

누에를 이용한 환경 변이원 검색계 개선

윤형주* · 김삼은 · 김종길 · 최지영

농촌진흥청 농업과학기술원 농업생물부 유용곤충과

Improvement of a Screening System for Environmental Mutagens by Means of a Specific Locus Mutation of the Silkworm, *Bombyx mori*

Hyung-Joo Yoon*, Sam-Eun Kim, Jong-Gill Kim and Ji-Young Choi

Department of Agricultural Biology, The National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT : The efficiency to detect mutagenicity of the system using a specific locus mutation of *Bombyx mori* was examined and improved. In the system, mutagenicity could be detected by the egg colour manifested by the *pe* and/or *re* genes, which is a kind of recessive visible mutation of the insect. Among tested four mutagens, MMC had specially high sensitivity in the oocytes of silkworm and EMS had in the spermatozoa. PCB and dioxin showed a positive effect in both the oocytes and spermatozoa. In a consequence of sensitivity of mutagen by mating number of male moth of *B. mori*, treated mutagen, there was no difference between one mating - and three mating - male moth in sensitivity of mutagen. Sun3ho, *B. mori* variety, which showed high sensitivity to mutagens was improved in the major characteristics by crossing of C5 and N12.

KEY WORDS : Mutagenicity, *Bombyx mori*, Specific locus mutation, Egg colour

초 록 : 누에의 가시 돌연변이 형질을 이용한 환경변이원 검색계 수립을 위하여 MMC, EMS, PCB에 대한 누에알 변이원 검색계의 감수성을 조사한 결과, 난모세포계는 MMC, 정세포계는 EMS에 대하여 특정적으로 높은 감수성을 보였고, PCB와 dioxin에 대해서도 양성반응을 얻을 수 있었다. 수나방의 사정횟수에 따른 정세포의 변이원 감수성 변화를 시험한 결과, 1교와 3교 때 사정된 정자 간에는 큰 차이가 없었다. 변이원 감수성은 높으나, 산란성, 우화율 등 검색계로서 주요형질이 극히 불량한 선3호는 C5, N12, 한삼면과의 교잡으로 주요형질이 개선되고 높은 변이원 감수성을 유지하였다.

검색어 : 변이원성, 누에, 특정좌위 돌연변이, 알색

최근 산업화와 더불어 필연적으로 발생하는 유해화학 물질 및 각종 환경변이원 물질에 의한 발암 및 기형아 출산 등 변이원성 질환이 날로 증가 일로에 있다(Cooper and Grover, 1990). 또한 화학물질의 생산과 사용도 급증해 각종 폐수에서 검출되는 화학물질의 종류가 무려

1,600만종에 이르고 있으며, 해마다 4만종 정도가 새로 생성되고 있는 실정이다. 그러므로 최첨단 시약과 물리·화학적 방법을 동원해도 오염물질을 모두 가려 낼 수는 없는 실정이기 때문에 동물, 식물 그리고 곤충 등을 생물 지표로 이용해서 환경오염정도를 측정하는 연구가 많이

*Corresponding author. E-mail: yoonhj@rda.go.kr

이루어지고 있다(Aisemberg *et al.*, 2005; Fernandez-Bayon *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1994). 일반적으로 변이원성 질환의 원인물질을 규명하기 위하여 OECD는 유전독성 시험 지침에 따라, 유전자 돌연변이시험 6종, 염색체 이상시험 6종, DNA 손상시험 3종 중 각 1종씩, 3종의 조합시험을 거쳐 발암물질을 검색하도록 추천하고 있다(Kuroda, 1995). 이와 같은 조합시험을 추천하고 있는 이유는 각 검색계마다 비용, 신속성, 검색 스펙트럼, 인간에의 적용범위 등 여러 면에서 나름대로의 장단점을 보이고 있으나, 모든 면에서 공통적으로 우수한 단일 검색계가 아직 존재하지 않기 때문에, 현재 각 검출계 별로 효율성을 증진시키기 위한 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

현재 주로 이용되고 있는 화학물질의 변이원성 시험법으로는 미생물을 이용하는 Ames test(Gee *et al.*, 1994; Maron and Ames, 1983)와 *in vitro* 수준에서 염색체 이상을 검출하는 염색체 이상시험(Dean and Danford, 1984) 및 *in vivo*에서 염색체 손상을 검출하는 소핵시험(Hayashi *et al.*, 1990) 등이 있다.

이 중에서 Ames test는 살모넬라균의 복귀 돌연변이를 이용하여 변이원성을 검색하므로 간편하고 비용이 저렴하다는 장점이 있으나, 원핵 생물을 대상으로 하기 때문에 염색체 돌연변이를 검출할 수 없다는 근본적 문제점을 안고 있다. 한편 배양세포(CHO/CHL 세포주 등)를 이용하는 변이원성 검색계는 인간세포를 이용할 수 있다는 장점이 있는 반면에 배양기내의 세포가 배수성을 나타내는 등 그 핵형이 비정상이라는 문제점이 있다. 또한 포유류 검색계는 얻어진 결과를 인간에게 적용하기에 가장 적절한 시험계이지만, 1~2년 기다려야 결과를 알 수 있고 실험동물의 사육 관리에 막대한 비용이 소요된다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 보완하기 위한 수단으로, 원핵 생물과 포유류를 연결할 수 있는 중간 위치에 있는 곤충계를 이용하는 검색 방법이 있다(Kuroda, 1989; Murakami, 1983).

곤충 중에서는 초파리(*Drosophila melanogaster*)가 유전독성 검색에 주로 이용되고 있는데, 초파리는 유전학적으로 많은 연구가 축적되어 있을 뿐 아니라 1세대 소요 기간이 약 10일에 불과하여 단기간 내에 시험결과를 확인할 수 있는 많은 장점이 있다(Wurgler and Vogel, 1985). 그러나 생존기간이 짧다는 것은 잠복기가 긴 화학물질의 독성검사에는 부적합한 단점으로도 작용할 수 있으며 초파리는 크기가 매우 작아서 가장 기본적 약제투여 방법인 주사법을 적용하기 어렵다는 단점도 있다.

한편 누에를 이용하는 변이원성 검출제도 있는데(Tazima, 1978), 그 기작은 흑색란을 산란하는 야성형 누에에 변이원을 투여하여 marker인 *pe·re*를 호모로 갖는 개체와 교배시킨 후 변이원에 의해 유발된 돌연변이를 백란(*pe*)과 적란(*re*)의 출현율로 검색하는 것이다. 누에의 경우, 대규모 사육이 용이하고 실험하기에 적당한 크기이며, 다른 포유류 동물인 쥐나 원숭이와는 달리 인체에 병원균(예: 쥐, 한탄 바이러스, 원숭이; ADIS 바이러스)을 전염시킬 염려도 없을 뿐 아니라 알과 유충의 색깔로 돌연변이를 가시적으로 쉽게 구별할 수 있다. 또한 인간에 의해 오랜 세월동안 사육 관리되어오면서 그 유전형질이 자세히 분석되어 있다는 점 등 변이원 검색에 많은 장점을 갖고 있다. 따라서 위와 같은 장점이 있는 누에 검색계를 도입하여 변이원에 대해 감수성이 높은 누에 계통을 선발하고 변이원 투여에 적합한 누에의 발육시기를 검토하는 등, 누에 검색계의 검색 효율성을 검토한 바 있다(Kim *et al.*, 2000).

이에 본 연구에서는 효율성이 있을 것으로 판단된 누에 변이원 검색계를 새로운 검색계로서의 활용 가능성을 검토하고자 각종 변이원에 대한 감수성조사, 수나방의 사정 횟수에 따른 정세포의 변이원 감수성 변화 및 변이원 감수성은 높으나 검색계로서 주요형질이 극히 불량한 선3호의 주요형질 개선 등의 실험을 행하였다.

재료 및 방법

누에알의 색깔로 변이원성을 검색하는 기작

*pe*와 *re*는 각각 제 5번 염색체의 0.0과 31.7의 위치에 좌위하는 알색에 대한 열성가시 돌연변이 유전자로, *pe* 호모형은 흰 알이 되고 *re* 호모형은 붉은 알이 되는데 *pe*가 *re*의 우위에 있으므로 *pe·re*를 동시에 호모로 갖는 개체는 흰 알이 된다. 야성형(*pe⁺·re⁺*)의 알색은 검은색으로 *pe·re*에 대해 우성이다. 누에의 알색으로 변이원을 검색하는 방법은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 검은 알을 낳아야 할 야성형(*pe⁺·re⁺//pe⁺·re⁺*) 누에에 변이원을 투여한 후, 흰 알을 낳는 *pe·re//pe·re* 형의 누에와 교배시킨다. 야성형 누에의 *pe⁺*와 *re⁺*에 아무 변화가 없을 때는 그 F₁은 *pe⁺·re⁺//pe·re*형이 되어 흑색란이 되지만 *pe⁺* 단독 또는 *pe⁺·re⁺* 양 좌위에서 동시에 돌연변이가 일어났을 경우에 F₁은 *pe^{*}·re⁺//pe·re* 또는 *pe^{*}·re^{*}//pe·re* 형이 되어 백색란이 된다(편의상 돌연변이가 유발된 유전자는

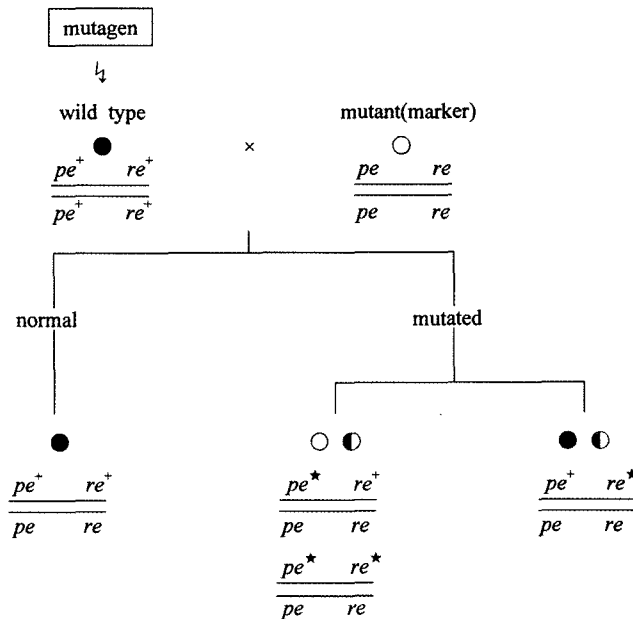


Fig. 1. Schematic explanation to detect a mutagen by the specific loci method using the egg-colour mutants in *Bombyx mori*. ★; gene mutation, ●; black egg, ○; white egg, ●; red egg, ◐; white mosaic egg, ◑; red mosaic egg.

로 표시함). 마찬가지로 re^+ 좌위에 변이가 일어났을 경우에는 $pe^+ \cdot re^ // pe \cdot re$ 가 되어 F₁은 적색란이 된다. 따라서 흰 알과 붉은 알의 출현 빈도로 투여한 변이원의 변이 유발 빈도를 산출할 수 있다(Fig. 2).

각 종 변이원에 대한 감수성 조사

누에알을 이용한 검색계의 변이원에 대한 자웅별 생식 세포의 감수성을 조사하기 위해서 변이원은 Ethylmethanesulfonate (EMS) (Sigma Co., St. Louis, USA)와 Mitomycin C (MMC) (Sigma Co., St. Louis, USA), Polychlorinated biphenyl (PCB) (Sigma Co., St. Louis, USA)를 공시하였고, 대조로서 생리식염수와 옥수수기름을 사용하였다. EMS는 0.1% 수용액으로 하여 두당 25 μ l를, MMC는 두당, 1 μ g씩을 25 μ l용량으로, PCB는 두당 25 μ l용량으로. 대조로 사용한 생리식염수와 옥수수기름도 두당 25 μ l용량으로 주사하였다. 변이원 투여 시기는 Tazima (1978) 및 Kim 등(2000)에 따라, 난모세포를 대상으로 할 때는 난각이 분비되기 직전인 우화 5일전(화용 8일째)의 암컷에 주사하고, 정세포를 대상으로 할 때는 우화 1일전의 수컷에 주사하였다.

공시 누에 계통은 실험을 통하여(Kim *et al.*, 2000), 주요 형질과 변이원 감수성이 높은 N12를 시험구별 200두 씩

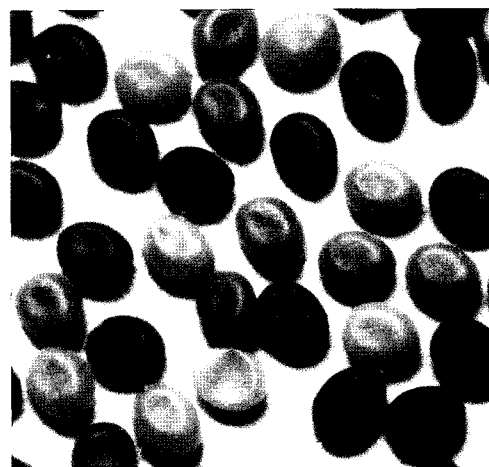


Fig. 2. Egg-colour mutation in *Bombyx mori*. Mutagens are detected by the visible egg-colours manifested by the genes, *pe* and/or *re*. black egg: wild type, white egg: *pe* mutant, red egg: *re* mutant

공시하였으며, 누에사육은 관행적인 표준사육법에 준하였다. Marker로는 $pe \cdot re \cdot ch$ 호모계통을 사용하여 우화율, 정상산란비율, 산란수 등 일반 독성 및 자웅별 생식세포의 감수성 등 돌연변이 빈도를 조사하였다. 우화율은 공시한 5령 유충수에 대해 사육 후 얻어진 나방수의 비율로 나타내었고 정상산란 나방은 한 마리의 산란수가 200개 이상

인 동시에 산란된 알의 50% 이상이 수정된 개체를 기준으로 정하였다. 수나방에 대한 정상산란 나방비율, 산란수 및 수정란 비율은 N12와 교배한 *pe·re·ch* ♀에 대한 값으로 나타내었다. 난색특정좌우 돌연변이 빈도는 변이원 처리구의 돌연변이 빈도 값에서 대구조인 생리식염수 투여구의 자연돌연변이 빈도 값을 뺀 값으로 표기하였고, 배수는 변이원 투여구 빈도를 생리식염수 투여구의 빈도로 나눈 값으로 나타내었다.

수나방 다교 시험

일반적으로 누에 수나방의 경우, 경우에 따라서 여러 번 교미하여 이용하기 때문에 변이원이 투여된 수나방을 효율적으로 다회 사용하기 위하여 수나방의 사정횟수에 따른 정세포의 변이원 감수성 변화를 조사하였다. 공시 누에품종은 주요형질 및 변이원에 대한 감수성이 높은 C5를 이용하였다(Kim *et al.*, 2000). 시험구는 1교와 3교로 나누어서 시험구별 200두 씩 공시하였으며, 공시변이원은 EMS로 0.1% 수용액으로 하여 두당 25 μ l를 우화 1일전인 번데기 말기에 투여하였다. Marker로는 *pe·re·ch* 호모계통을 사용하였으며, 교미 후 채종한 누에알에 대해서는 산란 후 1~2개월 후 교미회수별 난색 특정 좌우 돌연변이 빈도를 조사하였다.

누에 품종 선3호를 이용한 검색 효율성 개선

변이원 감수성은 높으나 검색제로서 주요형질이 극히 불량한 선3호의 주요형질 개선을 위하여 누에 계통은 선3호를 비롯하여 누에의 강건성과 산란성이 높은 N12, C5, 한삼면 등과 교잡한 선3호×N12, 선3호×C5, 선3호×한삼

면과 대조로 N12 등을 사용하였다. 공시두수는 계통별 100두씩 공시하였으나, 대조로 사용한 N12는 200두를 공시하였다. Marker로는 *pe·re·ch* 호모계통을 사용하였다. 변이원은 EMS로 0.1% 수용액으로 하여 두당 25 μ l를 암번데기는 화용 8일째에 수번데기는 우화 1일전인 번데기 말기에 주사한 후 우화율, 정상산란비율, 수정율, 변이원 고 감수계통 선발 및 변이원성 등을 조사하였다. 위의 각종 변이원에 대한 감수성 조사에서처럼 우화율은 공시한 5령 유충수에 대해 사육 후 얻어진 나방수의 비율로서 누에의 강건성을 나타내는데, 우화율이 94% 미만인 계통은 선발대상에서 제외시켰다. 정상산란 나방은 한 마리의 산란수가 200개 이상인 동시에 산란된 알의 50% 이상이 수정된 개체를 기준으로 정하였는데 정상산란 나방비율이 80% 미만인 계통 역시 선발대상에서 제외시켰다. 마찬가지로 나방 당 산란수 500개 미만, 수정율 95% 미만인 계통을 제외시킨 후 변이원 검색에 적합한 계통으로 선정하였다.

결과 및 고찰

각 종 변이원에 대한 감수성 조사

누에의 강건성과 산란성을 기준으로 하여 선정한 N12를 대상으로 EMS, MMC와 PCB에 대한 감수성을 확인하기 위하여 우화율, 정상산란 나방비율 등 변이원 투여가 누에나방의 주요형질에 미치는 영향을 조사하였다(Table 1). 우화율이 80%를 넘는 변이원은 암나방에서는 MMC, 수나방에서는 EMC와 PCB이었다. 한 마리의 산란수가 200개 이상인 동시에 산란된 알의 50%이상이 수정된 개

Table 1. Effect of different mutagens in a few major characteristics of silkworm, *Bombyx mori*

Kinds of Mutagen	Eclosion rate (%)		Rate of moth to lay eggs normally (%)		No. of eggs layed		Fertility (%)	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
MMC	89	74	69	85	604	512	97	90
EMC	25	86	69	85	571	543	97	96
PCB	40	82	62	88	582	526	96	94
PBS	53	76	50	85	687	257	98	96
Corn oil	76	73	69	80	618	544	97	92

1) Abbreviation : MMC; Mitomycin C, EMS; Ethylmethansulfonate, PCB; Polychlorinated biphenyl, PBS; phosphate buffered saline.
 2) Tested silkworm variety was N12 and 200 female pupae allotted to the experimental regimes of different mutagens.
 3) Mutagens were treated in the eighth day after pupation in female pupa and the just before eclosion in male pupa.
 4) The volume of treated mutagen per one pupa : EMS; 25 μ l 0.1% solution, MMC; 25 μ l 0.4% solution, PCB; 25 μ l.
 5) Moth to lay eggs normally is defined to the female moth layed more than 200 eggs, and which eggs hatched over 50%.
 6) Rate of moth to lay eggs normally, No. of eggs layed and fertility of male moth represented the value of female of *pe·re·ch*.

체를 기준으로 정한 정상산란 나방비율의 경우, 80%이상 인 변이율은 암나방에서는 전혀 없는 반면, 수나방에는 85%이상이었다. 또한 변이원 처리구의 나방 당 산란수가 대부분이 500개 이상이었고, 수정율도 90%이상으로서 투여된 변이원 MMC, EMC와 PCB가 누에나방의 주요형질에 미치는 영향에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

변이원별 난모세포의 *pe*와 *re*의 돌연변이 빈도를 살펴 보면(Table 2), MMC의 *pe*와 *re*의 전체변이와 부분변이를 포함한 돌연변이 빈도의 배수가 54.4와 129.5로 이들을 합하여 나눈 배수평균이 92.0으로서 배수평균이 3.0과 8.0인 EMC와 PCB보다 정모세포에서의 돌연변이 빈도가 상당히 높음을 알 수 있었다. 변이원별 정세포의 *pe*와 *re*의 돌연변이 빈도의 경우는(Table 3), 난모세포의 경우와 달리 EMC의 돌연변이 빈도가 다른 변이원보다 상당히 높아 EMS와 MMC에 대한 반응은 자웅 생식세포 간에 큰 차이를 보였다. PCB는 난모세포와 정세포 모두에 감수성을 나타내었으며, dioxin 또한 감수성을 나타내었다. 따라서 MMC, EMC, PCB와 dioxin에 대한 누에의 자웅

생식세포간의 돌연변이 빈도를 비교해 본 결과(Fig. 3), MMC를 주사한 경우에는 난모세포 쪽이 정세포보다 102배 월등히 높은 값을 보였다. 반면에 EMS의 경우에는

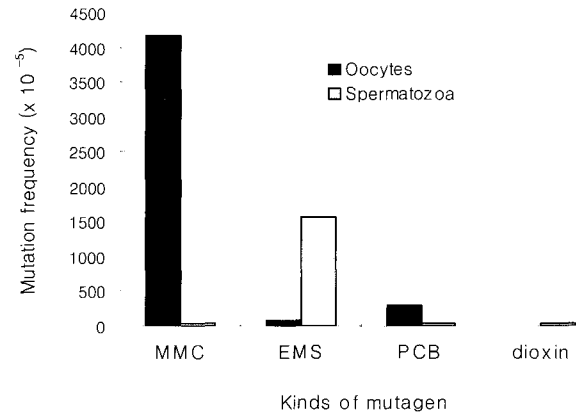


Fig. 3. Mutation frequency by N12, variety of *B. mori*, in different mutagens. Mutation frequency was obtained from the sum of *pe*- and *re*-mutant.

Table 2. The *re*- and *pe*-mutation frequency of oocytes of silkworm, *B. mori* in different mutagens

Kinds of Mutagen	No. of eggs tested	<i>re</i> mutation frequency				<i>pe</i> mutation frequency				Total mutation frequency	Average of relative mutagenic activity
		Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity	Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity		
MMC	64,628	261	1,341	1,602	54.4	289	2,281	2,570	129.5	4,172	92.0
EMC	18,843	0	2	2	1.1	48	28	76	4.8	78	3.0
PCB	19,788	-2	91	91	5.0	16	18	197	10.9	286	8.0

- 1) For abbreviation, tested silkworm variety and the stage and volume of treated mutagen, see legend to Table 1.
- 2) Mutation frequency represents the value subtracted natural mutation frequency from mutation frequency of treated mutagens.
- 3) Relative mutagenic activity represents the value divided mutation frequency of silkworm treated mutagen into mutation frequency of silkworm treated phosphate buffered saline.

Table 3. The *re*- and *pe*-mutation frequency of spermatozoa of silkworm, *B. mori* in different mutagens

Kinds of Mutagen	No. of eggs tested	<i>re</i> mutation frequency				<i>pe</i> mutation frequency				Total mutation frequency	Average of relative mutagenic activity
		Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity	Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity		
MMC	61,440	0	-2	-2	-1.0	-5	31	26	2.3	41	0.7
EMC	71,133	4	198	202	102.0	8	1,347	1,355	68.8	1,557	85.4
PCB	66,276	12	12	24	4.0	6	6	12	1.5	30	2.8
dioxin	7,208	0	23	23	6.8	1	10	11	1.6	34	4.2

- 1) For abbreviation, tested silkworm variety and the stage of treated mutagen, see legend to Table 1.
- 2) The volume of treated mutagen per one pupa : EMS; 25 μ l 0.1% solution, MMC; 25 μ l 0.4% solution, PCB; 25 μ l, dioxin; 1 μ g 25 μ l.
- 3) Mutation frequency represents the value subtracted natural mutation frequency from mutation frequency of treated mutagens.
- 4) Relative mutagenic activity represents the value divided mutation frequency of silkworm treated mutagen into mutation frequency of silkworm treated phosphate buffered saline.

정세포쪽이 난모세포보다 변이빈도가 20배나 높은 값을 나타내었다. PCB는 난모세포와 정세포에 다 감수성을 나타내었으나 난모세포쪽이 정세포보다 9.5배 정도 높은 변이빈도를 나타내었고, dioxin도 감수성을 나타내었다.

Murakami (1984)는 암수번데기에 EMS와 MMC를 투여한 후 무처리 개체와 교배시켜 얻어진 알의 부화비율을 조사한 결과 EMS의 경우에는 주사한 개체의 자웅에 관계 없이 차세대 알의 부화비율이 비슷하였는데, MMC의 경우에는 웅성 생식세포는 그 치사율이 미미하였지만(10 µg 주사로 10% 치사), 자성 생식세포는 5 µg 주사로 99% 치사하는 막대한 장애를 받았다. 또한 Murakami (1983)는 EMS와 MMC에 대한 자웅 생식세포의 이러한 차이를 누에 대사계에서는 EMS가 직접변이원으로 작용하는데 반해 MMC는 간접변이원으로 작용하기 때문인 것으로 보고하고 있다. 대부분의 동물 생식세포가 그러하지만 특히 누에 생식세포의 경우에도 정자는 세포질이 거의 없이 핵물질이 대부분으로 구성되어 있는데 비하여 난모세포 또는 난자는 핵질에 비하여 막대한 양의 세포질로 구성되어 있고, 그 세포질 내에 물질 대사에 관여하는 각종 효소가 함유되어 있는 것으로 알려져 있어 Murakami의 주장을 수료할 만하다고 생각된다. 그러나 일반적으로 MMC는 직접변이원으로 알려져 있는 물질이므로, 누에 알의 특징적 반응에 대해서는 금후 더 자세한 검토가 이루어져야 할 것으로 보인다.

수나방 다교 시험

변이원을 주사기로 일일이 번데기에 투여하는 작업은

많은 노력이 요구되기 때문에 변이원이 투여된 수나방을 효율적으로 이용하기 위하여 MMC를 이용하여 수나방의 사정횟수에 따른 정세포의 변이원 감수성 변화를 조사하였다. 그 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 1교와 3교의 *pe*와 *re*의 전체변이와 부분변이를 포함한 돌연변이 빈도 배수가 10.3과 7.2로 1교와 3교 때 사정된 정자 간에는 큰 차이가 없었다. 따라서 투여된 수나방은 적어도 3번 정도는 교미를 시켜 사용해도 변이원에 대한 감수성은 유지할 것으로 판단되었다.

선3호를 이용한 검색 효율성 개선

검색대상이 될 개체수가 적어도 천에서 만 단위를 요구하는 변이빈도 산출 시험의 특성상, 변이원 검색계로 이용할 때에는 사육하기 쉽고 알을 많이 낳는 계통이어야 유리하다. 그런데 선3호의 경우 변이원 감수성은 높으나 검색계로서 주요형질이 극히 불량하기 때문에(Kim *et al.*, 2000), 선3호의 강건성과 산란성 등을 높이기 위하여 변이원성이 높았던 한산면, C5, N12와 교배를 시켜 변이원을 투여한 후 대조품종인 N12를 포함한 5개 계통에 대하여 강건성과 산란성 등 주요형질을 조사하였다(Table 5). 우화율은 공시한 5령 유충수에 대해 사육 후 얻어진 나방수의 비율로서 누에의 강건성을 나타내는데, 우화율이 94%미만인 계통은 선발대상에서 제외시켰다. 정상산란 나방은 한 마리의 산란수가 200개 이상인 동시에 산란된 알의 50% 이상이 수정된 개체를 기준으로 정하였는데 정상산란 나방비율이 80% 미만인 계통 역시 선발대상에서 제외시켰다. 마찬가지로 나방당 산란수 500개 미만,

Table 4. The *re*- and *pe*-mutation frequency of spermatozoa in mating number of male moth of *B. mori*

Kinds of Mutagen	No. of mating	No. of eggs tested	<i>re</i> mutation frequency				<i>pe</i> mutation frequency				Total mutation frequency	Average of relative mutagenic activity
			Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity	Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity		
EMS	one	45,216	2	58	60	15.0	4	62	66	5.5	126	10.3
	three	26,190	4	42	46	6.6	4	50	54	7.7	100	7.2
PBS (Control)	one	47,736	2	2	4	-	8	4	12	-	16	-
	three	14,818	0	7	7	-	0	7	7	-	14	-

- 1) Abbreviation are the same in Table 1.
- 2) Tested silkworm variety was C5, and 100 male pupae in one time-mating and 50 male pupae in three times-mating were allotted
- 3) Mutagens were treated in the just before eclosion.
- 4) The volume of treated mutagen per one pupa : EMS; 25 µl 0.1% solution, PCB; 25 µl.
- 5) Mutation frequency represents the value subtracted natural mutation frequency from mutation frequency of treated mutagens.
- 6) Relative mutagenic activity represents the value divided mutation frequency of silkworm treated mutagen into mutation frequency of silkworm treated phosphate buffered saline.

Table 5. Selection of the proper silkworm varieties for mutagen screening test by datum point of a few characteristics.

Varieties of silkworm	Mutagens	Eclosion rate (%)		Rate of moth to lay eggs normally (%)		No. of eggs layed		Fertility (%)		No. of passed item	Selected
		Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male		
Sun3ho	EMS	98	98	59	92	425	495	89	95	3	-
	PBS	97	99	59	89	401	401	90	96	-	-
Sun3ho×	EMS	100	100	91	95	386	511	96	98	7	+
Hansammyeon	PBS	100	100	85	94	365	510	96	97	-	-
Sun3ho×N12	EMS	100	99	81	96	618	523	98	96	8	+
	PBS	98	99	79	94	609	516	98	97	-	-
Sun3ho×C5	EMS	94	100	92	95	549	503	98	98	8	+
	PBS	91	98	90	94	537	431	98	95	-	-
N12 (Control)	EMS	25	86	69	85	571	543	97	96	5	-
	PBS	53	76	50	85	687	527	98	96	-	-

- 1) Tested silkworm variety was N12, and 100 female pupae allotted to the experimental regimes of different silkworm varieties.
- 2) Mutagen, EMS was treated in the eighth day after pupation.
- 3) Moth to lay eggs normally is defined to the female moth layed more than 200 eggs, and which eggs hatched over 50%.
- 4) Rate of moth to lay eggs normally, No. of eggs layed and fertility of male moth represented the value of female of *pe·re·ch*.
- 5) Datum point to pass in each item : 94% for the rate of eclosion; 80% for the rate of moth to lay eggs normally; 500 eggs for No. of eggs layed; 95% for fertility.

Table 6. The *re*- and *pe*-mutation frequency by mutagen, EMS, in oocyte of different silkworm varieties.

Varieties of silkworm	No. of eggs tested	<i>re</i> mutation frequency				<i>pe</i> mutation frequency				Total mutation frequency	Average of relative mutagenic activity
		Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity	Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity		
Sun3ho	23,800	8	50	58	12.6	4	372	376	26.1	434	19.4
Sun3ho× Hansammyeon	35,126	3	40	43	43.0	17	308	325	18.1	368	30.6
Sun3ho× N12	51,294	2	33	35	18.5	23	243	266	27.6	301	23.1
Sun3ho× C5	43,371	2	51	53	53.0	0	288	288	42.1	341	47.6
N12	18,843	0	2	2	1.1	48	28	76	48	78	3.0

- 1) Mutagen, EMS (25 μl 0.1% solution per one pupa) was treated in the eighth day after pupation of female pupa.
- 2) Mutation frequency represents the value subtracted natural mutation frequency from mutation frequency of treated mutagens.
- 3) Relative mutagenic activity represents the value divided mutation frequency of silkworm treated mutagen into mutation frequency of silkworm treated phosphate buffered saline.

수정율 95% 미만인 계통을 제외시킨 후 8개 조사 항목 중 선3호×한삼면, 선3호×C5, 선3호×N12가 합격 항목수가 6개 이상으로 합격항목수가 3개와 5개인 선3호와 N12보다 많아서 산란성 및 강건성 등 주요형질이 개선됨에 따라 변이원 검색에 적합한 계통으로 선정하였다(Table 5).

위의 5개 계통 누에의 자웅별 생식세포의 변이원 감수성을 확인하기 위하여 정세포에서 높은 감수성을 나타내는 EMS를 투여한 야성형 ($pe^+·re^+//pe^+·re^+$) 누에 번데기가 우화한 후 *pe·re//pe·re* 개체와 교배시켜 산란된 알의 색깔로 변이유발 빈도를 조사하였다. EMS에 대한 5개 계통의 난모세포와 *pe*와 *re*의 돌연변이 빈도를 살펴보면

(Table 6), 선3호의 *pe*와 *re*의 돌연변이 빈도배수가 19.4인데 비하여 선3호×한삼면, 선3호×C5, 선3호×N12는 23.1-47.6으로 선3호보다 배수평균이 높아 감수성이 더 우수함을 알 수 있었다. 정세포의 *pe*와 *re*의 돌연변이 빈도의 경우(Table 7) 역시, 선3호×한삼면의 배수평균이 309.1로서 선3호보다 1.6배 높았다. 단지 선3호×C5 및 선3호×N12는 선3호보다는 감수성이 낮았으나 대조인 N12와는 비슷한 수준을 나타내어 이 둘 교배된 품종이 변이원에 대한 감수성이 우수함을 알 수 있었다. 또한 위의 선3호, 선3호×한삼면, 선3호×C5, 선3호×N12, N12 등 5개 계통에 대해서 EMS를 투여한 생식세포간의 돌연

Table 7. The *re*- and *pe*-mutation frequency by mutagen, EMS, in spermatozoa of different silkworm varieties.

Varieties of silkworm	No. of eggs tested	<i>re</i> mutation frequency				<i>pe</i> mutation frequency				Total mutation frequency	Average of relative mutagenic activity
		Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity	Whole mutation	Partial mutation	Sum	Relative mutagenic activity		
Sun3ho	41,580	0	322	322	108.3	602	1,897	2,499	278.7	2,821	193.5
Sun3ho× Hansamyeon	40,880	2	294	296	296.0	0	1,656	1,656	322.2	1,952	309.1
Sun3ho× N12	42,971	7	345	352	89.0	6	1,246	1,252	105.3	1,604	97.2
Sun3ho× C5	50,300	-5	172	167	9.4	3	982	985	141.7	1,152	75.6
N12	71,133	4	198	202	102.0	8	1,347	1,355	68.8	1,557	85.4

- 1) Mutagen, EMS (25 μl 0.1% solution per one pupa) was treated in the eighth day after pupation of male pupa.
- 2) Mutation frequency represents the value subtracted natural mutation frequency from mutation frequency of treated mutagens.
- 3) Relative mutagenic activity represents the value divided mutation frequency of silkworm treated mutagen into mutation frequency of silkworm treated phosphate buffered saline.

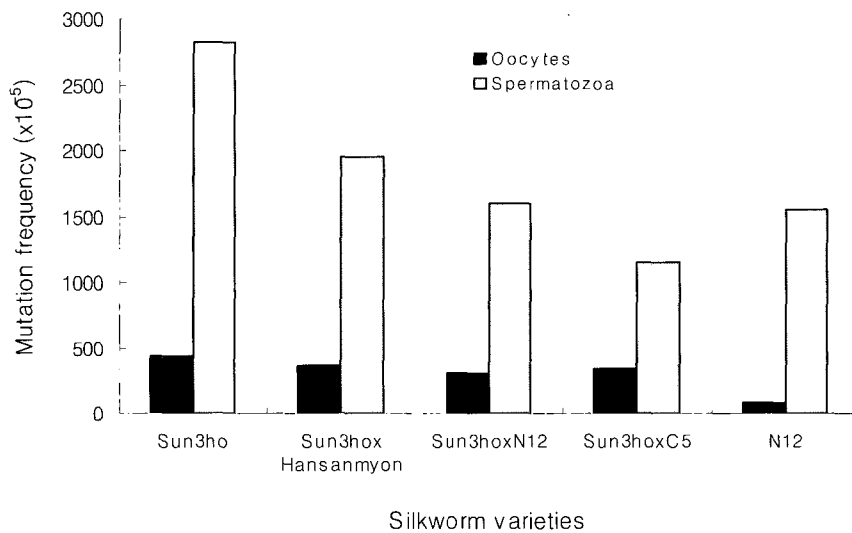


Fig. 4. Mutation frequency by EMS in 5 varieties of *B. mori*. Mutation frequency was obtained from the sum of *pe*- and *re*-mutant.

변이 빈도를 비교해 본 결과(Fig. 4), 난모세포의 경우 선3호×한삼면, 선3호×C5, 선3호×N12 등의 계통은 선3호와 비슷한 돌연변이 빈도를 나타내었으나, 정세포의 경우에는 선3호에 비해서 다소 감수성이 떨어지기는 결과를 나타내었다. 하지만 산란성 및 감수성 등 주요형질이 개선되고 감수성도 유지되어 선3호는 강건성 및 산란성이 우수한 C5와 N12의 교잡으로 인하여 변이원성에 대한 효율성이 개선되었다.

이상의 결과를 종합해보면 여러 가지 변이원에 대해서 감수성을 조사한 결과, 높은 감수성을 나타내었으며, 특히 MMC는 난모세포계에서, EMS는 정세포계에 대하여 특

정적으로 높은 감수성을 보임으로서 누에 알색 관련 특정 좌위돌연변이 검출법이 변이원 검색에 유효하다는 것이 확인되었다. 또한 변이원이 투여된 수나방을 효율적으로 이용하기 위하여 수나방의 사정횟수에 따른 정세포의 변이원 감수성 변화를 조사한 결과, 3교 때까지는 사정된 정자 간에는 큰 차이가 없는 것이 확인되어 적어도 변이원 투여된 수나방을 3번 정도는 이용할 수 있기 때문에 일일이 변이원을 주사기로 변태기에 투여하는 과정의 노력을 많이 줄임 수 있는 것으로 판단되었다. 한편 변이원 감수성은 높으나, 검색계로서 주요형질이 극히 불량한 선3호는 주요형질과 감수성이 우수한 계통과의 교잡으로 주요

형질이 개선되고 높은 변이원 감수성을 유지하는 결과를 얻었다. 이상의 결과들로 볼 때 누에알을 이용한 검색계는 충분히 활용 가능성이 있다고 생각되어진다. 그러나 이 검색계가 변이원 검색현장에서 활용되기 위해서는 기존의 미생물이나 배양세포, 또는 포유류 검색계와의 검색 효율성에 대한 비교 검토가 이루어져야 하겠으며, 또한 이 검색계를 연중 검색할 수 있는 체계가 수립되어야 한다고 판단된다.

Literature Cited

- Aisemberg, J., D.E. Nahabedian, E.A. Wider and N.R. Verrengia Guerrero. 2005. Comparative study on two fresh-water invertebrates for monitoring environmental lead exposure. *Toxicol.* 210: 45-53.
- Cooper, C.S. and P.L. Grover. 1990. Chemical carcinogenesis and mutagenesis I. 1-29 pp. Springer-Verlag publishing company, Berlin.
- Dean, B.J. and N. Danford. 1984. Mutagenicity testing. *In* assays for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cells, eds. by Venitt, S. and Parry, J.M. 187-232 pp. IRL Press, Oxford.
- Fernandez-Bayon J.M., J.D. Barnes, J.H. Ollerenshaw and A.W. Davison. 1993. Physiological effects of ozone on cultivars of watermelon (*Citrullus lanatus*) and muskmelon (*Cucumis melo*) widely grown in Spain. *Environ. Pollut.* 81: 199-206.
- Gee, P., D.M. Maron and B.M. Ames. 1994. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 11606-11610.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Jr. Ishidate. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulonocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res.* 245: 245-249.
- Larsen K.J., S.R. Brewer, D.H. Taylor. 1994. Differential accumulation of heavy metals by web spiders and ground spiders in an old field. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 503-508.
- Kim S.E. M.Y. Ahn, H.J. Yoon, J.G. Kim and J.I. Choi. 2000. A screening system for environmental mutagens by means of specific locus mutation of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. toxicol. Pub. Health.* 16: 53-57.
- Kuroda, Y. 1989. Lectures on method of animal genetics. 124-151 pp. Konglib publishing company, Jappan.
- Kuroda, Y. 1995. Retrieval method of anti-mutagen and -cancer materials. 124-151 pp. Chungdamsa scientific publishing company, Jappan.
- Maron, D.M. and B.B. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 113: 173-215.
- Murakami, A. 1983. Characteristics on mutagenicity test of environmental chemicals using insects. *Environ. Mutation Res.* 5: 12-21.
- Murakami, A. 1984. Dose-response relationships for mutation induced by chemicals in the silkworm. Problems of threshold in chemical mutagenesis. 5-13.
- Tazima, Y. 1978. Mutagenicity testing of environmental chemicals in the silkworm: an important laboratory tool, 247-268 pp. Kodasha publishing company. Tokyo.
- Wurgler, F.E. and E.W. Vogel. 1985. Chemical Mutagens. *In vivo* mutagenicity tests using somatic cells of *Drosophila melanogaster* eds by F.J. de Serres. 1-72 pp. Pleum Press, New York.

(Received for publication 9 October 2006;
accepted 1 November 2006)