

PCR-RFLP를 이용한 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 미토콘드리아 DNA의 유전변이 연구

Study on the Genetic Variation of the Mitochondrial DNA in the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), Using PCR-RFLP

김용균 · 이명렬¹ · 정충렬
Yonggyun Kim, Myeong-Lyeol Lee¹ and Chungryul Chung

Abstract – Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of a DNA has been a useful tool for analyzing genetic variation. This research was performed to establish an RFLP analytic method on the mitochondrial DNA (mtDNA) of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). To do this, total size of the mtDNA was measured and polymerase chain reaction (PCR) primers were selected. Its mitochondrial genome size was ca. 16kb. From a serial PCR test of 29 primers referred to the compilation of Simon et al. (1994), 22 primers were selected to amplify its mtDNA fragments. These primers resulted in short (300~700 bp) or long (1000~2000 bp) DNA products which represented a total or partial sequence of each of CO-I, CO-II, Cyt-B, ND-1, 12S rRNA, 16S rRNA, and some tRNAs. PCR-RFLP was performed in some variable mtDNA regions with 8 kinds of 4bp recognizing restriction enzymes. Different populations from Andong, Kyungsan, and Sunchun did not show any restriction site polymorphisms but had some length variation in certain regions of mtDNA.

Key Words – *Spodoptera exigua*, Genetic variation, Mitochondrial DNA, PCR-RFLP

초 록 – DNA의 제한효소단편 다형현상 (RFLP)이 유전변이 연구에 널리 이용되고 있다. 본 연구는 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 RFLP방법을 개발하기 위해 게놈 크기 측정 및 PCR primer들을 선발하였다. 파밤나방의 mtDNA 전체크기는 약 16 Kb였다. 대부분 곤충 mtDNA에 적합하게 구성된 (Simon et al., 1994) 29개 primer들중 21개가 파밤나방의 mtDNA 증폭에 적합했다. 이들 primer들을 이용하여 여러 유전자 영역 (CO-I, CO-II, Cyt-B, ND-1, 12S rRNA, 16S rRNA 및 일부 tRNA)의 일부 또는 전체를 포함하는 유전자 절편을 증폭시켰다. 일반적으로 다형을 보이는 primer조합을 중심으로 4염기 제한부위를 인식하는 8종의 제한효소를 통해 분석된 PCR-RFLP는 서로 다른 지역 (안동, 경산, 순천) 집단들간에 제한부위에 있어서 차이가 없었으나 일부 영역에서는 길이 차이를 보여 유용한 유전지표로서의 가능성을 제시했다.

검색어 – 파밤나방, 유전변이, 미토콘드리아 DNA, PCR-RFLP

경북 안동시 송천동 388번지 안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부 곤충생리실 (Laboratory of Insect Physiology, School of Bioresource Sciences, College of Natural Sciences, Andong National University, Andong, Korea)

¹경기도 수원시 농업과학기술원 해외병해충과 (Oversea Pest Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea)

최근 분자유전학적 기술의 비약적인 발전으로 다양한 생물종에 대한 객관적이면서도 정밀한 비교를 가능하게 하는 여러 기술들이 축적되었다. 그 대표적인 것이 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)로서 일련의 DNA 사슬을 제한효소로 처리했을 때 생기는 DNA 단편들이 개체간의 유전적 조성의 차이 즉 염기서열상의 차이에 따라서 그 수나 길이가 서로 다르게 나타난다는 사실에 기초한 방법으로 집단 및 진화적 유전 연구, 형질개량연구의 유전적 식별, 유전자 분리 및 클로닝을 위한 표식 등 다양하게 이용되고 있다(Neale & Williams, 1991; Haymer, 1994).

모든 진핵생물의 세포내에 에너지 대사에 관여하는 세포내 소기관인 미토콘드리아는 핵DNA와는 독자적으로 자기복제 능력을 가지고 있으며 세포질에 존재한다. 이 미토콘드리아 DNA (mtDNA)는 작은 크기 때문에 1970년대 후반 DNA 염기서열 결정기술의 급속한 발전으로 가장 먼저 연구된 핵산 분자들 중의 하나이다. 특히 동물의 mtDNA는 보통 15 내지 20 Kb의 비교적 짧은 환상의 구조를 가지며 (Avisé *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987), 이 구조내에 13개의 단백질, 2개의 ribosomal RNAs, 22개의 transfer RNAs에 관한 유전정보를 가진다. 초파리류인 *Drosophila yakuba*의 mtDNA의 전체 염기서열이 밝혀져 있으며 (Clary & Wolstenholme, 1985), 이 외에도 *D. virilis* (Clary & Wolstenholme, 1987), *D. melanogaster* (de Bruijn, 1983; Satta *et al.*, 1987; Garesse, 1988), *Aedes albopictus* (HsuChen & Dubin, 1984; HsuChen *et al.*, 1984), *Apis mellifera* (Vlasak *et al.*, 1987), *Locusta migratoria* (McCracken *et al.*, 1987; Uhlenbusch *et al.*, 1987) 등의 염기 서열이 일부 밝혀져 있다. 비교적 매우 높은 A+T 염기 조성을 갖는 곤충의 mtDNA는 작은 크기로 인한 실험의 용이성, 세포내 많은 복제수가 존재, 세포질 유전자로서 생식세포를 만들 때 유전자 재조합이 일어나지 않는 대신 돌연변이가 일어날 확률이 핵 DNA에 비해 높은 특징들 때문에 집단 간 비교 연구에 많이 이용되고 있다 (Harrison, 1989; Simon, 1991; Wolstenholme, 1992). 특히 mtDNA의 부위별로 낮은 변이를 보이는 영역으로부터 비교적 변이가 높은 영역까지 보존성이 다양하여 비교하고자 하는 분류군의 차이 정도에 따라 선택된다 (Simon *et al.*, 1994).

탁월한 비행력으로 장거리 이동성 해충인 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))은 기주범위가 매우 넓으며 열대 및 아열대를 통해 전세계적으로 분포하고 있는 해충이다. 국내에서 이 해충이 최근 들어 농작물에 큰 피해를 주고 있다. 이 해충이 어디에서 유래되어 매년 개체군을 형성하는지에 대해 남방지역으로 부터의 장거리 이동 (고, 1993), 국내 월동가능성 (Kim & Kim, 1997) 등의 여러 가지 견해가 있다. 그러나 이러한 견해를 증

명하기 위해서는 우선적으로 집단의 특징적인 유전자표의 확보가 우선적이다.

본 연구에서는 파밤나방의 새로운 유전자표를 결정하기 위해 mtDNA의 크기 및 PCR-RFLP를 통한 각 유전자 부위별 증폭 가능성과 제한효소 단편 변이를 분석하였다.

재료 및 방법

시험 곤충

안동, 경산, 순천 및 의성의 파밤나방 집단들이 이용되었다. 안동집단은 안동시 송천동 파밭에서 채집한 파밤나방을 고 (1993)의 방법을 이용하여 인공사료로 실내에서 약 20세대 누대 사육된 집단이었다. 경산집단은 수원시 농촌진흥청 농업과학기술원 곤충과 사육실에서 약 25세대 누대 사육된 집단으로 경산근교 파밭에서 채집된 파밤나방의 실내 정착집단으로 규명된다. 순천과 의성집단들은 각각 순천시 및 의성 근교 파밭에서 채집한 야외집단들이었다.

mtDNA 추출

mtDNA를 초원심분리없이 분리하기 위해 일반 plasmid 분리방법을 변형시킨 Birnboim & Doly (1979)의 방법으로 분리하였다. 약 600 mg의 파밤나방사료를 같은 부피의 homogenizing buffer (250 mM sucrose, 10 mM EDTA, 30 mM Tris-Cl, pH 7.5)로 분쇄 후 원심분리 (1000 g)하여 상등액을 취했다. 미토콘드리아를 분리하기 위해 다시 12,000 g에서 원심분리한 후 침전액을 취하여 lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.0)로 녹였다. 이 용액에 2배 부피 (2×)의 0.2 M NaCl, 1% SDS를 첨가한 후 얼음에서 5분간 반응시켰다. 1.5× 부피의 3 M sodium acetate를 첨가 후 다시 5분간 얼음에서 반응시켰다. 이후 원심분리 (12,000 g)하여 상등액을 취한 후 phenol 추출 및 ethanol 침전으로 DNA를 수거했다 (Sambrook *et al.*, 1989). 제한효소 처리는 제조회사의 조건에 따라 반응조건을 맞춘 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 0.7% agarose 겔로 DNA 절편을 확인하였다.

PCR-RFLP

곤충 mtDNA 중 매우 보존적인 영역으로부터 Simon 등 (1994)에 의해 제시된 primers를 기준으로 29종의 primers에 의해 PCR 증폭을 시도하였다 (Table 1). PCR 반응용액은 완충액 (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris, pH 8.3) 50 µl에 최종농도 약 10~100 ng의 DNA 시료, 30 pmol sense & antisense primers, 10 µM의 dNTP 및 0.5 unit의 Taq polymerase로 구성되었다. PCR 반응은

Table 1. Primers tested for PCR of mitochondrial DNA fragments of *S. exigua*

# Primer	Location ¹	Sequence
1	C1-N-2191	5' CCTGGTAAAATTAAGATATAAACTTC 3' (26mer)
2	C1-N-2329	5' ACTGTAAATATATGATGTGCTCA 3' (23mer)
3	C1-J-2441	5' CCTACTGGAATTAATAATTTTTAGTTGATTAC 3' (32mer)
4	TM-J-206	5' GCTAAATAAGCTAACAGGTTTCAT 3' (23mer)
5	TM-J-748	5' ATGGAGGTTTAAACCAAAC 3' (20mer)
6	C1-J-1718	5' GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC 3' (26mer)
7	C1-J-1751	5' GGATCACCTGATATAGCATTCCC 3' (23mer)
8	TL2-N-3014	5' TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA 3' (25mer)
9	C2-J-3400	5' ATGGACATCAATGATATTGA 3' (21mer)
10	C2-N-3661	5' CCACAAATTTCTGAACATTGACC 3' (23mer)
11	C2-J-3696	5' GAAATTTGTGGAGCAAATCATAG 3' (23mer)
12	C3-N-5460	5' TCAACAAAGTGTCAGTATCA 3' (20mer)
13	N4-J-8944	5' GGAGCTTCAACATGAGCTTT 3' (20mer)
14	CB-N-10920	5' TCCTCAAATGATATTTGTCTCA 3' (24mer)
15	CB-J10933	5' TATGTTTTACCATGAGGACAAATATC 3' (26mer)
16	CB-N-11367	5' ATAACCTCCTAATTTATTAGGAAT 3' (26mer)
17	N1-N-11841	5' GGTACATTACCTCGGTTTCGTTATGAT 3' (27mer)
18	N1-J-12248	5' AAGCTAATCTAACTTCATAAG 3' (21mer)
19	LR-N-12866	5' ACATGATCTGAGTTCAAACCGG 3' (22mer)
20	LR-J-12945	5' GCGACCTCGATGTTGGATTAA 3' (21mer)
21	LR-N-13398	5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3' (20mer)
22	SR-N-14588	5' AAACCTAGGATTAGATACCCTATTAT (25mer)
23	C3-J-5014	5' TTATTTATTGCATCAGAAGT 3' (20mer)
24	SR-J-14233	5' AAGAGCGACGGGCGATGTGT 3' (20mer)
25	SR-N-14922	5' AAGTTTTATTTGGCTTA 3' (18mer)
26	SR-N-1091	5' AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT 3' (35mer)
27	SR-J-1478	5' TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT 3' (28mer)
28	LR-J-12884	5' CCGGTCTGAACTCAGATCA 3' (19mer)
29	LR-N-13399	5' GCCTGTTTACCAAAAACAT 3' (19mer)

¹ Primers are named by a trinomial method (gene - strand - 3' end) of Simon *et al.* (1994). All sequences and their locations of the genes are designed on the basis of the published *D. yakuba* sequence (Clary & Wolstenholme 1985). 'J' denotes the major strand to be transcribed and 'N' is the opposite minor strand.

Thermal Cycler (PTC-100, MJ Research Inc.)로 95°C에서 1분, 94°C에서 45초, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초씩 1과정 후 94°C에서 45초, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초씩 35과정을 거치며 72°C에서 7분동안 마지막 사슬연장시킨 후 종료되었다.

PCR product는 0.5 × TBE에서 1% agarose젤로 확인되었다. 제한효소처리는 8종의 제한효소 (*AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *MspI*, *NciI*, *RsaI*, *Sau3A*, *TaqI*)로 제조회사의 조건에 따라 반응조건을 맞춘 후 *TaqI*을 제외하고 모든 효소는 37°C에서 3시간 반응시켰고 *TaqI*은 65°C에서 반응시켰다. 제한효소 처리 후 0.5 × TBE에서 1.5% agarose젤로 DNA 절편을 확인하였다.

결 과

파밤나방 미토콘드리아 DNA의 전체 크기

일반 plasmid분리방법을 변형시킨 Birnboim & Doly (1979)의 방법으로 분리된 파밤나방의 미토콘드리아 DNA가 *BamHI*과 *HindIII*로 각각 처리된 후 0.8% agarose젤에서 분리되었다(Fig. 1). 제한효소로 처리되지 않은 시료에서 1개의 밴드만 보여 본 추출방법이 파밤나방의 미토콘드리아 DNA추출방법으로서 적합했음을 보였다. *HindIII*로 처리된 시료에서도 1개의 밴드가 약 16 kb 위치에서 보였고 처리되지 않은 DNA시료에 비해 차이를 두고 양(+)극쪽에 위치했다. *BamHI*으로 처리된 DNA시료는 3개의 밴드(16 Kb, 12 Kb, 4 Kb)를 보였다.

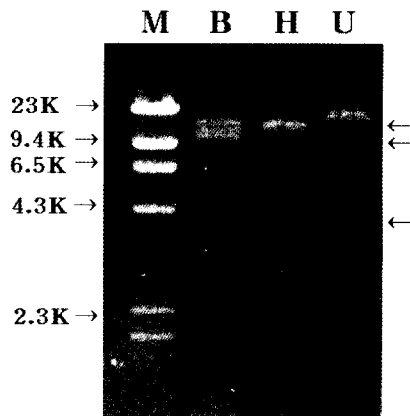


Fig. 1. Size of the mitochondrial DNA of *S. exigua* where M= λ *Hind* III marker, B=*Bam* HI-treated, H=*Hind* III-treated, and U=untreated mtDNAs. Twenty μ l of each digest was loaded on 0.7% agarose gel, stained with EtBr after electrophoresis, and photographed on UV light.

즉 2개의 제한효소자리를 두고 1개 위치에서만 잘린 조각과 2개 위치 전부에서 잘린 조각이 혼재했음을 보였다.

파밤나방 mtDNA의 PCR primers

곤충 mtDNA의 보존염기영역 (Simon *et al.*, 1994)을 기초로 제작된 primer들의 23조합이 파밤나방 mtDNA의 부분증폭을 위해 검증되었다 (Table 2). 300~700 bp의 비교적 짧은 조각을 형성하기 위한 primer조합들중 일부(SC10, SC12, SC13)를 제외하고 증폭되었다. 1000 bp 이상의 길이를 증폭시키려는 primer조합들 중에서도 일부(LC1, LC4, LC5, LC10)를 제외하고 증폭되었다. 다만 긴 조각의 증폭에서는 증폭반응에서 낮은 primer annealing 온도(48°C)를 이용하였기에 비특이적 결합에 의한 증폭이 많았다. 50°C의 primer annealing 온도에서는 이러한 비특이적 증폭물은 없어졌다. 증폭된 DNA 조각의 크기가 *D. yakuba*로 추정된 조각의 길이와 차이가 없었다($\chi^2=9.62$, $df=15$, $P=0.8428$). 이상의 결과로 29개 primer들 중에서 #4, #11, #12, #20, #23, #25, #26, #27을 제외한 21개 primer들이 파밤나방 mtDNA 증폭에 적합함을 나타냈다.

이들 primer들로부터 증폭된 mtDNA 영역을 이미 mtDNA의 전체 염기서열이 알려진 *D. yakuba*와 비교하여 볼 때 cytochrome oxidase I, tRNA-leucine, cytochrome oxidase II, cytochrome oxidase b, NADH dehydrogenase-1, 16S rRNA 및 12S rRNA 등의 유전자 전체 또는 일부영역을 포함했다 (Fig. 2).

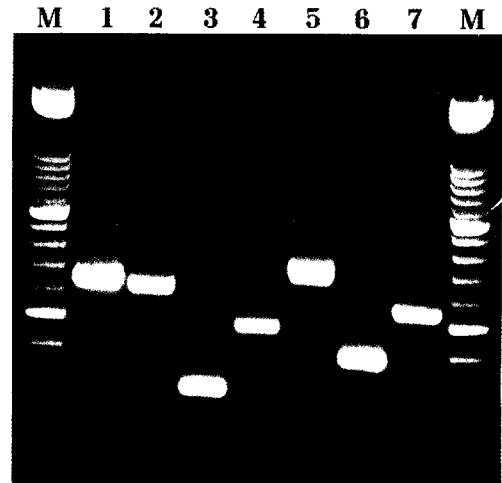


Fig. 2. PCR products amplified from seven different regions in mitochondrial DNA of *S. exigua*. Lane 1: CO-I (1693-2351), Lane 2: CO-I to tRNA^{leu} (2410-3038), Lane 3: CO-II (3380-3684), Lane 4: Cyt-B (10908-11392), Lane 5: ND1 to 16S rRNA (12227-12875), Lane 6: 12S rRNA (14214-14612), Lane 7: 16S rRNA (12866-13416), and M: size marker, 100bp ladder. Ten μ l of each product was loaded on 1.5% agarose gel, stained with EtBr after electrophoresis, and photographed on UV light. Figures in parentheses represent 5'-positions of primer used in this study, which are presumed on the published *D. yakuba* sequence (Clary & Wolstenholme 1985).

파밤나방 미토콘드리아 DNA의 PCR-RFLP분석

선발된 primer들을 중심으로 증폭된 DNA 조각들은 4염기 제한부위를 인식하는 8종의 제한효소 (*AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *MspI*, *NciI*, *RsaI*, *Sau3A*, *TaqI*)로 각각 절편을 만든 후 agarose젤상에서 밴드의 다형을 조사하였다 (Table 3).

분석된 파밤나방의 모든 mtDNA 영역에서 *Sau3A*가 가장 많은 제한부위를 가졌으며 *AluI*은 cytochrome oxidase에서만 제한부위를 가졌다. *HaeIII*와 *RsaI*은 어느 영역에서도 제한부위를 갖지 못했다. 어느 제한효소에서건 파밤나방 지역별 개체간에 다형현상을 보이지 못했다 (Fig. 3).

제한효소에 따른 제한부위의 다형현상은 없었지만 CO-I이 포함된 영역 (SC2, SC4, LC2, LC3)에서 개체별 길이의 차이가 agarose젤상에서 나타나 이들의 차이를 구분하기 위해 PCR product를 5% polyacrylamide 젤로 분리시켰다 (Fig. 4). 증폭된 영역이 같지만 일부의 개체들 (#1, #2, #12)은 5~10bp 정도 길이가 길게 나타났다.

Table 2. Primer combinations for PCR of mitochondrial DNA fragments of *S. exigua*

Primer - Primer ¹	Amplified region	Expected size (bp) of PCR product ²	Observed size (bp) of PCR product
SC1 (#6 - #1)	CO-I	523	530
SC2 (#6 - #2)	CO-I	658	660
SC3 (#7 - #1)	CO-I	487	500
SC4 (#7 - #2)	CO-I	622	630
SC5 (#3 - #8)	CO-I to tRNA ^{leu}	628	630
SC6 (#9 - #10)	CO-II	303	310
SC7 (#15 - #16)	Cyt-B	484	490
SC8 (#18 - #19)	ND1 to 16S rRNA	659	660
SC9 (#28 - #29)	16S rRNA	551	550
SC10 (#23 - #12)	CO-III	484	-3
SC11 (#24 - #22)	12S rRNA	398	400
SC12 (#24 - #25)	12S rRNA	725	-
SC13 (#26 - #27)	12S rRNA	326	-
LC1 (#4 - #1)	CO-I to tRNA ^{met}	2032	-
LC2 (#5 - #2)	CO-I to tRNA ^{met}	1622	1700
LC3 (#6 - #10)	CO-I to CO-II	1990	2000
LC4 (#9 - #12)	CO-II to CO-III	2099	-
LC5 (#11 - #12)	CO-II to CO-III	1805	-
LC6 (#13 - #14)	Cyt-B to ND4	2018	2100
LC7 (#15 - #17)	Cyt-B to ND-1	959	1000
LC8 (#15 - #19)	Cyt-B to 16S rRNA	1979	2000
LC9 (#18 - #21)	ND-1 to 16S rRNA	1189	1200
LC10 (#20 - #22)	16S to 12S rRNA	1687	-

¹ See each primer context in Table 1. 'SC' and 'LC' indicate short and long combinations, respectively, which are arbitrarily classified by the length of the amplified fragment.

² The sizes of each region are estimated on the basis of the published *D. yakuba* sequence (Clary & Wolstenholme 1985).

³ '-' represents absent PCR product.

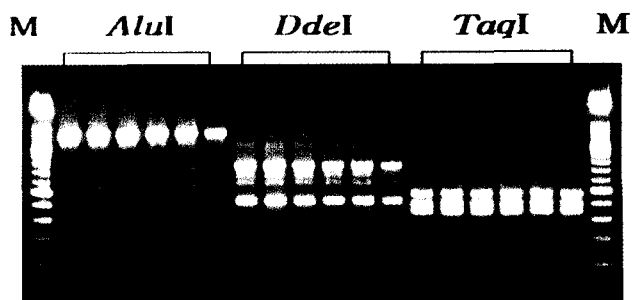


Fig. 3. Examples of restriction enzyme fragments cut from amplified DNA of the region between ND1 and 16S rRNA (12227-13417). Ten μ l of each product was loaded on 1.5% agarose gel, stained with EtBr after electrophoresis, and photographed on UV light. These fragments did not show any polymorphism. *S. exigua* samples from three localities (Kyungsan, Suncheon, and Euseong) were tested. First six lanes: *AluI* digested fragments, second six lanes: *DdeI*, and last six lanes: *TaqI*.



Fig. 4. Minute length polymorphisms in CO-I region amplified from mitochondrial DNAs of *S. exigua* collected from four localities. Lane 1: Euseong, Lane 2-4: Suncheon, Lane 5-10: Kyungsan, and Lane 11-14: Andong. M: size makers, 100bp ladder. Five μ l of PCR reaction solution was loaded on 5% polyacrylamide gel and stained with EtBr.

Table 3. PCR-RFLP of different regions of *S. exigua* mtDNA

Amplified region ¹	# of restriction sites								Polymorphic restriction enzymes
	<i>AluI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	<i>NciI</i>	<i>RsaI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>TaqI</i>	
CO-I (1693-2351)	>2	0	0	0	0	0	3	0	none
CO-I (1729-2351)	1	0	0	0	0	0	2	0	none
Cyt-B (10908-11392)	0	0	0	0	0	0	1	0	none
16S rRNA (12925-13417)	0	1	0	0	0	1	1	0	none
CO-I to CO-II (1693-3683)	>4	1	0	0	0	1	>4	0	none
ND-I to 16s rRNA (12228-13417)	0	2	0	1	0	>2	2	2	none

¹ Figures in parentheses represents 5'-position of primer used in this study on the published *D. yakuba* sequence (Clary & Wolstenholme, 1985).

고 찰

파밤나방 mtDNA 크기를 측정하기 위한 DNA추출방식은 종전의 CsCl구배에 따른 초원심분리방식 (Radloff *et al.*, 1967)을 따르지 않고 단순히 세포소기관 분리와 분리된 미토콘드리아에서 플라스미드의 DNA분리 방법을 복합시킨 것 (Birnboim & Doly, 1979; Peloquin *et al.*, 1993)으로 시간과 경비면에서 매우 효율적이었다. 그러나 DNA수거율이 낮아 전기영동상에서 충분히 뚜렷한 밴드를 보려면 5g 이상의 시료를 요구한다. 또 파밤나방의 발육시기 및 보존기간에 따라 수거되는 mtDNA 양에서 차이를 나타냈다.

이렇게 해서 얻어진 파밤나방의 mtDNA의 크기는 약 16 Kb로서 일반적 후생동물의 mtDNA 크기 (15~20 Kb)에 속한다고 볼 수 있다. 특히 이러한 mtDNA크기는 이 해충과 유사한 종으로 *S. frugiperda*의 크기 (16.3 Kb)와 유사하였다 (Ke & Pashley, 1992). 이 해충보다 좀 더 긴 mtDNA (18.5 Kb)를 갖는 *D. yakuba* (Clary & Wolstenholme, 1985)와 각 유전자 영역별 길이를 비교하여 보면 거의 차이를 보이지 않아 이들 종간 길이의 차이는 아마도 비암호영역에서 비롯될 것으로 사료된다. 일반적으로 동물의 mtDNA는 가능하면 최소한의 크기로 유지하려 한다 (Rand & Harrison, 1989). 그러나 일부 20 Kb 이상의 크기를 소유하고 있는 종들은 유전자 조절부위와 같은 비암호영역의 중복 또는 반복염기배열로 형성된다 (Moritz *et al.*, 1987).

단지 본 결과가 일반적인 곤충 mtDNA 제한효소 위치와 다른 점이 특히 *HindIII*에서 나타났다. 제한효소로 처리 후 나타난 절편수를 보면 *HindIII*의 경우 한 개의

제한부위를 나타낸 반면 다른 곤충들은 일반적으로 6개를 가져 훨씬 적은 숫자를 나타냈다. 이는 아마도 본 연구 결과가 소수 개체로부터 얻은 mtDNA 시료에 따른 변이로 여겨진다. *Heliothis virescens* (Roehrdanz *et al.*, 1994)의 mtDNA 경우 이 효소에 대해 2개의 제한부위를 보였고 같은 종의 초파리 경우 (DeSalle *et al.*, 1986) 이 효소에 대해 다양한 절편 양상 보이기도 했다.

파밤나방의 mtDNA의 부위별 PCR방법을 개발하기 위해 조사된 29개 primer들 중 21개가 선발되었다. 즉 파밤나방의 mtDNA 염기배열이 일반적인 곤충의 mtDNA 염기배열과 크게 다르지 않음을 의미하여 조사된 primer들 외에 Simon 등 (1994)이 제시한 곤충 mtDNA용 primers 중에서 더욱 많은 것들이 파밤나방 mtDNA 증폭을 위해 선발될 수 있음을 시사한다.

선발된 primer들은 17개의 primer 조합을 가능하게 했고 이들 조합중에서 일반적으로 다형을 보이는 조합을 중심으로 4염기 제한부위를 인식하는 8종의 제한효소를 통해 분석된 PCR-RFLP는 지역집단간 (안동, 경산, 순천 및 의성) 제한부위에 있어서 차이가 없음을 나타냈으나 일부 증폭부위에서는 절편의 길이 차이를 보여 유용한 유전지표로서의 가능성을 제시했다. 이러한 길이 차이를 보인 영역들중 CO-I이 포함된 영역에서 비교적 뚜렷하게 나타났다. mtDNA의 각 유전자가 개체의 생존에 주는 영향이 달라 자연히 도태압을 받는 정도는 다르기에 따라 mtDNA의 영역에 따라 염기변이를 가질 확률이 다르게 된다 (Simon *et al.*, 1994). rRNA나 tRNA 영역들에 대한 돌연변이가 생존에 미치는 영향은 일반적인 유전자의 돌연변이가 보다 커서 이들에 대한 돌연변이가 유지될 확률은 매우 적다. 자연히 이들 유전자에

대한 변이 정도는 분류군에서 보면 차이 정도가 큰 목간 수준 이상이 된다. 그러나 비교적 돌연변이의 효과가 개체의 생존에 크게 영향을 주지 않는 영역도 있어서 이들 부위에 대한 유전변이는 분류단계면에서 하위 분류군의 차이를 분석할 때 이용하게 된다. 이러한 하위 분류집단간의 분석에 많이 이용된 mtDNA의 영역중에 하나가 CO-I이다(Lunt *et al.* 1996). CO-I은 미토콘드리아의 내막에 위치한 막 단백질로서(Saraste, 1990) 주로 막 주변으로 나와있는 영역을 암호화하는 3'쪽 CO-I이 큰 변이를 보여 종내 변이를 연구하는데 이용되어 왔다(Lunt *et al.*, 1996).

파밤나방의 변이를 조사하려는 각 지역의 표본수와 파밤나방의 기주가 제한되어 있지만 제한효소부위에 따른 변이가 나타나지 않아서 국내 파밤나방집단의 동질성을 시사하고 있다. 물론 국내 뿐만 아니라 외국의 파밤나방을 포함하는 여러 집단의 비교와 mtDNA의 여러 유전자에 존재 가능한 RFLP에 대한 변이에 대한 탐색이 진행되어야 할 것이다. 이번 연구에서 나타난 mtDNA의 동질성은 국내의 파밤나방이 유전적 병목현상(bottle neck)에 의해 유전적으로 균일한 집단을 이룰 가능성을 보이고 있다. 즉 파밤나방의 이동성을 비추어 볼 때 미국의 지역별 *Heliothis virescens* 집단들의 경우에서 보듯(Roehrdanz *et al.*, 1994) 매년 새로운 집단이 일정지역으로부터 유입되어 새로운 국내 파밤나방집단을 형성한다고 여겨질 수 있다. 그러나 파밤나방의 내한성기작(Kim & Kim, 1997)을 감안할 때 국내 월동가능성을 배제할 수 없고 실제로 국내 시설재배지의 확대에 이들의 월동가능성은 더욱 높아 국내의 파밤나방 집단은 매년 이주하여 오는 집단과 국내 월동집단간에 혼재된 양상을 보일 가능성은 충분히 있다.

한편, 이 해충의 동위효소를 대상으로 한 유전변이 분석 결과(김과 김, 1998)는 집단내에 큰 유전다형현상을 나타냈다. 즉 국내 파밤나방 집단의 동질성 또는 이질성을 증명하기 위해서는 일반적으로 집단 변이가 가능성이 큰 유전지표를 이용하여 특히 국내 월동 가능성이 비교적 높은 지역의 파밤나방집단을 대상으로 유전분석이 이루어져야 한다.

사 사

이 연구를 수행하는 과정에서 실험곤충의 사육에 도움을 준 안동대학교 곤충생리실 실원인 송원혜, 이준익에게 감사드린다. 또 지역별 파밤나방의 생태유전적 배경을 설명하여 준 농업과학기술원 해외병해충과 이문홍 박사님께 감사드린다. 본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구사업(961-0603-025-1)의 연구비 지원으로 수행되었다.

인 용 문 헌

- Awise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb & N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489~522.
- Birnboim, H. & S. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513~1517.
- Clary, D.O. & D.R. Wolstenholme. 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22: 252~271.
- Clary, D.O. & D.R. Wolstenholme. 1987. *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequence in the A+T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. *J. Mol. Evol.* 25: 116~125.
- de Bruijn, M.H.L. 1983. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: a novel organization and genetic code. *Nature* 304: 234~241.
- DeSalle, R., L.V. Giddings & A.R. Templeton. 1986. Mitochondrial DNA variability in natural populations of Hawaiian *Drosophila*. I. Methods and levels of variability in *D. silvestris* and *D. heteroneura* populations. *Heredity* 56: 75~85.
- Garesse, R. 1988. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics* 118: 649~663.
- Harrison, R.G. 1989. Animal mtDNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4: 6~11.
- Haymer, D.S. 1994. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 717~722.
- HsuChen, C.-C. & D.T. Dubin. 1984. A cluster of four transfer RNA genes in mosquito mitochondrial DNA. *Biochem. Int.* 8: 385~391.
- HsuChen, C.-C., R.M. Kotin & D.T. Dubin. 1984. Sequences of the coding and flanking regions of the large ribosomal subunit RNA gene of mosquito mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 12: 7771~7785.
- Ke, L.D. & D.P. Pashley. 1992. Characterization of fall armyworm mitochondrial DNA (Lepidoptera : Noctuidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 21: 263~269.
- 김용균, 김경성. 1998. 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))의 동위효소 유전좌위 분석. *한울곤지*. 37: (인쇄중).
- Kim, Y. & N. Kim. 1997. Cold hardiness of *Spodoptera*

- exigua* (Lepidoptera : Noctuidae). Environ. Entomol. 26: 1117~1123.
- 고현관. 1993. 채소의 주요해충인 파밤나방의 생태학적 특성. 박사학위논문. 충북대학교.
- Lunt, D.H., D. -X. Zhang, J. M. Szymura & G. M. Hewitt. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Mol. Biol. 5: 153~165.
- McCracken, A., I. Uhlenbusch & G. Gellissen. 1987. Structure of the cloned *Locusta migratoria* mitochondrial genome: restriction mapping and sequence of its ND-1 (URF-1) gene. Curr. Genet. 11: 625~630.
- Moritz, C., T.E. Dowling & W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 269~292.
- Neale, D.B. & C.G. Williams. 1991. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. Can. J. For. Res. 21: 545~554.
- Peloquin, J.J., D.M. Bird & E.G. Platzer. 1993. Rapid mini-prep isolation of mitochondrial DNA from metacestodes, and free-living and parasitic nematodes. J. Parasitol. 79: 964~967.
- Radloff, R., W. Bauer & J. Vinograd. 1967. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57: 1514~1521.
- Rand, D.M. & R.G. Harrison. 1989. Molecular population genetics of mitochondrial DNA size variation in crickets. Genetics 121: 551~569.
- Roehrdanz, R.L., J.D. Lopez, J. Loera & D.E. Hendricks. 1994. Limited mitochondrial DNA polymorphism in North American populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera : Noctuidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 856~866.
- Sambrook, J.E., F. Fritsh & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Saraste, M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. Q. Rev. Biophys. 23: 331~366.
- Satta, Y., H. Ishiwa & S.I. Chigusa. 1987. Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. Mol. Biol. Evol. 4: 638~650.
- Simon, C. 1991. Molecular systematics at the species boundary: exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animal via direct sequencing from amplified DNA. Molecular Techniques in Taxonomy (Eds. Hewitt, G.M., A. W.B. Johnston & J.P.W. Young), pp. 33~71. Springer, Berlin.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu & P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 651~701.
- Uhlenbusch, I., A. McCracken & G. Gellissen. 1987. The gene for the large (16S) ribosomal RNA from the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. Curr. Genet. 11: 631~638.
- Vlasak, I., S. Burgschwaiger & G. Kreil. 1987. Nucleotide sequence of the large ribosomal RNA of honeybee mitochondria. Nucleic Acids Res. 15: 2388.
- Wolstenholme, D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. Int. Rev. Cytol. 141: 173~216.

(1997년 7월 4일 접수, 1998년 1월 15일 수리)