

누에 백란 계통의 유전적 특성구명을 위한 유전·생화적 연구

이은정·임봉화·김종길*·김삼은*·성수일
수원대학교 자연과학대학, *농촌진흥청 잠사곤충연구소

Genetical and Biochemical Studies on White Egg Strains of Silkworm, *Bombyx mori*

Eun Jung Lee, Bong Hag Lim, Jong Gill Kim*, Sam Eun Kim* and Su Il Seong

College of Natural sciences, The University of Suwon, Suwon, 445-743, Korea

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

ABSTRACT

To elucidate genetical and biochemical characters of the white egg strains preserved in National Sericultural and Entomology Research Institute(NSERI), RDA of Korea, the genetic segregation ratios in egg colours were investigated by crossing test, and egg pigment precursors were also analyzed by paper chromatography and UV-spectrophotometer scanning. The results obtained by crossing test between the white egg strains and normal one illustrated that the most of white egg strains showed typical segregation ratio of white egg-2(w-2), while maternal inheritance which can be seen in white egg-1(w-1) was not found in any white egg strains. Paper chromatographic analysis showed that egg extracts of all the white egg strains contained 3OH-kynurenine, while kynurenine which is known to exist in white egg-1(w-1) could not be detected at all. From the results of these experiments, it was found that all the white egg strains preserved in NSERI were classified as the white egg-2(w-2) strain.

Key words : Silkworm, *Bombyx mori*, 3OH-kynurenine, White egg, Paper chromatography

서 론

곤충의 피부, 눈, 알 등에서 발견되는 색소로는 carotenoids, tetrapyrroles(porphyrins), bile pigments, ommochromes, melanins, papiliochromes, pteridines, quinones 등이 알려져 있다(Kerkut *et al.*, 1985). 그 중 곤충의 난색과 관련된 색소는 ommochromes 계로서 이 색소계열에는 ommatins(xanthommatin, rhodommatin, ommatin D, acridiommatin 1 & 2, cinnabaric acid), ommins(ommin A), ommidins(ommidin, cryptommidin) 등이 있으며, 이러한 ommochromes 색소계 형성은 tryptophan에서 시작되는 일련의 아미노산 대사의 결과에 의해 이루어지는 것으로 보고 되고 있다(Bückmann, 1966).

누에의 난색 역시 ommochromes의 ommins 색소계열로 tryptophan → kynurenine → 3OH-kynurenine

→ ommochromes라는 일련의 아미노산 대사에 의해 색소가 형성된다. 이 아미노산 대사에는 각 반응 단계마다 고유의 효소가 관여하며 만약 이들 효소중 어느 하나라도 결여되면 반응이 정지되어 착색이 안되고 백란(w-1, w-2)과 같은 난색 돌연변이체가 나타나게 된다(Kikkawa, 1948).

현재 우리나라의 농촌진흥청 잠사곤충연구소에는 300종 이상의 누에품종이 매년 계대 사육되고 있으나 이들 누에 품종은 유전자 자원으로서의 중요성만 인식되고 있을 뿐 이들 품종의 특성에 대한 유전학적 기초연구는 동위 효소에 관한 일부 보고를 제외하면 극히 미진한 상태이다(성, 1994, 1995). 누에의 백란 역시 귀중한 누에 유전자 자원의 하나로서 현재 20여 백란 계통이 보존되고 있으나 아직 이들에 대한 정확한 유전학적 및 생화학적 특성은 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 20여 백란계통을 대상으로 교배실

험에 의한 난색의 분리비 검정과 아울러 누에알 추출물에 대한 paper chromatography 및 UV-spectrophotometer scanning 분석을 통하여 누에 백란계통에 대한 유전학적 및 생화학적 특성을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시 누에품종

농촌진흥청 잠사곤충연구소에서 1994년에 채종한 20여종의 백란계통과 Cre, S8Re 등의 난색 돌연변이체, 그리고 정상 착색란과 그의 미수정란을 사용하였다.

2. 난색 분리를 위한 교배 실험

N희백란을 포함한 8개 백란계통과 정상착색란(P50)과 교배하여 F_1 , F_2 를 얻고 이들로부터 난색의 분리비를 조사하였다. 교배는 백란(♀)×정상란(♂) 및 그의 역교배를 하여 난색의 모성유전 관계를 조사하였다.

3. 난색소 전구물질의 추출과 분석

1) 난색소 전구물질의 추출

난색소 전구물질은 일정량의 누에알을 80% ethanol로 마쇄하여 추출한 후 미량원심분리기로 1,500 rpm에서 3분간 원심하여 얻어진 상등액을 사용하였다(Seong & Park, 1973).

2) Paper chromatography

난색소 전구물질의 정성 분석은 paper chromatography로 하였으며, 전개용지는 Whatmann paper No. 1, 전개용매는 TBA(tert-Butanol : HOAC : D.W. = 3 : 1 : 1; HOAC, Acetic acid : D.W. = 15 : 85)를 이용하였다. 전개는 실온에서 하였으며, 전개시 난색소 전구 물질인 tryptophan, kynurenine, 3OH-kynurenine (이상 Sigma제)을 표준물질로 하여 동일 여과지상에서 시료와 함께 전개하였다.

전개후 암실에서 자외선등을 비추어 난색소 전구물질의 spot을 관찰하였으며, 이때 spot의 크기와 색의 농도에 따라 -, ±, +, ++, +++ 등으로 색소물질의 상대적 농도를 표시 하였다.

3) 자외선 분광광도계 scanning에 의한 난색소 전구물질의 정량분석

Paper chromatography에서 사용한 난색소 전구물질 추출 시료액을 흡광범위 190 nm~600 nm에서 UV-spectrophotometer(HITACHI U-2000, Hitachi Corp., Japan)를 이용하여 scanning하고 얻어진 흡광 곡선을 통해 이들 물질에 대한 정량 분석을 하였다.

결과 및 고찰

1. 교배 실험에 의한 난색 분리비 조사

N희백란을 포함한 8개 백란 계통과 정상착색란(P50) 계통간의 교배에 의한 F_1 , F_2 의 결과는 표 1과 같다.

백란(♀)×정상란(♂) 및 그의 정역교배로부터 얻어진 F_1 의 난색은 조사된 모든 백란 계통에서 P50 고유의 정상란색이었고, 제1백란(w-1)의 유전양식에서 볼 수 있는 중간색은 나타나지 않았다. F_2 에서의 난색 조사는 3 나방분의 잠란을 계수하였는데, 표 1에서와 같이 Combodue 계통을 제외한 모든 백란 계통에서 정상란과 백란이 3:1($x^2 < 2.14$)로 분리되는 전형적인 멘델의 분리비를 보임으로써 조사된 이들 백란은 모두 제2백란(w-2) 계통임이 확인되었다.

그러나 Combodue 계통은 F_2 에서 이들 백란들과는 상이한 분리비를 나타냈다. 즉, F_2 에서 P50의 정상란과 Combodue의 연등자색외에 양친에는 없는 백란이 출현하였다. 그리고 이들 정상 착색:연등자색:백색이 1:2:1의 분리비($x^2 < 1.26$)를 나타냈고, 이러한 결과는 정역교배의 분리비에서도 동일하였다. Combodue계통에서의 이러한 난색 분리비는 단순한 멘델의 분리비를 나타내는 제2백란(w-2)은 물론, 모성유전을 보이는 제1백란(w-1), 제1갈란(b-1) 및 제2갈란(b-2)의 유전 양식과도 상이하여(Kikkawa, 1948), 앞으로 Combodue계통에서의 난색 분리비에 대한 유전학적 검토가 과제로 남고 있다.

2. 난색 색소 전구물질의 paper chromatography 분석

일정량의 누에알을 80% ethanol로 추출하고, 그의 원심 상등액을 paper chromatography로 분석한 후, 암실에서 UV-lamp로 분리된 물질을 확인하였다. 미수정란, 정상착색란 및 공시 백란계통의 시료들로부터 상이한 Rf값과 함께 각각 다른 형광색소에 의해 구별되는 3개의 spot이 검출되었으며, 이들 시료들과 동시에 전개된 tryptophan, kynurenine, 3OH-kynurenine 등의 표준물질과의 비교에 의해 3개의 spot중 Rf 0.52 물질이 3OH-kynurenine인 것으로 확인되었다(그림 1).

분석 결과, 공시된 전체 백란계통과 미수정란으로부터 3OH-kynurenine이 공통으로 검출되었으나 kynurenine은 어느 백란구에서도 검출되지 않았다. 한편 정상 착색란과 Cre, S8Re 착색란에서는 3OH-kynurenine이 검출되지 않거나 흔적적으로 검출되었다(표 2). 이러한 잠란 추출물 검출 결과를 통해, 조사된 전체 백란계통에서 tryptophan → kynurenine →

Table 1. Segregated ratio of egg colours from hybrids between white egg strains and normal one(P50).

White egg strains	Generation	Crossing	Egg colours			χ^2
			Normal	White egg	Light brown	
C Heebaekran	F1		○			
	F2	C Hee × P50	1,493	524		1.03
		P50 × C Hee	1,597	584		1.93
N Heebaekran	F1		○			
	F2	N Hee × P50	1,431	512		1.36
		P50 × N Hee	1,451	472		0.47
Q Heebaekran	F1		○			
	F2	Q Hee × P50	1,414	472		0.05
		P50 × Q Hee	1,419	453		0.27
O9C	F1		○			
	F2	O9C × P50	1,444	511		1.15
		P50 × O9C	1,487	561		2.50
O9Q	F1		○			
	F2	O9Q × P50	1,652	609		2.14
		P50 × O9Q	1,785	551		1.58
N71	F1		○			
	F2	N71 × P50	1,631	544		0.01
		P50 × N71	1,516	504		0.05
E9	F1		○			
	F2	E9 × P50	1,745	575		0.24
Combodue	F1		○			
	F2	Comb × P50	497	524	1,055	1.26
		P50 × Comb	454	479	927	0.69

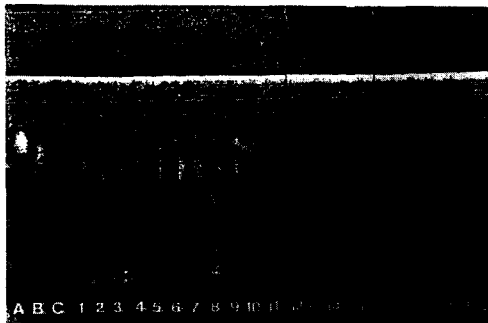


Fig. 1. Paper chromatogram of silkworm egg extracts A, Tryptophan; B, Kynurenine; C, 3OH-kynurenine; 1, unfertilized egg; 2, C, Heebaekran; 3, N Heebaekran; 4, F9; 5, 123E; 6, N71; 7, γ W; 9, 124×F; 10, E9; 11, O8N; 12, Sk-1; 13, H43; 14, Damheukjam; 15, Yzepera; 16, Combodue; 17, O9Q; 18, O9C; 19, Q Heebaekran; 20, Cre; 21, S8Re; 22, fertilized egg.

3OH-kynurenine까지의 반응은 정상으로 진행되었으나 마지막 3OH-kynurenine → ommochrome의 단계에서 필요한 효소의 결여로 인해 반응이 정지되고, 결국 3OH-kynurenine의 축적과 함께 색소형성은 더 이상 진전되지 않고 있음을 알 수 있었다. 본 연구의 난색 전구체 분석에는 교배실험에서 공시한 백란 계통 8품종 외에 10품종이 추가로 조사되었는데 조사된 전체 백란계통에서 동일한 결과를 나타냄으로써, 현재 우리나라에 보존중인 백란계통은 모두 제2백란(w-2) 계통인 것으로 확인되었다.

Cre, S8Re는 자주색을 나타내는 누에의 난색형질로는 다소 독특한 계통이라고 할 수 있는데, 이들 계통에서는 3OH-kynurenine이 전혀 검출되고 있지 않음으로써 이들 계통 역시 3OH-kynurenine 이후 ommochromes 색소 형성까지는 정상란과 동일한 색소형성 반응이 이루어지나, 최종 ommochromes 색소 형성

Table 2. Distributions of relative amounts in egg pigment precursors among silkworm strains analyzed by paper chromatography.

No	Strains	Egg colours	Precursors of silkworm egg				
			Tryptophan	Kynurenine	30H · Kynurenine	Unknown	
						Rf 0.29	Rf 0.13
1	Unfertilized	Light yellow	-	-	+++	-	±
2	C Heebaekran	Light yellow	-	-	+++	++	+++
3	N Heebaekran	Light orange	-	-	+++	++	+
4	F9	Light orange	-	-	+++	+++	+++
5	123E	Yellow	-	-	+++	++	+++
6	N71	Light yellow	-	-	+++	++	+
7	B	Light yellow	-	-	+++	+	++
8	yw	Yellow	-	-	+++	++	+++
9	124×F	Light orange	-	-	+++	++	+++
10	E9	Yellow	-	-	+++	+++	+++
11	O8N	Light orange	-	-	+++	+++	+++
12	Sk-1	Orange	-	-	+++	+	++
13	N43	Light range	-	-	+++	++	-
14	Damheukjan	Orange	-	-	+++	+	++
15	Yzepere	Orange	-	-	+++	+	+
16	Combodue	Light brown	-	-	+++	++	±
17	O9Q	Light orange	-	-	++	++	-
18	O9C	Yellow	-	-	++	+++	+++
19	Q Heebaekran	Light orange	-	-	+	+	-
20	Cre	Light purplish red	-	-	-	++	+
21	S8Re	Dark purplish red	-	-	-	+	+
22	Normal	Normal	-	-	±	++	±

과정에서의 색소물질 차이에 의해 이 계통고유의 난색이 완성되어지는 것으로 생각되어진다.

한편, 교배 실험에 의한 난색분리비 결과, Combodue계통은 특이하게 F₂에서 양친에는 없는 연등자색란이 나타나 정상착색:연등자색:백색이 1:2:1으로 분리된 바 있다(표 3). 이 F₂에 분리된 각각의 난색별 ethanol추출물을 paper chromatography로 분석해 본 결과, 예상대로 정상 착색란에서는 3OH-kynurenine이 검출되지 않았고 연등자색란과 백색란에서는 다량의 3OH-kynurenine 성분이 검출되었으며 그 함량도 백색란에서 더욱 많게 나타났다. 연등자색란의 경우, 일부의 3OH-kynurenine이 ommochromes으로의 색소형성에 참여하였을 가능성은 쉽

게 생각할 수 있으나, 다량의 3OH-kynurenine을 함유하고 있는 백색란의 갑작스런 출현에 대해서는 현재 명확한 해석이 불가능하다. 앞으로 Combodue 계통의 독특한 유전자양식의 해명을 위한 보다 정밀하고도 종합적인 유전 생화학적 검토가 필요한 것으로 생각된다.

3. 누에알 색소 전구물질의 자외선 분광광도계 scanning 분석

누에알 색소 전구물질에 대한 paper chromatography 분석은 여과지상에 적하되는 시료량을 동일하게 조절할 수 없는 기술상의 문제로 인해 엄밀한 의미에서는 정량적이라 할 수 없다. 또한 paper chromatography 상에서 검출된 3개 성분 이외의 다른 미동정 성분도 함유되어 있을 것으로 생각되어 누에알의 ethanol 추출물을 자외선 분광광도계의 scanning 분석을 실시하였다.

그림 2는 190 nm 에서 600 nm 까지의 scanning 분석에 의해 나타난 흡광곡선으로 peak는 처음의 기대와는 달리 260 nm와 370 nm를 전후한 2개의 peak만이 인정되었다. 그리고 누에알 색소전구체의 표준물

Table 3. Analysis of 3OH-kynurenine in normal, light brown and white eggs segregated from F₂ between combodue and P50.

F2 (Comb × P50)	Egg colours		
	Normal	Light brwn	White
30H · Kynurenine	±	+++	++++

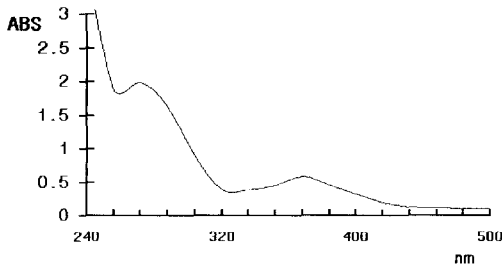


Fig. 2. Optical curve of silkworm egg ethanol extracts observed by UV-spectrophotometer scanning.

질인 tryptophan, kynurenine, 3OH-kynurenine을 사용하여 이들 peak 성분을 동정한 결과, 370 nm의 peak가 3OH-kynurenine임이 확인되었다. 한편, 260 nm 부근의 peak는 tryptophan의 최대흡광도와 거의 유사하였으나 어떠한 물질인지는 동정되지 않았다.

앞에서의 paper chromatography 분석과는 달리 자외선 분광광도계의 scanning 분석에 의해 각 난색 계통별 3OH-kynurenine의 함유량을 보다 정밀하게 비교할 수 있었다. 즉, 정상란 및 Cre, S8Re 등 착색란 계통은 370 nm에서의 peak가 극히 완만한데 비하여 백란계통은 뚜렷한 peak를 보였으며, 뿐만 아니라 백란 계통간에도 peak의 높이에 차이를 나타내어 각각의 백란 계통이 함유하고 있는 3OH-kynurenine의 함

량상에 일정한 차이가 있음을 알 수 있었다. 이와 같이 조사된 전체 백란계통별 370 nm에서의 최대흡광도 값은 계통에 따라서는 최고 2배까지의 차이도 나타났다(표 4). 그러나 백란 계통간의 이러한 3OH-kynurenine의 함량이 실제 백란의 색상, 즉 색의 밝기, 착색정도 등에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 뚜렷한 결론을 얻지 못하였다. 한편 270 nm를 전후하여 얻어진 흡광 peak의 형태는 누에 계통에 따라 일정하지가 않고, 대략 그림 3와 같은 3가지 유형을 보이고 있었다. 표준물질에 의한 조사에 의해 270 nm 부근에서는 tryptophan이 최대 흡광도를 나타내고 있으나, 앞의 paper chromatography에서 tryptophan은 전혀 검출된 바 없으므로, 이들 peak가 tryptophan을 함유하고 있을 가능성은 희박하며 따라서 현재로서는 물질확인은 안된 상태이다. 다만 이들 peak의 유형이 난색의 착색정도 즉, 백란의 밝기 및 착색여부 등과 일정한 관련성을 갖는 경향을 보여 주목되고 있다. 즉, 뚜렷한 peak를 갖는 계통은 밝은 백란을 보이는데 비해 이 peak가 완만한거나 혹은 거의 peak의 형태가 안보일 수록 굴색에 가까운 어두운 백란 및 착색란을 보이고 있었다. 270 nm peak 정도와 난색의 색상과의 관련성을 밝히기 위해서는 무엇보다도 이 peak가 어떤 물질인지 그의 동정이 먼저 해결되어야 할 과제로 생각된다.

Table 4. Optical density of egg extracts by ethanol in 370 nm observed by UV-spectrophotometer scanning.

No.	Strains	Egg colours	O.D. in 370 nm
1	Cre	Light purplish red	0.179
2	S8Re	Dark purplish red	0.212
3	Q Heebaekran	Light orange	0.280
4	N Heebaekran	Light orange	0.296
5	Sk-1	Orange	0.314
6	Normal	Normal	0.337
7	O9Q	Light orange	0.346
8	Yzepere	Orange	0.356
9	B	Light yellow	0.358
10	Combodue	Light brown	0.362
11	N71	Light yellow	0.390
12	124×F	Light orange	0.418
13	N43	Light orange	0.427
14	Damheukjam	Orange	0.427
15	F9	Light orange	0.439
16	Unfertilized	Light yellow	0.446
17	O9C	Yellow	0.461
18	yw	Yellow	0.470
19	123E	Yellow	0.475
20	E9	Yellow	0.491
21	C Heebaekran	Light yellow	0.510
22	O8N	Light orange	0.576

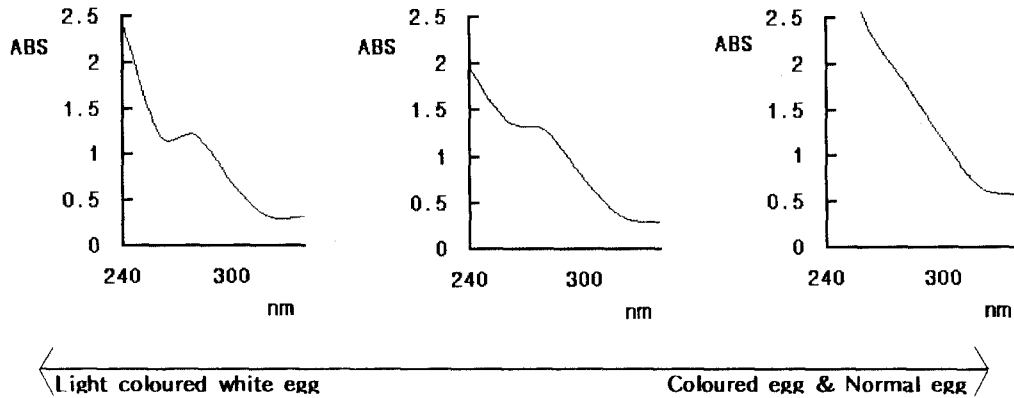


Fig. 3. Three types of optical curve of egg ethanol extracts near 270 nm range observed by UV-spectrophotometer scanning.

적 요

인용문헌

한국 잠사곤충연구소에 보존되어 있는 백란 계통의 유전적 특성을 구명하기 위해, 교배실험에 의한 난색 분리비 조사와 함께 누에알의 ethanol 추출물로부터 색소진구물질을 paper chromatography 및 자외선 분광광도계의 scanning으로 분석하였다.

백란 계통들과 정상란 계통과의 교배 실험결과, Comboduc를 제외한 대부분의 백란 계통이 전형적인 제2백란의 분리비를 보였으며, 모성유전으로 알려진 제1백란 계통은 발견되지 않았다. Paper chromatography에 의한 색소 진구물질의 분석 결과에서도 전체 백란계통에서 3OH-kynurenine이 검출되었고, 제1백란에 축적되어 있는 것으로 알려진 kynurenine은 검출되지 않음으로서 난색의 분리비 실험과 동일한 결과를 나타냈다.

이상의 실험의 결과, 현재 잠사곤충연구소에 계대 보존 중인 백란계통은 Comboduc를 제외하고 모두 제2백란 계통임이 확인되었다.

Bückmann, D., A. Willig and B. Linzen (1966) Veränderungen der h molymph vor der verpuppung von cerura vinula L. : Der gehalt an eiwei ß, aminos uren, ommochron-vorstufen und ommochromen. Z. Naturf. 21B : 1184-1195.

Kerkut, G. A. & L. I. Gilbert (1985) Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. Vol. 10 : pp. 367-415. Pergamon Press, Sydney.

Kikkawa, H. (1948) On pigments relating to tryptophan metabolism in insects. Adv. Biol. Jap., 3:36-70. (j)

Seong, S. I and K. E. Park (1973) Changes in free amino acids of the diapause eggs of *Bombyx mori*. J. Sericult, Sci. Japan, 42 : 340-345.

성수일 (1994) 누에의 품종 분류를 위한 동위효소의 다형성조사. 수원대. 기초과학논문집, 제3집 : 23-138.

성수일 (1995) 동위효소 다형특성에 의한 누에 품종의 유연관계. 수원대. 기초과학논문집, 제4집 : 151-170.