

RAPD를 이용한 한국산 참개구리(양서 강; 개구리 과)의 유전적 변이에 대한 연구

송재영 · 정규희*

경기대학교 생물학과

Genetic variation of Korean *Rana nigromaculata* (Amphibia; Ranidae) based on Random Amplified Polymorphic DNA marker

Song, Jae-Young · Kyu-Hoi Chung

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

ABSTRACT

The population of Jeju 1, *Rana nigromaculata* have not a mid-dorsal line comparing with the other group. Local population of Jeju 1 was investigated to clarify genetic variation with the other populations. Their populations were analyzed by the RAPD technique with 18 random decamer primers, and a phenogram was constructed based on RAPD using the UPGMA method.

In this result, among 121 different bands detected, 34 (28.1%) showed polymorphisms, a phenogram constructed to two branches between continental and island population by UPGMA method. Gene flow of *R. nigromaculata* between two areas would have been interrupted by high sea level after middle pleistocene Ice Ages, geographical isolation arose from isolation of populations.

Despite same habitat in Jeju island, Jeju 1 was distinguished from Jeju 2 population on the basis of morphological character. Further analyses for additional populations belonging to *R. nigromaculata* will be necessary to clarify the taxonomic status.

Key words : Ice Age, polymorphism, population, *Rana nigromaculata*, RAPD, UPGMA

서 론

개구리과(Family Ranidae)는 약 3,600만년전인 신생대(Cenozoic Era) 점신세(Oligocene period)에 출현하였으며, 세계적으로 47속 667종으로 개구리목에서 가장 큰 분류군이다. 이 분류군은 시베리아 지역과 북아메리카 북부, 남아메리카 중남부, 사하라 사막, 오세아니아 대륙을 제외한 전 세계에 분포하고 있다

(Duellman and Trueb, 1986; Suh, 1999).

한국산 개구리과는 도입종인 황소개구리(*Rana catesbeiana*)를 제외하면 1속 6종으로 참개구리(*Rana nigromaculata*), 금개구리(*Rana plancyi chosonica*), 옴개구리(*Rana rugosa*), 아무르산개구리(*Rana amurensis coreana*), 북방산개구리(*Rana dybowskii*) 및 계곡산개구리(*Rana huanrenensis*)가 서식하고 있다(Kang and Yoon, 1975; Zhao and Adler, 1993; Sengoku et al, 1996; Maeda and Matsui, 1999).

본 연구 대상인 참개구리는 한국 전역과 국외에는 중국, 일본 및 러시아 등에도 분포하고 있다. 이를 대상으로 양서류의 형태, 유전 연구에 보편적으로 많이 이용되고 있다. 국내에서는 분포(Yang and Yu, 1978), 유전적 변이(Yang, 1983), 종간의 유전적 다양성(Yang et al., 1997)에 관한 연구가 이루어 졌다. 또한 Lee et al. (1999)은 mitochondrial cytochrome b gene (=mt cyt b)을 이용하여 지역적 차이를 비교 분석하였다.

참개구리의 형태학적인 분류시에 이용되는 분류학적 형질은 정중선의 유무, 측선의 유무, 등 및 다리 부분의 점, 뒷다리의 길이 등으로 동정하는데(Stejneger, 1907; Kang and Yoon, 1975; Nakamura and Ueno, 1976; Yang et al., 2001), 제주도에 서식하고 있는 개체군의 정중선은 없었다. 이러한 예로는 백령도에서 채집 보고된 1개체가 유일한 정도로(Shim, 2001) 매우 희박한 경우이다.

따라서 본 연구는 종 및 개체군 사이의 유전적 차이 연구시 이용되는 RAPD 방법을 이용하여 한국산 참개구리의 지역 집단간 변이 및 유연관계를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

이번 연구에 사용된 참개구리는 6개 집단에서 각 1개체씩, 청개구리(*Hyla japonica*)와 두꺼비(*Bufo gargarizans*)도 각 1개씩 이용하였다. 모든 재료는 경기대학교 생물학과 내에 있는 냉동고에 -70℃로 보관하였다(Table 1).

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

Species (Populations)	Locality	Remark
<i>R. nigromaculata</i>		
Jeju-do	Gumoonorum, Manwon-ub, Jeju, Jeju-do	Jeju 1
Jeju-do	Mt. Suryeong, Manwon-ub, Jeju, Jeju-do	Jeju 2
Chungcheongbuk-do	Dumoso, Mokgye-ri, Jecheon, Chungcheongbuk-do	Jecheon
Chungcheongnam-do	Anmyeondo, Taean-ub, Taean-gun, Chungcheongnam-do	Taean
Gyeonggi-do	Hwaseong-ub, Hwaseong-gun, Gyeonggi-do	Hwaseong
Gyeongsangbuk-do	Chuseong-ri, Macheon, Hamyang, Gyeongsangbuk-do	Hamyang
<i>H. japonica</i>		
	Dumoso, Mokgye-ri, Jecheon, Chungcheongbuk-do	
<i>B. gargarizans</i>		
	Yiui-dong, Paldal-Gu, Suwon, Gyeonggi-do	

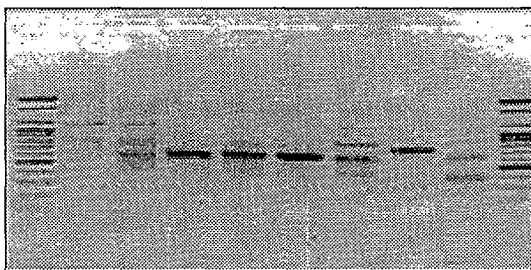
채집한 개체에서 DNA를 얻기 위하여 간 및 다리근육 등의 조직을 적출 한 후, -70℃로 1시간동안 냉동 처리한 후 E-Tube에 옮겼으며, 300ul extraction buffer [150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM

EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate를 넣고 homogenizer를 이용하여 조직을 분쇄하였으며, proteinase K와 phenol을 이용하여 DNA를 분리하였다(Sambrood and Rusell, 2001). 참개구리의 RAPD분석을 위하여 PCR (polymerase chain reaction)법을 이용하였으며, 각각의 조성은 template DNA ($10\text{ng}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$, dNTP (2.5mM) $1\mu\text{l}$, Taq polymerase ($5\text{Unit}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$, PCR buffer (GeneClone Co, Korea) $2.5\mu\text{l}$, primer (100pmole) $1\mu\text{l}$ 로 하였으며, 증류수를 $17.5\mu\text{l}$ 첨가하여 총 volume을 $25\mu\text{l}$ 로 하였다. PCR은 총 45cycle을 시행하였으며, 각 cycle은 denaturation 94°C , 1분; annealing 38°C , 2분; polymerization; 72°C 1분으로 하고, 추가적으로 initial denaturation을 94°C 에서 3분, final extention을 72°C 에서 5분동안 실시하였다. Primer는 U.B.C random decamer primer 18개(U.B.C -4, -121, -125, -127, -128, -134, -138, -140, -141, -142, -143, -150, -170, -171, -178, -181, -184 and -194 primer)를 사용하였으며, 그 중 유의성이 있는 8개의 primer (U.B.C -4, -127, -171, -178, -181, -184, -190 and -194)를 이용하여 분석하였다.

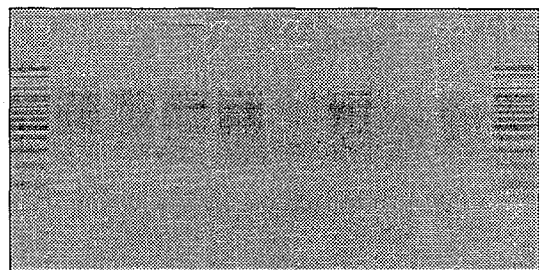
RAPD 분석에서, 밴드가 나타난 것은 '1', 나타나지 않은 것은 '0'으로 표기하였으며, sample간 공통적으로 나타난 밴드 비율(proportion of shared bands; $\text{psb}=2\text{NAB}/(\text{NA}+\text{NB})$)을 이용하여 genetic distance ($D=1-\text{psb}$)를 계산하여 distance matrix를 작성하였다. psb에서 NA와 NB는 각 종 및 집단에서 확인된 총 밴드 수를 나타낸 것이며 NAB는 종 및 집단간 공통적으로 나타난 밴드 수를 나타낸 것이다. Phenogram은 PHYLIP package의 NEIGHBOR program에서 UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages) 방법으로 분석하였으며, 각 분석에 있어서 신뢰성을 높이기 위하여 1,000번의 bootstrap replication (Felsenstein, 1985)을 실시하였다. 비교 대상으로 한국산 청개구리(*Hyla japonica*)와 두꺼비(*Bufo gargarizans*)를 함께 분석하였다.

결과 및 고찰

RAPD 분석에서 총 18개의 U.B.C random decamer primer (U.B.C -4, -121, -125, -127, -128, -134, -138, -140, -141, -142, -143, -150, -170, -171, -178, -181, -184 and -194)를 사용하였으나, 그 중 유의성이 있는 8개 primer (U.B.C -4, -127, -171, -178, -181, -184, -190 and -194)를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 총 121개의 band를 확인할 수 있었으며 primer당 평균 15.1개의 밴드를 관찰할 수 있었고, 이중 34개 (28.1%)가 polymorphism으로 확인되었다(Figure 1).



U.B.C 4 Primer



U.B.C 127 Primer

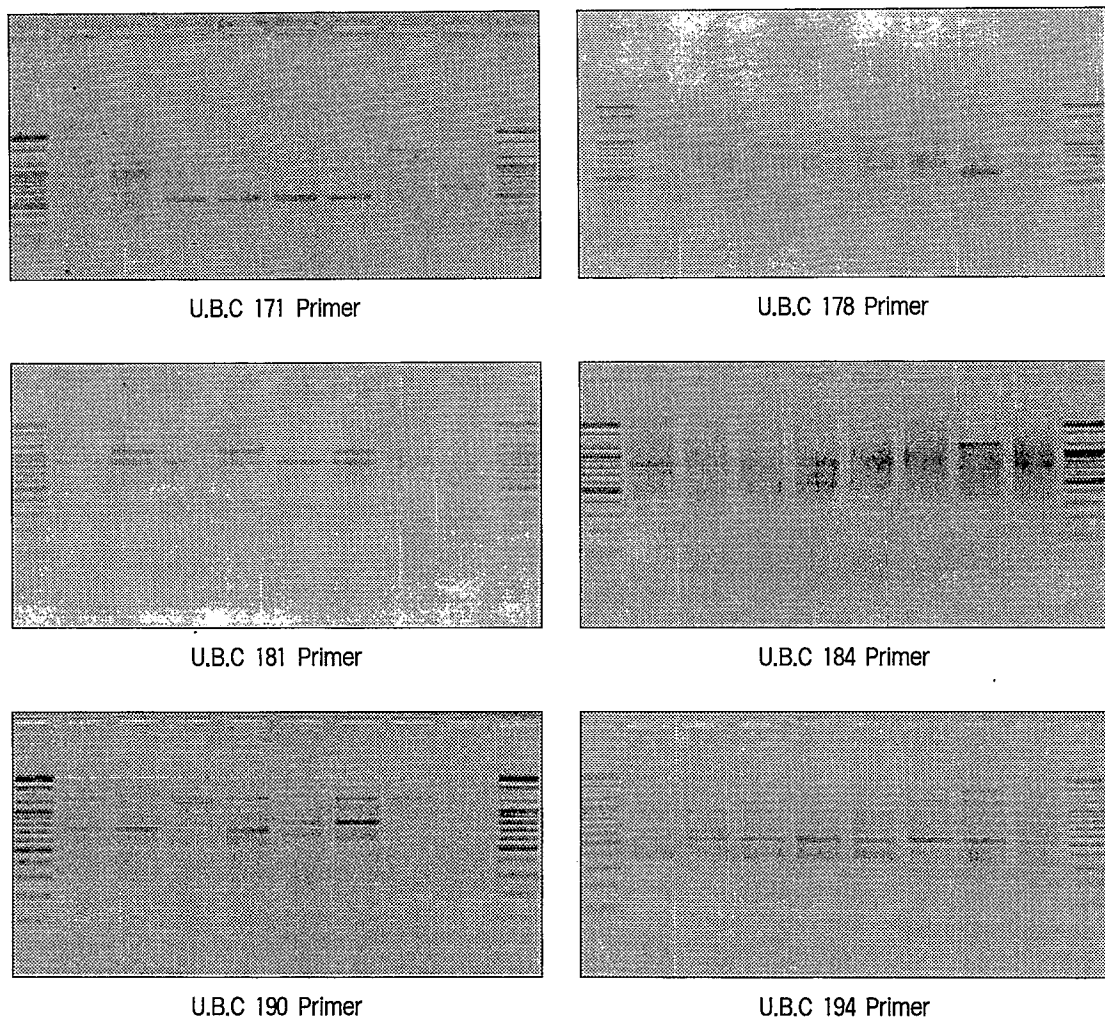


Fig. 1. RAPD-PCR markers of eight primer in six local populations of *R. nigromaculata*, *H. japonica* and *B. gargarizans*. Line 1 and 10, size marker (100bp DNA ladder, Bioneer) ; Line 2, Jeju 1; Line 3, Jeju 2; Line 4, Hwaseong; Line 5, Jecheon; Line 6, Jecheon; Line 7, Taean; Line 8, *B. gargarizans*; Line 9, *H. japonica*.

참개구리 6개 집단의 genetic distance (D)는 0.152-0.491로 나타났으며, 이들 참개구리 집단과 두꺼비는 0.588-0.800, 참개구리 집단과 청개구리는 0.724-0.905이었다. 그리고 두꺼비와 청개구리는 0.524로 나타났다.

따라서, 전체적으로 볼 때 참개구리의 지역 집단간 거리는 $D \leq 0.5$, 중간 거리는 $D \geq 0.5$ 로 나타난 것을 알 수 있었다. 참개구리 제주도 집단 중 외부 형질이 차이가 있는 집단(Jeju 1, 2)간에는 0.394로 나타남에 따라, 외부형질과는 상관없이 유전적 거리가 크지 않은 것을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. Genetic distance among six local populations of *Rana nigromaculata*, *Bufo gargarizans* and *Hyla japonica* based on pairwise character difference.

	Jeju 1	Jeju 2	Hwaseong	Jecheon	Hamyang	Taeon	<i>B. gargarizans</i>	<i>H. japonica</i>
Jeju 1	-							
Jeju 2	0.394	-						
Hwaseong	0.400	0.314	-					
Jecheon	0.491	0.278	0.152	-				
Hamyang	0.482	0.500	0.310	0.400	-			
Taeon	0.257	0.400	0.297	0.316	0.353	-		
<i>B. gargarizans</i>	0.704	0.625	0.724	0.800	0.692	0.588	-	
<i>H. japonica</i>	0.818	0.778	0.750	0.840	0.905	0.724	0.524	-

UPGMA 분석에서 크게 2개의 branch로 cluster되었다. 그 중 첫 번째는 Jeju 1, Jeju 2 및 Taeon 등 도서지역에 분포하고 있는 지역 집단들(local populations)이, 두 번째는 Hwaseong, Jecheon 및 Hamyang 등 내륙지역에 분포하고 있는 집단이 cluster를 형성되었다(Figure 2).

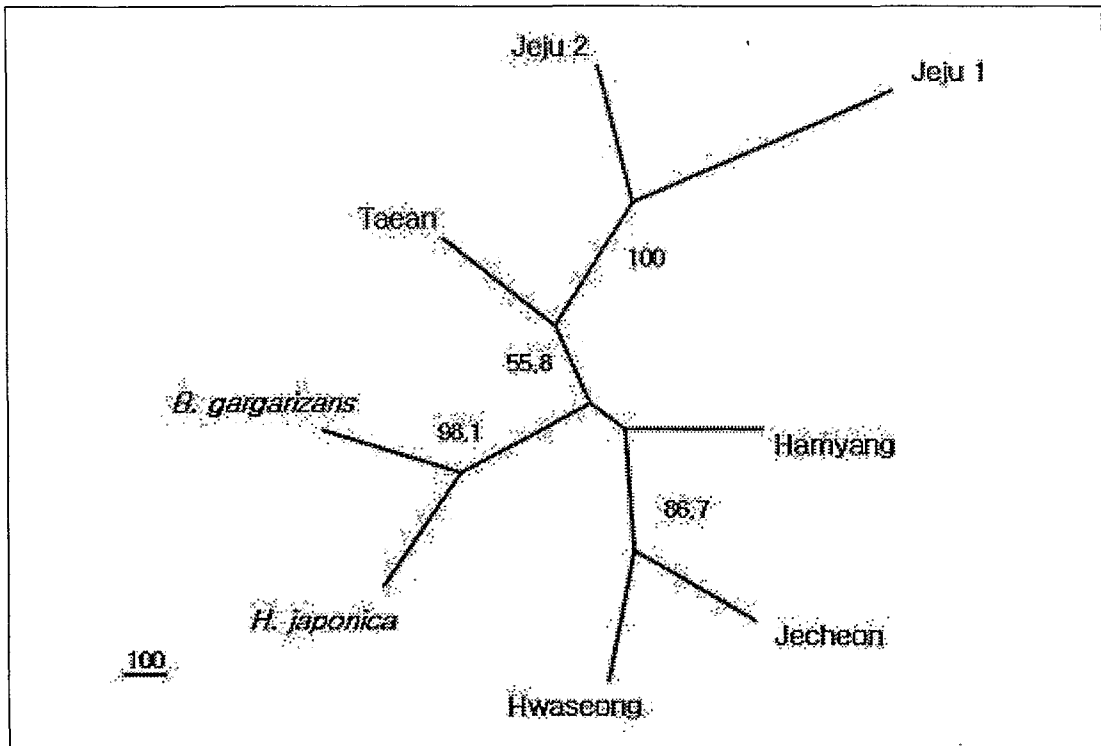


Fig. 2. UPGMA tree of the six populations of *R. nigromaculata*, *B. gargarizans* and *H. japonica* based on genetic distance (D) of RAPDs, $D=1-psb$. The numbers on branches are the bootstrap value for 1,000 replicate analyses.

참개구리 집단 중 Jeju 1과 Jeju 2는 1,000번의 bootstrap에서 100% iteration을 보이면서 subcluster를 형성하였고, 이들과 Taean 집단이 55.8%의 bootstrap iteration을 보이면서 하나의 cluster를 형성하였다. 또한 Jecheon과 Hwaseong집단은 86.7%의 높은 iteration을 보였으며, 이들과 Hamyang 집단이 또 다른 cluster를 형성하였다.

주목할만한 것은, 이번 연구에서 사용된 Jeju 1은 다른 참개구리와 다르게 모두 등 중앙에 정중선이 없는 집단을 선택해서 분석하였다. 첫 번째 cluster의 경우 Jeju 1과 Jeju 2에서는 정중선의 유무 등 외부 형질의 차이가 나타남에 불구하고 유전적으로는 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며(Table 2), 또한, Jeju 1 및 Jeju 2 집단이 subcluster를 형성한 후 이들과 Taean 집단이 하나의 cluster를 형성함에 따라, 도서지단과 내륙 집단이 각각 다른 cluster를 형성했다는 것이다.

한편 참개구리의 유전적 변이에 대한 연구는 Kim et al., (1999)에 의하여 한국의 5개 지역 집단과 일본의 1개 지역 집단에 대한 mt cytb에 대한 분석이 이루어졌다. 이들의 결과에서 한국산 참개구리의 5개 내륙 집단이 유전적으로 큰 차이를 보이지 않은 것으로 나타났다. 선행 연구결과와 본 연구에서 나타난 RAPD 분석 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다. 또한, 선행 연구에서 한국 내 집단간 유전적 차이가 크게 나타나지 않은 반면, 국내 집단과 도서지역인 일본 집단간 mt cytb를 비교할 때, 집단간 차이가 나타나는 것은 RAPD 분석에서 한국의 내륙지역과 도서지역이 각각 서로 다른 cluster를 형성하는 것과 유사하다는 것을 알 수 있었다.

이와 같은 연구 결과들에서 볼 수 있듯이 지역 집단간의 유전적인 차이는 지리적인 격리와 매우 밀접하다고 볼 수 있다. 참개구리류의 공통조상은 초기에 한반도를 중심으로 중국 동부에 분포하였으며, 빙하기에 남쪽과 북쪽 방향으로 각각 2개의 집단으로 분리되었다. 해수면의 상승으로 인하여 한반도에 분포하는 개구리류의 참개구리(*R. nigromaculata*)로 분화되었으며, 일본에서는 *R. porosa porosa*로 종분화 되었다. 이후 두 번째 빙하기에 한반도와 일본열도가 연결되면서 한반도에 분포하고 있던 참개구리가 일본열도로 분산되게 되었다(Matsui, 1996). 또한, 신생대의 한반도 주변 지역의 지형 형성을 보면, 제주도는 신생대 제3기 말부터 제4기 사이인 약 200만년전에 형성된 섬으로 알려져 있다. 러시아 연해주와 사할린 사이에 Mamiya해협은 약 8,500년전에, 사할린과 홋카이도 사이에 있는 Soya해협은 12,000년 전에 형성된 것으로 알려져 있으며, 이 시기의 해수면 상승으로 인하여 지리적 격리를 가져옴에 따라 양서류의 분포에 커다란 영향을 주게 되었다. 예를 들어, 아무르산개구리는 동북아시아와 도서 지역인 사할린에는 분포하지만, 우리나라의 제주도 및 일본열도에는 분포하지 않는다는 점을 예로 들 수 있다(Tanaka-Ueno et al., 1998). 그리고 현재의 종 분포와 지사학적 정보를 바탕으로 살펴보면 참개구리는 약 20,000년 전부터 18,000년 전까지 한반도와 일본열도에서 집단간 유전자를 공유하였으나 그 이후 해수면의 상승으로 집단간 격리가 일어난 것으로 여겨진다. UPGMA 분석에서도 볼 수 있듯이 한국 내륙지역과 도서지역에 분포하는 참개구리 집단간에 서로 다른 cluster를 형성한 것은 비록 짧은 기간이지만 지리적인 격리로 각각 독립적으로 진화한 것으로 볼 수 있다. 한국산 참개구리는 최근 1만년전 부터 해수면의 상승으로 인한 지리적 격리로 인하여 집단간 격리도 함께 일어난 것으로 보인다. Mitochondrial 16S rDNA 분석 (송, Unpublished data)에서 집단간의 차이가 매우 적은 것으로 분석되어 최근에 집단간 격리가 이루어진 것으로 판단되며, RAPD 분석 결과에서는 지역적 격리에 의한 집단간 intraspecific variation이 일어난 것을 알 수 있다.

그러므로 Jeju 1과 2 집단은 같은 지역에 분포함에 불구하고 서로 다른 외부 형질이 타나는 것에 대해서는 집단들에 관한 형태적, 생태적 그리고 유전적 분석 등 더욱 다양한 방법을 이용하여 추가적으로 연구가 실시되어야 할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 2002년도 (사)한국자연보전협회 학술연구비에 의해 이루어졌으며, 연구 수행에 있어 많은 자문을 해 주신 경기대학교 미생물학 연구실의 이상섭 교수님, 국립공원관리공단 자연생태연구소의 차진열 박사님, 제주대학교 교육과학과의 오홍식 교수님께 진심으로 감사드립니다.

인용문헌

- Duellman, W.E. and L. Trueb, 1986. Biology of amphibians. McGraw-Hill, New York, pp.670.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 : 783-791.
- Kang, Y. S. and I. B. Yoon, 1975. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea Vol 17 amphibian · Reptila. The Korean ministry of education, Seoul, pp. 191.
- Kim, J. B., H. Y. Lee and S. Y. 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, J. E., D. E. Yang, Y. R. Kim, H. Lee, H. L. 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.
- Matsui, M., 1996. National History of the Amphibia. University of Tokyo Press. Tokyo. pp. 250-260
- Meada, N. and M. Matsui, 1999. Frogs and Toads of Japan. Bun-Ichi Soga Shuppan, Tokyo. pp.223
- Nakamura, K. and S. Ueno, 1976. Japanese reptiles and amphibians in colour. Hoikusha, Osaka, pp. 214
- Sambrood, J. and D. W. Rusell, 2001. Molecular cloning. 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Sengoku, S., T. Hikida, M. Matsui, and K. Nakaya, 1996. The encyclopaedia of animals in Japan. Heibonsha, Tokyo. pp.206.
- Shim, J. H., 2001. A story of amphibia by Dr. Shim JH, in Calling frog for the life. Darunsesang, Seoul.
- Stejneger, L., 1907. Herpetology of Japan and adjacent territory. Smithsonian institution, Washington. pp.577
- Suh, J. H., 1999. Molecular systematics of Korean amphibia. Ph. D. Thesis. Inha Univ., Incheon. 114pp.

- 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 sequences (Amphibia, Ranidae). J. Herpetol. 17 : 91-97.
- Yang, S. Y. and C. H. Yu, 1978. Check list of Korean amphibians. Bull. Inst. Basic Sci. Inha Univ. 5 : 81-90.
- Yang, S. Y., 1983. Genetic variation in natural populations of *Rana nigromaculata* in Korea. Bull. Inst. Basic Sci. Inha Univ. 4 : 61-67.
- Yang, S. Y., J. B. Kim, M. S. Min, J. H. Suh, and Y. J. Kang, 2001. Monograph of Korean Amphibia. Academic Press, Seoul. pp.181.
- Yang, S. Y., H. Y. Lee, C. H. Yu, I. B. Yoon and S. R. Park, 1997. Intra- and interspecific diversity and speciation of 2 species of the genus *Rana*. Ministry of Education.
- Zhao, E. M. and K. Adler, 1993. Herpetology of China. Society for the study of amphibians and reptiles. Oxford. pp.522.

요 약

한국산 참개구리(*Rana nigromaculata*)중 정충선이 없는 집단이 발견되어, 이들 집단과 다른 집단들 사이에 유전적 변이를 규명하고자 RAPD 분석을 실시하였다. 또한, 본 연구에서 비교 대상으로 한국산 청개구리(*Hyla japonica*)와 두꺼비(*Bufo gargarizans*)를 함께 사용하였다. 18개의 random decamer primer를 이용한 RAPD-PCR 분석한 결과, 총 121개의 밴드를 관찰할 수 있었으며, 이들 중 28.1%인 34개의 밴드가 polymorphism으로 확인되었다. 또한, 유전적 차이는 종내 범위를 크게 벗어나지 않았다. 그러나, UPGMA 분석에서 내륙 및 도서지역의 집단이 각각 다른 cluster를 형성하였다.

이러한 결과는, 신생대인 약 20,000년 전부터 18,000년 전까지는 집단간 유전자 공유가 이루어졌으나 그 이후, 간빙기에 의해 해수면 상승으로 인한 지역적 격리(도서지역의 격리)에 의하여 집단간의 유전적인 변이를 가져왔을 것으로 사료된다.

하지만, 제주도 집단(Jeu 1, 2)이 동일한 지역에 분포함에 불구하고 서로 다른 외부 형질이 나타나는 것에 대해서는 집단에 대한 형태, 생태 및 유전적 분석 등 다양한 방법을 이용하여 추가적으로 연구해야 할 것으로 본다.

검색어: 신생대, 참개구리, Polymorphism, RAPD, UPGMA