

뽕나무속 식물의 ITS 영역 염기서열 분석

성규병 · 류근섭* · 김호락 · 남학우 · 구태원 · 조세연
농업과학기술원 잠사곤충부, *경북대학교 농과대학

Analysis of ITS Nucleotide Sequences in Ribosomal DNA of *Morus* Species

Gyoo-Byung Sung, Keun-Sup Ryu*, Ho-Rak Kim, Hack-Woo Nam, Tae-Won Goo and Sae-Yun Cho

Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon, Korea

*Department of National Fiber Science, Kyungpook National University, Taegu, Korea

ABSTRACT

Nucleotide sequence in internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA among mulberry varieties (*Morus* species) were analyzed in order to identify the possibility of classification for the species. The variations in the ITS regions were compared among 9 mulberry varieties and one variety of *Cudrania* species as an outgroup. ITS 1 region of the varieties ranging from 219 to 220 bp in length was 49-50 bp shorter than ITS 2 region. Of 510 sites in the ITS 1 and 2 regions, 148 sites were potentially variable, of which 52% and 48% sites were distributed in ITS 1 and ITS 2 regions, respectively. By pairwise comparisons on the nucleotide sequences in the ITS 1 and 2 regions among 9 mulberry varieties, they were classified into 5 groups. Divergence values of the sequences, however, were considerably low ranging from 0 to 1.3%. Especially, there was no divergence among *Backasipmunja*, *Chungilppong* and *Milsungppong* and *Jungyasang*, *Ssarigol II* and *Yulbon*, respectively.

Key words : Mulberry, Internal transcribed spacer, ITS, *Morus*, ribosomal DNA, Phylogenetic relationship

서 론

누에의 유일한 사료작물인 뽕나무는 有性 및 無性으로 번식하는 목본작물로서 육종이나 유전 연구에 있어서 유전적 특성을 명확히 하는 일은 매우 중요하다.

뽕나무는 온대에서부터 열대에 걸쳐 세계 각지에 널리 분포하고 있으나, 아시아지역에 가장 많이 분포하고 있으며, 중국에 24종, 일본에 19종, 우리나라에 6종, 대만에 4종, 인도, 미얀마, 인도네시아에 각각 3종이 서식하며, 이외에도 태국, 베트남, 아프가니스탄 등 여러 나라에 분포한다(金, 1982; Sanjappa, 1989).

뽕나무 분류는 Linnaeus(1753)가 처음으로 그의 저서 'Species Plantarum'에서 7종으로 분류하였으며, 그 이후 많은 분류학자들에 의해 암꽃 花柱의 有無와 形態, 잎 表皮細胞(epidermis)내의 cystolith 形狀, 잎과 가지의 형태 등 외부 형태적 성상을 근거로 하여 분류되어 왔다. 小泉(1917)는 花柱의 有無와 形態에 따라 2구로 나눈 다음 이것을 柱頭に 微毛를 가지고 있는가, 乳頭突起를 가지고 있는가에 따라 2亞區로 분류하였다. 堀田(1951)는 花柱의

有無외에 表皮細胞 안의 cystolith의 형태에 따라 *dolichosytolithiae cell*과 *bracysytolithiae cell*의 2亞區로 분류하였으며, Katsumata(1971)는 잎의 *idioblast* 형태에 따라 A, B, C, 및 D형으로 분류하였다. 한편 平野(1976, 1980)는 뽕나무 동위효소의 패턴에 따라 5개의 형으로 분류하여 종속간의 차이가 있음을 보고하였다.

이와 같이 다양한 관점에서 뽕나무를 분류하고 있으나 외부형태적 특성은 재배조건이나 환경에 의하여 변할 수 있으며, 또한 관찰자의 경험에 의하여 판단되므로 지속적인 객관성 있는 계통관계를 파악하는데 있어서 많은 혼란이 야기될 수 있다. 한편, 동위효소의 패턴은 일반적으로 환경조건에 따라 차이를 나타내지는 않지만 발육단계나 추출에 이용된 조직의 차이에 따라 영향을 받을 수 있는 한계점이 있다. 따라서 이와 같은 기존의 뽕나무 분류는 보편적이고 객관적인 근거를 바탕으로 체계화되어 있다고 볼 수 없다. 그러므로 계통간 유연관계를 추론하기 위해서는 형태적 형질에 의한 분류체계를 보완 할 수 있는 객관적인 새로운 기준이 요구된다. DNA는 재배환경 또는 발육단계나 조직에 따른 영향을 받지 않기 때문에

염기서열이나 다형현상의 분석에 의한 유연관계 해석은 객관성을 유지할 수 있어서 더 많은 신뢰성을 줄 수 있다. 또한 이와 같은 분자생물학적 방법에 기초를 둔 해석은 유전적 유연관계를 나타내는 것으로서 종간 또는 종내 변이정도와 근연관계를 구명하는 데 있어서 매우 중요한 방법인 동시에 유전육종관련 기초연구에 효과적으로 활용 할 수 있다.

근래에는 기존의 분류방법들을 보완하고 보다 정밀한 정보에 의한 종 및 계통분류를 위하여, 다양한 생물소재를 대상으로 유전적 동질성 및 변이의 확인 수단으로서 염기서열 분석 등의 분자생물학적 방법이 이용되고 있다.

진핵생물의 nuclear ribosomal DNA gene(rDNA)는 18S, 5.8S 및 26S coding 영역과 18S와 5.8S를 접속하는 ITS 1과 5.8S와 26S를 접속하는 ITS 2 및 external non transcribed intergenetic spacer(IGS)의 noncoding 영역으로 나누어진다(Fig. 1).

rDNA의 구성성분 중 18S, 5.8S 및 26S coding영역의 염기서열은 거리가 먼 생체체의 유연관계를 연구하는데 유용하고, 2개의 ITS noncoding영역은 비교적 크기도 작고, 인접한 다른 coding 영역과 비교하여 진화속도가 빠르고 변화가 심하여 종속간에 다양성을 보여주므로 동일 종내의 개체군간 혹은 종간의 비교 및 계통의 유연관계 추정을 위한 marker로서 유용하게 이용되고 있다(Anderson and Stasobski, 1992; Baldwin, 1992; Bailey and Doyle, 1999; Kim and Jansen, 1994).

본 연구는 기존의 형태학적 분류방법을 보완하는 것은 물론 동일 종내 혹은 종간의 rDNA ITS 영역의 염기변이 정도에 따른 유전적 유연관계를 해석하여 뽕나무 품종분류의 기초자료를 얻기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시품종 및 DNA 추출

본 연구의 대상 분류군 선정은 뽕나무 속을 花柱의 有無 및 形態에 따른 분류체계(小泉,1917)에 의하여 분류된 白桑系(*Morus alba* L.) 2종, 山桑系(*Morus bombycis* K.) 2종, 魯桑系(*Morus Lhou*(SER) K.) 4종, 毛桑系(*Morus tiliaefolia* MAKINO) 1종 등 모두 4계통과 outgroup으로

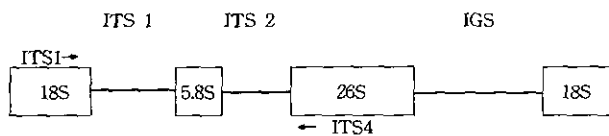


Fig. 1. Schematic representation of the ribosomal DNA repeat unit including 18S, 5.8S, and 26S rRNA. The arrows denote the positions of the PCR primers.

Table 1. List of *Morus* and *Cudrania* species used for DNA analysis in this study

Genotype	Species
Backsipmunja	<i>Morus alba</i> L.
Chungilppong	<i>Morus alba</i> L.
Milsungppong	<i>Morus bombycis</i> K.
Ssarigol II	<i>Morus bombycis</i> K.
Busangwhan	<i>Morus Lhou</i> (SER) K.
Hyungsang	<i>Morus Lhou</i> (SER) K.
Jungyasang	<i>Morus Lhou</i> (SER) K.
Yulbon	<i>Morus Lhou</i> (SER) K.
Mohusang	<i>Morus tiliaefolia</i> MAKINO
Silkworm-thorn	<i>Cudrania tricuspidata</i> BUREAU

서 뽕나무속(*Morus*) 식물과 近緣으로 알려진 뽕나무과(Moraceae)의 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata* BUREAU) 1종 등 10종을 대상으로 하였다(Table 1). 뽕나무와 꾸지뽕나무는 농업과학기술원 잠사곤충부(수원시 서둔동 61 소재) 유전자원 보존포에 보존되어 있는 것을 사용하였다.

DNA 추출은 뽕잎을 채취하여 액체질소로 급속 냉동시킨 상태에서 마쇄하여 미세 분말을 만든 다음 Genomic DNA Purification Kit(Promega, A1120)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 분리하였다.

2. Polymerase Chain Reaction(PCR)에 의한 ITS 증폭 및 sequencing

ribosomal DNA의 ITS 영역(Fig. 1)을 증폭하기 위하여 사용한 primer는 White *et al.*(1990)의 ITS1(5'-TCCGTTAGG TGAACCTGCGG-3')과 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATT GAT ATGC-3')를 사용하였으며, 한국 Bioneer사에 의뢰하여 합성하였다.

PCR 반응은 100 ng의 genomic DNA를 각각의 primer 70 pmole 및 200 μ M dNTPs와 섞은 후 TaKaRa의 10x Buffer용액(100 mM Tris-HCl pH8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂)을 넣고 2.5 unit Taq DNA polymerase를 가한 다음 멸균수로 전체 반응용액을 100 μ l로 하였다.

PCR 반응조건은 95°C에서 2분간 initial denaturation 처리 후, 95°C/60초, 55°C/60초, 72°C/60초로 40 cycle 반응시켰고 72°C에서 7분간 final extension하였다.

PCR 증폭산물의 DNA는 Gene Clean II kit(Bio 101 Inc., USA)를 사용하여 회수하였으며, pGEM-T vector를 이용하여 형질전환하여 Perkin Elmer automatic sequencer (model 377)로 sequencing하였다.

3. 염기서열 및 유연관계 분석

Ribosomal DNA내의 ITS 영역의 분리는 18S, 5.8S, 26S 등의 coding 영역이 잘 보존되어 있는 특성을 이용하여,

기준에 발표된 이들의 염기서열과 비교하는 방법을 사용하였다. 즉, 느릅나무, 토마토 및 벼의 염기서열(Jackson *et al.*, 1999; Kiss *et al.* 1988; Takaiwa *et al.*, 1985)을 Clustal W programme(Thompson *et al.*, 1997, <http://www.clustalw.genome.ad.jp/>)으로 정렬, 비교하여 ITS 1과 ITS 2의 경계부위인 18S, 5.8S와 26S를 구분하고 ITS 영역을 정하였다.

유연관계 분석은 염기서열이 동일한 5.8S를 제외하고 ITS 1과 ITS 2의 염기서열만을 사용하였으며, 분지분석에서 gap은 missing character로 처리하였다. 분지분석은 PAUP(Swofford, 1999)프로그램을 사용하여 가장 짧은 분지도를 가지는 최절약 계통수(most parsimonious tree)를 작성하였으며, 분지도에서의 각 분지에 대한 신뢰도를 계산하기 위하여 '100 replications'를 사용하여 bootstrap 분석(Felsenstein, 1985)을 하였다.

분류군간의 염기변이 산출은 PHYLIP(version 3.5; Felsenstein, 1993)의 DNADIST program에서 transition : transversion을 two-parameter method(Kimura, 1980)로 계산하였으며, 분지분석은 PAUP(version 4; Swofford, 1999)의 'branch and bound search algorithm'을 'collapse of zero-length branches' option과 함께 선택하여 실행하였다. 또한 neighbor-joining tree는 two-parameter method(Kimura, 1980)로 계산된 염기변이 값을 기초로 PHYLIP의 NEIGHBOR program을 이용하여 산출하였다.

결과 및 고찰

1. ITS 염기서열 분석

4계통 뽕나무 9종과 outgroup으로 꾸지뽕나무 1종에 대한 ITS 1과 ITS 2의 길이는 각각 219-234 bp와 269-271 bp이었으며, 5.8S의 길이는 모두 161 bp인 것으로 나타났다(Table 2). ITS 1의 길이는 백상계의 백아십문자, 청일뽕, 산상계의 밀성뽕, 노상계의 형상 및 모상계의 모후상이 219 bp이었으며, 산상제인 싸리골 II, 노상계의 부상환과 울본이 220 bp이었고, outgroup인 꾸지뽕이 234 bp로 가장 큰 것으로 나타났다. ITS 2의 길이는 모든 뽕나무속의 품종들이 269 bp이었으며, 꾸지뽕이 271 bp임이 확인되었다.

뽕나무를 대상으로 한 이 실험결과에서는 ITS 1과 ITS 2의 길이가 각각 219-220 bp와 269 bp로서 ITS 1의 길이는 현재까지 다른 현화식물에서 보고된 범위(187-298 bp)에 포함되는 것으로 나타났으나(Downie and Katz-Downie, 1996; 조 등, 1996; Shi *et al.*, 1998; Ainouche *et al.*, 1999), ITS 2는 다른 식물들의 경우(187-252 bp)보다 다소 큰 것으로 확인되었다. ITS 1과 ITS 2의 상대적인 크기는 대

Table 2. Size and base composition of ITS 1, ITS 2, and 5.8S region of nuclear ribosomal DNA in *Morus* species and *Cudrania* species

Varieties	ITS 1		5.8S		ITS 2	
	Size (bp)	G+C (%)	Size (bp)	G+C (%)	Size (bp)	G+C (%)
<i>Morus alba</i>						
Backasipmunja	219	58.5	161	53.4	269	63.6
Chungilppong	219	58.5	161	53.4	269	63.6
<i>Morus bombycis</i>						
Milsungppong	219	58.5	161	53.4	269	63.6
Ssarigol II	220	58.2	161	53.4	269	63.6
<i>Morus Lhou</i> (SER)						
Busangwhan	220	58.6	161	53.4	269	63.6
Jungyasang	219	58.9	161	53.4	269	63.6
Hyungsang	219	58.9	161	53.4	269	23.6
Yulbon	220	58.2	161	54.0	269	63.6
<i>Morus uliaefolia</i>						
Mohusang	219	58.9	161	53.4	269	63.6
<i>Cudrania tricuspidata</i>						
Silkworm-thorn	234	55.6	161	55.9	271	54.3

부분 거의 유사하거나 ITS 1이 상대적으로 큰 것으로 나타나고 있으나(Bailey and Doyle, 1999; Wojciechowski *et al.*, 1993; Kiss *et al.*, 1988), 뽕나무의 경우는 ITS 2가 큰 것으로 나타나 다른 경향을 보였다. 뽕나무들의 5.8S의 길이는 모두 161 bp로서, 163-166 bp로 알려진 다른 현화식물(Suh *et al.* 1992; Baldwin *et al.*, 1995; Downie and Katz-Downie, 1996; Starr *et al.*, 1999)과 큰 차이가 없었으나, *Sphaerocardamum*의 172 bp 보다는 적은 것으로 나타났다(Bailey and Doyle, 1999).

염기의 G+C 비율은 ITS 1 영역에서는 꾸지뽕이 55.6%로서 가장 낮았으며, 뽕나무 품종들은 58.2-58.9%를 나타내었다(Table 2). ITS 2에서는 꾸지뽕이 54.3%로서 ITS 1에서와 같이 최저치를 나타내었으며, 다른 뽕나무 품종들은 모두 63.6%이었다. ITS 1과 ITS 2 영역의 G+C 비율의 차이는 식물의 종류에 따라 달라서 Carex와 같이 ITS 1 영역이 높은 경우(Starr *et al.*, 1999)와 Fabaceae와 같이 ITS 2 영역이 높은 경우(Wojciechowski *et al.*, 1993)등 일정한 경향이 없으나, 뽕나무는 ITS 2 영역이 높은 결과를 나타내었다. 한편 5.8S에서는 꾸지뽕이 55.9%로 가장 높았으나 뽕나무 품종들은 53.4-54.0%를 나타내어 다른 spacer 영역에 비하여 낮은 값을 보였다.

뽕나무 9 품종과 꾸지뽕나무의 정렬된 염기서열에서 관찰된 indel은 32군데이었으며, 대부분의 indel은 1-3 bp의 크기이나 꾸지뽕나무의 ITS 1 부위에서 12 bp의 가장 큰 insertion이 나타났다(Fig. 2).

뽕나무 품종들간의 ITS 영역의 염기서열 변이는 ITS 1 영역에서 0-1.8%로서 부상환과 형상, 그리고 정야상그릅

18S

Backasipmunja AAGGATCATTGTCGAAACCTGCAAAGCAGAAAGACCAGCGGACCCATTACAACACCC-AGGGGTG-----ACCCCAACCCC(1-90)
 Chungilppong
 Jungyasang
 Milsungppong
 Ssarigol II
 Busangwhan
 Hyungsang
 Yulbon
 Mohusang
 Silkworm-thorn G.....CC.....C...A...TG...GT,C.T,GTG,T....GGGGTGCAGCATGC...TTCG,T.A

Backasipmunja TGACGCTGAGTGTGTGCAGCCCTGCCTTGCGCCCTCAGCATAAAACGAACCCAGGCGCGGAACCGTCAAGGAATCATAACGAAACGAGC(91-180)
 Chungilppong
 Jungyasang
 Milsungppong
 Ssarigol II
 Busangwhan
 Hyungsang
 Yulbon
 MohusangG.....
 Silkworm-thorn .C.T..CA...C...C.TT,A..G,CA.....G..CCTG.....C.....A.....AG,C..T.....G

ITS 1 5.8S

Backasipmunja TCCTGCCGTGGCCCCGGGGACGGTG---ATCGCCGAGCAGCTGTGTTGTGCTT-GGTT-AAGTCTAAAATGACTCTCGGCAACGGATAT(181-270)
 Chungilppong
 JungyasangAA.....
 Milsungppong
 Ssarigol IIAA.....
 BusangwhanAA.....
 HyungsangG.....
 YulbonAA.....
 Mohusang
 Silkworm-thorn G,-.A..AA,T.A.TA,AATT...TAT...TTG,TG.TC..A---C...G.....G.....T..C.....

Backasipmunja CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA(271-360)
 Chungilppong
 Jungyasang
 Milsungppong
 Ssarigol II
 Busangwhan
 Hyungsang
 YulbonC.....
 Mohusang
 Silkworm-thornC.....

5.8S ITS 2

Backasipmunja GTTGCGCCTGAAGCCATCAGGCTGAGGGCAC-GTCTGCCTGGGCGTCAAACACCGATGCCCCCCAAATCCCTCGTCACTCTCCCTGA(361-450)
 Chungilppong
 Jungyasang
 Milsungppong
 Ssarigol II
 Busangwhan
 HyungsangC.....
 Yulbon
 Mohusang
 Silkworm-thornC.....C..TC.....C...T.T.....T...T.....T.....GTTGTGT.

Fig. 2. Continued.

뽕나무속 식물의 ITS 영역 염기서열 분석

```

Backasipmunja GTGCCCGGGAGTGTGGGGTCGGATGATGGCCTCCCGTG---TCTTGGCT-CGCGTTGGCCCAAAGTCGAGTCCTCGGTACCGTTAC(451-540)
Chungilppong .....
Jungyasang .....
Milsungppong .....
Ssarigol II .....
Busangwhan .....
Hyungsang .....
Yulbon .....
Mohusang .....
Silkworm-thorn ...AT.T..C.AAAA..G..T..AT.....CGA.A.G.A..T.AT.....C..A.....CTT.....TGC.T

Backasipmunja CGTGGTGACAGGTGGTTGTGGTCGGTACCCCGTCACGTGC-GCCGGACACGAATCGAGACTCTCTTGATTACCCCAACGCATCCC(541-630)
Chungilppong .....
Jungyasang .....
Milsungppong .....
Ssarigol II .....
Busangwhan .....A.....G.....
Hyungsang .....
Yulbon .....
Mohusang .....
Silkworm-thorn T...CA.A.....A..AG.C..T.....T..AT....A...T.AA.G....C.AG---G.....T....GA
    
```

ITS 2 26S

```

Backasipmunja C-GTTTGGGTGCTCTGATGTGACCCAGGTCAGGCGGGCTACCCGCTGAGTTTAA(631-688)
Chungilppong .....
Jungyasang .....
Milsungppong .....
Ssarigol II .....
Busangwhan .....
Hyungsang .....
Yulbon .....
Mohusang .....G.....
Silkworm-thorn TA..G.A.....T.TGA.A.C.....
    
```

Fig. 2. Aligned nucleotide sequences of ITS regions in 9 varieties of *Morus* species and one of *Cudrania* species. The dashes indicate gaps inserted for alignment and the periods denote identical bases to the first variety.

(정야상, 짜리골 II와 율본)과 모후상이 1.8%로 최대치를 보였으며, ITS 2 영역에서는 0-1.11%로서 다른 *Acer*속 (*Aceraceae*) 13종 : 0-16.5%, *Hamamelidaceae*의 32종 : 1.4-33.4%, *Winteraceae*의 7속 : ITS 1과 ITS 2가 각각 0-11.8%와 0-12.9%, *Brassicaceae* 6종 : ITS 1과 ITS 2가 각각 0-24.2%와 0-19.7%)에 비하여(조 등, 1996; Li *et al.*, 1999; Suh *et al.*, 1993; Baily and Doyle, 1999) 변이의 폭이 매우 낮았으나(Table 3), 뽕나무의 ITS 2 영역의 염기서열 변이가 ITS 1 영역보다 낮은 것으로 나타나, Liston 등 (1996)과 Cheng(2000)의 보고와 같은 경향을 나타내었다. 5.8S coding 영역에서는 하나의 염기 삽입이 있었고, 하나의 염기치환이 관찰되었으나, 염기변이는 높지 않았다(Fig. 2).

ITS 1과 ITS 2 영역을 합한 뽕나무 품종간 염기변이는

0-1.3%를 나타내어 유전적으로 매우 가까운 것으로 판단되었으며, 백아십문자, 청일뽕과 밀성뽕이 그리고 정야상, 짜리골 II와 형상이 0%를 나타내어 염기변이가 없는 것으로 나타났다.

현재 뽕나무 분류에 널리 이용되고 있는 암꽃 花柱(style)의 길이 및 花頭(stigma)의 형태에 의한 분류체계(小泉, 1917)에 따르면 24종으로 분류한 것과 같이 뽕나무 품종이 어느 종에 속하는지는 각 종의 표본과 형태적으로 어느 정도 가까운가에 따라 결정하였으며, 우리나라에 자생하고 있거나 도입되어 재배되고 있는 뽕나무 품종들이 대부분 白桑系(*Morus alba* L.), 山桑系(*Morus bombycis* K.) 또는 魯桑系(*Morus Lhou*(SER.) K.)에 속해 있으나 일반적으로 높은 交雜親和性을 가지고 있어(堀田, 1951) 유전자의 급속한 균일화가 진행되어 유전적 유연관계가 매우

Table 3. Pairwise comparisons on sequence divergence and differences of nucleotides in ITS 1 and ITS 2 region among nine *Morus* varieties and Silkworm-thorn as outgroup

	1	2	3	4	5	6
ITS 1+ITS 2(combined)						
1. Silkworm-thorn	-	0.331	0.337	0.333	0.337	0.329
2. Backasipmunja Chungilppong Milsungppong	169	-	0.008	0.002	0.004	0.004
3. Busangwhan	174	4	-	0.010	0.004	0.013
4. Hyungsang	170	1	5	-	0.006	0.006
5. Jungyasang Ssarigol II Yulbon	172	2	2	3	-	0.010
6. Mohusang	168	2	6	3	5	-
ITS 1						
1. Silkworm-thorn	-	0.387	0.400	0.391	0.400	0.387
2. Backasipmunja Chungilppong Milsungppong	91	-	0.009	0.013	0.009	0.004
3. Busangwhan	94	3	-	0.018	0.000	0.013
4. Hyungsang	92	1	4	-	0.013	0.009
5. Jungyasang Ssarigol II Yulbon	94	2	0	3	-	0.018
6. Mohusang	91	1	3	2	4	-
ITS 2						
1. Silkworm-thorn	-	0.283	0.290	0.283	0.283	0.280
2. Backasipmunja Chungilppong Milsungppong	78	-	0.003	0.000	0.000	0.003
3. Busangwhan	80	1	-	0.003	0.007	0.011
4. Hyungsang	78	0	1	-	0.000	0.003
5. Jungyasang Ssarigol II Yulbon	78	0	2	0	-	0.003
6. Mohusang	77	1	3	1	1	-

Percent sequence divergence is presented above diagonals and their numbers of nucleotide differences are given below diagonals.

가까워진 것으로 추측된다. 이러한 이유로 염기서열의 변이가 크지 않으며, 이들의 육성 또는 교잡생산 연한이 길지 않을 것으로 판단된다.

또한 noncoding 영역의 DNA 염기서열이 coding 영역에 비하여 빠른 속도로 진화되었을 것으로 기대되어 ITS 영역이 계통분류에 널리 이용되고 있으나, 길이가 길지 않아서 Bailey and Doyle(1999)가 언급한 바와 같이 유연관계 해석에 충분치 못한 때문일 수도 있다. 그러므로 형

태적인 특성을 지배하는 DNA의 coding 영역에 있어서 염기서열 변이와 본 연구의 ITS noncoding 영역에서의 결과와 비교 검토한다면 보다 다양한 염기변이를 근거로 하여 중간 유연관계를 비교적 정밀하게 밝힐 수 있을 것으로 기대된다. 아울러 분류의 marker로 이용될 수 있는 genome내의 다른 영역의 염기변이분석과 같은 분자생물학적인 연구를 통하여 보다 명확한 유연관계 해석에 의한 분류가 가능할 것으로 생각된다.

2. 뽕나무 품종간 유연관계 분석

유연관계 분석은 coding 영역으로 염기서열의 변이가 거의 없는 5.8S 부분을 제외하고 ITS 1과 ITS 2의 염기서열만을 사용하여 수행하였다. 그 결과, 총 510개 site 중 148개의 variable site가 나타났으며, 이들 중 2개가 2개 이상의 품종에서 공유되어 해상력을 제공하는 형질(informative site)로서 판단되었다(Fig. 2). Informative site를 부위별로 살펴보면 ITS 1이 52.0%를 그리고 ITS 2가 48.0%를 차지하는 것으로 나타났다.

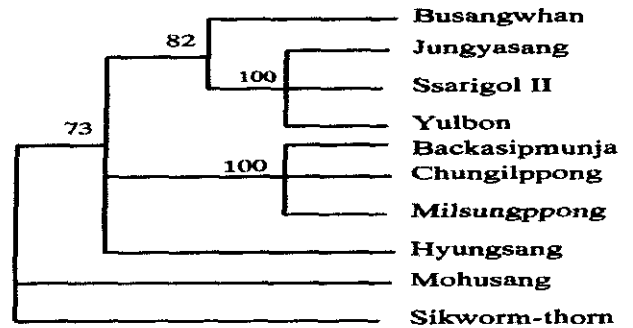


Fig. 3. The single most parsimonious tree based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA(CI=1.000, RI=1.000) in *Morus* species. The tree was rooted using Silkworm-thorn as outgroup. The numbers above branches indicate the bootstrap values in 100 replicates.

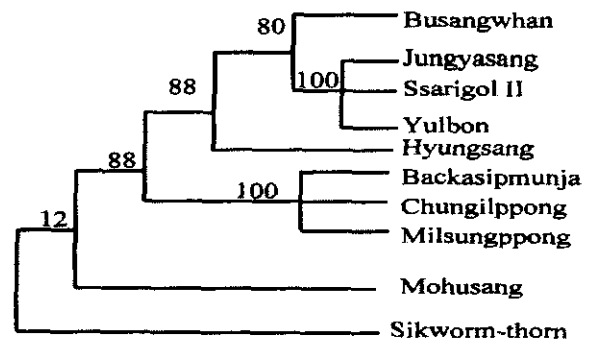


Fig. 4. The single most parsimonious tree based on PHYLIP analysis of ITS sequences in *Morus* species. The numbers shown above branches were bootstrap values for 100 replications obtained from the subprogram CONSENSE.

백아십문자, 청일뽕과 밀성뽕이 염기서열이 동일하여 변이가 없었고, 또한 정야상, 짜리골 II와 울본이 마찬가지로 완전히 일치하여 유전적으로 높은 상동성을 나타내고 있음을 인정할 수 있었다.

PAUP 분석 결과, 최절약 계통수를 얻었으며(Fig. 3), consistency index와 retention index는 각각 1.00으로 나타났다. 본 계통수의 경우 공시한 9종의 뽕나무 품종들을 5개의 분류군으로 나눌 수 있었으며, 기부에서 毛桑系에 속하는 모후상이 하나의 독립된 분계조를 형성하였으나, 부상환과 정야상군(정야상, 짜리골 II, 울본)이 그리고 백아십문자군(백아십문자, 청일뽕, 밀성뽕)과 형상이 자매군 관계를 형성하면서 분지되어 독립된 분계조를 형성하지 않아서 노상계의 부상환은 백상계의 정야상, 산상계의 짜리골 II 및 노상계의 울본과 가까운 관계임이 인정되었다.

Kimura(1980)의 염기치환율 'K'값(Kimura, 1980)을 기초로 하여 얻어진 neighbor-joining tree(Saitou and Nei, 1987)는 Fig. 4와 같으며, PAUP 분석에 의한 계통수와 같이 모후상이 하나의 독립된 분계조를 형성하면서 기부에서 분기되었다. 또한 정야상군(정야상, 짜리골 II, 울본)은 부상환과 그리고 형상은 백아십문자군(백아십문자, 청일뽕, 밀성뽕)과 각각 자매군으로 연결되어, 계통수의 양상은 최절약 계통수와 유사한 양상을 보였다.

적 요

본 연구는 형태적인 특성에 의해 분류가 이루어져, 객관성이 부족한 뽕나무를 대상으로 분자생물학적인 기법을 활용하여 유연관계를 분석하여 뽕나무 품종분류의 기초자료를 얻기 위하여 본 실험을 수행하였다.

백상계, 산상계, 노상계 및 모상계에 속하는 뽕나무속(*Morus* spp.) 9종과 꾸지뽕나무를 대상으로 rDNA의 5.8S를 포함하는 ITS 영역의 염기서열을 비교하여 품종간 유연관계를 분석하였다.

ITS 영역의 염기서열 분석결과 ITS 1 영역은 219-220 bp이었으나, ITS 2 영역은 269 bp로 나타났으며, ITS 영역 510개 site 중에서 148개의 variable site가 나타났으며, 영역별로는 ITS 1이 52%를 차지하고 ITS 2가 48%를 차지하였다.

ITS 염기서열 분석에 의한 뽕나무 품종간 유연관계 분석 결과, 9개의 공시 품종을 5개의 군으로 분류할 수 있었으나, 염기서열 변이는 모든 품종에서 0-1.30%로 매우 낮았다. 특히 2개의 분류군(백아십문자, 청일뽕 및 밀성뽕과 정야상, 짜리골 II 및 울본)에서 염기서열의 변이가 없어 유전적으로 유사도가 매우 높은 것이 확인되었다.

사 사

본 연구를 수행함에 있어 유용한 정보와 유연관계 분석에 많은 도움을 주신 농업과학기술원 잠사곤충부 김익수 박사님께 감사드립니다.

인용문헌

- Ainouche A.-K. and R. J. Bayer(1999) Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Am. J. Bot.* **86**(4) : 590-607.
- Anderson, J. B., and E. S. Stasobski(1992) Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia*. **84**(4) : 501-506.
- Baily, D. C. and J. J. Doyle(1999) Potential phylogenetic utility of the low-copy nuclear gene *Pisillata* in Dicotyledonous plants: Comparison to nrDNA ITS and trnL intron in *Sphaerocaradum* and other Brassicaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* **13**(1) : 20-30.
- Baldwin, B. G.(1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants : An example from the Compositae. *Molec. Phylogene. Evol.* **1** : 3-16.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter M. F. Workiechowski, C. S. Campbell and M. J. Donoghue(1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence of angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **82** : 247-277.
- Cheng, Y., R. G. Nicolson, Kim Tripp and S.-M. Chaw(2000) Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae genera inferred from Chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA ITS region. *Mol. Phylogenet. Evol.* **14**(3) : 353-365.
- 조혜정·김상태·서영배·박종욱(1996) 단풍나무속 일부 종의 ITS 염기서열과 계통학적 고찰. *Kor. J. Plant Tax.* **46**(4) : 271-291.
- Downie, S. R. and D. S. Katz-Downie(1996) A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae : Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* **83** : 234-251.
- Felsenstein, J.(1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* **39** : 783-791.
- Felsenstein, J.(1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5. Department of Genetics. University of Washington. Seattle.
- 平野 久, 中島建次(1976) クワ科植物におけるパーオキシゲン-ゼアインザイム 패턴의 種屬間差異. *蠶絲研究.* **98** : 19-24.
- 平野 久(1980) クワ의 탄닌 함유에 관한 育種學的 研究. *蠶試報.* **28** : 67-186.
- 堀田禎吉(1951) 農學大系作物部門 桑編. 養賢堂. 24-44.
- Jackson, R. B., Moore, L. A., Hoffmann, W. A., Pockman, W. T. and Linder, C. R.(1999) Ecosystem rooting depth determined with caves and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**(20) : 11387-11392.
- Katsumata(1971) Shape of idioblasts in mulberry leaves with spe-

- cial reference to the classification of mulberry trees. *J. Sericult. Sci. Japan.* **40**(4) : 323-322.
- Kim, K. J. and R. K. Jansen(1994) Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions(*Krigia*): Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA, *Pl. Syst. Evol.* **190** : 157-185.
- 金文浹(1982) 裁桑學. 郷文社. 64-67.
- Kimura, M(1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparable studies of nucleotide sequences. *J. Molec. Evol.* **16** : 111-120.
- Kiss, T., M. Kis, S. Abel and F. Solymosy(1988) Nucleotide sequence of 17S-25S spacer from tomato rDNA. *Nucl. Acids Res.* **16** : 7179.
- 小泉源一(1917) 桑屬植物考. 蠶試報. **3** : 1-62.
- Linnaeus, C(1753) *Species Plantarum*. Stockholm. Li, J., A. L. Bogle and A. Klein(1999) Phylogenetic relationships of the Hamamelidaceae inferred from sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Am. J. Bot.* **86**(7) : 1027-1037.
- Liston, A., Robinson, W. A., and Oliphant, J. M(1996) Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of non-flowering seed plants. *Syst. Bot.* **21** : 109-120.
- Saitou, N. and M. Nei(1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* **4** : 406-425.
- Sanjappa M(1989) Geographical distribution and exploration of the genus *Morus* L. (Moraceae). In *Genetic resources of mulberry and utilization*. Sengupta K., Dandin S. B. (eds). Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore. 4-7.
- Shi, S., H. T. Chang, Y. Chen, L. Qu, J. Wen(1998) Phylogeny of the Hamamelidaceae based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Biochem. Syst. Ecol.* **26** : 55-69.
- Starr, J. R., R. J. Bayer, and B. A. Ford(1999) The phylogenetic position of *Carex* section *Phyllostachys* and its implications for phylogeny and subgeneric circumscription in *Carex* (Cyperaceae). *Am. J. Bot.* **86**(4) : 563-577.
- Suh, Y., L., B. Thien and E. A. Zimmer(1992) Nucleotide sequences of internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene in *Canella winterana* (Magnoliaiales: Canellaceae). *Nucl. Acids Res.* **20** : 6101-6102.
- Suh, Y., L., B. Thien, H. E. Reeve and E. A. Zimmer(1993) Molecular evolution and phylogenetic implication of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Amer. J. Bot.* **80** : 1042-1055.
- Swofford, D. L(1999) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer. Sunderland. Massachusetts. USA.
- Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura(1985) Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from rice rDNA. *Pl. Molec. Biol.* **4** : 355-364.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins(1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* **24** : 4876-4882.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor(1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Innis M, S. Gelfand, J. Sninsky and T. White (eds). Academic Press. San diego. 315-322.
- Wojciechowski, M. F., M. J. Sanderson, B. G. Baldwin and M. J. Domoghue(1993) Monophyly of aneuploid *Astagalus* (Fabaceae) Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* **80** : 711-722.