

## 미토콘드리아 ND1/tRNA 유전자 서열 비교를 통한 국내 서식 황소개구리의 유전적 다양성 조사

이지영 · 심재한<sup>1</sup> · 정인실\*

한서대학교 생물학과, <sup>1</sup>한국 양서파충류 생태연구소

### Genetic Diversity of *Rana catesbeiana* in Korea based on Mitochondrial ND1/tRNA Sequence Analysis

Lee, Ji-Young, Jae-Han Shim<sup>1</sup> and In-Sil Joung\*

Department of Biology, Hanseo University, Seosan, Chungnam 356-706, Korea

<sup>1</sup>Ecological Research Institute of Korean Herpetofauna, Suwon, Kyunggi 441-873, Korea

**ABSTRACT:** The American bullfrog, *Rana catesbeiana* was imported from Japan for farming for the human consumption in 1970's and introduced populations were a great threat to native habitats in the pond and lake ecosystem. However, it is thought that the population of bullfrog has rapidly declined for past years in Korea. In this study, we investigated the intra-genetic diversity of *R. catesbeiana* habitated in Korea. The nucleotide sequences of 1,215bp mitochondrial ND1/tRNA region in bullfrogs sampled from 5 sites in Jeollanamdo were analyzed and compared to the original sequence of *R. catesbeiana* reported in Genbank. The nucleotide similarity between Korean and North American bullfrog was ranged from 98.7% to 100% based on kimura-2-parameter distance. In addition, bullfrogs analyzed in this study were clustered into two groups with one including Jangheung and the other including Gwangju populations in the neighbor-joining tree. North American *R. catesbeiana* was grouped in Jangheung cluster, indicating that there is the very low genetic difference between Korean and North American populations. The maximum parsimony tree in which North American *R. catesbeiana* was set as an outgroup suggests that Jangheung group represents the introduced population to Korea. Taken together, the results indicate that the population of *R. catesbeiana* in Korea has not segregated geographically yet, after the introduction.

**Key words:** Genetic similarity, Mitochondrial ND1/tRNA, *Rana catesbeiana* in Korea

### 서론

황소개구리(*Rana catesbeiana*)는 동부 북미 대륙이 주서식지였으나(Shaw 1802) 양식을 목적으로 전 세계에 분양되어 현재 유럽 대륙, 남미 및 아시아 전 지역에 널리 분포되어 있다. 국내에 서식하는 황소개구리는 1970년대 양식을 목적으로 일본에서 도입된 후 농가 대부분이 양식을 포기함에 따라 자연생태계에 방치되어 토착종을 제치고 그 개체수가 급격히 증가하였다. 이와 같이 황소개구리 개체수의 급격한 증가로 국내 하천과 호소생태계에 큰 피해를 주어 왔지만 최근 생태계 교란 사례가 현저히 감소하는 등 개체수가 줄어든 것으로 추정되고 있다. 우리나라에서 황소개구리에 대한 연구는 1970년대의 인공 양식, 야외 방사 관리 방법과(김 1971, 1973, 1975) 1990년대 자연생태계에서 피식, 포식관계를 중심으로 한 토산 생태계에 미치는 영향을 규명하는 연구(고 등 1991, 강 1992, 강과 윤 1994, 김

과 고 1998)가 수행되었으나 이후 개체군 동태에 대한 조사가 체계적으로 이루어지지 않았다. 또한 외래종으로 도입되어 40여 년 동안 국내에 서식하고 있는 황소개구리에 대한 유전적 분석은 양 등(2001)의 연구가 유일하다.

한국산 개구리의 종 내 다양성에 대한 유전적 연구에는 mitochondrial DNA (mtDNA)의 염기서열 분석이 많이 이용되었다(Song *et al.* 2004). mtDNA는 고등동물에서 모계 유전을 하는 안정적인 유전자이며, mtDNA의 진화속도는 일반적으로 nuclear DNA(nDNA)에 비해 빠르기 때문이다(Hillis *et al.* 1996). 또한 하나의 세포에 여러 copy의 mtDNA가 있으므로 세포 당 한 copy씩만 존재하는 핵 내의 DNA보다 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 증폭하기가 용이하다. 이에 따라 여러 종의 한국산 개구리의 다양성 분석 연구에서 mtDNA의 cytochrome *b* gene(cyt *b*), mt 12s 및 16s RNA gene의 염기서열이 이용되었다(Lee *et al.* 1999, Song *et al.* 2003).

12s와 16s RNA 서열이 종 이상의 분류군 사이의 유연관계를

\* Corresponding author; Phone: +82-41-660-1341, Fax: +82-41-688-3403, e-mail: ijoung@hanseo.ac.kr

조사하는데 유용한 반면 근연관계인 종이나 종 내의 유전적 연관성 분석에는 mtDNA D-loop부위나 cyt b gene의 염기서열 분석이 보다 유용하다(Hillis *et al.* 1996). 최근에는 염기서열이 가까운 동종 분류군 사이의 유전적 연관성 분석에는 mtDNA의 coding sequence 부위인 ND1(NADH dehydrogenase subunit 1) gene과 몇몇 tRNA의 염기서열 분석이 더욱 유용하다고 보고되었다(Macey *et al.* 2001, Monsen and Blouin 2003). 이번 연구에서는 외국에서 도입되어 수십 년 동안 국내에 서식하는 황소개구리의 유전적 분석을 위한 기초 자료를 제공하기 위해 국내에서 채집한 황소개구리의 mtDNA ND1/tRNA의 염기서열을 분석하고 이를 상호 비교하여 종 내 유전적 유사도를 조사하였다.

**재료 및 방법**

**채집 및 서식밀도 조사**

2004년 봄과 여름에 걸쳐 서울, 경기 전라남도에서 황소개구리의 서식밀도를 조사하였다. 조사 지역은 서울시 서초구 양재천, 경기도 양평군 양수리와 전라남도 지역에서 광주광역시 오산동 황룡강, 나주시 남평읍 문씨방죽, 고흥군 동강면 침교제, 장흥군 장동면 북동제, 영암군 금정면 아천제 일대를 선택하였다. 서식밀도는 현장 조사 시 정성적으로 확인한 결과와 서식면적, 은신처와 먹이원이 제공되는 서식 환경 등을 고려하여 4등급으로 구분하였으며, 1등급(풍부), 2등급(중간), 3등급(빈약), 4등급(극히 미비)로 하였다(Table 1). 등급 기준은 국립환경과학원의 제2차 전국 자연 환경 조사에서 사용한 기준을 이용하였다. 성체의 경우 저수지의 수변 20 m × 20 m 내에 황소개구리가 자주 활동하는 낮 2시에서 4시 사이에 1시간 동안 황소개구리를 포획하여 그 개체 수를 산정하였으며, 올챙이는 저수지의 경우 수변 20 m × 20 m 크기의 방형구를 정한 다음 방형구 내에서 1시간 동안 불위로 부상하는 개체 수를 산정하였다. 수로나 하천의 경우에는 2 m × 2 m 크기의 방형구 10곳을 무작위로 선정하여 다음 족대를 이용하여 포획하였다. 서식밀도 조사는 봄과 여름에 걸쳐 2회 실시되었으며, 각 조사 지역마다 성체 방형구 1곳과 올챙이 방형구 10곳을 설치하여 반복 조사하였고 그 결과를 평균치로 환산하여 등급별로 나누었다.

**DNA 분리 및 PCR**

Table 1. Standard for the degree representing the population density

Degree	Population density (individual/20 m × 20 m)
1 : abundant	>25
2 : medium	15~24
3 : rare	5~14
4 : very rare	<5

각 지역당 2개체 이상씩 채집한 황소개구리는 실험에 이용할 때까지 -20℃에 보관하였고, 각 DNA sample들은 뒷다리 대퇴부 근육에서 DNeasy Tissue Kit(Qiagen, USA)를 이용하여 분리하였다. 이 DNA를 주형으로 PCR을 이용하여 mtDNA에 ND1/tRNA fragment를 증폭하였다. 각 각의 primer는 기존에 발표된 *R. catesbeiana* mitochondrial genome(*Rana catesbeiana*, NCBI Genbank gi:336962; Nagae 1988; Yoneyama 1987)에 근거하여 제작하였으며 사용한 primer의 염기서열은 Table 2에 표시하였다.

각각의 PCR 조성은 template DNA 10 μL, forward primer와 reverse primer는 각각 1 μL(10 pM μL<sup>-1</sup>), 10X Taq PCR Buffer I (with MgCl<sub>2</sub>) 5 μL, dNTP mixture (2.5 mM each) 1 μL, Taq DNA polymerase (5 unit μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL를 넣고, 멸균된 증류수로 최종부피 50 μL을 맞추었다. Thermocycler를 이용한 PCR 증폭은 94℃에서 5 min간 preincubation 한 후, 94℃에서 45 sec간 denaturation하였으며, 50℃에서 45 sec간 primer annealing하였다. 그 후 DNA extension는 72℃에서 45 sec로 하여 총 30 cycles을 수행하였다. 모든 PCR 과정이 끝난 후 agarose gel 전기영동으로 증폭된 DNA의 크기를 확인하였다.

**각 Sample별 염기 서열 결정 및 분석**

PCR를 이용하여 증폭한 mtDNA ND1/tRNA large fragment의 염기 서열은 ABI BigDye terminator를 이용한 cycle sequencing 방법(Applied Biosystems Inc., USA)으로 해독하여 분석하였다. ND1/ tRNA large fragment의 염기서열은 F23과 F24, MB130 primer를 이용하여 분석하였다(Table 2). 염기 서열은 양 방향으로 확인하였고, 2회 이상 반복 실시하여 결정하였다. 모든 sample의 염기 서열은 GenBank에 등록된 황소개구리 염기 서열과 함께 clustalX로 alignment하였다. 지역 개체 군간의 분화를 나타내는 거리 및 형질에 기초한 분지도를 얻기 위하여 MEGA3 software(Kumar *et al.* 2004)를 이용하여 kimura-2-

Table 2. Primer and product information for mtDNA ND1/tRNA fragments

Primer (sequence)*	Size (bp)	Position in <i>R. catesbeiana</i> mitochondrial genome**
Gene amplification		
(F)MB77 5'tggcagagcttggtatgcaaaaga3'	1215	2669 <sup>a</sup>
(R)MB74 5'ggtatgagcccgatagctta3'		3883 <sup>a</sup>
Internal sequencing		
(F)F23 5'ttgctgatggcgtaaaa3'		2892 <sup>b</sup>
(F)F24 5'ttgctgaaactaacca3'		3315 <sup>b</sup>
(R)MB130 5'gaaatgyraargaagagggt3'		3227 <sup>b</sup>

\* (F) forward, (R) reverse.

\*\* Primer positions relative to published sequences of the bullfrog, *R. catesbeiana* are given. <sup>a</sup>Nagae, 1988; <sup>b</sup>NCBI gene.

parameter distance, neighbor-joining (NJ; Saitou and Nei 1987) 및 maximum parsimony(MP) 분석을 실시하였다(Swofford *et al.* 1996). NJ 및 MP 분석 시 각각 1000번 및 100번의 bootstrap을 실행하였으며 MP 분석 결과에서 GenBank에 등록된 황소개구리의 염기 서열을 외군으로 사용하여 rooted tree를 작성하였다.

**결과 및 고찰**

**황소개구리의 국내 서식 분포 및 밀도**

밀도 조사를 실시한 지역 중 서울 양재천을 제외한 전 지역에서 황소개구리가 관찰되었다. 경기도 양수리와 전남 지역의 광주, 남평, 장흥에서의 황소개구리 서식 밀도는 아주 낮았으며 영암은 중간, 그리고 고흥에서는 풍부한 서식 밀도를 관찰할 수 있었다(Fig. 1, Table 3).

**ND1/tRNA Large Fragment Sequencing 및 국내 서식 황소개구리의 유전적 연관성 분석**

타 지역에 비해 황소개구리의 출현이 빈번한 것으로 조사된 전라남도 지역에서 채집한 개체를 대상으로 하여 유전자 염기 분석을 실시하였다. mtDNA ND1/tRNA gene을 PCR로 증폭하여 예상된 1215 bp 크기를 agarose gel 전기영동으로 확인한 후(자료 미제시) 염기 서열 분석에 이용하였다. 기존에 발표된 황소개

Table 3 Locations of sampling and the numbers of the bullfrog found on each site

Survey sites	Population density (Individual /20m×20m)*		Degree (Based on adult)
	Adult	Tadpole	
Seoul	Adult	0	not detected
	Tadpole	0	
Yangpyoung	Adult	5.0	rare
	Tadpole	5.0	
Gwangju	Adult	9.5	rare
	Tadpole	9.5	
Nampyoung	Adult	6.5	rare
	Tadpole	3.5	
Goheung	Adult	39.5	abundant
	Tadpole	29.0	
Youngam	Adult	20.0	medium
	Tadpole	17.0	
Jangheung	Adult	8.0	rare
	Tadpole	14.0	

\* The degree for the population density is determined by the average from samplings at the spring and summer season.

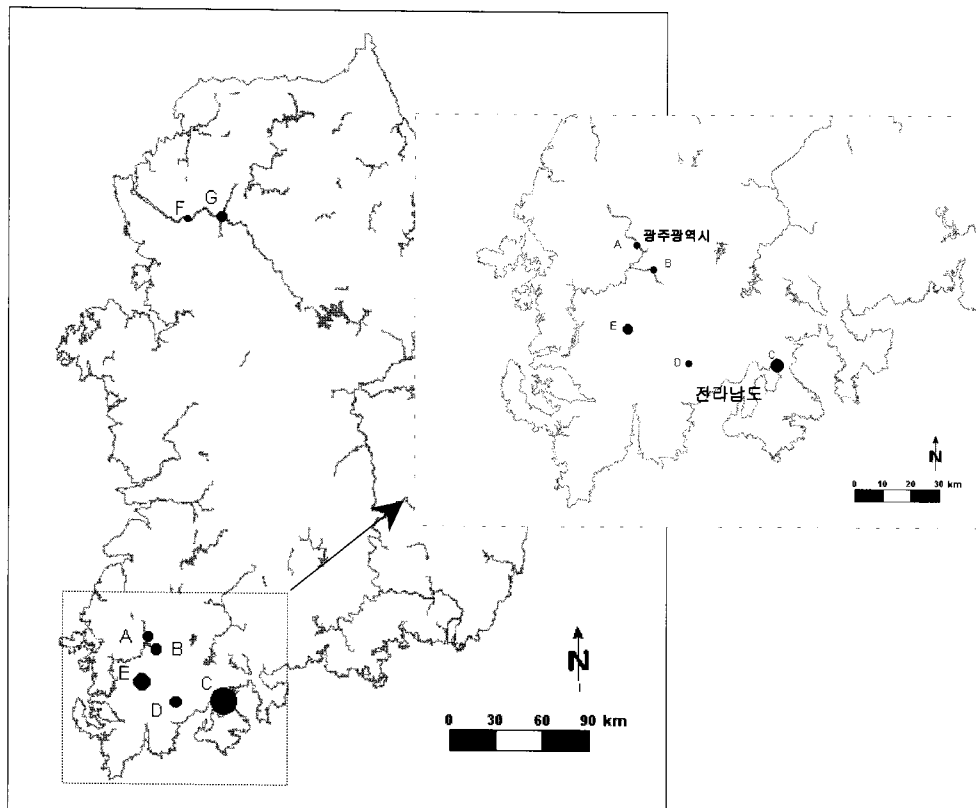


Fig. 1. A map showing population density of *R. catesbeiana* in Korea. Degree marks indicate each survey site and large plot size means the density is high. A, Gwangju; B, Nampyoung; C, Goheung; D, Jangheung; E, Youngam; F, Seoul; G, Yangpyoung.

구리의 염기 서열과 비교하였을 때 조사한 모든 개체들에서 *R. catesbeiana* mitochondrial genome의 C<sup>2714</sup>가 G로 transition이 일어난 것으로 확인되었다(Fig 2). 이 중 영암의 한 개체와 고흥의 한 개체는 C<sup>2714</sup>→G 변이만이 발견되었으므로 이 서열이 국내 도입 개체군의 초기 서열로 추정된다. 그러나 국내에 서식하는 황소개구리가 일본으로부터 도입된 것을 고려할 때, C<sup>2714</sup>→G 변이가 국내에 유입되기 전에 일어난 것인지 국내에 유입된 후 특이적으로 변화한 것인지는 본 연구에서는 규명되지 않았다. 광주를 비롯한 남평과 고흥의 한 개체는 염기 서열 변화가 6위치에서 발견되었으나 (*R. catesbeiana* mitochondrial genome의 2714, 2899, 2975, 3182, 3242, 3445) 전체 1.2kb에서 매우 적은 변이가 일어난 것을 알 수 있다. 이상의 결과는 국내에 서식하는 황소개구리는 원산지의 개체와 비교하여 큰 유전적 변이가 없는 것을 시사한다(Fig 2).

Kimura-2-parameter distance 분석법에 의하여 국내에 서식하는 황소개구리 각 개체들 간의 genetic distance를 비교하였을 때 장흥 1 및 2, 고흥 2, 영암 1의 4개체는 원산지 황소개구리와 100%, 영암 2를 제외한 나머지의 광주를 비롯한 6개체는 98.7%~99.1%의 유사도를 나타내 종내 유전적 유사도가 매우 높은 것을 알 수 있다. 이는 한국산 개구리의 종내 유사도가 참 개구리의 경우 98%, 아무르산 개구리의 경우 97.6~99.6%(Lee et al. 1999, Song et al. 2003, 2004) 인 것과 비슷한 수준으로 국내에 서식하는 황소개구리의 종내 유전적 유사도는 매우 높은 것으로 확인되었다(Table 4). 영암의 한 개체는 96.5%의 유사도를 나타내 다른 개체와 비교해 상대적으로 특이적인 유전적 분화

를 나타내고 있으나, 이 개체만이 이러한 특징을 보이고 있으므로 현재 영암 지역에서 특이적인 지역적 분화가 일어났다고 결정하기 어렵다. 일차적으로 인위적인 지역 이동이나 유난히 염기 변이가 심한 개체가 실험에 이용되었을 가능성도 배제할 수 없으며 다른 지역의 개체들의 종내 유사도가 매우 높아 국내에서의 지역적 분화가 시작된 것이라고 판단하기에는 이르다.

NJ 분석에서는 원산지 황소개구리를 외군으로 주어지지 않은 상태에서 영암 2를 제외하고 두 개의 분명한 cluster를 형성하는 것이 확인되었다. 광주 1, 2, 남평 1, 2, 3, 고흥 1의 6개체로 구성된 cluster는 95%, 장흥 1, 2, 고흥 2, 영암 1의 5개체가 속한 cluster는 89%로 높은 bootstrap iteration 결과를 보였다. 원산지 황소개구리가 처음부터 따로 분화되어 있는 것이 아니라 장흥의 개체 등과 동일한 cluster에 속하는 것을 볼 때 계통 분류적으로 매우 가까운 것을 알 수 있다(Fig. 3a). 기존의 발표된 황소개구리 염기 서열을 외군으로 설정하여 분석한 MP(maximum parsimony)에서 100번의 bootstrap을 수행한 결과 크게 2가지의 cluster가 형성됨을 볼 수 있다. 광주 1, 2, 남평 1, 2, 3, 고흥 1의 6개체와 영암 2가 하나의 cluster를 이루어 90%의 높은 bootstrap 결과를 보였다. 이와 같이 MP와 NJ 분석 결과 국내에 서식하는 황소개구리는 원산지 집단과 비교하여 유전적으로 매우 가까운 것을 확인하였다. NJ 분석 결과에서 영암 2 개체가 따로 분화한 것으로 보이나 이는 앞서 genetic distance 결과와 같이 인위적인 지역 이동이나 유난히 염기 변이가 심한 변이체가 실험된 것이라는 추정을 뒷받침한다. 그러나 여기서 흥미로운 사실은 고흥의 2가 장흥 1, 고흥 2, 영암 1의 cluster에서 분화되어 나뉜 것이 아

Table 4. Matrix of percent similarities of nucleotide sequence (above diagonal) and Kimura-2-parameter distance (below diagonal) among gene sequence of mitochondrial ND1/tRNA in *R. catesbeiana*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	98.7	99.1	98.7	98.7	98.7	98.7	100	100	96.5	100	100
2	0.013	-	100	100	100	100	100	98.7	98.7	96.1	98.7	98.7
3	0.009	0.000	-	100	100	100	100	99.1	99.1	96.5	99.1	99.1
4	0.013	0.000	0.000	-	100	100	100	98.7	98.7	96.1	98.7	98.7
5	0.013	0.000	0.000	0.000	-	100	100	98.7	98.7	96.1	98.7	98.7
6	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	-	100	98.7	98.7	96.1	98.7	98.7
7	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	98.7	98.7	96.1	98.7	98.7
8	0.000	0.013	0.009	0.013	0.013	0.013	0.013	-	100	96.5	100	100
9	0.000	0.013	0.009	0.013	0.013	0.013	0.013	0.000	-	96.5	100	100
10	0.035	0.039	0.035	0.039	0.039	0.039	0.039	0.035	0.035	-	96.5	96.5
11	0.000	0.013	0.009	0.013	0.013	0.013	0.013	0.000	0.000	0.035	-	100
12	0.000	0.013	0.009	0.013	0.013	0.013	0.013	0.000	0.000	0.035	0.000	-

1. USA, 2. Gwangju 1, 3. Gwangju 2, 4. Nampyoung 1, 5. Nampyoung 2, 6. Nampyoung 3, 7. Goheung 1, 8. Goheung 2, 9. Youngam 1, 10. Youngam 2, 11. Jangheung 1, 12. Jangheung 2.

2678 START

```

2701      cctttaaacc gggcttcaaa tccccttact aactataaaa cttttattca tatatcttct
Gwangju1      .....g.....
Gwangju2      .....g.....
Nampyoung1    .....g.....
Nampyoung2    .....g.....
Nampyoung3    .....g.....
Goheung1      .....g.....
Goheung2      .....g.....
Youngam1      .....g.....
Youngam2      .....g.....
Jangheung1    .....g.....
Jangheung2    .....g.....

2761      acctctactt tatattgctc ctattctcct cgcagtgcca tttttaactt taattgaacg

2821      aaaaatccct gggtatatac aacatcgtaa aggtccta gttgtaggac catttgact

2881      tctacaacct attgctgatg gcgtaaaact atttattaaa gaaccaatto gtccatcaac
Gwangju1      .....c.....
Gwangju2      .....g.....
Nampyoung1    .....c.....
Nampyoung2    .....c.....
Nampyoung3    .....c.....
Goheung1      .....c.....
Goheung2      .....c.....
Youngam1      .....c.....
Youngam2      .....c.....
Jangheung1    .....c.....
Jangheung2    .....c.....

2941      atcttcccaa ctccatatta ttctagcacc aaccttagct ctagccctcg ctataattat
Gwangju1      .....c.....
Gwangju2      .....c.....
Nampyoung1    .....c.....
Nampyoung2    .....c.....
Nampyoung3    .....c.....
Goheung1      .....c.....
Goheung2      .....c.....
Youngam1      .....c.....
Youngam2      .....c.....
Jangheung1    .....c.....
Jangheung2    .....c.....

3001      gtggactcca ttcctctctc ccatocetta ctogaateta aaccttagca ttttatttat

3061      cctcgccatc tccagcttaa cegttttatac aattttaggg tcagggttag cctctaatto
Gwangju1      .....c.....
Gwangju2      .....c.....
Nampyoung1    .....c.....
Nampyoung2    .....c.....
Nampyoung3    .....c.....
Goheung1      .....c.....
Goheung2      .....c.....
Youngam1      .....c.....
Youngam2      .....a.....
Jangheung1    .....c.....
Jangheung2    .....c.....

3121      taagtatgcc ttaattggcg ccctccgggc cgtcgcccaa acgatttctc acgaagtcac

3181      cttagccctg attattttat gctctgtcct cctggcagga ggatttacco tctctgcctt
Gwangju1      .....c.....
Gwangju2      .....c.....
Nampyoung1    .....c.....
Nampyoung2    .....c.....
Nampyoung3    .....c.....
Goheung1      .....c.....
Goheung2      .....c.....
    
```

Fig. 2. Nucleotide sequence alignment (1,215bp) of the mitochondrial ND1/tRNA sequence among Korean populations of *R. catesbeiana*. Nucleotide sequences of isolates were compared to that of *R. catesbeiana* reported in GenBank (top line). Sequences contains variations are presented, otherwise no nucleotide change was found among the population. Dots indicated the same nucleotide in sequences.

Youngam1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Jangheung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Jangheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
3241	cgctatttca	caggaattta	catgatttat	tttaccoccta	tgaccaatat	tcottatatg
Gwangju1	.....a.....	.....	.....	.....	.....	.....
Gwangju2	.....a.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung1	.....a.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung2	.....a.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung3	.....a.....	.....	.....	.....	.....	.....
Goheung1	.....a.....	.....	.....	.....	.....	.....
Goheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam2	.....a.....	.....	.....	.....	.....g.....c.....	.....
Jangheung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Jangheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
3301	atttgtctcc	actcttgctg	aaactaaccg	agccccattt	gacctcacag	aaggtagtc
Gwangju1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Gwangju2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Goheung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Goheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam2	.....	.....	.....	.....	.....g.....	.....
Jangheung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Jangheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
3361	agaactagtt	tcggggttta	atggtgaata	tcggggaggc	cccttcgct	tatttttct
Gwangju1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Gwangju2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung1	.....	.....	.....g.....	.....	.....	.....
Nampyoung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Goheung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Goheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Jangheung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Jangheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
3421	agcagaatat	gctaataattt	taatgataaa	taccctctca	actattattt	tttttaggtc
Gwangju1	.....	.....a.....	.....	.....	.....	.....
Gwangju2	.....	.....a.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung1	.....	.....a.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung2	.....	.....a.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung3	.....	.....a.....	.....	.....	.....	.....
Goheung1	.....	.....a.....	.....	.....	.....	.....
Goheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam2	.....	.....c.....	.....	.....	.....	.....
Jangheung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Jangheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
3481	ctgtatatea	tcactaaccc	taaccacatc	tctactcata	actaaagcct	caattttatc
Gwangju1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Gwangju2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Nampyoung3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Goheung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Goheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Youngam2	.....	.....	.....	.....c.....	.....	.....
Jangheung1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Jangheung2	.....	.....	.....	.....	.....	.....

3541 - 3800 no nucleotide variation found

Fig. 2. Continued.

나라 처음의 분화 시점에서 나뉘어 있다는 것이다. 이들은 앞서 말한 것과 같이 국내 도입된 초기 개체군으로 추정되며, 광주 1, 2를 비롯한 6개체와 영암의 한 개체가 고흥 2로부터 분화되어 나뉘어졌음을 추정할 수 있다(Fig. 3b). 이와 같이 국내에 서식하는 황소개구리는 도입시기와 비교하여 유전적 분화가 거의 없음을 확인하였고, 이로써 국내 환경에 따른 독특한 유전적 변이에 의해 국내에 서식하는 황소개구리들이 감소하는 것으로 볼 수 없다.

지금까지 보고된 mtDNA 비교에 의한 국내 서식 개구리의 분류에는 CO1(cytochrome c oxidase)서열이나 16s RNA 서열이 이용되었는데 이들의 연구에서는 400~500 bp 크기의 DNA fragment를 분석하였다. 최근의 연구에서 *Rana* 속 내의 종의 분류에 있어 16s RNA와 같은 noncoding sequence는 protein coding sequence에 비해 서열 비교 분석을 이용한 분류학적인 정확성이 떨어지는 것으로 밝혀졌다(Macey *et al.* 2001). 우리는 이번 연구에서 분류에 보다 유용한 정보를 제공하는 것으로 알려진 protein-coding sequence인 미토콘드리아 ND1(NADH hydrogenase subunit I)과 연이어 위치한 tRNA coding sequence(tRNA Leu, Gln, Met) 1214bp를 비교 분석한 결과 국내에 서식하는 황소개구리 개체간의 유전자 변이가 극히 적은 것을 알 수 있었다. 이는 동종효소 단백질 전기영동에 의한 국내 서식 황소개구리의 종내 유사도 분석과도 비슷한 결과이다. 전기영동 분석에서 Nei distance는 0.008(양 등 2001)로 본 조사의 염기 서열 분석에 의한 Tamura-Nei distance 0.005(자료미제시)와 약간의 차이를

보였으나 이는 유전자 분석과 단백질 전기영동 분석 간의 실험 방법의 차이, 또는 조사 시기의 차이점이 반영된 것으로 볼 수 있으며, 실험 개체의 소규모에 의한 효과일 수도 있다. 그러나 이번 연구로 국내에 서식하는 황소개구리는 원산지 개체와 유전적 유사도가 높으며, 국내에 서식하는 개체 간에도 유전적 다양성은 극히 미비하다는 것을 알 수 있다. 북미지역에서는 수십 km의 지리적 거리마다 *R. catesbeiana*가 유전적 차이를 나타내는 서식지 개체군을 형성된다는 보고가 있다(Austin *et al.* 2004). 그러나 국내에 서식하는 황소개구리는 외국에서 인위적으로 도입된 소수의 개체가 국내 여러 지역의 자연 생태에 방사되었기 때문에 다양성이 적은 집단인 개체 사이에서 교배가 지속되어 새로운 유전적 차이를 나타내는 서식지 개체군을 형성하기 힘들 것으로 추정된다. 그러나 보다 정확한 결론을 도출하기 위해 서식 집단에 따라 더 많은 개체군의 분석과 현 조사에서 이용되었던 mtDNA와 더불어 nuclear DNA의 염기 서열 분석도 병행되어야 할 것이다. 이번 연구에서 확립된 유전자 서열은 향후 유전적 다양성이 외래 도입종의 개체군 동태에 미치는 영향을 분석하는 데 기초 자료로 제공될 수 있을 것이다.

적 요

1970년 대 식용을 위한 양식을 목적으로 일본에서 도입된 황소개구리는 1990년대 초반까지 국내 하천과 호소 생태계에 큰 피해를 주었으나 최근 급속히 그 개체수가 줄어든 것으로 추정된다. 이번 연구에서는 황소개구리의 개체군 동태에 미치는 유전적 요인을 조사하기 위하여 국내에 서식하는 황소개구리의 유전자 분석을 실시하였다. 황소개구리 출현이 많은 전라남도 5개 지역에서 지역별로 채집한 개체의 미토콘드리아 ND1/tRNA 유전자 1,215 bp의 염기 서열을 결정하고 이를 기존에 발표된 황소개구리의 염기서열과 비교, 분석한 결과 모든 개체의 1개 위치에서 염기 변화가 발견되었다. 또한 조사한 개체 일부에서 유전자 염기 서열의 6개 위치에서의 변이가 발견되었으나 이는 1,215bp에서 극히 일부분이 변화된 것으로 유전적 변이가 일어났다고 판단하기 어렵다. Kimura-2-parameter distance 분석에서 국내 서식 황소개구리는 98.7%~100%의 높은 유사도를 보여 종내 유전적 거리의 차이가 거의 없었으며 유전적으로 유사한 개체들이 cluster를 형성하는 Neighbor-Joining 분석 결과에서 원산지 황소개구리가 국내 서식 황소개구리의 일부와 함께 같은 cluster에 속하므로 원산지와 국내 서식 황소개구리는 유전적 차이가 적은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들로부터 국내에 서식하는 황소개구리는 종내 유전적 유사도가 매우 높으며 국내에 도입된 후 지역 특이적으로 유전적 분화가 거의 일어나지 않은 것을 알 수 있다.

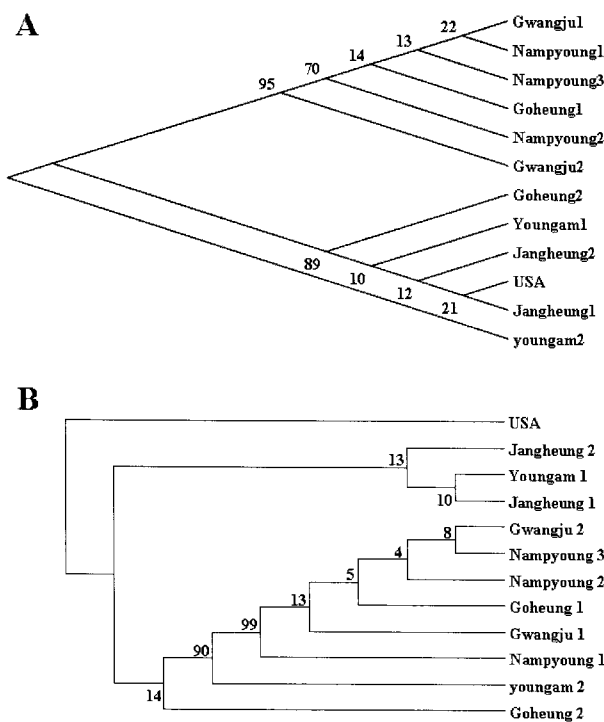


Fig. 3. Phylogenetic relationships among the *R. catesbeiana* based on Neighbor-Joining analysis (A), a maximum-parsimony tree (B). USA represents the sequence reported in GenBank.

감사의 글

이 연구는 2004년 환경부 자연보전국 자연생태과로부터 지

원받은 “황소개구리 감소요인에 대한 연구” 과제의 일부로 수행하였음.

### 인용문헌

- 강언중. 1992. 고창 인천강의 어류상과 황소개구리의 생태. 전북의 자연 연구 1: 23-32.
- 강언중, 윤창호. 1994. 도입종 황소개구리의 국내 정착과 분포. 한국 자연보존협회 연구보고서 13: 231-250.
- 고흥선, 천태영, 노용석. 1991. 이입된 황소개구리가 토산생태계에 끼친 영향에 관한 연구. Bulletin of the Natural Sciences(충북대학교) 5: 93-101.
- 김현규. 1971. 황소개구리의 생태. 한국생활과학연구원 논총 8: 67-92.
- 김현규. 1973. 황소개구리 양식에 관한 연구. 한국생활과학연구원 논총 10: 173-200.
- 김현규. 1975. 황소개구리의 종과 실내사육. 한국생활과학연구원 논총 15: 225-238.
- 김혜숙, 고선근. 1998. 도입종 황소개구리(*Rana catesbeiana*)의 분포, 식성과 생식세포 형성 주기에 관한 연구. 산림과학논문집 57: 165-177.
- 양서영, 김종범, 민미숙, 서재화, 강영진. 2001. 한국의 양서류. 아카데미서적. 서울. 97p.
- Austin, J.D., S.C. Loughheed and P.T. Boag. 2004. Controlling for the effects of history and nonequilibrium conditions in gene flow estimates in northern bullfrog (*Rana catesbeiana*) population. Genetics. 168: 1491-1506.
- Hillis, D.M., B.K. Mable and C. Moritz. 1996. Application of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. In D.M. Hillis, B.K. Mable, C. Moritz (eds.), Molecular Systematics. Sinauer. Sunderland. pp. 515-543.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform. 5: 150-163.
- Lee, J.E., D.E. Yang, Y.R. Kim, H. Lee, H.I. Lee, S.Y. Yang and H.Y. Lee. 1999. Genetic relationships of *Rana amurensis* based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. Korean J. Biol. Sci. 3: 303-309.
- Macey, J.R., J.L. Strasburg, J.A. Brisson, V.T. Vredenburg, M. Jennings and A. Larson. 2001. Molecular phylogenetics of western north american frogs of the *Rana boylei* species group. Mol. Phylogenet. Evol. 19: 131-143.
- Monsen, K.J. and M.S. Blouin. 2003. Genetic structure in a montane ranid frog: Restricted gene flow and nuclear-mitochondrial discordance. Mol. Ecol. 12: 3275-3286.
- Nagae, Y. 1988. The primary and secondary structures of the ribosomal RNAs of *Rana catesbeiana* mitochondrion. Nippon Ika daigaku Zasshi. 55: 417-430.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Bio. Evol. 4: 406-425.
- Shaw. 1802. Original description citations for the reptiles and amphibians of north America. Gen. Zool. 3: 106-107.
- Song, J.Y., B.S. Yoon, H.S. Oh and K.H. Chung. 2003. Genetic diversity of *Rana amurensis* (Amphibia:Ranidae) based on mitochondrial 16s rDNA sequences. Korean J. Environ. 21: 45-51.
- Song, J.Y., J.A. Shin, M.H. Chang, B.S. Yoon and K.H. Chung. 2004. Intra-, inter specific variation of Korean *Rana* (Amphibia: Ranidae) based on partial sequence of mitochondrial 16s rDNA. Korean J. Environ. Biol. 22: 66-74.
- Swoffors. D.L., G.J. Olsen., P.J. Waddell., and D.M. Hillis. 1996. Phylogenetic inferene. In D.M. Hillis, B.K. Mable, C. Moritz (eds.), Molecular Systematics. Sinauer. Sunderland. pp. 407-514.
- Yoneyama, Y. 1987. The nucleotide sequence of the heavy and light strand replication of the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome. Nippon Ika daigaku Zasshi. 429-440.

(2005년 6월 28일 접수; 2005년 11월 25일 채택)