘렀습니다. 항상 많은 가르침을 주시고 매 순간 마다 배려와 도움, 학위논문을 위해 많은 조언과 지도 편달 해주신 남윤권 교수님께 말로 다 표현할 수 없으나 진심으로 고개 숙여 감사드립니다. 그리고 바쁜 업무와 연구에도 저의 박사 학위 논문을 면밀히 검토해주시고 지도해주신 이혁제 교수님, 학위 논문에서의 중요한 부분과 박사로서 갖추어야 할 부분을 조언해주신 김현우 교수님, 공승표 교수님, 김찬희 교수님께 정말 감사드립니다. 그리고 학위를 하는데 여러 도움을 주신 유전자원학 연구실 김은정 실장님과 이하 모든 후배님들께도 감사드립니다. 또한 2019년 올인원진텍이라는 회사를 설립하면서 옆에서 항상 같이 고민하고 동거동락하며 묵묵히 회사 실무를 이끌어준 원세, 그리고 회사가 성장하는데 많은 도움을 주신 올인원진텍의 유능한 전현직 직원분들의 노고에 감사의 인사를 드립니다.

항상 장남의 목표와 꿈을 향해 바른 길로 나아갈 수 있도록 항상 격려와 사랑으로 키워주신 사랑하는 아버지, 어머니와 항상 형을 배려해주는 동생 지우에게 정말 감사드립니다. 사위가 걱정없이 학위와 사업을 할 수 있도록 제 입장에서 모든 부분을 생각해주시고 배려해주신 장모님, 장인어른께도 감사의 말 전해드립니다.

무엇보다 결혼 이후 헌신과 사랑으로 아이들을 잘 키워주고 남편이 학위와 사업을 하는데 있어 많은 어려운 상황과 위기 속에서도 격려와 용기로 저의 새로운 인생을 살게 해준 내 삶의 동반자 현모양처 아내 김근희와 아빠가 자주 놀아주지는 못하지만 항상 건강하고 밝게 자라주는 배려심 많고 활발한 우리 큰 딸 한수연, 귀엽고 애교 많은 작은 딸 한다연 우리 가족에게 너무 고맙고 누구보다 사랑한다는 말과 함께 감사한 모든 분들에게 박사 학위 취득을 전해 올립니다.