

한국산 흑대기 *Paraplagusia japonica* (참서대과)의 형태 및 분자 마커에 의한 집단구조

박경현 · 김진구^{1,*}

국립수산과학원 생명공학과, ¹부경대학교 수산생명과학부 자원생물학전공

Population Structure of Korean *Paraplagusia japonica* (Cynoglossidae) Based on Morphological and Molecular Markers by Gyeong Hyun Park and Jin-Koo Kim^{1,*} (Biotechnology Research Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 46083, Republic of Korea; ¹Division of Fisheries and Life Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea)

ABSTRACT The cynoglossid fishes are popular for food in the world including Korea, China and Japan, and among them, *Paraplagusia japonica* lives all over the sea of Korea. In order to establish appropriate management measure, it is essential to clarify population structure of *P. japonica* from the morphological and molecular perspectives. We collected a total of 132 individuals of *P. japonica* from six localities in Korea between 2008 and 2021. Canonical discriminant analysis results showed that the West Sea population (Incheon) slightly differed from the South (Tongyeong, Busan) and East Sea populations (Pohang, Donghae, Sokcho). Similar results were also shown in Kruskal-Wallis test of meristic characters. Furthermore, neighbor-joining and maximum-likelihood trees based on 849 base pairs of mitochondrial DNA cytochrome *b* sequences showed that *P. japonica* was divided into two lineages (designated as A and B) with a high significance ($\Phi_{st}=0.0781$, $P<0.001$). Interestingly, however, the two lineages in the admixture area (South-East Sea) were not different in morphological characters. Our results suggest that *P. japonica* had undergone differentiated history during the Late Pleistocene, but secondary contact may occur at the admixture area.

Key words: *Paraplagusia japonica*, Cynoglossidae, population structure, cytochrome *b*, morphometric analysis

서 론

참서대과 어류는 한국을 포함하여 전 세계적으로 인기있는 식용 어류로 (Minami, 1982), 증가하는 소비량을 충족시키기 위해 양식기술개발이 진행중이나, 생식 조절, 산란 유도, 부화 조건 등 해결해야 할 과제가 많다 (An *et al.*, 2014). 그중 흑대기는 동중국해 및 서해에서 1964년에 약 1,200톤의 어획량에서 1976년부터 1994년까지 연간 어획량 약 100~300톤으로 급감하여 자원 관리의 중요성이 높아졌다 (Yamada *et al.*, 2007). 또한, 흑대기는 한국, 중국, 일본, 대만 등 북서태평양에 주로 서식

하는 종으로 (Shen, 1983; Masuda *et al.*, 1984; Ni and Kwok, 1999; Kim *et al.*, 2005), 다른 서대류와 달리 한국 전 해역에서 서식하는 특성상 (Kim *et al.*, 2019) 고기후조건에 따른 진화역사 연구의 흥미로운 대상종이 될 수 있다. 특히 흑대기는 후기자어 시기에 착저하여 짧은 부유 유생기를 지니며 (Minami, 1982) 사질 또는 진흙질의 저서 생활을 하여 성어기에 이동성이 적다 (Nakabo and Yamada, 2013). 저서 생활을 하는 어류는 낮은 분산 능력과 서식지에 대한 적응으로 인해 집단이 나눌 가능성이 있다는 이전 연구에 따라 (Kato *et al.*, 2020), 고기후조건뿐 아니라 생물특성에 따라 집단구조를 형성할 가능성이 높다. 집단구조 연구는 효율적인 자원관리 방안 마련에 중요한 기초자료로 제공될 수 있다 (Hutchings and Fraser, 2008; Reiss *et al.*, 2009). 종의 분포범위가 넓은 경우, 종의 합리적인 관리 수단을 강

저자 직위: 박경현 (석사후 인턴연구원), 김진구 (교수)
*Corresponding author: Jin-Koo Kim Tel: 82-51-629-5927,
Fax: 82-51-629-5931, E-mail: taengko@hanmail.net

구하기 위해 집단의 유전적 다양성이나 집단구조, 집단 간 유전적 교류 등에 대한 연구 수요가 점차 증가하고 있다(Waldman, 2005; Han *et al.*, 2008; Kim, 2009; Myoung and Kim, 2014). 해양생물의 집단구조에 영향을 미치는 요인으로 빙하기 전후의 해수면 변화 또는 수온과 같은 해양 환경 변화 등이 주목받고 있다. 빙하기에 해수면이 낮아지면서 종의 개체군이 고립되는 육교가 형성되는 사건이 발생하였다(Hewitt, 2000; Kaiser *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2011). 또는, 해류, 해양 순환, 해양 생물의 제한된 유생 분산, 행동학적 특성 등은 지역에 따라 현재의 유전적 차이를 발생시키는 원인으로 주목받기도 한다(Grant and Bowen, 1998; He *et al.*, 2015; Kato *et al.*, 2020). 이전 연구에서 고기후 변화 또는 현재의 해양조건 등으로 인해 한국 주변 해역에 서식하는 어종이 형태 및 유전적 증거에 따라 최소 2개의 집단으로 나뉜다는 연구보고가 있다(Kim *et al.*, 2008; Myoung *et al.*, 2016; Jang *et al.*, 2019).

미토콘드리아 DNA(mtDNA)는 핵 DNA에 비해 작고, 치환율이 높은 점에서 오랫동안 집단유전학 분야에서 사용되어 왔다(Brown *et al.*, 1982; Wilson *et al.*, 1985; Bartlett and Davidson, 1991; Buoncorsi *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2019). 특히 cytochrome *b* 영역은 중간, 종내 변이에 관한 유용한 정보를 모두 제공해 주는 점에서 집단 연구에 광범위하게 사용되었다(Grant and Bowen, 1998; Colborn *et al.*, 2001; Muss *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006a, 2007; Myoung *et al.*, 2016; Jang *et al.*, 2019). 한편, 어류는 태어나고 자란 곳의 환경 특성에 맞게 형태 변이가 발생하며(Park and Song, 2010; Choi *et al.*, 2013), 계수 및 계측 형질은 종내 지역 집단을 구분하는데 유용한 마커로 인식되어 왔다(Villaluz and MacCrimmon, 1988; Haddon and Willis, 1995; Silva, 2003; Kim, 2012). 따라서, 본 연구는 고기후 변화 또는 해역별 특징에 따라 종내 집단이 나뉜다는 이전 연구 결과에 따라 한국산 흑대기가 해역별로 집단이 나뉜다는 가설을 바탕으로 형태 및 유전변이를 분석하였다. 한국산 흑대기 자원의 효율적인 보존과 관리를 위한 기초 연구로 한국 전해역에서 채집된 흑대기의 형태 및 분자 변이 분석을 통해 집단의 구조를 파악하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험표본

총 132개체의 흑대기가 2008년에서 2021년까지 우리나라 6개 지역에서 채집되었다(Table 1; Figs. 1, 2): 서해의 인천(IC, 54개체), 남해의 통영(TY, 15개체)과 부산(BS, 17개체), 동해의 포항(PH, 12개체)과 동해(DH, 11개체), 속초(SC, 23개체). 근육 조직은 고정 전 무안측(blind side)에서 떼어내어 95% 에탄올에 보존하여 DNA 추출 전까지 -20°C 또는 상온에 보관하였다. 액침 표본은 10% 농도의 포르말린 수용액에 약 일주일 고정시킨 후, 흐르는 물에 세척하여 70% 농도 에탄올에 옮겨 부경대학교(PKU) 어류학실험실에 등록 및 보관하였다.

2. 형태 분석

6개 지역 집단의 132개체 중 근육 조직 7개체를 제외한 125개체의 형태 분석을 진행하였다: 서해의 인천(IC, 54개체), 남해의 통영(TY, 15개체)과 부산(BS, 12개체), 동해의 포항(PH, 11개체)과 동해(DH, 10개체), 속초(SC, 23개체).

계수형질은 등지느러미 연조 수(Dorsal fin rays, D), 배지느러미 연조 수(Pelvic fin rays, P₂), 뒷지느러미 연조 수(Anal fin rays, A), 꼬리지느러미 연조 수(Caudal fin rays, C), 척추골 수(Vertebrae, V), 측선 사이 비늘 수(Interlinear scale rows, ILS) 6개의 형질을 계수하였다. 척추골 수는 SoftX-ray(SOFTX HA-100, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 125개체 중 9개체는 배지느러미, 46개체는 비늘이 손상되어 배지느러미 연조 수와 측선 사이 비늘 수를 정확히 측정하지 못하였다. 계측형질은 전장(Total length, TL), 체장(Standard length, SL), 두장(Head length, HL), 체고(Body depth, BD), 문장(Snout length, SNL), 안경(Eye diameter, ED), 양안 간격(Interorbital width, IOW), 주둥이 끝부터 입까지의 거리(Distance between snout and mouth, STM), 입부터 아가미구멍까지의 거리(Distance between mouth and gill opening, MTG) 9개의 형질을 계측하였다. 형태 분석에 이용한 형질 선택 및 측정 방법은 Kim and Choi (1994)와 Nakabo and Yamada (2013)의 방법을 따랐으며

Table 1. *Paraplagusia japonica* specimens used in this study

Locality	Sampling date	Number of specimens	Standard length (cm)
Incheon, West Sea	2020~2021	54	20.9~32.6 (24.9)
Tongyeong, South Sea	2009~2021	15	23.2~30.5 (27.7)
Busan, South Sea	2013~2021	17	21.5~27.8 (23.8)
Pohang, East Sea	2008~2021	12	22.5~30.2 (26.7)
Donghae, East Sea	2018~2020	11	26.0~30.0 (28.2)
Sokcho, East Sea	2021	23	22.8~33.0 (27.8)

Values of mean in parentheses



Fig. 1. The specimen of *Paraplagusia japonica* (PKU 20415).

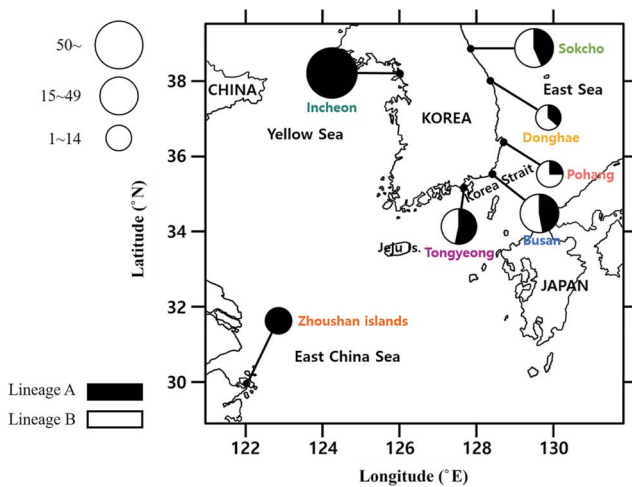


Fig. 2. Map of the sampling areas of *Paraplagusia japonica* in Korea. Distribution of lineages for cytochrome *b* sequences of *Paraplagusia japonica* populations. The area of circle is proportional to sample size.

Vernier calipers를 이용하여 0.01 mm 단위까지 측정하였다.

계수형질에 의한 형태 분석은 통계 프로그램 SPSS version

26을 이용하여 Kruskal-Wallis 비모수검정 (Zar, 1999)을 실시하였고, 계측형질은 동일 프로그램을 사용하여 정준판별분석 (CDA)과 독립표본 *t*-test를 실시하였다. 계측형질 값을 같은 비율의 작은 수로 바꾸어 왜도와 첨도를 줄여 정규성을 띠게 하기 위해 모든 계측형질 값을 로그값으로 변환하여 분석하였다.

3. DNA 추출, PCR 및 Sequencing

6개 지역 집단의 132개체의 분자 분석을 진행하였다: 서해의 인천 (IC, 54개체), 남해의 통영 (TY, 15개체)과 부산 (BS, 17개체), 동해의 포항 (PH, 12개체)과 동해 (DH, 11개체), 속초 (SC, 23개체). Genomic DNA는 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 추출하였다. Genomic DNA 추출 방법은 제조사 매뉴얼을 따랐다. 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 cytochrome *b* 영역은 *Paraplagusia japonica*-specific primers: PJ-Glu-F (5'-AAA CCT GTG GGC TGA AAA AC-3')와 PJ-Thr-R (5'-GCA GTA GGA AGG GGT TAC TC-3')를 이용하여 849 bp를 증폭하였다. 위 primer set는 흑대기 (Gen Bank Accession Number: NC021376)의 mitogenome 염기서

열을 기반으로 흑대기의 염기서열 증폭에 잘 작용하도록 직접 제작하였다. PCR 반응은 10X PCR buffer 2 μ L, dNTP 1.6 μ L, forward primer 0.5 μ L, reverse primer 0.5 μ L, TaKaRa Taq polymerase 0.1 μ L를 섞은 혼합물에 Genomic DNA 2 μ L를 첨가한 후, 총 20 μ L가 될 때까지 3차 증류수를 넣고 실험을 수행했다. Thermal Cycler (Bio-rad T100TM, USA)를 이용하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다: Initial denaturation 95°C, 3분; PCR reaction 34 cycles (Denaturation 95°C, 30초; Annealing 54°C, 45초; Extension 72°C, 1분 30초), Final extension 72°C, 7분. PCR 산물은 ABI PRISM 3730XL Analyzer (Applied Biosystems Inc., USA)에서 ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystem Inc., USA)를 이용하여 염기서열을 얻었다. 흑대기의 염기서열을 NCBI에 등록하였다(등록번호: OM718876-719007).

4. 자료 분석

mtDNA *cytb*의 염기서열은 BioEdit version 7 (Hall, 1999)의 CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 정렬하였고, 염기서열 간 유전 거리는 MEGA X (Kumar *et al.*, 2018)에서 Kimura-2-parameter 모델(Kimura, 1980)을 이용하여 계산했다. 지역 개체 간 유연관계를 확인하기 위해 neighbor-joining (NJ) 방법과 maximum-likelihood (ML) 방법으로 분지도를 작성하였다. NJ tree는 MEGA X (Kumar *et al.*, 2018)에서 bootstrap 1,000번 수행하여 작성하였다. ML tree의 가장 적합한 모델을 찾기 위하여 jModeltest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012)를 사용하였고, GTR+I+G 모델이 선택되었다. ML tree는 Mega X에서 bootstrap 1,000번으로 계통수를 지지하였다. 외집단으로 NCBI의 GenBank에 등록된 박대(*Cynoglossus semilaevis*)의 염기서열(*cytb* sequence: GenBank Accession Number, FJ786631)을 사용하였다. 또한, NCBI의 GenBank의 중국 Zhoushan islands, Zhejiang province의 흑대기 2개체(NC021376, JQ639066)의 염기서열을 얻어 분지도를 작성하였다. mtDNA 통계 분석은 DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) (Rozas *et al.*, 2017)와 Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010)를 이용하여 haplotype 수(N), 유전자형 다양성(haplotype diversity, *h*), 염기 다양성(nucleotide diversity, π), pairwise differences 평균 수(*k*)를 포함한 유전적 다양성을 측정하였다. 지역 간 또는 lineage 간 유전적 차이를 측정하기 위해 Arlequin 3.5를 이용하여 pairwise Φ_{st} 를 계산하였다. 또한, 채집 지역을 가장 최적의 방법으로 그룹화하기 위해 지리적 분포가 반영되는 AMOVA (Analysis of molecular variance) (Excoffier *et al.*, 1992)를 수행하였다. Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010)를 이용하여 F_u 's F_s 로 흑대기의 개체군 증대를 확인하고, mutation drift의 평형에 대한 증립성 검정은

Tajima's *D*로 확인하였다. 흑대기의 historical demography는 mismatch distribution (Rogers and Harpending, 1992)로 추정하였다. 추정된 demographic model의 유효성은 observed mismatch distribution과 estimated mismatch distribution 간의 검정된 통계적 SSD (sum of squared differences) (Schneider and Excoffier, 1999)의 분포로 확인하였다. Sudden expansion model에 따른 observed distribution과 expected distribution의 일치성은 Harpending's raggedness index (Harpending, 1994)와 SSD (sum of squared differences)로 평가하였다. 개체군 팽창 연대는 τ (time since expansion expressed in units of mutational time) (Li, 1997) 값과 $T = \tau/2u$ 의 식으로 계산하여 추정하였다. $u = \mu \times m_T$ 로 μ 는 돌연변이율(mutation rate)/site/세대 (generation)를 나타내고 m_T 는 염기서열의 뉴클레오티드 개수를 의미한다(Rogers and Harpending, 1992; Kim, 2012). 해양 어류의 *cytb* 영역의 보편적인 돌연변이율은 백만 년당 2%로, 흑대기의 lineage 분기 시기와 개체군 팽창 연대 추정에 사용되었다(Avise, 1994; Bowen *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2019).

결 과

1. 형태 분석

서해 54개체 (인천 54개체), 남해 27개체 (통영 15개체, 부산 12개체), 동해 44개체 (포항 11개체, 동해 10개체, 속초 23개체), 총 125개체의 지역 집단 간 계수형질 차이가 있는지 확인하기 위해 Kruskal-Wallis 비모수검정을 수행한 결과, 등지느러미 연조 수(D), 뒷지느러미 연조 수(A), 척추골 수(V), 측선 사이 비늘 수(ILS)에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 어떤 지역 집단 사이에 차이가 있는지 알아보기 위해 다중비교를 실시했고, 등지느러미 연조 수, 뒷지느러미 연조 수, 측선 사이 비늘 수는 인천과 나머지 5개 지역 집단 사이에 차이가 있고, 척추골 수는 인천과 나머지 5개 지역 집단, 동해와 나머지 5개 지역 집단 사이에 차이가 있는 것으로 나타났다($P < 0.05$) (Table 2).

정준판별분석(CDA) 결과, 각 지역 집단에 대한 결과는 정준판별함수 공분산행렬 유의확률이 $P < 0.001$ 로 통계적으로 유의미하지 않게 나타나, 가설에 따라 해역별(서해, 남해, 동해) 집단에 대한 분석을 실시하였다. 각 집단별 판별적중률은 동해 72.7%, 남해 66.7%, 서해 83.3%로 서해 집단이 다른 집단에 비해 높은 값을 나타냈고, 원래의 집단 케이스 중 총 76%가 올바르게 분류되었다. 두 개의 판별 함수를 생성했고, 제1판별함수(CAN1)의 고유치는 1.003, 기여율은 80.3%, 제2판별함수(CAN2)의 고유치는 0.246, 기여율은 19.7%로서, CAN1

Table 2. Kruskal-Wallis test for counts of *Paraplagusia japonica* among six localities

Characters	IC	TY	BS	PH	DH	SC
Dorsal fin rays	116.4 ^a	114.2 ^b	111.4 ^b	112.0 ^b	110.9 ^b	112.8 ^b
Anal fin rays	91.9 ^a	88.4 ^b	87.7 ^b	88.3 ^b	86.6 ^b	87.1 ^b
Pelvic fin rays	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a
Caudal fin rays	7.6 ^a	7.3 ^a	7.5 ^a	7.6 ^a	7.4 ^a	7.6 ^a
Vertebrae	55.2 ^a	53.9 ^b	53.0 ^b	53.0 ^b	51.1 ^c	53.2 ^b
Interlinear scale rows	19.1 ^a	16.9 ^b	17.2 ^b	17.1 ^b	17.5 ^b	17.0 ^b

Values and different superscript letters indicate means and significant difference ($P < 0.05$), respectively. IC, Incheon; TY, Tongyeong; BS, Busan; PH, Pohang; DH, Donghae; SC, Sokcho.

Table 3. Standardized canonical coefficients (CAN) based on 9 morphometric characters of three seas of *Paraplagusia japonica*

Measurements	Standardized canonical discriminant function coefficients		Structure matrix	
	CAN 1	CAN 2	CAN 1	CAN 2
Total length	0.339	-0.707	0.396	0.393
Standard length	-2.014	1.084	0.396	0.396
Head length	1.655	-0.248	0.485	0.370
Body depth	1.636	0.281	0.565	0.383
Snout length	-1.640	-0.422	0.201	0.407
Eye diameter	0.181	-0.242	0.479	-0.359
Interorbital width	-0.267	-1.093	0.281	0.221
Distance between snout and mouth	0.158	1.073	0.271	0.502
Distance between mouth and gill opening	0.375	0.348	0.570	0.366
Eigenvalues	CAN 1: 1.003		CAN 2: 0.246	
Proportions	CAN 1: 0.803		CAN 2: 0.197	
Cumulative values	CAN 1: 0.803		CAN 2: 1.000	

의 기여도가 높게 나타났다. 표준화된 정준판별함수 계수 (Standardized canonical discriminant function coefficients)는 CAN1에서는 체장 (-2.014)과 두장 (1.655), CAN2에서는 양안 간격 (-1.093)과 체장 (1.084)에서 큰 절대값을 나타내, 공통적으로 체장에서 큰 절대값을 나타냈다. 구조행렬 (structure matrix)은 CAN1에서는 입부터 아가미구멍까지의 거리 (0.570)와 체고 (0.565), CAN2에서는 주둥이 끝부터 입까지의 거리 (0.502)와 문장 (0.407)에서 큰 절대값을 나타냈다 (Table 3). CDA 결과 1축으로는 서해가 나머지 두 집단과 약간 구분되었고 2축으로는 모든 집단이 대부분 중첩되어 보였다 (Fig. 3).

2. 분자 분석

서해 54개체 (인천 54개체), 남해 32개체 (통영 15개체, 부산 17개체), 동해 46개체 (포항 12개체, 동해 11개체, 속초 23개체), 총 132개체의 cytochrome *b* (*cytb*) 영역 849 bp를 증폭하였다.

흑대기 132개체의 *cytb* sequences를 NJ와 ML 방법으로 계통수를 그렸을 때, Lineage A와 Lineage B로 구분되었다 (Fig. 4). 두 Lineage 사이의 유전 거리는 약 1.2%로 나타났다. 인천 지역 집단과 NCBI의 중국산 흑대기 2개체는 모두 Lineage A만 포함하였고, 통영, 부산, 포항, 동해, 속초 지역 집단은 Lineage A와 B 모두 포함하였다. Lineage B를 포함하는 지역 집단 중 통영을 제외한 나머지 지역 집단에서는 Lineage B를 Lineage A보다 많이 포함하여 50% 이상을 차지하는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

지역 집단 간 Φ_{st} 값은 인천 지역 집단과 나머지 지역 집단 사이에만 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 ($P < 0.01$). Φ_{st} 값은 인천 지역 집단과 부산 지역 집단 사이에서 가장 크게 나타났고 ($\Phi_{st} = 0.1026$, $P < 0.001$), 인천 지역 집단과 동해 지역 집단 사이에서 가장 작게 나타났다 ($\Phi_{st} = 0.0743$, $P < 0.01$) (Table 4).

AMOVA 분석은 가설에 따라 서해, 남해, 동해 해역 세 그룹으로 나누었을 때와, lineage 분포 등의 분자 분석 결과에 따라

서해와 남·동해 해역 두 그룹으로 나누었을 때 분석을 진행하였다. 세 그룹[(IC) vs (TY, BS) vs. (PH, DH, SC)]으로 나누었을 때, 세 그룹 간에 유의한 차이가 있는 것으로 확인되었다(29.71%, $P < 0.05$). 또한, 두 그룹[(IC) vs. (TY, BS, PH, DH, SC)]으로 나누었을 때, 두 그룹 간에도 유의한 차이가 있는 것으로 확인되었다(34.91%, $P < 0.001$). 앞서 세 그룹으로 나누었을 때보다, 두 그룹으로 나누었을 때 더 큰 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 5).

흑대기 132개체의 *cytb* 영역의 유전자형 다양성 (h)은 0.8791~0.9881로 나타났고, 염기 다양성 (π)은 0.0032~0.0077로 나타났다. 유전자형 다양성은 속초에서 가장 높게 나타났고(0.9881), 인천에서 가장 낮게 나타났다(0.8791). 염기 다양성은 포항과 속초에서 가장 높게 나타났고(0.0077), 인천에서 가

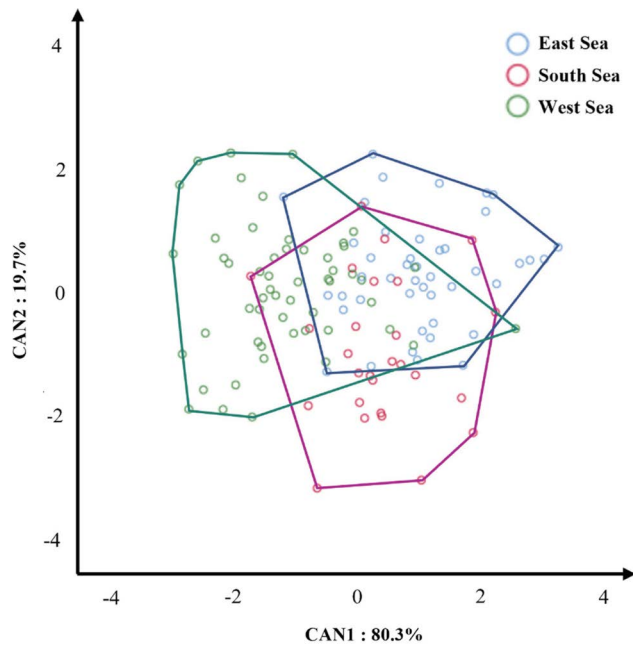


Fig. 3. Plots of canonical discriminant scores on the first and second canonical (CAN) axes among three seas of *Paraplagusia japonica*, based on 9 morphometric characters.

장 낮게 나타났다(0.0032). Lineage A의 유전자형 다양성은 0.9423, Lineage B의 유전자형 다양성은 0.9000로 나타났고, Lineage A의 염기 다양성은 0.0042, Lineage B의 염기 다양성은 0.0041로 두 Lineage의 유전적 다양성은 유사했다(Table 6).

지역 집단별, Lineage별 historical demography 분석 결과는 Table 7에 나타내었다. 지역 집단이 확장(expansion) 또는 평

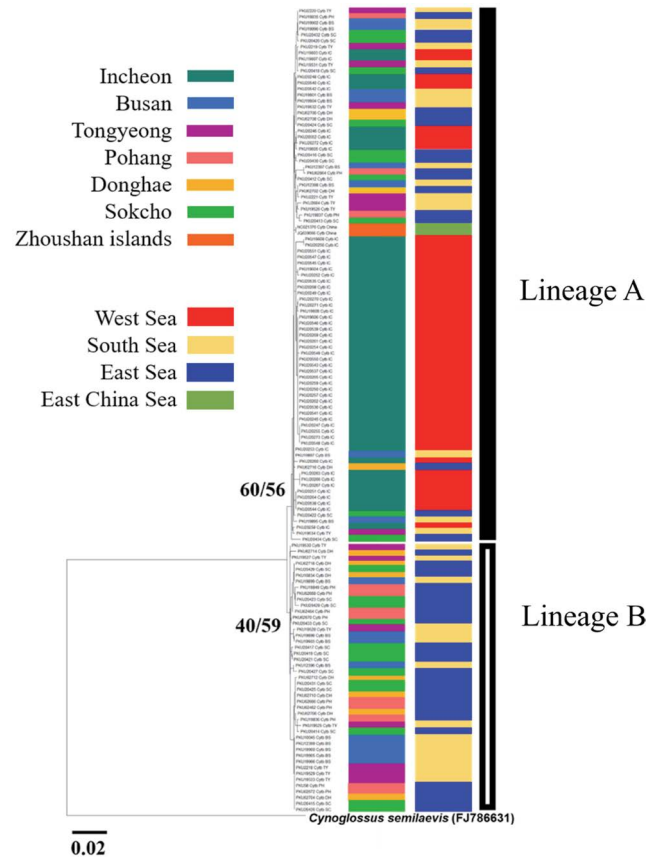


Fig. 4. The phylogenetic tree based on the neighbor-joining and maximum-likelihood for the cytochrome *b* sequences of 132 specimens. *Cynoglossus semilaevis* was chosen as an outgroup. The number on the node is bootstrap value (%) by 1,000 replicates in neighbor-joining and maximum-likelihood methods.

Table 4. Pairwise fixation index (Φ_{st}) values (below diagonal) and pairwise Φ_{st} P values (above the diagonal) for mtDNA cytochrome *b* among six localities.

Locality	Incheon	Tongyeong	Busan	Pohang	Donghae	Sokcho
Incheon		0.0020	0.0000	0.0029	0.0127	0.0000
Tongyeong	0.0775*		0.5625	0.5772	0.3213	0.2451
Busan	0.1026**	-0.0081		0.3301	0.4316	0.0635
Pohang	0.0807*	-0.0048	0.0053		0.3936	0.9463
Donghae	0.0743*	0.0072	0.0030	0.0031		0.6680
Sokcho	0.0669**	0.0045	0.0204	-0.0161	-0.0083	

*Significant, $P < 0.05$; **Significant, $P < 0.001$

Table 5. AMOVA results based on mtDNA cytochrome *b* sequences data for *Paraplagusia japonica*

Source of variation	Variance components	Percentage of variation	Fixation indices	<i>P</i>
Analysis 1 = (IC) vs. (TY, BS) vs. (PH, DH, SC)				
Among groups	1.01150	29.71	<i>F</i> _{ct} = 0.29711*	< .05
Among populations within groups	0.00957	0.28	<i>F</i> _{sc} = 0.00400	0.842
Within populations	2.38341	70.01	<i>F</i> _{st} = 0.29992**	< .001
Analysis 2 = (IC) vs. (TY, BS, PH, DH, SC)				
Among groups	1.30443	34.91	<i>F</i> _{ct} = 0.34915**	< .001
Among populations within groups	0.04822	1.29	<i>F</i> _{sc} = 0.01983	0.500
Within populations	2.38341	63.79	<i>F</i> _{st} = 0.36205**	< .001

IC, Incheon; TY, Tongyeong; BS, Busan; PH, Pohang; DH, Donghae; SC, Sokcho. *Significant, *P* < 0.05; **Significant, *P* < 0.001

Table 6. Genetic diversity indices based on mtDNA cytochrome *b* of six localities and two lineages

	<i>n</i>	<i>N</i>	<i>h</i>	π	<i>k</i>
Incheon	54	19	0.8791	0.0032	2.7030
Tongyeong	15	12	0.9619	0.0073	6.1714
Busan	17	10	0.9044	0.0070	5.9559
Pohang	12	10	0.9697	0.0077	6.5152
Donghae	11	9	0.9636	0.0071	6.0000
Sokcho	23	20	0.9881	0.0077	6.5455
Lineage A	87	40	0.9423	0.0042	3.5338
Lineage B	45	21	0.9000	0.0041	3.4263

n: number of samples; *N*: number of haplotypes; *h*: haplotype diversity; π (%): nucleotide diversity; *k*: mean pairwise difference

Table 7. Mismatch analysis and neutrality testing of mtDNA cytochrome *b* for six localities and two lineages

	τ	θ_0	θ_1	Raggedness index (<i>P</i>)	SSD (<i>P</i>)	Tajima's <i>D</i> (<i>P</i>)	Fu's <i>F</i> _s (<i>P</i>)
Incheon	3.469	0.007	9.004	0.02073 (0.80900)	0.00470 (0.61800)	-1.403 (0.068)	-9.161 (0.001)*
Tongyeong	6.879	1.316	16.960	0.00943 (0.99400)	0.00721 (0.86500)	0.466 (0.740)	-3.819 (0.039)*
Busan	8.207	0	16.296	0.15436 (0.02100)	0.06165 (0.02900)	-0.338 (0.417)	-0.944 (0.324)
Pohang	11.639	0.002	11.749	0.02342 (0.94200)	0.01580 (0.80000)	0.155 (0.607)	-2.709 (0.081)
Donghae	8.121	0	29.209	0.03967 (0.72100)	0.01700 (0.48800)	0.151 (0.602)	-2.226 (0.097)
Sokcho	8.627	0.002	20.508	0.01429 (0.83600)	0.01170 (0.46100)	-0.519 (0.327)	-11.692 (0.000)**
Lineage A	3.766	0.018	36.172	0.02117 (0.56700)	0.00236 (0.39500)	-1.836 (0.012)*	-26.147 (0.000)**
Lineage B	4.285	0	13.438	0.01871 (0.74900)	0.00535 (0.53400)	-0.935 (0.174)	-10.801 (0.001)*

τ : expansion parameter; θ_0 : mutation parameter before expansion; θ_1 : mutation parameter after expansion; SSD: sum of squared deviations, observation of a less good fit between the model and the observed distribution by chance, and Tajima's *D* and Fu's *F*_s, corresponding *P* value. **P* < 0.05; ***P* < 0.001

형 (equilibrium)을 따르는지 알기 위해 중립성 검정 (neutrality test)을 실시한 결과, Tajima's *D* 값은 인천, 부산, 속초 지역 집단에서 음의 값, 통영, 포항, 동해 지역 집단에서 양의 값을 나타냈지만 모두 통계적으로 유의하지 않았다. Fu's *F*_s 값은 모든 지역에서 음의 값을 나타냈고, 인천, 통영, 속초 지역 집단에서만 통계적으로 유의하였다. 지역 집단의 mismatch distribution은

인천 지역 집단만 단봉형의 분포 (unimodal distribution)를 나타냈고, 나머지 지역 집단은 양봉형의 분포 (bimodal distribution)를 나타냈다 (Fig. 5). 지역 집단이 sudden expansion model을 따르는지 검정하기 위해 SSD (sum of squared differences)의 *P* 값을 비교한 결과, 인천, 통영, 포항, 동해, 속초 지역 집단이 sudden expansion model을 따랐고 (인천 *P* = 0.618, 통영

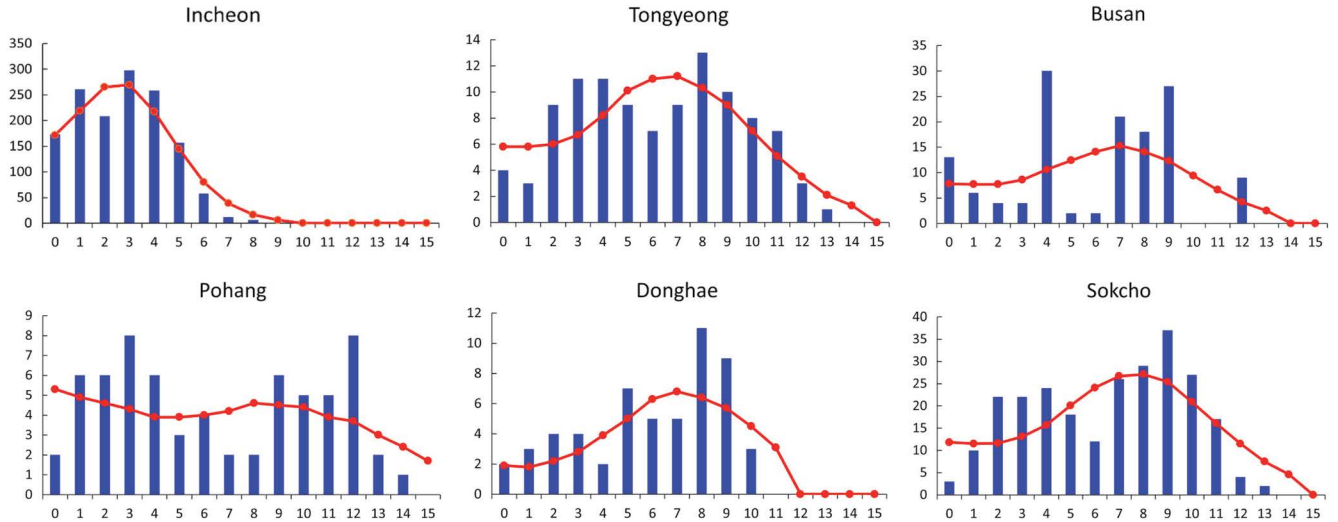


Fig. 5. Mismatch distribution from the mitochondrial DNA cytochrome *b* sequences from six localities. Bar: observed distributions; line: expected distributions from the sudden expansion model; x-axis: pairwise differences; y-axis: frequency.

$P=0.865$, 포항 $P=0.800$, 동해 $P=0.488$, 속초 $P=0.461$), 부산 지역 집단은 기각되었다($P=0.029$). Lineage별 중립성 검정 결과, Tajima's *D* 값은 두 Lineage 모두 음의 값을 나타냈지만, Lineage A에서만 유의한 것으로 나타났다. Fu's *F_s* 값은 두 Lineage 모두 유의한 음의 값을 나타냈다. SSD의 *P* 값을 확인한 결과, 마찬가지로 두 Lineage 모두 sudden expansion model을 따르는 것으로 확인되었다(Lineage A, $P=0.395$; Lineage B, $P=0.534$).

3. Lineage 간 형태 비교 분석

Lineage A와 Lineage B 사이에는 등지느러미 연조 수, 뒷지느러미 연조 수, 척추골 수, 측선 사이 비늘 수에서 유의한 차이를 보였고(Kruskal-Wallis test, $P<0.05$), 계측형질에서도 전장, 체장, 두장, 체고, 안경, 양안 간격, 입부터 아가미구멍까지의 거리에서 유의한 차이를 보였다(*t*-test, $P<0.05$). 서해 Lineage A와 남·동해 Lineage B 사이의 계수 및 계측형질을 비교한 결과도 같게 나타났다(Kruskal-Wallis test, $P<0.05$; *t*-test, $P<0.05$). 서해 Lineage A와 남·동해 Lineage A 사이에는 등지느러미 연조 수, 뒷지느러미 연조 수, 척추골 수, 측선 사이 비늘 수에서 흥미롭게도 유의한 차이를 보였고(Kruskal-Wallis test, $P<0.05$), 계측형질에서도 전장, 체장, 두장, 체고, 안경, 입부터 아가미구멍까지의 거리에서 유의한 차이를 보였다(*t*-test, $P<0.05$). 두 Lineage가 함께 출현한 남·동해 지역(통영, 부산, 포항, 동해, 속초)을 대상으로 Lineage A와 Lineage B 사이의 계수 및 계측형질을 비교한 결과 흥미롭게도 모든 형질에서 유의한 차이가 나타나지 않았다(Kruskal-Wallis test, $P>0.05$; *t*-test, $P>0.05$).

고 찰

본 연구에서는 한국 전 연안의 6개 지역에서 채집된 흑대기 132개체를 대상으로 형태와 분자 마커를 이용하여 처음으로 집단구조를 구명하였다. 우선 mtDNA *cytb* 염기서열 849 bp 분석 결과, 2개의 lineage로 구분되었으며($\Phi_{st}=0.0781$, $P<0.001$), 이는 한국산 흑대기가 최소 2개의 집단을 형성할 가능성을 시사한다(Evans *et al.*, 2010; Myoung and Kim, 2014). Pairwise Φ_{st} 가 0.05~0.15 수준이면 집단 간 약간 차이가 있고, 0.15~0.25 수준이면 상당한 차이가 있다고 보아, 본 연구에서 2개의 lineage는 집단 간 유의한 차이가 있다고 할 수 있다(Wright, 1978). 이전 연구에 따르면, 이러한 결과는 해수 온도나 해류의 영향 때문일 수 있다(Santos *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006b, Kim *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2013). Myoung *et al.* (2014)에서는 한국 서해 해역과 남해 해역 일부에서는 Lineage A만, 남·동해 해역에서는 Lineage A와 Lineage B가 모두 나타났으며 이는 수온과 같은 서식지의 특징 또는 해류의 영향 때문일 수 있다고 보고하였다. 또한, Kim *et al.* (2006b, 2010)과 Han *et al.* (2012)은 종내 지역 집단 간에 lineage가 형성되는 이유를 빙하기 동안 격리된 각 서식지에 대한 적응 결과로 보았다. Kato *et al.* (2020)은 고기후 변동과 함께 생물특성(낮은 분산 능력 등)을 원인으로 제안한 바 있다. 경골어류의 일반적인 mtDNA *cytb* 영역의 염기서열 분기율은 백만 년당 2%로, 흑대기의 두 lineage 사이의 분기 사건은 약 60만 년 전에 발생한 것으로 추정된다(Avise, 1994; Bowen *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2019). 플라이스토세 후기(The late Pleistocene period: the past 1 million years)에는 큰 빙하기와

간빙기 변화가 있었고(Imbrie *et al.*, 1992), 지난 80만 년 동안 빙하기 때 서해 지역 해수면은 현재보다 약 130 m 낮아져 동해는 고립되었다(Kitamura and Kimoto, 2006; Liu *et al.*, 2007). 이때, 두 lineage가 분기되고 Lineage A는 육지화되지 않은 태평양 해역에, Lineage B는 동해 해역에 고립된 것으로 보인다(Liu *et al.*, 2006b). 빙하기와 관련된 해수면과 수온, 염분 등의 차이는 lineage 분화를 견인한다는 이전 연구(Liu *et al.*, 2006b; Han *et al.*, 2012; Myoung and Kim, 2014)에 따라, 한국산 흑대기는 빙하기로 인한 동해의 고립으로 두 lineage로 분화되었을 것으로 추정된다. Umino *et al.* (2009)에서 보고된 바, 수온, 염도와 같은 물리적 장벽과 해류의 영향은 유전자 흐름에 제한을 둘 수 있다. 우리나라와 일본의 점망둑(*Chaenogobius annularis*) 계군 구조에 대한 연구에 따르면, 플라이스토세의 빙하기 때 3개의 clade가 형성되었고 점망둑의 낮은 분산 능력과 서식지에 대한 적응으로 인해 빙하기가 끝난 이후에도 고립이 지속되었다고 보고되었다(Kato *et al.*, 2020). 한국산 흑대기의 Lineage A는 빙하기가 끝난 이후 쿠로시오 해류와 쓰시마난류의 흐름에 따라 서해와 남해, 동해로 분산된 것으로 사료된다. 하지만 Lineage B는 동해 쪽으로 강하게 흐르는 동한난류의 영향과 고립된 동해에서 적응한 서식지 특징에 따라 서해까지 분산되지 못한 것으로 보인다(Kim *et al.*, 2010). 그로 인해, 인천과 동중국해 지역 집단에서는 Lineage B가 나타나지 않은 것으로 추정된다. τ 값을 식에 대입하여 개체군 팽창 연대를 계산해보면 Lineage A는 102,149년 전, Lineage B는 342,726년 전에 개체군 팽창이 이루어졌음을 알 수 있다. 즉, 한국산 흑대기는 빙하기 때 유효 개체군 크기가 작아진 이후 간빙기에 회복하여 sudden population expansion을 겪었을 가능성이 있다(Santos *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010). 인천 지역 집단의 유전자형 다양성과 염기 다양성은 다른 지역 집단에 비해 낮게 나타났는데, Lineage A와 Lineage B의 유전적 다양성은 유사하게 나타났다. 따라서, 인천 지역 집단의 유전적 다양성이 낮은 이유는 Lineage A와 Lineage B가 혼재하는 다른 지역 집단과 달리 Lineage A만 존재하기 때문인 것으로 사료된다.

수온, 염분, 해류 등과 같은 환경적 요인과 유전적 요인은 어류의 형태에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Hubbs, 1922; Vladykov, 1934; Lindsey, 1988; Swain and Foote, 1999). 본 연구에서 두 lineage는 대부분의 계수 및 계측형질에서 잘 구분되었다. 따라서 한국산 흑대기는 lineage 분기 이후 각 서식지의 수온, 염분 등 특정 환경에 적응하며 유전적 영향과 함께 형태 형질의 지리적 변이를 나타낸 것으로 보인다. 서해 Lineage A와 남·동해 Lineage B는 전체 Lineage A와 B 사이의 결과와 마찬가지로, 계수와 계측형질에서 유의한 차이를 보여 유전 결과를 잘 반영해 주는 것이라 사료된다. 그러나 서해와 남·동해 Lineage A 사이에서 확인된 형태적 차이는 유전적 영향보다 환경적 영향이 더 클 수 있음을 의미한다. 또한, 남·동해에서 동시

에 출현한 Lineage A와 B 사이의 형태적 유사성은 그들 사이의 유전적 장벽이 형성되기에 분화 역사가 충분히 길지 않았음을 시사한다. 이와 유사하게 삼세기(*Hemipteris villosus*)는 유전적으로 서해 집단만 구분된 반면, 형태적으로는 동해 집단만 구분되어(Jang *et al.*, 2019), mtDNA에 의한 과거 역사와 형태에 의한 현재 역사 사이의 차이를 확인할 수 있다. Grant and Utter (1984)에 따르면, 형태학적 데이터가 단기적이고 환경적인 요인에 의해 유발된 어류의 변동을 탐지하는 데 더 유용하다고 알려져 있다. 따라서, 인천 지역 집단의 Lineage A 개체들은 남동해에 서식하는 Lineage A 개체들과 유전적인 차이는 미미하지만, 환경적 영향 등으로 인해 형태학적으로 차이가 발생하였을 수 있다. 반면, 서로 다른 lineage이지만 남·동해 해역에서 Lineage A와 Lineage B는 형태형질에서 유의한 차이가 없었다. 이는 남해와 동해에 서식하는 두 lineage 간에 2차접촉이 일어났을 가능성을 시사한다. 두 lineage 간의 2차접촉을 직접적으로 확인하기 위해서는 microsatellite와 같은 더 민감한 DNA marker를 이용한 추후 연구가 필요하다(Kai *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017). 지역 집단 간 형태 분석에서 동해 지역 집단이 척추골 수에서 인천 지역 집단을 포함한 다른 지역 집단과 유의한 차이를 보였다. 나머지 형태 형질에서는 동해가 남·동해 지역의 다른 지역 집단과 유의한 차이가 없는 것으로 보아 동해 지역 집단의 개체수가 11개로 가장 적어, 개체수에 따른 통계적인 오류가 발생하였을 가능성이 있다.

본 연구를 통해 발견한 중요한 사실을 요약하면 다음과 같다. 첫째, 한국산 흑대기는 형태 및 유전적 차이로 2개의 lineage로 나뉘는 것을 확인하였다. 둘째, 서해(인천)에서는 Lineage A만 존재하고, 남해(통영, 부산)와 동해(포항, 동해, 속초)에서는 Lineage A, B 모두 존재하는 것으로 나타났다. 따라서, 인천 지역 집단은 별도의 자원 관리 단위가 필요할 것으로 사료된다. 특히 인천 지역 집단은 Lineage A만이 존재하고 다른 지역 집단에 비해 유전적 다양성이 낮게 나타나, 자원 상태를 안정적으로 유지하기 위해 산란기 친어를 보호하거나 포획금지제장과 같은 수산업법상 규제가 필요할 것으로 생각된다. 셋째, 남해와 동해의 두 lineage는 계수 및 계측 형질에서 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다. 이는 남·동해 지역의 두 lineage 간에 2차접촉의 가능성을 시사하는 것으로 단일의 관리 단위로 볼 수 있으나, 2차접촉의 보다 확실한 증거를 확보하기 위해 남·동해 지역 집단을 대상으로 microsatellite 또는 SNP와 같은 추가적인 연구가 필요하다.

요 약

참서대와 어류는 한국, 중국, 일본 등 전 세계적으로 식용으로 인기가 있으며, 그중에서도 흑대기(*Paraplagusia japonica*)는

한국 전 해역에 서식한다. 적절한 관리방안 수립을 위해서는 형태학적, 분자적 관점에서 흑대기의 집단구조를 명확히 하는 것이 필수적이다. 본 연구에서는 2008년부터 2021년까지 국내 6개 지역에서 총 132개체의 흑대기를 채집했다. 계측 형질에서 정준 판별분석(CDA) 결과 서해(인천) 집단은 남해(통영·부산)와 동해(포항·동해·속초) 집단과 약간 차이가 있는 것으로 나타났다. 계측 형질에 대한 Kruskal-Wallis test에서도 유사한 결과가 나타났다. 또한, 미토콘드리아 DNA Cytochrome *b* 염기서열 849 bp를 기반으로 한 neighbor-joining과 maximum-likelihood tree는 흑대기가 높은 유의성($\Phi_{st} = 0.0781$, $P < 0.001$)을 갖는 두 lineage (A와 B로 지정)로 나뉘어져 있음을 보여주었다. 그러나 흥미롭게도 혼합 해역(동남해)의 두 lineage는 형태학적 특징에서 유의한 차이가 없었다. 본 연구 결과는 한국산 흑대기가 플라이스토세 후기 동안 분화된 역사를 겪었으나, 혼합 해역에서 2차 접촉이 발생할 수 있다는 가능성을 시사한다.

사 사

논문을 세심하게 검토해주신 심사위원 세 분께 감사드립니다. 또한, 시료 확보에 도움을 준 최시원, 김이정, 이유진에게도 감사의 말을 전합니다. 이 논문은 2022년 국립해양생물자원관(2022M01100)의 재원으로 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- An, H.S., H.W. Kang, H.S. Han, J.Y. Park, J.I. Myeong and C.M. An. 2014. Population genetic structure of the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) in Korea based on multiplex PCR assays with 12 polymorphic microsatellite markers. *Genes. Genom.*, 36: 539-549. <https://doi.org/10.1007/s13258-014-0190-0>.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall Press, New York, U.S.A., p. 511.
- Bartlett, S.E. and W.S. Davidson. 1991. Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of mitochondrial cytochrome *b* genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 309-317. <https://doi.org/10.1139/f91-043>.
- Bowen, B.W., A. Muss, L.A. Rocha and W.S. Grant. 2006. Shallow mtDNA coalescence in Atlantic pygmy angelfishes (Genus *Centropyge*) indicates a recent invasion from the Indian Ocean. *J. Hered.*, 97: 1-12. <https://doi.org/10.1093/jhered/esj006>.
- Brown, W.M., E.M. Prager, A. Wang and A.C. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, 18: 225-239. <https://doi.org/10.1007/BF01734101>.
- Buonaccorsi, V.P., J.R. McDowell and J.E. Graves. 2001. Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Mol. Ecol.*, 10: 1179-1196. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01270.x>.
- Choi, K.H., E.Y. Chung and G.M. Park. 2013. Phylogenetic relationship and DNA polymorphism of *Boleophthalmus pectinirostris* and *Scartelaos gigas* (Teleostei: Gobiidae) of Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 25: 149-156.
- Colborn, J., R.E. Crabtree, J.B. Shaklee, E. Pfeiler and B.W. Bowen. 2001. The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula* spp.): Cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. *Evol.*, 55: 807-820. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00816.x>.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*, 9: 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- Evans, R.D., L. Van Herwerden, G.R. Russ and A.J. Frisch. 2010. Strong genetic but not spatial subdivision of two reef fish species targeted by fishers on the Great Barrier Reef. *Fish. Res.*, 102: 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2009.10.002>.
- Excoffier, L., P.E. Smouse and J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genet.*, 131: 479-491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>.
- Excoffier, L. and H.E. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10: 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.
- Grant, W.S. and B.W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.*, 89: 415-426. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>.
- Grant, W.S. and F.M. Utter. 1984. Biochemical population genetics of Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 856-864. <https://doi.org/10.1139/f84-102>.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Haddon, M. and T.J. Willis. 1995. Morphometric and meristic comparison of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*, Trachichthyidae) from the Puysegur Bank and Lord Howe Rise, New-Zealand, and its implications for stock structure. *Mar. Biol.*, 123: 19-27. <https://doi.org/10.1007/BF00350319>.
- Han, Z.Q., T.X. Gao, T. Yanagimoto and Y. Sakurai. 2008. Deep phylogeographic break among white croaker *Pennahia argentata* (Sciaenidae, Perciformes) populations in North-western Pacific. *Fish. Sci.*, 74: 770-780. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01588.x>.
- Han, Z., T. Yanagimoto, Y. Zhang and T. Gao. 2012. Phylogeography study of *Anmodytes personatus* in Northwestern Pacific: Pleistocene isolation, temperature and current conducted second-

- ary contact. PLoS ONE, 7: e37425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037425>.
- Harpending, R.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Hum. Biol., 66: 591-600.
- He, L., T. Mukai, C.K. Hou, Q. Ma and J. Zhang. 2015. Biogeographical role of the Kuroshio Current in the amphibious mudskipper *Periophthalmus modestus* indicated by mitochondrial DNA data. Sci. Rep., 5: 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep15645>.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature, 405: 907-913. <https://doi.org/10.1038/35016000>.
- Hong, S.E., J.K. Kim, J.N. Yu, K.Y. Kim, C.I. Lee, K.E. Hong, K.Y. Park and M.G. Yoon. 2012. Genetic variation in the Asian shore crab *Hemigrapsus sanguineus* in Korean coastal waters as inferred from mitochondrial DNA sequences. Fish. Aquat. Sci., 15: 49-56. <https://doi.org/10.5657/FAS.2012.0049>.
- Hubbs, C.L. 1922. Variations in the number of vertebrae and other meristic characters of fishes correlated with the temperature of water during development. Am. Nat., 56: 360-372. <https://doi.org/10.1086/279875>.
- Hutchings, J.A. and D.J. Fraser. 2008. The nature of fisheries and farming induced evolution. Mol. Ecol., 17: 294-313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03485.x>.
- Imbrie, J., E.A. Boyle, S.C. Clemens, A. Duffy, W.R. Howard, G. Kukla, J. Kutzbach, D.G. Martinson, A. McIntyre, A.C. Mix, B. Molino, J.J. Morley, L.C. Peterson, N.G. Pisias, W.L. Prell, M.E. Raymo, N.J. Shackletons and J.R. Toggweiler. 1992. On the structure and origin of major glacial cycles. I. Linear responses to Milankovich forcing. Paleoceanogr., 7: 701-738.
- Jang, S.H., J.W. Lee and J.K. Kim. 2019. Molecular and morphometric variations in the sea raven, *Hemitripteris villosus* from Korea, with its implication on fisheries management. Ocean Sci. J., 54: 419-433. <https://doi.org/10.1007/s12601-019-0021-y>.
- Kai, Y., K. Sakai, J.W. Orr and T. Nakabo. 2011. Secondary contact in the Sea of Japan: the case of the *Careproctus rastrinus* species complex (Liparidae). Ichthyol. Res., 58: 366-369. <https://doi.org/10.1007/s10228-011-0226-2>.
- Kaiser, T.S., D. Neumann, D.G. Heckel and T.U. Berendonk. 2010. Strong genetic differentiation and postglacial origin of populations in the marine midge *Clunio marinus* (Chironomidae, Diptera). Mol. Ecol., 19: 2845-2857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04706.x>.
- Kato, S., S. Arakaki, K. Kikuchi and S. Hirase. 2020. Complex phylogeographic patterns in the intertidal goby *Chaenogobius annularis* around Kyushu Island as a boundary zone of three different seas. Ichthyol. Res., 68: 86-100. <https://doi.org/10.1007/s10228-020-00772-4>.
- Kim, E.A. 2012. Morphological and genetic variation of geographic populations of mud skipper, *Scartelaos gigas* and *Boleophthalmus pectinirostris* from Korea. Pukyong National Univ. Press, Busan, Korea, pp. 1-73.
- Kim, I.S. and Y. Choi. 1994. A taxonomic revision of the family Cynoglossidae (Pisces, Pleuronectiformes) from Korea. Bull. Korean Fish. Soc., 27: 803-813.
- Kim, I.S., Y. Choi, C.L. Lee, Y.J. Lee, B.J. Kim and J.H. Kim. 2005. Illustrated book of Korean fishes. Kyo-Hak Press, Seoul, Korea, p. 615.
- Kim, J.K. 2009. Diversity and conservation of Korean marine fishes. Korean J. Ichthyol., 21: 52-62.
- Kim, J.K., R. Doiuchi and T. Nakabo. 2006a. Molecular and morphological differences between two geographic populations of *Salanx ariakensis* (Salangidae) from Korea and Japan. Ichthyol. Res., 53: 52-62. <https://doi.org/10.1007/s10228-005-0315-1>.
- Kim, J.K., J.Y. Park and Y.S. Kim. 2006b. Genetic diversity, relationships and demographic history of three geographic populations of *Ammodytes personatus* (Ammodytidae) from Korea inferred from mitochondrial DNA control region and 16S rRNA sequence data. Kor. J. Genet., 28: 343-351.
- Kim, J.K., J.H. Park, Y.S. Kim, Y.H. Kim, H.J. Hwang, S.J. Hwang, S.I. Lee and T.I. Kim. 2008. Geographic variations in Pacific sand eels *Ammodytes personatus* (Ammodytidae) from Korea and Japan using multivariate morphometric analysis. J. Ichthyol., 48: 904-910. <https://doi.org/10.1134/S003294520810007X>.
- Kim, J.K., S.E. Bae, S.J. Lee and M.G. Yoon. 2017. New insight into hybridization and unidirectional introgression between *Ammodytes japonicus* and *Ammodytes heian* (Trachiniformes, Ammodytidae). PLoS ONE, 12: e0178001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178001>.
- Kim, J.K., J.H. Ryu, H.J. Kwun, H.S. Ji, J.H. Park, S.H. Myoung, Y.S. Song, S.J. Lee, H.J. Yu, S.E. Bae, S.H. Jang and W.J. Lee. 2019. Distribution map of sea fishes in Korean peninsula. Ministry of Oceans and Fisheries, Korea Institute of Marine Science and Technology Promotion, and Pukyong National Univ. Press, Seocho and Busan, Korea, p. 486.
- Kim, W.J., K.K. Kim, H.S. Han, B.H. Nam, Y.O. Kim, H.J. Kong, J.K. Noh and M. Yoon. 2010. Population structure of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Korea inferred from microsatellite marker analysis. J. Fish. Biol., 76: 1958-1971. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02638.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Kitamura, A. and K. Kimoto. 2006. History of the inflow of the warm Tsushima Current into the Sea of Japan between 3.5 and 0.8 Ma. Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol., 236: 355-366. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2005.11.015>.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol., 35: 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

- Li, W.H. 1997. Molecular Evolution. Sinauer Associates Press, Massachusetts, U.S.A., 432 pp.
- Lindsey, C.C. 1988. Factors controlling meristic variation. In: Hoar, W.S. and D.J. Randall (eds.) Fish Physiology. Academic Press, Cambridge, U.S.A., pp. 197-234.
- Liu, J.X., T.X. Gao, K. Yokogawa and Y.P. Zhang. 2006a. Differential population structuring and demographic history of two closely related fish species, Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) in Northwestern Pacific. Mol. Phylogenet. Evol., 39: 799-811. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.01.009>.
- Liu, J.X., T.X. Gao, Z.M. Zhuang, X.S. Jin, K. Yokogawa and Y.P. Zhang. 2006b. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*). Mol. Phylogenet. Evol., 40: 712-723. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.04.019>.
- Liu, J.X., T.X. Gao, S.F. Wu and Y.P. Zhang. 2007. Pleistocene isolation in the Northwestern Pacific marginal seas and limited dispersal in a marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck and Schlegel, 1845). Mol. Ecol., 16: 275-288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03140.x>.
- Liu, S.Y.V., T. Kokita and C.F. Dai. 2008. Population genetic structure of the neon damselfish (*Pomacentrus coelestis*) in the northwestern Pacific Ocean. Mar. Biol., 154: 745-753.
- Masuda, H., K. Amaoka, C. Araga, T. Uyeno and T. Yoshino. 1984. The fishes of the Japanese Archipelago. Vol. 1. Tokai Univ. Press, Tokyo, Japan, p. 437.
- Minami, T. 1982. The early life history of a tongue fish *Paraplagusia japonica*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 48: 1041-1046.
- Muss, A., D.R. Robertson, C.A. Stepien, P. Wirtz and B.W. Bowen. 2001. Phylogeography of *Ophioblennius*: The role of ocean currents and geography in reef fish evolution. Evol., 55: 561-572. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00789.x>.
- Myoung, S.H., T.W. Ban and J.K. Kim. 2016. Population structure of *Liparis tanakae* (PISCES, Liparidae) from Korea based on morphological and molecular traits. Korean J. Fish. Aquat. Sci., 49: 198-207. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0198>.
- Myoung, S.H. and J.K. Kim. 2014. Genetic diversity and population structure of the gizzard shad, *Konosirus punctatus* (Clupeidae, Pisces), in Korean waters based on mitochondrial DNA control region sequences. Genes. Genom., 36: 591-598. <https://doi.org/10.1007/s13258-014-0197-6>.
- Nakabo, T. and U. Yamada. 2013. Family Cynoglossidae. In: Nakabo, T. (ed.), Fishes of Japan with pictorial keys to the species, 3rd ed. Tokai Univ. Press, Tokyo, Japan, p. 1388.
- Ni, I.H. and K.Y. Kwok. 1999. Marine fish fauna in Hong Kong waters. Zool. Stud., 38: 130-152.
- Park, G.M. and H.B. Song. 2010. Phylogenetic divergence in the south torrent catfish, *Liobagrus mediadiposalis* (Pisces; Amblycipitidae) of Korea. J. Fisher. Soc. Taiwan, 37: 173-181. <https://doi.org/10.29822/JFST.201009.0002>.
- Peng, S., Z. Shi, J. Hou, W. Wang, F. Zhao and H. Zhang. 2009. Genetic diversity of silver pomfret (*Pampus argenteus*) populations from the China Sea based on mitochondrial DNA control region sequences. Biochem. Syst. Ecol., 37: 626-632.
- Reiss, H., G. Hoarau, M. Dickey-Collas and W.J. Wolff. 2009. Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. Fish. Fish., 10: 361-395. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00324.x>.
- Rogers, A.R. and H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Mol. Biol. Evol., 9: 552-569. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040727>.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J.C. Sanchez-DelBarro, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins and A. Sanchez-Gracia. 2017. DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. Mol. Biol. Evol., 34: 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
- Santos, S., T. Hrbek, I.P. Farias, H. Schneider and I. Sampaio. 2006. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. Mol. Ecol., 15: 4361-4373.
- Santos, S., H. Schneider and I. Sampaio. 2003. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. Genet. Mol. Biol., 26: 151-161.
- Schneider, S. and L. Excoffier. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. Genet., 152: 1079-1089. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.3.1079>.
- Shen, K.N., B.W. Jamandre, C.C. Hsu, W.N. Tzeng and J.D. Durand. 2011. Plio-Pleistocene sea level and temperature fluctuations in the northwestern Pacific promoted speciation in the globally distributed flathead mullet *Mugil cephalus*. BMC Evol. Biol., 11: 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-83>.
- Shen, S.C. 1983. Cynoglossid fishes (Pleuronectiformes: Cynoglossidae) of Taiwan. Bull. Inst. Zool. Academia Sinica, 22: 105-118.
- Silva, A. 2003. Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. ICES J. Mar. Sci., 60: 1352-1360. [https://doi.org/10.1016/S1054-3139\(03\)00141-3](https://doi.org/10.1016/S1054-3139(03)00141-3).
- Swain, D.P. and C.J. Foote. 1999. Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. Fish. Res., 43: 113-128. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(99\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(99)00069-7).
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Umino, T., T. Kajihara, H. Shiozaki, T. Ohkawa, D.S. Jeong and K. Ohara. 2009. Wild stock structure of *Girella punctata* in Japan revealed shallow genetic differentiation but subtle substructure.

- ture in subsidiary distributions. *Fish. Sci.*, 75: 909-919. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0118-9>.
- Villaluz, A.C. and H.R. Maccrimmon. 1988. Meristic variations in milkfish *Chanos chanos* from Philippine waters. *Mar. Biol.*, 97: 145-150. <https://doi.org/10.1007/BF00391254>.
- Vladykov, V.D. 1934. Environmental and taxonomic characters of fishes. *Trans. Roy. Can. Inst.*, 20: 99-140.
- Waldman, J.R. 2005. Definition of Stocks. In: Cadrin S.X., K.D. Friedland and J.R. Waldman (eds.), *Stock Identification Methods*. Academic Press, Cambridge, U.S.A., pp. 7-16.
- Wilson, A.C., R.L. Cann, S.M. Carr, M. George, U.B. Gyllensten, K.M. Helm-Bychowski, R.G. Higuchi, S.R. Palumbi, E.M. Prager, R.D. Sage and M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.*, 26: 375-400. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1985.tb02048.x>.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations*. Chicago Univ. Press, Chicago, U.S.A., p. 590.
- Yamada, U., M. Tokimura, H. Horikawa and T. Nakabo. 2007. *Fishes and fisheries of the East China and Yellow Seas*. Tokai Univ. Press, Tokyo, Japan, p. 1139.
- Yoon, M.G., J.Y. Jung and D.S. Kim. 2013. Genetic diversity and gene flow patterns in *Pollicipes mitella* in Korea inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. *Fish. Aquat. Sci.*, 16: 243-251. <https://doi.org/10.5657/FAS.2013.0243>.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Pearson Prentice Hall Press, New Jersey, U.S.A., p. 960.