

## Microsatellite DNA marker를 이용한 넙치, *Paralichthys olivaceus* 방류종묘의 유효어미수 평가

정달상\*, 김광수, 김정길<sup>1</sup>

국립수산과학원 자원조성연구팀, <sup>1</sup>남해수산연구소 어류육종연구센터

## Evaluation of Effective Breeders Number (Ne) for Stock Enhancement in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Using Microsatellite DNA Markers

Dal-Sang Jeong\*, Kwang-Soo Kim<sup>1</sup> and Kyung-Kil Kim<sup>1</sup>

Fisheries Resources Enhancement Research Team, NFRDI, Busan 619-902, Korea

<sup>1</sup>Fish Genetics and Breeding Research Center, South Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Geoje, 656-842, Korea

Genetic change from broodstock to hatchery stock of the olive flounder *Paralichthys olivaceus* and effective number of breeders ( $N_e$ ) were investigated by the different fertilized-egg collecting methods; E1 (eggs collected one day after spawning) and E2 (eggs collected two days after spawning) using seven microsatellite loci (Kop2, Kop22, Kop18, Kop3, Kop21, Kop9 and Kop26) for the better understanding of stock enhancement. Observed heterozygosity in three stocks ranged from 0.651 at Kop3 to 0.928 at Kop22, with offspring being slightly higher heterozygous over their parents. However, the genetic reduction of offspring was significant. The offspring allele number per locus was reduced to 23.5% for E1 and 17.6% for E2 of their maternal number.  $N_e$  to the hatchery stock was estimated to be 21.9 for E1 and 34.3 for E2. The inbreeding coefficients of populations E1 and E2 were 0.023 and 0.015, respectively. The present study suggests the extension of the egg collection period for a recovery of the genetic diversity in artificially produced offspring.

**Keywords:** Olive flounder, Microsatellite DNA maker, Genetic variability, Effective number of breeders, Stock enhancement

### 서 론

최근 많은 인공종묘들이 방류됨으로서 방류 대상종의 유전적 다양성의 파악은 수산자원의 조성과 관리를 위한 아주 중요한 과정이 되었다. 인공종묘생산에 이용되고 있는 어미는 자연산에 비해 아주 적은 유전자 공급원(gene pool)을 가지고 있다. 따라서 이들 어미로부터 생산된 종묘는 유전자 빈도 및 대립유전자수의 감소 뿐 만 아니라 이러한 종묘들이 대량으로 자연에 방류되면 자연집단의 유전적 다양성을 감소시킬 것으로 예상되고 있다. 그러므로 종묘방류는 생태계에 영향을 최소화시킬 수 있는 질적으로 향상된 건강한 종묘의 방류가 요구되고 있다(Evans et al., 2004; FAO, 1993; Jeong D. S., 2003; Norris et al., 2000; Sekino et al., 2002).

또한 유전적 다양성은 생물집단의 적응에 관련한 중요한 특

성이므로 유전적 다양성을 높게 유지하기 위해서는 집단의 유효크기를 높게 유지하는 것이 요구된다. 집단의 유효크기가 작으면 유전적 다양성을 유지할 수 없을 뿐만 아니라 근교에 의한 동형접합체율(Homozygosity)의 상승과 함께 근교약세(inbreeding depression)를 초래하게 된다(Fujio, 1997; Norris et al., 2000; Taniguchi and Nugroho, 2001). 특히 Tessier et al. (1997)은 지속적인 대량방류에 따라 대서양 연어 집단의 유효집단크기를 50% 감소시킨다는 보고를 하였다.

따라서 FAO (1981)에서는 수산생물의 유전적 다양성 보호와 근친교배를 방지하기 위하여 유효어미수를 단기사육에서는 50 마리, 장기사육에서는 500마리로 유지할 것을 권고하고 있다. 또한 자연환경에 대한 유전학적인 고려 없는 대량방류는 자연집단의 생존, 성장 및 산란수 등에 영향을 미치며, 이러한 영향을 최소화할 수 있는 유일한 방법은 유효어미수(effective number of breeders,  $N_e$ )를 유지하는 것이라고 보고하고 있다(Sekino et al., 2002).

\*Corresponding author: dsjeong@nfrdi.re.kr

본 연구는 수산 및 양식생물의 집단유전학, 유전육종, 유전 지도도 작성, 친자감별 등에 널리 이용되고 있으며, 자원조성을 위한 방류용 어미의 관리를 위한 연구에도 적용(Allendorf, F. W., 1986; Hara and Sekino, 2003; Jeong et al., 2003; Sekino et al., 2003; Takagi et al., 1997) 되고 있는 microsatellite DNA marker 를 이용하여 우리나라 종묘 방류에 많은 비중을 차지하고 있는 넙치, *Paralichthys olivaceus*를 대상으로 일반적인 방법으로 생산된 방류종묘집단과 어미집단의 유전적 차이를 파악하고 방류종묘의 유전적 다양성을 향상시키기 위한 방안을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

일반적으로 종묘생산에 많이 이용되고 있는 3~4년생(평균 전장 55.1±4.1 cm, 평균 체중 2.4±0.6 kg) 양식산으로 암컷 31마리, 수컷 52마리로 총 83마리를 구입하여 국립수산물연구원 어류육종연구센터의 실내 80톤 원형 수조에 수용하여 본 실험의 어미집단으로 사용하였다. 종묘집단은 이들 어미집단으로부터 산란기의 피크인 2004년 4월 중순에 자연산란으로 부상된 수정란을 하루 동안(약 15시간) 수집하여 생산된 종묘(E1 종묘집단)와 이들 동안(약 30시간) 수집하여 생산된 종묘(E2 종묘집단)로 나뉘었으며, 각각의 수집된 수정란은 2톤 원형수조에 수용하여 로티피, 알테미아, 배합사료 등을 먹이로 주면서 40일간 실내 사육하였다.

분석에 이용된 종묘집단(평균 전장 2.1±0.2 cm)은 실내 사육 후 E1 종묘집단에서 129마리, E2 종묘집단에서 111마리를 사육수조에서 무작위로 채집하였고, 어미집단은 산란시기가 끝난 후 전 개체의 꼬리지느러미 일부를 절취하였다. 채집된 각 시료는 100% alcohol에 보관하여 DNA 분석에 사용하였다.

### Microsatellite 분석

Dr. GenTLE kit (TaKaRa)를 이용하여 DNA를 추출하였으며, 분석에 사용된 microsatellite loci는 Kim et al. (2003)의 방법에 의해 추출된 7개(Kop2, Kop22, Kop18, Kop3, Kop21, Kop9, Kop26)를 이용하였다. 또한 각 시료의 genotype 분석은 DNA 염기서열 분석기(US/ABI Prism 3100, Applied Biosystems)를 사용하였다.

어미집단과 종묘집단의 유전적 다양성을 파악하기 위하여 각 유전자좌에 대한 대립유전자수(number of alleles per locus), 이형접합체율(observed heterozygosity;  $H_o$ , expected heterozygosity;  $H_e$ ), 유전자 빈도 등을 분석하였으며, 각 유전자좌에 대하여 AMOVA (Analysis of molecular variance approach used in Arequin,  $P < 0.05$ )에 의한 Hardy-Weinberg equilibrium test를 하였다.

### 친자감별

어미집단과 이들 어미로부터 생산된 종묘집단간의 친자감별은 Perez-Enriquez et al. (1999) 및 Taniguchi and Nugroho (2001)의 방법에 따라 어미와 종묘들의 대립유전자의 일치율을 판별할 수 있는 프로그램을 자체 개발하여 이용하였으며, 7개의 microsatellite loci의 크기가 완전히 일치하는 것만을 분석에 사용하였다. 또한, 유전자 동일성검사 결과에 따라 산란에 참여한 실제 어미를 파악하고 유효어미수(the effective number of parents,  $N_e$ )와 근교계수(inbreeding coefficient,  $F$ )를 구하였다.

## 결 과

어미집단의 대립유전자수는 평균 12.1개였으며, Kop3에서 6개로 가장 적었고 Kop22와 Kop18은 각각 15개로 가장 많았다

**Table 1.** Genetic variability between breeders and offspring of olive flounder in seven microsatellite loci

	Kop2	Kop22	Kop18	Kop3	Kop21	Kop9	Kop26	Mean
<b>Breeders</b>								
No. of alleles	11	15	15	6	14	11	13	12.1
Heterozygosity								
Observed ( $H_o$ )	0.819	0.928	0.831	0.651	0.795	0.723	0.904	0.807
Expected ( $H_e$ )	0.819	0.878	0.878	0.668	0.744	0.811	0.858	0.808
( $H_o/H_e$ )	1.000	1.057	0.946*	0.975	1.069	0.891*	1.054	0.999
<b>E1</b>								
No. of alleles	9	11	12	5	9	9	10	9.3
Heterozygosity								
Observed ( $H_o$ )	0.884	0.891	0.906	0.651	0.814	0.760	0.837	0.820
Expected ( $H_e$ )	0.813	0.852	0.851	0.725	0.780	0.760	0.807	0.798
( $H_o/H_e$ )	1.087*	1.046*	1.065*	0.898*	1.044*	1.000*	1.037*	1.025
<b>E2</b>								
No. of alleles	10	13	12	5	11	9	10	10.0
Heterozygosity								
Observed ( $H_o$ )	0.829	0.883	0.811	0.703	0.829	0.910	0.874	0.834
Expected ( $H_e$ )	0.816	0.880	0.849	0.702	0.788	0.800	0.828	0.809
( $H_o/H_e$ )	1.016*	1.003*	0.955*	1.001*	1.052*	1.138*	1.056*	1.032

\*Departure from Hardy-Weinberg equilibrium (AMOVA test,  $P < 0.05$ ).

(Table 1). 하루 동안 채란하여 생산된 E1 종묘집단의 대립유전자수는 평균 9.3개이며, Kop3이 5개로 가장 적었고, Kop18이 12개로 가장 많았다. 또한 이들 동안 채란하여 생산된 E2 종묘집단의 대립유전자수는 평균 10.0개였으며, Kop3가 5개로 가장 적었고, Kop22가 13개로 가장 많았다. 채란기간이 길수록 대립유전자수가 많아지는 결과를 나타내었다.

어미집단, E1 종묘집단 및 E2 종묘집단 등 3개 집단의  $H_o$  범위는 0.651~0.928이었으며, Kop3가 가장 낮고 Kop22에서 높게 나타났다. 또한 어미집단의 평균  $H_o$ 는 0.807로 3개 집단 중 가장 낮았고 E2 종묘집단에서 0.834로 가장 높게 나타났으며, 채란기간이 길수록 높게 나타나는 경향을 보였다. 각 유전자좌에 대한 AMOVA에 의한 Hardy-Weinberg equilibrium test 결과, 어미집단에서 Kop18과 Kop9에서  $P < 0.05$ 의 유의적인 차이를 보인 반면에 종묘집단에서는 모든 locus에서 유의적인 차이를 보였다(Table 1). 그러나 각 유전자좌별 대립유전자의 빈도는 Table 2와 같이 두드러진 차이는 보이지 않았다.

채란기간의 차이에 따른 대립유전자와  $H_o$ 의 변화를 보면, 종묘집단의 대립유전자수는 어미집단에 비해 최저 9.1%에서 최고 35.7%의 감소를 나타내었고, 평균적으로 E1 종묘집단에서 23.5%, E2 종묘집단에서 17.6%의 감소하였다. 또한  $H_o$ 는 어미집단에 비해 유전자좌에 따라 차이가 있으나 평균적으로 E1 종묘집단에서 1.6%, E2 종묘집단에서 3.3%가 증가하였다(Table 3).

친자감별 검사 결과, 산란에 관여한 암수 한 쌍의 couple 수는 E1 종묘집단에서는 27이었으며, E2 종묘집단에서는 60으로 E1 종묘집단 보다 2배 정도가 높았다. 또한 실제 산란에 참여한 어미수는 E1 종묘집단에서 총 23마리였으며 이중 암컷 9마리, 수컷 14마리였고, E2 종묘집단에서는 35마리로 암컷 15마리, 수컷 20마리였다. 유효어미집단크기( $N_e$ )를 추정하기 위해 산란에 관여한 실측어미의 암수의 비율을 보정하면,  $N_e$ 는 E1 종묘집단에서 21.9마리, E2 종묘집단에서 34.3마리로 추정되었다. 이에 따라 근교계수는 E1 종묘집단이 0.023, E2 종묘집단은 0.015로서 E2 종묘집단에서 낮게 나타났다(Table 4).

### 고 찰

집단의 유효크기는 임의교배를 행하는 이상적인 집단의 개체수로 환산해서 나타내는 것으로 정의되며, 그 집단의 생존을

**Table 2.** Major allele frequencies of olive flounder breeders and offspring at seven microsatellite loci

Allele	Size (bp)	Breeders	E1	E2
Kop2	84	0.114	0.163	0.081
	94	0.120	0.031	0.086
	98	0.331	0.236	0.333
	102	0.151	0.085	0.131
	114	0.120	0.295	0.167
Kop22	144	0.096	0.035	0.072
	150	0.084	0.105	0.153
	158	0.253	0.209	0.149
	160	0.084	0.174	0.144
	162	0.127	0.174	0.162
	164	0.084	0.143	0.077
Kop18	204	0.181	0.248	0.303
	210	0.090	0.070	0.077
	218	0.225	0.136	0.113
	220	0.120	0.174	0.113
	222	0.066	0.074	0.099
Kop3	113	0.482	0.256	0.427
	115	0.271	0.376	0.261
	117	0.139	0.151	0.158
	121	0.078	0.213	0.149
Kop21	139	0.054	0.074	0.095
	141	0.453	0.329	0.372
	143	0.102	0.116	0.179
	153	0.060	0.062	0.086
	167	0.175	0.287	0.144
Kop9	184	0.211	0.097	0.295
	186	0.120	0.066	0.041
	192	0.321	0.395	0.221
	194	0.078	0.027	0.077
	198	0.120	0.244	0.221
Kop26	177	0.090	0.012	0.059
	179	0.048	0.105	0.117
	183	0.261	0.329	0.248
	185	0.102	0.120	0.126
	195	0.199	0.205	0.260
	215	0.072	0.101	0.072

위한 최소 크기를 의미하며 그 크기를 높게 유지하는 것이 중요하다. 집단의 유효크기가 작아지면 유전적 다양성이 적어지며, 또한 근교에 의한 동형접합체율(Homozygosity)이 증가하게 되고 근교약세에 의한 집단의 퇴보가 일어나게 된다. 어류와 같이 산란양이 많은 생물에서 인공종묘집단의 유효 크기는 수조 내의 어미수 보다는 적어진다. FAO (1993)는 인공종묘생산에서 유지해야 하는 어미수에 관한 지침을 제시하였으나 인공종묘집단의  $N_e$ 를 파악하는 방법은 충분히 검토되지 못하였다.

**Table 3.** Reduction in alleles per locus (%) and heterozygosity (%) from broodstock to offspring in different egg collecting periods

	Kop2	Kop22	Kop18	Kop3	Kop21	Kop9	Kop26	Mean
Alleles per locus								
E1	18.2	26.7	20.0	16.7	35.7	18.2	23.1	23.5
E2	9.1	13.3	20.0	16.7	21.4	18.2	23.1	17.6
Heterozygosity ( $H_o$ )								
E1	-7.9	4.0	-9.0	-	-2.4	-5.1	7.4	-1.6
E2	-1.2	4.8	2.4	-8.0	-4.3	-25.9	3.3	-3.3

**Table 4.** Estimation of effective number of broodstock size by pedigree tracing using seven microsatellite loci

	Offspring	
	E1	E2
Number of contributors	23	35
Female (Nf)	9	15
Male (Nm)	14	20
Ne (unequal sex proportion) = 4 NfNm / (Nf+Nm)	21.9	34.3
Inbreeding coefficient (F=1/2Ne)	0.023	0.015

현재 우리나라에서 넙치의 종묘생산에 이용되는 어미는 1980년대 중반 이후 생산된 종묘로부터 성장이 빠른 것 혹은 체색깔이 좋은 것 등을 수 세대에 걸쳐 양식용 종묘생산을 위한 어미로 이용한 것으로 알려져 있다. 이러한 어미로부터 생산된 종묘들의 유전형질은 자연산에 비해 단순해 있을 것으로 추정되며, 이러한 종묘들이 대량으로 자연생태계에 방류된다면 자연산 집단의 유전적 조성 등에 영향이 미칠 것으로 예상된다.

Sekino et al., (2002)이 넙치를 대상으로 인공 생산된 종묘집단과 그 지역의 자연 집단과의 유전학적 차이를 11개의 microsatellite loci를 이용하여 조사한 결과에 의하면, 종묘집단의 평균  $H_o$ 는 0.67로서 자연집단의 0.76 보다 낮게 나타났으며, 종묘집단의 대립유전자수는 5.9~10.7개로 자연집단의 15.3~18.2개에 비하여 평균 47.2%가 감소하였다. 그러나 Sekino et al., (2002)의 실험에서는 약 100마리의 자연산 어미를 이용하여 생산된 종묘집단을 자연집단과 비교한 결과이므로 양식용 어미를 이용할 경우에는  $H_o$ 와 대립유전자수가 보다 더 감소될 것으로 예상된다.

6마리의 암컷 어미와 8마리의 수컷 어미로부터 생산된 종묘 집단의  $H_o$ 는 0.883으로서 어미집단 보다 낮게 나타났다(Hara and Sekino, 2003). 그러나 본 실험에서는 종묘집단의  $H_o$ 가 어미집단보다 약간 높게 나타났다. 이와 같은 이유는 한정된 수 조 내에서 수컷이 산란에 적극적으로 참여하였을 것으로 추정된다. 실제로 산란에 관여된 암수 한 쌍 중에서 암컷 1마리에 수컷 9마리가 관여된 것을 볼 수 있었으며, 이와 같은 사례는 감성돔과 참돔의 경우에서도 나타났다(Jeong, 2003; Perez-Enrique et al., 1999).

본 실험에서의 각 유전자좌에 대한 AMOVA에 의한 Hardy-Weinberg equilibrium test 결과, 어미집단에서 Kop18과 Kop9에서 유의적인 차이( $P < 0.05$ )를 보인 반면에 종묘집단에서는 모든 locus에서 유의적인 차이를 보였다. 이러한 결과는 종묘집단이 유전적으로 불안정한 상태라는 것을 나타낸 것이라고 할 수 있다.

어미집단과 종묘집단의 대립유전자수는 하루 동안 체란한 E1 종묘집단에서 23.5%가 감소하였고, 이를 동안 체란한 E2 종묘집단에서는 17.6%가 감소하여 체란기간이 긴 집단에서 대립유전자수의 감소가 줄어들었다. 감성돔에서는 어미 51마리에서 생산된 종묘의 유전자 감소는 2년간 평균 약 20%의 대립유전

자수가 감소하였으며, 참돔의 경우는 248마리의 어미로부터 평균 25.5%가 감소했다(Jeong, 2003; Perez-Enrique et al., 1999). 따라서 microsatellite DNA marker를 이용한 방류종묘의 유전학적 다양성의 평가는 이형접합체를 보다 유전자좌에 따른 대립유전자수의 파악이 보다 중요하다고 생각된다.

본 실험의 친자감별 결과, E1 종묘집단의 생산에 참여한 어미수는 암컷 29.0%와 수컷 26.9%가 산란에 참여했으며, E2 종묘집단의 생산에는 암컷 48.4%와 수컷 38.5%의 어미가 산란에 참여하여 체란일수가 많은 E2 종묘집단의 어미들이 산란에 참여하는 비율이 높게 나타났다.

참돔 248마리의 어미집단을 이용하여 생산된 종묘집단의 유효어미수와 근교계수의 추정에는 유효어미수가 63.7마리였으며, 근교계수는 0.008로서 FAO에서의 50마리와 0.10의 기준을 넘었지만(Perez-Enrique et al., 1999), 본 실험에서 양식산 어미를 이용하여 생산된 종묘의 추정된 유효어미수는 약 15시간 동안 체란한 E1 종묘집단에서 21.9마리였고, 약 30시간 동안 체란한 E2 종묘집단에서 34.3마리로 체란기간이 길어질수록 유효어미수가 많아지는 경향을 보였다. 그러나 FAO에서 자연집단의 유전적 다양성에 영향이 최소화 될 수 있도록 권고한 50마리에도 미치지 못한 값이었다. 이에 따라 근교계수도 15시간 동안 체란한 E1 종묘집단에서 0.023이었고, 30시간 동안 체란한 E2 종묘집단에서 0.015로 FAO의 권고치인 0.10 보다 높게 나타났다. 보다 정확한 Ne 추정을 위하여 한 쌍의 어미로부터 생산된 종묘수를 보정할 경우에는 Ne의 값은 훨씬 더 떨어질 것이고 이에 따라 F의 값은 더욱 더 높아질 것으로 생각된다. 따라서 방류용 종묘를 생산할 경우, 유전적 다양성을 높일 수 있도록 많은 어미를 확보한다든가 자연산 어미를 이용한다든가 혹은 체란일수를 늘리는 등의 방안이 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

현재 우리나라에서 종묘방류량이 많은 넙치의 유전적 다양성을 파악하기 위하여 양식산 어미 암컷 31마리, 수컷 52마리로 총 83마리로부터 생산된 종묘의 유효어미수와 근교계수를 microsatellite DNA marker 7개를 이용하여 추정하였다. 어미집단과 종묘집단의 대립유전자수는 어미집단에 비하여 하루 동안 체란한 E1 종묘집단에서 23.5%가 감소하였고, 이를 동안 체란한 E2 종묘집단에서는 17.6%가 감소하였다.

유전자 동일성검사 결과, 산란에 관여한 어미수는 E1 종묘집단에서 총 23마리였으며 이중 암컷 9마리, 수컷 14마리였고, E2 종묘집단에서는 35마리로 암컷 15마리, 수컷 20마리였다. 유효어미집단크기(Ne)를 추정하기 위해 산란에 관여한 실제 어미의 암수의 비율을 보정하면, Ne는 E1 종묘집단에서 21.9마리, E2 종묘집단에서 34.3마리로 추정되었다. 이에 따라 근교계수는 E1 종묘집단이 0.023, E2 종묘집단은 0.015로서 E2 종묘집단에서 낮게 나타났다. 이와 같은 결과는 수산생물의 다양성을 보존하

기 위한 FAO의 권고 기준보다 높게 나타남에 따라 유전적 다양성을 향상시키는 방류용 종묘생산 방안이 필요할 것으로 나타났다.

### 감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원(수산자원조성사업 기반연구, RP-2006-RE-002)의 지원에 의하여 연구되었습니다.

### 참고문헌

- Allendorf, F. W., 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biol.*, 5, 181-190.
- Evans, B., J. Bartlett, N. Sweijd, P. Cook and N. G. Elliott, 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.
- FAO, 1993. Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic genetic resources. FAO Fisheries Report No. 491, 58 pp.
- FAO, 1981. Conservation of genetic resources of fish, Report of the expert consultation on the genetic resources of fish. FAO Fish Tech. Paper., 217, 1-43.
- Fujio, Y., 1997. Genetic variability and heterotic effect within population of aquatic organism. *Fish Genet. Breed Sci.*, 24, 43-52.
- Hara, M. and M. Sekino, 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture*, 217, 107-114.
- Jeong, D. S., 2003. Studies on genetic evaluation of black sea bream *Acanthopagrus schlegeli* in stock enhancement. Ph. D. thesis, Hiroshima University, Japan, 71 pp.
- Jeong, D. S., T. Umino, K. Kuroda, M. Hayashi, H. Nakagawa, J. C. Kang, K. Morishima and K. Arai, 2003. Genetic divergence and population structure of black sea bream *Acanthopagrus schlegeli* inferred from microsatellite analysis. *Fish. Sci.*, 69, 896-902.
- Kim, W. J., K. K. Kim, J. H. Lee, D. W. Park, J. Y. Park and J. Y. Lee, 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 491-493.
- Norris, A. T., D. G. Bradley and E. P. Cunningham, 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, 182, 73-83.
- Perez-Enriquez, R., M. Takagi and N. Taniguchi, 1999. Genetic change and pedigree tracing of a hatchery-reared stocks of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 173, 413-423.
- Sekino, M., K. Saitoh, T. Yamada, A. Kumagai, M. Hara and Y. Yamashita, 2003. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, 221, 255-263.
- Sekino, M., M. Hara and N. Taniguchi, 2002. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 213, 101-122.
- Takagi, M., N. Taniguchi, D. Cook, R. W. Doyle, 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream and detection in closely related species. *Fisheries Sci.*, 63, 199-204.
- Taniguchi, N. and E. Nugroho, 2001. Estimation of effective population size and inbreeding coefficient in hatchery reared red sea bream by microsatellite DNA markers. *Fish Genet. Breed Sci.*, 30, 89-95.
- Tessier, N., L. Bernatchez and JM Wright, 1997. Population structure and impact supportive breeding inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-locked Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Mol. Ecol.*, 6, 735-750.

원고접수 : 2006년 6월 15일

수정본 수리 : 2006년 7월 28일