

미토콘드리아 Cytb 유전자를 이용한 잔가시고기의 신규 서식지 고령 회천 집단의 유전적 다양성 분석

김강래 · 성무성¹ · 황유진 · 이명석 · 정주희 · 김희수 · 유정남*

국립낙동강생물자원관, ¹물들이연구소

Analysis of Genetic Diversity across Newly Occupied Habitats within the Goryeong Population of *Pungitius kaibarae* Using the Mitochondrial Cytb Gene by Kang-Rae Kim, Mu-Sung Sung¹, Yujin Hwang, Myeong Seok Lee, Ju Hui Jeong, Heesoo Kim and Jeong-Nam Yu* (Animal & Plant Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Republic of Korea; ¹Muldeli Research, Icheon 17345, Republic of Korea)

ABSTRACT The 886-bp sequence of the mitochondrial region encoding the cytb gene was used to identify the origin of the Goryeong (GR) population of *Pungitius kaibarae* and to characterize genetic diversity and structure among wild populations. The GR population showed the lowest haplotype diversity ($H_d=0.000$), while the highest haplotype diversity was confirmed at 0.755 among the Goseoung (GS) population. Nucleotide diversity ranged was the highest diversity at 0.00291 in the GS population and the lowest diversity at 0.00000 in the GR population. The GR population was genetically closest to the Pohang (PH) population. The haplotype network confirmed that the GR population was most similar to the PH population. The GR population also clustered with the PH population with high bootstrap support (98%) in a phylogenetic tree. We thus conclude that the GR population is derived from a population similar to the PH population.

Key words: *Pungitius kaibarae*, genetic diversity, translocation population

서 론

잔가시고기 *Pungitius kaibarae*는 큰가시고기과(Gasterosteidae)에 속하며, 한국 및 일본에 서식한다고 알려져 있다(Kim, 1997). 한국은 북동해안 수계, 남동해안 수계, 금호강이 주요 분포 지역이다(Ko *et al.*, 2022). 일본에 서식하는 잔가시고기의 분포는 기록이 있으나, 최근 일본에서 일부 집단만이 서식하는 것으로 알려져 있다(Kobayashi, 1932; Kobayashi, 1933; Kim, 1997).

잔가시고기는 서식지 및 개체수 감소를 근거로 환경부가 2005년도에 멸종위기야생동·식물 II급으로 지정하였다(ME, 2005). 이후 환경부는 지속적인 모니터링 및 관리를 통해 서식지 및 개

체수가 증가함에 따라 2012년(ME, 2012)에 멸종위기야생생물 II급에서 해제하였다. 그러나 2019년도에 국립생물자원관에서 개체수와 분포 범위를 근거로 관심대상종으로 평가되었고(NIBR, 2019), Ko *et al.*(2022)에 의해 서식지 분포, 서식지 감소율 및 위협요인 등에 따라 취약(Vulnerable, VU A2ace)으로 평가된 바 있어 보전의 필요성이 강조되고 있다. 보전을 위해서는 대상종의 분포 조사, 서식 환경, 유전적 다양성 등이 고려되어야 한다(Frankham, 2005).

2023년 이전 고령 회천에는 잔가시고기의 서식에 대한 기록이 없었으나, 2023년도에 어류 분포 조사를 통해 경상북도 고령 회천에서 잔가시고기의 신규 서식지가 확인되었다(unpublished). 따라서 고령 회천의 잔가시고기의 집단이 이입에 의한 것인지 자생하고 있는 집단인지 불명확하다. 우리나라에서 잔가시고기는 지느러미 체색의 차이로 북동해안(투명)과 남동해안(흑청색)의 수계로 나뉘는데(Chae, 1989), 이번에 발견된 고령 회천의 잔가시고기는 형태학적으로 체색의 특징이 남동해안

저자 직위: 김강래(박사), 성무성(소장), 황유진(석사), 이명석(석사), 정주희(석사), 김희수(박사), 유정남(박사)

*Corresponding author: Jeong-Nam Yu Tel: 82-54-530-0830, Fax: 82-54-530-839, E-mail: susia000@nnibr.re.kr

수계의 특징을 나타내는 포항 형산강 집단과 유사한 것으로 추정되나 논문이나 서적 등으로 보고된 바 없다.

우리나라는 수계에 따라 생물다양성 및 계통이 지리학적으로에 의해 유전적으로 분화되어 나타나는 것으로 보고되었다(Jeon *et al.*, 2022). 생물의 보전을 위해 유전적 요인을 고려하는 것은 종의 복원 시 사용될 대상 개체나 집단을 선정하여 재도입하는 데 기초자료로서 고려될 수 있다(Li *et al.*, 2016). 또한 원서식지가 아닌 곳에 이입된 종의 기원을 파악하는 것은 유전적 교란을 막고 효과적으로 종의 보전 전략을 수립하는 데 기초자료가 될 수 있다(Billington *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2016).

최근 담수어류의 유전자 분석을 위해 미토콘드리아 영역 중 cytochrome b (cytb)를 활용하는 연구가 많다(Ha *et al.*, 2020). Cytb 유전자는 염기서열의 변이가 많으며, 진화속도가 빨라 개체나 집단의 유전적 차이를 분석하는 데 해상력이 높은 유전자 구간으로 보고되었다(Baharum and Nurdalila, 2012; Bae and Suk, 2015). Cytb 유전자로 어류의 집단 내 유전적 변이, 계통발생 관계, 분류학 및 어류 종의 집단 유전학을 연구하는 데 사용되고 있고(Murray *et al.*, 2008; Pages *et al.*, 2009; Bae and Suk, 2015), 잔가시고기의 경우 cytb 유전자로 한국의 9개 집단에 대해 집단 유전학 분석 결과가 보고되었다(Bae and Suk, 2015).

본 연구에서는 고령에서 확인된 잔가시고기의 신규 집단에 대해 cytb 유전자 영역을 이용하여 기존에 서식하고 있는 집단과 비교 분석하여 유전적 특성을 규명하고 신규 서식지로서의 보전 방안에 대해 제안하고자 한다.

재료 및 방법

1. 집단 확보 및 DNA 추출

본 연구에 사용한 잔가시고기 *Pungitius kaibarae* 집단은 2023년 4월 경상북도 고령(회천, GR), 포항(곡강천, PH), 경산(오목천, GYSA), 강원도 고성(배봉천, GS) 일대에서 족대(망목 4×4 mm)을 이용하여 각 집단별로 20개체 이상 채집하였다(Fig. 1). 채집한 개체는 50 mL 코니컬 튜브에 알코올 99.9%로 고정하여 실온에서 보관하고 DNA 추출에 이용하였다.

DNA 추출을 위해 잔가시고기의 꼬리지느러미를 채취하여 Blood & Tissue Kit (Qiagen)의 제조사의 매뉴얼에 따라 Genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA는 NanoDrop을 이용하여 순도와 양을 확인하고 4°C가 유지되는 저온냉장고에 보관하였다.

2. 염기서열 결정 및 유전 다양성 분석

추출된 DNA는 본 연구에서 개발한 cytb 유전자 프라이머(Puka_cytb_F1: 5'-AGGACTTTAACCAGGACTAACGA-3',

Puka_cytb_R1: 5'-CTCTGGCACTGAGCTACTTAT-3')를 이용해 PCR을 수행하여 유전자를 증폭하였다. PCR 반응은 TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) 10 μL, 정방향 프라이머 1 μL (10 pmol), 역방향 프라이머 1 μL (10 pmol), Genomic DNA 50 ng/μL 넣은 후 총 용적 20 μL가 되도록 3차 증류수를 추가하였다. 증폭에 수행된 PCR 조건은 95°C에서 초기 변성 5분, 95°C에서 변성 30초, 58°C에서 DNA와 프라이머 간 결합 30초, 72°C에서 신장 30초를 34 cycles 반복하였고 최종 신장 72°C에서 7분간 과정을 수행하여 증폭 산물을 생성하였다. 증폭된 산물은 1.5% 아가로스 겔을 통해 전기영동으로 확인하였다. PCR로 증폭된 산물은 정방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 Sanger sequencing 방법으로 염기서열분석기(ABI 3730XL)로 정방향과 역방향으로 염기서열을 결정하고, 결정된 염기서열은 조립하여 최종 분석에 이용하였다.

최종적으로 결정된 염기서열은 유전자 분석을 하기 위해 DnaSP ver. 5 (Librado and Rozas, 2009)를 이용하여 각 집단별로 Nucleotide diversity, Haplotype diversity (H_d), Tajima's D 및 Fu/Li's F 통계 값을 분석하였다.

3. 분자계통학적 유연관계 분석

신규 확인된 집단의 분자계통학적 유연관계를 분석하기 위해 각 집단별 개체들의 유전자(cytb)들을 MAFFT ver. 7.490 (Katoh and Standley, 2013) 자동화 알고리즘 명령어(mafft-auto)를 이용하여 염기서열을 정렬하였다.

MEGAX ver. 11.0.1 소프트웨어를 이용하여 계통수를 재구성하고 1,000번의 부트스트랩 반복을 수행하였다(<https://www.megasoftware.net>). Haplotype 네트워크는 Network ver. 10.2.0.0 (Bandelt *et al.*, 1999) 소프트웨어를 이용하였다.

결 과

1. 유전 다양성 분석

미토콘드리아 DNA의 cytb 유전자 영역에서 886 bp 길이의 서열을 이용하여 4개 집단의 유전자형(Haplotype)을 조사하였다. 총 14개 유전자형(H1~H14)이 도출되었고, 62개의 염기서열 변이 구간이 확인되었다. H1은 고령(GR) 집단, H2~H4는 포항(PH), H5와 H6은 경산(GYSA) 집단, H7~H14는 고성(GS) 집단에서만 관찰되었다. Median-joining 네트워크에서 유전자형은 집단 간에 공유는 없었고, 경북 지역 집단(고령, 포항, 경산)과 강원도 지역 집단(고성) 간 46개의 염기서열 차이로 그룹이 2개로 뚜렷하게 나뉘었다(Fig. 2).

Haplotype 다양성은 0.000에서 0.755 값의 범위였고(Table 1), 고령(GR) 집단에서 가장 낮은 haplotype 다양성을 나타냈고

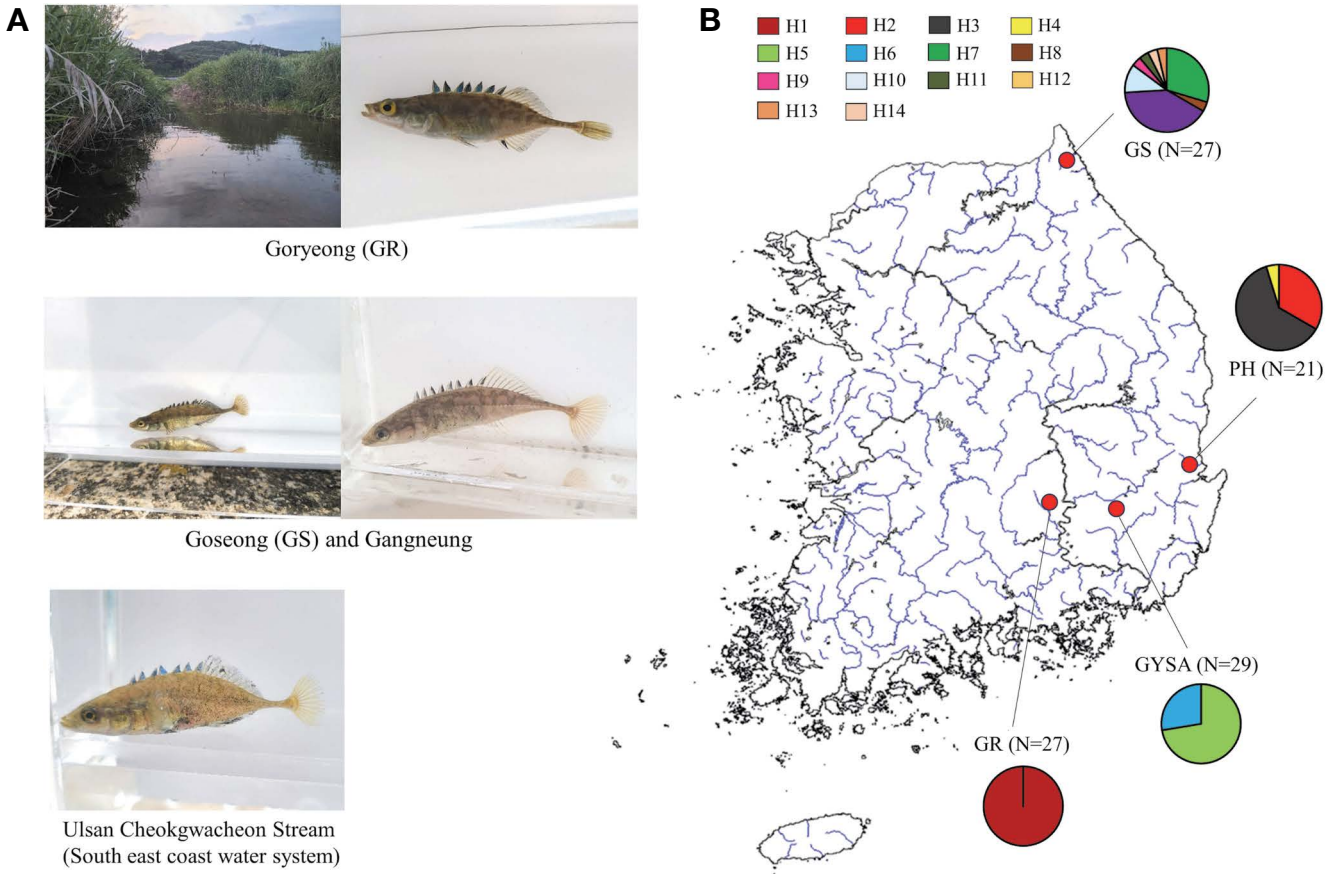


Fig. 1. A: view of the collection site and photos of individual. B: Location where the sample of *Pungitius kaibarae* was collected.

($H_d=0.000$), 고성(GS) 집단에서 0.755로 가장 높은 haplotype 다양성이 확인되었다. Nucleotide 다양성은 0.00000에서 0.00291 값의 범위로, 고성(GS) 집단에서 0.00291로 가장 높은 다양성을 나타냈으며, 고령(GR) 집단에서 0.00000로 가장 낮은 다양성을 보였다. Tajima's D 는 값을 구할 수 없는 경우를 제외하고(GR 집단), -0.60124 에서 1.20247 의 범위였고, Fu/Li's F 값은 값을 구할 수 없는 고령(GR) 집단을 제외하고, -1.23407 에서 0.81078 의 범위였다. Tajima's D 및 Fu/Li's F 값은 고성(GS) 집단에서 음수로 나타났으나, 통계적으로 유의미하지 않았다.

2. 유전적 분화도 분석

잔가시고기 4개 집단의 유전적 분화도를 분석한 결과 F_{ST} 는 0.706에서 0.972로 나타났으며, 모든 집단에서 유의미한 유전적 분화를 보였다(Table 2). 신규 집단인 고령(GR) 집단은 포항(PH) 집단과 유전적으로 가장 가까운 것으로 나타났다($F_{ST}=0.706$). 고성(GS) 집단은 유전적으로 고령(GR), 포항(PH), 경산(GYSA) 집단과 유전적 분화가 높은 것으로 나타났다($F_{ST}=0.954\sim 0.972$). 경산(GYSA) 집단은 낙동강 수계의 고령

(GR) 집단($F_{ST}=0.959$)보다 포항(PH) 집단($F_{ST}=0.840$)과 유전적으로 가까운 것으로 나타났다.

3. 분자계통학적 분석

계통발생학적 tree는 두 개의 큰 clade로 군집되어 나뉘었으며, 첫 번째 clade는 *P. hellenicus*, *P. platygaster*, *P. laevis*, *P. sinensis*, *P. pugitius*가 군집되었다(Fig. 3). 두 번째 clade는 *P. tymensis*와 *P. kaibarae*로 나뉘었다.

잔가시고기 *P. kaibarae*는 2개의 큰 clade로 나뉘었으며, 첫 번째 clade는 낙동강, 경산(GYSA), 포항(PH), 고령(GR)이 포함되었다. 두 번째 clade는 러시아(NCBI no.: LC108056, LC108058), 고성(GS), Buk River(LC108068)이 군집되었다. 신규 집단인 고령(GR) 집단은 계통발생학적 tree에서 높은 지지도(98%)의 값으로 포항(PH) 집단과 군집됨을 확인하였다.

고찰

잔가시고기는 우리나라에 동해안 독립 수계 및 낙동강 권역에 서식하고 있다(Ko et al., 2022). Ko et al. (2022)에서 1980년에

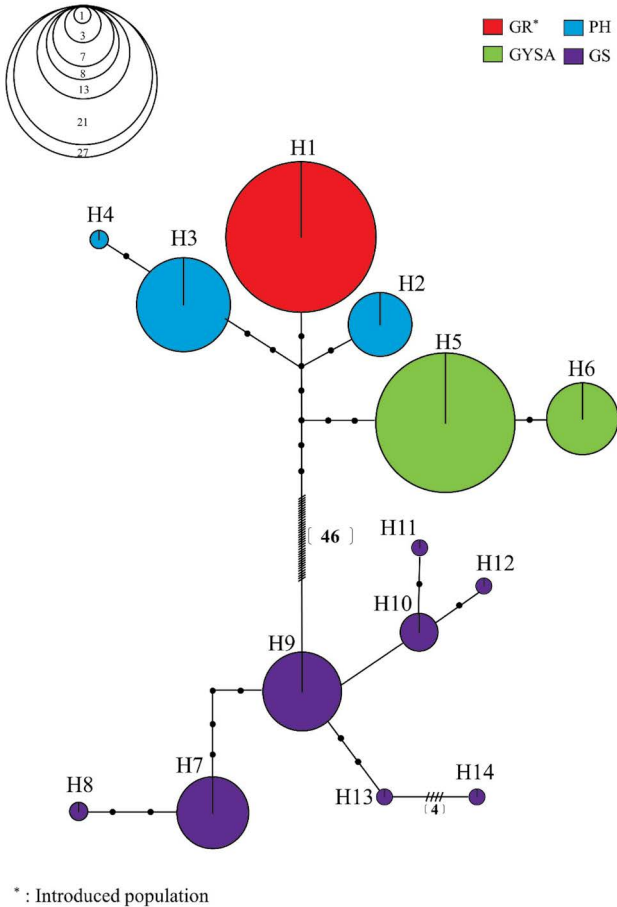


Fig. 2. Median-joining network plot using the sequence of the mitochondrial cytb region. GR: Goryeong population, PH: Pohang population, GYSA: Gyeongsan population, GS: Goseong population.

Table 1. Genetic diversity information of the four populations of *Pungitius kaibarae*

ID	MtDNA	<i>h</i>	<i>H_d</i>	Nucleotide diversity	<i>D</i>	<i>F</i>
GR	27	1	0.000	0.00000	–	–
GS	27	8	0.755	0.00291	–0.60124	–1.23407
PH	21	3	0.529	0.00180	1.20247	0.51802
GYSA	29	2	0.414	0.00047	0.98512	0.81078

h: number of haplotype, *H_d*: haplotype diversity, *D*: Tajima's D, *F*: Fu's F value.

서 2020년까지 분포 양상을 조사하였으나, 고령(GR) 집단은 발견되지 않았다(Ko *et al.*, 2022). 신규 서식이 확인된 고령(GR) 집단은 포항(PH) 집단과 형태학적으로 유사하였으나, 이에 대한 추정만 하고 있으며 고령(GR) 집단의 기원에 대한 보고는 현재 없다. 보통 신규 서식지가 발견될 때는 두 가지 가설을 세울 수 있다. 첫 번째는 원래 자생하고 있었으나 발견되지 않은 경우, 두

Table 2. Genetic differentiation information of the four populations of *P. kaibarae*

ID	GR	GS	PH	GYSA
GR	–	0.000	0.000	0.000
GS	0.972	–	0.000	0.000
PH	0.706	0.954	–	0.000
GYSA	0.959	0.968	0.840	–

Above: Significant level ($P < 0.05$), Below: F_{ST} .

번째는 원래의 서식지가 아닌 곳에 이입이 된 경우이다(Kim *et al.*, 2023b).

본 연구의 결과 haplotype 네트워크는 모든 지역에서 공유되지 않았다. 이는 이전 연구 보고와 같이 유전적으로 분화가 명확히 일어나 공유되지 않은 것 판단된다(Bae and Suk, 2015). 각 지역을 대표하는 집단만을 선정하여 채집하였기 때문에 집단의 수가 부족하여 각 수계 지역 내에서 haplotype 네트워크의 공유가 일어나지 않은 것으로 판단된다. Bae and Suk (2015) 이전 연구에 따르면 북동해안 수계의 집단들은 서로 haplotype을 공유하고 있었으며, 남동해안 수계 개체군들은 서로 haplotype을 공유하였고, 낙동강 수계 단일 집단으로 공유되지 않는 것으로 보고되었다. 따라서 북동해안, 남동해안, 낙동강 수계는 서로 haplotype을 공유하지 않아 이전 결과와 같은 경향을 보였다.

Haplotype 네트워크에서 고령(GR) 집단은 포항(PH) 집단과 같은 네트워크로 그룹화되었다. 그러나 고령(GR) 집단은 포항(PH) 집단과 같은 haplotype을 공유하지 않았으나, 유전적으로 가장 유사성이 높아 군집된 것으로 판단된다. 또한 분자계통학적 tree에서 신규 집단인 고령(GR) 집단이 지리적으로 가장 가까운 경산(GYSA) 집단과 군집될 것이라 예상되었으나, 고령(GR) 집단은 높은 지지도(98%)로 포항(PH) 및 형산강 집단(GenBank accession no.: LC108064)과 군집되었다(Fig. 3). 유전적 분화도에서도 신규 집단인 고령(GR) 집단이 지리적으로 가장 가까운 경산(GYSA) 집단보다 포항(PH) 집단과 유전적으로 가까운 것으로 나타났다.

원래 자생하고 있는 경우라면 같은 수계에 존재하는 경산(GYSA) 집단과 고령(GR) 집단이 유사하여야 하나, 독립 수계인 포항(PH) 집단과 haplotype 네트워크 및 분자계통학적 tree에서 고령(GR) 집단이 같이 군집되었고 유전적 분화도에서도 포항과 상대적으로 유전적 거리가 가까운 것으로 나타나 첫 번째 가설의 가능성이 낮은 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고 계통수에서 완전히 일치하지 않는 것으로 보아 유전적 분화가 일어나 자생하고 있는 집단일 가능성도 완전히 배제할 수는 없다. 따라서 추후 추가적으로 형산강 및 남동해안 수계 집단의 개체수를 30개체 이상 확보하여 이입 또는 자생하는 집단인지 비교할 필요가 있다.

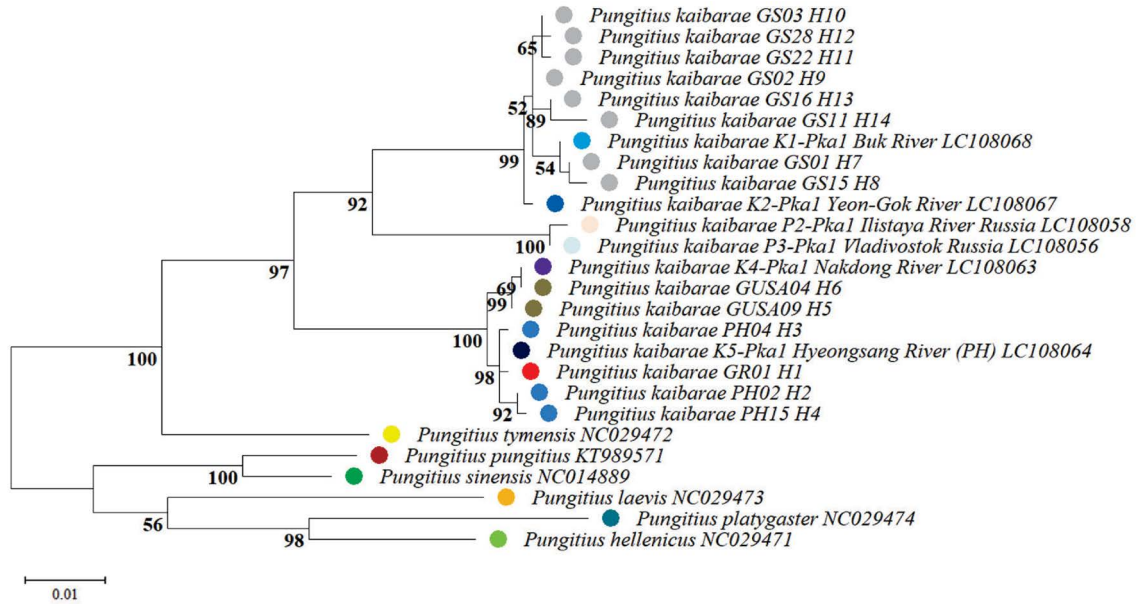


Fig. 3. Phylogenetic tree using the maximum likelihood method in MEGA X (ver. 11.0.1) software for the genus *Pungitius*. The color of the circle preceding the scientific name indicates the species and population.

두 번째 가설로는 인간에 의한 이입으로 인해 새로운 서식지가 만들어진 경우가 있을 수 있다. 이입된 집단은 유전적으로 모 집단과 유사한 경향이 있다(Tan *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2023a). 고령 (GR) 집단은 포항 (PH) 집단과 haplotype 네트워크가 함께 군집되었고, 분자계통학적 tree 결과에서도 형산강 haplotype (GenBank accession no.: LC108064)과 같이 군집되어, 포항 (PH) 집단과 유사한 집단에서 유래한 것으로 판단된다. 인간에 의한 이입은 한반도의 수계에 따른 유전적 분화에 관계없이 유입된 집단은 같은 수계 내에서 유전적 유사도와 다른 높은 유전적 분화를 보일 수 있다. 본 연구에서와 같이 낙동강 수계 내에서 고령 (GR)과 경산 (GYSA) 집단은 높은 유전적 분화를 보였고 ($F_{ST}=0.959$), 포항 (PH) 집단이 고령 (GR) 집단에 비해 상대적으로 유전적 분화 ($F_{ST}=0.706$)가 상당히 분화되었으나 계통수에서 형산강 집단 (GenBank accession no.: LC108064) 및 포항 집단과 유사하였다. 인간에 의한 이입의 근거로서 두 번째 가설의 가능성이 높다고 판단된다. 그러나 모계 유전을 하는 미토콘드리아 DNA의 특성을 근거로 하였을 때 포항 (PH) 및 형산강 (GenBank accession no.: LC108064) 집단 cyt b 서열의 haplotype이 완전히 같지 않아 이 연구에서 사용된 지역 및 NCBI에 등록된 개체 외 집단이 이입된 것으로 추정된다.

국내 및 국외 하천에 원래 서식하지 않았던 담수어류가 발견되는 경우(꺼지, 얼룩동사리, *Trichopodus pectoralis*)가 보고되고 있다(Tan *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2023a, 2023b). 이입된 집단은 모 집단의 유전 다양성 수준과 관련이 있다(Kim *et al.*, 2023a, 2023b). 이 연구에서 고령 (GR) 집단은 유전적 다양성이 매우 낮

은 것으로 나타났다($H_d=0.000$, nucleotide diversity = 0.00000). 이에 대한 가설로 채집 과정에서 하나의 어미에서 태어난 개체들이 편향적으로 채집되었을 경우 유전적 다양성이 낮을 수 있다. 그러나 성어 개체들을 채집하였기 때문에 이러한 가능성은 낮을 것으로 판단된다.

일반적으로 미토콘드리아 다양성은 암컷 (female) 집단의 다양성에 따라 좌우되며, 이는 모계 유전을 하는 미토콘드리아의 특징 때문이다(Lieber *et al.*, 2019). 이입 집단은 암컷 집단의 유전 다양성이 높은 곳에서 유래하는 경우 이입 집단의 높은 유전 다양성을 가지며, 반대로 소수의 암컷 집단으로부터 유래하는 경우 유전 다양성이 낮은 것으로 나타난다(Kim *et al.*, 2023a, 2023b). 한국 고유종 꺾지 *Coreoperca herzi*는 유전 다양성이 낮은 소수의 집단에서 유래한 것으로 추정되며(Kim *et al.*, 2023b), 얼룩동사리 *Odontobutis interrupta*는 유전 다양성이 높은 모 집단으로부터 유래한 것으로 추정되어 보고된 바 있다(Kim *et al.*, 2023a). 일반적으로, 이입된 집단은 집단을 구성하는 일부 개체의 DNA만 분산되어, 창시자 효과나 낮은 유전 다양성을 보이는 경향이 있는 것이 관찰된다(Wares, 2005; Excoffier *et al.*, 2009). 따라서, 이입된 것으로 추정되며, 유전 다양성이 매우 낮은 고령 (GR) 집단은 적은 수의 암컷 집단에서 유래되었을 것으로 추정된다. Ko *et al.* (2022)에 의하면 잔가시고기는 서식지의 질적 하락, 서식지 감소율, 외래종 배스의 영향 등을 근거로 취약 (Vulnerable, VU A2ace)으로 조사되어 멸종위기야생생물 I 또는 II급으로 재지정 가능성을 시사하고 있다. 이입 집단의 일부는 생태계에 부정적인 영향을 끼칠 수 있지만, 반대로 유전 다양

성의 저장소 역할을 할 수 있다(Rollins *et al.*, 2023). 이는 고령(GR) 집단이 이입된 생태계에 부정적인 영향을 미칠 수 있으나, 장기적인 관점에서 잔가시고기 종의 보전을 위한 유전자풀로 보았을 때 보전을 위한 집단으로 간주할 수 있으므로 이에 대한 조사와 연구가 이루어져야 한다고 판단된다.

유전적 다양성 및 구조를 근거로 보았을 때 보전 전략 계획 수립 시 잔가시고기는 북동해안 수계와 남동해안 수계, 낙동강 수계로 관리해야 하며, 특히 고령(GR) 집단의 경우 포항(PH) 집단인 남동해안 수계와 유사하므로, 낙동강 수계의 집단과 유전적 오염을 피하면서 보전할 수 있는 전략이 필요하다. 잔가시고기는 2012년 멸종위기생물에서 해제되었으나 다수의 연구에서 종의 취약성평가가 매우 낮게 평가되는 등 여전히 보호가 필요한 실정이다. 따라서, 본 연구에서 잔가시고기의 야생 집단 및 이입 집단인 고령(GR) 집단에 대한 유전적 다양성과 유전적 구조의 파악은 향후 보전 계획 수립의 기초자료로서 도움이 될 것이다.

요 약

잔가시고기 *Pungitius kaibarae*의 신규 집단인 고령(GR) 집단과 야생 집단의 특성을 규명하기 위해 미토콘드리아 cytb 유전자 영역의 886 bp 서열을 이용 총 4개 집단(경상북도 고령(회천, GR), 포항(곡강천, PH), 경산(오목천, GYSA), 강원도 고성(배봉천, GS))을 분석하였다. 고령(GR) 집단에서 가장 낮은 haplotype 다양성을 나타냈고($H_d=0.000$), 고성(GS) 집단에서 0.755로 가장 높은 haplotype 다양성을 확인하였다. Nucleotide 다양성은 고성(GS) 집단에서 0.00291로 가장 높은 다양성을 나타냈으며, 고령(GR) 집단에서 가장 낮은 다양성을 보였다. 유전적 분화도에서 고령(GR) 집단은 포항(PH) 집단과 유전적으로 가장 가까운 것으로 나타났다. Haplotype 네트워크는 고령(GR) 집단이 포항(PH) 집단과 근집되어 가장 유사한 것으로 나타났다. 고령(GR) 집단은 계통발생학적 tree에서 높은 지지도(98%)의 값으로 포항(PH) 집단과 근집됨을 확인하였다. 따라서 고령(GR) 집단은 포항(PH) 집단과 유사한 집단에서 유래됨을 추정하였다.

사 사

본 논문은 국립낙동강생물자원관의 지원을 받아 연구되었습니다(NNIBR202302101).

REFERENCES

Bae, H.G. and H.Y. Suk. 2015. Population genetic structure and col-

- onization history of short ninespine sticklebacks (*Pungitius kaibarae*). *Ecol. Evol.*, 5: 3075-3089.
- Baharum, S.N. and A.W.A. Nurdalila. 2012. Application of 16s rDNA and cytochrome b ribosomal markers in studies of lineage and fish populations structure of aquatic species. *Mol. Biol. Rep.*, 39: 5225-5232.
- Bandelt, H.J., P. Forster and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 37-48.
- Billington, N., R.J. Barrette and P.D. Hebert. 1992. Management implications of mitochondrial DNA variation in walleye stocks. *N. Am. J. Fish. Manag.*, 12: 276-284.
- Chae, B.S. 1989. 韓國産 가시고기 (*Pungitius sinensis*: Gasterosteidae)의 形質分析에 의한 分類. Kyungpook National University, pp. 1-82.
- Excoffier, L., M. Foll and R.J. Petit. 2009. Genetic consequences of range expansions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40: 481-501.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.*, 126: 131-140.
- Ha, T.T.T., T.T. Nga, T.N.A. Hang and M.S. Alam. 2020. Genetic diversity in *Pangasius* spp. collected in Bangladesh based on mitochondrial cytochrome b gene sequence analysis. *Aquac. Rep.*, 17: 100351.
- Jeon, H.B., H.Y. Song, H.Y. Suk and I.C. Bang. 2022. Phylogeography of the Korean endemic *Coreoleuciscus* (Cypriniformes: Gobionidae): the genetic evidence of colonization through Eurasian continent to the Korean Peninsula during Late Plio-Pleistocene. *Genes Genom.*, 44: 709-719.
- Katoh, K. and D.M. Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 30: 772-780.
- Kim, I.S. 1997. Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea, freshwater fishes. Ministry of Education, Yeongi, Korea, 629pp.
- Kim, K.R., H.K. Choi, T.W. Lee, H.J. Lee and J.N. Yu. 2023a. Population structure and genetic diversity of the spotted sleeper *Odontobutis interrupta* (Odontobutidae), a fish endemic to Korea. *Diversity*, 15: 913.
- Kim, K.R., S.K. Kim, M.S. Sung and J.N. Yu. 2023b. Genetic structure and genetic diversity of the endemic Korean auchaperch, *Coreoperca herzi* (Centropomidae), in Korea. *Animals*, 13: 2614.
- Ko, M.H., M.S. Han and H.S. Kim. 2022. Distribution status and extinction threat evaluation of the short ninespine stickleback *Pungitius kaibarae* (Gasterosteidae) in Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 34: 262-269.
- Kobayashi, J. 1932. General observation of Japanese gasterosteid fishes. *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser.B. Div.1. Vol.2. Art.8*: 145-154.
- Kobayashi, J. 1933. Ecology of a stickleback *Pungitius sinensis* var. *kaibarae*. *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser.B. Div.1. Zoology*, 2: 71-89.
- Li, X., Y. Deng, K. Yang, W. Gan, R. Zeng, L. Deng and Z. Song.

2016. Genetic diversity and structure analysis of *Percocypris pingi* (Cypriniformes: Cyprinidae): implications for conservation and hatchery release in the Yalong River. PLoS One, 11: e0166769.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinform., 25: 1451-1452.
- Lieber, T., S.P. Jeedigunta, J.M. Palozzi, R. Lehmann and T.R. Hurd. 2019. Mitochondrial fragmentation drives selective removal of deleterious mtDNA in the germline. Nature, 570(7761): 380-384.
- ME (Ministry of Environment). 2005. Enforcement of wildlife laws (Law No. 7167).
- ME (Ministry of Environment). 2012. Conservation and management laws of wildlife (Law No. 10977).
- Murray, B.W., J.Y. Wang, S.C. Yang, J.D. Stevens, A. Fisk and J. Svavarsson. 2008. Mitochondrial cytochrome b variation in sleeper sharks (Squaliformes: Somniosidae). Mar. Biol., 153: 1015-1022.
- NIBR (National Institute of Biological Resources). 2019. Red data book of Republic of Korea, Volume 3. Freshwater fishes. Ministry of Environment, National institute of biological resources, Incheon, Korea, 250pp.
- Pages, M., N. Desse-Berset, C. Tougard, L. Brosse, C. Hänni and P. Berrebi. 2009. Historical presence of the sturgeon *Acipenser sturio* in the Rhône basin determined by the analysis of ancient DNA cytochrome b sequences. Conserv. Genet., 10: 217-224.
- Rollins, L.A., D. Lees, A.P. Woolnough, A.J. West, M. Perry and D.M. Forsyth. 2023. Origins and population genetics of sambar deer (*Cervus unicolor*) introduced to Australia and New Zealand. Wildlife Research.
- Tan, M.P., T. Amornsakun, M.N. Siti Azizah, A. Habib, Y.Y. Sung and M. Danish-Daniel. 2019. Hidden genetic diversity in snakeskin gourami, *Trichopodus pectoralis* (Perciformes, Osphronemidae), inferred from the mitochondrial DNA COI gene. Mitochondrial DNA Part B, 4: 2966-2969.
- Wares, J.P. 2005. Mechanisms that drive evolutionary change. Insights from species introduction and invasions. Species invasions: insights into ecology, evolution, and biogeography, pp. 229-257.