



수 산 학 석 사 학 위 논 문

# 부세(*Larimichthys crocea*)의 유전적 다양성 분석을 위한 차세대염기서열 분석법 기반의 Microsatellite 마커 개발



부경대학교대학원

수 산 생 물 학 과

전 해 련

수 산 학 석 사 학 위 논 문

## 부세(*Larimichthys crocea*)의 유전적 다양성 분석을 위한 차세대염기서열 분석법 기반의 Microsatellite 마커 개발

지도교수 김 종 명

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함.

2023년 02월

부경대학교대학원

수 산 생 물 학 과

전 해 련

## 전해련의 수산학석사 학위논문을 인준함.

2023년 2월 17일





요약(Abstract) ······	iii
표 목차(List of tables)	v
그림 목차(List of figures) ······	vii

	NATIO	NAL UN	
I. 서론·	6		1

Ⅱ. 재료 및 방법4
1. 시료 확보4
2. Microsatellite marker set 개발 ······5
가. DNA 추출
나. NGS (Next Generation Sequencing) 분석
다. Microsatellite region 확인 및 primer design
라. Multiplex PCR set 개발을 위한 마커 선별 및 검증8
3. 집단유전학적 분석 및 유전적 다양성 평가
가. 집단분석을 위한 DNA 분리 및 유전자 추출
나. 유전자형 분석
다. 유전적 다양성 통계분석

Ⅲ. 결 과
1. Microsatellite marker set 개발 결과
가. DNA & Library QC13
나. NGS (Next Generation Sequencing) 결과
다. Microsatellite region 확인 및 primer design
라. Multiplex PCR set 마커 선별 및 검증
2. 집단유전학적 분석 및 유전적 다양성 평가
가. 종자 집단
나. 어미 집단
annie
Ⅳ. 고찰 ···································
V. 삼고준헌 40
A CH of m

Development of Microsatellite marker based on Next-generation sequencing for genetic diversity analysis of *Larimichthys crocea* 

Hae-ryeon Jeon

Department of Fisheries Biology, The Graduated School,

Pukyong National University

#### Abstract

Demand for large yellow croker (*Larimichthys crocea*), which is used as a raw material for Gulbi of high economic value, has been increased. In this study, a microsatellite marker was developed using a next-generation sequencing method for efficient gene management of broodstock used for artificial seed production, and for the genetic analysis of the breeding populations. More than 15G bases of total reads were generated through Next-generation sequencing (NGS) with a quality score of Q20 of 99% reliability for 94.5% of the total. From microsatellite regions selected through the calculated results, 192 markers were selected. Out of 75 sets of markers selected through PCR screening, 24 markers were selected after confirming amplification and diversity by performing genotyping by synthesizing dye labeled primers. Based on the range according to the dye, we developed 2 sets

of multiplex PCRs in which 8 loci are 1 set. Genetic analysis of large yellow crocker seeds and broodstock groups using the developed marker indicated that the average number of alleles for the total 144 individuals was 13.66 by applying allele richness. This was similar to the number of alleles (K) with an average of 13.62. The average expected heterozygous rate (He) was 0.857, and the average observed heterozygous rate (Ho) was 0.770. The polymorphism information index (PIC) showed an average of 0.835, which confirmed that genetic diversity was well maintained and that there was no linkage imbalance between markers. In addition, the evaluation of the exclusion power of 16 markers showed a high discrimination power of 7.248 X  $10^{-16}$ . The microsatellite marker developed in this study is expected to be useful for genetic analysis and genetic diversity identification of large yellow crocker populations in the future.

## 표 목 차

Table 1. DNA concentration QC (Quality control) results
Table 2. LC26, LC31 results of tax NGS raw data generation16
Table 3. Number of microsatellite regions by unit size
Table 4. Microsatellite marker set-A genotyping peak23
Table 5. Microsatellite marker set-B genotyping peak
Table 6. Microsatellite marker set-A information
Table 7. Microsatellite marker set-B information
Table 8. Multiplex PCR conditions    30
Table 9. Discrimination calculation values for each marker    32
Table 10. Genetic diversity and population genetic analysis of 96 seeds

Table	11.	Genetic	diversity	and	population	genetic	analysis	of	48
	ł	roodstock							· 36



## 그림목차

Figure 1. Analysis of genomic DNA by agarose gel ecectrophoresis … 13
Figure 2. LC26, LC31 library QC result
Figure 3. LC26, LC31 library QC result15
Figure 4. Microsatellite region ratio through assembly
Figure 5. Secondary selection of 75 marker multiplex set configuration 21
Figure 6. Final selected mulplex PCR set combinations
Figure 7. Multiplex PCR set marker null allele test results (16 loci) … 31

#### I. 서론

부세는 국내에서 굴비의 원료로 이용되며 연간 소비량은 2013년 9,320톤에서 2020년 16,922톤으로 꾸준히 증가했지만, 국내 어획량은 2013년 190톤, 2020년 307톤에 불과하며 2020년 중국산 수입이 국내 수요량 대부분인 16,615톤을 차지하고 있다(Source of data: FIPS, NFQS). 부세는 소비량에 비해 어업 생산량은 증가하지 못하고 있으며 대부분 중국 수입에 의존하고 있으므로 안정적 수급을 위해 자체적인 인공종자 생산 및 대량생산이 요구되고 있는 실정이다.

부세는 황금빛을 띄는 특성 때문에 국내보다 중국에서 더욱 고부가가치 어종으로 많은 소비가 이루어지고 있다. 중국에서 1970년대 이후 남획으로 인해 자원량이 급감하였고, 이를 해결하기 위해 부세 양식 산업이 발달 하였으나, 양식 세대가 길어짐에 따라 낮은 성장률, 조기 성 성숙, 낮은 생존율 등 많은 상업적 특성이 저하되기 시작하였다. 부세처럼 자연산 친어의 유입이 어려운 소규모 양식집단에서 친어의 유전형을 고려하지 않고 무작위 교배를 실시하게 되면 대립 유전자형의 감소가 발생할 수 있으며 (Rudnick, and Lacy, 2008), 이는 유전자의 부동과 병목현상을 일으켜 질병 저항성 감소, 기형의 증가, 성장 저하, 근친도의 증가 등 부정적 영향을 미칠 수 있다(Allendort et al., 2004). 또한, 유전적 근교약세로 이어지게 되며 생산된 종자의 생존력에도 악영향을 미칠 수 있다(Kim et al., 2015). 상기와 같은 이유로 중국에서는 종자의 질 저하 원인이 한정적 어미의 지속적 사용으로 인한 유전적 다양성 소실의 영향일 것으로 예상하여 유전자 분석 마커들을 통해 양식산과 자연산의 유전적 다양성 파악(Wang et al., 2002; Li 2005; Liu et al., 2015; Lou et al., 2015) 및 친자판별(Xiande et al., 2012) 등 많은 연구가 수행되었다. 결과적으로 자연산 대비 양식산 품종이 유전적 다양성이 유의적으로 낮은 것으로 확인되었으며 종자 생산에 있어 유전적 다양성 확보를 위한 연구들이 중점적으로 수행되고 있다.

국내의 부세 생산에 있어 친어 및 종자의 유전자형을 고려하지 않고 종자 생산을 시행한다면 중국과 유사한 상황으로 이어질 것으로 예상되므로, 친어의 체계적 유전적 관리뿐만 아니라 생산 종자의 유전적 다양성을 파악하여 관리 할 수 있는 연구가 필요하다. 그러나 현재 국내의 부세에 관한 연구로는 부세(*Larimichthys crocea*)의 수정란 및 종자 생산 연구 (Park et al. 2022), 한국산 민어과 농어목 어류의 분류(Lee and Park, 1992), 참조기와 부세의 외부 형질 비교(Park and Oh, 2020), 다중 PCR (Multiplex species specific polymerase chain reaction)분석법을 이용한 참조기, 부세, 흑조기, 긴가이석태의 종 판별법(Noh et al., 2017) 등 종자생산 과 분류학적 연구만 수행되었을 뿐 집단 유전학적 평가와 유전적 다양성에 대한 연구는 매우 미비한 실정이다.

집단유전학적 평가와 유전적 다양성을 분석하는 방법은 Microsatellite, Amplified fragment length polymorphism, Single nucleotide polymorphism 등이 있으며 이번 연구에서 사용되는 microsatellite marker 는 개체 간 다형성이 높고 반복 실험 시에도 재현성이 높으며 공우성 (co-dominant)을 나타내어 유전적 다양성 파악이 용이하여 유전자 지도 작성, 집단유전학 및 보존 유전학 등에 활용되는 분자유전학 연구에 유용한 마커이다(Guyomar et al., 2006; Hauswaldt and Glenn, 2003; Pettay and Lajeunesse, 2009).

이번 연구에서 차세대염기서열 (NGS, Next Generation Sequencing) 분석을

이용하여 대량 염기서열을 확보한 후 microsatellite region을 탐색하여 microsatellite marker set를 개발하고자 하였으며, 개발된 마커를 활용하여 현재 생산, 방류되고 있는 부세의 집단유전학적 분석 및 유전적 다양성 파악뿐만 아니라 종자 생산에 필요한 유전적 기초자료를 제공하고자 하였다.



## Ⅱ. 재료 및 방법

#### 1. 시료 확보

전라남도 해양수산과학원으로부터 2021년 종자 생산에 사용한 어미 49개체와 2021년 생산된 종자 96개체를 냉동 상태로 인계받았다. 인계받은 샘플은 어미의 경우 지느러미 조직을 채취하였으며 종자의 경우 어체 전체를 99% 에탄올에 고정 후 분석에 사용하였다.



#### 2. Microsatllite marker set 개발

#### 가. DNA 추출

어미 개체 중에서 조직의 상태가 우수한 8개체를 선별하여 NGS 분석을 진행하였으며, 선별된 8개체의 지느러미 조직에서 E.Z.N.A. mollusc DNA kit (Omega, USA)를 이용하여 Proteinase K (20mg/ml)와 lysis buffer에 조직을 60℃에서 4시간 이상 완전히 녹인 후 제조사가 제공한 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였다. Spectrophotometer (Nano-400A)를 통해 DNA의 농도 및 순도를 확인하였다. 또한, 2차 선별된 마커 검증을 위하여 종자 96개체의 DNA를 추가로 추출하여 분석하였다.



#### 나. NGS (Next Generation Sequencing) 분석

DNA QC를 통과한 DNA는 library를 제작하고 2100 BioAnalyzer (Agilent, USA)장비 및 DNA High sensitivity chip을 이용하여 제작된 library의 사이즈, 농도 및 순도를 검사하였다. Quality 높은 데이터를 생산 하기 위한 library 농도 및 볼륨 기준은 최소 20 ul, 농도는 최소 5 nM 이상 되도록 하며 2개의 Library 제작하였다.

HiSeq X의 HiSeq system (llumina, USA)을 이용하여 Rawdata를 생산 하였고, SOAPdenovo2 프로그램을 이용한 De novo assembly 분석을 진행하였다. 400bp의 Insert size를 가지는 Read를 Genome size의 15배 이상인 15Gb 이상 생산하였으며, FLASH tool을 이용해 Read 1과 2를 병합한 뒤 Assembly를 진행하였다. Contig graph를 얻은 후 최종의 untangled assembly를 진행하였고, 생산된 Total base reads를 확인한 후 NGS로 해독한 각 염기의 정확도 Q20을 기준으로 하였으며, 이는 염기 100개를 불러올 때 1개의 염기를 잘못 불러올 확률로 99%의 정확성을 나타낼 확률로 해석되며 이에 해당하는 data의 생산량을 확인하였다.

#### 다. Microsatellite region 확인 및 primer design

생산된 data는 Q20이 90% 이상인 reads만 남기고 필터링을 실시하였으며, De novo assembly 후 microsatellite region만 선별하고 반복되는 sequence를 찾는 MISA tool(http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/)을 이용 하여 PCR product가 100-450bp의 크기를 가지는 microsatellite region를 선발하였다.

선발된영역으로부터 Primer3(http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/ input.htm)를 이용하여 microsatellite marker design을 하였다. 마커는 반복 되는 염기의 개수가 trinucleotide, tetranucleotide로 반복되는 microsatellite region를 선별하였고, Annealing temperature는 58-60°C, GC contents는 40-60%으로 설정하며, 유전서열 내에 반복된 서열이 없고 msDNA repeat은 8번 이상 반복을 반복하며, 대립유전자 수는 15-40개의 범위인 마커로 디자인하였다.

디자인된 마커 중 microsatellite region에서 해당 repeat motif를 기준으로 Tm값(annealing Temperature)을 58-60℃, 증폭 fragment size를 100-450bp 범위로 두고 primer 제작을 진행하였다. 이후 마커의 시퀀스 중복 여부를 확인하여 선별하였다.

#### 라. Multiplex PCR set 개발을 위한 마커 선별 및 검증

NGS분석 데이터를 이용하여 1차 선발된 마커 후보에 대해 PCR screening을 실시하였다. PCR의 경우 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하였으며 Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 증폭을 실시하고, 예상 사이즈 내에서의 증폭 밴드 유무를 확인하였다. Gel electrophoresis는 1.5% agarose gel을 이용하고 120V, 30분간 분리하여 증폭산물의 크기를 확인하였다.

동일한 microsatellite region에 대한 중복 마커 제작을 방지하기 위해 모든 마커에 대한 증폭 부위 fragment sequence를 이용하여 Multiple alignment 분석과 중복 여부를 확인하였다. 또한, 2차 선별된 마커는 NCBI BLAST를 이용하여 기존에 등록된 microsatellite 마커와 현재 개발되는 마커들 사이의 중복 여부를, ClustalW multiple align을 통하여 확인하였다.

PCR screening 및 중복성 검사가 완료된 마커에 대해 Dye labeled primer (Applied Biosystems, USA)합성을 진행하였다. 형광 Dye의 경우, 사이즈 별 구간을 나누어 random 하게 부착하도록 하였으며, 정방향 올리고 (forward primer)는 5 '쪽에 FAM, VIC, NED, PET 등 네 가지의 형광물 질을 부착하였다. PCR 조합은 각 마커 간에 사이즈가 겹치지 않도록 set 당 8-9개의 마커로 구성된 group을 임의로 구성하여 실제 유전형 분석 (genotyping)을 실시하였다. 증폭 여부, 다양성 등을 확인하고, Null allele 이 포함되지 않고 다양성이 높으며 증폭 효율 및 Noise peak이 낮은 마커 후보군들을 우선적으로 선발하였다.

선발된 마커를 이용하여 종자 96개체 genotyping을 진행하였다. PCR을 진행한 후 ABI-3500xl Genetic Analyzer3500xl (Applied Biosystem, USA) 를 이용하여 크기별로 분류되도록 모세관 전기영동 하였으며, 각 마커에 대한 표준 allele ladder를 제작하고 GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems, USA)등 분석프로그램을 이용하여 모든 개체를 scoring하고 크기와 표식자의 종류별로 분류하여 자료를 취합하여 최종 마커 2세트를 선별하였다. Scoring이 완료된 데이터를 Microsoft Excel (Microsoft, USA) 를 이용하여 취합하였으며, Micro-checker program 2.2을 이용해 Null allele을 확인하였다. 또한, 마커 식별력 및 편중 현상을 판단하기 위해 exclusion power 확인하였다.



#### 3. 집단유전학적 분석 및 유전적 다양성 평가

#### 가. 집단분석을 위한 DNA 분리 및 유전자 추출

기존에 추출하였던 개체를 제외한 나머지 어미 41개체에 대한 DNA 추출을 진행하였다. DNAdvance Kit (Beckman, USA)를 활용하여 제조사가 제공 한 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 농도 및 순도를 확인 후 실험에 사용하였다.



#### 나. 유전자형 분석

PCR 증폭은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 사용하였다. 증폭이 완료된 PCR 산물은 DW로 10X dilution 시킨 후, 증폭산물 1µℓ와 GeneScan LIZ500(Applied Biosystems, USA) Size Standard 및 Hi-Di Formaide (Applied Biosystems, USA) 혼합물을 1:9로 희석한 후 95도에 2분간 반응시켜주었다. ABI-3500xl Genetic Analyzer3500xl (Applied Biosystem, USA)를 이용하여 크기별로 분류되도록 모세관 전기영동 하였 으며, GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems, USA) 분석프로그램을 이용하여 모든 개체를 scoring하고 크기와 표식자를 종류별로 분류하여 자료를 취합하였다.



#### 다. 유전적 다양성 통계분석

최종적으로 개발된 마커를 이용하여 부세 어미와 종자 집단의 집단유전학적 분석 및 유전적 다양성 평가를 실시하였으며 유전자좌당 대립유전자 빈도 (Allele frequency), 다형성정보지수(PIC; Polymorphic Information Content), 대립유전자 수, 이형접합체율 관찰치 및 기대치(Ho, He)는 Cervus 3.07 software을 통하여 산출하였으며(Marshall et al., 1998) FSTAT ver2.93 software에서는 최소 샘플 수를 기준으로 대립유전자 수를 보정하는 allelic richness 및 Fis 값을 확인하였다(Goudet, 1995).



## Ⅲ. 결 과

#### 1. Microsatllite marker set 개발

#### 가. DNA & Library QC

선별된 8개체의 지느러미 조직에서 DNA를 추출하고, Spectrophotometer와 Gel loading을 통해 DNA의 QC(Quality control)를 확인하였다(Figure 1). 추출한 DNA의 경우 모두 260/280에서 순도 1.8-2.1 사이에 있어 NGS 분석에 적합하게 추출되었으며, 농도 또한 30-400ng/ul로 적합하게 추출 되었다(Table 1).



Figure 1. Analysis of genomic DNAby agarose gel ecectrophoresis. Broodstock sample genomic DNA 26-33

Sample name	Con.(ng/ul)	Final volume(ul)	Total Amount(ug)
LC26	12.037	50	0.602
LC27	4.536	50	0.227
LC28	3.112	50	0.156
LC29	6.975	50	0.349
LC30	8.312	50	0.416
LC31	12.236	50	0.612
LC32	5.044	50	0.252
LC33	8.981	50	0.449

Table 1. DNA concentration QC (Quality control) results

DNA QC를 통해 순도 및 농도가 High quality range에 부합되는 LC26, LC31 개체 DNA를 Library 제작에 이용하였다. Library 제작 후에는 2100 BioAnalyzer (Agilent, USA) 장비 및 DNA High sensitivity chip을 이용하여 제작된 library의 사이즈, 농도 및 순도를 검사하였다(Figure 2, 3). 농도 134.15nM (LC26), 155.54nM (LC31)에 해당하는 시료를 대상으로 NGS sequencing을 진행하였다.



Figure 2. LC26, LC31 library QC result

Library Name	Library Type	Conc. (ng/ul)	Conc. (nM)	Size (bp)	
LC26	TruSeq Nano DNA (350)	54.67	134.15	627	Pa
LC31	TruSeq Nano DNA (350)	62.08	155.54	614	Pas

Figure 3. LC26, LC31 library QC result

#### 나. NGS (Next Generation Sequencing) 분석

부세의 Total read bases의 경우 15G bases 이상 생성이 완료되었으며 99% 신뢰도를 기준으로 생산된 데이터(Q20)는 전체의 94.5%, 94.54%로 높은 결과 값을 나타내었다(Table 2).

Table 2. LC26, LC31 results of NGS raw data generation

Library Name	Total Read Bases	Total Reads	GC (%)	Q 20 (%)
LC 26	16,376,219,384	108,451,784	42.1	94.5
LC 31	17,130,328,182	113,445,882	42.18	94.54
OVKYO			ERSIT	

#### 다. Microsatellite region 확인 및 primer design

생산된 data는 99% 신뢰도를 기준으로 필터링을 실시한 뒤, Assembly가 완료된 결과를 통해 microsatellite region만 선별하였다(Figure 4, Table 3). 이를 바탕으로 tri-, tetra- 로 반복되는 microsatellite region를 선별하고 해당 repeat motif를 기준으로 Tm 값을 58-60℃, 증폭 fragment size가 100-450 bp 범위로 두고 primer design을 진행하였다.



Figure 4. Microsatellite region ratio through assembly completed results. A: LC 26, B: LC 31



Table 3. Number of microsatellite regions by unit size

sample name	Dinucleotide	Trinucleotide	Tetranucleotide	Pentanucleotide	Hexanucleotide
LC26	226,373	117,639	39,607	10,293	2,501
LC31	238,618	119,932	40,973	10,501	2,593

디자인된 프라이머중 PCR 증폭 효율을 높이기 위해 primer에 sequence와 동일한 반복서열이 없고, fragment sequence 안에 다른 repeat motif가 2 개 이상 있지 않도록 하며 동일 부위의 유전자 서열인지 확인 후 1차적으로 192개의 primer set을 디자인하였다.

1차 선별된 192set의 marker 후보군과 어미 4개체 DNA를 이용하여 1차 PCR screening을 실시하고 전기영동 결과를 확인하였다. Agarose gel 상에서 밴드가 명확히 단일 밴드가 나타나며 다양성이 확보되는 75set의 marker 후보군을 2차 선별하였다.



#### 라. Multiplex PCR set 개발을 위한 마커 선별 및 검증

Microsatellite 마커 개발에서 동일한 Microsatellite region에 중복되는 오류를 방지하기 위하여 선별된 75개의 마커를 대상으로 NCBI BLAST를 이용하여 기존에 등록된 Fragment의 microsatellite region과 현재 개발 되는 마커들 사이에 microsatellite region이 중복되지 않는 것을 검증하였 으며, Clustalw multiple align을 통해 Multiple alignment 분석을 시행하여 개발하고자 하는 마커 간의 sequence가 중복되지 않는 것을 확인하였다. PCR screening 및 중복성 검사가 완료된 75개 마커에 대해 Dye labeled primer 합성을 진행하도록 하였다. 형광 Dye의 경우, 사이즈별 구간을 나누어 random 하게 부착하도록 하였고, Labeled primer는 정방향 올리고 (forward primer)의 5'쪽에 FAM, VIC, NED, PET 등 네 가지의 형광물질을 부착하고 증폭물의 크기가 서로 중복될 경우 형광물질 색으로 구분할 수 있도록 다른 색의 형광물질로 표지시켰다.

또한, PCR 조합은 각 마커 간에 사이즈가 오버랩 되지 않도록 set 당 8-9개의 마커로 구성된 group을 임의로 구성하여 실제 유전형 분석 (genotyping)을 실시하여 증폭 여부, 다양성 등 1차 분석을 실시하도록 하였다(Figure 5).



Figure 5. Secondary selection of 75 marker multiplex set configuration

전체 8개체 분석을 통해 증폭 안정성이 확인된 마커에 대해 대립유전자 수를 확인하였으며, 다양성이 확보된 24개의 마커를 3차 선별하였다. Dye에 따른 range를 고려하여 8 loci가 1 set가 되는 multiplex PCR set 2개와 추가 후보군 1개 set을 구성하였다.

선발된 2개의 multiplex PCR set을 기반으로 부세 종자 96개체에 대해 multiplex PCR을 실시한 후 genotyping을 모두 실시하였다. Dye에 따른 range가 고려된 마커의 유전자형 분석 및 다양성 분석 결과, Table 4, 5와 같이 대립유전자 수와 PCR 증폭 효율이 안정적인 것을 선별하였으며 최종 적으로 총 2개의 multiplex PCR set (8 loci X 2set)을 선별하였다. 최종 선별된 16개 마커의 label과 range는 Figure 6에 나타냈으며 마커 정보는 Table 6, 7으로 나타내었다.



Table 4. Microsatellite marker set-A genotyping peak.(continued)

Marker name	Genotyping	
LaCr(4)_103	LaCr(4)_103 20000 16000 16000	
LaCr(3)_075	12000 8000 4000 sz 107.66 iz 138.83 sz 309.571.36	
LaCr(3)_023	LaCr(3) 023         LaCr(3) 054           20000         140         210         280         350         420           16000         1         1         1         1         1         1         1	
LaCr(3)_054	8000 4000 sz 105.58 sz 240.62.63	

Table 4. Microsatellite marker set-A genotyping peak.



Table 5. Microsatellite marker set-B genotyping peak.(continued)



Table 5. Microsatellite marker set-B genotyping peak.

- 26 -

Set	ABI labeled	Name	Range	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	0 230	24	0 250	26	50 27	0 28	30 2	90 3	00	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
Α	FAM	LaCr(3)_003_F	89~173																																						
Α	FAM	LaCr(3)_067_F	247~325											-	_	-		-	-																						
Α	VIC	LaCr(3)_004_F	92~164										1	1		1						1																			
Α	VIC	LaCr(3)_056_F	196~295								/						11		1		/																				
Α	NED	LaCr(3)_075_F	306~348							/			1		-	-			1	1		1	1	2																	
Α	NED	LaCr(4)_103_F	94~194							1	1. I		/								1			10																	
Α	PET	LaCr(3)_023_F	99~177																			_		1	2.	/															
Α	PET	LaCr(3)_054_F	211~236					/		~	/			1	1					-					1																
В	FAM	LaCr(3)_017_F	102~147					/		6	1		1	1	1					1				1			/														
В	FAM	LaCr(3)_047_F	199~235							1				1																											
В	FAM	LaCr(4)_186_F	357~437				1			1			1	6	1																										$\square$
В	VIC	LaCr(3)_096_F	345~414							1					Ī																										
В	VIC	LaCr(4)_107_F	113~209						A.								1.0		7							1															
В	NED	LaCr(3)_028_F	121~169						_																	4															
В	NED	LaCr(3)_062_F	199~262						-	/															/																
В	PET	LaCr(4)_127_F	153~345							/																															
Figu	B     NED     LaCr(3)_062_F     199-262       B     PET     LaCr(4)_127_F     153-345   gure 6. Final selected mulplex PCR set combinations																																								

Dve	Nome	Sequence(5' to 3')	Repeat	Size ronge	
Dye	Name	Sequence(3 to 3)	Motif	Size Tallge	
	LaCr(3)_003_F	GCAGTCTGCAAACTTGGAAAC	AAG	80-173	
EAM	LaCr(3)_003_R	TCGAGTGTACACACCAGTGG	AAO	09-115	
ΓΑΙνΙ	LaCr(3)_067_F	ATCCACGTGTACAGCTGTCC	СТА	247 225	
	LaCr(3)_067_R	CGCAGCTGAAAGTTCAAGATTGG	GIA	247-323	
	LaCr(3)_004_F	CCATAACAGCTATTGTCTATTGCAATTGAC	OTT	02 164	
МС	LaCr(3)_004_R	CATCCCTCAAATCCTTCAGGTTGG	GII	92-104	
VIC	LaCr(3)_056_F	GTCTCGTCAGGTGCCTTTGA		106 205	
	LaCr(3)_056_R	CCTACGCTCAAAAGCCATGC		190-295	
	LaCr(3)_075_F	AGACTCCGAGTTTGTTTGCCT		206 249	
NED	LaCr(3)_075_R	AAACGTCTGGAGGCGCTTTA	AGA	300-340	
NED	LaCr(4)_103_F	CGTGTGTGCTCGTATGAGGA		04 104	
	LaCr(4)_103_R	CACCTCATCCAGCATGATGC	AAGG	94-194	
	LaCr(3)_023_F	CATGGGGCACTGATTCTCCA		00 177	
DET	LaCr(3)_023_R	CCGTTTGAAGTTCGACTGGC	AGA	99-177	
PE1	LaCr(3)_054_F	ATCTGGACCGAGAGGAGACAATAG	TTC	011 026	
	LaCr(3)_054_R	AGGTGTGTGGCGATGATTCA		211-230	

Table 6. Microsatellite marker set-A information

Dye	Name	Name Sequence(5' to 3')			
	LaCr(3)_017_F	TTAGCAGGTGACCCAAGCTG		102-147	
	LaCr(3)_017_R	CCATGTGCTTTCTGTTCCACTCTG	ЛІЛ		
FAM	LaCr(3)_047_F	CTCCCTGGTATGACGAGCAC	ATC	100 225	
	LaCr(3)_047_R	AATGTTGTCTGGCGGTTTGC	AIG	199-233	
	LaCr(4)_186_F	CCCTCTTTGTCGTATCCGCA		357-437	
	LaCr(4)_186_R	TTCTTTTTGCAGCCCGAAGC	ACAG		
	LaCr(3)_096_F	CCAAAGACAAGCCTGTGTCTCC		245 414	
MC	LaCr(3)_096_R	AGGCAGGGCACGTTTCTTTA	AAG	040 414	
VIC	LaCr(4)_107_F	CCTGGCATCTGACAAAGTTTAATGG	CATC	112 200	
	LaCr(4)_107_R	GGAAAACCTTGCCAGGAGGA	CATC	113-209	
	LaCr(3)_028_F	CTCCACATCAAACTCCAGCA		101 100	
NED	LaCr(3)_028_R	GCTCAGATGTGACTCCACCA	AGA	121-109	
NED	LaCr(3)_062_F	GACGTGTTGCGCAAGACTTT	TTC	100, 262	
	LaCr(3)_062_R	GTGACTGCAAACCTGTGACG	- IIC	199-262	
DET	LaCr(4)_127_F	GAGATGGATGGGTGGTAAATAAGTTAGC		152 245	
FEI	LaCr(4)_127_R	CCAAGATGTGGATGGGTAGCTTC	ATAG	100-040	

Table 7. Microsatellite marker set-B information

Multiplex PCR의 경우 annealing temperature에 따른 영향 및 multiplex PCR 시 첨가하는 시약 농도의 영향을 많이 받게 되는데 touch-down PCR 방식으로 온도를 낮춰주며 annealing temperature에 따른 영향을 최소화하였고 아래의 표와 같이 시약 또한 최적의 조성 및 조건을 보정하며 진행하였다(Table 8).

Initial Step	Pre-denaturation	95℃, 10 min
10	Melt	94°C, 60 sec
1st Step (9 cycles)	Annealing	58°C, 90 sec
	Extend	72°C, 60 sec
NO	Melt	94°C, 60 sec
2nd Step (5 cycles)	Annealing	57°C, 90 sec
	Extend	72°C, 60 sec
	Melt	94°C, 60 sec
3rd Step (25 cycles)	Annealing	56°C, 90 sec
5	Extend	72°C, 60 sec
Final Step	Final Extension	65℃, 5 min
	Final Step	8℃ Hold

Table 8. Multiplex PCR conditions

Scoring이 완료된 genotyping data를 기초로 null allele check를 진행하였 으며 null allele의 유무는 micro-checker 프로그램을 통해 분석되었다. Genotyping 결과를 이용하여 null allele 확인 결과 16개 마커 모두 null allele 가능성이 없는 것으로 나타났다(Figure 7). 부세 96개체의 genotyping data를 이용하였으며 추후 분석 개체 수를 증가 및 가계 집단을 추가 확보하여 추가적인 분석이 필요할 것으로 생각되며 이러한 결과는 마커에 대한 정확성 및 신뢰도를 증가시킬 것으로 사료된다.



Figure 7. Multiplex PCR set marker null allele test results (16 loci)

개발 마커의 배제력(Exclusion power)분석은 유전자좌의 변별력을 측정한 값으로 대립유전자 수(no. of alleles)와 그 대립유전자들의 발현빈도(allele frequency)로 계산된다. 이는 대립유전자가 다양하고 빈도가 그 집단 내에 고르게 분포할 때 그 유전자좌의 식별력이 우수한 것으로 판별되며 (Evett et al., 1998) 배제력 분석 공식은 하기와 같다.

$$P=1+4\sum_{i=1}^{n} Pi^{4} - 4\sum_{i=1}^{n} Pi^{5} -3\sum_{i=1}^{n} Pi^{6} + 8(\sum_{i=1}^{n} Pi^{2})^{2} + 8(\sum_{i=1}^{n} Pi^{2})(\sum_{i=1}^{n} Pi^{3}) + 2(\sum_{i=1}^{n} Pi^{3})^{2}$$
(Pi= allele frequency)

부세 종자집단 96개체, 어미집단 8개체에 대해 개발된 16개의 마커의 Exclusion power을 평가한 결과 7.248 X 10<sup>-16</sup>으로 높은 변별력을 나타내 었으며, 이는 99.9999999 이상으로 신뢰수준이 매우 높은 마커 세트라는 것 을 확인할 수 있다(Table 9).

Maker	Power of each marker
LaCr(3)_003	0.0671
LaCr(3)_004	0.1212
LaCr(3)_017	0.1751
LaCr(3)_023	0.1086
LaCr(3)_028	0.0771
LaCr(3)_047	0.1502
LaCr(3)_054	0.1786
LaCr(3)_056	0.0873
LaCr(3)_062	0.0869
LaCr(3)_067	0.1128
LaCr(3)_075	0.1984
LaCr(3)_096	0.2130
LaCr(4)_103	0.1282
LaCr(4)_107	0.0769
LaCr(4)_127	0.0658
LaCr(4)_186	0.0966
Exclusion Power	7.248E-16

Table 9. Discrimination calculation values for each marker

#### 2. 집단유전학적 분석 및 유전적 다양성 평가

47 70

#### 가. 종자 집단

본 연구에서 개발된 multiplex PCR 2 set를 이용하여 부세 종자 96개체의 유전적 다양성 및 집단유전학적 분석을 실시하였다. 전체 96개체에 대한 대립유전자의 수는 11-19개로 평균 14.88개로 나타났으며 그 중 LaCr(4)\_127 마커에서는 19개로 가장 많이 나타났다. 개체 수의 편차에 따른 대립유전자 수 보정치(allele richness)를 적용하여 분석한 결과는 9.89-17.94개로 평균 14.04개로 대립유전자의 수(K)와 유사하게 나타난 것을 볼 수 있다. 한 개체의 Loci에서 두 개의 대립유전자가 서로 다르게 나타나는 비율인 이형접합체율 기대치(He)는 평균 0.860, 이형접합체율 관찰치(Ho)는 평균 0.767를 나타내었다. 다형성정보지수(PIC)는 평균 0.841, 근교계수(FIS)는 평균 0.110으로 매우 낮은 값을 나타내었다(Table 10).

CH OF IN

Loci	N	Na	Ar	Но	Не	PIC	FIS
LaCr(3)_003	96	17	16.94	0.708	0.890	0.875	0.205
LaCr(3)_004	96	14	13.89	0.688	0.849	0.829	0.191
LaCr(3)_017	96	16	15.89	0.698	0.870	0.853	0.199
LaCr(3)_023	96	10	9.89	0.760	0.823	0.794	0.077
LaCr(3)_028	94	16	15.90	0.649	0.885	0.870	0.268
LaCr(3)_047	96	17	16.84	0.729	0.868	0.850	0.161
LaCr(3)_054	96	10	9.95	0.729	0.776	0.747	0.061
LaCr(3)_056	96	15	14.79	0.792	0.855	0.835	0.075
LaCr(3)_062	95	15	14.96	0.874	0.882	0.866	0.010
LaCr(3)_067	96	12	11.95	0.885	0.883	0.867	-0.002
LaCr(3)_075	96	10	10.00	0.760	0.839	0.814	0.094
LaCr(3)_096	96	15	14.89	0.906	0.888	0.873	-0.020
LaCr(4)_103	94	12	11.94	0.532	0.809	0.780	0.344
LaCr(4)_107	95	15	14.96	0.874	0.882	0.866	0.010
LaCr(4)_127	94	18	17.94	0.787	0.899	0.886	0.125
LaCr(4)_186	91	14	14.00	0.901	0.869	0.850	-0.037
Average	95.19	14.13	14.04	0.767	0.860	0.841	0.110

Table 10. Genetic diversity and population genetic analysis of 96 seeds

\* Number of individuals(N), Number of Observed Alleles(Na), allelic richness(Ar), Observed heterozygosity(Ho), Expected heterozygosity(He),
 Polymorphism information contents(PIC), Inbreeding coefficient (FIS)

#### 나. 어미 집단

본 연구에서 개발된 multiplex PCR 2 set를 이용하여 부세 어미 48체의 유전적 다양성 및 집단유전학적 분석을 실시하였다. 전체 48개체에 대한 대립유전자의 수는 8-18개로 평균 13.19개로 나타났으며 그 중 LaCr(3)\_003 마커에서는 18개로 가장 많이 나타났다. 개체 수의 편차에 따른 대립유전자 수 보정치(allele richness)를 적용하여 분석한 결과는 8-18개로 평균 13.19개로 대립유전자의 수(K)와 동일하게 나타난 것을 볼 수 있다. 한 개체의 Loci에서 두 개의 대립유전자가 서로 다르게 나타나는 비율인 이형접합체율 기대치(He)는 평균 0.854, 이형접합체율 관찰치(Ho)는 평균 0.773를 나타내었다. 다형성정보지수(PIC)는 평균 0.829, 근교계수(FIS)는 평균 0.097로 매우 낮은 값을 나타내었다(Table 11).

Loci	N	k	Ar	Но	He	PIC	FIS
LaCr(3)_003	48	18	18	0.938	0.912	0.895	-0.028
LaCr(3)_004	48	17	17	0.667	0.879	0.859	0.243
LaCr(3)_017	48	14	14	0.854	0.890	0.871	0.041
LaCr(3)_023	48	9	9	0.813	0.804	0.765	-0.011
LaCr(3)_028	48	16	16	0.521	0.890	0.872	0.417
LaCr(3)_047	48	15	15	0.833	0.882	0.860	0.056
LaCr(3)_054	48	8	8	0.604	0.770	0.727	0.217
LaCr(3)_056	48	14	14	0.646	0.790	0.765	0.184
LaCr(3)_062	48	11	11	0.938	0.872	0.848	-0.076
LaCr(3)_067	48	14	14	0.896	0.843	0.817	-0.063
LaCr(3)_075	48	8	8	0.833	0.842	0.812	0.011
LaCr(3)_096	48	13	13	0.833	0.864	0.839	0.036
LaCr(4)_103	48	10	10	0.604	0.789	0.755	0.236
LaCr(4)_107	48	13	13	0.833	0.885	0.863	0.059
LaCr(4)_127	48	17	17	0.833	0.895	0.876	0.070
LaCr(4)_186	48	14	14	0.729	0.860	0.836	0.154
Average	48	13.19	13.19	0.773	0.854	0.829	0.097

Table 11. Genetic diversity and population genetic analysis of 48 broodstocks

\*\* Number of individuals(N), Number of Observed Alleles(Na), allelic richness(Ar), Observed heterozygosity(Ho), Expected heterozygosity(He), Polymorphism information contents(PIC), Inbreeding coefficient (FIS)

#### Ⅳ. 고찰

본 연구를 통해 총 16개의 마커가 개발되었으며 multiplex PCR 2 set가 조성되었다. 개발된 마커로 분석했을 때 전체적으로 각 마커들이 특정 유전형에 편중되지 않으며 마커의 다형성 정보량을 판단할 수 있는 PIC 값이 모두 0.5로 특정 마커에 편중되지 않았으며, exclusion power가 7.248 X 10<sup>-16</sup> 으로 99.999999으로 산출되었다. PIC의 경우 0.5이상일 때 집단 및 품종의 유전적 다양성 파악에 있어 많은 정보량을 보유한 마커로 보고되었으며 (Bosttein et al., 1980) exclusion power이 모든 마커의 변별력의 합이 최소한 10<sup>-10</sup>일 때 신뢰수준이 매우 높은 마커 세트로 식별할 수 있으므로 해당 마커들은 그 기준을 모두 충족하여 부세의 유전적 다양성 및 유전학적 집단분석에 유용한 마커로 판별된다.

개발된 마커를 통해 산출된 2021년 종자와 어미의 결과 값을 보았을 때 어미와 종자 모두 이형접합체율 기대치(He)는 0.860과 0.854로 해산어류 12종의 평균 0.79보다 높은 값을 나타내었다. 이형접합체율 기대치(He)와 이형접합체율 관찰치(Ho)의 비율을 보았을때 관찰치가 더 낮은 이형접합체 결손현상이 나타났다. 하디바인베르크평형 법칙에 준하였을 때 이형접합체 기대치가 관측치보다 낮은 것을 이형접합체 결손이라고 하며, 적어도 1개 이상의 좌위에서 발생했을 때 근친교배가 있었다고 판별할 수 있다(Rousset & Raymond 1995). 자원량의 감소가 일어났거나, 표본의 크기가 작거나 또는 null 대립 유전자의 존재로 인해 근친 교배가 발생할 수 있기 때문에 집단내 근친의 발생이 있었다고 판단할 수 있었다. 본 연구의 부세집단에서도 이형 접합체 결손 현상이 발생한 것은 생산에 활용된 어미가 중국산 양식용 부세이며 부세의 자원량 또한 남획이나 환경변화로 급감한 상태이기 때문에 이러한 결과가 나타난 것으로 유추된다. 그러나 이외의 다형성정보지수 (PIC)는 평균 0.842, 0.829로 다양성 지수가 높았으며 근교계수(FIS)는 0에 가까운 평균 0.110, 0.097로 낮은 값을 나타내었다. 이는 유전적으로 안정된 상태에 있어 특징이 급변할 가능성은 대단히 낮다고 볼 수 있다. 근친교배의 발생은 있었으나 유전적 다양성이 유지가 잘 되고 있는 것으로 확인된다.

기존에 연구된 민어과 어류와 PIC값을 비교해보았을 때, 자연산 참조기의 경우 30개체를 35개의 마커로 분석하였을 때 0.367-0.940으로 평균 0.832 였으며(ZhenmingLu et al., 2013), 민어의 경우 24개의 마커로 30개체를 분석하였을 때 0.348-0.823으로 평균 0.576이었다(Miao and Liang et al., 2015). 또한, 자연산 보구치의 경우 230개체를 12개의 마커로 분석하였을 때 0.297-0.698로 평균 0.532(Sun et al., 2011)를 나타내는 것을 보았을 때 부세의 PIC 값은 동일한 민어과 어류보다 다양성 지수가 높은 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 이전의 중국의 자연산 부세의 유전적 다양성 PIC값에 대한 연구 결과로는 평균 0.672(0.383-0.866, n=38), 평균 0.731(0.283-0.866, n=68), 평균 0.580(0.064-0.885, n=30)이 보고되었다(ZhenmingLu et al., 2013; Ye and Hua et al., 2012; Guo and Wei et al., 2005). 이전 연구에 결과에 비해 해당 연구의 종자와 어미의 PIC값이 상대적으로 높은 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 국내 부세의 다양성 지수가 상대적으로 높다는 것을 나타낼 수 있으나 동일 마커를 사용하지 않았기 때문에 마커의 감도에 따라 결과 값의 차이가 발생할 수 있는 점은 감안 되어야 한다. 정확한 비교를 하기 위해선 본 연구를 통해 개발된 마커를 이용하여 국내의 자연 집단과의 비교 분석 뿐만 아니라, 양식 친어 및 종자와 자연 집단의 비교 분석을 통해 유전적 다양성이 보존되고 있는지에 대한 추가연구도 시행되어야 할 것으로 사료된다.

또한, 현재 자연에서 부세는 Critically Endangered (INCU, 2016) 등급의 멸종위기 위험종으로 선정될 만큼 자원량이 많이 감소해있는 상황이며, 이로 인해 자체 증식 능력이 많이 저하되어 자가적인 회복이 어려울 것으로 예상된다(Zhang et al., 2017). 그러므로, 자원량 회복 및 어업생산량을 증대 하기 위한 방류가 필요한 실정이다. 그러나, 유전적 다양성을 고려하지 않고 대량을 방류를 시행하게 되면 자연 집단들의 유전적 다양성에 영향을 미칠 수 있기 때문에(Allendorf and Ryman, 1875; Yoshida et al., 2000; Ward, 2006), 방류시행에 있어 지속적인 모니터링을 통해 유전적 다양성을 확보할 수 있어야 한다.



### V. 참고문헌

- Allendorf, F.W. and N. Ryman. 1987. Genetic management of hatchery stocks. In: Ryman, N. Utter, F.W. (Eds.), Population genetics and fishery management. University of Washington Press, 141–159.
- Allendort, F. W., Luikart, G. and Aitken, S. N. 2013. Conservation and the Genetics of Populations. Wiley–Blackwell, Oxford, U.K.
- Bosttein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 32(3):314 331.
- Chen, W., & Cheng, Q. 2013. Development of thirty-five novel polymorphic microsatellite markers in Pseudosciaena polyactis (Perciformes: Sciaenidae) and cross-species amplification in closely related species, Pseudosciaena crocea. Biochemical Systematics and Ecology, 47, 111-115.
- 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.

FIPS and NFQS.2020. Fishery production of Larimichthys crocea and

consumption trends. Retrieved from https://www.fips.go.kr and https://impfood.mfds.go.kr. Accessed 31 Mar 2021.

- Frankham, R., Ballow, J. D. and Briscoe, D. A. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. Journal of Heredity, 86, 485–486.
- Guo, Wei, et al. 2005. Isolation and characterization of six microsatellite markers in the large yellow croaker (Pseudosciaena crocea Richardson). Molecular Ecology Notes 5.2 (2005): 369–371.
- Guyomar, R.S., Mauger, K., Tabet-Canale, S., Martieau, C., Genet, F.K., Quillet, E., 2006. A type I and II microsatellite linkage map of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) with presumptive coverage of all chromosome arms. BMC Genomics 7, 302 - 314.
- Hauswaldt, J.S., Glenn, T.C., 2003. Microsatellite DNA loci from the Diamondback terrapin (Malaclemys terrapin). Mol. Ecol. Notes 3, 174 - 176.
- Kim, K. S., Noh, C. H., Sade, A. and Bang, I. C. 2015. Effectiveness of microsatellite markers for parentage analysis of giant grouper (Epinephelus lanceolatus). Kor. J. Ich. 27, 10–15.

- Lee CL and Park MH. 1992. Taxonomic Revision of the Family Sciaenidae (Pisces, Perciformes) from Korea. Korean J Ichthyol 4, 29–53.
- Liu, X., Zhao, G., Wang, Z., Cai, M., Ye, H., & Wang, Q. 2012. Parentage assignment and parental contribution analysis in large yellow croaker Larimichthys crocea using microsatellite markers. Current Zoology, 58(2), 244–249.
- Liu Y, Wu XW, Wu XF, Xue LY, Xiao SJ, Wang ZY. 2015. Analysis of genetic diversity in cultured populations of DaiQu and Min-Yue Groups of Larimichthys crocea. J. Southwest University (Nat. Sci.) 37: 6 12 (in Chinese).
- Lou JF, Lei SY, Zhu JQ, Wu XF. 2015. AFLP Analysis of genetic diversity in two cultured communities of Pseudosciaena crocea. Adv. Mar. Sci. 33: 361 - 366 (in Chinese).
- Marshall, TC, Slate, J, Kruuk, LEB & Pemberton, JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology 7: 639–655.
- Miao, L., Li, M. Y., Chen, Y. Y., Guo, X. F., Xu, Y. M., Li, X. M., & Chen, J. 2015. Development of Microsatellite Markers for Miiuy Croaker, Miichthys miiuy (Sciaenidae), and Their Application in

Verifying Gynogenesis of Large Yellow Croaker, Pseudosciaena crocea, Induced with M. miiuy Sperm. Journal of the World Aquaculture Society, 46(1), 83–91.

- Noh ES, Lee MN, Kim EM, Park JY, Noh JK, An CM and Kang JH. 2017. Development of a multiplex PCR assay for rapid identification of Larimichthys polyactis, L. crocea, Atrobuccanibe, and Pseudotolithus elongates. J Life Science 27, 746–753.
- Pettay, D.T., Lajeunesse, T.C., 2009. Microsatellite loci for assessing genetic diversity, dispersal and clonality of coral symbionts in 'stress-tolerant' clade D Symbiodinium. Mol. Ecol. Res. 9, 1022 -1025.
- Park IS and Oh JS. 2020. Comparison of morphometric traits between small yellow croaker, Larimichthys polyactis and yellow croaker, L. crocea. Korean Journal of Environmental Biology. Korean Society of Environmental Biology 38, 507–517.
- 박충열, 송지훈, 황남용, 양사랑, 양석우, & 박준택. 2022. 부세 (Larimichthys crocea) 의 수정란 및 종자생산 연구. 수산해양기술연구 (구 한국어업기술학회지), 58(3), 205-213.
- Rousset, F., & Raymond, M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. Genetics, 140(4), 1413–1419.

- Rudnick, J. A. and Lacy, R. C. 2008. The impact of assumptions about founder relationships on the effectiveness of captive breeding strategies. Conserv. Gen. 9, 1439–1450.
- Sun, D. Q., Xu, T. J., & Wang, R. X. 2011. Characterization of microsatellites in white croaker (Pennahia argentata) through cross species amplification of Miichthys miiuy. Journal of genetics, 1–4.
- Ward, R.D. 2006. The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. Fisheries Research, 80, 9–18.
- Wang Z, Wang Y, Lin L, Qiu S, Okamoto N. 2002. Genetic polymorphisms in wild and cultured large yellow croaker Pseudosciaena crocea using AFLP fingerprinting. J. Fish. Sci. China 9: 198 - 202 (in Chinese).
- Chen, Wenming, and Qiqun Cheng. 2013. Development of thirty-five novel polymorphic microsatellite markers in Pseudosciaena polyactis (Perciformes: Sciaenidae) and cross-species amplification in closely related species, Pseudosciaena crocea. Biochemical Systematics and Ecology 47 (2013): 111–115.

Yoshida, K., M. Takagi, M. Tanaka and N. Taniguchil. 2000. Genetic

variability and divergence of wild and artificially raised Japanese flounder Paralichthys olivaceus inferred from microsatellite DNA analysis. Fish Gen. Breeed. Sci., 29, 93–102.

- YE, Hua, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in large yellow croaker, Larimichthys crocea. Acta Oceanologica Sinica, 2012, 31.4: 149–153.
- Ye, Hua, et al. 2012. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in large yellow croaker, Larimichthys crocea. Acta Oceanologica Sinica 31.4 (2012): 149–153.
- Zhang QY, Hong WS, Chen SX. 2017. Stock changes and resource protection of the large yellow croaker (Larimichthys crocea) and ribbon fish (Trichiurus japonicus) in coastal waters of China.J. Appl. Oceanogr. 36: 438 - 445 (in Chinese).05): 369–371.