

한국산 백합 (*Meretrix lusoria*) 의 전사체 분석

강정하¹, 정지은², 김봉석¹, 안철민¹, 강현숙¹, 강세원², 황희주², 한연수³, 채성화⁴, 고현숙⁵,
이준상⁶, 이용석²

¹국립수산과학원 생명공학부, 인제대학교 ²의과대학 기생충학교실 및 UHRC, ³전남대학교
농생명과학대학 농학과, ⁴㈜지앤시바이오, ⁵신라대학교 생물학과, ⁶강원대학교 환경연구소

Expressed sequence tag analysis of *Meretrix lusoria* (Veneridae) in Korea

Jung-Ha Kang¹, Ji Eun Jeong², Bong Seok Kim¹, Chel-Min An¹, Hyun-Sook Kang¹, Se-Won
Kang², Hee Ju Hwang², Yeon Soo Han³, Sung-Hwa Chae⁴, Hyun-Sook Ko⁵, Jun-Sang Lee⁶ and
Yong Seok Lee²

¹Biotechnology Research Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

²Department of Parasitology, College of Medicine and UHRC, Inje University, Busan 614-735, Korea

³Department of Agricultural Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

⁴Research Institute, GnC Bio Co., LTD., Daejeon 305-150, Korea

⁵Department of Biological Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

⁶Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT

The importance of biological resources has been gradually increasing, and mollusks have been utilized as main fishery resources in terrestrial ecosystems. But little is known about genomic and transcriptional analysis in mollusks. This is the first report on the transcriptomic profile of *Meretrix lusoria*. In this study, we constructed cDNA library and determined 542 of distinct EST sequences composed of 284 singletons and 95 contigs. At first, we identified 180 of EST sequences that have significant hits on protein sequences of the exclusive Mollusks database through BLASTX program and 343 of EST sequences that have significant hits on NCBI NR database. We also found that 211 of putative sequences through local BLAST (blastx, E < e-10) search against KOG database were classified into 16 functional categories. Some kinds of immune response related genes encoding allograft inflammatory factor 1 (AIF-1), B-cell translocation gene 1 (BTG1), C-type lectin A, thioester-containing protein and 26S proteasome regulatory complex were identified. To determine phylogenetic relationship, we identified partial sequences of four genes (COX1, COX2, 12S rRNA and NADH dehydrogenase) that significantly matched with the mitochondrial genomes of 3 species-Ml (*Meretrix lusoria*), Mp (*Meretrix petechialis*) and Mm (*Meretrix meretrix*). As a result, we found that there was a little bit of a difference between sequences of Korean isolates and other known isolates. This study will be useful to develop breeding technology and might also be helpful to establish a classification system.

Keywords: *Meretrix lusoria*, EST sequence, Molecular phylogenetic Study

Introduction

차세대 염기서열분석 (NGS; Next Generation Sequencing) 기술이 등장하면서 유전정보의 대량생산이 매우 쉬워지고 있으며 그 결과 Genomes Online 데이터베이스 (<http://www.genomesonline.org>) 에 의하면 현재 진행되거나 완성된 유전체 프로젝트의 수는 15,513 개이다. 프로젝트의 진행상황 면에서 살펴보면 이 중 현재 진행 중인 프로젝트는 8,025개이며, Draft 서열수준의 프로젝트는 2,855개 이었으며 완성되었지만 아직 논문이 나오지 않은 프로젝트는 41개

Received: November 15, 2012 ; Accepted: December 19, 2012

Co-first author : Jung-Ha Kang & Ji Eun Jeong

Corresponding author : Yong Seok Lee

Tel: +82 (51) 890-6462 e-mail: yslee@inje.ac.kr
1225-3480/24462

이었다. 생물군별로 살펴보면 고세균류가 252종, 박테리아가 12,688종 그리고 진핵생물은 2,593종으로 매우 많은 생물군에 대한 서열분석이 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 하지만 연체동물문의 경우에는 다른 생물군에 비해 서열분석 관련 연구의 진행이 느린 것으로 판단된다. Bang 등이 보고한 2010년 12월 NCBI에 등록되어진 연체동물 관련 서열 (Bang *et al.*, 2010) 현황과 2012년 12월 현재 현황을 비교해 보면 nucleotide 등록 숫자는 246,987개 이었으나 현재 기준으로 681,398개이며 nucleotide EST의 경우에는 1,023,358개에서 1,121,843개로, 그리고 Nucleotide GSS의 경우는 5,665에서 23,112개로 작은 변화가 있음을 알 수가 있다. 백합속 (Genus *Meretrix*) 의 경우에도 NCBI에 총 11종이 등록되어 있는데 *Meretrix meretrix* (Asiatic hard clam) 의 nucleotide 35,145개 및 EST 2,111개를 제외하고는 거의 서열분석이 이루어지지 않았음을 볼 수 있었다. 유전체 서열의 경우도 *M. meretrix*, *M. lusoria*, *M. petechialis* 3종의 mitochondrial genome 만 분석이 되어 있었다. 백합과 (Veneridae) 에 속하는 백합 (*Meretrix lusoria*) 은 우리나라의 경우, 함경남도를 제외한 전 연안 해역에 걸쳐 분포하며 서남연안을 포함하여 일본, 타이완, 중국, 필리핀, 동남아시아 등 세계적으로 분포하며, 유용 이매패류로 알려져 있다 (Loosanoff and Davis, 1963; Anderson, 1982; Lee and Kim, 1991; Jung *et al.*, 2004). 우리나라에는 알려진 472종의 이매패류 중 백합목에 속하는 종은 29과 216종이 있고, 이 중 백합과 (Family Veneridae) 에는 45종이 알려져 있다 (Min *et al.*, 2004). 백합은 Shiba (Shiba, 1934) 에 의하여 처음으로 국내 자생종으로 기록 되었고, Lee 에 의하여 국명

이 신칭 되었다 (Lee, 1956). 백합은 말백합 *Meretrix petechialis*과 형태적으로 유사하여 가끔 혼동되기도 하지만, 패각을 이루는 각과 각 폭 등의 뚜렷한 형태로 형질의 차이를 보이고 있다. 백합과의 분자계통분류에 관한 연구로는 백합과 5종의 유전적 유연관계 (Jung *et al.*, 2004) 에 관한 보고가 있으며, Mitochondrial 16S rRNA 유전자나 cytochrome oxidase 염기서열을 이용한 연구 등이 발표된 바 있다(Chen *et al.*, 2009). 본 연구는 *Meretrix lusoria* 의 cDNA 라이브러리를 제작한 후 EST 염기서열을 획득하여, 이를 바탕으로 전사체학적 분석과 계통분류학적인 분석을 통해 각종 유용 유전자를 발굴하고 체계적인 분류 체계를 확립하는데 활용되어질 기초자료를 확보하고자 수행되었다.

실험재료 및 방법

1. Sample collection

연체동물문 (Phylum Mollusca), 이매패강 (Class Bivalvia), 이치아강 (Subclass Heterodonta), 백합목 (Order Veneroida), 백합과 (Family Veneridae), 백합속 (Genus *Meretrix*)에 속하는 백합 (*Meretrix lusoria*) 은 경남 진해시 용원동에서 채취한 개체로 2009년 8월 28일 부산 광역시 자갈치시장에서 구입하여 사용하였다.

2. cDNA Library Construction

전체조직으로부터 Trizol reagent를 사용하여 total RNA를 정제한 후, Stratagene Absolutely mRNA Purification Kit (Stratagene, CA, USA) 를 이용하여 mRNA를 정제 하

Table 1. The current status of genetic resources in genus *Meretrix* (registered in NCBI)

Species	Nucleotide	Nucleotide EST	Protein	Genome
<i>Meretrix meretrix</i> (Asiatic hard clam)	35,145	2,111	77	1
<i>Meretrix lusoria</i>	40		49	1
<i>Meretrix petechialis</i>	24		38	1
<i>Meretrix petechialis</i> A JC-2011	9		9	
<i>Meretrix petechialis</i> B JC-2011	15		15	
<i>Meretrix cf. petechialis</i> Mpe	1			
<i>Meretrix lamarckii</i> (Korean hard clam)	26		45	
<i>Meretrix lyrata</i>	26		18	
<i>Meretrix casta</i>	2		2	
<i>Meretrix sp.</i> Tudumari	2		1	
<i>Meretrix sp.</i> JC-2011	4		4	
<i>Meretrix sp.</i> YD-2011	1		1	
Total	35,295	2,111	259	3

었다. 정제된 mRNA를 주형으로 하여 oligo dT 와 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성하였고, 정제 과정이나 합성 과정에서 생길 수 있는 partial cDNA를 제거하기 위해서 Sepharose CL-2B gel filtration medium을 이용하여 size fractionation 단계를 거쳐 길이가 500bp 이상인 cDNA만을 획득하였다. 이 cDNA들을 pBK-CMV vector에 ligation하였고, Gigapack Gold 1 (Stratagene, LaJolla, CA) packaging system을 사용하여 packaging하였다. ZAP Express cDNA Synthesis Kit 을 이용하여 library를 구축하였고, 전기영동으로 확인한 결과 평균 insert size는 약 1.3 kb 였다.

3. DNA Sequencing

Cre-loxP recombination system을 이용한 *E. coli* 균주에서 lambda linear 형인 pTriplEx2 벡터에서 circular 형인 pTriplEx2 벡터로 변환시킨 후 carbenicillin 이 포함된 LB agar plate에 plating 하여 37℃ 에서 overnight 배양한 후 NucleoGen Plasmid Purification Kit를 사용하여 Plasmid 정제하여 ABI-3730-XL 자동염기서열 분석기(ABI prism)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

4. Sequence Analysis

자동염기서열 분석기를 통해 생산되어진 chromatogram 파일은 phred (Ewing and Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998) 소프트웨어를 이용하여 Phred score; 20 (trim-alt 0.05) 이상의 조건으로 base calling 하였다. Cross_match 프로그램을 이용하여 벡터마스킹을 한 후 100 bp 이하의 서열들을 제거하였고, Emboss package (Rice *et al.*, 2000) 의 trimest 소프트웨어를 사용하여 Poly-A 서열 또한 제거하였다 (<http://www.phrap.org>). 이러한 과정을 거친 mFASTA 파일은 TGICL (Pertea *et al.*, 2003) 패키지를 사용하여 클러스터링 및 어셈블리 작업을 한 후 local BLAST (Altschul *et al.*, 1990) 를 통해 분석되었다 (Fig. 1). 서열들은 다음과 같은 3종의 데이터베이스; (1) Mollusks amino acid database (Lee *et al.*, 2004); (2) NCBI nr database; (3) NCBI KOG database에 대하여 blast분석을 실시하였으며 E-value 값 1e-10 의 조건으로 분석하였다. 분석되어진 서열들은 DDBJ/EMBL/NCBI (accession numbers; F999088- F999629) 의 Genbank 에 등록되었다.

5. BLAST search를 통한 관련서열의 확보 후 다중서열정렬 분석 및 phylogenogram 작성

기존에 서열 분석이 완료된 *Meretrix lusoria* (GQ903339), *Meretrix petechialis* (EU145977),

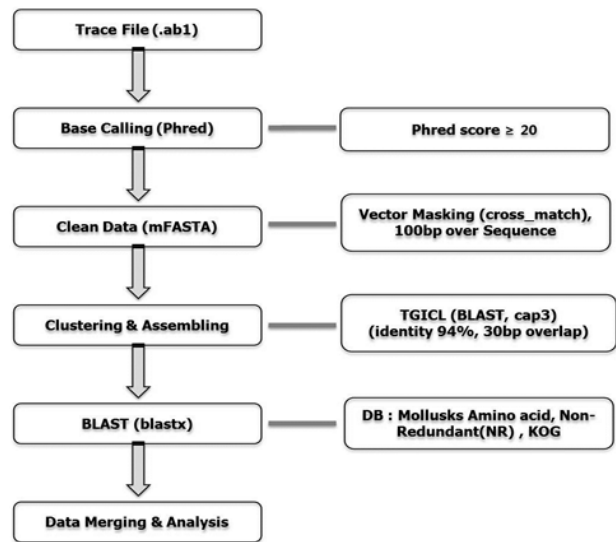


Fig. 1. Schematic diagram of EST sequences analysis process

Meretrix meretrix (GQ463598) 3종의 Mitochondrial Genome 서열과 본 연구에 의해 서열이 밝혀진 *Meretrix lusoria* EST 서열을 대상으로 하여 BLAST 검색을 통해 추출되어진 서열들을 Tamura-Nei model을 기반으로 한 Maximum Likelihood 방법 (Tamura and Nei, 1993) 을 통해 MEGA 5 프로그램을 이용하여 phylogenogram 을 작성하였다.

결과 및 고찰

1. BLAST analysis of EST Sequences

백합 (*Meretrix lusoria*) 의 cDNA library로부터 576개의 임의서열을 single-pass sequencing 방식으로 해독한 후 생성된 ab1 파일을 phred score 20 (trim_alt 0.05) 이상 조건으로 base calling 하였다. 만들어진 mFASTA 형식의 파일을 대상으로 cross_match 프로그램을 이용하여 vector masking 한 후 100 bp 이상의 서열만 취한 결과 542개의 서열을 확보하였다. 확보한 서열들의 평균 길이는 731 bp 이었으며 TGICL package (Pertea *et al.*, 2003)를 이용하여 clustering and assembling한 결과 95개의 cluster, 95개의 contig 및 284개의 singleton 이 형성되었다. 확보된 서열의 평균길이 및 clustering and assembling 결과로 살펴볼 때 양질의 cDNA library 구축에 성공하였으며 서열의 다양성도 확보되었음을 확인할 수 있었다 (Table 2).

확보되어진 multi-FASTA 형태의 서열들은 E-value 값 1e-10 의 조건으로 NCBI local BLASTX 를 이용하여 nr 데이터베이스에 매치시킨 결과, 343개의 유효한 결과를 얻을 수 있었으며 연체동물 서열데이터베이스 (Lee *et al.*, 2004)

Table 2. General characteristics of *M. lusoria* EST sequences

Description	Number
Total number of cDNA analyzed	542
Average EST length (bp)	731
EST clusters	
Cluster	95
The number of unique sequences	
Contigs	95
Singletons	284
Significant blast hit (KOG DB)	211 / 542
Significant blast hit (Mollusks amino acid DB)	180 / 542
Significant blast hit (NCBI NR DB)	343 / 542

의 Mollusks 아미노산 데이터베이스에 매치시킨 결과 180개의 서열을 얻을 수 있었다. 최종적으로는 199개의 unknown 서열이 발굴되었다 (Table 2).

2. KOG analysis

각 유전자의 기능분석을 하기 위하여 KOG (Clusters of orthologous groups for eukaryotic complete genomes) 분석을 실시하여 분석한 결과 542 서열 중 211개의 서열에 대해 유의한 결과를 얻을 수 있었다 (Tatusov *et al.*, 2003). 211개의 서열은 총 16개의 카테고리로 나누어졌는데 Translation, ribosomal structure and biogenesis 관련 유전자 9.48%를 비롯하여 RNA processing and modification 1.42%, Transcription 0.95%, cell cycle control, cell division, chromosome partitioning 0.95%, Signal transduction mechanisms 5.69%, Cell motility 0.47%, Cytoskeleton 9.00%, Extracellular structures 4.74%, Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport 0.47%, Posttranslational modification, protein turnover, chaperones 8.06%, Energy production and conversion 16.11%, Carbohydrate transport and metabolism 3.32%, Amino acid transport and metabolism 7.58%, Nucleotide transport and metabolism 1.42%, Lipid transport and metabolism 1.42%, Inorganic ion transport and metabolism 1.90%, General function prediction only 15.17% 및 기능을 알 수 없는 Function unknown 유전자는 2.84% 였다 (Fig. 2).

3. Immune-related genes

BLAST 를 이용하여 분석한 결과 다음과 같은 Allograft inflammatory factor 1 (AIF-1) (Yang *et al.*, 2005),

B-cell translocation gene 1, C-type lectin A 등과 같은 면역관련 유전자가 발굴되었는데 이 유전자들은 병원체 노출로 인한 pro-inflammatory cytokine, interferon 등의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. Lee 등은 primary culture 되어진 mouse microglial cells에서 B cell translocation gene 1 (*BTG1*) 이 LPS 와 IFN- γ 자극에 의해 발현이 증가한다고 보고하였으며 (Lee *et al.*, 2003), C-type lectin 도메인은 lectin의 한 종류로 병원체에 대한 cell-cell adhesion, 면역반응, apoptosis 등을 포함한 매우 많은 기능을 가지고 있다고 알려져 있다 (Drickamer, 1999; Cambi and Figdor, 2009). Thioester-containing protein의 경우, 곤충에서 innate immunity 와 관련된 매우 중요한 단백질임이 *Anopheles gambiae* 및 *Drosophila melanogaster* 등에서의 연구를 통해 밝혀졌다 (Blandin and Levashina, 2004). 또한 Apoptosis, cellular stress 에 대한 반응, 적응 면역시스템 등의 역할을 하는 것으로 알려진 26S proteasome regulatory complex 도 발현됨을 알 수 있었다 (Low *et al.*, 1997).

4. Phylogenetic Analysis

DNA에 근거한 이매패류의 계통분류학적 분류에 관한 연구들이 많이 시도 되어져 왔다. 특히 Canapa 등은 백합과 패류 9종을 대상으로 mitochondrial 16S rRNA 유전자 염기서열을 얻어 고생물학적 자료와 비교한 결과를 보고한 바 있다 (Canapa *et al.*, 1996). 백합속의 계통관계를 밝히려는 연구 시도도 있었는데 2009년 Chen 등은 CO-I 유전자를 대상으로 시도 하였으며, 2006년 Mikkelsen 등은 형태와 분자계통학적으로 시험을 하였고, 2006년 Kappner와 Bieler는 Venerinae 55종을 대상으로 하여 CO-I barcoding 영역을 대상으로 하여 계통분류를 시도하였다. (Kappner *et al.*, 2006; Mikkelsen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009). 또한,

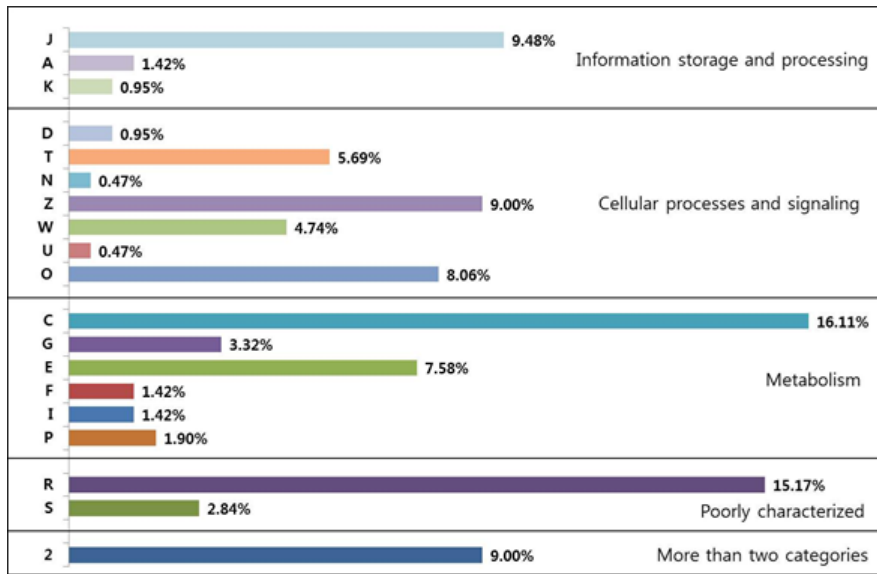


Fig. 2. Code descriptions of KOG: **J** (Translation, ribosomal structure and biogenesis), **A** (RNA processing and modification), **K** (Transcription), **D** (Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning), **T** (Signal transduction mechanisms), **N** (Cell motility), **Z** (Cytoskeleton), **W** (Extracellular structures), **U** (Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport), **O** (Posttranslational modification, protein turnover, chaperones), **C** (Energy production and conversion), **G** (Carbohydrate transport and metabolism), **E** (Amino acid transport and metabolism), **F** (Nucleotide transport and metabolism), **I** (Lipid transport and metabolism), **P** (Inorganic ion transport and metabolism), **R** (General function prediction only), **S** (Function unknown), **2** (More than two categories)

2004년 Kim 등은 백합과 패류의 mtCOI 일부 서열을 이용하여 계통분류를 실시한 바 있다 (Kim *et al.*, 2004).

기존에 서열분석이 완료된 *Meretrix lusoria* (Wang *et al.*, 2010), *Meretrix petechialis* (Ren *et al.*, 2009), *Meretrix meretrix* (unpublished) 3종의 Mitochondrial Genome 서열들을 대상으로 본 연구에 의해 밝혀진 *Meretrix lusoria* EST 서열들을 BLAST 검색을 통해 추출되어진 서열들을 매치한 결과, 4개의 유전자에 대해 총 14개의 clone (COX1 5 clone, COX2 5 clone, 12S rRNA 3 clone 및 NADH dehydrogenase 1 clone) 이 매치되었다. 각 유전자

에 매치된 clone 들을 cap3 소프트웨어를 통해 assembly 한 결과 COX1 에 해당하는 clone 들의 평균길이는 695 bp 로 *M. lusoria*, *M. petechialis*, *M. meretrix* 3종의 평균길이인 780 bp 에 대해 89.1% coverage 이었으며 COX2 는 평균길이 1,169 bp 에 비해 1,073 bp 로 91.8% 이었다. 12S ribosomal RNA 의 경우는 68%, NADH dehydrogenase 는 54.5% 였다 (Table 3).

4 종류의 유전자를 대상으로 하여 *M. lusoria* (MI), *M. petechialis* (Mp), *M. meretrix* (Mm) 3종과 본 실험에 사용되어진 한국산 *M. lusoria* (MIK) 4종을 대상으로

Table 3. The results of matched clones about four genes (COX1, COX2, 12S rRNA and NADH dehydrogenase) of MIK (*Meretrix lusoria* Korean strain) against the mitochondrial genomes of 3 species-MI (*Meretrix lusoria*), Mp (*Meretrix petechialis*) and Mm (*Meretrix meretrix*)

Gene Name	Match	MIK Length (assembled)	Cov.	MI length	Mm length	Mp length	MI,Mm,Mp Avg. length
COX1	5 clone	695	89.1%	780	780	780	780
COX2	5 clone	1,073	91.8%	1,161	1,173	1,173	1,169
	3 clone	770	67.9%	1,026	1,187	1,187	1,133
NADH dehydrogenase	1 clone	576	54.5%	1,056	1,056	1,056	1,056

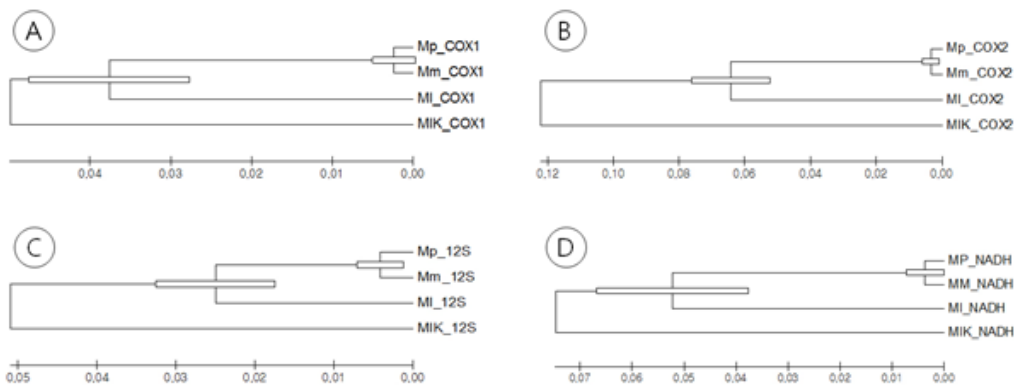


Fig.3. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method.

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model (Tamura *et al.*, 1993). The tree with the highest log likelihood (Ⓐ -1308.3197 ; Ⓑ -2267.6190 ; Ⓒ -1442.6346 ; Ⓓ -1302.4489) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically as follows. When the number of common sites was < 100 or less than one fourth of the total number of sites, the maximum parsimony method was used; otherwise BIONJ method with MCL distance matrix was used. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 4 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 781 (Ⓐ), 695 (Ⓑ), 764 (Ⓒ), 533 (Ⓓ) positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5(Tamura *et al.*, 2011).

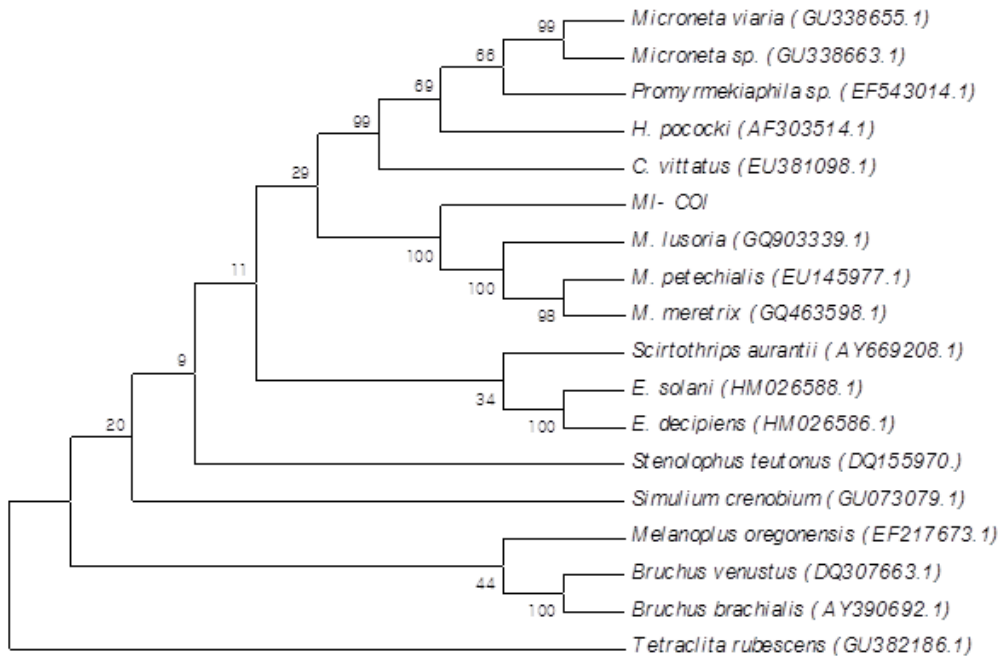


Fig. 4. Evolutionary relationships of 18 taxa.

This shows the evolutionary history inferred from mitochondrial DNA sequences of COI gene identified in *M. lusoria*. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA5 using the Maximum Parsimony method. The length of trees is 1240 and the consistency index is (0.591062), the retention index is (0.679233), and the composite index is 0.413565 (0.401469) for all sites and parsimony-informative sites (in parentheses). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The MP tree was obtained using the Close-Neighbor-Interchange algorithm.

MEGA5를 이용하여 Maximum Likelihood 방법으로 분자 계통학적 분석을 실시한 결과 MIK의 서열은 모두 따로 분지되어 나오는 양상을 띠었다. (Fig. 3)

*M. lusoria*의 cytochrome c oxidase subunit I (COI) 유전자를 가진 클론의 염기서열을 NCBI로부터 BLAST search한 후, COI로 동정된 서열을 NCBI에서 BLAST search로 Genbank에 등록된 18종에 대한 mCOI 염기서열을 얻어서 Multi-Fasta format으로 변환한 후 ClustalX 프로그램을 이용하여 다중서열 분석을 실시하였으며 MEGA5를 이용하여 Maximum Parsimony (MP) method를 통해 phylogenogram을 도식화함으로써 *M. lusoria*의 cytochrome c oxidase subunit I (COI) 서열의 evolutionary history를 18종의 연체동물 데이터와 비교 분석하였다 (Fig. 4). Maximum parsimony 분석결과 (Fig. 4)를 보면, *M. lusoria*와 본 연구에서 분석한 클론 MI-COI과 동일한 분지가 나올 확률이 100%에 달하고 있으나, 백합 *M. petechialis*와 *M. meretrix*는 98%의 분지도를 나타내고 있다. 또한 특이하게도 *M. lusoria*와 두 종 *M. petechialis* 및 *M. meretrix*과는 100%의 분지도를 나타내고 있다. 이러한 결과는 같은 종일 가능성이 높음을 의미하며 한국산 백합과 중국산 간에 같은 종이 존재한다고 생각해 볼 수도 있겠지만, 다른 종인데 동정이 잘못된 실험재료를 사용하였을 가능성도 배제할 수 없으므로 이에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 이와 같이 본 실험에서 *M. lusoria*의 COI의 유전자를 이용한 계통분류학적 연구를 통해 근연 생물군들과의 상관관계를 확인할 수 있었으며, 향후 더 많은 새로운 종의 유전자 발굴로 더 많은 다른 종과의 비교 연구 등이 가능하리라 여겨진다.

Acknowledgements

본 연구는 국립수산물학원의 수산시험연구과제 (RP-2012-BT-051) 연구비지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**: 403-410.
- Anderson, G.J. (1982) Comments of the settlement of Manila clam spats (*Trapes philippinarum*) at Filucy Bay, Washington. USA. *Journal of Shellfish Research*, **2**: 115.
- Bang, I.S., Han, Y.S., Lee, J.-S., and Lee, Y.S. (2010) Current Status of Genome Research in Phylum Mollusks. *The Korean Journal of Malacology*, **26**: 317-326.
- Blandin, S., and Levashina, E.A. (2004) Thioester-containing proteins and insect immunity. *Molecular Immunology*, **40**: 903-908.
- Cambi, A., and Figdor, C. (2009) Necrosis: C-type lectins sense cell death. *Current Biology*, **19**: R375-378.
- Canapa, A., Marota, I., Rollo, F., and Olmo, E. (1996) Phylogenetic analysis of Veneridae (Bivalvia): comparison of molecular and palaeontological data. *Journal of Molecular Evolution*, **43**: 517-522.
- Canapa, A., Marota, I., Rollo, F., and Olmo, E. (1999) The small-subunit rRNA gene sequences of venerids and the phylogeny of bivalvia. *Journal of Molecular Evolution*, **48**: 463-468.
- Canapa, A., Schiaparelli, S., Marota, I., and Barucca, M. (2003) Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia). *Marine Biology*, **142**: 1125-1130.
- Chen, A.-h., Li, Z.-x., and Feng, G.-n. (2009) Phylogenetic Relationships of the Genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) Based on Mitochondrial COI Gene Sequences. *Zoological Research*, **30**: 233-239.
- Cheng, H.L., Xia, D.Q., Wu, T.T., Meng, X.P., Ji, H.J., and Dong, Z.G. (2006) Study on sequences of ribosomal DNA internal transcribed spacers of clams belonging to the Veneridae family (Mollusca: Bivalvia). *Yi Chuan Xue Bao*, **33**: 702-710.
- Choi, K.C. (1971) Ecological studies of the clams, *Meretrix lusoria* and *Cyclina sinensis* for increasing seed clam yield. *Korean Journal of Limnology*, **4**: 1-10.
- Choi, S.S. (1975) Comparative studies on the early embryonic development and growth of *Meretrix lusoria* and *Cyclina sinensis*. *Journal of The Korean Fisheries Society* **8**: 185-195.
- Choi, S.S., and Song, Y.K. (1975) Studies on the artificial fertilization and development of *Cyclina sinensis*. *Journal of The Korean Fisheries Society*, **8**: 185-195.
- Drickamer, K. (1999) C-type lectin-like domains. *Current Opinion Structural Biology*, **9**: 585-590.
- Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, **8**: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, **8**: 175-185.
- Jung, H.T., Kim, J., and Choi, S.D. (2004) Phylogenetic relationship of the five Korean Veneridae clams, Bivalviam, Veneroida according to morphological characters. *Journal of Aquaculture*, **17**: 197-208.
- Kappner, I., and Bieler, R. (2006) Phylogeny of venus clams (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **40**: 317-331.
- Kim, A.Y. (1971) Ecological studies on the propagation of *Saxidomus purpuratus* (Sowerby). *Journal of The Korean Fisheries Society*, **4**: 92-98.
- Kim, H.J., and Zhang, C.I. (1999) A Population

- Ecological Study of Short necked Clam, *Tapes philippinarum* in the Adjacent Waters of Jinhae. *Journal of The Korean Fisheries Society*, **2**: 32-43.
- Kim, J.J., Kim, S.C., and Hong, H.C. (2004) Molecular Phylogeny of Veneridae (Bivalvia: Heteroconchia) on the Basis of Partial Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I. *Korean Journal of Malacology*, **20**: 171-181.
- Kwon, O.K., Park, K.M., and Lee, J.S. (1993) Coloured Shells of Korea. *Coloured Shells of Korea*, : 371.
- Lee, B.D. (1956) The catalogue of Molluscan Shell of Korea. *Bulletin of Pusan Fisheries College.*, **1**: 53-100.
- Lee, H., Cha, S., Lee, M.-S., Cho, G.J., Choi, W.S., and Suk, K. (2003) Role of Antiproliferative B Cell Translocation Gene-1 as an Apoptotic Sensitizer in Activation-Induced Cell Death of Brain Microglia. *The Journal of Immunology*, **171**: 5802-5811.
- Lee, J.Y., and Kim, Y.G. (1991) Environmental survey on the cultivation ground in the West coast of Korea. 3. Environmental conditions for Hard clam farm in Puan. *Journal of Aquaculture*, **4**: 111-128.
- Lee, Y.S., Jo, Y.H., Kim, D.S., Kim, D.W., Kim, M.Y., Choi, S.H., Yon, J.O., Byun, I.S., Kang, B.R., Jeong, K.H., and Park, H.S. (2004) Construction of BLAST Server for Mollusks. *Korean Journal of Malacology*, **20**: 165-169.
- Loosanoff, V.L., and Davis, H.C. (1963) Rearing of bivalve molluscus. *Advanced Marine Biology*, **1**: 1-136.
- Low, P., Bussell, K., Dawson, S.P., Billett, M.A., Mayer, R.J., and Reynolds, S.E. (1997) Expression of a 26S proteasome ATPase subunit, MS73, in muscles that undergo developmentally programmed cell death, and its control by ecdysteroid hormones in the insect *Manduca sexta*. *FEBS Letters* **400**: 345-349.
- Mikkelsen, P.M., Bieler, R., Kappner, I., and Rawlings, T.A. (2006) Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **148**: 439-521.
- Min, D.K., Lee, J.S., Koh, D.B., and Je, J.K. (2004) Mollusks in Korea. *Min Molluscan Research Institutte*
- Pertea, G., Huang, X., Liang, F., Antonescu, V., Sultana, R., Karamycheva, S., Lee, Y., White, J., Cheung, F., Parvizi, B., Tsai, J., and Quackenbush, J. (2003) TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics*, **19**: 651-652.
- Ren, J., Shen, X., Sun, M., Jiang, F., Yu, Y., Chi, Z., and Liu, B. (2009) The complete mitochondrial genome of the clam *Meretrix petechialis* (Mollusca: Bivalvia: Veneridae). *Mitochondrial DNA*, **20**: 78-87.
- Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, **16**: 276-277.
- Salvi, D., and Mariottini, P. (2012) Molecular phylogenetics in 2D: ITS2 rRNA evolution and sequence-structure barcode from Veneridae to Bivalvia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**: 792-798.
- Shiba, N. (1934) A catalogue of the mollusca in Chosen(Corea). *Journal of the Chosen Natural History*, **18**: 6-31.
- Tamura, K., and Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**: 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**: 2731-2739.
- Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Kiryutin, B., Koonin, E.V., Krylov, D.M., Mazumder, R., Mekhedov, S.L., Nikolskaya, A.N., Rao, B.S., Smirnov, S., Sverdlov, A.V., Vasudevan, S., Wolf, Y.I., Yin, J.J., and Natale, D.A. (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, **4**: 41.
- Wang, H., Zhang, S., Li, Y., and Liu, B. (2010) Complete mtDNA of *Meretrix lusoria* (Bivalvia: Veneridae) reveals the presence of an atp8 gene, length variation and heteroplasmy in the control region. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, **5**: 256-264.
- Xu, X., Wu, X., and Yu, Z. (2010) The mitogenome of *Paphia euglypta* (Bivalvia: Veneridae) and comparative mitogenomic analyses of three venerids. *Genome*, **53**: 1041-1052.
- Yang, Z.F., Ho, D.W., Lau, C.K., Lam, C.T., Lum, C.T., Poon, R.T., and Fan, S.T. (2005) Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. *International Immunology*, **17**: 1391-1397.
- Yue, X., Liu, B., Sun, L., and Tang, B. (2011) Cloning and characterization of a hsp70 gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the immune response against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, **30**: 791-799.