

희귀종 남방황성대 (*Peristedion liorhynchus*)의 한국해 유입 증거 혼합 어란의 대용량 염기서열 분석법 (high-throughput sequencing)으로 발견

최해영^{1,2} · 진병선³ · 박경수³ · 김 성^{1,*}

¹한국해양과학기술원 해양생태연구센터, ²국립수산과학원 기후변화연구과,
³안양대학교 강화캠퍼스 해양바이오시스템공학과

Evidence of Intrusion of a Rare Species, *Peristedion liorhynchus*, into Korean Waters Based on High-throughput Sequencing of the Mixed Fish Eggs by Hae-young Choi^{1,2}, Byung-sun Chin³, Gyung-soo Park³ and Sung Kim^{1,*} (¹Oceanic Climate & Ecology Research Division, Korea Institute of Ocean Science & Technology, Yeongdo-gu, Busan Metropolitan City 49111, Republic of Korea; ²Marine Ecosystem Research Center, National Institute of Fisheries Science, Gijanghaean-ro, Gijang-eup, Busan 46083, Republic of Korea; ³Department of Marine Biotechnology, Anyang University, Ganghwa, Incheon 23038, Republic of Korea)

ABSTRACT The appearance of larvae of a rare species, *Peristedion liorhynchus*, in Korean waters is suggestive of spawning or adult intrusion. We conducted high-throughput sequencing (HTS) on 31,776 pelagic fish eggs collected from 123 stations off the Korean Peninsula during May to August in 2013, 2014 and 2017. A total of 21,621,874 HTS reads were mapped onto the *P. liorhynchus* COX1 reference sequence. Three consensus sequences (313 bp) were constructed from the three samples, respectively, off Uljin and Goeje Islands in May and off Ulsan in July. These samples were formed a clade with *P. liorhynchus* in the maximum likelihood tree of *Peristedion*. The average genetic distance within the *P. liorhynchus* clade (0.0054 ± 0.0046) was less than that among clades (0.1475 ± 0.0396). The results indicate that the HTS analysis of mixed fish eggs is useful for monitoring the intrusion of rare species such as *P. liorhynchus* in Korean waters.

Key words: COX1, fish eggs, high-throughput sequencing, *Peristedion liorhynchus*

서 론

황성대과(Peristediidae)의 남방황성대(*Peristedion liorhynchus*)는 일본(Ochiai and Yatou, 1984), 대만(Monkolprasit *et al.*, 1997), 필리핀(Richards, 1999), 인도네시아(Gloerfelt-Tarp and Kailola, 1984), 호주(Paxton *et al.*, 2006), 괌(Richards, 1999), 뉴칼레도니아(Richards, 1999) 등 서태평양을 축으로 남반구와 북반구에 걸쳐 광범위한 해역에 분포한다.

최근 서태평양의 북반구에 위치한 한국의 제주도 근해에서

이 종의 치어 한 마리(14.1 mm SL; 2019년 5월 5일)가 출현하였다(Jang *et al.*, 2020a). 동일 속의 미동정 치어(*Peristedion* sp. 12.4 mm SL; 1983년 5월 30일; Okiyama, 2014)도 일본의 태평양 연안에서 발견되었다. 황성대속 치어의 출현은 한국을 포함한 서태평양 북반구가 이들 어종의 산란장으로 이용되고 있을 가능성을 시사한다. 하지만 치어의 출현과 체장 등의 제한적인 정보만으로 산란장과 산란시기는 물론 성체 유입을 추정하기에는 불충분하다.

자치어와 달리 어란은 산란장 탐색의 직접 증거로 사용 가능하다. 대표적인 사례는 어란의 DNA 바코드(16S rRNA) 분석을 통한 담수산 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 산란장-북서태평양의 마리아나 해연 부근의 해산-발견이다. 이곳에서 뱀장어의 알과

저자 직위: 최해영 (1)UST 학생연구원, (2)박사후인턴, 진병선 (조교수), 박경수 (교수), 김 성 (책임연구원)

*Corresponding author: Sung Kim Tel: 82-51-664-3278,
Fax: 82-51-955-3981, E-mail: skim@kiost.ac.kr

유생은 물론 산란에 참여한 성체도 발견되었다. 이 연구에서 산란장 탐색의 핵심은 DNA 바코드를 이용한 뱀장어 알의 정확한 종 동정이었다(Tsukamoto *et al.*, 2011).

현재 어류의 DNA 바코드 정보는 다양한 분류군의 어란 종 동정에 활용되고 있다. 엘통이(Kim *et al.*, 2008), 황아귀(Oh and Kim, 2015), 뱀장어목 어류(Choi *et al.*, 2018), 참조기(Jang *et al.*, 2020b) 등 소수 종의 어란 동정을 넘어 다양한 종의 산란 모니터링으로 그 영역이 점점 넓어지고 있다(Han *et al.*, 2015, 2017; Harada *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2016). 이와 같이 어란 동정에 DNA 바코드를 적용하면, 한국 연근해 어류 산란생태 연구에서 최고의 약점 - 한국 주변해에서 형태형질만으로 종 수준의 동정이 가능한 어란은 멸치와 엘통이 등 소수에 불과함 - 을 극복할 수 있어, 어란을 기반으로 한 연구 활성화로 인해 다양한 어류의 산란 정보 확보가 증가할 것이다.

어류의 생활사 - 어란, 난황자어, 자어, 치어, 유어 등 - 에 따른 사망률을 고려하면 발생 단계별 개체수 밀도는 발생 초기의 어란이 가장 높다(Houde, 1987). 뿐만 아니라 방란 직후의 어란은 산란 모체와 함께한다. 이러한 어류의 산란 생태를 고려하면, 희귀 어종일지라도 산란기에는 자치어나 성체보다 동종의 알 발견 확률이 수천에서 수만 배 높을 것이다.

우리는 한국 연안 어류의 산란 생태 연구를 위해 수집한 혼합 어란의 COX1 염기서열을 대용량 염기서열 분석법(high-throughput sequencing)으로 확보하였다. 이를 분석하는 과정에서 남방황성대 어란을 발견하였다. 이에 희귀종인 남방황성대가 한국 주변 해역으로 산란 회유했을 가능성을 이 논문을 통해 보고한다.

재료 및 방법

서태평양 북반구에서 남방황성대(*Peristedion liorhynchus*)의

성체 유입 탐사에 사용한 어란 시료는 한국 연안의 155개 정점 중 123개 정점에서 2013, 2014, 2017년 5~8월에 수집하였다(Fig. 1; Table 1). 어란 수집에 사용한 난자치어 네트는 망목이 300 μm 이고, 망구는 60 cm와 80 cm인 두 종류였다(Table 1). 현장에서 채집한 표본을 95% 에탄올에 보관하였다. 해부현미경을 이용하여 123개 표본에서 분리한 어란은 총 31,776개였다. 조

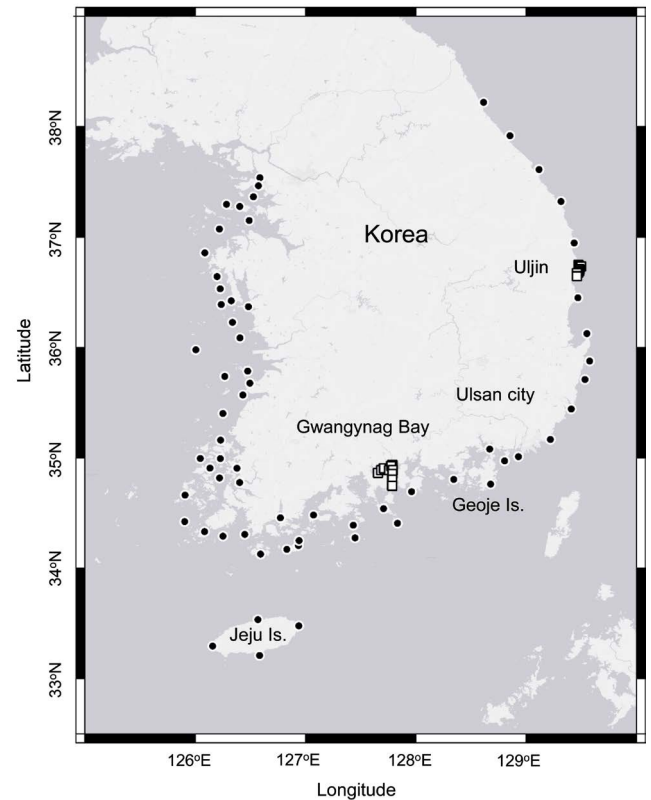


Fig. 1. Sampling stations for pelagic fish eggs off the coasts of Korea. This map and Fig. 4 were prepared with QGIS software v.3.14.16-Pi (<https://qgis.org>).

Table 1. Information on sampling and high-throughput sequencing for the pelagic fish eggs

Survey areas	Sampling date	Sampling gears	Number of stations	Number of eggs	Number of mixed egg samples	Total sequence reads*	
Off Uljin	6 August 2013	Mouth diameter, 60 cm, Mesh size, 300 μm	10	3,491	10	2,059,750	
	23 July 2014		10	3,136	10	2,275,592	
Gwangyang Bay	28 August 2013		10	1,833	7	1,448,360	
	25 July 2014		10	4,026	10	1,416,520	
Korean coastal waters	2 May~19 June 2017		Mouth diameter, 80 cm, Mesh size, 300 μm	57	9,421	37	6,723,862
	23 July~29 August 2017			58	9,869	49	7,893,808
Total			155	31,776	123	21,817,892	

* , COX1 reads sequenced by MiSeq (Illumina, USA)

Table 2. Primers (a) and PCR conditions (b) for high-throughput sequencing of the mixed pelagic fish eggs

a		
PCR	Primer sequences (5'-3')	Direction
1 st PCR	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG <u>GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC</u> [†]	Forward
	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG <u>TAIACYTCIGGRTGICRAARAAYCA</u> [†]	Reverse
2 nd PCR	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-index2-TCGTCGGCAGCGTC [‡]	Forward
	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index1-GTCTCGTGGGCTCGG [‡]	Reverse

[†], The underline indicates sequences from Leray *et al.* (2013) for amplifying COX1 gene.

[‡], All sequences without underlines from Amplicon *et al.* (2013). Index1 names and sequences: N701, TCGCCTTA; N702, CTAGTACG; N703, TTCTGCCT; N704, GCTCAGGA; N705, AGGAGTCC; N706, CATGCCTA; N707, GTAGAGAG; N710, CAGCCTCG; N711, TGCCTCTT; N712, TCCTCTAC; N714, TCATGAGC; N715, CCGTGGAT; N716, TAGCGAGT. Index2 names and sequences: S502, CTCTCTAT; S503, TATCCTCT; S505, GTAAGGAG; S506, ACTGCATA; S507, AAGGAGTA; S508, CTAAGCCT; S510, CGTCTAAT; S511, TCTCTCCG (https://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/wp-content/uploads/2013/06/illumina-adapter-sequences_100000002694-00.pdf).

Step	Temperature (°C)		Time		Number of cycles	
	1 st PCR	2 nd PCR	1 st PCR	2 nd PCR	1 st PCR	2 nd PCR
Initial denaturation			3 min		1	
Denaturation	95					
Annealing	46	55	30 sec		40	8
Extension	72		1 min	30 sec		
Final extension			5 min		1	
Hold	4		∞		∞	

사 해역의 수온과 염분 측정에 Sea-Bird SBE 9 또는 Sea-Bird SBE 19 plus V2 (Sea-Bird Electronics, USA)를 이용하였다.

정점별 혼합 어란에서 gDNA를 추출하기 위해 에탄올을 제거하고 phosphate buffered saline으로 2회 세척하였다. 이후 gDNA 추출 과정은 MagListoTM 5 M genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)의 절차를 따랐다. 혼합 어란의 COX1 영역을 MiSeq (Illumina, USA)으로 분석하기 위한 라이브러리를 제작하였다. 2단계 PCR로 이루어지는 라이브러리 제작 순서는 Amplicon *et al.* (2013)을 따랐다. 먼저 MiSeq 어댑터를 포함한 COX1 영역 증폭 프라이머로 1차 PCR을 실시하였다 (Table 2a). MagListoTM 5 M PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)를 이용해 1차 PCR 산물을 정제한 후 index 염기서열 (Table 2a)을 부착하는 2차 PCR을 실시하였다. 1차와 2차 PCR 조건은 Table 2b와 같다. 1차 PCR 산물의 정제법과 동일하게 처리한 2차 PCR 산물의 농도를 NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)로 측정하였다. 2차 PCR 산물을 동일한 농도로

혼합한 후 MiSeq (2 × 300 bp; Illumina, USA)에서 분석한 결과 총 21,817,892개 리드 (reads)를 확보하였다 (Table 1). 이들 양방향 리드 (프라이머 영역을 제거한 평균 길이, 313 bp)를 병합한 후 남방황성대 (*Peristedion liorhynchus*)의 COX1 참조염기서열 (reference sequence) (NCBI/GenBank accession number, JN312126)에 Geneious 11.1.5 (<http://www.geneious.com>)를 이용하여 매핑 (mapping)하였다. 작성된 일치서열 (consensus sequence)을 종으로 결정하기 위해 황성대속 (*Persistedion*)과 외집단 (*Sebastes koreanus* NC023265; Jang *et al.*, 2014)의 염기서열을 NCBI/GenBank (Clark *et al.*, 2016)에서 추출하였다. 어란의 일치서열과 외집단을 포함한 황성대속의 이용 가능한 모든 염기서열을 CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994)로 정렬한 후, 종간 종내 유전적 거리와 maximum-likelihood tree (GTR + G + I 모델)를 MEGA-X로 분석하였다 (Nei and Kumar, 2000; Kumar *et al.*, 2018).

남방황성대의 지리분포 정보는 FishBase (Kaschner *et al.*,

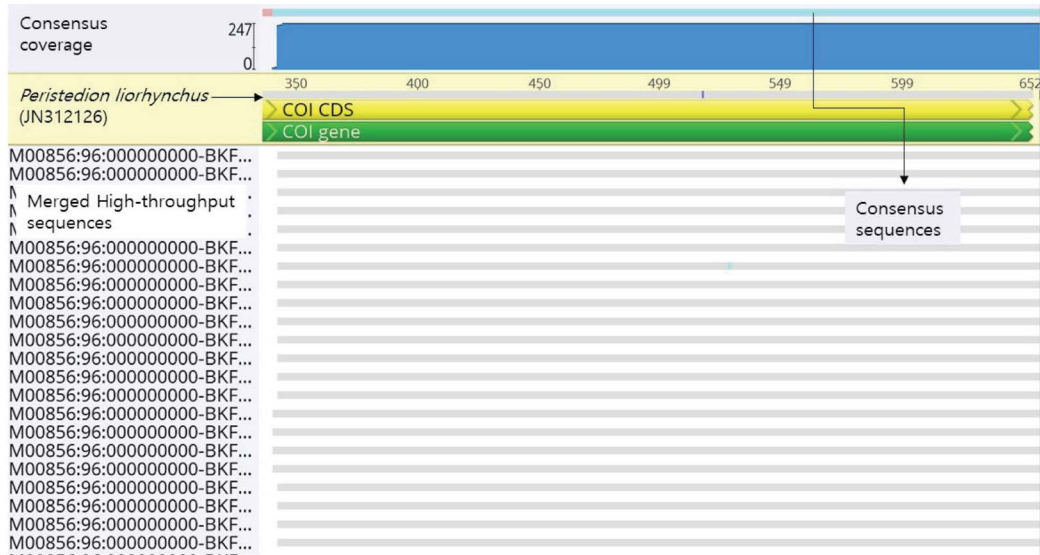


Fig. 2. A snapshot on the reference mapping results from analyzing high-throughput sequencing reads from the mixed fish eggs using Geneious 11.1.5 (<http://www.geneious.com>).

Table 3. Information of sampling stations and reference mapping of reads from the mixed pelagic fish eggs

Survey areas	Sampling date	Locations	Temperature (°C)	Salinity (psu)	Number of eggs	HST reads (merged reads)	Consensus coverage reads (merged reads)	Sequence length
Off Uljin	11 May 2013	36°56'49"N	S (1 m), 10.6	34.7	56	73,524 (17,149)	1,319 (248)	313
		129°26'06"E	B (39 m), 6.6	34.2				
Off Ulsan	26 July 2014	35°26'35"N	S (1 m), 17.2	32.7	155	158,076 (72,620)	44 (19)	313
		129°24'31"E	B (32 m), 9.9	34.3				
Off Goeje Is.	26 May 2017	34°45'45"N	S (1 m), 15.6	34.1	151	150,514 (70,211)	364 (162)	313
		128°40'40"E	B (19 m), 14.9	34.1	140	134,270 (62,747)	ND	ND

S, surface; B, bottom; ND, *Peristedion liorhynchus* not detected from the reference mapping

2019; Froese and Pauly, 2020)에서 추출하였다. 이와 동시에 동일 종의 자치어(Jang *et al.*, 2020a)와 동일 속의 미동정종 자치어(Okiyama, 2014)의 출현 정보도 수집하였다.

결 과

한국 연안의 123개 정점에서 채집한 혼합 어란 시료의 COX1 영역을 대용량 염기서열 분석(high-throughput sequencing, HTS)하여 총 21,817,892개 리드(reads)를 확보하였다. 이들 대량 리드를 남방황성대(*Peristedion liorhynchus*) COX1 참조 염기서열(JN312126)에 매핑(mapping)한 결과 울진과 거제(5월), 울산(7월) 연안의 3개 정점에서만 일치서열(consensus sequence)이 작성되었다(Table 3). 일치서열이 작성된 3개 정점

의 표층 수온은 10.6~17.2°C, 저층은 6.6~14.9°C, 염분은 표층이 32.7~34.7 psu, 저층이 34.1~34.2 psu였다(Table 3).

COX1 참조염기서열(JN312126)에 매핑된 리드수는 44~1,319개, 매핑에 사용한 정점별 리드수는 73,524~158,076개였다. 이때 HTS 분석에 사용한 어란의 수는 56~151개였다(Fig. 2; Table 3). 남방황성대 COX1 참조염기서열에 대한 매핑으로 생성된 일치서열은 길이가 326 bp이고, 모두 동일하였다(GenBank Accession Number: MW881369~MW881371).

어란의 일치서열은 황성대속 7종의 COX1 maximum-likelihood tree에서 남방황성대 계통군에 속하였다(Fig. 3). 종을 대표하는 각각의 계통군 내 평균 유전적 거리는 0.0057±0.0032(0.0025±0.0025~0.0122±0.0058)로 종 구분의 기준이 되는 계통군 간 평균 유전적 거리 0.1475±0.0396보다 적었다. 흥미롭게도 남방황성대(*P. liorhynchus*)로 기록된 염기서열 KU893057

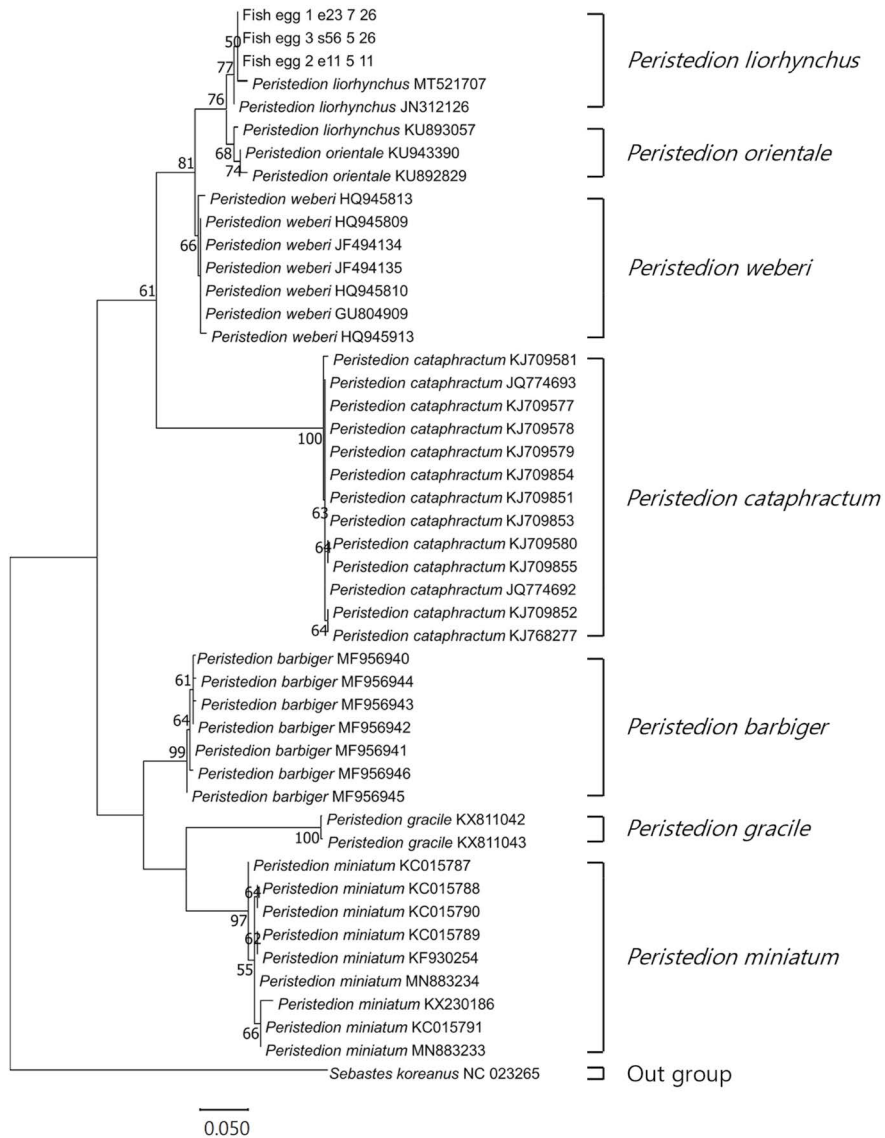


Fig. 3. Phylogenetic relationships of COX1 gene sequences among the seven *Peristedion* species and one outgroup as exhibited in the maximum likelihood tree.

은 황성대(*Peristedion orientale*) 계통군에 속하였다. 이 염기서열은 남방황성대와 황성대 두 계통군을 구성하는 염기서열과 유전적 거리가 각각 0.0247 ± 0.0045 와 0.0122 ± 0.0058 로 전자보다 후자와 유전적 유사성이 높았다.

고찰

어란은 형태적 유사성이 높아 형태형질기록을 이용하여 동정하는 것은 매우 어렵다(Shao *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2014). 이용 가능한 어란의 형태학적 분류형질 정보가 매우 적고, 난의 배아는 발생에 따라 형태가 급격하게 변하기 때문이다. 대안은 생활사에 따라 변하지 않는 DNA 바코드 염기서열을 어란 종 동

정 지표로 사용하는 것이다. DNA 바코드는 종간 종내 유전적 거리를 기반으로 종 동정의 기준으로 사용할 수 있는 일종의 분류 형질이다(Hebert *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008; Oh and Kim, 2015; Delrieu-Trottin *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2018).

본 연구에서도 어란 종 동정에 미토콘드리아 COX1 영역을 DNA 바코드로 활용하였다. 하나의 어란을 분석하는 생어 염기서열 분석법(Sanger sequencing) 대신, 대량의 혼합 어란 분석에 효과적인 대용량 염기서열 분석법(high-throughput sequencing, HTS) (Duke and Burton, 2020; 종 동정이 완료된 어란 시료를 혼합한 표본을 대상으로 HTS의 가능성을 확인한 첫 연구 사례)을 응용하였다. HTS는 동물플랑크톤의 종조성(Song *et al.*, 2021)이나 eDNA를 이용한 어류 종 탐사(Kim and Song, 2021)

에도 활용되고 있다. 우리는 HTS를 통해 확보한 혼합 어란의 대량 리드(reads)를 목표 종인 남방황성대의 COX1 참조염기서열(JN312126)에 매핑(mapping)하여 일치서열(consensus sequence) 3개를 작성하였다(Fig. 2; Table 3).

DNA 바코드 기반의 종 동정은 중간 종내 유전적 거리와 계통수 분석을 기본으로 한다(Kim *et al.*, 2008; Oh and Kim, 2015; Song *et al.*, 2021). 이와 같은 방법으로 본 연구에서 남방황성대와 유사한 3개의 일치서열(consensus sequence)과 황성대속의 COX1 maximum-likelihood tree를 분석하여 3개 일치서열이 남방황성대 염기서열(KU893057)이 포함된 계통군에 속함을 확인하였다(Fig. 3). 뿐만 아니라 종을 대표하는 각각의 계통군 내 평균 유전적 거리(0.0057 ± 0.0032)는 종 동정의 기준이 되는 계통군 간 평균 유전적 거리(0.1475 ± 0.0396)보다 적었다. 위의 두 결과를 종합하여 3개의 동일한 일치서열(consensus sequence)을 남방황성대로 결정하였다.

한편, 남방황성대(*P. liorhynchus*)로 기록된 염기서열 KU893057은 maximum-likelihood tree에서 황성대(*P. orientale*) 계통군에 속하였다(Fig. 3). 이 염기서열은 남방황성대와 황성대 두 계통군과의 유전적 거리가 각각 0.0247 ± 0.0045 와 0.0122 ± 0.0058 로 전자보다 후자와 유전적 유사성이 높았다. 남방황성대로 보고된 KU893057는 황성대의 종 동정 오류일 가능성이 높다.

HTS는 분석 효율을 높이기 위해 다양한 시료에 index 염기서열을 부착한 후 혼합하여 동시에 분석한다(Amplicon *et al.*, 2013). 이때 오염 발생 가능성이 있다(Ballenghien *et al.*, 2017). 뿐만 아니라 현미경을 이용한 어란 분리 과정에서 어란에서 유출된 DNA가 시료 간 오염을 일으킬 수 있다. 그러나 어란은 두꺼운 난막이 배아 세포를 감싸고 있어 난막에 손상이 가지 않는 한 DNA 유출은 없는 것으로 알려져 있다(Takeuchi *et al.*, 2019). 우리는 거제도 연안의 한 정점에서 수집한 어란 시료를 양분하여 2개 표본을 HTS한 결과에서 한 시료에서만 남방황성대 일치서열(consensus sequence)을 확인하였다. 이와 같은 결과는 어란 시료 처리과정의 오염은 물론 HTS 염기서열 분석 과정의 오류가 없음을 시사한다. 따라서 본 연구는 혼합 어란의 HTS 분석을 통해 3개 정점의 남방황성대 탐지 오류는 없는 것으로 판단된다.

본 연구에 사용한 혼합어란 시료는 부유생물 채집에 적합한 동물플랑크톤 네트로 수집하였다(Table 1). 이와 같은 시료 채집 정보로부터 남방황성대는 부유성 어란을 산란하는 종으로 추론이 가능하다. 아쉽게도 개별 어란 대신 어란을 혼합하여 추출한 gDNA로 HTS를 실시하였기 때문에 남방황성대 어란에 대한 형태 정보 추출은 불가능하였다.

남방황성대의 주 분포 해역은 대륙붕의 모래가 있는 저층이다(May and Maxwell, 1986). 본 연구 해역에서 조사 당시 표층과 저층의 염분은 큰 차이가 없었다(34.02 ± 0.68 psu; Table 3). 수온은 염분과 달리 표층과 저층은 물론 정점 간 차이가 컸다

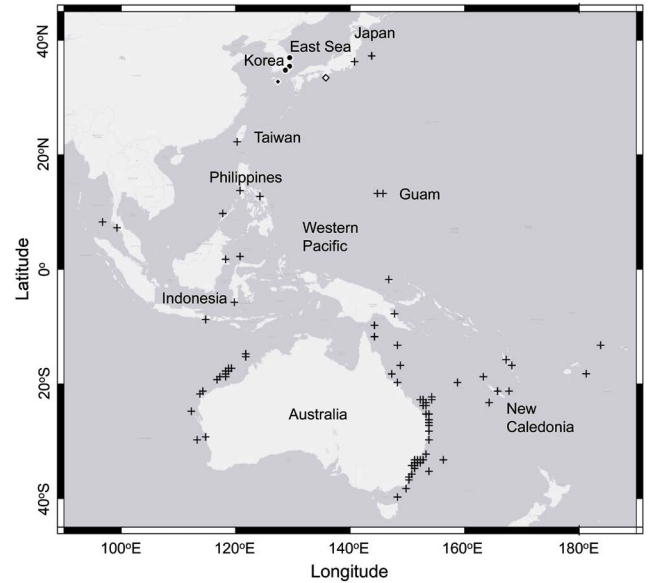


Fig. 4. Distributions of *Peristedion liorhynchus* eggs, larvae and adults in the Western Pacific. Closed circles, eggs (in this study); closed diamond, larva (Jang *et al.*, 2020); open diamond, larva (*Peristedion* sp.; Okiyama, 2014); and crosses, adults (FishBase; Kaschner *et al.*, 2019; Froese and Pauly, 2020).

($12.47 \pm 4.07^\circ\text{C}$). 자료가 축적되면 이 어종의 산란 선호 수온을 특정할 수 있을 것이다.

남방황성대는 서태평양의 남반구와 북반구에 걸쳐 광범위하게 분포한다(Fig. 4). 현재 한국 주변 해역에서 남방황성대의 성체 출현 기록은 없다(Jang *et al.*, 2020a; National list of species of Korea, 2020). 본 연구에서 발견한 동종의 어란(5월, 거제와 울진; 7월, 울산)과 자치어(5월, 제주도 동남부; Jang *et al.*, 2020a) 출현이 유일하다. 이들 어종의 최고 출현 위도는 본 연구의 어란이 출현한 울산(36.57°N)이었다. 남방황성대의 분포 한계인 남반구의 호주(39.75°S)와 북반구의 일본 태평양 연안(37.25°N), 어란과 자치어 출현을 고려하면(Fig. 4), 이 종은 한반도 주변 해역에서 산란은 물론 서식이 가능한 것으로 보인다.

요 약

한국 근해에서 희귀종 남방황성대(*Peristedion liorhynchus*) 치어의 출현은 이 종의 산란이나 성체의 유입 가능성을 암시한다. 우리는 2013, 2014, 2017년 5~8월 한국 연안의 123개 정점에서 수집한 어란 31,776개의 미토콘드리아 COX1 유전자에 대해 대용량 염기서열 분석(high-throughput sequencing, HTS)을 실시하였다. 확보한 21,621,874개 리드(reads)를 남방황성대(*P. liorhynchus*) COX1 참조염기서열(reference sequence)에 매핑(mapping)하여 이 종과 유전적 유사성이 높은 일치서열

(consensus sequence) (313 bp)을 거제도과 울진(5월), 울산(7월) 주변해에서 발견하였다. 이 일치서열은 황성대속 maximum-likelihood tree에서 남방황성대 계통군에 속하였다. 남방황성대 계통군의 평균 유전적 거리(0.0054 ± 0.0046)는 황성대속 내 계통군 간 평균 유전적 거리(0.1475 ± 0.0396)보다 적었다. 이는 HTS 기반의 혼합 어란 분석을 남방황성대와 같은 희귀종 모니터링에 적용할 수 있음을 시사한다.

사 사

본 논문은 한국해양과학기술원의 연구 과제(PEA0012)와 해양수산부와 해양환경공단이 주관하는 “국가해양생태계종합조사”의 자료를 이용하여 작성하였습니다. 국가해양생태계종합 조사는 매년 입찰에 의하여 조사 기관이 선정되므로 조사 연도에 따라 자료 생산 기관이 상이하여 연구자 및 조사 기관을 전부 특정할 수 없어 본 논문의 저자에서는 생략하였습니다. 본 과제의 현장 조사 및 시료 분석에 기여하신 다수의 연구자와 조사 선박을 운영하여 주신 분들께 감사드립니다.

REFERENCES

- Amplicon PCR, Clean-Up PCR and Index PCR. 2013. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf.
- Ballenghien, M., N. Faivre and N. Galtier. 2017. Patterns of cross-contamination in a multispecies population genomic project: detection, quantification, impact, and solutions. *BMC Biol.*, 15: 1-16.
- Choi, H.Y., J. Oh and S. Kim. 2018. Genetic identification of eggs from four species of Ophichthidae and Congridae (Anguilliformes) in the northern East China Sea. *PLoS One*, 13: e0195382.
- Clark, K., I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell and E.W. Sayers. 2016. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 44: D67-D72.
- Delrieu-Trottin, E., L. Liggins, T. Trnski, J.T. Williams, V. Neglia, C. Rapu-Edmunds, S. Planes and P. Saenz-Agudelo. 2018. Evidence of cryptic species in the blenniid *Cirripectes alboapicalis* species complex, with zoogeographic implications for the South Pacific. *Zookeys*, 810: 127-138.
- Duke, E.M. and R.S. Burton. 2020. Efficacy of metabarcoding for identification of fish eggs evaluated with mock communities. *Ecol. Evol.*, 10: 3463-3476.
- Froese, R. and D. Pauly. (eds). 2020. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (12/2020).
- Gloerfelt-Tarp, T. and P.J. Kailola. 1984. Trawled fishes of southern Indonesia and northwestern Australia. Australian Development Assistance Bureau (ADAB), Directorate General of Fisheries, Indonesia (DGF), and German Agency for Technical Cooperation (GTZ), Jakarta, 407.
- Han, S.H., M.J. Kim and C.B. Song. 2015. Molecular identification and distribution pattern of fish eggs collected around Jeju Island. *Korean J. Ichthyol.*, 27: 284-292.
- Harada, A.E., E.A. Lindgren, M.C. Hermsmeier, P.A. Rogowski, E. Terrill and R.S. Burton. 2015. Monitoring spawning activity in a southern California marine protected area using molecular identification of fish eggs. *PLoS One*, 10: e0134647.
- Hebert, P.D., A. Cywinska, S.L. Ball and J.R. Dewaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.*, 270: 313-321.
- Houde, E.D. 1987. Fish early life dynamics recruitment variability. *American Fisheries Society Symposium*, 2: 17-29.
- Ikedo, T., A. Hirai, S. Tabata, Y. Onishi and S. Mito. 2014. In: An atlas of early stage fishes in Japan. 2nd edition (Okiyama M. editor), 108 pp. Tokyo: Tokai University Press.
- Jang, S.H., J.K. Kim and H.J. Ryu. 2020a. Morphological description and molecular identification of juvenile *Peristedion liorhynchus* (Peristediidae, Pisces) from Jeju-do Island, Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 794-799.
- Jang, S.H., J.K. Kim and J.H. Ryu. 2020b. First report on the occurrence of eggs of the small yellow croaker *Larimichthys polyactis* from Chilsan-do Island, Jeollanam-do, Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 650-655.
- Jang, Y.S., K.Y. Kim and S. Kim. 2015. The complete mitochondrial genome of the Hwanghae Rockfish *Sebastes koreanus* (Scorpaenidae, Scorpaeniformes). *Mitochondrial DNA*, 26: 834-835.
- Kaschner, K., K. Kesner-Reyes, C. Garilao, J. Segschneider, J. Rius-Barile, T. Rees and R. Froese. 2019. AquaMaps: Predicted range maps for aquatic species. World Wide Web electronic publication, www.aquamaps.org, version 10/2019 (final).
- Kim, G. and Y. Song. 2021. Identification of freshwater fish species in Korea using environmental DNA technique—from the experiment at the freshwater fish ecological learning center in Yangpyeong, Gyeonggi Do. *J. Environ. Impact Assess.*, 30: 1-12.
- Kim, S., C.G. Kim, J. Oh, B.J. Kim, H.S. Seo, W.S. Kim and Y.H. Lee. 2008. Genetic similarity between the South Atlantic and the western North Pacific *Maurollicus* (Stomiiformes: Actinopterygii) taxa, *M. walvisensis* Parin & Kobylansky and *M. japonicus* Ishikawa: evidence for synonymy? *J. Fish. Biol.*, 72: 1202-1214.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evolution*, 35: 1547-1549.
- Leray, M., J.Y. Yang, C.P. Meyer, S.C. Mills, N. Agudelo, V. Ranwez, J.T. Boehm and R.J. Machida. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front. Zoology*, 10: 1-14.
- Lin, H.Y., M.Y. Chiu, Y.M. Shih, I.S. Chen and M.A. Lee. 2016. Species composition and assemblages of ichthyoplankton during

- summer in the East China Sea. *Cont. Shelf Res.*, 126: 64-78.
- May, J.L. and J.G.H. Maxwell. 1986. Trawl fish from temperate waters of Australia. CSIRO Division of Fisheries Research, Tasmania, 492.
- Monkolprasit, S., S. Sontirat, S. Vimolhokarn and T. Songsirikul. 1997. Checklist of fishes in Thailand. Office of environmental policy and planning, Bangkok, Thailand, 353.
- National list of species of Korea. 2020. National Institute of Biological Resources, online at <http://kbr.go.kr> accessed on February 21 2022.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Ochiai, A. and T. Yatou. 1984. Peristediidae. In: *The fishes of the Japanese Archipelago*. Masuda, H., K. Amaoka, C. Araga, T. Uyeno and T. Yoshino. Editors, Tokai University Press, Tokyo, Japan, 301-364.
- Oh, J. and S. Kim. 2015. Morphological and molecular characterization of separated pelagic eggs from *Lophius litulon* (Lophiiformes; Lophiidae). *J. Fish Biol.*, 86: 1887-1891.
- Okiyam, M. (Editor). 2014. *An atlas of early stage fishes in Japan*. 2nd edition. 1639pp. Tokyo: Tokai University Press.
- Paxton, J.R., J.E. Gates, D.J. Bray, M.F. Gomon and D.F. Hoese. 2006. Triglidae. armoured gurnards, armoured sea robins, gurnards, sea robins, searobins. In: *zoological catalogue of Australia*. Vol. 35. Fishes. Part 2. Actinopterygii: acanthopterygii (in part): mugiliformes to perciformes (Zoarcoidei to Labroidei). Hoese, D.F., D.J. Bray, J.R. Paxton and G.R. Allen. (Editors)., ABRS & CSIRO Publishing, Melbourne, Australia, pp. 921-930.
- Richards, W.J. 1999. Triglidae. In: *FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific*. Vol. 4. Bony Fishes Part 2 (Mugilidae to Carangidae). Carpenter, K.E. and V.H. Niem (Editors). FAO, Rome, Italy, pp. 2359-2382.
- Shao, K.T., J.S. Yang, K.C. Chen and Y.S. Lee. 2001. An identification guide of marine fish eggs from Taiwan. Institute of Zoology, Academia Sinica and Taiwan Power Company, 179.
- Song, C.U., H. Choi, M.S. Jeon, E.J. Kim, H.G. Jeong, S. Kim, C.G. Kim, H. Hwang, D.W. Purnaningtyas, S. Lee, S.I. Eyun and Y.H. Lee. 2021. Zooplankton diversity monitoring strategy for the urban coastal region using metabarcoding analysis. *Sci. Rep.*, 11: 1-13.
- Takeuchi, A., T. Iijima, W. Kakuzen, S. Watanabe, Y. Yamada, A. Okamura, N. Horie, N. Mikawa, M.J. Miller, T. Kojima and K. Tsukamoto. 2019. Release of eDNA by different life history stages and during spawning activities of laboratory-reared Japanese eels for interpretation of oceanic survey data. *Sci. Rep.*, 9: 1-9.
- 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. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Tsukamoto, K., S. Chow, T. Otake, H. Kurogi, N. Mochioka, M.J. Miller, J. Aoyama, S. Kimura, S. Watanabe, T. Yoshinaga, A. Shinoda, M. Kuroki, M. Oya, T. Watanabe, K. Hata, S. Ijiri, Y. Kazeto, K. Nomura and H. Tanaka. 2011. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nat. Commun.*, 2: 1-9.