

피라미속 어류의 계통분류학적 연구 IV. 한국 및 일본산 갈겨니 (*Z. temmincki*)의 유전적 분화

민미숙 · 양서영

인하대학교 이과대학 생물학과

한국과 일본에 분포하는 갈겨니 (*Z. temmincki*)를 대상으로 유전적 변이를 조사한 결과 한국에 분포하는 갈겨니 A(mm)-type과 일본에 분포하는 B-type(Watanabe and Mizuguchi, 1988)은 유전적으로 매우 가까운 동일종으로 나타났고 한국산 갈겨니 B(MS)-type과 일본산 갈겨니 A-type의 유연관계가 가장 멀게 나타났다. 따라서 한국 및 일본에 분포하는 갈겨니는 모두 3종이 존재하는 것으로 추정되며 일본과 한국에 각각 2종씩이 분포하는 것으로 나타났다. 이들 갈겨니의 분화시기는 홍적세시기(Pleistocene)에 이루어진 것으로 추정되었다.

KEY WORDS: *Zacco temmincki*, Phylogeny, Electrophoresis, Speciation

담수어류중 잉어과, 피라미속의 갈겨니 (*Zacco temmincki*)는 한반도와 일본의 서부지역에 넓게 분포하는 어종이다(Uchida, 1939; Banare scu, 1968; Nakamura, 1969). 한국의 경우 종전까지 갈겨니는 1종으로 보고되어져 있었으나(Chyung, 1977; Choi, *et al.*, 1990) Yang과 Min(1987)은 동위효소 분석과 형태분석, 인공교배실험을 통하여 우리나라의 갈겨니는 형태적으로 매우 유사하나 유전적으로 뚜렷이 구별되는 2 자매종을 보고한 바 있고, 이들 사이에는 세포유전학적으로도 큰차이가 있음을 밝힌 바 있다(Lee *et al.*, 1988; Lee and Lee, 1988). 또한 Min과 Yang(1991)은 한국산 갈겨니 2종과 일본산 갈겨니 1종에 대한 동위효소 분석결과 일본산 갈겨니는 한국산 갈겨니 A(MM)-type과 동일종으로 보고한 바 있다. 일본의 경우 종전의 1종으로 보았던 갈겨니를 Watanabe와 Mizuguchi(1988)는 형태적으로 2 type의 갈겨니가 있음을 보고하였고 또한 Okazaki 등(1991)은 동위효소분석을 통하여 일본산 갈겨니

의 경우도 유전적으로 뚜렷이 구별되는 2 type의 종이 존재하는 것을 밝힌 바 있다. 본 연구는 한국산 갈겨니 2종과 일본산 갈겨니 2종에 대한 종문제를 명확히 밝히기 위하여 이들에 대한 동위효소 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 재료는 Yang과 Min(1987), Min과 Yang(1991)이 사용한 표본과 추가로 채집된 일본산 갈겨니 2 type을 비교 분석하였다(Table 1). 전기영동은 Yang과 Min(1987, 1989)의 방법으로 horizontal starch gel electrophoresis를 실시하였다. 전기영동후 얻어진 각 효소 및 단백질의 전기영동상을 이용하여 각 개체별의 유전자형(genotype)을 확인하고 이를 이용 BIOSYS program(Swofford and Selander, 1981)으로 유전자 분석을 실시하여 각 종 및 집단의 유전자 빈도, 유전자당 평균대립인자수(A), 다형형 빈도(% polymorphism) 및 이형접합자빈도를 구하여 집단 및 종간의 유전적 변이 정도를 조사하였고(Selan

본 연구는 1988년도 문교부 기초과학 육성연구비의 지원에 의한 것이다.

Table 1. Collecting localities, date, and number of *Zacco temmincki* in Korea and Japan.

Collection locality	No. of specimens	Collection date
<i>Z. temmincki</i> A-type (Japan)		
1. Asahi: Asahi-river, Okayama-city, Okayama prefecture	14	Dec. 2, 1990
<i>Z. temmincki</i> B-type (Japan)		
2. Yono: Yono-stream, Fishio, Ikeda-city	25	June 22, 1990
3. Sasayama: Sasayama-stream, Kodanaka, Sasayama-cho, Taki-gun	25	June 23, 1990
4. Arima: Arima-stream, Hyogo-prefecture	25	June 23, 1990
5. Hikami: Gago-stream, Isaguchi, Hikami-cho, Hikami-gun	10	June 23, 1990
6. Ado: Ado-stream, Siga-prefecture	12	Nov. 29, 1990
<i>Z. temmincki</i> B(MS)-type (Korea)		
7. Kochang: Ungyang-myon, Kochang-gun, Kyongsangnam-do	19	Sep. 21, 1988
8. Yanggu: Pangsang-myon, Yanggu-gun, Kangwon-do	10	Apr. 5, 1988
9. Yongchon: Pungan-myon, Youngchon-gun, Kyongsangnam-do	12	July 18, 1988
<i>Z. temmincki</i> A(MM)-type (Korea)		
10. Ulchin: So-myon, Ulchin-gun, Kyongsangbuk-do	20	Sep. 12, 1986
11. Yongchon: Pungan-myon, Yongchon-gun, Kyongsangnam-do	11	July 18, 1988
12. Kochang: Ungyang-myon, Kochang-gun, Kyongsangnam-do	19	July 25, 1986

der, 1976), 유전자빈도를 토대로하여 Rogers (1972)의 유전적 근연치(S)와 Nei(1972)의 유전적 차이치(D)를 구하고 S값을 이용하여 UPGMA방법(Sneath and Sokal, 1973)으로 dendrogram을 작성하였다

결과

한국 및 일본산 갈겨니 12개 집단에 대한 전기영동결과 한국산 갈겨니 2 type의 경우 총 14 종류의 효소 및 비효소단백질에서 21개의 유전자를 검출하였으며 일본산 갈겨니 2 type에서는 총 15개의 효소 및 비효소단백질에서 26개의 유전자를 검출하였고 각 유전자에 대한 유전자빈도를 구한 결과는 Table 2와 같다.

전체 26개의 유전자 중 *Pgm*, *Ldh-2*, *Me-1*, *Got-1*, *Gp-3*, *Gp-4* 등 5개 유전자는 한국 및 일본집단 모두에서 변이가 없이 monomorphic하였다. 한국산 갈겨니 B(MS)-type의 경우 *Mdh-2*와 *Fum*는 종특유의 인자였고 일본산 갈겨니 A-type의 경우는 *Idh*, *Mpi-1*, *6Pgd*, *Pept-2*, *Pept-3* 등 5개 유전자가 종특유의 인자였으며 *Pept-3*에서만 변이를 보인 반면 B-

type의 경우는 *Aco*, *Mdh-1*, *Ldh-1*, *Pept-2*, *Pgi-1*, *Pgi-2* 등에서 변이를 보였다. 또한 일본산 2 type간에는 총 26개 유전자 중 *Idh*, *Mpi-1*, *Mpi-2*, *6Pgd*, *Pept-1*, *Pept-2*, *Pept-3*, *Est-2* 등 8개의 유전자가 완전히 다른 인자로 뚜렷한 차이를 보였다. 각 집단의 유전적 변이정도는 Table 3과 같다. 일본산 갈겨니 A-type은 $\bar{H}_o=0.019$, $\bar{H}_e=0.019$, $\bar{P}=7.7\%$, $\bar{A}=1.1$ 이었고, B-type은 $\bar{H}_o=0.016$, $\bar{H}_e=0.016$, $\bar{P}=8.4\%$, $\bar{A}=1.1$ 이었으며 한국산 갈겨니 A(MM)-type의 경우 $\bar{H}_o=0.007$, $\bar{H}_e=0.014$, $\bar{P}=7.9\%$, $\bar{A}=1.2$, B-type은 $\bar{H}_o=0.018$, $\bar{H}_e=0.021$, $\bar{P}=17.4\%$, $\bar{A}=1.1$ 이었다.

Table 2의 유전자빈도를 이용하여 각 집단 및 type간 유전적 근연치(S) (Rogers, 1972)와 유전적 차이치(D) (Nei, 1972)를 구한 결과는 Table 4와 같다. 일본집단간의 유전적 근연치 및 차이치의 계산은 26개 유전자를 토대로 산출하였으며 일본집단과 한국집단과의 비교는 21개 유전자(공통유전자)만을 이용하여 산출한 값이다.

일본 및 한국산 갈겨니 각 type내 집단간 평균 유전적 근연치는 $\bar{S}=0.90$ 이상으로 집단간 근연관계를 나타내었다. 일본산 갈겨니 2 type

		Japan						Korea					
		A-type		B-type				B(MS)-type			A(MM)-type		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Mpi-2</i>	a	1.00							—			—	
	b		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00						
<i>Pept-1</i>	a		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00						
	b	0.03							—			—	
	c	0.93											
	d	0.04											
<i>Pept-2</i>	a												
	b						0.08	1.00	1.00	1.00			
	c	1.00											
	d		1.00	1.00	1.00	1.00	0.88				1.00	1.00	1.00
	e						0.04						
<i>Pept-3</i>	a	0.21											
	b	0.79											
	c		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>6Pgd</i>	a		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	b	1.00											
<i>Pgi-1</i>	a	1.00	0.94	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.83	0.80	1.00
	b		0.06								0.17	0.20	
<i>Pgi-2</i>	a		0.08	0.02			0.08						
	b	1.00	0.92	0.98	1.00	0.90	0.92	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00
	c					0.10			0.10				
<i>Pgm</i>	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

간의 유전적 근연치는 평균 $\bar{S}=0.689$ 로서 중간 수준의 차이를 나타냈으며 일본산 B-type과 한국산 A(MM)-type간의 평균 유전적 근연치는 $\bar{S}=0.981$ 로 집단간 차이정도로 아주 가깝게 나타났다. 가장근연관계가 먼 것은 일본산 A-type과 한국산 B(MS)-type으로 평균 유전적 근연치가 $\bar{S}=0.667$ 였으며 일본산 A-type과 한국산 A(MM)-type간도 $\bar{S}=0.760$ 으로서 중간 수준의 차이를 보였다.

Table 4의 유전적 근연치를 이용하여 dendrogram을 작성한 결과는 Fig. 1과 같다. 한국산 A(MM)-type과 일본산 B-type이 같은 1 group으로 묶여 한국산 B(MS)-type과 clustering되며 이 2 group은 일본산 A-type과 $\bar{S}=0.705$ 에서 clustering되고 있어 전체적으로

3 group으로 나누어짐을 볼 수 있었다. 또한 이들 갈겨니의 유전적 차이치를 이용하여 Nei (1975) 방법으로 분화년대를 추정 한 결과 일본산 갈겨니 A-type과 B-type간은 약 170만년 전에 분화된 것으로 나타났고 한국산 갈겨니 A(MM)-type과 일본산 갈겨니 A-type간은 약 130만년 전, 한국산 갈겨니 B(MS)-type과 일본산 갈겨니 A-type, B-type간은 약 200만년 전, 약 80만년 전후 하여 각각 분화된 것으로 추산되었다.

고찰

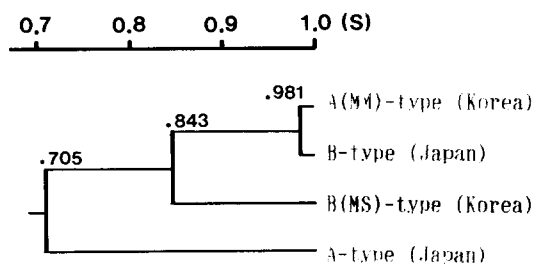
한국과 일본에 분포하는 갈겨니에 대한 유전적 변이 정도는 일본산 갈겨니 2 type의 유전적 변

Table 3. Genic variations of 13 populations of *Zacco temmincki* of Korea and Japan.

	Number of specimens (N)	Mean No. of alleles per locus (A)	% of loci polymorphic (P)	Mean heterozygosity (H)	
				Observed (H _o)	Expected (H _e)
<i>Z. temmincki</i> A-type (Japan)					
1. Asahi	14	1.0	4.8	0.020	0.017
<i>Z. temmincki</i> B-type (Japan)					
2. Yono	25	1.1	14.3	0.027	0.024
3. Sasayama	25	1.1	14.3	0.008	0.008
4. Arima	25	1.0	4.8	0.019	0.016
5. Hikami	10	1.1	9.5	0.029	0.033
6. Ado	12	1.1	9.5	0.020	0.019
<i>Z. temmincki</i> B-type (Korea)					
7. Kochang	10	1.2	19.0	0.023	0.022
8. Yanggu	10	1.2	23.8	0.024	0.032
9. Yongchon	12	1.1	9.5	0.008	0.008
<i>Z. temmincki</i> A-type (Korea)					
10. Ulchin	20	1.1	9.5	0.017	0.019
11. Yongchon	5	1.0	4.8	0.000	0.017
12. Kochang	19	1.1	9.5	0.005	0.005

Table 4. Average Rogers' (1972) coefficients of genetic similarity (S) (above diagonal) and average Nei's (1972) coefficients of genetic distance (D) (below diagonal) of *Zacco temmincki* in Korea and Japan.

		1	2	3	4
1.	<i>Z. temmincki</i> A-type (Japan)		.689	.667	.760
2.	<i>Z. temmincki</i> B-type (Japan)	.364		.842	.981
3.	<i>Z. temmincki</i> B(MS)-type (Korea)	.396	.156		.844
4.	<i>Z. temmincki</i> A(MM)-type (Korea)	.266	.004	.156	

**Fig. 1.** Dendrogram of *Zacco temmincki* in Korea and Japan based on Rogers' (1972) genetic similarity coefficients (S).

이가 한국산 갈겨니 보다 약간 높은 것으로 나타났으나 이는 일반적인 어류의 평균유전적 변이 보다는 아주 낮은 값이었다(Avise and Selander,

1972; Avise, 1977; Selander, 1976; Buth and Burr, 1978; Yang and Son, 1986; Park, 1988; Yang *et al.*, 1991).

일본산 갈겨니의 경우 B type의 분포지역은 A type에 비하여 매우 넓은 반면 A type은 주로 Biwa호와 Seto Inland Sea 일대에 제한분포하며 이들의 형태에 있어서도 A type은 등지느러미와 가슴지느러미 가장자리가 붉은색인데 반하여 B type은 노란색을 띠며 측선린수도 A type이 B type에 비하여 그수가 많아 2 type간에 차이를 나타내며 (Watanabe and Mizuguchi, 1988; Kawanabe and Mizuno, 1989) 이들의 유전적인 면에서도 차이를 보이는 것으로 보고되었다(Okazaki *et al.*, 1991). 또한 한국산 갈겨니의 경우는 2 type간에 잡종이 형성

되지 않으며 유전적으로 구별이 되는 2 자매종임이 보고된 바 있다(Yang and Min, 1987). 이들 한국 및 일본산 갈겨니의 유전적 근연관계에서 한국산 A(MM) type과 일본산 B type의 평균유전적 근연치가 $\bar{S}=0.981$ 으로 매우 가깝게 나타나 동종내 집단간 차이를 나타내었고, 한국의 B(MS)-type과 일본의 A type이 $\bar{S}=0.668$ 로서 가장 멀게 나타났으며 또한 일본산 A-type과 B-type간의 유연관계도 $\bar{S}=0.696$ 으로 역시 중간 수준의 차이가 있었다(Table 4). Okazaki 등(1991)은 일본산 갈겨니 2 type에 대한 유전자 분석을 통하여 2 type간에 뚜렷한 유전적 차이가 있고 이들을 2개의 종으로 보고한 바 있는데 본 연구의 결과와도 잘 일치하고 있다.

한국산 2 type과 일본산 갈겨니 2 type에 대한 유전자 분석결과(Table 2) 일본산 갈겨니 B-type은 한국산 갈겨니 A(MM)-type과 동일한 종으로 간주되며 한국산 갈겨니 B(MS) type은 일본지역에는 분포하지 않으며 또한 일본산 갈겨니 A-type은 한국에는 존재하지 않는 것으로 나타났으며 따라서 한반도 및 일본에서 식하는 갈겨니는 모두 3종인 것으로 사료된다. 한편 일본산 갈겨니의 경우 Mizuguchi 등(1989)은 갈겨니 2 type에 대한 형태분석을 실시하고 학명 사용에 있어 갈겨니 B type과 형태적으로 뚜렷이 구별되는 A-type을 *Z. sieboldi*로 할 것을 주장한 바 있다. 이들의 유전적 차이치를 이용한 분화시기 추정결과 일본산 A type과 B-type간의 분화정도는 D값이 0.364로서 약 170만년전에 분화된 것으로 추산되었으나 Okazaki 등(1991)은 일본의 17개 집단을 대상으로 2 type을 분석한 결과 전체 27개 유전자중 13개 유전자가 완전히 다른 인자로 나타나 이들간의 유전적 차이치가 $\bar{D}=0.64$ 로 약 300만년 전으로 추정된 바 있어 본 연구의 분화연대 추정과 차이를 보이고 있으나 2 type간의 유전적 차이는 종 수준이상의 차이를 보이고 있어 두 연구결과가 서로 일치하고 있다. Okazaki 등(1991)은 일본의 갈겨니 2 type의 경우 지리적으로 넓게 분포하는 B-type에서 분포지역이 매우 협소한 A-type(*Z. sieboldi*)이 분화

되었을 것이라 추정한 바 있다. 그러나 본 연구의 결과에서 보는 바와 같이 한국의 A(MM) type(일본의 B-type)과 B(MS) type간의 유전적 근연관계가 일본의 2 type사이의 근연관계 보다 훨씬 가까우며, 또한 한국의 B(MS) type과 일본의 A type사이의 유전적 근연치가 매우 낮은 점 등으로 보아(Table 4) Okazaki 등(1991)의 가설은 타당성이 없다고 본다. 한편 Yang과 Min(1987, 1989)은 한국의 갈겨니 2 type이 동일속의 피라미(*Zacco platypus*)에서 일차적으로 B(MS) type이 분화된 후 2차적으로 저온적응의 결과 B(MS) type에서 다시 A(MM) type으로 분화되어 현재 한국과 일본에 분포하였을 것으로 추정된 바 있는데 본 실험결과와는 Yang과 Min(1987, 1989)의 가설을 뒷바침 한다고 볼 수 있다. 즉 유전적 근연치로 미루어보아(Table 4 및 미발표자료) 한국의 B(MS) type과 일본의 A-type(*Z. sieboldi*)은 약 400만년전 기원종(피라미)에서 거의 동일한 시기에 분화되었다고 추정되며 후에 한국의 B(MS) type에서 A(MM)-type(일본의 B-type)이 약 80만년전에 분화되어 현재에 이르렀다고 추정된다. 이들의 분화경로와 분포에 관한 가설은 여러가지 있을 수 있겠으나 보다 확실한 답을 얻기위하여는 앞으로 화석상의 기록이나 지사학적인 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Awise, J.C., 1977. Genic heterozygosity and rate of speciation. *Paleontology* **3**: 422-432.
- Awise, J.C. and R.K. Selander. 1972. Evolutionary genetics of cavedwelling fishes of the genus *Astyanax*. *Evolution* **26**: 1-19.
- Banarescu, P., 1968. Revision of the genera *Zacco* and *Opsariichthys* (Pisces, Cyprinidae). *Vestn. Cesko-Slov. Spolecn. Zool.*, **32(4)**: 305-311.
- Buth, D.G. and B.M. Burr. 1978. Isozyme variability in the Cyprinid genus *Campostoma*. *Copeia* **1978**: 198-331.
- Choi, K.C., S.R. Jeon, I.S. Kim, and Y.M. Son, 1990. Coloured Illustrations of Freshwater Fishes of Korea.

- Hyang-Moon Sa. Seoul, pp.88
- Chyung, M.K., 1977. The Fishes of Korea. Il-Ji Sa. Seoul, pp.187-189.
- Kawanabe, H.K. and N. Mizuno. 1989. Freshwater Fishes of Japan. Yama-kei Publ. Co. Tokyo, Japan. pp.239-259.
- Lee, H.Y., S.Y. Yang, S.G. Paik, C.S. Park, S.L. Yu, and S.K Lee, 1988. A study on the speciation of a fresh water fish *Zacco temmincki*. VII. Variation of mitochondrial DNA between 2 types of *Zacco temmincki*. *Korean J. Zool.* **31**: 236-242.
- Lee, H.Y. and H.S. Lee, 1988. Evolutionary study on the Dark Chub (*Zacco temmincki*). V. Geographical variation on the karyotypes between two allelotypes. *Korean J. Genet.* **10**: 93-99.
- Min, M.S. and S.Y. Yang, 1991. Systematic study on the genus *Zacco* (Pisces, Cyprinidae). II. Phylogenetic relationships of the genera *Zacco* and *Candidia*. *Korean J. Zool.* **34**: 571-584.
- Mizuguchi, K., M. Watanabe, T. Okazaki, and K. Hosoya, 1989. On the two types of the Dark Chub (*Zacco temmincki*) V. Relationship of A-type and *Leuciscus sieboldii*. Abstracts for 17th Annual Meeting of Ichthyological Soc. of Japan.
- Nakamura, M., 1969. Cyprinid Fishes of Japan. Spec. Publ. Res. Inst. Nat. Resources. Tokyo, Japan. pp. 455.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natural.* **106**: 283-292.
- Nei, M., 1975. Molecular Population Genetics and Evolution. North-Holland publ. Co., Amsterdam.
- Okazaki, T., M. Watanabe, K. Mizuguchi, and K. Hosoya, 1991. Genetic differentiation between two types of Dark Chub, *Zacco temmincki*, in Japan. *Japanese J. Ichthy.* **38**: 133-140.
- Park, B.S., 1988. Systematic study on the genus *Cobitis* in Korea. Ph.D. Dissertation, Inha University.
- Rogers, J.S., 1972. Measure of genetic similarity and genetic distance. *Studies in genetics VII. Univ. Texas Publ.* **7213**: 145-153.
- Selander, R.K., 1976. Genic Variation in Natural Populations. In: Molecular Evolution (Ayala, F. J., ed.). Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 21-45.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal, 1973. Numerical Taxonomy. W. H. Freeman Co., San Francisco.
- Swofford, D.L. and R.B. Selander, 1981. BIOSYS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics. *J. Heredity* **72**: 281-283.
- Uchida, K., 1939. Freshwater fishes of Korea. Nematognthii and Eventognathii. Chosen Sotokufu Suisan Shikenjo Hokoku. pp.458.
- Watanabe, M. and K. Mizuguchi, 1988. On the two types of the Dark Chub (*Zacco temmincki*) IV. Morphological variation of B-type (fluvial type). Abstracts for 16th Annual Meeting of Ichthyological Soc. of Japan.
- Yang, S.Y. and M.S. Min, 1987. Evolutionary study on the Dark Chub (*Zacco temmincki*) IV. Genetic variation, morphology and artificial hybridization. *Korean J. Zool.* **30**: 417-431.
- Yang, S.Y. and M.S. Min, 1989. Evolutionary study on the Dark Chub (*Zacco temmincki*) I.. Geographic distribution and seasonal variation of two allelomorphs of MDH. *Korean J. Zool.* **32**: 232-241.
- Yang, S.Y. and Y.M. Son, 1986. Genetic and morphological variation of the genus *Liobargus* in Korea. *Korean J. Syst. Zool.* **2**: 1-12.
- Yang, S.Y., H.Y. Lee, H.J. Yang, and J.H. Kim, 1991. Systematic study on the family Cobitidae (Pisces, Cypriniformes) I. Geographic variation of *Nemacheilus toni*, *Lefua costata* and *Niwaella multifasciata*. *Korean J. Zool.* **34**: 110-122.

(Accepted October 30, 1992)

Systematic Study on the Genus *Zacco* (Pisces, Cyprinidae). IV.**Genetic Differentiation of the Dark Chub (*Zacco temminckii*) From Korea and Japan**

Mi Sook Min and Suh Yung Yang (Department of Biology, Inha University, Incheon 402-751, Korea)

Surveys of electrophoretic variation in isozymes and general proteins encoded by 21-26 presumptive loci were conducted to clarify the taxonomic status and differentiation of the Dark Chub, *Zacco temminckii*, from Korea and Japan. Genetic similarity estimates between Korean A(MM)-type and Japanese B-type indicates that they are conspecific ($\bar{S} = 0.981$) whereas Korean B(MS)-type and Japanese A-type (*Zacco sieboldi*, by Mizuguchi *et al.*, 1989) are distinct species. It is speculated, based on the divergent time estimate (Nei, 1975), that Korean B(MS)-type and Japanese A-type (*Z. sieboldi*) were first differentiated simultaneously from *Z. platypus* about four million years ago (Pliocene) while Korean A(MM)-type and Japanese B-type subsequently branched from Korean B(MS)-type about 800 thousand years ago (Pleistocene) through a progressive adaptation toward colder temperature (Yang and Min, 1987) before present distribution.