

ORIGINAL ARTICLE

Rhabditidae과 선충의 CO II 유전자 클로닝 및 염기서열 분석

이상몽 · 손흥주 · 김근기 · 홍창오 · 박현철*

부산대학교 생명환경화학학과

Cloning and Sequencing of the Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit II Gene from Rhabditidae Family Nematode

Sang Mong Lee, Hong Joo Son, Keun Ki Kim, Chang Oh Hong, Hyeon Cheal Park*

Department of Life Science & Environmental Biochemistry, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Abstract

Cytochrome *c* oxidase subunit II gene(CO II gene) is subunit of cytochrome oxidase, which is complex IV of mitochondria electron transport system. It has been frequently used in molecular phylogenetic studies because the speed of its DNA variation is faster than that of nucleus. It is especially useful in phylogenetic study of molecular biology in insects. In this study, we cloned and sequenced CO II gene of mitochondria DNA from Rhabditidae family nematode. Our results showed that this gene is comprised of 696 base pairs(bp). In the analysis of similarity of this gene with other known genes of 14 species of nematodes in Rhabditida order, we identified that this gene has high similarity with that of *Caenorhabditis briggsae*(86.0%) and *C. elegans*(85.6%) in Rhabditidae family. On the meanwhile, it has very low similarity with that of *Angiostrongylus cantonensis*(31.8%) in Angiostrongylidae family and *Metastrongylus salmi*(31.6%) in Metastrongylidae family. Based on the results of this study, we suggest that this nematode is closely related with that of *Caenorhabditis* genus in Rhabditidae family.

Key words : Cloning, Sequencing, Mitochondria, COII gene, Nematode

1. 서론

선충은 식물체, 토양, 수중 등의 다양한 환경에서 서식하고 있는데(Micoletzky, 1925; Winslow, 1960), 그 중 토양에 서식하는 선충의 역할은 다양하다. 일반적으로 토양 선충은 생태계 내에서 영양물질의 순환 및 천적로서의 역할을 하고 있으나, 일부 선충은 해충으로서 주요 경제적 작물에 피해를 주기도 한다. 이들 중 경제작물에 피해를 주고 있는 토양 선충에 의한 손실액은 전 세계

적으로 1,180억 달러(2001년)로 추산되며, 이는 전체 생산량의 약 10%에 해당한다(McCarter, 2009). 선충 피해가 가장 큰 작물은 벼와 옥수수로, 중국의 경우 총 벼 생산량의 28%가 선충에 의해 피해를 입고 있으며, 미국에서는 전체 옥수수 피해액이 약 100억 달러에 달하는 것으로 알려져 있다. 이 때문에 현재의 선충 연구는 작물 피해를 줄이기 위한 방제에 초점이 맞추어져 활발히 진행되고 있다. 그러나 토양 선충은 인간의 식량 생산에 부정적 역할을 하는 작물 피해 외에도 영양물질의 순환과

Received 31 October, 2018; Revised 13 December, 2018;

Accepted 13 December, 2018

*Corresponding author: Hyeon Cheal Park, Department of Life Science & Environmental Biochemistry, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Phone : +82-55-350-5547

E-mail : hcpark@pusan.ac.kr

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

생물학적 조절자로서의 역할을 하고 있고 이러한 긍정적인 생태학적 역할 때문에 앞으로 환경 친화적 토양 연구 및 생태 복원을 위한 연구에도 선충이 매우 중요하게 이용될 것으로 사료되며(Yeates et al., 1993), 이러한 목적의 생태학적 연구를 위해서는 우선 관심 있는 선충의 계통 발생학적 분류가 필수적일 것이다.

토양에서 가장 흔히 볼 수 있는 선충 중에 하나인 Rhabditidae과 선충은 후생동물계(Metazoa) 선형동물문(Nematoda) 쌍선충강(Chromadorea) Rhabditida목에 속하는 생물이다. 선충은 절지동물문 다음으로 2번째 많은 수의 종이 속해 있어(Agrios, 2005; Nicol et al., 2011) 절대적으로 가장 많은 수의 개체가 포함될 것으로 여겨지고 있다(Chitwood and Chitwood, 1974; Maggenti, 1981; Agrios, 2005). Rhabditidae과에 속한 대부분의 선충은 자유생활(free-living) 선충으로서 Rhabditida 중 가장 많은 수의 종이 포함된 과(Family) 중에 하나이지만(Andrássy, 1976) 아직 많은 종이 확인되지 않았다(Andrássy, 1976; Sudhaus, 1991). 따라서 최근의 계통 분류에서는 Rhabditidae과는 Osche(1952)이 확립한 stomatal(mouth cavity)의 구조를 이용한 진단 방법으로 계통 분류가 진행 되어왔다. 이 계통 분류 방법은 Dougherty(1955)에 의해서 개정이 되었고 이후에는 Sudhaus(1976)가 형태학적, 생태학적, 습성을 서술하여 Rhabditidae과의 계통 분류의 보완에 공헌하였다. 그러나 Rhabditidae과의 이런 다양성이 아직 밝혀지지 않았고 형태학적인 특징이 상사성 진화(homoplasy)한 경향이 있기 때문에 계통분류에 혼란이 많은 것이 사실이다(Sudhaus, 1976; Maggenti, 1981).

분자 생물학적 계통분류에 있어서 개체의 속성, 시간적 변화 과정, 자연군집에서의 유전적 다양성의 형태 패턴의 직간접적 연구 등을 위해 다양한 표지 유전자(Genetic marker)가 이용된다(Avise, 1994, 1995). 그 중 미토콘드리아 DNA의 정보는 핵 DNA 표지들 보다 유전적 구조를 평가하거나 집단, 다른 종들과 유연관계가 있는 종간의 유전자 변화 흐름이나 계통학적인 관계를 밝히는데 유용하다(Avise, 1994). 이는 미토콘드리아 DNA의 유전자가 보존영역과 변이영역이 잘 구분되어 있고 또한 핵 DNA의 유전자보다 빠르게 진화하여 속이나 종간의 유연관계를 분석하는데 유용한 유전자 표지로서 이상적인 특성을 보유하고 있기 때문이다(Miura et

al., 2000). 미토콘드리아 DNA의 유전자 중에 Cytochrome c oxidase subunit II를 암호화 하는 유전자인 CO II gene은 곤충의 계통 분류학적 연구에 가장 유용하게 이용되고 있다고 알려져 있다(Liu and Beckenbach, 1992). 본 연구에서는 Rhabditidae과 미등정 선충의 CO II 미토콘드리아 DNA 염기서열을 밝혀내어 공시한 부식 선충의 분자 생물학적 분류에 중요한 참고자료로 이용하고자 수행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시선충 분양 및 사육

본 연구에 사용된 선충은 Rhabditidae과 선충으로서 경상북도 유기농업연구소로부터 분양 받았으며, NB배지에 선충이 섭취할 세균인 E6BB를 25°C, 200 rpm으로 2일간 배양하였다. 배양한 세균을 선충 배양용 배지인 PDA 배지에 2 ml 접종한 후에 공시선충을 접종하여 25°C에서 7일간 사육하였다. 사육한 선충은 500 mesh 체를 이용하여 수확하고 사용 시까지 냉장고에 보관하였다.

2.2. Genomic DNA의 추출

수확한 선충의 total DNA를 추출하기 위하여 Promega사의 Wizard Genomic DNA Purification Kit를 이용하였다. 수확한 선충을 1.5 ml microtube에 넣은 다음 Nuclei lysis solution을 100 µl 넣고 마쇄기를 이용하여 조직을 분쇄한 후 500 µl를 추가 하여 최종 부피를 600 µl로 하였다. 이후 56°C 항온수조에서 3시간 동안 배양하여 조직을 분해시켰다. 조직을 분해시킨 후 RNase 3 µl 넣고 37°C에서 30분간 배양하였다. Protein precipitation solution을 200 µl 첨가한 다음 vortexing한 후 얼음에 5분간 보관하여 세포 잔해물을 침전시키고 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 다른 1.5 ml microtube에 상층액을 옮기고 isopropanol을 600 µl 넣은 후 가볍게 섞으면서 응축된 DNA가닥을 눈으로 확인하고 DNA를 모으기 위하여 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 70% ethyl alcohol을 1 ml 첨가한 다음 12,000 rpm에 10분간 원심분리하여 DNA를 세척하였다. 이후 상온에서 15분간 ethyl alcohol을 제거하고 DNA 재수화용액(rehydration solution) 50 µl를 첨가하여 65°C 항온수조에서 1시간 동안 DNA를 재수화시켰다. DNA는 1% agarose gel

전기영동을 통하여 확인한 다음, 이후 사용 시까지 -20°C에 냉동 보관 하였다.

2.3. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction: PCR)

추출한 Genomic DNA로부터 목적한 미토콘드리아의 CO II gene을 중합효소연쇄반응(PCR) 방법을 사용하여 증폭시켰다. 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에 보고된 선충 중 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)의 CO II gene을 참고하여 새로운 primer를 제작 하였다. 즉 CO II forward primer(F)는 5'-AGG TTC ATA CCC TTG AGG TGG-3'(21bp)이며, CO II reverse primer(R)는 5'-TCA CAA AGG TCG ACA TAT CAA CTC-3'(24bp)이었다. 반응 용액은 Bioneer사의 AccuPower® PCR premix와 Primer F, R 2 μ l (각 10 pM), template DNA 2 μ l를 넣고 멸균된 증류수로 총 부피를 20 μ l가 되도록 맞추었다. 중합효소연쇄반응은 변성(denaturation): 94°C, 1분, 가열냉각: 51°C, 1분, 중합: 72°C, 1분의 조건으로 35 cycle 시행하였다.

2.4. 중합효소연쇄반응 산물의 Gel을 이용한 분리 및 정제

Bioneer사의 AccuPrep® Gel Purification kit를 사용하여 PCR 산물로부터 Rhabditidae과 선충의 CO II gene을 다음과 같이 정제하였다. PCR 산물은 Agarose gel 전기영동을 한 후 Rhabditidae과 선충의 CO II gene이 포함된 gel을 잘라내었다. 잘라낸 gel은 1.5 ml microtube에 넣은 후, buffer I 용액을 600 μ l 넣고 60°C 항온수조에서 약 12분 동안 배양하여 gel 조각을 충분히 용해시켰다. 용해된 Gel 조각은 강하게 2분간 vortexing한 후 DNA 흡착칼럼에 넣고 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리하였다. DNA binding membrane을 Washing buffer로 2번 세척한 후, 1.5 ml microtube로 DNA 흡착칼럼을 옮긴 후 buffer III(Elution buffer) 용액을 30 μ l를 넣고 12,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 DNA를 회수하였다.

2.5. 중합효소연쇄반응 산물의 vector 삽입

정제한 Rhabditidae과 선충의 CO II gene을 pGEM® - T Easy vector(Promega)에 ligation 시켰다. Ligation

반응 용액은 2X rapid Ligation Buffer 2.5 μ l, vector 1.25 ng, T4 DNA Ligase 1.5 units, Rhabditidae과 선충의 CO II gene 20 ng로 하였다.

2.6. 형질전환

Rhabditidae과 선충의 CO II gene이 삽입된 vector와 competent cell(DH5 α)을 섞은 후에 얼음에 20분간 보존한 후 42°C 항온수조에서 1분간의 열처리하고 다시 얼음에 20분간 보존처리하여 형질전환 시켰다.

2.7. 형질전환된 대장균의 선발

형질전환된 대장균을 LB(+A) agar배지에 접종하여 37°C에 약 12시간 동안 배양하였다. 선별 방법으로 LacZ를 이용하여 형질전환 유무를 colony 색으로 결정할 수 있는 color selection 방법을 이용하였다.

2.8. Plasmid 증식 및 정제

형질전환 된 대장균의 colony를 LB(+A)배지 1 ml에 접종하여 37°C에서 약 16시간 보전처리하여 plasmid를 증식하였다. 증식된 재조합 plasmid를 Bioneer사의 AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit를 사용하여 다음과 같이 정제하였다. 형질전환된 대장균을 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 buffer I 용액을 250 μ l 넣고 재 현탁하고 5분 후에 buffer II 용액을 250 μ l 첨가하여 다시 상온에서 5분간 두었다. 여기에 350 μ l의 buffer III 용액을 넣고 잘 섞은 다음, 얼음에 5분간 보전처리 한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 DNA 흡착칼럼에 옮긴 다음 12,000 rpm에서 2분간 원심분리하고, 침전물에 buffer IV(Washing buffer) 용액을 700 μ l 넣어 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. DNA 흡착칼럼은 새로운 1.5 ml microtube에 옮기고 buffer V(Elution buffer)용액을 30 μ l 넣고 상온에서 5분간 두었다가 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다.

2.9. DNA 염기서열 분석

정제한 재조합 plasmid의 CO II gene은 3,730XL DNA analyzer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

2.10. DNA 분석

염기 서열이 분석된 Rhabditidae과 선충의 CO II

```

-144      AGGTTTCATACCCCTTGAGGTGGTTTCTCTTATTTAAAAGTTTTAGT
-100     ATAATATAGTATATTTTATTGTCAATAAAAAAGGTGAAAACCTTAGATTCT
-50      CTAGTATATTTTAGTACATTTGACTTCCAATCAGAAAGATTTGAGGATTA
  1      ATAAATAATTTTTTTCAAGGATATAATTTAATATTTTCAAATAGTTTTATT
  51      TGCTAGATATATAGATTGATTTTCATAGATTTAATTGTAGTTTATTATTAG
 101      GAGTATTAGTTTTTTGTTGTATTGTTATTTTTTTTATTTAATTGTTAGAAAA
 151      TTTTATTTTAAAAGAAAAAGATTGAATATCAATTTGGTGAATTATTATG
 201      TAGAGTTTTTCTACTTTAATTTTATTAATGCAGATAGTTCCTTCTTTAA
 251      GATTATATATTATTATGGTTTAATAAAATTTGGATAGAAATTTAACAAAT
 301      AAAGTTACTGGTCATCAGTGATATTGAAGATATGAGTTTAGTGATATTCC
 351      TGGATTGGAATTTGATTCTTATATAAAGTCGTTAGACCAATTAATTTAG
 401      GGGAACCTCGTTTATTAGAAGTTGATAATCGTTGTGTTGTACCTTGTGAT
 451      ACAAATATTCGTTTTTGTATCACATCGGCAGATGTAATTCATGCTTGAGC
 501      TTTATCTTCATTATCAGTAAAATTAGATGCTATAAGAGGGGTTTTATCAA
 551      CATTATGTTATAGATTCCTATAGTTGGTGTATTTTACGGACAATGTTCA
 601      GAAATTTGTGGTGCAAATCATAGTTTTTATACCTATTGTTTTAGAAAGTAAC
 651      TTTGTTAGATAATTTTAAAAGATGATGTTTTGGTAATATTGAATAA
 696      GCTTTATAGTTTAAATTAATAAATTTTTGTTTGTGGTACAAAAGATAGAAGA
 697      GCTTTAAATTTTATTTTTATAAATATTTGGTATTGCATATCATTTAAAGGAA
 747      AATTCATATTAATGAATAATAGAAATGAAAGGTAGAAAGATATTTAGTT
 797      TTATTGTTTCATATTAATAATATCTTTAGAGTTGATATGTTCGACCT
 847      TTGTGA

```

Fig. 1. Sequence of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II gene.

gene을 Bioedit 소프트웨어를 이용하여 NCBI에 보고된 Rhabditida 목 14종 선충의 염기서열 비교 및 서열일치도를 분석하였다. 서열비교 분석결과를 이용하여 Maximum Parsimony (MP)방법을 이용하여 계통수를 작성하였다. MP방법은 MEGA 4.0 software를 이용하여 계산하였으며 신뢰도를 향상시키기 위해서 계통관계의 bootstrap 분석을 10,000회 반복으로 수행하였다. 또한 CO II gene의 염기서열이 암호화하는 아미노산 서열도 동정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Rhabditidae과 선충 CO II 유전자 염기서열

클로닝한 Rhabditidae과 선충의 CO II gene의 DNA 염기서열 분석 결과는 Fig. 1과 같다. CO II 유전자는 696bp로 이루어져 있었으며 Adenine 224개(32.18%), Cytosine 54개(7.76%), Guanine 113개(16.24%), Thymine 305개(43.82%)로 구성되어 있었다. 한편, G+C 함량은 23.99%, A+T 함량은 76.01%였다(Table 1).

Table 1. Nucleotide composition of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II gene the family Rhabditidae nematode

Number				Mol(%)				G+C content (%)	A+T content (%)
A	C	G	T	A	C	G	T		
224	54	113	305	32.18	7.76	16.24	43.82	23.99	76.01

3.2. Rhabditidae과 선충 CO II 유전자와 Rhabditida목 14종 선충 CO II 유전자의 염기서열비교분석 및 서열일치도

Rhabditidae과 선충의 CO II 유전자와 Rhabditida목 14종 선충 CO II 유전자의 유전자 비교분석에 이용된 Rhabditida목 선충은 Angiostrongylidae과 *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis*, Cooperiidae과 *Cooperia oncophora*, Haemonchidae과 *Haemonchus contortus*, *Mecistocirrus digitatus*, Heterorhabditidae과 *Heterorhabditis bacteriophora*, Metastrongylidae과 *Metastrongylus pudendotectus*, *Metastrongylus salmi*, Rhabditidae과 *Caenorhabditis briggsae*, *Caenorhabditis elegans*, Steinernematidae과 *Steinernema carpocapsae*, Syngamidae과 *Syngamus trachea*, Trichostrongylidae과 *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus vitrinus* 였으며, 염기서열 비교분석 결과는 Fig. 2와 같다.

이 결과를 이용하여 Rhabditidae과 선충의 CO II 유전자와 Rhabditida목 14종 선충 CO II 유전자의 서열 일치도를 분석한 결과, 서열 일치도는 *Angiostrongylus cantonensis* 31.6%, *Angiostrongylus costaricensis* 33.9%, *Cooperia oncophora* 82.2%, *Haemonchus contortus* 81.6%, *Mecistocirrus digitatus* 80.8%, *Heterorhabditis bacteriophora* 83.1%, *Metastrongylus pudendotectus* 79.1%, *Metastrongylus salmi* 31.8%, *Caenorhabditis briggsae* 86%, *Caenorhabditis elegans* 85.6%, *Steinernema carpocapsae* 80%, *Syngamus trachea* 80.6%, *Teladorsagia circumcincta* 82%, *Trichostrongylus vitrinus* 83%이었다(Table 2).

이러한 결과로 볼 때 Rhabditidae과 선충의 CO II 유전자는 *C. briggsae*와는 86%, *C. elegans*와는 85.6%로 가장 높은 상동성을 보였으며, *M. salmi*와는 31.8%, *A. cantonensis*와는 31.6%로 가장 낮은 상동성을 보였다.

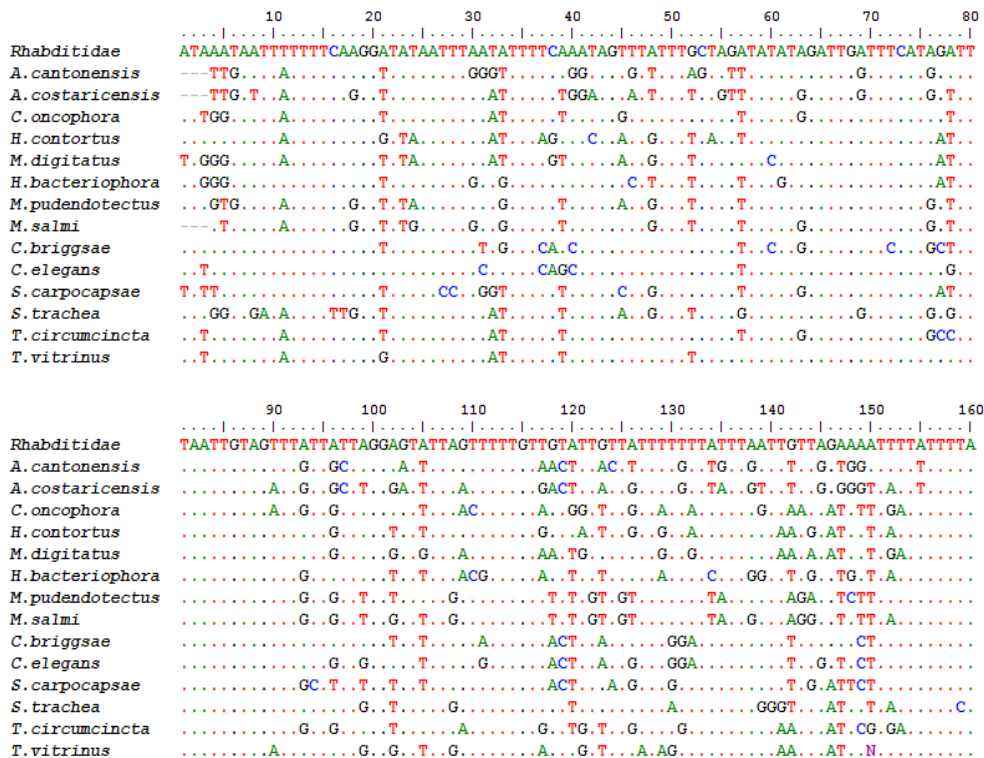


Fig. 2. Sequence alignment of the CO II gene.

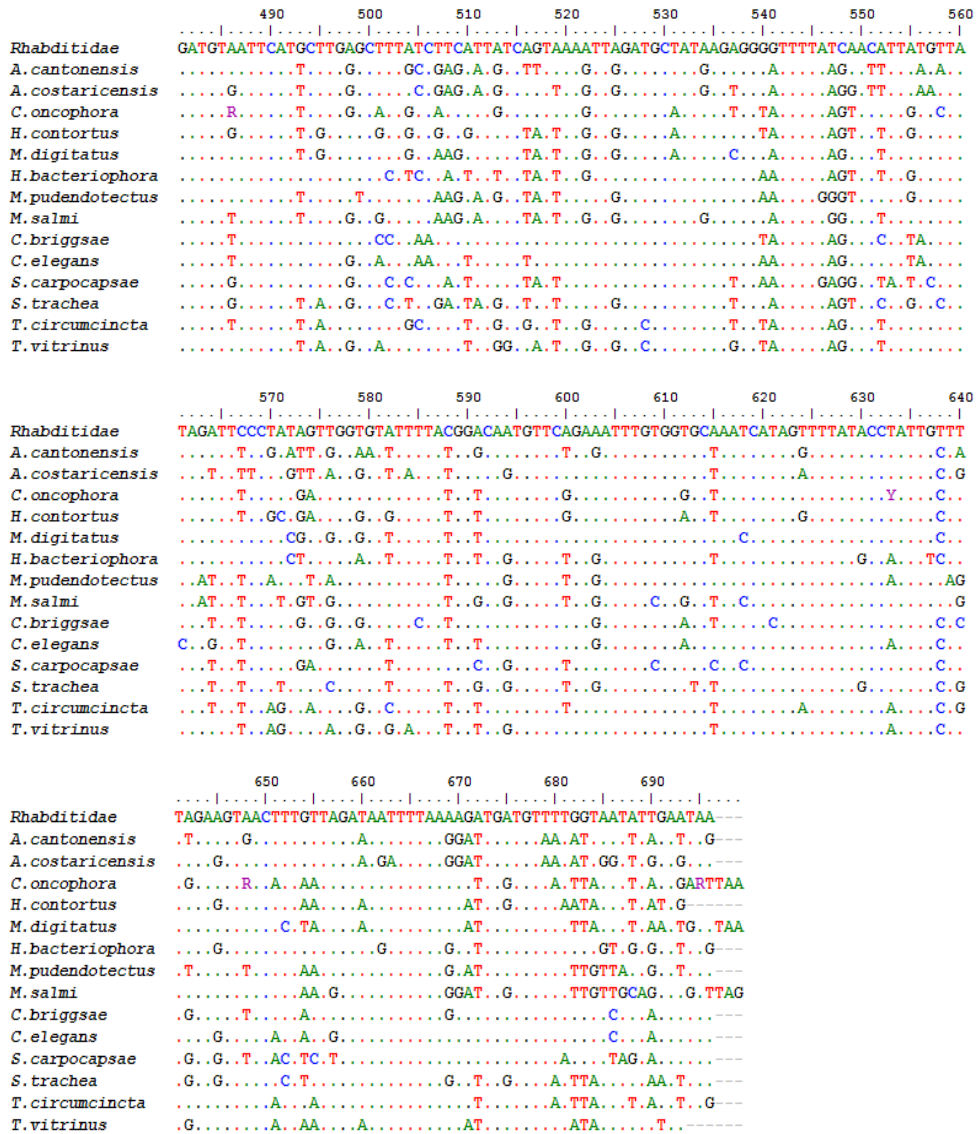


Fig. 2. (continued)

3.3. Rhabditidae과 선충 COII gene과 Rhabditida목

14종 선충 COII gene를 이용한 계통수 작성

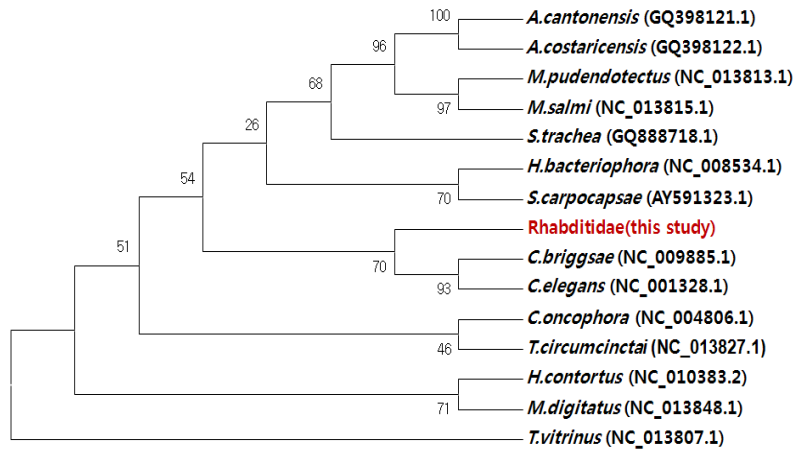
Rhabditidae과 선충 COII gene과 Rhabditida목 14종 선충 COII gene를 이용한 계통수 분석 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 *C. briggsae*, *C. elegans*와 가장 높은 유연관계가 있음을 확인하였다.

3.4. Rhabditidae과 선충 COII의 아미노산 조성 분석

Rhabditidae과 선충 COII의 아미노산 조성을 분석하였다. 분석 결과 Rhabditidae과 선충의 COII는 총 231개의 아미노산으로 구성되어 있었으며, leusine 14.72%, serine 10.82%로 가장 높은 비율로 구성되어 있으며, arginine 1.3%, histidine 1.73%로 가장 낮은 비율로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Table 3, Fig. 4).

Table 2. Comparative analysis of CO II gene sequence identity (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Rhabditidae (this study)	ID														
2. <i>C.briggsae</i>	86	ID													
3. <i>C.elegans</i>	85.6	88.7	ID												
4. <i>H.bacteriophora</i>	83.1	80.7	80.7	ID											
5. <i>T.vitrinus</i>	83	79.1	80	79.3	ID										
6. <i>C.oncophora</i>	82.2	79.9	79.2	80.2	81.8	ID									
7. <i>T.circumcincta</i>	82	80.6	80.3	80.6	83.4	84.1	ID								
8. <i>M.digitatus</i>	80.8	77.8	78.3	79.9	82.6	82.8	83.4	ID							
9. <i>S.trachea</i>	80.6	78.4	77.5	79.7	80.1	79.9	81.3	80.5	ID						
10. <i>S.carpocapsae</i>	80	80	82.4	81.1	77.4	76.8	79.1	78.2	78.3	ID					
11. <i>H.contortus</i>	81.6	79.5	80.1	80.1	83.5	82.1	82.7	84.4	77.7	80.1	ID				
12. <i>M.pudendotectus</i>	79.1	76.7	75.7	78.4	77.7	76.8	77.4	77.3	78.7	76.7	78.3	ID			
13. <i>A.costaricensis</i>	33.9	33.4	32	32.9	31.6	32	30.4	30.4	33.3	31	33.4	31.4	ID		
14. <i>M.salmi</i>	31.8	31.6	32.1	32.7	33.3	33.7	32.7	32.3	32.9	32.4	32.9	32.6	78.3	ID	
15. <i>A.cantonensis</i>	31.6	31.1	29.1	32.4	30.5	32	29.8	30.4	31.6	29.5	32	30.3	85.7	79.1	ID

**Fig. 3.** Dendrogram for Rhabditida(Order) 15 nematode species based on the cytochrome c oxidase II gene.**Table 3.** Evaluation of amino acid composition from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II gene

	Ala (A)	Cys (C)	Asp (D)	Glu (E)	Phe (F)	Gly (G)	His (H)	Ile (I)	Lys (K)	Leu (L)	Met (M)	Asn (N)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	Ser (S)	Thr (T)	Val (V)	Trp (W)	Tyr (Y)
Number	6	9	10	9	21	12	4	11	8	34	10	13	7	6	3	25	7	18	5	13
Mol(%)	2.6	3.9	4.33	3.9	9.09	5.19	1.73	4.76	3.46	14.72	4.33	5.63	3.03	2.60	1.30	10.82	3.03	7.79	2.16	5.63

1 MNNFFQGYNLMFNSLSLFASYMDWFHSFNCSLLLGVLVVFVLLFFYLIVSK
 51 FYFKSKKIEYQFGELLCSVFPTLILLMQMVPSSLLEYGLMNLDSNLTI
 101 KVTGHQWYWSYEFSDIPGLEFDSYMKSLDQLNLGEPRLLEVDNRCVVPD
 151 TNIRFCITSADVIHAWALSSLSVKLDAMSGVLSTLCYSFPMVGVFYGQCS
 201 EICGANHSFMPIVLEVTLLDNFKSWCFGNIE

Fig. 4. Amino acid sequence of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II gene.

4. 결론

위에서 언급한 것처럼, 미동정 Rhabditidae과 선충의 미토콘드리아 DNA로부터 cytochrome *c* oxidase subunit II 유전자를 복제하였으며, 복제한 CO II 유전자의 염기서열을 분석한 결과 696 bp의 염기로 구성되어 있었다. 이 Rhabditidae과 선충의 CO II 유전자를 NCBI에 보고된 Rhabditida목 14종 선충의 CO II 유전자와 염기서열을 비교분석한 결과 Rhabditidae과의 *Caenorhabditis briggsae*와 86%, *Caenorhabditis elegans*와 85.6%로 가장 높은 상동성을 보였으며, Metastrongylidae과 *Metastrongylus salmi*와 31.6%, Angiostrongylidae과 *Angiostrongylus cantonensis*와 31.8%로 가장 낮은 상동성을 보였다.

또한, *Caenorhabditis*속의 *briggsae*와 *elegans*가 88.7%의 상동성을 보이고 *Angiostrongylus*속의 *cantonensis*와 *costaricensis*가 86.7%의 상동성을 보이는 것으로 미루어 볼 때, 같은 속 간에 sequence 상동성은 대체로 85% 이상이였다. 그러므로 본 연구에 사용한 부식 선충의 CO II 유전자의 염기서열이 *Caenorhabditis*속의 *briggsae*과 86%, *elegans*와 85.6%의 상동성을 보이고 있으므로 본 연구에 사용된 부식 선충의 분자 생물학적 계통 분류의 위치는 *Caenorhabditis*속 내에 위치하고 있다고 추정 할 수 있다. 이상 본 연구 결과는 선충의 분자 생물학적 기초 연구 및 계통 분류에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Agrios, G. N., 2005, Plant pathology, 5th ed., Academic Press, New York, 922.
- Andrássy, I., 1976, Evolution as a basis for the systematization of nematodes, 1st ed., Pitman, London, 288.
- Avise, J. C., 1994, Molecular markers, natural history, and evolution, 1st ed., Chapman & Hall, New York, 511.
- Avise, J. C., 1995, Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation, *Cons. Biol.*, 9, 686-690.
- Chitwood, B. G., Chitwood, M. B., 1974, Introduction to nematology, University Park Press, Baltimore, London, Tokyo, 334.
- Dougherty, E. C., 1955, The genera and species of subfamily Rhabditinae Micoletzky, 1922 (Nematoda): a nomenclatorial analysis -including an addendum on the composition of the family Rhabditidae Örley, 1880, *J. Helminthol.*, 29(3), 105-152.
- Liu, H., Beckenbach, A. T., 1992, Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects, *Mol. Phylog. Evol.*, 1(1), 41-52.
- Maggenti, A., 1981, General nematology, Springer, New York, 1-3.
- McCarter, J. P., 2009, Molecular approaches toward

- resistance to plant-parasitic nematodes, in: Berg, R. H., Taylor, C. G. (eds.), Cell biology of plant nematode parasitism, Vol. 15, Springer-Verlag Press, Berlin, 239-267.
- Micoletzky, H., 1925, Die freilebenden süßwasser-und moornematoden Dänemarks nebst anhangüber amöbospodien und andere parasiten bei freilebenden Nematoden, Kong. Dans. Viden. Sel. Skr., 10(2), 55-310.
- Miura, T., Roisin, Y., Matusmoto, T., 2000, Molecular phylogeny and biogeography of the nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific tropics, Mol. Phylogenet. Evol., 17(1), 1-10.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., den Nijs, L., Hockland, S., Maafi, Z. T., 2011, Current nematode threats to world agriculture, in: Jones, J. T., Gheysen, G., Fenoll, C. (eds.), Genomics and molecular genetics of plant - nematode interactions, Springer, Heidelberg, 21-44.
- Osche, G., 1952, Systematik und phylogenie der Gattung *rhabditis* (Nematoda), Zool. Jahab. Abt. Syst., 81, 190-280.
- Sudhaus, W., 1976, Vergleichende untersuchungen zur phylogenie, systematik, ökologie, biologie und ethologie der *Rhabditidae* (Nematoda), Zoologica, 43, 1-229.
- Sudhaus, W., 1991, Check list of species of *Rhabditis* sensu lato (Nematoda: Rhabditidae) discovered between 1976 and 1986, Nematologica, 37, 229-236.
- Winslow, R. D., 1960, Some aspects of the ecology of free-living and plant-parasitic nematodes, in: Sasser, J. N., Jenkins, W. R. (eds), Nematology: fundamentals and recent advances with emphasis on plant parasitic and soil forms, University of North Carolina Press, Chapel Hill, 341-415.
- Yeates, G. W., Bongers, T., de Goede, R. G. M., Freckman, D. W., Georgieva, S. S., 1993, Feeding habits in soil nematode families and genera - an outline for soil ecologists, J. Nematol., 25, 101-313.

-
- 이상몽, 부산대학교 생명환경화학학과 교수
serilsm@pusan.ac.kr
 - 손홍주, 부산대학교 생명환경화학학과 교수
shjoo@pusan.ac.kr
 - 김근기, 부산대학교 생명환경화학학과 교수
kkkim@pusan.ac.kr
 - 홍창오, 부산대학교 생명환경화학학과 교수
soilchem@pusan.ac.kr
 - 박현철, 부산대학교 생명환경화학학과 교수
hcpark@pusan.ac.kr