

# NGS를 이용한 참굴 (*Crassostrea gigas*) microsatellite markers 개발

동춘매<sup>1</sup>, 이혜민<sup>1</sup>, 이미난<sup>1</sup>, 노은수<sup>1</sup>, 남보혜<sup>2</sup>, 김영옥<sup>1</sup>, 김은미<sup>1</sup>

<sup>1</sup>국립수산과학원 생명공학과, <sup>2</sup>국립수산과학원 양식연구과

## Development of new Microsatellite DNA Markers Using Next-generation Sequencing in pacific oyster *Crassostrea gigas*

Chun Mae Dong<sup>1</sup>, Hye Min Lee<sup>1</sup>, Mi Nan Lee<sup>1</sup>, Eun Soo Noh<sup>1</sup>, Bo Hye Nam<sup>2</sup>,  
Young-Ok Kim<sup>1</sup> and Eun-Mi Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

<sup>2</sup>Aquaculture Management Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to develop microsatellite markers in *Crassostrea gigas* using next-generation sequencing. A total of 46,335,655,445 bp reads were generated on an Illumina HiSeq x ten system, yielding 600,863,377 bp sequences. The de novo assembly resulted in 30,636 contigs. A total of 261 contigs, including 56 microsatellite loci, were derived from 30,636 contigs longer than 518 bp. A total of 22 polymorphic nuclear microsatellite markers were chosen to evaluate population genetic parameters in the farm. The mean number of effective alleles was 9, ranging from 3 to 25. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranged between 0.104 and 0.896 with an average of 0.469 and from 0.214 to 0.947 with an average of 0.579, respectively. No significant linkage disequilibrium was observed after Bonferroni revision in any loci. The results show that the 22 polymorphic nuclear microsatellite markers can be used to study the population and conservation genetics of *Crassostrea gigas* in Korea. The analysis of polymorphic SSR could provide an important experimental tool for examining a range of issues in *Crassostrea gigas* genetics

**Keywords** : *Crassostrea gigas*, next generation sequencing, microsatellite markers, genetic variability

### 서 론

참굴 (*Crassostrea gigas*) 은 전 세계적으로 조간대 부근에서 광범위하게 분포하는 부착성 이매패류로, 전 세계 양식 생산량의 약 40%를 차지하며 국내에서도 양식 생산량의 약 13.5%를 차지하는 경제성이 높은 주요 양식생물이다 (FAO, 2020). 2018년 기준 우리나라에서 생산된 참굴은 약 30만 톤

이고, 생산금액은 2천억원을 넘었으며, 수하식 양식법이 보급되기 시작한 1970년과 비교하면 약 8배 증가한 생산량이다 (Shim *et al.*, 2021). 이는 전 세계에서 중국 다음으로 두 번째로 높은 생산량에 해당한다 (Cho *et al.*, 2021). 이처럼 우리나라 참굴 양식업은 경제적 가치가 높고, 수요가 지속적으로 증가하고 있어 참굴 양식 생산을 위해 종자 생산 및 양성에 관한 많은 연구들이 이루어지고 있지만, 대부분 참굴 종자는 자연에서 확보하여 양성하고 있기 때문에 고유 지역의 자연 발생 참굴 개체 수는 급격히 감소하고 있다 (Guo *et al.*, 2006). 또한, 장기 연작으로 인한 참굴 종자의 열성화 및 잡종화, 우량 어미 자원의 부족, 참굴 자연 채묘장의 매립 등으로 자연 종자 수급이 불안정하여 어업인들의 불안감이 고조되고 있다.

현재까지 참굴에 대한 국내 연구는 개체군 양식산업 발전 방향 (Park *et al.*, 2018), 참굴 유생의 성장과 체조성 변화 (Hur *et al.*, 2008), 상향식 수류 장치를 이용한 어린 개체군의 양성 효과 (Lim *et al.*, 2020), 통영-거제해역 수하연 양식

Received: September 15, 2022; Revised: September 23, 2022;  
Accepted: September 30, 2022

Corresponding author: Eun-Mi Kim

Tel: +82 (51) 720-2462, e-mail: ocean0629@korea.kr  
1225-3480/24822

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

참굴 (*Crassostrea gigas*) 의 비만도 장기변화와 영향 요인 고찰 (Shim *et al.*, 2021) 등 양식산업 및 생태학적 연구에 관한 것으로, 참굴의 유전학적 통계분석을 통해 체계적으로 굴 자원을 관리할 수 있는 연구는 미비한 실정이다. 굴의 유전학적 관리가 중요한 이유는 소규모 양식집단에서 종자의 유전자형을 고려하지 않은 장기 연작으로 인해 극단적인 유전자형의 손실이 일어날 수 있으며 (Rudnick and Lacy, 2008), 이는 근교약세 (inbreeding depression) 로 이어져 생산된 자손의 생존에 악영향을 미칠 수 있기 때문이다 (Kim *et al.*, 2015). 또한, 유전적 다양성의 부족으로 인한 유전적 부동과 열성화는 질병에 대한 저항성 감소, 성장 저하, 잡종화 등의 부정적인 영향을 미칠 수 있는 잠재성이 있다 (Allendorf *et al.*, 2013; Frankham *et al.*, 2004). 패류의 대표적 양식인 전복의 경우도 여러 세대에 걸쳐 한정된 종자로부터 종묘가 생산되어 왔기 때문에 자연집단에 비해 양식집단이 유전자 빈도 및 대립유전자 수가 크게 감소되었다고 보고된 바 있다 (Evans *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Sugaya *et al.*, 1999). 따라서 장기 연작으로 인한 참굴 종자의 열성화 예측 및 지속적으로 이용 가능한 생물자원의 체계적인 관리를 위해 우리나라 참굴 종자의 유전적 다양성 유지에 관한 연구가 필요하다.

DNA 표지의 대표적인 종류로는 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), SSR (Simple Sequence Repeat) 등이 있다 (Baek *et al.*, 2016). 그러나 RAPD와 AFLP의 경우 다형성 정도는 높으나 반복 재현성이 떨어진다는 단점이 있다 (Kwon *et al.*, 2013). Microsatellite 표지는 생물마다 가지고 있는 DNA의 염기서열 정보에 기반하여 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 결과물의 길이 차이를 이용하여 종이나 집단을 비교 분석하는 방법이다 (Park *et al.*, 2017). 따라서 다른 표지보다 다형성 정도가 높고 공우성을 나타내기 때문에 검정 계통의 이형접합도 여부를 쉽게 확인할 수 있는 장점이 있다 (Tautz, 1989; McCouch *et al.*, 1997; Coburn *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2006). 이처럼 좋은 표지의 조건은 다형성을 가지고 있으며 공우성으로 검출할 수 있고, 대상 생물체의 유전체 전체에 고르게 분포하며 변이를 탐색하는데 있어 짧은 시간에 분석이 가능하면서도 재현성이 높게 나타나는 것이 좋다 (Park *et al.*, 2017).

최근 기술의 발전으로 차세대 염기서열 (Next-Generation Sequencing, NGS) 분석방법을 이용하여 대상 종의 염기서열 정보를 대량으로 확보하고, microsatellite 영역을 직접 탐색함으로써 전통적 방식의 microsatellite 표지 개발법

(enriched method, Paetkau, 1999) 보다 다형성 및 재현성이 높은 microsatellite 표지를 개발하는 방법으로 주로 이용되고 있으며 (Mardis, 2008; Wang *et al.*, 2009; Gardner *et al.*, 2011; Zalapa *et al.*, 2012), NGS로 개발된 microsatellite 표지는 높은 변이를 나타내는 유전자 표식으로 유전자 지도, 개체식별 및 친자확인, 집단유전학 등의 많은 연구에 광범위하게 활용되고 있다 (Park *et al.*, 2014). NGS를 이용하여 수산자원을 대상으로 한 연구로는 연어 (Tsukagoshi *et al.*, 2015), 명태 (Giusti *et al.*, 2017), 문어 (Kim *et al.*, 2018), 새우 (Wang *et al.*, 2018), 방어 (Dong *et al.*, 2020) 등으로 유전학적 연구가 수행되었지만, 참굴을 대상으로 NGS를 적용한 유전학적 연구는 아직까지 미비하다.

본 연구는 우리나라 주요 양식생물인 참굴을 대상으로 전통적 분석법이 아닌 NGS 분석을 적용하여 새로운 microsatellite 영역을 탐색하였으며, 이들 영역에서 다형성 및 재현성이 높은 microsatellite 표지를 개발하였다. 또한, 기존에 AFLP 및 EST 분석방법으로 개발된 굴 microsatellite 표지도 함께 분석에 이용하였다 (Huvet *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Sekino *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). 참굴 자원의 지속 가능한 이용을 위해 새로 개발된 microsatellite 표지로 유전적 다양성 및 유연관계 분석 등을 파악하여, 유전학적 기초정보 확보에 활용할 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 확보 및 genomic DNA 추출

Microsatellite 표지 개발을 위해 참굴 통영 (2022년, n = 48) 집단 중 3개체를 NGS (Next Generation Sequencing) 분석에 이용하였다. Genomic DNA의 순수분리와 정제는 DNeasy<sup>®</sup> 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Germany) 를 이용하였다. 분석 대상 시료 20 mg을 E-tube에 담아 DNeasy<sup>®</sup> 96 Blood & Tissue Kit로 제조사의 분석방법에 따라 ATL Buffer 150  $\mu$ l와 Proteinase K 20  $\mu$ l를 첨가한 후, 혼합하여 56°C에서 10분 동안 반응시켰다. AL Buffer 180  $\mu$ l와 99% ethanol 180  $\mu$ l을 첨가하여 S-Blocks의 DNeasy 96 plates에 옮겨 8,000 rpm (6,000  $\times$  g) 으로 15분간 원심분리 하였다. Column plates를 교체한 후, AW 1 Buffer 300  $\mu$ l 첨가하여 8,000 rpm (6,000  $\times$  g) 으로 15분간 원심분리 하였다. 이전과 동일한 방법으로 column plates를 교체한 후, AW 2 Buffer 300  $\mu$ l 첨가하여 20,000 rpm (14,000  $\times$  g) 으로 3분간 원심분리 하였다. Ethanol을 제거하기 위해 공기 중에 말린 다음, AE Buffer 50  $\mu$ l를 첨가하여 genomic DNA를 회수하였다. 회수한 genomic DNA는 1.5% (w/v) agarose gel로 전기영동하여

genomic DNA 밴드의 유무를 확인한 후, E-Graph Gel Documentation System (ATTO, Korea) 으로 농도를 측정하였다.

## 2. 차세대 염기서열 분석 (NGS) 및 microsatellite 탐색

차세대 염기서열 분석 (NGS) 는 Hiseq X ten (Illumina, USA) 을 이용하였으며, short reads (Resequencing data) 의 전처리 과정은 PCR duplicate reads를 제거 후, cutadapt로 adaptor 서열을 제거하였다 (Martin, 2011). Quality trimming을 위해 SolexaQA (v.1.13) package의 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 이용하였다 (Cox *et al.*, 2010). DynamicTrim은 phred score에 따라 short read의 양쪽 끝의 품질이 낮은 염기서열 (bad quality base) 를 잘라내고 양질의 깨끗한 서열 (cleaned read) 로 정제하였으며, LengthSort는 DynamicTrim에서 너무 많은 염기 (base) 가 잘린 read를 제거하는 과정을 수행하였다 (Ness *et al.*, 2011; Garg *et al.*, 2011). 전처리 과정을 통과한 깨끗한 서열 (cleaned read) 를 이용해 SOAPdenovo2 (version 2.04) 프로그램의 정식 protocol에 따라 default option을 이용하여 정렬 (assembly) 을 수행하였다 (Luo *et al.*, 2012). Assembled contig 서열에서 MISA (v1.0) (Thiel *et al.*, 2003) 프로그램을 이용하여 SSR을 탐색하였다. 분석 샘플 간 SSR의 비교 분석을 수행하기 위해, 참조서열을 (reference) 기준으로 비교 샘플간의 SSR size matrix를 작성하였다. Reference 서열에서 찾은 SSR 영역을 기준으로 앞뒤 20 bp 의 flanking sequence를 추출하고, flanking sequence를 reference와 분석 샘플의 reference genome에 in silico PCR을 수행하여 각 샘플 별 예상 SSR size를 계산하였다. Reference genome 서열에서 찾은 SSR을 대상으로 primer 를 제작하였다. Primer의 제작은 Primer3 (v2.3.5) (Untergasser *et al.*, 2012) 프로그램을 이용하여, primer 길이는 18-24 bp, 증폭 산물의 크기는 100-400 bp, GC의 함량은 50% 내외를 기준으로 하였으며, Tm 값은 50-63°C로 설정하였다.

## 3. Microsatellite 표지 선발

참굴의 NGS 분석으로 탐색된 microsatellite 영역의 증폭 여부를 확인하기 위해 통영 (2022년, n=48) 집단 중 8개체를 대상으로 PCR 분석을 수행하였다. 또한, 기존에 AFLP 및 EST 분석방법으로 개발된 참굴 microsatellite 표지 L8, L10, L16 (Huvet *et al.*, 2000), ucdCg-109, ucdCg-133, ucdCg-150, ucdCg-175 (Li *et al.*, 2003), Crgi3, Crgi26 (Sekino *et al.*, 2003), otgfa0\_0007\_B07, otgfa0\_0139\_G12, otgfa0\_0468\_E01 (Qi *et al.*, 2009), CGC005 (Li *et*

*al.*, 2009) 도 함께 PCR 분석을 수행하였다 (Table 1). PCR 조성은 10X Ex Taq buffer (Mg<sup>2+</sup> plus, 20 mM) 1  $\mu$ l, dNTP Mixture (2.5 mM each) 0.8  $\mu$ l, TaKaRa Ex Taq (5 U/ $\mu$ l) 0.1  $\mu$ l, forward primer와 reverse primer 각각 0.3  $\mu$ l (10 mM), template DNA 1  $\mu$ l를 넣고, 총 10  $\mu$ l까지 멸균된 증류수를 넣은 후, Veriti™96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems™, US) 를 이용하였다.

PCR 조건은 95°C에서 10분간 DNA를 사전변성 (preincubation) 후, 95°C에서 1분간 변성 (denaturation) 하였다. 54°C에서 1분간 primer 합성 (annealing), 72°C에서 1분간 DNA 합성 (extension) 하여 총 35회 반복한 후, 최종 DNA 합성 (full extension) 을 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 후, 1.8% agarose gel 상에서 전기영동으로 증폭된 DNA 밴드의 유무를 확인하였다. PCR 분석을 통해 증폭 여부를 확인한 후, 선별된 microsatellite 표지의 forward 서열 정방향에 형광물질 (6-FAM, HEX 및 TAMRA) 을 합성하여 위와 같은 방법으로 PCR을 수행하였다 (Table 1). PCR 산물에 Size standard, GeneScan 400HD ROX (Applied Biosystems, USA) 와 Hi-Di Forma-mide를 혼합하여 95°C에서 3분간 변성한 후, ABI PRISM 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) 로 단편의 크기 (fragment size) 를 분석하였다.

## 4. Microsatellite 표지의 유전학적 통계분석

선발된 microsatellite 표지를 통영 (2022년, n = 48) 집단을 대상으로 PCR 분석을 수행하였다. 참굴 통영 집단에서 분석된 SSR 증폭 결과에 따라, microsatellite의 다양성 정보량 (Polymorphic Information Content, PCI) 을 확인하기 위해 Cervus ver. 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) 의 대립인자 빈도 분석법을 적용하여 산출하였으며, Null 대립유전자는 MICRO-CHECKER (v 2.2.3; Van Oosterhout *et al.*, 2004) 로 분석하였다. Arlequin version 3.1 software (Excoffier *et al.*, 2005) 및 GENEPOP version 4.0 computer package (Rousset, 2008) 를 이용하여 대립유전자 수 (Number of Alleles, NA) 및 유전자좌위별 이형접합도 (heterozygosity) 의 관찰치 이형접합률 (Observed Heterozygosity, H<sub>O</sub>) 과 Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) 에서의 기대치 이형접합률 (Expected Heterozygosity, H<sub>E</sub>) 을 계산하였다. 유전적 다양성은 FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 1995) 를 이용하여 집단 크기를 보정한 대립유전자 수 (Allelic Richness, A<sub>R</sub>), 근친교배 (Inbreeding coefficient, F<sub>IS</sub>) 수치를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**Table 1.** Genetic characterization of polymorphic microsatellite markers in *Crassostrea gigas*

Locus	Primer sequence (5'-3')	Motif	AT (°C)	Observed size ranges (bp)	Null	GenBank accession no.
ucdCg 109	F-GCTATGGTTGTCATCCTCGAA R-TGCCTTTATCGGTTTTGCTT	(CAT) <sub>N</sub>	60	145-241		AF468525
ucdCg 175	F-GGGCATGGATCAACTCCTAA R-CCAACCAGCCCTAGTCTGTG	(CAT) <sub>N</sub>	60	227-347		AF468573
CG4	F-ATCTCTCTCAGTACTGGCAT R-TGAGGTAAGAAGTAGTGGTT	(AAG) <sub>5</sub>	60	145-154	O	
CG11	F-CTTGGCAGGTTCTATGTCTT R-TGATATCGCTAAACTGGTGG	(CTC) <sub>6</sub>	60	190-205		
CG18	F-CAATCACCGTAACAAAGACG R-TGTTTTGATTCCGTGGATCT	(TCC) <sub>7</sub>	60	221-230		
CG36	F-GTGAAATCCCAAGAGTAGCA R-CAACATCACTGTGTTGTCAG	(TGAA) <sub>4</sub>	60	177-197		
CG46	F-ATGCATCCTGGTTATTCTCC R-CCATTGGGCACTAGAATGAT	(AT) <sub>6</sub>	60	234-284		
CG52	F-CAATGTTTCATGGCTTTCCTC R-TTTTCTGGTTTCTAGGGACG	(TA) <sub>6</sub>	60	143-161	O	
CG18-N	F-AGCACTGCAAGATGACAATA R-AGGAATGCGTTCATCCAAA	(TTTA) <sub>5</sub>	60	134-174	O	
CG23-N	F-TGGTGGGAATGATACCAATG R-CAAGAGTGTCCGTTTTAGGA	(CCT) <sub>6</sub>	60	170-194	O	
CG22-2	F-AAACAGATCTTTCCCGAAA R-TTTCGTAAAGGTCACCCAAA	(TG) <sub>10</sub>	60	181-199		
CG22-5	F-TGCCAAAATCACTGTGAAAC R-TTGTCCCTGTATACATGCC	(AC) <sub>7</sub>	60	206-216		
CG22-10	F-TTTTGTGCAACAGATGGAAC R-CATAAATACCTCTGCCCTCC	(AT) <sub>13</sub>	60	271-287	O	
CG22-17	F-TACACAGTAATCGCATTGCT R-GGAGGAAAATGCTAGCTCTT	(CT) <sub>8</sub>	60	224-290		
CG22-59	F-GCGTTTTGTGGAGTTTGTAT R-CAACTTATGGGGTGGGTTAA	(CA) <sub>8</sub>	60	293-307	O	
CG22-67	F-CATTTTACAGACGCTGATTC R-ATTTCCACAAAGACCCAAGT	(AT) <sub>6</sub>	60	196-218	O	
CG22-68	F-GGAGACTGAAACCAGACATT R-CATCCACCCCTAAAGAAACA	(TA) <sub>6</sub>	60	168-206	O	
CG22-101	F-ACAGGACATTTGAAACAGT R-GCAAAATGTCATTTCCACA	(GA) <sub>6</sub>	60	269-281	O	
CG22-136	F-GGGAGTCAAGATGTGAACAA R-AGCTTGGATTCTTACGGTTT	(AT) <sub>7</sub>	60	200-260	O	
CG22-32	F-GGGAGCGGTATCCAATTTTA R-ACAATAATGTGGGCAGGAAT	(AAT) <sub>5</sub>	60	185-221	O	
CG22-3	F-GTTCGCGCTATCTTTTCTTT R-ATCAGCGCTTTTTCAGACTA	(AATA) <sub>5</sub>	60	282-290		
CG22-7	F-TCTGCATTACAACGGATGAA R-TAAAGATGGAAATCGGGAGC	(ACAG) <sub>5</sub>	60	115-131		

**1. 염기서열 탐색 및 및 다형성 확인**

참굴의 새로운 microsatellite 표지 개발 및 유전적 다양성 등 유전학적 특성 분석을 위해, 통영 (2022년, n = 48) 집단에서 3개체를 대상으로 Illumina Hiseq X ten platform을 이용하여 다량의 염기서열 정보를 획득하였다. 총 생산된 평균 염기서열은 46,335,655,445 bp 였으며, paired-end library는 151 bp이었다. 각 개체별로는 45,677,154,059-47,475,929,479 bp

의 염기서열을 생성하였다. 염기서열 정확도 99%를 나타내는 Q20에서 참굴 3개체의 평균값이 95%로 높은 수치를 나타냈으며 (Song and Chung, 2019; Kim *et al.*, 2021), GC의 비율 평균값은 35.24%로 나타났다. NGS 분석으로 생산된 염기서열은 SolexaQA (v.1.13) package의 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 이용하여 염기서열 전처리 과정 (pre-processing) 을 수행하였다 (Cox *et al.*, 2010).

**Table 2.** Statistics of NGS sequencing data

Sequencing raw data				PCR duplicate removal data		
Sample	No. Of reads	Avg. length (bp)	Total length (bp)	No. Of reads	Total length (bp)	Trimmed/raw (%) <sup>*1</sup>
1	302,497,709	151	45,677,154,059	283,848,925	42,861,187,675	93.84%
2	314,410,129	151	47,475,929,479	296,608,204	44,787,838,804	94.34%
3	303,668,098	151	45,853,882,798	285,952,554	43,178,835,654	94.17%
Average	306,858,645	151	46,335,655,445	288,803,228	43,609,287,378	94.11%

  

Final trimmed data				
Sample	Total length (bp)	Trimmed/raw (%) <sup>*1</sup>	GC (%) <sup>*2</sup>	Q20 (%) <sup>*3</sup>
1	32,183,901,164	70.46%	35.3	95.51
2	32,887,248,581	69.27%	35.17	95.07
3	31,620,458,891	68.96%	35.25	94.86
	30,011,103,899	64.78%	35.24	95.15

<sup>\*1</sup> Trimmed/Raw (%): (Total length of trimmed reads / Total length of raw reads)\*100

<sup>\*2</sup> GC (%): GC content.

<sup>\*3</sup> Q30 (%): Ratio of bases that have phred quality score of over 20

**Table 3.** Statistics of assembled contigs

Sample	k-mer <sup>*1</sup>	Num. of contigs	Length (bp) of contigs	
			Total length	N50 <sup>*2</sup>
1		1,450,584	604,202,404	416
2	69	1,433,191	596,203,369	415
3		1,440,351	602,184,358	418
Average		1,441,375	600,863,377	

<sup>\*1</sup> K-mer: assembly k-mer length.

<sup>\*2</sup> N50: sequence length of the shortest contig at 50% of the total genome length.

DynamicTrim의 phred score  $\geq 20$ 을, LengthSort 과정은 short read length  $\geq 25$  bp로 설정하여 DynamicTrim과정에서 너무 많은 염기 (base) 가 잘린 read를 최종적으로 제거하였다 (Ness *et al.*, 2011; Garg *et al.*, 2011). DynamicTrim를 통해 전 처리된 평균 염기서열은 43,609,287,378 bp로 원데이터 (raw data) 의 94.11% 였고, 각 개체별로는 42,861,187,675-44,787,838,804 bp였다. LengthSort의 통해 최종 처리된 평균 염기서열은 30,011,103,899 bp로 원데이터의 64.78% 였고, 각 개체별로는 31,620,458,891-32,887,248,581 bp였다 (Table 2). Draft genome 분석은 전처리 과정을 통과한 평균 염기서열 30,011,103,899 bp를 대상으로 SOAPdenovo2 (v.2.04) 프로그램을 이용하여 시료 3개체의 염기서열 데이터를 각각 *de novo* assembly 하였다 (Luo *et al.*, 2012). *de novo* assembly 결과, 각 개체별로 604,202,404, 596,203,369,

602,184,358 bp의 contig가 생성되었다. 생성된 contig 중 가장 긴 contig 길이는 604,202,404 bp로 나타났으며, 이들의 총 평균값은 600,863,377 bp였다. K-mer 분석을 통해 유전체 크기를 측정 한 결과, 69-mer의 분포 경향을 확인할 수 있었다 (Table 3). 검색된 SSR 구간의 각 개체별로 평균값은 541, 634, 534, 543, 541, 263개 였으며, 각 개체의 서열을 탐색한 결과, di-nucleotide 36,404 (6.7%), 35,053 (6.6%), 35,136 (6.5%) 개, tri-nucleotide 4,470 (0.8%), 4,577 (0.9%), 4,416 (0.8%) 개, tetra-nucleotide 7,524 (1.4%), 7,530 (1.4%), 7,564 (1.4%) 개, penta-nucleotide 9,420 (1.7%), 9,213 (1.7%), 9,375 (1.7%) 개, hexa-nucleotide 319,457 (59.0%), 314,722 (63.9%), 319,270 (59.0%) 개, hepta-nucleotide 97,036 (17.9%), 96,438 (18.0%), 97,666 (18.0%) 개, octa-nucleotide 40,962 (7.6%), 40,666 (7.6%), 41,052 (7.6%) 개, nona-nucleotide 17,325 (3.2%),

**Table 4.** Statistics of SSR detection

Motif type	Reference (NCBI, GCF 902806645.1)	1	2	3
p2 (di-nucleotide)	53,052	36,404	35,053	35,136
p3 (tri-nucleotide)	6,327	4,470	4,577	4,416
p4 (tetra-nucleotide)	8,051	7,524	7,530	7,564
p5 (penta-nucleotide)	11,097	9,420	9,213	9,375
p6 (hexa-nucleotide)	347,980	319,457	314,722	319,270
p7 (hepta-nucleotide)	110,002	97,036	96,438	97,666
p8 (octa-nucleotide)	46,790	40,962	40,666	41,052
p9 (nona-nucleotide)	20,078	17,325	17,413	17,680
p10 (deca-nucleotide)	11,489	9,036	8,931	9,104
Total	614,866	541,634	534,543	541,263

17,413 (3.3%), 17,680 (3.3%) 개, deca-nucleotide 9,036 (1.7%), 8,931 (1.7%), 9,104 (1.7%) 개로 확인되었다. 이 중 hexa-nucleotide의 비율이 가장 높았으며, deca-nucleotide가 가장 낮은 비율을 나타냈다 (Table 4).

**2. Microsatellite 표지 제작**

탐색된 SSR 구간에서 서로 중복되는 SSR motif가 없도록 하였으며, 반복 수 길이가 10 bp 이상, 증폭산물 크기 100-400 bp, primer 크기 20-24 bp, 적정 온도 (Tm) 50-62°C, GC 함량 40-60%의 조건으로 microsatellite 표지 후보군 30,636개를 선별하였다. 선별한 30,636개의 서열 중 반복 염기의 종류, primer의 위치, 증폭산물의 크기, 반복 수 등을 고려하여 261개를 1차적으로 선별하였다. 1차 선별된 후보서열 261개 중 PCR 증폭 여부 등을 확인하여, 56개의 microsatellite 표지를 2차 선별하였으며, 선별된 표지에 형광 표지 (dye) 처리를 하였다. 형광 표지 처리한 56개의 microsatellite 표지 후보의 유전자형 (genotyping) 분석으로 대립유전자 수, 크기 등을 고려하여 최종적으로 20개를 microsatellite 표지로 선별하였다. 기존에 AFLP 및 EST 방법으로 개발된 microsatellite 표지는 참굴로 분석 시 원데이터의 유전자형 분석이 어렵거나 null 대립유전자가 존재하여 유전적 다양성 분석에 적합하지 않았으며, 그 중 ucdCg-109, ucdCg-175 (Li *et al.*, 2003) 표지는 원데이터의 유전자형 해석이 분명하고, 다형성 및 재현성이 높게 나타나 본 연구에서 새롭게 개발된 microsatellite 표지와 함께 이용하였다. 최종적으로 선별된 microsatellite 표지는 22개이며, 이를 국내 통영 참굴 집단에 적용하여 microsatellite 표지의 유전학적 특성 분석을 수행하였다 (Table 1).

**3. Microsatellite 표지의 유전학적 특성 분석**

NGS를 이용하여 개발된 20개의 microsatellite 표지와 기존에 보고된 2개 (ucdCg-109, ucdCg-175) 의

microsatellite 표지의 특성 분석을 위해 참굴 통영 집단 (n = 48) 을 대상으로 유전적 다양성을 분석하였다. Microsatellite 표지의 다형성 정도를 나타내는 PIC 값이 0.5 이상 넘으면 충분한 개체식별력을 갖는 표지인 것으로 보고되고 있다 (Botstein *et al.*, 1980). 본 연구에서 이용한 22개의 microsatellite 표지 PIC 값은 0.206-0.934 범위로 평균 0.542의 수치로 나타났으며, 이는 이용한 microsatellite 표지가 높은 개체식별력을 나타내는 것을 의미한다. Null 대립유전자 존재 여부는 6개 (CG4, CG52, CG22-10, CG22-68, CG22-101, GC22-136) 의 microsatellite 표지에서 null이 존재하여 null 대립유전자가 27.2% 였다. 굴을 대상으로 microsatellite 표지를 개발한 Li *et al.* (2003) 의 보고에도 79개의 microsatellite 표지 중 41개의 microsatellite 표지에서 51.9%의 null이 나타난다고 보고되었다. 근교계수 (Inbreeding coefficient,  $F_{IS}$ ) 는 집단별 이형접합체 감소 정도를 나타내는 척도로 집단 내 유전적 고정 정도에 따른 근친화 정도를 확인하는데 이용된다 (Suh *et al.*, 2021). 본 연구에서  $F_{IS}$  값은 20개의 microsatellite에서 양수를 나타냈으며, 평균 0.218로 계산되었다.  $F_{IS}$  값이 높게 나타난 이유는 분석에 이용된 참굴 집단이 자연발생 종자 집단이 아닌 채묘지 양성 집단이며, 동일 채묘지 내에서 어느 정도 근친교배가 발생할 수 있을 것으로 추정된다 (Ozaki and Fujio, 1985; Sekino *et al.*, 2003). 하디-바인베르크 평형 (HWE) 검정결과 14개의 microsatellite는 유전적 평형 상태를 유지하고 있었으며 CG4, CG52, CG18-N, CG23-N, CG22-10, CG22-59, CG22-68, CG22-101의 8개 microsatellite 표지는 유전적 평형 상태를 유의적으로 ( $p < 0.0023$ ) 벗어나 있음을 확인하였다.

Qi *et al.* (2009) 보고에 따르면, 굴 집단 내의 대립유전자 수 (Number of Alleles,  $N_A$ ) 는 3-9개이며, 관측치 이형접합율 (Observed Heterozygosity, HO) 값은 0.080-0.880, 기대치 이형접합성 (Expected Heterozygosity, HE) 값은

**Table 5.** Genetic variabilities at 22 microsatellite markers in the population of *Crassostrea gigas*

Locus	ucdCg 109	ucdCg 175	CG4	CG11	CG18	CG36	CG46	CG52	CG18-N	CG23-N	CG22-2
N <sub>A</sub>	23	25	4	6	4	6	11	8	6	9	8
H <sub>O</sub>	0.854	0.896	0.104	0.646	0.438	0.583	0.583	0.146	0.292	0.458	0.646
H <sub>E</sub>	0.933	0.947	0.261	0.636	0.407	0.617	0.603	0.234	0.420	0.679	0.662
PIC	0.918	0.934	0.242	0.582	0.38	0.575	0.577	0.227	0.359	0.650	0.624
F <sub>IS</sub>	0.085	0.055	0.604	-0.015	-0.076	0.055	0.033	0.379	0.307	0.327	0.025
HW	0.084	0.048	0.000	0.050	0.964	0.161	0.578	0.000	0.000	0.000	0.421
CG22-5	CG22-10	CG22-17	CG22-59	CG22-67	CG22-68	CG22-101	CG22-136	CG22-32	CG22-3	CG22-7	Mean all loci
6	9	13	6	6	5	6	12	6	3	5	9
0.604	0.396	0.688	0.354	0.146	0.208	0.417	0.438	0.458	0.375	0.583	0.469
0.620	0.722	0.766	0.594	0.214	0.405	0.682	0.629	0.641	0.455	0.613	0.579
0.581	0.671	0.737	0.544	0.206	0.376	0.639	0.603	0.594	0.366	0.530	0.542
0.026	0.454	0.104	0.406	0.322	0.488	0.392	0.306	0.287	0.177	0.049	0.218
0.517	0.000	0.129	0.000	0.034	0.000	0.000	0.004	0.005	0.306	0.027	0.151

N<sub>A</sub> = number of alleles per locus; H<sub>E</sub> = expected heterozygosity; H<sub>O</sub> = observed heterozygosity; F<sub>IS</sub> = inbreeding coefficient

\*Not in conformity with Hardy-Weinberg equilibrium (p < 0.0023, Bonferroni-corrected value)

0.174-0.876으로 보고되었다. 본 연구 결과를 이와 비교해 보면, 국내 통영 참굴 집단의 대립유전자 수 (N<sub>A</sub>) 는 3-25개이며, H<sub>O</sub> 값은 0.104-0.896, H<sub>E</sub> 값은 0.214-0.947로 비슷하거나 높게 나타났다. 평균 H<sub>O</sub>와 H<sub>E</sub> 값은 각각 0.469, 0.579로 크게 차이가 나타나지 않았다 (H<sub>O</sub> < H<sub>E</sub>). 이와 같은 결과는 Sekino *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2009와도 유사한 결과로, 새로 개발된 microsatellite 표지가 참굴 자원의 유전적 다양성을 확인하는데 유용할 것으로 판단된다 (Table 5).

본 연구는 우리나라 참굴 자원의 유전학적 특성 분석을 위한 microsatellite 표지를 개발하고자 차세대 염기서열 (NGS) 분석을 수행하여 새로운 염기서열 정보를 확보하였다. 확보된 염기서열에서 최종적으로 20개의 microsatellite 표지를 선발했으며, 기존에 보고된 ucdCg-109, ucdCg-175 (Li *et al.*, 2003) 와 함께 유전학적 특성 분석에 적용하였다. 22개의 microsatellite 표지를 통영 참굴 집단에 적용 시 충분한 다형성 및 재현성을 나타내었으며, 참굴 자원의 유전적 다양성을 분석하는데 유용한 것으로 판단되었다. 참굴 자원에 대한 상업적 관심이 높아짐에도 불구하고, 아직까지 국내에서 참굴 자원에 대한 유전학적 특성 분석이나 유전 정보는 미비하며, NGS를 이용한 해상력이 높은 microsatellite 표지가 개발되지 않

은 상황을 고려할 때, 참굴 자원의 과학적 관리와 보존을 위해서는 충분한 양의 유전자 표지가 필요할 것이다. 본 연구에서 새롭게 개발된 microsatellite 표지는 참굴 자원에 대한 유전적 다양성 및 집단 구조 분석 등의 유전학적 특성 분석에 적용이 가능하여 참굴 자원을 과학적이고 체계적으로 관리하는데 활용될 것으로 사료된다.

### 요 약

본 연구는 차세대 염기서열 분석법 (NGS) 을 이용하여 참굴의 새로운 microsatellite 표지를 개발하고, 개발된 microsatellite 표지의 유전학적 특성 분석을 위해 참굴 통영 집단에 적용하였다. Illumina Hiseq X ten로 총 평균 46,335,655,445 bp의 reads를 확보하여 assembly를 수행한 결과, 전체의 약 0.003%에 해당하는 1,441,375개의 read들이 수집 (assembly) 되었으며, 이 read들의 총 평균 길이는 600,863,377 bp로 확인되었다. 크기가 518 bp 이상이 되는 contig는 30,636개로 나타났으며, 이 중 microsatellite 영역을 포함하는 contig 261개를 1차로 탐색하였고, PCR 증폭 여부 및 유전자형 분석을 통해 microsatellite 후보 56개를 2차



로 선별하였다. 56개의 microsatellite 후보에서 최종적으로 참굴 집단의 microsatellite 표지로서 유용한 20개의 microsatellite 표지를 선별하였다. 또한, 기존에 보고된 2개의 microsatellite 표지도 함께 분석에 이용하였다. 참굴 집단을 대상으로 이용된 22개의 microsatellite 표지로 분석한 결과, 관찰된 유효 대립유전자 수 ( $N_A$ ) 는 평균 9 였으며, 평균 관측치 이형접합도 ( $H_O$ ) 와 평균 기대치 이형접합도 ( $H_E$ ) 는 각각 0.469와 0.579으로 나타났다. PIC 값은 0.206-0.934 범 위였으며 평균 0.542의 수치로 나타났고, 이는 개발한 microsatellite 표지가 높은 개체식별력을 나타내는 것을 의미 한다. 따라서 본 연구에서 이용된 22개의 microsatellite 표지 는 참굴 집단의 유전적 다양성 분석에 유용할 것으로 사료된다.

## 사 사

이 논문은 2022년도 국립수산물연구원 수산과학연구소 (R2022044) 의 지원으로 수행된 연구입니다.

## REFERENCES

- Allendorf, F.W., Luikart, G. and Aitken, S.N. (2013) Conservation and the Genetics of Populations. Wiley-Blackwell, Oxford, U.K.
- Baek, S.H., Lee, J.W., Hong, K.N., Lee, S.W., Ahn, J.Y. and Lee, M.W. (2016) Identification and characterization of polymorphic microsatellite loci using next generation sequencing in *Quercus variabilis*. *Journal of Korean Society of Forest Science*, **105**(2): 186-192.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, **32**: 314.
- Cho, Y.G., Lee, H.M., Kim, J.H., Shin, J.S., Choi, K.S., Kang, J.H. and Jeung, H.D. (2021) Seeking of oyster traits for simple indices to evaluate marketability of cultchless single pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Korean Journal of Malacology*, **37**(3): 93-101.
- Coburn, J.R., Temnykh, S.V., Paul, E.M. and McCouch, S.R. (2002) Design and application of microsatellite marker panels for semiautomated genotyping of rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Science*, **42**(6): 2092-2099.
- Cox, M.P., Peterson, D.A. and Biggs, P.J. (2010) SolexaQA: at-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, **11**: 485.
- Dong, C.M., Lee, M.N., Kim, E.M., Park, J.Y., Kim, G.D. and Noh, J.K. (2020) Development and Genetic Diversity Analysis of Microsatellite Markers Using Next-generation Sequencing in *Seriola quinqueradiata*. *Journal of Life Science*, **30**(3): 291-297.
- Evans, B., Bartlett, J., Sweijd, N., Cook, P. and Elliott, N.G. (2004) Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture*, **233**: 109-127.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. (2005) Arlequin (ver.3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, **1**: 47-50.
- FAO (2020) FAO Global Fishery and Aquaculture Productions Statistics. Retrieved April 13, 2021, from <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquacultureproduction/en>.
- Frankham, R., Ballou, J.D. and Briscoe, D.A. (2004) A primer of conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Gardner, M.G., Fitch, A.J., Bertozzi, T. and Lowe, A.J. (2011) Rise of the machines-recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Molecular Ecology Resources*, **11**(6): 1093-1101.
- Garg, R., Patel, R.K., Tyagi, A.K. and Jain, M. (2011) *de novo* assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification. *DNA Research*, **18**: 53-63.
- Giusti, A., Armani, A. and Sotelo, C.G. (2017) Advances in the analysis of complex food matrices: Species identification in surimi-based products using Next Generation Sequencing technologies. *PLoS ONE*, **12**(10): e0185586.
- Goudet, J. (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**(6): 485-486.
- Guo, X., Zhang, G., Qian, L., Wang, H., Liu, X. and Wang, A. (2006) Oysters and oyster farming in China: a review. *Journal of Shellfish Research*, **25**: 734.
- Hur, Y.B., Min, K.S., Kim, T.E., Lee, S.J. and Hur, S.B. (2008) Larvae growth and biochemical composition change of the pacific oyster *Crassostrea gigas*, Larvae during artificial seed production. *Journal of Aquaculture*, **21**(4): 203-212.
- Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C. and Bonhomme, F. (2000) Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics*, **31**: 71-72.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. and Marshall, T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, **16**(5): 1099-1106.
- 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*). *Korean Journal of Ichthyology*, **27**: 10-15.
- Kim, T.M., Seo, H.D., Hennighausen, L., Lee, D.Y. and Kang, K.S. (2018) Octopus-toolkit: a workflow to automate mining of public epigenomic and



- transcriptomic next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Research*, **46**(9): e53.
- Kim, T.H., Kim, Y.K., Son, J.H., Chun, J.B. and Yoon, Y.M. (2021) Utilization of Whole Genome Re-Sequencing for Large-InDel Markers Development in Malting Barley. *Korean Journal of Breeding Science*, **53**(3): 266-276.
- Kwon, Y.S., Hong, J.H. and Choi, K.J. (2013) Construction of a Microsatellite Marker Database of Commercial Pepper Cultivars. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, **31**(5): 580-589.
- Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V. and Hedgecock, D. (2003) Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes*, **3**(2): 228-232.
- Li, Q., Liu, S. and Kong, L. (2009) Microsatellites within genes and ESTs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and their transferability in five other *Crassostrea* species. *Electronic Journal of Biotechnology*, **12**(3): 15-16.
- Li, Q., Park, C., Endo, T. and Kijima, A. (2004) Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Aquaculture*, **235**: 207-222.
- Lim, H.J., Hwang, I.J., Han, J.C., Choi, J., Sohn, S.B., Yoon, J.H., Kim, H.W. and Kim, B.J. (2020) Effect of upwelling system for cultchless juvenile Pacific oyster, *Crassostrea gigas* culture. *Korean Journal of Malacology*, **36**: 15-22.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Y., Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Liu, Y., Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., Cheung, D.W., Yiu, S.M., Peng, S., Xiaoqian, Z., Liu, G., Liao, X., Li, Y., Yang, H., Wang, J., Lam, T.W. and Wang, J. (2012) SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler. *GigaScience*, **1**: 18.
- Mardis, E.R. (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **9**: 387-402.
- Martin, M. (2011) Cutadapt: cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, **17**: 10-12.
- McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T. and Blair, M. (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology*, **35**: 89-99.
- Ness, R.W., Siol, M. and Barrett, S.C. (2011) *de novo* sequence assembly and characterization of the floral transcriptome in cross-and self-fertilizing plants. *BMC Genomics*, **12**: 298.
33. Ozaki, H. and Fujio, Y. (1985) Genetic differentiation in geographical populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, **36**: 49-61.
- Paetkau, D. (1999) Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. *Biotechniques*, **26**: 690-697.
- Park, C.J., Nam, W.S., Lee, M.S., Kang, J.Y. and Kim, K.K. (2014) Microsatellite multiplex PCR method for selective breeding studies in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Korean Journal of Malacology*, **30**(4): 383-390.
- Park, K.C., Kim, Y.G., Hwangbo, K., Gil, J.S., Chung, H., Park, S.G., Hong, C.P. and Lee, Y. (2017) Development of Simple Sequence Repeat Markers from *Adenophora triphylla* var. *japonica* (Regel) *H. Hara* using Next Generation Sequencing. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **25**(6): 411-417.
- Park, M.S., Do, Y.H. and Rho, S.W. (2018) Development Direction of Individual Oyster Aquaculture Industry in Korea. *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, **30**(3): 913-922.
- Pinto, L.R., Oliveira, K.M., Marconi, T., Garcia, A.A.F., Ulian, E.C., and De Souza, A.P. (2006) Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. *Plant Breeding*, **125**(4): 378-384.
- Qi, H., Wu, Q., Li, L. and Zhang, G. (2009) Development and characterization of microsatellite markers for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Conservation Genetics Resources*, **1**: 451-453.
- Rousset, F. (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 103-106.
- Rudnick, J.A. and Lacy, R.C. (2008) The impact of assumptions about founder relationships on the effectiveness of captive breeding strategies. *Conservation Genetics*, **9**(6): 1439-1450.
- Sekino, M., Hamaguchi, M., Aranishi, F. and Okoshi, K. (2003) Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, **5**(3): 227-233.
- Shim, J.H., Lee, S.J., Koo, J.H. and Jeong, R.H. (2021) Long-term Change and Factors Affecting the Fatness of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* in Tongyeong-Geoje Bays, Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**(4): 434-444.
- Song, W.H. and Chung, S.M. (2019) Whole genome re-sequencing and development of SSR markers in oriental melon. *Journal of Plant Biotechnology*, **46**(2): 71-78.
- Sugaya, T., Ikeda, M. and Fujio, Y. (1999) Comparison for the genetic variabilities of natural and seed populations of Japanese flounder based on PCR-RFLP analysis of mtDNA D-loop. *Fish genetic breeding Science*, **28**: 65-73.
- Suh, S.W., Kim, D.H., Kim, S.W., Park, B.H., Choi, T.J., Park, M.N., Park, Y.S., Kim, E.S., Jung, K.S., Jung, D.J., Beak, J.J. and Oh, J.D. (2021) Genetic Diversity and Bottleneck Analysis of Chikso Based on Microsatellite Marker Polymorphism. *Journal of Agriculture & Life Science*, **55**: 83-90.

- Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, **17**(16): 6463-6471.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K. and Graner, A. (2003) Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **106**(3): 411-422.
- Tsukagoshi, H., Terui, S. and Abe, S. (2015) Characterization of sixteen polymorphic microsatellite DNA loci in the chum salmon (*Oncorhynchus keta*) isolated by next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, **7**: 173-175.
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G. (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, **40**(15): e115.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. and Shipley, P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**(3): 535-538.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, **10**: 57-63.
- Wang, Z., Wu, Q., Guo, H., Tang, D., Bai, Y., Wang, Z. and Tao, Y. (2018) Next-generation sequencing yields the complete mitogenome of *Caridina multidentata* and phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA B Resources*, **3**: 68-70.
- Zalapa, J.E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown, B., Harbut, R. and Simon, P. (2012) Using nextgeneration sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany*, **99**(2): 193-208