

# 미토콘드리아 16S rDNA 부분 염기서열을 이용한 한국산 개구리 속 (Amphibia: Ranidae)의 종간, 종내 변이에 대한 연구

송재영 · 신정아 · 장민호 · 윤병수 · 정규희\*

경기대학교 생물학과

## Intra-, Inter-specific Variation of Korean *Rana* (Amphibia: Ranidae) Based on the Partial Sequence of Mitochondrial 16S rDNA

Jae-Young Song, Jung-A Shin, Min-Ho Chang, Byoung-Su Yoon and Kyu-Hoi Chung\*

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

**Abstract** - In order to clarify intra- and inter-specific variation of Korean *Rana* species, the partial DNA sequences of mitochondrial 16S rDNA gene were determined from 6 Korean and 1 Japanese *Rana* species. DNA sequences from Korean and Japanese species were comparison-analysed within, and also with the sequences from three species of Japanese brown frogs. DNA similarities were calculated as 91.3~97.3% among brown frog (*R. amurensis coreana*, *R. dybowskii* and *R. huanrenensis*), as 96.11~97.26% among pond frogs (*R. nigromaculata* and *R. plancyi chosonica*). Genetic distance of pond frog and wrinkle frog (*R. rugosa*) were near than that of pond frog and brown frog. Two clusters were formed brown frogs and the other group by neighbor-joining and maximum-likelihood analysis, also the populations of *R. nigromaculata* were well distinguished between Korean peninsula and Korean island. But result from maximum-likelihood analysis slightly differed from neighbor-joining to cluster of *R. rugosa*. Further analyses for their population will be necessary to study the phylogenetic status.

**Key words** : genetic distance, Maximum-likelihood, Neighbor-joining, *Rana*, similarity, mt 16S rDNA

### 서론

개구리과(Family Ranidae)는 약 3,600만년전인 신생대(Cenozoic Era) 점신세(Oligocene period)에 출현하였으며, 세계적으로 47속 667종으로 개구리목에서 가장 큰

분류군이고, 그 분포역은 시베리아 지역과 북아메리카 북부, 남아메리카 중남부, 사하라 사막, 오세아니아 대륙을 제외한 전 세계에 분포하고 있다(Duellman and Trueb 1986).

한국산 개구리 과(Family Ranidae)는 1속 6종이 분포하고 있으며, 이들은 산개구리류(아무르산개구리, *R. amurensis coreana*; 북방산개구리, *R. dybowskii*; 계곡산개구리, *R. huanrenensis*), 참개구리류(참개구리, *R. nigro-*

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

*maculata*; 금개구리, *R. plancyi chosonica*) 그리고 옴개구리류(옴개구리, *R. rugosa*) 등 크게 3가지 분류군으로 나뉘고 있다(Kang and Yoon 1975; Zhao and Adler 1993; Sengoku *et al.* 1996; Maeda and Matsui 1999; Yang *et al.* 2001).

한국산 개구리 속(Genus *Rana*)에 대한 mitochondrial (mt) DNA gene에 대한 연구는 mt DNA RFLP, mt cytochrome *b* gene, mt 12S rRNA 및 16S rRNA 유전자 분석 등 다양하게 이루어졌으나(Lee and Kim 1993; Lee *et al.* 1999; Suh 1999; Song *et al.* 2003), 지금까지의 연구에서 mt 16S rRNA 유전자 분석에 대한 연구는 빈약하며, mt 16S rRNA 유전자를 이용한 종간, 종내 유전적 변이에 대한 연구도 부족한 실정이다.

한편, mt DNA는 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 하는 안정적인 유전자로 알려져 있고, 종, 속, 과 수준의 분류체계에서 많이 사용되는 유전자이다. 하지만, mt DNA의 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 사용된다(Meyer and Wilson 1990). 또한, 미토콘드리아 16S rRNA는 속이나 과 수준에서 분류학적 연구에 많이 사용되었으며, 특히 이들의 부분 염기서열은 양서류의 속간, 또는 속내의 관계를 밝히는데 넓게 사용된다(Harris 2001).

따라서, 본 연구는 국내에 분포하고 있는 개구리 속 6종과 일본산 개구리 속 1종에 대한 mt 16S rDNA의 염기서열을 결정하고, 이미 발표된 국외집단의 mt 16S rDNA 염기서열과 상호 비교하여 한국산 개구리 속 6종 및 인근 지역에 분포하는 개구리 속의 종간, 종내 유전적

변이의 정도를 밝히고자 하였다.

### 재료 및 방법

본 연구에 사용된 한국산 및 일본산 개구리는 1속 7종 11개 집단(Table 1)으로, 채집한 후에 경기대학교 생물학과 생태학실험실(KUEL, Ecological Lab., Kyonggi University) 내에 있는 냉동고에서  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 이들 개체에서 간 및 다리근육 등의 조직을 적출한 후 DNA를 분리하기 위하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 1시간동안 냉동 처리한 후 E-*Tube*에 옮겼으며, 300  $\mu\text{l}$  extraction buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate]를 넣고 homogenizer를 이용하여 조직을 분쇄한 후, proteinase K와 phenol을 이용하여 DNA를 분리하였다(Sambrook and Russell 2001).

염기서열 분석을 위해서 PCR (polymerase chain reaction)법을 이용하였으며, 각각의 조성은 template DNA (10 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , dNTP (2.5 mM) 1  $\mu\text{l}$ , Taq polymerase (5 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.

Primer는 16S1F (5'-gaggtccagcctgccag-3')와 16S1R (5'-ccctgatccaacatcgag-3')을 이용하였으며 (Song *et al.* 2003), PCR 시행 후 1.5% agarose gel에 전기영동하여 증폭된 DNA를 확인하였으며, Bioneer AccuPrep™ Gel Purification kit를 이용하여 gel로부터 DNA를 추출한

**Table 1.** Sampling species, localities and populations detected this study

Species	Localities	Legends
<i>R. nigromaculata</i>	Mt. Seongju, Seongju-ri, Boryeong-shi, Chungcheongbuk-do Hamyang-ub, Hamyang-gun, Gyeongsangbuk-do Hwaam village, Sangdong-myeon, Namhae-gun, Gyeongsangnam-do Mt. Halla national park, Jeju-shi, Jeju-do	Boryeong Hamyang Namhae Jeju
<i>R. p. chosonica</i>	Jeongryang-Ji, Hapcheon-gun, Gyeongsannam-do	-
<i>R. a. coreana</i>	Mt. Kwanggyo, Paldal-gu, Suwon-shi, Gyeonggi-do Mokgye-ri, Jecheon-shi, Chungcheongbuk-do	Suwon Jecheon
<i>R. huanrenensis</i>	Mt. Sorak national park, Gangwon-do	-
<i>R. dybowskii</i>	Mt. Sorak national park, Gangwon-do	-
<i>R. rugosa</i>	Mt. Seongju, Seongju-ri, Boryeong-shi, Chungcheongbuk-do	-
<i>R. tsushimensis</i>	Mt. Tatera (Ayumodoshi natural park), Izuhara, Nagasaki, Japan	-

<i>X. laevis</i>	1	CGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACT
<i>R. amurensis</i>		
Suwon		.....C.....A.....AG.....
Jecheon		.....C.....A.....AG.....
<i>R. huanrenensis</i>		.....C.....A.....AC.....
<i>R. pirica</i>		.....C.....A.....
<i>R. onativentris</i>		.....C.....A.....
<i>R. dybowskii</i>		.....C.....A.....G.....
<i>R. tsushimensis</i>		.....C.....A.....G.....
<i>R. japonica</i>		.....C.....A.....
<i>R. nigromaculata</i>		
Boryeong		.....C.....A.....AG.....
Hamyang		.....C.....A.....AG.....
Namhae		.....ACC.T.....A.....AG.....
Jeju		.....C.....A.....AG.....
<i>R. p. chosenica</i>		.....C.....C.....A.....AG.....
<i>R. rugosa</i>		.....C.....A.....CC.....AG.....
<i>X. laevis</i>	61	AGTATGAATGGCACCACGAAGGTTACACTGTCTCCTTTTTCTAATCAGTGAACTAATCC
<i>R. amurensis</i>		
Suwon		T...C..C...T...G...T.....C...C.....G..CT
Jecheon		T...C..C...T...G...T.....C...C.....G..T
<i>R. huanrenensis</i>		C...C..C...T...G..C..T.....G...T
<i>R. pirica</i>		C...C..C...T...G..C..T.....G...T
<i>R. onativentris</i>		T...C..C...T...G..C..T.....G...T
<i>R. dybowskii</i>		C...C..C...T...G..C..T.....G...T
<i>R. tsushimensis</i>		C...C..C...T...G..C..T.....A...G...T
<i>R. japonica</i>		C...C..C...T...G..C..T.....G...T
<i>R. nigromaculata</i>		
Boryeong		C...C..C...T...G..C..T.....C..C...A...G...T
Hamyang		C...C..C...T...G..C..T.....C..C...A...G...T
Namhae		C...C..C...T...G..C..T.....C..C...A...G...T
Jeju		C...C..C...T...G..C..T.....C..C...A...G...T
<i>R. p. chosenica</i>		C...C..C...T...G..C..T.....C..C...A...G...T
<i>R. rugosa</i>		.....C..C...T...G..C..A.....C..C.....G...T
<i>X. laevis</i>	121	CCCCGTGAAGAAGCGGGATAGACCTATAAGACGAGAAGACCTATGGAGCTTTAAACTA
<i>R. amurensis</i>		
Suwon		.....TAT.A.....C.....-
Jecheon		.....TAT.A.....C.....-
<i>R. huanrenensis</i>		.....T.TAA.....C.....-
<i>R. pirica</i>		.....TA.AA.....C.....-
<i>R. onativentris</i>		.....TA.GA.....C.....-
<i>R. dybowskii</i>		.....TA.AA.....C.....-
<i>R. tsushimensis</i>		.....C..CA.AA.....C.....-
<i>R. japonica</i>		.....CA.AAC.....C.....C.....-
<i>R. nigromaculata</i>		
Boryeong		.....TA.....C.....C.....-
Hamyang		.....TA.....C.....C.....-
Namhae		.....TA.....C.....C.....-
Jeju		.....TA.....C..A...C.....-
<i>R. p. chosenica</i>		.....TA.....C.....C.....-
<i>R. rugosa</i>		.....TA.GA.....C.....-
<i>X. laevis</i>	181	AATAACATTGCGTCTCTATTTAACTCACTTCAGAGTAATTAACATTTATTTAGCCCCCT
<i>R. amurensis</i>		
Suwon		--C..C...A.A.C...G.T..CAT.TC-----CCAT,----GCACA..AGA...
Jecheon		--C..C...A.A.C...G.T..CAT.TC-----CCAT,----GCACA..AGA...
<i>R. huanrenensis</i>		--C..C...G.A.C...G.GCTC..AT..C-----C...----CACACCAGA...
<i>R. pirica</i>		--C..C...G.A.C...G.GCTCT.AT..C-----C...G-----CACACCAGA...
<i>R. onativentris</i>		--C..C...G.A.C...G.GCTC.CAT..C-----CC..G-----CACACCAGA...
<i>R. dybowskii</i>		--C..C...G.A.C...G.GCCC.CAT.TC-----C...----CACACCAGA...

Fig. 1. Continued.

*R. tsushimensis* --C. CT. . G. A. C. . . G. GCCC. --T. . C----- . CAT. ----- . CACA. TAGT. . .  
*R. japonica* --CTCT. . G. A. . . . . . GCCC. --AC. C----- . C. . ----- . CA. A. . AAAT. . .  
*R. nigromaculata*  
 Boryeong --C. . T. . A. A. C. . . . CGC. C. CAA. TCA-----C. . T. ----GCCCCA. . AGAT. . .  
 Hamyang --C. . T. . A. A. C. . . . CGC. C. CAA. TCA-----C. . T. ----GCCCCA. . AGAT. . .  
 Namhae --C. . T. . A. A. C. . . . CGC. C. CAA. TCA-----C. . . ----GCCCCA. . AGAT. . .  
 Jeju --C. . T. . A. A. . . . . CGC. C. CAA. TCA-----C. . . ----GCCCCA. AAGAT. . .  
*R. p. chosonica* --C. . . . . ATA. C. . . . CGC. CT. AA. . CA-----C. . T. ----GCCCCA. . AGA. . .  
*R. rugosa* --C. GT. . A. A. C. . . . C. A. C. CA. . . CA----- . C. . . ----CCC. A. AAG- . . .

*X. laevis* 241. GATTATTAGTTTTAGGTTGGGGTGACCGGGAGTAAAAAATAACCTCCACATTGAATGGG  
*R. amurensis*  
 Suwon . TA. G. . . . . . . . . . . G. . . . . A. . . . . C. C. . CT. . . . . T. ACA. . . . .  
 Jecheon . TA. G. . . . . . . . . . . G. . . . . A. . . . . C. C. . CT. . . . . T. ACA. . . . .  
*R. huanrenensis* . CA. G. . . . . . . . . . . A. . . . . T. . CT. . . . . GCA. . . . .  
*R. pirica* . CA. GC. . . . . . . . . . . A. . . . . T. . CT. . . . . T. GCA. . . . .  
*R. onativentris* . CA. G. . . . . . . . . . . A. . . . . T. . FTC. . . . . T. GCA. . . . .  
*R. dybowskii* . CA. GC. . . . . . . . . . . A. . . . . C. . CT. . . . . GCA. . . . .  
*R. tsushimensis* . CA. . . . . . . . . . . G. . . . . A. . . . . C. . T. . . . . ACA. . C. . . . .  
*R. japonica* . CA. . C. . . . . . . . . . . G. . . . . A. . . . . C. . TT. . . . . T. ACA. . . . .  
*R. nigromaculata*  
 Boryeong . TA. . . . G. . . . . G. . . . . . . . . . . T. . . . . GACA. . C. . . . .  
 Hamyang ATA. . . . G. . . . . G. . . . . . . . . . . T. . . . . GACA. . C. . . . .  
 Namhae . TA. . . . G. . . . . G. . . . . . . . . . . T. . . . . GACA. . C. . . . .  
 Jeju . TA. . . . G. . . . . G. . . . . . . . . . . T. . C. . . . . GACA. . C. . . . .  
*R. p. chosonica* CTA. G. . . . . G. . . . . . . . . . . T. . . . . GACA. . C. . . . .  
*R. rugosa* . TA. . C. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . C. . T. . . . . GACA. . C. . . . .

*X. laevis* 301 GAAGTACCCCTGAACCTATGAGCTACAACCTAAGCACCAATAAATTGACATTAATTGACC  
*R. amurensis*  
 Suwon CT. -ACA. . . . T. T. C. C. . . AC. . . . . . . . . . . A. TT. C. . . . C. A. TGC. T-A. . . . .  
 Jecheon CT. -ACA. . . . T. T. C. C. . . AC. . . . . . . . . . . A. TT. C. . . . C. A. TGC. T-A. . . . .  
*R. huanrenensis* CT. -ATA. . . . T. T. C. C. . . AC. . . . . . . . . . . A. TT. C. . . . C. A. TGC. T-AC. . . . .  
*R. pirica* CT. -ATA. . . . T. T. C. C. . . AC. . . . . . . . . . . A. TT. T. . . . C. A. TGC. T-AC. . . . .  
*R. onativentris* CT. -AAA. . . . T. T. C. C. . . AC. . . . . C. . . . . A. TT. T. . . . C. A. TGC. T-AC. . . . .  
*R. dybowskii* CT. -ATA. . . . T. T. C. C. . . AC. . . . . . . . . . . A. TT. T. . . . T. C. A. TGC. T-A. . . . .  
*R. tsushimensis* CT. -ACA. . . . T. C. C. C. . . AC. . . . . . . . . . . A. TT. C. . . . C. A. TGC. T-AC. . . . .  
*R. japonica* CT. -ACA. . . . T. T. C. C. . . AC. . . . . . . . . . . A. TT. TC. . . . C. A. TG. . T-A. . . . .  
*R. nigromaculata*  
 Boryeong CTTTACG. . . . T. T. C. C. . . A. . . . . G. . . . . . . . . . . A. T. . . . . C. . . . . TG. . T-A. . . . .  
 Hamyang CTTTACG. . . . T. T. C. C. . . A. . . . . G. . . . . . . . . . . A. T. . . . . C. . . . . TG. . T-A. . . . .  
 Namhae CTTTACG. . . . T. T. C. C. . . A. . . . . G. . . . . . . . . . . A. T. . . . . C. . . . . TG. . T-A. . . . .  
 Jeju CTTTACG. . . . T. T. C. C. . . A. . . . . G. . . . . . . . . . . A. T. . . . . C. . . . . TG. . T-A. . . . .  
*R. p. chosonica* CTTTATG. . . . T. T. C. C. . . A. C. . . . G. . . . . . . . . . . A. T. . . . . C. . . . . TG. . T-A. . . . .  
*R. rugosa* CT. -ACG. . . . T. T. C. . . . . AC. . . . . G. . . . . . . . . . . A. T. . . . . C. . . . . TC. . . . . TG. . TTA. . . . .

*X. laevis* 361 CAATAAATTGATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCGCTTTAAGAG  
*R. amurensis*  
 Suwon . G. . . . T. C. . . . . TG. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
 Jecheon . G. . . . T. C. . . . . TG. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CT. . . . .  
*R. huanrenensis* . G. . . . T. C. . . . . C. TG. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
*R. pirica* . G. . . . T. C. . . . . TG. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
*R. onativentris* . G. . . . T. C. . . . . TG. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
*R. dybowskii* . G. . . . T. C. . . . . TG. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
*R. tsushimensis* . G. . . . T. C. . . . . TG. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
*R. japonica* . G. . . . T. C. . . . . TG. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
*R. nigromaculata*  
 Boryeong . G. . . T. T. C. . . . . . G. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
 Hamyang . G. . . T. T. C. . . . . . G. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
 Namhae . G. . . T. T. C. . . . . . G. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
 Jeju . G. . . T. T. C. . . . . . G. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .  
*R. p. chosonica* . G. . . T. T. C. . . . . . G. . . . . . . . . . . G. . . . . . . . . . . TA. . . . . CA. . . . .

Fig. 1. Continued.

<i>R. rugosa</i>	.G....G.C.....G.....G.....TA...TA....
<i>X. laevis</i>	421 CTCCTATCGACAAGCGG
<i>R. amurensis</i>	
Suwon	...A.....TA.
Jecheon	...A.....TA.
<i>R. huanrenensis</i>	.C.A.....TA.
<i>R. pirica</i>	.C.A.....TA.
<i>R. onativentris</i>	.C.A.....TA.
<i>R. dybowskii</i>	.C.A.....TA.
<i>R. tsushimensis</i>	.C.A.....TA.
<i>R. japonica</i>	.C.A.....TA.
<i>R. nigromaculata</i>	
Boryeong	.C.....TA.
Hamyang	.C.....TA.
Namhae	.C.....TA.
Jeju	.C.....TA.
<i>R. p. chosonica</i>	.C.....TA.
<i>R. rugosa</i>	.C.....TA.

**Fig. 1.** Nucleotide sequence alignment (437 bp) of the mitochondrial 16S rDNA genes in Genus *Rana*. Hyphens designate the gap and dots is the same nucleotide, as a *Xenopus laevis*.

후 direct sequencing method에 의하여 염기서열을 결정하였으며, sequencing error율을 낮추기 위하여 양방향 염기서열을 결정하여 분석하였다.

한국산 개구리 속과 인근지역의 개구리 속에 대한 mt 16S rDNA를 비교분석하기 위하여 본 연구에서 채집된 한국산 및 일본산 개구리 속의 7종 11집단 (*R. nigromaculata* KUEL90~93, KUEL129~130, KUEL184~187; *R. planeyi chosonica* KUEL136~138; *R. amurensis coreana* KUEL26~28; *R. huanrenensis* KUEL77~78; *R. dybowskii* KUEL297~298; *R. rugosa* KUEL269~271; *R. tsushimensis* KUEL 394~396)과 GenBank에 등록된 개구리 속 3종 (Accession number *R. pirica*, AB\_058872; *R. ornativentris*, AB\_058874; *R. japonica*, AB\_058876)도 함께 비교하였으며, 이들 중 공통염기서열인 437 bp의 유전자를 CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994)를 이용하여 비교 분석하였다.

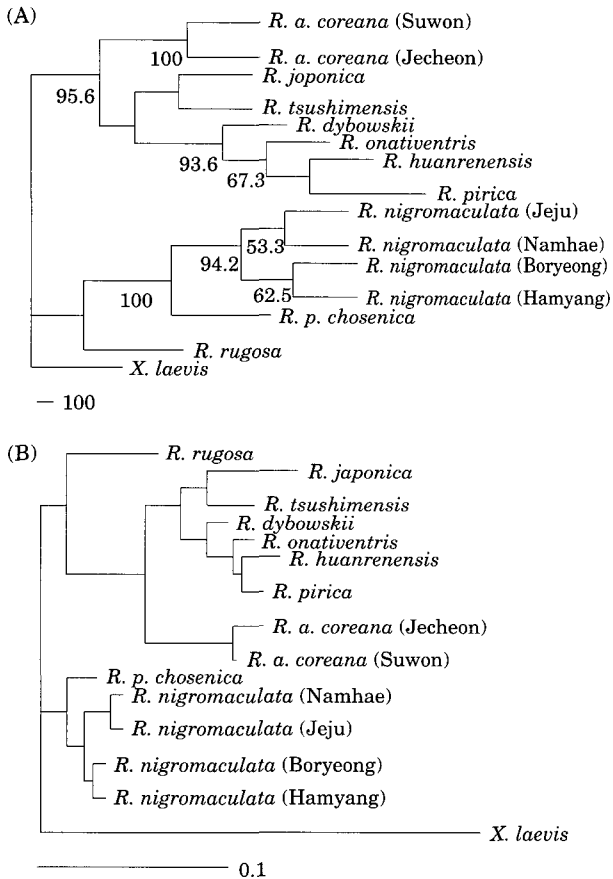
또한, PHYLIP package를 이용한 분석을 실시하였으며, PHYLIP package의 DNADIST에서 Kimura's two parameter method에 의하여 지역 집단 사이의 genetic distance를 분석하였으며, NEIGHBOR program의 neighbor-joining (NJ) 분석을 하였고, DNAML algorithm (Felsenstein 1993)을 이용하여 maximum likelihood (ML) 분석을 실시하였으며, transition-transversion ratio는 2.0으로 하였다. 또한, 각각의 계통수의 신뢰성을 높이기 위하여 1,000번의 bootstrap replication (Felsenstein 1985)을 실시하였으며 outgroup으로 발톱개구리 (*Xenopus laevis*, NC\_001573)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

총 437 bp의 mt 16S rDNA 염기서열들의 분석에서, 한국 및 일본산 산개구리류에 대한 DNA similarity는 91.3~97.3%이며, 산개구리류와 참개구리류는 86.3~89.5%로 나타났다. 산개구리류와 옴개구리류의 similarity는 85.6~88.8%로 나타났으며, 참개구리류인 참개구리와 금개구리는 96.1~97.3%로, 참개구리와 옴개구리는 90.4~90.7%, 그리고 금개구리와 옴개구리는 89.7%로 나타났다. 또한, 종내 similarity는 아무르산개구리의 Suwon과 Jecheon 집단이 99.8%로 나타났으며, 참개구리 4개 집단 사이의 similarity는 98.4~99.8%로 나타났다. 참개구리 및 아무르산개구리의 종내 similarity는 98% 이상으로 높게 나타났다 (Table 2).

종간 genetic distance에서 참개구리와 금개구리는 0.029~0.040로 나타났으며, 산개구리류는 0.029~0.094로 나타났고, 산개구리류와 참개구리류는 0.105~0.136로 나타났다. 참개구리류와 옴개구리는 0.088~0.098로 나타났으며, 산개구리류와 옴개구리는 0.113~0.139로 나타났다. 따라서, 참개구리류, 산개구리류 및 옴개구리류에서, 참개구리류와 옴개구리류 사이의 distance가 참개구리류와 산개구리류의 distance보다 가깝게 나타났다. 종내 distance에서, 참개구리 4개 집단은 0.002~0.017으로 매우 가깝게 나타났으며, 아무르산개구리 2개 집단은 0.003로 나타났다 (Table 2).

NJ분석에서 총 2개의 cluster를 형성하였는데, 첫 번째



**Fig. 2.** A phylogenetic relationships among the Genus *Rana* based on Neighbor-joining analysis (A), a maximum-likelihood tree (B). Nodal values in (A) indicated percent support for branches in 1,000 bootstrap replicates.

는 참개구리류와 움개구리류가 하나의 cluster를 형성하였으며, 산개구리류가 다른 하나의 cluster를 형성하였다. 또한, 산개구리류에서 계곡산개구리, 북방산개구리, *R. pirica* 및 *R. onativentris* 등 4종이 하나의 subcluster를 형성하면서 93.6%의 bootstrap 결과를 보였으며, 이들과 *R. tsushimensis*, *R. japonica* 및 아무르산개구리는 95.6%의 높은 bootstrap 결과를 나타냈다.

ML분석에서 개구리 속은 크게 2개로 cluster되었는데, 첫 번째는 참개구리 4개 집단, 즉 Boryeong, Hamyang, Jeju 및 Namhae 집단이 하나로 묶인 후, 금개구리가 참개구리와 함께 묶인 것이며, 두 번째는 산개구리류 7종과 움개구리가 cluster를 형성한 것이다. 산개구리류는 각각의 subcluster를 형성하였는데, 계곡산개구리, 북방산개구리, *R. pirica* 및 *R. onativentris* 등 4종이 하나의 subcluster를 형성하였고, 이들과 *R. tsushimensis*와 *R. japonica*가 함께 묶였으며, 마지막으로 아무르산개구리의 Suwon

과 Jecheon 집단의 subcluster와 함께 묶이는 것을 볼 수 있었다.

NJ, ML분석에서 산개구리류가 모두 하나의 cluster를 나타냈으며, 그들은 3가지의 subcluster를 형성하는 것을 볼 수 있었다. 산개구리류에서 첫 번째 subcluster에 포함된 계곡산개구리, 북방산개구리, *R. pirica* 및 *R. onativentris*는 염색체가  $2n = 24$ 이며, 두 번째 subcluster에 포함된 *R. tsushimensis*, *R. japonica*는 염색체가  $2n = 26$ 에 해당한다. 또한, 이들과 세 번째 subcluster인 아무르산개구리 (*R. amurensis coreana*)가 연결되는데, 아무르산개구리도 두 번째 subcluster와 마찬가지로  $2n = 26$ 의 염색체를 가지고 있는 종이다 (Maeda and Matsui 1999). 또한, 우리의 NJ, ML분석에서 첫 번째 및 두 번째 subcluster가 먼저 묶이고 이후에 세 번째 subcluster인 아무르산개구리가 묶이는 것은 Tanaka-Ueno *et al.* (1998)의 결과와 유사한 것을 알 수 있다.

한국산 산개구리류의 NJ와 ML분석에서 북방산개구리와 계곡산개구리가 먼저 묶이고 이들과 아무르산개구리가 묶이는 경향이 나타났는데, 일반적으로 종의 염색체 수가 많은 쪽에서 적은 쪽으로 진화하는 경향 (Duellman and Trueb 1986; Nishioka *et al.* 1992)과 일치한다. 그러나 Yang *et al.* (2001)에서는 염색체 수가 서로 다른 아무르산개구리 ( $2n = 26$ )와 북방산개구리 ( $2n = 24$ )가 먼저 묶인 후 이들과 계곡산개구리 ( $2n = 24$ )가 묶이는 것으로 나타났다. 그 이유로 염색체의 감수현상이 단 한번에 걸쳐 일어나지 않고 최소 2회 이상 독립적으로 발생한다고 하였으며, 이러한 결과는 Green and Borkin (1993)의 결과와 유사하다. 따라서, 이러한 상반된 견해에 대해 염색체의 진화적 측면에 대하여 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

참개구리류인 한국산 금개구리 (*R. plancyi chosonica*)는 분류초기에 참개구리의 아종 (*R. nigromaculata chosonica*)으로 명명되었을 정도로 참개구리와 형태나 서식환경이 매우 유사하며 (Yang *et al.* 2001), 이러한 결과는 NJ 및 ML분석에서 참개구리류(참개구리와 금개구리)가 하나의 cluster를 형성하는 것과 일치한다고 할 수 있다. 그리고 참개구리의 Boryeong, Hamyang, Namhae 및 Jeju 집단의 분석 결과에서 Boryeong과 Hamyang 집단이 함께 묶이고, Namhae와 Jeju 집단이 함께 묶이는 것은 지리적 격리와 매우 밀접하다고 볼 수 있다. 이러한 결과는 참개구리 집단간 RAPD-PCR 분석 (Song and Chung 2003)에서 내륙지역과 도서지역에 분포하는 집단 사이에 유전적 차이가 나타나는 것과 유사하다.

특히, 참개구리류의 공통조상은 초기에 한반도를 중심으로 중국 동부에 분포하였으며, 간빙기 동안에 해수면

**Table 2.** Similarity (Above diagonal %) and Genetic distance (Below diagonal) among Genus *Rana* and reference species based on sequence of mt 16S rDNA. ((*R. a. coreana* 1. Suwon; 2. Jecheon); 3. *R. huanrenensis*; 4. *R. pirica*; 5. *R. ornativentris*; 6. *R. dybowskii*; 7. *R. tsushimanensis*; 8. *R. japonica*; (*R. nigromaculata* 9. Boryeong; 10. Hamyang; 11. Namhae; 12. Jeju); 13. *R. p. chosenica*; 14. *R. rugosa*; 15. *X. xenopus*)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-	99.8	92.9	92.5	93.1	93.6	92.9	91.5	89.5	89.3	88.3	88.1	89.0	87.4	76.2
2	0.003	-	92.5	92.7	92.9	93.6	92.7	91.3	89.0	88.8	88.3	87.9	88.6	87.4	75.8
3	0.074	0.077	-	97.3	96.1	96.6	94.1	92.0	87.0	86.7	86.5	86.5	87.9	85.6	76.7
4	0.079	0.081	0.029	-	97.0	97.0	93.4	92.9	86.7	86.5	86.3	86.3	88.1	88.8	76.4
5	0.072	0.074	0.041	0.031	-	95.9	93.4	92.7	87.7	87.2	87.0	87.2	87.7	87.0	76.4
6	0.067	0.069	0.036	0.031	0.043	-	94.3	93.4	88.3	88.1	87.9	87.9	88.3	87.0	76.9
7	0.072	0.074	0.060	0.065	0.065	0.055	-	93.8	88.8	88.6	87.9	87.9	87.9	87.7	76.4
8	0.091	0.094	0.079	0.070	0.077	0.065	0.065	-	88.1	87.7	87.4	87.7	86.7	87.8	76.2
9	0.105	0.108	0.129	0.131	0.122	0.115	0.108	0.115	-	99.8	99.1	98.9	97.3	90.6	77.1
10	0.107	0.110	0.132	0.134	0.125	0.117	0.111	0.118	0.002	-	98.9	98.6	97.3	90.4	77.1
11	0.115	0.117	0.134	0.136	0.127	0.120	0.118	0.120	0.010	0.012	-	98.4	96.7	90.4	76.7
12	0.117	0.120	0.134	0.136	0.127	0.120	0.118	0.118	0.012	0.014	0.017	-	96.1	90.6	76.9
13	0.110	0.112	0.120	0.117	0.120	0.115	0.115	0.127	0.029	0.029	0.038	0.040	-	89.7	77.1
14	0.120	0.122	0.139	0.134	0.125	0.122	0.113	0.118	0.088	0.091	0.093	0.091	0.098	-	77.6
15	0.213	0.215	0.206	0.210	0.209	0.208	0.212	0.204	0.209	0.212	0.214	0.212	0.212	0.200	-

상승으로 인하여 한반도에 분포하는 참개구리류의 공통 조상은 참개구리로 분화되었으며, 일본에서는 *R. porosa porosa*로 종분화 되었다. 또한, 일본의 종은 화산대의 형성에 의하여 *R. p. porosa*의 일부가 *R. p. brevipoda*로 분화되었다. 이후 두 번째 빙하기에 한반도와 일본열도가 연결되면서 한반도에 분포하고 있던 참개구리가 일본열도로 분산된 것으로 추정된다(Matsui 1996).

옴개구리(*R. rugosa*)는 NJ 분석에서 참개구리류와 함께 cluster되었으나 ML 분석에서는 산개구리류와 함께 묶임에 따라, 서로 상반된 결과를 나타냈다. 옴개구리(*R. rugosa*)는 러시아, 한국 및 일본에 분포하고 있으며, 특히 한국에 분포하고 있는 옴개구리는 영덕, 포항, 경주 등 남부지역과 기타 지역의 유전적 차이가 큰 것으로 나타나며(Suh 1999), 일본 집단과 외부 특징에서 차이를 보이는 등 추가적인 연구가 필요한 실정이다.

개구리 속의 mt 16S rDNA 분석에서 종간 및 종내 집단간 similarity에서 참개구리류와 산개구리류의 종간 범위는 90% 미만으로 나타났으며, 아무르산개구리 및 참개구리의 종내 범위는 98% 이상 높게 나타났다. NJ분석에서 참개구리류와 옴개구리류가 cluster를 형성하였고, 산개구리류가 다른 하나의 cluster를 형성하였으며, 산개구리류가 포함된 cluster는 크게 3가지의 subcluster를 형성하는 것을 볼 수 있었다. 또한, 이들은 95.6%의 높은 bootstrap 결과를 나타냈으며, 참개구리류도 100%의 높은 결과를 나타냈다. ML 분석에서도 NJ 결과와 마찬가지로, 개구리 속이 크게 2가지로 cluster를 형성하였으며, 산개구리류도 염색체 수에 따라 각각의 subcluster를 형

성하였다. 하지만 NJ와 ML분석에서 옴개구리의 위치가 서로 다르게 cluster된 것에 대해서는 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## 적 요

한국에 분포하고 있는 개구리 속에 대한 염기서열을 결정하고 상호 비교하여 종간 유전적 변이 정도를 밝히기 위하여 한국산 개구리 속 6종과 일본산 개구리 속 1종에 대한 미토콘드리아 16S rDNA를 분석하였으며, Genbank에 수록된 일본산 산개구리류 3종도 함께 비교 분석하여 총 437 bp의 염기서열을 결정하였다. 산개구리류 7종에 대한 similarity는 91.3~97.3%이며, 참개구리류는 96.1~97.3%로 나타났다. 또한, 참개구리류와 옴개구리류의 genetic distance가 참개구리류와 산개구리류보다 더 가깝게 나타났다. Neighbor-joining 분석에서 참개구리류와 산개구리류로 2개의 cluster를 형성하였는데, 이 중 산개구리류는 총 3개의 subcluster를 형성하였다. 또한, 참개구리는 내륙지방과 도서지방에 분포하는 집단이 각각 나뉘는 것은 지리적 격리에 의한 결과라고 사료된다. Maximum-likelihood 분석도 NJ 분석 결과와 매우 유사하게 나타났으나 옴개구리(*R. rugosa*)는 NJ와 ML 분석에서 서로 상반된 결과를 나타냈다. 이는 한국산 옴개구리가 남부지역과 기타 지역에서 유전적 차이가 크게 나타나며, 일본 집단과 외부 특징에서 차이를 보이는 등 문제점을 가지고 있기 때문에 보다 다양한 연구가 이루어

어저야 올바른 해석이 가능하리라 판단된다.

### 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.
- Duellman and Trueb. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York. 670pp.
- 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.
- Green M and L Borkin. 1993. Evolutionary relationships of Eastern Palearctic Brown Frogs, genus *Rana*: parphyly of the 24-chromosome species group and the significance of chromosome number change. *Zool. J. Linn Soc.* 109:1-25.
- Harris DJ. 2001. Reevaluation of 16S ribosomal RNA variation in *Bufo* (Anura: Amphibia). *Mol. Phylogenet. Evol.* 19:326-329.
- Kang YS and IB Yoon. 1975. *Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea Vol 17 Amphibia · Reptila*. The Korean ministry of education. Seoul.
- Lee HJ, SJ Oh, DE Yang, YL Kim and SY Yang. 1997. Genetic differentiation between 2 species of the genus *Rana* in Korea. *Kor. J. Genet.* 19:317-324.
- Lee HY and IS Kim, 1993. Analysis of mitochondrial DNA size difference in Korean frog, *Rana amurensis*. *Kor. J. Genet.* 15:17-22.
- 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. *Kor. J. Biol. Sci.* 3:303-309.
- Matsui M. 1996. *Natural History of the Amphibia*. pp.250-257. University of Tokyo Press.
- 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. Biol.* 41:273-291.
- Nishioka M, S Sumida, LJ Borkin and ZA Wu. 1992. Genetic differentiation of 30 populations of 12 brown frog species distributed in Palearctic region elucidated by the electrophoretic method. *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ.* 11:109-160.
- Sambrook J and DW Rusell. 2001. *Molecular cloning*. third edition. Cold spring harbor laboratory press. New York.
- Sengoku S, T Hikida, M Matsui and K Nakaya. 1996. *The encyclopaedia of animals in Japan*. Heibonsha press, Tokyo.
- 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.
- Song JY and KH Chung. 2003. Genetic variation of Korean *Rana nigromaculata* (Amphibia: Ranidae) based on Random Amplified Polymorphic DNA marker. *Korean J. Nat. Con.* 1(4):75-83.
- Song JY, BS Yoon, HS Oh and KH Chung. 2003. Genetic Diversity of *Rana amurensis* (Amphibia: Ranidae), Based on Mitochondrial 16S rDNA Gene sequences. *Kor. J. Environ. Biol.* 21:45-51.
- Suh JH. 1999. *Molecular systematics of Korean amphibia*, Ph D. Program in Biology, Graduate School of Inha University.
- Tan AM and DB Wake. 1995. MtDNA phylogeography of the California Newt, *Taricha torosa* (Caudata: Salamandridae). *Mol. Phyl. Evol.* 4:383-394.
- 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.
- 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, JB Kim, MS Min, JH Suh and YJ Kang. 2001. *Monograph of Korean Amphibia*. Academic press. Seoul.
- Yang SY, JB Kim, MS Min, JH Suh, YJ Kang, M Matsui and L Fei. 2000. First Record of a Brown Frog *Rana huanrenensis* (Family Ranidae) from Korea. *Kor. J.*



Biol. Sci. 4:45-50.

Zhao EM and K Adler. 1993. Herpetology of China. Society  
for the study of amphibians and reptiles, Ohio.

Manuscript Received: August 30, 2003

Revision Accepted: November 14, 2003

Responsible Editorial Member: Myung Chan Gye  
(Hanyang Univ.)