

Microsatellite 마커를 이용한 대왕바리 (*Epinephelus lanceolatus*) 친어 집단의 가계도 분석 효율

김근식 · 노충환 · Ahemad Sade¹ · 방인철^{2,*}

한국해양과학기술원 동해연구소, ¹말레이시아 사바주 수산청, ²순천향대학교 생명시스템학과

Effectiveness of Microsatellite Markers for Parentage Analysis of Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*) Broodstock by Keun-Sik Kim, Choong Hwan Noh, Ahemad Sade¹ and In-Chul Bang^{2,*} (East Sea Research Institute, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Ulsan, Korea; ¹Department of Fisheries, Sabah, 4th Floor, Wisma Pertanian Sabah, Jalan Tasik, 88624 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia; ²Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea)

ABSTRACT Giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) is an endangered species considered as a vulnerable grade-organism in the International Union for Conservation of Nature (IUCN) red list. As a fundamental baseline study for establishing a giant grouper broodstock management system, the efficiency for parentage analysis was evaluated by using microsatellite makers previously available in this species. The eight microsatellites generated a total 52 alleles from 32 individuals, the mean expected heterozygosity was 0.663, and mean inbreeding coefficient was 0.011, consequently suggesting that the present broodstock has retained the high level of genetic diversity. However, our analysis also recommended the collection of more broodfish for more stable brood line, since the estimated value of the effective population size was proven to be 35. The average probability of identity was 6.85×10^{-11} . NE-2P and NE-PP of paternity non-exclusion probabilities were 0.00835 and 0.00027, respectively. As the result of principle coordinate analysis, the genotype of broodstock was not overlapped, suggesting that the management system of giant grouper based on eight selected microsatellite markers might be effective, although further validation with extended number of broodfish might also be needed in future. Data of present study could be a useful basis to avoid the unwanted selection of broodfish that possess close genetic relationship with current broodstock, and consequently to establish effective broodstock management system allowing the production of progeny with high genetic diversity.

Key words : Giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*, broodstock management, microsatellite marker, parentage analysis

서 론

바리과 (family Serranidae) 중 능성어아과 (sub-family Epinephelinae)는 15속 159종으로서 산업적으로 매우 중요한 분류군이다 (Heemstra and Randall, 1993; Froese and Pauly, 2014). 이 중 대왕바리 (*Epinephelus lanceolatus*)는 초대형 어

류로서 인도-서태평양 일대의 열대 및 아열대 해역에 서식하며 (Heemstra and Randall, 1993; Nelson, 2006), 최근 우리나라 제주도 연안에서도 1마리가 채집되어 보고된 바 있다 (Myoung *et al.*, 2013).

세계자연보전연맹 (IUCN)에서 발간한 적색목록 (red list)을 참고하면 대왕바리는 현재 야생에서 절멸 위기에 처할 가능성이 높은 취약 (VU, Vulnerable) 등급에 속한다 (Shuk Man and Chuen, 2006). 이에 따라 인위적인 자손생산을 통한 자원확보가 필요하며, 이를 위해 우선적으로 유전 다양성을 유

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

지하고 있는 친어의 확보가 선행되어야 한다. 유전 다양성의 감소는 유전적 부동과 병목현상으로 집단 근친도의 증가, 성장 저하, 질병 저항성 감소, 기형 증가 등의 악영향으로 이어질 가능성이 높다 (Frankham *et al.*, 2004; Allendorf *et al.*, 2013). 친어의 유전자형을 고려하지 않은 무작위 교배는 극단적인 유전자형의 손실을 야기할 수 있으며 (Rudnick and Lacy, 2008), 이는 근교약세 (inbreeding depression)로 이어져 생산한 자손의 생존에 악영향을 미칠 수 있다. 특히 대왕바리는 자원량이 부족할 뿐만 아니라 개체 크기가 20 kg 이상일 때 교배가 가능하기 때문에 사용할 수 있는 친어의 수가 제한적일 수밖에 없다. 따라서 효율적인 교배 지침을 마련하기 위해서는 우선 친어의 유전자형을 파악할 수 있는 검증된 분자마커의 확보가 필요하다.

Microsatellite 마커는 2~4 bp 크기의 염기서열이 반복되는 부분으로서, 진핵생물 유전체에 전체적으로 존재한다 (Liu and Cordes, 2004; Liu, 2011). 특히 개체 간 차이를 나타낼 수 있을 만큼의 높은 다형성을 표현할 수 있으며, Hardy-Weinberg 평형 가설을 기초하기 때문에 집단유전학적 연구에 널리 활용되고 있다 (Tautz, 1989; Jarne and Lagoda, 1996). 따라서 microsatellite 마커는 멸종위기종을 대상으로 유전 다양성 유지를 위한 포획 사육 (captive breeding) 프로그램을 개발하기 위해 다양하게 이용되고 있으며 (Schwartz *et al.*, 2007), 또한 연어과 어류 (Koljonen *et al.*, 2002; Beacham *et al.*, 2004), 넙치 (Sekino *et al.*, 2003), 참돔 (Perez-Enriquez *et al.*, 1999), 전복 (Evans *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004), 굴 (Boudry *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006) 등의 유전적 관리에 적극 활용되고 있다. 대왕바리 역시 종 보전과 집단유전학적 분석을 위해서 microsatellite 마커가 개발되어 있다 (Zeng *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011). 대만에서는 대왕바리의 근친교배를 방지하고자 microsatellite 마커를 활용한 가계 분석 시스템을 개발한 바 있지만 (Kou *et al.*, 2014), 대왕바리뿐만 아니라 다른 바리와 어류의 microsatellite 마커를 이용하였다. 다른 종의 microsatellite 마커를 이용할 시 유전적 거리가 멀어 null allele 발생 가능성이 높으며, 이로 인해 가계도 분석에 오류가 생길 수 있다 (Wan *et al.*, 2004).

따라서 본 연구는 대왕바리 친어의 효율적인 관리 시스템 구축을 위한 기반 마련의 일환으로 기 개발되어 있는 동종의 microsatellite 마커를 이용하여 현재 확보되어 있는 대왕바리 친어를 대상으로 가계도 분석 효율을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 친어 확보

본 연구에 이용한 대왕바리 (*Epinephelus lanceolatus*)는 말



Fig. 1. Giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) samples collected from Tawau region, Sabah, Malaysia.

레이시아 사바주 타와우 (Tawau) 인근에서 포획하여 3.0 × 6.0 × 3.0 m 가두리에서 사육한 개체로서 전장 95.9 ± 9.06 cm, 체장 83.5 ± 7.98 cm, 체중 20.3 ± 6.28 kg의 32마리를 이용하였다 (Fig. 1). 이용한 개체는 등 근육에 RFID microchip을 삽입하여 태깅을 수행하였다.

2. Genomic DNA 분리

Genomic DNA의 추출을 위해 가슴지느러미를 약 1 cm² 내외로 절단하여 99.9% ethanol에 담아 실험실로 운반하여 이용하였다. 운반한 지느러미는 멸균 3차 증류수로 세척하고, TNEs-urea buffer와 100 mg/mL 농도의 proteinase K (Sigma, USA)가 혼합된 용액에 담아 55°C에서 12시간 동안 반응하였다. 이 반응액에 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 처리하여 단백질을 제거하였으며, 2-propanol로 침전하였다. 침전된 pellet은 70% ethanol로 세척하고 멸균 3차 증류수로 용해하였다. 추출한 genomic DNA는 Nano-Drop ND-1000 (Thermo Scientific Inc., Germany)을 이용하여 양을 측정하고, 0.8% 아가로즈 겔에 전기영동 후 질을 확인하여 실험에 이용하였다.

3. Microsatellite 마커 PCR 및 genotyping

본 연구에 이용한 microsatellite 마커는 이전의 연구들에서 개발된 마커들을 대상으로 하였으며 (Zeng *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011), PCR 증폭이 원활하고, genotyping이 용이한 8개를 최종 이용하였다 (Table 1). PCR 반응은 20 μL 용적의 AccuPower[®] PCR Premix Kit (Bioneer Inc., Korea)에 genomic DNA 20 ng과 마커별 프라이머 각각 5 μM을 넣은 후,

Table 1. Primers used for characterization of microsatellite loci in giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*

Loci	Accession number	Repeat motif	Primer sequences (5'→3')	Allele size range	Reference
ELMS007	EF607130	(AG) _n ... (AGC) _n ... (CA) _n ... (CAG) _n ... (AG) _n (CA) _n	F: TTTGCCTTTCTAGACTTAT R: CATCACATGATTCTTTCTAT	337~339	Zeng <i>et al.</i> , 2008
ELMS009	EF607131	(AG) _n (CA) _n	F: TTCCACAGCAATTAGCAGCA R: TTTCTTCCCACAGTCCAAAG	249~267	
ELMS019	EF607138	(TC) _n ... (TCC) _n ... (TC) _n ... (TG) _n ... (AC) _n	F: TCAGCAAGCACTTTTTGGAC R: TGCTTCCTTCAGTGCATCAG	373~381	
An2	JN185623	(TG) _n AG (TG) _n	F: TGCCCTCCGACAATAATA R: AACGGGACTTGTGGTTTTTG	218~242	Yang <i>et al.</i> , 2011
An4	JN185625	(CA) _n	F: GATGCACACAAGCACAAACA R: GCAGGCTTATCCAAAACAGC	180~200	
An8	JN185629	(CA) _n	F: ACCATGCATAAATGCCCACT R: GCTCTCTGTCTCGCAAGGAT	134~164	
An25	JN185646	(TG) _n ... (GT) _n	F: TCTGTGCTGATGCCGACTAC R: CCGTGTGTCACACTCTCTG	147~183	
An31	JN185652	(GT) _n	F: TCATGTGTGCAAACGCTGTA R: CAACATGGCCGAAACCTAAT	174~194	

94°C에서 10분간 초기 열변성 반응을 시킨 후, 94°C 30초, 각 마커별 annealing 온도(ELM : 55°C, An : 60°C) 30초, 72°C 30초의 순환 반응을 35회 실시하였으며, 최종 신장반응은 72°C 15분간 수행하였다. 증폭된 산물은 1.5% 아가로스 젤 상에서 전기영동으로 확인하였으며, 각 마커 밴드는 genotyping에 적절한 농도로 희석하였다. 희석한 PCR 산물과 Genescan™ 400HD (ROX) size standard, HiDi mixture를 섞고 95°C에서 5분간 변성시킨 후 ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA)를 이용하여 명시된 매뉴얼에 따라 genotyping을 수행하였다.

4. 데이터 분석

대립유전자의 정확한 크기는 모두 Peak Scanner™ software (ver. 1.0; Applied Biosystems, USA)으로 분석하였다. 대립유전자의 크기가 결정된 데이터는 MICRO-CHECKER 프로그램 (ver. 2.2.3; Van Oosterhout *et al.*, 2004)를 이용하여 null allele 유무, large allele dropout, scoring errors 유무에 대한 검사를 실시하였다. Genepop 프로그램 (ver. 4.0; Raymond and Rousset, 1995)을 이용하여 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 이탈에 대한 분석을 수행하였다. 유효집단 크기 추정치는 LDNe 프로그램 (ver. 1.31; Waples and DO, 2008)을 이용하였다. 대립유전자 수, 기대치 이형접합률 (expected heterozygosity, H_E), 관찰치 이형접합률 (observed heterozygosity, H_O) 및 부권 부정률 (non-exclusion probability)은 Cervus 프로그램 (ver. 3.0; Marshall *et al.*, 1998)을 이용하였다. 부권 부정률은 부모에 대한 정보가 전혀 없는 경우 (NE-1P), 한쪽 부모에 대한 정보만 있는 경우 (NE-2P), 양친과 자손을 모두 알고 있는 경우 (NE-PP)를 산출하였다. 추정된 F-통계

량을 이용하여 무작위, 반형매 그리고 전형매 교배집단으로 가정하여 유전자형의 동일한 개체 출현 확률은 API-CALC 프로그램 (ver. 1.0; Ayres and Overall, 2004)을 이용하여 산출하였다. 또한 확보한 대왕바리 친어 개체 간 유전형 중복 여부를 확인하고자 유전적 거리를 기반으로 주좌표 분석 (principal coordinates analysis; PCoA)을 수행하였으며, 이는 GenAlEx 프로그램 (ver. 6.0; Peakall and Smouse, 2006)을 이용하였다.

결과 및 고찰

대왕바리 (*Epinephelus lanceolatus*) 32마리를 대상으로 8개의 microsatellite 마커를 이용하여 확보된 유전자형을 MICRO-CHECKER 프로그램으로 분석한 결과 null allele, large allele dropout, scoring errors는 나타나지 않았다. 각 마커에서 산출된 대립유전자 수, 기대치 이형접합률 (expected heterozygosity, H_E), 관찰치 이형접합률 (observed heterozygosity, H_O), 다형정보지수 (polymorphic information content, PIC) 및 Hardy-Weinberg equilibrium 통계치 및 근친교배계수 (inbreeding coefficient, F_{IS})는 Table 2에 제시하였다. 총 52개의 대립유전자가 검출되었으며, 평균 대립유전자수는 6.5개로 마커에 따라 2~10개로 나타났다. 평균 기대치 이형접합률은 0.663으로 0.396~0.840, 평균 관찰치 이형접합률은 0.657로 0.469~0.844로 확인되었다. 대왕바리의 유전 다양성은 해산 어류 평균인 0.79에 비해 다소 낮았으나 (DeWoody and Avise, 2000), 8종의 *Epinephelus* 속의 어류에서 확인된 0.36~0.62의 기대치 이형접합률에 비해 다소 높은 유전 다양성 지수를 보였으며 (Koedprang *et al.*, 2007), 근친

교배계수는 0.011로 낮고 유의하지 않았다. 따라서 현재 확보된 대왕바리 친어는 유전 다양성을 비교적 잘 유지하고 있는 것으로 조사되었다. 하지만 대왕바리 친어 집단의 유효집단 크기 (effective population size)는 35로 추정됨으로써 자손 집단의 유전 다양성 감소에 영향을 미칠 수 있다 (Frankham *et al.*, 2004; Palstra and Ruzzante, 2008). 유효 집단 크기가 50 이하일 경우 근친교배에 따른 심각한 악영향이 있을 수 있어 (Franklin, 1980), 자손 집단의 유전 다양성을 유지하고 근친교배를 방지하기 위해서는 지속적인 수집을 통한 친어 개체수의 확대가 필요하다. 그리고 현재 제한된 친어의 유효 집단 크기를 고려할 때 유전 다양성을 유지하기 위해서는 무작위 교배보다는 유전적 거리가 먼 암수 친어 간 선택적인 1:1 교배를 여러 차례 수행하는 것이 바람직할 것이다.

Microsatellite 마커의 다형성은 기본적으로 유전자 조합의

Table 2. Descriptive statistics summary of eight microsatellite loci for giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*

Loci	N _A	H _E	H _O	PIC	P _{HWE}	F _{IS}
ELMS007	2	0.396	0.469	0.314	0.392	-0.186
ELMS009	8	0.772	0.688	0.725	0.498	0.111
ELMS019	4	0.650	0.688	0.566	0.950	-0.059
An2	7	0.641	0.594	0.596	0.470	0.075
An4	6	0.681	0.594	0.626	0.162	0.129
An8	7	0.621	0.656	0.585	0.716	-0.058
An25	10	0.840	0.844	0.805	0.548	-0.005
An31	8	0.706	0.719	0.665	0.514	-0.058
Overall	6.5	0.663	0.657	0.610	0.765	0.011

N_A, number of allele; H_E, expected heterozygosity; H_O, observed heterozygosity; PIC, polymorphic information content; P_{HWE}, significance of the probability test for deviation from expected Hardy-Weinberg proportions; F_{IS}, inbreeding coefficient

반복수에 의해 결정되며, 이것은 부모로부터 반반씩 물려받는 멘델 유전법칙을 기반으로 하기 때문에 친자감별, 가계도 분석 등의 연구에 큰 장점을 가지고 있다 (McConnell *et al.*, 1995; Sunnucks, 2000). 많은 바리과 어류는 암컷에서 수컷으로 성 전환하는 자성선속형 (protogynous) 생식 특성을 보유하고 있다 (Bean *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2013). 이로 인해 일반적으로 한쪽 부모로부터 전달받는 미토콘드리아 DNA 영역의 염기서열을 분자마커로 이용할 시 오류를 범할 수 있다 (Kuo *et al.*, 2014). 따라서 microsatellite 마커를 이용한 데이터베이스 구축은 친어의 체계적인 관리 측면에서 큰 장점을 가지고 있다고 할 수 있다. 본 연구에 이용한 8개의 microsatellite 마커 중 7개가 0.500 이상의 다형정보지수가 나타남은 물론 모든 마커가 Hardy-Weinberg equilibrium을 위배하지 않는 것으로 확인됨에 따라 친자확인, 가계도 분석 등을 수행할 시 비교적 높은 식별력과 낮은 오류 확률을 가질 것으로 예상된다.

8개의 microsatellite 마커를 사용할 경우 동일한 유전자형 출현확률과 부권 부정률 (non-exclusion probability)에 대한 정보는 Table 3에 정리하였다. 본 마커 세트를 이용할 시 동

Table 3. Paternity identity and combined non-exclusion probabilities based on eight microsatellite loci

Paternity identity probabilities			Combined non-exclusion probabilities		
PI	PI _{half-sibs}	PI _{sibs}	NE-1P	NE-2P	NE-PP
6.59×10^{-11}	2.74×10^{-8}	1.53×10^{-4}	0.07198	0.00835	0.00027

PI, probability of identity; PI_{half-sibs}, probability of identity from half sibs; PI_{sibs}, probability of identity from sibs; NE-1P, average non-exclusion probability for one candidate parent; NE-2P, average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex; NE-PP, average non-exclusion probability for a candidate parent pair

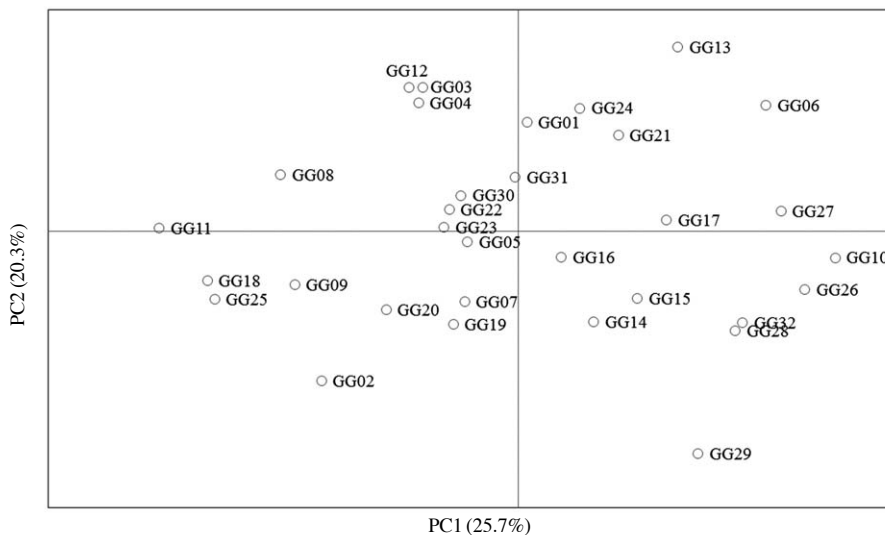


Fig. 2. Principal coordinate analysis (PCoA) of 32 individuals giant grouper, *Epinephelus lanceolatus* based on Nei's genetic distances.

일한 유전자형 출현 확률은 무작위 교배집단(PI)에서는 6.59×10^{-11} , 반형매 교배집단(PI_{sibs})은 2.74×10^{-8} 로 추정되었고, 전형매 교배집단(PI)에서는 1.53×10^{-4} 로 추정되었다. 부권 부정률은 부모에 대한 정보가 전혀 없는 경우(NE-1P)에 0.07198로 다소 높았으나, 한쪽 부모의 유전자형 확보(NE-2P) 또는 양친의 유전자형이 확보된 상황(NE-PP)에서 교배에 활용할 시 부권 부정률은 각각 0.00835, 0.00027로 나타났다. 대만의 대왕바리 친어 관리를 위한 microsatellite 마커 세트의 경우 한쪽 부모의 유전자형이 확보된 상황(NE-1P)에서의 부권 부정률이 0.00090으로서(Kuo *et al.*, 2014), 본 연구와 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 개체 간 유전자형 중복을 판단하기 위해 수행한 주좌표 분석(principal coordinates analysis) 결과 확보한 32마리의 유전자형은 중복되지 않았다(Fig. 2). 이 결과는 본 연구에 이용한 microsatellite 마커 조합으로도 개체 식별력이 높음을 의미하며, 친어의 유전자형 데이터베이스를 작성하여 관리할 시 반형매 및 무작위 교배집단의 경우 동일한 유전자형이 출현할 확률이 낮고, 한쪽 부모의 유전자형 또는 양친의 유전자형이 확보된 상황에서 교배에 활용할 시 친자감별 확률이 높을 것으로 기대된다.

따라서 현재까지 추정된 판별효율로 미루어 볼 때 본 연구에 이용한 8개의 microsatellite 마커로도 유전자형 데이터베이스를 기반으로 한 대왕바리 친어 관리 시스템 구축이 가능할 것으로 판단된다. 또한 이러한 대왕바리 친어 관리 시스템은 유전 다양성이 높은 자손 생산을 가능하게 할 뿐만 아니라 유전적으로 유사한 개체의 중복 확보를 방지할 수 있어 친어 확보의 효율성을 높일 수 있을 것이다.

요 약

현재 IUCN의 취약 등급인 대왕바리(giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*) 친어의 효율적인 관리 시스템 구축을 위한 기반연구로서 기 개발되어 있는 동종의 microsatellite 마커를 이용한 가계도 분석 효율을 조사하였다. 대왕바리 친어 32마리를 8개의 microsatellite 마커로 분석한 결과 총 52개의 대립유전자가 검출되었으며, 기대치 이형접합율은 0.663, 근친교배계수는 0.011로 조사되어 현재 확보된 대왕바리 친어는 유전 다양성이 비교적 잘 유지되고 있었다. 하지만 유효집단 크기가 35로 추정됨으로써 지속적인 친어 확보의 필요성을 보였다. 해당 마커를 이용한 동일 유전자형 출현 확률은 무작위 집단에서 6.85×10^{-11} 그리고 한쪽 부모의 유전자형 확보 및 양친의 유전자형이 확보된 상태에서의 부권 부정률은 각각 0.00835, 0.00027로 나타났으며, 주좌표 분석 결과 친어의 유전자형은 중복되지 않았다. 따라서 본 연구에 이용한 8개의 microsatellite 마커로도 유전자형 데이

터베이스를 기반으로 한 대왕바리 친어 관리 시스템 구축이 가능할 것이며, 이를 활용한 유전 다양성이 높은 자손 생산 및 유전적으로 유사한 개체의 중복 확보를 방지할 수 있어 친어 확보의 효율성을 높일 수 있을 것이다.

사 사

본 논문은 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청 'Golden Seed 프로젝트 사업(213004-04-2-SB510)' 지원에 의해 수행되었습니다.

인 용 문 헌

- Allendorf, F.W., G. Luikart and S.N. Aitken. 2013. Conservation and the Genetics of Populations. Wiley-Blackwell, Oxford, U.K.
- Ayres, K.L. and A.D.J. Overall. 2004. API-CALC 1.0: a computer program for calculating the average probability of identity allowing for substructure, inbreeding and the presence of close relatives. Mol. Ecol. Notes, 4: 315-318.
- Beacham, T.D., M. Lapointe, J.R. Candy, K.M. Miller and R.E. Withler. 2004. DNA in action: rapid application of DNA variation to sockeye salmon fisheries management. Conserv. Gen., 5: 411-416.
- Bean, K., B.D. Mapstone, C.R. Davies, C.D. Murchie and A.J. Williams. 2003. Gonad development and evidence of protogyny in the red-throat emperor on the Great Barrier Reef. J. Fish Biol., 62: 299-310.
- Boudry, P., B. Collet, F. Cornette, V. Hervouet and F. Bonhomme. 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. Aquacult., 204: 283-296.
- DeWoody, J.A. and J.C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. J. Fish Biol., 56: 461-473.
- Evans, B., J. Bartlett, N. Sweijid, P. Cook and N.G. Elliott. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). Aquacult., 233: 109-127.
- Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Franklin, I.R. 1980. Evolutionary change in small populations. In: Soule, M.E. and B.A. Wilcox (eds.), Conservation Biology: An Evolutionary Ecological Perspective. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Froese, R. and D. Pauly. (eds.). 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org (version 02/2014).

- 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 p.
- Jarne, P. and P.J.G. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol. Evol., 11: 424-429.
- Koedprang, W., U. Na-Nakorn, M. Nakajima and N. Taniguchi. 2007. Evaluation of genetic diversity of eight grouper species *Epinephelus* spp. based on microsatellite variations. Fish. Sci., 73: 227-236.
- Koljonen, M.L., J. Tähtinen, M. Säisä and J. Koskiniemi. 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. Aquacult., 212: 69-92.
- Kuo, H.C., H.H. Hsu, C.S. Chua, T.Y. Wang, Y.M. Chen and T.Y. Chen. 2014. Development of pedigree classification using microsatellite and mitochondrial markers for giant grouper broodstock (*Epinephelus lanceolatus*) management in Taiwan. Mar. Drugs, 12: 2397-2407.
- Li, Q., C. Park, T. Endo and A. Kijima. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). Aquacult., 235: 207-222.
- Li, Q., H. Yu and R. Yu. 2006. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. Aquacult., 259: 95-102.
- Liu, Z. 2011. Genomic variations and marker technologies for genome-based selection. In: Liu, Z. (ed.), Next Generation Sequencing and Whole Genome Selection in Aquaculture. Wiley-Blackwell, Oxford, U.K.
- Liu, Z.J. and J.F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquacult., 238: 1-37.
- Marshall, T.C., J. Slate, L.E.B. Kruuk and J.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Mol. Ecol., 7: 639-655.
- McConnell, S., L. Hamilton, D. Morris, D. Cook, D. Paquet, P. Bentzen and J. Wright. 1995. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. Aquacult., 137: 19-30.
- Myoung, J.-G., C.-B. Kang, J.M. Yoo, E.K. Lee, S. Kim, C.-H. Jeong and B.-I. Kim. 2013. First record of the giant grouper *Epinephelus lanceolatus* (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae) from Jeju island, South Korea. Fish. Aquat. Sci., 16: 49-52.
- Nelson, J.S. 2006. Fishes of the World. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc., 601pp.
- Oh, S.R., H.C. Kang, C.H. Lee, S.W. Hur and Y.D. Lee. 2013. Sex reversal and masculinization according to growth in long-tooth grouper *Epinephelus bruneus*. Dev. Reprod., 17: 79-85. (in Korean)
- Palstra, F.P. and D.E. Ruzzante. 2008. Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? Mol. Ecol., 17: 3428-3447.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. Genealex 6: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes, 6: 288-295.
- Perez-Enriquez, R., M. Takagi and N. Taniguchi. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. Aquacult., 173: 413-423.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Hered., 86: 248-249.
- Rudnick, J.A. and R.C. Lacy. 2008. The impact of assumptions about founder relationships on the effectiveness of captive breeding strategies. Conserv. Gen., 9: 1439-1450.
- Schwartz, M.K., G. Luikart and R.S. Waples. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends Ecol. Evol., 22: 25-33.
- Sekino, M., K. Saitoh, T. Yamada, A. Kumagai, M. Hara and Y. Yamashita. 2003. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. Aquacult., 221: 255-263.
- Shuk Man, C. and N.W. Chuen (Grouper & Wrasse Specialist Group). 2006. *Epinephelus lanceolatus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 27 March 2015.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. Trends Ecol. Evol., 15: 199-203.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucl. Acids Res., 17: 6463-6471.
- Van Oosterhout, C., W. Hutchinson, D. Willds and P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol. Notes, 4: 535-538.
- Wan, Q.-H., H. Wu, T. Fujihara and S.-G. Fang. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue? Electrophor., 25: 2165-2176.
- Waples, R.S. and C. Do. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. Mol. Ecol., 8: 753-759.
- Yang, S., L. Wang, Y. Zhang, X.C. Liu, H.R. Lin and Z.N. Meng. 2011. Development and characterization of 32 microsatellite loci in the giant grouper *Epinephelus lanceolatus* (Serranidae). Genet. Mol. Res., 10: 4006-4011.
- Zeng, H.S., S.X. Ding, J. Wang and Y.Q. Su. 2008. Characterization of eight polymorphic microsatellite loci for the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus* Bloch). Mol. Ecol. Resour., 8: 805-807.