

COX I 및 RAG 2 유전자 염기서열 분석에 의한 tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus*와 giant grouper *E. lanceolatus* 간 잡종의 동정

김근식 · 이효련 · Ahemad Sade¹ · 방인철*

순천향대학교 생명시스템학과, ¹말레이시아 사바주 수산청

Identification of Hybrid between the Tiger Grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and the Giant Grouper *E. lanceolatus* by Analyzing COX I and RAG 2 Sequences by Keun-Sik Kim, Hyo-Ryeon Lee, Ahemad Sade¹ and In-Chul Bang* (Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea; ¹Department of Fisheries, Sabah, 4th Floor, Wisma Pertanian Sabah, Jalan Tasik, 88624 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia)

ABSTRACT Interspecific hybrids between tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and giant grouper *E. lanceolatus* were genetically identified based on the partial sequence analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase I (COX I) gene and nuclear recombination activating gene 2 (RAG 2) gene. Out of 585 base positions of RAG 2, a total of five nucleotide substitutions were detected between the two parental species (*E. fuscoguttatus* and *E. lanceolatus*). The hybrids had two distinct types of RAG 2 sequences corresponding to those of both parental species. Mitochondrial COX I gene sequencing showed that hybrids had sequences identical to *E. fuscoguttatus*. Molecular data clearly demonstrate that hybridization does occur between *E. fuscoguttatus* and *E. lanceolatus*, but with *E. fuscoguttatus* as the maternal parent.

Key words : Interspecific hybrids, *Epinephelus fuscoguttatus*, *E. lanceolatus*, COX I, RAG 2

바리과 어류(family Serranidae)는 3아과 529종이며, 그 중 주요 양식 대상종은 능성어아과(subfamily Epinephelinae)로 15속 159종으로 대부분 인도-태평양 지역에 서식한다(Heemstra and Randall, 1993; Froese and Pauly, 2014). 바리과 어류는 고가의 양식어류로 각광받아 양식생산량이 2011년 94,040톤으로 급증하여 10년 동안 7.3배 증가를 보였다(FAO, 2013).

현재까지 바리과 어류의 잡종은 dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) × white grouper (*E. aeneus*), goldblotch grouper (*E. costae*) × dusky grouper, tiger grouper (*E. fuscoguttatus*) × spotted grouper (*E. polyphekadion*), orange-spotted grouper (*E. coioides*) × tiger grouper, orange-spotted grouper × giant grouper (*E. lanceolatus*), 그리고 red-spotted grouper

(*E. akaara*) × orange-spotted grouper 등이 보고되어 있어 상업화를 위해 다양한 종을 대상으로 잡종 교배가 시도되고 있음을 알 수 있다(Glamuzina *et al.*, 1999; James *et al.*, 1999; Glamuzina *et al.*, 2001; Liufu *et al.*, 2007; Koh *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2010; Kiriyakit *et al.*, 2011). 특히 tiger grouper 암컷과 giant grouper 수컷 간 교배를 통해 유도된 잡종은 내병성과 속성장 등의 이점으로 인해 말레이시아 바리과 어류 양식생산량의 70%를 차지하고 있다(Ch'ng and Sensoo, 2008; Addin and Senoo, 2011). 또한 유도된 잡종 바리과 어류는 성숙이 가능하여 역교배에 의한 원종을 생산할 수도 있다(Luin *et al.*, 2013). 따라서 바리과 잡종개체를 유전적으로 동정할 수 있는 마커 개발이 요구되었으나, 지금까지 바리과 잡종 동정의 분자마커에 대한 연구는 소수에 불과하다(Wang *et al.*, 2007).

잡종 개체의 미토콘드리아 및 핵 유전자의 염기서열을 동시에 분석하면 모계와 부계를 정확하게 동정할 수 있다

*Corresponding author: In-Chul Bang Tel: 82-41-530-1286, Fax: 82-41-530-1256, E-mail: incbang@sch.ac.kr

Table 1. Ninety-one base position in which sequences of cytochrome c oxidase I (COX I) were different between tiger grouper (♀), giant grouper (♂) and their hybrid

Species	Variation sites (bp)																			
	9	21	36	48	75	78	81	84	99	102	103	114	120	123	129	138	139	144	165	183
Tiger grouper	C	C	C	C	A	C	T	G	C	C	C	A	G	T	A	T	T	T	T	T
Hybrid grouper
Giant grouper	T	T	T	T	G	T	G	A	T	T	T	G	A	A	G	C	C	C	C	C

Species	Variation sites (bp)																			
	219	222	240	249	279	291	297	303	315	324	336	339	342	345	351	363	366	369	375	384
Tiger grouper	C	T	C	C	T	T	A	C	C	T	T	C	T	T	C	A	A	C	A	T
Hybrid grouper
Giant grouper	T	C	T	T	C	C	G	T	T	C	C	T	C	C	T	T	G	T	G	G

Species	Variation sites (bp)																			
	394	414	426	433	450	453	454	459	462	463	465	474	477	486	501	510	525	531	540	552
Tiger grouper	T	T	T	T	A	T	A	T	A	C	T	T	A	C	C	C	T	T	C	C
Hybrid grouper
Giant grouper	C	C	C	C	G	C	G	C	G	T	C	C	T	T	T	T	C	C	T	T

Species	Variation sites (bp)																			
	558	565	570	576	579	582	594	597	600	603	612	618	621	627	630	633	654	663	675	681
Tiger grouper	A	T	T	C	G	T	T	T	C	T	T	T	A	A	C	A	T	C	G	C
Hybrid grouper
Giant grouper	G	C	C	A	A	A	C	C	T	C	C	C	T	G	T	T	C	T	A	T

Species	Variation sites (bp)										
	684	696	699	702	714	717	723	729	736	738	750
Tiger grouper	T	A	C	A	T	T	G	T	T	G	T
Hybrid grouper
Giant grouper	A	G	C	G	C	C	A	C	C	A	C

Dot indicates identical bases

(Sonnenberg, 2007; 윤 등, 2009; 이 등, 2009). 따라서 본 연구에서는 바리과 어류 간 잡종의 분자생물학적 동정을 위한 선행 연구로서 giant grouper와 tiger grouper 간 잡종을 대상으로 미토콘드리아 cytochrome c oxidase I (COX I) 유전자와 핵 recombination-activating gene 2 (RAG 2) 유전자를 활용한 잡종 동정의 가능성을 평가하였다.

본 연구에 이용한 tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*), giant grouper (*E. lanceolatus*) 그리고 이들 두 종 간의 잡종 (*E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)은 말레이시아 사바주의 수산연구소에서 사육 중인 것으로, 각각 2개체, 32개체, 8개체를 대상으로 하였다. Genomic DNA는 꼬리지느러미 일부를 절단하여 phenol법으로 분리하였다. COX I과 RAG 2의 일부 영역을 중합효소연쇄반응 (PCR)을 통해 증폭하기 위하여 GenBank DB에 확보되어 있는 염기서열을 바탕으로 두 쌍의 primer를 제작하여 사용하였다 [COX_2F (cgatcctRcaaaccttagttaac), COX_4R (gttcaRataattcRattcYtg) 및 rag2_F2 (cgcctYgaYccctatga), rag2_R1 (gctgcactcactctctctg)]. PCR 반응은 20 µL 용적의 AccuPower PCR Premix Kit (Bioneer, Korea)에 genomic DNA 100 ng과 각 유전

자를 증폭할 수 있는 primer는 각각 5 pmole을 넣었으며, 94°C에서 3분간 초기 열변성 반응을 시킨 후, 94°C 30초, 52°C (COX I) 또는 58°C (RAG 2)에서 30초, 72°C 30초의 순환 반응을 35회 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 7분간 신장반응을 수행하였다. PCR 반응의 성공 여부를 GelRed (Biotium Inc., USA)로 염색된 1.5% agarose 겔에서 전기영동하여 확인하였다. 증폭된 PCR산물은 MG™ PCR SV Purification kit (Macrogen Inc., Korea)로 정제한 후, PCR primers를 사용하여 direct sequencing 방법으로 염기서열분석기 ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열 데이터를 BioEdit (ver. 7.0.9) 프로그램 (Hall, 1999)의 ClustalW (Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 다중서열정리를 수행하였다.

미토콘드리아 COX I 유전자의 염기서열 분석 결과 시작 코돈부터 771 bp의 염기서열이 확보되었으며, tiger grouper와 giant grouper에서 나타난 대표 haplotype 간 비교 분석 결과 91개의 변이서열이 나타나 변이율은 약 11.80%였다. Tiger grouper와 giant grouper는 명확하게 구분되었고, 둘 사

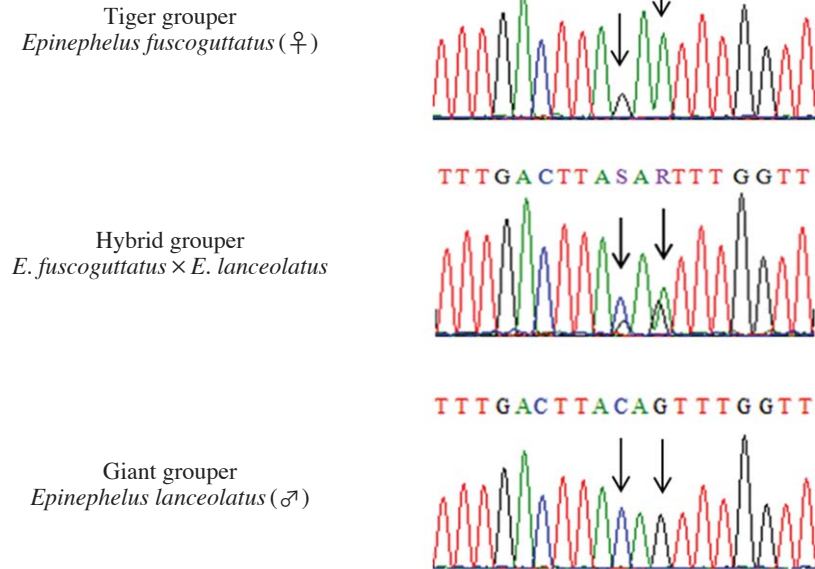


Fig. 1. A fragment electropherograms showing sequences of recombination-activating gene 2 (*RAG 2*) gene of tiger grouper (♀), giant grouper (♂) and their hybrid. Note double peaks at the positions for the hybrids.

Table 2. Five base positions in which sequences of recombination-activating gene 2 (*RAG 2*) were different between tiger grouper (♀), giant grouper (♂) and in which polymorphic bases were found in their hybrids

Species	Variation sites (bp)				
	123	258	292	294	519
Tiger grouper	T	T	G	A	G
Hybrid grouper	W	Y	S	R	S
Giant grouper	A	C	C	G	C

*W=A/T, Y=C/T, S=C/G, R=A/G

이의 잡종은 모든 염기 변이서열 위치에서 tiger grouper와 100% 일치하였다 (Table 1). 이는 모계 유전하는 미토콘드리아의 특성으로서 (Hauswith and Clayton, 1985), 잡종의 경우 그 모계와 동일한 미토콘드리아 유전 정보를 가지게 되는 일반적인 특징을 보였다. *RAG 2* 유전자의 염기서열 분석 결과 585 bp의 염기서열이 확보되었으며, tiger grouper와 giant grouper에서 나타난 대표 haplotype 간 비교 분석 결과 5개의 변이서열이 나타나 변이율은 약 0.85%였다. Electropherogram 비교 분석 결과 tiger grouper와 giant grouper 두 친어 개체들에서는 명확한 single peak들만 나타난 반면 잡종은 5개의 변이서열 위치에서 양친의 염기서열이 함께 표현되는 double peaks 양상을 보이므로 모계와 부계의 변이영역 염기서열을 모두 반영하고 있어 멘델의 유전법칙을 따랐다 (Table 2, Fig. 1). 따라서 본 연구에서 분석된 tiger grouper와 giant grouper의 잡종은 각시붕어와 떡납줄갱이 간 잡종

개체 (윤 등, 2009)와 줄종개와 왕종개 간 자연잡종 개체에서 *RAG 1* 유전자 (이 등, 2009) 및 *R. rutilus*와 *A. alburnus* 간 잡종개체에서 핵 LSU rRNA 유전자 (Sonnenberg *et al.*, 2007) 분석 결과와 동일한 양상으로 나타남에 따라 tiger grouper와 giant grouper의 잡종임을 시사하였다.

본 연구에서는 이 종의 두 친어종들과 잡종 개체의 미토콘드리아와 핵 유전자들의 염기서열 정보를 함께 분석하여 비교함으로써, 잡종 여부의 판단뿐만 아니라 그 모계의 추정 이 가능하였다. 이를 tiger grouper와 giant grouper 및 두 종 간의 잡종을 대상으로 입증함으로써 바리과 어류의 잡종을 명확히 동정할 수 있는 분자마커의 가능성을 확인하였다.

사 사

본 논문은 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청 ‘Golden Seed 프로젝트 사업’ 지원에 의해 수행되었습니다.

인 용 문 헌

윤영은 · 이일로 · 박상용 · 강연종 · 김응오 · 양상근 · 남윤권 · 방인철. 2009. *RAG-1* 유전자의 염기서열 분석에 의한 각시붕어 *Rhodeus uyekii*와 떡납줄갱이 *R. notatus* 잡종의 동정. 한국양식학회지, 22: 79-82.

- 이일로 · 양 현 · 김중환 · 김근용 · 방인철. 2009. 미토콘드리아 COI와 RAG1 유전자 분석에 의한 줄종개 (*Cobitis tetralineata*)와 왕종개 (*Iksookimia longicorpa*)간 자연잡종 동정. 한국어류학회지, 4: 287-290.
- Addin, A.M. and S. Senoo. 2011. Production of hybrid groupers: spotted grouper *Epinephelus polyphekadion* × tiger grouper *E. fuscoguttatus* and coral grouper *E. corallicola* × tiger grouper *E. fuscoguttatus*. International Symposium on Grouper Culture; December, 2011.
- Ch'ng, C.L. and S. Senoo. 2008. Egg and larval development of a new hybrid grouper, tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* × giant grouper *E. lanceolatus*. Aquacult. Sci., 56: 505-512.
- Chu, K.I.C., S.R.M. Shaleh, N. Akazawa, Y. Oota and S. Senoo. 2010. Egg and larval development of a new hybrid orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* × giant grouper *E. lanceolatus*. Aquacult. Sci., 58: 1-10.
- FAO. 2013. FishStatJ, a tool for fishery statistics analysis. FAO Fisheries and Aquaculture Department FIPS - Statistics and information, Rome.
- Froese, R. and D. Pauly. (eds). 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org (version 02/2014).
- Glamuzina, B., N. Glavić, B. Skaramuca, V. Kožul and P. Tutman. 2001. Early development of the hybrid *Epinephelus costae* ♀ × *E. marginatus* ♂. Aquacult., 198: 55-61.
- Glamuzina, B., V. Kožul, P. Tutman and B. Skaramuca. 1999. Hybridization of mediterranean groupers: *Epinephelus marginatus* ♀ × *E. aeneus* ♂ and early development. Aquacult. Res. 30: 625-628.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Res., 41: 95-98.
- Hauswith, W.W. and D.A. Clayton. 1985. Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. Nucl. Acids Res., 13: 8093-8104.
- Heemstra, P.C. and J.E. Randall. 1993. FAO species catalogue. Vol. 16. Groupers of the world (family Serranidae, subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. FAO Fish. Synop., 125: 382.
- James, C.M., S.A. Al-Thobaiti, B.M. Rasem and M.H. Carlos. 1999. Potential of grouper hybrid (*Epinephelus fuscoguttatus* × *E. polyphekadian*) for aquaculture. Naga (The ICLARM Quarterly), 22: 19-23.
- Kiriyakit, A., W.G. Gallardo and A.N. Bart. 2011. Successful hybridization of groupers (*Epinephelus coioides* × *Epinephelus lanceolatus*) using cryopreserved sperm. Aquacult., 320: 106-112.
- Koh, I.C.C., S.R.M. Shaleh and S. Senoo. 2008. Egg and larval development of a new hybrid orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* × tiger grouper *E. fuscoguttatus*. Aquacult. Sci., 56: 441-451.
- Liufu, Y.-Z., H.-H. Zhao, X.-C. Liu, H.-R. Lin, G.-G. Huang, H.-F. Zfang and Y.-X. Wang. 2007. Preliminary study on the hybrid red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) ♂ × orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) ♀. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 46: 72-75. (in Chinese)
- Luin, M., C.F. Fui and S. Senoo. 2013. Sexual maturation and gonad development in tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) × giant grouper (*E. lanceolatus*) hybrid. J. Aquac. Res. Develop., 5: 213-217.
- Sonnenberg, R., A. Nolte and D. Tautz. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. Front. Zool., 4: 6.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res., 22: 4673-4680.
- Wang, S., J. Du, J. Wang and S. Ding. 2007. Identification of *Epinephelus malabaricus* and *Epinephelus coioides* using DNA markers. Acta Oceanolog. Sin., 26: 122-129.