ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2014** Vol. 24. No. 6. 626~632 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2014.24.6.626

Genetic Structure and Phylogenetic Relationship of Red Spotted Grouper (*Epinephelus akaara*) Based on the Haplotypes and Polymorphisms of Mitochondrial *COI* Gene Sequences

Sang-Hyun Han[1,2*], Young-Don Lee[3], Hae-Ja Baek[4], Hong-Shik Oh[1,2] and Choong Hwan Noh[5*]

[1]*Educational Science Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea*
[2]*Department of Science Education, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea*
[3]*Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 695-965, Korea*
[4]*Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*
[5]*East Sea Research Institute, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Uljin 767-813, Korea*

Received May 12, 2014 / Revised May 24, 2014 / Accepted May 29, 2014

The genetic structure and phylogenetic relationship were investigated in Korean red spotted grouper populations using the nucleotide sequence polymorphisms of the mitochondrial DNA (mtDNA) *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI*) gene. The *COI* gene was sequenced showed 99.1-99.8% identity with the EF607565 sequence previously reported. A total of twenty haplotypes were found, and the Korean population showed nineteen haplotypes. Among those, Hap_03 and Hap_08 showed Jeju-do and China-specific *COI* sequences, respectively. However, Hap_07 had twelve *COI* sequences from South Korea and records from Hong Kong and Taiwan. Neighbor-joining (NJ) trees constructed from the phylogenetic analyses based on the polymorphisms of the *COI* haplotypes showed a monophyletic branching pattern within the genus *Epinephelus*. This indicated that the red spotted grouper populations had evolved from common maternal ancestors. In addition, the Hap_08, which had the *COI* sequence recorded only from China Sea, was found in the middle of the NJ tree nearby Hap_07 and showed a close relationship with Hap_07. This indicates that Chinese red spotted grouper is also maternally related to other populations in East Asia. Consequently, East Asian red spotted grouper populations are maternally related, as well as sharing the same evolutionary history, and are still affected by the East Asian ocean current (Kuroshio). These findings help to explain the genetic structure and phylogenetic relationship of red spotted grouper and also contribute to research on artificial breeding and industrialization.

Key words : C*ytochrome c oxidase subunit I* (*COI*), haplotype, phylogenetic relationship, polymorphism, red spotted grouper

서 론

붉바리(*Epinephelus akaara*)는 농어목(Perciformes), 바리과(Serranidae), 능성어아과(Epinephelinae), 우레기속(*Epinephelus*)에 속하는 길이 40 cm 전후까지 성장하는 대형어로, 우리나라의 남해안, 제주도 연안, 일본의 중부이남, 중국, 대만, 동남아시아 지역에 이르는 열대에서 온대해역의 천해에 분포하는 온수성 어류이다. 정착성 어류로 연안의 암초지대에 주로 서식하며, 육식성인 야행성이며, 사회적으로 성전환을 발생하는 어종으로 알려져 있다[11, 21, 22, 24, 30]. 붉바리는 맛이 좋아 고가의 어종으로써 수요가 증가하고 있으며, 우리나라와 일본의 고급요리의 원료로 수출종목으로도 유력하나, 최근 어획량의 지속적인 감소 추세로, 현재까지 붉바리에 관한 연구는 대부분 인공종묘생산기술과 영양, 면역, 성전환의 조절에 관한 연구에 국한되어 있다[12, 19-23, 26, 28, 29].

우레기속 어종에 대한 분자유전학적 연구는 동남아시아 및 중국에서 중요하게 다루어지고 있는 일부 종들, *E. awoara*, *E. areolatus*, *E. bruneus*, *E. coioides*, *E. fasciatomaculosus*, *E. latifasciatus* 등에 대한 미토콘드리아 유전체 전체서열의 특성들이 보고되었고[9, 17, 25, 32, 34], microsatellite (MS) marker 유전자형의 지역별 분포, 동일지역에 출현하는 붉바리와 도도바리(*E. awoara*)의 구분을 위한 mtDNA D-loop 내에서의 VNTR 마커 개발[8], 고급어종이면서도 종 식별에 있어 사회적인 문제가 되고 있는 다금바리, 자바리, 능성어의 구분을 위한 유전자 마커의 개발 연구 등이 보고된 수준이다[33]. 바리과의 어종들 사이에서의 다양성과 계통 유연관계에 대한 보고

***Corresponding authors**
Tel : +82-54-780-5200, Fax : +82-54-780-5249
E-mail : hansh04@rda.go.kr (Sang-Hyun Han)
chnoh@kiost.ac (Choong Hwan Noh)

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.

는 Dong 등[6]에 의해 MS marker의 다형성에 근거한 연구결과가 보고된 바 있으며, mtDNA Cytochrome B (*CYTB*) 유전자 서열의 다형성에 근거하여 중국산 어종들[4]과 한국산 어종들 간의 계통 유연관계[14]에 대한 연구결과가 보고된 바 있다. 또한 종 내 집단의 구조에 대한 연구는 Thailand와 Indonesia의 갈색둥근바리(*E. coioides*)에서 MS 대립인자의 분포에 관한 연구결과가 보고된 바 있다[1].

Hebert 등[10]에 의해서 제안된 DNA Barcoding은 유전자 서열을 이용하여 종을 동정하는 분자유전학 기법으로, 동물에서는 mtDNA 내의 *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI*) 유전자의 서열이 제안되었다. 어류에서도 Fish Barcode of Life (FISH-BOL)가 제안되어[38], *COI* 유전자 서열의 종간 차이를 이용한 어류 종의 동정 및 종간 식별, 계통 유연관계의 분석 등에 활용되고 있다[2, 5, 16, 27, 31, 35].

현재까지 바리과 어류의 여러 종에서 분자유전학적 실험기법을 이용한 계통 유연관계와 유전자형의 지역적 분포, 종 간 식별 능력의 확인 등을 위한 연구들이 진행되어 왔고, 고가의 시장을 겨냥한 양식 종묘의 개발 등 바리과 어종에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으나, 향후 계통관리 등에서 요구되는 계통의 다양성이나 유전적 집단의 구조 등에 대한 기초자료는 보고되지 않고 있다. 동남아시아, 중국, 대만, 일본과 한국에 서식하는 온수성 어류인 붉바리 종에 대하여 한국산 붉바리 집단의 유전적 다양성을 살펴보기 위하여 모계유전에 의해 유전되는 분자인 mtDNA 중 fish-barcording에 활용되고 있는 *COI* 유전자의 서열을 결정하고, 서열의 다형성에 근거한 haplotype 사이의 계통 유연관계를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 DNA 분리

분석에 이용된 시료는 전라남도 고흥군, 경상남도 통영시, 제주도 제주시에서 어획된 붉바리 성어들을 구입하였고, 전혈이나 꼬리, 근육 등을 채취하여 DNA 분리에 이용하였다. 전혈, 꼬리, 근육 등에서 DNA 분리는 Sambrook 등[36]의 방법을 변형하여 수행하였으며, 분리한 DNA는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, USA)로 흡광도를 측정한 후 A_{260}/A_{280}와 A_{230}/A_{280}이 모두 1.8 이상인 DNA들을 50 ng/ul로 희석하여 PCR 반응의 주형으로 이용하였다.

mtDNA *COI* 유전자의 증폭

추출한 DNA를 주형으로 mtDNA *COI* 유전자의 증폭을 위해 Ivanova 등[13]에 의해 제안된 fish cocktail (VF2_t1, FishF2_t1, FishR2_t1, FR1d_t1, 1:1:1:1 혼합액)을 이용하였다. PCR 반응은 10× 반응완충액, 20 mM dNTP, 각각 200 mM primer, 20 pmole primer cocktail, 1.5 units i-*Taq* DNA polymerase (Intron Biotechnology, Korea)와 50-60 ng genomic DNA 용액에 멸균한 탈이온수를 첨가하고, PTC-200 (MJ Research, USA)을 이용하여 95℃ 3분 초기변성 후, 94℃-30초, 65℃-45초, 72℃-45초로 구성된 연쇄반응을 35회 반복한 후 72℃에서 5 분간 최종 신장하였다. PCR 증폭 산물은 ethidium bromide가 함유된 1.0% agarose 겔 상에서 전기영동하여 확인하였다.

DNA sequencing

증폭된 PCR 산물은 QIAex II Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)를 이용하여 정제하고, 정제된 PCR 산물을 주형으로 PCR 증폭에 이용한 primer에 삽입된 M13 forward, M13 reverse primer를 이용하여 DYEnamic ET-Dye Terminator Kit (GE Healthcare, USA)로 dye-termination 반응을 수행한 후, MegaBase1000 (Amersham Pharmacia, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 서열을 육안으로 확인한 후, BLAST 검색을 통해 GenBank database에 보고된 서열과 비교하였다. 연구를 통해 얻은 77 개의 붉바리 *COI* 유전자 서열들은 National Center for Biological Information (NCBI)의 nucleotide database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/)에 등록하였다(Acc. nos KJ743720-KJ743796).

Haplotype 결정 및 phylogenetic analysis

본 연구를 통해 얻은 한국산 붉바리 mtDNA *COI* 유전자 서열들과 기존에 GenBank 상에 보고된 서열들을 모두 수집한 후, 염기서열에 대한 다중정렬을 CLUSTAL W program[18]을 이용하여 수행하고, 정렬된 서열들 간의 유전적 거리지수의 산출과 neighbor-joining tree의 작성은 PHYLIP program package ver. 3.695 [7]의 DNADIST와 NEIGHBOR 프로그램을 통해 작성하였다. 유전적 거리지수는 Kimura's two parameter method [15]에 근거하여 transition : transversion의 비를 1:2로 가정하여 산출하였다. 염기서열의 haplotype의 결정은 DnaSP v5 프로그램을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

붉바리 *COI* 서열의 염기 유사도 확인

Ivanova 등[13]에 의해서 보고된 어류 *COI* 유전자 증폭용 primer cocktail을 이용하여 PCR 증폭한 *COI* 유전자 서열은 677-bp의 길이를 나타내었으며, BLAST 검색을 통해 확인된 최대 유사종의 서열은 *Epinephelus akaara*의 mitochondrial genome 서열(NCBI acc. no. EU043377 [39])에서 *COI* 유전자 영역에 해당되었다. 기존에 보고된 유전자 서열과의 BLAST 검색 결과, 77개체에서 얻은 유전자 서열과의 일치도는 최소 99.1%에서 최대 99.8%의 범위에서 확인되었다. 붉바리 종 이외에 가장 높은 유사성을 나타낸 종의 서열은 *E. fasciatomaculosus*

(rock grouper)의 *COI* 서열(acc. no. EF607565)로 최대 유사도는 약 95.7%를 나타내었다. BLAST 검색 결과 붉바리 종의 *COI* 서열은 동일 속인 *Epinephelus*의 다른 종들과 최소 96% 미만의 상동성을 나타내어, 종간 식별능력이 좋은 것으로 판단되었다. *CYTB* 유전자 서열의 다형성에 근거한 계통 유연관계에 대한 연구에서 붉바리는 도도바리(*E. awoara*) [14], 대문바리(*E. areolatus*)와 가장 근연인 것으로 보고하였으나[4], 두 연구보고에서 이용한 종들이 서로 다르고, 모두 *E. fasciatomaculosus*를 포함하고 있지 않아, 본 연구결과와 직접 비교하는 것은 무리가 있다고 하겠다. 따라서 종합적으로 볼 때, 붉바리 종은 국내 종 중에서는 도도바리, 국외의 종까지 포함한 범주에서는 대문바리, *E. fasciatomaculosus*와 근연인 것으로 추정되나, 향후 충분한 시료에 대한 유전자 서열 정보를 바탕으로 계통 유연관계 정립에 대한 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

다수의 haplotype 출현과 지역적 분포

본 연구를 통해 결정된 77 개의 한국산 붉바리 *COI* 유전자 서열과, 중국과 대만, 홍콩에서 보고된 각각 1개체씩(중국, EF607565; 대만, JF750758; 홍콩, JQ013801) 총 80 개의 서열정보를 수집하여 haplotype을 분석하였다. *COI* 유전자 서열의 haplotype 분석 결과, 전체 붉바리의 *COI* 유전자 서열은 20개의 haplotype으로 구분되었다(Table 1). 전체 20가지 haplotype 중에서 둘 이상의 서열이 출현하는 haplotype은 6가지이고, 나머지 14종의 haplotype들은 각각 하나의 서열만을 포함하고 있었다. 제주도와 남해안에서 수집된 한국산 붉바리 집단에 출현한 haplotype은 19가지였으며, 남해안 집단은 18가지, 제주도 집단은 4가지 haplotype을 나타내었고, 이들 중 Hap_01, Hap_07, Hap_11 등은 남해안과 제주산 붉바리에서 공통으로 출현하였다. 발견된 haplotype들 중에서 Hap_02는 39개의 *COI* 서열을 포함하여 가장 많은 서열이 포함되었으나, 지역별로는 모두 남해안산 붉바리의 서열들만 출현하였다. 중국과 대만, 홍콩 등에서 수집된 붉바리의 서열들 중에서 중국산 붉바리의 *COI* 서열은 Hap_08로 별개의 haplotype으로 구분되었으나, 대만과 홍콩의 붉바리 서열은 남해안산과 제주산 붉바리 서열들과 함께 Hap_07에 포함되었다. 이 결과에서 중국산 붉바리의 *COI* 서열이 한국산 붉바리의 *COI* 서열과 서로 다른 *COI* happlotype을 갖는다고 볼 수 있으나, 현재까지 보고된 중국산 붉바리의 *COI* 서열이 단 1개의 서열뿐이라는 점에서 두 국가의 붉바리 집단의 *COI* 유전자 서열을 모두 포함한다고 볼 수 있는 근거는 없으며, 이에 따라 한국과 중국의 붉바리 집단의 모계혈통이 구분된다고 주장할 수 있는 충분한 근거는 되지 못한다. 이를 해결하기 위해서는 중국산 붉바리에 대한 충분한 *COI* 서열 정보의 확보가 뒤따라야 할 것이다. 발견된 *COI* haplotype들 중에서 흥미로운 부분은 Hap_07으로 한국산 개체들 중에서 남해안, 제주도 개체의 *COI* 서열과

Table 1. *COI* haplotypes found in the Red Spotted grouper in South Korea

Haplotype	No. of sequences	Country				
		South Korea		China	Hong Kong	Taiwan
		South Sea	Jeju-do			
Hap_01	2	1	1			
Hap_02	39	39				
Hap_03	1		1			
Hap_04	2	2				
Hap_05	1	1				
Hap_06	1	1				
Hap_07	12	9	1		1	1
Hap_08	1			1		
Hap_09	1	1				
Hap_10	1	1				
Hap_11	3	2	1			
Hap_12	9	9				
Hap_13	1	1				
Hap_14	1	1				
Hap_15	1	1				
Hap_16	1	1				
Hap_17	1	1				
Hap_18	1	1				
Hap_19	1	1				
Hap_20	1	1				
Total	81	74	4	1	1	1

홍콩, 대만의 붉바리 서열이 모두 확인되었다. 이는 대만과 홍콩, 제주도와 남해안을 포함한 한국에 이르는 지역의 붉바리들이 직접적인 모계 연관을 갖는 공통의 모계선조집단에서 유래되었을 가능성을 시사해주는 자료라 하겠다.

Fig. 1은 붉바리 *COI* haplotype들의 지역별 분포를 나타낸 것이다. 한국산 붉바리 중 남해안 집단에서는 18가지의 haplotype들이 발견되었고, 그 중 4가지 haplotype들은 2 이상의 서열을 포함하고 있었다(Table 1). 중국과 대만, 홍콩 등에서는 모두 1가지 haplotype이 발견되었는데, 이는 기존의 보고에서 각각 1개의 *COI* 서열만 이용되었기 때문이다.

붉바리 종이 연안성, 정착어류로 알려져 있지만[21], 우리나라뿐만 아니라 일본, 중국, 대만, 동남아시아 지역에 이르는 넓은 지역에서 분포하는 온수성 어류이고, 붉바리의 주요 산지가 한국이나 일본 등 동북아시아보다는 인도네시아, 태국, 베트남, 필리핀, 중국 남부 등 동남아시아이며[11, 22, 24, 30], 제주도와 남해안, 중국, 일본, 대만, 홍콩, 동남아시아를 모두 경유하는 쿠로시오 해류(Kuroshio current)의 영향권 내에 위치한다는 면에서 지역간 유전자 교류는 충분히 고려되어야 할 것이다. 또한 붉바리 종에 대한 계통 유연관계의 보다 구체적인 결과를 확인하기 위해서는 추후 각 지역별 시료에 대한 충분한 자료가 보충되어야 할 것으로 사료된다.

동아시아 붉바리 집단들의 계통 유연관계

Fig. 2에서는 *COI* 유전자 haplotype들의 서열의 다형성이 나타내는 계통 유연관계를 나타낸 것이다. Fig. 2A는 한국, 중국, 홍콩, 대만에서 수집된 모든 붉바리 *COI* 유전자 서열들에서 발견된 모든 haplotype들이 단계통적으로 진화한 것임으로 보여주며, Fig. 2B에서는 haplotype들이 몇 개의 소그룹으로 구분됨을 보여주고 있다. 남해안산 붉바리들은 모든 소그룹에서 출현하였다. 제주도산 붉바리의 경우도 4가지 소그룹에서 발견되었으나, 남해안이나 외국에서 보고된 자료들과 구분되는 양상은 발견되지 않았다. 홍콩과, 대만, 중국에서 보고된 자료들은 남해안과 제주도와 함께 계통수의 중앙부에서 발견되었다. Haplotype 분석에서 다른 지역 붉바리들과 구분되었던 중국산 붉바리의 *COI* 서열 역시 계통수 상에서는 중국-대만-제주도 및 남해안산 hapotype들과 별개로 구분되지 않

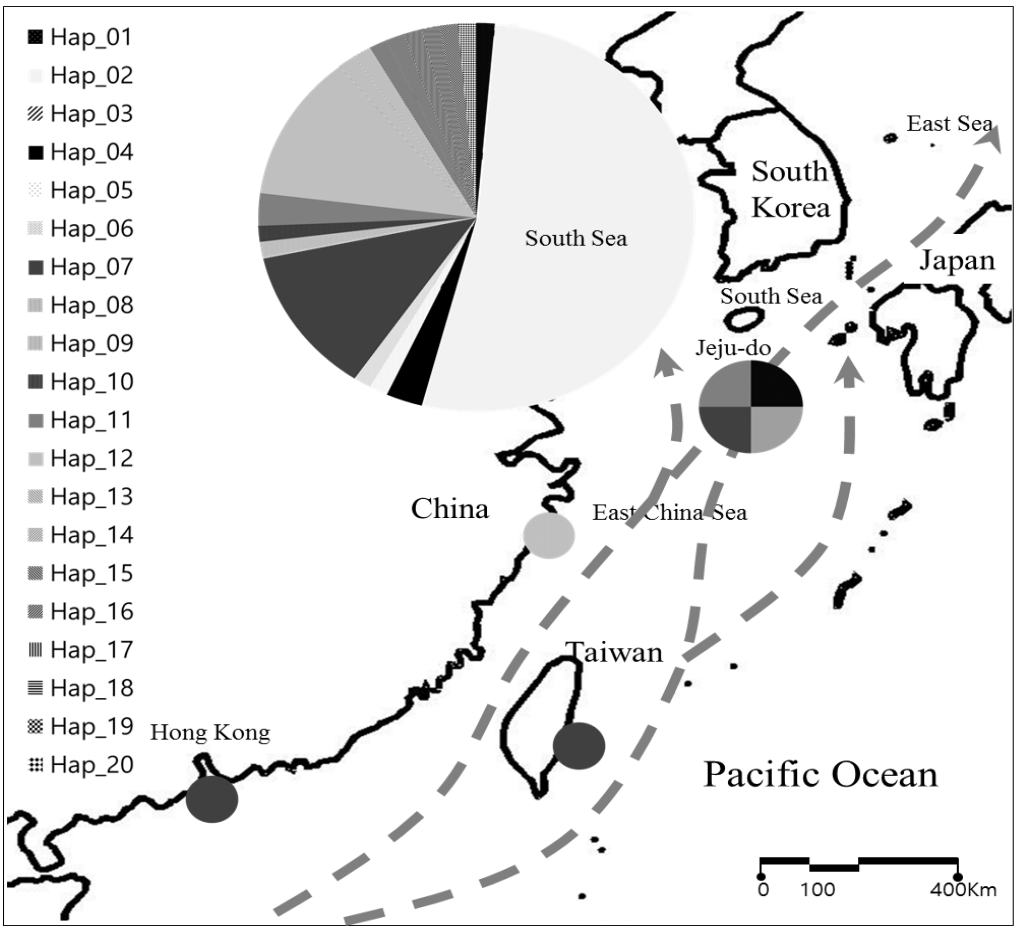

Fig. 1. Haplotype distribution of *COI* gene sequences of Hong Kong grouper. Numbers of *COI* sequences for the populations of Red Spotted groupers are seventy five (South Sea, South Korea), four (Jeju-do, South Korea) and one (Taiwan, Hong Kong and China). Gray-dotted lines indicate the Kuroshio current.

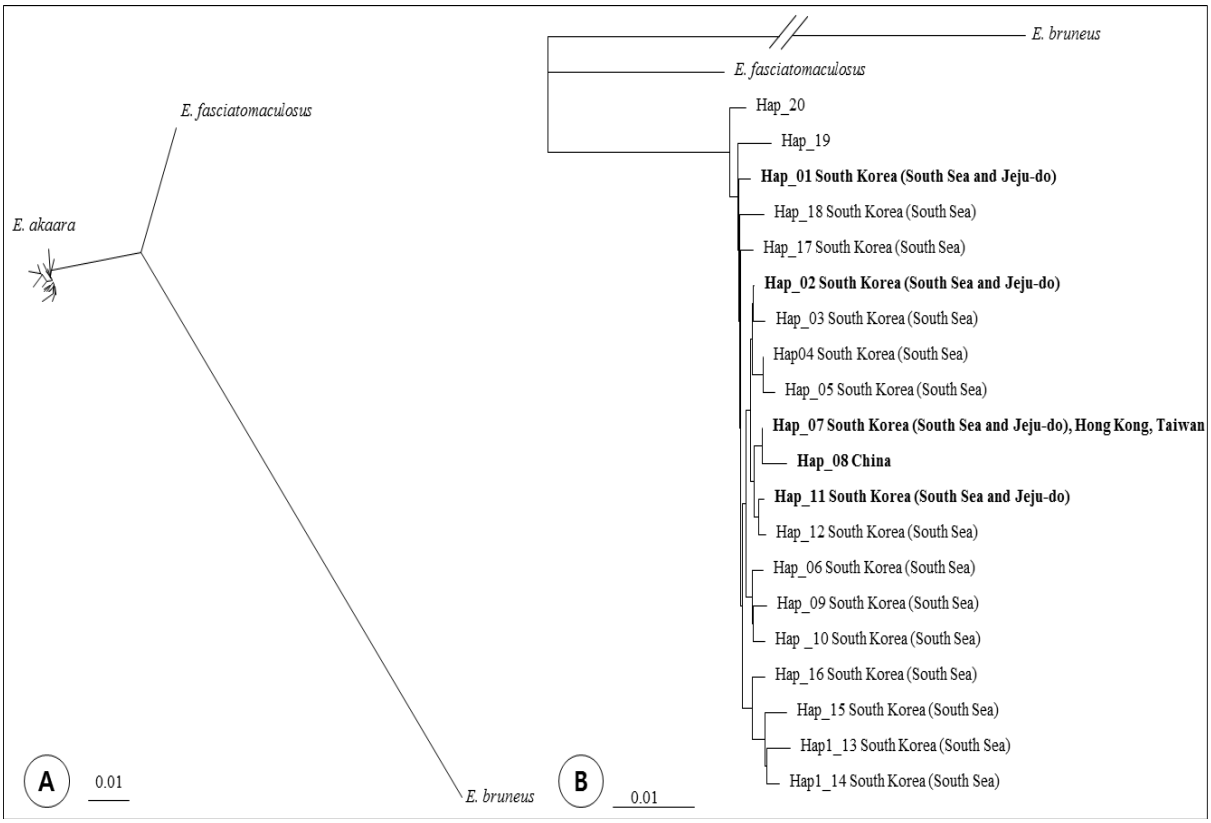

Fig. 2. Neighbor-joining (NJ) trees based on the sequence polymorphisms among the *COI* haplotypes in the Red Spotted grouper (*E. akaara*) collected in South Korea. A, unrooted tree; B, phylogram. Three foreign *COI* sequences originated from China (EU043377), Hong Kong (JQ013801) and Taiwan (JF750758) previously reported in GenBank database were also used for phylogenetics analysis. The *COI* sequences of *E. bruneus* (JQ518289) and *E. fasciatomaculosus* (EF607565) were used for out-group rooting.

는, 동일한 위치-상에서 발견되어, 모계 계통이 타 지역과 구분되는 계통은 아니라는 것을 보여주고 있다. 전체적으로 한국산 붉바리 집단이 중국, 대만, 홍콩 등과 구분되는 haplotype들이 발견되었으나, 모계의 유전자 서열이 구분되는 집단으로 규정할만한 근거는 발견되지 않았다.

어류 집단의 유전적 다양성과 집단 간의 유전적 특성에 대한 연구는 생물의 진화적 상관관계를 구명하는 학문적인 분야 이외에도, 최근에는 생물자원의 국가 간 이동에 따른 식량자원으로써의 안정성 관리 및 사후인증의 범주에까지 영향을 주고 있다[3, 37]. 바리과 어류들은 3년 이상의 긴 생육기간을 요구하며, 출생 시 유전적 성결정 이후 성장과정에서 어군의 사회적 성비에 따른 2차적인 성전환을 함에 따라[11, 21, 22, 24, 30], 어군 및 친어관리에 상당한 어려움으로 작용하여 바리과 어류의 인공증식과 산업화는 초기단계에 머물고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 어종 자체가 고가의 시장을 형성한다는 면에서 주요 소비국가인 동남아시아, 중국, 한국, 일본 등에서 바리과 어류에 대한 대량증식을 위한 연구가 지속적으로 시도되고 있다[12, 19-23, 26, 28, 29]. 인공증식의 성공여부를 떠나서 수산생물에 대한 원산지 추적이 사회적인 문제가 되고 있는 시점에서 본 연구의 결과는 향후 붉바리를 비롯한 바리과 생물자원에 대한 연구와 국가간 유통관리에 중요한 기초자료가 될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부・해양수산부・농촌진흥청・산림청의 Golden Seed Project 수출용 붉바리 종자개발 사업에 의해 이루어진 것임.

References

1. Antoro, S., Na-Nakorn, U. and Koedprang, W. 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. *Mar Biotechnol* **8**, 17-26.
2. Chakraborty, M. and Ghosh, S. K. 2014. An assessment of the DNA barcodes of Indian freshwater fishes. *Gene* **537**, 20-28.
3. Collins, R. A., Armstrong, K. F., Meier, R., Yi, Y., Brown,

S. D., Cruickshank, R. H., Keeling, S. and Johnston, C. 2012. Barcoding and border biosecurity: identifying cyprinid fishes in the aquarium trade. *PLoS One* **7**, e28381.
4. Ding, S., Zhuang, X., Guo, F., Wang, J., Su, Y., Zhang, Q. and Li, Q. 2006. Molecular phylogenetic relationships of China Seas groupers based on cytochrome b gene fragment sequences. *Sci China C Life Sci* **49**, 235-242.
5. Di Pinto, A., Di Pinto, P., Terio, V., Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E. and Tantillo, G. 2013. DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chem* **141**, 1757-1762.
6. Dong, Q. F., Liu, C. W., Guo, Y. S., Liu, L. and Wu, Y. 2007. Microsatellite analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of nine species of grouper in genus *Epinephelus*. *Yi Chuan* **29**, 837-843.
7. Felsenstein, J. 1993. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package)* ver. 3.572, Computer program distributed by the author, Dept. of Genetics, University of Washington, Seattle, USA
8. Han, J., Lv, F. and Cai, H. 2011. Detection of species-specific long VNTRs in mitochondrial control region and their application to identifying sympatric Hong Kong grouper (*Epinephelus akaara*) and yellow grouper (*Epinephelus awoara*). *Mol Ecol Resour* **11**, 215-218.
9. He, B., Lai, T., Peng, Z., Wang, X. and Pan, L. 2013. Complete mitogenome of the Areolate grouper *Epinephelus areolatus* (Serranidae, Epinephelinae). *Mitochondrial DNA* **24**, 498-500.
10. Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. and deWaard J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* **270**, 313-321.
11. Heemstra, P. C. and Randall, J. E. 1993. *Groupers of the World FAO Species Catalogue*, pp. 106-107, Rome, Italy.
12. Hwang, S., Lee, Y. D., Song, C. B. and Rho, S. 1998. Gonadal development and the effects of 17α-methyltestosterone on sex inversion of the red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J Aquacult* **11**, 173-182.
13. Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. and Hebert, P. D. N. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol Ecol Notes* **7**, 544-548.
14. Kang, G. Y. and Song, C. B. 2004. Phylogenetic relationships among groupers (genus *Epinephelus*) based on mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences. *J Korean Fish Soc* **37**, 414-422.
15. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparable studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
16. Kumar, G., Kunal, S. P. and Shyama, S. K. 2013. Evolutionary history and phylogenetic relationship between *Auxis thazard* and *Auxis rochei* inferred from *COI* sequences of mtDNA. *Int J Bioinform Res Appl* **9**, 604-613.
17. Lai, T., He, B., Peng, Z., Wang, X. and Pan, L. 2013. Complete mitochondrial genome of the striped grouper *Epinephelus latifasciatus* (Serranidae, Epinephelinae). *Mitochondrial DNA* **24**, 510-512.
18. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
19. Lee, C. B. and Hur, S. B. 1997. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J Aquacult* **10**, 473-483.
20. Lee, C. B. and Hur, S. B. 1998. Effect of live food and water temperature on larval survival of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J Aquacult* **11**, 565-572.
21. Lee, C. K., Hur, S. B., Ko, T. S. and Park, S. 1998. Maturation, sex ratio and sex-reversal of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *J Aquacult* **11**, 573-580
22. Lee, T. W. and Lee, C. K. 1996. Age and growth of *Epinephelus akaara* in the south western sea of Korea. *Korean J Ichthyol* **8**, 16-22.
23. Li, G. L., Liu, X. C. and Lin, H. R. 2006. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Physiol Biochem* **32**, 25-33.
24. Li, G. L., Liu, X. C. and Lin, H. R. 2007. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Anim Reprod Sci* **99**, 156-166.
25. Li, J. L., Liu, M. and Wang, Y. Y. 2013. Complete mitochondrial genome of the rock grouper *Epinephelus fasciatomaculosus* (Pisces: Perciformes). *Mitochondrial DNA* **24**, 625-626.
26. Li, S. W., Long, Z. F., Du, J., Liu, S. G. and Wen, J. J. 2009. Analysis of differential expression and characterization of PIN in the gonads during sex reversal in the red-spotted grouper. *Mol Cell Endocrinol* **309**, 32-38.
27. Liu, S. Q., Mayden, R. L., Zhang, J. B., Yu, D., Tang, Q. Y., Deng, X. and Liu H. Z. 2012. Phylogenetic relationships of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes) inferred from mitochondrial and nuclear genes with analyses of gene evolution. *Gene* **508**, 60-72.
28. Mai, W., Liu, P., Chen, H. and Zhou, Y. 2013. Cloning and immune characterization of the c-type lysozyme gene in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Fish Shellfish Immunol* **36**, 305-314.
29. Mao, M. G., Lei, J. L., Alex, P. M., Hong, W. S. and Wang, K. J. 2012. Characterization of RAG1 and IgM (mu chain) marking development of the immune system in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Shellfish Immunol* **33**, 725-735.
30. Masuda, H., Amaoka, K., Araga, C., Ueno, T. and Yoshno, T. 1984. *The Fishes of the Japanese Archipelago*, p. 437, Tokia University Press, Tokyo, Japan.
31. Mat Jaafar, T. N., Taylor, M. I., Mohd Nor, S. A., de Bruyn, M., Carvalho, G. R. 2012. DNA barcoding reveals cryptic diversity within commercially exploited Indo-Malay Carangidae (Teleosteii: Perciformes). *PLoS One* **7**, e49623.
32. Oh, B. S., Oh, D. J., Jung, M. M. and Jung, Y. H. 2012. Complete mitochondrial genome of the longtooth grouper *Epinephelus bruneus* (Perciformes, Serranidae). *Mitochondrial DNA* **23**, 137-138.
33. Park, Y. C. Jung, Y. H., Kim, M. R., Shin, J. H., Kim, K.

H., Lee, J. H., Cho, T. Y., Lee, H. J. and Han, S. B. 2013. Development of detection method for *Niphon spinosus*, *Epinephelus bruneus*, and *Epinephelus septemfasciatus* using 16S rRNA gene. *Korean J Food Sci Technol* **45**, 1-7.
34. Qu, M., Zhang, X. and Ding, S. X. 2012. Complete mitochondrial genome of yellow grouper *Epinephelus awoara* (Perciformes, Epinephelidae). *Mitochondrial DNA* **23**, 432-434.
35. Ribeiro, A. O., Caires, R. A., Mariguela, T. C., Pereira, L. H., Hanner, R. and Oliveira, C. 2012. DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. *Mol Ecol Resour* **12**, 1012-1020.
36. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Manniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory mannual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory; New York, USA.
37. Steinke, D., Zemlak, T. S. and Hebert, P. D. 2009. Barcoding nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *PLoS One* **4**, e6300.
38. Ward, R. D., Hanner, R. and Hebert, P. D. N. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J Fish Biol* **74**, 329-356.
39. Zhuang, X., Ding, S., Wang, J., Wang, Y. and Su, Y. 2009. A set of 16 consensus primer pairs amplifying the complete mitochondrial genomes of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) and Hong Kong grouper (*Epinephelus akaara*). *Mol Ecol Resour* **9**, 1551-1553.

초록 : 미토콘드리아 *COI* 유전자 서열의 다형성과 반수체형에 근거한 한국산 붉바리(*Epinephelus akaara*)의 유전적 구조와 계통 유연관계

한상현[1,2*] · 이영돈[3] · 백혜자[4] · 오홍식[1,2] · 노충환[5*]
([1]제주대학교 교육과학연구소, [2]제주대학교 과학교육과, [3]제주대학교 해양과학연구소, [4]부경대학교 자원생물학과, [5]한국해양과학기술원 동해특성연구부)

한국산 붉바리 집단에서 유전적 구조와 계통 유연관계를 mtDNA *COI* 유전자 서열의 다형성을 이용하여 조사하였다. *COI* 유전자 서열을 결정하였고 기존에 보고된 서열들과 비교하였다. 본 연구를 통해 결정된 *COI* 서열들은 기존에 보고된 EF607565에 대하여 99.1-99.8%의 동일성을 나타내었다. 전체 20가지의 haplotype들이 발견되었고, 한국산 붉바리 집단은 19가지의 haplotype을 나타내었다. 이들 중 Hap_03과 Hap_08은 각각 제주도와 중국-특이적인 *COI* 서열들을 보였다. 반면, Hap_07은 한국에서 채집된 시료들과 홍콩과 대만에서 보고된 기록 등 여러 *COI* 서열들을 포함하였다. *COI* haplotype들의 다형성에 근거한 계통 유전학적 분석을 통해 작성된 NJ tree는 *Epinephelus* 속 내에서 단계통적인 분지양상을 나타내었고, 이는 붉바리 집단들이 공통의 모계 선조에서 진화한 것임을 나타내었다. 또한 중국해에서 보고된 *COI* 서열만을 포함하였던 Hap_08은 NJ tree의 중앙부에서 위치하였고, Hap_07의 서열들과도 근연의 관계임을 보여주었다. 이 결과는 중국산 붉바리 역시 동아시아의 다른 집단들과 모계적으로 연관되어있음을 보여주었다. 결과적으로, 동아시아 붉바리 집단들은 모계적으로 연관되어있을 뿐만 아니라 공통의 진화 역사를 공유하고 있으며 여전히 동아시아 해류(Kuroshio 해류)에 의해 영향을 받는 집단이라고 할 수 있다. 본 연구는 붉바리의 유전적 구조와 계통 유연관계를 이해하는 데 도움을 줄 수 있으며, 인공증식과 산업화에 관련된 연구에 있어 중요한 역할을 담당할 것으로 기대된다.