

BSPE99964-13012-3

어란 DNA 바코드 기반 한반도 연근해 주요 어류의 산란장 지도 작성

2022. 03. 01

주관연구기관 / 한국해양과학기술원

한국해양과학기술원

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “어란 DNA 바코드 기반 한반도 연근해 주요 어류의 산란장 지도 작성” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 03. 01

연구 책임자: 김 성
참여 연구원: 장요순
양은찬
김충곤
조홍연

보고서 초록

과제고유 번호	BSPE99964 -13012-3	해당단계 연구기간	2021.06.14 - 2021.12.31	단계 구분	없음
연구사업명	중사업명	기관고유사업			
	세부사업명	주요사업			
연구과제명	대과제명	신진중견연구자 및 창의적 아이디어 지원			
	세부과제명	어란 DNA 바코드 기반 한반도 연근해 주요 어류의 산란장 지도 작성			
연구책임자	김 성	해당단계 참여연구원수	총 : 5 명 내부: 5 명 외부: 0 명	해당단계 연구비	정부: 80,000천원 기업: 천원 계 : 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 5 명 내부: 0 명 외부: 0 명	총 연구비	정부: 80,000천원 기업: 천원 계 : 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 해양생태연구센터		참여기업명		
위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	50
<p>○ 한반도 연근해 혼합어란 high-throughput sequencing(HTS) 원시자료 864건 137GB 수집</p> <p>- 2012 - 2020년 한반도 연근해 및 하구역(한국해양과학기술원, 해양환경공단 등)</p> <p>○ 혼합어란 HTS 원시자료 분석을 위한 COX1 reference library(종 동정 기준) 제작</p> <p>- NCBI/GenBank, BOLD 등에서 DNA 바코드 염기서열 추출</p> <p>- 중복염기서열 제거 및 정렬</p> <p>- 종 목록 작성</p> <p>○ Mothur와 Qiime2로 혼합어란의 HTS 원시자료 재분석</p> <p>○ 혼합어란 DNA 메타바코딩 자료 기반 한반도 연근해 주요 어류의 산란종 목록 작성</p> <p>- 2문 2강 35목 96과 190속 260종(연체동물 1목 2과 4속 4종 포함)</p> <p>○ 멸치, 정보리멸, 민어 등의 산란장 지도 작성</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	어란, 산란장, DNA 바코드, COX1 reference library, DNA 메타바코딩, high-throughput sequencing			
	영 어	fish eggs, spawning area, DNA barcode, COX1 reference library, DNA metabarcoding, high-throughput sequencing			

요약문

I. 제목

어란 DNA 바코드 기반 한반도 연근해 주요 어류의 산란장 지도 작성

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

○ 한반도 연근해에서 수집한 대량의 혼합어란 HTS(high-throughput sequencing) 원시자료의 재분석을 통한 주요 어종의 산란장 지도 작성

2. 연구개발의 필요성

- 해양경골어류의 알은 산란장과 산란시기 규명에 필요한 직접 증거
- 산란을 위해 방출된 대량의 부유성 알은 채집이 쉽지만 형태형질을 이용한 종 동정의 어려움으로 연구 활용도가 매우 낮음
- 이를 극복하기 위해서는 대량의 혼합어란 중 분석에 적용 가능한 DNA 메타바코딩 방법 도입 필요

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구 기간

2021. 06. 14 - 2021. 12. 31

2. 연구 개발의 내용 및 범위

- 어란 기반 어종별 산란장 지도 작성을 위한 혼합어란 high-throughput sequencing(HTS) 원시자료 수집
 - 어란 수집해역은 한반도 연근해
 - HTS 플랫폼: MiSeq
 - HTS 자료 분석을 위한 어류 전용 COX1 reference library 구축
 - HTS 자료 분석 파이프라인 구축
- 산란참여 종목록 및 종별 산란장 지도 작성

IV. 연구개발결과

- 혼합어란 HTS 원시자료 분석을 위한 기반 구축
 - 어류의 종내 종간 유전적 변이 기반, 대량의 혼합어란 메타바코딩을 위한 mothur용 어류 COX1 reference library 구축: 염기서열 106,363건
 - Qiime2용 진핵생물 COX1 reference library 구축: 염기서열 약 190만건
- 혼합어란 HTS 원시자료 수집
 - 2012 - 2020년 혼합어란 메타바코딩 원시자료 864건 137GB수집
- 혼합어란 HTS 분석을 통한 산란참여종목록 및 주요 어종별 산란장 지도 작성
 - Qiime2를 이용한 혼합어란 HTS 자료 분석 결과 어류는 34목 94과 256종
 - 연체동물 1목 2과 4종
 - 멸치, 청보리멸, 민어 산란장 지도 작성

S U M M A R Y

The locations and sampling times of pelagic fish eggs of marine bony fishes can be used as direct evidence for spawning areas and times. Although they are easily collected, it is challenging to study spawning ecology using fish eggs due to the difficulties of identifying species using morphological traits. To overcome this problem, it was necessary to employ a DNA metabarcoding method to analyze mixed fish eggs. We collected and analyzed 137GB of high-throughput sequencing (HTS) raw data derived from 864 mixed fish egg samples collected from coastal waters off the Korean Peninsula during the 2012-2020 period using Qiime2 and mothur. The HTS data revealed the presence of 34 orders, 94 families, and 245 species of fish as well as 1 order, 2 families, and 4 species of mollusks. The DNA metabarcoding method for analyzing mixed fish eggs is thus very useful for egg-based spawning research.

C O N T E N T S

Summary	i
Contents	v
List of Figures	vii
List of Tables	viii
Chapter 1. Outline of the study	1
Section 1. Necessities of the study	3
Section 2. Objectives of the study	4
Chapter 2. Status of domestic and oversea technology	7
Section 1. Trends of study in Korea	9
Section 2. Trends of study in foreign countries	9
Chapter 3. Content and results of the study	11
Section 1. Material and methods	13
Section 2. Mothur pipeline	14
Section 3. Qiime2 pipeline	20
Section 4. Species list of the mixed fish eggs from Tongyoung Marine Living Resources Station	26
Section 5. Species list of the mixed fish eggs from Korean waters	26
Section 6. Spawning maps based on the fish eggs	28
Section 7. Discussion	31
Chapter 4. Application plan and ripple effect of the study results	33
Section. 1. Application plans of the study results	35
Section 2. Ripple effects of the study results	35
Chapter 5. References	37

목 차

요약문 i

목차 v

List of Figures vii

List of Tables viii

제1장 서 론 1

 제1절 연구개발의 필요성 3

 제2절 연구개발의 목표 및 내용 4

제2장 국내외 연구 동향 7

 제1절 국내 동향 9

 제2절 국외 동향 9

제3장 연구 수행 내용 및 결과 11

 제1절 재료 및 방법 13

 제2절 Mothur pipeline 14

 제3절 Qiime2 pipeline 20

 제4절 통영해양생물자원기지 혼합어란의 종조성 26

 제5절 한반도 연근해 혼합어란의 종 조성 26

 제6절 주요 어종의 어란 분포도 28

 제4절 토의 31

제4장 연구개발결과의 활용계획 및 파급효과 33

 제1절 연구개발 결과의 활용계획 35

 제2절 연구개발 결과의 파급효과 35

제5장 참고문헌 37

List of Figures

Fig. 3.1.1. Phylogenetic relationships among the COX1 106,363 sequences of fishes from the NCBI/GenBank exhibited in the FastTree 14

Fig. 3.6.1. A spawning map based on the *Engraulis japonicus* eggs in the coastal waters off the Korean Peninsular during the 2017-2020 period 29

Fig. 3.6.2. A spawning map of *Sillago japonica* found by DNA metabarcoding on the mixed fish eggs in the coastal waters off the Korean Peninsula during 2017-2020 period 30

Fig. 3.6.3. A spawning map of *Miichthys miiuy* found by DNA metabarcoding on the mixed fish eggs in the coastal waters off the Korean Peninsula during 2017-2020 period 31

List of Tables

Table 3.1.1. A list of high-throughput sequencing raw data on the mixed fish eggs in Korean waters during 2012-2020 period	13
Table 4.1.1. A taxonomic list of the pelagic fish eggs from Tongyoung Marine Living Resources Station during 2013-2019 period	26
Table 5.1.1. A taxonomic list of the pelagic eggs off Korean waters during 2012-2020 period	27
Supplementary table 1. A species list of the pelagic fish eggs from Tongyoung Marine Living Resources Station during 2013-2019 period	42
Supplementary table 2. A species of the pelagic eggs from Korean waters during 2012-2020 period	44

제1장 서론

제1장 서론

제1절 연구개발의 필요성

1.1.1. 기술적 측면

- 어란은 기후변화에 따른 해양생태계의 반응을 분석할 수 있는 고감도 생물학적 지표
 - 어란은 산란기 성체와 같이 수온변화에 가장 민감(Dahlke et al., 2020)
 - 번식을 위한 종 고유의 최적 산란 수온은 환경에 따라 변하지 않음
- 한반도 주변해의 난류성 어류는 기후변화 지표
 - 회귀종(성체)으로 발견 확률이 매우 낮음
- 기후변화 지표로 난류종의 성체보다 어란 모니터링이 효율적임
 - 해양경골어류(약 80%)는 번식을 위해 대량의 어란 방출
 - 산란기에는 산란참여 성체보다 어란 발견 확률이 매우 높음(Houde, 1987)
 - 어란은 유영능력이 없어 채집도구에 대한 선택성이 거의 없어 펌프를 이용한 채집도 가능(Checkley et al., 1997)
- 이와 같은 어란의 장점에도 불구하고 산란장 지도 작성에 어란 사용은 저조함
 - 부유성 어란의 대부분은 중간 형태적 유사성이 높아 형태형질만으로 종 동정이 매우 어렵기 때문임
 - 형태형질로 종 수준의 어란 동정이 가능한 종은 멸치와 엘통이 등 소수
- 대량의 어란 종 동정을 위한 DNA 메타바코딩 도입 필요
 - DNA 바코딩으로 개별 어란도 종 수준의 동정 가능
 - 개별 어란 DNA 바코딩 기반 어류의 산란 모니터링은 시간과 비용 소모적
 - 시간과 비용 절감을 위해 분석 대상의 어란 선별은 매우 어려움
 - DNA 메타바코딩으로 연구 대상의 어란 선정 어려움 극복
 - 대량의 시료 분석 가능하여 다양한 어종의 산란장 지도 작성에 유리

1.1.2. 경제·산업적 측면

- DNA 메타바코딩 기반 어란 종동정은 어류산란 모니터링 비용 획기적 절감
 - 야생의 어란 동정 방법: 살아있는 알 부화, 형태형질(소수 종), 개별어란 DNA 바코딩 등
 - 개별 어란 DNA 바코드 분석(Sanger sequencing)은 많은 시간과 비용이 필요
 - 혼합 DNA 메타바코딩은 시간과 비용 측면에서 개별 어란 바코딩보다 유리
- 한반도 주변해의 상업적 가치가 높은 아열대종의 증가 및 한류성 종의 감소 진단 가능
- 어류자원 보호를 위한 다양한 어류의 종별 산란장과 산란시기 모니터링 가능

1.1.3. 사회·문화적 측면

- 해양생물을 이용한 한반도 주변해의 생물학적 아열대화 진행 정도 평가
- 미보고 열대 및 아열대 어종의 한반도 주변해 출현 감시

제2절 연구개발의 목표 및 내용

1.2.1. 연구개발의 목표

- 한반도 연근해에서 수집한 대량의 혼합어란 HTS(high-throughput sequencing) 원시자료 재분석을 통한 주요 어종의 산란장 지도 작성

1.2.2. 연구개발의 내용 및 범위

- 어란 DNA 메타바코딩 원시 자료 재분석을 통한 산란 참여 종목록 작성
 - 어란 기반 주요 어종의 종별 산란장 지도 작성
 - DNA 메타바코딩 기반 대량의 혼합어란 종동정을 위한 어류 전용 COX1 reference library 구축
 - DNA 메타바코딩 기반 진핵생물 종동정을 위한 COX1 reference library 구축

- 어란 기반 어종별 산란장 지도 작성을 위한 어란 DNA 메타바코딩 원시자료 수집과 분석
 - 혼합어란 DNA 메타바코딩을 이용한 희귀종 탐지
 - 한국해 혼합어란 DNA 메타바코딩 원시자료 864건 137GB수집어란 시료 확보

제2장 국내외 연구 동향

제2장 국내외 연구 동향

제1절 국내 동향

한반도 주변해의 어란 분포 첫 조사는 1965년 6월부터 1968년 9월에 국립수산물진흥원(현 국립수산물과학원)에서 수행하였다(Lim et al., 1970). 처음으로 보고된 어란은 멸치, 엘통이, 참조기, 쫄치, 갈치, 눈통멸, 얼룩통구멍, 퉁빌메통이 등 8종이다. 첫 연구 이후 오랜 시간의 많은 연구에도 불구하고 어란 종 동정은 여전히 난제로 남아있다. 이로 인해 멸치와 엘통이 두 종 이외에는 이용 가능한 축적된 어란의 시공간 분포정보는 거의 없는 실정이다.

형태형질 기반 어란 동정의 한계를 극복하기 위한 DNA 바코드 분석을 2008년에 처음으로 엘통이 어란에 적용하였다(Kim et al., 2008). 이후부터 단일 어란 DNA 바코드 분석을 통해 황아귀(Oh and Kim, 2015), 뱀장어목 어류(Choi et al., 2018), 참조기(Jang et al., 2020) 등의 알 동정에 성공하였다. 이제는 소수 종의 어란 동정을 넘어 다양한 종의 어란 DNA 바코딩으로 적용 범위가 점점 넓어지고 있다(Han et al., 2015). 최근에는 정확도가 높은 개별 어란의 DNA 바코딩과 함께 다양한 종의 동시 산란생태 모니터링에 적합한 대량의 혼합어란 분석에 DNA 메타바코딩을 도입하고 있다(한국해양과학기술원, 2020).

제2절 국외 동향

어란에 대한 첫 연구는 1865년 노르웨이의 G.O. Sars(1879)가 북해산 대구알 보고이다. 오랜 시간의 연구에도 불구하고 대부분의 해산어류 알은 형태형질로는 종 구분이 매우 어렵다. 형태형질이 독특한 소수의 종만 종 수준으로 동정 가능하다(Okiyama, 2014). 이를 극복하기 위한 DNA 바코드 분석을 개별 어란의 종 동정에 적용하여 성공하였다(Shao et al., 2001; Kawakami et al., 2010). 이후에 어류의 산란장 탐색이나 해양보호구역 설정에 필요한 어류의 종별 산란생태 정보 확보에서, DNA 바코드 기반 어란 종동정은 필수 기술로 자리매김을 하고 있다(Harada et al., 2015; Lin et al., 2016; Lewis et al.,

2016).

어란의 DNA 바코드 분석을 통한 어류의 산란장 탐색에 성공한 대표적인 사례는 담수산 뱀장어(*Anguilla japonica*)의 산란장-북서태평양의 마리아나 해연 부근의 해산-발견이다. 뱀장어의 어란과 함께 부화한 유생은 물론 산란참여 성체도 동시에 이 해역에서 발견되었다(Tsukamoto et al., 2011). 최근에는 단일 어란 DNA 바코드 분석에서 대량의 어란 분석을 위한 DNA 메타바코딩에 대한 실험적 연구가 시작되었다(Duke and Burton, 2020; 알려진 혼합 어란 시료를 이용한 시범적인 첫 연구 사례).

제3장 연구 수행 내용 및 결과

제3장 연구 수행 내용 및 결과

제1절 재료 및 방법

연구에 사용한 자료는 한반도 연근해에서 2012년부터 2020년에 한국해양과학기술원과 해양환경공단(안양대 수행)에서 채집하여 분석한 혼합어란의 MiSeq 원시자료 864건 137GB이다(Table 3.1.1).

Table 3.1.1. A list of high-throughput sequencing raw data on the mixed fish eggs in Korean waters during 2012–2020 period

Survey area	Date	Number of MiSeq raw data	Remarks
Gwangyang bay	2013, 2014	17	Summer
Off Uljin	2013, 2014	20	Summer
Ocean research station	2012, 2014, 2016	25	Irregular
Tongyoung Marine Living Resources Station	2013–2019	103	Biweekly
South Sea	2016, 2017	21	Irregular
Nakdong estuary	2019–2020	19	Seasonal
Cheonsu bay	2019	3	Summer
Youngdo(KIOST)	2019	19	Biweekly
Korean coastal area	2017–2020	639	Seasonal
Total		864(137GB)	

혼합어란 MiSeq 원시자료 분석을 위해 mothur(Schloss et al., 2007)와 Qiime2(Bolyen et al., 2019) pipeline을 구축하였다.

Mothur를 위한 어류의 COX1 reference library 구축에 필요한 염기서열을 NCBI/GenBank에 추출하였다(2021년 7월). 이들 염기서열에서 mlCOIintF와 jgHCO2198 (Leray et al., 2013; Geller et al., 2013) 두 프라이머 외측 영역을 제거하였다. 중복 염기서열 제거 후 남은 106,363건의 COX1 염기서열의 길이는 202–383bp였다. 이들 염기서열을 MAFFT(Katoh and Standley,

2013)로 정렬 후 FastTree(Price et al., 2010) 분석을 실시하였다(Fig. 3.1.1).

Mothur pipeline을 이용하여 Tongyoung Marine Living Resources Station(Table 3.1.1)에서 수집하여 분석한 103건의 혼합어란 MiSeq 원시자료를 분석하였다.

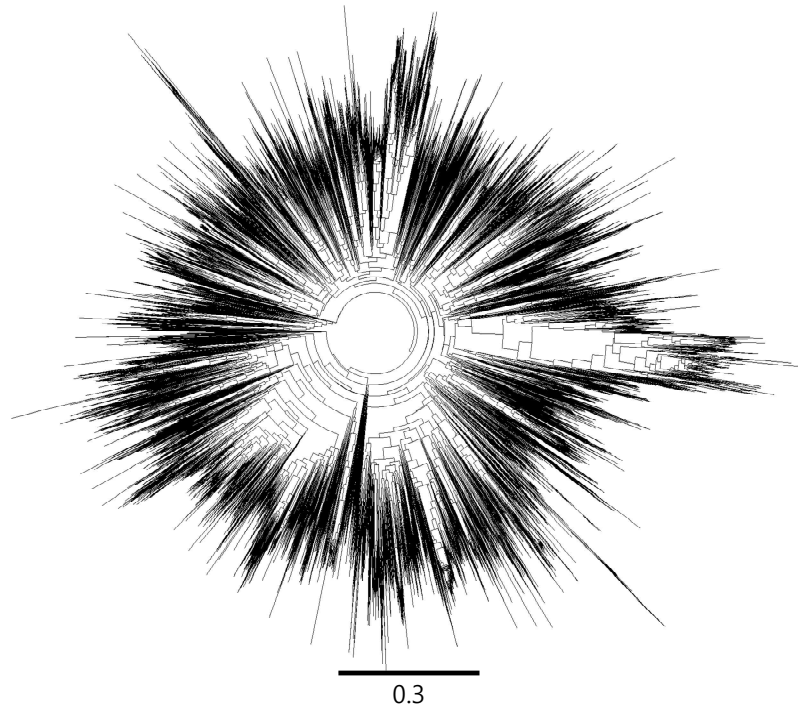


Fig. 3.1.1. Phylogenetic relationships among the COX1 106,363 sequences of fishes from the NCBI/GenBank exhibited in the FastTree.

Qiime2 pipeline으로 혼합어란 MiSeq raw data 분석을 위해 NCBI/GenBank에서 어류를 포함한 진핵생물의 COX1 추출 후 중복염기서열 및 degenerates 5개 이상, homopolymer 12개 이상의 염기서열이 제거된 약 190만 건을 어란 중 동정의 reference로 사용하였다. Table 3.1.1에 나열된 864건의 MiSeq 원시자료를 Qiime2 pipeline에서 진핵생물의 COX1 reference와 비교하여 어란 종을 탐지하였다.

제2절 Mothur pipeline

Mothur는 <https://mothur.org>에 접속하여 컴퓨터 운영체제(window, linux, OSX-10 등)에 적합한 프로그램을 download 받아 설치하였다. Mothur를 이용

하기 위해서는 3.2.2의 stability.files, 3.2.3의 oligos.oligos, 3.2.4의 reference=COX1.ref.pices.mlCOIntF_jgHC02198_20211221.ver.02.fasta (정렬된 참조 염기서열), 3.2.5의 taxonomy=COX1.ref.pices.mlCOIntF_jgHC02198_20211221.ver.02.tax (3.2.4의 염기서열에 상응한 종 정보)가 분석할 MiSeq 원시자료와 한 폴더에 있어야 한다.

3.2.1. mothur scripts

Mothur 실행 후 내부 명령 프롬프트에서 아래의 script를 한 줄씩 실행한다 (일괄 수행 가능). 모든 실행 결과는 /home/mothur.working에서 볼 수 있다.

- 아래 -

```
$set.dir(input=/home/mothur.working)
$make.contigs(file=stability.files, oligos=oligos.oligos, pdiffs=3, processors=12)
$summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.fasta)
$screen.seqs(fasta=stability.trim.contigs.fasta, group=stability.contigs.groups,
summary=stability.trim.contigs.summary, maxambig=0, minlength=250,
maxlength=350)
$summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.fasta)
$unique.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.fasta)
$count.seqs(name=stability.trim.contigs.good.names,
group=stability.contigs.good.groups)
$summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.fasta,
count=stability.trim.contigs.good.count_table)
$align.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.fasta,
reference=COX1.ref.pices.mlCOIntF_jgHC02198_20211221.ver.02.fasta, flip=t)
$summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.align,count=stability.trim.conti
gs.good.count_table)
$screen.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.align,
count=stability.trim.contigs.good.count_table,
summary=stability.trim.contigs.good.unique.summary, maxambig=0,
minlength=250,maxlength=330)
$summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.align,count=stability.trim.
```

```

contigs.good.good.count_table)
$unique.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.align,
count=stability.trim.contigs.good.good.count_table)
$pre.cluster(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.align,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.count_table, diffs=2)
$chimera.uchime(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.align,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.count_table,
dereplicate=t)
$remove.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.align,
accnos=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.denovo.uchime.accnos)
$summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.align)
$classify.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.align,
,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.denovo.uchime.pick.count_table, reference=COX1.ref.pices.mlCOIintF_jgHC02198_20211221.ver.02.fasta,
taxonomy=COX1.ref.pices.mlCOIintF_jgHC02198_20211221.ver.02.tax, cutoff=80)
$remove.lineage(taxonomy=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.02.wang.taxonomy,
fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.align,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.denovo.uchime.pick.count_table, taxon=unknown;)
$summary.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.pick.align)
$dist.seqs(fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.pick.align, cutoff=0.03)
$phylotype(taxonomy=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.02.wang.pick.taxonomy, label=1)
$classify.otu(list=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.02.wang.pick.tx.list,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.denovo.uchime.pick.pick.count_table,
taxonomy=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.02.wang.pick.equalized.taxonomy, label=1)

```

```
$make.shared(list=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.02.wan
g.pick.tx.list,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.denovo.uchime.pick.pi
ck.count_table, label=1)
$get.oturep(list=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.02.wan
g.pick.tx.list,
column=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.pick.dist,
count=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.denovo.uchime.pick.pi
ck.count_table,
fasta=stability.trim.contigs.good.unique.good.unique.precluster.pick.pick.align,
label=1)
$quit()
```

3.2.2. stability.files

파일 형식은 아래와 같다.

- 아래 -

```
YD1 YD1_1.fastq YD1_2.fastq
YD2 YD2_1.fastq YD2_2.fastq
```

3.2.3. oligos.oligos

파일 형식은 아래와 같다.

- 아래 -

```
primer GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA
```

3.2.4. reference

reference=COX1.ref.pices.mlCOLintF_jgHC02198_20211221.ver.02.fasta
 는 총 106,363건의 염기서열로 만들어졌다. Reference의 자료 형식은
 아래와 5개 염기서열과 같이 MFAFFT(Katoh and Standley, 2013)로 정렬한

결과이다.

- 아래 -

>AB006953

```

---ggcac-cgga-tgaa-c-agta-tac---ccc-cctcttgca---ggaaa-cc-tg-gcc--cacg--c-a
-ggag-catcag-tagacctaacatt-tt-ctc-acta-c-a-tt--ta-g-c--a-ggt-g-ttcatc-aa-t--
-c-ct-t-ggggcaa-tc-aa-c-ttc-----attactac-aact-a-tt-a---ac-a-t-aaaa---
-cct-c--c-a-g-cca-----tct-cccag---ta-c-c-aaa---ca-cc-----c--c-t-a-
tt--t-g-ttt-gat-c---c-g-tac---t--t-g-ta-a-ccg-c-c-g---t--t-ct-c---c-
--t--t-c-tc---c---ta-t-c--a---c-t---a-cc-t-----g---tcc-t-----g
-g--c-t-g-c-c-gg-t-a--t-t-a--c-a-a-tg---c-tt--t-t--aa--c-----ag-
--a-t-c-g-----aaa--t-----c-t--ca-a-c-a--c-c---a---c---a--t-t
--c-----tt-t-ga-t-c-----c-c-g-c-a--g--g-c--g-
g-----g--g-----g-a--g-a-----c-----
---c---c-----a--a---t--c-c---t--c---t--a--c-c--a--a-
---c---a-c-t-ta--t-t-c-----t--g-a--tt--c--t-tt--g-g-----t----
--c--a--c--c--g--g--a-a-g---ttaa-----

```

>LC097946

```

---ggcac-cgga-tgaa-c-agta-tac---ccc-cctcttgca---ggaaa-cc-tg-gcc--cacg--c-a
-ggag-catcag-tagacctaacatt-tt-ctc-acta-c-a-tt--ta-g-c--a-ggt-g-ttcatc-aa-t--
-c-ct-t-ggggcaa-tc-aa-c-ttc-----attactac-aact-a-tt-a---ac-a-t-aaaa---
-cct-c--c-a-g-cca-----tct-cccag---ta-c-c-aaa---ca-cc-----c--c-t-a-
tt--t-g-ttt-gat-c---c-g-tac---t--t-g-ta-a-ccg-c-c-g---t--t-ct-c---c-
--t--t-c-tc---c---ta-t-c--a---c-t---a-cc-t-----g---tcc-t-----g
-g--c-t-g-c-c-gg-t-a--t-t-a--c-a-a-tg---c-tt--t-t--aa--c-----ag-
--a-t-c-g-----aaa--t-----c-t--ca-a-c-a--c-c---a---c---a--t-t
--c-----tt-t-ga-t-c-----c-c-g-c-a--g--g-c--g-
g-----g--g-----g-a--g-a-----c-----
---c---c-----
-----
-----
-----

```

>AP011239

```

---ggcac-cgga-tgaa-c-agta-tac---ccc-cctcttgca---ggaaa-cc-tg-gcc--cacg--c-a
-ggag-catcag-tagacctaacatt-tt-ctc-acta-c-a-tt--ta-g-c--a-ggt-g-ttcatc-aa-t--
-c-ct-t-ggggcaa-tc-aa-c-ttc-----attactac-aact-a-tt-a---ac-a-t-aaaa---
-cct-c--c-a-g-cca-----tct-cccag---ta-c-c-aaa---ca-cc-----c--c-t-a-
tt--t-g-ttt-gat-c---c-g-tac---t--t-g-ta-a-ccg-c-c-g---t--t-ct-c---c-

```



```

--t--t-c-tc---c---ta-t-c--a---c-t---a-cc-t-----g---tcc-t-----g
-g--c-t-g-c-c-gg-t-a--t-t-a--c-a-a-tg---c-tt--t-t--aa--c-----ag-
--a-t-c-g-----aaa--t-----c-t--ca-a-c-a--c-c---a---c---a--t-t
--c-----tt-t--ga-t-c-----c-c--g-c-a--g--g-c--g-
g-----g--g-----g-a--g-a-----t-----
--c--c-----a--a---t--c-c--t--c---t--a--c-c--a--a-
---c--a-c-t-ta--t-t-c-----t--g-a--tt--c--t-tt--g-g-----t---
--c--a--c--c-c--a--g--a-a-g---ttta-----

```

>LC097943

```

---ggcac-cgga-tgaa-c-agta-tac---ccc-cctcttgca---ggaaa-cc-tg-gcc--cacg--c-a
-ggag-catcag-tagacctaacatt-tt-ctc-acta-c-a-tt--ta-g-c--a-ggt-g-tttcatc-aa-t--
-c-ct-t-ggggcaa-tc-aa-c-ttc-----attactac-aact-a-tt-a---ac-a-t-aaaa---
-cct-c--c-a-g-cca-----tct-cccag---ta-c-c-aaa---ca-cc-----c--c-t-a-
tt--t-g-ttt-gat-c---c-g-tac---t--t-g-ta-a-ccg-c-c-g---t--t-ct-c---c-
--t--t-c-tc---c---ta-t-c--a---c-t---a-cc-t-----g---tcc-t-----g
-g--c-t-g-c-c-gg-t-a--t-t-a--c-a-a-tg---c-tt--t-t--aa--c-----ag-
--a-t-c-g-----aaa--t-----c-t--ca-a-c-a--c-c---a---c---a--t-t
--c-----tt-t--ga-t-c-----c-c--g-c-a--g--g-c--g-
g-----g--g-----g-a--g-a-----t-----
--c--c-----
-----
-----
-----
-----

```

>KJ553287

```

---ggcac-cgga-tgaa-c-agta-tac---ccc-cctcttgca---ggaaa-cc-tg-gcc--cacg--c-a
-ggag-catcag-tagacctaacatt-tt-ctc-actg-c-a-tt--ta-g-c--a-ggt-g-tttcatc-aa-t--
-c-ct-t-ggggcaa-tc-aa-c-ttc-----attactac-aact-a-tt-a---ac-a-t-aaaa---
-cct-c--c-a-g-cca-----tct-cccag---ta-c-c-aaa---ca-cc-----c--c-t-a-
tt--t-g-tct-gat-c---c-g-tac---t--t-g-ta-a-ccg-c-c-g---t--t-ct-c---c-
--t--t-c-tc---c---ta-t-c--a---c-t---a-cc-t-----g---tcc-t-----g
-g--c-t-g-c-c-gg-t-a--t-t-a--c-a-a-tg---c-tt--t-t--aa--c-----ag-
--a-t-c-g-----aaa--t-----c-t--ca-a-c-a--c-c---a---c---a--t-t
--c-----tt-t--ga-t-c-----c-c--g-c-a--g--g-c--g-
g-----g--g-----g-a--g-a-----t-----
--c--c-----a--a---t--c-c--t--c---t--a--c-c--a--a-
---c--a-c-t-ta-----
-----
-----

```

3.2.5. taxonomy

taxonomy=COX1.ref.pices.mlCOLintF_jgHC02198_20211221.ver.02.tax의 자료 형식은 아래와 같다. taxonmoy 파일은 아래의 5 분류군를 포함하여 총 106,363건이다.

- 아래 -

```
AB006953 Actinopteri;Cypriniformes;Cyprinidae;Carassius;Carassius_langsdorfii_AB006953;
LC097946 Actinopteri;Cypriniformes;Cyprinidae;Carassius;Carassius_auratus_grandoculis_LC097946;
AP011239 Actinopteri;Cypriniformes;Cyprinidae;Carassius;Carassius_auratus_grandoculis_AP011239;
LC097943 Actinopteri;Cypriniformes;Cyprinidae;Carassius;Carassius_auratus_grandoculis_LC097943;
KJ553287 Actinopteri;Cypriniformes;Cyprinidae;Carassius;Carassius_langsdorfii_KJ553287;
```

제3절 Qiime2 pipeline

3.3.1. Qiime2 설치(Linux)

Qiime2는 <https://docs.qiime2.org/2022.2/install/>를 참고하였다. 그 과정은 아래와 같다.

- 아래-

```
$conda update conda
$conda install wget
$wget https://data.qiime2.org/distro/core/qiime2-2022.2-py38-linux-conda.yml
$conda env create -n qiime2-2022.2 --file qiime2-2022.2-py38-linux-conda.yml
$rm qiime2-2022.2-py38-linux-conda.yml # OPTIONAL CLEANUP
$conda activate qiime2-2022.2
$qiime --help
```

3.3.2. Taxonomy custom reference DB 구축

COX1 reference DB 구축 과정은 <https://forum.qiime2.org/t/building-a-coi-database-from-ncbi-references/>

16500를 참고하였다.

설치과정 1: 아래와 같은 script를 수행하면
/NFS/users/cldns809/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime 폴더에
sequences.qza(sequence reads)와 taxonomy.qza (분류군 정보) 두 개의
파일이 형성된다.

- 아래 -

```
~$conda activate qiime2-2021.11
~$conda install -c conda-forge -c bioconda -c qiime2 -c defaults xmltodict
~$sudo apt-get install git
~$pip install git+ https://github.com/bokulich-lab/RESCRIPT.git
~$qiime dev refresh-cache
~$qiime --help
~$qiime rescript get-ncbi-data --p-query 'txid2759[ORGN] AND (cytochrome c
oxidase subunit 1[Title] OR cytochrome c oxidase subunit I[Title] OR cytochrome
oxidase subunit 1[Title] OR cytochrome oxidase subunit I[Title] OR COX1[Title]
OR CO1[Title] OR COI[Title]) AND "BARCODE"[KYWD] NOT
environmental*[Title] ' --output-dir
/NFS/users/cldns809/NCBI_COI_notEnv_for_Qiime
```

~/NFS/users/cldns809/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime 폴더에 아래와
같은 2개 파일 생성된다.

- 아래 -

```
sequences.qza #sequence reads
taxonomy.qza #분류군 정보
```

Eukaryota 검색을 위한 txid2759 코드는 아래의 두 URL 주소 참조
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/TaxIdentifier/tax_identifier.cgi
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

설치과정 2: Reference로 사용할 염기서열에서 degenerates (R, Y, M, K,
S, W, V, H, B, D, N 등 5개 이상)와 homopolymer (12개 이상)을 아래의
script를 사용하여 제거하였다.

- 아래 -

```

~$qiime rescript cull-seqs --i-sequences
/home/users/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/sequences.qza --p-num-degenerates 5
--p-homopolymer-length 12 --o-clean-sequences
/home/users/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/NCBI_COX1_Eukaryota_notEnv_ambi_hpo
ly_filtd_seq.qza &

```

설치과정 3: 위의 결과에서 염기서열의 길이가 250 - 1600bp를 벗어난 것은 아래의 script를 이용하여 제거하였다.

- 아래 -

```

~$qiime rescript filter-seqs-length --i-sequences
/home/users/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/NCBI_COX1_Eukaryota_notEnv_ambi_hpo
ly_filtd_seq.qza --p-global-min 250 --p-global-max 1600 --o-filtered-seqs
/home/users/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/NCBI_COX1_Eukaryota_notEnv_ambi_hpo
ly_length_filtd_seq.qza --o-discarded-seqs
/home/users/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/NCBI_COX1_Eukaryota_notEnv_ambi_hpo
ly_length_discarded_seq.qza &

```

설치과정 4: 마지막으로 중복염기서열을 아래의 script를 이용하여 제거하여 진핵생물의 COX1 reference를 완성하였다. 이 염기서열 파일을 이용하여 Qiime2 pipeline으로 혼합어란의 MiSeq raw data를 분석하였다.

- 아래 -

```

~$qiime rescript dereplicate --verbose --i-sequences
/home/users/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/NCBI_COX1_Eukaryota_notEnv_ambi_hpoly_lengt
h_filtd_seq.qza --i-taxa /home/users/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/taxonomy.qza
--p-mode 'super' --p-derep-prefix --p-rank-handles 'silva'
--o-dereplicated-sequences
/home/users/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/NCBI_COI_notEnv_derep1_seqs.qza
--o-dereplicated-taxa
/home/users/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/NCBI_COI_notEnv_derep1_taxa.qza
--p-threads 24

```

3.3.3. manifest.csv

파일 형식은 아래와 같다.

- 아래 -

```
sample-id,absolute-filepath,direction
YD1,/home/Q2mbarcoding/YD1_1.fastq,forward
YD1,/home/Q2mbarcoding/YD1_2.fastq,reverse
YD2,/home/Q2mbarcoding/YD2_1.fastq,forward
YD2,/home/Q2mbarcoding/YD2_2.fastq,reverse
```

3.3.4. Metadata.txt

파일 형식은 아래와 같다.

- 아래 -

#SampleID	Sampling_Date	Longitude_E	Latitude_N	SST_Celcius	Salinity_psu
YD1	2018	NA	NA	NA	NA
YD2	2018	NA	NA	NA	NA

3.3.5. Qiime2 pipeline

Qiime2를 이용한 혼합어란의 MiSeq raw data pipeline은 아래와 같다.

- 아래 -

```
$qiime tools import --type 'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' --input-path
/home/Q2mbarcoding/manifest.csv --output-path
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding.qza --input-format
PairedEndFastqManifestPhred33 &
$qiime demux summarize --i-data /home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding.qza
--o-visualization /home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding-summary.qzv &
$qiime cutadapt trim-paired --i-demultiplexed-sequences
"/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding.qza" --p-front-f
GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC --p-front-r
TANACYTCNGGRTGNCCRAARAYCA --p-no-match-read-wildcards
--p-discard-untrimmed --p-match-adapter-wildcards --o-trimmed-sequences
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_Primer_Trimed.qza --p-cores 12 --verbose
&
```

```

$time qiime dada2 denoise-paired --i-demultiplexed-seqs
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_Primer_Trimed.qza --p-trim-left-f 0
--p-trim-left-r 0 --p-trunc-len-f 250 --p-trunc-len-r 250 --o-table
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_table_denoise.qza
--o-representative-sequences
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_table_denoise-rep-seq.qza --o-denoising-stats
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_denoise-stats.qza --p-chimera-method
consensus --p-n-threads 120 --verbose --p-trunc-q 2 &

$qiime feature-table summarize --i-table
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_table_denoise.qza --o-visualization
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_table_denoise.qzv --m-sample-metadata-file
/home/Q2mbarcoding/Metadata.txt &

$qiime feature-table tabulate-seqs --i-data
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_table_denoise-rep-seq.qza --o-visualization
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_table_denoise-rep-seq.qzv &

$qiime metadata tabulate --m-input-file
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_denoise-stats.qza --o-visualization
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_denoise-stats.qzv &

$qiime feature-classifier classify-consensus-blast --i-query
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_table_denoise-rep-seq.qza --i-reference-reads
/home/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/NCBI_COI_notEnv_derep1_seqs.qza
--i-reference-taxonomy
/home/NCBI_COX1_Eukaryota_for_Qiime/NCBI_COI_notEnv_derep1_taxa.qza
--p-perc-identity 0.99 --o-classification
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_taxonomy-blast99.qza --verbose &

$qiime metadata tabulate --m-input-file
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_taxonomy-blast99.qza --o-visualization
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_taxonomy-blast99.qzv

$qiime taxa barplot --i-table /home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_table_denoise.qza
--i-taxonomy /home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_taxonomy-blast99.qza
--m-metadata-file /home/Q2mbarcoding/Metadata.txt --o-visualization
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_bar-plots-blast99.qzv
    
```

```

$qiime taxa filter-table --i-table
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_table_denoise.qza --i-taxonomy
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_taxonomy-blast99.qza --p-exclude
Unassigned,K__Viridiplantae,K__Fungi --o-filtered-table
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_filtered-table.qza
$qiime taxa barplot --i-table /home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_filtered-table.qza
--i-taxonomy /home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_taxonomy-blast99.qza
--m-metadata-file /home/Q2mbarcoding/Metadata.txt --o-visualization
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_filtered-bar-plots-blast99.qzv
$qiime taxa collapse --i-table /home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_filtered-table.qza
--i-taxonomy /home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_taxonomy-blast99.qza --p-level
7 --o-collapsed-table
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_filtered_collapsed_table.qza
$qiime tools export --input-path /home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_filtered-table.qza
--output-path /home/Q2mbarcoding/Phyloseq #feature-table.biom 생성됨
$qiime tools export --input-path
/home/Q2mbarcoding/fishEggMBarcoding_taxonomy-blast99.qza --output-path
/home/Q2mbarcoding/Phyloseq #taxonomy.tsv 생성됨
$biom convert -i /home/Q2mbarcoding/Phyloseq/feature-table.biom -o
/home/Q2mbarcoding/Phyloseq/feature-table.tsv --to-tsv
$biom head -i /home/Q2mbarcoding/Phyloseq/feature-table.tsv

```

3.3.6. Qiime2 분석결과 보기

Qiime2로 분석한 결과는 *.qzv 또는 *.qza의 압축파일이다. 이 파일을 보기 위해서는 <https://view.qiime2.org/>에서 txt 파일 형식으로 변환해야 한다.

제4절 통영해양생물자원기지 혼합어란의 종조성

한국해양과학기술원의 통영해양생물자원기지에서 2013년부터 2019까지 7년간 격주로 수집한 혼합어란의 MiSeq 원시자료를 mothur pipeline으로 분석하였다. 그 결과 혼합어란에서 산란참여종 14목 41과 55속 73종을 찾았다(Table 4.1.1). 이 중에서 농어목(Perciformes)이 22종으로 가장 다양하였다.

Table 4.1.1. A taxonomic list of the pelagic fish eggs from Tongyoung Marine Living Resources Station during 2013–2019 period

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Chordata	Actinopteri	Acanthuriformes	2	3	3
		Acropomatiformes	1	1	1
		Aulopiformes	1	1	1
		Blenniiformes	1	1	2
		Carangiformes	7	9	14
		Centrarchiformes	1	1	1
		Clupeiformes	3	5	5
		Gadiformes	1	1	1
		Ophidiiformes	1	1	1
		Perciformes	12	16	22
		Perciformes_sedis_mutabilis	5	6	9
		Scombriformes	3	5	5
		Syngnathiformes	2	3	5
		Tetraodontiformes	1	2	3
		Total		14	41

제5절 한반도 연근해 혼합어란의 종 조성

통영해양생물자원기지를 포함하여 한반도 연근해에서 2012년부터 2020년까지 9년간 한국해주변에서 수집한 혼합어란의 MiSeq 자료를 Qiime2 pipeline으로 분석하였다. 분석 결과 총 2문 2강 35목 96과 190속 260종을 발견하였다(Table 5.1.1). 이 중에서 어류는 34목 94과 186속 256종, 연체동물은 1목 2과 4속 4종이었다.

Table 5.1.1. A taxonomic list of the pelagic eggs off Korean waters during 2012-2020 period

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Chordata	Actinopteri	Anguilliformes	3	3	4
		Aulopiformes	2	5	8
		Beloniformes	2	2	3
		Blenniiformes	2	3	6
		Carangiformes	2	9	11
		Centrarchiformes	7	8	9
		Chaetodontiformes	2	4	4
		Clupeiformes	3	9	14
		Cypriniformes	1	1	1
		Euteleosteomorpha	9	17	22
		Gadiformes	2	2	2
		Gerreiformes	1	1	1
		Gobiiformes	1	8	13
		Kurtiformes	1	1	1
		Labriformes	1	9	13
		Lobotiformes	1	1	2
		Lophiiformes	1	1	1
		Lutjaniformes	2	4	4
		Mugiliformes	1	2	2
		Myctophiformes	1	2	2
		Ophidiiformes	2	2	3
		Osmeriformes	1	1	1
		Pempheriformes	5	6	7
		Perciformes	12	22	28
		Pleuronectiformes	6	22	31
		Priacanthiformes	1	1	1
		Scombriformes	7	15	21
		Siluriformes	1	1	1
		Spariformes	3	6	9
		Stomiiformes	2	2	2
		Syngnathiformes	3	6	15
		Tetraodontiformes	3	5	5
		Trachichthyiformes	1	1	1
Uranoscopiformes	2	4	8		
Mollusca	Cephalopoda	Teuthida	2	4	4
Total		35	96	190	260

제6절 주요 어종의 어란 분포도

3.6.1. 멸치(*Engraulis japonicus*)

2017-2020년 한반도 연안의 계절별 조사에서 어란으로 확인된 멸치의 산란해역은 한반도 연안 전역이었다(Fig. 3.6.1). 어란의 출현 빈도로부터 이 종의 주 산란시기는 봄철이었다. 여름철은 봄철보다 어란 발견해역이 넓지만, 출현빈도는 봄보다 낮았다. 가을과 겨울에는 남해의 일부 정점에서만 어란이 출현하였다.

HTS 염기서열에서 추출한 대표 염기서열의 하나는 아래와 같다. 이 염기서열은 *Engraulis japonicus* 참조유전자 염기서열 MW128517.1과 99.35% 일치하였다.

-아래-

```
TCTAGCAGGAAACCTCGCCCACGCCGAGCATCAGTAGATTTAACAATCTTCTCTCT
CCACTTGGCAGGGATTTTCATCAATCCTAGGTGCCATTAATTTTCATTACTACCATCAT
TAATATGAAACCACCTGCTATTTTACAATACCAGACACCTCTATTTGTCTGAGCTGT
ATTAATCACGGCAGTACTTTTACTTCTTTCACTACCCGTTCTAGCTGCTGGGATTAC
TATGCTTCTCACAGACCGAAACCTAAATACTACTTTCTTCGACCCAGCAGGGGGAGG
AGACCCAATTCTTTATCAACACCT
```

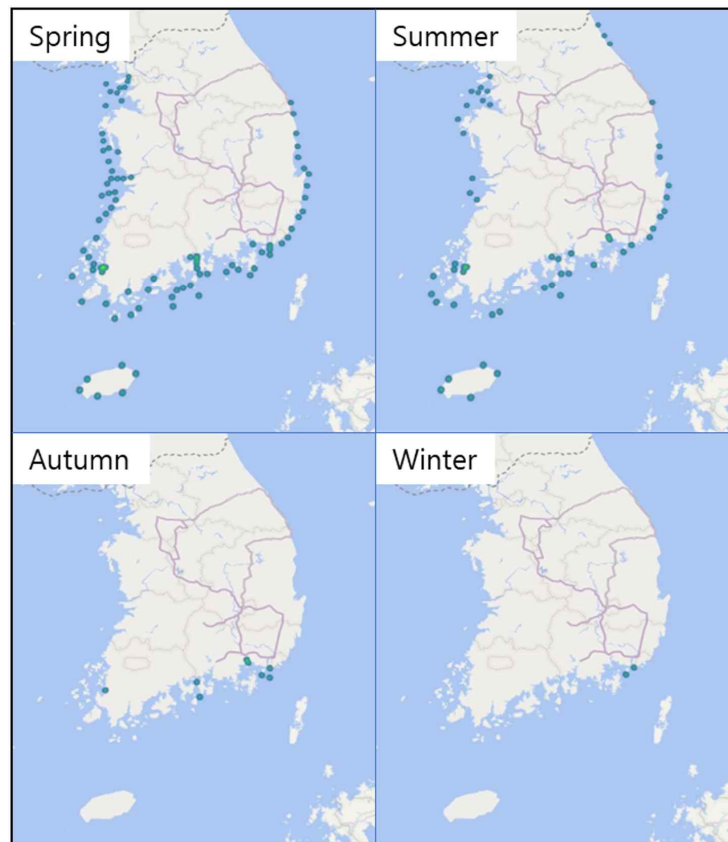


Fig. 3.6.1. A spawning map based on the *Engraulis japonicus* eggs in the coastal waters off the Korean Peninsular during the 2017-2020 period

3.6.2. 청보리멸(*Sillago japonica*)

2017-2020년 계절별 조사에서 청보리멸로 동정된 어란은 한반도 연안의 광범위한 해역에 분포하였다(Fig. 3.6.2). 이 종의 어란이 발견된 시기는 주로 봄과 여름철이었다. 어란의 출현빈도와 분포 해역으로 보아 주 산란시는 여름철이었다. 주요 산란장은 남해와 서해의 광범위한 해역이었다. 이에 반해 동해에서는 울진 이남이 산란장이었다.

HTS 염기서열에서 작성된 대표 염기서열의 하나는 아래와 같다. 이 염기서열은 *Sillago japonica* 참조유전자 염기서열 MK264510.1과 99.04% 일치하였다.

-아래-

TTTGGCAGGGAATTTAGCCACGCAGGGGCTTCTGTTGATTAACTATTTT

TTCTCTTCACTTGGCAGGGATTTTCATCGATTTTATAGGGGCAATTAACCTTCAT
 TACAACTATCATCAACATAAAAACCTCCAGCAACTTCACAATATCAAACCCC
 CCTATTCGTATGATCTGTTCTAATTACAGCCGTTCTTCTACTCCTCTCACT
 CCCAGTACTTGCCGCTGGAATTACTATGCTTCTAACGGATCGAAATCTAAA
 CACCACGTTCTTTGACCCTGCTGGGGGTGGTGACCCAATTCTTTACCAACA
 CCTCTTC

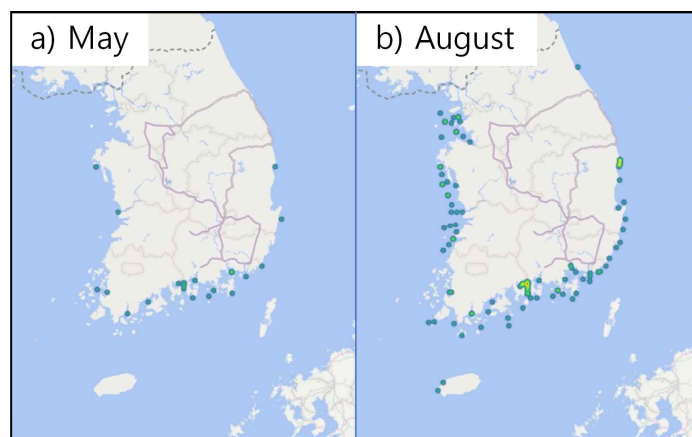


Fig. 3.6.2. A spawning map of *Sillago japonica* found by DNA metabarcoding on the mixed fish eggs in the coastal waters off the Korean Peninsula during 2017–2020 period

3.6.3 민어(*Miichthys miiuy*)

2017–2020년 계절별 조사에서 민어로 확인된 알이 분포한 해역은 전라남도 신안의 시야해였다(Fig. 3.6.3). 어란이 발견된 시기는 8월이었다. 이 종은 멸치와 청멸과 달리 어란 출현빈도와 발견해역은 매우 좁았다.

HTS 염기서열로 만든 대표 염기서열의 하나는 아래와 같다. 이 염기서열은 *Miichthys miiuy* 참조유전자 염기서열 MK560626.1과 99.68% 일치하였다.

- 아래 -

ACTTGCTGGAAACCTCGCACATGCAGGGGCTCCGTCGACTTGGCCATCTTTTCCC
 TTCACCTCGCAGGTGTTTCCTCAATTCTAGGTGCCATCAACTTTATTACAACTATT

ATCAACATAAAACCCCCAGCCATCTCCCAGTACCAGACACCCTTATTCGTATGGGC
 CGTCCTGATCACAGCAGTCCTCCTCCTGCTCTCACTCCCTGTCTTAGCTGCCGGCA
 TTACAATACTTCTAACAGACCGTAAACCTAAACACAACCTTCTTCGACCCCGCAGGC
 GGAGGCGACCCCATCCTTTACCAACATTTATTC



Fig. 3.6.3. A spawning map of *Miichthys miiuy* found by DNA metabarcoding on the mixed fish eggs in the coastal waters off the Korean Peninsula during 2017-2020 period

제7절 토의

어란은 형태적 유사성이 높아 종동정의 기준인 형태형질을 이용하여 종 수준으로 동정하는 것은 매우 어렵다(Shao et al., 2001; Ikeda et al., 2014). 이용 가능한 어란의 형태학적 분류형질 정보가 매우 적고, 난의 배아는 발생으로 인해 급격하게 변하기 때문이다. 대안은 생활사에 따라 변하지 않는 DNA 바코드 염기서열을 어란 중 동정의 지표로 사용하는 것이다. 여기에서 DNA 바코드는 종간 종내 유전적 거리를 기반으로 한 일종의 종 판별에 사용할 수 있는 지표의 하나이다(Hebert et al., 2003; Kim et al., 2008; Oh

and Kim, 2015; Delrieu-Trottin et al., 2018; Choi et al., 2018).

본 연구의 어란 종 동정 지표는 미토콘드리아 COX1 영역이다. 이 바코드 분석에 하나의 어란을 분석하는 Sanger sequencing 대신, 대량의 혼합어란 분석에 효과적인 HTS(high-throughput sequencing; Duke and Burton, 2020; 알려진 혼합어란 시료를 이용한 어란 종동정에 대한 시범적 첫 연구 사례) 방법을 활용하였다. HTS를 이용한 DNA 메타바코딩은 분석 효율을 높이기 위해 각각의 시료에 index 염기서열을 부착한 후 혼합하여 동시에 분석한다(Amplicon et al., 2013). 이와 같은 HTS 기반의 DNA 메타바코딩은 동플랑크톤상(Song et al., 2021)이나 eDNA 기반의 어류상(Kim and Song, 2021) 분석에도 이미 활용되고 있다.

혼합어란 분석을 위해 동물플랑크톤과 어란을 분리할 때 해부현미경과 핀셋을 사용한다. 이때 어란에서 유출된 DNA가 다른 어란 시료를 오염시킬 수 있다. 다행히 어란은 두꺼운 난막이 배아세포를 감싸고 있고 난막에 손상이 없는 한 한 배아로부터 DNA 유출은 발생하지 않는다(Takeuchi et al., 2019).

본 연구에서 확보한 대량의 혼합어란 HTS 염기서열을 mothur와 Qiime2 두 종류의 메타바코딩 적용에 성공하였다. 멸치와 엘통이 두 종의 알은 형태형질로도 충분히 종 수준의 동정이 가능함을 확인하였다. 두 종의 어란은 DNA 메타바코딩 과정에서 분석오류를 탐지하는 positive control로써 매우 유용하였다.

DNA 메타바코딩으로 확인한 260종의 어란(두족류 4종 포함) 중에서 멸치, 청보리멸, 민어 등의 3종에 대해 어란기반 산란장 지도를 작성하였다. 이 때 함께 제공된 종 종판별 기준인 COX1 염기서열은 어란기반 산란장 지도 작성에서 종동정의 정확성 및 사후 검정의 중요한 기준이 될 것이다.

멸치알의 경우 종동정은 형태형질과 DNA 메타바코딩 두 결과의 혼합물이다. 멸치알은 형태형질만으로도 종 수준의 동정이 가능하였다. 축적된 과거의 멸치알의 기록도 산란장 분석에 재분석에 매우 유용할 것이다. 이에 반하여 청보리멸은 멸치알과 달리 보고된 자료가 매우 적지만 보고사례가 있다(Cha and Shim, 1988). 하지만 종동정의 정확성을 검증할 수 있는 정보는 없는 실정이다. 민어알은 출현정보가 거의 없다. 이 종의 알이 발견된 해역은 한반도 서남부의 시아해에서 8월에 반복적으로 출현하는 것으로 보아 이 종의 주요 산란장을 발견한 것으로 판단된다.

본 연구를 종합하면 혼합어란의 DNA 메타바코딩은 다양한 어종의 산란모니터링에 매우 유용한 방법으로 판단된다.

제4장 연구개발결과의 활용계획 및 파급효과

제4장 연구개발결과의 활용계획 및 파급효과

제1절 연구개발 결과의 활용계획

- 한반도 주변해 어류의 종별 산란장 지도 작성
- 어란 기반 경골어류의 종별 시계열 산란 모형
- 어란 기반 외래 유입종 탐사

제2절 연구개발 결과의 파급효과

- 기술적 측면: 정확한 어류의 종별 산란장 지도 작성 방법
 - 상업성 어류 위주의 어류 산란장 지도를 비상업종으로 확대
 - 발견 확률이 높은 어란은 산란 모니터링 지표
 - 다양한 어종의 동시 산란 모니터링
 - 어란 기반 미보고 희귀종의 한반도 주변해 유입 탐지
 - 생식소 속도지수 분석 방법의 대체
- 경제 산업적 측면: 다양한 어종의 산란장(어장) 동시 모니터링
 - 경제적인 어류산란 모니터링 방법
 - 어란 채집 비용은 산란기 성체 채집보다 매우 저렴
 - 어류의 종별 산란생태 정보에 근거한 어류자원 관리방안 수립에 기여
- 사회적 측면: 기후변화에 따른 한반도 아열대화의 생태학적 근거 확보
 - 아열대종의 산란을 이용한 한반도 주변해 기후변화 모니터링
 - 다양한 기후대 어류(한류성, 온대성, 아열대, 열대, 심해 종 등)의 산란 유무

제5장 참고문헌

제5장 참고문헌

- Amplicon PCR, Clean-Up PCR, 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.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, ..., Caporaso JG. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852-857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- Cha SS, Shim JH. 1988. Seasonal variations of the pelagic fish egg community in the mid-east coastal waters of the Yellow Sea. *J. Oceanological Soc. Korea* 23(4): 184-193.
- Choi HY, Oh J, Kim S. 2018. Genetic identification of eggs from four species of Ophichthidae and Congridae (Anguilliformes) in the northern East China Sea. *PloS One* 13(4):e0195382.
- Delrieu-Trottin E, Liggins L, Trnski T, Williams JT, Neglia V, Rapu-Edmunds C, Planes S, Saenz-Agudelo P. 2018. Evidence of cryptic species in the blenniid *Cirripectes alboapicalis* species complex, with zoogeographic implications for the South Pacific. *Zookeys* 810: 127-138.
- Duke EM, Burton RS. 2020. Efficacy of metabarcoding for identification of fish eggs evaluated with mock communities. *Ecol. Evol.* 10(7): 3463-3476.
- Geller J, Meyer C, Parker M, Hawk H. 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular ecology resources* 13(5): 851-861.
- Han SH, Kim MJ, Song CB. 2015. Molecular identification and distribution pattern of fish eggs collected around Jeju Island. *Korean J. of Ichthyology* 27(4): 284-292.
- Harada AE, Lindgren EA, Hermsmeier MC, Rogowski PA, Terrill E, Burton RS. 2015. Monitoring spawning activity in a Southern California marine protected area using molecular identification of fish eggs. *PloS one*

- 10(8), e0134647.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the royal society B* 270(1512): 313-321.
- Ikeda T, Hirai A, Tabata S, Onishi Y, Mito S. 2014. In: *An atlas of early stage fishes in Japan*. 2nd edition (Okiyama M. editor), 108 pp. Tokyo: Tokai University Press.
- Jang SH, Kim JK, Ryu JH. 2020. 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(4): 650-655.
- Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution* 30(4): 772-780.
- Kim G, Song Y. 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. *Journal of Environmental Impact Assessment* 30(1): 1-12.
- Kim S, Kim CG, Oh J, Kim BJ, Seo HS, Kim WS, Lee YH. 2008. Genetic similarity between the South Atlantic and the western North Pacific *Maurolicus* (Stomiiformes: Actinopterygii) taxa, *M. walvisensis* Parin & Kobylansky and *M. japonicus* Ishikawa: evidence for synonymy? *J. Fish. Biol.* 72(5): 1202-1214.
- Kwiatkowski L, Torres O, Bopp L, Aumont O, Chamberlain M, ..., Ziehn T. 2020. Twenty-first century ocean warming, acidification, deoxygenation, and upper-ocean nutrient and primary production decline from CMIP6 model projections. *Biogeosciences* 17(13): 3439-3470.
- Leray M, Yang JY, Meyer CP, Mills SC, Agudelo N, Ranwez V, Boehm JT, Machida RJ. 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. *Frontiers in zoology* 10(1): 34.
- Lewis LA, Richardson DE, Zakharov EV, Hanner R. 2016. Integrating DNA barcoding of fish eggs into ichthyoplankton monitoring programs. *Fishery Bulletin* 114: 153-165.
- Lim JY, Jo MK, Lee MJ. 1970. The occurrence and distribution of the fish eggs and larvae in the Korean adjacent sea. *Rep. Fish. Kes.* 8: 7-29.

- Lin HY, Chiu MY, Shih YM, Chen IS, Lee MA, Shao KT. 2016. Species composition and assemblages of ichthyoplankton during summer in the East China Sea. *Continental Shelf Research* 126: 64-78.
- Oh J, Kim S. 2015. Morphological and molecular characterization of separated pelagic eggs from *Lophius litulon* (Lophiiformes; Lophiidae). *J. Fish Biol.* 86(6): 1887-1891.
- Okiyama M. 2014. *An Atlas of the Early Stage Fishes in Japan* 2nd edition. Hadano:Tokai University Press.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2009. FastTree: Computing Large Minimum-Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26:1641-1650, doi:10.1093/molbev/msp077
- Sars GO. 1879. Indberetninger til Departementet for det Indre fra professor, dr. G.O. Sars om de af ham i aarene 1864-1878 anstillede undersøgelser angaaende saltvandsfiskerierne. Bergh & Ellefsens bogtrykkeri, Christiania [Oslo]. 221 pp.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann, ..., Weber CF. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 75(23): 7537-7541.
- Shao KT, Yang JS, Chen KC, Lee YS. 2001. *An identification guide of marine fish eggs from Taiwan*. Taipei:Institute of Zoology Academia Sinica and Taiwan Power Company.
- Song CU, Choi H, Jeon MS, Kim EJ, Jeong HG, Kim S, ..., Lee YH. 2021. Zooplankton diversity monitoring strategy for the urban coastal region using metabarcoding analysis. *Sci. Rep.* 11(1): 1-13.
- Takeuchi A, Iijima T, Kakuzen W, Watanabe S, Yamada Y, ..., Tsukamoto K. 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): 1-9.
- Tsukamoto K, Chow S, Otake T, Kurogi H, Mochioka N, ..., Tanaka H. 2011. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nat. Commun.* 2(1): 1-9.
- 한국해양과학기술원. 2020. CUFES를 이용한 인도-태평양 어류의 산란가입. 한국해양과학기술원보고서 BSPE99771-12262-3, 43 pp.

Supplementary table 1. A species list of the pelagic fish eggs from Tongyoung Marine Living Resources Station during 2013–2019 period

Class	Order	Family	Genus	Species
Actinopteri	Acanthuriformes	Lobotidae	Hapalogenys	sp.
Actinopteri	Acanthuriformes	Leiognathidae	Equulites	sp.
Actinopteri	Acanthuriformes	Leiognathidae	Nuchequula	nuchalis
Actinopteri	Acropomatiformes	Champsodontidae	Champsodon	snyderi
Actinopteri	Aulopiiformes	Synodontidae	Synodus	sp.
Actinopteri	Blenniiformes	Blenniidae	Parablennius	sp.
Actinopteri	Blenniiformes	Blenniidae	Parablennius	yatabei
Actinopteri	Carangiformes	Citharidae	Citharoides	macrolepidotus
Actinopteri	Carangiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	interruptus
Actinopteri	Carangiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	sp.
Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Trachurus	japonicus
Actinopteri	Carangiformes	Paralichthyidae	Paralichthys	olivaceus
Actinopteri	Carangiformes	Paralichthyidae	Paralichthys	sp.
Actinopteri	Carangiformes	Soleidae	Pseudaesopia	sp.
Actinopteri	Carangiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	joyneri
Actinopteri	Carangiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	interruptus
Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Trachurus	sp.
Actinopteri	Carangiformes	Sphyraenidae	Sphyraena	sp.
Actinopteri	Carangiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	interruptus
Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Decapterus	maruadsi
Actinopteri	Carangiformes	Cynoglossidae		sp.
Actinopteri	Carangiformes	Pleuronectidae	Eopsetta	grigorjewi
Actinopteri	Carangiformes	Pleuronectidae	Dexistes	sp.
Actinopteri	Centrarchiformes	Oplegnathidae	Oplegnathus	fasciatus
Actinopteri	Clupeiformes	Engraulidae	Engraulis	japonicus
Actinopteri	Clupeiformes	Dussumieriidae	Etrumeus	micropus
Actinopteri	Clupeiformes	Clupeidae	Konosirus	punctatus
Actinopteri	Clupeiformes	Clupeidae	Sardinops	melanostictus
Actinopteri	Clupeiformes	Engraulidae	Thryssa	kammalensis
Actinopteri	Gadiformes	Bregmacerotidae		sp.
Actinopteri	Ophidiiformes	Ophidiidae	Neobythites	sivicola
Actinopteri	Perciformes	Pomacentridae	Chromis	sp.
Actinopteri	Perciformes	Serranidae	Epinephelus	sp.
Actinopteri	Perciformes	Aploactinidae	Erisphex	pottii
Actinopteri	Perciformes	Labridae	Halichoeres	sp.
Actinopteri	Perciformes	Labridae	Halichoeres	tenuispinis
Actinopteri	Perciformes	Hoplichthyidae	Hoplichthys	langsдорffii
Actinopteri	Perciformes	Tetrarogidae	Hypodytes	rubripinnis

Actinopteri	Perciformes	Tetrarogidae	Hypodytes	sp.
Actinopteri	Perciformes	Serranidae	Hyporthodus	septemfasciatus
Actinopteri	Perciformes	Synanceiidae	Inimicus	sp.
Actinopteri	Perciformes	Labridae		sp.
Actinopteri	Perciformes	Triglidae	Lepidotrigla	microptera
Actinopteri	Perciformes	Labridae	Parajulis	poecilepterus
Actinopteri	Perciformes	Pinguipedidae	Parapercis	sexfasciata
Actinopteri	Perciformes	Platycephalidae	Platycephalus	indicus
Actinopteri	Perciformes	Platycephalidae	Platycephalus	sp.
Actinopteri	Perciformes	Labridae	Pseudolabrus	sieboldi
Actinopteri	Perciformes	Labridae	Pteragogus	flagellifer
Actinopteri	Perciformes	Scorpaenidae	Scorpaena	miostoma
Actinopteri	Perciformes	Scorpaenidae	Scorpaena	sp.
Actinopteri	Perciformes	Tetrarogidae		sp.
Actinopteri	Perciformes	Uranoscopidae	Uranoscopus	sp.
Actinopteri	Perciformes_sedis_mutabilis	Sparidae	Acanthopagrus	schlegelii
Actinopteri	Perciformes_sedis_mutabilis	Malacanthidae	Branchiostegus	japonicus
Actinopteri	Perciformes_sedis_mutabilis	Lutjanidae	Dipterygonotus	balteatus
Actinopteri	Perciformes_sedis_mutabilis	Sparidae	Pagrus	major
Actinopteri	Perciformes_sedis_mutabilis	Sciaenidae	Pennahia	anea
Actinopteri	Perciformes_sedis_mutabilis	Sciaenidae	Pennahia	argentata
Actinopteri	Perciformes_sedis_mutabilis	Sillaginidae	Sillago	japonica
Actinopteri	Perciformes_sedis_mutabilis	Sillaginidae	Sillago	sp.
Actinopteri	Perciformes_sedis_mutabilis	Sparidae		sp.
Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Auxis	sp.
Actinopteri	Scombriformes	Nomeidae	Cubiceps	sp.
Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Scomber	japonicus
Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Thunnus	sp.
Actinopteri	Scombriformes	Trichiuridae	Trichiurus	japonicus
Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Callionymus	beniteguri
Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Callionymus	sp.
Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Repomucenus	curvicornis
Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Repomucenus	sp.
Actinopteri	Syngnathiformes	Mullidae	Upeneus	japonicus
Actinopteri	Tetraodontiformes	Monacanthidae	Thamnaconus	modestus
Actinopteri	Tetraodontiformes	Monacanthidae	Stephanolepis	cirrhifer

Supplementary table 2. A species of the pelagic eggs from Korean waters during 2012–2020 period

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Chordata	Actinopteri	Anguilliformes	Anguillidae	Anguilla	japonica
Chordata	Actinopteri	Anguilliformes	Congridae	Gnathophis	heterognathos
Chordata	Actinopteri	Anguilliformes	Ophichthidae		
Chordata	Actinopteri	Anguilliformes	Ophichthidae	Ophisurus	macrorhynchos
Chordata	Actinopteri	Aulopiformes	Aulopidae	Hime	japonica
Chordata	Actinopteri	Aulopiformes	Synodontidae	Harpadon	nehereus
Chordata	Actinopteri	Aulopiformes	Synodontidae	Saurida	sp.
Chordata	Actinopteri	Aulopiformes	Synodontidae	Saurida	elongata
Chordata	Actinopteri	Aulopiformes	Synodontidae	Synodus	macrops
Chordata	Actinopteri	Aulopiformes	Synodontidae	Synodus	sp.
Chordata	Actinopteri	Aulopiformes	Synodontidae	Synodus	variegatus
Chordata	Actinopteri	Aulopiformes	Synodontidae	Trachinocephalus	myops
Chordata	Actinopteri	Beloniformes	Exocoetidae	Cheilopogon	agoo
Chordata	Actinopteri	Beloniformes	Exocoetidae	Cheilopogon	nigricans
Chordata	Actinopteri	Beloniformes	Hemiramphidae	Oxyporhamphus	micropterus
Chordata	Actinopteri	Blenniiformes	Blenniidae	Omobranchus	fasciolatoceps
Chordata	Actinopteri	Blenniiformes	Blenniidae	Omobranchus	punctatus
Chordata	Actinopteri	Blenniiformes	Blenniidae	Omobranchus	sp.
Chordata	Actinopteri	Blenniiformes	Blenniidae	Parablennius	sp.
Chordata	Actinopteri	Blenniiformes	Blenniidae	Parablennius	yatabei
Chordata	Actinopteri	Blenniiformes	Tripterygiidae	Enneapterygius	etheostomus
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Carangoides	equula
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Caranx	sexfasciatus
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Decapterus	macarellus
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Decapterus	macrosoma
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Decapterus	maruadsi
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Megalaspis	cordyla
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Scomberoides	commersonianus
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Seriola	lalandi
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Trachurus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Carangidae	Ulua	mentalis
Chordata	Actinopteri	Carangiformes	Coryphaenidae	Coryphaena	hippurus
Chordata	Actinopteri	Centrarchiformes	Centrarchidae	Lepomis	macrochirus
Chordata	Actinopteri	Centrarchiformes	Cheilodactylidae	Cheilodactylus	quadricornis
Chordata	Actinopteri	Centrarchiformes	Cheilodactylidae	Cheilodactylus	zonatus
Chordata	Actinopteri	Centrarchiformes	Cirrhitidae	Cirrhitichthys	aureus

Chordata	Actinopteri	Centrarchiformes	Girellidae	Girella	punctata
Chordata	Actinopteri	Centrarchiformes	Kyphosidae	Kyphosus	bigibbus
Chordata	Actinopteri	Centrarchiformes	Kyphosidae	Microcanthus	strigatus
Chordata	Actinopteri	Centrarchiformes	Oplegnathidae	Oplegnathus	fasciatus
Chordata	Actinopteri	Centrarchiformes	Terapontidae	Rhynchopelates	oxyrhynchus
Chordata	Actinopteri	Chaetodontiformes	Chaetodontidae	Chaetodon	modestus
Chordata	Actinopteri	Chaetodontiformes	Leiognathidae	Equulites	rivulatus
Chordata	Actinopteri	Chaetodontiformes	Leiognathidae	Leiognathus	ruconius
Chordata	Actinopteri	Chaetodontiformes	Leiognathidae	Nucchequula	nuchalis
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Clupeidae		
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Clupeidae	Clupea	pallasii
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Clupeidae	Konosirus	punctatus
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Clupeidae	Sardinella	lemuru
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Clupeidae	Sardinella	zunasi
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Clupeidae	Sardinops	melanostictus
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Dussumieriidae	Etrumeus	teres
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Engraulidae	Coilia	mystus
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Engraulidae	Coilia	nasus
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Engraulidae	Engraulis	encrasicolus
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Engraulidae	Engraulis	japonicus
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Engraulidae	Setipinna	sp.
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Engraulidae	Setipinna	tenuifilis
Chordata	Actinopteri	Clupeiformes	Engraulidae	Thryssa	kammalensis
Chordata	Actinopteri	Cypriniformes	Cyprinidae	Carassius	auratus
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Callanthiidae	Callanthias	japonicus
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Emmelichthyidae	Emmelichthys	struhsakeri
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Emmelichthyidae	Erythrocles	sp.
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Malacanthidae	Branchiostegus	albus
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Malacanthidae	Branchiostegus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Plesiopidae	Bleekeria	mitsukurii
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Plesiopidae	Bleekeria	nigrilinea
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Pomacanthidae	Chaetodontoplus	septentrionalis
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Pomacentridae	Chromis	notata
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sciaenidae		
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sciaenidae	Argyrosomus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sciaenidae	Collichthys	niveatus
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sciaenidae	Johnius	sp.
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sciaenidae	Larimichthys	polyactis
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sciaenidae	Miichthys	miiuy

Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sciaenidae	Nibea	albiflora
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sciaenidae	Pennahia	anea
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sciaenidae	Pennahia	argentata
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sillaginidae	Sillago	japonica
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sphyraenidae	Sphyraena	japonica
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sphyraenidae	Sphyraena	jello
Chordata	Actinopteri	Euteleosteomorpha	Sphyraenidae	Sphyraena	pinguis
Chordata	Actinopteri	Gadiformes	Bregmacerotidae	Bregmacerotidae	sp.
Chordata	Actinopteri	Gadiformes	Gadidae	Gadus	macrocephalus
Chordata	Actinopteri	Gerreiformes	Gerreidae	Gerres	sp.
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae		
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Acentrogobius	pflaumii
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Amblychaeturichthys	hexanema
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Odontamblyopus	lacepedii
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Periophthalmus	chrysospilus
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Pseudogobius	masago
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Rhinogobius	sp.
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Rhinogobius	similis
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Rhinogobius	sp.
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Taenioides	anguillaris
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Tridentiger	sp.
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Tridentiger	brevispinis
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Tridentiger	nudicervicus
Chordata	Actinopteri	Gobiiformes	Gobiidae	Tridentiger	trigonocephalus
Chordata	Actinopteri	Kurtiformes	Apogonidae	Jaydia	lineata
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae		
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Calotomus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Choerodon	azurio
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Halichoeres	tenuispinis
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Iniistius	dea
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Labridae	sp.
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Parajulis	poecilepterus
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Pseudolabrus	sp.
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Pseudolabrus	eoethinus
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Pseudolabrus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Pseudolabrus	siboldi
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Pteragogus	flagellifer
Chordata	Actinopteri	Labriformes	Labridae	Stethojulis	sp.
Chordata	Actinopteri	Lobotiformes	Hapalogenyidae	Hapalogenys	analis

Chordata	Actinopteri	Lobotiformes	Hapalogenyidae	Hapalogenys	nigripinnis
Chordata	Actinopteri	Lophiiformes	Lophiidae	Lophius	litulon
Chordata	Actinopteri	Lutjaniformes	Haemulidae	Parapristipoma	trilineatum
Chordata	Actinopteri	Lutjaniformes	Haemulidae	Plectorhinchus	cinctus
Chordata	Actinopteri	Lutjaniformes	Lutjanidae	Caesio	caerulaurea
Chordata	Actinopteri	Lutjaniformes	Lutjanidae	Dipterygonotus	balteatus
Chordata	Actinopteri	Mugiliformes	Mugilidae	Mugil	cephalus
Chordata	Actinopteri	Mugiliformes	Mugilidae	Planiliza	haematocheilus
Chordata	Actinopteri	Myctophiformes	Myctophidae	Benthoosema	pterotum
Chordata	Actinopteri	Myctophiformes	Myctophidae	Diaphus	garmani
Chordata	Actinopteri	Ophidiiformes	Bythitidae	Dinematichtys	iluocoeteoides
Chordata	Actinopteri	Ophidiiformes	Ophidiidae		
Chordata	Actinopteri	Ophidiiformes	Ophidiidae	Neobythites	sivicola
Chordata	Actinopteri	Osmeriformes	Salangidae	Neosalanx	anderssoni
Chordata	Actinopteri	Pempheriformes	Acropomatidae	Acropoma	japonicum
Chordata	Actinopteri	Pempheriformes	Banjosidae	Banjos	banjos
Chordata	Actinopteri	Pempheriformes	Champsodontidae	Champsodon	snyderi
Chordata	Actinopteri	Pempheriformes	Lateolabracidae	Lateolabrax	sp.
Chordata	Actinopteri	Pempheriformes	Lateolabracidae	Lateolabrax	japonicus
Chordata	Actinopteri	Pempheriformes	Pempheridae	Parapriacanthus	ransonneti
Chordata	Actinopteri	Pempheriformes	Pempheridae	Pempheris	rapa
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Apistidae	Apistus	carinatus
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Aploactinidae	Erisphex	pottii
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Hoplichthyidae	Hoplichthys	langsдорffii
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Peristediidae	Peristedion	liorhynchus
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Platycephalidae	Cociella	crocodilus
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Platycephalidae	Onigocia	spinosa
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Platycephalidae	Platycephalus	indicus
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Platycephalidae	Platycephalus	sp.
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Scorpaenidae	Scorpaena	sp.
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Scorpaenidae	Scorpaena	miostoma
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Scorpaenidae	Scorpaenodes	littoralis
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Sebastidae	Sebastes	inermis
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Serranidae	Chelidoperca	hirundinacea
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Serranidae	Epinephelus	akaara
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Serranidae	Hyporthodus	septemfasciatus
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Serranidae	Pseudanthias	elongatus
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Serranidae	Pseudanthias	squamipinnis
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Serranidae	Sacura	margaritacea

Chordata	Actinopteri	Perciformes	Synanceiidae	Inimicus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Synanceiidae	Minous	monodactylus
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Tetrarogidae	Hypodytes	rubripinnis
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Tetrarogidae	Paracentropogon	rubripinnis
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Tetrarogidae	Snyderina	yamanokami
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Triglidae	Lepidotrigla	sp.
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Triglidae	Lepidotrigla	guentheri
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Triglidae	Lepidotrigla	hime
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Triglidae	Lepidotrigla	longimana
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Zoarcidae	Zoarces	elongatus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Bothidae	Parabothus	kiensis
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Bothidae	Psettina	tosana
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Citharidae	Citharoides	macrolepidotus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	sp.
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	abbreviatus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	interruptus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	itinus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	joyneri
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	lighti
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	robustus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Cynoglossus	semilaevis
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Paraplagusia	
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Cynoglossidae	Paraplagusia	japonica
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Paralichthyidae	Paralichthys	olivaceus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Paralichthyidae	Pseudorhombus	pentophthalmus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Paralichthyidae	Tarphops	elegans
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Cleisthenes	herzensteini
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Dexistes	rikuzenius
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Eopsetta	grigorjewi
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Glyptocephalus	kitaharae
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Glyptocephalus	stelleri
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Hippoglossoides	robustus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Kareius	bicoloratus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Microstomus	achne
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Myzopsetta	punctatissima
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Platichthys	stellatus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Pleuronichthys	cornutus
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Pseudopleuronectes	herzensteini
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Soleidae	Heteromycteris	japonicus

Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Soleidae	Pseudaesopia	japonica
Chordata	Actinopteri	Pleuronectiformes	Soleidae	Zebrias	zebrinus
Chordata	Actinopteri	Priacanthiformes	Priacanthidae	Cookeolus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Bramidae	Brama	dussumieri
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Centrolophidae	Psenopsis	anomala
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Gempylidae	Nealotus	tripes
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Nomeidae	Cubiceps	pauciradiatus
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Auxis	rochei
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Auxis	thazard
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Euthynnus	affinis
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Gymnosarda	unicolor
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Katsuwonus	pelamis
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Rastrelliger	brachysoma
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Rastrelliger	kanagurta
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Sarda	orientalis
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Scomber	sp.
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Scomber	japonicus
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Scomberomorus	commerson
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Scomberomorus	niphonius
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Thunnus	albacares
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Scombridae	Thunnus	obesus
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Stromateidae	Pampus	sp.
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Stromateidae	Pampus	argenteus
Chordata	Actinopteri	Scombriformes	Trichiuridae	Trichiurus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Siluriformes	Bagridae	Tachysurus	nitidus
Chordata	Actinopteri	Spariformes	Lethrinidae	Lethrinus	nebulosus
Chordata	Actinopteri	Spariformes	Nemipteridae	Nemipterus	furcosus
Chordata	Actinopteri	Spariformes	Nemipteridae	Nemipterus	virgatus
Chordata	Actinopteri	Spariformes	Sparidae	Acanthopagrus	latus
Chordata	Actinopteri	Spariformes	Sparidae	Acanthopagrus	schlegelii
Chordata	Actinopteri	Spariformes	Sparidae	Evynnis	cardinalis
Chordata	Actinopteri	Spariformes	Sparidae	Evynnis	tumifrons
Chordata	Actinopteri	Spariformes	Sparidae	Pagrus	major
Chordata	Actinopteri	Spariformes	Sparidae	Rhabdosargus	sarba
Chordata	Actinopteri	Stomiiformes	Phosichthyidae	Vinciguerria	sp.
Chordata	Actinopteri	Stomiiformes	Sternoptychidae	Maurolicus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae		
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Callionymus	sp.
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Callionymus	beniteguri

Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Callionymus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Callionymus	kaianus
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Callionymus	valenciennei
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Foetorepus	altivelis
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Repomucenus	sp.
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Repomucenus	curvicornis
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Callionymidae	Repomucenus	ornatipinnis
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Fistulariidae	Fistularia	petimba
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Mullidae	Parupeneus	ciliatus
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Mullidae	Parupeneus	spilurus
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Mullidae	Upeneus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Syngnathiformes	Mullidae	Upeneus	tragula
Chordata	Actinopteri	Tetraodontiformes	Diodontidae	Diodon	holocanthus
Chordata	Actinopteri	Tetraodontiformes	Monacanthidae	Rudarius	ercodes
Chordata	Actinopteri	Tetraodontiformes	Monacanthidae	Stephanolepis	cirrhifer
Chordata	Actinopteri	Tetraodontiformes	Monacanthidae	Thamnaconus	modestus
Chordata	Actinopteri	Tetraodontiformes	Ostraciidae	Lactoria	fornasini
Chordata	Actinopteri	Trachichthyiformes	Trachichthyidae	Aulotrachichthys	prosthemiis
Chordata	Actinopteri	Uranoscopiformes	Pinguipedidae	Kochichthys	flavofasciatus
Chordata	Actinopteri	Uranoscopiformes	Pinguipedidae	Parapercis	sp.
Chordata	Actinopteri	Uranoscopiformes	Pinguipedidae	Parapercis	multifasciata
Chordata	Actinopteri	Uranoscopiformes	Pinguipedidae	Parapercis	pulchella
Chordata	Actinopteri	Uranoscopiformes	Pinguipedidae	Parapercis	sexfasciata
Chordata	Actinopteri	Uranoscopiformes	Uranoscopidae	Uranoscopus	japonicus
Chordata	Actinopteri	Uranoscopiformes	Uranoscopidae	Uranoscopus	oligolepis
Chordata	Actinopteri	Uranoscopiformes	Uranoscopidae	Xenocephalus	elongatus
Mollusca	Cephalopoda	Teuthida	Enoploteuthidae	Abralia	andamanica
Mollusca	Cephalopoda	Teuthida	Enoploteuthidae	Watasenia	scintillans
Mollusca	Cephalopoda	Teuthida	Ommastrephidae	Sthenoteuthis	oualaniensis
Mollusca	Cephalopoda	Teuthida	Ommastrephidae	Todarodes	pacificus