

RAPD 마커를 이용한 멧누에와 집누에 계통간의 분자적 유연관계 분석

황재삼[†] · 이진성* · 구태원 · 강현아 · 손해룡** · 김호락

농촌진흥청 잠사곤충연구소
*생명공학연구소 유전체사업단
**경북대학교 농과대학

Analysis of Molecular Relationships Between *Bombyx mandarina* and *Bombyx mori* Strains Using RAPD-Markers

Jae-Sam Hwang[†], Jin-Sung Lee*, Tae-Won Goo, Hyun-Ah Kang, Hae-Ryong Sohn**, and Ho-Rak Kim

National Sericulture & Entomology Research Institute R.D.A., Suwon 441-100, Korea

*Genome Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB), KIST, P.O.Box 115 Yusong, Taejeon 305-600, Korea

**Col. of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract

The molecular relationships have analyzed between the *Bombyx mandarina*(wild silkworm) and *Bombyx mori* strains (domesticated silkworm, geographical silkworms). A total of 166 polymorphic RAPD markers amplified from 35 different primers were used to analyze the molecular relationships among thirteen silkworm strains. The genetic similarity coefficient between *Bombyx mandarina* and Jam305 showed the lowest genetic similarity value with 0.451, *Bombyx mandarina* and Bibaekjam showed the highest genetic similarity value with 0.598. These strains were classified into *Bombyx mandarina*(a wild silkworm) and *Bombyx mori*(twelve domesticated silkworm) groups upon the genetic similarity coefficient of 0.55. Further classification of *Bombyx mori* group was possibly sub-groups into a small clusters at the genetics similarity coefficient of 0.60 ; the 1st sub-group (J111, Bibaekjam, *pnd*^{ps}), the 2nd sub-group (Galwon, C18, *od* yujam, JAM306, C108), the 3rd sub-group(R-hwang, *p50*), the 4th sub-group(zebra) and the 5th sub-group(JAM305). According to this study, RAPD markers seems to be a valuable tool for molecular relationships and classification among the silkworms

Key words : RAPD, *Bombyx mandarina*, *Bombyx mori*

서 론

집누에(*Bombyx mori*)의 선조형으로 보고된 멧누에(*Bombyx mandarina*)는 형태 및 생리생태가 집누에와 비슷한

특징을 가지고 있어 집누에의 분화라는 측면에서 매우 중요하며 이에 대한 많은 연구가 수행되어졌다^{19),20)}. Astorave등²⁾은 중국에 서식하는 멧누에의 염색체수 n=28이고, 한국과 일본에 서식하는 멧누에의 염색체수 n=27임을 보

[†] Corresponding author

고했다. Murakami와 Imai¹⁴⁾는 일본에 서식하는 멧누에와 집누에(n=28)의 교잡에 의해 얻어진 F₁ 염색체의 연구결과 멧누에 염색체중 하나가 집누에로 변이 혹은 분화하는 과정에서 두개로 나누어 졌음을 밝혔다. 또한, 이들 두 종은 견단백질을 암호화하는 5' end flanking 부위의 염기서열 및 promoter부분에서 상동성이 높고¹²⁾, fibroin 단백질을 구성하는 18개의 아미노산 조성과 화학 구조가 비슷하였다¹¹⁾.

본 연구에서는 근친계통간에도 유연관계를 비교적 객관적으로 구명할 수 있는 RAPD 마커를¹⁰⁾ 이용하여 멧누에와 집누에 계통간의 분자적 유연관계를 분석하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. Insects

본 연구에 사용된 집누에(*Bombyx mori*)는 농촌진흥청 잠사곤충연구소에서 계대 보존하고 있는 것을 사용하였고, 멧누에(*Bombyx mandarina*)는 동 연구소의 뽕밭에서 야생하고 있는 것을 채집하여 실험재료로 사용하였다.

2. Extraction of Genomic DNA

Genomic DNA의 추출을 위하여 5령 3일째의 누에 유충을 해부하여 견사선을 꺼내어 차가운 1 X SSC 완충액(0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0)으로 여러번 세척하면서 후부실샘 이외의 조직, 기관, 체액 등을 제거한 후 액체질소(-196 °C)에 급속 동결하여 사용시까지 -80 °C에 냉동 저장하였다. 누에 genomic DNA는 Suzuki등¹⁶⁾의 방법을 일부 변형하여 분리하였다. 시료는 시료무게 2.5배의 DNA 추출용 완충액(0.5% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate), 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.1 M NaCl, 10 µg/ml의 proteinase K)을 첨가한 후, 유리균질기로 마쇄하여 37°C에서 15분 반응시킨 다음, 2 ml의 1 M Tris-HCl(pH 7.5)과 3 ml의 phenol을 가하여 천천히 혼합, 저온원심(5,000rpm, 5°C)후 상등액을 모으고 2회의 phenol/chloroform추출 후 3배의 salted ethanol (2% potassium acetate포함)을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 유리봉으로 모아 TE완충액(20 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA)에 녹인 후 다시 3배의 salted ethanol을 가하여 DNA를 침전시키고 70% etha-

nol에 washing한 후 건조시켜 1 ml의 TE완충액을 가한 다음, 10 µg/ml이 되도록 RNaseA를 처리하였다. 37°C에서 2시간 반응시킨 후 phenol /chloroform으로 2회 추출하고 salted ethanol (2% potassium acetate 포함)로 DNA를 침전시켜 70% ethanol에 washing한 다음 건조시켜 TE 완충액에 녹여 실험용 genomic DNA로 사용하였다.

3. Polymerase Chain Reaction

RAPD-PCR분석에 이용된 oligonucleotide primer는 Operon사의 random primer였으며(Table 1), dNTP 및 Taq DNA polymerase는 코아바이오시스템(주)의 제품들, PCR 반응기는 한국 화인사의 반응기를 각각 사용하였다. RAPD-PCR분석을 위한 반응조건은 황등⁹⁾이 구명한 최적 조건을 사용하였다. 즉 25 µl 용량에 대해 genomic DNA 30 ng, dNTP mixture 200 µM, random primer 5 pmol을 첨가해서, 95°C에서 5분 DNA를 변성시킨 다음, Taq polymerase 1 unit를 첨가한 뒤, 다시 94°C 60초, 35°C 60초, 72°C 90초간의 반응을 한 cycle로 하여 45 cycles반응 후, 72°C에서 300초 반응시켰다.

4. Analysis of RAPD markers

PCR반응 후 RAPD 분석은 NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) computer program의 UPGMA (Unweighed Pair-Group Method with Arithmetic average) 분석방법¹⁵⁾을 이용하여 계산하였다.

결론 및 고찰

실험 대상 생물을 *in vitro*에서 증폭하는 기술인 RAPD-PCR기법을 이용, 멧누에와 집누에 계통간 분자적 유연관계를 분석하였다. 35개의 primer에서 증폭된 band size범위는 0.2-3kb사이였고, major band는 400bp에서 2kb사이에서 증폭되었다(Figure 1). 또한, primer에 따라 RAPD마크가 2-8개로 다양하게 나타났으며, 전체 35개의 primer에서 166개의 마커를 얻을 수 있었다(Table 1). 이들 마커에 대해서 밴드가 있으면 "1" 밴드가 없으면 "0"으로 코드화하여 NTSYS-PC program에 의해 분자적 유사계수와 계통수를 작성하였다(Table 2, Figure 2). 분자적 유사계수의 범위는 0.451에서 0.701 사이였으며, 멧누에와 각

Table 1. Random primers for RAPD analysis of the silkworms

Primers	Nucleotide sequences	RAPDs	Primers	Nucleotide sequences	RAPDs
OPB 01	5'-GTTTCGCTCC-3'	6	OPD 01	5'-ACCGCGAAGG-3'	7
03	5'-CATCCCCCTG-3'	6	02	5'-GGACCCAACC-3'	6
04	5'-GGACTGGAGT-3'	5	03	5'-GTCGCCGTCA-3'	3
05	5'-TGCGCCCTTC-3'	4	04	5'-TCTGGTGAGG-3'	5
06	5'-TGCTCTGCCC-3'	5	05	5'-TGAGCGGACA-3'	3
07	5'-GGTGACGCAG-3'	7	07	5'-TTGGCACGGG-3'	2
08	5'-GTCCACACGG-3'	7	08	5'-GTGTGCCCCA-3'	5
11	5'-GTAGACCCGT-3'	6	09	5'-CTCTGGAGAC-3'	7
12	5'-CCTTGACGCA-3'	8	12	5'-CACCGTATCC-3'	4
13	5'-TTCCCCCGCT-3'	6	13	5'-GGGGTGACGA-3'	3
14	5'-TCCGCTCTGG-3'	6	16	5'-AGGGCGTAAG-3'	4
15	5'-GGAGGGTGTT-3'	3	18	5'-GAGAGCCAAC-3'	3
16	5'-TTTGCCCCGA-3'	4	20	5'-ACCCGGTCAC-3'	5
17	5'-AGGGAACGAG-3'	6	OPM 03	5'-CCAGATGCAC-3'	4
18	5'-CCACAGCAGT-3'	3	17	5'-CTACTGCCGT-3'	3
19	5'-ACCCCCGAAG-3'	5	18	5'-GGACTGCAGA-3'	2
20	5'-GGACCCTTAC-3'	3	19	5'-ACGGCGTATG-3'	4
			20	5'-AACGGTGACC-3'	6
Total					166

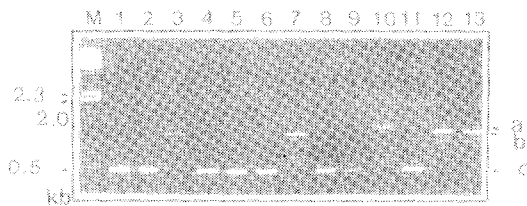


Fig. 1. RAPD profile of the twelve silkworm strains (*Bombyx mori*) and *Bombyx mandarina* generated by the Operon primer OPM17. A-C; polymorphic RAPD markers. M; DNA size marker. Lane 1: J111, Lane 2: Galwon, Lane 3: C18, Lane 4: R-hwang, Lane 5: *pnd^{ps}*, Lane 6: Zebra, Lane 7: Bibaekjam, Lane 8: JAM305, Lane 9: JAM306, Lane 10: od yujam, Lane 11: *p50*, Lane 12: C108, Lane 13: *Bombyx mandarina*.

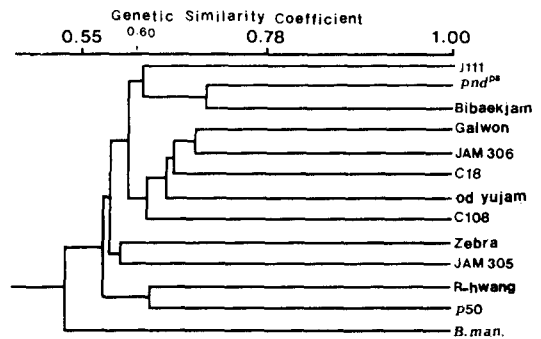


Fig. 2. Dendrogram based on a 13×13 matrix of similarity coefficients calculated from RAPD data of 166 amplification products generated by 35 primers.

Table 2. Similarity coefficient matrix among the silkworm strains

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
J111	1.000												
Galwon	0.665	1.000											
C18	0.604	0.659	1.000										
R-hwang	0.555	0.646	0.585	1.000									
<i>pnd^{ps}</i>	0.604	0.671	0.646	0.622	1.000								
Zebra	0.512	0.616	0.543	0.579	0.616	1.000							
Bibaekjam	0.646	0.591	0.665	0.579	0.701	0.585	1.000						
JAM305	0.561	0.591	0.579	0.591	0.604	0.598	0.524	1.000					
JAM306	0.598	0.689	0.665	0.665	0.640	0.634	0.622	0.659	1.000				
od yujam	0.549	0.652	0.640	0.567	0.640	0.573	0.561	0.537	0.671	1.000			
<i>p50</i>	0.591	0.573	0.598	0.634	0.610	0.530	0.567	0.555	0.579	0.543	1.000		
C108	0.512	0.616	0.616	0.555	0.579	0.622	0.598	0.610	0.671	0.622	0.506	1.000	
<i>Bombyx mandarina</i>	0.512	0.518	0.506	0.567	0.555	0.549	0.598	0.451	0.524	0.561	0.506	0.524	1.000

1 : J111, 2 : Galwon, 3 : C18, 4 : R-hwang, 5 : *pnd^{ps}*, 6 : Zebra, 7 : Bibaekjam, 8 : JAM305, 9 : JAM306, 10 : od yujam, 11 : *p50*, 12 : C108, 13 : *Bombyx mandarina*.

지리적 집누에 계통간 분자적 유사계수를 보면 J111 : 0.512, Galwon : 0.518, C18 : 0.506, R-hwang : 0.567, *Pnd^{ps}* : 0.555, Zebra : 0.549, Bibaekjam : 0.598, JAM305 : 0.451, JAM306 : 0.524, od yujam : 0.561, *p50* : 0.506, C108 : 0.524였다. 즉, 뿔누에와 분자적 유사계수가 가장 높은 것은 비백잡이고, 가장 낮은것은 잠305였다.

또한, 분자적 유사계수 0.55에서 뿔누에와 집누에 계통군으로 나누어지고, 집누에 계통군은 0.60에서 3개의 아군 그룹과 2개의 독립개체로 나누어 졌다. 제1아군에는 J111(일본종계), *pnd^{ps}*(일본종계), Bibaekjam(일본종계)이, 제2아군에는 Galwon(중국종계), C18(중국종계), od yujam, JAM306(중국종계), C108(중국종계)이, 제3아군에는 R-hwang(중국종계), *p50*(일본종계)이 포함되어 있고, zebra(유럽종계)와 JAM305(일본종계)는 독립개체로 나누어졌다. 이러한 결과는 지금까지 지역적 서식지 및 외부형질에 의해 분류되어진 기존의 결과와 유사한 경향으로 본 기법에 의해 누에의 계통해석 혹은 높은 잡종효과를 얻기 위해서 원연 품종간의 교배를 위한 계통선발에도 응용할 수 있을 것으로 사료된다. 현재까지 누에 계통분류는 지리적 분류외에 화성, 면성, 견색, 견형, 난색 등 일반 유전형질에 대해서 유전자 좌위를 비롯하여 유전생리학적 연구가 많이 수행되

었다^{20,4,5)}. 뿔누에와 집누에는 형태 및 생리 생애, 염색체수, fibroin을 조성하는 아미노산 및 화학구조, 효소형 출현빈도 등 많은 연구가 수행되었다^{19,20,2,14,11,17,18,13)}. 그러나 유전형질의 경우 한개 이상의 유전자들로부터 복합적인 지배를 받아 발현되는 경우가 많고 때로는 환경에 의한 영향도 받기 때문에 외부적인 형질만으로 생물종을 분류한다는 것은 객관성 및 정확성이 부족하다. 이러한 단점을 보완하고 근친계통간에도 계통해석 및 분자적 유연관계를 추정할 수 있다는 RAPD 기법¹⁰⁾이 보고된 후 진디과, 파리목등 다양한 곤충에서 분석을 시도한 바 있고^{3,6,7)}, 누에에서도 성특이적인 마커선발 및 분자적 유연관계 분석이 응용된다 있다^{1,8)}.

본 연구에서는 primer 종류 및 수를 확대해서 뿔누에와 집누에 지역적 계통간의 분자적 유연관계를 분석하였다. 그 결과, 본 저자등⁸⁾이 보고한 결과와 거의 일치하는 경향이었고, 특히 뿔누에의 경우 집누에와 분자적 유사계수가 낮은 것은 오랫동안 자연 환경에 적응하면서 핵 DNA의 유전자 조성이 뿔누에 특이적인 것으로 진화했을 것으로 여겨진다.

요 약

본 연구는 RAPD 마커를 이용, 뿔누에와 집누에의 분자적

유연관계를 분석하였다. 공시한 35개의 primer에서 166개의 RAPD마커를 얻었으며, 이들 마커를 UPGMA에 의해 분석한 결과, 멧누에와 분자적 유사계수가 가장 낮은 품종은 잠305였고, 가장 높은 품종은 Bibaekjam이었다. 또한, 분자적 유사계수 0.55에서 멧누에와 집누에 계통군으로 분류되고, 0.60에서 3개의 아군 그룹과 2개의 독립개체로 분류되었다. 제1아군에는 J111(일본종계), *pnd^{ps}* (일본종계), Bibaekjam(일본종계)이, 제2아군에는 Galwon(중국종계), C18(중국종계), od yujam, JAM306(중국종계), C108(중국종계)이, 제3아군에는 R-hwang(중국종계)이 포함되어 있었고, zebra(유럽종계)와 JAM305(일본종계)는 독립개체로 분류되었다.

참 고 문 헌

1. Abe, H., Shimada, T., Yokoyama, T., Oshiki, T. and Kobayashi, M. : Identification of random amplified polymorphic DNA on the W chromosome of the Chinese 137 strains of the silkworm, *Bombyx mori*. *Jpn. J. Sericult. Sci.* **64**(1) : 19-22 (1995).
2. Astaurov, B. L., Garisheba, M. D., Radinskaya, I. S. : Chromosome complex of Ussuri geographical race of *Bombyx mori* L. *Cytology* **1** : 327-332 (1959).
3. Black, W. C., Duteau, N., Putetka, G., Nechols, J. and Pettorini, J. : Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA ploymorphisms in aphids. *Bull. Ent.* **82** : 151-159 (1992).
4. 蒲生卓磨 : 蠶品種の分化と類縁關係. *蠶絲科學と技術* **20**(2) : 54-57 (1981).
5. 蒲生卓磨 · 大塚雄 : 血液の蛋白質多型にもとづく蠶品種の系統發生學的 研究. *蠶試報* **28** : 15-50 (1980).
6. Gawel, N. and Bartlett, A. : Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.* **2** : 33-38 (1993).
7. Haymer, D. and McInnis, D. : Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome* **37** : 244-248 (1994).
8. 황재삼, 이진성, 강현아, 이상몽, 서동상 : RAPD-PCR을 이용한 누에 계통간 유연관계 분석. *한국유전학회지*. **17**(4) : 291-300 (1995).
9. 황재삼, 이진성, 강현아, 이상몽, 서동상. : RAPD-PCR 분석을 위한 기초연구. *한국잠사학회지*. **38**(1) 7-12 (1995).
10. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. and White, T. S. : Optimization of PCRs. In : PCR protocols, a guide to methods and application. Academic Press. Inc. San Diego : 3-20 (1990).
11. 桐村二郎 : 微生物定量法による絹蛋白質のアミノ酸組成および化學構造に關する研究. *蠶試報*, **17**, 447-522 (1962).
12. Kusuda, J., Tazima, Y., Onimaru, K., Ninaki, O. and Suzuki, Y. : The sequence around the 5, end of the fibroin gene from the wild silkmoth, *Bombyx mandarina* and comparison with that of the domesticated species, *B. mori*. *Mol. Gen. Genet.* **203** : 359-395 (1986).
13. 松村秀美 : 日本種, 支那種, 印度支那種及び歐羅巴種のアミラセ型の分析. *蠶試報*, **13** : 521-533 (1951).
14. Murakami, A., Imai, H. : Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (*Bombycidae*, *Lepidoptera*). *Chromosoma* **47** : 167-178 (1974).
15. Rohlf, F. J. : NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 1.50. Exeter. publ., NEW YORK (1989).
16. Suzuki Y. S., Takiya, T., Suzuki, C. C., Hui, K., Matsuno, M., Fukuta, T., Nagata, T. : Development transition of silk gene expression in the *Bombyx mori*. "in molecular insect science", Plenum press, New York, pp : 88-89 (1990).
17. Yoshitake, N. : Difference in the multiple forms of several enzymes between wild and domesticated silkworms. *Jpn. J. Genet.* **4** : 259-267 (1966).
18. 吉武成美 : 種々酸素型からみたクワコとカイコの類縁關係について. *遺傳雜* **41** : 259-267 (1966).
19. 吉武成美 : 家蠶日本種の起源に關する-考察. *日蠶雜* **37** : 83-87 (1968).
20. 吉武成美 : 家蠶生化學 1-19 (1984).