

## 미토콘드리아 16S rDNA를 이용한 아무르산개구리 (양서 강: 개구리 과)의 유전적 다양성

송재영 · 윤병수 · 오홍식<sup>1</sup> · 정규희\*

경기대학교 생물학과, <sup>1</sup>제주대학교 과학교육과

### Genetic Diversity of *Rana amurensis* (Amphibia: Ranidae), Based on Mitochondrial 16S rDNA Gene Sequences

Jae-Young Song, Byoung-Su Yoon, Hong-Shik Oh<sup>1</sup> and Kyu-Hoi Chung\*

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea,

<sup>1</sup>Department of Science Education., Cheju National University, Jeju 690-750, Korea

**Abstract** - Genetic diversity of local populations among geologically isolated groups of *Rana amurensis* was refined by sequence comparison of the mitochondrial (mt) 16S rDNA genes. Each 401 base pairs of DNA sequences, which was determined from four local populations of *Rana amurensis*, two local populations of *R. nigromaculata*, and three species of the genus *Rana* were used in this analysis. Despite morphological similarity of *Rana amurensis*, Korean populations were well distinguished from the other groups on the basis of 16S rDNA gene difference. Further analyses for additional local populations belonging to *R. amurensis* will be necessary to clarify the taxonomic status.

**Key words** : local populations, genetic variation

### 서 론

산개구리류는 형태적 유사성으로 인하여 분류하기 매우 어려운 group으로 알려져 있다(Boulenger 1920). 또한, 현재까지 산개구리류에 대한 많은 연구들이 이루어졌으나, 그들의 계통분류학적 관계에 대한 연구는 빈약한 실정이다. 한국 내 분포하는 개구리속(Genus *Rana*)은 총 6종으로 참개구리(*Rana nigromaculata*), 움개구리(*R. rugosa*), 금개구리(*R. plancyi*), 북방산개구리(*R. dybowskii*), 계곡산개구리(*R. huanrenensis*) 그리고 아무

르산개구리(*R. amurensis*)가 있다(Kang and Yoon 1975; Zhao and Adler 1993; Sengoku *et al.* 1996; Maeda and Matsui 1999). 아무르산개구리는 한국을 포함하여, 몽골 북부, 중국 및 러시아의 시베리아에서부터 사할린까지 넓게 분포하고 있으며, 이렇게 넓은 지역에 분포함에 따라 상대적으로 유전적 변이도 클 것으로 추측된다.

또한, 한국에서는 아무르산개구리에 대한 분류학적 위치에 대하여 여러 양서·파충류 학자간에 의견이 분분하다. 한국산 아무르산개구리에 대한 형태 및 생태적 분석 등 구체적인 연구의 부족과 본 종의 기재 지역인 러시아 집단과의 직접적인 비교의 부족, 기존 연구에서 한국산 집단과 러시아산 집단사이의 일부 유전자 비교에서 차이점 발견 등으로 인하여, 국내에서 발간된 보고

\*Corresponding author: Kyu-Hoi Chung, Tel. 031-249-9641, Fax. 031-251-4721, E-mail. yamori@korea.com

서, 논문 등에서 본 종의 학명을 *Rana amurensis*, *Rana amurensis coreana*, *Rana coreana*로 혼용하여 표기하고 있으며 (Shim 1997; Yang *et al.* 2001), 이러한 분류학적 위치에 대하여 양서·파충류 학자들 간의 의견이 서로 다른 것이다.

한편, 미토콘드리아 유전자는 분류학적으로 많이 사용되고 있으며 (Brown *et al.* 1982; Smith and Patton 1991; Moritz *et al.* 1992; Tan and Wake 1995; Lee *et al.* 1997), 이들은 고등동물에서 모계유전을 하며, 안정적인 유전자로 알려져 있고, 종, 속, 과 수준의 분류체계에서 많이 사용되는 유전자이다. 하지만, 미토콘드리아의 진화속도는 일반적으로 핵 유전자에 비하여 빠르며 (Birky *et al.* 1989; Tan and Wake 1995), 짧게는 몇 천년부터 길게는 약 10억년 정도까지 진화에 대한 문제를 해결하기 위하여 사용되기도 한다 (Meyer and Wilson 1990).

따라서, 본 연구는 한국산 아무르산개구리 (*R. amurensis* 또는 *R. amurensis coreana*)의 미토콘드리아 16S rDNA의 염기서열을 결정하고 이미 발표된 국외 집단과의 16S rDNA 염기서열과 상호 비교하여 한국산 아무르산개구리의 유전적 변이 정도를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 연구에 사용된 아무르산개구리는 경기도 수원시 팔달구에서 5개체를 채집하였으며, 참개구리는 경상북도 문경시 일대에서 2개체를 채집한 후에 경기대학교 생물학과 내에 있는 냉동고에서  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였으며, 이들 개체에서 간 및 다리근육 등의 조직을 적출한 후 DNA를 분리하였다.

개구리의 미토콘드리아 16S rDNA를 분리하기 위해서 PCR (polymerase chain reaction)법을 이용하였으며, 각각의 조성은 template DNA ( $10\text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , dNTP (2.5 mM) 1  $\mu\text{l}$ , Taq polymerase ( $5\text{ Unit } \mu\text{l}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , PCR buffer 10  $\mu\text{l}$  (GeneClone Co, Korea), primer (100 pmole) 1  $\mu\text{l}$ , 그리고 증류수를 85  $\mu\text{l}$  첨가하여 총 volume을 100  $\mu\text{l}$ 로 하였다. PCR은 총 30 cycle을 시행하였으며, 각 cycle은 denaturation  $94^{\circ}\text{C}$ , 1분; annealing  $58^{\circ}\text{C}$ , 1분, polymerization;  $72^{\circ}\text{C}$  1분으로 하고, 추가적으로 initial denaturation을  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 3분, final extension을  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 실시하였다. Primer제작은 참개구리 유전자 (GenBank Accession No. NC\_002805)를 참고하여 제작하였으며, 이중 16S1F (5'-gaggtccagcctgccagtg-3')는 885번부터 904번째 유전자의 염기서열에 해당하며, 16S1R (5'-ccctgatccaacatcgag-3')은 1,346부터 1,363까지의 염

기서열에 해당한다. PCR 시행 후 1.5% agarose gel에 전기영동하여 증폭된 DNA를 확인하였으며, Bioneer AccuPrep™ Gel Purification kit를 이용하여 gel로부터 DNA를 추출한 후 direct sequencing method에 의하여 염기서열을 결정하였으며, sequencing error율을 낮추기 위하여 양방향 confirmation을 실시하였다. 한국산 아무르산개구리와 동북아 지역 (중국, 몽골 및 러시아)의 아무르산개구리의 16S rDNA를 비교분석하기 위하여 본 연구에서 확인된 한국산 아무르산개구리와 참개구리 그리고 GenBank에 등록된 아무르산개구리 (*R. amurensis* AB\_058885, 몽골 북부; AB\_058886, 러시아 연해주; AB\_058887, 중국 만주), 참개구리 (*R. nigromaculata* AF\_467981, 일본 히로시마 집단) 및 같은 속 (Genus *Rana*) 내에 있는 다른 종들 (*R. catesbeiana* M\_57527, *R. dybowskii* AB\_058873, *R. pirica* AB\_058872, *R. chensiensis* AB\_058871 & AB\_058870)도 함께 비교하였으며, 이들 중 공통염기서열인 401 bp의 유전자를 CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994)를 이용하여 비교 분석하였다.

또한, PAUP과 PHYLIP package를 이용한 분석을 실시하였으며, 두 가지의 분석에서 동일한 결과를 나타냄에 따라 PHYLIP 분석에 의한 결과만을 수록하였다. PHYLIP package의 DNADIST에서 Kimura's two parameter method에 의하여 지역 집단간 유전적 거리를 분석하였으며, NEIGHBOR program의 neighbor-joining algorithm에 의하여 유집분석을 하였고, DNAML algorithm (Felsenstein 1983)을 이용하여 maximum likelihood (ML) 분석을 하였으며, transition-transversion ratio는 2.0으로 하였다. 또한, 각 분석에 있어서 신뢰성을 높이기 위하여 1,000번의 bootstrap replication (Felsenstein 1985)을 실시하였으며, outgroup으로 *Rana catesbeiana*를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

총 401 bp의 미토콘드리아 16S rDNA 염기서열들을 분석한 결과를 살펴보면, 아무르산개구리의 중국 만주 집단과 러시아 연해주 집단의 염기서열이 100% 일치하는 것으로 나타났으며 (Fig. 1), 이들과 몽골 북부지역의 집단과 유전자의 유사성이 99.75%로 매우 높게 나타났다. 이와는 대조적으로, 중국, 몽골 및 러시아산 아무르산개구리와 한국산 아무르산개구리의 16S rDNA의 유사성이 96.00~96.25%로 나타나, 중국, 몽골 및 러시아 집단들 사이의 유사성보다 상대적으로 낮은 것으로 분석되었다. 또한, 한국과 일본의 참개구리에 대한 분석에서



<i>R. catesbeiana</i>	301	AAGAATTACTAACTAATGTTTAAAGACCCAATATTTGATGAATGAACCAAGTTACCTGG
<i>R. pirica</i>		.....T.....C...C.....G.....C...C.....
<i>R. chensinensis</i> 1		.....C...C...A...G.....C...CC.....
<i>R. dybowskii</i>		.....T...T.....C...T.....G.....C...C.....
<i>R. chensinensis</i> 2		.....TC.....C...C.....G.....C...C.....T.....
<i>R. amurensis</i> (China)		.....A...G.....C...T.....G.....C...C.....
<i>R. amurensis</i> (Russia)		.....A...G.....C...T.....G.....C...C.....
<i>R. amurensis</i> (Mongolia)		.....A...G.....C...T.....G.....C...C.....
<i>R. amurensis</i> (Korea)		.....C...T.....G.....C...C.....
<i>R. nigromaculata</i> (Korea)		.....C...A.....G.....T.....G.....C...C...C.....A...
<i>R. nigromaculata</i> (Japan)		.....C...A.....G.....T.....G.....C...C...C.....
<i>R. catesbeiana</i>	361	GGATAACAGGGCAATCTACTTCAAGAGCCCTATCGACAAG
<i>R. pirica</i>		.....C.....A.....
<i>R. chensinensis</i> 1		.....C.....A.....
<i>R. dybowskii</i>		.....C.....A.....
<i>R. chensinensis</i> 2		.....C.....A.....
<i>R. amurensis</i> (China)		.....C.....T...A.....
<i>R. amurensis</i> (Russia)		.....C.....T...A.....
<i>R. amurensis</i> (Mongolia)		.....C.....A.....
<i>R. amurensis</i> (Korea)		.....C.....T...A.....
<i>R. nigromaculata</i> (Korea)		.....C.....
<i>R. nigromaculata</i> (Japan)		.....C.....

Fig. 1. Continued.

**Table 1.** Pairwise distance among four local populations found in *R. amurensis* and the reference species, Genus *Rana* (1. *R. pirica*; 2. *R. chensinensis* 1; 3. *R. dybowskii*; 4. *R. chensinensis* 2; 5. *R. amurensis* (China); 6. *R. amurensis* (Russia); 7. *R. amurensis* (Mongolia); 8. *R. amurensis* (Korea); 9. *R. nigromaculata* (Japan); 10. *R. nigromaculata* (Korea); 11. *R. catesbeiana*)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-										
2	0.0228	-									
3	0.0331	0.0357	-								
4	0.0460	0.0487	0.0593	-							
5	0.0890	0.0864	0.0892	0.0973	-						
6	0.0890	0.0864	0.0892	0.0973	0.0000	-					
7	0.0919	0.0893	0.0921	0.1002	0.0025	0.0025	-				
8	0.0781	0.0701	0.0647	0.0808	0.0460	0.0460	0.0487	-			
9	0.1039	0.1098	0.1069	0.1181	0.1236	0.1236	0.1267	0.1009	-		
10	0.1325	0.1212	0.1126	0.1296	0.1236	0.1236	0.1267	0.1066	0.0305	-	
11	0.1136	0.1341	0.1167	0.1398	0.1191	0.1191	0.1222	0.1134	0.1023	0.1109	-

이들 두 집단 사이의 유사성이 97.51%로 나타나, 참개구리에 비하여 아무르산개구리의 유전자 유사성이 더 낮게 나타나는 것으로 밝혀졌다 (Table 1).

Genetic distance를 살펴보면 중국, 몽골 및 러시아 집단들이 매우 가까운 것으로 나타났다. 중국산 아무르산개구리와 러시아산 아무르산개구리의 유전적 거리가 0.0000으로 나타났으며, 이들과 몽골산 아무르산개구리도 0.0025로 매우 가깝게 나타났다. 하지만 한국산 아무르산개구리와 중국, 몽골 및 러시아 집단과의 거리는 0.0460~0.0487로 나타나, 한국 집단이 다른 집단과 비교하여 큰 차이를 보였다. 또한, 한국 및 일본산 참개구

리의 종내 유전적 거리는 0.0305로 나타났다. 같은 속 내에 존재하는 산개구리류의 종간 유전적 거리 (*R. pirica*, *R. chensinensis*, *R. dybowskii*)를 살펴보면 0.0228~0.0593으로 나타났으며, 특이한 것은 중국, 몽골 및 러시아산 아무르산개구리의 집단과 한국산 아무르산개구리 간의 유전적 거리가 종간 거리 수준에 이르고 있다는 것이다 (Table 1).

Neighbor-Joining (NJ) 분석에서 산개구리류인 아무르산개구리 집단이 subcluster를 형성하였으며, 나머지 산개구리류가 또 하나의 subcluster를 형성하였다. 아무르산개구리 중 중국, 러시아 집단과 몽골 집단이 100%

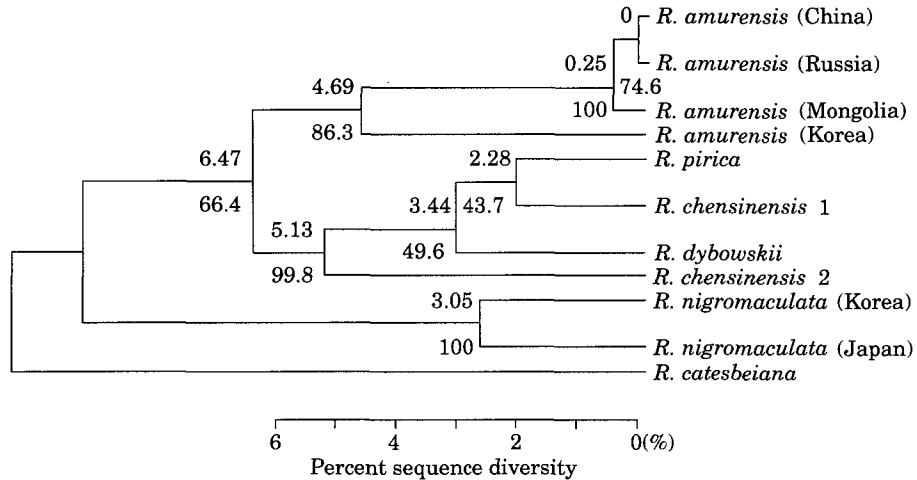


Fig. 2. A evolutionary relationships among the Genus *Rana* based on Neighbor-Joining analysis. Numbers above nodes indicate Kimura-2-parameter distance values and below nodes indicate bootstrap proportions.

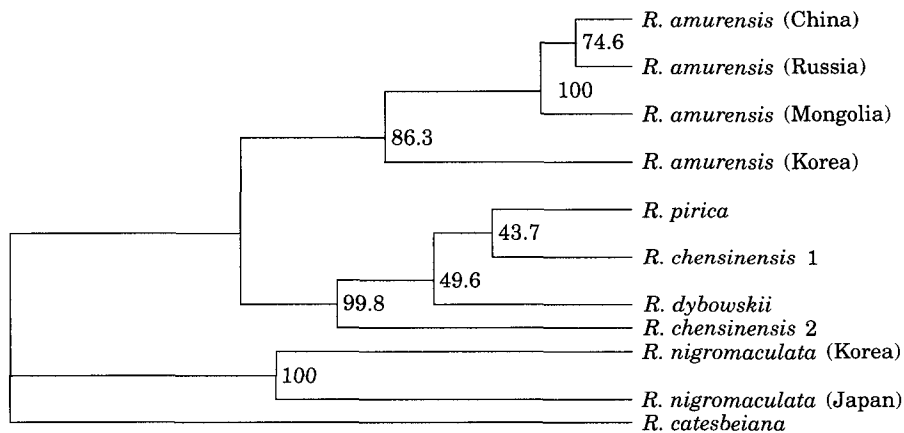


Fig. 3. A Maximum-likelihood Tree of geologically isolated groups, showing the phylogenetic relationship among the Genus *Rana* based on a maximum-likelihood analysis. Numbers of nodes indicate bootstrap proportions.

bootstrap iteration을 보였으며, 이들 집단과 한국산 아무르산개구리가 86.3%의 iteration을 보였다. 아무르산개구리 subcluster는 주로 저지대 논 혹은 야산에 주로 서식하며, 다른 산개구리 subcluster에 해당되는 종은 일반적으로 저지대를 포함해서 고산지대까지 넓은 분포역을 가지고 있다. 또한, 아무르산개구리 subcluster의 경우 염색체의 수가  $2n = 26$ 이며, 다른 산개구리 subcluster에 해당하는 종들은  $2n = 24$ 의 염색체를 가지고 있는 종으로 (Maeda and Matsui 1999), 이들 두 집단간에는 생태적, 유전적 차이처럼 NJ 분석에서도 서로 다르게 cluster를 형성하였다. 또한, 이들 두 subcluster간에 66.4%의 iteration을 보였다.

흥미로운 것으로, *R. chensinensis* 1, 2가 같은 종임에도

불구하고 서로 다르게 위치하는 것이다. *R. chensinensis*의 분포는 중국 중부, 서부 및 동북부 지역, 극동 러시아에서부터 사할린, 쿠릴 남부, 일본의 홋카이도, 북한 및 몽골 지역 등 동아시아에 넓게 분포하는 종이며, 그들의 서식환경도 매우 다양하다 (Zhao and Adler 1993). 이와 같이 넓은 지역에 분포하는 *R. chensinensis*에 대한 연구에서 원기재 지역과 기타 지역에 분포하는 집단간에 형태적, 유전적으로 많은 차이가 나타나며, 최근까지 *R. chensinensis*로 알려진 종이 많은 연구를 통해서 *R. pirica* 등 다른 종으로 확인되었다 (Maeda and Matsui 1999; Tanaka-ueno *et al.* 1999). 따라서, NJ분석에서 서로 다르게 위치하는 것에 대해서는 보다 깊은 연구가 필요하다고 판단된다.

Maximum-likelihood (ML) 분석에서도 NJ분석과 마찬가지로 참개구리류와 산개구리류 2가지로 cluster를 형성하였으며 (Fig. 3), 한국산 아무르산개구리는 중국, 몽골 및 러시아 집단이 먼저 cluster를 형성한 후에, 이들과 하나의 cluster를 형성하였으며, 이들은 다른 산개구리류 집단과 하나의 group을 이루고 있는 것을 볼 수 있었다.

16S rDNA 401 bp를 분석한 결과 중국, 몽골 및 러시아 집단은 99.75~100%의 유전자 유사성을 보였으나, 한국의 집단은 96.00~96.25%로 타 집단과 비교해 볼 때 상대적으로 낮은 유사성을 보였다. 더욱이, 아무르산개구리는 한국 및 일본산 참개구리의 유사성보다 더 큰 폭으로 나타났으며, 다른 산개구리류의 중간 범위에 포함될 정도의 차이를 볼 수 있었다. 그러므로, 한국산 아무르산개구리를 종내 집단으로 보는 것 보다는 아종 혹은 새로운 종으로 보는 것이 타당하다고 판단된다.

NJ 그리고 ML 분석에서도 중국, 몽골 및 러시아 집단이 하나의 cluster를 형성하였으며, 한국집단이 다시 이들과 연결되는 것을 알 수 있었으나 sequence divergence가 중간 범위에 포함될 정도로 크게 나타나는 것을 볼 수 있었다.

본 연구에서 중국, 몽골 및 러시아 집단의 미토콘드리아 16S rDNA 분석결과는 유전자 유사성이 99.75~100%로 매우 높게 나타났으며, 이는 Tanaka-Ueno *et al.* (1998)의 미토콘드리아 cytochrome b 유전자 분석 결과 (similarity 98.5~99.0%)처럼 높은 유사성을 나타냈다. 비록, 미토콘드리아 내 서로 다른 유전자이지만, 현재까지 보여준 결과에 의하면 중국, 몽골, 러시아산 아무르산개구리의 유사성이 매우 높게 나타났으나, 한국산 아무르산개구리의 16S rDNA 유사성 (96.00~96.25%)이 상대적으로 낮은 것을 알 수 있다.

또한, Lee *et al.* (1999)의 아무르산개구리 Cytb 504 bp 분석에서 한국산 7개 집단의 유전적 차이가 99.6~97.6%로 매우 가깝게 나타났으며, 러시아산 집단과는 85.5~86.9%로 다소 멀게 나타났고, 이들의 결과에서도 종내 유전적 차이가 종간의 유전적 차이 정도로 크게 나타난 것을 볼 수 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 볼 때, 미토콘드리아 Cytb 분석 결과와 본 연구를 통해 나타난 16S rDNA의 결과가 매우 비슷한 것으로 확인되었다. 참개구리의 16S rDNA 분석에서도 한국 및 일본산 참개구리의 유사성이 97.51%로 높게 나타났다. 하지만 참개구리, 다른 산개구리류 및 아무르산개구리를 상호 비교할 때 (Table 1), 이들보다 한국산 아무르산개구리의 유사성이 더 낮은 것으로 확인되었다. 따라서, 한국산 아무르산개구리가 중국, 몽골

및 러시아 집단과 동일한 종내 집단으로 판단하기 보다는 아종 혹은 새로운 종으로 판단하는 것이 바람직하다고 본다.

미토콘드리아 16S rDNA는 일반적으로 종 이상의 상위 분류단계에서 분류학적 키로서 많이 사용되고 있다. 하지만, 본 연구를 통하여 미토콘드리아 16S rDNA의 401 bp를 분석하였기 때문에 이 정도의 길이로 한국산 아무르산개구리의 분류학적 위치를 분명히 하기는 부족한 것으로 사료되나 아무르산개구리의 형태적 유사성에도 불구하고, 한국산 아무르산개구리의 유전적 변이를 대변할 수 있는 자료로서 미토콘드리아 16S rDNA 염기서열상에서 타 지역 집단과 많은 차이를 보임에 따라, 앞으로 한국산 아무르산개구리의 분류학적 위치의 재정립을 위하여 다른 지역 집단과의 유전적 차이도 반드시 고려해야 할 것으로 판단된다.

## 적 요

지리적으로 격리되어 있는 아무르산개구리 (*Rana amurensis*)의 유전적인 변이를 알아보기 위하여 미토콘드리아 16S rDNA 유전자 중 401 bp 염기서열을 분석하여 비교하였다. 아무르산개구리 (4개 지역집단; 한국, 중국, 몽골 및 러시아), 참개구리 (2개 지역집단; 한국, 일본) 및 다른 종류의 산개구리류 미토콘드리아 16S rDNA 유전자도 함께 비교하였다. 아무르산개구리의 형태적 유사성에도 불구하고, 한국 집단은 다른 지역의 집단들과 비교하여 염기서열상의 상당한 차이를 나타냈다.

본 연구에서 염기서열 분석 (401 bp 분석)으로 한국산 아무르산개구리가 아종인가 아니면 독립종인지에 대하여 설명할 수는 없으나, 본 연구의 결과와 Lee *et al.* (1999)에 의해 연구된 한국산 아무르산개구리의 미토콘드리아 cytochrome b 유전자 분석 결과가 서로 일치하는 것을 알 수 있었다.

따라서, 한국산 아무르산개구리에 대한 분류학적 위치를 종 수준에서 다시 재검토해야 할 것으로 판단되나, 보다 명확한 결과를 위해서 더 많은 지역의 개체군을 포함하여 형태학적, 생태학적 연구가 진행될 필요가 있으며, 한국산 아무르산개구리의 유전적 차이도 함께 고려해야 할 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 경기대학교 교내 연구비에 의해 이루어졌으

며, 채집을 도와주신 국립환경연구원의 윤희남 선생님, 경기대학교 생태학연구실, 유전학연구실, (주) GeneClone 내 여러분께 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Birky CW, P Fuerst and T Maruyama. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: Equilibrium expectation, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison of nuclear genes. *Genetics*. 121:613-627.
- Brown WM, EM Prager, A Wang and AC Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequence of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18:225-239.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny inference package) Version 3.5c. Distributed by the author. Dept. Genet. Univ. Washington.
- Kang YS and IB Yoon. 1975. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea Vol 17 Amphibia · Reptila. The Korean ministry of education. Seoul.
- Kim JB, HY Lee and SY Yang. 1999. Genetic variation of the Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequence in a Korean Pond Frog, *Rana nigromaculata*, with a report of the Discordance in the Genetic Divergence of mtDNA and Nuclear DNA. *Korean J. Genetics*. 21:127-134.
- Lee HJ, SJ Oh, DE Yang, YL Kim and SY Yang. 1997. Genetic differentiation between 2 species of the genus *Rana* in Korea. *Korean J. Genetics*. 19:317-324.
- Lee JE, DE Yang, YR Kim, H Lee, HL Lee, SY Yang, and HY Lee. 1999. Genetic relationships of *Rana amurensis* based on mitochondrial Cytochrome b gene sequences. *Korean J. Biol. Sci.* 3:303-309.
- Meada N and Matsui M. 1999. Frogs and Toads of Japan. Bun-Ichi Soga Shuppan press, Tokyo.
- Meyer A and AC Wilson. 1990. Origin of tetrapods inferred from mitochondrial DNA application to lungfish. *J. Mol. Evol.* 31:359-364.
- Moritz C, GJ Schneider and DB Wake. 1992. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex conform the ring species interpretation. *Syst. Bio.* 41: 273-291.
- Sengoku S, T Hikida, M Matsui and K Nakaya. 1996. The encyclopaedia of animals in Japan. Heibonsha press, Tokyo.
- Shim JH. 1997. Herpetofauna survey and ecological research in neighboring 4 regions of Seoul City (I). *J. Kor. Biota*. 2:207-221.
- Smith MF and JL Patton. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Mol. Biol. Evol.* 8:85-103.
- Tan AM and DB Wake. 1995. MtDNA phylogeography of the California Newt, *Taricha torosa* (Caudata, Salamandridae). *Mol. Phyl. Evol.* 4:383-394.
- Tanaka T, M Matsui and O Takenaka. 1996. Phylogenetic Relationship of Japanese Brown frogs (*Rana*: Ranidae) Assessed by Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences. *Bio. Sys. and Eco.* 24:299-307.
- Tanaka-Ueno T, M Matsui, T Sato, S Takenaka and O Takenaka. 1998. Local Population differentiation and Phylogenetic Relationships of Russian Brown frog, *Rana amurensis* Inferred by Mitochondrial Cytochrome b Gene (Amphibia, Ranidae). *Jpn. J. Herpetol.* 17:91-97.
- Tanaka-Ueno T, M Matsui, GF Wu, L Fei and O Takenaka. 1999. Identity of *Rana chensinensis* from Other Brown Frogs as Assessed by Mitochondrial Cytochrome b Sequences. *Copeia*. 1:187-190.
- Thompson DL, DG Higgins and TJ Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position, specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Yang SY and CH Yu. 1978. Check List of Korean Amphibians. Inha University I. I. R. 5:81-90.
- Yang SY, JB Kim, MS Min, JH Suh and YJ Kang. 2001. Monograph of Korean Amphibia. Academic press. Seoul.
- Zhao E and K Adler. 1993. Herpetology of China. Society for the study of amphibians and reptiles, Ohio.

(Received 8 November 2002, accepted 20 February 2003)