

해삼(*Stichopus japonicus*)의 microsatellite 유전자형 분석을 위한 multiplex PCR 시스템 개발

심용택* · 이철상¹*

miDNA유전체연구소, ¹군산대학교 생물학과

Development of a Multiplex PCR System for Microsatellite Genotyping of the Sea Cucumber *Stichopus japonicus*

Yong-Teak Sim* and Chul-Sang Lee¹*

miDNA Genome Research institute, Kunsan 54156, Korea

¹Department of Biology, Kunsan National University, Kunsan 54150, Korea

A multiplex PCR system comprising 14 microsatellite markers was developed for genotyping analysis of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. A total of 286 samples were used to evaluate genetic polymorphisms and forensic parameters of the microsatellite loci. In a single PCR reaction, all 14 loci were uniformly amplified and a total of 269 alleles were identified. The AJ19024 locus had the largest number of alleles (46), and its discriminatory power and exclusion power were 0.99 and 0.76, respectively. The fewest alleles (8) were present at the Psj2575 locus, which provided the lowest discriminatory power (0.81) and exclusion power (0.20). The mean number of alleles, mean heterozygosity, mean discrimination power and mean exclusion power per locus were 19.21, 0.70, 0.93, and 0.46, respectively. The combined matching probability for the 14 loci was 9.64×10^{-19} , and the combined power of exclusion was 0.999995. Thus, the forensic parameters evaluated in the present study demonstrated the utility of our multiplex PCR system for biological tracing methods, such as individual identification and paternity testing, in the sea cucumber.

Key words: Sea Cucumber, *Stichopus japonicus*, Multiplex, Microsatellite, Identification

서론

해삼(sea cucumber)은 전세계에 약 1,714종이 보고 되었으며 이중 약 20여종을 식용으로 이용하고 있다(Paulay, 2014). 특히 돌기해삼(*Stichopus japonicus*)은 한국, 중국 그리고 일본인들이 선호함에 따라 부가가치가 상승하고 있으며, 이에 따라 종묘 생산 및 방류사업이 활발히 진행되고 있다(Park et al., 2013). 이와 더불어 국내에서는 외국산 해삼 종묘가 불법적으로 국내 연안에 방류되는 사례가 보고되고 있는데(Kim and Lee, 2016), 외국산 종묘의 방류는 수중 생태계를 교란할 뿐만 아니라 외래 질병 및 기생충 전파의 원인이 될 수도 있다(Purcell et al., 2016). 따라서 생태계 교란과 질병의 전파를 예방하고, 국내의 해삼 종묘생산업 보호하기 위해서는 국내에서 생산된 해삼임을 추적할 수 있는 개체식별 및 친자확인 검사와 같은 생물학적

추적검사시스템의 확립이 절실히 요구된다.

대표적인 생물학적 추적검사시스템으로 게놈 DNA 염기서열 중 특정 염기서열군이 반복적으로 배열된 microsatellite 좌위의 다형성(polymorphism)을 분석하는 방법이 있다(Jeffreys et al., 1985). Kanno et al. (2005)은 일본의 돌기해삼에서 반복서열 탐침자를 이용해 Psj microsatellite 좌위 20개를 찾았으며, Zhan et al. (2007)과 Chen et al. (2013)은 한국, 중국, 러시아 그리고 일본에서 채집한 돌기해삼에서 AH와 AJ microsatellite 좌위를 각각 45개씩 발굴하였다. 우리나라에서는 남한 전체 해역에서 수집된 해삼에 대해 Kanno et al. (2005)이 발굴한 Psj microsatellite 좌위 9개에 대한 대립유전자 다형성을 연구한 바 있다(Kim et al., 2008). 하지만 이들 연구는 해삼에서 microsatellite 좌위를 발굴하거나, 서식지역에 따른 개체군의 계통유전학적 유연관계를 연구하기 위함이었다(Kang et al., 2011).

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0806>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(6) 806-811, December 2017

Received 6 November 2017; Revised 27 November 2017; Accepted 12 December 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 10. 3515. 7690 Fax: +82. 63. 471. 5663

E-mail address: Loud2004@kunsan.ac.kr

기존 연구들의 microsatellite 분석 방법은 한번의 PCR반응으로 1-3개 좌위를 분석하는 방식이기에, 다수의 시료를 대상으로 여러 좌위의 특성을 분석해야 하는 개체식별 및 친자확인 분석에 적용하기에는 비용과 시간적 측면에서 매우 비효율적이라 할 수 있다. 따라서 개체식별 및 친자확인을 위한 DNA microsatellite 분석을 위해서는 한번의 PCR반응으로 10개 이상의 좌위를 동시에 증폭하는 다중증폭효소연쇄반응(multiplex PCR)을 적용하는 것이 비용과 시간적 측면에서 매우 유용하다 할 것이다(Krenke et al., 2002). 하지만 이 경우에는 수 많은 대립유전자들을 한번에 명확하게 구분할 수 있어야 하기에, 목적한 PCR 산물 이외의 비특이적 증폭 또는 stutter peak의 생성을 최소화하기 위한 최적 증폭시발체(primer)의 선별 및 다중증폭효소연쇄반응의 최적 조건 확립 연구가 선행되어야 한다(Berg et al., 2000). 또한 자동염기서열분석장치 등 자동화 장치를 통해 분석의 재현성과 신뢰성을 극대화하여 결과의 과학적 안정성을 확보하여야 한다(Hill et al., 2009). 이 같은 조건이 만족된다면 해당 DNA microsatellite multiplex PCR 분석법은 서식 환경 내 모든 해삼 개체를 구별할 수 있는 높은 누적개체식별력(combined power of discrimination)과 신뢰성있는 친자확인 분석을 가능케 할 높은 누적부권배제력(combined power of exclusion)을 나타내 주어야 한다(Turrina et al., 2014).

본 연구에서는 국내 돌기해삼(*Stichopus japonicus*)의 게놈 DNA에서 2 또는 3 염기 반복서열을 갖는 14개 microsatellite 좌위, AH075, AH204, AH025, AH198, AJ19270, AH028, AJ03, AJ78245, AJ08658, Psj2575, Psj2409, AJ14707, AJ19024 및 AH144를 한꺼번에 증폭시킬 수 있는 multiplex PCR 시스템을 개발하였으며, 이를 이용하여 서해안에서 채집된 해삼 286 개체의 유전자형을 조사하고, 이들의 법과학적 지표들을 분석함으로써 이 시스템의 해삼 개체식별 및 친자확인 검사 활용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

시료의 수집 및 DNA추출

해삼 시료는 인천에서 70개체, 대천에서 70개체, 군산에서 74개체, 부안에서 72 개체를 수집하였다. DNA추출은 해삼돌기 끝부분 약 2 mm를 잘라 Ivanova et al. (2006)의 방법에 따라 추출 하였다.

Multiplex PCR 과 Genotyping

연구에 사용된 좌위는 Zhan et al. (2007), Chen et al. (2013), Kanno et al. (2005)이 보고한 돌기해삼의 microsatellite 좌위들 중에서 대립유전자 수가 8개 이상이고, multiplex 반응에서 증폭효율이 상대적으로 높으며, 대립유전자의 분포가 서로 겹치지 않는 좌위 14개를 선정하였다. Multiplex PCR에 반응을 위해서 시료 DNA 약 10-30 ng, hot-start Taq polymerase (Ge-

netbio, Korea) 1 unit, 10X PCR buffer 2 μ L, dNTP 200 mM, MgCl 2 mM, 그리고 primer mix 2 μ L를 혼합하여 최종 반응 용액이 15 μ L가 되게 하였다. 분석에 이용한 혼합 primer쌍의 염기서열은 Table 1과 같다. PCR은 GeneAmp PCR[®] System 9700 (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 40초(ramp 50%), 72 $^{\circ}$ C에서 40초(ramp 60%)의 조건으로 30 cycle을 수행하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응물은 증류수로 20배 희석하고 0.2 μ L를 취해 GeneScan[™] 500 LIZ (Applied Biosystems, USA)와 Hi-Di[™] Formamide (Thermo Fisher Scientific, USA)를 함께 혼합하여 98 $^{\circ}$ C에서 1분간 변성시킨(denaturation) 다음, POP-7[™] polymer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 채운 36 cm 모세관을 장착한 Applied Biosystems 3130x1 자동염기서열분석장치(Applied Biosystems, USA)에서 60 $^{\circ}$ C로 전기영동하였다. 유전자형(genotype) 분석은 GeneMapper[®] ID v3.1 (Applied Biosystems, USA)에서 500 LIZ size standard와 비교하여 대립유전자를 분석하였다.

법과학적 지표의 산출

FSTAT 2.9.3 프로그램(Lausanne University, Switzerland)을 이용하여 각 좌위별 유전자다양성(gene diversity), 대립유전자 수(number of alleles)를 산출하였다(Goudet, 2001). 하디-와이버그 평형상태(hardy-weinberg equilibrium exact test, HWE) 검정은 GENEPOP v4.2을 통해 dememorization number=10,000, number of batches=5,000 그리고 number of iterations per batch=10,000의 조건으로 수행하였다(Guo and Thompson, 1992). 정보력(polymorphism information content), 식별력(power of discrimination), 일치율(matching probability) 그리고 배제력(power of exclusion) 등과 같은 주요 법과학적 지표들은 PowerState v1.2 프로그램(Promega, USA)을 이용해 산출하였다(Tereba, 1999). 누적일치율은 $\prod_{i=1}^n (1-P_{di})$ 공식에 따라 산출하였고 누적부권배제력은 $1-\prod_{i=1}^n (1-PE_i)$ 공식으로 구하였다(Jones, 1972; Krüger et al., 1968).

결 과

Microsatellite 14좌위의 multiplex PCR 결과 14좌위 모두 한번의 반응으로 안정적으로 증폭되었다(Fig. 1). AH025, AH028, AJ19024 좌위의 이형접합자(heterozygote)중 반복횟수가 많은 일부 대립유전자에서 주 peak의 높이와 비교해 평균 10-30% 높이의 stutter peak가 관찰되었으나, 유전자형 분석 프로그램인 GeneMapper에서 대립유전자를 자동 지정하는 과정에 아무런 영향을 끼치지 않았다. 그 외의 좌위들에서는 stutter peak가 관찰되지 않거나 주 대립유전자 peak 높이와 비교해 평균 5% 이내로 나타났다.

해삼 286 개체 게놈 DNA상의 14개 microsatellite 좌위에서 확인된 대립유전자는 총 269개였으며, 그 중 AJ19024좌위

Table 1. Primer sequences and locus characteristics for microsatellite multiplex PCR system

Locus		Primer sequence (5' to 3')	Repeat Motif	Reference
AH075	F	6-FAM-GCAACAACACTGTTTAAGCAGATAA	(GA)n	Zhan et al. (2007)
	R	GTTTCTTCCCACAGCAGAGAGTAATTC		
AH204	F	6-FAM-TTTGGTGATATTCTGGGAGTG	(AG)n	Zhan et al. (2007)
	R	GTTTCTTAAGAAGAGGGGTGCCTATTT		
AH025	F	6-FAM-GTATAGGGCTCTCATAACGATCA	(AG)n	Zhan et al. (2007)
	R	GTTTCTTGATATATGACACAAGTCCATAGC		
AH198	F	6-FAMACGTACACGTTTAGCAGAGC	(AC)n ..(AC)n	Zhan et al. (2007)
	R	GTTTCTTGATGTGTGTTCTCGGATTTG		
AJ19270	F	VIC-ATTGTCTTCTTGCCTTCCT	(TCC)n	Chen et al. (2013)
	R	GTTTCTTGAAACAGAAATGGAACCTG		
AH028	F	VIC-TCAGTTCTACAAACATATGTAATCC	(TA)n(GA)n..(GA)n	Zhan et al. (2007)
	R	GTTTCTTCCAAAGTCGGACGTTATTACC		
AJ03	F	VIC-GGTATTACATTGTATGGAAGCCTAC	(AC)n	Zhan et al. (2007)
	R	GTTTCTTCGAGTACAAGTACGGAGTTATCTG		
AJ78245	F	NED-GACACATTTTCTCCATCTCA	(TCT)n	Chen et al. (2013)
	R	GTTTCTTCTCGCTTGAAGACGATGAC		
AJ08658	F	NED-AAGGAGCCACTACGATGACG	(TGT)n	Chen et al. (2013)
	R	ACCGTCAAAACCCACAAAAA		
Psj2575	F	NED-GATGTTTCGCTAAATACATGG	(CA)n	Kanno et al. (2005)
	R	GTTTCTTCGCTCGCTTGGAGAGTAA		
Psj2409	F	NED-TCAATCATAAGGTCCCGAGT	(CA)n(AT)n	Kanno et al. (2005)
	R	GTTTCTTCGTATTCATGTCCGACAAC		
AJ14707	F	PET-CGGGATGATGACTTTGATTT	(GAG)n	Chen et al. (2013)
	R	GTTTCTGAGTTGATTGCACAAGGTT		
AJ19024	F	PET-TCGTGGA AAAAGTTGGATTTG	(GAA)n	Chen et al. (2013)
	R	GTTTCTTGCTGCTATCGGTCTCTTTTCG		
AH144	F	PET-TTCCGTTAACGCATATCTCAA	(AG)n	Zhan et al. (2007)
	R	GTTTCTTCTACATTCACGACGGGTGTA		

는 46개로 대립유전자 숫자가 가장 많았으며, 관측이형접합률 0.89, 유전자다양성지수 0.95, 유전자정보력 0.95, 식별력 0.99, 부권배제력 0.76으로 14개 좌위 중 분석한 모든 법과학적 지표들이 가장 높게 나타났다(Table 2). 반면 Psj2575좌위는 8개의 대립유전자만 발견되었고 유전자다양성지수 0.62, 유전자정보력 0.58, 식별력 0.81로 14개 좌위 중에서 가장 낮은 법과학적 지표 값을 나타냈다. HWE 평형상태 검정에서 AH204와 AH144 좌위는 각각 $p = 0.61$ 과 0.12 로 평형상태에 있었지만 이를 제외한 나머지 좌위들은 HWE 평형상태에서 이탈되어 있는 것으로 나타났다. 한편, 이형접합률과 부권배제력에서는 AH075좌위가 각각 0.52와 0.20으로 14개 좌위 중에서 가장 낮은 값을 보였다. 14개 좌위의 누적일치율은 9.64×10^{-19} 였으며, 누적부권배제력은 0.999995로 매우 높게 나타났다.

고 찰

일부 좌위의 대립유전자에서 stutter peak가 관찰되었다. Stutter peak는 연구자로 하여금 실제 대립유전자들과 혼동하게 할 수 있어 개체식별 및 친자확인 분석에서는 그 발생 비율을 매우 중요하게 취급해야 한다(Arif et al., 2010). Stutter peak은 DNA 증합효소가 microsatellite 반복염기서열을 증폭하는 과정에서 반복 구간 1-2개를 빼먹는 slippage 현상이라 할 수 있다(Walsh et al., 1996). 이런 현상이 나타난 좌위는 모두 2염기 반복서열을 갖는 AH025, AH028, AJ19024 좌위들이다. 일반적으로 2염기 반복서열 좌위의 평균 stutter peak 높이는 주 peak 높이의 30-44% 수준으로 알려져 있다(Bacher et al., 2004). 이런 연구 결과와 비교했을 때 본 연구에서 관찰된 stutter peak의

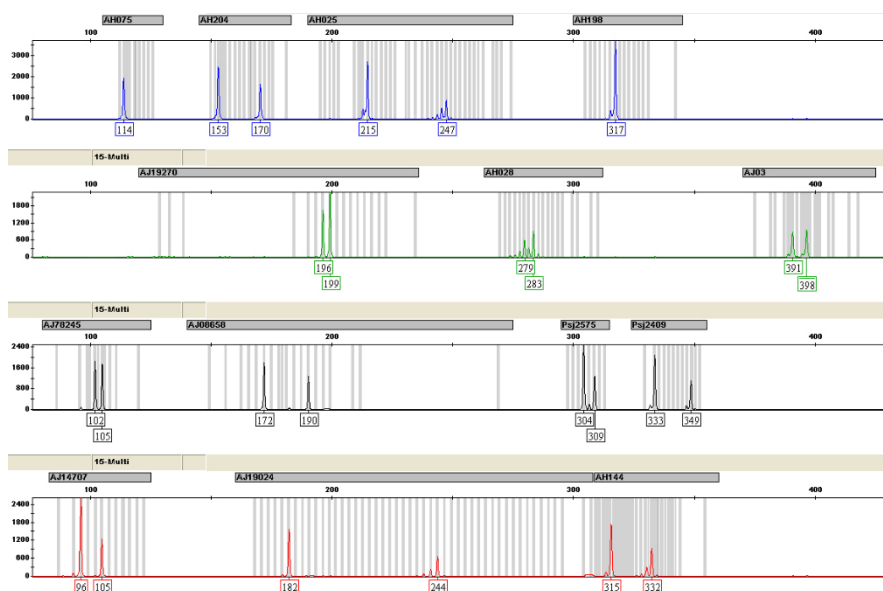


Fig. 1. Capillary electrophoretic separation of the fourteen-microsatellite multiplex PCR. Electrophoresis was carried out under POPTM-7 polymer and the sequences were analyzed by ABI 3130xl Genetic Analyzer. The blue line (FAM): AH075, AH204, AH025 and AH198; green line (VIC): AJ19270, AH028 and AJ03; black line (NED): AJ78245, AJ08658, Psj2575 and Psj2409; red line (PET): AJ14707, AJ19024 and AH144.

Table 2. Forensic parameters of 14 microsatellite loci in sea cucumber *Stichopus japonicus* (n=286)

	nA	He _{obs}	GD	PIC	PD	MP	PE	HWE
AH075	10	0.52	0.67	0.64	0.85	0.15	0.20	<0.01
AH204	16	0.78	0.84	0.82	0.96	0.04	0.57	0.61
AH025	33	0.85	0.90	0.90	0.98	0.02	0.69	0.01
AH198	14	0.63	0.70	0.67	0.87	0.13	0.33	<0.01
AJ19270	14	0.58	0.71	0.68	0.88	0.12	0.27	<0.01
AH028	18	0.79	0.89	0.88	0.98	0.02	0.58	<0.01
AJ03	21	0.79	0.88	0.87	0.97	0.03	0.58	<0.01
AJ78245	11	0.64	0.73	0.69	0.88	0.12	0.34	<0.01
AJ08658	18	0.76	0.84	0.82	0.96	0.04	0.53	0.01
Psj2575	8	0.57	0.62	0.58	0.81	0.19	0.25	<0.01
Psj2409	12	0.57	0.71	0.67	0.88	0.12	0.26	<0.01
AJ14707	15	0.59	0.86	0.84	0.96	0.04	0.28	<0.01
AJ19024	46	0.89	0.95	0.95	0.99	0.01	0.76	<0.01
AH144	33	0.89	0.92	0.91	0.98	0.02	0.76	0.12

nA, Number of observed alleles; He_{obs}, Observed heterozygosity; GD, Gene diversity; PIC, Polymorphism information content; PD, Power of discrimination; MP, Matching probability; PE, Power of exclusion; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium exact test.

높이는 일반적인 평균 높이 보다는 낮은 stutter peak 높이를 보임을 알 수 있다. HWE 평형상태 검정에서는 AH204와 AH144를 제외한 모든 좌위에서 평형이탈을 나타냈다. 지난 수년간 부모 돌기해삼 개체를 인위적으로 선택하고 이로부터 수천만 마리의 돌기해삼 종묘를 생산하여 전국 해안에 방류하는 해삼종

묘방류사업이 지속되어 왔다. 따라서 많은 좌위들의 HWE 평형상태 이탈은 유전자형의 인위적 선택과 인공번식에 의한 유전적부동(genetic drift) 현상일 가능성을 배제할 수 없을 것이다. 분석된 14개 microsatellite 좌위의 평균 식별력은 0.93으로 매우 높았으며, 14개 좌위를 multiplex PCR을 통해 한번에 분

석하였을 때의 누적일치율은 9.64×10^{-19} 로써, 극도로 높은 개체식별력을 제공해준다고 할 수 있다. 한편, 14개 좌위의 누적 부권배제력(combined PE)은 0.999995로 확인되었는데, 이는 본 연구에서 개발한 multiplex PCR 시스템이 생물학적 부모개체를 정확히 찾아낼 수 있는 능력을 가지고 있음을 의미한다. 따라서 본 연구의 14좌위 microsatellite multiplex PCR 시스템은 기존 DNA분석법에 비해 소요 비용과 시간을 획기적으로 절감시킬 수 있기에 매우 경제적인 DNA분석법이라 할 수 있다. 또한 이 DNA분석 시스템이 가지는 고도의 개체식별력과 높은 부권배제력은 본 연구의 분석시스템이 돌기해삼의 개체식별과 친자확인에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것임을 시사한다.

사 사

이 논문은 2016학년도 군산대학교 대학자체 학술공모과제 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Arif IA, Khan HA, Shobrak M, Al Homaidan AA, Al Sadoon M, Al Farhan AH and Bahkali AH. 2010. Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx. *Genet Mol Res* 9, 259-265. <http://dx.doi.org/10.4238/vol9-1gmr714>.
- Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL, Nassif NA, Burgart LJ, Halberg RB, Megid WM and Thibodeau, SN. 2004. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis Markers* 20, 237-250.
- Berg KD, Glaser CL, Thompson RE, Hamilton SR, Griffin CA and Eshleman JR. 2000. Detection of Microsatellite Instability by Fluorescence Multiplex Polymerase Chain Reaction. *J Mol Diagn* 2, 20-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60611-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60611-3).
- Chen M, Gao L, Zhang W, You H, Sun Q and Chang Y. 2013. Identification of forty-five gene-derived polymorphic microsatellite loci for the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *J Genet* 92, 31-35.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3. Retrieved from <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> on Jul 11, 2017.
- Guo SW and Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372. <http://dx.doi.org/10.2307/2532296>.
- Guo SW and Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372. <http://dx.doi.org/10.2307/2532296>.
- Hill CR, Butler JM and Vallone PM. 2009. A 26 plex autosomal STR assay to aid human identity testing. *J Forensic Sci* 54, 1008-1015.
- Ivanova NV, Dewaard JR and Hebert PDN. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Mol Ecol Notes* 6, 998-1002.
- Jeffreys AJ, Wilson V and Thain SL. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*. 314, 67-73.
- Jones DA. 1972. Blood samples: probability of discrimination. *J Forensic Sci* 12, 355-359. [https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(72\)70695-7](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(72)70695-7)
- Kang JH, Kim YK, Kim MJ, Park JY, An CM, Kim BS, Jun JC and Kim SK. 2011 Genetic differentiation among populations and color variants of sea cucumbers (*Stichopus japonicus*) from Korea and China. *Int J Biol Sci* 30, 323-32.
- Kanno M, Li Q and Kijima A. 2005. Isolation and characterization of twenty microsatellite loci in japanese sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Mar Biotechnol* 7, 179-183. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-004-0006-3>
- Kim IS and LEE SJ. 2016. Incheon Customs Press Release. Retrieved from http://www.customs.go.kr/kcshome/cop/bbs/selectBoard.do?bbsId=BBSMSTR_1075&layoutMenuNo=20716&nttId=1083 on May 15, 2017.
- Kim MJ, Choi TJ and An HS. 2008. Population genetic structure of sea cucumber, *Stichopus japonicus* in Korea using microsatellite markers. *Aquaculture Res* 39, 1038-1045.
- Krenke BE, Tereba A, Anderson SJ, Buel E, Culhane S, Finis CJ, Tomsey CS, Zchetti JM, Masibay A, Rabbach DR, Amriott EA and Sprecher CJ. 2002. Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J Forensic Sci* 47, 773-777.
- Krüger J, Fuhrmann W, Lichte KH and Steffens C. 1968. Zur Verwendung des Polymorphismus der sauren Erythrocytenphosphatase bei der Vaterschaftsbegutachtung. *Dtsch Z Gerichtl Med* 64, 127-146. <https://doi.org/10.1007/BF00586813>.
- Park KJ, Ryu SO, Baek YS, Kim YS, Kang HW and Han HS. 2013. Substrate Characteristics of Sea Cucumber *Stichopus japonicus* Habitats in the West Coast of Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 886-891. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0886>.
- Paulay G. 2014. Holothuroidea. World Register of Marine Species. Retrieved from <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=760198> on May 15, 2017.
- Purcell SW, Conand C, Uthicke S and Byrne M. 2016. Ecological roles of exploited sea cucumbers. *Oceanography and Marine Biology. An Annual Review* 54, 367-386.
- Tereba A. 1999. Tools for analysis of population statistics, Profiles in DNA, vol 2. Prometheus Corporation Press, Madison, U.S.A., 14-16.
- Turrina S, Ferriani M, Caratti S and De Leo D. 2014. Evaluation of genetic parameters of 22 autosomal STR loci (PowerPlex® Fusion System) in a population sample from Northern Italy. *Int J Legal Med* 128, 281-283. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-013-0934-4>.
- Walsh PS, Fildes, NJ and Reynolds R. 1996. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res* 24, 2807-2812.

Zhan AB, Bao ZM, Lu W, Hu XL, Peng W, Wang M and Hu J.
2007. Development and characterization of 45 novel microsatellite markers for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Mol Ecol Notes* 7, 1345-1348.