

호남지역 Sea Grant 시범대학사업단**2007년도 최종연구보고서**

과제명(국문) : 국내산 참게와 수입산 참게 집단의 분자 생물학적 marker, 집단 동정 및 유전적 분석 연구

과제명(영문) : Molecular Markers, Population Identification and Genetic Variations between Korean and Imported Freshwater Crab (*Eriocheir sinensis*) throughout Its Distribution Range

2007. 3 . .

군산대학(교) SG연구사업단

해 양 수 산 부 지 정

호남지역 Sea Grant 시범대학사업단

[별지 제10호 서식]

최종연구보고서(표준양식)

해양수산부지정 호남지역 Sea Grant 시범대학사업단 연구개발사업의 2007년도 종료과제에 대한 '최종연구보고서'를 첨부와 같이 제출합니다.

- 첨 부 : 1. 최종연구보고서 5부
2. 대학의 자체평가의견서 1부
3. 최종연구보고서 요약서 5부
4. 상기 1,2,3항의 자료를 저장한 CD 1매

2007년 3 월 일

군산대학교 총장 직인

SG연구사업단장 직위 교수 성명 서 승 원 (인)

연구팀장 직위 부교수 성명 윤 종 만 (인)

호남지역 Sea Grant 시범대학사업단 주관대학
목 포 해 양 대 학 교 총 장 귀 하

(뒷면)

(앞면)

호남지역 Sea Grant 시범대학사업단

2007년도 최종연구보고서

과제명(국문) : 국내산 참게와 수입산 참게 집단의 분자생물학적 marker, 집단 동정 및 유전적 분석 연구

과제명(영문) : Molecular Markers, Population Identification and Genetic Variations between Korean and Imported Freshwater Crab (*Eriocheir sinensis*) throughout Its Distribution Range

2007. 3 . .

군산대학(교) SG연구사업단
해양수산부 지정
호남지역 Sea Grant 시범대학사업단

제 출 문

호남지역 Sea Grant 시범대학사업단 주관대학
목포해양대학교 총장 귀하

본 보고서를 2006년 6월부터 2007년 3월까지의 “해양수산부지정 호남
지역 Sea Grant 시범대학사업단 연구개발사업” 과제의 2007년도 최종연
구보고서로 제출합니다.

2007 년 3 월 일

대학교명 : 군산대학교
사업단장 : 서 승 원
연구팀장 : 윤 종 만

요 약 문

I. 과 제 명:

국문 : 국내산 참게와 수입산 참게 집단들의 분자생물학적 marker, 집단 동정 및 유전적 분석 연구

영문 : Molecular Markers, Population Identification and Genetic Variations between Korean and Imported Freshwater Crab (*Eriocheir sinensis*) throughout Its Distribution Range

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구 목적

추진하고자 하는 단계별 연구목표는 다음과 같다.

- ① 각 지역 및 국가간 참게개체 및 집단들의 특징 지역들간의 genomic DNA의 유전적 특징을 computer 와 연계된 통계적인방법 및 bandsharing method (similarity matrix 작성, AMOVA analysis) 을 이용하여 비교분석하였다.
- ② 얻어진 similarity matrix 로부터 통계적인 방법 (neighbor-joining method, clustering analysis) 을 이용하여 genetic distance 를 측정하여 dendrogram 을 도식
- ③ principal coordinates method 분석에 의한 여러 지역 및 국가의 참게집단간의 유전적 차이와 그 유사성 분석평가
- ④ 개체 및 집단의 특이적인 유전자 및 공동유전자자원의 개발. 선발된 개체 및 집단의 DNA 표지인자탐색, 계통 및 집단의 조기 선발을 위한 분자유전육종기술확립
- ⑤ 학술대회 발표 및 최종보고서 작성, 학술진흥재단 등재학술지 논문게재

2. 연구 필요성

● 자연은 기후를 조절하고 오염물질의 흡수·분해, 토양의 안정화 및 수원의 함유 등 자정기능을 수행하고 인간의 정서를 순화하는 등 생명부양능력을 유지시켜 준다. 이러한 자연환경은 대기, 물 및 토양 등 무기환경과 동물, 식물 등의 생물로 구성되어 있으며, 기능적인 면에서 상호 끊임없는 순환작용을 통해 조화와 균형을 유지해 나가는 하나의 생태계이다. 그러나 이러한 자연생태계는 최근 들어 인구의 증가와 도시집중, 산업시설의 확충, 각종 개발행위 등으로 인

해 그 균형과 질서가 흔들리게 되었고, 급기야는 자연생태계에 서식하는 야생 동·식물의 생존은 물론 인류의 생존마저 위협하는 단계에 이르게 되었다.

● 자연생태계는 일단 파괴되면 복원이 거의 불가능하며, 복원이 된다하더라도 오랜 시간이 소요되고 많은 경제적 부담이 따르기 때문에 사전에 그 대책을 수립하여 보전하는 것이 바람직하다. 더구나 우리나라와 같이 국토가 협소하고 인구밀도가 높으며 자연자원이 빈약한 나라일수록 자연환경보전의 중요성이 더 한층 강조된다. 자연환경보전의 기본원칙으로는 자연환경을 인위적인 훼손과 오염으로부터 보호, 자연자원은 환경차원에서 건전하고 지속 가능한 범위내 이용, 야생 동·식물 및 그 서식지 보호로 생물종의 멸종 방지 및 수려한 자연경관, 우수한 생태계 및 문화·학술·자연자원이 보호에 있다. 우리나라 남부권역의 자연식생은 침엽수 및 활엽수가 혼합림의 상태로 존재하며, 동해안 지방은 상록 침엽수로 주로 구성되어 있다. 또한 낙동강 달성습지 등은 철새도래지로 생태학적으로 보존가치가 있으며, 무분별한 개발로 인해 생물다양성이 단순화 상태로 변화되고 있다.

● 동물이 다양한 만큼 많은 종들의 집단은 자기만의 한정되고 독특한 삶을 갖는 경향을 갖고 있으며, 영양물질이 극히 적은 아주 깨끗한 물을 좋아하는 곤충, 어느 정도의 영양물을 갖고 있는 좀 덜 깨끗한 환경을 좋아하는 곤충 등 환경에 대한 자신의 내성 범위를 갖고 있다. 따라서 주변 환경과 각별한 관계를 맺고 있는 동물 집단의 생태를 연구하면, 그 동물의 분포와 밀도 상태로서 현재 살고 있는 환경의 질을 측정할 수도 있다. 이처럼 동물의 출현 여부와 밀도 등으로 우리에게 그 환경의 질을 측정하게 해 주는 동물을 환경지표동물이라고 할 수 있다. 특히 1급수 수질의 대표종인 등근날개 날도래는 환경지표곤충으로서 이러한 곤충의 연구는 육상보다는 변수가 적은 수서환경에서 연구가 많이 이루어져 왔다. 국내에서도 간이 환경 평가지수용 종이 선정되어 있는 등 수질과 관련된 연구가 있어 왔다. 최근 들어서 육상의 농업생태계와 산림생태계에서도 지표곤충을 이용하려는 연구가 진행되고 있다. 농경지에서 농약과 비료의 사용량 증가에 따라서 서식곤충의 종과 밀도 변화에 대한 연구와 산림에서 차지하는 수목의 종류와 그 지표종의 연구 등이 진행되고 있다.

● 이처럼 농업생태계와 산림생태계에서 관련된 종들을 보호 관찰하여 농업과 산림업에 이용하고자하는 시도가 많이 이루어지고 있는 상황에서 생태계의 종 다양성 그리고 유전적 다양성과 같은 생물의 다양성 연구와 보존에 관한 윤리적인 가치관이 세계적으로 G-7 국가에서 주로 형성되어왔다. 이러한 종의 다양성을 실제로 가지고 있는 국가는 다름 아닌 경제후진국 즉 생태적인 부국 (M-7) 이 전 세계의 50% 이상을 점유하고 있다. 그러나 오늘날 급격한 인구의 증가와 산업화에 의해서 야기되는 오염으로 인하여 생태계의 파괴와 생물학적 다양성의 소실은 짧은 기간동안에 빠르게 진행되면서 생각지 못했던 많은 변화가 여러 생물에서 나타나고 있다.

● 그 무렵 외래 어종인 초어가 수원 근교의 보통리지와 신갈지에서 처음으로 선을 보이더니 뒤이어 무지개 송어, 배스, 블루길, 향어, 떡붕어, 체널메기, 태국메기, 틸라피아 (역돔) 등이 외국에서 종란, 또는 치어로 도입해서 이식에 성공하면서 속속 낚시터에 방류하게 됐다. 그러면서 상대적으로 토종붕어는 날이 갈수록 그 수가 줄기 시작했다. 토종붕어만 줄기 시작한 것이 아니라 최근에 와서는 우리나라에서 양식되고 있는 모든 어종이 이웃나라 특히 중국으로부터 대량으로 수입되고 있는 게 현실이다. 이러한 현상은 자유시장 경제체제에서는 어쩔 수 없는

경우라 하더라도 우리나라의 재래어종을 보존하고 증대시키는 데 모든 힘을 아껴서는 안될 것이라고 생각된다. 왜냐하면 외국산 수입산 어종에서 무게를 늘리기 위해서 넣은 납이 검출되기도 하고 우리나라의 경우는 아니지만 외국의 경우 어린 아이의 젖가슴이 부풀어오르고, 서너살 된 여자아기가 달거리를 하는 등 비정상적인 조숙 현상이 나타나기도 하였다. 이러한 원인은 외국산 먹거리의 재료에 여성 호르몬인 에스트로겐이 다량 함유된 경우로 밝혀지기도 하였다. 더 많은 달걀을 얻기 위해서 닭에게 공급된 스테로이드성 합성호르몬제가 문제가 되었던 것이다.

● 이처럼 넘쳐나는 수입 농수산물의 유해물질 오염은 심각한 수준에 이르렀으며, 추석을 앞두고 터진 중국산 납꽃계 파동을 비롯해 유전자 조작 수입콩, 섯가루 고춧가루, 황산 식용유 등 맹독성 위해식품은 예전의 석회 두부, 물 먹인 쇠고기, 톱밥 고춧가루 등의 불량식품과는 차원이 다르다. 그래서 주부 10명 중 9명은 불안하다는 생각을 가지고 있으며, 지난해 한국소비생활연구원이 서울 주부 467명을 대상으로 한 설문조사에서, 68.2%는 수입산 농수축산물의 위해성이 아주 심각하다고 답했으며, 26.4%는 심각한 편이라고 응답한 결과가 제시되기도 하였다. 가장 해롭다고 느끼는 수입식품은 육류 (36.9%), 어류 (29.9%), 채소류 (17.7%) 순으로서 어류가 차지하는 순위가 육류 다음으로 높게 나타났으며, 소득수준이 낮을수록 식탁에서 수입 농수축산물이 차지하는 비중이 높아 저소득 가정이 더 큰 위험에 노출되어 있는 것으로 드러났다. 전문가들은 안전한 식품을 확보하기 위해서는 먼저 식품안전관리의 일원화가 필요하다고 지적하고 있다. 식품에 대한 인·허가 및 단속권한과는 별개로 식품의 안전 여부를 검사하는 기구는 일원화하는 것이 바람직하다는 것이다.

● 현재 우리나라에서는 식품관리를 식품위생법 축산물가공처리법, 주세법, 보건범죄 단속에 관한 특별조치법, 학교급식법 등에 따라 보건복지부, 식품의약품안전청, 농림부, 해양수산부, 교육부, 환경부, 산업자원부, 국세청 지방자치단체 등 여러 곳에 분산돼 있다. 또 수입품의 경우 축산물 및 축산가공품은 농림부 수의과학검역원이 수산물은 해양수산부 수산물검사소가, 그 밖의 식품은 식약청이 검사를 맡고 있다. 하지만 이들 기관의 검사정보시스템이 통합돼 있지 않아 총체적 안전관리가 이뤄지지 못하고 있으며, 허술한 검역체계도 문제가 되고 있다. 수입농수축산물의 유전자 조작 여부와 중금속 등 각종 오염물질 탐지를 위해서는 과학적 정밀검사가 필요하지만 서류검사와 육안 관능검사에 그치는 경우가 많다. 유해 불량식품 문제는 끊이질 않고 있는 데 이것은 정부가 문제가 발생할 때마다 근절 의지를 밝히고 있지만, 처벌이 약한 게 근본 원인이다. 부정·불량식품 제조와 고의적 유통은 사실상 무차별 살상행위에 가까운데도 돈에 눈먼 상흔 정도로 넘겨서는 안 된다는 여론이 높다.

● 특히 2005년 10월에 한국과 중국의 양국 현안으로 대두한 말라카이트 그린의 사용을 차단하기 위해 이 성분이 검출된 잉어, 뱀장어, 향어, 농어, 가물치, 무지개송어 등 9개 품종 이외에 말라카이트 그린, 수은, 카드뮴, 납 등 참돔, 뱀장어, 참조기, 농어 및 점성어와 같은 해산어류에 대해서는 중국이 수출 전 검사를 의무화하고 중국 당국이 발급한 위생증명서를 첨부하기로 했다.

● 유기농법과 환경농법은 안전한 식품을 위한 근본 해결책으로서 최근 들어 세계무역기구(WTO) 와 경제협력개발기구(OECD) 등의 농업관련 국제 동향은 무역과 환경을 연계하는 이

른바 그린라운드와 무역자유화로 집약되고 있다. 이는 환경문제 해결을 위한 무역규제가 늘어나고 개방·평등·비차별이라는 기본원칙에 따라 농산물 시장이 전면 개방되는 것을 뜻한다. 이에 따라 농업생산·농산물무역·환경문제를 통합한 정책을 적극적으로 펴야 할 것이다. 이에 대비해 유럽연합과 미국 등 선진국들은 비료·농약사용 기준 등을 명시한 13개 농업환경지표 개발에 착수하는 등 식품의 안전성 확보에 큰 관심을 쏟아야 하며, 이에 우리나라의 재래어종을 보존하면서 육성하고 생산하여 우리나라의 금수강산 물이 있는 댐, 호수, 저수지 및 연못 등에 우리의 자연생태계에 오랜 기간동안 넓게 적응해온 재래어종 및 갑각류를 방류하여 우리 국민 누구나 잡거나 이용할 수 있도록 필요성이 있다.

● 우리나라도 1997년에 환경농업육성법을 제정하고 1998년을 환경농업 원년으로 삼아 환경과 인간에게 친근한 농업 육성과 유통을 지원하는 쪽으로 정책을 전환하고 있다. 하지만 아직 증산을 통한 소득증대라는 현실을 무시할 수 없는 일반 농민들의 무차별적 농약살포, 외국에서 헐값으로 들어오는 불량 농산물의 범람은 여전히 식품안전과 건강을 위협하고 있다. 이러한 무분별하고 무지한 사고방식을 과감히 버린 경우에서만이 종을 보존할 수 있을 것이라 생각된다.

○ 지역현안 측면

◆ 수입 수산물 중 중국산과 러시아산이 수입 수산물 시장의 절반 이상을 차지하는 것으로 나타났다. 2006년 국립수산물품질검사원에 따르면 지난해 83개국에서 들여온 수입 수산물 93만 2,085톤 가운데 중국 및 러시아산이 전체 물량의 58%에 달하는 54만2,313톤으로 국내 유통물량을 주도했다.

◆ 지난해 중국산 수산물은 말라카이트 그린 파동의 후유증으로 지난 2004년의 36만2,343톤보다 줄어든 33만4,141톤으로 전체물량의 35%를 차지했다. 품목별로는 냉동 참조기 5만2,081톤, 냉동 낙지 2만6,805톤, 냉동 갈치 2만477톤, 냉동 아귀 1만9,748톤, 냉동 명태 1만2,049톤의 순이었다.

◆ 러시아산은 21만1,459톤으로 수입 수산물의 23%를 차지했다. 러시아산은 냉동명태 1만5,213톤, 냉동오징어 1만2,089톤, 활 대게 4,084톤 및 명태 곤이 2,711톤 등이 집중적으로 수입됐다.

◆ 북한산은 대만·일본산에 이어 4만9,151톤으로 5위에 그쳤지만 활 바지락이 2만4,388톤이나 반입되는 등 전년도에 비해 물량 면에서 20% 증가했으며, 주로 조개류의 수입이 주류를 이루었다. 북한산 비너스백합 및 개조개 등 조개류는 속초 고성 양양에 있는 4개 업체에서 전국 유통량의 23%인 3,662톤을 수입했으며, 이러한 조개류는 주로 서해안 지역에서 생산되는 것으로서 이 지역의 어민들에게 커다란 타격을 주고 있다.

◆ 러시아 대게는 대부분이 동해항과 속초 삼척항구를 통해 수입되었으며, 북한산 비너스백합 및 개조개 등 조개류는 속초 고성 양양에 있는 4개 업체에서 전국 유통량의 23%인 3,662톤을 수입했다. 국내산 수산물 보호 및 어업인 소득증대에 앞장서야 할 수협중앙회가 자회사를 통해 외국산 수산물을 수입 유통 및 판매하고 있는 점은 영세 어민들의 생존권을 위협하는 것으로 비난을 면키 어렵다는 지적이다.

◆ 관세청은 불법 농수산물의 수입을 근절하기 위하여 실시하고 있는 「불법 수입 농·수산물

특별단속」 1개월간 결과 52건, 410억원을 적발 하였고, 이는 전년 동기 실적 23건, 124억원에 비하여 금액대비 2.3배가 증가한 실적이며, 주요 품목으로는 옥수수 358억원, 고추10억원, 김치 6억원 순 다음의 순위를 차지하고 있다.

◆ 수입통관단계부터 철저하게 엄격한 법적용을 하면서 국민의 건강과 소비자 보호 및 국내 산업을 보호하고 동시에 WTO 체제로부터 농어민을 보호하기 위해서 필요한 품목을 수입통관 단계에서 원산지표시 대상품목으로 지정하며, 원산지 표시방법을 구체적으로 정하고, 이를 엄격하게 집행하고 있는지를 단속하는 과정에서 국내산과 수입산 수산물의 종 차이 및 집단차이를 정확하게 동정 및 확인함으로써 수입통관단계 및 검역단계에서 수산물에 대한 원산지표시 위반을 단속할 수 있을 것이다. 이러한 검역방법은 수산물품질관리원의 철저한 단속의지를 실현시킬 수 있는 제도적인 장치가 될 것이다.

○ 연구수행 측면

● PCR 기술을 이용하여 분자생물학적 수준에서 개체, 집단 및 종 그리고 속간의 유전적 차이를 확인할 수 있게 되어 선발의 정확도 및 유전적 개량속도를 빠르게 향상시킬 수 있다. 이러한 방법에는 PCR 을 활용한 restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Clifford et al., 1998; Garcia-Mas et al., 2000), RAPD (Johnson et al., 1994; Partis and Wells, 1996; Callejas and Ochando, 1998; Liu et al., 1998; Tassanakajon et al., 1998; Iyengar et al., 2000; McCormack et al., 2000), single-strand conformation polymorphism (SSCP) (Dekomien and Eppelen, 2000), amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Lin et al., 1996; Mackill et al., 1996; Hansen et al., 1999; Purba et al., 2000) 및 microsatellite (MS) (Waldbieser and Wolters, 1999; Li et al., 2000) 등이 있다.

● DNA 표지인자 (DNA marker) 는 동물 집단의 유전적 변이성과 유전적 특성 규명과 함께 개체 식별, 가계분석, 종내 품종식별, 유전적 질병의 진단, quantitative trait loci (QTL), target traits and economic trait loci (ETL), marker-assisted selection (MAS), genotype-assisted selection (GAS) (Groenen et al., 1995; Hospital et al., 1997)를 위한 DNA markers 검색 등에 대한 이용 가능성이 제시되었다. 실제로 PCR 기법을 이용하여 가축, 가금류 계통간의 이종을 식별할 수 있는 특이적인 표지인자를 확인하였고, 이 유전적 표지인자에 의한 품종 상호간에 구별 가능성을 제시하였다. 국내에서도 최근에는 PCR 기법을 이용하여 한우육, 유우육, 수입육 및 재래 가축을 대상으로 품종 구분을 위한 연구가 Lee et al. (1994), Chung et al. (1995) 및 Koh et al. (1997) 에 의해 보고된 바 있다. 이상에서 제시한 여러 문헌들을 살펴 본 바와 같이 육상동물의 품종을 구별하거나 식별하기 위하여 RFLP, RAPD 또는 다른 DNA 분석 기술을 이용했으나 그 대상은 대동물을 중심으로 한 연구가 이루어져 왔다.

● 양식생물에 대한 유전자원연구는 학계나 연구기관에서 양식어패류 집단폐사의 원인규명, 질병발생원인 분석, 고유종의 지속적 관리 및 이용을 위해 유전자분석을 통한 집단의 유전적 차이 구명, 종 및 집단간의 유전적 유연관계 등 몇 가지 미세조류 및 어패류에서 실시된 바가 있지만 다른 연구대상에 비해 상대적으로 적은 수에 불과하다 (김 등, 1997a; 김 등, 1997b; Lee et al., 2000; Huh and Huh, 2001). 특히 그 동안 갑각류에 관한 연구는 주로 성성숙 단계의 성선 발달의 조직학적 연구, 성장률을 높이기 위한 사료개발 및 사육밀도 등을 중심으로 연구가 이루어져 왔다. 갑각류에 대한

분자유전 및 분자생물학적 연구는 사료, 사양, 생태적인 연구와 비교해 볼 때 그 질과 양에 있어서 미진한 부분이 많은 것으로 평가되고 있다. 그러나 최근 분자생물학 및 유전자 분석기술의 급속한 발달로 DNA 분자수준에서 다형성 분석 및 그 이용성이 가능하게 되었다.

● 특히 국내에서는 이에 관한 연구가 육상동물에 비교해 볼 때 초기단계에 머물러 있는 실정이나 수산생물이나 해양미생물을 대상으로 DNA 표지인자를 이용한 갑각류의 종동정이나 어류질병에 관한 연구가 외국의 연구소나 대학에서 이루어져 왔고, 우리나라의 경우 국립수산과학원과 일부 대학의 생명과학과 관련된 학과 등에서 시행되어 왔다. 따라서 여러 가지 기법을 이용하여 종이나 집단 간의 특이성을 나타내는 유용한 특이 marker 를 개발하여 보다 간편하고 안정적인 종 및 집단을 구분할 수 있는 방법이 제시되고 있다. 특히 DNA 다형현상은 genome 해석 연구에 획기적인 변화를 가져와 DNA 염기서열 수준에서 변이성을 나타내는 특정 형질과 연관된 유전자를 확인하고 이를 유전적 표지로 활용하여 어패류의 육종개량을 위한 선발도구의 수단으로 이용될 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- ◆ 한국의 자연산 참게와 양식산 참게의 시험대상 선정, 채취 및 분류
한국산 참게와 중국산 참게의 시험대상 선정, 채취 및 분류
- ◆ 7개 이상의 지역에 있는 참게 양식장과 중국산 및 북한산 참게 등을 바탕으로 oligonucleotide primer를 사용하여 genome내 특정 DNA 염기서열 부위를 임의로 증폭시켜 genetic marker 를 찾는 분석기술을 이용해 고도의 유전적 다형성을 검출한다.
- ◆ 각 시험대상 갑각류로부터 분리 추출된 genomic DNA 의 순도 및 농도의 측정
- ◆ 참게근육으로부터 genomic DNA 분리 추출 및 정제, primer 에 의한 특이 부분의 PCR 에 의한 증폭 및 전기영동실험
- ◆ 한국의 양식산 참게, 자연산 참게 및 중국산 참게 개체의 genomic DNA의 유전적 특징을 pc-software program 과 연계된 computer 에 의한 통계적인 방법 및 bandsharing method (similarity matrix 작성, AMOVA analysis) 을 이용하여 비교분석
- ◆ Similarity matrix 로부터 수리통계적인 방법 (neighbor-joining method, clustering analysis) 을 이용하여 genetic distance 를 측정하여 dendrogram 을 도식
- ◆ Bootstrapping 을 분석하기 위하여 SYSTAT 10 Version-pc package 의 bootstrapping program 을 활용하며, genetic distance를 구하기 위해서 PHYLIP-pc package 의 neighbor-joining program 의 unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) 를 활용한다.
- ◆ Principal coordinates method 분석에 의한 참게집단간의 유전적 차이와 그 유사성 분석평가
- ◆ 집단 특이적이고 종 특이적인 specific loci, polymorphic loci 및 shared loci 의 개발 및 DNA 다형성 분석
- ◆ 한국의 야생산 참게와 양식산 참게 사이에 존재하는 유전적 차이와 분자생물학적 marker screening 완성
- ◆ 한국산 참게와 중국산 참게의 DNA fingerprinting 을 위한 특이적인 genetic marker 확인
- ◆ 우수한 경제형질을 지닌 것으로 확인된 양식산 및 자연산의 개체, 계통 및 집단간 동정 및 판별의 실용화 확립
- ◆ 선발된 개체 및 참게집단의 DNA 표지인자 (genetic marker) 이용 및 공동 유전자자원의 활용
- ◆ Grapsidae, Potamonidae 및 Portunidae 에 속하는 다른 갑각류간의 유전적 차이 및 변이성을 연속성이 있게 조사한 이후 실효적인 연구 가능성을 제시
- ◆ 중간, 최종보고서 작성 및 전국규모 등재 (후보) 학술지와 SCI급 학회 학술대회에서 논문 발표 및 SCI급 학술지 논문 게재

IV. 연구개발결과, 활용실적 및 활용계획

1. 연구개발결과

- 1) Identification of specific loci, polymorphic loci and shared loci in species and geographical population
- 2) Especially, population Identification of specific genetic markers in Korean and Chinese freshwater for DNA fingerprinting.
- 3) Discrimination of individuals or species and populations
- 4) Confirming diagnostic marker effects by statistical analytical treatments
- 5) Designing strategy for crustacean genetic improvement program

2. 활용실적

가. 논문게재 실적

- Jong-Man Yoon. 2006. Genetic differences and variations in freshwater crab (*Eriocheir sinensis*) and swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Developmental and Reproduction* 10 (1): 19-32.

나. 논문발표 실적

- Jong-Man Yoon and Su-Young Park. 2007. Breed identification and genetic variations between Korean and Chinese freshwater crab (*Eriocheir sinensis*). 2007 *Aquaculture*. San Antonio, Texas, USA.

다. 기타 활용실적

본 연구과제를 불철주야 밤낮을 가리지 않고 연구에 임하던 연구조원이 3인의 석사과정생이 석사학위를 받아 졸업을 하였으며, 그 뒤를 이어 학문후속세대인 7인의 학부생들이 겨울방학기간에도 열심히 연구에 열중할 수 있는 계기가 되어 본 연구실이 활발하게 연구를 지속적으로 할 수 있는 전환점이 되었다. 또한 본 연구를 수행하면서 어류, 갑각류 및 조개류에서 DNA에 관한 다양한 DNA 분석기법을 구사하게 되어 다른 어패류에서도 폭넓게 확산시킬 수 있게 되었으며, 어패류에 관한 DNA의 다형현상을 분석하고 분자통계적인 방법으로 처리 검색하는 기술도 또한 획득할 수 있게 되었다. 또한 인천의 한 중학교 과학교사연수에도 우리 연구실이 참여하여 DNA에 관한 다양한 이용사례와 실질적인 연구기법에 대해서 강의와 실험을 할 수 있게 된 것이 커다란 보람이라 사료된다.

Genetic Differences and Variations in Freshwater Crab(*Eriocheir sinensis*) and Swimming Crab(*Portunus trituberculatus*)

Jong-Man Yoon[†]

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

참게(*Eriocheir sinensis*)와 꽃게(*Portunus trituberculatus*)의 유전적 차이와 변이

윤종만*

국립군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

ABSTRACT : Genomic DNA isolated from two species of Korean freshwater crab(*Eriocheir sinensis*) and swimming crab(*Portunus trituberculatus*) was amplified several times by PCR reactions. The seven arbitrarily selected primers OPA-05, OPA-13, OPA-16, OPB-06, OPB-15, OPB-17 and OPD-10 were used to generate the identical, polymorphic, and specific fragments. 505 fragments were identified in the freshwater crab species, and 513 in the swimming crab from Buam. 81 specific fragments(16.0%) in the freshwater crab species and 100(19.5%) in the swimming crab. 165 identical fragments, with an average of 23.6 per primer, were observed in the freshwater crab species. 66 fragments, with an average of 9.4 per primer, were identified in the swimming crab species. The numbers of polymorphic fragments in the freshwater crab and swimming crab were 50 and 14, respectively. The oligonucleotides decamer primer OPB-17 generated identical DNA fragments, approximately 300 bp, in both the freshwater crab and swimming crab species. Compared separately, the average genetic difference was higher in the swimming crab than in the freshwater crab species. The average genetic difference was 0.726 ± 0.004 between the freshwater crab and swimming crab species. The dendrogram obtained by the seven primers indicates four genetic clusters: cluster 1(FRESHWATER 01), cluster 2(FRESHWATER 02, 03, 04, 05 and 06), cluster 3(FRESHWATER 07, 08, 09, 10 and 11), and cluster 4(SWIMMING 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 and 22). The shortest genetic distance displaying significant molecular differences was between individuals SWIMMING no. 18 and SWIMMING no. 17 from swimming crab(0.096). Ultimately, individual no. 02 of the freshwater crab was most distantly related to freshwater crab no. 03(genetic distance = 0.770). As stated above, the potential of RAPD-PCR to identify diagnostic markers for the identification of two crab species has been demonstrated.

Key words : Bandsharing value, *Eriocheir sinensis*, Freshwater crab, Genetic distance, *Portunus trituberculatus*, Similarity matrix, Swimming crab.

요약 : 참게(*Eriocheir sinensis*)와 꽃게(*Portunus trituberculatus*)의 2종으로부터 genomic DNA를 분리 추출하였다. 선형된 7개의 OPA-05, OPA-13, OPA-16, OPB-06, OPB-15, OPB-17 and OPD-10의 RAPD primer를 이용하여 identical, polymorphic 그리고 specific fragment를 얻어냈다. 본 연구에서 무안산 참게 집단에서는 505개의 fragment가 나타났고, 꽃게 집단에서는 513개의 fragment가 확인되었다. 참게 집단에서는 165개의 identical fragment가 나타났으며, 이는 primer당 평균적으로 23.6개의 fragment로 확인되었다. 또한 꽃게 집단에서는 66개로서 평균해서 primer당 9.4개의 identical fragment가 나타났다. 참게 집단과 꽃게 집단의 polymorphic fragment는 각각 50개와 14개로 나타났고, 참게 집단과 꽃게 집단의 경우 OPB-17에서 identical fragment가 300 bp의 크기에서 확인되었다. 각각을 비교해 보았을 때 유전적 차이는 참게 집단에서보다 꽃게 집단에서 더 높은 수치를 나타내었고, 2종 사이에서 0.726 ± 0.004 의 수치를 나타내었다. 7개의 primer를 사용하여 얻어진 dendrogram은 cluster 1(FRESHWATER 01), cluster 2(FRESHWATER 02, 03, 04, 05 및 06), cluster 3(FRESHWATER 07, 08, 09, 10 및 11) 및 cluster 4(SWIMMING 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 and 22)와 같이

4개의 유전적 클러스터로 나뉘어졌다. 꽃게 집단에서 18번째 개체(SWIMMING no. 18)와 17번째 개체(SWIMMING no. 17) 사이가 가장 가까운 유전적 관계(genetic distance 0.096)를 나타내었다. 궁극적으로 본 때 참게 집단의 2번째(FRESHWATER no. 02)와 참게 집단의 3번째(FRESHWATER no. 03) 개체 사이가 가장 먼 유전적 거리(genetic distance=0.770)를 나타내었다. 위에서 언급했던 것처럼 RAPD-

[†]This work was supported by the 2006 Sas Grant Program of Honam District University.

*Correspondence: Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea. Tel: 82-63-469-1887, Fax: 82-63-463-9493, E-mail: jmyoon@kunsan.ac.kr



Aquaculture 2007 - Meeting Abstract

- Home
- On-Line Store
- Members
- Join WAS
- Chapters
- Conference Presentations
- Organization
- Students
- Publications
- WAS Meetings
- Other Meetings
- Education
- Employment
- Links
- Sponsors
- Search

1012

BREED IDENTIFICATION AND GENETIC VARIATIONS BETWEEN KOREAN AND CHINESE FRESHWATER CRAB (*Eriocheir sinensis*)

Jong-Man Yoon* and Su-Young Park
Department of Aquatic Life Medicine
Kunsan National University,
Kunsan 573-701, Republic of Korea
jmyoon@kunsan.ac.kr

Genomic DNA isolated from two populations of Korean (KFC) and Chinese freshwater crab (CFC) (*Eriocheir sinensis*) was amplified several times by PCR reactions. The seven arbitrarily selected primers OPA-05, OPA-13, OPA-16, OPB-06, OPB-10, OPB-17 and OPD-10 were used to generate the identical, polymorphic, and specific loci. Here, we first assessed genetic variation in the KFC population. Primer OPA-16 generated fragments ranging from 180 bp to 1,400 bp. Interestingly, the 22-shared loci that established population identity were 500 bp and 900 bp. The decamer primer OPA-05 also detected 22-shared loci of sizes 200 bp and 1,400 bp, which were identical in all samples of the KFC population. The number of unique shared loci to each population and number of shared loci by the two populations generated by RAPD analysis using 7 primers in KFC and CFC population. The oligonucleotides decamer primer OPB-17 generated shared loci, approximately 300 bp, in both the Korean and Chinese freshwater crab populations. Especially, the decamer primer OPB-06 generated the shared loci by the two populations, approximately 280 bp, in both KFC and CFC population. The decamer primer OPB-17 also generated the shared loci by the two populations, approximately 300 bp, between the two populations. Compared separately, the average genetic difference was higher in the KFC population than in the CFC population. The average genetic difference was 0.660 0.003 between the two freshwater crab populations. The dendrogram obtained by the seven primers indicates three genetic clusters: cluster 1 (KOREAN 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10 and 11), cluster 2 (CHINESE 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 and 20), and cluster 3 (CHINESE 21 and 22). The shortest genetic distance displaying significant molecular difference was between individuals CHINESE no. 22 and CHINESE no. 21 (0.047). Ultimately, individual no. 20 of the Chinese freshwater crab was most distantly related to Korean freshwater crab no. 05 (genetic distance = 0.674). From what has been said above, the potential of RAPD analysis to identify diagnostic markers for the identification of two freshwater crab populations has been demonstrated.

Member Login

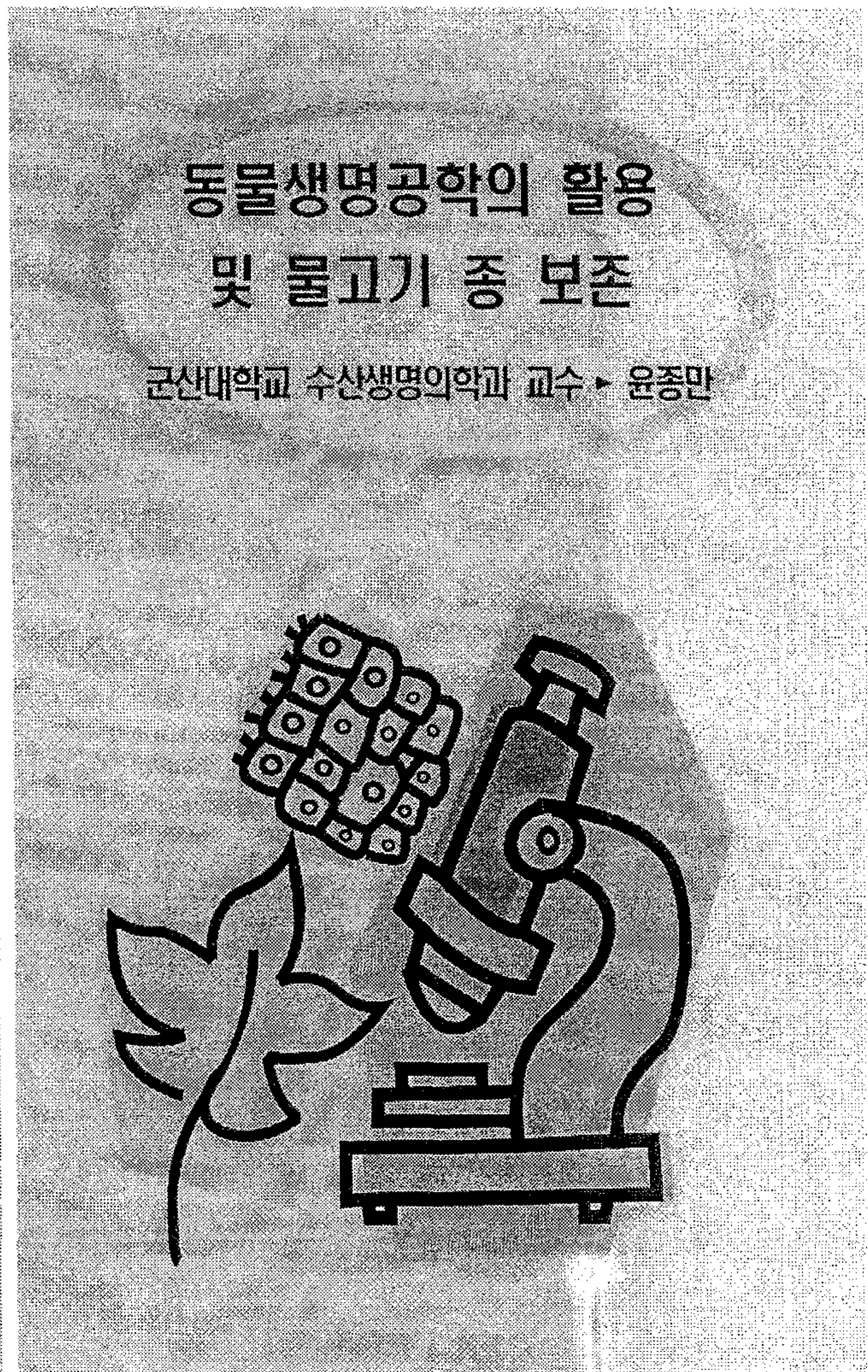
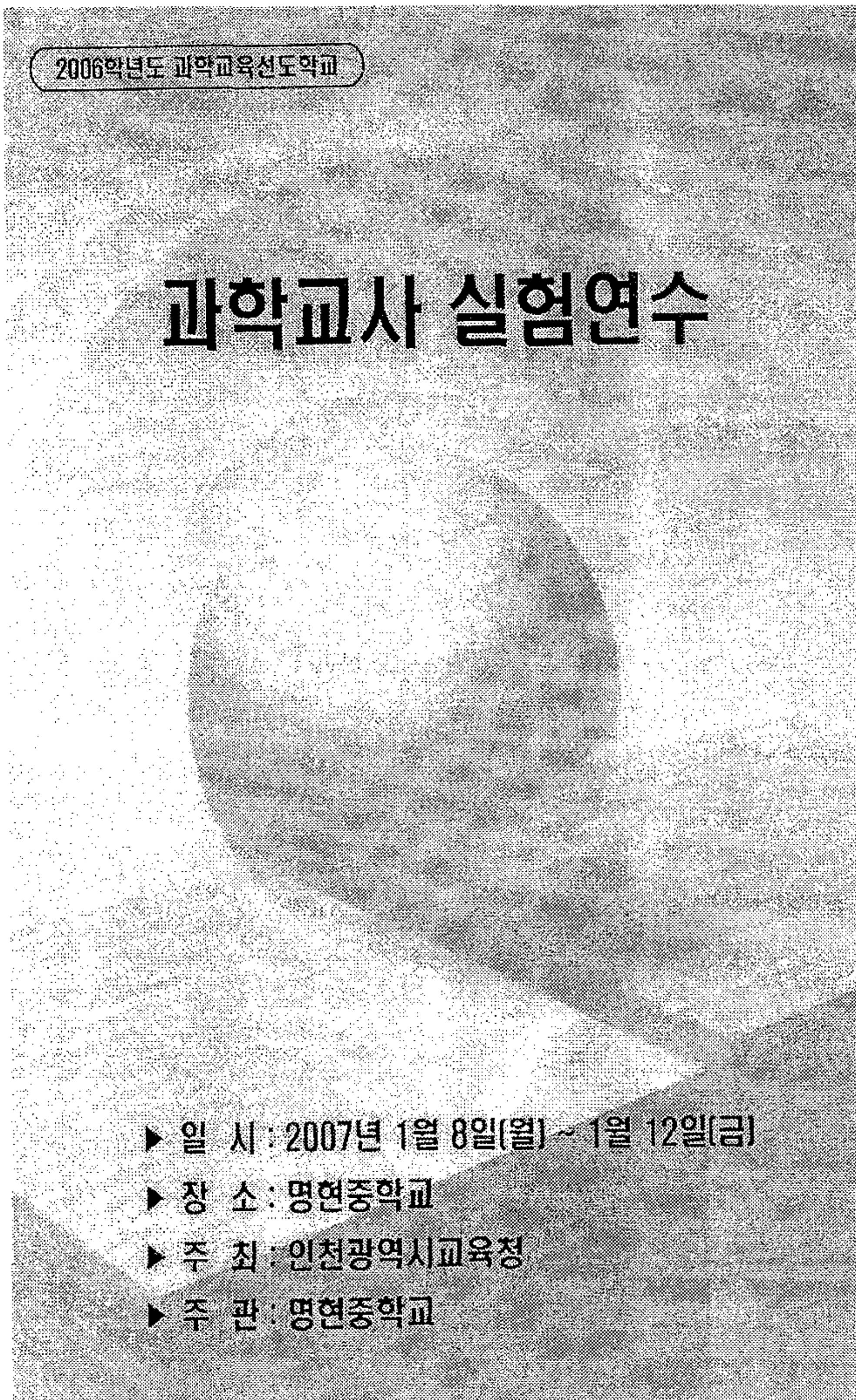
Member ID:

Password:

[Forgot your password?](#)
[Become a member of WAS](#)

라. 결과발표 확산 실적

제 목	발표자	발표	발표장소	년, 월	발행기관
동물생명공학의 활용 및 물고기 종 보존	Jong-Man Yoon	과학교사 실험연수	인천 명현중학교	2007. 1. 8. ~ 2007. 1. 12.	명현중학교



3. 활용계획

- ◎ 육안이나 통계적인 기법에 의해서 나타난 외국 및 국내산 참게 집단간에 특이하게 존재하는 specific marker 를 이용한다면 특이 fragment 를 얻을 수 있게 해주는 primer 를 제작할 수 있기 때문에 이를 이용한 어패류의 아종, 계통, 집단 및 종 동정 및 확인을 위한 특허를 출원할 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 사료된다.
- ◎ 또한 참게에서 개발된 종 동정 및 확인기술을 다른 어패류에 접목 및 확대시키게 되면 수입산 소고기와 한우고기와의 차이를 식별 가능하게 해주는 kit 개발의 사례처럼 생산성의 향상 및 수산물의 부가가치를 높일 수 있는 기술로 개발이 가능해 질 수 있기 때문에 추가적인 연구가 있어야 하겠지만 그 개발 가능성은 더욱더 높아질 것으로 사료되어 본 연구결과는 다른 어떤 결과보다도 우수하다고 사료된다.

핵심기술(연구내용)	활 용 계 획(활용시기, 활용방법 등을 요약하여 기재)
1)Discrimination of individuals or species and populations	수입산과 국내산 종의 확인 및 집단구별에 활용할 계획이다.
2)Confirming diagnostic marker effects by statistical analytical treatments	통계기법을 다른 수입된 러시아산 대게와 국내산 대게간의 차이점에 대해서 통계검버을 사용할 계획이다.
3) Designing strategy for crustacean genetic improvement program	연구가 미미한 갑각류의 품종개량과 육종계획을 세우는데 활용할 계획이다.
All contents mentioned above	SCI급 학술지나 학술진흥재단 등재 (후보) 학술지에 추가로 게재 및 발표할 예정이다.

V. 기대효과

○ 지역현안 측면

- ☑ 수입산과 국내산 재래 참게의 종 동정 및 확인에 적용함으로써 국민들에게 식품의 안정성 확보라는 이미지를 제고시킬 수 있고, 미래 식량자원의 하나인 어패류 단백질의 확보를 통한 국민건강유지 및 증진효과를 기대할 수 있다.
- ☑ PCR 전기영동법을 이용한 분자생물학적 기술은 어패류의 DNA marker와 경제형질간의 연관성 분석을 통해 우수한 경제형질과 관련된 표지인자의 탐색은 물론 유전적 잠재능력을 조기 예측하는 데 매우 중요하다. 또한 어류의 육종계획에 있어 표현형 정보와 함께 DNA marker 에 의한 유전자 정보를 병행하여 이용할 경우 표현형 정보에만 의존하는 전통적인 방법에 비하여 품종개량 효과를 크게 제고시킬 수 있다.
- ☑ 어패류를 선발할 수 있는 표지인자의 개발이 가능하게 된다면 참게양식장에서 나타나는 바이러스 및 세균성질병의 해결 방안을 분자유전학적인 측면에서 해결될 수 있을 것이다. 따라서 서해안 지역에 있는 농어촌의 생활안정을 위한 소득증대와 동시에 내수면 및 해수면 양식이 크게 발달할 것이 또한 기대되며, 실제로 이를 이용하려는 서해안 및 남해안 지역 참게 및 대하 양식업자 및 농어민들에게 정보 및 기술을 제공할 수 있게 될 것이다.
- ☑ 수산업 및 양식업의 급격한 환경변화에 적극적으로 대처하여 지속적인 육성 및 국제경쟁력을 강화시킬 수 있다.

○ 학술적 측면

- 학부 및 대학원 석박사 과정생을 연구에 동참시킴으로써 분자생물학적 연구능력을 향상시킬 수 있어 BT 산업의 일원으로 활동할 수 있는 고급기술인력의 지속적인 배출이 이루어지게 할 수 있다.
- 인천의 중학교 과학교사연수에도 우리 연구실이 참여하여 DNA 에 관한 다양한 이용사례와 실질적인 연구기법에 대해서 과학교사를 대상으로 강의와 실험을 함으로써 과학기술의 확산과 더불어 어패류에 관한 높은 관심을 이끌어 낼 수 있었다.
- 어패류 생산기술에 관여하는 고도의 분자유전학, 생명공학, 동물발생 및 세포공학적 기초 기술의 확립과 훈련으로 고급 연구인력 확보에 의해 연구능력의 국제화를 기할 수 있으며 기타 산업에 기술전수로 고도의 수산 및 해양 생물공학의 산업화가 가능하며 타 분야에 응용될 수도 있을 것이다.

○ 기술이전 가능성 및 방법

- DNA polymorphic marker 와 specific marker 를 외국산 어패류와 국내산 어패류간에 특이하게 존재하는 것이 육안이나 통계적인 방법으로 확인되었을 경우에 이러한 특이 fragment 를 얻을 수 있게 해주는 primer 를 제작할 수 있기 때문에 이를 이용한 어패류의 아종, 계통, 집단 및 종 동정 및 확인을 위한 특허를 출원할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이다.
- 갑각류중 참게에서 개발된 종 동정 및 확인기술을 다른 어패류에 접목 및 확대시키게 되면 가축에서 수입산 소고기와 한우고기와의 차이를 식별 가능하게 해주는 kit 개발의 사례처럼 생산성의 향상 또는 수산물의 부가가치를 높일 수 있는 기술로 개발이 가능해 질 수 있을 것이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

Genomic DNA isolated from two populations of Korean freshwater crab(KFC) and Chinese freshwater crab (CFC), also known as Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) was amplified several times by PCR reactions. The seven arbitrarily selected primers OPA-05, OPA-13, OPA-16, OPB-06, OPB-10, OPB-17 and OPD-10 were used to generate the shared loci, specific, unique shared loci to each population and shared loci by the two populations. Here, we first assessed genetic variation in the KFC population. Primer OPA-16 generated loci ranging from 180 bp to 1,400 bp. Interestingly, the 22-shared loci that established population identity were 500 bp and 900 bp (Fig. 1A). The decamer primer OPA-05 also detected 22-shared loci of sizes 200 bp and 1,400 bp, which were identical in all samples of the KFC population. The number of unique shared loci to each population and number of shared loci by the two populations generated by RAPD analysis using 7 primers in KFC and CFC population, as illustrated in Table 2. The oligonucleotides decamer primer OPB-17 generated shared loci, approximately 300 bp, in both the Korean and Chinese freshwater crab populations. Especially, the decamer primer OPB-06 generated the shared loci by the two populations, approximately 280 bp, in both KFC and CFC population. The decamer primer OPB-17 also generated the shared loci by the two populations, approximately 300 bp, between the two populations. The average Dice coefficient (F) value reached 0.751 ± 0.007 within the KFC population, whereas the F value showed 0.711 ± 0.011 within the CFC population. Therefore, regarding individual results, freshwater crabs from KFC population exhibited higher F values than did ones from CFC population. The average F value between the two geographic freshwater populations 0.449 ± 0.006 , also ranged from 0.322 to 0.639. The hierarchical dendrogram indicates three main branches: cluster 1 (KOREAN 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10 and 11), cluster 2 (CHINESE 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 and 20), and cluster 3 (CHINESE 21 and 22). The shortest genetic distance displaying significant molecular difference was between individuals' CHINESE no. 22 and CHINESE no. 21 (0.047). Ultimately, individual no. 20 of the Chinese freshwater crab was most distantly related to Korean freshwater crab no. 05 (genetic distance = 0.674). From what has been said above, the potential of RAPD analysis to identify diagnostic markers for the identification of two freshwater crab populations has been demonstrated.

Key words: *Eriocheir sinensis*, dendrogram, freshwater crab, genetic distance, similarity matrix

Introduction

Crabs are the most popular marine products in Korea because of their taste and nutritional value, and Koreans consume them in large quantities. Among crabs, the Korean freshwater crab (*Eriocheir sinensis*; KFC) and Chinese freshwater crab (*Eriocheir sinensis*; CFC), also known as Chinese mitten crab, are economically important aquacultural species that belongs to the family Grapsidae. KFC and CFC are widely distributed in the entirety of ponds, brooks, rivers, estuary, brackish-water habitats and seawater areas of the West Sea in the Korean Peninsula, as well as in several areas in China. During the last five decades the estuarine fisheries are threatened by over-fishing, migration interception by dam construction and various environmental pollutions, and in the 2000s farmers were engaged in aquaculture of freshwater crabs for the opportunity of its preservation. In recent years the feasibility of commercial culture investigated in a recently begun project at a few of inland farming research institutes and national culture establishments.

The KFC is one of the most highly sought after species that is collected from the sea during the late autumn. The consumption of this species has increased considerably, as restaurants that specialize in serving crabs in various forms, such as raw with lemon, boiled with vegetables, or fried, have recently become established. Accordingly, for a long time the consumption of this crab species has also increased considerably as restaurants specialize in various preparations of freshwater crab for a long time.

Largely, the body size, body weight and body color of the crab varies widely according to habitat, such as river, marsh, or seawater area, the depth of the water, nutrition, and other common factors. The environmental requirements of crab species grown at different geographic sites are not known, although crab species identification is advanced. Especially, the rate at which freshwater crab grows and the migrations depends very much on physical, biological, and aquatic factors like water temperature, availability of feed organisms and population density. The water temperature of 18°C ~ 22°C is about optimal and the transparency of the water river is 20cm to 40cm at a spawning time. Accordingly, the growth period of this crab is from June to September. Like other crabs, this species commonly hatches in seawater and then grows in fresh-water, which it attains a marketable size. When they are fully grown among the mountains and valley, they migrate to the brackish water or mouth of the river and then descend the seawater regions of the spawning ground from September to October. Since crabs are nocturnal creatures, young crabs burrow under the pebbles, sands and rocks in the riverbed during the day and ascend the river at night. During migration, the body color of young crabs gradually becomes darker. Dorsal shell is covered with hard surface without scales. The shape of crab dorsal shell is basically rectangular, embossed pattern on a dorsal shell and four

protuberances exist in the brow surface of this shell. Especially, a number of hairs are located in the anterior and basic parts of the claws.

However, in spite of their economic and scientific consequences, a little information currently exist regarding the physiological and ecological levels only of crab species in Korea (Kim, 1983; Kim and Chung, 1990; Koo et al., 2004).

The molecular markers peculiarto breed, species, genus or geographical population have been employed in the identification of individuals, species and populations, hybrid parentages and genetic diagnostics (Smith et al., 1997; Muchmore et al.,1998; Huang et al., 2000; Kim et al., 2000; Yoon and Kim, 2004a). Molecular markers have also been widely used to characterize the population genetic structure of endangered organism (Li and Jin, 2006). Many techniques have been applied in the analysis of the heredity of organisms, such as the allozymes (Smith et al., 1997; Cagigas et al., 1999), genomic in situ hybridization (GISH) (Friesen et al., 1997), fluorescence in situ hybridization (FISH) (Calderini et al., 1997), and other PCR-based molecular techniques,including restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) (Lee and Kim, 2003), amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) (Barki et al., 2000), minisatellites (Huang et al., 2000) and microsatellites (Waldbieser and Wolters, 1999 Chenyambuga et al., 2004).

By the way, many molecular/genetic researches have used this technique, because random amplified polymorphic DNAs-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) is a sharp, reliable, easy and relatively rapid method for the investigation of numerous genomic DNAs with respect to genetic diversity in a population (Iyengar et al., 2000 Kim et al., 2000; Yoon and Kim, 2003a; Li and Jin, 2006). The RAPD method was used to identify for genetic discrimination and monitoring of 7 wild and cultured populations of the genus *Pangio*: *Pangio kuhlii*, *P. semicineta*, *P. shelfoldii*, *P. muraeniformis*, *P. piperata*, *P. filinaria* and *P. oblonga* (Siti Azizah al., 2005). Until now, RAPD markers are expected to offer a good representation of genomic diversity and/or DNA polymorphisms between organisms because of their random amplification and their ability to represent specific positions of the amplified products (Jeffreys and Morton, 1987 Smith et al., 1997; Tassanakajon et al., 1998; McCormack et al., 2000; Kim et al., 2004 Sandoval-Castellanos et al., 2007). Interestingly, the RAPD method requires very small amounts of genomic DNA and can be used to analyze a large number of individuals in a short time (Deragon and Landry, 1992).

The clustering analysis of the genetic distances between various fish and invertebrate species, or populations from different geographic sites, which was performed using RAPD-PCR, is of little quantity (Klinbunga et al., 2000a; McCormack et al., 2000; Yoon and Park, 2001; Yoon & Kim, 2004). However, genetic variation, species-specific markers, and region-specific markers in catfish, penaeid shrimp, oyster and eel-loach have already been assessed by molecular methods (Yoon & Kim, 2001; Yoon & Kim, 2003b; Kim et al., 2004;

Siti Azizah et al., 2005), proving the feasibility of such a study on other invertebrate and fish species. However, little is known about the genetics of freshwater crabs in Korea and/or the foreign (Kim, 1983; Klinbunga et al., 2000b; Koo et al., 2004). As the KFC culture industry increases rapidly, understanding the genetics of this mollusk species is crucial to an evaluation of the genetic effect of crab production operations.

In the present study, to elucidate the genetic distances and differences among geographical freshwater crab populations, we performed a clustering analysis of KFCs and CFCs collected from Korea and China. The present study was also undertaken to confirm that the population relationships identified by RAPD analysis are consistent with previously obtained data using morphological and/or ecological affinities.

Materials and Methods

Sampling and gDNA extraction

Two populations of freshwater crab (*E. sinensis*) were obtained from Buan district in the vicinity of the West Sea of Korea and imported from China, respectively. Crab muscle was collected in sterile tubes, immediately placed on dry ice, and stored at -40°C until the genomic DNA extraction. RAPD analysis was performed on the muscle extracts from 22 individuals, using seven decamer oligonucleotides primers. Genomic DNA was extracted and purified under the conditions described previously (Yoon and Kim 2004). After several washings, lysis buffer I [155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA] was added to the samples, and the mixture tubes were gently inverted. The precipitates obtained were then centrifuged and resuspended in lysis buffer II [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS], and 15 µl of proteinase K solution (10 mg/ml) was added. After incubation, we added 300 µl of 3 M NaCl, and gently pipetted for a few minutes. 600 µl of chloroform was then added to the mixture and inverted (no phenol). Ice-cold 70% ethanol was added, and then the samples were centrifuged at 19,621 g for 5 minutes to extract the DNA from the lysates. The DNA pellets were then incubation-dried for more than 10 hours, maintained at -40°C until needed, then dissolved in the ultra-pure water (Kwangmyung Co., Ltd., Korea). The concentration of the extracted genomic DNA was measured by its absorbance ratio at 260 nm, with a spectrophotometer (Beckman Coulter, Buckinghamshire, UK).

Primers, markers and amplification conditions

The arbitrarily chosen primers were purchased from Operon Technologies, USA. The G + C content of the primers was between 60 ~ 70%. Among the 20 primers selected, seven primers, OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3'), OPA-13 (5'-CAGCACCCAC-3'), OPA-16 (5'-AGCCAGCGAA-3'), OPB-06 (5'-GCTCTGCCC-3'), OPB-15 (5'-GGAGGGTGTT-3'), OPB-17 (5'-AGGGAACGAG-3') and OPD-10 (5'-GGTCTACACC-3') were shown to generate total, shared and specific loci which could be clearly scored. We used these primers to determine the genetic variability and similarity of the freshwater crab. RAPD-PCR was performed as described previously (Yoon and Kim, 2004) using two Thermal Cyclers (MJ Research, Inc., USA Perkin Elmer Cetus, USA). DNA amplification was performed in 25 µl samples, which contained 10 ng of template DNA, 20 µl of premix (Bioneer Co., Korea), and 1 unit of primer. Amplification products were generated via electrophoresis on 1.4% agarose (VentechBio, Korea) gel containing TBE [90 mM Tris (pH 8.5), 90 mM borate, 2.5 mM EDTA].

The 100 bp Ladder DNA marker (Bioneer Co., Korea) was used as a DNA molecular

weight marker. The agarose gels with ethidium bromide staining were illuminated by ultraviolet rays, and photographed using a Photoman direct copy system (PECA products, USA) and image analysis system (Syngene Co., UK).

Data analysis

The DNA banding patterns generated from RAPD analysis were analyzed by a computer program, Systat Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A dendrogram with the genetic distances was built using this pc-package program. Genetic differences and Euclidean genetic distances within and between populations were also calculated by complete linkage method using the Systat hierarchical dendrogram program version 10. Only fragments between 100 bp and 2,000 bp in size that were readily visible were scored for statistical analysis. Weak and inconsistent amplification fragments were not included in the analysis.

The F value was calculated by the presence/absence of amplified products at specific positions in the same gel from the RAPD profiles. The samples were considered to be similar or identical if there was a complete concordance of DNA fragment profiles and considered different if there was a difference of one or more DNA bands. The degree of variability was calculated by use of the Dice coefficient (F), which is given by the formula: $F = 2n_{ab} / (n_a + n_b)$, where n_{ab} is the number of bands shared between the samples a and b, n_a is the total number of bands for sample a and n_b is the total number of bands for sample b (Jeffreys and Morton, 1987; Yoon and Kim, 2003b; Yoke-Kqueen and Radu, 2006). An F value of 1.000 indicates that the two samples are identical and an F value of 0 indicates that the samples are different. The average of within-population similarity is calculated by pairwise comparison between individuals within a crab population. In addition, Systat version 10 was used to obtain other statistical results, including means, standard errors, and t-test scores.

Results and Discussion

The variation within and between populations

In spite of the difference in reproducibility, RAPD and/or RAPD-based techniques have been widely applied to the discrimination of genetically peculiar features of numerous finfishes and invertebrates (Callejas and Ochando, 1998; Cagigas et al., 1999; Iyengar et al., 2000; Kim et al., 2004; Yoon and Kim, 2004b; Park et al., 2005; Kim et al., 2006). In general, RAPD analysis is one of the fast and easy methods for the identification of genetic differences and DNA polymorphisms in various organisms. It has been reported that RAPD analysis does not also require a prior knowledge of the genomic DNA (Welsh and McClelland, 1990; Welsh et al., 1991; Mamuris et al., 1999; Iyengar et al., 2000; Klinbunga et al., 2000a).

Consequently, in this study, seven primers generated a total of 636 loci in the KFC population, and 389 in the CFC population, with a DNA loci size ranging from 100 bp to 2,000 bp, as summarized in Table 1. Referring to shellfishes and crustaceans, for RAPD analysis, McCormack et al. (2000) insisted that DNA fragments obtained by four primers ranged from 100 bp to 2,300 bp in the brittle star (*Amphiura filiformis*). Yoon and Kim (2003a) reported that 7 decamer primers generated 585 major and minor RAPD bands from three geographic sites, producing approximately 6.6 average products per primer in marsh clams (*Corbicula* sp.) from Gochang. It has been reported that 7 primers generated 317 bands in a cultured shrimp population, and 385 bands in the wild population, ranging from 100 bp to 1,800 bp (Yoon and Kim, 2003b). 481 fragments were identified in the oyster population of Buan, and 264 in the oyster population from Geojedo: 143 polymorphic fragments (29.7%) in the Buan population, and 60 (22.7%) in the Geojedo population (Kim et al., 2004). DNA fragment sizes varied from 50 bp to 1,600 bp. Park et al. (2005) identified a total of 510 fragments in Korean slipper lobster (*Ibacus ciliatus*) and 526 in Indian Ocean deep sea lobster (*Puerulus sewelli*), with DNA fragment sizes ranging from 100 bp to 2,000 bp using eight oligonucleotides primers, respectively. Seven-four sharp and reliable bands amplified with five primers were included in the RAPD analysis, out of a total of 124 bands (Sandoval-Castellanos et al., 2007). Their sizes were between 190 bp and 1,000 bp.

Concerning various finfishes, Partis and Wells (1996) reported that DNA fragments ranging from 350 bp to 700 bp were detected in the RAPD-PCR profiles of barramundi (*Lates calcarifer*). They used nine primers, generating a total of 65 reliable bands, which ranged in size from approximately 200 bp to 1,000 bp, within and among four natural Spanish populations of brown trout (*Salmo trutta*) (Cagigas et al., 1999). Mamuris et al. (1999) reported that fragment sizes varied from 220 bp to 1,700 bp in four species of the

Mullidae. It has been reported that five primers generated 1,084 distinct fragments, which ranged in size from 120, to larger than 4,270 bp in wild and cultured populations of crucian carp (Yoon and Park, 2002). Six primers were used, generating a total of 602 scorable bands in catfish, and 195 in the bullhead population, respectively, ranging in DNA fragment size from less than approximately 100, to more than 2,000 base pairs (Yoon and Kim, 2004b). By other methods, Tassanakajon et al. (1998) insisted that eighty fragments, ranging from 200 bp to 2,200 bp, were unambiguously counted in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). A tandemly repeated satellite DNA of 290 ~ 291 bp was identified by *SalI* digestion of the genomic DNA of five species of Eastern Pacific abalone (genus *Haliotis*) (Muchmore et al., 1998).

In this study, on average, a decamer primer generated 90.9 amplified products per primer in the KFC population, and 55.6 in the CFC population, as illustrated in Table 1. A primer generated an average of 8.3 amplified loci per sample, ranging from 3.3 to 12.7 loci in the KFC population. In the KFC population, the primer OPA-13 generated loci of a great many sizes, ranged from 150 bp to 1,400 bp, as summarized in Table 1. In this population, the primer OPA-13 generated 44 major and/or minor shared loci, of 280 bp, 400 bp, 480 bp and 800 bp, respectively, as shown in Fig. 1B. The 11-shared loci that established population identity were 300 bp, as shown in Fig. 1D. The specific banding patterns of the RAPD products of approximately 200 bp (lane 3), 250 bp (lanes 3 and 11), 350 bp (lanes 4, 6 and 10) and 750 bp (lanes 1, 7 and 10) were also detected. The 9 specific loci generated by this primer exhibited inter-individual-specific characteristics, thus revealing DNA polymorphisms.

Moreover, in the CFC crab population, shared loci of the banding patterns, corresponding to loci of 1,000 bp, were generated by the decamer primer OPB-10, as shown in Fig. 1E. This decamer primer generated the most loci (a total of 102), with an average of 9.3, as illustrated in Table 1. This primer detected 15 specific major and/or minor loci that identified individuals. The banding patterns generated by this decamer primer in this CFC population varied widely, as shown in Fig. 1E. The complexity of the banding patterns varied widely between primers and/or geographic locales. The primer OPB-17 generated 11-shared loci in all samples, approximately 330 bp in size (Fig. 1F). Especially, this decamer primer generated the least loci (a total of 13), with an average of 1.2, in comparison to the other primers used (Table 1). The 5 specific loci generated by this primer exhibited inter-individual-specific characteristics, thus revealing DNA polymorphisms. These results, as a matter of fact, indicate that the genome sizes of freshwater crab and are similar to those of the black tiger shrimp (Tassanakajon et al., 1998), penaeid shrimp (Yoon and Kim, 2003b), oyster (Kim et al., 2004) and crayfish (Kim et al., 2006). Generally, the size and number of fragments generated depends both on the nucleotide sequence of the primer

used, and on the source of the template DNA, resulting in a genome-specific DNA fragment (Welsh and McClelland, 1990; Welsh et al., 1991).

88 unique shared loci to each population, with an average of 12.6 per primer, were observed in the KFC population, and 44 loci, with an average of 6.3 per primer, were observed in the CFC population. 44 unique shared loci to each population, of approximately 280 bp, 400 bp, 480 bp and 800 bp, were identified by the decamer primer OPA-13, which established identifications for populations and/or species, as shown in Fig. 1B. The primer OPD-10 detected 22 unique shared loci to each population major and/or minor loci of sizes 350 bp and 500 bp, in all samples in CFC population (Table 2) (Fig. 1G). The decamer primer OPA-16 generated the shared loci by the two populations, of approximately 200 bp, in both KFC and CFC population, as shown in Table 2. Especially, the decamer primer OPB-06 generated the shared loci by the two populations, approximately 300 bp, in both KFC and CFC population (Table 2) (Fig. 1D). The decamer primer OPB-17 also generated the shared loci by the two populations, of approximately 300 bp, in both crab populations, as shown in Fig. 1F. The 200 bp bands produced by the primer OPD-10 were identified as being common to two crab populations, which were identifying species and/or genus, as shown in Fig. 1G. The other primers, however, did not generate the shared loci by the two populations in both crab populations, as shown in Fig. 1A, B and E. These results demonstrate that the KFC crab population is moderately different from the CFC population. Population-related RAPD fragments were identified in the channel catfish (*Ictalurus*) and the blue catfish (*I. furcatus*), and also in their F₁, F₂ and backcross hybrids (Liu et al., 1998). Klinbunga et al. (2000b) insisted that the primers generated 36, 32, and 24 bands in different mud crab species from Eastern Thailand (genus *Scylla*), respectively. It has also been reported that one primer generated 9 to 15 distinct bands in the black tiger shrimp (Tassanakajon et al., 1998). 176 common fragments, with an average of 25.1 per primer, were observed in the Buan population, and 99 fragments, with an average of 14.1 per primer, were observed in the Geojedo population (Kim et al. 2004). Generally speaking, using a variety of arbitrary primers, RAPD-PCR has been applied to identify polymorphic/specific markers particular to line, species and geographical population, as well as genetic diversity/polymorphism in diverse species of organisms (Partis and Wells, 1996; McCormack et al., 2000; Klinbunga et al., 2000a; Yoon and Kim, 2004a).

In this study, 7 decamer primers generated 50 specific loci (122/636 loci, 19.18%) in the KFC crab population, and 69 (69/389 loci, 17.74%) in the CFC population, as illustrated in Table 1. These results demonstrate that the primers detected a great deal of specific loci. The RAPD-PCR method, using random primers, was applied to the identification of three endemic Spanish barbel species: *Barbus bocagei*, *B. graellsii* and *B. sclateri* (Callejas and Ochando, 1998). The random RAPD method has been applied to eight fish species:

barramundi, Nile perch, john dory, mirror dory, silver dory, spiky oreo, warty oreo and smooth oreo (Partis and Wells, 1996).

The F values and genetic distances

In this study, the F value, which is based on the presence or absence of amplified loci, was utilized to calculate similarity indices, as illustrated in Table 3. The similarity matrix, which was based on the average F values obtained from all samples, ranged from 0.653 to 0.866 in the KFC crab population, and ranged 0.586 – 0.953 in the CFC population. The average F value within the KFC crab population was found to be 0.751 ± 0.007 , and, in the CFC crab population, was found to be 0.711 ± 0.011 . The F value between the two crab populations ranged from 0.322 to 0.639, with an average of 0.449 ± 0.006 . The F value between individuals no. 06 and no. 07 was 0.866, which was the highest value identified within the KFC crab population. The value between no. 02 and no. 03 was 0.653, which was the lowest within the KFC population. The F value between individual's no. 05 and no. 18 was 0.639, which was the highest between the two crab species. The value between individual's no. 11 and no. 13 was 0.322, which was the lowest between the two crab populations. Regarding individual results, individuals within the KFC population exhibited higher F values than did ones within the CFC population.

Our F values between the two crab populations are inconsistent with the previously reported results (Callejas and Ochando, 1998; Yoon and Park, 2002; Kim et al., 2004). To illustrate, reports have shown that the average bandsharing value obtained using five random primers was 0.40 ± 0.05 in the wild crucian carp population (Yoon and Park, 2002), and 0.282 ± 0.008 between the two geographical oyster populations (Kim et al., 2004). The F value illustrated by our study is, however, similar to 0.69 ± 0.08 in the cultured crucian carp population (Yoon and Park, 2002), and the value reported for Spanish barbel species (0.71 – 0.81) (Callejas and Ochando, 1998). The F value obtained in our study is also higher than that identified between the common carp and Israeli carp species (0.57 ± 0.03) (Yoon, 2001), and the bullhead population (0.504 ± 0.115) (Yoon and Kim, 2004b).

The average genetic difference was 0.257 ± 0.007 within the KFC crab population, and 0.289 ± 0.011 within the CFC population. Comparatively speaking, the average genetic difference was higher in the CFC population than in the KFC crab population. This suggests that the genetic variation in the CFC population is higher than in the KFC population. The average genetic difference was 0.555 ± 0.006 between two crab populations. The average genetic difference was higher the level (0.327 ± 0.072) between the two shrimp (*Penaeus*) populations (Yoon and Kim, 2003b), whereas the genetic difference was lower than that (0.710 ± 0.009) between the two oyster (*Crassostrea gigas*) populations (Kim et al., 2004).

In this study, based on the similarity matrix generated by F values and genetic distances,

hierarchical clustering analysis was performed in order to obtain a dendrogram, as shown in Fig. 2. The dendrogram obtained by the seven primers indicates three genetic clusters: cluster 1 (KOREAN 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10 and 11), cluster 2 (CHINESE 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 and 20), and cluster 3 (CHINESE 21 and 22). The shortest genetic distance displaying significant molecular difference was between individuals' CHINESE no. 22 and CHINESE no. 21 (0.047). Ultimately, individual no. 20 of the Chinese freshwater crab was most distantly related to Korean freshwater crab no. 05 (genetic distance = 0.674). From what has been said above, the potential of RAPD analysis to identify diagnostic markers for the identification of two freshwater crab populations has been demonstrated. Our cluster analysis revealed a pattern similar to the one posited by Yoon and Kim (2004b). They reported that single linkage cluster analysis, which indicated four genetic groupings, and a dendrogram revealed close relationships between individual identities within two geographical populations. Scatter plot graph showed the relation between genetic distances and geographic distances, as shown in Fig. 3.

In invertebrates, by cluster analysis of the pairwise population matrix, generated from RAPD data, Huang et al. (2000) illustrated that geographically close populations tended to cluster together in the blacklip abalone. A neighbor-joining tree based on the genetic distances between populations, using the RAPD-PCR method, indicates the relationships of three mud crab species (Klinbunga et al., 2000b). This study showed that large genetic differences could be found between geographical populations within a species, as well as between species. Kim et al. (2000) reported that phylogenetic relationships among 5 abalone (*Haliotis* sp.) species and one hybrid were conducted by calculation of the distance coefficient and construction of a phylogenetic tree based on RAPD data. Decisively, they insisted that RAPD analysis constitutes a powerful tool for the elucidation of phylogenetic relationships, based on their analysis of 6 species of *Haliotis*. The dendrogram obtained from the Korean oyster (*Crassostrea gigas*) population by the four primers, indicates three main branches (Kim et al., 2004). The genetic distance between the two geographic populations ranged from 0.039 to 0.284. The shortest genetic distance displaying significant molecular differences, 0.080, was found to exist between individuals no. 09 and no. 07 from Buan.

By means of phylogenetic tree obtained using the neighbor-joining and maximum parsimony analyses, Bernardi and Talley (2000) illustrated that samples of killifish, *Fundulus parvipinnis* were partitioned into two major clades at a higher level. They reported that these two clades were very robust (99 to 100% of bootstrap replicates) and genetically distant (average sequence divergence 5.8%). Cagigas et al. (1999) reported that genetic variation within samples was also found to be significantly higher by microsatellite and RAPD analysis, than by enzyme loci within and among four natural Spanish populations of brown

trout (*Salmo trutta*).

The identification of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), penaeid (*Penaeus chinensis*), oyster (*Crassostrea gigas*), shortnecked clam (*Ruditapes philippinarum*), and crayfish (*Cambaroides similis*) populations was an essential pace in the foundation and advance of crustacean/mollusk breeding programs (Tassanakajon et al., 1998; Yoon and Kim, 2003b; Kim et al., 2004; Yoon and Kim, 2004a; Kim et al., 2006). Molecular genetic markers, including, most notably, microsatellite loci (ML), quantitative trait loci (QTL), and genomic mapping (GM), will be worthwhile in the selection of broodstock for multiple reproductive traits (MRT), or production- (PRT) and hygiene-related traits (HRT), in fisheries science and aquaculture industry (Waldbieser and Wolters, 1999).

As stated above, the outlook of RAPD to identify diagnostic markers for breed, stock, species and population identification in invertebrates (Klinbunga et al., 2000b McCormack et al., 2000; Kim et al., 2004; Yoon and Kim, 2004a; Park et al., 2005) has also been demonstrated.

In our study, RAPD-PCR analysis has revealed a significant genetic distance between two population pairs. RAPD-PCR enabled us to detect the existence of population discrimination and genetic variation in the crab species. This confirms that the method is a suitable tool for DNA comparisons, both within and between individuals, species, and populations. Fundamentally, the categorization of crab species/population is based on morphological variations in body size, body type, body color, claw type, claw size, carapace size, and carapace type (Lee and Kim, 2003). It is assumed by Chenyambuga et al. (2004) that differences in such traits reflect distinct origins or genetic identity. They illustrated that there is a clear association between particular goat types and sub-regions of sub-Saharan Africa. Furthermore, basic knowledge of the DNA polymorphisms and molecular markers in two crab populations may contribute significantly to broodstock selection and selective invertebrate-breeding programs. Li and Jin (2006) inferred that low gene flow due to mixed mating system and anthropogenic activities likely played important roles in shaping the population genetic structure of an endangered species of China. Accordingly, further analysis with more individuals, primers, and species will be required to fully establish the specificity of loci to particular taxa, and subsequent inter-specific gene flow in the family Grapsidae. The degree of genetic diversity of the endangered finfish/shellfish species need to be accurately estimated for designing conservation program. In the future, we need to develop and/or identify the gene flow, multiple single nucleotide polymorphism, bandmapping and genetic linkage maps for freshwater crabs with morphological characters, RAPD, AFLP, microsatellite, VNTR, EST and SNP marker data.

Acknowledgements

The authors would like to thank the reviewers who assisted us with thorough and far-reaching criticisms. This work was also supported by the 2006 Sea Grant Program of Honam District University. Finally, particular thanks go to our laboratory colleagues, for their assistance in sample collection, their help with the PCR techniques, and their team work with the statistical analysis.

References

- Barki, Y., J. Douek, D. Graur, D. Gateño, and B. Rinkevich. 2001. Polymorphism in soft coral larvae revealed by amplified fragment-length polymorphism (AFLP) markers. *Marine Biology* 136: 37-41.
- Bernardi, G. and D. Talley. 2000. Genetic evidence for limited dispersal in the coastal California killifish, *Fundulus parvipinnis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 255: 187-199.
- Cagigas, M. E., E. Vazquez, G. Blanco, and J. A. Sánchez. 1999. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites, and RAPD markers. *Marine Biotechnology* 1: 286-296.
- Calderini, O., F. Pupilli, F. Paolucci and S. Arcioni. 1997. A repetitive and species-specific sequence as a tool for detecting the genome contribution in somatic hybrids of the genus *Medicago*. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 734-740.
- Callejas, C. and M. D. Ochando. 1998. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology* 53: 208-215.
- Chenyambuga, S. W., O. Hanotte, J. Hirbo, P. C. Watts, S. J. Kemp, G. C. Kifaro, P. S. Gwakisa, P. H. Petersen, and J. E. O. Rege. 2004. Genetic characterization of indigenous goats of sub-Saharan Africa using microsatellite DNA markers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 17:445-452.
- Deragon, J. M. and B. S. Landry. 1992. PCR methods and applications: RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf disks. *PCR Methods Application* 1: 175-180.
- Friesen, N., R. Fritsch, and K. Bachmann. 1997. Hybrid origin of some ornamentals of *Allium subgenus* *Melanocrommyum* verified with GISH and RAPD. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1229-1238.
- Huang, B. X., R. Peakall, and P. J. Hanna. 2000. Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Marine Biology* 136: 207-216.
- Iyengar, A., S. Piyapattanakorn, D. M. Dtone, D. A. Heipel and B. R. Howell, S. M. Baynes, and N. Maclean. 2000. Identification of microsatellite repeats in turbot (*Scophthalmus maximus*) and dover sole (*Solea solea*) using aRAPD-based technique: Characterization of microsatellite markers in dover sole. *Marine Biotechnology* 2: 49-56.
- Jeffreys, A. J. and D. B. Morton. 1987. DNA fingerprints of dogs and cats. *Animal Genetics* 18: 1-15.
- Kim, Y. H. 1983. Studies on *Orithya sinica* (Linnaeus) in the Western Sea- II- Weight of ovary, number of eggs spawned and egg diameter. *Bulletin of the Korean Fisheries*

- Society. 16: 14-16.
- Kim, Y. H. and S. C. Chung. 1990. Studies on the growth and molting of the tiger crab, *Orithyia sinica* (Linnaeus). Bulletin of the Korean Fisheries Society. 23: 93-108.
- Kim, S. K., Y. H. Jung, S. H. Han, Y. S. Oh, M. H. Ko, and M. Y. Oh. 2000. Phylogenetic relationship among *Haliotis* sp. Korea by the RAPD analysis. Korean Journal of Genetics 22: 43-49.
- Kim, J. Y., C. Y. Park, and J. M. Yoon. 2004. Genetic differences and DNA polymorphism in oyster (*Crassostrea* sp.) analysed by RAPD-PCR. Korean Journal of Genetics 26: 123-134.
- Kim, S., Y. H. Kim and J. M. Yoon. 2006. Genetic variation in geographic (*Cambaroides similis*) populations. Journal of Fish Pathology, 19 (2) : 141-153.
- Klinbunga, S., P. Ampayup, A. Tassanakajon, P. Jarayabhand, and W. Yoosukh. 2000a. Development of markers of the tropical oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. Marine Biotechnology 2: 476-484.
- Klinbunga, S., A. Boonyapakdee, and B. Pratoomchat. 2000b. Genetic diversity and species-diagnostic markers of mud crabs (Genus *Scylla*) in Eastern Thailand determined by RAPD analysis. Marine Biotechnology 2: 180-187.
- Koo, J. G., J. H. Jee, J. M. Kim and J. C. Kang. 2004. Effect of water temperature on survival, growth and intermolt period of tiger crab, *Orithyia sinica* (Linnaeus) larvae. Journal of Fish Pathology 17: 139-144.
- Lee, S. Y. and S. H. Kim. 2003. Genetic variation and discrimination of Korean arkshell *Scapharca* species (Bivalvia, Arcoida) based on mitochondrial COI gene sequences and PCR-RFLP. Korean Journal of Genetics 25: 309-315.
- Li, J. M. and Z. X. Jin. 2000. High genetic differentiation revealed by RAPD analysis of narrowly endemic *Sinocalycanthus chinensis* Cheng et S. Y. Chang, an endangered species of China. Biochemical Systematics and Ecology. 34: 725-735.
- Liu, Z., P. Li, B. J. Argue, and R. A. Dunham. 1998. Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus*), blue catfish (*I. furcatus*) and their F₁, F₂ and backcross hybrids. Animal Genetics 29: 58-62.
- Mamuris, Z., C. Stamatis, M. Bani, and C. Triantaphyllidis. 1999. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: allozymes, random amplified polymorphic DNA mitochondrial DNA. Journal of Fish Biology 55: 572-587.
- McCormack, G. C., R. Powell, and B. Keegan. 2000. Comparative analysis of two populations of the brittle star *Amphiura filiformis* (Echinodermata: Ophiuroidea) with different life history strategies using RAPD markers. Marine Biotechnology 2: 100-106.
- Muchmore, M. E., G. W. Moy, W. J. Swanson, and V. D. Vacquier. 1998. Direct sequencing

- of genomic DNA for characterization of a satellite DNA in five species of Eastern Pacific abalone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7 (1): 1-6.
- Park, S. Y., J. S. Park, and J. M. Yoon. 2005. Genetic difference and variation in slipper lobster (*Ibacus ciliatus*) and deep sea lobster (*Puerulus sewelli*) throughout its distribution range determined by RAPD-PCR Analysis. *Korean Journal of Genetics*, 27: 307-317.
- Partis, L. and R. J. Wells. 1996. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA. *Molecular and Cellular Probes* 10: 435-441.
- Sandoval-Castellanos, E., M. Uribe-Alcocer and P. Díaz-Jaimes. 2007. Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. *Fisheries Research*. 83: 113-118.
- Siti Azizah, M. N., A. Ruzainah and I. Patimah. 2005. Development of RAPD markers in the eel-loach (*Pangio* sp.) for genetic discrimination and monitoring of wild and cultured populations. *World Aquaculture*, 36 (1): 37-43.
- Smith, P. J., P. G. Benson, and S. M. McVeagh. 1997. A comparison of three genetic methods used for stock discrimination of orange roughy, *Hoplostethus atlanticus*: allozymes, mitochondrial DNA, and random polymorphic DNA. *Fishery Bulletin* 95: 800-811.
- Tassanakajon, A., S. Pongsomboon, P. Jarayabhand, S. Klinbunga, and V. Boonsaeng. 1998. Genetic structure in populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using randomly amplified polymorphic DNA *Journal of Marine Biotechnology* 6: 249-254.
- Waldbieser, G. C. and W. R. Wolters. 1999. Application of polymorphic microsatellite loci in a channel catfish *Ictalurus punctatus* breeding program. *Journal of the World Aquaculture Society* 30 (2): 256-262.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- Welsh, J., C. Petersen, and M. McClelland. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Research* 19: 303-306.
- Yoke-Kqueen, C. and S. Radu. 2006. Random amplified polymorphic DNA analysis of genetically modified organisms. *Journal of Biotechnology* 127: 161-166.
- Yoon, J. M. and H. Y. Park. 2002. Genetic similarity and variation in the cultured and wild crucian carp (*Carassius carassius*) estimated with random amplified polymorphic DNA. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 15: 470-476.
- Yoon, J. M. and Y. H. Kim. 2003a. Wide marsh clam (*Corbicula* sp.) populations from three sites analysed by. *Bulletin of Electrochemistry* 19: 337-348.
- Yoon, J. M. and G. W. Kim. 2003b. Genetic differences between cultured and wild penaeid shrimp (*Penaeus*) populations analysed by RAPD-PCR. *Korean Journal of Genetics* 25: 21-32.

- Yoon, J. M. and Y. H. Kim. 2004a. Bandsharing values and genetic distances of two wild shortnecked clam, *Ruditapes philippinarum* populations from the Yellow Sea assessed by random amplified polymorphic DNAs-polymerase chain reaction. *Journal of Aquaculture* 17: 12-23.
- Yoon, J. M. and J. Y. Kim. 2004b. Genetic differences within and between populations of Korean catfish (*S. asotus*) and bullhead (*P. fulvidraco*) analysed by RAPD-PCR. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 17: 1053-1061.

Table 1. The total, average, shared, and specific loci generated by RAPD analysis using 7 random primers in freshwater crab (*E. sinensis*) from Korea and China, respectively.

Item Primer \ Population	No. of unique shared loci to each population		No. of shared loci by the two populations
	Korean crab	Chinese crab	Two populations
OPA-05	22	0	0
OPA-13	44	11	0
OPA-16	11	0	11
OPB-06	0	0	11
OPB-10	11	11	0
OPB-17	0	0	11
OPD-10	0	22	11
Total no.	88	44	44
Average no. per primer	12.6	6.3	6.3

Table 2. The number of unique shared loci to each population, and shared loci by the two populations generated by RAPD analysis using 7 random primers in crab (*E. sinensis*) from Korea and China.

Item Primer \ Population	No. of average loci per lane		No. of shared loci		No. of specific loci	
	KFC	CFC	KFC	CFC	KFC	CFC
OPA-05	11.0 (121)	5.3 (58)	22	0	18	6
OPA-13	12.7 (140)	7.4 (81)	44	11	23	4
OPA-16	8.2 (90)	5.4 (59)	22	11	22	24
OPB-06	5.2 (57)	2.4 (26)	11	11	9	7
OPB-10	10.2 (112)	9.3 (102)	11	11	18	15
OPB-17	3.3 (36)	1.2 (13)	11	11	5	5
OPD-10	7.3 (80)	4.5 (50)	11	33	27	8
Total no.	57.8 (636)	35.4 (389)	132	88	122	69
Average no. per primer	8.3 (90.9)	5.1 (55.6)	18.9	12.6	17.4	9.9

KFC: Korean freshwater crab, CFC: Chinese freshwater crab

The total number of loci generated by a primer in freshwater crab is shown in parentheses.

Table 3. Similarity matrix, including F values (above the diagonal) and genetic differences (under the diagonal) calculated with the number of bands shared for sample pairs in Korean and Chinese freshwater crab (*E. sinensis*), respectively.

		<i>F</i> values of freshwater crab from Korea										<i>F</i> values of freshwater crab from China											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Genetic differences of freshwater crab from Korea and China	1		0.719	0.689	0.790	0.817	0.743	0.744	0.765	0.726	0.713	0.717	0.413	0.410	0.517	0.439	0.492	0.469	0.534	0.575	0.588	0.484	0.436
	2	0.281		0.653	0.740	0.733	0.679	0.689	0.656	0.722	0.686	0.697	0.414	0.421	0.518	0.406	0.428	0.453	0.560	0.505	0.506	0.442	0.416
	3	0.331	0.347		0.690	0.747	0.711	0.698	0.738	0.671	0.671	0.706	0.336	0.372	0.496	0.347	0.359	0.343	0.393	0.418	0.396	0.331	0.326
	4	0.210	0.260	0.310		0.819	0.826	0.740	0.782	0.798	0.797	0.738	0.421	0.420	0.541	0.438	0.463	0.422	0.500	0.501	0.477	0.395	0.368
	5	0.183	0.267	0.253	0.181		0.862	0.757	0.741	0.788	0.762	0.750	0.472	0.468	0.607	0.500	0.546	0.484	0.639	0.586	0.531	0.463	0.441
	6	0.257	0.321	0.289	0.174	0.138		0.866	0.791	0.783	0.842	0.785	0.427	0.406	0.494	0.438	0.450	0.415	0.508	0.504	0.499	0.442	0.443
	7	0.256	0.311	0.302	0.260	0.243	0.134		0.804	0.732	0.812	0.716	0.463	0.442	0.457	0.455	0.389	0.470	0.479	0.511	0.506	0.452	0.468
	8	0.235	0.344	0.262	0.218	0.259	0.309	0.196		0.785	0.777	0.739	0.371	0.407	0.497	0.385	0.407	0.417	0.393	0.446	0.499	0.394	0.394
	9	0.274	0.278	0.329	0.202	0.212	0.217	0.268	0.215		0.822	0.835	0.434	0.352	0.545	0.448	0.515	0.423	0.499	0.505	0.492	0.408	0.434
	10	0.387	0.314	0.329	0.303	0.238	0.158	0.188	0.223	0.178		0.747	0.414	0.410	0.447	0.453	0.486	0.427	0.446	0.466	0.450	0.387	0.400
	11	0.283	0.303	0.294	0.362	0.250	0.215	0.284	0.261	0.165	0.253		0.368	0.322	0.437	0.343	0.390	0.394	0.498	0.495	0.466	0.392	0.387
	12	0.587	0.586	0.664	0.579	0.538	0.573	0.537	0.629	0.566	0.586	0.632		0.861	0.750	0.838	0.767	0.655	0.686	0.692	0.586	0.721	0.722
	13	0.590	0.579	0.628	0.580	0.532	0.594	0.558	0.593	0.568	0.590	0.678	0.139		0.829	0.885	0.751	0.656	0.653	0.672	0.591	0.707	0.710
	14	0.483	0.482	0.504	0.459	0.393	0.306	0.543	0.503	0.455	0.553	0.563	0.250	0.171		0.803	0.709	0.653	0.599	0.612	0.659	0.625	0.625
	15	0.561	0.394	0.653	0.567	0.500	0.596	0.545	0.615	0.552	0.547	0.657	0.162	0.115	0.197		0.773	0.654	0.697	0.730	0.606	0.670	0.688
	16	0.508	0.572	0.641	0.537	0.454	0.550	0.550	0.593	0.485	0.514	0.610	0.233	0.249	0.291	0.227		0.717	0.671	0.647	0.589	0.601	0.618
	17	0.531	0.547	0.657	0.578	0.516	0.555	0.530	0.583	0.577	0.573	0.606	0.345	0.344	0.347	0.316	0.283		0.707	0.671	0.796	0.751	0.754
	18	0.466	0.440	0.607	0.500	0.361	0.492	0.521	0.607	0.561	0.554	0.592	0.314	0.347	0.401	0.303	0.329	0.293		0.806	0.698	0.740	0.752
	19	0.425	0.495	0.582	0.499	0.414	0.496	0.489	0.554	0.495	0.554	0.425	0.308	0.328	0.388	0.280	0.353	0.329	0.194		0.776	0.703	0.709
	20	0.432	0.494	0.604	0.523	0.449	0.501	0.494	0.501	0.508	0.539	0.534	0.414	0.409	0.341	0.393	0.411	0.204	0.302	0.224		0.802	0.807
	21	0.516	0.558	0.669	0.605	0.537	0.558	0.548	0.606	0.592	0.613	0.628	0.279	0.293	0.375	0.330	0.399	0.249	0.260	0.297	0.198		0.955
	22	0.564	0.584	0.674	0.632	0.559	0.557	0.532	0.606	0.576	0.600	0.613	0.278	0.290	0.375	0.312	0.382	0.246	0.248	0.291	0.193	0.047	

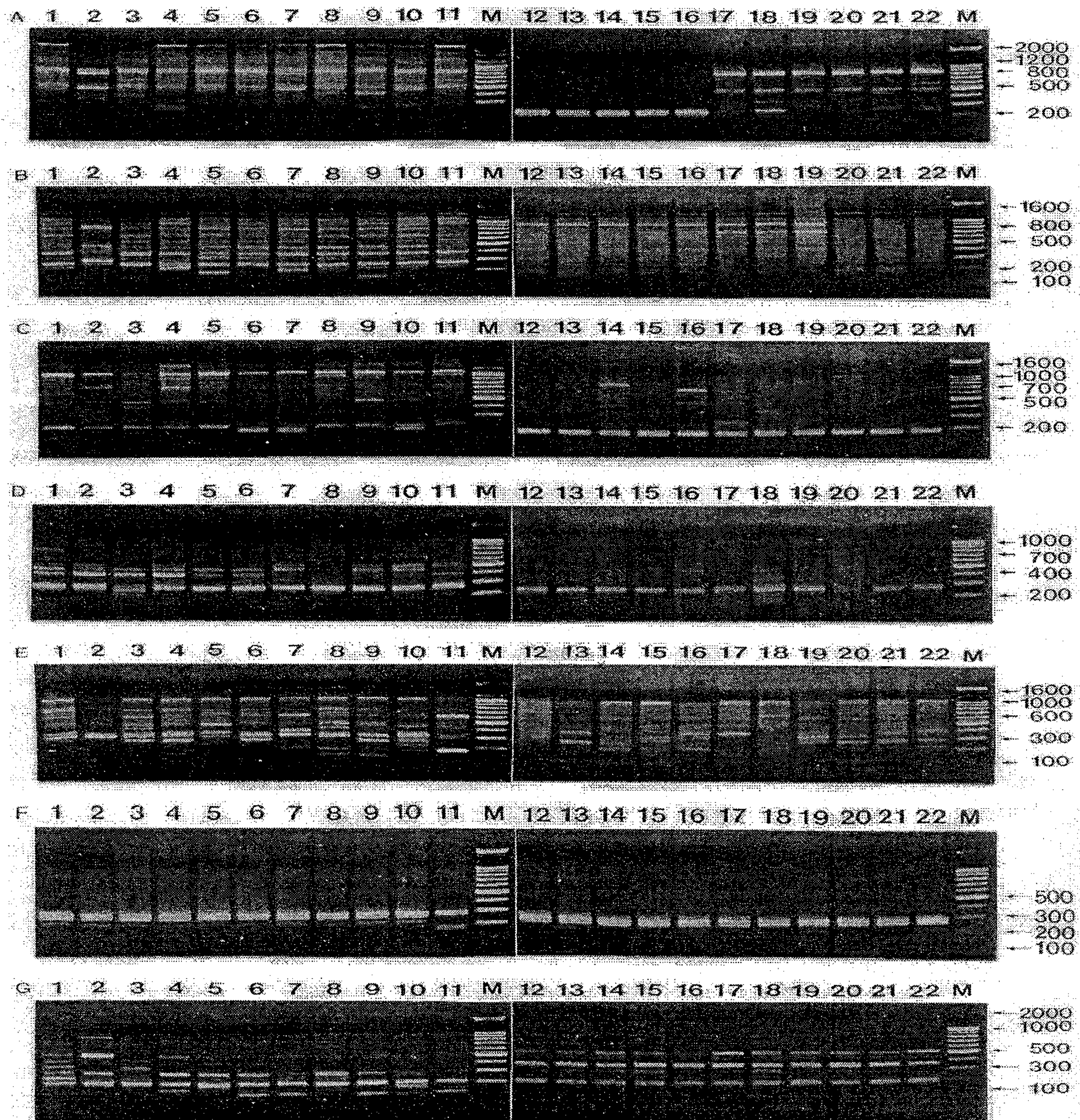


Fig. 1. PCR-based electrophoretic profiles of different individuals in freshwater crab (*E. sinensis*) population. Genomic DNAs isolated from Korean freshwater crab (lane 1 ~ 11) and Chinese freshwater crab (lane 12 ~ 22) were generated by random primers OPA-05 (A), OPA-13 (B), OPA-16 (C), OPB-06 (D), OPB-10 (E), OPB-17 (F) and OPD-10 (G). Amplified PCR products were electrophoresed on 1.4% agarose gel and detected by staining with ethidium bromide. The electrophoresed agarose gels were illuminated by ultraviolet rays, and photographed using a photoman direct copy system. Each lane shows DNA samples from 22 individuals. Lane M represents 100 bp DNA ladder molecular weight marker.

Cluster Tree

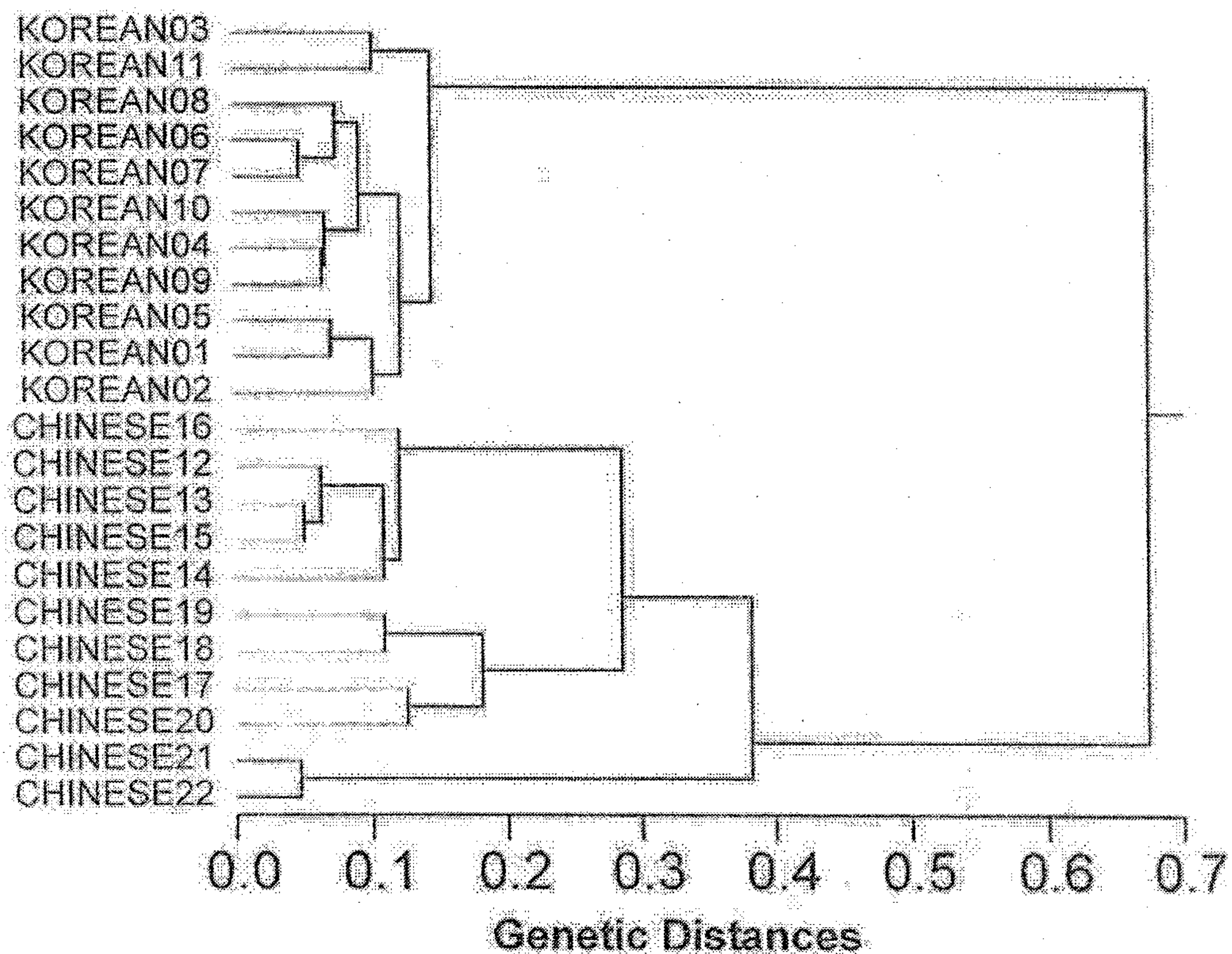


Fig. 2. Hierarchical dendrogram of genetic distances obtained from two geographical populations of Korean freshwater crab (No. 01 ~ 11) and Chinese freshwater crab (No. 12 ~ 22). The relatedness between different individuals in the two geographic freshwater crab populations was generated by Systat version 10 according to the RAPD data (see Table 3). Bar scale represents the coefficient of Nei's genetic distance.

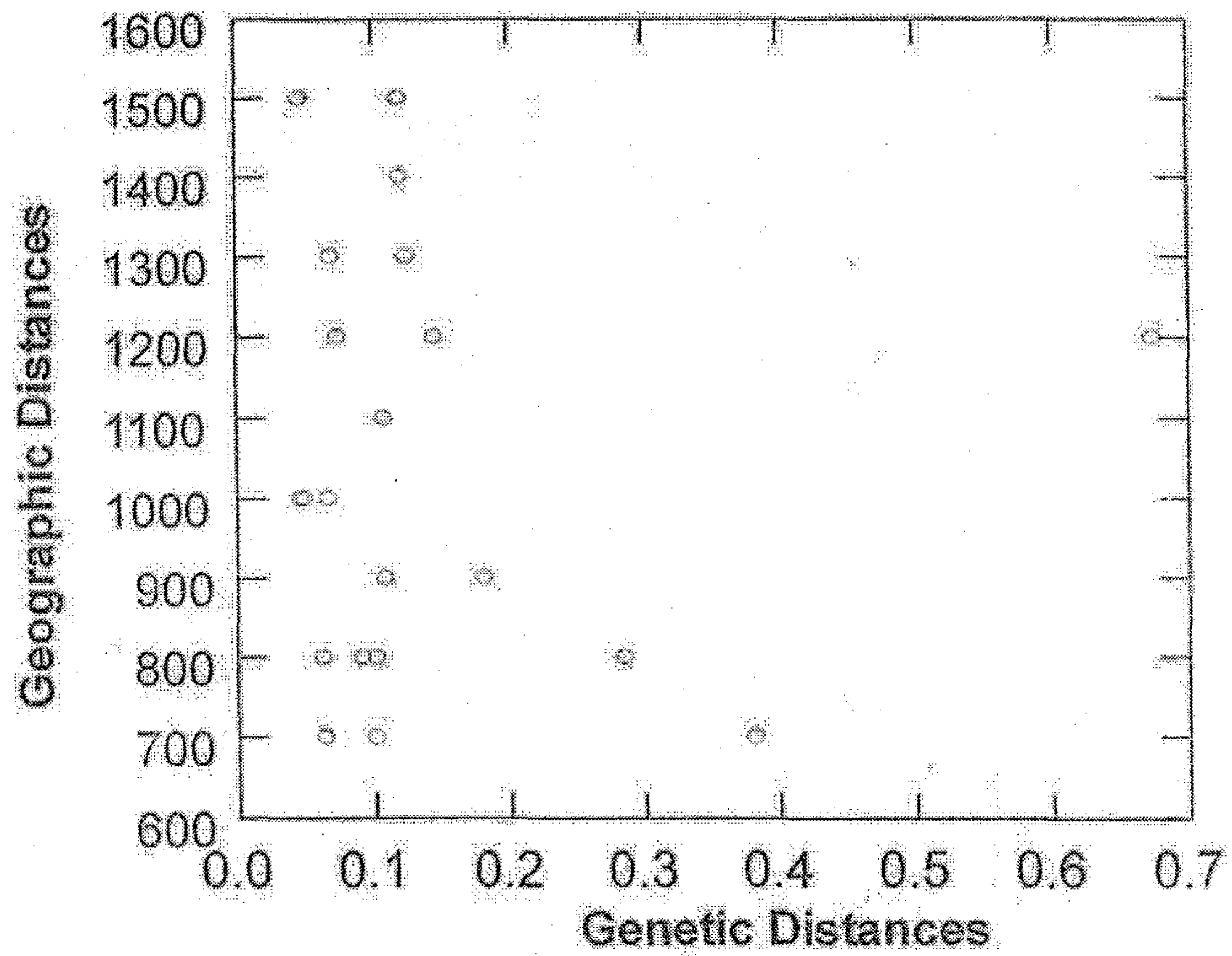


Fig. 3. Isolation of distances performed by means of a SYSTAT program. Scatter plot graph that shows the relation between genetic distances and geographic distances.