

수입산 바리과(Family Serranidae) 잡종 어류(*Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)의 분자생물학적 판별

김용휘 · 박종연 · 김재훈¹ · 방인철*

순천향대학교 생명시스템학과, ¹국립수산과학원 제주수산연구소

Molecular Biological Species Identification of Imported Groupers (*Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)

Yong Hwi Kim, Jong Yeon Park, Jae Hoon Kim and In-Chul Bang*

Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

Jeju Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Jeju 63610, Korea

To classify a presumed hybrid of imported grouper species acquired from the National Fishery Products Quality Management Service, maternal and paternal lines were identified based on partial sequencing of mitochondrial cytochrome c oxidase 1 (*co1*) and nuclear recombination activation gene 1 (*rag1*) genes. The matrilineal species was identified as *Epinephelus moara* by a partial (760 bp) *co1* sequence. Ambiguous sequences with base pairs belonging to *E. moara* or *E. lanceolatus* were found in a total of 15 different base pairs in the partial 1,159 bp of the *rag1* gene, and the patrilineal species was found to be *E. lanceolatus*. Therefore, all of the groupers examined in the study were identified to be hybrids of *E. moara* and *E. lanceolatus*. In addition, a fast and convenient method using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) was established for hybrid discrimination. Hybrids between *E. moara* ♀ and *E. lanceolatus* ♂ were identified through specific bands of 387 bp and 433 bp in PRIMER 6.

Keywords: *Epinephelus*, *co1*, *rag1*, RAPD, Hybrid grouper

서론

바리과(family Serranidae) 어류는 전 세계에 5아과 73속 522종이 분포하고 있다(Eschmeyer et al., 2010; Myoung et al., 2013). 주요 분포지역은 인도-태평양 지역의 암초 및 산호초 지대로 알려져 있으며(Kim et al., 2014, Tahir et al., 2018), 그동안 우리나라 해역에서는 12종의 우레기속(Genus *Epinephelus*) 어류가 분포하고 있는 것으로 기록되어 있으나(Kim et al., 2005), 최근 제주도 연안 및 마라도 부근에서 대문바리(*E. areolatus*), 대왕바리(*E. lanceolatus*), 마라바리(*E. radiatus*) 등이 추가로 확인되어 현재까지 약 15종이 분포하고 있는 것으로 기록되어 있다(Kim and Song, 2010; Myoung et al., 2013; Han et al., 2014). 또한, 바리과 어류의 전 세계 양식생산량은 최근 2017년을 기준으로 183,989톤을 기록하고 있으며, 이 수치는 2010년

의 양식생산량 79,692톤과 비교하면 230%의 매우 가파른 증가량을 기록하였다(FAO, 2017). 특히, 바리과 어류 중에서도 참바리속 어종들은 먹거리로써의 중요성뿐만 아니라 관상용으로도 각광을 받고 있어, 수산자원의 주요 구성 요소로 인식되고 있으며, 자바리(*E. moara*)를 비롯하여 붉바리(*E. akaara*), 대왕바리(*E. lanceolatus*), 갈색점바리(*E. fuscoguttatus*), 갈색둥근바리(*E. coioides*), 흥기흑점바리(*E. malabaricus*), 미끈다금바리(*E. tauvina*), 내소바리(*E. striatus*) 등이 인공증식에 선전하고 있다(Govindaraju and Jayasankar, 2004; Tian et al., 2017).

바리과 어류들은 양식 대상종으로서 빠른 성장속도, 광범위한 서식수온, 질병 내성 등의 이점을 얻기 위하여 자바리와 대왕바리간의 잡종(*E. moara* × *E. lanceolatus*), 갈색점바리와 대왕바리간의 잡종(*E. fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*), 붉바리와 대왕바리간의 잡종(*E. akaara* × *E. lanceolatus*), 갈색둥근바리와 대

*Corresponding author: Tel: +82. 41. 530. 1286 Fax: +82. 41. 530. 1493

E-mail address: incbang@sch.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0566>

Korean J Fish Aquat Sci 53(4), 566-571, August 2020

Received 24 June 2020; Revised 10 August 2020; Accepted 12 August 2020

저자 직위: 김용휘(연구원), 박종연(선임연구원), 김재훈(박사후 인턴 연구원), 방인철(교수)

왕바리과의 잡종(*E. coioides* × *E. lanceolatus*) 등 여러 잡종을 생산하여 양식업에 이용하고 있다(Kiriyakit et al., 2011; Kim et al., 2014; Lim et al., 2016; Tang, 2018; Kim et al., 2020). 특히, 바리과 어류들의 잡종은 현장에서 형태분석으로 정확한 종 동정이 어려운 한계점을 내포하고 있어, 미토콘드리아 DNA 및 핵 DNA의 유전자 분석과 RAPD (random amplification of polymorphic DNA) PCR band 분석 등을 이용한 분자생물학적 종 동정 및 잡종 판별 연구들이 선행되고 있으나, 관련 연구는 소수에 불과하다(Wang et al., 2007; Kim et al., 2014; Choi, 2019). 특히 RAPD 분석 방법은 단편으로 된 임의의 염기서열을 한 가닥의 짧은 oligonucleotide primer를 통해 속 및 종간 유전적 변이를 탐색하는 기술로써, 염기서열 정보 없이 적은 양의 template DNA로 쉽고 편리한 유전학적 분석이 가능한 이점을 가지고 있어, 분자생물학적 종 동정 분석에 지속적으로 이용되고 있다(Pyo and Choi, 1996; Song and Bang, 2009; Bang et al., 2013).

본 연구에서는 국립수산물품질관리원의 수입 수산물 검역 당시에 자바리로 수입된 개체들의 체색이 선명하지 않고 눈에 띄게 흐린 점이 교잡종으로 의심되어, 정확한 종 동정을 위하여 해당 수입산 바리과 어류 3개체의 꼬리지느러미 조직을 통해 DNA를 추출하고, 미토콘드리아 DNA의 *co1* 및 핵 DNA의 *rag1* 유전자의 일부 염기서열들을 활용하여 모계 및 부계 판별 분석을 수행하였으며, 추가적으로 RAPD를 이용한 PCR band 분석 방법을 이용하여 실제 수산물 유통 및 검역 현장에서 신속하고 간편하게 쓰일 수 있는 잡종 판별 방법을 구축하고자 하였다.

재료 및 방법

Genomic DNA 추출, PCR 및 Sequencing

국립수산물품질관리원으로부터 2019년 6월에 인수한 수입산 바리과 어류 3개체(*E. moara* × *E. lanceolatus*)의 꼬리지느러미 일부를 절단하여 99.5% 에틸알코올에 고정 후 실험에 이용하였으며, 부계 추정을 위한 핵 DNA의 recombination activating protein gene 1 (*rag1*, 1,159 bp) 영역의 chromatogram을 통한 double peaks 비교를 위하여 순천향대학교 어류표본수장고에 보관 되어있는 자바리(SUC19347; NIFS, Jeju, Korea)와 대왕바리(SUC19348; Pingtung, Taiwan) 각각 1개체의 뒷지느러미 일부를 절단하여 실험에 이용하였다. Genomic DNA (gDNA)는 HiGene™ Genomic DNA Prep Kit (Biofact, Daejeon, Korea)를 이용하여 추출하였다. PCR 증폭을 위하여 미토콘드리아 DNA의 cytochrome c oxidase 1 (*co1*, 760 bp) 영역에 대한 primer는 COX_2F 및 COX_4R (Kim et al., 2014)를 이용하였으며, 핵 DNA의 *rag1* 영역에 대한 primer는 1495f3 및 3067r (Kim and Bang, 2010)을 이용하였다. PCR 반응 조건은 총 20 μL 용적의 AccuPower PCR Premix Kit (Bioneer, Daejeon,

Korea)에 gDNA 100 ng과 *co1* 및 *rag1*의 영역을 증폭할 수 있는 primer를 각각 10 pmole을 첨가하였으며, 94°C에서 30초의 초기 변성 반응을 유도한 후, 52°C (*co1*) 또는 58°C (*rag1*)에서 30초, 72°C에서 30초의 순환 반응을 35회 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 7분간 신장 반응을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 specific band 유무를 확인하였다. 이후, *co1* 및 *rag1* 영역의 PCR 증폭산물은 MG PCR Purification kit (Cancer Rop Co., Ltd, Seoul, Korea)로 정제된 후, 동일한 primer를 이용하여 염기서열분석기 ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 통해 direct sequencing 방법으로 염기서열을 결정하였다.

rag1 및 *co1* 유전자의 염기서열 분석

확보된 염기서열 데이터는 Sequencher ver. 5.4.6를 이용하여 trimming을 실시한 후, BioEdit ver. 7.0.9 (Hall, 1999)의 clustalW (Thompson et al., 1994)를 이용하여 다중염기서열정리 (multiple alignment)를 수행하였다. 완성된 *rag1* 및 *co1* 유전자의 염기서열 정보는 NCBI (national center for biotechnology information) GenBank에 등록된 후 사용하였다. *rag1* 유전자의 chromatogram을 통해 double peaks를 비교 분석하기 위하여 수입산 바리과 어류 3개체(MT584976-584978), 자바리 1개체(MT597423), 대왕바리 1개체(MT597422)를 직접 sequencing하여 사용하였다. *co1* 유전자의 분자계통도는 본 연구에서 직접 얻은 수입산 바리과 어류 3개체(SUC13944-13945; MT584973-584975)의 염기서열을 비롯하여, NCBI GenBank에 등록된 자바리 1개체(NC_017891.1, KP009977.1), 대왕바리 3개체(NC_011715.1, KJ451389.1, KM386619.1, HQ660062.1), 갈색점바리 1개체(MK791189.1), 불바리 1개체(NC_011113.1)의 염기서열을 이용하였으며, 외집단으로 돌돔 1개체(*Oplegnathus fasciatus*; NC_010968.1)의 염기서열을 함께 비교하였다. 확보된 *co1* 유전자의 염기서열들은 MEGA X (Kumar et al., 2018)의 Kimura 2-parameter (Kimura, 1980)로 계산하여 1000번의 bootstrap을 통해 유전적 거리(genetic distance)와 neighbor-joining (NJ) tree를 작성하였다.

RAPD를 이용한 PCR band 분석

RAPD PCR band 분석은 Choi (2019)의 바리과 어류 잡종 동정 방법에 따라, SRILS UniPrimer™ Kit I (SEOULIN SCIENTIFIC Co., Ltd, Seongnam, Korea)을 이용하였으며, 최종적으로 specific band가 감지된 PRIMER 6을 선택하여 실험에 이용하였다. PCR 반응 조건은 총 20 μL 용적의 AccuPower PCR Premix Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 gDNA 100 ng과 PRIMER 6을 10 pmol 첨가하고, 94°C에서 3분간 초기 변성 반응을 유도한 후, 94°C, 55°C, 72°C에서 각각 1분간 35회 순환 반응을 실시하였으며, 72°C에서 7분간 신장 반응을 수행하였다. 이후, 증폭된 산물은 Fragment analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)에서 전기영동하고, PRO-

size 3.0.1.6 software (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany)를 이용하여 specific band를 분석하였다.

결과 및 고찰

모계 추정을 위한 미토콘드리아 DNA의 *coI* 유전자 염기서열은 총 760 bp를 확보하였으며, 수입산 바리과 어류, 자바리, 대왕바리 사이에서 총 76 bp의 variation position을 나타내었다(Table 1). 이에 따라, 수입산 바리과 어류 3개체는 *coI* 유전

자에서 자바리와 유전적 거리(genetic distance)가 0.0026으로 나타나 유전자 흐름(gene flow)이 거의 나타나지 않았으며, 대왕바리와는 0.1101로 나타나 유전적 거리가 비교적 먼 것으로 나타났다. 따라서 분자계통도에서 수입산 바리과 어류 3개체는 순종 자바리와 동일한 단계통군을 형성하였고 갈색점바리와 자매군을 형성하였다. 반면에, 대왕바리와는 각각 독립적인 단계통군을 형성하였다(Fig. 1a). 따라서 수입산 바리과 어류 3개체의 모계는 모두 자바리로 판명되었으며, 이들은 모계 유전을 하는 미토콘드리아의 특성을 잘 반영하는 것으로 나타났다

Table 1. The variation position on the sequence of Cytochrome c oxidase 1 (*coI*) from mitochondrial DNA for a hybrid between *Epinephelus moara* ♀ and *E. lanceolatus* ♂ and them

Species	Variation position (bp)									
	36	48	49	75	78	81	99	102	103	114
<i>E. moara</i>	C	C	A	A	C	T	C	C	C	A
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. lanceolatus</i>	T	T	G	G	T	G	T	T	T	G
	120	129	141	147	150	159	183	219	222	225
<i>E. moara</i>	G	A	A	C	C	C	C	T	G	T
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. lanceolatus</i>	A	G	G	T	T	T	T	C	A	C
	240	246	270	279	288	297	300	303	315	321
<i>E. moara</i>	C	T	A	A	A	T	A	C	T	A
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. lanceolatus</i>	T	C	T	G	G	C	G	T	C	T
	333	345	351	366	369	390	394	399	405	426
<i>E. moara</i>	C	T	G	C	T	G	T	C	C	C
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-
<i>E. lanceolatus</i>	T	C	A	T	C	A	C	C	T	T
	438	448	453	456	462	465	474	513	516	549
<i>E. moara</i>	C	T	T	A	A	C	T	G	A	A
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-
<i>E. lanceolatus</i>	T	C	C	G	G	T	C	A	A	G
	552	555	558	561	564	565	582	585	594	597
<i>E. moara</i>	T	G	A	G	C	T	T	G	T	T
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. lanceolatus</i>	C	A	G	T	A	C	A	A	C	C
	603	618	621	627	633	651	654	660	663	666
<i>E. moara</i>	T	T	A	A	A	C	T	C	C	T
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. lanceolatus</i>	C	C	T	G	T	T	C	T	T	A
	681	684	696	702	726	736				
<i>E. moara</i>	C	G	A	A	A	T				
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	-	-	-	-	-	-				
<i>E. lanceolatus</i>	T	A	G	G	G	C				

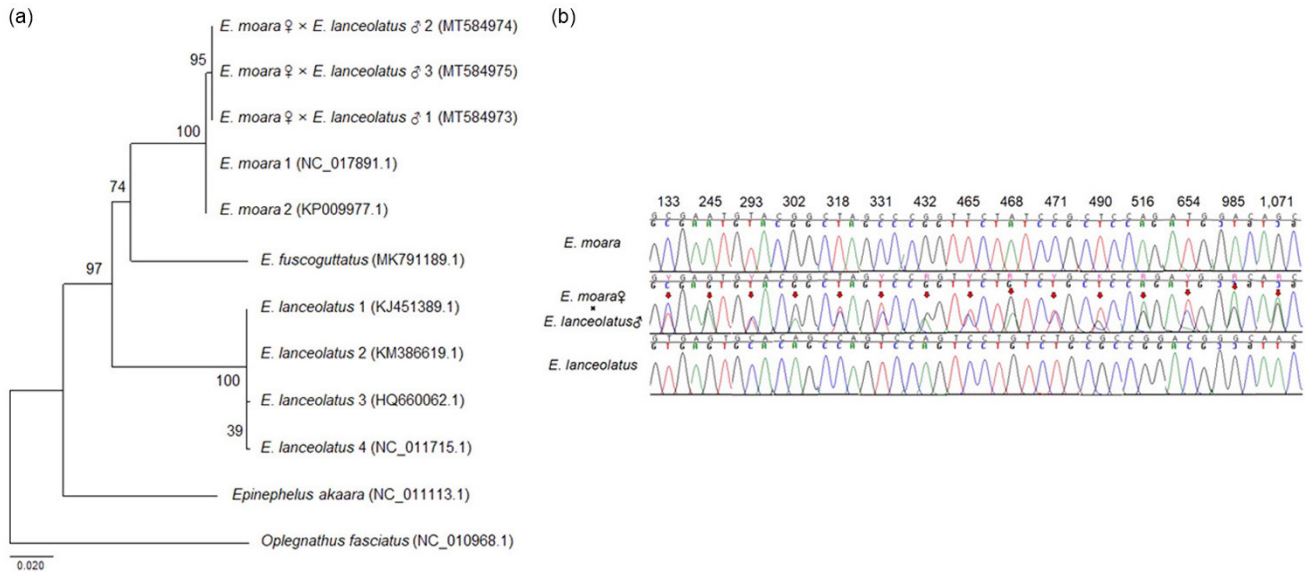


Fig. 1. Maternal and paternal estimation using mitochondrial DNA (*coI*) and nuclear DNA (*rag1*) genes. a, Neighbor-joining tree based on *coI* gene shows the genetic relationship between *E. moara* and *E. lanceolatus* and hybrid (*E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂); b, The chromatogram (*rag1* gene) shows the variation position for *E. moara* and *E. lanceolatus*, and the double peaks in hybrid (*E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂), the red arrows indicate double peaks.

(Hauswith and clayton, 1895). 또한, 부계 추정을 위한 핵 DNA의 *rag1* 유전자 염기서열은 총 1,159 bp를 확보하였으며, chromatogram 분석을 통해 자바리와 대왕바리의 *rag1* 염기서열에서 15개의 변이위치와 잡종 간의 뚜렷한 double peaks 양상을 확인하였다(Fig. 1b). 따라서 수입산 바리과 어류 3개체는 자바리와 대왕바리가 나타내는 *rag1* 유전자의 15개 변이위치에 따라, 두 종간의 염기변이를 모두 반영하는 ambiguous sequence 양상을 나타내어 이들의 부계는 대왕바리로 판명되었다(Table 2). 따라서 본 연구에서 분석된 수입산 바리과 어류 3개체는 *coI* 및 *rag2* 유전자 염기서열을 이용한 갈색점바리와 대왕바리간의 잡종 동정(Kim et al., 2014), 황지천에 서식하는 쉬리속(genus *Coreoleuciscus*) 어류 집단의 종 동정 및 잡종 판별(Song et al.,

2017), 각시붕어(*Rhodeus uyekii*)와 흰줄납줄개(*R. ocellatus*)의 교잡에 대한 연구(Park, 2018), 미토콘드리아 *coI*과 핵 *rag1* 유전자 분석에 의한 줄종개(*Cobitis tetralineata*)와 왕종개(*Iksookimia Longicorpa*)간 자연 잡종 동정(Lee et al., 2009), 묵납자루(*Acheilognathus signifer*)와 납자루(*A. lanceolatus*) 사이의 자연 잡종 출현(Kim et al., 2015) 등의 선행 연구 결과와 동일한 양상을 나타내어 자바리와 대왕바리간의 잡종 개체인 것으로 판명되었다.

추가적으로 RAPD 분석 방법을 이용하여 PCR band 수준에서 잡종 동정을 실시한 결과, 대조군으로 사용한 자바리와 대왕바리의 잡종 개체들과 수입산 바리과 어류들은 PRIMER 6을 사용하였을 경우에 약 387 bp 및 433 bp 부근에서 specific band

Table 2. The variation position on the sequence of Recombination activating gene 1 (*rag1*) gene from nuclear DNA for a hybrid between *Epinephelus moara* ♀ and *E. lanceolatus* ♂ and them

Species	Variation position ¹ (bp)									
	133	245	293	302	318	331	432	465	468	471
<i>E. moara</i>	C	A	T	G	T	C	G	T	A	C
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	Y	R	Y	R	Y	Y	R	Y	R	Y
<i>E. lanceolatus</i>	T	G	C	A	C	T	A	C	G	T
	490	516	654	985	1,071					
<i>E. moara</i>	T	A	T	A	G					
<i>E. moara</i> × <i>E. lanceolatus</i>	K	R	Y	R	R					
<i>E. lanceolatus</i>	G	G	C	G	A					

¹Ambiguous sequence: R=A/G, Y=C/T, K=G/T.

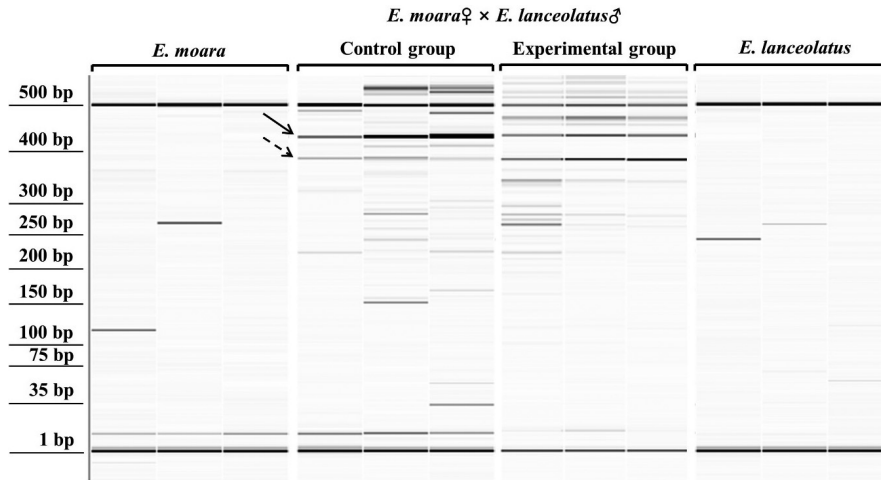


Fig. 2. RAPD PCR band analysis between *E. moara*, *E. lanceolatus* and hybrid (*E. moara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). Dot arrow (387 bp) and normal arrow (433 bp) indicate specific bands (used PRIMER 6).

가 관찰되었다(Fig. 2). 이러한 특징은 Choi (2019)의 붉바리와 대왕바리간의 잡종 분석 연구에서 약 252 bp 및 284 bp 부근에서 specific band가 관찰된 결과와 비슷한 양상을 나타내어 잡종 식별에 적합한 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서 RAPD를 이용한 PCR band 분석을 통해 자바리와 대왕바리간의 잡종 동정 조건을 확립하여 실제 수산물 유통 및 검역 현장에서 경제적으로 신속하고 간편하게 이용될 수 있을 것으로 생각되며, 이에 따라 동정 착오로 인한 산업적 및 학술적 피해를 최소화할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 해양수산부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 Golden Seed project 사업(213008-05-4-SB410) 및 해양수산과학기술진흥원의 지원(수산생물 원산지 판별기술 및 현장 단속 키트개발, 20200425-03)과 순천향대학교의 연구비 지원을 받아 수행된 연구입니다.

References

- Bang KH, Chung JW, Kim YC, Cho IH, Kim JU, Shin MR and Moon JY. 2013. Analysis of genetic polymorphism of Korean ginseng cultivars and breeding lines using RAPD markers. *J Korean Soc Int Agric* 25, 184-193. <https://doi.org/10.12719/KSIA.2013.25.2.184>.
- Choi JI. 2019. Molecular biological identification for two hybrid groupers, *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂ and *E. akaara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂. MS Thesis, Soonchunhyang University, Asan, Korea.
- Eschmeyer WN, Fricke R, Fong JD and Polack DA. 2010. *Marine fish diversity: history of knowledge and discovery* (Pisces). *Zootaxa* 2525, 19-50. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2525.1.2>.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2017. *FishStatJ, a tool for fishery statistics analysis*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, FIPS-Statistics and information. FAO, Rome, Italy.
- Govindaraju GS and Jayasankar P. 2004. Taxonomic relationship among seven species of groupers (genus *Epinephelus*; family Serranidae) as revealed by RAPD fingerprinting. *Mar Biotechnol* 6, 229-237. <https://doi.org/10.1007/s10126-003-0021-9>.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Han SH, Kim MJ and Song CB. 2014. First record of the oblique-banded grouper, *Epinephelus radiatus* (Perciformes: Serranidae) from Korea. *Korean J Ichthyol* 26, 143-146.
- Hauswirth WW and Clayton DA. 1985. Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 13, 8093-8104. <https://doi.org/10.1093/nar/13.22.8093>.
- Kim HS, Yun SW, Kim HT and Park JY. 2015. Occurrence of a Natural Hybrid between *Acheilognathus signifer* and *A. lanceolatus* (Pisces: Cyprinidae). *Korean J Ichthyol* 27, 199-204.
- Kim IS, Choi Y, Lee CL, Lee YJ, Kim BJ and Kim JH. 2005. Illustrated book of Korean fishes. Kyohak Publishing Co Ltd, Seoul, Korea, 613.
- Kim KM, Lee HJ, Yun HB, Cho JH, Kim SR, Lee KM and Kim JH. 2020. Changes of hematological parameters and plasma components in the hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) by acute ammonia exposure. *Korean J Environ Biol* 38, 40-46. <https://doi.org/10.11626/>

- KJEB.2020.38.1.040.
- Kim KS, Lee HR and Bang IC. 2014. Identification of Hybrid between the Tiger Grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and the Giant Grouper *E. lanceolatus* by Analyzing *COX I* and *RAG 2* Sequences. Korean J Ichthyol 26, 70-73.
- Kim KY and Bang IC. 2010. Molecular phylogenetic position of *Abbottina springeri* (Cypriniformes: Cyprinidae) based on nucleotide sequences of *RAG1* gene. Korean J Ichthyol 22, 273-278.
- Kim MJ and Song CB. 2010. First record of *Epinephelus areolatus* (Perciformes: Serranidae) from Korea. Korean J Fish Aquat Sci 13, 340-342. <https://doi.org/10.5657/fas.2010.13.4.340>
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16, 111-120.
- Kiriyaikit A, Gallardo WG and Bart AN. 2011. Successful hybridization of groupers (*Epinephelus coioides* × *Epinephelus lanceolatus*) using cryopreserved sperm. Aquaculture 320, 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.012>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Lee IR, Yang H, Kim JH, Kim KY and Bang IC. 2009. Identification of a natural hybrid between the striped spine loach *Cobitis tetralineata* and the king Spine loach *Iksookimia Longicorpa* by Analyzing Mitochondrial *COI* and Nuclear *RAG1* Sequences, Korean J Ichthyol 21, 287-290.
- Lim SG, Han SB and Lim HK. 2016. Effects of salinity on the growth, survival and stress responses of red spotted grouper *Epinephelus akaara* and hybrid grouper *E. akaara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂. Korean J Fish Aquat Sci 49, 612-619. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0612>.
- Myoung JG, Kang CB, Yoo JM, Lee EK, Kim S, Jeong CH and Kim BI. 2013. First record of the giant grouper *Epinephelus lanceolatus* (Perciformes: Serranidae: Epinephelinae) from Jeju island, South Korea. Korean J Fish Aquat Sci 16, 49-52. <https://doi.org/10.5657/FAS.2013.0049>.
- Park JM. 2018. A Study on the Hybrid between of *Rhodeus uyekii* and *R. ocellatus*. Ph. D Dissertation, Chonnam National University, Yeosu, Korea.
- Pyo HJ and Choi KS. 1996. Analysis of genetic polymorphism among six Korean wild *Artemisia* spp. by using RAPD method. Korean J Agric Sci 23, 99-107.
- Song HY and Bang IC. 2009. Genetic variation of *Coreoleuciscus splendidus* populations from four major rivers in Korea as assessed by RAPD PCR. Korean J Ichthyol 21, 129-133.
- Song HY, Kim JH, Seo IY and Bang IC. 2017. Species and hybrid identification of genus *Coreoleuciscus* species in Hwnag-ji stream, Nakdong River Basin in Korea. Korean J Ichthyol 29, 1-12.
- Tahir D, Shariff M, Syukri F and Yusoff FM. 2018. Serum cortisol level and survival rate of juvenile *Epinephelus fuscoguttatus* following exposure to different salinities. Vet World 11, 327-331. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.327-331>.
- Tang J, Tian, Y, Li Z, Cheng M, Chen Z, Mao D and Li B. 2018. Analysis of genetic characters in *Epinephelus moara*, *E. lanceolatus* and their hybrids. J Agric Biotechnol 26, 819-829.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22, 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Tian Y, Chen Z, Tang J, Duan H, Zhai J, Li B, Ma W, Liu J, Ho u Y and Sun Z. 2017. Effects of cryopreservation at various temperatures on the survival of kelp grouper (*Epinephelus moara*) embryos from fertilization with cryopreserved sperm. Cryobiology 75, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.02.007>.
- Wang S, Du J, Wang J and Ding S. 2007. Identification of *Epinephelus malabaricus* and *Epinephelus coioides* using DNA markers. Acta Oceanolog Sin 26, 122-129.