

극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 친자확인을 위한 유전자 마커 개발노은수 · 신은하 · 박경현 · 김은미 · 김영옥 · 유용운¹ · 김신권¹ · 남보혜*국립수산과학원 양식산업연구부 생명공학과, ¹국립수산과학원 양식산업연구부 양식연구과Development of Microsatellite Markers for Parentage Analysis in the Japanese Eel *Anguilla japonica*Eun Soo Noh, Eun-Ha Shin, Gyeong-Hyun Park, Eun-Mi Kim, Young-Ok Kim, Yongwoon Ryu¹, Shin-Kwon Kim¹ and Bo-Hye Nam*

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

Aquaculture Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

The Japanese eel *Anguilla japonica* is a highly valued research object that is important for aquaculture in Asia, including the Republic of Korea. However, few studies have been conducted analyzing parentage using microsatellite markers derived from the Japanese eel. We acquired Japanese eel genome data using next generation sequencing technology, and constructed a draft genome comprising 1,087 Mbp. Using the Simple Sequence Repeat Identification Tool program, 444,724 microsatellites were identified. Of these, 1,842 microsatellites located in the 3' untranslated region, which are stably inherited, were finally selected. Ninety-six primers were selected to validate polymorphism at these microsatellites, and 9 primers were finally identified for multiplex analysis. Using multiplex polymerase chain reaction with three different fluorescence chemistries, we performed parentage analysis of an artificial Japanese eel population. CERVUS software was used to calculate the logarithm of the odds (LOD) scores and the confidence of the parentage assignments. The results presented here show that 83 out of 85 paternity cases were assigned at 95% confidence to a candidate father and mother with LOD scores ranging from 4.79 to 28.2. This study provided a microsatellite marker-based assay for parentage analysis of Japanese eels, which will be useful for selective breeding and genetic diversity studies.

Keywords: Japanese eel, Parentage analysis, Microsatellite marker

서론

뱀장어는 우리나라를 포함하여 많은 국가에서 강장식품으로 사랑받는 어류 중 하나로서 양질의 단백질과 비타민을 포함한 풍부한 영양소를 제공하는 식품이다. 전 세계적으로 뱀장어의 생산량은 1990년대 후반부터 연간 20만톤 이상이 생산되고 있으며 지속적인 증가세를 보여 2020년에는 28만톤을 기록하였다(FAO, 2022). 특히 뱀장어의 소비는 주로 우리나라와 일본에서 많이 이루어지고 있으며, 이는 연간 뱀장어 소비량의 20% (62,640톤, 2016년 기준)를 차지한다(Baek et al., 2021). 현재 뱀장어 공급의 97% 이상이 양식에 의해 이루어지고 있으나 인

공종자의 대량생산 기술이 확립되지 않아 대부분 자연에서 채집된 실뱀장어의 입식을 통하여 양식되고 있다(Hamidoghli et al., 2019). 최근에는 자원의 남획과 서식지 파괴, 지구 온난화 등으로 채집되는 실뱀장어의 어획량이 감소하여 수입되는 비율이 점차 높아지고 있는 상황이다(Chang et al., 2018). 또한, 멸종위기종인 유럽산 뱀장어와 더불어 극동산 뱀장어의 수출입 금지 및 무역제재 품종으로 지정하려는 움직임이 있어 인공종자 생산을 위한 완전양식 기술 개선이 필요하다(Pike et al., 2020; Baek et al., 2021). 혈통 정보는 선발육종에서의 유전적 개선 및 양식생물의 개체 또는 가계 관리를 위한 필수적인 요소이다(Chavanne et al., 2016). 가축 및 식물 중에서는 물리적인

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2452 Fax: +82. 51. 720. 2456

E-mail address: nambohye@korea.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2022.0557>

Korean J Fish Aquat Sci 55(5), 557-566, October 2022

Received 3 August 2022; Revised 30 August 2022; Accepted 13 September 2022

저자 직위: 노은수(연구사), 신은하(연구원), 박경현(연구원), 김은미(연구사), 김영옥(연구관), 유용운(연구사), 김신권(연구사), 남보혜(연구관)

표지를 활용하여 개체에 표지가 가능하지만 대부분의 수산생물의 경우 물리적 표지가 어려운 단점이 있으며, 유전자 마커를 이용한 친자확인도 이러한 수산생물에서도 혈통 분석을 가능하게 하였다(Liu and Cordes, 2004). 그 중 microsatellite 마커는 short tandem repeat 또는 SSR (simple sequence repeat) 이라고도 불리며, 짧은 염기서열이 반복되는 수의 차이에 의해 나타나는 유전변이형 중 하나로 주로 집단유전학적 연구와 친자분석 등에 활용되고 있다(Vieira et al., 2016).

유전자 마커를 이용한 친자확인은 자손이 각 부모로부터 각 유전자좌에 있는 두 개의 대립 유전자 중 하나를 물려받는다는 단순한 개념에 기초한다(Herbing et al., 1995). 따라서 자손 개체는 각 부모로부터 하나의 대립 유전자를 가지고 있게 된다. 친자확인은 자손의 DNA (deoxyribo nucleic acid) 마커와 잠재적 부모의 유전자형을 비교하여 수행할 수 있다. 비교 시 한 세트의 마커 유전자좌에 있는 대립형질이 추정된 부모에게 없는 자손의 유전자형에서만 발견되면 친자관계를 100% 확실하게 배제할 수 있다. 반대로 여러 마커의 유전자좌에서 자손과 잠재적 부모의 유전자형이 완벽하게 일치하면 높은 확률로 친자관계에 있음을 확인할 수 있다. 이러한 분석에 사용되는 DNA 마커가 많을수록 정확도는 향상되게 된다(Yue and Xia, 2014).

또한, 유전적 열성화에 의해 발생하는 기형과 질병 발생을 예방하기 위한 유전적 다양성 확보가 무엇보다 중요하다 할 수 있다(Lorenzen et al., 2012). 유전적 다양성의 축소는 집단 근친도의 증가와 유전적 병목현상으로 이어지고, 성장 저하, 빈번한 질병 발생, 기형 등의 외적표현으로 나타나게 되며 결국에는 집단의 크기가 축소되거나 멸종하게 되는 심각한 결과로 이어진다(Martien et al., 2018). 따라서 극동산 뱀장어의 자원관리 및 인공 종자 대량생산기술 확립을 위해서는 분자 마커를 이용한 개체관리 및 친자확인도 이를 이용한 유전적 다양성 유지가 필수적이라 할 수 있다.

본 연구에서는 극동산 뱀장어 인공종자의 효율적인 가계관리를 위한 친자확인을 microsatellite 마커를 개발하고 다중중복 조건 확립을 통한 분석과정을 최적화하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 준비

뱀장어 친자확인을 위한 microsatellite 마커를 개발하고자 국립수산물품질관리원 양식산업연구부 양식연구과에서 양식연구 수행 중인 뱀장어 성체 1개체(2019년 3월 15일)를 확보하였다. 또한, 친자확인 유전자 마커의 검정을 위해 수컷 9개체, 암컷 4개체의 교배 조합을 통해 생산된 자손세대 4개 집단 95개체와 대조구로써 자연에서 채집된 실험뱀장어 22개체를 확보하였다(Table 1).

DNA 추출

뱀장어의 고분자 게놈 DNA를 분리하기 위하여 근육조직을

채취하여 8M TNES-UREA 600 µL에 Proteinase K를 5 µL 가한 후 37°C에서 12시간 반응시켰다. 이후, 조직이 완전히 녹은 것을 확인한 후 페놀-클로로포름(phenol:chloroform) 추출법과 에탄올 침전법을 이용하여 게놈 DNA를 정제하였다. 분리한 게놈 DNA를 1% 아가로스겔에서 전기영동법을 통하여 게놈 DNA의 유무를 확인하였으며, NanoVue (Ge Healthcare, Fairfield, NJ, USA) 분광광도계를 이용하여 농도를 측정하였다.

추출된 뱀장어의 게놈 DNA로부터 유전학적 종 식별을 위하여 미토콘드리아 DNA의 Cytochrome b 유전자 서열 분석을 수행하였다. L14724 (5'-CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT-3'), H15149 (5'-AAA CTG CAG CCC CTG CTC AGAATG ATA TTT GTC CTC A-3') universal primer를 사용하여 염기서열 확보 후 NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 분석을 수행하였다(Irwin et al., 1991).

유전체 정보 대량생산 및 분석

앞서 추출된 게놈 DNA로부터 뱀장어 유전체 조립 및 microsatellite 마커 선별을 위해 차세대염기서열분석을 수행하였다. 먼저 short read 염기서열분석을 위해 Illumina TruSeq Nano DNA Prep Kit (Insert 550 bp)를 이용하여 NGS (next generation sequencing) 분석을 위한 라이브러리를 제작하였으며, 제작된 라이브러리는 Agilent High Sensitivity DNA Chip을 이용하여 DNA 단편 크기 및 농도를 측정하였다. 이후 digital PCR (polymerase chain reaction)과 Taqman probe를 이용하여 adapter dimer를 제외한 뱀장어 라이브러리의 농도만을 정확히 정량한 후 NovaSeq 6000 platform (Illumina, San Di-

Table 1. The sample information of *Anguilla japonica* for parentage analysis

Group	Female	Male	Number of individual
1	F4462	M3171 M3893	24
2	F4867	M1211 M3893	23
3	F3703	M3689 M3171 M3745 M3278 M1211 M2881	23
4	F3591	M3072 M3893 M3278 M3896	25
Out	Wild type	-	22

ego, CA, USA)으로 염기서열분석을 수행하였다. 또한, long read 염기서열분석을 위해 PacBio SMRT sequencing 방식으로 라이브러리를 구축하고 500 ng–5 µg을 BluePippin system (0.75% gel)을 이용하여 15 kb 이상만을 회수한 후 bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)로 라이브러리의 QC (quality control) 과정을 수행하였다. 제작된 라이브러리는 PacBio SMRT sequencing 방식으로 분석하였다. Long reads를 이용한 1차 유전체 조립을 위해 clean paired-end reads를 이용해 long reads contamination을 제거하였다. Decontaminated long reads는 FALCON_UNZIP을 이용한 1차 유전체 조립 후 clean paired-end reads를 이용해 error correction 및 2차 유전체 조립을 수행하였다.

Microsatellite 마커 선별

극동산 뱀장어의 microsatellite 마커 선별에는 GRAMENE의 Simple Sequence Repeat Identification Tool (SSRIT; <http://archive.gramene.org/db/markers/ssritool>)가 활용되었다. 조립된 뱀장어 초벌 유전체 데이터로부터 motif의 길이에 따라 반복수를 달리하여 후보 마커를 발굴하였다. 예측조건은 motif의 길이가 18–20 bp의 크기를 갖도록 di-는 9반복이상, tri-는 6반복 이상, tetra-는 5반복 이상, penta-는 4반복 이상, 마지막으로 hexa-는 3반복 이상을 염기서열은 반복 조건으로 설정하였다. 선별된 마커 중 PCR 프라이머 제작을 위한 upstream, downstream 각각 최소 500 bp 정도의 서열이 확보되며, 비교적 안정적으로 유전되면서 다양성이 높은 3'-UTR 영역의 microsatellite 마커를 우선적으로 선별하였다(Vieira et al., 2016).

탐색된 microsatellite 마커 후보를 기준으로 Primer 3 소프트웨어를 이용하여 PCR 증폭을 위한 프라이머를 디자인하였다. Microsatellite 마커 서열을 중심으로 양쪽 인접 서열의 보존 영역을 대상으로 안정적인 증폭이 이루어질 수 있도록 하였으며, 각각의 microsatellite 마커를 대상으로 증폭산물의 크기를 100, 200, 300 bp로 설정하여 3개의 서로 다른 프라이머 서열을 예측하여 추후 단회의 분석으로 일괄적으로 결과를 확인할 수 있는 multiplex PCR을 대비하였다.

Microsatellite 마커 검증

임의 선별된 후보 microsatellite 마커는 해당 영역의 증폭을 위한 primer 제작 후 국립수산물품질관리원 수산생명자원 수장고에 보관 중인 극동산 뱀장어(NFRDI-FI-IS-0029044, NFRDI-FI-IS-0029045)를 활용하여 primer의 검정을 수행하였다. PCR 증폭에는 TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase (TAKARA Bio. inc., Kusatsu, Japan)를 사용하였으며, 20 µL 볼륨을 기준으로 gDNA 1 µL, 10x Ex Taq buffer 2 µL, 2.5 mM dNTP mixture 1.6 µL, 10 pmol forward primer 1 µL, 10 pmol reverse primer 1 µL, 그리고 Ex Taq polymerase 0.1 µL로 구성하였다. PCR 반응은 ABI verity fast thermal (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)을 이용하여 95°C에서 10분 동안 pre-

incubation 후 95°C에서 1분간 denaturation, 57°C에서 1분간 annealing 및 72°C에서 1분간 extension 조건으로 32 cycle을 진행하였으며, 최종적으로 65°C에서 7분간 final extension 과정을 수행하였다.

Multiplex PCR 조건 확립

분석방법의 효율화를 위해 multiplex PCR 조건을 확립하고자 PCR 증폭 여부 확인 및 산물의 사이즈 등을 고려하여 최종적으로 9개의 microsatellite 마커를 선별하였다. 이들 마커는 총 3개의 fluorescence dye (FAM, HEX, TAMRA)를 사용하여 genotyping 분석 시 중복되는 부분이 없도록 하였다. Multiplex PCR 조건 확립에는 선행 연구와 동일한 polymerase를 사용하였으며, 혼합물의 조성은 gDNA 2 µL, 10x Ex Taq buffer 2 µL, 2 mM dNTP mixture 1.6 µL, 10 pmol forward primer 각 0.1 µL, 10 pmol reverse primer 각 0.1 µL, 그리고 Ex Taq polymerase 0.1 µL로 구성하였으며, 분석결과에 따라 각 primer의 양을 조절하여 최적화하였다.

데이터의 통계 분석

Microsatellite 마커의 대립유전자들의 크기 분석은 ABI 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems)를 이용하였으며, GeneMapper v5.0 (Applied Biosystems) 프로그램을 사용하여 결과값을 산출하였다. 이후 GenAlEx v6.502 프로그램을 사용하여 대립유전자 수, 유전자형의 빈도 등을 분석하였으며 (Smouse and Peakall, 2012), 분석된 정보를 기반으로 Cervus 3.0.7. 프로그램을 이용하여 친자확인을 위한 마커의 효율성을 검정하였다(Kalinowski et al., 2007).

결 과

Microsatellite 마커 선별

유전체 정보 분석에 사용된 시료는 Cytochrome b 유전자 분석을 통해 *Anguilla japonica* (MH050933)와 100% 일치하는 것을 확인하였다. 이로부터 유전체 정보를 대량생산한 결과 short read는 약 26 Gb, long read는 약 84 Gb의 염기서열을 확보하였다. 최종 유전체 조립 결과 1,306개의 contig로 이루어진 1,051.82 Mb의 극동산 뱀장어 초벌 유전체를 완성하였으며, 유전체 조립의 품질을 나타내는 N50 contig length는 1.6 M로 확인되었다(Table 2). 이를 기준으로 SSRIT를 이용하여 SSR 영역을 탐색한 결과 di-는 294,001개, tri-는 54,314개, tetra-는 36,680개, penta-는 16,764개, 그리고 hexa-는 42,965개가 선별되었다(Table 3). 선별된 마커들의 유전체 영역 내 위치정보를 확인한 결과 intergenic 영역에서 427,361개로 가장 많은 마커들이 선별된 것으로 확인되었으며, 3'-UTR 영역에서 7,705개, 5'-UTR 영역에서 7,424개, 그리고 CDS 영역에서 2,664개로 확인되었다. 이후 선별 조건에 부합하는 3'-UTR 영역에 존재하는 di- 1,188개, tri- 216개, tetra- 176개, penta- 102개, 그리고

hexa- 160개를 최종 후보로 선별하였다.

Microsatellite 마커 검정

친자검정을 위해서는 유전자형 정보 생산에 대한 일관성과 정

확성이 요구됨을 고려하여, tri-motif 조건의 반복 횟수 기준으로 상위 96개의 마커 정보를 최종 확보하여 프라이머 제작 및 검정을 수행하였다. PCR 분석 결과 96개의 마커 중 18개를 제외한 모든 마커가 증폭이 되었음을 확인하였으며, 증폭산물의 사이즈와 repeat 수를 고려하여 최종적으로 9개의 마커를 선별하였다. 해당 마커는 multiplex PCR 분석이 가능하도록 PCR 산물의 사이즈가 100 bp, 200 bp, 300 bp 각 3개씩으로 구성하였으며, 3개의 fluorescence를 사용하여 유사한 사이즈 내 PCR 산물의 결과 해석이 가능하도록 하였다(Table 4, Fig. 1).

Multiplex PCR 조건 확립

Multiplex PCR을 위한 최적의 조건 탐색을 통해 최종적으

Table 2. Genome assembly statistics

Assembly feature	Statistics
Estimated genome size (bp)	1,087,876,121
No. contigs	1,306
Total contig length (bp)	1,051,819,391
Achievement of assembly	96.69 %
Avg. length (bp)	805,374
Min. length (bp)	27,149
Max. length (bp)	7,452,511
N50 (bp)	1,611,243
N (%)	0.00
GC (%)	43.42
Repeat (%)	24.27
BUSCO (Actinopterygii_odb10) (%)	94.11
BUSCO (vertebrate_odb10) (%)	95.90
CEGMA (%)	80.24

BUSCO, Benchmarking universal single-copy orthologs; CEGMA, Core eukaryotic genes mapping approach.

Table 3. Distribution of repeat motif types

Motif	Di	Tri	Tetra	Penta	Hexa
3	-	-	-	-	32,674
4	-	-	-	11,115	6,333
5	-	-	16,878	3,377	1,648
6	-	12,834	8,455	996	753
7	-	7,953	4,134	413	407
8	-	5,394	2,146	209	260
9	55,491	3,957	1,347	130	188
≥10	238,510	24,176	3,720	524	702

Table 4. List of microsatellite markers for parentage analysis

Name	Motif	Size range	Primer	Fluorescence	Na ¹	PIC ²
ANJAP-30	(TTA)13	82-148	(F) CCAGTTTCGTGCCTTGACTTT (R) ACCAGCCTGTGTAAAGGCTTA	FAM	19	0.922
ANJAP-50	(TTA)16	78-147	(F) ACAGAGGAACATGTAAATGTATCCA (R) CGGATAATGTCTAGCCCTGCTT	HEX	15	0.840
ANJAP-51	(TTA)13	102-144	(F) GCCATGGCAATTCAGAGCATAA (R) ACGGTCATTAAGGTTAGAGGGT	TAMRA	11	0.848
ANJAP-03	(TTA)21	156-246	(F) GGGGAAAGAATCTGTGTCCCAT (R) AAGGAAAGCACCAGCAAACATC	FAM	19	0.892
ANJAP-47	(AAT)25	163-205	(F) GGTAGCGGGTATTCAAAATGC (R) CCGTCTAGAGCGCTTTTATGGA	HEX	13	0.865
ANJAP-56	(TAA)22	295-334	(F) CAGCCTTAACGGTCCTATCAGT (R) TCTGATTCAATACCCAGGGCAC	TAMRA	13	0.791
ANJAP-69	(ATT)21	292-337	(F) CGCAGTGTAAGCTGGTGATAGA (R) TCATTCTGATGCCCCAAGGTTA	FAM	15	0.900
ANJAP-78	(TTA)19	258-324	(F) CACCACACGATGCAATCAACTT (R) GGACAATGGGGTACAAAACCG	HEX	19	0.898
ANJAP-89	(ATT)22	246-282	(F) AGAAAGCCTTACCTGCATGTGA (R) CGCTGCTTGAAGTGCTGATAAA	TAMRA	12	0.845

¹Na, Indicated Number of allele. ²PIC, Indicated polymorphism information contents.

로 PCR mixture 전체 20 μ L를 기준으로 ANJAP-30 마커의 primer는 0.4 μ L를 사용하고 그 외의 primer는 0.1 μ L를 사용하였다. 또한, PCR 반응은 다양한 primer가 복합적으로 사용되는 만큼 touchdown 방법을 사용하여 기존 분석방법을 기준으로 59°C에서 1 cycle, 58°C에서 1 cycle, 그리고 57°C에서 32 cycle을 수행하였을 경우 가장 좋은 결과값을 확보할 수 있었다(Table 5).

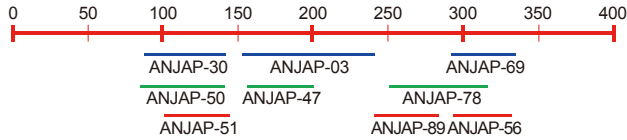


Fig. 1. Size range of multiplex PCR products. PCR, Polymerase chain reaction.

Table 5. PCR cycling for multiplex method

State	Time (min)	Cycle
Pre-incubation	10	1
Denaturing	1	1
Annealing	1	
Extension	1	
Denaturing	1	1
Annealing	1	
Extension	1	
Denaturing	1	32
Annealing	1	
Extension	1	
Final extension	30	1

PCR, Polymerase chain reaction.

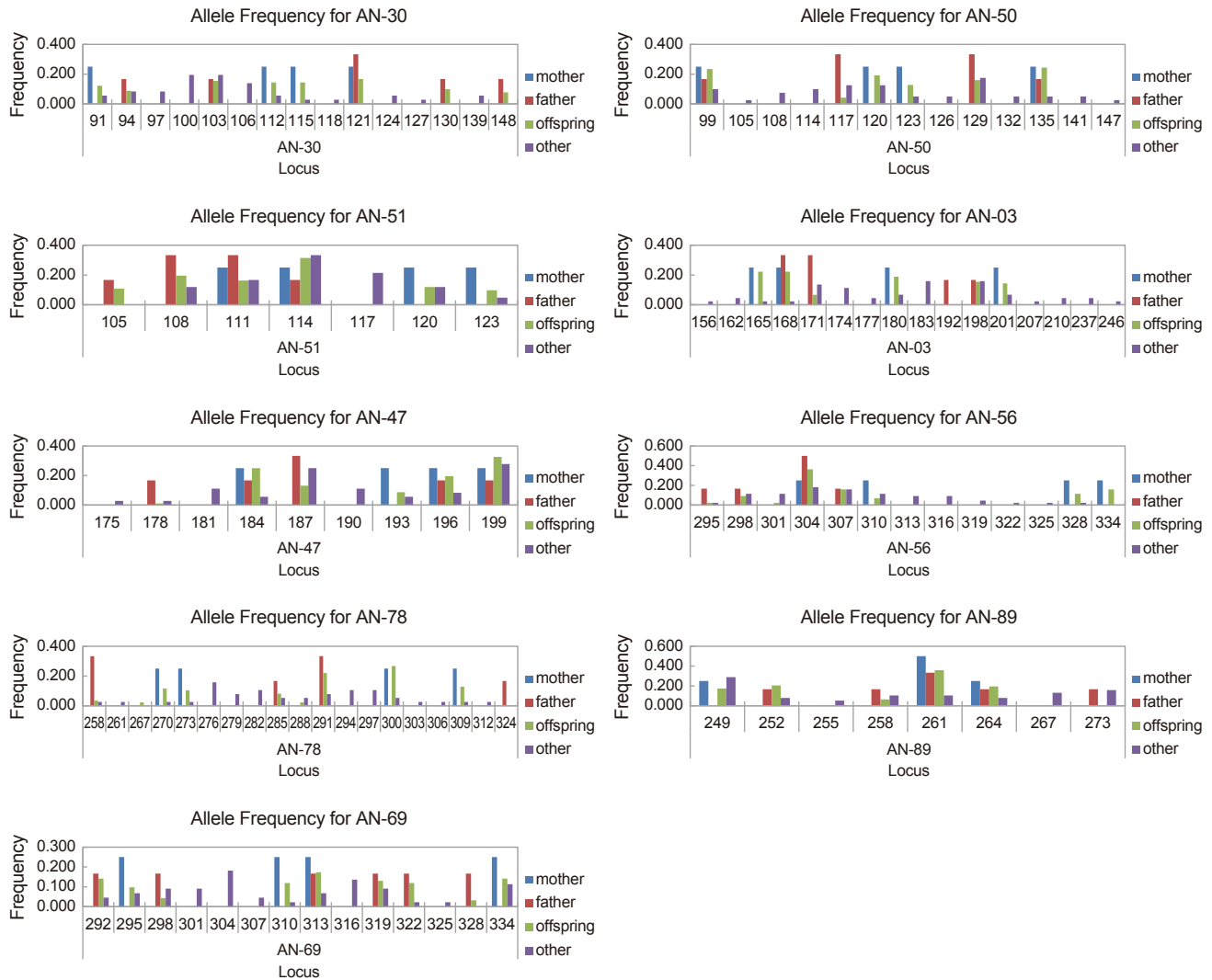


Fig. 2. Allele frequency of each markers.

Table 6. The results of parentage analysis

Offspring	Candidate mother	Pair loci ¹		LOD score ²	Candidate mother	Pair loci ¹		LOD score ²	Trio loci ¹		LOD score ²
		Compare	Mismatch			Compare	Mismatch		Compare	Mismatch	
Group 1-01	F4462	8	0	5.59E+00 *	M3171	8	0	5.61E+00 *	8	0	1.61E_01 *
Group 1-02	F4462	9	0	8.02E+00 *	M3171	9	1	2.70E+00 *	9	1	1.37E+01 *
Group 1-03	F4462	9	0	8.52E+00 *	M3171	9	1	8.29E-01 *	9	1	1.32E+01 *
Group 1-04	F4462	9	0	9.24E+00 *	M3171	9	1	3.48E+00 *	9	1	1.59E+01 *
Group 1-05	F4462	8	0	6.09E+00 *	M3171	8	0	5.21E+00 *	8	0	1.66E+01 *
Group 1-06	F4462	9	0	7.91E+00 *	M3171	9	0	8.87E+00 *	9	0	2.21E+01 *
Group 1-07	F4462	9	0	1.09E+01 *	M3171	9	1	2.19E+00 *	9	1	1.65E+01 *
Group 1-08	F4462	6	0	4.87E+00 *	M3171	6	1	-3.89E-02	6	1	6.64E+00 *
Group 1-09	F4462	9	0	6.83E+00 *	M3171	9	0	5.35E+00 *	9	0	1.81E+01 *
Group 1-10	F4462	9	0	8.53E+00 *	M3171	9	1	-7.35E-01	9	1	1.19E+01 *
Group 1-11	F4462	9	1	3.47E+00 *	M3171	9	2	4.39E+00 *	9	2	8.70E+00 *
Group 1-12	F4462	9	0	1.08E+01 *	M3171	9	1	-1.69E-01	9	1	1.50E+01 *
Group 1-13	F4462	9	1	3.68E+00 *	M3171	9	2	1.08E+00 *	9	2	7.36E+00 *
Group 1-14	F4462	9	0	7.29E+00 *	M3171	9	0	5.40E+00 *	9	0	1.76E+01 *
Group 1-15	F4462	8	0	9.15E+00 *	M3171	8	0	4.46E+00 *	8	0	1.77E+01 *
Group 1-16	F4462	6	1	1.21E+00 *	M3171	6	1	4.83E+00 *	6	1	8.36E+00 *
Group 1-17	F4462	8	0	7.66E+00 *	M3171	8	0	6.70E+00 *	8	0	1.80E+01 *
Group 1-18	F4462	9	0	7.61E+00 *	M3171	9	0	5.43E+00 *	9	0	1.82E+01 *
Group 1-19	F4462	9	0	1.08E+01 *	M3171	9	0	6.63E+00 *	9	0	2.28E+01 *
Group 1-20	F4462	9	0	9.44E+00 *	M3171	9	0	5.08E+00 *	9	0	2.00E+01 *
Group 1-21	F4462	9	0	8.17E+00 *	M3171	9	0	6.03E+00 *	9	0	1.98E+01 *
Group 1-22	F4462	9	0	8.72E+00 *	M3171	9	1	1.59E+00 *	9	1	1.47E+01 *
Group 1-23	F4462	9	0	8.08E+00 *	M3171	9	0	7.05E+00 *	9	0	2.01E+01 *
Group 1-24	F4462	7	0	4.98E+00 *	M3171	7	1	4.32E+00 *	7	1	9.69E+00 *
Group 2-01	F4867	9	0	9.32E+00 *	M3893	9	0	9.72E+00 *	9	0	2.46E+01 *
Group 2-02	F4867	9	0	1.02E+01 *	M1211	9	3	-5.47E+00	9	3	4.83E+00 *
Group 2-03	F4867	9	0	8.82E+00 *	M3893	9	1	3.81E+00 *	9	1	1.60E+01 *
Group 2-04	F4867	9	0	8.40E+00 *	M1211	9	2	-1.42E+00	9	3	4.85E+00 *
Group 2-05	F4867	9	1	3.17E+00 *	M3893	9	1	7.82 E+00 *	9	2	1.36E+01 *
Group 2-06	F4867	9	1	3.82E+00 *	M3893	9	1	4.58 E+00 *	9	2	1.17E+01 *
Group 2-07	F4867	9	0	8.40E+00 *	M1211	9	1	4.91 E+00 *	9	1	1.67E+01 *
Group 2-08	F4867	8	0	6.30E+00 *	M3893	8	0	7.59 E+00 *	8	1	1.41E+01 *
Group 2-09	F4867	9	0	8.79E+00 *	M3893	9	1	5.13 E+00 *	9	1	1.73E+01 *
Group 2-10	F4867	9	0	7.65E+00 *	M3893	9	0	1.28 E+01 *	9	1	2.14E+01 *
Group 2-11	F4867	9	0	8.27E+00 *	M3893	9	0	9.28 E+00 *	9	0	2.21E+01 *
Group 2-12	F4867	8	0	6.63E+00 *	M3893	8	1	2.98 E+00 *	8	1	1.23E+01 *
Group 2-13	F4867	9	0	8.81E+00 *	M1211	9	1	3.47 E+00 *	9	1	1.46E+01 *
Group 2-14	F4867	9	1	2.50E+00 *	M3893	9	1	5.94 E+00 *	9	2	1.07E+01 *
Group 2-15	F4867	9	0	1.05E+01 *	M1211	9	2	-2.11E+00	9	2	9.86E+00 *
Group 2-16	F4867	7	0	6.43E+00 *	M1211	7	1	3.51 E+00 *	7	1	1.26E+01 *
Group 2-17	F4867	8	0	6.12E+00 *	M3893	8	1	3.2 E+00 *	8	1	1.20E+01 *

Table 6. Continued

Offspring	Candidate mother	Pair loci ¹		LOD score ²	Candidate mother	Pair loci ¹		LOD score ²	Trio loci ¹		LOD score ²
		Compare	Mismatch			Compare	Mismatch		Compare	Mismatch	
Group 2-18	F4867	8	0	6.74E+00 *	M3893	8	0	7.89 E+00 *	8	0	2.02E+01 *
Group 2-19	F4867	9	0	9.87E+00 *	M1211	9	1	4.28 E+00 *	9	1	1.70E+01 *
Group 2-20	F4867	9	0	9.63E+00 *	M3893	9	1	3.11 E+00 *	9	1	1.66E+01 *
Group 2-21	F4867	9	0	9.19E+00 *	M3893	9	1	3.91 E+00 *	9	1	1.65E+01 *
Group 2-22	F4867	9	0	8.88E+00 *	M3893	9	0	1.07 E+01 *	9	0	2.46E+01 *
Group 2-23	F4867	8	0	5.42E+00 *	M3893	8	1	4.55 E+00 *	8	1	1.26E+01 *
Group 3-01	F3703	7	0	7.18E+00 *	M3171	7	0	4.91E+00 *	7	0	1.67E+01 *
Group 3-02	F3703	9	1	5.00E+00 *	M3171	9	0	7.56E+00 *	9	1	1.75E+01 *
Group 3-03	F3703	9	1	5.88E+00 *	M3689	9	2	4.99E-01 *	9	3	7.07E+00 *
Group 3-04	F3703	9	0	1.20E+01 *	M2881	9	1	8.60E+00 *	9	1	2.45E+01 *
Group 3-05	F3703	9	0	1.06E+01 *	M2881	9	2	1.65E+00 *	9	2	1.52E+01 *
Group 3-06	F3703	9	0	1.17E+01 *	M3171	9	1	1.39E+00 *	9	1	1.77E+01 *
Group 3-07	F3703	9	0	1.06E+01 *	M1211	9	0	1.12E+01 *	9	0	2.50E+01 *
Group 3-08	F3703	8	0	1.01E+01 *	M3278	8	0	7.97E+00 *	8	1	1.72E+01 *
Group 3-09	F3703	8	0	1.04E+01 *	M2881	8	1	5.74E+00 *	8	1	1.83E+01 *
Group 3-10	F3703	9	1	3.82E+00 *	M2881	9	2	1.15E+00 *	9	3	7.63E+00 *
Group 3-11	F3703	9	0	9.18E+00 *	M2881	9	0	1.32E+01 *	9	0	2.76E+01 *
Group 3-12	F3703	9	0	9.53E+00 *	M3171	9	0	6.61E+00 *	9	0	2.18E+01 *
Group 3-13	F3703	8	0	6.74E+00 *	M3171	8	0	5.79E+00 *	8	0	1.78E+01 *
Group 3-14	F4462	7	0	5.11E+00 *	M3171	7	0	4.31E+00 *	7	0	1.33E+01 *
Group 3-15	F3703	9	0	1.04E+01 *	M1211	9	2	-1.83E+00	9	2	1.10E+01 *
Group 3-16	F3703	9	0	1.05E+01 *	M2881	9	2	2.70E+00 *	9	2	1.60E+01 *
Group 3-17	F3703	9	0	9.62E+00 *	M2881	9	1	7.94E+00 *	9	1	2.13E+01 *
Group 3-18	F3703	9	0	1.03E+01 *	M2881	9	1	6.66E+00 *	9	1	2.10E+01 *
Group 3-19	F3703	9	1	5.14E+00 *	M3689	9	2	2.41E+00 *	9	3	8.73E+00 *
Group 3-20	F3703	9	0	1.18E+01 *	M3278	9	0	7.64E+00 *	9	0	2.27E+01 *
Group 3-21	F3703	9	1	4.38E+00 *	M3171	9	1	2.65E+00 *	9	2	1.04E+01 *
Group 3-22	F3703	8	0	8.80E+00 *	M3745	8	0	1.41E+01 *	8	0	2.82E+01 *
Group 3-23	F3703	8	0	9.32E+00 *	M1211	8	1	4.26E+00 *	8	1	1.54E+01 *
Group 4-01	F3591	8	2	-2.74E+00	M3278	8	0	1.11E+01 *	8	2	1.07E+01 *
Group 4-02	F3591	9	0	1.09E+01 *	M3072	9	3	-7.77E+00	9	3	4.79E+00 *
Group 4-03	F3591	9	0	1.05E+01 *	M3072	9	1	1.13E+01 *	9	1	2.56E+01 *
Group 4-04	F3591	9	2	-6.20E-01	M3072	9	2	2.17E+00 *	9	4	1.95E+00+
Group 4-05	F3591	9	0	9.75E+00 *	M3072	9	2	2.92E+00 *	9	2	1.55E+01 *
Group 4-06	F3591	9	0	6.74E+00 *	M3278	9	1	2.97E+00 *	9	1	1.44E+01 *
Group 4-07	F3591	9	0	7.75E+00 *	M3278	9	1	8.43E+00 *	9	1	2.09E+01 *
Group 4-08	F3591	9	1	4.05E+00 *	M3072	9	1	1.38E+01 *	9	2	2.14E+01 *
Group 4-09	F3591	9	0	7.11E+00 *	M3278	9	0	9.43E+00 *	9	0	2.12E+01 *
Group 4-10	F3591	9	0	8.58E+00 *	M3278	9	0	8.43E+00 *	9	0	2.21E+01 *
Group 4-11	F3591	8	1	1.32E+00 *	M3278	8	0	7.90E+00 *	8	1	1.25E+01 *
Group 4-12	F3591	9	0	8.05E+00 *	M3072	9	2	2.24E+00 *	9	2	1.33E+01 *

Table 6. Continued

Offspring	Candidate mother	Pair loci ¹		LOD score ²	Candidate mother	Pair loci ¹		LOD score ²	Trio loci ¹		LOD score ²
		Compare	Mismatch			Compare	Mismatch		Compare	Mismatch	
Group 4-13	F3591	9	1	4.14E+00 *	M3072	9	3	-5.06E+00	9	4	-2.60E-01
Group 4-14	F3591	9	0	1.10E+01 *	M3072	9	3	-5.48E+00	9	3	6.93E+00 *
Group 4-15	F3591	9	0	8.43E+00 *	M3278	9	0	6.59E+00 *	9	0	2.05E+01 *
Outgroup-01	F4462	7	5	-1.91E+01	M3893	7	5	-1.73E+01	7	5	-1.88E+01
Outgroup-02	F3703	8	5	-1.80E+01	M3893	8	4	-8.45E+00	8	7	-2.19E+01
Outgroup-03	F3591	9	6	-1.99E+01	M3171	9	4	-1.12E+01	9	7	-2.15E+01
Outgroup-04	F3591	9	6	-1.76E+01	M3745	9	7	-2.40E+01	9	8	-2.70E+01
Outgroup-05	F4867	6	2	-5.07E+00	M2881	6	3	-8.20E+00	6	4	-1.02E+01
Outgroup-06	F3703	9	7	-2.67E+01	M3893	9	4	-9.02E+00	9	7	-2.34E+01
Outgroup-07	F3591	9	6	-2.18E+01	M3171	9	3	-7.01E+00	9	6	-1.86E+01
Outgroup-08	F3591	9	6	-1.86E+01	M2881	9	6	-1.89E+01	9	7	-2.17E+01
Outgroup-09	F3703	8	5	-1.61E+01	M3893	8	5	-1.55E+01	8	7	-2.31E+01
Outgroup-10	F3591	8	3	-8.20E+00	M3893	8	6	-2.19E+01	8	6	-1.99E+01
Outgroup-11	F4462	8	5	-1.81E+01	M3171	8	2	-2.13E+00	8	6	-1.85E+01
Outgroup-12	F4867	9	5	-1.82E+01	M3278	9	4	-1.32E+01	9	7	-2.38E+01
Outgroup-13	F4462	8	5	-1.64E+01	M3072	8	5	-1.35E+01	8	6	-1.73E+01
Outgroup-14	F4462	8	6	-2.11E+01	M3896	8	5	-1.68E+01	8	6	-2.18E+01
Outgroup-15	F3591	7	3	-6.74E+00	M3896	7	3	-8.14E+00	7	5	-1.23E+01
Outgroup-16	F3591	8	4	-1.07E+01	M3745	8	6	-2.23E+01	8	6	-2.03E+01
Outgroup-16	F3591	8	4	-1.07E+01	M3896	8	6	-2.23E+01	8	6	-2.03E+01
Outgroup-17	F4867	9	6	-2.14E+01	M3072	9	6	-1.99E+01	9	7	-2.43E+01
Outgroup-18	F4462	9	7	-2.50E+01	M3072	9	6	-1.98E+01	9	8	-3.01E+01
Outgroup-19	F4867	9	6	-2.18E+01	M3893	9	4	-1.01E+01	9	7	-2.26E+01
Outgroup-20	F4867	8	4	-1.15E+01	M3896	8	5	-1.48E+01	8	7	-2.15E+01
Outgroup-21	F3703	8	5	-1.58E+01	M3278	8	2	-7.92E-01	8	7	-1.96E+01
Outgroup-22	F3591	8	3	-9.64E+00	M3072	8	5	-1.73E+01	8	5	-1.62E+01

¹Concordance of genetic markers between parent and offspring. ²This letters indicated confidence value. * indicated >0.95, and + indicated >0.85.

친자확인 분석

Cervus 분석은 자손개체와 부모개체의 microsatellite 마커에 의해 확보된 유전자형의 일치도를 기준으로 후보 부모개체를 선별하게 된다. 해당 결과의 신뢰도(confidence)는 LOD (logarithm of the odds) score 값에 의해 결정되며, 해당 값이 양의 수를 나타낼 때 신뢰도가 높다고 볼 수 있다. (*)는 95% 이상의 정확도를 나타내며 (+)는 80% 이상의 정확도를 나타낸다(Marshall et al., 2003). 부모집단(수컷 9개체, 암컷 4개체), 자손집단(95개체), 그리고 자연산집단(22개체)의 유전자형 정보를 모두 활용하여 Cervus 분석을 수행한 결과, 그룹 1 (F4462 × M3171, M3893)의 자손집단은 모두 F4462 × M3171의 부모로부터 생산된 것을 확인할 수 있었으며, 그룹 2 (F4867 × M1211, M3893)의 자손세대는 F4867 × M1211의 부모로부터 7마리, F4867 × M3893 부모로부터 16마리가 생산된 것을 확인할 수

있었다. 그룹 3 (F3703 × M3689, M3171, M3745, M3278, M1211, M2881)의 자손세대는 F3703 × M3689의 부모로부터 2마리, F3703 × M3171 부모로부터 6마리, F3703 × M3745의 부모로부터 1마리, F3703 × M3278의 부모로부터 2마리, F3703 × M1211의 부모로부터 3마리, F3703 × M2881의 부모로부터 8마리, 그리고 F4462 × M3171의 부모로부터 1마리가 생산된 것을 확인할 수 있었다. 또한 그룹 4 (F3591 × M3072, M3893, M3278, M3896)의 자손세대는 F3591 × M3072의 부모로부터 8마리, 그리고 F3591 × M3278의 부모로부터 7마리가 생산된 것을 확인하였다. 대조구로 사용된 자연산 뱀장어 그룹에서는 분석에 사용된 부모 개체와의 연관성은 확인되지 않았으며, 이는 마커별 유전자형 빈도 분석결과를 통해서도 확인이 가능하다(Table 6, Fig. 2). 특히, ANJAP-30, ANJAP-50, ANJAP-03, ANJAP-56, ANJAP-78, 그리고 ANJAP-69에서

다양한 유전자형이 확보되었다.

고 찰

유전자 마커는 환경의 영향을 받지 않고 DNA 수준에서 유전적 변이와 관계를 예측할 수 있는 효율적인 수단으로 활용되고 있다(Van et al., 1981). 그 중에서 microsatellite 마커는 종의 유전적 특성을 본질적으로 반영할 뿐 아니라, 진핵 생물의 유전체 전반에 걸쳐 존재한다(Kalia et al., 2011). 또한, 개체 간 다형성이 높고 재현성이 높기에 생물 종의 유전적 다양성 유지를 위한 집단유전학적 연구와 친자확인 등의 연구에 널리 활용되고 있다(Jarne and Lagoda, 1996).

하지만, 모든 microsatellite가 멘델의 유전법칙을 따르는 것은 아니기 때문에 잘못된 유전자 마커의 선별은 친자확인에서의 큰 오류로 나타날 수 있다(Flanagan et al., 2018). 그러므로 친자확인을 위해서는 마커의 적합성을 확인하는 것이 필수적이라 할 수 있다. 초기 microsatellite 마커는 개발 과정에 어려움이 있어 4개 또는 5개의 마커를 활용하여 친자확인을 수행한 경우가 있었으나(Norris et al., 2000), 현재에는 유전체 정보분석 기술의 발달로 microsatellite 마커의 선별이 점점 간편해지고 이에 따라 각 마커의 적합성을 개별적으로 검증하는 것이 가능해졌다.

최근 친자확인 연구에 단일염기변이(single nucleotide polymorphism, SNP)를 활용하는 사례가 늘고 있으며, 이에 microsatellite와 SNP마커의 비교에 관한 논의가 진행된 바 있다. 친자확인을 위한 SNP마커의 경우 위음성 결과를 최소화하기 위해 약 200개 이상의 SNP마커가 필요하며, 또한 위양성의 결과를 최소화하기 위해서는 약 700개의 SNP 마커가 사용되어야 하는 것으로 보고되었다(Flanagan et al., 2018; Pei et al., 2018). 유전자 칩을 이용한 육종프로그램에서는 SNP마커의 활용도가 높을 수 있으나, 일반적인 친자확인 목적에서는 이러한 이유로 SNP 마커보다 microsatellite가 선호되고 있다.

일반적으로 microsatellite 마커는 di-motif 가 주로 사용되고 있으나, 이는 대립 유전자 해석에서의 오류로 나타나는 돌연변이 DNA 합성과정에서 미끄러짐 현상으로 짧은 밴드가 만들어지는 stutter band 현상이 발생할 수 있다(Walsh et al., 1996). 반대로 tri-, tetra-, penta- 등은 이러한 현상의 발생 가능성이 낮기 때문에 보다 정확한 해석이 가능하다(Gill et al., 2005).

본 연구는 극동산 뱀장어의 친자확인을 위한 microsatellite 마커를 보고한 최초의 연구이다. 극동산 뱀장어의 유전체정보를 해독하고, 이로부터 검정된 9개의 microsatellite 마커를 선별하였다. 선별된 마커 정보에서는 대립유전자의 유전에 관한 문제점은 발견되지 않았으며, 국립수산물과학원에서 인공 생산한 극동산 뱀장어 4개 집단 95개체 중 93개체가 모두 95% 이상의 신뢰도로 부모개체의 확인이 가능하였다. 또한, 교배조합과는 다르게 교배가 이루어진 자손개체(Group 3-14, F4462 × M3171)와 인공종자 생산에서 배제된 부모개체(M3893, M3896)가 있

는 것으로 확인되었으나, LOD score를 기준으로 볼 때 분석과정에서의 오류로는 판단되지 않는다. 따라서 본 연구에서 개발된 microsatellite 마커는 극동산 뱀장어의 친자확인을 위한 신뢰도 높은 결과를 얻을 수 있으며, 단회의 분석으로 다량의 결과값을 확보할 수 있는 multiplex PCR 방법을 적용하여 분석의 효율성을 극대화하였다. 본 분석방법은 극동산 뱀장어의 친자확인을 통한 방류자원조사 및 양식연구를 위한 혈통관리와 유전적 다양성 유지 등을 위해 활용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원 수산물과학연구사업(R2022045)의 지원으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

References

- Baek EY, Lee NS and Cho GH. 2021. A study on institutional changes of the eel aquaculture in Japan. J Kor Soc Fish Mar Sci Edu 33, 634-642. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2021.6.33.3.634>.
- Chang YLK, Miyazawa Y, Miller MJ and Tsukamoto K. 2018. Potential impact of ocean circulation on the declining Japanese eel catches. Sci Rep 8, 5496. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23820-6>.
- Chavanne H, Janssen K, Hofherr J, Contini F, Haffray P, Consortium A, Komen H, Nielsen EE and Bargelloni L. 2016. A comprehensive survey on selective breeding programs and seed market in the European aquaculture fish industry. Aquac Int 24, 1287-1307. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-9985-0>.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2022. FishStatJ: Universal Software for Fishery Statistical Time Series. Aquaculture production 1950-2020. FAO, Rome, Italy.
- Flanagan SP and Jones AG. 2018. The future of parentage analysis: From microsatellites to SNPs and beyond. Mol Ecol 28, 544-567. <https://doi.org/10.1111/mec.14988>.
- Gill P, Curran J and Elliot K. 2005. A graphical simulation model of the entire DNA process associated with the analysis of short tandem repeat loci. Nucleic Acids Res 33, 632-643. <https://doi.org/10.1093/nar/gki205>.
- Hamidoghli A, Bae J, Won S, Lee S, Kim D and Bai SC. 2019. A review on Japanese eel (*Anguilla japonica*) aquaculture, with special emphasis on nutrition. Rev Fish Sci Aquac 27, 226-241. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1583165>.
- Herbinger CM, Doyle RW, Pitman ER, Paquet D, Mesa KA, Morris DB, Wright JM and Cook D. 1995. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. Aquaculture 137, 245-256. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01109-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01109-9).
- Irwin DMA, Kocher TD and Wilson AC. 1991. Evolution of the

- cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol* 32, 128-144. <https://doi.org/10.1007/BF02515385>.
- Jarne P and Lagoda P. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11, 424-429. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5).
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R and Dhawan AK. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177, 309-334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>.
- Kalinowski ST, Taper ML and Marshall TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16, 1099-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>.
- Liu ZJ and Cordes FC. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027>.
- Lorenzen K, Beveridge MCM and Mangel M. 2012. Cultured fish: integrative biology and management of domestication and interactions with wild fish. *Biol Rev* 87, 639-660. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00215.x>.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB and Pemberton JM. 2003. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7, 639-655. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x>.
- Martienz AS, Willoughby JR and Christie MR. 2018. Genetic diversity in fishes is influenced by habitat type and life-history variation. *Ecol Evol* 8, 12022-12031. <https://doi.org/10.1002/ece3.4661>.
- Norris AT, Bradley DG and Cunningham EP. 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* 182, 73-83. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00247-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00247-1).
- Pei J, Bao P, Chu M, Liang C, Ding X, Wang H, Wu X, Guo X and Yan P. 2018. Evaluation of 17 microsatellite markers for parentage testing and individual identification of domestic yak (*Bos grunniens*). *PeerJ* 6, e5946. <https://doi.org/10.7717/peerj.5946>.
- Pike C, Kaifu K, Crook V, Jacoby D and Gollock M. 2020. *Anguilla japonica*. IUCN Red List Threatened Species 2020, e.T166184A176493270. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T166184A176493270.en>.
- Smouse PE and Peakall ROD. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Van Dijk H, Wolff K and Devries ANDA. 1981. Genetic variability in *Plantago* species in relation to their ecology. *Theor Appl Genet* 60, 285-290. <https://doi.org/10.1007/BF00263720>.
- Vieira MLC, Santini L, Diniz AL and Munhoz CF. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol* 39, 312-328. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>.
- Walsh PS, Files NJ and Reynolds R. 1996. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res* 24, 2807-2812. <https://doi.org/10.1093/nar/24.14.2807>.
- Yue GH and Zia JH. 2014. Practical considerations of molecular parentage analysis in fish. *J World Aquacult Soc* 45, 89-103. <https://doi.org/10.1111/jwas.12107>.