

미토콘드리아 ND1 유전자 염기서열 비교를 통한 국내 서식 황소개구리의 유전적 다양성 조사

이지영* · 심재한** · 정인실*

*한서대학교 생물학과

**한국 양서·파충류 생태연구소

e-mail: ijoung@hanseo.ac.kr

Genetic Diversity of *Rana catesbiana* Captured on various sites in Korea based on mitochondrial ND1 sequence

Ji-Young Lee*, Jae-Han Shim**, Insil Joung*

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

**Research Institute of Korean Herpetofauna

요 약

1970년대 식용을 위한 양식을 목적으로 일본에서 수입된 황소개구리가 국내 하천과 호서생태계에 큰 피해를 주었으나, 최근 급속히 그 개체수가 줄어든 것으로 추정되므로 이번 연구에서는 국내에 서식하는 북미산 황소개구리의 유전자 분석을 통하여 개체군동태에 대한 유전적 연관성을 조사하였다. 이를 위하여 전라남도 지역에서 서식하는 황소개구리를 채집하여 이미 발표된 북미산 황소개구리와 미토콘드리아 ND1/tRNA 유전자 1215 bp의 염기서열을 비교, 분석하였다. 북미산과 비교 하였을 때 조사한 국내 서식 개체 모두에서 ND1/tRNA 유전자 1개 위치에서 염기변화가 발견되었으나 이는 도입 개체군의 유전자인지 국내 특이변이가 진행된 것인지 확실하지 않다. 또한 조사한 개체 일부에서 유전자 염기서열의 6위치에서의 변이가 발견되었으나 국내 서식 황소개구리는 미국산 황소개구리와 유전적 차이가 거의 없으며, Kimura-2-parameter 분석결과 국내 서식 황소개구리 개체 내에서 98.7%~100%의 높은 유사성을 보여 종내 유전적 차이가 거의 없는 것으로 보인다. Neighbor-Joining과 Maximum Parsimony 분석 결과, cluster를 이루는 개체군의 차이를 보였으므로 개체들이 분화되어 나온 시점과 위치가 다른 것으로 확인 되었지만 장흥, 영암, 고흥의 개체가 국내 도입시기의 개체군에 속하며 광주, 남평 지역의 개체군이 고흥의 한 개체로부터 분화되어 나왔음을 추정할 수 있다. 이러한 결과로부터 국내에 서식하는 황소개구리가 도입 후 지역 특이적 분화가 일어났다고 결정하기는 무리가 있으며, 이와 같이 유전적 유사도가 높은 개체들 간의 교배에 따른 유전적 다양성의 감소가 최근에 관찰되는 국내산 황소개구리의 급격한 감소원인들 중의 하나일 가능성을 시사한다.

1. 서론

국내에 서식하는 황소개구리(*Rana catesbiana*; American bullfrog)는 1970년대 새마을 소득사업의 일환으로 일본에서 도입하여 전국 각지의 농가에서 분양, 사육하였으나 경제성이 낮고 식품으로서의 수요가 적어 농가 대부분이 양식을 포기함에 따라 자연 생태계에 방치되었다. 그 결과 황소개구리 개체수의 급격한 증가로 국내 하천과 호서생태계에 큰 피해를 주어왔지만 최근 생태계 교란 사례가

현저히 감소하는 등 개체수가 줄어든 것으로 추정되고 있다. 그러나 우리나라에 외래종으로 도입되어 40여 년 동안 국내에 서식하고 있는 북미산 황소개구리에 대해 분자적 수준에서의 연구는 없었으며, 이에 본 연구는 국내에 서식하는 북미산 황소개구리의 유전자 분석을 통하여 그들의 개체군동태에 관한 유전적 연관성에 관하여 조사하였다.

2. ND1/tRNA의 염기서열 비교 분석

2.1. 염기서열 분석에 사용된 mtDNA

본 연구에 사용된 mitochondrial DNA (mtDNA)는 고등동물에서 모계유전을 하는 안정적인 유전자이며 [3], 하나의 세포에 여러 copy가 있으므로 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 증폭하기가 용이하다. 이러한 mtDNA 중 ND1(NADH dehydrogenase subunit 1)을 암호화하는 부위의 유전자 염기서열은 주로 종간분석에 따른 분류에 이용된다[7]. 본 연구에서는 국내 서식하는 북미산 황소개구리의 mtDNA 중 ND1/tRNA의 염기서열을 결정하고 이미 발표된 북미의 황소개구리 집단의 ND1/tRNA 염기서열과 상호 비교하여 국내 서식하는 북미산 황소개구리의 감소원인과 유전자 변이의 연관 관계를 살펴보고자 하였다.

2.2. 국내 서식 황소개구리의 채집 및 계통분석

이번 조사에서는 전라남도의 각기 다른 다섯 지역에서 채집한 개구리의 대퇴부에서 Dneasy Tissue Kit (Qiagen)를 이용하여 DNA를 분리하여, ND1/tRNA fragment 1215bp로 PCR 증폭시키고 염기서열을 분석하였으며, 북미산 황소개구리와 국내 서식지 집단 간의 유전자서열을 비교하였다. 모든 sample의 염기서열과 gene bank에 등록된 북미산 황소개구리 염기서열(*Rana catesbeiana*, NCBI gene bank [gi:336962])은 clustalX로 alignment하였다. MAGA3 software [4]를 이용하여 kimura-2-parameter distance, neighbor-joining(NJ) 및 maximum parsimony (MP) 를 이용하여 rooted tree를 작성하였다.

3. 국내 서식하는 황소개구리의 유전자 분석결과

3.1. 황소개구리의 국내 서식 분포 및 밀도

밀도 조사는 2004년 5월과 7월 두 차례 실시하였으며 광주광역시 오산동 황룡강, 나주시 남평읍 문씨방죽, 고흥군 동강면 침교재, 장흥군 장동면 북동재, 영암군 금정면 아천재 일대를 수행하였다. 이 중 광주, 남평, 장흥에서의 황소개구리 서식밀도는 아주 낮았으며 영암은 중간, 그리고 고흥에서는 풍부한 서식밀도를 관찰할 수 있었다 (Fig 1).

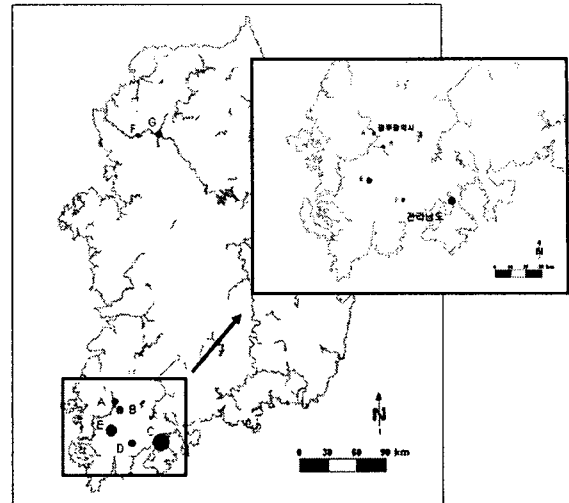


Fig. 1. 국내 서식하는 황소개구리의 채집 장소와 서식 밀도. 조사지역별 등급표시는 점으로 표현 하였으며 점의 크기가 클수록 황소개구리의 서식밀도가 높음을 뜻한다. A Gwangju. B Nampyoung. C Goheung. D Jangheun. E Youngam

3.2. 국내 서식 황소개구리의 유전자 연관관계 분석

kimura-2-parameter distance에 의하여 확인된 북미산 황소개구리와 국내산 각 개체들 간의 genetic distance를 비교해보면 먼저 장흥 1 및 2, 고흥, 영암의 4개체는 북미산 황소개구리와 100%, 광주를 비롯한 6개체는 98.7%~99.1%의 유사성을 보였다(Table 1). 한국에 서식하는 아무르산 개구리의 종 내 유전적 거리가 0.0025~0.0460을 나타내는 것[3]과 비교하여 국내에 서식하는 황소개구리의 종 내 유전적 유사도는 매우 높은 것으로 확인 되었다. 영암의 한 개체는 0.035~0.039의 비교적 높은 유전적 거리를 나타내어 상대적으로 특이적인 유전적 분화를 나타내고 있으나, 이 개체만이 이러한 특징을 보이고 있으므로 현재 영암지역에서 특이적인 지역적 분화가 일어났다고 결정하기에는 무리가 있다. 또한 일차적으로 인위적인 지역 이동이나 유난히 염기변이가 심한 변이체가 실험에 이용되었을 가능성도 배제할 수 없다. 또한 다른 지역의 개체들도 종간 유사성이 매우 높아 국내에서의 지역적 분화가 시작된 것이라고 판단하기에는 이르다.

Table 1. 미토콘드리아 ND1 gene 서열을 근거로 한 황소개구리간의 kimura-2-parameter distance

	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. Youngam1, 10. Youngam2, 11. Jangheung1, 12. Jangheung2

NJ 분석에서 영암 2개체를 제외하고 두 개의 분명한 cluster를 형성하는 것이 확인되었다. 광주 1, 2, 남평 1, 2, 3, 고흥 1의 6개체 cluster는 95%, 북미산 황소개구리와 장흥 1, 2, 고흥 2, 영암 1의 5개체 cluster는 89%로 높은 bootstrap 결과를 보였다. 그러므로 북미산 황소개구리가 처음부터 따로 분화되어 있는 것이 아니라 장흥 1, 2, 고흥 2, 영암 1의 4개체 cluster에 속하며, 이 개체들이 국내도입시기 개체군에 속하는 것으로 추정된다 (Fig. 2A). MP(maximum parsimony)에서는 크게 2가지의 cluster가 형성됨을 볼 수 있다. 광주 1, 2, 남평 1, 2, 3, 고흥 1의 6개체와 영암의 한 개체가 NJ 분석과는 달리 한 cluster를 이루는 것을 볼 수 있으며, 이는 90%의 높은 bootstrap 결과를 보여 NJ분석 결과로는 지역 특이적 분화로 볼 수도 있었으나 앞서 영암 2개체에 대한 distance 결과와 같이 MP분석 또한 인위적인 지역이동이나 유난히 염기 변이가 심한 변이체가 실험된 것이라는 추정을 뒷받침한다. (Fig. 2B).

4. 결론

이번 조사 결과로 국내에 서식하는 황소개구리들은 원산지인 북미산 황소개구리와 유전적분화가 거의 없음을 확인하였고, 이로써 독특한 유전적 변이에 의해 국내에 서식하는 황소개구리들이 감소하는 것이라고 보기보다 양등이 제한한 바와 같이 [1] 외국으로부터 도입 시 본래 유전적 변이의 stock이 적은 집단에서 도입된 후 사육에 의해 근친교배로 인한 감소일 가능성이 크다. 북미지역에서는 수십 km의 지리적 거리마다 *R. catesbiana*의 상호 교잡 개체군이 형성된다는 보고가

있으나 [2] 앞서 추정한 대로 국내에 유입된 황소개구리는 현재 서식지 특이적 변이가 진행되고 있다고 보기는 어렵다. 그러나 보다 정확한 결론을 도출하기 위해 서식 집단에 따라 더 많은 개체군의 분석과 현 조사에서 이용되었던 mtDNA와 더불어 nuclear DNA의 염기 서열분석도 병행되어야 할 것이다.

A.

B.

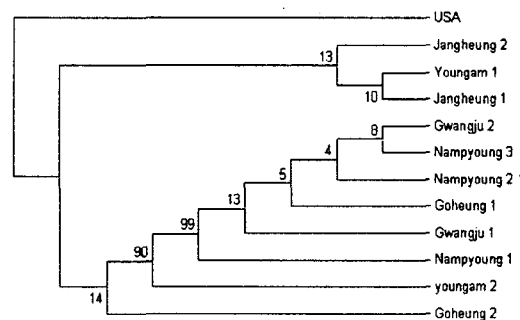


Fig. 2. 황소개구리 유전자서열에 의한 계통분석
A: 북미산과 국내서식 황소개구리간의 NJ(neighbor-joining) tree, B: 미국산과 국내서식 황소개구리간의 MP(maximum-parsimony) tree.

감사의 글

이 연구는 2004년 환경부 자연보전국 자연생태과로부터 지원받은 “황소개구리 감소요인에 대한 연구” 과제의 일부로 수행하였음.

참고문헌

- [1] 양서영, 김종범, 민미숙, 서재화, 강영진, 2001. 한국의 양서류. 아카데미서적. 서울. : 97,101
- [2] Austin, J.D., Loughheed, S.C., Boag, P.T., 2004. Controlling for the effects of history and nonequilibrium conditions in gene flow estimates in northern bullfrog (*Rana catesbeiana*) population. *Genetics* 168: 1491-1506.
- [3] Song, J.Y., Yoon, B.S., Oh, H.S., Chung, K.H. 2003. Genetic diversity of *Rana amurensis* (Amphibia: Ranidae) based on mitochondrial 16s rDNA sequence. *Korean J. Environ.* 21: 45-51.
- [4] Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5: 150-163.
- [5] Lee, J.E., Yang, D.E., Kim, Y.R., Lee, H., Lee, H.I., Yang, W.Y., Lee, H.Y., 1999. Genetic relationships of *Rana amurensis* based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Korean J. Biol. Sci.* 3: 303-309.
- [6] Marcey, J.R., Strasburg, J.L., Brisson, J.A. Vredenburg, V.T., Jennings, M., Larson, A. 2001. Molecular phylogenetics of western north american frogs of *Rana boylei* species group. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19: 131-143.
- [7] Monsen, K.J. and Blouin, M.S. 2003. Genetic structure in a montane ranid frog: restricted gene flow and nuclear-mitochondrial discordance. *Molecular Ecology.* 12: 3275-3286.