

Short Communication



CrossMark

Open Access

고온에서 배추좀나방 유충 지방체의 유전자 발현 변화 분석

김광호¹, 이대원^{2*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 작물보호과, ²경성대학교 화학생명과학부 생명과학전공

Analysis of Gene Expression in Larval Fat Body of *Plutella xylostella* Under High Temperature

Kwang Ho Kim¹ and Dae-Weon Lee^{2*} (¹Crop Protection Division, Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea, ²Department of Life Sciences, School of Chemistry and Life Sciences, Kyungshung University, Busan 48434, Korea)

Received: 22 November 2018/ Revised: 17 December 2018/ Accepted: 21 December 2018

Copyright © 2018 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

ORCID

Dae-Weon Lee

<https://orcid.org/0000-0002-6076-6070>

Abstract

BACKGROUND: Insects are ectothermic organisms in terrestrial ecosystems and play various roles such as controlling plant biomass and maintaining species diversity. Because insects are ectothermic, their physiological responses are very sensitive to environmental temperature which determines survival and distribution of insect population and that affects climate change. This study aimed to identification of genes contributing to fitness under high temperature.

METHODS AND RESULTS: To identify genes contributing to fitness under high temperature, the transcriptomes of fat body in *Plutella xylostella* larva have been analyzed via next generation sequencing. From the fat body transcriptomes, structure-related proteins, heat shock proteins, antioxidant enzymes and detoxification proteins were identified. Genes encoding proteins such as structural proteins (cuticular proteins, chitin synthase and actin), stress-related protein (cytochrome P450), heat shock protein and antioxidant enzyme (catalase) were up-regulated at high temperature. In contrast expression of glutathione S transferase was

down-regulated.

CONCLUSION: Identifications of temperature-specific up- or down-regulated genes can be useful for detecting temperature adaptation and understanding physiological responses in insect pests.

Key words: Gene expression, *Plutella xylostella*, Temperature, Transcriptome,

서 론

온도 변화에 대한 생물종의 적응은 주로 생태적, 생리적 특성에 의존한다. 제한된 적응온도는 생물종의 지리적 분포, 지역에 따른 적응 등을 결정한다(Sunday *et al.*, 2014; Deutsch *et al.*, 2008). 넓은 적응온도 범위를 가지기 위해서 생물종은 많은 생리적 비용을 필요로 하며, 서식환경 온도에 종이 적응함으로써, 지리적 분포를 결정하게 된다(Sunday *et al.*, 2014). 고온에 적응하기 위한 생물종에서 제한된 표현형의 가소성과 적응능력이 요구된다(Leal and Gunderson, 2012; Barrett *et al.*, 2011). 육상 생태계에 서식하는 곤충은 외온 동물로서 주변환경의 온도변화에 민감하다. 온도는 곤충의 생존 개체군, 분포를 결정짓는 중요한 물리적 요인이다(Bauerfeind and Fischer, 2014; Chown *et al.*, 2006, 2010; Deutsch *et al.*, 2008).

온도는 곤충과 같은 변온동물의 대사속도를 결정함으로써, 경쟁, 포식, 먹이섭식과 같은 생태계의 상호작용에 영향을 미

*Corresponding author: Dae-Weon Lee

Phone: +82-51-663-4644; Fax: +82-51-627-4645;

E-mail: daeweonlee@ks.ac.kr

친다(O'Connor *et al.*, 2009; Vucic-Pestic *et al.*, 2011). 온도가 상승함에 따라 대사요구는 급격히 증가하기 때문에, 곤충은 대개 먹이섭식을 증가시키거나 증가하는 대사의 비용을 낮추기 위해 먹이의 질로 보완하기도 한다(Lemoine *et al.*, 2013; O'Connor, 2009). 이러한 결과로 먹이활동은 온도가 상승함에 더 증가하는 경향을 보인다(Hillebrand *et al.*, 2009; Vucic-Pestic *et al.*, 2011). 그러나 소비속도나 적응성은 최적 온도 이상에서 오히려 급격히 감소한다(Lemoine and Burkepile, 2012). 적응과 진화적 요인들은 온도의 최적화를 결정하고, 생물종들은 서로 다른 온도반응곡선을 가지게 된다(Angilletta *et al.*, 2004). 곤충은 육상생태계의 조절에 관여하며, 식물생체량을 조절하고, 종 다양성을 유지하고, 영양순환을 강화한다(Bagchi *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013; Metcalf *et al.*, 2014). 곤충은 변온동물이기 때문에, 에너지의 소비와 생산속도를 포함한 생리적 반응속도는 직접적으로 온도와 관련이 있다(Sable and Rana, 2016).

배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)은 십자화과 작물의 주요해충으로, 영기는 1-4령, 번데기, 성충의 생활사를 가지며 (Talekar and Shelton, 1993), 전세계적 분포를 가진다(Lee *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2001). 수십 년 동안 살충제를 이용한 방제법이 적용되었고, 신경독성을 일으키는 약제의 살포는 비표적 생물에 부작용들을 많이 일으켰다(Dennis and Weisenburger, 1993; Zhang *et al.*, 2016). 또한 배추좀나방의 살충체에 저항성의 발달과 농경지에 잔류된 식물보호제의 잔류독성은 농업생태계의 심각한 오염과 방제비용의 증가를 초래하였다 (Lee *et al.*, 1993). 배추좀나방은 겨울철 최저 일평균기온이 0°C 이상이 되는 지역에서 월동가능하며, 7°C 이상의 온도에서 발육 및 성장이 가능하기 때문에 우리나라의 남부지방에서는 월동이 가능하다(Kim *et al.*, 2014). 남부지방의 연간 발생세대는 10세대이상으로, 여름철 고온에도 세대유지가 가능하기 때문에 고온에도 적응된 종으로 파악된다(Kim *et al.*, 2014).

본 연구는 배추좀나방에서 고온 적응에 기여하는 요인을 유전자 수준에서 동정하기 위해, 유충을 고온(35°C)과 상온(25°C)으로 나누어서 사육하였다. 사육된 유충으로부터 대사 반응의 중심인 지방체에 대해 전사체를 분석하고, 대조구인 상온에서 발현되는 유전자군과의 비교를 통해 고온에서 발현 차이가 나는 유전자군을 동정하였다.

재료 및 방법

배추좀나방 사육

배추좀나방의 번데기(50개체)는 안동대학교 식물의학과로부터 분양받았고, 아크릴 곤충사육상(60 × 60 × 60 cm; ㈜가이아, 수원, 한국)에서 우화시켰다. 배추잎(10 × 10 cm)을 사육상에 매일 공급하여 산란을 유도하였고, 성충먹이로 10% 설탕물을 공급하였다. 배추잎에 산란한 알을 부화시키기 위해, 알이 있는 잎을 페트리디쉬(지름 10 cm; ㈜에스피엘, 포천, 한국)에 들어갈 수 있도록 배추잎을 자른 후, 항온습상 배양기(대한과학 (주), 원주, 한국)로 옮겼다. 2령 이상의 유충(50개체)은 아크릴사육상(30 × 20 × 7 cm; ㈜가이아)에 신선

한 배추잎을 공급하여 사육하였다. 시험구의 특성에 따라 음성 대조구는 25°C 항온 조건, 고온 사육충은 35°C 항온조건에서, 광조건 16:8 (L:D) h, 상대습도 60 ± 10% 사육실에서 사육하였다.

Total RNA 추출과 차세대 염기서열 분석법을 이용한 지방체 전사체 분석

두 가지의 항온조건에서 사육한 배추좀나방의 유충이 4령 충이 되었을 때, 먼저 70%에탄올로 유충을 소독한 다음, 해부용 가위로 표피를 등면에서 절개하였다. 절개 부위에서 포셉을 이용하여 지방체를 분리하고 시험튜브에 넣었다. 분리한 지방체로부터 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, MD, USA)를 사용하여, 제조사의 권장방법에 따라 total RNA를 추출하였다. Total RNA로부터 mRNA를 분리하기 위해, Dynabead (ThermoFisher Scientific)를 제조사의 권장방법에 따라 사용하였다. mRNA를 절편화시켜 random primer를 이용하여 역전사 효소로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 RNaseH를 처리하고(ThermoFisher Scientific), Taq DNA 중합효소(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 두 가닥의 DNA를 만들었다. DNA는 차세대 염기서열분석용 end repair mix (Takara, Kusatsushi, Japan)를 blunt end로 변환시킨 다음, 3'말단에 A 염기를 첨가하였다. 어댑터 서열을 두 가닥의 DNA에 결합시키고, DNA를 PCR을 통해 증폭시켰다. Illumina 기술을 이용한 차세대 염기서열 분석법을 통해 DNA 절편의 서열을 읽고 HiSeq2000 통해 염기서열을 분석 (㈜마크로젠, 서울, 한국)하였다.

데이터의 분석

염기서열에 대한 정확도 관리(quality control) 분석을 위해 FastQC를 수행하였고, Trimmomatic (Ver. 0.32)를 이용하여, 실험원자료 정리와 어댑터 서열을 제거하였다. Trinity 소프트웨어를 이용하여 contig를 확보하였다. 또한 RSEM을 기반으로 전사체의 발현정도를 계산하였다. 전사체 발현이 확인된 유전자는 BlastX를 이용한 gene ontology를 수행하였다. 전사체에서 발현이 확인된 유전자는 BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하여 유전자를 동정하였고, BlastGO를 통해 유전자 존재분석을 수행하였다. 각 전사체로부터 동정된 유전자군들에 대해 발현의 차이를 대조구와 비교하였다. 본 연구에 사용된 전사체 정보는 NABIC (<http://nabic.rda.go.kr>)에 등록하였다 (NN-1865-000001, NN-1863-000001).

결과 및 고찰

고온에 노출된 4령의 배추좀나방 지방체로부터 추출한 total RNA를 mRNA로 변환하였다. Illumina HiSeq2000 system을 이용하여 101 bp paired end sequencing을 통해 대조구인 25°C 사육충에서 10,335 Mbp, 고온인 35°C 사육충에서 12,490 Mbp를 얻었다. 확보된 실험원자료로부터 약 91.7 Mbp 염기서열을 확보하였다.

Table 1. Summary of assembled statistic results from deep sequencing analysis of fat body of *Plutella xylostella*

Sample	*Px_fat_body ²⁵	*Px_fat_body ³⁵
Total obtained bp	10,335,023,768	12,490,021,580
Total assembled bases	91,690,799	
Total trinity transcripts	125,154	
Total trinity 'genes'	95,847	
Range of contig length	201~28,201	
Mean contig length	732	

**Samples, *Px_fat_body²⁵ and *Px_fat_body³⁵, indicate that fat body was obtained from larvae reared at 25°C and 35°C

확보된 염기서열을 Trinity 프로그램을 이용하여 125,154 개의 contig을 확보하였고(Table 1), BlastGO 프로그램을 이용하여 유전자존재분석을 실시하였다. 전체의 67%는 상동성을 가지지 않았으나, 33%의 contig는 각각 생물기능(13%), 분자기능(11%) 및 세포작용(9%)은 GO 분류군에 포함되었다(Fig. 1). 생물기능에서 가장 많은 기능군은 각각 대사, 조절, 단백질 작용 및 세포작용으로 나타났고, 분자기능에서는 결합, 촉매작용 및 수송 기능군으로 나타났다. 한편 세포작용에서는 세포영역과 세포소기관 및 세포막의 발현 유전체로 나타났다(Fig. 1).

필수 유전자 데이터베이스 분석에서는 온도 조건을 달리 한 사육충들의 유전자 발현 분포가 큰 차이를 보이지 않았으며, 이것은 전사체 서열 분석을 통해서 전체적으로 유전자들의 편차가 없음을 의미한다(결과 미제시). 유전자 발현의 상대적 비교에서는 고온 사육충에서 유전자 발현 수준이 다른 유전자들이 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 정상온도에서 발현되는 유전자들과의 차이를 보이는 유전자들은 온도변화에 따라 특이적 발현할 개연성이 높다고 할 수 있다. 이러한 사육조건에 따른 상대적 유전자 발현 차이를 토대로, 온도의 영향을 받는 contig를 분석한 결과, 고온에서 사육된 개체의 지방체 유전자 발현이 정상온도에서 사육된 개체에 비해 2,147개 contig에서 유전자 발현이 증가하였으며, 유전자 발현이 감소하는 contig는 2,235개였다.

고온과 상온조건의 배추좀나방 유충 지방체에서 유전자의 발현 변화를 분석하기 위해, 구조단백질, 열충격단백질, 항산화효소, 해독작용의 전사체를 동정하였다. 구조단백질(structural protein)에 속하는 표피 단백질(cuticular protein)은 탈수에 대한 저항성 증가와 살충제의 침투의 구조적 장벽으로 알려져 있고, 특히 스트레스에 대한 노출은 glycine이 풍부한 표피 단백질의 발현에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Balabanidou *et al.*, 2018; Watson *et al.*, 2017). 배추좀나방 지방체의 전사체로부터 확인된 표피 단백질의 contig는 32개이며(결과 미제시), 이중 7개의 contig가 대조구보다 발현이 높았다(Table 2). 이 결과는 표피 단백질의 발현의 차이가 고온의 노출이라는 스트레스와 관련이 있는 것으로 사료된다. 표

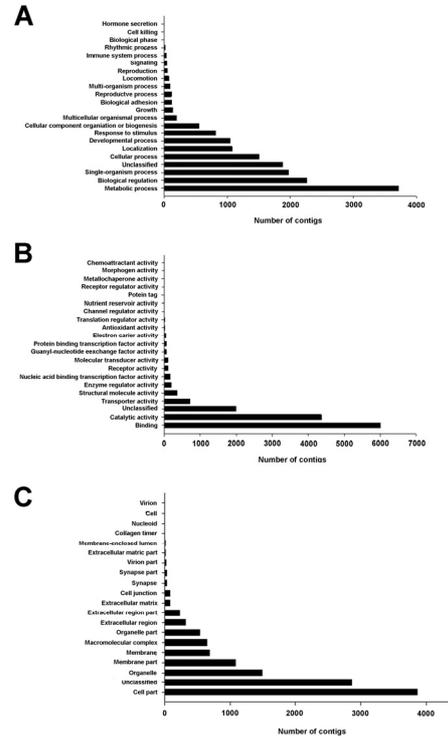


Fig. 1. Gene ontology of the fat body transcriptome in *Plutella xylostella* larvae. All contigs from cDNA of the fat body in *P. xylostella* were converted into six-frame translational products and GO-annotated from protein sequence database of NCBI. The proteins with associated GO terms, biological process (A), molecular function (B) and cellular component (C) were grouped.

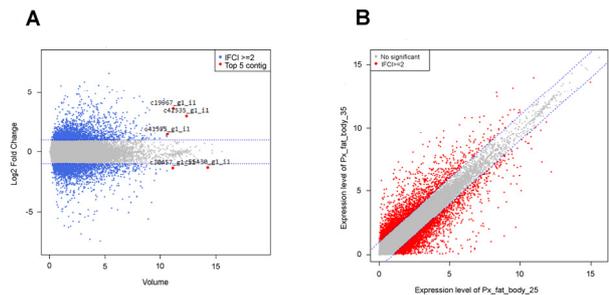


Fig. 2. Volume plot (A) and scattered plot (B) of contigs from transcriptomes of the Diamondback moth larvae reared at 25°C and 35°C. Both plots revealed the comparison of relative expression level between Px_fat body_35 (high temperature) and Px_fat body_25 (control). (A) Volume is defined as square-root (Control Normalized value × Test Normalized value). Blue dots outside area of dotted lines indicates fold change ranges, IFCI >= 2. Red dots exhibits top 5 ranking contigs of volume value. (B) Red dots outside area of dotted lines indicates fold change ranges, IFCI >= 2.

피 단백질을 합성하는 키틴합성효소(chitin synthase) 전사체는 발현수준이 대조구와 비슷하였다. 키틴합성효소를 발현하는 contig인 c49401_g1_i1는 상대적으로 고온에서 높게 발현되

Table 2. Structure-related protein genes identified from fat body transcriptome of *Plutella xylostella*

contig	Expression*		Length (bp)	Description	Species	Coverage	E-Value
	25°C	35°C					
<i>Cuticular protein</i>							
c43450_g1_i2	-	▲	671	Cuticular protein 11A		29.26	2.00E-16
c42111_g2_i1	-	▲▲	1055	Cuticular protein 49Aa	<i>Drosophila melanogaster</i>	74.31	2.00E-25
c42811_g1_i2	-	▲	889	Cuticular protein 49Aa	<i>Drosophila melanogaster</i>	54.86	6.00E-18
c40443_g1_i1	-	▲	659	Cuticular protein 49Aa	<i>Drosophila melanogaster</i>	72.92	1.00E-30
c42811_g1_i1	-	▲	904	Cuticular protein 49Aa	<i>Drosophila melanogaster</i>	54.86	7.00E-18
c40971_g1_i1	-	▲	800	Cuticular protein 49Ae	<i>Drosophila melanogaster</i>	76.87	7.00E-26
c42694_g2_i1	-	▲	542	Cuticular protein 65Ax2	<i>Drosophila melanogaster</i>	78.43	6.00E-31
<i>Chitin synthase</i>							
c49006_g2_i1	-	-	1156	glucuronosyltransferase	<i>Drosophila melanogaster</i>	61.13	4.00E-72
c49401_g1_i1	-	▲	1711	glucuronosyltransferase	<i>Drosophila melanogaster</i>	86.23	6.00E-92
c52070_g1_i1	-	-	1925	Ugt86Da	<i>Drosophila melanogaster</i>	94.51	2.00E-70
<i>Chitinase</i>							
c47435_g1_i1	-	-	1813	Chitinase 2	<i>Drosophila melanogaster</i>	91.12	2.00E-148
c48153_g1_i1	-	-	2674	Cht5	<i>Drosophila melanogaster</i>	68.91	0
c48871_g2_i1	-	-	2679	Cht7	<i>Drosophila melanogaster</i>	56.27	0
<i>Actin</i>							
c41462_g1_i1	-	▲	298	Muscle-specific protein 300 kDa	<i>Drosophila melanogaster</i>	0.6	3.00E-24
c45002_g1_i1	-	▲	645	Muscle-specific protein 300 kDa	<i>Drosophila melanogaster</i>	1.2	2.00E-37
c45847_g1_i3	-	-	625	Actin filament	<i>Drosophila melanogaster</i>	5.45	0.00009
c45775_g2_i1	-	▲	764	Calpain-A	<i>Drosophila melanogaster</i>	26.69	3.00E-26
c45775_g2_i1	-	▲	764	Calpain-A	<i>Drosophila melanogaster</i>	26.69	3.00E-26

*The expression level of each contig can be divided into upregulation ($\log_2F_c > 2$), downregulation ($\log_2F_c < -2$), and not meaningful ($-2 < \log_2F_c < 2$) compared to the control. $2 < \log_2F_c < 10$: ▲; $10 < \log_2F_c < 50$: ▲▲; $-10 < \log_2F_c < -2$: ▼; $-50 < \log_2F_c < -10$: ▼▼

었다. 표피단백질 분해에 관여하는 키틴해효소(chitinase) 유전자들이 동정되었으나, 고온전사체는 전체적으로 대조구의 발현과 큰 차이를 보이지 않았다(Table 2). 고온전사체에서 액틴의 발현은 대조구와 비슷하였고, 일부 유전자들(근육특이 단백질, 칼파인-A)의 발현은 증가하였다(Table 2).

생물의 생존과 영속성은 환경에 대한 대처능력에 좌우된다. 다양한 종류의 스트레스에 직면했을 때 세포수준에서 자신을 방어하기 위한 방법은 열충격단백질의 발현을 유도하는 것이다(Tissieres *et al.*, 1974). 열충격단백질은 환경으로부터 받게 되는 스트레스에 대한 반응으로, 세포 안에서 합성된다. 이 단백질은 대부분의 생물체에서 발현되고, 곤충에서는 온도와 수분조절에 대해 보호기능을 하는 것으로 알려져 있다(Goto and Kimura, 1998). 열충격단백질은 온도의 급격한 변화에 주로 관련이 있는 것으로 보고되었으나, 저온, 자외선, 조직손상 및 조직의 재구성 등에 관여하는 것이 밝혀졌다. 생체분자보호활성(Ehrnsperger *et al.*, 1997; Haslbeck *et al.*, 1999), 세포골격보호(Lavoie *et al.*, 1993), 세포자살 과정 변화(Bruet *et al.*, 2000) 등에 대한 열충격단백질의 역할은 직접적으로 환경에 대한 세포의 보호이다. 열충격단백질의 분자량은 10-100kDa로 다양하며, 분자량에 따라 6개

family로 나눈다. Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, sHsps. sHsps는 주로 12-43 kDa 크기를 가지며, C-말단에 α -crystallin domain이 특징적으로 존재한다(Kriehuber *et al.*, 2010). Hsp27와 α A-, α B-crystallin와 같은 sHsp 계열은 거대한 복합체를 형성하며, Class I, II로 나눌 수 있다(Taylor and Benjamin, 2005). 이들은 열에 유도된 스트레스를 극복하거나(Class I), 발생 분화 조직특이적 기능에 관여한다(Class II; Chowdary *et al.*, 2004). Hsp40은 Hsp70의 co-factor로 알려져 있고, Hsp60은 단백질 접힘, Hsp70은 단백질 접힘 뿐만 아니라 열충격에 대해 내열성을 갖게 한다. Hsp90은 스테로이드 수용체 및 전사인자로 작용하며, Hsp104와 Hsp110은 극한 온도에 내성을 갖게 한다. 배추좀나방의 지방체에서 Hsp23, Hsp68의 contig가 확인되었다(Table 3). 열충격 단백질에서 Hsp23만이 고온 전사체에서 발현이 증가하였다. 이것은 초파리의 변태기가 41°C 고온 노출에 앞서 열처리에 노출되었을 때, 내열성이 유도되고, Hsp23의 발현이 급격히 증가한다(Arrigo, 1987)는 보고와 일치한다.

소수성과 친수성의 항산화 물질은 카제인, 펩타이드, 항산화 효소[과산화물제거효소(SOD), catalase, 글루타치온과산화

Table 3. Heat shock proteins and catalase identified from fat body transcriptome of *P. xylostella*

contig	Expression*		Length (bp)	Description	Species	Coverage	E-Value
	25°C	35°C					
<i>Heat shock protein</i>							
c44076_g1_i1	-	-	337	HSP68	<i>Drosophila melanogaster</i>	16.06	3.00E-27
c48023_g1_i1	-	▲	1047	HSP23	<i>Drosophila melanogaster</i>	53.23	8.00E-13
<i>Catalase</i>							
c53547_g1_i1	-	▲	1784	Catalase	<i>Drosophila melanogaster</i>	98.42	0

*The expression level of each contig can be divided into upregulation ($\log_2 Fc > 2$), downregulation ($\log_2 Fc < -2$), and not meaningful ($-2 < \log_2 Fc < 2$) compared to the control. $2 < \log_2 Fc < 10$: ▲; $10 < \log_2 Fc < 50$: ▲▲; $-10 < \log_2 Fc < -2$: ▼; $-50 < \log_2 Fc < -10$: ▼▼;

화효소], 공액리놀레산, 조효소 Q10, 비타민(C, E, A, D3), 카로티노이드 등이 있다(Grażyna *et al.*, 2017; Lindmark-Månsson and Åkesson, 2000). 특히 효소들은 활성산소를 과산화수소(SOD)나, 물로 전환시켜 항산화 작용을 일으킨다. 배추좀나방의 지방체 전사체에서 이들 효소들을 확인하였다. 활성산소를 과산화수소로 전환시키는 SOD는 배추좀나방 전사체에서 4개 contigs(c45955_g1_i1, c54183_g1_i1, c54183_g4_i2, c47221_g1_i1)가 동정되었으나, 곤충의 유전자와는 상동성을 가지지 않았다. 과산화수소를 물로 전환시키는 촉매제로는 1개의 contig가 동정되었고, 고온 전사체에서만 발현이 증가되었다(Table 3).

스트레스와 관련된 해독작용에서는 시토크롬P450, UDP-당전이효소, 글루타치온 S 전달효소 등이 관여한다. 곤충에서 시토크롬P450의 수는 37-160개로 다양하다(Lee *et al.*, 2010; Strode *et al.*, 2008) 발달과정에 필수적인 유전자들은 보존되는 반면에 생물종의 환경에 의존하는 특이 해독반응에 관여하는 유전자들은 기능적 억제조건에서는 보존되지 않는다. 일부 P450 유전자들은 매우 보존적이며 안정화되어 있고, 종간의 필수유전자로 위치한다 (Thomas, 2007). 파리목 곤충에서 보존적인 P450 유전자들 중에서(Strode *et al.*, 2008), Cyp302a1, Cyp306a1, Cyp307a1, Cyp307a2, Cyp314a1, Cyp315a1, Cyp18a1 유전자들은 성상호르몬인 20-hydroxyecdysone의 생합성, 활성 및 불활성에 관여한다 (Guittard *et al.*, 2011; Rewitz and Gilbert, 2008). Cyp4g1은 지질대사에 관여하며(Gutierrez *et al.*, 2007), Cyp4g15는 신경계에서 발현된다(Maibeche-Coisne *et al.*, 2000). 시토크롬 P450는 복잡한 조절을 통해 곤충의 저항성 발달에 중요한 역할을 한다(Balabanidou *et al.*, 2016; Kaplanoglu *et al.*, 2017; Peyser *et al.*, 2017). 배추좀나방의 발현 전사체에서 시토크롬 P450의 15개 contig를 확인하였다(Table 4). 초파리와 모기에서 DDT 약제 저항성에 관여하는 유전자로 알려진 CYP6 family에 속하는 contig는 9개로, 고온 전사체에서는 CYP6a2, 6g1, 6g2-, family에서 발현이 증가되었고, 다른 CYP6a21, 6d5, CYP9 family 발현은 대조구와 차이를 보이지 않았다(Table 4).

UDP-당전이효소(UGT)는 작고 다양한 소수성 분자를 가지는 활성화된 당 공여자인 UDP-glycoside에서 당 그룹의

결합을 촉진시켜 생성되는 당화과정에 관여한다. UGT는 해독작용(Li *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2018), 경화반응(Hopkins and Kramer, 1992), 색소화반응 (Casique-Arroyo *et al.*, 2014), 곤충의 저항성(Kaplanoglu *et al.*, 2017)에도 관여한다고 알려져 있다. 배추좀나방의 전사체에서 2개의 UGT contig를 확인하였다. 고온 전사체는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다(Table 4).

글루타치온 S 전이효소(GST)는 살충제 뿐만 아니라 이형 물질, 중금속의 해독작용을 위해 외래물질에 환원형 글루타치온이 불도록 촉매한다(Pavliidi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2015). GST는 분자량이 크고, 여러 가지 역할을 하는 효소군으로 보고되어 있으며, 주 기능은 외래물질을 해독하여 세포에 중요한 단백질이나 핵산이 반응하지 못하도록 하는 것으로 알려져 있다. 곤충의 약제 저항성 기작에서, GST는 직접적으로 살충제를 무력화시키거나, 시토크롬 P450 또는 carboxyl cholinesterases와 같은 해독효소가 만들어 내는 2차 대사산물에 작용하기도 한다. GSTs는 글루타치온 첨가반응으로 잘 알려져 있다(Habig *et al.*, 1974; Mannervik, 1985). 첨가 반응을 통한 약제 저항성은 유기인계, 피레스로이드계, 살비제 등 여러 종류의 살충제에서 보고되고 있다(Enayati *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Riveron *et al.*, 2014; Yamamoto and Yamada, 2016). 살충제는 직접적인 독성 이외에, 산화 스트레스를 유발하여 독성을 일으킬 수 있으며, 지질의 hydroperoxides를 생성한다(Abdollahi *et al.*, 2004). 많은 GSTs는 과산화효소 활성을 보이며(Lumjuan *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2009) lipid hydroperoxides의 환원에 중요한 역할을 함으로써 간접적으로 저항성에 기여한다. GSTs는 촉매에 관여하지 않는 부위의 결합과 격리를 통해서 피레스로이드 저항성을 일으킨다(Yamamoto *et al.*, 2009; Wilding *et al.*, 2015). 배추좀나방의 발현 전사체에서 14개의 contig가 확인되었으며, 발현수준은 대조구와 큰 차이를 보이지 않았으나 (결과미제시), 이들 중 D1, Z1, O3 isoform에서만 발현이 감소하였다(Table 4).

이상의 결과를 요약하면, 고온에 노출된 배추좀나방 유충은 적응을 위하여 유전자의 발현 패턴에 변화를 보임을 알 수 있다. 이들 중에서 유전자 발현이 증가한 것은 구조단백질, 스트레스관련단백질, 열충격단백질, 항산화 단백질이었으며,

Table 4. Detoxification genes identified from fat body transcriptome of *P. xylostella*

contig	Expression*		Length (bp)	Description	Species	Coverage	E-Value
	25°C	35°C					
<i>Cytochrome P450</i>							
c48515_g1_i1	-	▲	2780	Cyp6a2	<i>Drosophila melanogaster</i>	94.47	4.00E-95
c52395_g1_i1	-	▲	1768	Cyp6a2	<i>Drosophila melanogaster</i>	94.66	8.00E-76
c49434_g1_i1	-	▲	1786	Cyp6a2	<i>Drosophila melanogaster</i>	95.85	1.00E-98
c52426_g1_i1	-	▲	2677	Cyp6a2	<i>Drosophila melanogaster</i>	99.41	8.00E-71
c46326_g2_i1	-	-	609	Cyp6a21	<i>Drosophila melanogaster</i>	35.91	3.00E-28
c50258_g1_i1	-	-	565	Cyp6d5	<i>Drosophila melanogaster</i>	36.22	5.00E-14
c46659_g1_i1	-	▲	1642	Cyp6g1	<i>Drosophila melanogaster</i>	37.6	2.00E-31
c47201_g1_i3	-	▲	939	Cyp6g2	<i>Drosophila melanogaster</i>	33.53	7.00E-31
c52468_g1_i3	-	▲	830	Cyp6g2	<i>Drosophila melanogaster</i>	48.55	3.00E-31
c43715_g2_i1	-	-	869	Cyp9b1	<i>Drosophila melanogaster</i>	53.86	1.00E-36
c48673_g2_i1	-	-	1629	Cyp9f2	<i>Drosophila melanogaster</i>	69.57	5.00E-71
c49249_g1_i1	-	-	1772	Cyp9f2	<i>Drosophila melanogaster</i>	100	2.00E-88
c36866_g1_i1	-	-	429	Cyp9f2	<i>Drosophila melanogaster</i>	27.52	1.00E-21
c47084_g1_i1	-	-	1666	Cyp12a4	<i>Drosophila melanogaster</i>	95.52	5.00E-84
c49988_g1_i1	-	▲	1971	Cyp301a1	<i>Drosophila melanogaster</i>	83.18	4.00E-25
<i>UDP-glycosyltransferase</i>							
c49639_g1_i1	-	-	1807	Ugt35a	<i>Drosophila melanogaster</i>	86.03	2.00E-50
c52070_g1_i1	-	-	1925	Ugt86Da	<i>Drosophila melanogaster</i>	94.51	2.00E-70
<i>Glutathione S transferase</i>							
c44544_g1_i1	-	▼	1120	GST D1	<i>Drosophila melanogaster</i>	98.09	7.00E-67
c24768_g1_i1	-	▼	1756	GST Z1	<i>Drosophila melanogaster</i>	84.55	2.00E-44
c43439_g1_i1	-	▼	602	GST O3	<i>Drosophila melanogaster</i>	69.29	5.00E-47

*The expression level of each contig can be divided into upregulation ($\log_2F_c > 2$), downregulation ($\log_2F_c < -2$), and not meaningful ($-2 < \log_2F_c < 2$) compared to the control. $2 < \log_2F_c < 10$: ▲; $10 < \log_2F_c < 50$: ▲▲; $-10 < \log_2F_c < -2$: ▼; $-50 < \log_2F_c < -10$: ▼▼

감소한 것은 글루타치온 S 전이효소이었다. 이러한 결과들은 기후변화의 주요인인 온도변화에 대한 해충의 온도 적응과 생리적 대응을 이해하는데 기초자료를 제시한다.

은 오히려 감소되었다. 이상의 결과는 기후변화의 주요인인 온난화에 대한 해충의 생리적 대응과 온도적응을 이해하는데 필요한 기초자료를 제시한다.

요 약

곤충은 변온동물로 육지생태계에서 주로 서식하면서, 식물의 생체량 조절, 종다양성 유지에 중요한 역할을 한다. 주변 온도는 변온동물인 곤충의 생리적 반응속도, 뿐만 아니라 생존과 분포를 결정하며, 기후변화에 영향을 준다. 본 연구는 높은 온도에서 곤충의 적응성에 관련있는 유전자를 전사체를 이용하여 동정하였다. 고온에서 사육된 배추좀나방 유충의 지방체로부터 차세대 염기서열 분석법을 이용하여 전사체를 확보하였다. 대사중심인 지방체에서 구조단백질, 열충격단백질, 항산화단백질, 해독효소 등이 동정되었다. 이들 중에서 포피단백질(포피단백질, 키틴합성효소, 엑틴, 카이틴 합성), 스트레스관련단백질(시토크롬 P450), 열충격단백질, 한산화단백질은 발현이 증가되었으나, glutathione S transferase 발현

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ012307)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., &

- Rezaie, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review, *Med. Sci. Monitor* 10, Ra141-147.
- Angilletta, M. J., Steury, T. D., & Sears, M. W. (2004). Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle, *Integr. Comp. Biol.* 44, 498-509.
- Arrigo, A.-P. (1987). Cellular localization of HSP23 during *Drosophila* development and following subsequent heat shock, *Dev. Biol.* 122, 39-48.
- Bagchi, R., Gallery, R. E., Gripenberg, S., Gurr, S. J., Narayan, L., Addis, C. E., Freckleton, R. P., & Lewis, O. T. (2014). Pathogens and insect herbivores drive rain forest plant diversity and composition, *Nature* 506, 85-88.
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance, *Curr. Opin. Insect Sci.* 27, 68-74.
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G. J., Tittiger, C., Juárez, M. P., Mijailovsky, S. J., Chalepakis, G., Anthoni, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G. J., & Vontas, J. (2016). Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 113, 9268-9273.
- Barrett, R. D., Paccard, A., Healy, T. M., Bergek, S., Schulte, P. M., Schluter, D., & Rogers, S. M. (2011). Rapid evolution of cold tolerance in stickleback, *Proc. Biol. Sci.* 278, 233-238.
- Bauerfeind, S. S., & Fischer, K. (2014). Simulating climate change: Temperature extremes but not means diminish performance in a widespread butterfly, *Popul. Ecol.* 56, 239-520.
- Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E., & Garrido, C. (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c, *Nat. Cell Biol.* 2, 645-652.
- Casique-Arroyo, G., Martinez-Gallardo, N., de la Vara, L. G., & Delano-Frier, J. P. (2014). Betacyanin biosynthetic genes and enzymes are differentially induced by (a)biotic stress in *Amaranthus hypochondriacus*, *PLOS ONE* 6, e99012.
- Chowdary, T. K., Raman, B., Ramakrishna, T., & Rao, C. M. (2004). Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity, *Biochem. J.* 381, 379-387.
- Chown, S. L., Hoffmann, A. A., Kristensen, T. N., Angilletta, M. J., Stenseth, N. C., & Pertoldi, C. (2010). Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology, *Climate Res.* 43, 3-15.
- Chown, S. L., Terblanche, J. S., & Simpson, S. J. (2006). Physiological diversity in insects: ecological and evolutionary contexts, *Adv. Insect Physiol.* 33, 50-152.
- Dennis, D., & Weisenburger, M. D. (1993). Human health effects of agrichemical use, *Human Pathol.* 24, 571-576.
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C., & Martin, P. R. (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 6668-6672.
- Ehrensperger, M., Graber, S., Gaestel, M., & Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation, *EMBO J.* 16, 221-229.
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance, *Insect Mol. Biol.* 14, 3-8.
- Goto, S., & Kimura, M. (1998). Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*, *J. Insect Physiol.* 44, 1233-1239.
- Grażyna, C., Hanna, C., Adam A., & Magdalena, B. M. (2017). Natural antioxidants in milk and dairy products, *Int. J. Dairy Technol.* 70, 165-178.
- Guittard, E., Blais, C., Maria, A., Parvy, J. P., Parishna, S., Lumb, C., Lafont, R., Daborn, P. J., & Dauphin-Villemant, C. (2011). CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis, *Dev. Biol.* 349, 35-45.
- Gutierrez, E. D., Wiggins, D., Fielding, B., & Gould, A. P. (2007). Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism, *Nature* 445, 275-280.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B., (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrensperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R., & Buchner, J. (1999). Hsp26: a temperature-regulated chaperone, *EMBO J.* 18, 6744-6751.
- Hillebrand, H., Borer, E. T., Bracken, M. E. S., Cardinale, B. J., Cebrian, J., Cleland, E. E., Elser, J. J., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Ngai, J. T., Sandin, S., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., Smith, J. E., & Smith, M. D. (2009). Herbivore metabolism and stoichiometry each constrain herbivory at different organizational scales across ecosystems, *Ecology Lett.* 12, 516-527.
- Hopkins, T. L., & Kramer, K. J. (1992). Insect cuticle

- sclerotization, *Annu. Rev. Entomol.* 37, 273-302.
- Kaplanoglu, E., Chapman, P., & Scott, Donly, C. (2017). Overexpression of a cytochrome P450 and a UDP glycosyltransferase is associated with imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, *Sci. Rep.* 7, 1762.
- Kim, E., Choi, B., Park, Y., Cha, O., Jung, C., Lee, D., Kim, K., & Kim, Y. (2014). Overwintering conditions of the Diamondback moth and genetic variation of overwintering populations, *Kor. J. Appl. Entomol.* 53, 353-363.
- Kim, S. M., Hur, J. H., Han, D. S., Cho, J. M., & Kim, K. J., 2001. Diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in Kangwon alpine vegetable croplands, *Kor. Soc. Pestic. Sci.* 5, 24-30.
- Kim, T. M., Underwood, N., & Inouye, B. D., 2013. Insect herbivores change the outcome of plant competition through both inter- and intraspecific processes, *Ecology* 94, 1753-1763.
- Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins, *FASEB J.* 24, 3633-3642.
- Lavoie, J. N., Gingras-Breton, G., Tanguay, R. M., & Landry, J. (1993). Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization, *J. Biol. Chem.* 268, 3420-3429.
- Leal, M., & Gunderson, A. R. (2012). Rapid change in the thermal tolerance of a tropical lizard, *Am Nat.* 180, 815-822.
- Lee, S. C., Cho, Y. S., Kim, D. I. (1993). Comparative study of toxicological methods and field resistance to insecticides in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), *Kor. J. Appl. Entomol.* 32, 323-329.
- Lee, S. H., Kang, J. S., Min, J. S., Yoon, K. S., Strycharz, J. P., Johnson, R., Mittapalli, O., Margam, V. M., Sun, W., Li, H. M., Xie, J., Wu, J., Kirkness, E. F., Berenbaum, M. R., Pittendrigh, B. R., & Clark, J. M. (2010). Decreased detoxification genes and genome size make the human body louse an efficient model to study xenobiotic metabolism, *Insect Mol. Biol.* 19, 599-615.
- Lemoine, N. P., & Burkepile, D. E. (2012). Temperature-induced mismatches between consumption and metabolism reduce consumer fitness, *Ecology* 93, 2483-2489.
- Lemoine, N. P., Drews, W. A., Burkepile, D. E., & Parker, J. D. (2013). Increased temperature alters feeding behavior of a generalist herbivore, *Oikos* 122, 1669-1678.
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics, *Annu. Rev. Entomol.* 52,231-253.
- Li, X., Zhu, B., Gao, X., & Liang, P. (2017). Overexpression of UDP-glycosyltransferase gene UGT2B17 is involved in chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.), *Pest Manag. Sci.* 73, 1402-1409.
- Lindmark-Månsson, H., & Åkesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk, *Br. J. Nutr.* 84, 103-110.
- Lumjuan, N., McCarroll, L., Prapanthadara, L. A., Henningway, J., & Ranson, H. (2005). Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35,861-871.
- Maibeche-Coisne, M. L., Monti-Dedieu, S., Aragon, S., & Dayphin-Villemant, C. (2000). A new cytochrome P450 from *Drosophila melanogaster*, CYP4G15, expressed in the nervous system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 1132-1137.
- Mannervik, B. (1985). The isoenzymes of glutathione transferase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 57, 357-417.
- Metcalf, D. B., Asner, G. P., Martin, R. E., Espejo, J. E. S., Huasco, W. H., Amezcuita, F. F. F., Carranza-Jimenez, L., Cabrera, D. F. G., Baca, L. D., Sinca, F., Quispe, L. P. H., Taype, I. A., Mora, L. E., Davila, A. R., Solorzano, M. M., Vilca, B. L. P., Roman, J. M. L., Bustios, P. C. G., Revilla, N. S., Tupayachi, R., Girardin, C. A. J., Doughty, C. E., & Malhi, Y. (2014). Herbivory makes major contributions to ecosystem carbon and nutrient cycling in tropical forests. *Ecol. Lett.* 17, 324-332.
- O'Connor, M. I. (2009). Warming strengthens an herbivore-plant interaction, *Ecology* 90, 388-398.
- O'Connor, M. I., Piehler, M. F., Leech, D. M., Anton, A., & Bruno, J. F. (2009). Warming and resource availability shift food web structure and metabolism, *PLOS Biol.* 7, e1000178.
- Pan, Y., Tian, F., Wei, X., Wu, Y., Gao, X., Xi, J., & Shang, Q. (2018). Thiamethoxam resistance in *Aphis gossypii* Glover relies on multiple UDP-glucuronosyltransferases, *Front. Physiol.* 9, 322.
- Pavliidi, N., Vontas, J., & Van Leeuwen, T. (2018). The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors, *Curr.*

- Opin. Insect Sci. 27, 97-102.
- Peysner, R. D., Lanno, S. M., Shimshak, S. J., & Coolon, J. D. (2017). Analysis of cytochrome P450 contribution to evolved plant toxin resistance in *Drosophila sechellia*, *Insect Mol. Biol.* 26, 715-720.
- Rewitz, K. F., & Gilbert, L. I. (2008). *Daphnia* Halloween genes that encode cytochrome P450s mediating the synthesis of the arthropod molting hormone: evolutionary implications, *BMC Evol. Biol.* 8, 60.
- Riveron, J. M., Yunta, C., Ibrahim, S. S., Djouaka, R., Irving, H., Menze, B. D., Ismail, H. M., Hemingway, J., Ranson, H., Albert, A., & Wondji, C. S. (2014). A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector, *Genome Biol.* 2014, 15.
- Sable, M. G., & Rana, D. K. (2016). Impact of global warming on insect behavior - A review, *Agricultural Rev.* 37, 81-84.
- Strode, C., Wondji, C. S., David, J. P., Hawkes, N. J., Lumjuan, N., Nelson, D. R., Drane, D. R., Karunaratne, S. H., Hemingway, J., Black, W. C., & Ranson, H. (2008). Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 113-123.
- Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2012). Thermal tolerance and the global redistribution of animals, *Nat. Clim. Chang.* 2, 686-690.
- Sunday, J. M., Bates, A. E., Kearney, M. R., Colwell, R. K., Dulvy, N. K., Longino, J. T., & Huey, R. B. (2014). Thermal-safety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 5610-5615.
- Talekar, N., & Shelton, A. (1993). Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38, 275-301.
- Taylor, R. P., & Benjamin, I. J. (2005). Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 433-444.
- Thomas, J. H. (2007). Rapid birth-death evolution specific to xenobiotic cytochrome P450 genes in vertebrates, *PLOS Genet.* 3, e67.
- Tissieres, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs, *J. Mol. Biol.* 84, 389-398.
- Vucic-Pestic, O., Ehnes, R. B., Rall, B. C., & Brose, U. (2011). Warming up the system: higher predator feeding rates but lower energetic efficiencies, *Global Change Biol.* 17, 1301-1310.
- Watson, G. S., Watson, J. A., & Cribb, B. W. (2017). Diversity of cuticular micro- and nanostructures on insects: properties, functions, and potential applications, *Annu. Rev. Entomol.* 62, 185-205.
- Wilding, C. S., Weetman, D., Rippon, E. J., Steen, K., Mawejje, H. D., Barsukov, I., & Donnelly, M. J. (2015). Parallel evolution or purifying selection, not introgression, explains similarity in the pyrethroid detoxification linked GSTE4 of *Anopheles gambiae* and *An. Arabiensis*, *Mol. Genet. Genomics* 290, 201-215.
- Xu, Z.-B., Zou, X.-P., Zhang, N., Feng, Q.-L., & Zheng, S.-C. (2015). Detoxification of insecticides, allelochemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*, *Insect Sci.* 22, 503-511.
- Yamamoto, K., Nagaoka, S., Banno, Y., & Aso, Y. (2009). Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Bombyx mori*, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 149, 461-467.
- Yamamoto, K., & Yamada, N. (2016). Identification of a diazinon metabolizing glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*, *Sci. Rep.* 6.
- Zhang, X., Wu, M., Yao, H., Yang, Y., Cui, M., Tu, Z., Stallones, L., & Xiang, H. (2016). Pesticide poisoning and neurobehavioral function among farm workers in Jiangsu, People's Republic of China, *Cortex* 74, 396-404.