



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

제주도에 이입된 황소개구리
(*Rana catesbeiana*)의 분포 현황과
모계 계통 분석

제주대학교 대학원

생물학과

윤원석

2017년 8월

제주도에 이입된 황소개구리
(*Rana catesbeiana*)의 분포 현황과
모계 계통 분석

지도교수 김 세 재 · 오 흥 식

윤 원 석

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2017년 6월

윤원석의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 인
위 원 _____ 인
위 원 _____ 인
위 원 _____ 인
위 원 _____ 인

제주대학교 대학원

2017년 6월

Distribution Status and Analysis for Maternal
Lineage of the Introduced American Bullfrog
(*Rana catesbeiana*) in Jeju Island

Won-Seok Yun

(Supervised by professor Se-Jae Kim and Hong-Shik Oh)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for
the degree of Doctor of Philosophy

June, 2017

This thesis has been examined and approved.

Chairperson of the Committee

Date

Department of Biology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

This study was performed to provide the biological characteristics, and to estimate the origin of maternal lineage of American bullfrog in Jeju Island ecosystem. Firstly, the distribution and type of inhabitation, the number of individuals, and the morphological feature of adult bullfrog and tadpole of the American bullfrog were investigated. Then, the origin of maternal lineage was estimated by the analysing the *NDI* and *CTYB* haplotypes in American bullfrog populations. American bullfrog and tadpole were founded at 110 investigated Jeju inland wetlands (including 109 sites and previously reported 1 site) out of 320 wetlands, indicating that it has been gradually spreading. Although 107 sites were limited in western part of the Jeju Island, bullfrog's inhabitation were founded in Namwon-eup and Bonggae-dong as well. The average number of adult bullfrog was 7.8 individuals/site, ranged from 7.0 to 7.9 individuals/site, but no adult was found in Bonggae-dong. The number of adult-finding site was greater than that of tadpole-finding site, which is same with previous studies documented that the habitat dispersal of American bullfrog was resulted by geographical dispersal of adult frogs. Average body weight and average body length of adult frog is 321.3 ± 129.40 g and 337.8 ± 33.59 mm, respectively which is also similar with previous reports. A positive correlation ($R^2=0.6997$) was found between snout-vent length and body weight of adult American bullfrogs. Hindfoot length of male is longer than that of female ($p < 0.05$). Tadpole of American bullfrog showed significant differences in every measurement for external characters (BW, TBL, HL, HFL, and FFL) according to their habitats, suggesting that environmental factors of habitats may strongly affect the growth rate of tadpole. From the results of haplotype analysis for mtDNA *NDI* gene, two different haplotype (BNH01 and BNH02) were found in 85.7% and 14.3% frequencies. BNH01 was founded predominantly in Daejeong-eup and Hankyeong-myeon, but BNH02 was just founded in north and northeast parts of Hankyeong-myeon and southeast part of Daejeong-eup.

These results represent that American bullfrog introduced in Jeju Island has more than two maternal lineages or they have been introduced more than at least twice. Natural dispersal by adult frog can be estimated based on the result that frequencies of *NDI* haplotypes of adult frog and tadpole were different by habitats. In addition, the imbalance of genotype distribution between close distance groups may be supposed the artificial translocation for dispersal. Even though the a few sample was used for *NDI* haplotype analysis, the Korean Peninsula population has not only much more number of *NDI* haplotypes than those of the Jeju Island population but it also includes all haplotypes found in the Jeju Island population. The similar results from the haplotype analysis of *CYTB* gene were found between these two populations and can be supported by the results of phylogenetic analysis. These findings can be considered as molecular evidence that the Jeju Island population of American bullfrog were introduced through the Korean Peninsula. In addition, there is the possibility that multiple maternal lineages have been introduced via Korean Peninsula at the same time or several times. Moreover, maternal lineages of South Korea and Japan has close relationship from the perspective of genetic structure and also Chinese maternal lineages is very much similar with them. Previous reports described that the European populations of the American bullfrog have both eastern-lineage and western-lineage, the maternal lineages in East Asian Counties (Japan, China and South Korea) are almost based on the origin of western-lineage that came from southwest part of USA. The findings of this study concluded that haplotype currently founded were introduced after sequence differentiation in North America. However, more researches should be carried out to figure out accurate phylogenetic position of BCH03 that was not clearly defined yet. In addition, most of American bullfrogs in the Jeju Island and the Korean Peninsula are determined as population undergoing genetic bottleneck event or founder effect because they has low levels of genetic diversities of haplotype diversity as well as nucleotide diversity. This study will provide important biological information for management program for this invasive alien species American bullfrog in not only Jeju Island but also entire ecosystem of South Korea.

목 차

A B S T R A C T	i
목 차	iii
LIST OF TABLES	vi
LIST OF FIGURES	ix
I. 서 론	1
1. 황소개구리의 생물학적 특성	1
2. 황소개구리의 전 세계적 분포	2
3. 황소개구리의 국내 이입의 역사	4
4. 국내의 황소개구리 연구	5
5. 황소개구리의 계통 유연관계 연구	6
6. 제주도의 황소개구리 분포 실태에 대한 연구	7
7. 연구의 목적	9
II. 재료 및 방법	10
1. 조사 지역 및 조사 기간	10
2. 서식 실태 모니터링 조사와 증점조사	10
3. 개체수 확인	12
4. 시료 수집 및 외부 형태 측정	11
5. 통계 분석	14
6. Genomic DNA 분리	14

7. mtDNA <i>CYTB</i> , <i>ND1</i> 유전자 절편에 대한 PCR 증폭	15
8. DNA 서열 결정	15
9. 모계 혈통 구조와 유전적 다양성 분석	16
10. 계통 유연관계 분석	18
Ⅲ. 결 과	19
1. 황소개구리 서식지의 지리적 분포	19
2. 황소개구리 서식지 유형	19
3. 발견된 황소개구리의 개체수	27
4. 황소개구리의 외부 형태	34
5. 황소개구리의 암컷과 수컷의 외부 형태	34
6. 서식지별 황소개구리 올챙이의 외부 형태	39
7. <i>ND1</i> haplotype의 지리적 분포	41
8. <i>ND1</i> haplotype 서열의 계통 유연관계	49
9. <i>CYTB</i> haplotype의 지리적 분포	52
10. <i>CYTB</i> 서열의 계통 유연관계와 동아시아 집단의 모계 기원	56
Ⅳ. 고 찰	61
1. 황소개구리 서식지 및 유형	61
2. 서식지별 황소개구리 개체군의 분포	63
3. 제주도 황소개구리의 외부 형태적 특성	65
4. <i>ND1</i> haplotype 분석에 의한 모계 기원 추적	69

5. *CYTb* haplotype 분석에 의한 모계 기원 추적 75

V. 요 약 83

VI. 인 용 문 헌 85

LIST OF TABLES

Table 1. PCR primers for <i>CYTB</i> and <i>ND1</i> genes in the American bullfrogs used in this study	17
Table 2. Observation sites of the American bullfrogs in Jeju Island	21
Table 3. Habitat types of the American bullfrogs detected in the wetlands of the Jeju Island	29
Table 4. Number of the adult of the American bullfrogs found in each province in Jeju Island	30
Table 5. Number of finding site and density of the tadpole of the American bullfrogs found in Jeju Island	33
Table 6. Comparison of the external characters of the adults American bullfrogs collected in Korean Peninsula and Jeju Island	35
Table 7. Comparison of mean and range of the external characters of the males and females of the American bullfrogs	37
Table 8. Comparison of external characters of the males and females of the American bullfrogs found in Korean Peninsula and Jeju Island	38

Table 9. Comparison of the external characters of the tadpoles of American bullfrogs collected in eight different habitats	40
Table 10. Distribution of <i>ND1</i> haplotypes of the adult American bullfrogs collected in Jeju Island	42
Table 11. Geographical distribution of <i>ND1</i> haplotypes of the American bullfrogs in the populations of South Korea	45
Table 12. Population genetic diversities of the <i>ND1</i> gene within introduced American bullfrog populations in Jeju Island	47
Table 13. Population genetic diversities of the <i>ND1</i> gene within introduced American bullfrog populations in Jeju Island, Gyeongsangnam-do and Jeollanam-do	48
Table 14. Pair-wise genetic distances for <i>ND1</i> haplotype sequences of the American bullfrogs	50
Table 15. Distribution of the mtDNA <i>CYTB</i> haplotypes of the American bullfrogs collected in this study	53
Table 16. Geographical distribution of the mtDNA <i>CYTB</i> haplotypes of the American bullfrogs in South Korea	54

Table 17. Global distribution of the mtDNA <i>CYTB</i> haplotypes of the American bullfrogs	55
Table 18. Accession number and their origin of <i>CYTB</i> haplotype sequence of the American bullfrogs	57
Table 19. Pair-wise genetic distances for <i>CYTB</i> haplotype sequences calculated by Tajima and Nei (1984) method	58

LIST OF FIGURES

Figure 1. Preliminary monitoring sites for the American bullfrogs in Jeju Island	11
Figure 2. External measurement of the adult and tadpole of American bullfrogs	13
Figure 3. Observation sites of American bullfrogs in Jeju Island	20
Figure 4. Comparison of the finding sites of the American bullfrogs in Jeju Island	25
Figure 5. American bullfrogs found in this study	26
Figure 6. Finding site types of the American bullfrogs in this study	28
Figure 7. Frequencies of the finding site of the adult of the American bullfrogs	32
Figure 8. Correlation between body weights (BW) and SVL in the adults of the American bullfrogs collected in this study	36
Figure 9. Geographical distribution of <i>ND1</i> haplotypes in thirty bullfrog-finding sites in Daejeong-eup and	

Hankyeong-myeon.	43
Figure 10. Evolutionary relationships of <i>ND1</i> haplotype sequences of the American bullfrogs	51
Figure 11. Evolutionary relationships of <i>CYTB</i> haplotype sequences of the American bullfrogs obtained in this study and those previously reported in NCBI database	60

I. 서론

1. 황소개구리의 생물학적 특성

북아메리카가 원산지인 담수성 양서류인 황소개구리(American bullfrog, *Rana catesbeiana*) (Shaw, 1802)는 열대지역에서 온대지역까지 넓은 지역에 분포하며, 강이나 호수, 연못, 웅덩이 등에서 서식한다.

황소개구리는 주둥이-항문 길이(snout-vent length, SVL)가 약 20 cm, 체중은 약 800 g에 이르는 *Rana* 속에서 가장 큰 개구리류 중 하나이다. 자연 생태계에서 황소개구리는 1 회당 약 6천 개에서 2만 5천 개의 많은 알을 낳고(McAuliffe, 1978; Ryan, 1980; Medeiros et al., 2016), 높은 번식 성공률과 환경적응성을 나타낸다. 우리나라 생태계에서 황소개구리의 먹이로는 메뚜기, 파리, 모기, 장수말벌과 벌쌍살벌 등 곤충류뿐만 아니라, 거미류와 갑각류 등 절지동물, 복족류와 빈모강 등 연체동물, 어류, 상위포식자로 알려져 있던 과충류, 박새 등 조류, 등줄쥐, 땃쥐와 같은 소형포유류 등도 섭식하고, 참개구리, 무당개구리, 움개구리, 산개구리와 두꺼비 등의 우리나라 고유 양서류 종들과 동종인 황소개구리 어린 개체나 올챙이도 섭식하는 것으로 알려져 있다(김, 1972; 배, 1976; 고 등, 1991; 강, 1992; 박과 정, 1995; 김과 고, 1998; 최 등, 1998; 이 등, 2015). 또한 섭식량도 많아 고유 생태계에 미치는 영향이 매우 크다(최 등, 1998; Garner et al., 2006; Govindarajulu, 2006). 황소개구리가 도입된 지역에서는 양서류 종다양성과 개체군의 풍부도가 감소하고(Moyle, 1973; Fisher and Shaffer, 1996; Kiesecker et al., 2001; Blaustein and Kiesecker, 2002; Kats and Ferrer, 2003; Pearl et al., 2005; Li et al., 2011a, b), 황소개구리 올챙이는 개구리과(Ranidae), 두꺼비과(Bufoidea), 청개구리과(Hylidae)와 타이거 도롱뇽의 유생들을 먹이원으로 이용할 수 있다고 보고되었다(Kupferberg, 1997; Adams, 2000; Boone et al., 2004).

자연생태계에서 황소개구리가 곤충 등과 같이 잘 알려진 먹이원 뿐만 아니라

양서류를 포함하여 상위 포식자로 알려져 있던 파충류, 포유류, 조류 등까지도 섭식한다는 점이 알려지면서(Berlinger and Johnson, 1995; Wylie et al., 2003; Wu et al., 2005; Wang et al., 2007; 이 등 2015), 우리나라 생태계에는 사실상 황소개구리의 천적은 거의 없는 것으로 간주되고 있다(강, 1992; 최 등, 1998). 한때, 산란기 동안 두꺼비나 물두꺼비 수컷의 포섭에 의해 황소개구리 암컷들이 사망에 이른다는 점이 알려지기도 했으나, 이 시간 이외에는 두꺼비까지도 황소개구리의 먹이가 된다는 점이 밝혀졌다(박과 정, 1994; 최 등, 1998). 황소개구리에 의한 생태계의 피해는 먹이활동에 따른 수생태계 및 생물다양성의 감소뿐만 아니라, 항아리곰팡이병(chytridiomycosis)과 같이 양서류에 치명적인 질병을 매개하는 것으로도 알려져 있다(Berger et al., 1998; Daszak et al., 2004; Hirai, 2004; Garner et al., 2006). 일본의 Honshu, Kyushu 야생 황소개구리 집단에서 chytridiomycosis 원인균 *Batrachochytrium dendrobatidis*의 감염률이 다른 양서류들에 비해 높은 것으로 보고되었다(Goka et al., 2009).

고유종의 종다양성과 개체군 크기를 감소시키는 대표적인 외래침입종으로 우리나라뿐만 아니라 중국을 포함한 아시아 대부분 나라에서도 생태계를 교란하고 있다(Garner et al., 2006; Liu and Li, 2009; 노 등, 2017). 국내에서는 1998년 2월 생태계교란야생동물(최 등, 1998; 환경부, 2005)로 지정되어 관리대상으로 분류되고 있으며, 전 세계적으로도 세계자연보전연맹(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources: IUCN)에서 지정한 전 세계 100대 침입외래종(invasive alien species) 중 하나이다(Lowe et al., 2000; IUCN 2003; 환경부, 2006).

2. 황소개구리의 전 세계적 분포

황소개구리는 원산지인 미국의 남부와 동부, 캐나다에서는 Quebec 남부와 Nova Scotia, New Brunswick 지역, 남쪽으로는 멕시코의 Veracruz에까지 분포하고 있다(Frost, 1985, 2015). 1800년대 미국에서 식용으로 개발되기 시작한 이

후 전 세계적으로 확산되어 있다.

황소개구리는 20 세기 초 멕시코로 도입되었고, 코스타리카에 도입된 개체군은 멸종한 것으로 추정되고 있다. 쿠바와 푸에르토리코에는 1935년 전파되었으며, Hawaii에는 1800년대에 도입되어 전 지역으로 확산되었다. 이외에도 중미 도미니카공화국과 자메이카에도 도입되었다(Mahon and Aiken, 1977; Kraus, 2009; Santos-Barrera et al., 2009). 남아메리카에도 도입되었으며, 베네주엘라, 콜롬비아, 볼리비아에 도입되어 안데스산맥 인근의 사면과 카리브해 인근까지 확산되었다 (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2015). 페루에서는 Amazon Basin 과 태평양 연안의 Lima에서도 발견되고 있으며, 에콰도르와 브라질에서도 많은 수의 개체군들이 정착하였으며, 우루과이, 아르헨티나에도 도입되었다(Laufer et al., 2008; Santos-Barrera et al., 2009; Sanabria et al., 2011; Medeiros et al., 2016).

유럽에서도 최소 8 개국에서 25 회 이상 개별적으로 황소개구리를 도입하였고, 이탈리아에서 1937년까지 Po River Valley로 공식적으로 도입된 것을 시작으로 가장 많은 횡수에 걸쳐 도입되었다. 이후 여러 국가에서 황소개구리를 식용의 목적으로 수입하였으며, 벨기에, 프랑스, 독일, 그리스, 이탈리아, 네덜란드, 덴마크, 스페인, 영국 등에서 발견되고 있으며, 벨기에, 프랑스, 독일, 그리스, 이탈리아에서는 방류된 집단들이 발견되고 있다(Lanza, 1962, Stumpel, 1992; Lever, 2003; Ficetola et al., 2007, 2008a; Spitzen-van der Sluijs and Zollinger, 2010).

아시아에서는 필리핀, 말레이시아, 인도네시아, 태국, 싱가포르 등에서 발견되고 있다(IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2015). 또한 중국에서는 1950년대 말 일본으로부터 수입된 개체들이 Shanghai, Zhejiang, Tianjin 등에서 양식되었으나 실패하였고, 다시 쿠바에서부터 2차, 3차 수입을 통해 도입된 개체들이 Guangdong 지방에서 양식에 성공하였고 이후 농장에서 탈출한 야생 집단들이 Hunan, Hubei, Yunnan, Guizhou, Zhejiang 등 본토뿐만 아니라 섬 지역에서도 정착하였고, 또한 종교적 목적에 의한 방류나 다른 목적에 의해서도 야생화되었다(Li and Xie, 2004; Liu and Li, 2009; Liu et al., 2010; Li et al., 2006, 2011). 일본의 경우 1917년 도입되어 양식에 성공하였고, 이후 자연생태계로 확산되어 현재는 대만 동쪽에 위치한 Ishigakijima에서부터 Hokkaido 남부까지 거의 전 지

역에서 발견되고 있다(Teleford, 1960; 김, 1972; Minowa et al., 2008; Goka et al., 2009).

3. 황소개구리의 국내 이입의 역사

우리나라에는 1959년 일본으로부터 식용을 목적으로 진해 수산시험장에서 도입된 40 개체를 대상으로 양식을 시도하였으나 실패하였다(최 등, 1998; 환경부, 2005). 1971년에는 다시 일본으로부터 5 쌍을 수입하여 실내, 실외 사육에 성공하였으며, 부화에 성공한 올챙이를 서울 영등포, 마포의 연못과 경기도 시흥군의 왕면 사육장에 방사하였다(김, 1972, 1973, 1975). 이후 1972년 4월 9 개체, 5월 100 개체(암컷 50, 수컷 50)를 추가로 수입하여, 영등포와 시흥군의 사육장에 입식하거나 연못 등에 방사하였고, 1973년 5월에도 종와 200 개체를 추가로 수입하여 산란하게 하였다(김, 1973, 1975). 김(1975)은 수입한 황소개구리에서 생산된 2세대 종와들을 1974년에 비무장지대 부근의 목장, 용산 미8군 골프장 내 연못, 경기도 부천시 소사동에 위치한 농장 내 연못 등에 총 20 개체를 방사하여 같은 해 6월-7월 사이에 성공적으로 산란시켰다고 하였다. 배(1976)는 양식기술 개발 연구를 위해 경상남도와 경상북도 일대의 하천과 저수지에 3,300 개체의 어린 황소개구리를 방사한 후 토착화 여부를 확인하는 실험을 하였으며, 이후 전국 호소와 저수지 등에 방사하여 야생화할 것을 제안하였다.

1970년대 새마을운동의 농가소득사업으로 황소개구리 양식이 권장되면서 전국적으로 확대되었다(최 등, 1998; 조, 2002; 이 등, 2015). 그러나 먹이 등 까다로운 생태문제로 인한 경제성 부족, 대형 개구리에 대한 혐오, 국내 시장 확보의 실패 등으로 인해 대부분의 황소개구리 양식은 중단되었고, 이후 관리되지 않고 방치되거나, 인위적인 방류에 따라 많은 수가 자연 생태계로 유입되었다(조, 2002; 국립생태원, 2015; 이 등, 2015). 우리나라에서 황소개구리의 분포는 임업연구원의 보고(1993)에서 처음으로 전국 단위의 조사결과가 기록되었는데, 전국 204 개 시군에 대한 조사에서 41 개 시군에 12,441 개체가 서식한다고 기록되었다. 강과

윤(1994)이 강원도와 전라북도 산악지역과 제주도를 제외한 우리나라 전역에서 44개 지역에 분포한다고 하였으나, 이후의 조사를 통해 한반도의 대부분 지역과 다도해, 한려해상국립공원, 진도, 제주도 등 많은 섬 지역에서도 발견되고 있다(최 등, 1998; 박, 1999; 정 등, 2000; 양 등, 2001; 환경부, 2005; 오, 2005; 오와 홍, 2007; 고, 2008, 2009; 김, 2009; 장과 서, 2010). 특히 전라남도, 경상남도 등 남부 지역에서는 발견되는 서식지가 많을 뿐만 아니라, 개체수도 매우 많아 이들에 의한 생태계 훼손, 양식장 피해 등이 매우 심각한 수준으로 보고되었다(강과 윤, 1994; 최 등, 1998; 김과 고, 1998; 환경부, 2005). 언론보도에 대한 연구보고에서도 1980년대까지 황소개구리의 출현을 ‘길조’로 표현하기도 하였으나, 1992년 이후 황소개구리의 포식성과 생태계 피해 사례들이 알려지면서 황소개구리는 생태계 피해동물로 규정되기 시작하였고, 정부 및 지자체 차원의 퇴치운동이 벌어지기도 하였다(조, 2002).

4. 국내의 황소개구리 연구

우리나라에서 황소개구리에 대한 연구는 1970년대 황소개구리의 도입에 따른 양식과 생육특성에 대한 연구결과(김, 1972, 1973, 1975; 배, 1976)를 제외하면 대부분 국내 서식지 분포와 자연생태계에서 이용하는 먹이원 분석, 황소개구리 구제를 위한 포획법과 포획한 개체의 해결을 위한 이용 방법 등이 주를 이루고 있다(고 등, 1991; 강, 1992; 강과 윤, 1994; 최 등, 1998; 김과 고, 1998; 환경부, 2005; 오와 홍, 2007; 장과 서, 2010). 수생태계의 황소개구리를 대상으로 한 생화학적 분석을 통하여 수질오염 판단을 위한 기준으로 제공하고자하는 연구결과들도 보고되었다. 낙동강 수계에서 황소개구리 체내에 축적된 농약류 잔류물인 polychlorinated biphenyls의 함량이 붕어에 비해 22-47배 정도 낮은 수준이라고 하였고(문 등, 2003, 2004a, 2004b; 이 등, 2004a, b), 한강 수계에서는 붕어에 비해 황소개구리에 축적된 dioxin류의 함량이 낮다고 보고하였다(문 등, 2005). 한편, 영산강 수계에서 발견된 황소개구리의 뒷발의 결손이나 확장된 기형발생은

중금속 농도와 상관성이 있음을 보고하였다(이와 고, 2001). 또한 황소개구리의 vitellogenin에 대한 연구를 통해 낙동강, 금강 등 주로 수계의 수질상태와의 상관성 분석, 내분비기능 장애와의 관련성, vitellogenin-특이적 항체 개발을 통한 구제에 대한 연구결과들이 발표되기도 하였다(Lee et al., 2006; 정과 박, 2008; 정 등, 2008). 황소개구리의 발생과 생식에 대한 연구결과들은 발생과정 중 위장관에서 내분비물질에 대한 면역반응 세포들의 분포 및 특성에 관한 연구(이 등, 1998, 1999; 정과 이, 2001), 정자형성 관련 연구들(고와 이, 2001; 이와 박, 2005)이 보고되었다.

5. 황소개구리의 계통 유연관계 연구

황소개구리 집단의 모계에 대한 유전적 구조에 대한 연구 중, 이 등(2005)은 국내에 유입된 황소개구리의 분자계통에 대한 연구에서 광주광역시와 전라남도 나주시, 고흥군, 영암군, 장흥군의 5 개 지역에서 각각 수집한 총 11 개체에서 결정된 미토콘드리아 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) *NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1)* 유전자 서열들을 비교한 결과, 광주시-나주시-고흥군, 고흥군-영암군-장흥군 두 집단으로 구분되지만, 영암의 1 개체는 어느 집단에도 속하지 않고, 결정된 모든 서열이 미국에서 보고된 서열과도 다르며, 국내 개체들 간에도 차이가 있다고 하였다.

국외에서는 Austin et al. (2003b)이 북미산 *Rana* 속 개구리 종들의 mtDNA *cytochrome B (cytB)* 유전자와 *ND2* 서열의 다형성을 근거로 *Rana* 속의 진화에 관하여 연구한 결과를 보고하였고, 황소개구리의 광범위한 지리적 분포는 종 분화 이후 독립적인 분산에 의한 결과로 제안하였다. 또한 Austin et al. (2003a)은 microsatellite (MS) 유전자형 분석을 통해 황소개구리는 암컷-편향적 분산 (female-biased dispersal)의 유전적 증거를 제시하였다. MS 유전자형의 분포에 대한 연구결과를 토대로 Ontario 남부지역에서 수집한 황소개구리 집단들이 유전자의 흐름이 연속되어 있고, 인위적인 영향이 거의 없는 집단들이라고 하였다

(Austin et al., 2004a). 또한 Mississippi 강 동부지역인 미국의 중-동부 지역의 황소개구리 집단에서 mtDNA *cytochrome B* (*CYTB*) 유전자 서열이 총 41 개의 haplotype으로 나뉘고, 크게는 western lineage와 eastern lineage로 구분되며, western-eastern lineage의 분화는 1.86-2.48 백만 년 전(million years ago, MYA)으로 추정하였다(Austin et al., 2004b; Austin and Zamudio, 2008).

Ficetola et al. (2007)은 프랑스 서남부 지역의 2,500 개 이상의 습지에서 청음 조사를 통해 약 2,000km² 이상에서 황소개구리들이 발견되고, 유럽 내에서 강력한 확장력을 보이고 있으며, 적어도 25 회 이상 독립적인 유입이 있었다고 하였다. 반면, mtDNA *CYTB* 유전자 다형성을 근거로는 적어도 6 회 이상 유럽의 자연환경으로 황소개구리들이 독립적으로 유입되었고, 이후 2 차적인 확산과 인위적인 이동이 진행되었다고 판단하였다(Ficetola et al., 2008a). Ficetola et al. (2008b)은 환경 DNA(eDNA)에 대한 실험을 통해 황소개구리의 서식을 확인하기도 하였다. Kamath et al. (2016)은 *CYTB* haplotype의 빈도와 지리적 분포를 바탕으로 미국 Montana에서 도입한 집단들이 발견되었고, 특히 Yellowstone 강에서 유전자의 흐름이 서로 상이한 집단의 출현은 황소개구리 집단의 자연확산이 아니라 인간에 의한 이동(translocation)의 결과로 기술하였다.

6. 제주도의 황소개구리 분포 실태에 대한 연구

제주도에 황소개구리가 유입된 시기를 구체적으로 명시하고 있는 자료는 없으나, 1970년대 후반 대정읍 일대의 농가에서 식용개구리의 생산을 위해 처음으로 양식하기 시작한 것으로 알려져 있다(제주도 등, 2001). 그러나 육지부와 마찬가지로 경제적 타산성이 맞지 않아 농가에서의 양식은 실패하였고, 이후 방치된 개체들이 제주도 야생으로 분산된 것으로 추정하고 있다(제주도 등, 2001; 오, 2005; 오와 홍, 2007). 제주도 자연환경에서 황소개구리 발견은 임업연구원(1993)에 의해서 당시 남제주군과 북제주군에서 발견된다고 하였으나, 구체적인 장소는 기록되지 않았다. 이후 제주도 등(2001)은 현재의 제주시 지역에서 한경면 용수

리 용수저수지, 서귀포시 지역에서 대정읍 안성리 구멍물과 수월이못, 신도1리 맨처남물, 일과1리 옷못, 인성리 남문앞못, 보성리 봉우리못 등 총 7개 습지에 황소개구리가 발견되고, 연못과 하천 수로에서 서식하고 있다고 하였다. 고와 고(2005)는 용수저수지에 대한 양서류-과충류 조사에서 발견된 양서류 중 황소개구리가 57.7%에 이르는 우점종으로 출현하고, 용수저수지에서는 1990년대 중반부터 황소개구리가 관찰되었다고 하였다. 전국 단위의 황소개구리 분포 조사(강과 윤, 1994)에서 제주도에서는 제주시와 서귀포시에 황소개구리가 분포하지 않는다고 하였다. 오(2005)는 1988년에는 서귀포시 상호동과 남원읍, 제주시 수근동에서 각각 성체 1 개체가 포획된 바 있으나, 2005년도 조사 당시에는 발견되지 않았다고 하였으며, 남제주군(현 서귀포시) 안덕면 사계리에서 북제주군(현, 제주시) 한경면 두모리에 일대까지 총 24 개 지점에 분포한다고 하였다. 또한 대정읍 6 개 지점, 한경면 10 개 지점을 추가로 기록하였고, 안덕면 1 개 지점(사계리 군물)을 처음으로 기록하였다. 오와 홍(2007)은 제주도에 이입된 황소개구리와 붉은귀거북의 서식실태를 보고하였고, 황소개구리는 제주시 한경면, 서귀포시 대정읍, 안덕면 지역에 분포하고 있으며, 서식조건이 좋아 자연감소보다는 다른 지역으로의 확산뿐만 아니라 토종 어류, 양서류, 과충류에 대한 피해도 예측되어 구제가 필요하다고 하였다. 고 등 (2009)은 2004년부터 2008년까지 5년간 조사에서 제주도에 2 목(order) 5 과(family) 7 종의 양서류가 서식하고 있으며, 이 중 이입종인 황소개구리가 제주도 남서부(한경면, 대정읍, 안덕면)뿐만 아니라, 남동부 2 개 지역에서도 관찰되며, 자연적인 확산보다는 인간활동에 의해 성체나 올챙이가 이주되었을 가능성이 더 높다고 하였다. 우리나라 양서류의 분포에 관한 연구에서 김(2009), 양 등(2001)의 자료를 인용하여 제주도에 황소개구리가 서식한다고 하였으나, 장과 서(2010)는 제2차 전국자연환경조사 결과에서 제주도에 황소개구리가 관찰되지 않는다고 하였다. 한편, 김과 박(2011)은 한라산국립공원 내에 위치한 물장오리오름습지 내에서 황소개구리 올챙이를 발견하여 피해방지를 위한 구제가 필요하다고 제안하였다. 하지만 2012년 이후의 조사에서는 관찰되지 않는 것으로 보고되고 있다(제주녹색환경지원센터, 2013). 제주도 내륙습지에 대한 DB 구축에 대한 연구과정에서 오(2013)는 황소개구리 서식지 16 개 지점을 기록하였다. 최근 제주양서류생태연구소(2015)의 보고에서는 제주도 내 36 개 지

점에 황소개구리가 관찰되는데, 이 중 대정읍 6 개, 한경면 3 개 지점은 추가로 확인된 지점이었다. 국립생태원(2015)은 제주도 내에서 황소개구리가 21 개 지점에 서식한다고 보고하였다.

7. 연구의 목적

제주도에서 발견되고 있는 황소개구리에 대한 연구는 몇몇 습지에서 황소개구리가 서식한다는 보고를 제외하면, 제주도 황소개구리의 외부형태, 번식생태, 먹이원 등 일반적인 생물학적 특성뿐만 아니라 각 지역에서 발견되고 있는 집단 간의 혈연관계나 계통 특성에 대한 과학적인 자료는 마련되고 있지 않다. 이에 본 연구에서는 제주도 내의 자연 상태에 서식하고 있는 황소개구리의 서식상태와 서식지의 변화, 생물학적 특성과 유전적 구조와 집단 확산에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다. 이를 위해 2015년 3월부터 2017년 4월까지 서식지 현황에 대한 조사와 수집된 황소개구리의 외부 형태적 특성 분석, 서식지별로 수집된 황소개구리 올챙이의 형태적 특성과 서식지 환경의 상관관계, mtDNA의 *CYTB*, *ND1* 유전자 서열의 haplotype의 유형과 분포를 바탕으로 한 서식지와 유전자 흐름의 상관관계를 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 조사 지역 및 조사 기간

제주도에 유입된 황소개구리의 분포를 조사하기 위하여 2015년 3월부터 2017년 4월까지, 제주도 전역에 위치하는 총 320 개 지점의 습지(Figure 1)를 조사 대상으로 하여 서식 실태 모니터링과 서식지별 중점조사를 수행하였다.

2. 서식 실태 모니터링 조사와 중점조사

서식 실태 모니터링은 2015년 3월부터 2016년 4월까지 수행하였고, 모니터링은 모든 조사지를 2 회 이상 방문하여 성체와 올챙이의 서식 여부를 확인하였다. 모니터링은 조사원 2 인 이상이 동시에 실시하였으며, 선조사법(line census)과 정점조사법(point count)을 동시에 진행하였다. 모니터링 조사에서 황소개구리가 1 회 이상 발견된 지점, 주민 청문조사에서 확인된 지점, 기존문헌(제주도 등, 2001; 오, 2005, 2012; 오와 홍, 2007; 고 등, 2009; 제주양서류생태연구소, 2015; 국립생태원, 2015)에 제시된 지점들은 모두 중점조사 지점으로 선정하였다. 또한 모니터링 과정에서 황소개구리가 확인된 경우, 인근 지역에 위치한 농지 내 웅덩이와 저류지, 농수로 등 습지에 대한 조사를 추가하였다. 중점조사는 2016년 5-6월, 7-8월, 9-10월, 11-12월, 2017년 1-2월에 각각 1 회씩 총 5 회 조사하였고, 2017년 3월과 4월에는 각각 1 회씩 추가 조사하였다. 여름철 조사 시에는 주간 조사와 야간 조사를 병행하였다.

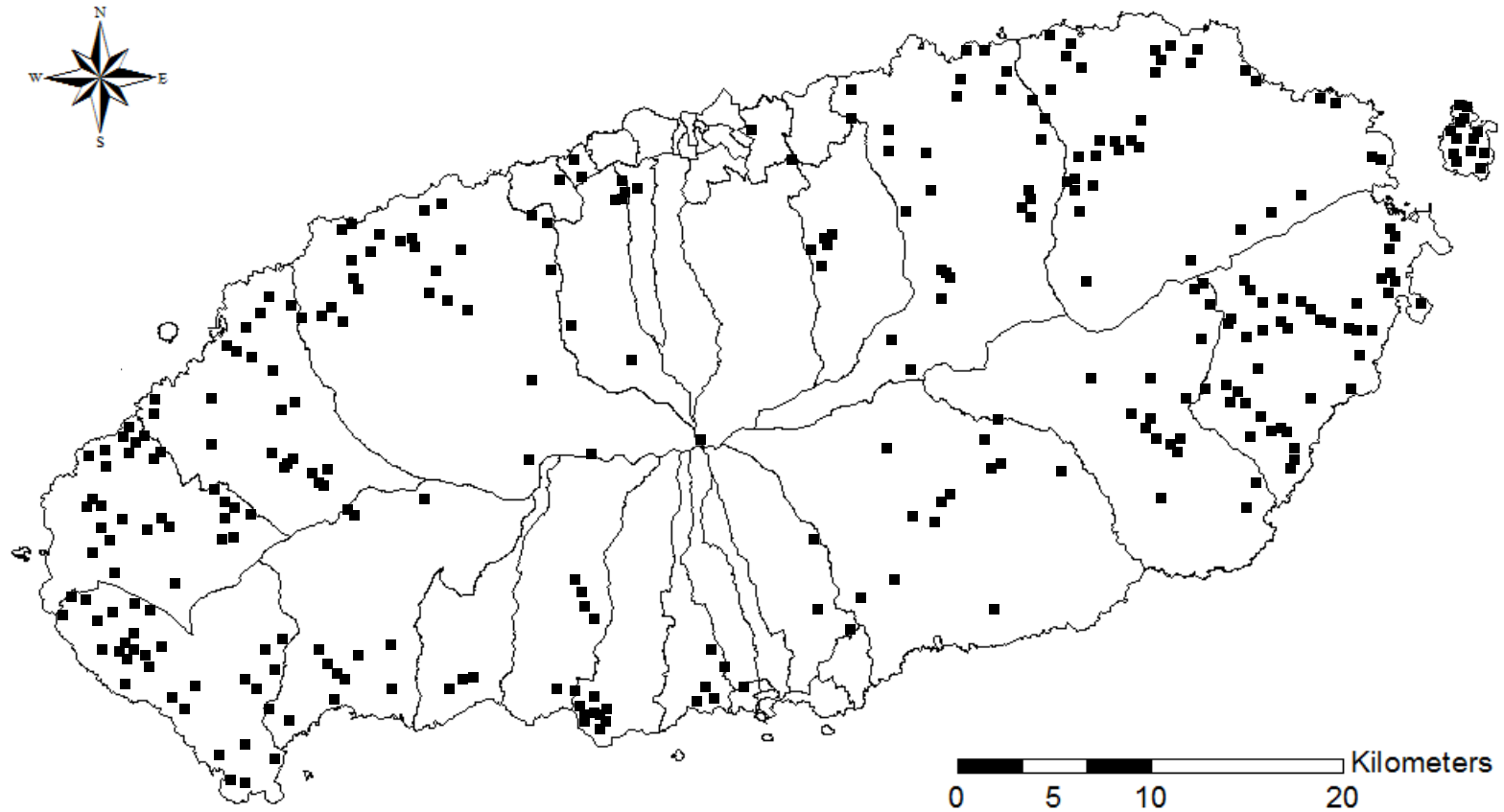


Figure 1. Preliminary monitoring sites for the American bullfrogs in Jeju Island. All wetlands described in Oh (2013) were screened for the American bullfrogs from March, 2015 to April, 2017. Squares indicates each monitoring sites. Detail information of each monitoring site was recorded in Oh (2013).

3. 개체수 확인

서식지 별 황소개구리 개체 수 확인은 동일습지에서 2 인 이상이 육안관찰과 쌍안경(Ziess, 8×42)을 이용하여 계수하였다. 황소개구리 성체 수는 습지별, 계절별로 각각 1 회 이상, 총 3 회씩 계수하고, 조사회수와 상관없이 지역별로 최대 개체수를 선정하였다. 성체는 직접 관찰된 개체수로 나타내었다. 올챙이의 수는 +(1 분 동안 1m²에서 관찰된 올챙이의 수가 9 개체 이하), ++(10 개체 이상-19 개체 이하), +++(20 개체 이상)로 구분하였고, 한 습지 내 3 개 장소에서 계수한 후 평균값을 이용하여 표시하였다. 황소개구리의 성체와 올챙이의 구분은 Gosner (1960)의 개구리 발생단계의 분류를 따랐다. 성체 계수에는 직접 관찰과 청음조사 자료를 이용하였고, 지역주민 청문조사 결과는 반영하지 않았다.

4. 시료 수집 및 외부 형태 측정

황소개구리 성체와 올챙이에 대한 외부 형태 측정은 동면이 끝난 2017년 1월 부터 3월까지에만 국한하였다. 황소개구리 성체와 황소개구리 올챙이는 통발과 손 뜯채를 이용하여 채집하였다. 수집한 시료는 살아있는 상태에서 실험실로 옮긴 후, 외부 형태를 측정하였다. 측정한 형질은 체중(body weight, BW), 몸 전체 길이(total body length, TBL), 주둥이-항문 길이(snout-vent length, SVL), 뒷발의 길이(hindfoot length, HFL), 앞발의 길이(forefoot length, FFL)를 측정하였다(Figure 2A). 올챙이는 BW, TBL, 머리 길이(head length, HL), 꼬리 길이(tail length, TL), 뒷다리의 길이(hindlimb length, HLL)을 측정하였다(Figure 2B). 해부실험 중 성체에 대한 암-수 판단은 혼인육지(nuptial pad)의 유무, 해부 시 알의 유무, 생식소의 종류를 기준으로 판단하였다. 성체와 올챙이에 대한 측정 시 신체기형이나 단순 출현 이외의 상흔이 있는 경우는 제외하였다.

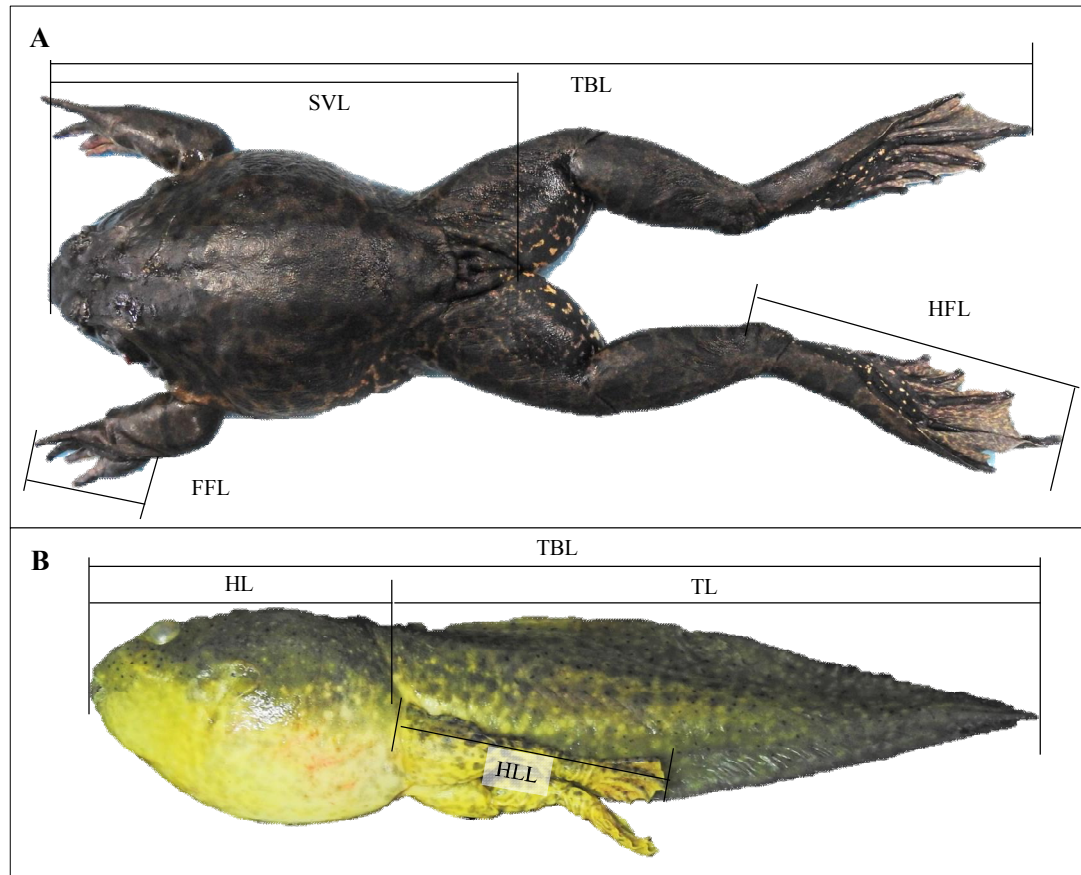


Figure 2. External measurement of the adult and tadpole of American bullfrogs. A, adult; B, tadpole. Measuring methods for each character are given the Materials and Methods. TBL, total body length; SVL, snout-vent length; HFL, hindfoot length; FFL, forefoot length; HL, head length, TL, tail length; HLL, hindlimb length.

5. 통계 분석

황소개구리 성체와 올챙이 외부 형태를 비교하기 위하여, 측정값의 평균을 이용한 통계 분석을 수행하였다. 성체의 암-수간 성적 이형(sexual dimorphism)의 유무는 형질별로 산출된 평균값을 student t-test를 이용하여 분석하였고, 유의적 차이는 95% 신뢰수준에서 판독하였다. 황소개구리 올챙이는 13 개의 서식지에서 수집되었고, 이 중 올챙이가 10 개체 이상 수집된 8 개 서식지에서 측정된 자료를 비교하였다. 서식지간 비교는 일원배치 분산분석(one-way analysis of variation, ANOVA)를 사용하였고, 유의적인 차이는 95% 신뢰수준에서 판독하였다. 집단 간 다중비교는 Tukey의 HSD 검정법(Tukey, 1949)으로 비교하였다. 모든 통계 분석은 SPSS Statistics 19 (IBM Inc., USA)를 이용하였다.

6. Genomic DNA 분리

수집한 시료 중 성체는 간(liver)이나 뒷다리 근육을 채취하여 DNA 분리에 이용하였고 올챙이는 꼬리의 일부를 절개하여 이용하였다. 유전자 서열의 다형성 비교에서 지역별 비교를 위하여, 물장오리오름습지(RCA055)와 한경면 용수리 용당못(RCA090)의 시료(김과 박, 2001)와 경상남도 마산시와 창녕군에서 채집된 시료는 제주대학교 과학교육과 동물표본실에 보관중인 표본의 일부를 절개하여 DNA 분리에 이용하였다. DNA 분리는 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, USA)를 이용하여 0.2 g 시료를 1.5 ml microtube에 옮긴 후 ATL 180 ul, proteinase K (10 mg/ml) 20 ul를 첨가하고 56°C 항온수조에서 조직이 용해될 때까지 배양하였다. 용해된 수용액에 200 ul의 AL buffer를 첨가하여 56°C에서 10 분간 반응시켰다. 반응이 끝난 수용액에 200 ul 에탄올을 가한 후 혼합하고, 원심분리하여 상층액만을 DNA micro-spin column에 옮겼다. Membrane-filter에

부착된 DNA는 AW1과 AW2로 세척하고, TE buffer (10 mM Tris, pH 7.2; 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 회수하였다. 준비한 DNA는 Nanodrop N-1500 (NanoDrop technologies Co., USA)으로 순도와 양을 측정한 후, A260/A280, A260/A230이 모두 1.8 이상인 DNA를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 위한 주형으로 이용하였다.

7. mtDNA *CYTB*, *ND1* 유전자 절편에 대한 PCR 증폭

추출한 DNA를 주형으로 황소개구리 *CYTB*와 *ND1* 유전자 절편에 대한 염기 서열을 얻기 위한 PCR을 수행하였다. 유전자 증폭을 위한 primer는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 중국과 일본에서 보고된 황소개구리 미토콘드리아 유전체 전체 서열(AB761267, KF049927)을 이용하여 Primer3 web program (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)으로 고안하였다(Table 1). PCR 반응은 Maxime™ i-StarTaq PCR Premix (iNtRON Biotechnology, South Korea)에 50-100 ng의 genomic DNA와 primer를 각각 1 ul씩 넣고, 증류수를 첨가하여 최종 20 ul로 반응하였다. 반응액을 94°C에서 3 분간 변성 시킨 후, 94°C에서 45 초, 55°C에서 45 초, 72°C에서 1 분으로 하는 연속 반응을 40 회 반복하였다. 72°C에서 5 분간 최종 신장하였고, Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany)를 이용하여 증폭하였다.

8. DNA 서열 결정

PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 UV image analyzer로 확인

하였다. 증폭된 PCR 산물은 QIAexII Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)를 이용하여 정제하고, PCR 반응에서 사용한 primer와 DYEnamic ET-Dye Terminator Kit (GE Healthcare, USA)을 이용하여 DNA sequencing을 위한 ddNTP dye-termination 반응을 수행하였다. DNA sequencing 반응액은 MegaBace1000 (Amersham Pharmacia, USA)을 이용하여 전개하고, 염기서열을 결정하였다. 결정된 서열은 BioEdit ver. 7.2.5 (Hall, 1998)을 이용하여 염기서열의 분석 상태와 변이 서열의 출현 상태를 재확인하였다.

9. 모계 혈통 구조와 유전적 다양성 분석

유전자 서열 분석을 통해 결정된 *ND1* 서열을 이용하여 모계 혈통 구조를 분석하였다. 채집한 황소개구리 시료에서 *ND1* 유전자 절편을 PCR로 증폭하고 DNA 염기서열을 결정하였다. 또한 모계 혈통 구조를 미국 집단과 비교하기 위하여 *CYTB* 유전자 서열을 분석하였다. *CYTB* 유전자의 다형성과 유전적 모계 혈통 분석에 이용한 *ND1* 유전자의 다형성의 연관(linkage) 여부를 수집한 모든 성체에 대한 염기서열을 비교하여 평가하였다. *ND1* haplotype에서 나타난 모든 다형성 변이 서열들은 *CYTB* 유전자와 완전히 연관되어 있었다. 제주도(n=44)와 경상남도 마산시(n=3), 창녕군(n=4)에서 수집한 황소개구리 51 개체에서 *CYTB* 유전자 서열을 PCR로 증폭하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 결정된 *ND1*, *CYTB* 염기서열들은 BioEdit ver. 7.2.5 (Hall, 1998)로 확인하고, NCBI database에서 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 검색을 통해 기존에 보고된 서열과 비교하였다. 결정된 서열들을 BioEdit ver. 7.2.5 (Hall, 1998)로 확인한 후, CLUSTAL W program (Larkin et al., 2007)로 다중정렬하고, DnaSP v5 (Librado and Rozas, 2009)를 이용하여 haplotype을 결정하였다. 서식지별로 결정된 haplotype의 다양성(haplotype diversity, *Hd*)와 염기서열의 다양성(nucleotide diversity, π), 중립성 검정(neutrality test)은 Tajima's D 값을 산출하여 분석하였다.

Table 1. PCR primers for *CYTb* and *ND1* genes in the American bullfrogs used in this study

Gene	Name	Sequences (5'→3')	PCR product length (bp)
<i>CYTb</i>	CYTb_F	GAA AAT CCC ACC CCC TTC TTA	948
	CYTb_R	CAA TTG GGC GGA ATA TGA GTG	
<i>ND1</i>	ND1_F	TGC TCC TAT TCT CCT CGC AG	802
	ND1_R	TCG TGG ATA TGA AGC TCG GA	

10. 계통 유연관계 분석

결정된 haplotype에 대한 계통 유연관계의 분석은 MEGA 7.0.14 program (Kumar et al., 2016)을 이용하였다. 유전적 거리지수는 best model test 적용하여 선정된 TN92: Tajima-Nei's model (Tajima and Nei, 1984)로 산출하였다. 계통수 작성은 산출된 거리지수를 바탕으로 neighbor-joining (NJ) (Saitoh and Nei, 1987) tree를 작성하였다. 분화시간(divergence time)의 측정은 Austin and Zamudio (2008)의 보고에 제시된 자료에 준하였다. 1백만년당 염기변이율은 Martin and Palumbi (1993)이 제시한 변온동물 내에서의 느린 염기변이 수준(0.69%)과 빠른 염기변이 수준(2.4%)을 근거로 산출하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 황소개구리 서식지의 지리적 분포

제주도 내 내륙습지 320 개 지점에 대한 모니터링과 정밀조사를 통해 확인한 황소개구리 서식지는 총 109 개 지점이었다(Table 2, Figure 3). 지역별로는 제주시 55 개, 서귀포시 54 개 지점에서 발견되었다. 제주시 지역은 한경면에서 55개 지점을 확인하였고, 한림읍, 애월읍, 조천읍, 구좌읍에서는 관찰되지 않았다. 제주시 동 지역에서는 황소개구리의 서식이 확인되지 않았으나, 김과 박(2011)이 봉개동 소재의 물장오리오름습지(RCA055)에서 황소개구리 올챙이에 대한 관찰과 채집을 기록한 바 있어, 서식 지점에 포함하였다. 서귀포시 지역은 대정읍 49 개, 안덕면 3 개, 남원읍 2 개 지점 등 총 54개 지점에서 관찰되었고, 서귀포시 동 지역, 표선면, 성산읍에서는 관찰되지 않았다. 물장오리오름습지를 포함한 전체 110 개 지점 중 107 개 지점은 제주도 서부권(제주시 한경면, 서귀포시 대정읍, 안덕면)에 편중된 분포를 보였고, 중부권인 제주시 봉개동 1개 지점과 남원읍 2 개 지점에서 발견되었다.

2. 황소개구리 서식지 유형

황소개구리가 발견된 지점들은 다양한 환경에서 발견되었다. 주로 사람들이 거주하는 마을 인근에 위치한 연못이나 수로에서 발견되었으나, 농업용 저류지, 농지나 도로 변에 위치한 웅덩이와 농업용수로, 오름 정상에 위치한 분화구습지, 야초지나 꽃자왈 주변에 위치한 소택지 등에서도 관찰되었고, 이동 중이거나 휴식중인 개체들이 도로나 마른 초지에서 발견되기도 하였다(Figure 6).

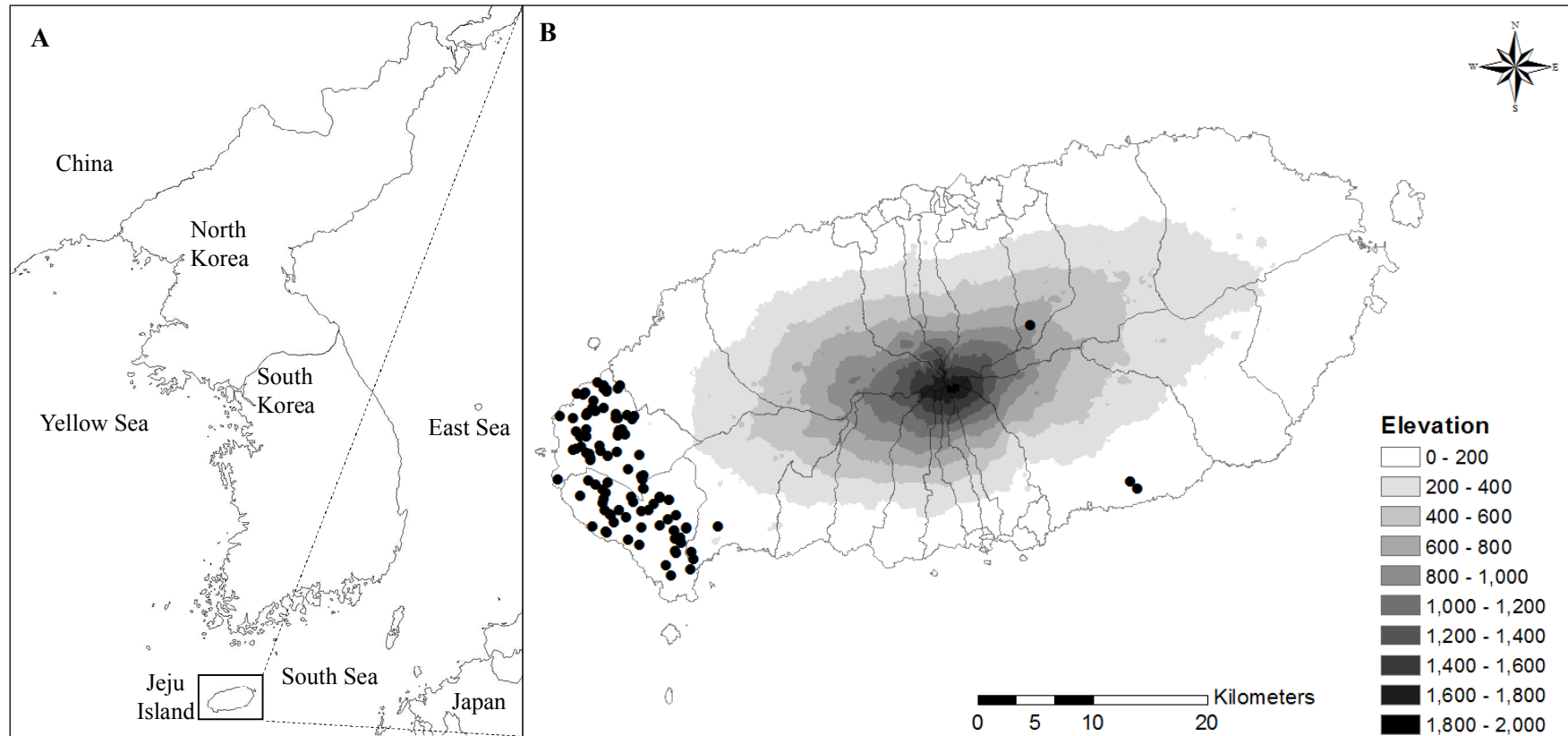


Figure 3. Observation sites of American bullfrogs in Jeju Island. A, Location of study area; B, geographical distribution of the finding sites of the American bullfrogs in this study. Dots on the map indicate each finding site of the American bullfrog. All information of each finding site are detailed in Table 2.

Table 2. Observation sites of the American bullfrogs in Jeju Island

Site no.	Coordinate	Province	No. of bullfrog found		Reference**						
			A ¹	T ^{2*}	2001	2007	2009 [†]	2011 [‡]	2013	2015	This study
RCA001	33° 16' 51.11"N 126° 42' 31.13"E	Namwon-ri, Namwon-eup, Seogwipo-si	11	+++			0			0	0
RCA002	33° 17' 10.81"N 126° 42' 05.69"E	Namwon-ri, Namwon-eup, Seogwipo-si	3	+			0			0	0
RCA003	33° 15' 41.26"N 126° 14' 45.18"E	Dongil-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	10	++							0
RCA004	33° 14' 55.51"N 126° 14' 47.51"E	Dongil-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	8			0					0
RCA005	33° 16' 45.51"N 126° 14' 51.65"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2							0	0
RCA006	33° 16' 42.93"N 126° 14' 52.61"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	1			0				0	0
RCA007	33° 17' 10.14"N 126° 14' 50.59"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2	+							0
RCA008	33° 17' 21.81"N 126° 14' 51.75"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	24	+++		0				0	0
RCA009	33° 16' 5.75"N 126° 14' 19.48"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	6	++						0	0
RCA010	33° 16' 20.02"N 126° 14' 11.12"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	33	+++						0	0
RCA011	33° 16' 32.10"N 126° 12' 46.61"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	3			0					0
RCA012	33° 16' 4.27"N 126° 12' 36.89"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	4	++						0	0
RCA013	33° 16' 13.89"N 126° 12' 38.31"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	6	+++		0				0	0
RCA014	33° 16' 40.85"N 126° 12' 35.86"E	Mureung-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	24	+++							0
RCA015	33° 16' 12.58"N 126° 16' 19.36"E	Boseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	7	+++							0
RCA016	33° 16' 13.54"N 126° 16' 18.87"E	Boseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	4	+							0
RCA017	33° 15' 18.69"N 126° 16' 16.03"E	Boseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	8	+++	0	0				0	0
RCA018	33° 15' 2.17"N 126° 15' 49.81"E	Boseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2								0
RCA019	33° 12' 58.02"N 126° 17' 32.43"E	Sangmo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	4	+							0
RCA020	33° 14' 15.40"N 126° 16' 58.30"E	Sangmo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2								0
RCA021	33° 14' 11.99"N 126° 17' 00.78"E	Sangmo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2								0
RCA022	33° 14' 27.91"N 126° 16' 58.77"E	Sangmo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	3	+						0	0
RCA023	33° 13' 48.48"N 126° 16' 39.67"E	Sangmo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	5								0
RCA024	33° 13' 45.19"N 126° 16' 44.13"E	Sangmo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	4	+++						0	0
RCA025	33° 12' 41.92"N 126° 16' 26.53"E	Sangmo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2	+							0
RCA026	33° 13' 10.19"N 126° 16' 11.39"E	Sangmo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	11	+++						0	0
RCA027	33° 17' 01.11"N 126° 12' 54.03"E	Sindo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	7	+++		0					0
RCA028	33° 16' 55.81"N 126° 12' 11.55"E	Sindo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	12	+++							0
RCA029	33° 17' 6.49"N 126° 11' 47.49"E	Sindo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	11		0	0				0	0
RCA030	33° 16' 22.20"N 126° 11' 19.99"E	Sindo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2	+							0
RCA031	33° 16' 2.55"N 126° 15' 28.74"E	Sinpyeong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	20	+++						0	0
RCA032	33° 15' 44.49"N 126° 15' 9.39"E	Sinpyeong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	12	++						0	0
RCA033	33° 16' 18.06"N 126° 15' 49.60"E	Sinpyeong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	26	+++						0	0

Table 2. Continued

Site no.	Coordinate	Province	No. of bullfrog found		Reference**					This study	
			A ¹	T ^{2*}	2001	2007	2009 [†]	2011 [‡]	2013		2015
RCA034	33° 16' 20.38"N 126° 15' 48.14"E	Sinpyeong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	6	+							0
RCA035	33° 14' 55.72"N 126° 17' 17.65"E	Anseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	32	+							0
RCA036	33° 14' 53.45"N 126° 17' 16.98"E	Anseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	3	+++							0
RCA037	33° 15' 30.18"N 126° 16' 43.51"E	Anseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	6	+	0	0			0	0	0
RCA038	33° 15' 42.09"N 126° 13' 31.54"E	Yeongrak-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2	++							0
RCA039	33° 15' 29.46"N 126° 13' 4.83"E	Yeongrak-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	1								0
RCA040	33° 15' 10.08"N 126° 13' 13.69"E	Yeongrak-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	4	++							0
RCA041	33° 14' 40.67"N 126° 12' 49.95"E	Yeongrak-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	1								0
RCA042	33° 14' 43.29"N 126° 12' 45.93"E	Yeongrak-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	1								0
RCA043	33° 15' 31.24"N 126° 13' 1.81"E	Yeongrak-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2								0
RCA044	33° 15' 43.90"N 126° 12' 42.04"E	Yeongrak-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	8	+							0
RCA045	33° 14' 57.31"N 126° 12' 3.22"E	Yeongrak-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2								0
RCA046	33° 14' 48.33"N 126° 16' 34.87"E	Inseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	22	+++	0	0				0	0
RCA047	33° 14' 47.84"N 126° 16' 37.34"E	Inseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	11	+++						0	0
RCA048	33° 14' 22.73"N 126° 16' 38.78"E	Inseong-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	2	+	0	0			0	0	0
RCA049	33° 14' 06.12"N 126° 14' 39.65"E	Ilgwa-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	4	+	0				0	0	0
RCA050	33° 15' 22.82"N 126° 13' 54.44"E	Ilgwa-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	5	++							0
RCA051	33° 14' 21.63"N 126° 14' 2.79"E	Ilgwa-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si	4						0		0
RCA052	33° 15' 0.19"N 126° 19' 02.99"E	Sagye-ri, Andeok-myeon, Seogwipo-si	18	+++	0					0	0
RCA053	33° 13' 45.93"N 126° 17' 35.11"E	Sagye-ri, Andeok-myeon, Seogwipo-si	1								0
RCA054	33° 13' 27.27"N 126° 17' 40.82"E	Sagye-ri, Andeok-myeon, Seogwipo-si	4	+							0
RCA055	33° 24' 30.43"N 126° 36' 27.40"E	Bonggae-dong Jeju-si		+					0		
RCA056	33° 18' 44.32"N 126° 12' 24.27"E	Gosan-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	12	+++							0
RCA057	33° 18' 04.28"N 126° 11' 55.35"E	Gosan-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	4	+							0
RCA058	33° 18' 10.08"N 126° 11' 52.65"E	Gosan-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2	+							0
RCA059	33° 18' 20.40"N 126° 11' 51.95"E	Gosan-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	1								0
RCA060	33° 18' 41.21"N 126° 11' 24.07"E	Gosan-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	12	+++						0	0
RCA061	33° 18' 24.62"N 126° 11' 38.96"E	Gosan-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	23	+++							0
RCA062	33° 18' 33.40"N 126° 10' 56.86"E	Gosan-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	11	+++							0
RCA063	33° 17' 08.01"N 126° 10' 4.75"E	Gosan-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	8	+							0
RCA064	33° 20' 51.47"N 126° 12' 2.28"E	Geumdeung-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2								0
RCA065	33° 19' 59.89"N 126° 14' 14.31"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	4	++	0					0	0
RCA066	33° 19' 16.44"N 126° 13' 48.23"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2								0

Table 2. Continued

Site no.	Coordinate	Province	No. of bullfrog found		Reference**							
			A ¹	T ^{2*}	2001	2007	2009 [†]	2011 [†]	2013	2015	This study	
RCA067	33° 19' 18.41"N 126° 13' 44.80"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2	+		0					0	0
RCA068	33° 19' 19.20"N 126° 13' 42.67"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	3									0
RCA069	33° 19' 19.92"N 126° 13' 44.02"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2	++		0						0
RCA070	33° 19' 32.09"N 126° 13' 39.53"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2	++								0
RCA071	33° 19' 28.45"N 126° 13' 29.44"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	14	+++		0					0	0
RCA072	33° 19' 20.11"N 126° 13' 36.39"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	40	+++							0	0
RCA073	33° 19' 17.06"N 126° 13' 27.04"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	1									0
RCA074	33° 19' 14.80"N 126° 13' 26.73"E	Nakcheon-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2									0
RCA075	33° 20' 31.97"N 126° 12' 38.25"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	4	+		0						0
RCA076	33° 20' 30.41"N 126° 11' 58.45"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	3	++								0
RCA077	33° 20' 27.23"N 126° 12' 02.75"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	12	+++								0
RCA078	33° 20' 22.69"N 126° 12' 10.30"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	3	+								0
RCA079	33° 19' 30.51"N 126° 11' 40.31"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2	+						0		0
RCA080	33° 20' 13.42"N 126° 11' 43.01"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	30	+++						0	0	0
RCA081	33° 20' 15.73"N 126° 11' 41.37"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2	+						0	0	0
RCA082	33° 20' 11.38"N 126° 11' 40.81"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	12	++						0	0	0
RCA083	33° 21' 13.02"N 126° 11' 33.76"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	6	+++		0						0
RCA084	33° 21' 07.62"N 126° 11' 26.97"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	4			0						0
RCA085	33° 21' 11.37"N 126° 11' 8.84"E	Dumo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	4			0						0
RCA086	33° 18' 35.59"N 126° 11' 6.22"E	Yongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2									0
RCA087	33° 19' 10.00"N 126° 11' 17.92"E	Yongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	25	+++	0	0				0		0
RCA088	33° 19' 11.02"N 126° 11' 40.55"E	Yongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	4								0	0
RCA089	33° 20' 01.78"N 126° 10' 55.99"E	Yongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	12	+++							0	0
RCA090	33° 19' 24.39"N 126° 11' 05.04"E	Yongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	5	+++						0	0	0
RCA091	33° 20' 06.62"N 126° 10' 11.32"E	Yongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	20	++								0
RCA092	33° 20' 09.66"N 126° 14' 19.40"E	Josu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2	+								0
RCA093	33° 20' 10.42"N 126° 13' 55.85"E	Josu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	3	+								0
RCA094	33° 20' 01.02"N 126° 13' 19.41"E	Josu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	10	+++								0
RCA095	33° 20' 01.88"N 126° 13' 24.21"E	Josu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	4	+								0
RCA096	33° 20' 14.43"N 126° 13' 17.48"E	Josu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	35	+++								0
RCA097	33° 18' 30.50"N 126° 12' 28.51"E	Josu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	6			0						0
RCA098	33° 18' 16.07"N 126° 12' 53.65"E	Josu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2			0						0
RCA099	33° 18' 26.19"N 126° 13' 22.30"E	Josu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	4	+++								0

Table 2. Continued

Site no.	Coordinate	Province	No. of bullfrog found		Reference**							
			A ¹	T ² *	2001	2007	2009 [†]	2011 [‡]	2013	2015	This study	
RCA100	33° 17' 17.78"N 126° 14' 44.23"E	Cheongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	10	+++								0
RCA101	33° 17' 17.72"N 126° 14' 47.03"E	Cheongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2	+								0
RCA102	33° 18' 19.94"N 126° 14' 38.81"E	Cheongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	3	+++								0
RCA103	33° 17' 38.94"N 126° 13' 59.51"E	Cheongsu-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	6	+++		0					0	0
RCA104	33° 21' 26.24"N 126° 13' 23.83"E	Panpo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	3	+								0
RCA105	33° 21' 34.54"N 126° 13' 32.85"E	Panpo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	3									0
RCA106	33° 21' 17.83"N 126° 12' 45.50"E	Panpo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2	+								0
RCA107	33° 21' 22.74"N 126° 12' 47.90"E	Panpo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	15	+++					0	0		0
RCA108	33° 21' 43.56"N 126° 12' 17.46"E	Panpo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	2									0
RCA109	33° 21' 32.71"N 126° 12' 36.47"E	Panpo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	12									0
RCA110	33° 21' 26.02"N 126° 12' 35.60"E	Panpo-ri, Hankyeong-myeon, Jeju-si	11	++								0
Overall			109	79	7	24	2	1	16	36		109

¹, adult; ², tadpole

^{*}, calculated using density values by the method described in the Materials and Methods section.

^{**}, 2001, Jejudo et al. (2001); 2007, Oh ad Hong (2007); 2009, Koh et al., (2009); 2011, Kim and Park (2011); 2015, Institute of Jeju Amphibian Ecology (2015).

[†], was just described these two sites as new.

[‡], has reported by the special field survey for this wetland.

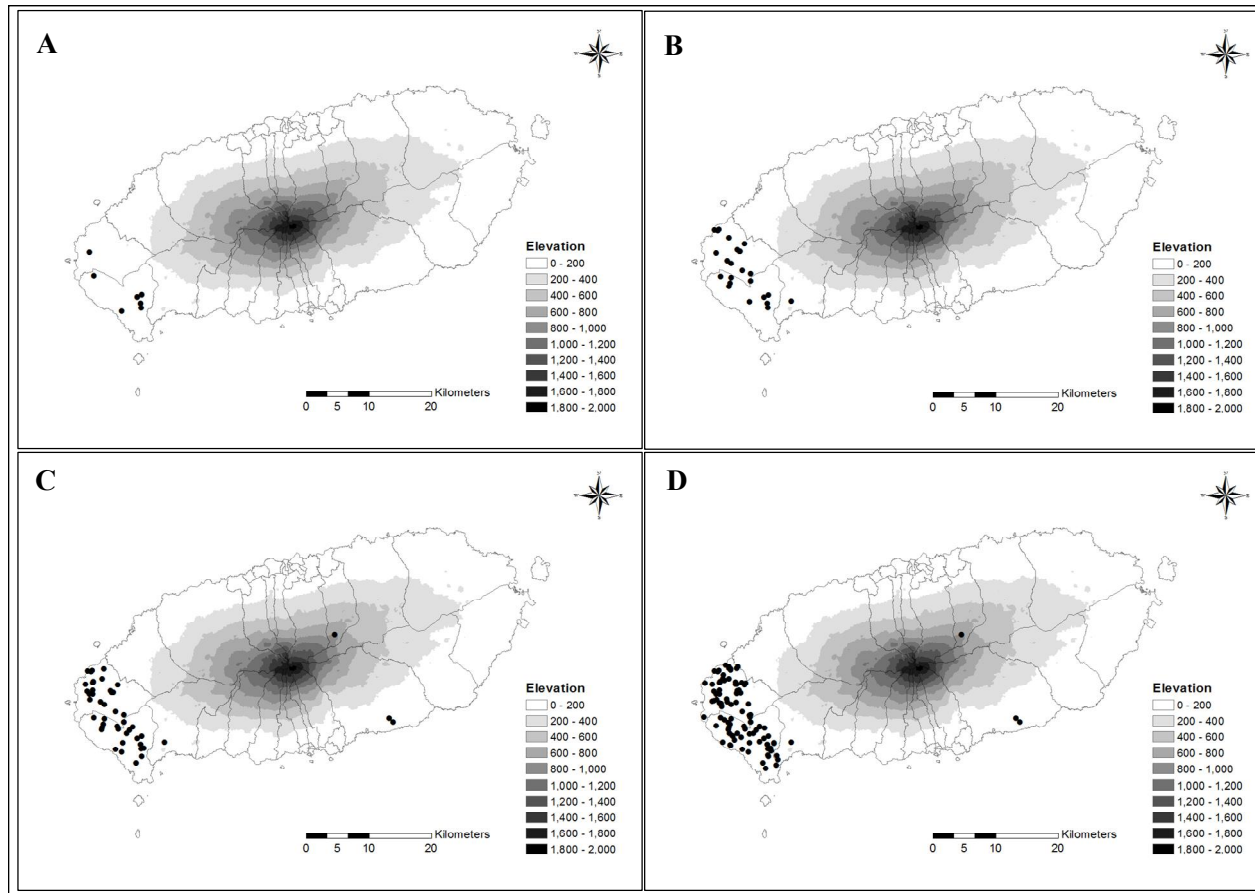


Figure 4. Comparison of the finding sites of the American bullfrogs in Jeju Island. A, Jeju-do et al. (2001); B, Oh and Hong (2007); C, the gross of the results from 2001 to 2015; D, this study.

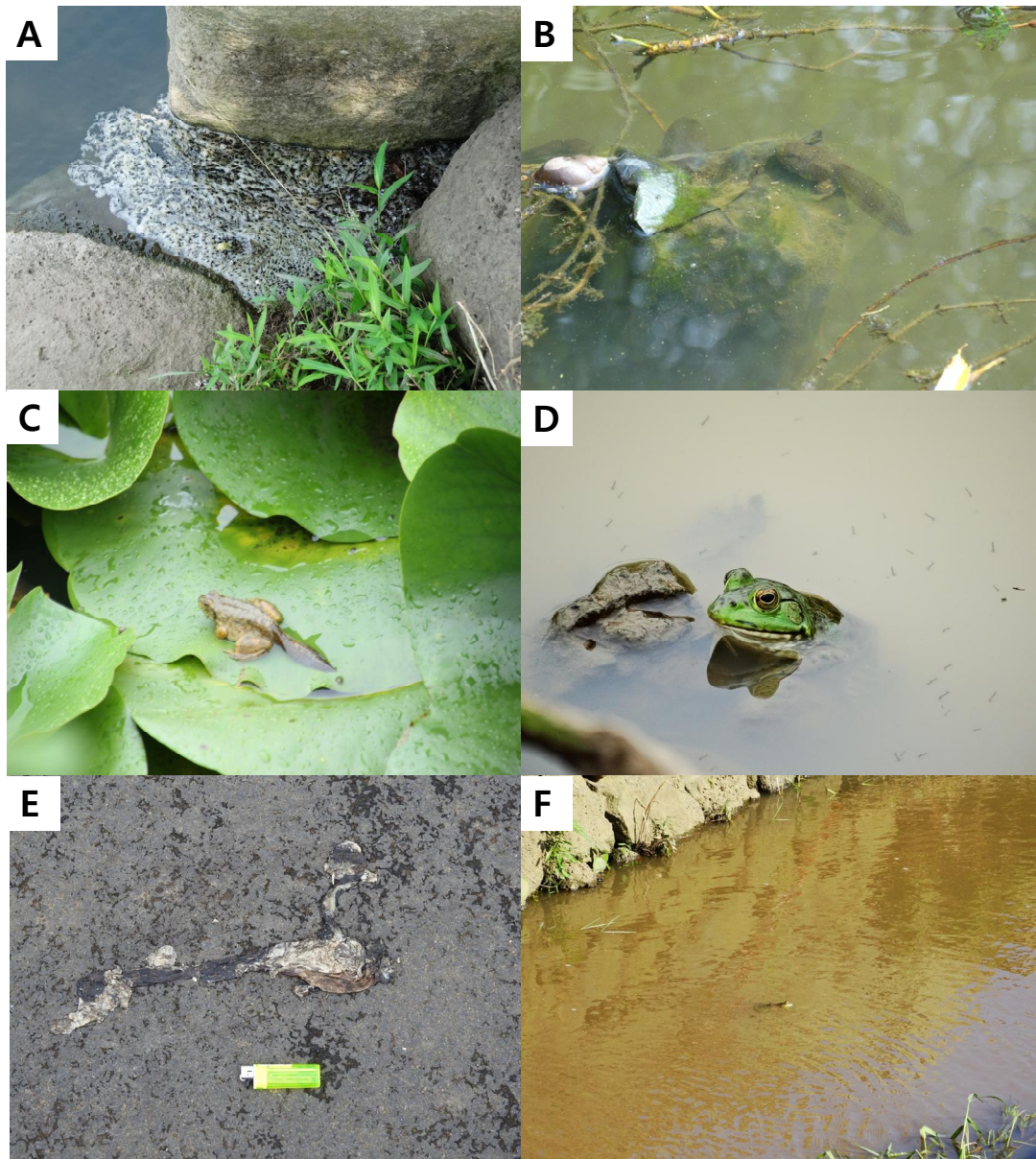


Figure 5. American bullfrogs found in this study. A, egg-crutch spawned; B, tadpole in the pond; C, tadpole under metamorphosis; D, adult female; E, bullfrog roadkilled on the motorway; F, adult bullfrog floating in the stream found in July 14th, 2016.

Table 3은 황소개구리가 관찰된 110개 서식지를 크게 연못, 분화구습지, 저류지, 농수로, 웅덩이, 소택지 등 6 가지 유형으로 구분하여 나타낸 결과이다. 서식지 중에는 가장 높은 빈도를 나타낸 유형은 연못(Figure 6A)으로 총 60 개 지점(54.5%)에서 관찰되었다. 분화구습지(Figure 6B)는 물장오리오름습지 1 개 지점(0.9%)에서만 관찰되었고, 저류지(Figure 6C)는 17 개 지점(15.5%)에서 황소개구리가 서식하고 있었다. 농수로(Figure 6D)는 8 개 지점(7.3%), 웅덩이(Figure 6E)는 15 개 지점(13.6%), 소택지(Figure 6F)는 9 개 지점(8.2%)에서 황소개구리의 서식이 확인되었다.

지역별로 서식지 유형을 구분해 보면, 남원읍 지역은 광지못(RCA001)과 수은못(RCA002) 등 연못에서만 관찰되었고, 안덕면은 군물(RCA052)과 사계리 연못(RCA053) 등 연못 2 개 지점과 저류지(RCA054) 1 개 지점에서 황소개구리가 관찰되었다. 대정읍에서 발견된 서식지 중에서 23개 지점(46.9%)은 연못이었고, 저류지 9개 지점(18.4%), 웅덩이와 농수로 각각 7개 지점(14.3%), 소택지 3개 지점(6.1%)이었다. 환경면은 연못 33개 지점(60.0%), 웅덩이 8개 지점(14.5%), 저류지 7개 지점(12.7%), 소택지 6개 지점(10.9%), 농수로 1개 지점(1.8%)이었다.

3. 발견된 황소개구리의 개체수

각각의 황소개구리 발견지점에서 성체 개체수와 올챙이의 밀도를 계수하였다. 서식지별로 확인된 성체의 개체수는 Table 2에 제시하였다. Table 4는 황소개구리 성체가 관찰된 지점의 수와 개체수를 지역별로 구분한 것이다.

전체 109 개 지점에서 발견된 황소개구리 성체는 총 852 개체였다. 지역별로 보면, 제주시 환경면에서 55 개 지점에서 432 개체로 가장 많이 발견되었다. 서귀포시 대정읍에서는 49 개 지점에서 총 383 개체의 성체가 관찰되었다. 안덕면에서는 3 개 지점에서 23 개체, 남원읍에서는 2 개 지점에서 14 개체의 성체가 발견되었다. 제주시 봉개동의 경우 김과 박(2011)에 의한 올챙이 관찰과 채집기록은 있으나, 조사과정에서는 성체나 올챙이가 발견되지 않았다.

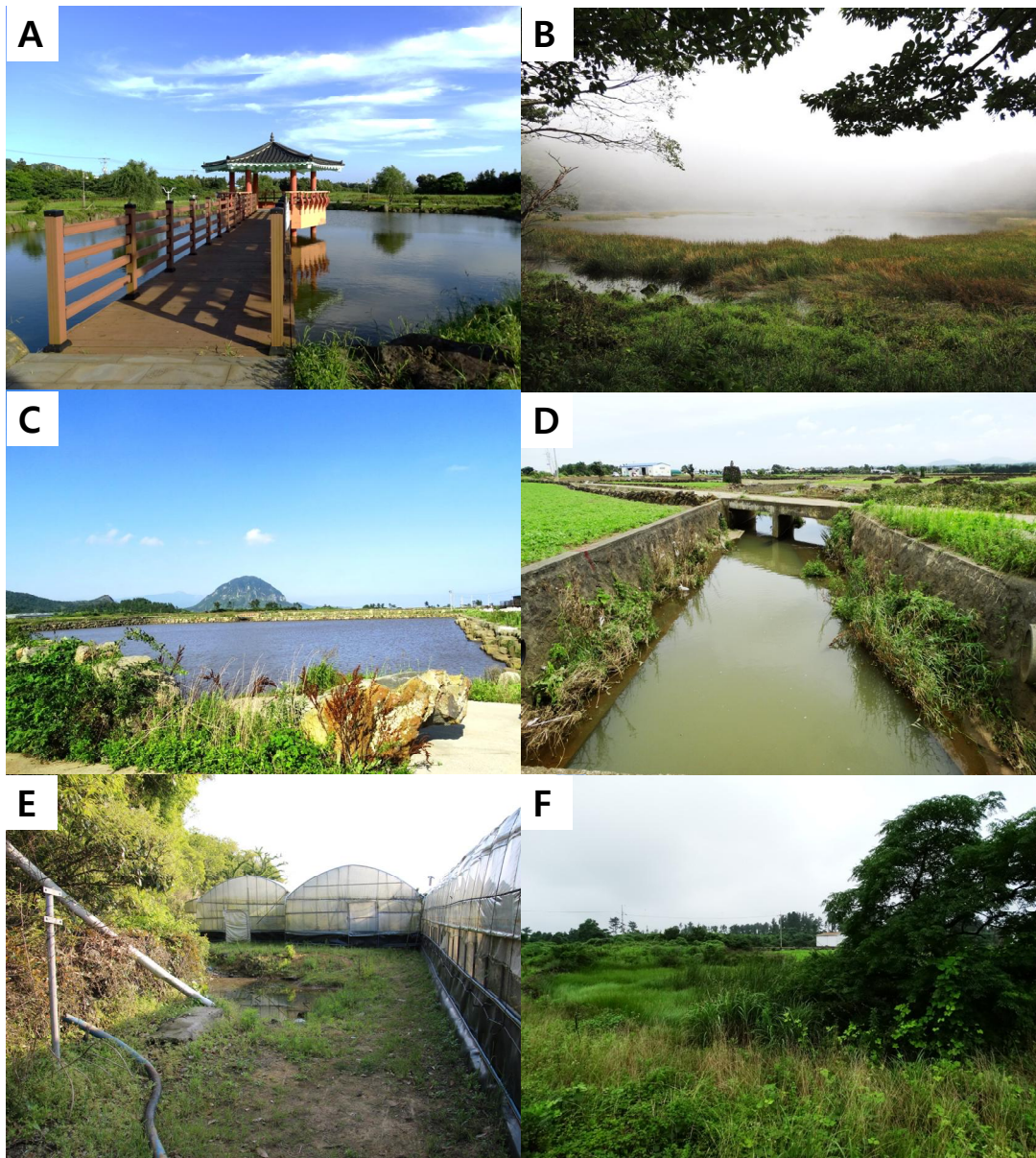


Figure 6. Finding site types of the American bullfrogs in this study. A, pond; B, crater lake in Boonggae-dong (Muljangori-oreum, RCA055); C, reservoir; D, waterway; E, puddle behind greenhouse in farming land; F, marshland.

Table 3. Habitat types of the American bullfrogs detected in the wetlands of the Jeju Island

Finding site		Pond	Crater lake	Puddle	Marshland	Reservoir	Waterway ²
Province	No. of site						
Bonggae-dong ¹	1		1 (100.0)				
Hankyong-myeon	55	33 (60.0)		8 (14.5)	6 (10.9)	7 (12.7)	1 (1.8)
Namwon-eup	2	2 (100.0)					
Daejeong-eup	49	23 (46.9)		7 (14.3)	3 (6.1)	9 (18.4)	7 (14.3)
Andeok-myeon	3	2 (66.7)				1 (33.3)	
Overall	110	60 (54.5)	1 (0.9)	15 (13.6)	9 (8.2)	17 (15.5)	7 (7.3)

¹, only recorded in Kim and Park (2011).

², included natural stream and agricultural waterway.

The numbers in the parenthesis are percentage of the habitat type observed in each province.

Table 4. Number of the adult of the American bullfrogs found in each province in Jeju Island

Province	No. of site	Adult			
		No. of site	No. of animal	Mean±SD	Range
Bonggae-dong ¹	1	0	n.d.		
Hankyong-myeon	55	55 (100)	432	7.85±8.67	1-33
Namwon-eup	2	2 (100)	14	7.00±5.66	3-11
Daejeong-eup	49	49 (100)	383	7.82±8.23	1-40
Andeok-myeon	3	3 (100)	23	7.67±9.07	1-18
Overall	110	109 (99.1)	852	7.82±8.34	1-40
<i>p</i> -value				0.999	

¹, cited from the Kim and Park (2011).

n.d., not detected.

The numbers in the parenthesis are percentage of the rates.

황소개구리 서식지에서 성체의 개체수를 측정하였다. 조사된 황소개구리 서식지 중 RCA072에서는 40 개체의 성체가 관찰되어 조사 지역 중 가장 많은 성체들이 발견되었다. 대정읍 지역의 RCA010에서는 33 개체의 성체가 관찰되었고, 안덕면의 RCA052에서는 18 개체, 남원읍의 RCA001에서 11 개체의 황소개구리 성체가 발견되어 지역별로 가장 많은 수의 성체가 발견되었다. 서식지 내에서 황소개구리 성체가 10 개체 이하인 지점은 79 개 지점으로 72.5%를 차지하여 가장 높은 빈도를 나타내었다. 성체가 11-20 개체인 경우는 19 개 지점(17.4%)이었고, 21-30 개체는 7 개 지점(6.4%)이었다. 단일 서식지에서 성체가 30 개체를 초과하는 경우는 4 개 지점(3.7%)이 확인되었다(Figure 7).

서식지별로 발견된 황소개구리 성체의 평균 개체수는 7.82 ± 8.34 개체/site를 나타내었다. 지역별로는 한경면 지역의 서식지별 평균 성체 개체수가 7.85 ± 8.67 개체/site로 가장 많았고, 대정읍은 7.82 ± 8.23 개체/site, 안덕면은 7.67 ± 9.07 개체/site를 나타내었다. 남원읍 지역은 2개의 연못에서 14개체가 발견되어 7.00 ± 5.66 개체/site를 나타내어 가장 적은 평균치를 나타내었다. 하지만, 발견된 황소개구리 성체의 개체수에 대한 지역별 분포는 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p > 0.05$).

Table 5는 지역별로 황소개구리 올챙이가 발견된 서식지의 수와 올챙이의 밀도를 나타낸 것이다. 황소개구리 올챙이가 발견된 지점은 총 79 개 지점으로 전체 110 개 서식지에서 71.8%에서 관찰되었다. 제주시 봉개동 1 개, 한경면 40 개, 서귀포시 남원읍 2 개, 대정읍 34 개, 안덕면 2 개 지점에서 황소개구리 올챙이가 관찰되었고, 봉개동 서식지(RCA055)는 김과 박(2011)의 자료와 보관중인 표본을 확인하였다. 봉개동과 남원읍에서는 발견된 모든 서식지에서 올챙이들이 관찰되었으나, 한경면은 72.7%, 대정읍은 69.4%, 안덕면은 66.7%의 서식지에서만 올챙이가 관찰되었다.

관찰 지점에서 발견된 올챙이의 밀도는 9 개체 이하(+)인 경우가 29개 지점으로 36.7%를 차지하였고, 10-19 개체(++)인 경우가 14개 지점으로 17.7%였다. 올챙이 밀도가 20 개체 이상(+++)인 경우는 36개 지점으로 45.6%를 나타내어 가장 높은 빈도를 보였다. 발견된 올챙이의 밀도는 지역별 분포와 통계적인 유의차를 나타내지 않았다($p > 0.05$).

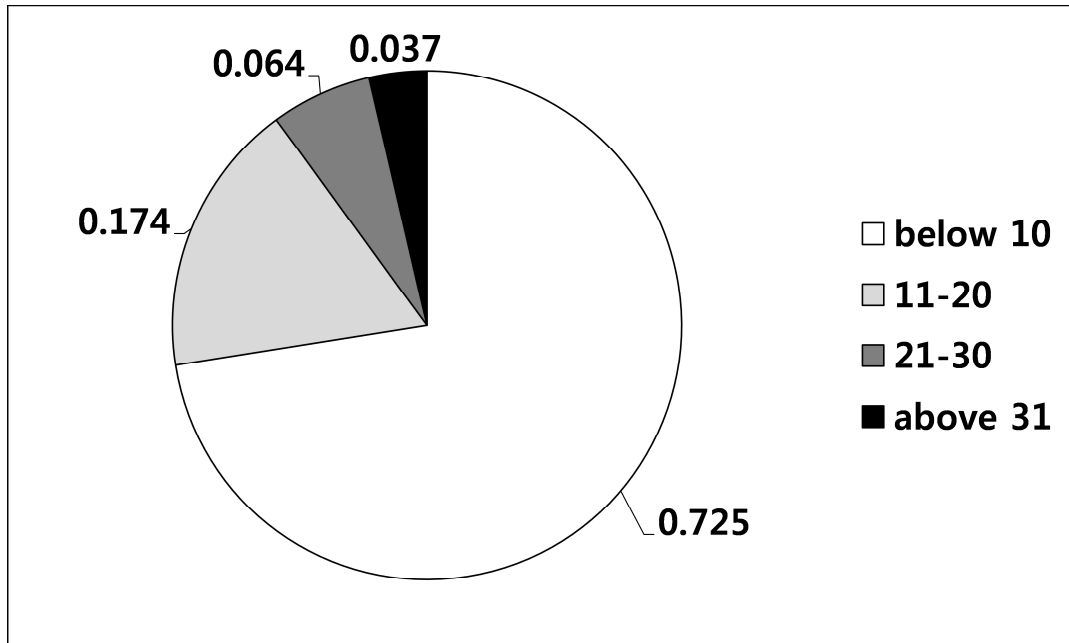


Figure 7. Frequencies of the finding site of the adult of the American bullfrogs. Different colors indicate different levels of adult bullfrogs found in each wetland. Blue, below 10 individuals; red, from 11 to 20 individuals; green, from 21 to 30 individuals; purple, above 31 individuals. Numbers are frequencies of the finding sites.

Table 5. Number of finding site and density of the tadpole of the American bullfrogs found in Jeju Island

Province	No. of site	Tadpole			
		No. of found site	Density ²		
			+	++	+++
Bonggae-dong ¹	1	1 (1.000)			
Hankyong-myeon	55	40 (0.727)	14 (0.350)	7 (0.175)	19 (0.475)
Namwon-eup	2	2 (1.000)	1 (0.500)	n.d.	1 (0.500)
Daejeong-eup	49	34 (0.694)	12 (0.353)	7 (0.206)	15 (0.441)
Andeok-myeon	3	2 (0.667)	1 (0.500)	n.d.	1 (0.500)
Overall	110	79 (0.718)	29 (0.367)	14 (0.177)	36 (0.456)
<i>p</i> -value				0.994	

¹, cited from the Kim and Park (2011).

², counted average number of the animals found in 1×1m² at three positions in each site.

³, average density: + is 9 individuals and under, ++ is 10 to 19 individuals, +++ is 20 individuals and above found in 1×1 m² in each site for 1 min, respectively.

n.d., not detected.

The numbers in the parenthesis are percentage of the rates.

4. 황소개구리의 외부 형태

조사과정에서 포획한 황소개구리 성체의 외부 형태에 대한 측정치는 Table 6에 제시하였다. 채집된 성체의 체중(body weights, BW)은 최소 151.1 g에서 최대 718.7 g을 나타내었고, 평균 321.3 ± 129.40 g이었다. 몸 전체의 길이(total body length, TBL)는 최소 292.0 mm에서 최대 418.0 mm이었고, 평균 337.8 ± 33.59 mm이었다. 주둥이-항문 길이(snout-vent length, SVL)는 최소 115.32 mm에서 최대 184.0 mm, 평균 143.14 ± 17.59 mm이었다. 뒷발의 길이(hindfoot length, HFL)는 최소 58.94 mm에서 최대 90.38 mm을 나타내었고, 평균 72.55 ± 8.09 mm의 수준을 보였다. 앞발의 길이(forefoot length, FFL)은 최소 28.79 mm에서 최대 44.14 mm, 평균 35.47 ± 4.00 mm이었다.

5. 황소개구리 암컷과 수컷의 외부 형태 비교

채집된 황소개구리 성체의 암컷과 수컷에서 측정된 외부 형질을 비교하였다 (Table 7). 월동 후 채집한 성체의 BW는 암컷이 최소 194.4 g에서 424.9 g이었고, 평균 277.3 ± 75.27 g이었다. 수컷의 BW는 151.1-718.7 g 수준을 보였고, 평균 358.9 ± 155.23 g이었고, 전체적으로 수컷이 암컷보다 더 무거웠다. TBL은 암컷이 325.0 ± 24.98 mm, 수컷이 348.7 ± 36.92 mm로 수컷이 더 길었다. SVL은 암컷이 137.69 ± 11.622 mm, 수컷이 147.8 ± 20.739 mm로 수컷이 더 길었다. HFL은 암컷이 68.88 ± 5.658 mm, 수컷이 75.69 ± 8.692 mm로 수컷이 더 길었다. FFL은 암컷이 34.26 ± 2.643 mm, 수컷이 36.6 ± 4.763 mm로 수컷이 더 길었다. 측정된 외부 형질 중 HFL은 암컷과 수컷 사이에서 통계적인 유의차를 보였다($p < 0.05$). 반면, 다른 형질들은 유의적 차이가 없었다($p > 0.05$).

Table 6. Comparison of the external characters of the adults the American bullfrogs collected in Korean Peninsula and Jeju Island

Character	This study (n=26)	Kim (1975) ¹ (n=20)	Kim (1975) ² (n=10)	Choi et al. (1998) (n=172)
BW (g)	321.26±129.40 151.10-718.70	393.55±187.39 140-805	334.2±219.59 141-743	249.5±21.0
TBL (mm)	337.78±33.59 292.0-418.0			
SVL (mm)	143.14±17.59 115.32-184.0		127±22.43 105-165	138±14
HFL (mm)	72.55±8.09 58.94-90.38			
FFL (mm)	35.47±4.00 28.79-44.14			

¹ and ², measured the individuals had been reared by indoor farming at about two-year old after birth and at eighteen-month old after birth, respectively by Kim (1975).

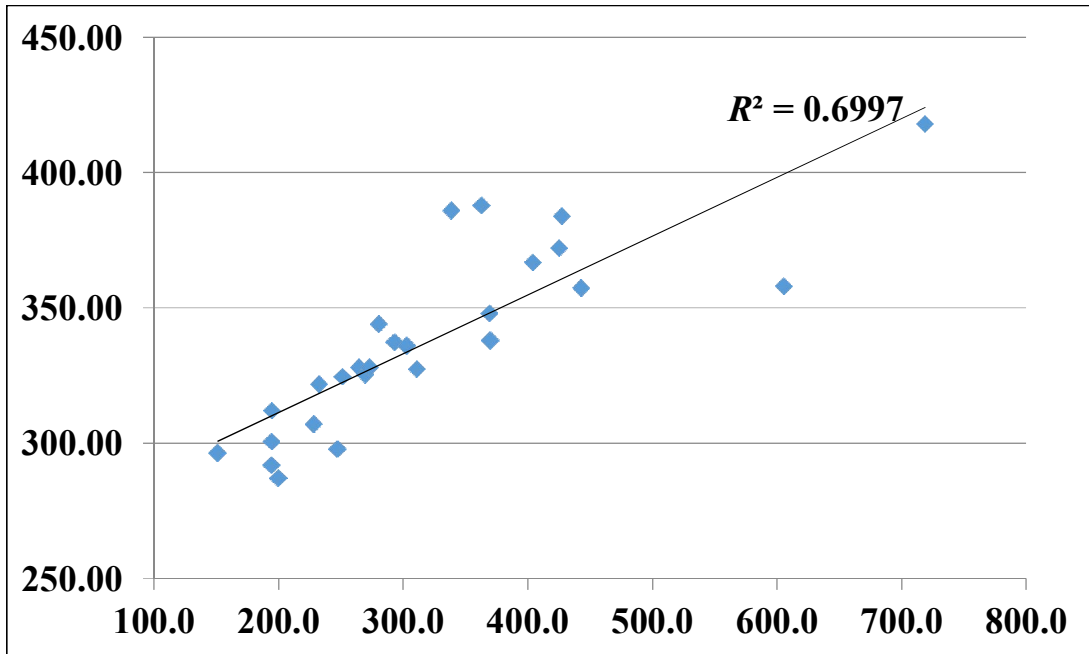


Figure 8. Correlation between body weight (BW) and Total body length (TVL) in the adults of the American bullfrogs collected in this study. Males and females were analyzed together.

Table 7. Comparison of mean and range of the external characters of the males and females of the American bullfrogs

Character ¹	Female (n=12)	Male (n=14)	<i>p</i> -value	Significance ²
BW (g)	277.3±75.27	358.9±155.23	0.110	n.s.
	194.4-424.9	151.1-718.7		
TBL (mm)	325.0±24.98	348.7±36.92	0.072	n.s.
	292.0-372.0	296.5-418.0		
SVL (mm)	137.69±11.622	147.8±20.739	0.134	n.s.
	122.87-164.0	115.32-184.0		
HFL (mm)	68.88±5.658 ^b	75.69±8.692 ^a	0.029	*
	58.94-80.15	60.69-90.38		
FFL (mm)	34.26±2.643	36.6±4.763	0.141	n.s.
	29.75-39.13	28.79-44.14		

¹, all abbreviations of each character tested were described in the Materials and Methods section.

², different superscripts in a same row indicate significant difference. * is significantly different at $p < 0.05$. n.s., not significant.

Table 8. Comparison of external characters of the males and females of the American bullfrogs found in Korean Peninsula and Jeju Island

Character ¹	Female			Male		
	This study (n=12)	Kim (1975) ² (n=10)	Kim (1975) ³ (n=5)	This study (n=14)	Kim (1975) ² (n=10)	Kim (1975) ³ (n=5)
BW (g)	277.3±75.26 194.4-424.9	383.7±217.7 140-805	344.6±223.4 160-597	358.9±155.3 151.1-718.7	403.4±162.9 151-690	323.8±241.5 141-743
SVL (mm)	137.69±11.62 122.87-164.0		126.6±24.3 105-155	147.8±20.74 115.32-184.0		127.4±23.3 103-165

¹, all abbreviations of each character tested were described in the Materials and Methods section.

² and ³, measured the individuals had been reared by indoor farming at about two-year old after birth and at eighteen-month old after birth, respectively by Kim (1975).

6. 서식지별 황소개구리 올챙이의 외부 형태

황소개구리 성체가 발견된 79 개 지점에서 올챙이가 관찰되었고, 18 개 지점에서 올챙이 766 개체를 채집하였다. 이 중 2017년 1월부터 3월까지 채집된 올챙이들($n=601$)의 외부형태를 측정하여 서식별로 비교하였다(Table 9). 비교대상 지점은 2017년도에 채집된 올챙이의 수가 측정된 15 개체 이상인 8 개 지점(RCA001, RCA008, RCA010, RCA026, RCA035, RCA052, RCA077, RCA096)을 대상으로 하였다. 지리적으로는 남원읍 1 개(RCA001), 대정읍 4 개(RCA008, RCA010, RCA026, RCA035), 안덕면 1 개(RCA052)과 한경면 2 개 지점(RCA077, RCA096)이었다.

모든 외부형질에 대해서 서식지 집단 사이에서는 통계적인 유의차를 보였다($p<0.05$). 체중(BW)은 전체 601 개체에서 10.69 ± 5.3 g, 최소 2.4 g부터 최고 45.1 g이었다. 분석한 8 개 집단들은 통계적으로 6 개의 동일집단군(a, b, c, d, e, f)로 구분되었다. RCA035-RCA026 집단군은 BW 6.23 ± 1.68 - 6.47 ± 1.5 g의 수준을 나타내어 가장 가벼웠고, RCA001-RCA052는 8.85 ± 1.46 - 10.38 ± 2.07 g, RCA077-RCA096은 11.12 ± 2.86 - 12.89 ± 3.87 g, RCA010은 14.83 ± 2.73 g, RCA008은 29.67 ± 7.52 g이었다. 조사된 집단들 중에서 RCA035 집단은 체중이 가장 가볍고, RCA008은 체중이 가장 무거운 집단이었고, 다른 서식지 집단에 비해 2 배 이상이었다.

몸 전체 길이(TBL)는 101.63 ± 14.86 mm를 나타내었고, 머리의 길이(HL)는 33.93 ± 4.25 mm, 꼬리의 길이는 67.76 ± 11.1 mm, 뒷다리의 길이(HLL)은 5.59 ± 8.42 mm를 나타내었다. TBL과 HL은 각각 5 개의 동일집단군으로 구분되었으나, TL은 4 개(RCA035-RCA026-RCA001, RCA052, RCA077-RCA096-RCA010, RCA008), HLL은 조사집단 중에서 RCA008만 유의적인 차이를 보였다. RCA008은 HLL이 23.14 ± 19.48 mm로, Gosner (1960)의 양서류 발생단계에서 37-38 단계 이상으로 발가락의 분화까지 이루어진 형태이나, 앞다리가 발생한 개체는 없었다. 반면, 다른 7개의 집단은 Gosner (1960)의 발생과정 31-36에 해당하는 개체가 대부분이며, 뒷다리 싹(hindlimb bud)이 1 mm 이하인 개체들도 발견되었다.

Table 9. Comparison of the external characters of the tadpoles of American bullfrogs collected in eight different habitats

Character ¹	Overall	Collection site ²								<i>p</i> -value	Significance ³
		RCA035	RCA026	RCA001	RCA052	RCA077	RCA096	RCA010	RCA008		
		n=601	n=117	n=18	n=56	n=219	n=62	n=76	n=29		
BW (g)	10.69±5.31 2.4-45.1	6.23±1.68 ^a 2.4-9.6	6.47±1.5 ^a 4.1-10.1	8.85±1.46 ^b 5.7-11.6	10.38±2.07 ^{bc} 5.7-17.0	11.12±2.86 ^{cd} 4.9-18.4	12.89±3.87 ^d 5.8-21	14.83±2.73 ^e 10.5-21.6	29.67±7.52 ^f 17.1-45.1	1.25E-164	**
TBL (mm)	101.63±14.86 59.96-177.53	89.57±9.96 ^{ab} 59.96-105.23	87.16±7.19 ^a 70.76-100.4	94.28±6.04 ^{bc} 80.33-105.05	100.37±7.6 ^c 74.45-119.88	107.85±11.21 ^d 81.45-129.83	110.4±11.99 ^d 83.33-133.38	112.01±7.55 ^d 95.05-127.97	148.59±12.56 ^e 124.09-177.53	1.09E-113	**
HL (mm)	33.93±4.25 22.07-52.12	30.32±30 ^a 22.07-35.22	30.99±2.44 ^a 25.93-35.91	33.76±2.11 ^b 28.85-39.54	33.49±2.42 ^b 25.3-39.51	34.04±3.06 ^b 26.97-39.02	36.12±3.87 ^c 27.72-45.7	38.1±2.42 ^d 33.75-43.45	45.96±3.23 ^e 39.3-52.12	1.94E-101	**
TL (mm)	67.76±11.10 36.39-125.41	59.24±7.37 ^a 36.39-72.96	56.17±4.97 ^a 44.83-64.49	60.76±4.45 ^a 50.93-69.22	66.87±5.93 ^b 47.98-83.58	73.81±8.49 ^c 54.43-91.22	74.22±8.48 ^c 55.61-92.82	73.71±5.83 ^c 61.3-86.9	102.33±10.02 ^d 83.44-125.41	1.39E-112	**
HLL (mm)	5.59±8.42 0.0-112.89	5.32±4.17 ^a 0.0-21.52	10.92±25.67 ^a 1.19-112.89	5.95±5.11 ^a 0.0-21.69	3.26±2.52 ^a 0.0-21	5.4±5.89 ^a 1.2-44.76	3.84±3.68 ^a 1.58-8.09	6.29±6.74 ^a 0.0-30.47	23.14±19.48 ^b 1.89-69.63	1.97E-28	**

¹, all abbreviations of external characters are given in the Materials and Methods section.

², detail information of collection sites are given in Table 2.

³, different superscripts in a same row indicate significant difference. ** *p*<0.01 level.

7. *ND1* haplotype의 지리적 분포

Table 10은 20 개 지점에서 채집된 황소개구리 올챙이 *ND1* haplotype의 분포를 나타낸다. 서귀포시 남원읍, 대정읍, 안덕면에서 채집한 177 개체에서 BNH01과 BNH02가 발견되었는데, 8 개 지점(RCA001, RCA010, RCA019, RCA028, RCA033, RCA035, RCA046, RCA052)은 BNH01만 발견되었고, RCA008와 RCA026은 BNH01과 BNH02가 모두 발견되었다. 서귀포시 전체에서 BNH01은 97.7%, BNH02는 2.3%의 빈도를 보였다. 제주시 지역 중 6 개 지점(RCA061, RCA065, RCA076, RCA080, RCA082, RCA096)은 BNH01만 나타내었고, RCA055와 RCA105는 모든 개체들이 BNH02였다. RCA077과 RCA095에서는 BNH01과 BNH02가 모두 관찰되었다. 전체 20 개 지점 중 BNH01만 발견된 곳은 14 개 지점, BNH02만 발견된 곳은 2 개 지점, 나머지 4 개 지점에서 BNH01과 BNH02가 모두 발견되었다(Table 10). 남원읍은 RCA001에서는 BNH01만 발견되었다. 대정읍의 RCA008은 BNH01, BNH02가 모두 출현하였고, 다른 지점들(RCA005, RCA010, RCA014, RCA026, RCA031, RCA035)은 모두 BNH01만 나타내었다. 하지만, RCA008에서는 성체 2 개체 중 1개체와 올챙이 25 개체 중 3 개체, 총 4 개체(14.8%)가 BNH02이었다. 안덕면 RCA035는 조사된 14개체 모두 BNH01을 나타내었다. 서귀포시 지역에서 채집된 성체 중에서 93.3%는 BNH01 이었고, 6.7%(1 개체)는 BNH02이고, 올챙이는 97.4%(187 개체)가 BNH01, 2.6%(5 개체)는 BNH02를 나타내어, 전체적으로 서귀포시 지역의 황소개구리는 BNH01 haplotype이 BNH02에 비해 대단히 높은 빈도를 보였다. 한경면에서는 BNH01과 BNH02가 모두 검출되었다. 이 중 BNH01만 관찰된 지점은 RCA059, RCA060, RCA063, RCA076, RCA080, RCA090, RCA104, RCA107, RCA108, RCA109 등 10 개 지점이었고, BNH02만 검출된 지점은 RCA077 1 개 지점, 나머지 4 개 지점(RCA089, RCA091, RCA096, RCA104)에서는 2 가지 haplotype이 모두 검출되었다. 제주시 지역(한경면, 봉개동) 성체 중 69.0%는 BNH01, 31.0%는 BNH02를 나타내어 BNH01의 빈도가 BNH02보다 높았다. 올챙이 역시 BNH01은 60.0%, BNH02는 40.0%로 BNH01이 더 높은 빈도를 나타내었다.

Table 10. Distribution of *NDI* haplotypes of the adult American bullfrogs collected in Jeju Island

Site no. ¹	Adult				Tadpole				Total						
	No. of animals tested	BNH01		BNH02		No. of animals tested	BNH01		BNH02		No. of animals tested	BNH01		BNH02	
		n	%	n	%		n	%	n	%		n	%	n	%
RCA001	4	4	100.0			23	23	100.0			27	27	100.0		
RCA005	1	1	100.0								1	1	100.0		
RCA008	2	1	50.0	1	50.0	25	22	88.0	3	12.0	27	23	85.2	4	14.8
RCA010	3	3	100.0			19	19	100.0			22	22	100.0		
RCA014	1	1	100.0								1	1	100.0		
RCA019						2	2	100.0			2	2	100.0		
RCA026	2	2	100.0			28	27	96.4	1	3.6	30	29	96.7	1	3.3
RCA028						2	2	100.0			2	2	100.0		
RCA031	1	1	100.0								1	1	100.0		
RCA033						16	16	100.0			16	16	100.0		
RCA035	1	1	100.0			13	13	100.0			14	14	100.0		
RCA046						16	16	100.0			16	16	100.0		
RCA052						33	33	100.0			33	33	100.0		
RCA055						3			3	100.0	3			3	100.0
RCA059	1	1	100.0								1	1	100.0		
RCA060	1	1	100.0								1	1	100.0		
RCA061						3	3	100.0			3	3	100.0		
RCA063	1	1	100.0								1	1	100.0		
RCA065						3	3	100.0			3	3	100.0		
RCA076	1	1	100.0			3	3	100.0			4	4	100.0		
RCA077	1		0.0	1	100.0	11	4	36.4	7	63.6	12	4	33.3	8	66.7
RCA080	6	6	100.0			1	1	100.0			7	7	100.0		
RCA082						10	10	100.0			10	10	100.0		
RCA089	5	2	40.0	3	60.0						5	2	40.0	3	60.0
RCA090	1	1	100.0								1	1	100.0		
RCA091	12	4	33.3	8	66.7						12	4	33.3	8	66.7
RCA095						4	3	75.0	1	25.0	4	3	75.0	1	25.0
RCA096	4	3	75.0	1	25.0	9	9	100.0			13	12	92.3	1	7.7
RCA104	2	2	100.0								2	2	100.0		
RCA105						13			13	100.0	13			13	100.0
RCA107	2	2	100.0								2	2	100.0		
RCA108	2	2	100.0								2	2	100.0		
RCA109	3	3	100.0								3	3	100.0		
Overall	57	43	75.4	14	24.6	237	209	88.2	28	11.8	294	252	85.7	42	14.3

¹, detailed information were given in Table 2.

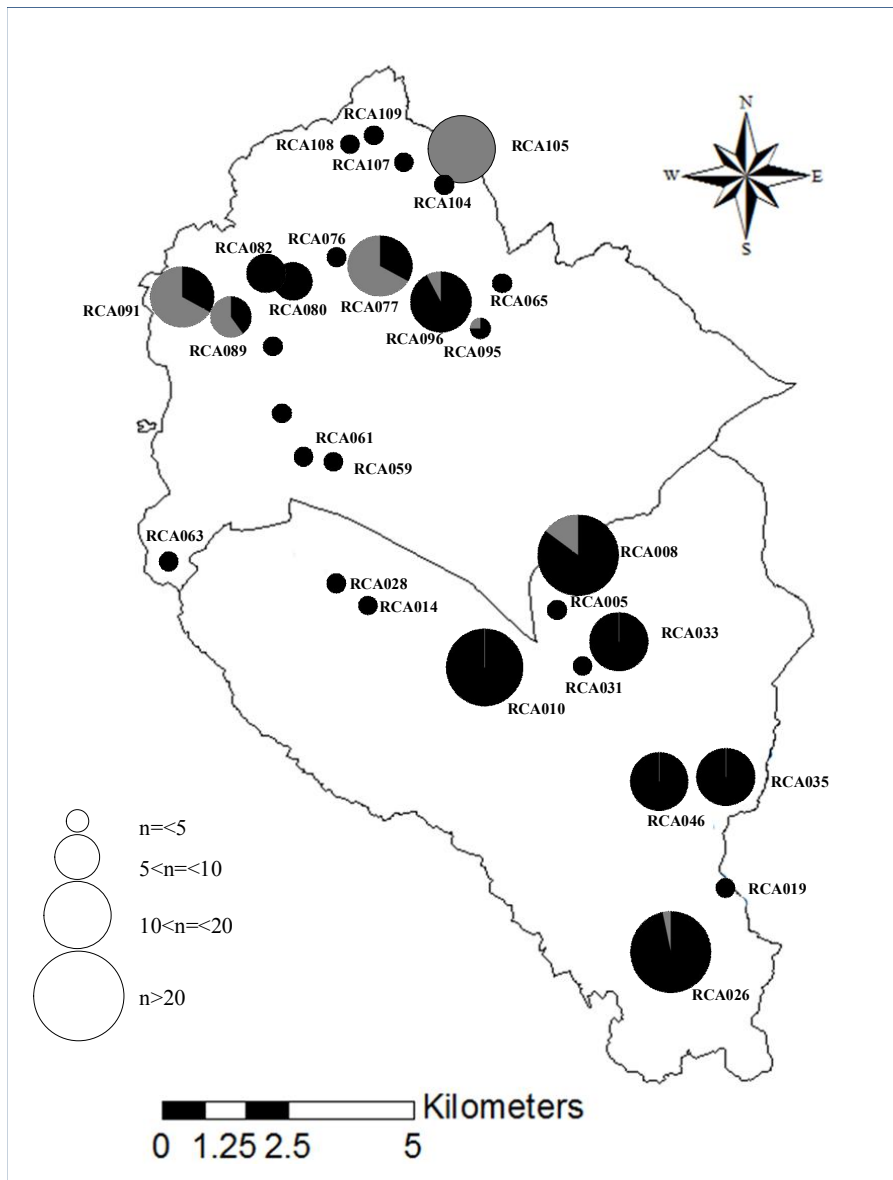


Figure 9. Geographical distribution of *NDI* haplotypes in thirty bullfrog-finding sites in Daejeong-eup and Hankyeong-myeon. *NDI* haplotypes were determined for the collection specimens from eleven sites of Daejeong-eup and nineteen sites of Hankyeong-myeon. Dark and gray circles indicate *NDI* haplotypes, BNH01 and BNH02, respectively. The number in the circles indicate the site no. in Table 2 and Table 13. Haplotype distribution of RCA001, RCA052 and RCA055 were not marked in this figure. Detailed information of each site were listed in Table 13.

황소개구리 올챙이와 성체가 모두 분석된 9 개 지점 중 6 개 지점(RCA001, RCA010, RCA035, RCA076, RCA080)은 BNH01만 출현하여, 성체와 올챙이 사이에서 haplotype의 분포가 일치함을 나타내고 있다. RCA008에서는 성체에서 BNH01과 BNH02가 같은 빈도를 나타내었으나, 올챙이의 경우 BNH01(88.0%)이 BNH02(12.0%)에 비해 훨씬 더 높게 나타났다. 반면, RCA026은 성체는 BNH01만 발견되었으나, 올챙이 중 1 개체가 BNH02를 나타내었고, RCA077에서는 성체는 BNH02이지만, 올챙이는 BNH01과 BNH02가 모두 출현하였다. 이와는 반대로 RCA096의 경우 성체 4 개체가 BNH01, BNH02로 구분되나, 올챙이들은 모두 BNH01만을 나타내었다.

제주도 황소개구리 집단 이외에 제주대학교에 소장 중인 경상남도 마산시와 창녕군의 표본에서 DNA 시료를 확보하여 유전자형 분석에 이용하였다. *ND1* 유전자 haplotype을 결정한 결과, 경상남도 황소개구리 시료에서도 BNH01과 BNH02가 모두 출현하고, 마산시(n=3)와 창녕군(n=4) 두 지역 모두 haplotype 2 가지가 모두 발견되었다(Table 11). 분석된 7 개체 중에서 BNH01은 57.1%(4 개체), BNH02는 42.9%(3 개체)를 나타내었다. Table 11은 본 연구에서 결정된 제주도와 경상남도 황소개구리 집단의 *ND1* 서열들과 이(2005)의 연구에서 발췌한 서열들을 모두 이용하여 haplotype을 결정하고, 지리적 분포와 빈도를 나타낸 것이다. 총 6 개의 haplotype으로 구분되었으며, 이 중 BNH01과 BNH02는 제주도 황소개구리 집단에 발견된 haplotype과 동일하였으나, BNH03-BNH06은 새로운 haplotype이었다. BNH02는 제주도, 경상남도, 광주시, 전라남도에서 공통으로 관찰되었다. 제주도에서 높은 빈도(85.7%)를 나타내었던 BNH01은 경상남도(57.1%)와 전라남도(44.4%)에서도 높은 빈도를 보였다. 반면, 광주시에서는 BNH01은 발견되지 않았다. BNH04는 광주시에서, BNH03, BNH05, BNH06 등은 전라남도에 서만 검출되었다. 한반도 집단에서 BNH01은 전체 18 개체 중 8 개체(44.4%)에서 출현하여, 제주도 집단의 BNH01의 빈도(85.7%)보다 낮았으나, BNH02는 6 개체(33.3%)에서 검출되어 제주도 집단의 출현빈도(14.3%)보다 높았다. 한반도 집단에서 추가로 검출된 BNH03, BNH04, BNH05, BNH06은 제주도 집단에서는 전혀 발견되지 않았던 haplotype들이었고, 출현빈도는 22.2%(4 개체)를 나타내었다.

Table 11. Geographical distribution of *NDI* haplotypes of the American bullfrogs in the populations of South Korea

Population	BNH01	BNH02	BNH03	BNH04	BNH05	BNH06	Total
Jeju-do	252 (85.7)	42 (14.3)					294
Gyeongsangnam-do	4 (57.1)	3 (42.9)					7
Gwangju-si ¹		1 (50.0)		1 (50.0)			2
Jeollanam-do ¹	4 (44.4)	2 (22.2)	1 (11.1)		1 (11.1)	1 (11.1)	9
Overall	260 (83.3)	48 (15.4)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)	312 (100.0)

¹, used *NDI* sequences recorded in the text of Lee (2005) but not deposited at NCBI database.

Numbers in the parenthesis are frequencies of the *NDI* haplotype found in the population.

Table 12는 제주도 황소개구리 집단에서 *ND1* haplotype 다양성(Hd)과 염기서열 다양성(π)을 나타낸 것이다. 전체 26개의 *ND1* 유전자 분석 지점 중에서 7개 지점(RCA008, RCA026, RCA077, RCA089, RCA091, RCA095, RCA096)은 Hd 와 π 값이 산출되어 다양성을 나타내었으나, 나머지 19개 지점은 모두 단일 haplotype과 단일 서열만을 가지고 있기 때문에 Hd 와 π 값이 산출되지 않았다. Hd 가 0.5이상을 나타낸 지점은 RCA089 (0.6000±0.1750), RCA095 (0.5000±0.2650), RCA096 (0.7692±0.1260) 등 3개 지점이었고, RCA096이 가장 높은 수준을 나타내었다. π 는 RCA026에서 0.0005±0.0004이었고, 가장 높은 지점은 RCA089로 0.0042±0.0012 수준을 나타내었다. 제주도에 조사된 전체 지점 중에서 π 값이 0.5%이상인 지점은 발견되지 않았다.

Table 13에서는 제주도, 경상남도, 광주시, 전라남도 황소개구리 집단에서 *ND1* 유전자 haplotype과 염기서열의 다양성을 나타낸 것이다. 광주시는 2 개체가 서로 다른 haplotype(BNH02, BNH04)을 보였기 때문에 Hd 는 1.000±0.5000으로 산출되었고, π 는 0.0014±0.0007를 나타내었다. 전체 9 개체에서 5 가지 haplotype들(BNH01, BNH02, BNH03, BNH05, BNH06)을 나타내었던 전라남도 집단의 Hd 는 0.8056±0.1200, π 는 0.0063±0.0063을 나타내었다. 제주도와 마찬가지로 BNH01과 BNH02 haplotype을 가지고 있던 경상남도 집단의 경우, Hd 는 0.5710±0.1191, π 는 0.0040±0.0008을 나타내었다.

전체적으로 시료수가 적기는 하지만, 광주시 집단의 Hd 가 1.000±0.5000로 가장 높은 수준을 나타내었고, 제주도 황소개구리 집단의 Hd 는 0.2570±0.0290로 가장 낮은 수준을 나타내었다. 조사된 집단 중에서 Hd 의 수준이 0.5 이상인 집단은 경상남도, 광주시, 전라남도 집단이었고, 제주도 집단은 Hd 가 0.5이하였다. 염기서열의 다양성을 나타내는 π 는 전라남도 집단이 0.0063±0.0016으로 가장 높은 수준을 보였으며, 경상남도(0.0040±0.0008), 제주도(0.0018±0.0002), 광주시(0.0014±0.0007) 순서를 보였다. 조사된 집단들 중에서 전라남도 집단만 π 값이 0.5% 이상이었다. 광주시 집단의 경우 Hd 는 가장 높은 수준이었으나, π 값(0.0014±0.0007)은 가장 낮은 수준이었고, 이는 제주도 집단에서 산출된 π 값(0.0018±0.0002)보다도 낮았다.

Table 12. Population genetic diversities of the *NDI* gene within introduced American bullfrog populations in Jeju Island

Population	No. of animals tested	No. of haplotype	Haplotype diversity		Nucleotide diversity		Neutrality test	
			Hd^1	SD	π^2	SD	Tajima's D^3	Significance
RCA001	27	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA008	27	2	0.2621	0.0970	0.0018	0.0007	0.0288	NS
RCA010	12	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA019	2	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA026	30	2	0.0667	0.0610	0.0005	0.0004	-2.0076	*
RCA028	2	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA033	16	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA035	12	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA046	16	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA052	33	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA055	2	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA061	3	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA065	3	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA076	4	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA077	12	2	0.4849	0.1060	0.0034	0.0008	0.0034	NS
RCA080	7	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA082	10	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA089	5	2	0.6000	0.1750	0.0042	0.0012	1.6869	NS
RCA091	12	2	0.4849	0.1060	0.0034	0.0008	1.7111	NS
RCA095	4	2	0.5000	0.2650	0.0035	0.0019	-0.7968	NS
RCA096	13	2	0.7692	0.1260	0.0011	0.0009	-1.8631	*
RCA104	2	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA105	13	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA107	2	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA108	2	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
RCA109	3	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	N.A.	
Overall	274	2	0.2570	0.0290	0.0018	0.0002	1.1106	NS

¹, mean of pairwise differences between all haplotypes.

², mean of pairwise differences between all sequences.

³, Tajima's D (1989) test for departure from neutrality (*, $p < 0.05$). N.A. indicates not available. N.S. indicates not significant.

Table 13. Population genetic diversities of the *NDI* gene within introduced American bullfrog populations in Jeju Island, Gyeongsangnam-do and Jeollanam-do

Population	No. of animals tested	No. of haplotype	Haplotype diversity		Nucleotide diversity		Neutrality test	
			<i>Hd</i>	SD	π	SD	Tajima's D	Significance
Jeju Island	274	2	0.2570	0.0290	0.0018	0.0002	1.1106	NS
Gyeongsangnam-do	7	2	0.5710	0.1191	0.0040	0.0008	1.9815	*
Gwangju-si	2	2	1.0000	0.5000	0.0014	0.0007	N.A.	
Jeollanam-do ¹	9	5	0.8056	0.1200	0.0063	0.0016	-0.2824	NS

Hd, mean of pairwise differences between all haplotypes.

π , mean of pairwise differences between all sequences.

Tajima's D (1989) test for departure from neutrality (*, $p < 0.05$). N.A. indicates not available. N.S. indicates not significant.

8. *ND1* haplotype 서열의 계통 유연관계

Table 14는 제주도를 포함한 우리나라 황소개구리 집단에서 발견된 6 가지 *ND1* haplotype들과 미국 California에서 보고된 서열에서 결정된 새로운 haplotype을 부가하여 총 7 가지 haplotype 서열들의 유전적 거리지수를 산출한 결과이다. 제주도에서 발견된 *ND1* haplotype 중 우리나라에서 경상남도 마산시와 창원군, 전라남도 영암군, 장흥군, 고흥군 등과 일본, 중국에서 공통적으로 발견된 BNH01의 경우 BNH07 (미국, California)과 유전적 거리지수가 0.0042로 가장 근연이었고, BNH01-BNH06 (전라남도 영암)은 0.0129로 가장 상이한 수준을 보였다. 우리나라에서 제주도와 경상남도 마산시와 창원군, 광주시, 전라남도 나주시와 고흥군에서 발견되는 BNH02는 BNH03, BNH04, BNH05와 유전적 거리지수가 0.0014로 근연이었고, BNH02-BNH06은 0.143으로 유연관계가 멀게 나타났다. 거리지수 상에서 BNH06은 BNH07과 0.0085로 가장 가깝지만, 다른 haplotype들과는 0.001이상의 거리지수를 보였다. 제주도 집단에서 발견된 BNH01과 BNH02는 유전적 거리지수가 0.0071을 나타내었다. 참개구리-황소개구리는 유전적 거리지수가 0.2723-0.2803이었고, 북방산개구리-황소개구리는 0.3222-0.3311, 참개구리-북방산개구리는 0.3878의 거리지수를 나타내었다.

ND1 유전자의 haplotype 염기서열들 사이의 거리지수를 바탕으로 작성한 계통유전학적 분지도(neighbor-joining tree, NJ tree)를 작성하였다. NJ tree 상에서 *ND1* haplotype들은 outgroup인 참개구리(*R. nigromaculata*)와 북방산개구리(*R. dybowskii*)와 구분되는 단계통적인(monophyletic) 분지 양상을 보였다. 또한 황소개구리 haplotype들은 크게 2 개의 그룹으로 분지되었다(Figure 10). Haplotype BNH01-BNH05들은 모두 BNH07과 함께 분지되었다. 유전적 거리지수가 근연이었던(Table 14) BNH02는 BNH03에 가까운 분지 상에서 발견되었고, BNH01은 BNH07과 가까운 위치에서 발견되었다. BNH06는 다른 황소개구리 haplotype들과는 별개의 분지를 형성하였고, 또한 황소개구리 *ND1* 서열 중에서는 outgroup인 참개구리, 북방산개구리와 가까운 위치에서 발견되었다. 계통수 상에서 황소개구리는 북방산개구리보다 참개구리와 더 근연인 관계임을 보였다.

Table 14. Pair-wise genetic distances for *NDI* haplotype sequences of the American bullfrogs

	BNH02	BNH03	BNH04	BNH05	BNH01	BNH07	BNH06	<i>R.</i> <i>nigromaculata</i>	<i>R.</i> <i>dybowskii</i>
BNH02		0.0014	0.0014	0.0014	0.0032	0.0028	0.0046	0.0282	0.0327
BNH03	0.0014		0.0020	0.0020	0.0035	0.0032	0.0048	0.0284	0.0329
BNH04	0.0014	0.0028		0.0020	0.0032	0.0028	0.0046	0.0282	0.0329
BNH05	0.0014	0.0028	0.0028		0.0028	0.0025	0.0043	0.0284	0.0330
BNH01	0.0071	0.0085	0.0071	0.0057		0.0025	0.0043	0.0289	0.0332
BNH07	0.0057	0.0071	0.0057	0.0042	0.0042		0.0035	0.0282	0.0327
BNH06	0.0143	0.0158	0.0143	0.0129	0.0129	0.0085		0.0286	0.0324
<i>R. nigromaculata</i>	0.2723	0.2749	0.2723	0.2749	0.2803	0.2723	0.2776		0.0383
<i>R. dybowskii</i>	0.3252	0.3281	0.3281	0.3281	0.3311	0.3252	0.3222	0.3878	

The number of base substitutions per site from between sequences are shown. Standard error estimate are shown above the diagonal. Analyses were conducted using the Tajima-Nei model (Tajima and Nei, 1984). The analysis involved 9 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 711 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar et al., 2007).

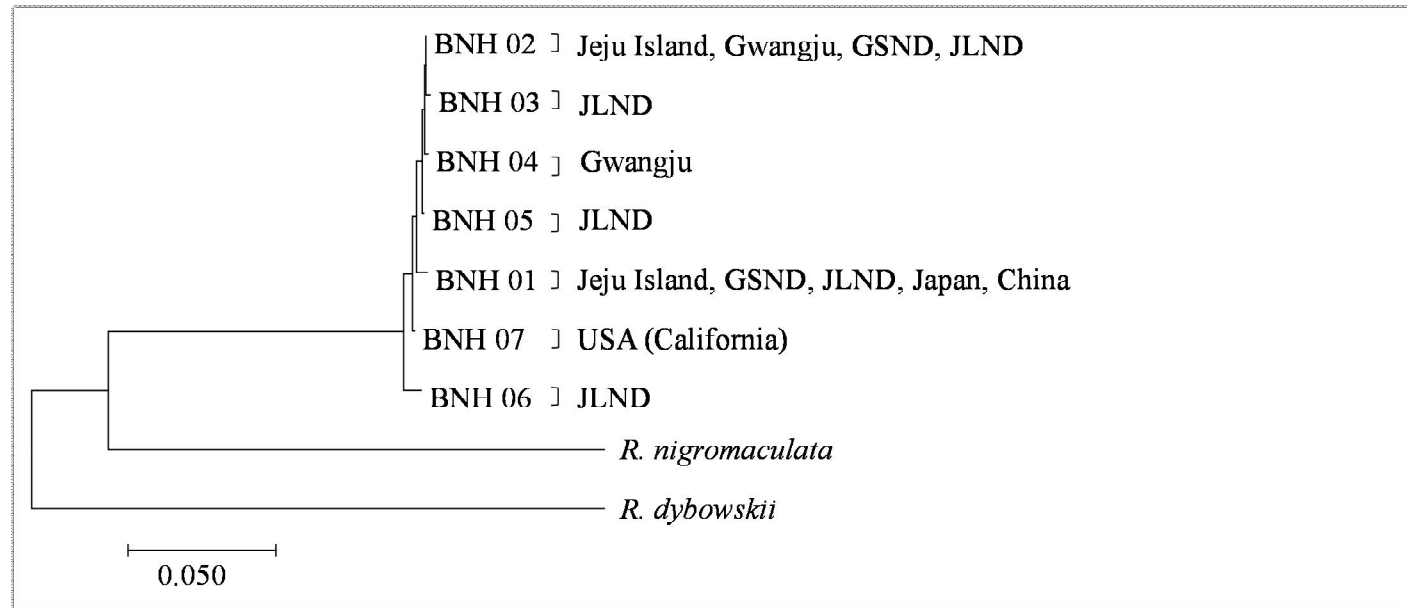


Figure 10. Evolutionary relationships of *NDI* haplotype sequences of the American bullfrogs. The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 0.50845144 is shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Tajima-Nei method (Tajima and Nei, 1984). Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (Kumar et al., 2016). GSND, Gyeongsangnam-do; JLND, Jeollanam-do. The *CYTB* sequence of *Rana nigromaculata* and *R. dybowskii* were used for out-group rooting.

9. *CYTb* haplotype의 지리적 분포

제주도 16 개 집단에서 선발한 44 개체의 *CYTb* 유전자 서열의 haplotype을 이용한 계통 유연관계를 분석하였다. 결정된 *CYTb* 서열에 대한 haplotype 분석 결과, 2 가지 haplotype (BCH01, BCH02)으로 구분되었다(Table 15). *CYTb* haplotype의 출현 양상은 *ND1* haplotype과 정확히 일치하였다. 즉, BCH01은 BNH01과, BCH02는 BNH02와 똑같은 양상을 보였다.

제주도, 경상남도 마산시와 창녕군 시료 등 총 51 개 *CYTb* 서열과 기존에 NCBI database에 보고된 한반도 서열(경상남도 진주시 1 개, 전라남도 장흥군 1 개, 전라북도 부안군 2 개)들을 함께 분석한 결과, 총 3 개의 haplotype (BCH01, BCH02, BCH03)이 발견되었다. 제주도와 경상남도에서는 BCH01과 BCH02, 전라남도에서는 BCH02, 전라북도에서는 BCH02와 BCH03 등 2 가지 haplotype들이 출현하였다. 이 중 BCH03은 전라북도에서만 관찰되었다(Table 16).

Table 17은 본 연구와 기존에 우리나라에서 보고된 *CYTb* 서열들(n=55)과 일본(n=1), 중국(n=2), 미국과 캐나다(n=26)에서 기존의 연구에 보고된 서열들을 모두 수집하여 haplotype을 분석한 결과이다. 전체적으로 총 84 개의 *CYTb* 서열은 27 개의 haplotype으로 구분되었다. 우리나라에서는 3 가지 haplotype (BCH01, BCH02, BCH03)들이 검출되었고, 일본에서 보고된 서열은 BCH01에 해당하였다. 중국에서 보고된 2 개 서열들은 각각 BCH01과 BCH04로 구분되었다. 미국과 캐나다 황소개구리 집단에서는 전체 26개 서열로부터 23개의 haplotype (BCH05-BCH27)이 결정되었다. 우리나라 황소개구리 haplotype인 BCH01, BCH02에 대한 BLAST search 검색을 통한 최대유사서열 검출 결과에서도 BCH01은 중국, 일본에서 보고된 서열들과 100% query-coverage 상에서 100% 일치도를 보였다. 하지만, BCH03 서열은 일본, 중국뿐만 아니라 미국, 캐나다에서 보고된 어떤 서열과도 100% 일치도를 나타내지는 않았다.

Table 15. Distribution of the mtDNA *CYTb* haplotypes of the American bullfrogs collected in this study

Site no. ¹	No. of animals tested	<i>CYTb</i> haplotype			
		BCH01		BCH02	
		n	%	n	%
RCA001	4	4.0	100.0		
RCA010	3	3.0	100.0		
RCA026	4	4.0	100.0		
RCA033	4	4.0	100.0		
RCA035	1	1.0	100.0		
RCA046	3	3.0	100.0		
RCA052	3	3.0	100.0		
RCA055	3			3.0	100.0
RCA076	1			1.0	100.0
RCA080	4	4.0	100.0		
RCA082	2	2.0	100.0		
RCA090	1	1.0	100.0		
RCA096	4	3.0	75.0	1.0	25.0
RCA104	1	1.0	100.0		
RCA105	4			4.0	100.0
RCA107	2	2.0	100.0		
Ovaerall	44	35	79.5	9	20.5

¹, detail information of collection sites are given in Table 2.

Table 16. Geographical distribution of the mtDNA *CYTb* haplotypes of the American bullfrogs in South Korea

Population	BCH01	BCH02	BCH03	Total
Jeju-do	35 (85.7)	9 (14.3)		44
Gyeongsangnam-do ¹	4 (50.0)	4 (50.0)		8
Jeollanam-do ²		1 (100.0)		1
Jeollabuk-do ²		1 (50.0)	1 (50.0)	2
Overall	39 (70.9)	15 (27.3)	1 (1.8)	55

¹, seven *CYTb* sequences were determined in this study, but one (NCBI accession no. JQ798776) of those was reported by Jeong et al (2013).

², all sequences were reported by Jeong et al. (2013).

Table 17. Global distribution of the mtDNA *CYTb* haplotypes of the American bullfrogs

Haplotype	South Korea	Japan ¹	China ²	USA-Canada ³	Total
BCH01	39	1	1		41
BCH02	15				15
BCH03	1				1
BCH04			1		1
BCH05				2	2
BCH06				1	1
BCH07				1	1
BCH08				1	1
BCH09				1	1
BCH10				1	1
BCH11				1	1
BCH12				1	1
BCH13				1	1
BCH14				1	1
BCH15				1	1
BCH16				1	1
BCH17				1	1
BCH18				1	1
BCH19				1	1
BCH20				1	1
BCH21				1	1
BCH22				2	2
BCH23				1	1
BCH24				2	2
BCH25				1	1
BCH26				1	1
BCH27				1	1
Overall	55	1	2	26	84

¹, reported by Kurabayashi et al. (2013).

², reported by Lin et al. (2014) and Yuan et al. (2016).

³, reported by Austin et al. (2003b, 2004b) and Kamath et al. (2016). The *CYTb* sequences of USA and Canada were not clearly discriminated into each country because sometimes native and introduced bullfrogs determined together even in a same location.

10. *CYTb* 서열의 계통 유연관계와 동아시아 집단의 모계 기원

본 연구에서 결정된 제주도 집단의 *CYTb* 서열과 NCBI database에 보고된 연구결과에서 수집한 834-bp 이상인 서열들(Table 18)의 haplotype을 결정하였다. 결정된 haplotype 서열들 사이에서 거리지수를 산출하였다(Table 19). BCH01, BCH02 서열과 가장 높은 상동성을 나타낸 서열은 BCH27 (KX344492)로 전체 937-bp 서열 중 BCH01의 935-bp와 BCH02의 936-bp가 동일한 서열로, 거리지수는 BCH01-BCH27 사이에서 0.0024, BCH02-BCH27 사이에서 0.0012였다. BCH27은 Kamath et al. (2016)에 haplotype Lcat-WY8로 명명되었으며, 미국 Wyoming 주의 Grand Teton National Park (8 개 지점, 27개 시료)에서 결정된 서열로, 1950년대에 미국 내 다른 주(state)에서 도입된 집단이며, 지리적으로도 Montana 주에 가깝다. Lcat-WY8 haplotype은 Austin et al. (2004b)에 의해 보고된 sub-haplotype Rcat627 (AY083292)과 가장 근연이었다. Bai et al. (2012)이 중국에서 보고한 H43 (BCH04)은 BCH01과 0.0036, BCH02와 0.0073의 유전적 거리지수를 나타내었다(Table 15). 또한 Bai et al. (2012)은 H43과 함께 발견된 H7은 Austin et al. (2004b)이 명명한 Rcat624와 Rcat627을 포함하는 상위 haplotype이다(Table 18). Rcat624는 Mississippi 주의 Starkville, Rcat627은 Alabama 주의 Walker Mines 시료에서 결정된 서열로, Mississippi 강의 동부에 위치하나 이 지역은 eastern-과 western-가 혼재하는 overlap-zone이며, 대표적인 western-lineage로 구분하였다(Austin et al., 2003b, 2004b; Kamath et al., 2016). 반면, 전라북도의 BCH03과 가장 가까운 서열(0.0857)은 BCH17 (AY210376), BCH18 (AY210377), BCH23 (KX344488)이었다. Austin et al. (2004b)은 BCH17 (AY210376)은 Rcat1038, BCH18 (AY210377)은 Rcat1112로 명명하였고, 모두 캐나다 Ontario 주에서 결정된 서열이다. 또한 BCH23 (KX344488)은 Kamath et al. (2016)이 Lcat-MT4로 명명한 서열로 Montana 주의 Bitterroot River에 위치한 MPG Ranch, Florence (7 개체), Stevensville 인근 연못(1 개체)에서 결정되었다. AY210376과 AY210377, KX344488은 eastern-lineage의 haplotype 서열로 분류되었다.

Table 18. Accession number and their origin of *CYTb* haplotype sequence of the American bullfrogs

Haplotype	Accession No.	Location
BCH01	This study	Jeju Island, South Korea
	This study	Masan-si and Chanyeong-gun, Geongsangnam-do, South Korea
	AB761267	Japan
	KX269354	Chengdu, Sichuan, China
BCH02	This study	Jeju Island, South Korea
	This study	Masan-si and Chanyeong-gun, Geongsangnam-do, South Korea
	JQ798775	Jangheung-gun, Jeollanam-do, South Korea
	JQ798776	Jinju-si, Gyeongsangnam-do, South Korea
BCH03	JQ798777	Buan-gun, Jeollabuk-do, South Korea
	AF205089	Buan, Jeollabuk-do, South Korea
BCH04	KF049927	Jinhua, Zhejiang Province, China
BCH05	AY083287	USA
	AY210375	Grenadier Island, Ontario, Canada
BCH06	AY210362	Boone, Missouri, USA
BCH07	AY210363	Colquitt, Georgia, USA
BCH08	AY210364	USA
BCH09	AY210366	Clarendon and Miller Township, Ontario, Canada
BCH10	AY210367	Augusta, Virginia, USA
BCH11	AY210368	Tyler, Texas, USA
BCH12	AY210369	Mercer, Missouri, USA
BCH13	AY210371	Desha, Arkansas, USA
BCH14	AY210372	Cross, Arkansas, USA
BCH15	AY210373	Welland, Ontario, Canada
BCH16	AY210374	USA
BCH17	AY210376	Port Rowan, Ontario, Canada
BCH18	AY210377	USA
BCH19	AY210378	Allegan, Michigan, USA
BCH20	KX344485	Montana, USA
BCH21	KX344486	Montana, USA
BCH22	KX344487	Montana, USA
	AY210370	Ontario, Canada
BCH23	KX344488	Montana, USA
BCH24	KX344489	Montana, USA
	AY210365	Ontario, Canada
BCH25	KX344490	Montana, USA
BCH26	KX344491	Montana, USA
BCH27	KX344492	Montana, USA
	AY083292	Walker Mines, Alabama, USA
	AY083294	Starkville, Mississippi, USA

Table 19. Pair-wise genetic distances for *CYTb* haplotype sequences calculated by Tajima and Nei (1984) method

<i>CYTb</i> sequence	Country	BCH0	BCH0	BCH0	BCH2	BCH2	BCH1	BCH2	BCH2	BCH2	BCH1	BCH1	BCH1	BCH0	BCH0	BCH1	BCH2	BCH2	BCH0	BCH0	BCH1	BCH1	BCH1	BCH2	BCH1	BCH0	R	R		
	¹	1	4	2	7	1	2	0	2	5	4	1	3	6	9	0	8	9	4	6	7	5	8	7	5	3	6	3	<i>nigromaculata</i>	<i>dybowskii</i>
BCH01	CJK																													
BCH04	CHN	0.0036																												
BCH02	KOR	0.0036	0.0073																											
BCH27	USA	0.0024	0.0060	0.0012																										
BCH21	USA	0.0060	0.0097	0.0048	0.0036																									
BCH12	USA	0.0060	0.0097	0.0048	0.0036	0.0073																								
BCH20	USA	0.0048	0.0085	0.0036	0.0024	0.0060	0.0012																							
BCH22	USA	0.0060	0.0097	0.0048	0.0036	0.0073	0.0024	0.0012																						
BCH25	USA	0.0073	0.0110	0.0060	0.0048	0.0085	0.0036	0.0024	0.0012																					
BCH14	USA	0.0036	0.0073	0.0024	0.0012	0.0048	0.0048	0.0036	0.0048	0.0060																				
BCH11	USA	0.0048	0.0085	0.0036	0.0024	0.0060	0.0060	0.0048	0.0060	0.0073	0.0024																			
BCH13	USA	0.0036	0.0073	0.0024	0.0012	0.0048	0.0048	0.0036	0.0048	0.0060	0.0024	0.0012																		
BCH06	USA	0.0122	0.0159	0.0110	0.0097	0.0134	0.0110	0.0097	0.0110	0.0122	0.0097	0.0097	0.0110																	
BCH09	USA	0.0184	0.0222	0.0197	0.0184	0.0222	0.0222	0.0210	0.0222	0.0235	0.0184	0.0184	0.0197	0.0184																
BCH10	USA	0.0197	0.0235	0.0210	0.0197	0.0235	0.0235	0.0222	0.0235	0.0248	0.0197	0.0197	0.0210	0.0197	0.0036															
BCH08	USA	0.0159	0.0197	0.0172	0.0159	0.0197	0.0197	0.0184	0.0197	0.0210	0.0159	0.0159	0.0172	0.0159	0.0024	0.0036														
BCH19	USA	0.0197	0.0235	0.0210	0.0197	0.0235	0.0235	0.0222	0.0235	0.0248	0.0197	0.0197	0.0210	0.0172	0.0060	0.0073	0.0036													
BCH24	USA	0.0184	0.0222	0.0197	0.0184	0.0222	0.0222	0.0210	0.0222	0.0235	0.0184	0.0184	0.0197	0.0159	0.0048	0.0060	0.0024	0.0012												
BCH26	USA	0.0184	0.0222	0.0197	0.0184	0.0222	0.0222	0.0210	0.0222	0.0235	0.0184	0.0184	0.0197	0.0159	0.0048	0.0060	0.0024	0.0036	0.0024											
BCH07	USA	0.0197	0.0235	0.0210	0.0197	0.0235	0.0235	0.0222	0.0235	0.0248	0.0197	0.0197	0.0210	0.0172	0.0060	0.0073	0.0036	0.0073	0.0060	0.0060										
BCH05	USA	0.0222	0.0261	0.0235	0.0222	0.0261	0.0261	0.0248	0.0261	0.0274	0.0222	0.0222	0.0235	0.0197	0.0134	0.0147	0.0110	0.0147	0.0134	0.0134	0.0122									
BCH18	USA	0.0184	0.0222	0.0197	0.0184	0.0222	0.0222	0.0210	0.0222	0.0235	0.0184	0.0184	0.0197	0.0184	0.0097	0.0110	0.0073	0.0110	0.0097	0.0097	0.0110	0.0036								
BCH17	USA	0.0184	0.0222	0.0197	0.0184	0.0222	0.0222	0.0210	0.0222	0.0235	0.0184	0.0184	0.0197	0.0159	0.0097	0.0110	0.0073	0.0110	0.0097	0.0097	0.0085	0.0036	0.0024							
BCH15	USA	0.0172	0.0210	0.0184	0.0172	0.0210	0.0210	0.0197	0.0210	0.0222	0.0172	0.0172	0.0184	0.0147	0.0085	0.0097	0.0060	0.0097	0.0085	0.0085	0.0073	0.0048	0.0036	0.0012						
BCH23	USA	0.0159	0.0197	0.0172	0.0159	0.0197	0.0197	0.0184	0.0197	0.0210	0.0159	0.0159	0.0172	0.0159	0.0073	0.0085	0.0048	0.0085	0.0073	0.0073	0.0085	0.0060	0.0024	0.0024	0.0012					
BCH16	USA	0.0197	0.0235	0.0210	0.0197	0.0235	0.0235	0.0222	0.0235	0.0248	0.0197	0.0197	0.0210	0.0197	0.0110	0.0122	0.0085	0.0122	0.0110	0.0110	0.0122	0.0122	0.0085	0.0085	0.0073	0.0060				
BCH03	KOR	0.0979	0.1025	0.0994	0.0979	0.1025	0.1025	0.1010	0.1025	0.1010	0.0963	0.0994	0.0994	0.1025	0.0948	0.0963	0.0917	0.0963	0.0948	0.0933	0.0963	0.0902	0.0857	0.0857	0.0872	0.0857	0.0917			
<i>R. nigromaculata</i>		0.2260	0.2301	0.2260	0.2240	0.2240	0.2260	0.2240	0.2240	0.2260	0.2240	0.2199	0.2219	0.2281	0.2281	0.2280	0.2260	0.2281	0.2301	0.2281	0.2301	0.2219	0.2179	0.2158	0.2178	0.2179	0.2240	0.1468		
<i>R. dybowskii</i>		0.2343	0.2342	0.2364	0.2343	0.2385	0.2343	0.2322	0.2322	0.2322	0.2364	0.2343	0.2322	0.2384	0.2385	0.2363	0.2364	0.2385	0.2364	0.2406	0.2405	0.2343	0.2364	0.2343	0.2363	0.2364	0.2343	0.2643	0.2514	

¹, CJK, China, Japan, and Korea; CHN, China; KOR, Korea; USA, United States of America and included Ontario, Canada.

Figure 11은 *CYTB* haplotype 서열들(Table 19)간의 유전적 거리지수를 근거로 작성한 NJ tree이다. 계통수는 크게 western-lineage, eastern-lineage 등 2 개의 그룹으로 구분되었으며, BCH03은 독립적인 분지 상에서 발견되었다. 계통수의 분지 양상은 Austin et al. (2004b)에서 제시한 것과 유사한 양상을 보였다. 지리적으로도 Austin et al. (2004b)에서 제안한 바와 같이 western-lineage와 eastern-lineage는 Mississippi 강을 중심으로 구분되는 양상을 보였다. Western-lineage에 속하는 고유 집단에서는 Texas 주의 Tyler, Arkansas 주의 Desha와 Cross 등에서 발견되었고, eastern-lineage는 Mississippi 강의 동부지역인 Missouri, Georgia, Virginia, Michigan 등과 캐나다 Ontario 주의 황소개구리 고유 집단에서 발견되었다(Austin et al., 2004b). 반면, western-lineage의 경우 도입 집단으로는 Montana, Wyoming, Missouri, Canada의 Ontario 주 등에서 발견되고, eastern-lineage는 Montana에서도 발견되었다(Kamath et al., 2016). 우리나라 제주도와 일본, 중국에서 발견된 BCH01, 우리나라의 제주도, 경상남도, 전라남도, 전라북도 등에서 발견된 BCH02, 중국에서 H43 haplotype으로 명명되었던 BCH04 등이 western-lineage와 같은 분지 상에서 발견되었다. 반면, 전라북도 부안군에서 발견된 BCH03의 경우 계통수 상에서는 western-lineage나 eastern-lineage와는 별개의 분지를 나타내었다.

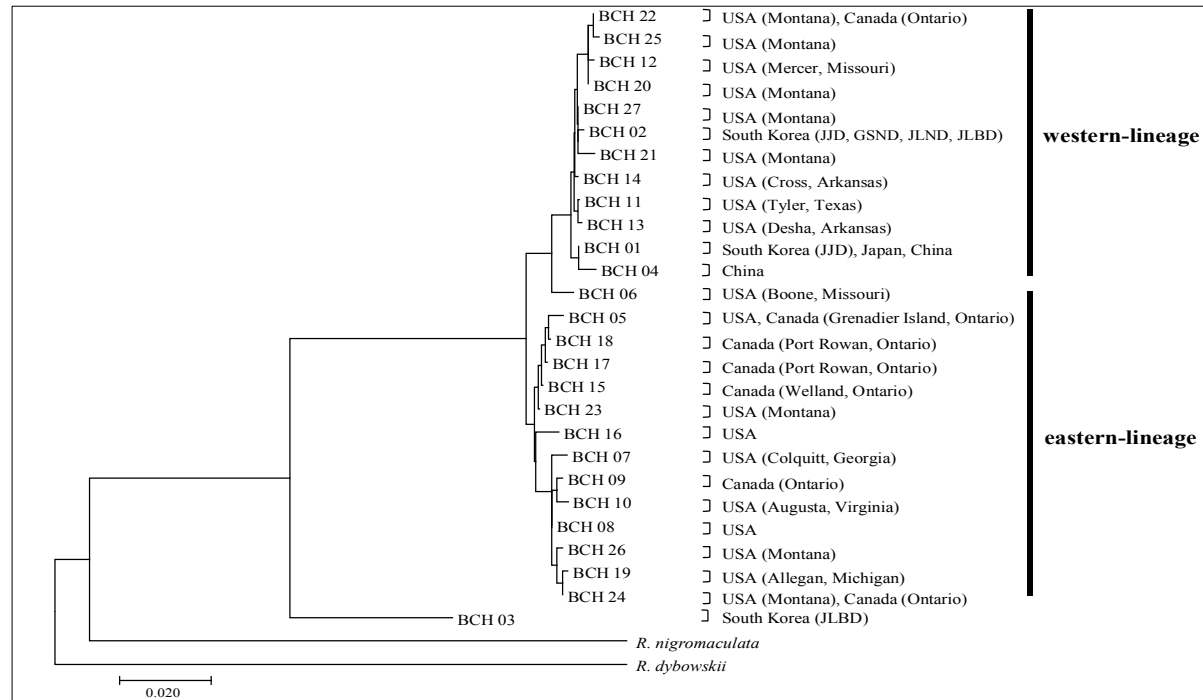


Figure 11. Evolutionary relationships of *CYTb* haplotype sequences of the American bullfrogs obtained in this study and those previously reported in NCBI database. The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). JJD, Jeju Island; GSND, Gyeongsangnam-do; JLND, Jeollanam-do; JLBD, Jeollabuk-do. The name of the state of US and Canada or city and province of South Korea are given in the parenthesis. The *CYTb* sequence of *Rana nigromaculata* and *R. dybowskii* were used for out-group rooting.

IV. 고 찰

1. 황소개구리의 서식지 및 유형

제주도 내 습지에 대한 모니터링과 중점조사 등을 통하여 제주도에서 황소개구리 서식지 총 109 개 지점을 확인하였다. 기존에 보고된 자료들을 종합해 보면, 제주도 내에서 황소개구리의 서식이 기록된 지점은 총 50 개 지점이었고 (Figure 4C), 물장오리오름습지(RCA055)를 제외한 49개 지점은 이번 조사에서도 모두 황소개구리가 서식하는 것으로 확인되었다(Table 2). 이는 제주도에 서식하는 황소개구리가 한 번 관찰된 지점에서는 완전히 사라지지 않고 지속적으로 서식한다는 의미로, 인위적인 조절이나 관리 없이 자연상태에서 황소개구리가 서식지를 포기하지 않거나, 이들을 완전히 없앨 수 있는 포식자 등 생태적 조절요인은 없음을 보여주는 결과라 하겠다.

한편, 물장오리오름습지에서 2011년에 관찰되었던 황소개구리 올챙이들은 이후 2012년, 2013년의 조사(제주녹색환경지원센터, 2013)와 본 연구과정에서도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 물장오리오름습지에서 2011년에 관찰된 황소개구리들이 모두 올챙이이고, 성체가 관찰된 바 없다는 점에서, 이들은 인위적으로 이동되어온 개체들로 추정되고 있다(김과 박, 2011). 또한 이동된 황소개구리 올챙이들이 정상부가 해발 938m, 분화구 내부 습지가 880m 전후인 고지대 습지환경에 적응하지 못하였거나, 물장오리오름습지 내에 서식하는 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*), 잠자리목(Odonata)의 유충, 물장군(*Lethocerus deyrollei*) 등 육식성 곤충류, 누룩뱀(*Elaphe dione*), 유혈목이(*Rhabdophis tigrinus*), 쇠살모사(*Gloydus ussuriensis*)와 같은 다양한 포식자들에 의한 섭식 등, 여러 원인에 의해 절멸된 것으로 생각되지만, 뒷받침할만한 자료는 아직 없다. 향후 다각적인 연구를 통해 습지 내로 도입된 황소개구리의 자연 감소나 절멸의 원인을 찾아낸다면, 황소개구리 도입지역에 대한 생태적 관리방안 마련에 도움이 될 것으로 판

단된다.

이번 연구에서 조사된 황소개구리 서식지의 분포는 이전 연구들과 유사하였지만, 서식지의 수는 2001년 7 개, 2007년 24 개, 2015년 36 개에서 이번 연구를 포함하면 2017년까지 총 109 개 지점으로 점차 증가하고 있다(Table 2, Figure 3, 4). 제주도 서부에 서식지가 집중(전체 97.3%)되는 것은 아마도 제주도에서 황소개구리 양식이 처음 시작된 지점이 대정읍 내에 위치하고(오, 2005), 한경면, 안덕면 지역이 해발 200m 이하의 평지가 많고 강수량이 적어, 농업용 저수지와 관개수로가 많이 준설되어 있으며, 농수로에 의해 많은 자연연못과 저수지 등이 서로 연결되어 있다는 점에서 지역적인 확산의 기회가 많았을 것이다(오와 홍, 2007; 국립생태원, 2015). 또한 황소개구리 서식지가 많이 발견된 한경면과 대정읍의 습지들의 경우, 폭우나 태풍에 의해 하천이 범람하는 시기에 서로 쉽게 연결되거나, 평소에도 농수로나 하천에 의해 서로 연결되어 있는 지점들이 많았다. 현지조사 과정에서도 봉우못(RCA017)-남문지못(RCA046)과 같이 수로로 연결되어 있거나, 저수지-농수로, 연못과 저수지 등이 농수로나 하천으로 연결된 경우들도 발견되었다. 이외에도 직접적으로 연결되어 있지 않다고 하더라도 자연적인 이주가 가능한 근거리에 위치한 경우들도 있었다. 예를 들어 한경면 낙천리의 새미왓물(RCA067)의 경우 반경 100 m 이내에 3 개의 서식지(RCA066, RCA068, RCA069)가 발견되었다. 뿐만 아니라 RCA073과 RCA074 사이에서 관찰된 roadkill 사체는 육상 이동을 뒷받침할만한 근거가 될 것이며(Figure 5E), 조사과정 중 비가 오는 날 낮 시간대에 육상에서 이동 중인 개체들이 관찰되기도 하였다. 또한 습지 사이를 연결하는 농수로에서 유수에 떠내려가는 개체가 관찰되기도 하였다(Figure 5F).

제주도는 화산활동에 의해 형성된 섬으로 현무암과 송이 등 물이 잘 흡수되는 암반이 많아 연중 대부분 물이 흐르지 않는 건천이 많다. 한라산 백록담, 물장오리오름습지, 물영아리습지 등 분화구습지들과 인위적으로 조성된 용수저수지(제주시 한경면 소재) 등 농업용 또는 상수용 저수지를 제외하면, 연중 물을 공급할 수 있는 자연 수원지는 거의 없다. 제주도 서부권은 토양이 비옥하여 농사짓기 좋으나 타 지역에 비해 강수량이 적고, 유수 하천도 거의 없어, 예로부터 식수원, 생활용수 해결을 위한 물통이나 연못 등을 준설하여 이용하였다. 20세기 후반에

농지 정비, 농업용 저류지 준설, 수로 정비 등을 통해 현재는 관개농업을 하고 있다. 또한 곳곳에 농업용수 확보를 위해 작은 보(dammed pool)와 농지 내 웅덩이를 만들어 관개농업에 이용하고 있다. 이러한 지역사회의 수자원 이용 특성이 1970년대에 도입된 황소개구리의 서식지 확산과 연관되어 있는 것으로 판단된다.

황소개구리의 서식지 유형에 대한 선행 연구에서도 황소개구리는 주로 물웅덩이, 저수지, 호수, 연못과 같은 정체된 물에 주로 서식하며, 하천의 경우도 흐름이 완만한 지역에서 서식한다고 보고되어 있다(Bury and Whelan, 1984; Dejean et al., 2012; Kamath et al., 2016). 국내 연구에서도 황소개구리의 서식지는 주로 저수지와 연못, 하천, 웅덩이 등이었다(이와 고, 2001; 국립환경과학원, 2007). 습지 유형에 대한 황소개구리의 서식지 선호 양상에 대한 연구결과들은 황소개구리가 보통 1-2년 정도 올챙이 형태로 월동하는 긴 유생기를 갖고, 변태 후 2년 후에야 성 성숙에 도달하는 등 성체까지 도달하는 시기가 길다는 특성(Willis et al., 1956; 김, 1973; Govindarajulu et al., 2006), 연중 장기간에 걸쳐 번식활동이 진행되는 번식특성 등(Ryan, 1980; 최 등, 1998; Medeiros et al., 2016)에서 기인한 것으로 판단된다. 제주도에서 보고된 자료에서도 연못과 농수로, 저류지, 분화구습지 등으로 동일한 결과라 하겠다(제주도 등, 2001; 고와 고, 2005; 오, 2005; 오와 홍, 2007; 김과 박, 2011; 제주녹색환경지원센터, 2013; 국립생태원, 2015; 제주도양서류생태연구소, 2015). 이번 연구에서도 황소개구리 서식지 대부분이 연못, 저수지, 웅덩이였으며, 이 역시 황소개구리의 생태적 특성이 반영된 결과라 할 것이다.

2. 서식지별 황소개구리 개체군의 분포

황소개구리 서식지 중에서 성체가 발견된 지점은 총 109 개 지점으로, 조사된 지역별로 황소개구리 성체의 개체수는 차이가 없었다. Oh and Hong (2007)은 제주도 서부지역에서 황소개구리 성체 182 개체를 24 개 지점에서 관찰하여, 약 7.6 개체/site로 본 연구의 결과(7.8 개체/site)와 매우 유사한 수준을 보였다. 이

는 2007년 이후 약 10년이 경과한 지금까지도 황소개구리의 습지별 빈도가 뚜렷하게 달라지지 않은 것으로 사료된다. 이러한 결과는 황소개구리의 생존율이나 행동권의 반경 등 여러 가지 요인을 생각할 수 있으나, 원인에 대해서는 면밀한 연구가 필요하다. 반면, 제주녹색환경지원센터(2013)와 제주양서류생태연구소(2015)의 보고에서는 관찰된 성체나 올챙이의 구체적인 개체수는 기록되어 있지 않다. 조사결과에서 기술한 황소개구리 성체의 경우 직접 계수된 개체들만을 기록하였다는 점에서 실제 서식하고 있는 개체수는 이보다 훨씬 더 많을 것으로 예상되나, 명확한 개체수 측정을 위해서는 개별 발견지점에 대한 정밀한 개체수 측정이 필요하다.

황소개구리 성체가 관찰되었던 109 개 지점 중, 79 개(72.5%) 지점에서 올챙이가 함께 관찰되었다. 이는 발견된 서식지 중에서 적어도 72.5% 이상의 습지가 황소개구리의 산란지(spawning site)로 이용될 가능성이 있다고 할 수 있다. Oh and Hong의 보고(2007)에서 올챙이나 어린 개체들이 전체 24 개 중 18 개 지점(75.0%)에서 관찰되었다고 기술하였고, 이 역시 이번 연구결과에서 나타난 수준과 거의 유사한 결과라 하겠다. 따라서 제주도 내에서 황소개구리 서식지의 75.0% 정도는 올챙이가 출현하고 있으며, 산란지에 대한 서식지의 비율이 어느 정도 유지되고 있는 것으로 판단된다. 반면, 발견된 올챙이들이 인근 습지에서 수로나 하천을 통해 유입되었을 가능성도 없지 않다. 따라서 황소개구리 산란지의 확인은 우리나라에서 황소개구리 산란기로 알려진 4-8월(김, 1975; 강과 윤, 1994; 김과 고, 1998; 최 등, 1998)에 산란된 알덩이를 직접 확인하는 조사가 추가로 이루어져야 할 것이다. 서식지 내에서 부화한 올챙이의 존속 여부는 습지 내에 포식자나 환경요인에 의해 달라질 수 있기 때문에(김, 1975; Li et al., 2011; 노 등, 2017), 올챙이나 어린 황소개구리들이 발견된 78개 지점에는 적어도 황소개구리의 생존에 직접적인 위협이 되는 천적이나 수질오염 등의 생물학적, 환경적 요인은 없다고 하겠다.

이러한 결과는 황소개구리 서식지 3/4은 성체들이 산란하여 올챙이가 생육하고 있는 장소이고, 나머지 1/4 지점들은 황소개구리 성체들이 새롭게 확산하여 아직까지 번식활동이 이루어지지 않거나, 수질 오염이나 포식자 등 외부 요인 때문에 황소개구리 올챙이가 생육할 수 없는 장소라 할 수도 있다. 올챙이가 발견되지

않는 지점들의 생물학적 요인과 환경요인에 관한 분석은 단순히 황소개구리 올챙이의 생육에 대한 적합 또는 부적합을 판단하는 것이 아니라, 황소개구리 올챙이의 자연 감소를 유도할 수 있는 관리프로그램의 개발에도 적용될 수 있을 것이다.

3. 제주도 황소개구리의 외부 형태적 특성

일반적으로 황소개구리는 SVL이 약 20 cm, BW 약 800 g에 이르는 대형종으로 알려져 있다(McAuliffe, 1978; Ryan, 1980; Medeiros et al., 2016). 본 연구에서 수집한 개체들은 SVL은 115.32-184.0 mm, 평균 143.14±17.59 mm였고, BW가 151.1-718.7 g, 평균 321.3±129.40 g으로 조사되어, 기존에 보고된 범위와 유사한 결과를 보였다. 우리나라에서 최초로 인공사육 과정에서 생산된 황소개구리의 경우 실내에서 2년간 사육된 개체들의 BW는 393.55±187.39 g이었고, 18개월 동안 사육한 개체들은 334.2±219.59 g 정도의 수준이라고 기재하였다(김, 1975). 최 등(1998)은 한반도에서 채집한 172 개체의 BW 249.5±21.0 g, SVL 138±14 mm의 수준을 보인다고 하였다.

전체적으로 본 연구에서 채집한 제주도 황소개구리의 체중은 최 등(1998)의 보고보다는 더 무겁지만, 김(1975)의 연구결과보다는 가벼웠다. 최 등(1998)의 연구는 여름철에 대부분 전라도 지역에서 채집되었고, 김(1975)은 실내에서 사육한 개체들이라는 점에 직접적으로 비교하기는 어렵다고도 할 수 있으나, 실내에서 18개월 동안 사육된 개체들이 야외에서 생활한 개체들에 비해 성장이 더 빠르다는 것을 보여주는 결과라 하겠다. 김(1975)은 산란 후 개구리로 변태할 때까지 야외에서는 약 1년 2개월이 걸리나, 실내사육에서는 약 7개월에 가능하다고 하여, 실내사육에서 올챙이의 성장과 변태가 더 빠르게 진행된다는 보고(김, 1973)와 유사한 결과라 하겠다. 최 등(1998)이 채집한 황소개구리 집단인 경우 4월부터 7월까지 채집하여, 성체들이 많이 포함된 결과라 추정된다. Howard (1978, 1981)는 암컷과 수컷 모두 성체가 된 이후에도 계속해서 지속적으로 성장하고,

오래된 성체들은 새롭게 성숙한 성체에 비해 50% 이상 더 크다고 하였다.

SVL는 제주도 집단이 한반도 집단(최 등, 1998)이나 김(1975)이 보고한 18개월령 집단에 비해 더 긴 양상을 나타내었는데, 이 같은 차이를 설명할 수 있는 자료는 현재 없으며, 연령과 성별, 천적의 유무와 습지 환경조건 등을 통제된 상태에서 얻은 조사결과를 이용하여 비교되어야 할 것이다. 하지만, 최 등(1998)이 제시한 체중과 체장 사이에 정(+)의 상관을 보고하였고, 제주도 집단에서도 $R^2=0.6997$ 로 계산되어, 제주도 집단 역시 체장이 길수록 체중이 증가하는 양상을 보인다는 분석 결과를 지지해 주고 있다. 체중과 SVL을 제외하면, 황소개구리의 외부 측정치를 집단 수준에서 비교할만한 연구결과들이 보고되어 있지 않아, 측정된 형질들이 지역별 차이나, 섬 환경에서 적용한 격리에 의한 차이들을 비교할 수 없었다.

한편, 황소개구리 성체 암컷과 수컷의 외부형태를 비교한 결과, BW는 수컷이 더 무겁고, TBL과 SVL, HFL, FFL 등은 모두 수컷이 더 길었다. 특히 측정된 외부 형질 중 HFL은 암컷(68.88 ± 5.658 mm)과 수컷(75.69 ± 8.692 mm) 사이에서 통계적인 유의차를 보였다($p < 0.05$). 우리나라에서 최초로 인공사육 과정에서 생산된 황소개구리에서 측정된 자료(김, 1975)에서는 2년간 실내에서 사육한 수컷들은 151-690 g(평균 403.3 ± 162.86 g), 암컷들은 140-805 g(평균 383.7 ± 217.69 g)로 개체가 변이는 심하나, 평균적으로 수컷이 암컷에 비해 약 20 g 정도 더 무겁다고 보고하였다(Table 8). 한편 1년 6개월 암컷($n=5$)은 체장 126.6 ± 24.30 mm에 체중 344.6 ± 223.35 g, 수컷($n=5$)은 체장 127.4 ± 23.26 mm, 체중 323.8 ± 241.54 g의 수준을 보여, 체장은 암컷과 수컷이 비슷하나 체중은 암컷이 수컷보다 약 20 g 정도 더 무거운 양상을 보인다고 하였다(김, 1973, 1975).

Howard (1978, 1981)는 성체의 성장률에서 암-수 차이는 없지만, 성체 암컷은 수컷에 비해 확연히 큰 성적이형(sexual dimorphism) 양상을 보인다고 하였다. 하지만, Ryan (1980)은 1976년 4월에 채집한 성체를 측정한 결과, 수컷의 SVL은 151.2 mm로 암컷(140.33 mm) 보다 더 길고, 암-수의 SVL 수준은 유의적인 차이를 나타낸다고 기술하였다. 중국 황소개구리에 대한 연구결과에서는 고도가 낮은 지역과 높은 지역 모두에서 암컷의 SVL은 수컷에 비해 성적이형을 보이며,

또한 저지대에서는 황소개구리의 연령이 증가하더라도 성적크기지형지수(sexual size dimorphism index, SDI)가 일정수준 이상으로 지속적으로 유지된다고 하였다. 또한 고지대에서 SDI가 연령이 많아질수록 감소하는데, 이는 고지대 집단이 정착 초기이기 때문에 나이가 많은 개체들이 적은 데서 기인한 것으로 제안하였다(Liu et al., 2010).

이 외에도 황소개구리의 성적이형은 보통 수컷의 고막은 눈보다 크지만, 암컷은 고막의 크기가 눈과 거의 같고, 수컷은 성 성숙 시기부터 턱 아랫부분이 황록색을 띠지만, 암컷은 희다(Ryan, 1980; Mason et al., 2003). 본 연구결과에서도 수컷은 고막이 눈보다 크고 턱 아랫부분이 황록색을 나타내었고, 암컷의 고막은 눈보다 크지 않으며, 턱 아래는 흰색을 나타내었고, 한반도 집단에서도 동일한 양상이 기록되었다(최 등, 1998). 황소개구리의 성적이형은 번식기 동안 수컷의 울음소리와 함께, 암-수를 식별하는 형질로써 야외조사에서 효과적으로 이용되고 있다 (Ficetola et al., 2007; Liu et al., 2010). 본 연구에서 검출된 수컷-편향적인 뒷발 길이의 성적이형이 번식기 동안 세력권을 형성하는 황소개구리 수컷에게 생태적인 중요성을 가질 것으로 예상되나, 연구된 정보와 시료의 수가 적어, 향후 해당 분야에 대한 시료 수 보충과 행동이나 생태적 중요성에 대한 평가가 수행되어야 할 것이다.

서식지별로 채집된 황소개구리 올챙이의 외부형태 측정 자료를 비교한 결과 (Table 9), 모든 외부형질에서 서식지별 집단 사이에서는 통계적인 유의차를 보였다($p < 0.05$). Gosner (1960)의 양서류 발생단계에서 37-38 단계 이상으로 발가락의 분화까지 거의 이루어진 형태이나, 앞다리가 출현한 개체는 없었다. 유럽에서 측정된 황소개구리 올챙이는 체장 167 mm까지, 체중은 최대 47 g까지 성장한다고 기록되었으며, 벨기에에서 황소개구리 올챙이의 경우 SVL이 45.1 mm, 체중은 평균 12 g이었다(Spitzen-van der Sluijs and Zollinger, 2010). 김(1972, 1973)은 올챙이 단계에서 TBL이 120 mm 정도(몸통 45 mm, 꼬리 75 mm), 체중 10 g 정도에서 변태하기 시작하여 뒷다리가 발생하고, 이후 34일 후에 앞다리가 발생한다고 기술하였다. 하지만 본 연구에서 RCA008의 경우 TBL이 148.59 ± 12.56 mm이었음에도 앞다리가 발생한 개체는 없었다. 조사과정에서 2017

년도에 채집된 황소개구리 올챙이 중에 앞다리의 발생이 시작된 개체는 발견되지 않았다. 따라서 적어도 3월말까지는 황소개구리 올챙이들이 앞다리의 분화가 시작되지 않는 것으로 판단된다. Collins (1979)는 황소개구리의 올챙이의 크기와 변태의 시기와는 상관없이 없다고 하였으며, 변태 시기가 동일 서식지를 이용하는 성체의 산란활동과 성체의 밀도에 따라 다양하게 나타난다고 하였다. 배 발생과 변태과정이 고도로 온도-의존적이며, 수온이 26℃ 이상인 조건에서 48 시간 이내에 부화하며, 부화 후 72 시간 이내에 난황을 모두 흡수한다고 기재하고 있다. 또한 황소개구리 올챙이의 성장에 있어 수온과 개체의 밀도 등 다양한 요인들이 영향을 미친다고 알려져 있다(McAuliffe 1978; Ryan 1980; Flores-Nava and Vera-Munoz, 1999; Spitzen-van der Sluijs and Zollinger, 2010; Medeiros et al., 2016). 우리나라로 도입된 황소개구리의 경우 수온이 9℃ 이하에서는 성체뿐만 아니라 올챙이들도 동면을 하게 된다(김, 1973; 최 등, 1998). 황소개구리가 우리나라 토종 무미 양서류종과 달리 올챙이 상태에서 월동을 하는 종이라는 점에서, 올챙이의 성장에 대한 계절적 요인이나 기후환경의 변화에 대한 연구를 위한 좋은 소재가 될 것으로 판단되나, 현재까지 우리나라에서 황소개구리 올챙이의 성장과 관련된 체계적인 연구는 거의 없다. 김(1972, 1973)은 황소개구리의 실내사육과정에서 올챙이의 성장과정을 관찰하면서 얻은 일부 사례를 소개하고 있으나, 집단 수준의 구체적 측정결과는 제시하지 않았다. 최 등(1998)은 황소개구리 난자와 정자발생, 올챙이의 성장단계에 대한 관찰결과를 제시하였으나, 체중이나 체장 등 외부형질의 변이에 관한 연구결과는 없다.

연구결과에서는 국내에서는 처음으로 황소개구리 올챙이의 성장 특성에 대해 살펴보고, 올챙이들이 서식지별로 발생단계나 외부형태에서 서로 차이를 나타내었다. 이는 서식지별 특성이 올챙이의 성장에 반영된 결과로 추정되지만, 결과에 대한 명확한 해석을 위해서는 성장단계와 성장속도에 영향을 줄 수 있는 요인들, 즉 서식지별로 먹이원과 밀도, 경쟁종이나 포식자의 유무 등 생물학적 요인이나 용존산소, 수온 등 환경요인에 분석적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

4. *ND1* haplotype 분석에 의한 모계 기원 추적

제주도 황소개구리 294 시료에서 *ND1* haplotype은 2 가지(BNH01, BNH02)로 분석되었다. 이는 제주도로 유입된 황소개구리의 모계가 적어도 2 가지 이상의 모계혈통에서 기원하였거나, 2회 이상의 독립적인 유입이 있었다고 할 수 있다. BNH01은 대정읍과 한경면의 서식지 대부분에서 발견되며, 특히 제주도의 서부권에서도 서남부 지역에 분포하고 있었다. 반면, BNH02의 경우 북동부와 대정읍의 동남부 등에서 발견되었고, 제주도의 지형적 특성 상 서식지 분포 자체가 불연속적이긴 하지만 BNH02의 분포는 전체 서식지의 동부에 편중된 띠 모양을 하고 있다. 이 결과는 BNH01과 BNH02가 동시에 제주도로 유입되어 자연확장을 하고 있기 보다는 독립적으로 유입된 2 개의 모계혈통이 자연생태계 내에서 개별적으로 확장하면서 일부 중첩된 서식지를 나타내고 있는 것이라 하겠다. 또 하나 생각할 수 있는 가설은 다수의 모계혈통이 동시에 유입된 후 인위적인 이동(translocation)에 의해 분산되었을 가능성이다. 이는 남원읍(RCA001, RCA002)이나, 제주시 봉개동(RCA055) 등 제주도 서부권과 거리가 먼 서식지의 개체들이 완전히 동일한 haplotype(RCA001은 BNH01, RCA055는 BNH02)만을 갖는다는 점과 일치하는 결과라 하겠다. 즉, 이들 두 지점(RCA001, RCA055)의 황소개구리들은 자연적인 확산보다는 사람의 활동(이동)에 의해 옮겨졌을 가능성이 더 높다고 하겠다. 특히, 봉개동의 물장오리오름습지(RCA055)의 경우 근처에 다른 서식지가 전혀 없는 상태에서 올챙이들만 발견되었다는 점에서 종교활동이나 또 다른 이유에 의해 옮겨진 결과로 추정된다(김과 박, 2011).

황소개구리 성체와 올챙이가 모두 채집된 지점에서의 *ND1* haplotype의 출현 양상이 일부지역(RCA026, RCA077, RCA096)에서 서로 상이하거나, 출현빈도가 다르게(RCA008) 나타나기도 하였다. 이러한 결과들은 시료 채집과정에서 발생한 sampling error라고 간주할 수도 있으나, 이들 서식지 중 RCA026, RCA076, RCA096은 홍수 외에는 올챙이들이 출입이 불가능하기 때문에, 개별 서식지에 산란하는 개체들과 발견되는 개체들은 서로 다를 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다. 간접적으로는 황소개구리들이 하나의 서식지에 완전히 머물러 있기보다는, 번식활동 이후 이동하면서 생활함을 나타내는 결과라 하겠다. Ryan (1980)은 황

소개구리 수컷이 습지에서 산란지 확보를 위해 세력권 경쟁(territorial competition)을 하고, 암컷은 수컷의 mating call에 따라 습지 내로 이동한다고 하였으며, Austin et al. (2003a)은 microsatellite (MS) 유전자형을 분석하여 황소개구리는 암컷-편향적 분산(female-biased dispersal)을 한다고 제안하였다.

황소개구리는 연중 짧게는 2 개월에서 길게는 수개월 동안 번식활동을 한다. 세력권을 보유한 수컷들은 습지 내에서 좋은 산란지를 확보하고, 이를 방어하면서 암컷을 유인하는 mating call을 내고, 방문한 암컷을 선택하여 산란하게 한다. 이 같은 번식기 동안의 행동양식은 수컷이 우선적으로 습지를 차지한 후 암컷을 유인하는 형태로 진행된다고 알려져 있다(Elmen 1968, Howard, 1978; Ryan, 1980; Austin et al., 2003a). 따라서 제주도 황소개구리 집단에서도 산란 이후 암컷과 수컷 모두 서식지에 지속적으로 머물지 않고, 다른 장소로 이동하는 것으로 판단된다. 또한, 하나의 서식지에서 둘 이상의 *ND1* haplotype을 갖는 올챙이들이 동시에 발견된다는 점은 해당 서식지를 이용하는 암컷-모계혈통들이 다수임을 나타내는 결과라 하겠다. 뿐만 아니라, 한 서식지에서 모계혈통에 따라 암컷들이 유전적으로 선택되거나 배제되지 않는다고 할 수 있다. 현재까지의 결과만으로 서식지 내에서 성장하고 있는 올챙이들을 생산한 부모의 개체수를 분자유전학적으로 산출할 수 있는 과학적 근거는 없다. 하지만, 동일 서식지의 올챙이들을 대상으로 핵 DNA MS 유전자형에 대한 분석이 진행된다면, 부모에 대한 정보를 보다 세밀하게 평가할 수 있을 것이다.

제주도 황소개구리 집단 중 일부 서식지에서는 성체와 올챙이가 나타내는 BNH01과 BNH02의 비율이 서로 다르거나, 출현 양상이 상이하게 나타났다. BNH01의 경우 성체의 75.4%를 차지하고 있으나, 올챙이는 88.2%를 나타내어, 비율이 더 높았다. BNH02의 경우 성체는 24.6%, 올챙이는 11.8%를 나타내었다. 이 결과는 제주도의 황소개구리 집단에서 BNH01-모계가 BNH02-모계에 비해 번식활동에 더 많이 참여하고 있거나, 더 높은 번식성공률을 나타낸다고 추정할 수 있다. 미토콘드리아는 ATP를 생성하는 세포소기관이고, 모계에 의해서 후손에 전달되기 때문에 성장과 신체구성, 신체적 활동과 고기와 우유의 생산성과 불임성 등 다양한 형질에 영향을 준다고 보고되었다(Wai et al., 2010; Tsai and St John, 2016; Wolff et al., 2016a, b). 포유류에서 mtDNA copy 수와 염기서열에

근거한 haplotype은 난질(oocyte quality)과 정자의 운동성(sperm motility)에 영향을 주는 중요한 요소이며(Wai et al., 2010), 사람에서는 mtDNA haplotype이 중국 한족 집단에서 정자 운동성(sperm motility)과도 유의적인 상관을 보인다고 하였다(Feng et al., 2013). 돼지(*Sus scrofa domesticus*)와 양(*Ovis aries*)에 대한 연구에서 mtDNA 다형성은 암컷의 난질과 다산성(prolificacy), 산자수(litter size) 등에 영향을 주지만, 암컷의 수명(female longevity), 출생 전 생존율(prenatal survival rate), 생시체중(bidy weight at birth), 일당증체율(daily growth rate) 등에는 영향을 주지 않는다고 하였다(Reicher et al., 2012; Tsai et al., 2016; Chen et al., 2017). 곤충에서도 호홉물이나 미토콘드리아의 수, 수컷의 가임성과 암컷의 생식연령에 영향을 준다고 하였다(Immonen et al., 2016; Wolff et al., 2016a, b). 즉, 제주도 황소개구리 집단에서도 번식성공률에 대해 mtDNA haplotype 내지는 모계-특이적인 영향이 나타날 수도 있을 것으로 사료된다. 이러한 가설을 증명하기 위해서는 *ND1* haplotype들이 모두 발견되는 습지를 대상으로 각각의 haplotype별로 산란한 알의 숫자 등 번식활동에 대한 연구자료가 뒷받침되어야 할 것이다.

황소개구리의 *ND1* haplotype의 지리적 분포(Figure 8)에서 제주도 내로 유입된 모계선조는 최소 2 개 이상에서 유래되었다고 추정할 수 있다. 따라서 황소개구리의 제주도 유입과정에 대해 기본적으로 2 가지 가설을 생각할 수 있는데, 첫째는 황소개구리가 제주도로 유입된 횟수가 단 1 회라면, 복수의 모계가 동시에 유입되었다고 할 수 있다. 이 경우 제주도로 수입된 황소개구리의 원산지(또는 중간 경유지)에는 적어도 제주도에서 발견된 것 이상의 모계혈통들이 있을 것으로 예상된다. 만약, 특별한 간섭이 없는 상태라면, 집단의 유전적 다양성(genetic diversity)은 자연적인 확산에 의해 집단의 일부가 이주할 경우 거리에 의한 분리(isolation by distance) 현상(Mantel, 1967; Kamath et al., 2016)을 나타내며, 확장 중심에서 멀어질수록 다양성은 감소하는 경향을 보인다. 한반도 집단에서 분석된 개체수가 제주도 집단에 비해 매우 적음에도 불구하고, 한반도 집단이 더 다양한 haplotype들(총 6 가지, BNH01-BNH06)을 보이고, 제주도 집단에서 발견된 모든 haplotype들(BNH01, BNH02)을 모두 포함하고 있기 때문에(Table 11), 이 결과들은 현재 제주도에서 발견되고 있는 황소개구리들은 한반도에 경유하여

도입되었음을 보여주는 분자적 증거라 하겠다.

유전자 서열의 유전적 다양성에 대한 평가에 있어, Grant and Bowen (1998)은 Hd 수준이 0.5이상이면 π 가 0.5% 이하이면, 빠른 확장이나 새로운 돌연변이의 축적에 따른 병목(bottleneck) 상태이라고 판독하였다. 제주도 황소개구리 집단 중 RCA089, RCA095, RCA096 등이 해당되는 경우들이다. 또한 $Hd > 0.5$, $\pi > 0.5\%$ 의 상태인 집단은 유전적으로 아주 안정적인 집단이거나 분화된 계통들(differentiated lineages)이 2 차 접촉을 하는 것으로 판단하였다. 제주도 내에서 이 같은 유형의 집단은 발견되지 않았다. $Hd < 0.5$, $\pi < 0.5\%$ 인 경우는 집단은 병목 상태이거나 창시자 효과(founder effect)가 진행되고 있는 집단임을 시사한다. 제주도 집단들 중 대부분(총 26 개 집단 중 23 개 집단, 88.5%)은 창시자 집단이라고 하겠다.

하지만, 이와 같은 해석은 유전적으로 매우 안정화된 집단에서부터 자연적인 확산에 의해 유전자의 흐름이 발생할 경우를 가정한 것이며, 제주도로 도입된 집단이 여러 집단이고, 황소개구리가 1 회 산란으로 평균 6-7천 개, 많게는 2만 5천 개의 많은 알을 낳는다는 점에서(McAuliffe 1978; Ryan 1980; Medeiros et al., 2016), 또 다른 해석도 가능하다. BNH01이 거의 100%에 이르는 모체가 제주도 서부권의 거의 전 지역에서 관찰되며, BNH02가 북쪽과 동쪽, 남쪽으로 선상으로 가장자리를 따라서 발견되기 때문에, BNH01 모체가 도입되어 2 차적인 자연 확산이 어느 정도 진행된 이후 BNH02가 추가로 도입되어 확산하고 있는 것으로 보인다. 따라서 2 차적인 자연확산의 중심은 한경면 북쪽지역에서 서쪽과 남쪽으로 이동하는 것으로 보인다.

제주도 황소개구리 집단에서 *ND1* haplotype의 분포에 대한 설명을 위해서는 또 하나의 가설이 요구되는데, 이는 김과 박(2011)에 의해 제기된 바 있는 인위적인 이동이다. Kamath et al. (2016)은 미국 Montana 주에 도입된 황소개구리 집단이 Yellowstone 강에서는 거리에 의한 분리의 형태를 나타내지만, 여타 다른 지역에서는 haplotype의 분포가 불연속적인 양상을 나타내면서 Hd , π 의 다양성이 매우 낮은 집단들을 주목하였고, 이들은 사람의 활동에 의한 2 차적인 이동의 결과라 하였다. 제주도 집단에서도 물장오리오름습지에서 관찰되는 BNH02, 남원읍지역 RCA001에서 관찰되는 BNH01의 경우 Hd , π 의 수준이 '0'를 나타내고

(Table 12), 타 지역과의 거리가 멀다는 점에서 인위적인 이동의 결과라 하겠다.

지리적으로 매우 가까운 RCA074와 RCA076(직선거리 약 140 m), RCA104와 RCA105(직선거리 약 300 m) 집단들은 거리가 가깝지만 haplotype의 출현양상은 상이하게 나타났다. 이는 일차적으로 두 서식지 간의 유전자의 흐름이 차단되었거나, 아니면 정착한 집단이 자연확산에 의한 결과가 아닐 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다. Patton and Yang (1977)은 미국 주머니뿔쥐(*Thomomys bottae*)의 경우 거리가 가깝더라도 유전자 교류가 차단되어 있거나 매우 적으면, 지리적 변이가 많이 출현하며, 심지어 핵형(karyotype)의 차이가 많다고 하였다. 또한 김 등(2016)은 제주도에 서식하는 큰밭윗수염박쥐에 대한 *ND1* haplotype의 분포가 동부, 한라산지역, 서부에서 서로 다른 유형으로 관찰된다는 점에서 빙하기를 거치는 동안 제주도 내에서 자체적인 유전적 분화가 진행되었을 가능성을 제안하였다. 하지만, 제주도 내에 서식하는 황소개구리 집단들은 대단히 짧은 기간 동안 제주도에 서식하였음에도 불구하고 일부 집단들은 매우 가까운 서식지 사이에서도 극단적으로 다른 haplotype을 나타내었다. 이는 집단 사이의 유전자 교류가 거의 없다는 것을 의미하며, 일부는 근처에 있는 집단의 자연적인 확장에 의해 형성된 집단이 아니라 인위적인 이동(translocation)의 결과라 할 수 있겠다. 즉, 1970년대 이후 황소개구리 집단의 초기 도입 이후에도 어떤 식으로건 초기 집단과 모계혈통이 다른 개체들이 추가로 유입되었을 가능성을 보여주는 결과라 하겠다. 이 등(2005)은 전라남도에서 *ND1* 염기서열이 다른 지역에 비해 다양하게 나타나는 이유에 대한 원인으로 도입 이후 지역 내에서의 분화된 것은 아니라고 제안하였으나, 동시에 이들은 양 등(2001)의 보고를 인용하여 국내로 도입된 개체가 유전적 변이가 적은 stock일 가능성 때문에 황소개구리 자연집단이 근친의 증가로 자연감소하고 있다고 제안하고 있다. Austin et al. (2003b)는 mtDNA의 *CYTB*와 *ND2* 서열이 서로 유사한 분화시간(divergence time)을 나타낸다고 하였으며, 0.69-2.4%/1백만년 정도로 예측하였다. 돌연변율/년/유전자는 *CYTB* 서열에 대하여 $2.78-9.82 \times 10^{-6}$ 의 범위를 보였고, 다른 변온동물에서의 분화시간과 유사한 범위에 해당하였다(Martin and Palumbi, 2006). 따라서 711-bp의 *ND1* 유전자의 경우 염기서열 1 개의 변화(0.1406%)에 의해 형성된 haplotype은 최대 5만-20만년의 기간을 나타낸다고 할 수 있다. 따라서 이 등

(2005)이 제안한 국내 도입 후 염기서열 다형성 형성은 가능성이 거의 없다.

제주도와 경상남도, 광주시, 전라남도 황소개구리 집단에서 *NDI* 유전자 서열의 유전적 다양성지수 분석결과를 Grant and Bowen (1998)의 제안에 따라 해석한다면, 경상남도 집단($Hd > 0.5$, $\pi < 0.5\%$)와 광주시($Hd > 0.5$, $\pi < 0.5\%$) 집단은 확장중인 병목상태라고 할 수 있다. 또한 전라남도 집단($Hd > 0.5$, $\pi > 0.5\%$)은 유전적으로 안정되거나 분화된 계통 간 2 차 접촉이 일어나고 있는 것으로 평가되지만, 5 가지 이상의 haplotype이 출현하고, 유전적 다양성이 매우 높다는 점에서 전라남도에 서식하는 황소개구리 집단은 여러 개의 모계혈통이 차례로 유입되었던 것보다 다양한 모계혈통들이 거의 같은 시기에 대량으로 유입되어 정착한 집단으로 보인다. 또한 이들이 현재는 지리적으로 고르게 분산되어 유전적으로 안정화되는 단계에 접어들었다고 할 수 있겠다. 제주도 집단($Hd < 0.5$, $\pi < 0.5\%$)은 유전적 다양성지수가 모두 낮은 수준이므로, 외부에서 유입된 집단이 급속하게 확산되고 있는 병목상태이며, 현재까지 집단 전체가 창시자 집단(founder population) 단계에 있다고 할 수 있다.

황소개구리 집단에서 발견된 7가지 *NDI* haplotype 중 우리나라에서 제주도, 전라남도 영암군, 장흥군, 고흥군 등과 일본, 중국에서 발견되는 BNH01은 BNH07 (미국 California)과 유전적 거리지수가 0.0042로 가장 낮은 수준을 보여 이들 집단들은 모계혈통의 유전적으로 매우 가까운 근연인 선조에서 유래되었음을 짐작할 수 있다. 반면 BNH01-BNH06 (전라남도 영암)은 0.0129로 가장 상이한 수준을 보여, 유전적으로 가장 거리가 먼 모계혈통으로 판독할 수 있다. BNH02는 제주도와 광주광역시, 전라남도 나주시와 고흥군에서 발견되었고, BNH03, BNH04, BNH05와 유전적 거리지수가 0.0014로 매우 가까운 관계임을 나타내었다. BNH02-BNH06은 0.143으로 유전적으로 유연관계가 매우 멀게 나타났다. 거리지수 상에서 BNH06은 BNH07과 0.0085로 가장 가깝지만, 다른 haplotype들과는 0.0010이상의 거리지수를 보여 유전적 혈연관계는 매우 먼 것으로 판단된다. 산출된 거리지수를 바탕으로 작성한 계통유전학적 분지도(NJ tree) 상에서는 *NDI* haplotype들은 크게 2 개의 그룹으로 분지되었다(Figure 10). BNH06은 outgroup인 참개구리, 북방산개구리와 가까운 위치에서 발견되었고, 나머지 서열들은 모두 동일한 분지 상에서 발견되었다. 이는 BNH06이 황소개구리

haplotype 서열들과는 상이한 염기서열을 다수 포함하고 있는데서 기인한 결과로 보인다.

유전적 거리지수와 NJ tree를 종합해 보면, 제주도에서 발견되는 BNH01과 BNH02는 두 haplotype 사이에서 직접적인 혈연관계에 있기 보다는 서로 다른 모계혈통에서 유래한 것이라 하겠다. 또한 우리나라 전체에서 발견된 haplotype의 수는 많지만, BNH06을 제외하면 모두 미국 California에서 보고된 BNH07 (AY819484)와 동일한 모계에서 유래된 것으로 판단된다. 우리나라와 일본, 중국, 미국 황소개구리 집단들 사이에서의 유전적 흐름이나 모계혈통의 상관을 분석하기에는 아직까지 일본과 중국, 미국 등에서 보고된 *ND1* 서열이 충분하지는 않지만, 적어도 우리나라에 도입된 황소개구리 집단은 모계혈통이 미국에서 기원하였고, 일본을 거쳐 들어왔을 가능성이 높다고 하겠다. 또한 동아시아의 한국, 중국, 일본의 황소개구리 집단의 모계는 서로 연관되어 있고, BNH01과 그 외의 모계로 구분되었다. 제주도 집단의 BNH01과 BNH02는 서로 다른 모계선조에서 기원했으나, 모두 미국에서 기원했다고 하겠다.

5. *CYTB* haplotype 분석에 의한 모계 기원 추적

ND1 유전자 분석결과와 마찬가지로, 제주도에서는 *CYTB* 유전자 역시 2 개의 haplotype (BCH01, BCH02)을 나타내어, 적어도 2 가지 이상의 모계혈통에서 유래되었다고 볼 수 있다. 또한 제주도와 한반도 집단 전체에서 3 가지 haplotype이 관찰됨으로써, 우리나라 전체 황소개구리 집단의 모계는 적어도 3 가지 이상의 다양한 모계혈통에서 유래된 집단이라고 판단된다. 현재까지는 전라남도나 경상남도 집단에서 충분한 시료를 대상으로 한 연구결과가 없기 때문에 현재의 연구결과만으로 제주도 황소개구리 집단의 모계혈통 구조가 전라남도 집단보다는 경상남도 집단과 더 유사하다고 단정할 수는 없다. 하지만 분명한 것은 *ND1* 유전자 분석의 결과와 마찬가지로, 한반도 집단의 시료 수가 적음에도 더 많은 *CYTB* haplotype들(BCH01, BCH02, BCH03)이 출현하고, 제주도 집단의 haplotype들을 모두 포함하기 때문에, 제주도 집단은 한반도를 거쳐 도입된 것이라 할 수 있다.

보고된 *CYTB* haplotype의 분석으로 동아시아 3 개국의 황소개구리 집단의 모계혈통 중 일부는 동일한 기원에서 유래되었음을 보여주었으며 이 결과는 우리나라와 중국, 일본에 도입된 황소개구리 수입과정에 대한 자료들과 일치한다. 일본의 경우 1917년 미국에서 수입되었고, 중국은 1959년과 1960년대에 일본과 쿠바에서, 우리나라는 일본에서 1959년과 1971-1973년까지 수차례에 걸쳐 수입하였다(Teleford, 1960; 김, 1972, 1973, 1975; Minowa et al., 2008; Goka et al., 2009; Liu et al., 2010). 따라서 동아시아 황소개구리 집단들은 1 차적으로 미국에서 일본으로 건너온 집단이 다시 분산된 형태이고, 중국의 경우는 쿠바 집단이 더해져 있다. 쿠바의 황소개구리 역시 1930년대 미국산 황소개구리가 도입된 것이므로 (Kraus, 2009; Santos-Barrera et al., 2009), 결과적으로 미국에서 출발한 황소개구리가 일본과 쿠바를 거쳐 중국으로, 일본에서 우리나라로 전해진 것이다. 따라서 중국에서 발견되는 BCH04의 경우 한국-일본과는 다른 모계혈통을 기원으로 하는 모계선조에서 기원한 것으로 추정되나, 중국과 일본에서 보고된 유전자 분석결과들이 거의 없어 국제적인 비교를 위한 자료의 보충이 요구된다고 하겠다.

Austin et al. (2003b)은 황소개구리의 *CYTB* haplotype 6 가지를 처음으로 기재하였다. 이후 408-bp 염기서열에 대한 분석에서 미국 내 42 개의 고유 집단에서 41 개의 haplotype들을 발견하였고, 이들은 eastern-, western-lineage들로 크게 구분되며, 추가적으로 파생된 단일 돌연변이 haplotype들이 추가로 기술하였다(Austin et al., 2004b). Eastern-lineage는 H8이 중심이고, H9, H11, H23 등을 중심으로 분화하였으며, western-lineage는 H7이 중심이고, H1, H6 등이 분화한 것으로 추정하였다. 또한 eastern-, western-lineage의 분화는 미국 중심부를 흐르는 Mississippi 강을 경계로 동-서로 확산되었으며, western-lineage는 Mississippi 서부인 남서부 지역에서부터 인접한 지역으로 연속적인 영역 확장(contiguous range expansion)의 결과이고, eastern-lineage는 빙하기와 간빙기를 거치는 동안 서식지 분절(fragmentation), 연속적인 영역 확장과 거리에 의한 분리(Mantel, 1967) 등이 반복되면서 Appalachians 산맥 남부에서부터 Canada에 이르는 지역에 걸쳐 인접지역 확산이 빙하기 이후에 반복적인 형태를 나타내면서 진행된 것이라 하였다. 또한 Mississippi 강이 eastern-, western lineage의 지리적 장벽으로 작용하는 것처럼 보이지만, 현재의 황소개구리 집단에서는 이들

두 혈통이 중첩되는 지역도 출현하고, 출현 양상 역시 연속성이 없어 최근의 인위적인 도입이 있었다고 제안하였다(Austin et al., 2004b). Kamath et al. (2016)은 미국 Montana와 Wyoming 주의 황소개구리 집단에 대한 *CYTB* haplotype을 분석하였다. Yellowstone 강을 따라 분포하는 고유 집단들은 유전적 다양성이 높고, 거리가 멀어질수록 유전적 다양성이 점차 낮아지는 거리에 의한 분리(Mantel, 1967) 양상이 나타난다고 하였다. 반면, Montana의 도입 집단들과 Wyoming의 Grand Teton National Park에서 발견되는 집단들은 유전적 다양성이 매우 낮아, 최근에 유입된 도입 집단이라고 판독하였다. 또한 이 외에 불연속적으로 발견되는 도입 집단-특이적 haplotype 분포와 국지적인 연속성은 집단의 도입은 1 차적으로는 인위적인 이동에 의한 결과이며, 이후 자연적인 확산에 의해 2 차적으로 분산된 형태라고 제안하고 있다(Kamath et al., 2016).

일본은 1917년 아시아에서 처음으로 황소개구리를 수입한 나라이며, 일본의 황소개구리가 미국으로 역수출되었을 뿐만 아니라, 중국, 한국 등으로도 수출되었다(Teleford, 1960; 김, 1972, 1973, 1975; Bai et al., 2012). 현재까지 일본에서는 황소개구리에서 mitochondrial genome 전체 서열(AB761267) 1 개의 *CYTB* 유전자 서열 1 개(AF077394)가 보고되었고, 그 중 하나인 AB761267의 *CYTB* 서열은 BCH01에 해당하였다. 반면, 다른 하나는 길이가 572-bp로 짧았으며, BCH01과 염기서열이 1 개 다른 양상을 보였고, BLAST 검색 결과에서도 기존에 보고된 서열 중 동일한 서열은 없었다. 비록 보고된 서열이 단 2 개뿐이지만, 이 결과는 일본의 황소개구리 집단 역시 적어도 2 개의 haplotype으로 구분되며, 다수의 모계선조에서 유래되었거나, 수차례에 걸쳐 도입되었다고 할 수 있다. 뿐만 아니라 우리나라에 도입된 집단들이 대부분 일본을 통해서 수입되었다는 점을 고려했을 때, 일본에서 결정된 AB761267의 모계와 우리나라 황소개구리의 BCH01-모계는 밀접한 관계에 있다. 하지만, 아직까지 일본에서 BCH02 개체는 분석되지 않은 것으로 보인다.

중국은 1959년 일본에서 수입한 개체의 사육에 실패한 후, 다시 쿠바에서 2차, 3차 수입을 시도하여 결과적으로 황소개구리 양식에 성공하였으며, 현재 중국 본토의 많은 지역들과 섬 지역의 야생에서도 정착한 집단들이 많다고 알려져 있다(Liu et al., 2010). Bai et al. (2012)는 중국에서 사육중인 개체들(222 시료:

23 개의 식료품시장에서 133 개체, 6 개의 양식장에서 89 개체)과 야생에서 포획한 개체들(Zhejiang 지역 Zhoushan Archipelago의 섬들에서 152 개체, Sichuan 과 Yunnan 지방 10 개 지점에서 136 개체)에 대한 *CYTB* 유전자 서열을 분석하였다. 그 결과에서 전체적으로 두 가지 haplotype들(H43, H7)이 발견되고, 이 중 H43 (JQ241268)은 중국에서 처음으로 검출되었으며, 야생 집단과 사육 집단에서 모두 더 높은 빈도를 나타내고, H7의 경우 Austin et al. (2004b)에 의해 보고된 서열과 같다고 하였다. 또한 두 가지 haplotype의 출현 빈도가 사육 집단과 야생 집단에서 서로 유의적인 차이를 나타내며, 현재 중국 내의 황소개구리 집단은 창시자 효과(founder effect)를 거치는 단계로 평가하였다. 최근 중국에서 보고된 KX269354 (Yuan et al., 2016)는 중국의 Chengdu의 애완동물시장의 시료에서 결정되었고, BCH01과 동일한 서열이었다. 또한 H43에 해당하는 JQ241268 역시 Austin et al. (2004b)의 분류(*CYTB* 408-bp 절편 이용)에 따르면, BCH01에 해당하는 서열이었다. 따라서 중국 황소개구리 집단 역시 H7, BCH01-유사 서열한 H43, H7, Yuan et al. (2016)의 BCH01 등이 발견되며, 이들은 모두 western-lineage에 해당하는 모계라 할 수 있다.

다시 말해서, 일본과 중국, 우리나라의 황소개구리 집단들은 모계혈통들이 미국의 western-lineage에서 유래된 집단이라고 할 수 있다. 주목할 점은 황소개구리 원산지인 미국에서 보고된 전체 26 개의 서열들이 총 23 개의 haplotype으로 구분되었지만, 이들 중 어느 것도 동아시아에서 발견된 BCH01, BCH02, BCH03, BCH04와 일치하지 않았다는 점이다. Austin et al. (2003b)이 분석한 황소개구리 서열들은 NCBI database에 등록 당시 이미 haplotype들로 구분되는 서열들을 주로 등록하였기 때문에 등록된 서열에 비해 대단히 많은 haplotype (haplotype 출현율 88.5%)들이 출현하지만, 동아시아 황소개구리 집단과 일치하는 것이 없다는 것이다. 이는 동아시아 집단과 미국 집단의 모계혈통이 직접적인 관련이 없다는 해석도 가능하지만, 명확한 해석을 위해서는 시료의 보완과 계통유전학적 분석이 이루어져야 하겠다.

한편, 동아시아에서 발견된 *CYTB* haplotype 서열과 100% 동일한 서열은 미국에서는 보고되지 않았으나, 동아시아에서 빈도가 높은 *CYTB* haplotype 서열 (BCH01, BCH02)과 가장 높은 상동성(99.8-99.9%)을 보인 BCH27 (KX344492)의

거리지수는 0.0012, 0.0024로 매우 근연임을 나타내었다. BCH27 (KX344492)은 Kamath et al. (2016)에 haplotype Lcat-WY8로 명명된 서열이며, 미국 Wyoming 주의 Grand Teton National Park (8 개 지점, 27개 시료)에서 결정되었고, 이들은 1950년대에 미국 내 다른 주(state)에서 도입된 집단으로 보고되었다. Lcat-WY8 haplotype은 Austin et al. (2004b)에 의해 보고된 sub-haplotype Rcat627 (AY083292)과 가장 근연이었다. Bai et al. (2012)이 중국에서 보고한 H43 (BCH04)은 BCH01과 0.0036, BCH02와 0.0073의 거리지수를 보여, BCH02보다는 BCH01과 더 근연임을 나타내었다. 또한 Bai et al. (2012)이 H43과 함께 보고한 H7은 Austin et al. (2004b)이 명명한 Rcat624와 Rcat627을 포함하는 상위 haplotype이며, Rcat624는 Mississippi 주의 Starkville, Rcat627은 Alabama 주의 Walker Mines 시료에서 결정된 서열이다. 이들 지역들은 지리적으로는 Mississippi 강의 동부에 위치하나, 이 지역은 eastern-lineage와 western-lineage가 혼재하는 overlap-zone으로 제안되었으며, 대표적인 western-지역으로 정의되었다(Austin et al., 2003b, 2004b; Kamath et al., 2016). 따라서 본 연구에서 결정된 우리나라 황소개구리의 BCH01, BCH02와 중국의 H43(Bai et al., 2012)은 모두 western-lineage 모계의 후손이라 하겠다.

반면, 전라북도의 BCH03과 가장 근연(0.0857)은 BCH17 (AY210376), BCH18 (AY210377), BCH23 (KX344488)이었다. Austin et al. (2004b)은 BCH17 (AY210376)은 Rcat1038, BCH18 (AY210377)은 Rcat1112로 명명하였고, 이들은 모두 캐나다 Ontario 주 Port Rowan의 Big Creek National Wildlife Area의 황소개구리에서 결정된 서열이다. 또한 BCH23 (KX344488)은 Kamath et al. (2016)이 Lcat-MT4로 명명한 서열로 Montana 주의 Bitterroot River에 위치한 MPG Ranch, Florence (7 개체), Stevensville 인근 연못(1 개체)에서 결정된 서열이다. AY210376과 AY210377은 Austin et al. (2004b)에 의해, KX344488는 Kamath et al. (2016)에 의해 eastern-lineage로 분류되었다.

CYTB haplotype 서열들의 계통수는 Austin et al. (2004b)에서 제시한 것과 유사한 양상을 보였다. 지리적으로도 Austin et al. (2004b)의 제안과 같이 western-lineage와 eastern-lineage는 Mississippi 강을 중심으로 구분되는 양상을 보였다. Western-lineage에 속하는 고유 집단에서는 Texas 주의 Tyler,

Arkansas 주의 Desha와 Cross 등에서 발견되었고, eastern-lineage는 Mississippi 강의 동부지역인 Missouri, Georgia, Virginia, Michigan 등과 캐나다 Ontario 주의 황소개구리 고유 집단에서 발견되었다(Austin et al., 2004b). 반면, western-lineage의 경우 도입 집단으로는 Montana, Wyoming, Missouri, Canada 의 Ontario 주 등에서 발견되고, eastern-lineage는 Montana에서도 발견되었다(Kamath et al., 2016).

Austin et al., 2003b은 황소개구리 mtDNA의 *CYTB* 서열이 0.69-2.4%/백만 년 정도의 분화시간을 나타낸다고 했으며, Austin and Zamudio (2008)는 이 결과를 변온동물의 느린 분화시간(Martin and Palumbi, 1993)인 0.6%/백만 년을 적용했을 때, eastern lineage와 western lineage는 약 2.48 ± 0.93 백만 년 전에 분화된 것으로 계산하였다. 이를 제주도 집단의 분석 결과에 적용하면, 제주도 황소개구리 집단의 *CYTB* BCH01-BCH02는 0.359%(834-bp 중 831-bp가 동일)의 염기변이율을 보이고, 약 15만-50만 년 전에 분화된 서열이라 볼 수 있다. 따라서 이들 두 haplotype들이 우리나라에 도입된 이후 분지되었을 가능성은 거의 없다고 하겠다. 계통유전학적 유연관계 분석에서 우리나라와 일본, 중국으로 도입된 황소개구리 집단들이 대부분 Austin et al. (2004b)에서 규정한 western-lineage에서 유래한 집단으로 추정할 수 있다. 우리나라에서 발견된 BCH01, BCH02가 western-lineage라는 점에서 제주도 황소개구리 집단은 미국의 Mississippi 강 서부 지역을 기원으로 하는 모계선조의 후손이다. 한반도 집단 역시 BCH03을 제외하면, western-lineage가 모계선조라는 결과에는 변함이 없다. 일본도 BCH01만 보고되었기 때문에 western-lineage에 해당한다. 중국 황소개구리 집단 역시 H7과 H43 (BCH04와 동일)이 western-lineage에서 유래되었다. 따라서 계통 유연관계 분석 결과는 동아시아의 한국, 중국, 일본의 황소개구리 집단은 미국의 western-lineage에서 유래한 집단이고, 이는 haplotype 분포에 대한 연구결과와 일치하고 있다. 동아시아 집단의 모계혈통 추적에 있어 고려할 점은 아시아에서 황소개구리를 처음으로 도입한 나라는 일본이며, 1917년에 미국 Louisiana 주 New Orleans에서 수입한 것으로 기록되어 있다(Teleford, 1960; 김, 1972). 현재까지 미국 본토에서 황소개구리의 유전자 분석 연구들(Austin et al., 2003a, 2004b, Kamath et al., 2016)에서 Louisiana 주의 시료가 전혀 분석된

바 없고, 일본의 시료도 적은 자료가 보고되어 포괄적인 분석은 이루어지지 않았다. 하지만, *CYTB* NJ tree (Figure 11)에서 동아시아 집단에서 주를 이루고 있는 haplotype들이 모두 western-lineage 서열들과 같은 분지 상에 위치하고, 근연관계에 있는 haplotype들이 Louisiana 주를 둘러싸고 있는 Texas 주(서쪽)의 Tyler, Arkansas 주(남쪽)의 Cross, Desha, Mississippi 주(동쪽)의 Starkwille, Alabama 주의 Walker Mines 등에서 보고되었고, 남쪽은 멕시코만이다. 이와 같은 지리적 조건과 계통유연관계 분석결과들은, 동아시아 황소개구리 집단의 모계 혈통은 미국 남부 집단과 밀접한 관계라고 할 수 있다.

연구결과에서 발견된 특이한 결과 중 하나는 haplotype BCH03의 분지도 상의 위치이다. BCH03은 western-lineage 0.1005와 eastern-lineage 0.0915의 평균 유전적 거리지수를 나타내었고, 전체적으로 0.0959 정도의 거리지수를 보였다. 하지만, BCH03을 제외한 나머지 26 개의 haplotype들 사이에서의 유전적 거리지수의 평균은 0.0139이었다. BCH03을 제외한 황소개구리 haplotype 26개와 참개구리 (*R. nigromaculata*; AB043889)와의 거리지수는 0.2245이나, BCH03과 AB043889의 거리지수는 0.1468이었다. 마찬가지로 북방산개구리(*R. dybowskii*; KF898355)와 BCH03은 0.2643, BCH03을 제외한 황소개구리 26 개 haplotype들과는 0.2357을 나타내었다. 또한 NJ tree 상에서 BCH03가 황소개구리의 26 개 haplotype들과는 구분되면서 참개구리와 좀 더 가까운 위치에 나타나는 양상과 일치하는 결과이다. 분화시간에 대한 분석결과에서도 BCH01과 BCH03은 8.464%의 염기변이율(827-bp 중 757-bp 일치)을 보여 약 3.4-12.0백만 년 전에 분화된 서열로 추정되었다. 이는 Austin and Zamudio (2008)이 제시한 eastern lineage와 western lineage의 분화시간(약 2.48 ± 0.93 백만 년 전)보다 적어도 1백만 년 이전에 분화된 서열임을 의미한다. 만약 전라남도 부안에서 발견된 BCH03 서열이 정확한 것이라면, 아마도 지금까지 연구된 황소개구리의 진화에 대한 가설과 분화시간의 설정은 모두 재검토되어야 할 것이다.

Ficetola et al. (2008a)은 유럽 전역의 9 개 집단에 대한 *CYTB* 유전자 서열의 다형성과 haplotype 분포를 조사하였다. 유럽 전체에서 발견된 haplotype은 5 가지였으며, 이 중 4 가지(H1, H5, H7, H9)은 미국 고유 집단에서 발견되는 것이며, 다른 하나인 H42는 벨기에와 그리스의 8개체에서 발견된다고 하였다. H1은

독일 전체와 프랑스 1 개 집단, H5는 절멸된 영국 집단, H7은 프랑스 3 개 집단과 이탈리아 전체, 그리스의 일부, H9은 벨기에의 11 개 집단에서 발견된다고 하였다. H42은 Austin et al. (2004b)에서 이용한 408-bp만을 비교했을 때, 미국의 H8에 해당한다고 하였다. Austin et al. (2004b)의 분류에 따르면, 유럽에서 발견된 haplotype 중에서 H1, H5, H7은 미국의 남서부 지역에서 유래된 western-lineage에 해당되고, H9와 벨기에와 그리스-특이적이었던 H42 (H8, Austin et al, 2004b)는 eastern-lineage이라 하였다(Ficetola et al., 2008a). 이상의 결과들은 유럽과 아시아에서 발견되고 있는 황소개구리 집단들의 모계혈통의 기원이 다소 차이가 있음을 보여주고 있다. 유럽은 아메리카 대륙과 대서양을 사이에 두고 위치하고 있어, 대부분의 해상교역의 중심이 New York과 Boston 등 미국의 북동부에 위치한 항구도시를 위주로 했기 때문에 유럽으로 도입된 황소개구리 집단에 eastern-lineage가 발견되는 것으로 보인다. 반면, New Orleans 지역에서는 New York이나 Boston과는 달리 상대적으로 수월하게 Panama 운하를 이용하여 태평양으로 접근할 수 있었던 것으로 보인다. 중국으로 유입된 쿠바산 황소개구리 역시 아마도 동일한 운항경로를 따라 이동되었을 것이다. 황소개구리의 전 세계적 교역이 활발했던 시기가 20세기 초와 중반이라는 점에서 살아 있는 황소개구리의 운반은 항공운송보다는 해상운송 수단에 의해 이동되었을 가능성이 더 높다고 하겠다. 이에 따라 해상운송의 교역의 중심지 인근에서 수집된 집단들이 이동되었을 것으로 보인다. 즉, 남부 New Orleans에서 황소개구리를 수입한 일본과 이들을 다시 재수입한 우리나라의 경우는 New Orleans가 위치한 western-lineage가 수입되었을 것이며, New York이나 Boston과의 교역이 활발했던 유럽으로는 미국 북동부 지역의 집단들이 이주했을 가능성이 더 높았던 것이고, Ficetola et al. (2008a)의 연구와 본 연구 결과들은 이를 간접적으로 뒷받침해주는 분자적 근거이다.

V. 요약

본 연구는 제주도에 유입된 황소개구리의 서식 현황, 서식지의 분포와 유형, 개체수, 성체와 올챙이의 외부 형태학적 특성을 파악하고, 또한 분자 수준에서의 유전적 구조와 모계선조의 기원, 계통 유연관계를 구명하고자 하였다. 조사된 제주도 내륙습지 320 개 지점 중 총 109 개 지점과 사전 보고된 1 개 지점까지 총 110 개 지점에서 황소개구리 성체나 올챙이가 확인되었고, 점차적으로 확산되고 있었다. 이 중 107 개 지점은 제주도 서부권에 한정되어 있으나, 남원읍과 봉개동에서도 발견되었다. 서식지별 황소개구리 성체의 평균 개체수는 7.8 개체/site, 많은 곳은 7.9 개체/site(한경면), 적은 곳은 7.0 개체/site(남원읍)이었고, 봉개동에서는 성체가 관찰되지는 않았다. 성체 발견지점의 수가 올챙이의 발견지점에 비해 많았고, 이는 황소개구리의 서식지 확산이 성체에 의해 진행된다는 기존의 연구결과와 동일한 결과라 하겠다. 성체의 체중은 평균 321.3 ± 129.40 g, 몸 전체의 길이는 평균 337.8 ± 33.59 mm로, 기존의 연구결과와 유사하였다. 황소개구리 성체의 SVL과 체중 사이에는 정의 상관($R^2=0.6997$)을 나타내었고, 수컷은 암컷에 비해 뒷발의 길이가 더 길었다($p < 0.05$). 황소개구리 올챙이는 서식지별로 측정된 모든 외부 형태(BW, TBL, HL, HFL, FFL)에서 유의적인 차이를 나타내어, 서식지 환경요인이 올챙이의 성장속도에 밀접한 영향을 주는 것으로 보인다. 황소개구리 *ND1* 유전자의 haplotype을 분석한 결과, 2 가지 *ND1* haplotype (BNH01, BNH02)들이 발견되었고, 각각 85.7%, 14.3%를 나타내었다. BNH01은 대정읍과 한경면의 서식지 대부분에서 발견되었고, BNH02는 한경면 북부, 북동부와 대정읍의 동남부에서 발견되었다. 이 결과들은 제주도 내로 유입된 황소개구리의 모계선조는 둘 이상이거나 최소 2 회 이상 유입된 것으로 추정되었다. 성체와 올챙이의 *ND1* haplotype의 빈도가 서식지별로 다른 분포를 보여 성체에 의한 자연적인 확장을 생각할 수 있었고, 근거리 집단에서 발견된 유전자형의 불균형은 인위적인 이동에 의한 확산 가능성도 제기하였다. *ND1* haplotype 분석결과에서 한반도 집단은 시료 수가 적음에도 불구하고 제주도 집단보다 더 많은

수의 haplotype을 가지면서, 제주도 집단 haplotype들을 모두 포함하고 있었다. 두 집단에 대한 *CYTB* 유전자의 haplotype 분석과 계통 유연관계 분석결과들도 모두 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과들은 제주도 황소개구리 집단이 한반도를 거쳐 유입되었음을 보여주는 분자적 증거라 할 수 있으며, 다수의 모계혈통이 한반도를 경유하여 동시에 유입되었거나, 여러 차례에 걸쳐 유입된 것으로 추정된다. 우리나라와 일본의 모계혈통 역시 분자적으로 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났으며, 중국 역시 모계선조의 혈통이 유사한 것으로 나타났다. 또한 eastern-lineage와 western-lineage가 모두 출현하는 유럽 황소개구리 집단과는 달리, 동아시아 황소개구리의 모계혈통들은 대부분 미국의 서남부지역을 기원으로 하는 western-lineage의 후손이며, 현재 발견되고 있는 haplotype들은 이미 미국 내에서 분화된 이후 유입된 것으로 추정되었다. 반면, 아직까지 명확하게 규정되지 않은 BCH03의 계통유전학적 위치를 규명하기 위해서는 추후 연구자료가 보완되어 뒷받침되어야 할 것이다. 또한, 현재 제주도와 한반도에 서식하고 있는 황소개구리 집단 대부분은 haplotype 다양성과 염기서열 다양성이 낮아, 유전적인 병목현상이나 창시자 효과를 나타내는 수준의 집단으로 보인다. 본 연구 결과는 제주도뿐만 아니라 우리나라 자연 생태계에서 생태계교란생물종으로 지정된 황소개구리 집단의 관리프로그램 마련에 핵심적인 생물학적 정보가 될 것이다.

VI. 인 용 문 헌

- 강언중. 1992. 고창 인천강의 어류상과 황소개구리의 생태. 전북의 자연연구. pp. 23-32.
- 강언중, 윤창호. 1994. 도입종 황소개구리의 국내 정착과 분포. 한국자연보존협회 연구보고서. 제13집:231-250.
- 고선근. 2008. 두류봉의 양서·파충류. 호남대학교 산업기술연구소 논문집. 14:75-78.
- 고송향, 이정훈. 2001. 황소개구리(*Rana catesbeiana*)의 세정관 상피의 분화와 정자 변태. 한국전자현미경학회지 31(2):143-156.
- 고영민, 고상범. 2005. 양서·파충류. 전국내륙습지 자연환경조사 2005: 제주도 (동백동산, 용수저수지). 환경부. pp. 211-218.
- 고영민, 고상범, 장민호, 오홍식. 2009. 제주도의 양서류 현황. 양서·파충류학회지 1(1):61-70.
- 고홍선, 천태영, 노용석. 1991. 이입된 황소개구리가 토산생태계에 끼친 영향에 관한 연구. 충북대학교 자연과학연구. 5(2):93-101.
- 국립생태원. 2015. 양서·파충류. 제주도의 외래생물. 국립생태원. 서천, GeoBook. pp. 56-71.
- 국립환경과학원. 2007. 생태계교란종 모니터링. 국립환경과학원. p. 4-22.
- 김병수, 박수곤. 2011. 양서·파충류. 2011 습지보호구역 정밀조사(한강하구·우포늪·물장오리오름). 환경부 국립습지센터. 과천, 대양문화사. pp. 999-1012.
- Rladbrud, 박수곤, 한상훈, 한상현, 오홍식. 2016. 제주도 큰발윗수염박쥐(*Myotis macrodactylus*)의 유전적 집단 구조와 계통 유연관계. 생명과학회지 26(7):749-757.
- 김중범. 2009. 한국산 양서류의 분류목록과 분포상. 양서·파충류학회지 1(1):1-13.
- 김현규. 1972. 황소개구리(*Rana catesbeiana*)의 생태. 이화여자대학교 한국생활과학 연구원 논총 8:67-92.

- 김현규. 1973. 황소개구리(*Rana catesbeiana*) 양식에 관한 연구. 이화여자대학교 한국생활과학연구원 논총 10:173-200.
- 김현규. 1975. 황소개구리의 종와의 실내사육. 이화여자대학교 한국생활과학연구원 논총 15:225-238.
- 김혜숙, 고선근. 1998. 도입종 황소개구리(*Rana catesbeiana*)의 분포, 식성과 생식 세포형성주기에 관한 연구. 산림과학논문집 57:165-177.
- 노선호, 정진석, 유영한. 2017. 자생종 포식자를 이용한 침입외래종 황소개구리(*Rana catesbeiana*)의 생태적 제어에 관한 연구. 한국환경생태학회지 31(1):54-61.
- 문지용, 김현정, 이성인, 문동호, 주창한, 정기호. 2003. 붕어 및 황소개구리 체내에 잔류되어 있는 co-planar PCBs의 분포 특성. 한국환경과학회 가을학술발표회 발표논문집. 12(2):377-378.
- 문지용, 문동호, 이상원, 정기호. 2005. 한강 수계에 서식하는 붕어 및 황소개구리 체내에 축적된 Dioxins의 잔류수준 및 분포 특성. 한국환경과학회 봄학술발표회지 14(1):298-300.
- 문지용, 이성인, 송희영, 이경진, 최경희, 정기호. 2004a. 낙동강 유역에 서식하는 붕어와 황소개구리 체내의 polychlorinated biphenyls의 축적도와 분포특성. 분석과학 17(4):347-354.
- 문지용, 송희영, 유재천, 주창한, 정기호. 2004a. 낙동강 수계에 서식하는 붕어와 황소개구리의 체내 Dioxin-like PCBs의 분포 특성. 한국환경과학회 봄학술발표회지 13(1):407-408.
- 박병상. 1999. 한려해상국립공원 거제도 지역의 양서류·파충류상. 환경생태학회지 12(4):381-388.
- 박용오, 정희함. 황소개구리의 생태적 특성과 이용에 관한 연구. 광주교육 19:165-171.
- 배안동. 1976. 식용개구리 양식시험(I), 월동올챙이의 변태과정 및 당년생 유와의 성장에 대한 연구. 수산청국립양어장연구보고. 1:145-158.
- 양서영, 김중범, 민미숙, 사재화, 강영진. 2001. 한국의 양서류. 아카데미서적, 서울. pp. 42-44.

- 오홍식. 2005. 제주지역 생태계 위해 외래동물의 분포현황 및 관리방안 연구. 제주지역환경기술개발센터. pp. 9-14.
- 오홍식. 2013. 제주특별자치도 내륙습지 D/B 구축 자료조사 연구. 제주녹색환경지원센터. pp. 3-386.
- 오홍식, 홍창의. 2007. 제주도에 이입된 황소개구리(*Rana catesbeiana*)와 붉은귀거북(*Trachemys scripta elegans*)의 서식실태 및 관리방안. 한국환경생태학회지 21:311-317.
- 이경진, 김현정, 이성인, 문지용, 정기호. 2004a. 낙동강 수계에 서식하는 붕어 및 황소개구리 체내에 축적된 polychlorinated biphenyls의 잔류 수준 및 분포 특성. 한국환경과학회 봄학술발표회지 13(1):99-100.
- 이두표, 고선근. 2001. 영산강 수계에서 채집된 황소개구리의 기형 양상 및 체내 중금속 축적. 한국환경생태학회지 15(2):153-158.
- 이선화, 송희형, 김영복, 정기호. 2004b. 붕어 및 황소개구리 체내에 유기염소계 농약류의 분석 및 분포 특성. 한국환경과학회 봄학술발표회지 13(1): 101-102.
- 이정훈, 박기룡. 2005. 황소개구리(*Rana catesbeiana*)와 참개구리(*Rana nigromaculata*) 정자의 미세구조. 한국전자현미경학회지 35(4):1-9.
- 이정현, 이창우, 임정철, 양병국, 박대식. 2015. 가항늪에 서식하는 황소개구리(*Lithobates catesbeianus*)의 먹이원 분석 연구. 한국양서·파충류학회 학술대회 pp. 10-11.
- 이지영. 2006. 미토콘드리아 NDI/tRNA 유전자 서열 비교를 통한 국내 서식 황소개구리의 유전적 다양성. 한서대학교 석사학위논문.
- 이지영, 심재한, 정인실. 2005a. 미토콘드리아 NDI/tRNA 유전자 서열 비교를 통한 국내 서식 황소개구리의 유전적 다양성 조사. 한국생태학회지 28(6):375-382.
- 이형식, 구세광, 이재현. 1998. 개체발생에 따른 황소개구리(*Rana catesbeiana*) 위장관내분비세포의 출현 및 분포에 관한 연구. 한국실험동물학회지 14(2):163-168.
- 이형식, 구세광, 이재현. 1999. 개체발생에 따른 황소개구리(*Rana catesbeiana*) 위장관에서 neurotensin, pancreatic polypeptide 및 gastrin/cholecystokinin 면역세포에 대한 면역조직화학적 연구. 대한수의학회지 39(1):20-26.

- 입업연구원. 1993. 야생동물실태조사. 입업연구보고서 4- I . pp. 441.
- 장환진, 서재화. 2010. 양서류 종의 국내 분포현황. 양서·파충류학회지 2:45-51.
- 정규희, 계명찬, 송재영. 2000. 진도 양서·파충류 생물다양성. 환경생물학회지 18(1):113-120.
- 정승돈, 이정훈. 2001. 황소개구리(*Rana catesbeiana*) 위장관 점막의 점액분비세포에 대한 조직화학적 연구. 경남대학교 기초과학지 15:99-112.
- 정징운, 박홍재. 2008. 영산강, 금강의 수질과 붕어와 황소개구리에 대한 내분비장애 특성 연구. 한국환경과학회 가을학술발표회 발표논문집. 17(1):205-210.
- 정징운, 박홍재, 김영식. 2008. 낙동강유역, 남강, 하동, 주남저수지의 붕어와 황소개구리의 vitellogenin 농도와 주질에 대한 상관관계성. 한국환경과학회 가을학술발표회 발표논문집 17(1):224-232.
- 제주녹색환경지원센터. 2013. 제주물장오리오름 습지보호지역 보전기본계획연구. 영산강유역환경청.
- 제주도, 제주발전연구원, 제주환경운동연합. 2001. 제주의 습지. 제주도 제주발전연구원, 제주환경운동연합. pp. 94-112.
- 제주양서류생태연구소. 2015. 제주도내 생태계교란생물(황소개구리) 서식지조사 및 포획사업 보고서. 환경부 영산강유역환경청. pp. 3-95.
- 조홍섭. 2002. 언론의 생태계 보도 사례 분석-황새, 황소개구리, 반달곰. 한국환경생물학회지 20:56-61.
- 최도성, 고선근, 정희함. 1998. 황소개구리의 생태적 특성과 포획 및 이용에 관한 연구. 환경부. pp. 1-83.
- 최은성. 1999. 인위적 저온상태가 황소개구리 원심방의 형태학적 변화에 미치는 영향. 전북대학교 석사학위논문.
- 환경부 (심재한, 정인실, 신광하, 이정옥, 이상철, 조형진, 이지영, 오광석). 2005. 황소개구리 감소요인에 대한 연구. 환경부. pp. 1-48.
- 환경부. 2006. 국내 도입 외래동물 현황 파악 및 생태계위해성 등급 분류 연구. 환경부. pp. 245.
- 황금택, 홍진선, 강성국, 정순택. 2002. 황소개구리에서 추출한 지방의 지방산 조성. 한국식품영양학회지 32(2):351-354.

- Adams M.J. 2000. Pond permanence and the effects of exotic vertebrates on anurans. *Ecol. Appl.* 10:559-568.
- Austin J.D., Dávila J.A., Loughheed S.C. and Boag P.T. 2003a. Genetic evidence for female-biased dispersal in the bullfrog, *Rana catesbeiana* (Ranidae). *Mol. Ecol.* 12:3165-3172.
- Austin J.D., Loughheed S.C. and Boag P.T. 2004a. Controlling for the effects of history and nonequilibrium conditions in gene flow estimates in northern bullfrog (*Rana catesbeiana*) populations. *Genetics* 168:1491-1506.
- Austin J.D., Loughheed S.C. and Boag P.T. 2004b. Discordant temporal and geographic patterns in maternal lineages of eastern North American frogs, *Rana catesbeiana* (Ranidae) and *Pseudacris crucifer* (Hylidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 32:799-816.
- Austin J.D., Loughheed S.C., Moler P.E. and Boag P.T. 2003b. Phylogenetics, zoogeography, and the role of dispersal and variance in the evolution of the *Rana catesbeiana* (Ranidae) species group. *Biol. J. Linn. Soc.* 80:601-624.
- Austin J.D. and Zamudio K.R. 2008. Incongruence in the pattern and timing of intra-specific diversification in bronze frogs and bullfrogs (Ranidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 48:1041-1053.
- Bai C., Ke Z., Consuegra S., Liu X. and Li Y. 2012. The role of founder effects on the genetic structure of the invasive bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in China. *Biol. Invasions* 14:1785-1796.
- Beringer J. and Johnson T. 1995. *Rana catesbeiana* (bullfrog): diet. *Herpetol. Rev.* 26:98.
- Berger L., Speare R., Daszak P., Green D.E., Cunningham A.A., Goggin C.L., Slocombe R., Ragan M.A., Hyatt A.D., McDonald K.R., Hines H.B., Lips K.R., Marantelli G. and Parkes H. 1988. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:9031-9036.
- Blaustein A.R. and Kiesecker J.M. 2002. Complexity in conservation: lessons from

- the global decline of amphibian populations. *Ecol. Lett.* 5:597-608.
- Boone M.D., Little E.E., Semlitsch R.D. and Fox S.F. 2004. Overwintered Bullfrog tadpoles negatively affect salamanders and anurans in native amphibian communities. *Copeia* 3:683-690.
- Bruneau M. and Magnin E. 1980. Croissance, nutrition et reproduction des ouaouarons *Rana catesbeiana* Shaw (Amphibia Anura) des Laurentides au nord de Montréal. *Can. J. Zool.* 58:175-183.
- Bury B.R. and Whelan J.A. 1984. Ecology and management of the bullfrog. *Resour. Publ.* 155, U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. pp. 23.
- Chen X., Wang D., Xiang H., Dun W., Brahi D.O.H., Yin T. and Zhao X. 2017. Mitochondrial DNA T7719G in tRNA-Lys gene affects litter size in Small-tailed Han sheep. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8:31.
- Collins J.P. 1979. Intrapopulation variation in body size at metamorphosis and timing of metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Ecology* 60:738-749.
- Daszak P., Strieby A., Cunningham A.A., Longcore J.E., Brown C.C. and Porter D. 2004. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol. J.* 14:201-207.
- Dejean T., Valentini A., Miquel C., Taberlet P., Belleman E. and Miaud C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *J. Appl. Ecol.* 49:953-959.
- Elmen S.T. 1968. Territoriality in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1968:240-243.
- Feng G.F., Zhang J., Feng L.M., Shen N.X., Li L.J. and Zhu Y.M. 2013. Mitochondrial DNA haplogroup associated with sperm motility in the Han population. *Asian J. Androl.* 15:630-633.
- Ficetola G.F., Bonin A. and Miaud C. 2008a. Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. *Mol. Ecol.* 17:773-782.

- Ficetola G.F., Coïc C., Detaint M., Berroneau M., Lorvelec O. and Miaud C. 2007. Pattern of distribution of the American bullfrog *Rana catesbeiana* in Europe. *Biol. Invasions* 9:767-772.
- Ficetola G.F., Miaud C., Pompanon F. and Taberlet P. 2008b. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4:423-235.
- Fisher R.N. and Shaffer H.B. 1996. The decline of amphibians in California's Great Central Valley. *Conserv. Biol.* 10:1387-1397.
- Flores-Nava A. and Vera-Muñoz P. 1999. Growth, metamorphosis and feeding behaviour of *Rana catesbeiana* Shaw 1802 tadpoles at different rearing densities. *Aquac. Res.* 30:341-347.
- Frost D.R. 1985. Amphibian species of the world: A taxonomic and geographical reference. Allen Press, Lawrence. p. 732.
- Frost D.R. 2015. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.0. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Garner T.W, Perkins M.W, Govindarajulu P., Seglie D., Walker S., Cunningham A.A. and Fisher M.C. 2006. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol. Lett.* 2:455-459.
- Goka K., Yokoyama J., Une Y., Kuroki T., Suzuki K., Nakahara M., Kobayashi A., Inaba S., Mizutani T. and Hyatt A.D. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Mol. Ecol.* 18:4757-4774.
- Gosner K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190.
- Govindarajulu P., Price W. and Anholt B.R. 2006. Introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in Western Canada: Has their ecology diverged?. *J. Herpetol.* 40:249-260.

- Grant W.S. and Bowen B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Heredity*. 89:415-426.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hirai T. 2004. Diet composition of introduced bullfrog, *Rana catesbeiana*, in the Mizorogaike Pond of Kyoto, Japan. *Ecol. Res.* 19:375-380.
- Howard R.D. 1978. The influence of male-defended oviposition sites on early embryo mortality in bullfrogs. *Ecology* 59:789-798.
- Howard R.D. 1981. Sexual dimorphism in bullfrogs. *Ecology* 62:303-310.
- Immonen E., Collet M., Goenaga J. and Arnqvist G. 2016. Direct and indirect genetic effects of sex-specific mitonuclear epistasis on reproductive ageing. *Heredity* 116:338-347.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2015. *Lithobates catesbeianus*. The IUCN red list of threatened species 2015: e.T58565A53969770. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4>. RLTS.T58565A53969770.en. Downloaded on 26 April 2017.
- Jeong T.J., Jun J., Han S., Kim H.T., Oh K. and Kwak M. 2013. DNA barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications. *Mol. Ecol. Resour.* 13:1019-1032.
- Kamath P.L., Sepulveda A.J. and Layhee M. 2016. Genetic reconstruction of a bullfrog invasion to elucidate vectors of introduction and secondary spread. *Ecol. Evol.* 6:5221-5233.
- Kats L.B. and Ferrer R.P. 2003. Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Divers. Distrib.* 9:99-110.
- Kiesecker J.M., Blaustein A.R. and Miller C.L. 2001. Potential mechanisms underlying the displacement of native red-legged frogs by introduced bullfrogs. *Ecology* 82:1964-1970.

- Kraus F. 2009. *Invading nature: Springer series in invasion ecology* 4. Springer, pp. 563.
- Kumar S., Stecher G. and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1974.
- Kupferberg S.J. 1997. Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of a California river: The role of larval competition. *Ecology* 78:1736-1751.
- Kurabayashi A., Kakehashi R. and Sumida M. 2013. Mitochondrial genomes of Japanese *Babina* frogs (Ranidae, Anura): unique gene arrangements and the phylogenetic position of genus *Babina*. *Genes Genet. Syst.* 88:59-67.
- Lanza B. 1962. On the introduction of *Rana ridibunda* Pallas and *Rana catesbeiana* Shaw in Italy. *Copeia* 1962:642-643.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Laufer G., Canavero A., Nuñez D. and Maneyro R. 2008. Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biol. Invasions* 10:1183-1189.
- Lee S.H., Kang Y.J., Li C.R., Kim A., Jin C.F., Chung K.H., Kim D.K., Park N.G., Park K., Kang S.W. and Park J.S. 2006. Development of quantitative vitellogenin ELISAs for bullfrog (*Rana catesbeiana*) used in endocrine disruptor screenin. *J. Environ. Toxicol.* 21:147-151.
- Lever C. 2003. *Naturalized amphibians and reptiles of the world*. Oxford University Press, New York. p. 344.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Lin Y., Tao B., Fang X., Wang T., and Zhang J. 2014. The complete mitochondrial genome of *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae). *Mitochondrial DNA* 25:447-448.
- Liu X. and Li Y. 2009. Aquaculture enclosures relate to the establishment of feral

- populations of introduced species. PLoS One 4:e6199.
- Liu X., Li Y. and McGarrity M. 2010. Geographical variation in body size and sexual size dimorphism of introduced American bullfrogs in southwestern China. Biol. Invasions 12:2037-2047.
- Li C. and Xie F. 2004. Invasion of bullfrog (*Rana catesbeiana*) in China and its management strategies. Chinese J. Appl. Environ. Biol. 10:95-99.
- Li Y., Ke Z., Wang S., Smith G.R. and Liu X. 2011. An exotic species is the favorite prey of a native enemy. PLoS One 6:e24299.
- Li Y., Ke Z., Wang Y. and Blackburn T.M. 2001. Frog community responses to recent American bullfrog invasions. Curr. Zool. 57:83-92.
- Li Y., Wu Z. and Duncan R.P. 2006. Why islands are easier to invade: human influences on bullfrog invasion in the Zhoushan archipelago and neighboring mainland China. Oecologia 148:129-136.
- Lowe S., Browne M. and Boudjelas S. 2000. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. A selection from the global invasive species database. IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG), Auckland, New Zealand. pp. 11.
- Mahon R. and Aiken K., 1977. The establishment of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana* (Amphibia, Anura, Ranidae) in Jamaica. J. Herpetol. 11:197-199.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. Cancer Res. 27:209-220.
- Martin A.P., and Palumbi S.R. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:4087-4091.
- Mason M.J., Lin C.C. and Narins P.M. 2003. Sex differences in the middle ear of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). Brain Behav. Evol. 61:91-101.
- McAuliffe J.R. 1978. Biological survey and management of sport-hunted bullfrog populations in Nebraska. Nebraska Game Parks Com., Lincoln. p. 78.
- Medeiros C.I., Both C., Kaefer I.L. and Cechin S.Z. 2016. Reproductive phenology of the American Bullfrog in subtropical Brazil: photoperiod as a main

- determinant of seasonal activity. An. Acad. Bras. Ciênc. 88(3 Suppl):1909-1921.
- Minowa S., Senga Y. and Miyashita T. 2008. Microhabitat selection of the introduced Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in paddy fields in eastern Japan. Curr. Herpetol. 27:55-59.
- Moyle P. 1973. Effects of introduced bullfrogs, *Rana catesbeiana*, on the native frogs of the San Joaquin Valley, California. Copeia 1:18-22.
- Patton J.L., and Yang S.Y. 1977. Genetic variation in *Thomomys bottae* pocket gophers: macrogeographic patterns. Evolution 31:697.
- Pearl C.A., Hayes M.P., Haycock R., Engler J.D. and Bowerman J. 2005. Observations of interspecific amplexus between western North American Ranid frogs and the introduced American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) and a hypothesis concerning breeding interference. Am. Midl. Nat. 154:126-134.
- Pröhl H., Koshy R.A., Mueller U., Rand A.S. and Ryan M.J. 2006. Geographic variation of genetic and behavioral traits in northern and southern túngara frogs. Evolution 60:1669-1679.
- Reicher S., Seroussi E., Weller J.I., Rosov A. and Gootwine E. 2012. Ovine mitochondrial DNA sequence variation and its association with production and reproduction traits within an Afec-Assaf flock. J. Anim. Sci. 90:2084-2091.
- Ryan M.J. 1980. The reproductive behavior of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). Copeia 1:108-114.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
- Sanabria E., Ripoll Y., Jordan M., Quiroga L., Ariza M., Guillemain M., Pérez M. and Chávez H. 2011. A new record for American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in San Juan, Argentina. Rev. Mex. de Biodivers. 82:311-313.
- Santos-Barrera G., Hammerson G., Hedges B., Joglar R., Inchaustegui S., Lue K., Chou W., Gu H., Shi H., Diesmos A., Iskandar D., Dijk P.P. van, Masafumi M., Schmidt B., Miaud C., Martínez-Solano C., Martínez-Solano I. 2009. *Lithobates catesbeianus*. In: IUCN Red List of Threatened Species, Version 2009.2.

unpaginated. <http://www.iucnredlist.org>

- Shaw G. 1802. General zoology. Volume III. Amphibians and reptiles. London, UK.
- Spitzen-van der Sluijs A.M. and Zollinger R. 2010. Literature review on the American bullfrog *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). Stichting RAVON, Nijmegen, the Netherlands. pp. 33.
- Stumpel Ahp. 1992. Successful reproduction of introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in northwestern Europe: a potential threat to indigenous amphibians. Biol. Conserv. 60:61-62.
- Tajima F. and Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. Mol. Biol. Evol. 1:269-285.
- Teleford D. 1960. The american bullfrog, *Rana catesbeiana* in Japan. Copeia 1960:155.
- Tsai T.S., Rajasekar S. and St John J.C. 2016. The relationship between mitochondrial DNA haplotype and the reproductive capacity of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). BMC Genet. 17:67.
- Tsai T. and St John J.C. 2016. The role of mitochondrial DNA copy number, variants, and haplotypes in farm animal developmental outcome. Domest. Anim. Endocrinol. 56 Suppl:S133-46.
- Tukey J.W. 1949. Comparing individual means in the analysis of variance. Biometrics 5:99-114.
- Wang Y.P., Guo Z.W., Pearl C.A. and Li Y.M. 2007. Body size affects the predatory interactions between introduced American bullfrogs *Rana catesbeiana* and native anurans in China: An experimental study. J. Herpetol. 41:514-520.
- Wai T., Ao A., Zhang X., Cyr D., Dufort D. and Shoubridge E.A. 2010. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. Biol. Reprod. 83:52-62.
- Willis Y.L., Moyle D.L. and Baskett T.S. 1956. Emergence, breeding, hibernation, movements, and transformation of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in Missouri. Copeia 1956:30-41.

- Wolff J.N., Pichaud N. Camus M.F., Côté G., Blier P.U. and Dowling D.K. 2016a. Evolutionary implications of mitochondrial genetic variation: mitochondrial genetic effects on OXPHOS respiration and mitochondrial quantity change with age and sex in fruit flies. *J. Evol. Biol.* 29:736-747.
- Wolff J.N., Tompkins D.M., Gemmell N.J. and Dowling D.K. 2016a. Mitonuclear interactions, mtDNA-mediated thermal plasticity, and implications for the Trojan Female Technique for pest control. *Sci. Rep.* 6:30016.
- Wu Z.J., Li Y.M., Wang Y.P. and Adams M.J. 2005. Diet of introduced bullfrogs *Rana catesbeiana*: Predation on and diet overlap with native frogs on Daishan Island, China. *J. Herpetol.* 39:668-674.
- Wylie G., Casazza M. and Carpenter M. 2003. Diet of bullfrogs in relation to predation on giant garter snakes at Colusa National Wildlife Refuge. *California Fish and Game* 89:139-145.
- Yuan Z.Y., Zhou W.W., Chen X., Poyarkov N.A. Jr., Chen H.M., Jang-Liaw N.H., Chou W.H., Matzke N.J., Iizuka K., Min M.S., Kuzmin S.L., Zhang Y.P., Cannatella D.C., Hillis D.M., and Che J. 2016. Spatiotemporal diversification of the true frogs (genus *Rana*): A historical framework for a widely studied group of model organisms. *Syst. Biol.* 65:824-842.