

새조개 (*Fulvia mutica*) 의 Microsatellite Markers 개발을 위한 차세대 염기서열 분석법의 활용

동춘매¹, 노은수¹, 이미난¹, 김우진¹, 김영옥¹, 김은미²

¹국립수산과학원 생명공학과, ²국립수산과학원 연구기획과

Utilization of Next-Generation Sequencing for the Development of Microsatellite Markers in the egg cockle (*Fulvia mutica*)

Chun Mae Dong¹, Eun Soo Noh¹, Mi-Nan Lee¹, Woo-Jin Kim¹, Young-Ok Kim¹ and
Eun-Mi Kim²

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

²Research Planning Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

ABSTRACT

This study aimed to utilize next-generation sequencing for developing microsatellite markers in *Fulvia mutica*. The Illumina NovaSeq 6000 System generated a total of 327,584,690 reads, resulting in a sequence length of 49,465,288,190 bp. The de novo assembly yielded an 885 Mb (885,020,821 bp) sequence. In this context, 675,057 contigs longer than 500 bp were identified. Among these, 107,985 contigs containing microsatellite regions were identified, accounting for 15.9%. A total of 105,632 microsatellite loci were found within these 107,985 microsatellite regions. Among these loci, polymorphism information was confirmed at 3,723 (3.5%) microsatellite marker positions. eighty-two primer sets were designed based on the 150 microsatellite loci. As a result, 14 microsatellite loci were selected for estimating population genetic parameters in both wild populations. The mean number of effective alleles was 11, ranging from 7 to 18. The observed heterozygosity (HO) ranged from 0.615 to 0.937, with an average of 0.790, while the expected heterozygosity (HE) ranged from 0.629 to 0.924, also with an average of 0.790. Based on these findings, the compiled panel of 14 microsatellite markers is anticipated to facilitate examining genetic traits within the *Fulvia mutica* population in Korea. The results of the analysis of genetic diversity and gene relationships in *Fulvia mutica* are expected to be crucial data for the management, conservation, and sustainable utilization of genetic resources. Such information is expected to play a pivotal role in developing conservation and management strategies and formulating policies and strategies for sustainable utilization of genetic resources.

Key words: Genetic variability, microsatellite markers, next generation, microsatellite loci, *Fulvia mutica*

서 론

새조개 (*Fulvia mutica*) 는 새조개목 (Cardiida) 새조개과

(Cardiidae) 에 속하는 해산 이매패류로서 주로 수심이 얇은 사니질에 서식하며 (Min *et al.*, 2004), 우리나라 남해안과 서해안 해역을 비롯하여 동중국해, 홍콩, 대만, 일본 등지에 분포한다 (Kim *et al.*, 1993a). 새조개의 형태는 좌우가 얇게 부풀어 있는 구형이며, 발 (복족) 은 새의 부리와 닮은 형태로 발달되어 있어, 크고 긴 발을 이용하여 해엄을 치거나 펄 속으로 잠입하는데 용이하다. 이러한 특징은 새조개의 생존과 먹이 획득에 매우 중요한 역할을 한다 (Yang *et al.*, 2011).

Received: June 10, 2024; Revised: June 15 2024; Accepted: June 26, 2024

Corresponding author: Eun-Mi Kim

Tel: +82 (51) 720-2841, e-mail: ocean0629@korea.kr
1225-3480/24867

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.

새조개는 특유의 단맛과 쫄깃한 식감으로 우리나라와 일부 아시아 국가들에서 고부가가치 품종으로 각광받고 있다. 특히, 일본의 경우 새조개를 중요한 수산자원으로 보고 있으며,

그 수요가 늘어난 만큼 양식산업 및 종묘생산에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Kandeel *et al.*, 2017). 이에 반해 우리나라의 경우 2000년대 초반까지 새조개의 양식생산이 이루어지지 않았으며, 전적으로 자연산 포획에만 의존해 왔다. 이로 인해 최근 몇 년간 어획량이 급격히 감소하여 2011년 1톤을 마지막으로 2012년부터 8년 연속 “0”을 기록하였다 (KOSIS, 2020). 이에 전라남도 해양수산과학원에서는 2011년부터 인공종묘생산 및 양식생산기술을 도입하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔으며, 2019년부터 천수만 해역에 인공 부화된 새조개를 방류하여 양식생산을 시작하였다.

현재까지 새조개에 관한 국외 연구는 산란시기와 관련된 생태학적 연구 (Inoue, 1955), 인공종묘생산 (Matsuoka *et al.*, 1968), 유생과 치패사육 (Hotta, 1977), 산란유발과 유생의 초기발생 (Nishihiro, 1980) 등이 보고되었으며, 우리나라에서는 새조개 난 발생 및 유생 성장에 미치는 수온의 영향 (Yang *et al.*, 2011), 새조개 생식세포의 형성과정 및 생식주기 (Chang and Lee, 1982), 생육과 자숙육 및 자숙액즙의 식품성분 비교 (Kim *et al.*, 1993a, b) 및 색소동정 (Bae *et al.*, 1996) 등 다양한 연구들이 보고되었다. 그러나 아직까지 새조개의 자원생물학적 특성 및 생태학적 연구에 그치고 있으며, 유전학적 통계분석을 통한 새조개 자원을 보다 체계적으로 관리할 수 있는 연구는 미흡한 실정이다.

새조개의 유전학적 관리의 중요성은 소규모 양식 집단에서 어미 개체의 유전자형을 고려하지 않고 무작위로 교배하는 경우, 유전자형의 손실이 발생할 수 있기 때문이다 (Rudnick and Lacy, 2008). 이로 인해 집단 내 유전적 다양성이 감소함에 따라 개체군 병목현상, 질병, 성장 저하, 집단 내 근친교배 증가, 저항력 감소, 기형 발생 등 다양한 부정적인 결과를 초래할 수 있다 (Kim *et al.*, 2015; Allendorf *et al.*, 2013; Frankham *et al.*, 2004).

전복, 넙치 및 연어와 같은 대표적인 양식어종의 경우에도 한정된 어미로부터 종묘 생산이 이루어져 왔기 때문에 양식 어미개체 사이의 유전적 다양성이 자연 집단에 비해 상당히 감소한 것으로 보고되고 있다 (Evans *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Norris *et al.*, 2000). 이러한 이유로, 우리나라의 새조개 양식에서도 체계적인 어미 관리가 중요하며, 이를 통해 새조개의 유전적 다양성을 유지하는 연구가 필요하다.

분자 마커 분석 초기에는 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP; 제한효소 단편 길이 다형성), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD; 무작위 증폭 다형성 DNA), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP; 증폭된 단편 길이 다형성), 그리고 Simple Sequence Repeat (SSR; 단순 서열 반복) 등이 널리 이용되었지만, 이러한 기술들은 상대적으로 정보량이 제한적

이며, 실험적인 절차가 복잡하고 연구비용과 노동력이 많이 드는 단점이 있다 (Cho *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2011).

2000년대 차세대 염기서열 (Next-Generation Sequencing, NGS) 분석 기술인 NGS 도입 이후 유전체 분석법이 발전하면서 이러한 단점을 극복하고 있으며, NGS를 이용하여 대량 종의 염기서열 정보를 대량으로 확보할 수 있게 되었다 (Paetkau, 1999). 이를 통해 기존의 전통적인 microsatellite 마커 개발 방법과는 다르게 microsatellite 영역을 직접 탐색하여 보다 높은 다형성과 재현성을 갖는 마커를 개발하고 있다 (Gardner *et al.*, 2011; Mardis, 2008). NGS 방법으로 개발된 microsatellite 마커는 높은 유전자 다양성을 나타내며 집단 유전학, 유전자 지도 작성, 개체 식별 및 친족 관련성 등 다양한 분야에서 활용되고 있다 (Park *et al.*, 2014).

따라서 본 연구는 새조개의 인공종묘생산에 있어 보다 체계적으로 어미개체를 관리하기 위해 NGS 방법을 이용하여 새로운 microsatellite 영역을 탐색하고, 이를 기반으로 다형성과 재현성이 높은 microsatellite 마커를 개발하였다. 새로 개발된 microsatellite 마커를 이용하여 새조개의 유전학적 다양성 분석한 후, 이로부터 얻은 유전학적 정보를 통해 새조개의 보전, 관리 및 유전자원의 지속 가능한 이용을 위한 기초 자료로 활용할 것이다.

재료 및 방법

1. 시료 확보 및 genomic DNA 추출

본 연구에 이용된 새조개 시료는 총 72개체이며, 2021년 여수 (N = 38) 와 장흥 (N = 34) 집단을 대상으로 분석에 이용하였다.

분석 대상 시료 15 mg을 E-tube에 담은 후, QIAGEN사의 DNeasy® 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Germany) 를 이용하여 genomic DNA의 순수분리 및 정제를 수행하였다. 시료에 ATL buffer 150 µl와 Proteinase K 10 µl을 첨가하여 혼합한 후, 56°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 그 다음, AL buffer 150 µl과 99% ethanol 150 µl을 첨가하여 S-Blocks의 DNeasy 96 plates에 시료를 옮겨 10,000 rpm (11,200 × g) 으로 2분간 원심분리 하였다. 이어서, column plates를 교체한 후, AW 1 buffer 300 µl을 첨가하여 10,000 rpm (11,200 × g) 으로 2분간 원심분리하여 잔여 염기와 다른 불순물을 제거하였다. 같은 방법으로 column plates를 교체한 후, AW 2 buffer 300 µl을 첨가하여 14,000 rpm (21,952 × g) 으로 5분간 원심분리하여 잔여의 염기를 제거하였다. Ethanol을 완전히 제거하기 위해 공기 중에서 말린 후, AE buffer 70 µl를 첨가하여 genomic

DNA를 회수하였다. 회수한 genomic DNA는 1.2% (w/v) 아가로즈 겔 (agarose gel) 전기영동을 거쳐 (E-Graph Gel Documentation System ATTO, Korea) genomic DNA 밴드의 존재 여부를 확인한 후, NanoPhotometer N60 Touch (Implen GMBH, Germany) 를 이용하여 농도를 측정하였다.

2. 차세대 염기서열 분석 (NGS) 및 microsatellite 탐색

새조개의 microsatellite 마커 개발을 위해 2021년 여수 (N = 38) 와 장흥 (N = 34) 집단에서 채집하였으며, 이 중 10 개체를 선택하여 DNA를 추출하였다.

추출한 DNA는 NanoDrop-1000 Spectrophotometer (Thermo scientific, USA) 및 Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA) 를 이용하여 정성적 및 정량적으로 평가한 후, 1% (w/v) 아가로즈 겔 (agarose gel) loading을 통해 DNA의 품질 (Quality control) 을 확인하였다. DNA의 품질 검사를 통과한 DNA는 적절한 크기로 조각낸 후, 어댑터 (adapter) 를 추가하여 라이브러리를 제작하였다. 이후, 라이브러리로부터 얻은 DNA 조각들을 bcl2fastq2 v2.20 (Illumina, USA) 소프트웨어를 이용하여 BCL (Base Call) 파일을 역다중화 (demultiplexed) 하여 FASTQ 파일로 변환한 후, 2100 BioAnalyzer (Agilent, USA) 을 이용하여 생성된 DNA fragment 라이브러리의 크기 분포와 품질을 확인하였다. 그 다음, 차세대 염기서열 분석 장비인 NovaSeq6000 (Illumina, USA) 를 이용하여 플로우셀 (flow cell) 을 장착하고 시퀀싱을 진행한 후, 발광 신호를 감지하여 염기서열 정보를 획득하였으며, Paired-end 시퀀싱을 통해 각 DNA 조각 양쪽 끝에서 시퀀싱되어 쌍으로 염기서열 정보를 생성하였다. 생성된 데이터는 Trimmomatic (v0.36) 프로그램을 이용하여 어댑터 트리밍 (adapter trimming) 및 품질 관리 (quality control) 작업을 거친 후 (Bolger *et al.*, 2014), CIC_assembler (v5.2.1) 를 이용하여 paired-end 염기서열 정보를 de novo assembled하여 contig 서열을 얻었다 (Koren *et al.*, 2017; Pinggera *et al.*, 2017). 이후, SSRIT (Simple Sequence Repeat Identification Tool) 를 이용하여 contig 서열에서 microsatellite을 탐색하고, 각 분석 샘플 간 microsatellite을 비교하기 위해 reference를 기준으로 한 microsatellite 크기 행렬 (matrix) 을 작성하였다. 이를 위해 reference genome에서 microsatellite 영역 주변의 flanking 서열을 앞뒤로 500 bp씩 추출하였다. 추출된 flanking 서열의 다형성 정보를 확보하기 위해 CLC Genomics Workbench의 Map Reads to Reference와 Indels and Structural Variants 프로그램을 각각 수행하였다. Map Reads to Reference를 이용하여 리드를 reference genome에 mapping하고, Indels and

Structural Variants를 이용하여 microsatellite 주변의 다양한 변이를 파악하였다. 또한, Reference genome과 분석 샘플의 reference genome에 대해 in silico PCR을 수행하여 각각의 샘플 별로 예상되는 microsatellite 크기를 계산하였다. 이를 기반으로 Primer3 (v2.3.5) (Untergasser *et al.*, 2012) 프로그램을 이용하여 프라이머를 설계하였으며, 프라이머 길이는 18-25 bp로 설정하고, 증폭 산물의 크기는 100-300 bp, GC 함량은 50% 내외, Tm 값은 55-65°C로 설정하였다.

3. Microsatellite 마커 선별

NGS 방법으로 탐색된 microsatellite 영역의 증폭 여부를 확인하기 위해 2021년 여수 (N = 38) 와 장흥 (N = 34) 집단 중 16개체를 대상으로 PCR 분석을 수행하였다. PCR 조성은 10X Ex Taq buffer (1 ml, 20 mM, Mg²⁺ plus) 1.5 µl, dNTP Mixture (800 µl, 2.5 mM each) 0.6 µl, forward 프라이머와 reverse 프라이머 각각 0.5 µl (10 mM), TaKaRa Ex Taq (250 U, 5 U/µl) 0.2 µl 그리고 template DNA 1 µl를 넣고, 이를 총 10 µl가 되도록 멸균된 증류수를 추가하였다. 그 후, VeritiTM96-Well Fast Thermal Cycler (Applied BiosystemsTM, USA) PCR을 이용하여 진행하였다. PCR 조건은 다음과 같이 95°C에서 7분간 DNA 사전변성 (preincubation) 후, 95°C에서 45초 동안 변성 (denaturation) 하고, 54°C에서 45초 동안 프라이머 합성 (annealing), 그리고 72°C에서 45초 동안 DNA 합성 (extension) 하여 이를 총 32회 반복한 후, 최종 DNA 합성 (full extension) 을 72°C에서 10분간 실시하였다. PCR 과정이 완료된 후, 전기영동을 이용하여 1.2% (w/v) 아가로즈 겔 (agarose gel) 상에서 증폭된 DNA 밴드의 존재 여부를 확인하였다. PCR 과정을 통해 증폭여부 등을 확인한 후, 선별된 후보 microsatellite 마커의 forward 서열 정방향에 형광물질 (6-FAM, TAMRA 및 HEX) 을 합성하여 위와 같은 방법으로 PCR을 다시 진행하였다. PCR 증폭산물에 Hi-Di Forma-mide 와 GeneScan 400HD ROX size standard (Applied Biosystems, USA) 를 혼합하여 95°C에서 4분간 변성한 후, ABI PRISM 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) 를 이용해 GeneMapper 소프트웨어 version 4.0 (Applied Biosystem, USA) 으로 유전자 단편 크기 (fragment size) 를 확인하였다.

4. Microsatellite 마커의 효율성 검증

2021년 채집된 여수 (N = 38) 와 장흥 (N = 34) 새조개 집단을 대상으로 최종 탐색된 microsatellite 마커의 효율성을 검증하였다.

Table 1. DNA sample quality control results

	Sample	conc. (ug for DNA; ng for RNA)	260/280	Volume (μl)
1	Yeosu	327	2.015	40
2	Yeosu	206	2.020	40
3	Yeosu	204	2.066	40
4	Yeosu	317	2.042	40
5	Yeosu	300	1.958	40
6	Jangheung	231	1.958	40
7	Jangheung	637	1.995	40
8	Jangheung	383	2.054	40
9	Jangheung	188	1.933	40
10	Jangheung	300	2.030	40

Microsatellite의 대립유전자 크기가 결정된 데이터 정보는 Micro-Checker 프로그램 (Oosterhout *et al.*, 2004) 을 이용하여 null allele로 인한 유전자 분석 오류 (genotyping error) 를 확인하였고, 다형성 정보량 지수 (Polymorphic Information Content, PIC) 를 측정하기 위해 Cervus ver. 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) 의 대립유전자 빈도 분석법을 적용하여 산출하였다.

Arlequin version 3.1 소프트웨어 (Excoffier *et al.*, 2005) 및 GENEPOP version 4.0 computer package 프로그램 (Rousset, 2008) 을 이용하여 대립유전자 수 (Number of Alleles, NA) 를 관찰하였으며, 관찰치 이형접합률 (Observed Heterozygosity, HO) 과 Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) 에서의 기대치 이형접합률 (Expected Heterozygosity, HE) 을 계산하였다.

결과 및 고찰

1. DNA 품질 검증 및 라이브러리 제작

새조개의 microsatellite 마커 개발을 위해 2021년 여수 (N = 38) 와 장흥 (N = 34) 집단에서 채집하였으며, 이 중 10 개체를 선택하여 DNA를 추출하였다.

추출한 DNA는 NanoDrop-1000 Spectrophotometer (Thermo scientific, USA) 및 Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA) 를 이용하여 정성적 및 정량적을 평가하였다. 그 결과, DNA의 순도는 260/280 비율이 1.933에서 2.066 사이로 나타났으며, DNA의 농도는 188 ng/μl에서 637 ng/μl 사이로 나타나 추출한 DNA가 NGS 분석에 적합한 것으로 확인되었다 (Table 1). 이후, 1% (w/v) 아가로스 겔 (agarose gel) loading을 통해 DNA의 품질 (Quality control) 을 검증하였으며, 품질이 검증된 DNA는 적절한 크기로 조각을 낸 후, 어댑터 (adapter) 를 추가하여 라이브러

리를 제작하였다. 이 라이브러리로부터 얻은 DNA 조각들을 bcl2fastq2 v2.20 (Illumina, USA) 소프트웨어를 사용하여 BCL (Base Call) 파일을 역다중화 (demultiplexed) 하여 FASTQ 파일로 변환한 후, 2100 BioAnalyzer (Agilent, USA) 를 이용하여 생성된 DNA fragment 라이브러리의 크기 분포와 품질을 확인하였다. 품질이 높은 데이터를 생산하기 위해 라이브러리 DNA 양과 농도 기준을 최소 0.2 ug이상 농도는 최소 4 ng/ul 이상 되도록 설정하였다. 그 후, 차세대 염기서열 분석 장비인 NovaSeq6000 (Illumina, USA) 를 이용하여 플로우 셀 (flow cell) 에 DNA 시료를 loading한 후, 이를 복제하여 클러스터 (cluster) 를 형성하였다. 클러스터링 (clustering) 이 완료되면 발광 신호를 통해 염기서열 정보를 획득하였으며, Paired-end 시퀀싱을 통해 각 DNA 조각의 양쪽 끝에서 시퀀싱을 수행하여 염기서열 정보를 생성하였다. 이 과정을 거쳐 총 두 개의 라이브러리가 생산되었다. 이 중 하나는 reference genome sequencing을 위해 이용되었으며, 나머지 하나는 polymorphic microsatellite 발견을 위한 pooling된 데이터로 이용되었다. 두 개의 라이브러리는 각각 151 bp의 Paired-end 라이브러리로 제작되었으며, 단일 시료로 시퀀싱된 데이터는 약 49 Gb (49,013,102,986 bp) 의 크기를 가졌으며, microsatellite 예측을 위해 pooling된 데이터는 약 50 Gb (49,917,473,394 bp) 의 크기를 가졌다 (Table 2). 염기서열의 정확도를 나타내는 Q20 값이 평균 95.37%로 나타났으며, 이는 시퀀싱된 염기 중 대부분이 정확한 위치에 매핑되었다는 것을 의미한다 (Kim *et al.*, 2021; Song and Chung, 2019). 또한 GC의 비율 평균이 38.28% 로 확인되었다

2. Microsatellite 탐색 및 다형성 확인

NGS 방법으로 분석된 염기서열들은 짧은 리드 (Short reads) 를 제거하기 위해 전처리 과정 (pre-processing) 을

Table 2. Statistics of microsatellite detection

Statistics of Sequencing raw data						
Sample	No. of reads	Avg. length (bp)	Total length (bp)	GC (%) ^{*1}	Q20 (%) ^{*2}	Genome cov. ^{*3}
Pooling_Library	330,579,294	151	49,917,473,394	38.28	95.47	56.40
<i>Fulvia mutica</i>	324,590,086	151	49,013,102,986	38.28	95.26	55.38
Total	327,584,690		49,465,288,190	38.28	95.37	55.89
Statistics of PCR duplicate removal data						
Sample	No. of reads	Total length (bp)	GC (%) ^{*1}	Genome cov. ^{*3}		
Pooling_Library	317,030,174	46,614,829,461	38.11	52.67		
<i>Fulvia mutica</i>	310,567,258	45,577,995,369	38.08	51.5		
Total	313,798,716	46,096,412,415	38.10	52.09		

^{*1} GC (%): GC content.

^{*2} Q30 (%): Ratio of bases that have phred quality score of over 20.

^{*3} Genome cov.: The total read length of each sample divided by the expected genome size.

Table 3. Statistics of assembled contig

Sample	Hash length (<i>k-mer</i>) ^{*1}	Num. of contigs	Length (bp) of contigs				
			Total length	MIN	MAX	AVG	N50 ^{*2}
<i>Fulvia mutica</i>	CLC_assembler v5.2.1 with the default setting	675,057	85,020,821	200	112,692	1311.03	2,629

^{*1} *K-mer*: assembly *k-mer* length.

^{*2} N50: Contig and scaffold length corresponding to 50% of the total number of total nucleotide sequences produced when accumulating in descending order for the generated contigs and scaffolds.

진행하였다. 전처리 과정은 PCR 중복 리드를 제거한 후, Trimmomatic (v0.36) 프로그램을 이용하여 어댑터 (sequence adapter) 및 저품질 (base quality) 리딩을 제거 하였다. 이러한 과정을 통해 데이터의 품질을 향상시키고 후속 분석의 정확성을 높였다. 원시 데이터 (raw data) 의 경우 49,465,288,190 bp였으나, 전처리 후에는 46,096,412,415 bp로 약 6.62%의 염기서열이 제거되었으며, 전처리된 46,096,412,415 bp의 염기서열을 CLC_assembler를 사용하여 각각 de novo 어셈블리 하였다. 이 과정에서 약 885 Mb (885,020,821 bp) 의 새로운 genome 서열을 얻었다 (Table 3). CLC_assembler를 통해 얻은 assembled contig 서열을 SSRIT (Simple Sequence Repeat Identification Tool) 를 이용하여 microsatellite 구간을 탐색하기 위해 다음과 같은 기준으로 적용하였다. Microsatellite의 길이는 18-20 bp로 설정하고 Di-nucleotide motif (2개) 의 경우 9번 반복, Tri-nucleotide motif (3개) 는 6번 반복, Tetra-nucleotide motif (4개) 는 5번 반복, Penta-nucleotide motif (5개) 는 4번 반복, 그리고 hexa-nucleotide motif (6개) 는 3번 반복

되도록 설정하였다. Microsatellite를 탐색한 결과, 총 675,057개의 genome scaffold 중 107,985개에서 microsatellite가 탐색되었으며, 이 중 두 개 이상의 microsatellite 가 탐색된 genome scaffold는 66,526개로 확인되었다. 이는 전체 genome scaffold의 약 9.86%에 해당된다 (Table 4). 각 개체별로 서열을 탐색한 결과, Di-nucleotide motif (23,164개), Tri-nucleotide motif (37,526개), Tetra-nucleotide motif (33,034개), Penta-nucleotide motif (5,601개), Hexa-nucleotide motif (7,147개), Hepta-nucleotide motif (1,513개) 로 나타났다. 각 motif 의 반복횟수는 최소 3번에서 21번 이상까지 나타났다 (Table 4). 이 중 Tri-nucleotide의 비율이 가장 높았으며, Hepta-nucleotide가 가장 낮은 비율을 나타냈다. 또한, Di-nucleotide motif 중에서 9번 반복되는 경우가 가장 많았으며, motif 반복 범위도 21번 이상까지 확인되었다. Tri-nucleotide motif의 경우 6번 반복되는 경우가 11,345 개, Tetra-nucleotide motif는 5번 반복되는 경우가 17,435 개, Penta-nucleotide motif는 4번 반복되는 경우가 3,986

Table 4. Statistics of microsatellite detection

Searching items	Counts
Genome scaffold	675,057
Identified SSRs	107,985
Genome scaffold containing SSRs	66,526
Di-nucleotide motif	23,164
Tri-nucleotide motif	37,526
Tetra-nucleotide motif	33,034
Penta-nucleotide motif	5,601
Hexa-nucleotide motif	7,147
Hepta-nucleotide motif	1,513
Total	107,985

Table 5. Statistics by microsatellite type

Motif	di	tri	tetra	penta	hexa	hepta
3	-	-	-	-	6,263	1,312
4	-	-	-	3,986	676	114
5	-	-	17,435	887	136	47
6	-	11,345	6,883	305	39	11
7	-	6,600	3,101	135	11	4
8	-	4,508	1,607	73	5	5
9	5,651	3,311	982	49	4	1
10	3,168	2,593	624	37	5	-
11	2,310	2,018	500	32	3	19
Repeat	12	1,696	1,536	392	13	-
	13	1,383	1,165	303	8	-
	14	1,040	1,009	258	20	-
	15	962	788	202	19	-
	16	807	639	179	9	-
	17	695	457	109	5	-
	18	593	365	95	4	-
	19	498	296	79	5	-
	20	500	240	62	4	-
	>= 21	3,861	656	223	10	-
Total	23,164	37,526	33,034	5,601	7,147	1,513

개, Hexa-nucleotide motif는 3번 반복되는 경우가 6,263개로 가장 높은 빈도를 나타내었다 (Table 5). 이러한 결과는 NGS 방법을 이용하여 수산 자원인 참굴을 연구한 결과와 비교했을 때, microsatellite의 분포 양상이 유사하나, 새조개에서 탐색된 microsatellite의 개수와 프라이머 쌍 비율이 더 높은 것으로 나타났다 (Dong *et al.*, 2022). 탐색된 107,985개의 microsatellite 중에 genome 구조 정보를 기반으로 한 microsatellite 마커의 위치 분포를 조사한 결과, 총 105,632개의 microsatellite가 나타났으며, 이 중 코딩 영역에 속한 마커는 5,668개 (5.37%) 이며, 나머지 마커는 3'-URT (861개, 0.82%), 5'-URT (694개, 0.66%), 그리고 Intergenic

(98,409개, 93.16%) 영역에 위치하였다 (Table 6).

유전자의 각 영역에 포함된 총 105,632개의 microsatellite 마커 후보군을 대상으로 CLC Genomics Workbench의 Map Reads to Reference와 Indels and Structural Variants 프로그램을 사용하여 다형성 정보를 확보하였으며, Map Reads to Reference를 이용하여 리드를 reference genome에 mapping하고, Indels and Structural Variants를 이용하여 microsatellite 주변의 다양한 변이를 파악하였다. 이를 통해 3,723개의 microsatellite 마커 위치에서 다형성 정보를 확인하였다.

Table 6. Distribution of microsatellite loci

	di	tri	tetra	penta	hexa	hepta	Total
3'-UTR	189	377	207	32	42	14	861
5'-UTR	145	304	170	20	44	11	694
CDS	1,730	2,952	536	28	414	8	5,668
Intergenic	20,529	33,087	31,444	5,396	6,504	1,449	98,409
Total							105,632

Table 7. Characteristics of 14 microsatellite loci developed in *Fulvia mutica*

No	Name	Primer Sequence (5'→3')	Repeat	Dye	Tm(°C)
1	FM32	F-TGACGCATATTTTCCAAGATCCAC R-TGTTTGTACTTAGAATCTACCCCGA	(TAC) ₁₀	FAM	60
2	FM37	F-ATGGCGACTTTGTTCTATCCGT R-GTTGCGCTGTCTATCGTTACAC	(TTA) ₁₁	FAM	60
3	FM41	F-TGGCGAATTTGGATTTTGGTGA R-TTCGCCGTTCAACCAAGAAATC	(TTG) ₇	HEX	60
4	FM61	F-TCGAGTCTTTAACCACGCTTGA R-CCCCGTATCAGATTGTCGCATA	(AAT) ₁₀	TAMRA	60
5	FM71	F-ATGCAACCCAGAGTACAAGCTT R-TCTCATATTGGAAGGTCAACAGA	(TCTG) ₆	TAMRA	60
6	FM77	F-TAACTTCCAACCTTACGCCGAA R-TTGGCGGAGTCTAGTTAAGCA	(TGAA) ₁₀	TAMRA	60
7	FM85	F-AGTGGATGACTTTGGAAGACGA R-GCAGTACACAGGTTTCATGTCG	(CAGA) ₆	FAM	58
8	FM91	F-CTGTGCAGGGATAAGACAGGTT R-AGGCTCAACAGAATTTTCATGGT	(TGTC) ₇	TAMRA	60
9	FM96	F-GAGGTGAGCTGTGAGAATCGAT R-TGGTTTGAAAGAGACAGAGCGA	(CGTC) ₇	HEX	60
10	FM105	F-CCGGAATGTGAGAGTAAGTCCA R-CGAACACTGCTAAAACGATACACA	(ATT) ₁₄	HEX	60
11	FM126	F-CCCGGTTCTGTATTGTTCCCTCT R-TGGTGTGAAAGACTGAGGCAT	(TGGA) ₁₀	FAM	60
12	FM129	F-CGCCGAAATAACAGCACAATGA R-AGACCAAAGAAAATTCAGCGGC	(AAT) ₁₀	HEX	60
13	FM138	F-CATGAGTAGGGGCAGTGGTTAA R-GTGCCTCCATTACGTTTGTAT	(TAT) ₁₄	HEX	60
14	FM149	F-AGTCGCCTTATCTGTTGAACGT R-GACTCCGACATTGACACAGCTA	(AATA) ₈	HEX	60

3. Microsatellite 마커 제작

탐색된 3,723개의 microsatellite 구간에서 서로 중복되는 microsatellite motif가 없도록 지정하고, 반복 수 길이가 10 bp 이상이며, 증폭산물 크기가 100-300 bp, 프라이머 크기가 18-25 bp, 적정 온도 (Tm) 가 55-65°C, GC 함량이 50%인

조건을 충족하는 microsatellite 마커 후보군 150개를 선별하였다. 선별된 150개의 서열 중 증폭산물의 위치, 반복 연기의 종류, 프라이머의 크기 등을 고려하여 82개의 microsatellite 마커 후보를 1차 선별하였다. 1차로 선별된 82개의 microsatellite 마커 후보에 형광물질 (dye) 를 부착시켜

Table 8. Genetic variabilities at 14 microsatellite markers in the 2 population of *Fulvia mutica*

Loci	Locus														Mean	
	FM32	FM37	FM41	FM61	FM71	FM77	FM85	FM91	FM96	FM105	FM126	FM129	FM138	FM149		all loci
Yeoshu (N = 38)	N _A	11	19	9	13	9	8	7	9	7	12	7	12	7	11	10
	H _O	0.789	0.974	0.658	0.947	0.868	0.842	0.763	0.868	0.579	0.868	0.500	0.895	0.711	0.737	0.765
	H _E	0.852	0.933	0.791	0.911	0.763	0.804	0.703	0.810	0.663	0.872	0.545	0.856	0.640	0.686	0.748
	F _{IS}	0.074	-0.045	0.17	-0.04	-0.14	-0.049	-0.087	-0.073	0.128	0.004	0.083	-0.046	-0.112	-0.076	-0.023
	PIC	0.821	0.915	0.749	0.891	0.716	0.763	0.642	0.776	0.613	0.846	0.511	0.828	0.599	0.65	0.712
	HWE	0.238	0.813	0.042	0.362	0.717	0.678	0.995	0.739	0.067	0.418	0.061	0.468	0.527	0.694	0.503
Jangheung (N = 34)	N _A	9	18	10	14	9	6	9	10	6	11	7	12	7	12	10
	H _O	0.853	0.941	0.794	0.824	0.824	0.794	0.941	0.882	0.706	0.882	0.529	0.765	0.647	0.794	0.769
	H _E	0.845	0.927	0.822	0.902	0.780	0.784	0.780	0.854	0.704	0.888	0.601	0.790	0.639	0.769	0.762
	F _{IS}	-0.009	-0.015	0.035	0.088	-0.057	-0.013	-0.21	-0.034	-0.003	0.006	0.121	0.033	-0.013	-0.034	-0.009
	PIC	0.812	0.907	0.786	0.878	0.742	0.737	0.74	0.823	0.64	0.862	0.571	0.753	0.601	0.742	0.727
	HWE	0.529	0.61	0.807	0.56	0.726	0.869	0.465	0.468	0.992	0.387	0.134	0.304	0.556	0.552	0.566
Mean all loci	N _A	10	19	10	14	9	7	8	10	7	12	7	12	7	12	10
	H _O	0.821	0.958	0.726	0.886	0.846	0.818	0.852	0.875	0.643	0.875	0.515	0.830	0.679	0.766	0.767
	H _E	0.849	0.930	0.807	0.907	0.772	0.794	0.742	0.832	0.684	0.880	0.573	0.823	0.640	0.728	0.755
	F _{IS}	0.033	-0.030	0.103	0.024	-0.099	-0.031	-0.149	-0.054	0.063	0.005	0.102	-0.007	-0.063	-0.055	-0.016
	PIC	0.817	0.911	0.768	0.885	0.729	0.750	0.691	0.800	0.627	0.854	0.541	0.791	0.600	0.696	0.720
	HWE	0.384	0.712	0.425	0.461	0.722	0.774	0.730	0.604	0.530	0.403	0.098	0.386	0.542	0.623	0.535

N_A = number of alleles per locus; H_O = observed heterozygosity; H_E = expected heterozygosity; F_{IS} = inbreeding coefficient; PIC = polymorphic information content.

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

PCR 증폭, 산물 크기, 유전자형 다형성 등을 확인하여 60개 microsatellite 마커 후보를 2차 선별하였다. 2차로 선별된 60개 microsatellite 마커 후보에서 전 집단 unll 존재 여부, 대립유전자 수 및 대립유전자 출현 빈도 및 이형적합도 (heterozygosity) 등을 고려하여 최종적으로 14개의 microsatellite 마커를 선별하였다. (Table 7). 새롭게 개발된 14개 microsatellite 마커로 우리나라 새조개 집단에 적용하여 유전적 다양성 및 유전학적 특성 분석을 수행하였다.

4. Microsatellite 마커의 효율성 검증

새롭게 개발된 14개의 microsatellite 마커를 이용하여 2021년 여수 (N = 38) 와 장흥 (N = 34) 집단의 새조개를 대상으로 효율성 검증을 수행하였다. Microsatellite 마커의 다형성 정보량을 나타내는 다형성 정보 지수 값이 0.5 이상인 경우, 충분한 개체식별력을 갖는 효율적인 마커로 보고되고 있으며 (Botstein *et al.*, 1980), 본 연구에서 개발한 14개 microsatellite 마커의 다형성 정보 지수 값은 0.599에서

0.907의 범위를 가지며, 평균은 0.756이다. 또한, null 대립 유전자 분석 결과에서는 14개의 microsatellite 마커에서 null allele, large allele dropout, scoring errors가 발견되지 않았으며, 이는 새조개 집단의 유전적 변이를 분석하는데 유용한 마커로 판단된다 (Table 8).

새조개 집단 내에서 산출된 대립유전자 수 (N_A) 는 평균 11개였으며, 관찰이형적합률 (H_O) 은 0.615에서 0.937으로 평균 0.790으로 나타났다. 기대이형적합률 (H_E) 은 0.629에서 0.924이며, 평균 0.790 범위로 나타났다 (Table 8). 이는 Martinez *et al.* (2009) 의 N_A 평균 9개 및 H_O과 H_E의 평균 0.530에서 0.726 범위 결과 값보다 더 높게 나타났다. 또한, 해산 어류의 평균인 0.79 (Barinova *et al.*, 2002) 와 동일한 결과를 보여주어 새로 개발된 14개의 microsatellite 마커가 새조개의 유전적 다양성을 분석하는데 유용한 마커로 판단된다.

본 연구는 NGS 방법을 이용하여 새조개의 새로운 염기서열 정보를 대량으로 확보하였으며, 이를 기반으로 최종 14개의

microsatellite 마커를 개발하였다. 최종 개발된 마커는 충분한 재현성과 다양성을 갖추어 새조개의 유전적 다양성을 분석하는데 유용한 마커로 판단되었다. 향후, 새롭게 개발된 14개의 microsatellite 마커를 이용하여 새조개의 유전적 다양성 및 집단 구조를 분석하고, 인공종묘생산을 체계적으로 관리하는데 활용될 것이다. 더 나아가, 이러한 유전학적 특성을 활용하여 유전학적 특성, 방류 효과 조사, 선발 육종, 교배 지침 등 종 보전을 위한 유전학적 기초 자료로 제공하고자 한다.

요 약

본 연구는 차세대 염기서열 분석(NGS) 방법을 이용하여 새조개 (*Fulvia mutica*)의 microsatellite 마커를 개발하고, 개발한 마커를 이용하여 새조개 집단의 유전학적 특성을 분석하기 위해 수행되었다. 차세대 염기서열 분석 장비인 NovaSeq6000 (Illumina, USA) 을 이용하여 약 50 Gb (49,465,288,190 bp) 의 염기서열을 얻어 어셈블리를 실행한 결과, 전체의 약 0.63%에 해당하는 313,798,716개의 리드가 어셈블리 되었으며, 이 리드의 총 길이는 46,096,412,415 bp 로 확인되었다. 리드 크기가 500 bp 이상이 되는 contig는 675,057개로 확인되었으며, 이 중 microsatellite 영역을 포함하는 contig는 107,985개 (15.9%) 로 확인되었다.

107,985개의 microsatellite 영역에 대한 microsatellite 마커의 위치 분포를 조사한 결과, 총 105,632개의 microsatellite 위치 분포가 나타났으며, 이 중 3,723개 (3.5%)의 microsatellite 마커 위치에서 다형성 정보를 확인하였다. PCR 증폭 여부를 통해 microsatellite 마커 후보 150개를 1차로 선별하였고, 2차로 형광표지를 부착하여 82개의 microsatellite 마커 후보를 선별하였다. 선별된 82개의 microsatellite 마커 후보에 PCR 증폭여부, 산물크기, 유전자 다형성 등을 확인한 후, 최종적으로 14개의 microsatellite 마커를 최종 선별하였다. 새로 개발한 14개의 microsatellite 마커를 이용하여 새조개 집단을 대상으로 분석한 결과, 관찰된 유효 대립유전자 수 (NA) 는 평균 11 (7-18개) 개로 나타났다. 평균 관측치 이형접합도 (HO) 는 0.790 (0.615-0.937), 평균 기대치 이형접합도 (HE) 는 0.790 (0.629-0.924) 으로 확인되었으며, 이는 해산어의 평균 값인 0.79와 동일한 수치를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 개발한 14개의 microsatellite 마커는 새조개 집단의 유전학적 특성 분석에 유용할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2024년도 국립수산물연구원 수산과학연구사업

(R2024018) 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.
- Bae, T.J., Kang, D.S. and Choi, O.S. (1996) Identification of Pigment Separated from Cockle Shell. *Journal of Korean Society Food Science Nutrition*, **25**(6): 1074-1079.
- Barinova, A.A., Kumagai, K., Nakajima, M. and Taniguchi, N. (2002) Identification and characterization of microsatellite DNA markers developed in threeline grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Suisanzousyoku*, **32**: 27-32.
- 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. *The American Journal of Human Genetics*, **32**(3): 314-331.
- Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**(15): 2114-2120.
- Chang, Y.J. and Lee, T.Y. (1982) Gametogenesis and reproductive cycle of the Cockle of *Fulvia mutica* (Reeve). *Bulletin of Korean Fisheries Society*, **15**(3): 241-253.
- Cho, Y.G., McCouch, S.R., Kuiper, M., Kang, M.R., Pot, J., Groenen, J.T.M. and Eun, M.Y. (1998) Integrated map of AFLP, SSLP and RFLP markers using a recombinant inbred population of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **97**: 370-380.
- Dong, C.M., Lee, H.M., Lee, M.N., Noh, E.S., Nam, B.H., Kim, Y.O. and Kim, E.M. (2022) Development of new Microsatellite DNA Markers Using Next-generation Sequencing in pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Korean Journal of Malacology*, **38**(3): 129-138.
- Evans, B., Bartlett, J., Sweijid, 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*, **1**: 47-50.
- 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.
- Hotta, M., 1977. On rearing the larvae and young of egg cockle, *Fulvia mutica* (Reeve). (Preliminary report). *Bulletin of the Hiroshima Fisheries Experimental Station*, **9**: 46-53.

- Inoue, T. (1955) Ecological studies of *Fulvia mutica* (Reeve)-II Spawning season. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **21**(1): 27-29.
- 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.
- Kandeel, K.E., Mohammed, S.Z., Mostafa, A.M. and Abd-Alla, M.E. (2017) Population Dynamics of the Cockle *Cerastoderma glaucum*: A comparison between Lake Qarun and Lake Timsah, Egypt. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **17**: 945-958.
- 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.
- 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*) broodstock. *Korean Journal of Ichthyology*, **27**(1): 10-15.
- Kim, K.S., Ha, B.S., Bae, T.J., Jin, J.H. and Kim, H.J. (1993a) Comparison of Food Components in the Raw, Cooked Meat and Cooked Meat Extracts of Cockle Shell 1. Proximate compositions and lipid components. *Bulletin of the Korean Fisheries Society*, **26**: 102-110.
- Kim, K.S., Ha, B.S., Bae, T.J., Jin, J.H. and Kim, H.J. (1993b) Comparison of Food Components in the Raw, Cooked Meat and Cooked Meat Extracts of Cockle Shell 2. Nitrogenous compounds and minerals. *Bulletin of the Korean Fisheries Society*, **26**: 111-119.
- Kim, S.G., Morishima, K., Satoh, N., Fujioka, T., Saito, S. and Arai, K. (2007) Parentage assignment in hatchery population of brown sole *Pleuronectes herzensteini* by microsatellite DNA markers. *Fisheries Science*, **73**: 1087-1093.
- Koren, S., Walenz, B.P., Berlin, K., Miller, J.R., Bergman, N.H. and Phillippy, A.M. (2017) Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation. *Genome research*, **27**(5): 722-736.
- KOSIS (2020) Fishery Production Trend Survey Report. Korean statistical information service. Retrieved April 19, 2021, from <http://kosis.kr>.
- Mardis, E.R. (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **9**: 387-402.
- Martínez, L., Arias, A., Méndez, J., Insua, A. and Freire, R. (2009) Development of twelve polymorphic microsatellite markers in the edible cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Cardiidae). *Conservation Genetics Resources*, **1**: 107-109.
- Matsuoka, Y., Tanaka, S. and Ikuta, T. (1968) Technical study on seed production of *Fulvia mutica*. *Contributions from Fisheries Station, Kyoto Prefecture*, **31**: 13-27.
- Min, D.K., Lee, J.S., Koh, D.B. and Je, J.G. (2004) Mollusks in Korea. Min Molluscan Research Institute, Hangeul Graphics, Busan. p. 433.
- Nishihiro, T. (1980) Studies on the artificial production of cockle, *Fulvia mutica*, 1: Inducing spawning and the early development. *Bulletin of the Kyoto Institute of Oceanic and Fishery Science*, **4**: 13-17.
- Norris, A.T., Bradley, D.G. and Cunningham, E.P. (2000) Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, **182**: 73-83.
- Oosterhout, C.V., 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.
- Paetkau, D. (1999) Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. *Biotechniques*, **26**(4): 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.
- Pinggera, A., Mackenroth, L., Rump, A., Schallner, J., Beleggia, F., Wollnik, B. and Striessnig, J. (2017) New gain-of-function mutation shows CACNA1D as recurrently mutated gene in autism spectrum disorders and epilepsy. *Human Molecular Genetics*, **26**(15): 2923-2932.
- 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.
- Rousset, F. (2008) GENEPOP007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**(1): 103-106.
- 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.
- 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.
- Yang, H.S., Kang, D.H., Park, H.S. and Choi, K.S. (2011) Seasonal Changes in Reproduction and Biochemical Composition of the Cockle, *Fulvia mutica* Reeve (1884), in Cheonsu Bay off the West Coast of Korea. *Journal of Shellfish Research*, **30**(1): 95-101.
- Yu, H., Xie, W., Wang, J., Xing, Y., Xu, C., Li, X., Xiao, J. and Zhang, Q. (2011) Gains in QTL detection using an ultra-high density SNP map based on population sequencing relative to traditional RFLP/SSR markers. *PLoS One*, **6**(3): e17595.