

동위효소 및 RAPD분석에 의한 한국재래종 누에계통의 계통학적 특성

이재만 · 노시갑
경북대학교 농업생명과학대학

Phylogenetic Relationships and Characterization of Korean Native Silkworm Strains Based on RAPDs and Isozyme Analysis, *Bombyx mori*

Jae Man Lee and Si-Kab Nho

Kyungpook National University, College of Agriculture and Life Science

ABSTRACT

This study was conducted to elucidate phylogenetic relationships and genetic characterization of silkworms that might be recognized as the Korean native strains. Genetic characterization in isozymes and the proteins of larval hemolymph of 17 silkworms were observed by acrylamide gel electrophoresis, on 12 genes; *Bph*, *Bes*, *Ies*, *Amy-hc*, *Ict-A*, *-B*, *-D*, *-E*, *-H*, *Pfl*, *Pst*, *Lp*. Gene frequencies in each locus were compared other geographic strains. Korean native strains were remarkably different from others considered as the genetic characterization of Korean native strains. Phylogenetic relationships in Korean native strains were analysed using RAPD-PCR markers. A total of 40 primers were used and 346 bands of amplified DNA were generated from geographic strains. Genetic similarity based on the RAPD bands was used to construct phylogenetic dendrogram based on analysis of band sharing data of amplified markers. Genetic similarity ranged from 0.595 to 0.860. In the genetic relationship based on dendrogram, they were classified into *Bombyx mori* group (including 16 domesticated silkworm strains) and *B. mandarina* group. The *Bombyx mori* group was separated into three sub-groups at the genetic similarity of 0.6930, including Korean, Japanese and Chinese groups. According to this result, the Korean native variety can be considered as a clearly different variety from other geographic strains. It may be concluded that the Korean native strains are also one of original geographic variety such as Japanese, Chinese, etc.

Key words : Korean native silkworm strains, Phylogenetic relationship, Genetic characterization, Isozyme, RAPD

서 론

집누에나방(*Bombyx mori*)은 최초 원산지를 중심으로 서식하고 있던 것이 오랜 기간동안 인위적 혹은 자연적 요인에 의해 각 지역으로 전파되어 고정되면서 오늘에 이르렀을 것이다. 이 과정에서 자연발생적이거나 혹은 인위적인 선발과 도태에 의해 중국종, 일본종, 유럽종 및 열대종과 같은 지리적 계통으로 고정되고 품종화된 것으로 생각되고 있다(吉武, 1984). 지리적 특징에 의해 분류되는 집누에의 계통 중에는 오늘날까지 '한국종'에 대한 언급은 거의 없으며, 국내 학자들조차도 지리적 특성에 의한 계통분류에서 한국종계통을 하나의 원종계통으로 인정할 경우가 거의 없었다.

吉武(1968)는 지리적 품종 분화에 대한 연구에서 한국종에 대하여 언급하였는데, 한국종은 대부분이 3면성(眠性)이며 1화성(化性)적 성질이 강하다고 하였다. 또한 한

국종은 중국종 1화성에 속하는 3면잡 계통으로부터 분화된 것으로 추측하였다. 지금까지 한국종 계통에 대해서는 이러한 단편적 사실만 알려져 있을 뿐 체계적인 연구는 대단히 미흡한 실정이었다. 이같은 사실은 현존하는 한국종계통의 품종수가 매우 적을 뿐만 아니라 국내에 보존되고 있는 한국종은 소수에 불과한 실정이므로 한 개의 지리적 원종계통으로는 인정하기 어려운 점도 있었을 것으로 생각된다.

이에 본 대학 곤충유전자원 연구실에서는 한국종이라고 추측되는 모든 품종들을 국내·외로부터 수집하여 기본적인 품종의 성장과 형질 특성에 대하여 조사하였다. 노·이(2000)는 한국종계통으로 추측되는 보존품종 중에서 국내에 보존된 5개 품종과 국외(일본)에 보존된 6개 품종에 대해서 조사하였다. 그 결과 한국종계통의 품종적 특성을 명확히 하였으며 타 지역종계통과 상당한 차이점이 있다는 것을 보고하였다. 그러나 대부분의 유전형질들은 복수

의 유전자들에 의한 복합적인 지배를 받을 뿐 만 아니라 그 발현 또한 복잡하고 때로는 환경에 의한 영향도 크기 때문에 단순히 표현적 형질 만으로 계통간의 유연관계나 품종 특성을 확정하는 것은 대단히 어려운 일이다. 이러한 복합적인 이유에 의해 계통이나 품종간의 유연관계 해석에는 계통분류학적 방법이나 각종 단백질유전자의 다형 현상 및 동위효소 유전자에 대한 분석등이 활발히 이용 되어왔다. 특히 최근에는 RFLP(Restriction fragment length polymorphism)나 RAPD(random amplified polymorphic DNA)와 같은 Genomic DNA의 다형분석법도 적극 활용 되고 있다.

동위효소의 분석은 사용되는 유전자의 수가 제한되고 시간과 비용이 많이 든다는 단점이 있으나, 객관성과 정확성이 높아 종의 구분이 애매할 때나 혹은 속(屬)내 종(種)들 간의 유연관계를 따지는 등의 특별한 경우에 매우 유용하다. 또한 유전자적 형질이 일정하여 연령이나 성에 따른 특수한 변이가 나타나지 않는 점을 장점으로 들 수 있다(金, 1997). RAPD 다형분석은 사용되는 primer에 따라 상이한 결과가 나올 수도 있지만, 특정 DNA부위에서 PCR에 의해 증폭된 단편들의 다형성을 이용하여 근친 계통간에도 유연관계를 객관적이고 정확하게 규명할 수 있으며, 다른 분자생물학적 방법에 비해 시간과 비용이 경제적인 장점이 있다(Haymer and McInnis, 1994; Gawel and Barelett, 1993; Chapco *et al.*, 1992).

본 연구는 현존하는 한국종 누에계통들에 대하여 표현 형질적 특성분석에 이어 분자생물학적 연구방법을 이용하여 지리적 원종계통으로서의 한국재래종 누에품종의 특성과 그 가치를 재확인하였다.

재료 및 방법

1. 공시누에계통

본 연구에 사용된 계통은 본 대학 보존품종 및 국내 · 외의 관련기관으로부터 수집한 한국종(9품종), 만주재래종(3품종), 일본종(3품종) 및 중국종(2품종) 등 17개 집누에

Table 1. List of silkworm strains

계통번호	계통명	계통번호	계통명
k30	고려삼면 (高麗三眠)	kl20	조선재래암 (朝鮮在來暗)
k301	한삼면(韓三眠)	kc11	만주재래황 (滿洲在來黃)
k302	삼면잠(三眠蚕)	kp56	만주재래백 (滿洲在來白)
k303	삼면홍회백 (三眠紅灰白)	jp20	적숙(赤熟)
j300	조선삼면 (朝鮮三眠)	jp22	일본금(日本錦)
j301	한삼면(韓三眠)	j101	지101(支101)
j304	선삼호(鮮三號)	j108	지108(支108)
kd18	조선녹견 (朝鮮綠繭)	kb31	금잠(錦蚕)
ki20	서천(西川)	<i>B. mandarina</i>	경남 · 진주

품종과 경남 진주지역에서 채집한 멧누에를 사용하였다. 각 계통과 품종에 대한 고유 품종명과 본 연구실에서 지정한 계통번호를 표1에 나타냈다. 사육은 표준 관행 사육법에 준하였으며 전령 상염육으로 하였다.

2. 동위효소 유전자분석

가. 시료 조제

5령 4~5일째의 누에유충으로부터 체액과 피부 등을 채취하였다. 체액은 배발을 소독 핀으로 찢러 원심투브에 채취하여 혈구 등을 spin down한 후 시료로 사용하였으며, 피부는 피부무게의 약 2배량의 Tris-glycine buffer를 가해서 homogenize한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상청액을 시료로 사용하였다.

나. Native-PAGE

6.5% polyacrylamide gel을 지지체로, Tris-glycine 용액을 전기영동용 buffer로 사용한 Slab gel 전기영동을 실시하였다. 영동 후 동위효소유전자에 따라서 기질과 발색제를 사용하였으며, 체액단백질인 경우에는 0.1% C.B.B(R-

Table 2. Summary of substrate and staining systems for detection of isozymes

Isozymes	Substrate	Staining Reagents
Blood acid phosphatase (<i>Bph</i>)	1-Naphthylphosphoric Acid	Fast Blue B
Blood & Integument esterase (<i>Bes, Ies</i>)	α-Naphthyl acetate	Fast Blue RR
Chymotrypsin inhibitor (<i>Ict</i>)	N-Acethyl-OL-Phenyl Alanine β-Naphtyl Ester NN'-Diemethyl formamide	Fast Blue BN
Amylase (<i>Amy-hc</i>)	Starch	Iodine Potassium iodine
Haemolymph (<i>Lp, Pst, Pfl</i>)		C.B.B

250)로 염색하였다(Table 2). 본 실험에 사용된 모든 계통은 암·수 관계없이 각 30두씩 분석에 사용하였다.

3. RAPD 다형분석

가. Genomic DNA 추출

5령 3일째의 누에 유충으로부터 견사선을 채취하여 액체질소에 동결한 것을 마쇄한 후, DNA추출용 buffer(1 M Tris-HCl(pH 8.0), 0.5 M EDTA(4Na) (pH 8.0), 10% SDS, Proteinase K(10 mg/ml)을 첨가하여 37°C에서 3시간 incubation하였다. Phenol 처리를 2회 한 후에 100% ethanol로 DNA를 침전시켰다. 침전부를 적당량의 D.D.W에 녹여 RNase A를 처리하여 37°C에서 1시간 incubation하였다. Phenol/chloroform을 2회 이상 처리하여 ethanol로 침전 건조 시킨 후, TE buffer(10 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0))에 녹여 PCR 반응의 주형 DNA로 사용하였다.

나. Primer와 PCR 반응

PCR 반응에 사용한 oligonucleotide primer는 Operon사의 random primer를 사용하였다. 최초 약 200개의 primer를 사용하여 시료계통에서 다형현상을 확인하는 primer screening를 실시하여 최적의 primer 20개를 선발하였다(Table 3).

PCR 반응액의 조성은 DNA 100 ng, 0.3 mM dNTP, 1 × buffer(50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3), 4 unit Taq poly-

merase, 0.25 mM primer로 하였으며, PCR 반응은 denaturation(94°C 60초), annealing(40°C 60초), extension(72°C 90초)를 1 cycle로 하여 45 cycle을 행하였다. 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 자외선 램프하에서 사진촬영을 하였다.

다. 유연관계 분석

RAPD분석의 결과는 NTSYS(Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) computer program의 UPGMA(Unweighed Pair-Group with Arithmetic average)법 (Rohlf, 1989)으로 하였으며 그 결과에 의해 계통수를 작성하고 계통간의 유연관계를 해석하였다.

결 과

1. 동위효소 유전자 분석

한국종, 만주재래종, 일본종 및 중국종 등 17개 품종에 대하여 체액산성 phosphatase(*Bph*), 체액 및 피부 esterase(*Bes*, *Ies*), Chymotrypsin Inhibitor protein(*Ict-A, B, D, E, H*), 체액 amylase(*Amy-hc*), 저분자 lipoprotein(*Lp*), 유충형 자특이단백질(*Pfl*), 저장단백질(*Pst*)등 8종 12개의 동위효소 유전자군에 대한 분석을 실시하였으며 그 결과를 표 4에 나타냈다(Table 4). 즉 '한삼면'(j301)의 경우는 *Bph* 유전자형이 모두 A형으로 검출되었으므로 A형의 빈도를 1로 하였고, '선3호'(j304)의 경우는 *Bph* 유전자형의 B형과 O형이 각각 0.62와 0.38의 빈도로 검출된 것을 나타낸 것이다. 이상의 빈도분석 결과를 종합하여 각 계통에서 특징적으로 발현되는 유전자형을 모식적으로 정리한 것이 그림 1이다. 실험에 사용된 모든 계통에서 *Ict-A* 유전자는 F형, *Ict-B* 유전자는 n형, *Pst* 유전자는 α형으로 모두 동일한 유전자형이 검출이 되었으므로 이 세 가지 유전자에 대해서는 정리를 생략하였다.

각 동위효소 유전자의 분석결과를 종합하여 특징적인 점을 아래와 같이 정리하였다.

(1) *Bph*; 주로 A형, B형, C형이 검출되었으며, 대부분의 한국종에서는 A형과 B형이 검출되었으나, '조선삼면'(j300)의 경우에는 중국종에서 주로 검출되는 C형이 나타났다.

(2) *Bes*; 대부분의 계통에서 A형과 B형이 검출되었으며, 한국종에서만 B형이 검출되었다.

(3) *Amy-hc*; 한국종에서는 F형, M형, S형, n형이 골고루 검출되었으며, 특히 F형의 경우에는 타 지역종에서는 검출되지 않는 유전자형이었다.

(4) *Lp*; 모든 계통에서 S형과 F형이 검출되었다.

(5) *Ies*; 모든 계통에서 C형과 D형이 검출되었으며, C형이 대부분이었다.

(6) *Ict-D*; 모든 계통에서 F형과 R형이 검출되었다.

Table 3. Random primers for RAPD analysis

Primers	Nucleotide sequences	Primers	Nucleotide sequences
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	15	5'-ACGCACAACC-3'
05	5'-AGGGGTCTTG-3'	17	5'-CTACTGCCGT-3'
06	5'-GGTCCCTGAC-3'	18	5'-GGACTGCAGA-3'
07	5'-GAAACGGGTG-3'	19	5'-ACGGCGTATG-3'
08	5'-GTGACGTAGG-3'	OPL-01	5'-GGCATGACCT-3'
10	5'-GTGATCGCAG-3'	04	5'-GAGTGCACAC-3'
11	5'-CAATCGCCGT-3'	05	5'-ACGCAGGCAC-3'
12	5'-TCGGCGATAG-3'	06	5'-GAGGGAAGAG-3'
14	5'-TCTGTGCTGG-3'	08	5'-AGCAGGTGGA-3'
15	5'-TTCCGAACCC-3'	10	5'-TGGGAGATGG-3'
16	5'-AGCCAGCGAA-3'	11	5'-ACGATGAGCC-3'
17	5'-GACCGCTTGT-3'	13	5'-ACCGCTGCT-3'
OPE-02	5'-GGTGCGGGAA-3'	14	5'-GTGACAGGCT-3'
03	5'-CCAGATGCAC-3'	16	5'-AGGTTGCAGG-3'
04	5'-GTGACATGCC-3'	17	5'-AGCCTGAGCC-3'
06	5'-AAGACCCCTC-3'	19	5'-GAGTGGTGAC-3'
07	5'-AGATGCAGCC-3'	20	5'-TGTTGGACCA-3'
09	5'-CTTACCCGA-3'	OPG-02	5'-GCCACTGAGG-3'
11	5'-GAGTCTCAGG-3'	04	5'-CCAGCAGCTT-3'
14	5'-TCGGCCTGAG-3'	OPK-14	5'-CCCGCTACAC-3'

Table 4. Isozyme polymorphism frequency of 17 silkworm strains

Gene	type	kd18	ki20	kl20	kc11	kp56	k30	j301	j300	j304	k301	k302	k303	jp20	jp22	j101	j108	jb31	
<i>Bph</i>	A	1.00	1.00	...	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.70	
	B	1.00	0.62	...	0.50	1.00	...	1.00	1.00	
	C	0.30	0.30	1.00	0.50	
	D	0.50	0.50
	O	0.50	0.38
	A'	0.20
<i>Bes</i>	A	1.00	1.00	...	1.00	1.00	1.00	1.00	...	1.00	1.00	0.68	1.00	1.00	1.00	1.00	
	B	1.00	1.00	1.00	1.00	0.32	
	C	
	O	
<i>Amy-hc</i>	F	1.00	1.00	...	0.77	
	M	...	1.00	1.00	...	1.00	0.40	...	1.00	1.00	1.00	...	1.00	
	S	1.00	
	n	1.00	...	1.00	1.00	...	1.00	0.23	0.60	
	S'	1.00	
<i>Pfl</i>	F	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	...	1.00	1.00	0.79	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	S	1.00	0.21	
<i>Lp</i>	F	0.53	1.00	...	1.00	1.00	...	0.39	1.00	0.50	...	1.00	
	M	0.47	
	S	1.00	...	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	...	1.00	0.61	...	0.50	1.00	...	
<i>Pst</i>	α	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
<i>Ict-A</i>	F	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	S	
<i>Ict-B</i>	F	
	S	
	n	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
<i>Ict-D</i>	F	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	...	0.53	1.00	0.10	...	1.00	
	M	
	S	
	R	1.00	...	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	...	0.43	0.47	...	0.90	1.00	...	
	n	0.57	
<i>Ict-E</i>	S	...	0.17	0.66	0.42	0.82	0.39	0.18	0.60	0.65	0.89	...	0.45	...	
	F	0.55	...	0.89	
	n	1.00	0.83	0.34	0.58	0.18	0.61	0.82	0.40	1.00	1.00	1.00	1.00	0.35	0.11	0.45	0.55	0.11	
<i>Ict-H</i>	M	...	1.00	0.05	
	S	1.00	0.10	
	n	1.00	...	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	...	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00	
	S'	0.10	
	O	0.10	
<i>Ies</i>	B	0.50	0.50	0.45	...	0.50	0.50	...	
	C	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	...	1.00	1.00	1.00	0.50	0.55	1.00	0.50	0.50	...	
	C'	1.00	
	D	0.50	0.90	1.00	
	O	0.10	

(7) *Ict-E*; 모든 계통에서 F형, S형, n형이 검출되었고, 한국종에서만 n형이 검출되었다.

(8) *Ict-H*; 대부분의 계통에서 n형이 검출되었지만, '조

선재래암'(kl20), '조선삼면'(j300)에서만 각각 M형과 S형이 검출되었다.

(9) *Pfl*; 대부분의 계통에서 n형이 검출되었고, '선삼호'

동위효소 및 RAPD분석에 의한 한국재래종 누에계통의 계통학적 특성

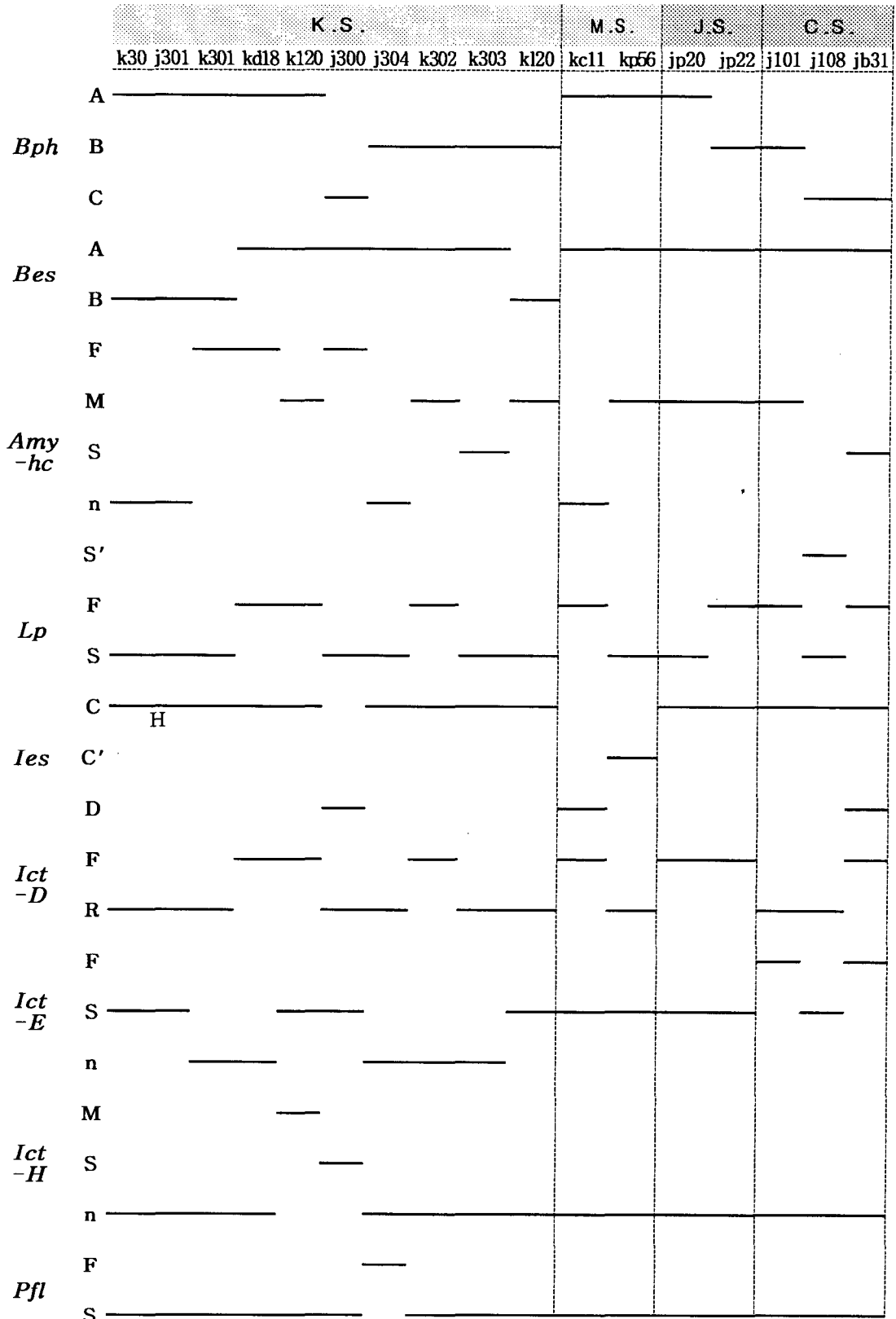


Fig. 1. Comparison of 9 isozyme polymorphic loci in 17 silkworm strains. K.S., Korean native strain; M.S., Manju (Northeast area of China) native strain; J.S., Japanese strain; C.S., Chinese strain

(j304)만 S형이 검출되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, *Bes* 유전자의 B형, *Amy-hc* 유전자의 F형, *Ict-E* 유전자의 n형, *Ict-H* 유전자의 M 및 S형, *Pfl* 유전자의 S형 등이 한국종에서 특이적으로 검출되는 것으로 만주재래종, 일본종 및 중국종 등에서는 전혀 검출되지 않은 유전자형임이 확인되었다.

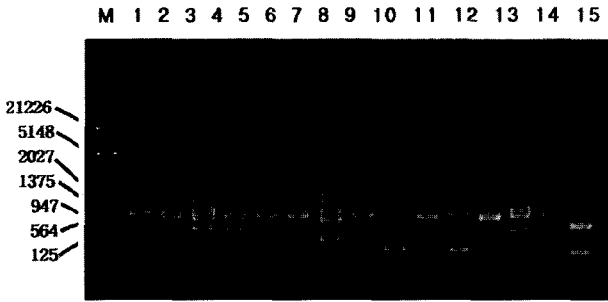


Fig. 2. RAPD profile of the 14 silkworm strains and *B. mandarina* generated by the operon primer OPA 07. M, DNA size maker; 1, kd18; 2, ki20; 3, kl20; 4, kc11; 5, k30; 6, j301; 7, j300; 8, j304; 9, k301; 10, k302; 11, k303; 12, jp20; 13, jp22; 14, j108; 15, *B. mandarina*.

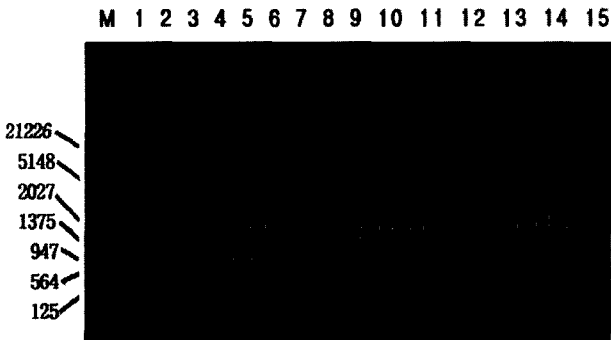


Fig. 3. RAPD profile of the 15 silkworm strains generated by the operon primer OPE 11. M, DNA size maker; 1, kd18; 2, ki20; 3, kl20; 4, kp56; 5, k30; 6, j301; 7, j300; 8, j304; 9, k301; 10, k302; 11, k303; 12, jp20; 13, jp22; 14, j101; 15, j108.



Fig. 4. RAPD profile of the 15 silkworm strains generated by the operon primer OPG 02. M, DNA size maker; 1, kd18; 2, ki20; 3, kl20; 4, kc11; 5, kp56; 6, k30; 7, j301; 8, j300; 9, j304; 10, k302; 11, k303; 12, jp20; 13, jp22; 14, j101; 15, j108.

2. RAPD 다형분석

공시한 16개의 집누에계통과 1개의 멧누에계통에 대해서 RAPD 분석을 위한 PCR 반응을 실시하였다. 그림 2, 3, 4에 PCR 산물을 분석한 전기영동상 중의 일부를 나타냈다. DNA size marker로는 *Eco* R1과 *Hind* III로 절단한 λ -phage DNA를 사용하였다. PCR 증폭산물의 대부분은 4 kb 이하에서 밴드로 확인이 되었으며, primer에 따라 5~13종의 다양한 밴드가 확인되었다. 총 40개의 primer로 PCR을 실시하여 반응산물을 분석한 결과 총 346개의 밴드를 얻을 수 있었다. 얻어진 모든 밴드에 대해서 밴드가 있으면 1, 해당 밴드가 없으면 0으로 코드화하여 모든 계통에 대해서 조사하였다. 이 조사값을 기초로 NTSYS-PC 프로그램에 의해 유전적 유사계수를 얻은 것이 Table 6이다. 이 값은 개체간의 유전자 유사계수로서, 그 값이 1에 가까울수록 유전적으로 가깝고, 수치가 작아질수록 거리가 먼 것을 나타낸다.

멧누에를 포함한 공시 17계통에 대한 유전적 유사계수의 범위는 최소 0.584에서 최대 0.869 사이였으며, 유전적 유사도가 가장 높은 것은 '고려삼면'(k30)과 '한삼면'

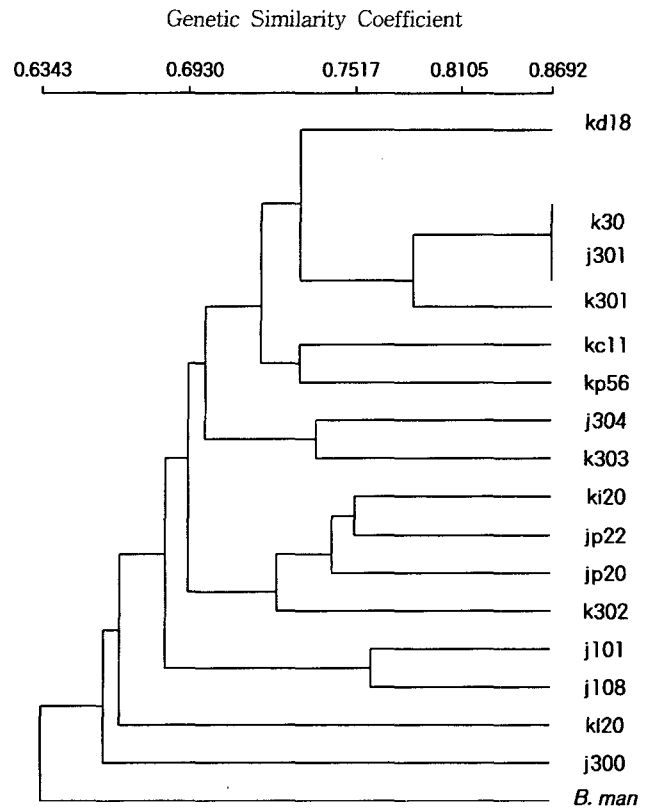


Fig. 5. Dendrogram based on a 18×18 matrix of similarity coefficient calculated from RAPD data of 346 amplification products generated by 40 primers for the identification of the silkworm strains.

(j301)이었고, 가장 낮은 것은 멧누에와 '조선삼면'(j300)이었다. 집누에와 멧누에 사이에서는 유전적 유사계수가 대체로 낮았다. 이상의 유전적 유사계수의 조사결과를 기초로 하여 UPGMA법에 의한 계통수를 작성하였다(Fig. 5). 계통수는 크게 집누에군과 멧누에군으로 나누어지며 이것을 다시 유사계수 0.6930을 기준으로 한국종 그룹, 일본종 그룹, 중국종 그룹으로 나눌 수 있었다. 한국종 그룹에는 '조선녹견'(kd18), '고려삼면'(k30), '한삼면'(k301), '선3호'(j304), '한삼면'(j301), '삼면홍회백'(k303)과 만주재래종인 '만주재래황'(kc11), '만주재래백'(kp56)이 속해 있었다. 일본종 그룹에는 일본종과 '서천'(ki20), '삼면잠'(k302) 등이 속해 있었으며, 중국종 그룹에는 중국종 품종만이 있으며 타 지역종은 전혀 속해 있지 않았다. 특이한 사실은 '조선재래암'(ki20), '조선삼면'(j300)이 독립된 cluster를 형성하여 한국종 그룹내에 포함되지 않았다. 이상의 사실에서 한국종은 일본종, 중국종과는 거리가 멀고, 만주재래종과는 유전적거리가 비교적 가까운 사실을 알 수 있었다.

고 찰

지금까지 한국종 누에계통에 대해서는 품종의 수도 적을 뿐 아니라 실용성이 비교적 낮은 경우가 많았던 관계로 관련 연구는 대단히 미미한 실정이었다. 또한 한국종은 지리적 원종계통으로도 거의 인정받아 오지 못한 것이 현실이었다. 이같은 사실은 양잠의 기원이나 집누에품종의 계통분화와 같은 연구에 있어서 한반도가 가지는 지리적 및 생물학적 의미에서 볼 때에도 매우 유감스러운 사실이라고 하겠다. 본 연구는 한국종 계통으로 인정되거나 혹은 추측되고 있는 모든 누에품종을 대상으로 한국종의 유전적 및 품종적 특성을 명확히 하기 위한 연구의 일환으로 실시되었다. 저자들은 이미 현존하는 모든 한국종 누에품종을 국내·외로부터 수집하여 생리생태 및 표현형질적 특성을 조사하여 한국종은 타 지리적 원종계통과는 상당히 상이한 계통적 특성이 있다는 사실을 보고하였다(노·이 2000). 그러나 계통이나 품종간의 유연관계 혹은 계통의 특성을 구명하기 위해서는 생리생태 및 표현형질적인 형질에 대한 조사분석만으로는 불충분한 경우가 많다. 즉 인위적 도태가 곤란한 보다 더 유전적인 형질에 대한 분석이 요구된다고 하겠다. 본 연구는 이와 같은 관점에서 isozyme 유전자 및 hemolymph 단백질유전자에 대한 생화학적 분석과 genomic DNA 유전자 염기조성을 기반으로 하는 DNA 다형현상을 분석하는 RAPD법 등의 분자생물학적 연구방법에 의해 한국종계통의 계통특성을 명확히 하였다.

본 연구에 사용된 동위효소 유전자는 Blood acid phosphatase(*Bph*), Blood & Integument esterase(*Bes*, *Ies*), Hemolymph amylase(*Amy-hc*), Chymotrypsin inhibitor protein(*Ict-A*, *B*, *D*, *E*, *H*), 저분자 Lipoprotein(*Lp*), 유충형 자특이단백질(*Pft*), 저장단백질(*Pst*) 등 8종 12개의 유전자군이다.

*Bph*유전자는 A, B, C, D 및 O형의 기본형이 있으며, 대부분의 품종에서 C형과 D형이 나타난다(吉武·秋山 1965). 본 연구에 사용된 한국종 품종의 대부분은 A형과 B형이 나타났다. *Bes*유전자는 A, B, C 및 O형의 기본형이 있으며, 중국종과 일본종의 대부분은 A형이 나타나지만(Yoshitake 1966, Yoshitake and Eguchi 1966), '고려삼면'(k30), '한삼면'(j301), '한삼면'(k301) 등의 한국종에서는 B형이 나타났다. 이와 함께 *Bes*유전자의 B형, *Amy-hc*유전자의 n형, *Pft*유전자의 S형 등은 타 지역종계통에서는 거의 나타나지 않고 한국종계통에만 존재하는 유전자형인 것으로 나타났다. 이러한 사실은 만주재래종, 일본종 및 중국종과는 상이한 한국종의 유전적 특징인 것으로 생각된다. 또한 성(1997)은 8종의 동위효소유전자를 사용하여 우리나라 잠사곤충연구소 보존 303개의 품종에 대한 유연관계 분석에서 한국종인 '한삼면'은 극히 작은 군이지만 독자적인 그룹을 형성하였다고 보고하였는데, 이같은 사실은 한국종계통의 종 특이성을 확인한 본 연구의 결과와도 일치한다.

동위효소단백질이나 체액단백질유전자와 마찬가지로 유전자 DNA도 인위적인 도태가 불가능하므로 오랜 진화과정에서 유전자의 변화나 집적은 지극히 자연적으로 이루어졌을 것이다. 이와 같은 관점에서 본 연구에서도 한국종과 타 지역종과의 유연관계를 genomic DNA를 이용한 RAPD 다형분석에 의해 확인하였다. RAPD법은 William and Kubelik(1990)에 의해 처음 보고된 후 이미 우리나라에서도 이 분석법을 이용해 많은 동·식물의 유전적 변이를 관찰하였다(Chung, 1994; Shin and Lee, 1995; Oh and Hong, 1995; Jeong, *et al.* 1997).

공시한 17품종에 대해서 40개의 random primer를 사용한 PCR 반응에서 총 346개의 반응산물을 확인하였다. 밴드의 유무를 코드화하여 NTSYS 프로그램에 의해 genetic similarity를 얻었으며 UPGMA법에 의해 계통수를 작성하였다. 계통수는 크게 집누에군과 멧누에군으로 나눌 수 있었고, 이를 다시 유전적 유사계수 0.6930을 기준으로 한국종 그룹, 중국종 그룹, 일본종 그룹으로 나눌 수 있었다. 이 결과는 일반적인 지리적 원종계통의 분류와 거의 일치하는 것이었다. 특히 멧누에는 집누에군과는 떨어진 별도의 cluster를 형성한 것으로 보아 유전자의 조성이 상당히 다른 것으로 생각된다. 한편, 한국종 그룹에는 만주재래종들이 속해 있는 것으로 보아 이들은 비교적 가까운

것으로 생각되었고, '서천'(ki20)과 '삼면홍희백'(k303)이 일본종 그룹에 속해있는 것과 '조선재래암'(ki20)과 '조선삼면'(j300)이 한국종 그룹과는 떨어져 있는 것은 특이한 사실이었다.

이상의 결과를 요약하면, 동위효소유전자의 분석 결과에서 한국종은 몇 개의 유전자에서 타 지역종과는 전혀 다른 유전자 분포 양상을 나타내는 것이 확인되었으며, RAPD 분석에서는 지리적 특성에 의해 분류되는 기존의 품종분류와 일치된 결과를 얻었다. 즉 집누에와 멧누에가 각각 별도의 대그룹을 형성하였고, 집누에군내에서는 일본종, 중국종 및 한국종 등으로 cluster화 되었다. 이상의 결과에 의해 RAPD 분석법은 누에의 계통이나 품종의 유연관계 구명에 매우 유효한 연구방법이 확인되었으며, 또한 한국종계통은 지리적 특성이 뚜렷한 지역형 원종계통의 하나라는 사실이 명확하게 되었다.

적 요

집누에는 지리적인 특징에 의해 중국종, 일본종, 유럽종, 열대종 및 한국종으로 분류된다. 한국종계통은 품종수도 적을 뿐만 아니라 관련 연구도 미미한 실정이다. 본 연구는 한국재래종으로 추측되는 품종들을 국내·외로부터 수집하여 동위효소 및 체액단백질유전자와 RAPD 다형분석을 실시하여 한국재래종 계통의 품종적 유연관계와 계통특성을 밝히고자 하였다.

1. 동위효소유전자의 분석결과, 몇 개의 유전자군에서 한국재래종과 타 지역종간에 유전자형 및 유전자 빈도의 차이가 명확히 나타났다.

2. RAPD의 결과를 UPGMA법에 의해 분석한 결과, 집누에군과 멧누에군으로 크게 구분되었으며 유전적 유사계수 0.6930을 기준으로 한국재래종, 일본종 및 중국종으로 그룹화되었다.

3. 이상의 결과를 종합하면, 한국재래종 누에계통은 하나의 지역형 원종계통으로 분류될 수 있는 명확한 유전적 특성을 가지는 것은 물론 한국종의 계통특성도 뚜렷한 것으로 확인되었다.

사 사

본 연구를 위하여 보존 잠품종을 분양하여주시는 농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부, 일본 농림성 잠사곤충연구소 및 일본 구주대학 유전자자원개발연구소의 관계자 여러분들에게 감사의 뜻을 표합니다.

본 연구는 1999년 경북대학교 학술진흥재단 연구장려비에 의해 수행되었음.

인용문헌

- Chapco, W., Aston, N., Martel, R and N. Antonishyn (1992) A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome*. **35** : 569-574
- Chung, T. Y. (1994) Polymorphism and phylogenetic relationship of red rice (weedy rice in *Oryza sativa*) based randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Korean J. Breed.* **27**(1) : 86-93.
- Eguchi, M. and N. Yoshitake (1966) Genetic studies on isozymes of the integument esterase in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Jpn. J. Genet.* **41** : 267-273.
- Gawel, N. and A. Barelett (1993) Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.* **2** : 33-38.
- Hayner, D. and D. McInnis (1994) Resolution of population of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*. **37** : 244-248.
- Jeong, H.W., K. S. Kim and J. H. Ha (1997) Analysis of phylogenetic Relationships among the Asian 8 Dog Breeds (*Canis familiaris*) thought Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Korean J. Genetics* **19**(2) : 143-149.
- 金 熏 洙 (1997) 動物分類?. 集賢社 : 50-58.
- Oh, M. J. and B. H. Hong (1995) Genetic relationship among Korean native tea tree, *Camellia sinensis*, using RAPD markers. *Korean J. Breed.* **27** : 140-147
- 노시갑·이재만(2000) 현존하는 한국재래종 잠품종의 형질특성. *한잠학지*. **42** : 12-13.
- Rohlf, F. J. (1989) NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 1.50. Exeter publ, New York.
- 성수일 (1997) 동위효소 다형특성에 의한 누에품종의 유연관계. *한잠학지*. **39** : 119-133.
- Shin, T. S. and S. J. Lee (1995) Genetic diversity in watermelon germplasm through RAPD analysis. *Korean J. Breed.* **27** : 94-107
- Williams, J. G. K. and A. R. Kubelik (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* **18** : 6531-6535.
- Yoshitake, N., M. Eguchi, M. Akiyama and Y. Tsuchiya (1996) Phosphatase and Esterase polymorphism in larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L. (*Lepidoptera* : *Bombycidae*). *Appl. Ent. Zool.* **1** : 41-48.
- 吉武成美(1968) 家蚕日本種の起源に関する一考察. *日蚕雑*. **37** : 83-87.
- 吉武成美·秋山昌子(1965) カイコの幼虫血液における酸性ホスホターゼ型の品種間変異について. *日蚕雑*. **34** : 99-103