



이중-PCR을 이용한 홍합, *Mytilus coruscus*의 신속한 종 판별법 개발

김근식 · 윤성진[†]
(한국해양과학기술원)

Development of Duplex-PCR Method for Rapid Identification of Hard-shelled Mussel, *Mytilus Coruscus*

Keun-Sik KIM · Sung-Jin YOON[†]
(Korea Institute of Ocean Science & Technology)

Abstract

Using multiplex polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers, a rapid method was developed to distinguish between the hard-shelled mussel (*Mytilus coruscus*) and Mediterranean mussel (*M. galloprovincialis*) in order to prevent their illegal distribution, and they are morphologically similar to each other during the spat period. The designed primers amplify the mitochondrial cytochrome b (COB) region from mussel shellfish (*genus Mytilus*). Using the sequences of the COB region, the Mytilus_c primer set that shows amplification for mussel shellfish (*genus Mytilus*) and the Mytilus_corS primer set that shows specific amplification for hard-shelled mussel was developed. In the hard-shelled mussel, duplex-PCR with both primer sets amplified a species-specific band of 334 bp with a 236 bp band common to the mussel genus. However, in the Mediterranean mussel, only a common 236 bp band was amplified. This result suggests that duplex-PCR with two primer sets allows identification of errors that may occur in the PCR process (i.e., lack of bands) and clearly distinguishes between hard-shelled mussel and Mediterranean mussel using a single PCR. Therefore, the molecular markers developed in this study can be a powerful and accurate tool to rapidly distinguish between hard-shelled mussels and Mediterranean mussel.

Key words : *Mytilus coruscus*, *Mytilus galloprovincialis*, Rapid identification, Duplex-PCR, Species-specific, Molecular marker

I. 서론

이미패강(*Bivalvia*) 홍합목(*Mytiloida*) 홍합과(*Mytilidae*)에 속하는 홍합속 패류는 전 세계적으로 식용으로 이용되어 산업적 가치가 높은 분류군이다(Kim et al., 2013). 우리나라 연안에 서식하며 경제성이 있는 종은 참담치 또는 섭조개로

불리는 홍합(*Mytilus coruscus*)과 지중해담치(*M. galloprovincialis*)가 있으며, 이 중 홍합은 울릉도를 포함한 동해안 일대와 완도, 만리포 등 서해안 일부 도서 지역, 그리고 제주도의 추자도 연안에 분포하는 것으로 보고되어 있다(Je et al., 1990; Kwon et al., 1993; Kang et al., 1999). 한편, 지중해가 서식지였던 지중해담치는 공식적으로

[†] Corresponding author : 054-791-8404, sjyon@kiost.ac.kr

* 본 연구는 한국해양과학기술원의 연구비(과제번호: PE99604) 지원으로 수행되었습니다.

언제 어디서 유입되었는지에 대한 기록은 없으나, 선박평형수에 유생이 포함되어 국내로 이입된 것으로 추정하고 있다(Wi et al., 2003; Kang et al., 2013). 지중해담치는 이입된 후 높은 생태적 지위로 홍합과의 서식지 경쟁에서 우위를 차지하며 우리나라 고유 홍합의 서식지를 감소시킨 것으로 알려져 있다(Wi et al., 2003).

홍합의 가격은 2008년 킬로그램당 1,467.7원에서 2015년 3,541.1원으로 141% 상승한 만큼 많은 가식부위와 희소성으로 산업적 가치가 높다(<http://www.fips.go.kr>). 하지만 홍합은 다양한 환경 변화, 남획 등과 더불어 지중해담치와의 서식지 경쟁에서 밀려 자원량이 지속적으로 감소하고 있어 대량 생산을 위해 제주도를 포함한 남해 일부 지역에서 시험양식을 추진하였으나, 인공채묘 및 양식은 현재까지는 어려운 실정으로(Wi et al., 2003; Lee et al., 2016) 양식 생산량을 추정하기에도 자료가 부족한 상태이다. 홍합과 지중해담치는 형태적으로 각정의 모양, 패각 안쪽의 광택, 크기 등의 형질에서 차이를 보이지만, 시장에서 두 종을 혼동하여 판매하고 있고 가공하면 육안으로 판별이 불가능하다. 또한 자연 및 인공채묘를 이용한 홍합 양식을 시도할 때 같이 서식하는 지중해담치의 피해를 구분하지 못하면 양식 효율이 급격히 낮아질 수 있다. 이에 따라 고유종 보호, 양식산업 활성화 등을 위해서 종 판별 검사의 정확성을 높이고, 처리 속도를 향상시키며 가공품의 종 판별도 가능한 객관적인 방법의 확립이 필요한 실정이다.

외부형질에 의존하는 기존의 종 판별방법의 한계를 극복하고, 정확하고 신속하게 판별하여 객관성을 높이고자 다양한 분자생물학 기법들이 개발되고 있다. 특히 유전자의 염기서열을 확보하여 비교 분석하는 분자계통학적 기법이 보편적이다. 이 중 미토콘드리아 유전자는 일반적으로 모계유전을 하는 특징을 가지며, 유전자 재조합이 일어나지 않아 점진적인 변화를 관찰할 수 있는 장점이 있으나(Hauswith & Laipias, 1985; Irwin et

al., 1991; Howard & Berlocher, 1998), 유전자염기서열을 확보하기 위해 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 정제, 염기서열결정의 과정은 시간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있다. 이를 보완하기 위해 최근 경제성이 있는 특정 종을 대상으로 최소 하나의 염기서열의 특정 변이를 기준하여 프라이머를 제작하고, 이를 이용한 PCR 증폭 유무로 종간(또는 종내)구분이 가능한 종 특이 PCR(species-specific polymerase chain reaction) 분석법이 개발되고 있다(Bang et al., 2013; Chung et al., 2017; Noh et al., 2017). 특히 다중-PCR (multiplex-PCR)은 한번에 여러개의 디자인된 프라이머를 넣고 증폭함으로써 종 특이 PCR의 효율을 극대화할 수 있는 방법이다.

따라서 본 연구에서는 부정 유통 근절 및 홍합 양식기술 개발의 일환으로 홍합속 패류들의 미토콘드리아 DNA 중 cytochrome b (COB) 영역의 염기서열을 확보하고, 이 중 홍합만을 특정적으로 증폭이 가능한 종 특이 프라이머를 개발함으로써 가공 처리후 또는 치폐시기에 형태학적으로 구분이 어려운 홍합 및 지중해담치를 명확하게 판별이 가능한 이중(duplex) PCR 방법을 개발하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 생물시료 및 유전자원 확보

본 연구를 위해서 홍합(*Mytilus coruscus*)은 전라남도 신안군 흑산면 예리 일대에서 30개체를 채집하였으며, 지중해담치(*M. galloprovincialis*)는 울릉도 현포항 일대에서 50개체를 채집하였다. 채집한 개체는 해수에 담아 실험실로 운반하였으며, 각장, 각고, 각폭, 전중, 체중을 측정하고, 동시에 각정이 구부러지고 패각의 두께 두꺼운 종을 홍합으로 형태학적 종 판별을 수행하였다. 각 개체별 패각근을 99.9% 에탄올에 담아 보관하였

으며, 패각근 일부를 절단하여 DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용해 제조사에서 제공한 매뉴얼에 의거해 genomic DNA를 추출하였다.

2. 미토콘드리아 Cytochrome b 영역 염기서열분석

유전자은행(Genbank)에 확보되어 있는 홍합, 지중해담치, 진주담치(*M. edulis*), 캘리포니아홍합(*M. californianus*), 북방담치(*M. trossulus*)의 미토콘드리아 DNA 전체 염기서열을 내려 받은 후 BioEdit 프로그램(ver. 7.1.11; www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)의 ClustalW (Thompson et al., 1997)를 이용하여 다중서열정렬을 수행하였다. 이후 보존성이 높은 부분의 염기서열 정보를 바탕으로 홍합속 패류에서 미토콘드리아 DNA 영역 중 cytochrome b (COB) 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하였다[*Mytilus_COBf* (5'-agg Yggtgagctgtaaactcat-3'), *Mytilus_COBr* (5'-ccatggacaa taccacaaaatc-3')]. 미토콘드리아 COB영역을 증폭하기 위한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 genomic DNA 100 ng과 각 프라이머 5 pmole을 20 μ L 용적의 *AccuPower*® PCR Premix (Bioneer, Korea)에 넣었다. 94°C에서 10분간 초기 열변성 후, 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분의 순환반응을 35회 실시하고, 최종적으로 72°C에서 7분간 신장 반응을 수행하였다. PCR 반응의 성공 여부를 GelRed (Biotium Inc., USA)로 염색된 1.5% 한천젤에서 전기영동하여 확인하였다. 증폭된 PCR산물은 MGTM PCR SV Purification kit (Macrogen Inc., Korea)로 정제한 후, 자동염기서열 분석기인 ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열을 확보하였다.

3. 프라이머 디자인

확보한 염기서열은 BioEdit 프로그램을 이용하

여 assemble하여 전체길이의 COB 염기서열을 확보하였다. 홍합 특이적 증폭 가능성을 높이기 위해 유전자은행(Genbank)에 확보되어 있는 홍합 (GenBank Accession No.: KJ577549), 지중해담치 (GenBank Accession No.: AY497292), 진주담치 (GenBank Accession No.: AY484747, NC_006161), 캘리포니아홍합(GenBank Accession No.: JN021300), 그리고 북방담치(GenBank Accession No.: NC_007687)의 미토콘드리아 전체 염기서열 중 COB 유전자 부위를 잘라 유전자 매트릭스에 추가하여 비교 분석 하였다. 유전자 매트릭스 내 염기서열 중 종내 다형성을 보이는 변이 서열을 제외하고, 종간 특이적으로 나타나는 변이 서열을 탐색하였다. 목적에 맞는 PCR 산물의 크기를 고려하여 홍합속 패류에서 모두 증폭이 가능하도록 보존적인 영역의 염기서열을 대상으로 *Mytilus_c* 프라이머 세트와 홍합에서만 증폭이 가능하도록 *Mytilus_corS* 프라이머 세트를 제작하였다<Table 1>.

<Table 1> Primer informations in this study

| Primers | Sequences (5'→3')* | Expected size (bp) | Remarks |
|----------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------------------------|
| <i>Mytilus_cF</i> | ccRtttgtRatagtggcggtt | 236 | genus <i>Mytilus</i> common amplification |
| <i>Mytilus_cR</i> | gtttttatMggRttagcaggcc | | |
| <i>Mytilus_corSF</i> | ccacattggctggttggactac | 334 | <i>M. coruscus</i> species-specific amplification |
| <i>Mytilus_corSR</i> | gttattcctcccttttcatgagg | | |

* R=a+g, M=a+c

4. PCR 증폭 및 이중(duplex) PCR 증폭

중합효소연쇄반응은 홍합과 지중해담치 genomic DNA 50 ng을 기준으로 *Mytilus_c* 프라이머 세트, *Mytilus_corS* 프라이머 세트를 각각 이용하여 목적에 맞게 증폭이 일어나는지 여부를 확인하였다. 각 프라이머 5 pmole을 20 μ L 용적

의 AccuPower® PyroHotstart Taq PCR Premix (Bioneer, Korea)에 넣은 후 94°C에서 10분 간 초기 열변성 후, 94°C 40초, 50.0~60.7°C 40초, 72°C 1분 30초의 순환반응을 35회 실시하고, 최종적으로 72°C에서 15분간 신장 반응을 수행하였다. PCR 반응의 성공 여부를 GelRed (Biotium Inc., USA)로 염색된 1.5% 한천젤에서 전기영동하여 확인하였다. 성공적으로 증폭이 확인된 프라이머 세트를 위와 같은 방법과 조건으로 동일하게 이중-PCR을 수행하여 확인하였고, 증폭시간을 단축하기 위해 동일한 PCR 반응으로 순환반응 횟수를 22반복, 25반복, 28반복을 기준으로 증폭여부를 확인하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

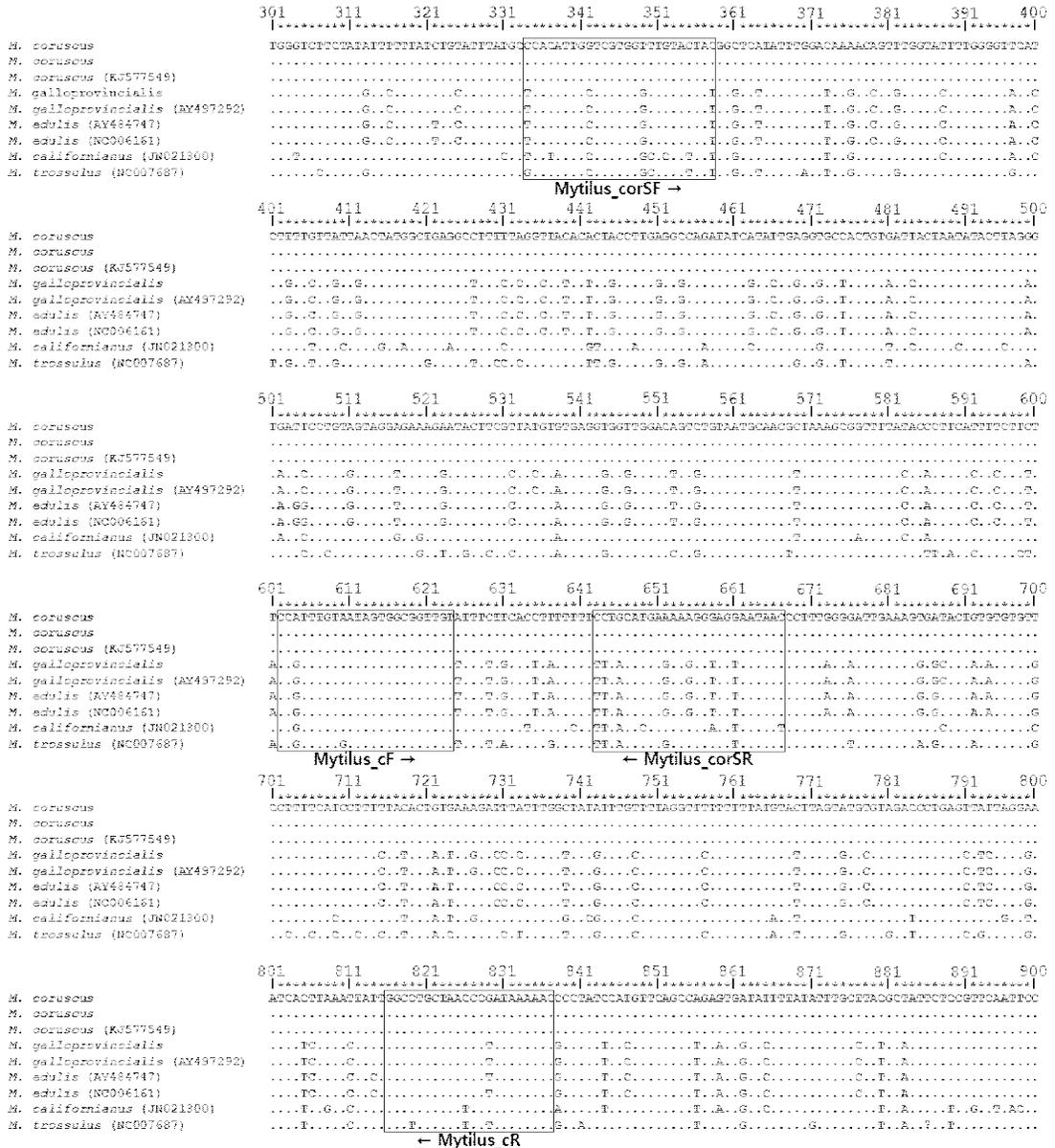
홍합(*Mytilus coruscus*)과 지중해담치(*M. galloprovincialis*)의 미토콘드리아 cytochrome b (COB) 영역의 염기서열 분석결과 총 1,308 bp로 확인되었다(Genbank accession no.: MH252428~MH252431). 홍합과 지중해담치의 대표 haplotype의 염기서열 조성은 홍합에서 아데닌(adenine, A)은 25.82%, 시토신(cytosine, C)은 15.81%, 구아닌(guanine, G)은 21.54%, 티민(thymine, T)은 36.82%로 확인된 반면, 지중해담치는 아데닌은 24.60%, 시토신은 17.34%, 구아닌은 22.31%, 티민은 35.75%로 홍합이 지중해담치에 비해 A+T함량이 높고, G+C함량이 낮은 것으로 조사되었다. 홍합, 지중해담치, 진주담치, 캘리포니아홍합, 그리고 북방담치를 포함한 COB 유전자 염기서열 매트릭스를 구축하여 변이 영역을 조사한 결과 염기서열의 변이는 434개였으며, 이 중 377개의 염기서열 위치에서 변이가 나타나 다형성 염기서열 사이트는 전체의 28.82%로 비교적 높았다. 총 변이가 나타난 염기서열 중 singleton variable 사이트는 90개였고, parsimony informative 사이트가 287개로 조사되었다. 생물종을 판별하기 위한 DNA

마커는 1970년대 allozyme을 시작으로 restriction fragment length polymorphisms (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphisms (AFLP), microsatellite DNA, single nucleotide polymorphism (SNP) 등으로 발전하였다(Liu & Cordes, 2004). 이 중 RFLP와 AFLP는 재현성은 뛰어나나 제한 효소를 처리해야하여 전처리 과정이 길고, RAPD는 재현성이 떨어지는 단점이 있다(Liu, 2011). Microsatellite DNA는 재현성과 다형성이 매우 좋지만 연구대상종 특이적 마커를 개발하고, 분석하는데 긴 시간이 걸리는 단점을 가지고 있다(Liu, 2011). 한편, 미토콘드리아 DNA는 재조합 과정 없이 모계유전으로 전달되기 때문에 대부분의 개체에 한 종류의 미토콘드리아만 존재하여 (Clayton, 1992) 이형 접합으로 인해 발생할 수 있는 오류를 피할 수 있어 종 판별에 매우 유용하다(Sezaki et al., 2005). 또한 핵 DNA에 비해 5~10배 높은 돌연변이율과 단순한 구조 덕분에 종 판별용 프라이머를 디자인할 시 유용하고, 많은 양의 복제수로 인해 PCR 실패율이 낮은 장점을 가지고 있다(Howard & Berlocher, 1998; Noh et al., 2017). 종 판별용 프라이머의 디자인을 위해서는 종을 대변할 수 있는 특정 염기서열을 대량으로 얻을 수 있어야하기 때문에 기준이 되는 유전자의 길이가 길어야 한다. 본 연구에서는 홍합속 패류에서 미토콘드리아 COB 영역 전체를 확보할 수 있는 *Mytilus_COB* 프라이머 세트를 개발하여 COB 유전자 전체 길이인 1,308 bp를 확보할 수 있어 개발한 COB 증폭용 프라이머의 효율은 매우 높았다. 또한 홍합과 지중해담치의 미토콘드리아 COB 영역 염기서열 조성에서 비교적 큰 차이를 보였으며, 홍합속 패류간에도 높은 변이율이 나타나 홍합 종 판별을 위한 특이 프라이머 디자인을 수행하기 위해 다양한 PCR 증폭 산물의 크기를 디자인할 수 있어 효율적이었다.

확인한 변이 사이트 중 홍합속 패류 공통으로 증폭이 가능한 *Mytilus_c*의 앞쪽 프라이머는 604

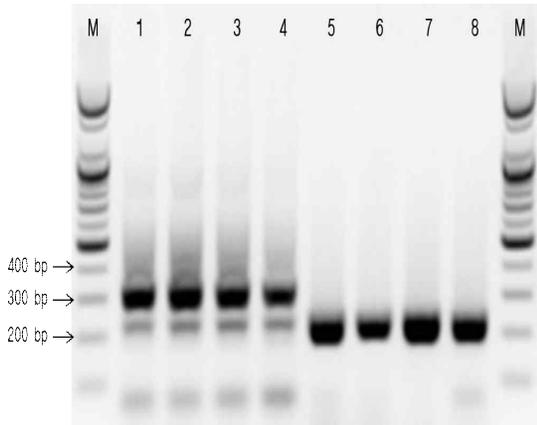
bp 위치의 변이 사이트를 포함하도록 디자인하였고, 뒤쪽 프라이머는 819, 826, 829 bp 위치의 변이 사이트를 포함하도록 디자인하였다. 또한 홍합 중 특이적 프라이머인 *Mytilus_corS*의 앞쪽 프라이머는 334, 337, 342, 349, 350, 352, 355, 358

bp 위치의 변이 사이트를 포함하도록 디자인하였고, 뒤쪽 프라이머는 643, 644, 646, 649, 652, 655, 658, 661, 667 bp 위치의 변이 사이트를 포함하도록 디자인하였다(Fig. 1).



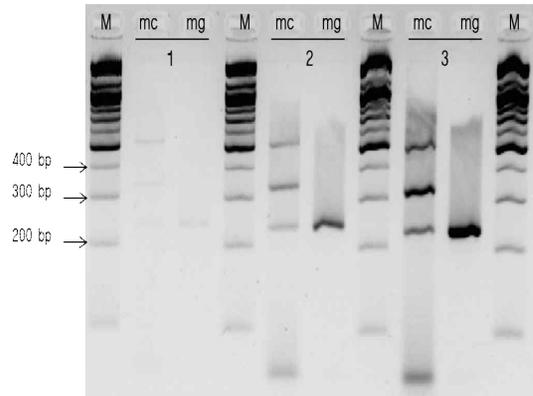
[Fig. 1] Position of polymorphism and primers design for duplex-PCR from the COB gene

디자인한 프라이머 세트를 이용하여 홍합과 지중해담치 간 적정증폭온도를 조사하기 위한 gradient PCR을 수행한 결과 Mytilus_c 프라이머 세트는 50.0~60.7°C에서 홍합과 지중해담치 모두에서 236 bp의 밴드가 확인되어 효율적으로 증폭되었으며, Mytilus_corS 프라이머 세트는 55.0~58.0°C에서 홍합에서만 334 bp의 밴드가 뚜렷이 확인되어 홍합 중 특이적 증폭 반응이 일어났다(data not shown). 일반적으로 가공처리를 하는 식품의 경우 고온, 고압, 멸균 등의 공정으로 인해 유전자가 손상되어 조각나는 경우가 발생하게 된다. 이로 인해 식품 내 첨가물을 동정하기 위한 마커는 PCR 증폭 산물을 작게 만드는 경향이 있다. 본 연구에서도 식품가공 공정에서 발생할 수 있는 유전자 손상시에도 개발한 프라이머 세트를 이용해 홍합 중 동정을 이룰 수 있도록 PCR 증폭산물의 크기를 350 bp 이하로 비교적 작게 디자인하여 홍합 가공시 발생할 수 있는 유전자 손상에 대해 일부 대비한 것으로 판단된다.



[Fig. 2] Rapid identification by duplex-PCR using genus *Mytilus* common primers with *M. coruscus* species-specific primers. The order of the samples is as follows: lanes 1~4, *M. coruscus*; lanes 5~6, *M. galloprovincialis*; lanes M, 100 bp plus DNA ladder (Bioneer, Korea)

이중-PCR 증폭을 위해 4개의 프라이머를 모두 동일한 농도로 넣고 PCR을 수행한 결과 홍합은 홍합 중 특이 밴드인 334 bp와 홍합속 패류 공통 밴드인 236 bp가 모두 확인된 반면 지중해담치는 홍합속 패류 공통 밴드인 236 bp만 확인되어 명확한 판별이 가능하였다([Fig. 2]). 이중-PCR 최소 PCR 반복수를 확인한 결과 25반복에서도 홍합과 지중해담치를 명확히 판별할 수 있었다([Fig. 3]).



[Fig. 3] Detection limits of duplex-PCR cycles. The order of the samples is as follows: lanes mc, *M. coruscus*; lanes mg, *M. galloprovincialis*; lane 1, 22 cycles duplex-PCR; lane 2, 25 cycles duplex-PCR; lane 3, 28 cycles duplex-PCR; lanes M, 100 bp plus DNA ladder (Bioneer, Korea)

이중-PCR을 포함한 다중-PCR (multiplex -PCR)의 경우 다양한 종을 대상으로 단 한번의 PCR로 종 판별을 이룰 수 있어 간편하고, 경제적이며, 재현성이 높아 종 판별 결과가 정확한 특징을 가지고 있다(Kang et al., 2015; Noh et al., 2017). 이러한 장점으로 해양 비브리오 종 판별(Izumiyama et al., 2011), 세균 동정(Park et al., 1998), 뱀장어 (Sezaki et al., 2005), 볼락류(Rocha-Olivares, 1998), 연어 및 송어(Rasmussen Hellberg et al., 2010), 식품 원료(Kim et al., 2014; Han et al., 2016) 및 가축(You et al., 2014) 등 다양한 분류군에서 활발

하게 개발되고 있다. 본 연구에서도 이중-PCR법을 이용하여 홍합과 지중해담치를 구분할 수 있는 종 특이 마커와 두 종 모두에서 증폭이 가능한 마커를 동시에 PCR함으로써 대상종의 특이 밴드 생성만을 목적으로 한 다른 연구들에 비해 단 한번의 PCR로 PCR 성공 여부를 알 수 있어 PCR 전처리 과정에서 발생할 수 있는 실수를 확인할 수 있고, 홍합과 지중해담치를 효과적으로 판별할 수 있다. 본 연구에서 개발한 이중-PCR 프라이머 세트 및 기술은 지중해담치를 홍합으로 속여 파는 등의 부정 유통 근절을 통한 소비자의 알권리를 증진할 수 있을 것이다. 더불어 형태학적으로 구분이 모호한 홍합과 지중해담치 치패를 정확하게 구분할 수 있기 때문에 홍합의 자연 및 인공채묘에 적극적으로 활용할 수 있는 기반기술로 이용가치가 높은 것으로 판단된다.

Acknowledgements

본 논문에 대한 공정한 심사를 해주신 익명의 심사위원들께 감사합니다.

References

- Bang, K. H. · Jo, I. H. · Kim, Y. C. · Kim, J. U. · Shin, M. R. · Moon, J. Y. · Noh, B. S. · Hyun, D. Y. · Cha, S. W. & Kim, H. S.(2013) Analysis of mitochondrial DNA sequence and molecular marker development for identification of *Panax* species, *Korean J Medicinal Crop Sci*, 21, 91~96. (in Korean)
- Clayton, D. A.(1992) Transcription and Replication of Animal Mitochondrial DNAs, *Int Rev Cytol*, 141, 217-232.
- Chung, I. Y. · Seo, Y. B. · Yang, J. Y. & Kim, G. D.(2017) Development and validation of real-time PCR to determine *Branchiostegus japonicus* and *B. albus* species based on mitochondrial DNA, *J Life Sci*, 27, 1331-1339. (in Korean)
- Han, S. H. · Oh, H. S. & Cho, I. C.(2017) Identifying the species of origin in commercial sausages in South Korea. *J. Applied Animal Res*, 45, 179~184.
- Hauswith, W. W. & Laiplas, P. J.(1985) Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA, *Nucl Acids Res*, 13, 8093~8104.
- Howard, D. J. & Berlocher, S. H.(1998) *Endless forms: species and speciation*, Oxford Univ. Press, 470 pp.
- Irwin, D. M. · Kocher, T. D. & Wilson, A. C.(1991) Evolution of cytochrome b gene of mammals, *J Mol Evol*, 32, 128~144.
- Izumiya, H. · Matsumoto, K. · Yahiro, S. · Lee, J. · Morita, M. · Yamamoto, S. · Arakawa, E. & Ohnishi, M.(2011) Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*, *Mol Cellular Probes*, 25, 174~176.
- Je, J. G. · Zhang, C. I. & Lee, S. H.(1990) Characteristics of shell morphology and distribution of 3 species belonging to Genus *Mytilus* (Mytilidae: Bivalvia) in Korea, *Korean J Malacol*, 6, 22~32. (in Korean)
- Kang, D. H. & Choi, K. S.(1999) Evaluation of methods used in the calculation of condition index using the mussel, *Mytilus coruscus* (Gould, 1861) collected from Chuja island, Cheju, Korea, *Korean J Malacol*, 15, 57~62. (in Korean)
- Kang, J. H. · Noh, E. S. · Park, J. Y. · An, C. M. · Choi, J. H. & Kim, J. K.(2015) Rapid origin determination of the northern mauxia shrimp (*Actetes chinensis*) based on allele specific polymerase chain reaction of partial mitochondrial 16S rRNA gene, *Asian-Australas. J Anim Sci*, 28, 568~572.
- Kim, K. H. · Lee, H. Y. · Kim, Y. S. · Kim, M. R. · Jung, Y. K. · Lee, J. H. · Chang, H. S. · Park, Y. C. · Kim, S. Y. · Choi, J. D. & Jang, Y. M.(2014) Development of species-specific PCR to determine the animal raw material, *J Fd Hyg Safety*, 29: 347~355.
- Kim, S. G. · Lee, S. J. & Oh, K. S.(2013) Food component characteristics of wild hard-shelled mussel *Mytilus coruscus* and cultured sea mussel

- Mytilus edulis* in Korea, Kor J Fisher Aqua Sci, 46, 717~724. (in Korean)
- Kwon, O. K. · Park, G. M. & Lee, J. S.(1993) Coloured shells of Korea, Academy Publishing Company, pp. 344. (in Korean)
- Lee, H. B. · Oh, J. K. · Moon, J. H. · Jo, H. J. · Jo, S. G. · Kim, H. S.(2016) Spat culture of the hard shelled mussel *Mytilus coruscus* in seawater pond, Korean J Malacol, 32, 203~209. (in Korean)
- Liu, Z. J. & Cordes, J. F.(2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics, Aquaculture, 238, 1~37.
- Liu, Z.(2011) Genomic variations and marker technologies for genome-based selection. In: Liu, Z. (eds.), Next Generation Sequencing and Whole Genome Selection in Aquaculture, Wiley-Blackwell, 3~19.
- Noh, E. S. · Lee, M. N. · Kim, E. M. · Park, J. Y. · Noh, J. K. · An, C. M. & Kang, J. H.(2017) Development of a Multiplex PCR Assay for Rapid Identification of *Larimichthys polyactis*, *L. crocea*, *Atrorhynchus nibe*, and *Pseudotolithus elongates*, J Life Sci, 27, 746~753. (in Korean)
- Park, Y. H. · Yoon, J. H. & S. T. Lee.(1998). Application of multiplex PCR using species-specific primers within the 16s rRNA gene for rapid identification of Nocardioideis strains, Int J Systematic Bacteriol, 48, 895~900.
- Rasmussen Hellberg, R. S. · Morrissey, M. T. & Hanner, R. H.(2010) A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America, J Food Sci, 75, 595-606.
- Rocha-Olivares, A.(1998) Multiplex haplotype-specific PCR: a new approach for species identification of the early life stages of rockfishes of the species-rich genus *Sebastes* Cuvier, J Exp Mar Biol Ecol, 231, 279~290.
- Sezaki, K. · Itoi, S. & Watabe, S.(2005) A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. Anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. Fisheries Sci, 71, 414~421.
- Thompson, H. D. · Gibson, T. J. · Plewniak, F. · Jeanmougin, F. & Higgins, D. G.(1997) The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, Nucleic Acids Res, 25, 4876~4882.
- Wi, C. H. · Chang, Y. J. · Lee, S. J. · Hur, Y. B. & Lee, J. S.(2003) Sexual maturation and gametogenic cycle of the hard shelled mussel, *Mytilus coruscus* (Bivalvia: Mytilidae), J of Aquaculture, 16, 245~251. (in Korean)
- You, J. · Huang, L. · Zhuang, J. & Mou, Z.(2014) Species-specific multiplex real-time PCR assay for identification of deer and common domestic animals. Food Sci Biotech., 23, 133~139.
- <http://www.fips.go.kr> on March 13, 2018.
-
- Received : 03 April, 2018
 - Revised : 09 May, 2018
 - Accepted : 18 May, 2018