

## ***Drosophila robusta* species group 2종(*D. lacertosa*와 *D. sordidula*)의 mtDNA 변이에 의한 종 분화 정도**

최 준 길 · 박 제 철\*

(상지대학교 생물학과, 동경도립대학 이학부 생물학과\*)

### 적 요

*Drosophila virilis* section 중 *D. robusta* 종군 내에서 *D. lacertosa* 아군의 *D. lacertosa*와 *D. robusta* 아군의 *D. sordidula*에 대한 형태학적 특징 및 세포학적 특징(핵형분석)간에 차이가 크기 때문에 이 두종을 대상으로 종의 분화 정도와 종형성 과정을 알아보기 위한 연구의 일환으로 10가지 제한효소를 사용하여 mtDNA의 절단 인식부위를 분석하였다. 그 결과 *D. lacertosa*와 *D. sordidula*의 전체 genome size는 공히 15.7 kbp인 것으로 나타났으며 mtDNA의 제한효소 fragment 수는 각각 26개와 32개인 것으로 조사되었다. 또한 2종류의 제한효소를 동시에 처리하여 제한효소 지도를 작성하여 보았을 때, 이들 두종의 제한효소 지도의 형태에서 매우 큰 차이가 있는 것으로 나타났다. 같은 종군 내에서 형태학적, 세포학적 차이 및 mtDNA의 제한효소 지도에 의한 차이로 볼 때 이들 2종의 차이는 아군 수준으로까지 분류할 수 있을 정도로 두 종의 분화가 오래전에 이루어졌음을 시사하였다.

Key words: *Drosophila robusta* group, *D. lacertosa*, *D. sordidula*, Restriction map of mtDNA

### 서 론

우리나라에는 100여종 이상의 초파리가 분포하고 있으며 이들 중 *Drosophila* 속에는 6아속 60여종이 속해있는 것으로 알려져 있고 이들 중 *D. lacertosa*와 *D. sordidula*는 우리나라 전역에 걸쳐 고르게 분포하는 것으로 보고되어 있다(Lee와 Kim, 1987).

생물의 종 분화에 관한 연구는 진화유전학의 중심 과제이며, 초파리는 종분화의 연구에 매우 적합한 재료인 것으로 알려져 있다. 이러한 종 분화에 관한 연구는 주로 형태학적 형질에 의존하

여 왔으나 근래에는 핵형분석 또는 전기영동법에 의한 핵유전자 변이 분석 등이 많이 사용되고 있다.

Mitochondrial DNA(mtDNA)는 핵 DNA에 비해 매우 작은 크기인 15-20 kbp 정도의 2중 환상구조로 되어 있으며, 모계 유전물질인 것으로 알려져 있다. 또한 mtDNA는 세포내외 환경 변화에 따라 핵 DNA보다 염기치환 속도가 매우 빠르다는 특징을 가지고 있어서 환경 적응 문제와 관련하여 근연종간 또는 자매종 및 잡종에 대한 연구에 많이 이용되고 있으며(Ferris 등, 1981, 1983; Lansman 등, 1981; Champman 등, 1982), 세포질 내에 존재하는 mtDNA의 염기배열 순서에 따라 종내 또는 종간 유연관계를 밝힘으로써 종의 분화과정을 분석하는 데도 매우 유용한 것으로 알려져 있다(Ferris 등, 1981; Avise 등, 1986).

이러한 연구들 중 초파리의 mtDNA 변이에 관한 연구로 Latorre 등(1986)과 Afonso 등(1990)은 *D. subobscura* 집단 간의 mtDNA 분화를 조사하여 이 종의 집단의 유래 및 격리 유지기구를 추정하였으며, Hale과 Singh(1986)은 *D. melanogaster*를 대상으로 집단간의 mtDNA type의 유래에 관하여 연구한 바 있다. 또한 Solignac과 Monnerot(1986)는 *D. simulans*, *D. mauritiana* 및 *D. sechellia*의 cleavage map을 작성하여, 그 결과를 토대로 종내 및 종간의 mtDNA type에 의한 종 분화의 과정을 규명하였다. 그외에도 Hunt와 Carson(1983)은 Hawaii산 *Drosophila* 4종의 진화에 관하여 연구하였으며, Hale과 Beckenbach(1985)는 *D. pseudoobscura*와 그의 근연종의 유연 관계를 mtDNA 분석을 통하여 규명하였다. 또한 Tamura 등(1991)은 *D. sulfurigaster* 2아종을 대상으로 mtDNA의 다형현상을, Gupta 등(1993)은 *D. bipectinata* 종군 2종의 mtDNA 변이 분석을, Kim 등(1993)은 *D. montium* subgroup의 mtDNA 변이에 의한 진화 관계를, Aotsuka 등(1994)은 *D. immigrans* 자연집단의 mtDNA 변이를, 그리고 Ohsako 등(1994)은 일본 본토에 서식하고 있는 *D. albomicans* 자연 집단의 기원을 mtDNA 변이 분석을 통하여 밝힌 바 있다. 국내 초파리를 대상으로한 mtDNA에 관한 연구로 Choo 등(1988), Kim과 Choo(1988) 그리고 Kim(1988)은 *D. melanogaster*를 대상으로 집단간의 mtDNA type을 4가지로 분석한 바 있으며, Choi와 Choo(1989)는 *D. virilis*를 대상으로 mtDNA 변이 분석을 행하여 국내 *D. virilis* 집단을 3 type으로 나누었다. 또한 Choi와 Choo(1993)는 *D. melanogaster*, *D. simulans*, 및 *D. virilis* 3종을 대상으로 mtDNA의 변이를 분석하여 종간의 유연관계를 밝힌 바 있다. 그러나 *D. lacertosa*나 *D. sordidula*를 대상으로한 mtDNA의 종간 변이에 관한 연구는 거의 이루어진 바 없다.

아시아 지역에 있어서 *Drosophila virilis* section에는 *angor species group*, *virilis species group*, *robusta species group*, *melanica species group*, *quadrissetata species group* 및 *polychaeta species group*이 있는데(Watabe, 1994, unpublished) 본 연구는 초파리 종간의 mtDNA 변이분석에 의한 종 형성과정 연구의 일환으로 *Drosophila*속 중 *D. robusta species group*에 해당하는 *D. lacertosa*와 *D. sordidula*를 대상으로 mtDNA를 추출하여 10가지의 제한 효소를 처리함으로써 얻어진 절편의 크기 차이를 이용하여 이들의 종 분화와 종형성 과정을 분석하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

본 실험에 사용된 *D. lacertosa*는 TMU-11 strain이며 *D. sordidula*는 TMU-4 strain으

로 이들 두 계통은 모두 동경도립대학 이학부 생물학과에서 계대 사육 중에 있다.

## 방 법

### ① mtDNA의 추출

mtDNA의 추출은 Tamura와 Aotsuka(1988)의 방법을 수정하여 사용하였다. 각 isofemale line으로부터 유래된 1 g의 성체에 homobuffer(0.25 M sucrose, 10 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 넣고 분쇄한 다음 teflon 분쇄기로 8~10회 분쇄한 후, 3,000 rpm으로 10분간 원심분리시켜 핵을 제거하였다. 상등액을 12,000 rpm으로 20분간 원심분리시켜 mitochondria 분획을 침전시킨 후, STE 용액(0.15 M NaCl, 10 mM Tris-EDTA, pH 8.0) 1.0 ml에 다시 현탁시켜 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 0.18 N NaOH와 1% SDS를 200  $\mu$ l 넣고 가볍게 흔들어 내용물을 혼합한 후 5분간 얼음 속에서 방치하여 알칼리 변성을 시켰다. 여기에 5 M ice-cold potassium acetate 용액(pH 4.8)을 넣고 내용물을 혼합한 다음 5분간 얼음에 두어 중화시킨 후, 4°C에서 5분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 상등액에 동량의 phenol-chloroform을 첨가한 후 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 다음, 2배의 ethanol을 첨가하여 실온에서 30분 이상 방치한 후 다시 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 mtDNA를 침전시킨 다음 상등액을 버리고 70% ethanol로 mtDNA를 세척한 후 12,000 rpm으로 5분간 다시 원심분리 하였다. mtDNA를 진공하에서 3분간 건조시킨 후, 100  $\mu$ l의 TE buffer(pH 8.0)에 녹인 다음 시료로 사용하였다.

### ② 제한효소의 처리

mtDNA 변이를 분석하기 위하여 10종류의 제한효소(BRL사 제품)를 사용하였다. 실험에 사용된 제한효소는 Hind III, Xba I, Hae III, Msp I, Sac I, EcoR I, EcoT<sub>22</sub> I, Nsp V, Pvu II 및 EcoRV 등 10가지였다. 제한효소의 처리는 시료 9  $\mu$ l에 restriction buffer 1  $\mu$ l, restriction enzyme 0.2  $\mu$ l를 첨가하여 잘 혼합한 다음 37°C에서 1시간 이상 두었다.

### ③ Restriction fragment의 크기 측정

Digestion시킨 mtDNA 시료에 loading buffer 2  $\mu$ l를 0.7% agarose gel, TPE buffer에서 50 V(80 mA)로 3시간 영동한 다음 ethidium bromide로 20분 정도 염색한 후 DNA 절편의 이동상을 적외선(700 nm) 하에서 촬영하였다. 제한효소에 의해 절단된 mtDNA 절편의 변이해석 및 크기는 전기영동 후 나타난 절편을 marker와의 상대 이동거리와 비교하여 측정하였다.

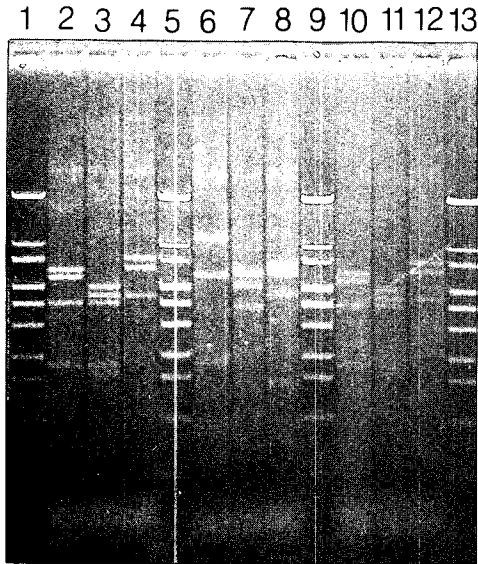
### ④ Cleavage map의 작성

각각의 제한효소에 의해 절단된 절편의 분자량과 2가지 효소를 동시에 처리하여 절단된 절편의 크기를 비교하여 작성하였다.

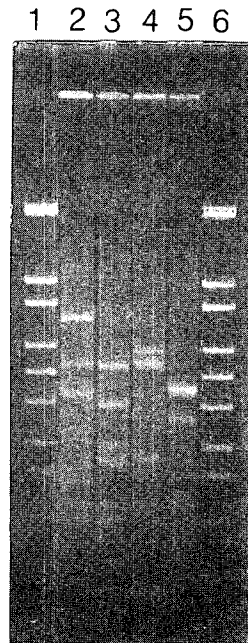
## 결 과

*D. lacertosa*와 *D. sordidula*의 mtDNA에 10가지 제한효소를 처리하여 얻어진 절편양상은 Fig. 1과 같으며, 2종의 초파리 자연집단에서 유래한 iso-female line으로부터 추출한 mtDNA에 대하여 10가지 제한효소의 처리로 나타난 절편의 수와 이들의 genome size를 Table 1에 나타내었다.

Fig. 1과 Table 1에서 보는 바와 같이 Pvu II에 의해서는 2종 모두 하나의 mtDNA 절편으



**Fig. 1.** Representative examples of fragment patterns after restriction endonuclease digestion of mtDNA from *D. lacertosa* and *D. sordidula* (Lane 1, 5, 9, 13:  $\lambda$ -DNA digested with restriction endonuclease Sty I to produce fragment size markers. 19.33, 7.74, 6.22, 3.47, 2.69, 1.88, 1.48, 0.93). Lane 2, 3, 4, 10, 11, 12: *D. lacertosa*, Lane 6, 7, 8: *D. sordidula*, Lane 2, 6, 10: Hind III, Lane 3, 7, 11: Hind III + Xba I, Lane 4, 8, 12: Xba I



**Fig. 2.** Representative examples of fragment patterns after double digestion of mtDNA from *D. lacertosa* (Lane 1, 6:  $\lambda$ -DNA digested with restriction endonuclease Sty I to produce fragment size markers. 19.33, 7.74, 6.22, 3.47, 2.69, 1.88, 1.48, 0.93). Lane 2: EcoR I + Bgl II, Lane 3: EcoR I + Hind III, Lane 4: EcoR I + Pvu II, Lane 5: EcoR I + Xba I

로 나타났으며, Hae III에 의해서는 *D. lacertosa*가, Nsp V와 EcoT<sub>22</sub> I에 의해서는 *D. sordidula*가 각각 하나의 절편(15.7 kbp)을, 그 외의 제한효소에 의해서는 2개에서 6개까지 매우 다양한 fragment를 갖는 것으로 확인되었다. 또한 2종에 있어서 공통의 인식 부위를 갖는 경우는 거의 없는 것으로 나타났으며, 전체 절편의 수는 *D. lacertosa*에서 26개, *D. sordidula*에서 32개인 것으로 각각 나타났다. 한편 *D. lacertosa*와 *D. sordidula*의 mtDNA의 genome size는 모두 15.7 kbp인 것으로 확인되었다.

mtDNA에 대하여 2가지 제한효소를 동시에 처리하여 나타난 절편의 양상을 Fig. 2에 나타내었으며 이를 토대로하여 작성한 초파리 2종의 cleavage map을 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 Cleavage map의 작성은 각 종이 공유하고 있는 Xba I site를 기준으로 하여 각 제한효소의 인식부위를 직선 상에 작성하였다. 그 결과 *D. lacertosa*에서는 26 site, *D. sordidula*에서는 32 site를 각각 점출할 수 있었다. 그러나 cleavage map의 작성 결과 이들 두 종은 공통된 인식 부위를 갖지 않는 것으로 나타나 매우 다른 mtDNA염기 배열을 갖고 있는 것으로 확인되었다.

**Table 1.** Sizes of restriction fragments of *D. lacertosa* and *D. sordidula* mtDNAs digested with 10 restriction endonucleases

Fragment	Hind III		Xba I		Hae III		Msp I		Sac I	
	1	s	1	s	1	s	1	s	1	s
A	5.3	8.2	6.4	5.4	15.7	7.2	14.0	4.6	6.7	10.6
B	4.7	4.9	5.5	5.0		6.7	1.7	3.0	5.1	2.8
C	3.5	1.7	3.8	3.9		1.8		2.8	3.9	2.4
D	1.6	5.0		1.4				2.2		
E	0.6	0.4						1.6		
F								1.5		
Total	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7

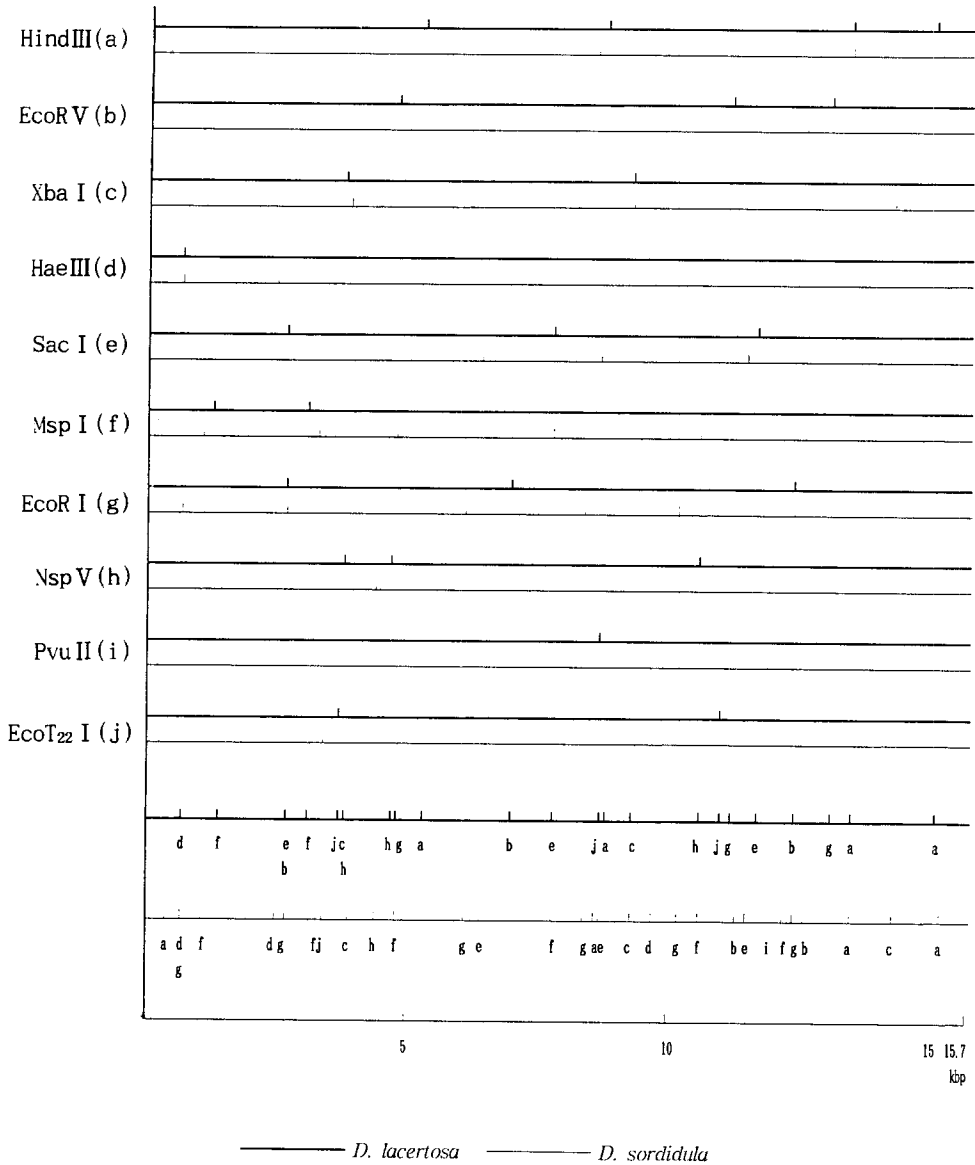
Fragment	EcoR I		EcoT <sub>22</sub> I		Nsp V		Pvu II		EcoR V	
	1	s	1	s	1	s	1	s	1	s
A	6.0	4.0	8.4	15.7	8.9	15.7	15.7	15.7	7.4	14.4
B	5.4	3.4	7.3		5.9				6.4	1.3
C	4.3	2.3			0.9				1.9	
D		2.2								
E		2.0								
F		1.4								
Total	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7

1: *D. lacertosa*, s: *D. sordidula*.

### 고 찰

본 연구는 *D. robusta* 종군의 계통관계 규명의 일환으로 *D. lacertosa* 아군의 *D. lacertosa*와 *D. robusta* 아군의 *D. sordidula*를 대상으로 mtDNA의 제한효소 지도를 바탕으로 종군 내의 종분화 과정을 확인하였다. 자연집단에 서식하는 종내변이에 있어서는 변이율이 작고(Aotsuka 등, 1994). 같은 종군 내에서도 같은 아군에 속하는 종들 사이의 종내 분화 정도는 그리 크지 않은 것으로 보고된 바 있다(Kim 등, 1993).

Hale과 Beckenbach(1985)는 *D. pseudoobscura*, *D. persimilis* 그리고 *D. miranda*의 Pacific Northwest집단을 대상으로 6가지 제한효소를 사용하여 mtDNA 변이를 분석한 결과 Hpa II에서 높은 변이성을 확인하고 이러한 높은 변이는 A-T rich region에 의한 삽입 또는 중복의 결과이며, 궁극적으로 종분화를 수반하게 된다고 하였다. 또한 Solignac과 Monnerot(1986)는 12가지 제한효소를 사용하여 mtDNA 분석에 의한 *D. simulans*, *D. mauritiana*와 *D. sechellia*의 종 형성과 종내 및 종간의 계통수를 작성하였으며 Madagascar섬의 *D. simulans* mtDNA의 introgression 가설을 주장한 바 있다. 본 연구에서도 Hind III와 *D.*



**Fig. 3.** Cleavage map of *D. lacertosa* and *D. sordidula* mtDNA.

*sordidula*에 있어서 Msp I 및 EcoR I 등에서 높은 변이성을 나타내었는데 이러한 인식부위의 높은 변이성은 삽입 또는 중복의 결과이며, 이러한 결과가 궁극적으로 종분화를 수반하게 되었을 것으로 추정되며 종분화 과정동안 introgression을 전혀 배제 할 수는 없을 것으로 판단된다.

한편 *D. lacertosa*와 *D. sordidula*는 형태적인 형질 뿐만아니라 염색체의 수나 이들의 반수체 핵형에 있어서도 각각 1V4JID와 2V2RID(Lee, 1993)로 확인되어 이들 2종은 매우 많은 차이가 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구 결과 전기 영동상에 나타난 절편의 양상을 비교해 볼때 이들 2종은 매우 큰 차이가 있었으며 2가지 제한효소를 동시에 처리하여 cleavage map을 작성해 본 결과에서도 공통된 절단 인식부위를 갖지 않는 것으로 확인되어 이들 2종은 형태적 형질과 핵형 분석에 의한 결과. 그리

고 mtDNA 절단 인식부위의 차이에 의한 결과는 일치하는 것으로 확인되었다.

이상의 연구 결과들을 종합해 볼 때, 같은 종군 내에서의 종내변이라든가 종간의 변이는 그리 크지 않은 것이 일반적이나 *D. lacertosa*와 *D. sordidula*와 같이 같은 종군 내에서도 종분화 정도가 큰 것은 종분화가 오래전에 이루어졌음을 시사하는 것으로 이들 2종은 형태적 특징과 세포학적 특징에 의해 구분된 아군수준 정도의 분화라고 보여진다. 한편, 본 연구 결과에 추가하여 *D. robusta* 종군 내의 여러종을 대상으로 mtDNA 변이 분석을 실시한다면 초파리 종간의 유연관계 뿐만 아니라 종형성과 분화의 과정 등을 더욱 명확히 규명할 수 있을 것이며 더불어 변이 유지기구의 기작도 함께 연구될 수 있을 것으로 생각된다.

### 참고문헌

- Afonso, J.M., A. Volz, M. Hernandez, H. Ruttkay, M. Gonzalez, J.M. Larruga, V.M. Cabrera and D. Sperlich, 1990. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in old-world populations of *Drosophila subobscura*. *Mol. Biol. Evol.*, **7**(2): 123-142.
- Aotsuka, T., H.Y. Chang, M. Aruga, F.J. Lin and O. Kitagawa, 1994. Mitochondrial DNA variation in populations of *Drosophila immigrans*. *Zoological studies*, **33**(1): 29-33.
- Avise, J.C., G.S. Helfman, N.C. Saunders and L.S. Hales, 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 4350-4354.
- Chapman, R.M., J.C. Stepens, R.A. Lansman and J.C. Avise, 1982. Models of mitochondrial DNA transmission genetics and evolution in higher eucaryotes. *Genet. Res. Camb.*, **40**: 41-57.
- Choi, J.K. and J.K. Choo, 1989. Studies on intraspecific variation of mitochondrial DNA in *Drosophila virilis*. *Kor. J. Genet.*, **11**(4): 269-277.
- Choi, J.K. and J.K. Choo, 1993. Restriction site polymorphism and variation in length of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* and *D. virilis*. *Kor. J. Entomol.*, **23**(3): 151-157.
- Choo, J.K., J.K. Choi and B.K. Kim, 1988. Studies on intraspecific variation of mitochondrial DNA in Korean natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Kor. J. Genet.*, **10**: 7-16.
- Ferris, S.D., A.C. Wilson and W.M. Brown, 1981. Evolutionary tree for apes and humans based on cleavage maps of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2432-2436.
- Ferris, S.D., R.D. Sage, C.M. Huang, J.T. Nielsen, U. Ritte and A.C. Wilson, 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 2290-2294.
- Gupta, J.P., T. Aotsuka, A. Inaba and O. Kitagawa, 1993. Analysis of mitochondrial DNA in two species of the *bipunctinata* species complex of *Drosophila*. *Jap. J. Genet.*, **68**(4): 257-264.
- Hale, L.R. and A.T. Beckenbach, 1985. Mitochondrial DNA variation in *Drosophila pseudoobscura* and related species in Pacific Northwest populations. *Can. J. Genet. Cytol.*, **27**: 357-364.
- Hale, L.R. and R.S. Singh, 1986. Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 8813-8817.
- Hunt, J.A. and H.L. Carson, 1983. Evolutionary relationships of four species of Hawaiian drosophila as measured by DNA reassociation. *Genetics*, **104**: 353-364.
- Kim, B.K., 1988. Mitochondrial DNA polymorphism in fourteen geographic strains of *Drosophila melanogaster*. *Kor. J. Zool.*, **31**: 218-224.

- Kim, B.K. and J.K. Choo, 1988. Polymorphism in mitochondrial DNA of *Drosophila* as revealed by restriction endonucleases. *Inst. Genet. Engin. Chung-Ang Univ.*, **1**: 13-21.
- Kim, B.K., T. Aotsuka and O. Kitagawa, 1993. Evolutionary genetics of the *Drosophila montium* Subgroup. II. Mitochondrial DNA variation. *Zool. Sci. Jap.*, **10**: 991-996.
- Lansman, R.A., R.O. Shade, J.F. Shapira and J.C. Avise, 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *J. Mol. Evol.*, **17**: 214-226.
- Latorre, A., A. Maya and F.J. Ayala, 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 8649-8653.
- Lee, T.J., 1993. Evolution in *Drosophila*. The Chung-ang Univ. Press, Korea.
- Lee, T.J. and N.W. Kim, 1987. Systematic study of the Drosophilidae in Korea. *Natural Science J. Chung-Ang Univ.*, **1**: 113-129.
- Ohsako T., T. Aotsuka and O. Kitagawa, 1994. The origins of the Japanese mainland population of *Drosophila albomicans*. *Jap. J. Genet.*, **69**(2): 183-194.
- Solignac, M. and M. Monnerot, 1986. Race formation, speciation, and introgression within *Drosophila simulans*, *D. mauritiana*, and *D. sechllia* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Evolution*, **40**: 531-539.
- Tamura, K. and T. Aotsuka, 1988. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochem. Genet.*, **26**: 815-819.
- Tamura, K., T. Aotsuka and O. Kitagawa, 1991. Mitochondrial DNA polymorphisms in two subspecies of *Drosophila sulfurigaster*: Relationship between geographic structure of population and nucleotide diversity. *Mol. Biol. Evol.*, **8**(1): 104-114.

RECEIVED: 12 October 1995

ACCEPTED: 15 November 1995



**Speciation Level by the Mitochondrial DNA Variation in *Drosophila robusta* Species Group (*D. lacertosa* and *D. sordidula*)**

**Jun Kil Choi and Je Cheol Park\***

(Department of Biology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea; \*Department of Biology, Tokyo Metropolitan University, Tokyo 192-03, Japan)

**ABSTRACT**

*Drosophila lacertosa* and *D. sordidula* are members of the robusta species group in *virilis* section of *Drosophila*. The mtDNA of both species was analyzed, using 10 restriction endonucleases. The mtDNA genome size of *D. lacertosa* and *D. sordidula* was 15.7 kbp, altogether, and the numbers of mtDNA fragment were 26 and 32, respectively. Restriction cleavage map of mtDNA in these species was constructed. The patterns of cleavage map were very different between two species and it means that speciation was taken for a long time ago.