



저온조건에서 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 지방체 유전자 발현 변화

김광호¹, 이대원^{2*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 작물보호과, ²경성대학교 화학생명과학부 생명과학전공

Transcriptomic Analysis of Larval Fat Body of *Plutella xylostella* under Low 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, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea)

Received: 31 October 2019/ Revised: 7 November 2019/ Accepted: 12 November 2019

Copyright © 2019 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: Temperature is known to be the main factor affecting development, growth and reproduction of organisms and also a physical factor directly related to insect survival. Insects as ectothermal species should be responsive to climate changes for their survival and develop various survival strategies under the unfavorable temperature such as low temperature. The purpose of this study is to identify genes contributing to adaptation of low temperature.

METHODS AND RESULTS: To identify genes contributing to adaptation of low temperature, the transcriptomic data were obtained from fat body in *Plutella xylostella* larvae via next generation sequencing. We identified structural proteins, heat shock proteins, antioxidant enzymes, detoxification proteins, and cryoprotectant mobilization and biosynthesis-related proteins. Genes encoding chitinase, cuticular protein, Hsp23, chytochrome protein, Glutathione S transferase, and phospholipase 2 were up-regulated under low temperature. Proteins related to energy metabolism such as UDP-glycosyltransferase, trehalase and trehalose transporter were down-regulated.

CONCLUSION: When insect pests were exposed to low

temperature, changes in gene expression of fat body could provide some hints for understanding temperature adaptation strategies.

Key words: *Plutella xylostella*, fat body, transcriptome, low temperature

서론

온도는 생물종의 발생, 성장, 번식 등에 영향을 미치는 주요 요인이며, 곤충의 생존에 가장 큰 영향을 미치는 물리적 요인이다(Chen et al., 2011; Bauerfeind and Fischer, 2014). 곤충은 적응온도를 벗어나는 저온에서 생존하기 위해 다양한 전략을 적용한다(Sinclair et al., 2003). 특히 저온에 생존하기 위해서는 내부동결을 극복해야 한다(Sformo et al., 2010; Li, 2016). 육상에 서식하는 곤충은 넓은 적응 온도영역을 가지고 있으며, 온도 변화에 따른 곤충의 생리적 변화는 다양하다. 온도 상승에 의한 해충의 연간 발생빈도 증가는 결과적으로 높은 경제적 피해를 야기한다(Yamamura and Kiritani, 1998). 고온은 phenoloxidase 등과 같은 효소의 활성을 높이고, 병원체에 대한 저항성을 높인다(Sable and Rana, 2016).

한편, 빙결온도 이하의 저온은 곤충의 생존을 위협하며(Neven, 2000), 저온에서 일부 곤충 세포는 동결저항적이거나, 동결손상을 보호하거나 보완하기도 한다(Gosden, 2011; Toxopeus and Sinclair, 2018). 곤충의 저온 내성은 높은 가스성을 보이며(Kvist et al., 2013), 저온 순응이나 식이 조절은 동결내성을 유도하기도 한다(Koštal et al., 2012). 따라

*Corresponding author: Dae-Weon Lee

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

E-mail: daeweonlee@ks.ac.kr

서 곤충은 생존에 영향을 미치는 물리적 한계를 극복하기 위해 휴면이나 항동결물질 생합성과 같은 생존 전략을 발전시켜왔다. 저온손상은 동결온도보다 높은 온도에서 생체막의 유동성과 단백질의 손상에 의해 야기되는 것으로 알려져 있으며(Michaud and Denlinger, 2004), 동결손상은 빙핵생장에 의한 직접적인 손상으로 생체막의 붕괴, 얼음형성에 의한 탈수 등이 나타난다(Clark and Worland, 2008). 따라서 내동결성 물질의 생합성은 저온을 극복하기 위한 내한성(cold hardiness) 기작으로 이해할 수 있다.

전 세계적으로 분포하는 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)은 십자화과 작물의 주요해충으로, 영기는 1~4령, 번데기, 성충의 생활사를 가진다(Talekar and Shelton, 1993; Lee et al., 1993; Cho et al., 2001). 국내에는 1980년대 이후 급격하게 밀도가 증가하고 있다(Kim and Lee, 1991). 국내에서 연중 발생 세대수가 10~11회로 추정되고, 다양한 농약 노출에 따른 약제 저항성을 발달시켜 농업에 경제적 피해가 증가하고 있다(Kim et al., 2011). 저항성 발달이외에도, 신경독성을 일으키는 약제의 살포는 비표적 생물에 부작용들을 유발하였고(Weisenburger, 1993; Zhang et al., 2016), 잔류독성은 농업생태계의 심각한 오염과 방제비용의 증가를 초래하였다(Lee et al., 1993). 배추좀나방은 겨울철 최저 일평균기온이 0°C 이상이 되는 지역에서 월동가능할 것으로 추정되어 왔다(Kim et al., 1999). 한편, 동결감수성 곤충인 배추좀나방은 생리적으로 내한성이 잘 발달되어 있어, 체내빙결점은 -14.3~-19.2°C의 범위로 발육시기에 따라 다양하다(Hayakawa et al., 1988). 배추좀나방은 저온 유기에 따른 내동결성 물질 생합성을 증가시켜 저온에 대한 내성 증가에 가소성을 보인다(Park and Kim, 2014).

본 연구는 배추좀나방에서 저온 적응에 기여하는 요인을 유전자 수준에서 동정하기 위해 유충을 저온(3~10°C)과 상온(25°C)으로 나누어서 사육하였다. 사육된 유충으로부터 대사 반응의 중심인 지방체에 대해 전사체를 분석하고, 대조구인 상온에서 발현되는 유전자군과의 비교를 통해 저온에서 발현 차이가 나는 유전자군을 동정하였다.

재료 및 방법

배추좀나방 사육

배추좀나방의 번데기(50개체)는 안동대학교 식물외과에서 분양받았고, 아크릴 곤충사육상(60 × 60 × 60 cm; (주)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; (주)에스피엘, 포천, 한국)에 들어갈 수 있도록 배추잎을 자른 후, 항온항습 배양기(대한과학 (주), 원주, 한국)로 옮겼다. 2령 이상의 유충(50개체)은 아크릴사육상(30 × 20 × 7 cm; (주)가이아)에 신선한 배추잎을 공급하여 사육하였다. 시험구의 특성에 따라 음성 대조구는 25°C 항온 조건, 저온 사육조건은 3~10°C가 유지

되도록 사육하였다. 광주선 16:8 (L:D) h, 상대습도 60 ± 10% 사육실에서 사육하였다.

Total RNA 추출과 차세대 염기서열 분석법을 이용한 지방체 전사체 분석

두 가지의 온도조건에서 사육한 배추좀나방의 유충이 4령 충이 되었을 때, 먼저 70%에탄올로 유충을 소독한 다음, 해부용 가위로 표피를 등면에서 절개하였다. 절개 부위에서 포셉을 이용하여 지방체를 분리하고 시럽튜브에 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 DNA절편의 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, Blast2GO를 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(저온 전사체: NN-1864-000001, 대조구: NN-1865-000001).

결과 및 고찰

저온에서 사육된 4령의 배추좀나방 지방체에서 얻은 total RNA를 mRNA로 변환 후 Illumina HiSeq2000 system을 이용하여 101bp paired end sequencing을 통해 저온에서는 10,773 Mbp, 대조구에서는 10,335 Mbp를 확보하였다. 얻어진 원서열(raw sequence)들을 연결시켜 전체적으로 125,154 개의 contig를 확보하였다. 확보한 contig에 대해 BlastGO 프로그램을 이용하여 GO 분석한 결과, 생물기능(13%), 분자

기능(11%) 및 세포작용(9%)는 GO 분류군으로 나눌 수 있었다. 생물기능에서 가장 많은 기능군은 각각 대사, 조절, 발생, 자극 반응, 세포작용 등으로 나타났고, 분자기능에서는 결합, 촉매작용 및 수송, 효소조절 등의 전사체가 다수를 차지하였다. 한편 세포작용에서는 세포영역과 세포소기관 및 세포막, 거대생체분자 복합체 등의 전사체가 동정되었다.

온도 조건을 달리한 배추좀나방 사육 유충들의 유전자 발현의 상대적 비교 분포에서 저온 사육충의 유전자 발현양에서 차이를 보이는 유전자들이 존재함을 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 저온과 대조구에서 발현 차이를 보이는 유전자들은 저온에 의한 특이적인 발현변화 경향을 보일 개연성이 높다. 온도변화에 따른 상대적 유전자 발현차이를 토대로, 저온에서 사육된 개체의 지방체의 유전자 발현에서 대조구에 비해 3038개 contig가 발현이 증가되었으며, 발현이 감소되는 contig는 2,946개로 나타났다(Fig. 1B).

온도변화에 따라 배추좀나방 유충의 지방체에서 유전자 발현차이를 조사하기 위해 구조단백질(structural protein), 열충격단백질(heat shock protein), 항산화효소(antioxidant enzymes), 해독작용(detoxification), 지질 변형효소(lipid modification enzyme), 내동결성물질 이동과 합성 관련유전자(cryoprotectant mobilization and biosynthesis-related genes)를 분석하였다. 곤충의 외골격을 구성하는 구조단백질에 속하는 표피 단백질(cuticular protein)은 탈수저항성, 살충제의 침투저해 기능을 가지며, 스트레스에 노출된 표피는 glycine을 많이 함유한 단백질의 발현을 유도하는 것으로 알

려져 있다(Watson et al., 2017; Balabanidou et al., 2018). 곤충에서 표피구조의 주성분은 chitin으로, *N*-acetyl- β -D-glucosamine의 중합체이다(Merzendorfer and Zimoch, 2003). chitin은 표피층뿐만 아니라 장의 상피세포를 따라 배치되어 있는 peritropic matrices와 기관(trachea)를 지지하는 기능을 한다. 또한 곤충의 성장과 탈피는 전적으로 chitin을 포함한 구조의 재배열을 통해 수행된다. 배추좀나방 지방체의 전사체 정보로부터 확인된 표피 단백질의 contig는 15개이며, 저온 발현 전사체의 contig가 대조구 전사체의 contig 보다 발현양이 대체로 높았다(Table 1). 이것은 표피 단백질의 발현이 주로 저온에 관련된 스트레스와 밀접한 관련성이 있음을 시사한다. 또한 표피의 주된 성분이 chitin의 분해와 생합성에 관련된 효소들도 동정되었다. 저온 발현 전사체의 경우, 대조구 발현전사체에 비해 상대적으로 chitinase 유전자들 (Cht2, Cht5, Cht6, Cht7)의 발현이 증가하였다. Chitin synthase의 발현은 온도 변화에 따른 차이를 보여주지 않았다. 필수 유전자인 actin은 저온 발현전사체에서 모든 actin 관련 유전자들의 발현이 증가되었다(Table 1). 저온 발현 전사체에서 chitin 관련 유전자의 발현은 생합성 관련유전자의 발현차이는 보이지 않았으나 분해효소의 발현은 대조구에 비해 높았다. 이것은 저온에서 chitin이 합성 보다는 분해가 우세한 방향으로 대사가 이루어지고 있음을 알 수 있다. 저온에서 곤충의 발육 속도가 지연되거나 낮기 때문에 새로운 표피 생합성을 위한 chitin 생합성의 필요성이 낮아지기 때문인 것으로 생각된다.

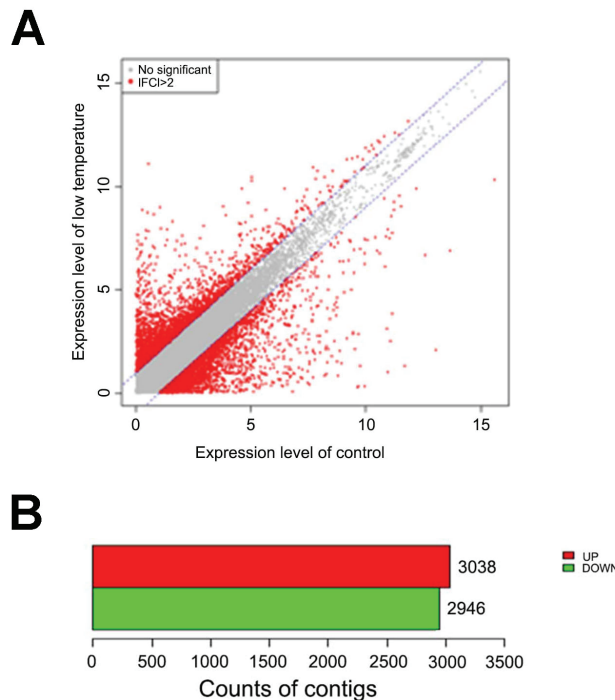


Fig. 1. Scattered plot (A) and numbers of up-regulated or down-regulated contigs (B).
 (A) Red dots outside area of dotted lines indicate fold change ranges, $|FC| \geq 2$. (B) Among contigs identified from transcriptome of fatbody in *Plutella xylostella* larvae, numbers of up-regulated or down-regulated contigs are 3,038 and 2,946, respectively.

Table 1. Structure-related protein genes identified from fatbody transcriptome of *Plutella xylostella*

| Contig | Expression* | | Length (bp) | Description | Species | Coverage | E-Value |
|--------------------------|-------------|------|----------------|---|--------------------------------|----------|-----------|
| | 3 to 10°C | 25°C | | | | | |
| Cuticular protein | | | | | | | |
| c43450_g1_i2 | ▲ | - | 671 | Cuticular protein 11A | <i>Drosophila melanogaster</i> | 29.3 | 2.00E-16 |
| c42111_g2_i1 | ▲▲ | - | 1055 | Cuticular protein 49Aa | <i>Drosophila melanogaster</i> | 74.3 | 2.00E-25 |
| c46024_g1_i1 | ▲▲ | - | 1617 | Cuticular protein 49Aa | <i>Drosophila melanogaster</i> | 62.5 | 4.00E-23 |
| c46024_g1_i2 | ▲▲ | - | 1638 | Cuticular protein 49Aa | <i>Drosophila melanogaster</i> | 62.5 | 4.00E-23 |
| c43017_g1_i1 | ▲▲ | - | 1737 | Cuticular protein 49Aa | <i>Drosophila melanogaster</i> | 70.8 | 1.00E-42 |
| c41699_g1_i1 | ▲ | - | 1231 | Cuticular protein 49Ab | <i>Drosophila melanogaster</i> | 36.3 | 1.00E-12 |
| c42172_g1_i1 | ▲▲ | - | 1045 | Cuticular protein 49Ab | <i>Drosophila melanogaster</i> | 32.4 | 1.00E-27 |
| c40971_g1_i1 | ▲ | - | 800 | Cuticular protein 49Ae | <i>Drosophila melanogaster</i> | 76.9 | 7.00E-26 |
| c43611_g1_i1 | ▲ | - | 1529 | Cuticular protein 49Ah | <i>Drosophila melanogaster</i> | 78.4 | 5.00E-41 |
| c90296_g1_i1 | ▲ | - | 1777 | Cuticular protein 50Cb | <i>Drosophila melanogaster</i> | 34.8 | 1.00E-12 |
| c45113_g2_i1 | ▲ | - | 3454 | Cuticular protein 50Ca | <i>Drosophila melanogaster</i> | 16.8 | 1.00E-17 |
| c42694_g2_i1 | ▲▲ | - | 542 | Cuticular protein 65Ax2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 78.4 | 6.00E-31 |
| c49764_g1_i1 | ▲▲ | - | 1424 | Cuticular protein 66D | <i>Drosophila melanogaster</i> | 29.6 | 5.00E-36 |
| c44947_g1_i1 | ▲ | - | 345 | Cuticular protein 78Cc | <i>Drosophila melanogaster</i> | 57.1 | 9.00E-23 |
| c43651_g3_i1 | ▲▲ | - | 855 | Cuticular protein 92A | <i>Drosophila melanogaster</i> | 27.8 | 3.00E-29 |
| Chitin synthase | | | | | | | |
| c49006_g1_i3 | - | - | 2714 | Glucuronosyltransferase | <i>Drosophila melanogaster</i> | 91.5 | 9.00E-106 |
| c49401_g1_i1 | - | - | 1711 | Glucuronosyltransferase | <i>Drosophila melanogaster</i> | 86.2 | 6.00E-92 |
| Chitinase | | | | | | | |
| c47435_g1_i1 | ▲ | - | 1813 | Cht2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 91.1 | 2.00E-148 |
| c48153_g1_i1 | ▲▲ | - | 2674 | Cht5 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 68.9 | 0 |
| c51992_g1_i1 | ▲ | - | 2565 | Cht6 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 3.5 | 4.00E-20 |
| c51992_g1_i3 | ▲ | - | 5152 | Cht6 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 1.6 | 3.00E-34 |
| c48871_g1_i1 | ▲▲ | - | 1498 | Cht7 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 43.6 | 0 |
| c48871_g2_i1 | ▲ | - | 2679 | Cht7 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 56.3 | 0 |
| Actin | | | | | | | |
| c46168_g1_i1 | ▲ | - | 785 | Actin filament | <i>Drosophila melanogaster</i> | 15.9 | 1.00E-94 |
| c45847_g1_i3 | ▲ | - | 625 | Actin filament | <i>Drosophila melanogaster</i> | 5.5 | 0.00009 |
| c44520_g2_i3 | ▲ | - | 574 | PDGF- and VEGF-receptor | <i>Drosophila melanogaster</i> | 8.0 | 3E-09 |
| c44520_g2_i4 | ▲ | - | 616 | PDGF- and VEGF-receptor | <i>Drosophila melanogaster</i> | 8.6 | 3.00E-12 |
| c48693_g2_i1 | ▲ | - | 685 | PAK-kinase | <i>Drosophila melanogaster</i> | 19.0 | 4.00E-63 |
| c46199_g1_i3 | ▲ | - | 1417 | Vacuolar protein sorting 28 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 99.1 | 4.00E-97 |
| c53824_g1_i3 | ▲ | - | 2031 | Dishevelled associated activator of morphogenesis | <i>Drosophila melanogaster</i> | 38.4 | 6.00E-170 |

* 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. $2 < \log_2 Fc < 10$: ▲; $10 < \log_2 Fc < 50$: ▲▲

Table 2. Heat shock proteins and catalases identified from fatbody transcriptome of *Plutella xylostella*

| contig | Expression* | | Length (bp) | Description | Species | Coverage | E-Value |
|--------------------|-------------|------|-------------|-----------------------|--------------------------------|----------|----------|
| | 3 to 10°C | 25°C | | | | | |
| Heat shock protein | | | | | | | |
| c44076_g1_i1 | ▼ | - | 337 | Heat shock protein 68 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 16.1 | 3.00E-27 |
| c48023_g1_i1 | ▲ | - | 1047 | Heat shock protein 23 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 53.2 | 8.00E-13 |
| Catalase | | | | | | | |
| c53547_g1_i2 | - | - | 458 | Catalase | <i>Drosophila melanogaster</i> | 24.1 | 5.00E-58 |
| c53547_g1_i1 | - | - | 1784 | Catalase | <i>Drosophila melanogaster</i> | 98.4 | 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. $2 < \log_2 Fc < 10$: ▲; $-10 < \log_2 Fc < -2$: ▼

열충격단백질은 환경으로부터 스트레스(운동, 중력, 열, 산소 Ca^{2+} 등)가 유발되었을 때, 세포보호를 위해서 만들어 내는 단백질이다. 곤충에서 열충격단백질은 열과 탈수 스트레스에 대한 보호에 관여하는 것으로 알려져 있다(Goto and Kimura, 1998). 열충격단백질은 이름처럼 열에 대한 반응에만 관여하는 것으로 알려져 있었으나, 저온, 자외선, 조직의 재구성, 생체분자 및 세포 골격보호, 세포자살 등에 열충격단백질이 관여하는 것이 보고되었다(Štětina et al., 2015; García-Reina et al., 2017; Haslbecket al., 1999; Bruey et al., 2000). 열충격단백질은 10에서 100 kDa 이상의 다양한 크기를 가지며, 다양한 세포구획에 존재한다(King and MacRae, 2015; Kriehuber et al., 2010). HSP10, HSP60, HSP75는 mitochondria에 존재하는 반면, 다른 단백질들은 생리적 조건에 따라 세포질, 소포체, 핵 등에 존재한다. 열충격단백질의 기능으로 Hsp10은 단백질 접힘에 관여하며, HspB과 Hsp27은 변성단백질의 접힘촉진, Hsp40은 Hsp70의 cofactor, Hsp60은 단백질 접힘, Hsp70은 단백질 접힘과 내열성에 관여하는 것이 알려져 있다(Li et al., 2009; Jee et al., 2016). Hsp90은 스테로이드 수용체 및 전사인자(transcription factor)로 작용하며, Hsp104와 Hsp110은 극한 온도의 내성과 관련이 있다(Krobitsch et al., 1998; Zuo et al., 2016). 배추좀나방의 지방체에서 Hsp23, Hsp68의 contig가 확인되었다(Table 2). 저온 발현 전사체에서 발현이 증가된 Hsp23은 주로 chill coma 상태의 초파리에서 발현이 증가된다는 보고(Colinet et al., 2010)와 일치하였고, 이 단백질의 발현저하는 저온상태에서 행동이상을 유발한다. 저온 발현 전사체에서 Hsp68 contig에 대해 유전자의 발현은 대조구에 비해 발현이 감소하였다. Hsp 68은 초파리에서 주로 열 스트레스에 의해 유도된다(Bettencourt et al., 2008; Sørensen et al., 2005). Hsp68은 단백질의 보호와 복구에 관여하는 Hsp70과 유사한 단백질로 알려져 있다(Palmer et al., 1986).

항산화물은 낮은 농도에서 단백질, 탄수화물, 지질, DNA의 산화를 지연시키는 물질이다. 항산화물의 분류는 크게 3가지 그룹으로 나눌 수 있다. 1) superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase 등과 같은 효소, 2)

glutathione (GSH), vitamin C, albumin, vitamin E, carotenoids, flavonoids 등의 항산화물질, 3) 산화된 지질이나 과산화물, 손상된 DNA나 단백질의 회복에 관여하는 효소(지질분해효소, 단백질 분해효소, 전이효소 등) (Irshad and Chaudhuri, 2002). SOD는 주로 소포체나 세포질에서 생화학 반응으로 인한 활성산소를 과산화수소로 변환시키며, catalase, glutathione peroxidase 등은 과산화수소를 물로 전환시켜 항산화 작용에 관여한다(Barbehenn, 2002). SOD는 배추좀나방 저온 발현전사체에서 4개 contig가 동정되었으나, 곤충의 SOD 유전자들과 낮은 상동성을 보였다. CAT는 2개 contig가 동정되었으나, 대조구와 저온 발현 전사체에서 유전자 발현차이를 보이지 않았다. Glutathione peroxidase는 배추좀나방의 전사체에서는 동정되지 않았다(Table 2).

스트레스와 관련된 해독작용에서는 cytochrome P450, metallothionein 2 및 UDP-당전이효소(UDP-glycosyltransferase), Glutathione S transferase 등이 관여한다. 곤충의 cytochrome P450s은 유약호르몬, 탈피호르몬, 표피의 탄화수소물, 페로몬의 생합성에 관여한다(Feyereisen, 1999). 이 효소들의 일부는 살충제의 활성화와 해독에 관련이 있다(Berge et al., 1998; Scott, 1999; Le Goff et al., 2003). 곤충의 cytochrome P450s은 또한 식물의 이종간 통신물질(allelochemical)의 대사에 중요한 역할을 한다(Danielson et al., 1998; Petersen et al., 2003; Wen et al., 2003; David et al., 2006). CYP6A1은 집파리(*Musca domestica*)에서 살충제인 Aldrin의 대사에 관여하며, CYP6D1와 함께 deltamethrin 대사에 작용한다. CYP4는 1차적으로 독성물질의 대사에 관여하는 것으로 알려져 있다(Danielson et al., 1998). 이러한 다양한 기능은 다양한 구조에 기인한 것으로 생각되며, 곤충 종에 따라 P450 유전자의 수도 다양하다. 초파리(*Drosophila melanogaster*)에서는 83개, *Anopheles* 속에서는 111개, 흰개미에서는 46개 P450 유전자가 발견되었다. 이것은 유전자의 다형성을 통해 다양한 물질에 대한 해독작용을 효과적으로 증대할 수 있는 분자기작으로 이해할 수 있다. 배추좀나방의 발현 전사체에서 cytochrome P450의 32개 contigs를 확인하였다(Table 3). 초파리와 모기에서 DDT 약제 저항성에 관여하는 유전자로

알려진 CYP6에 속하는 contig는 11개로 저온 발현 전사체는 CYP6a2, 6a18, 6a21, 6d5, 6g1, 6g2의 발현이 대조구보다 증가하였다. 독성물질 대사에 관여하는 2개의 CYP4 contig도 발현이 증가하였다. 또한 저온 발현 전사체에서 CYP9f2도 대조구에 비해 발현이 증가하였다(Table 3).

UDP-당전이효소는 동물, 식물, 미생물, 바이러스 등의 모든 생물체에서 발견되며, 공통된 조상으로 유래된 것으로 생각된다(Mackenzie et al., 1997; Meech and Mackenzie,

1997). 곤충의 UDP-당전이효소는 당의 주개(donor)로 UDP-glucuronic acid 보다는 UDP-glucose를 사용한다(Ahmad and Hopkins, 1993; Rausell et al., 1997). 척추동물과 유사하게 기질들은 곤충에서 쉽게 포도당과 결합하며, 다양한 공충 중에서 UDP-당전이효소 활성이 보고되었다(Real et al., 1991). 곤충의 UDP-당전이효소는 먹이에서 발견되는 식물의 이종간 통신물질을 해독하는 데 중요한 역할을 한다(Ahmad and Hopkins, 1993). UDP-당전이효소가 촉매하는 생체이물

Table 3. Detoxification and antioxidant enzyme genes identified from fatbody transcriptome of *Plutella xylostella*

| Contig | Expression* | | Length (bp) | Description | Species | Coverage | E-Value |
|----------------------------------|-------------|------|-------------|---|--------------------------------|----------|-----------|
| | 3 to 10°C | 25°C | | | | | |
| Catalase | | | | | | | |
| c53547_g1_i2 | - | - | 458 | Catalase | <i>Drosophila melanogaster</i> | 24.1 | 5.00E-58 |
| c53547_g1_i1 | - | - | 1784 | Catalase | <i>Drosophila melanogaster</i> | 98.4 | 0 |
| Cytochrome P450 | | | | | | | |
| c31995_g2_i1 | ▲ | - | 269 | Cyp4ac3 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 10.2 | 0.000001 |
| c51970_g3_i1 | ▲▲ | - | 2339 | Cyp4g15 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 83.8 | 0 |
| c49022_g1_i2 | ▲ | - | 1339 | Cytochrome P450-6a2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 83.2 | 2.00E-95 |
| c49022_g1_i3 | ▲ | - | 1645 | Cytochrome P450-6a2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 99.0 | 8.00E-101 |
| c49022_g1_i1 | ▲ | - | 975 | Cytochrome P450-6a2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 51.8 | 8.00E-64 |
| c43003_g2_i1 | ▲ | - | 1698 | Cyp6a18 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 94.9 | 2.00E-93 |
| c46326_g2_i1 | ▲ | - | 609 | Cyp6a21 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 35.9 | 3.00E-28 |
| c50258_g1_i1 | ▲ | - | 565 | Cyp6d5 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 36.2 | 5.00E-14 |
| c46659_g1_i1 | ▲ | - | 1642 | Cyp6g1 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 37.6 | 2.00E-31 |
| c45472_g1_i2 | ▲ | - | 1384 | Cyp6g2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 76.3 | 1.00E-60 |
| c47201_g1_i1 | ▲ | - | 1115 | Cyp6g2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 33.5 | 5.00E-30 |
| c49249_g1_i1 | ▲▲ | - | 1772 | Cyp9f2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 100.0 | 2.00E-88 |
| c36866_g1_i1 | ▲ | - | 429 | Cyp9f2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 27.5 | 1.00E-21 |
| UDP-glycosyltransferase | | | | | | | |
| c53351_g1_i2 | ▼ | - | 2201 | 2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase | <i>Drosophila melanogaster</i> | 79.1 | 1.00E-36 |
| c49639_g1_i1 | ▼▼ | - | 1807 | UDP-glycosyltransferase 35a | <i>Drosophila melanogaster</i> | 86.0 | 2.00E-50 |
| Glutathione S transferase | | | | | | | |
| c44544_g1_i1 | - | - | 1120 | GST D1 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 98.1 | 7.00E-67 |
| c47399_g2_i2 | ▲ | - | 1430 | GST D7 | <i>Anopheles gambiae</i> | 77.5 | 1.00E-50 |
| c24768_g1_i1 | - | - | 1756 | GST Z1 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 84.6 | 2.00E-44 |
| c46043_g3_i2 | ▲ | - | 947 | GST E4 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 96.0 | 3.00E-60 |
| c46043_g3_i1 | ▲ | - | 728 | GST E2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 50.2 | 3.00E-18 |
| c43439_g1_i1 | - | - | 602 | GST O3 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 69.3 | 5.00E-47 |

* 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. $2 < \log_2 Fc < 10$: ▲; $10 < \log_2 Fc < 50$: ▲▲; $-10 < \log_2 Fc < -2$: ▼; $-50 < \log_2 Fc < -10$: ▼▼

(xenobiotics)의 생물전환은 살충제 저항성과 관련이 있다(Bull and Whitten, 1972). 곤충의 UDP-당전이효소는 또한 표피층 형성, 색소화, 냄새각각에도 관여한다(Mizokami and Yoshitama, 2009; Hopkins and Kramer, 1992; Wang et al., 1999). 배추좀나방의 발현전사체에서 2개의 UDP-당전이효소 contigs를 확인하였다. 저온 발현 전사체의 경우, 2개 contigs에서는 모두 발현이 감소하였다(Table 3).

곤충의 글루타치온 S 전이효소(GST)는 해독효소로서, 살충제 저항성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Wilson, 2001). 곤충저항성과 관련하여 2가지의 생화학적 저항성 기전이 있다(Morton, 1992; Oppenoorth 1984). 첫 번째는 변형된 표적 분자를 만들어서 생체분자와 독소간의 상호작용을 저해함으로써 표적부위에 저항성을 유발하는 것이다. 곤충에서 표적 부위에 해당하는 것으로는 GABA 수용체, Na 채널, acetylcholine esterase, acetylcholine 수용체, 유약호르몬 수용체가 알려져 있다. 두 번째로는 대사저항성으로, 살충제의 독성이 저감되도록 변형되고, 표적 부위에 도달하기 전에 쉽게 배설되는 것이다. GST와 함께 hydrolases와 mixed function oxidases 등이 중요한 역할을 한다. 배추좀나방의 저온 발현 전사체에서 6개의 contig가 확인되었다. 저온 발현전사체는 GST-D7, E2, E4 contig가 발현이 증가하였고, 나머지 contig의 발현은 대조구와 비슷하였다(Table 3). GST-D, E에 속하는 효소들은 주로 유기인계, 유기염소계의 저항성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Li et al., 2007; Wei et al., 2001; Ortelli et al., 2003).

온도변화에 따라 곤충내 세포의 지질조성도 달라지게 되며, 이는 행동변화 뿐만 아니라 생리적 변화를 유발할 수 있다. 온도가 떨어졌을 때, 곤충과 같은 변온동물의 생체막에서 인지질성 지방산(phospholipid fatty acids)은 항점성(Homeoviscosity)을 유지하기 위해 불포화성으로 전환된다(Haubert et al., 2008). 막의 지질에서 온도에 의한 지방산의 조성변화는 상변이나 막의 항점성을 최적화하기 위한 것으로 생각되며, 이는 막의 기능에 중요하다(Hazel and Williams,

1990). 액상에서 gel 상태로의 상전이는 많은 생체막 관련 효소의 활성과 물과 양이온과 같은 물질의 투과성을 증가시키며(Hazel, 1995), 비동결 상태에서 저온으로 인한 손상을 유발시키는 중요한 인자 중의 하나이다(Drobnis et al., 1993). 배추좀나방의 저온 발현 전사체에서 3개 지방산 불포화효소에 대한 contigs를 동정하였고, 이들 유전자는 저온 변화에 관여하는 유전자이기 때문에 저온 발현 전사체에서 desaturase1과 지방산 $\Delta 11$ 불포화 효소의 발현이 증가하였다. 이것은 저온 변화에 관여하는 유전자들이 내한성 여부를 결정하는 중요한 표적유전자가 될 수 있음을 시사해준다. 또한 인지질의 조성을 변화시킬 수 있는 인지질 분해효소인 Phospholipase A2 (PLA2)는 배추좀나방의 저온 발현전사체에서 3개의 contig를 확인하였고, 모두 유전자 발현이 증가하였다(Table 4).

Trehalose는 혈림프에서 발견되는 주요 당이며, 1차적인 에너지원과 chitin 합성의 시작물질로 알려져 있다(Xiong et al., 2016; Thompson, 2003). 지방체는 척추동물의 간과 비슷한 역할을 하며, 대사중심으로써 trehalose-6-phosphate synthase를 이용하여 trehalose를 생산한다(Kern et al., 2012). 파밤나방에서 보고된 것처럼(Park and Kim, 2013), 배추좀나방도 저온에 노출되었을 때, 혈림프에서 글리세롤이 축적된다(결과 미제시). 이것은 글리세롤이 포도당으로부터 시작되는 배추좀나방의 내한성 대사과정에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사해준다. 따라서, 내한성과 관련된 trehalose의 분해와 운반에 관련된 유전자들은 저온에 노출된 나방유충의 생존에 중요한 기여를 한다고 파악할 수 있다. Trehalase (Treh)는 2개의 포도당 분자 생성을 위해 trehalose를 가수분해하는데 관여하고 에너지 대사에서의 중요한 역할과 함께 chitin 생합성 경로에서 나타나는 첫 번째 효소로서 성장, 탈피, 변태 및 생식 등의 다양한 생리대사에서 중요한 역할을 한다. Trehalose 합성에서 가장 잘 알려진 경로는 trehalose-6-phosphate synthase로 두 분자의 glucose가 UDP와 반응하여 uridine-5'-diphosphoglucose가 되고, UDP와 분리되어 glucose-6-phosphate가 된다. Trehalose-6-phosphate의 생성

Table 4. Lipid modification genes identified from fatbody transcriptome of *Plutella xylostella*

| Contig | Expression* | | Length (bp) | Description | Species | Coverage | E-Value |
|-----------------------|-------------|------|-------------|-------------------------------|--------------------------------|----------|-----------|
| | 3 to 10°C | 25°C | | | | | |
| Fatty acyl desaturase | | | | | | | |
| c47629_g6_i1 | ▲ | - | 554 | Desaturase 1 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 32.9 | 5.00E-49 |
| c50092_g2_i4 | ▲ | - | 771 | Acyl-CoA Delta(11) desaturase | <i>Spodoptera littoralis</i> | 44.4 | 1.00E-75 |
| c50092_g2_i1 | ▲ | - | 1316 | Acyl-CoA Delta(11) desaturase | <i>Spodoptera littoralis</i> | 71.6 | 1.00E-129 |
| Phospholipase A2 | | | | | | | |
| c37357_g1_i2 | ▲ | - | 274 | Phospholipase A2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 22.3 | 2.00E-23 |
| c44408_g1_i1 | ▲ | - | 1351 | Phospholipase A2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 42.6 | 1.00E-49 |
| c45154_g1_i2 | ▲ | - | 1149 | Phospholipase A2 | <i>Drosophila melanogaster</i> | 32.5 | 2.00E-51 |

* 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. $2 < \log_2 Fc < 10$: ▲

Table 5. Cryoprotectant mobilization genes identified from fatbody transcriptome of *Plutella xylostella*

| Contig | Expression* | | Length (bp) | Description | Species | Coverage | E-Value |
|-----------------------|-------------|------|-------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------|----------|
| | 3 to 10°C | 25°C | | | | | |
| Trehalase | | | | | | | |
| c53723_g3_i1 | ▼ | - | 641 | Trehalase | <i>Drosophila melanogaster</i> | 35.74 | 4.00E-53 |
| Trehalose transporter | | | | | | | |
| c50351_g2_i1 | ▼ | - | 1247 | Trehalose transporter Tret1 | <i>Apis mellifera ligustica</i> | 41.4 | 1.00E-20 |
| c50351_g2_i2 | ▼ | - | 1333 | Trehalose transporter Tret1 | <i>Apis mellifera ligustica</i> | 53.2 | 2.00E-24 |
| c44867_g1_i2 | ▼▼ | - | 1757 | Trehalose transporter Tret1 | <i>Bombyx mori</i> | 87.1 | 9.00E-32 |
| c52234_g1_i5 | ▼ | - | 1956 | Trehalose transporter Tret1 | <i>Bombyx mori</i> | 74.3 | 7.00E-37 |
| c52234_g1_i3 | ▼ | - | 1775 | Trehalose transporter Tret1 | <i>Bombyx mori</i> | 78.6 | 2.00E-38 |
| c48145_g1_i1 | ▼ | - | 1866 | Trehalose transporter Tret1 | <i>Culex quinquefasciatus</i> | 88.0 | 2.00E-51 |
| c54151_g1_i1 | ▼ | - | 503 | Trehalose transporter Tret1-2 homolog | <i>Drosophila sechellia</i> | 28.7 | 2.00E-09 |

*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. $2 < \log_2F_c < 10$: ▲; $10 < \log_2F_c < 50$: ▲▲; $-10 < \log_2F_c < -2$: ▼; $-50 < \log_2F_c < -10$: ▼▼

경로는 Trehalose-6-phosphate 탈수소효소에 의해 trehalose 로 전환된다. 배추좀나방의 저온 발현전사체는 대조구에 비해 Trehalase와 trehalose transporter의 발현이 감소되었다 (Table 5). 이것은 저온에서는 에너지 생산의 필요성이 낮아 지기 때문에 trehalose 분해를 통한 포도당대사 요구가 낮은 것으로 파악된다. 따라서 저온에서 trehalase 발현이 낮아지는 것은 에너지를 생산하기 위한 포도당 대사과정이 저하되는 것을 의미한다고 볼 수 있다. 결과적으로 trehalose transporter의 발현도 낮아지는 것도 이해할 수 있다.

요 약

온도는 곤충의 발달, 성장, 생식에 중요한 요인이며, 또한 곤충의 생존에 직접적 관련있는 물리적 요인이다. 변온동물인 곤충은 생존을 위해 기후변화에 반응을 해야 하며, 저온과 같은 취약한 환경하에서도 다양한 생존전략을 발달시켜야 한다. 본 연구는 저온에 대한 적응에 기여하는 유전자를 동정하기 위해 배추좀나방 유충의 지방체를 저온과 상온에 노출시켜 전사체 분석을 수행하였다. 저온전사체에서는 chitinase, 표피단백질, Hsp23, chytochrome, Glutathione S transferase, phospholipase 2 유전자의 발현이 증가된 반면, 에너지 대사에 관여하는 UDP-당전이효소, trehalase, trehalose transporter는 오히려 발현이 감소하였다. 저온에 곤충이 노출되었을 때, 대사중심인 지방체의 유전자 발현의 변화가 곤충의 온도 적응을 이해하는 단서를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

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

Ahmad, S. A., & Hopkins, T. L. (1993). β -glucosylation of plant phenolics by phenol β -glucosyltransferase in larval tissues of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23(5), 581-589.

Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science* 27, 68-74.

Barbehenn, R. V. (2002). Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper. *Journal of Chemical Ecology*, 28(7), 1329-1347.

Bauerfeind, S. S., & Fischer, K. (2014). Simulating climate change: temperature extremes but not means diminish performance in a widespread butterfly. *Population Ecology*, 56(1), 239-250.

Bergé, J., Feyereisen, R., & Amichot, M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353(1376), 1701-1705.

Bettencourt, B. R., Hogan, C. C., Nimali, M., & Drohan,

- B. W. (2008). Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of *Hsp70* copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in *Hsp70* null flies. *BMC biology*, 6(1).
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-5>.
- 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. *Nature Cell Biology*, 2, 645-652.
- Bull, D. L., & Whitten, C. J. (1972). Factors influencing organophosphorus insecticide resistance in tobacco budworms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(3), 561-564.
- Chen, S., Fleischer, S. J., Tobin, P. C., & Saunders, M. C. (2011). Projecting insect voltinism under high and low greenhouse gas emission conditions. *Environmental Entomology*, 40(3), 505-515.
- Cho, J. M., Kim, K. J., Kim, S. M., Han, D. S., & Hur, J. H. (2001). Diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in Kangwon alpine vegetable croplands. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 5(1), 30-35.
- Clark, M. S., & Worland, M. R. (2008). How insects survive the cold: molecular mechanisms—a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 178(8), 917-933.
- Colinet, H., Lee, S. F., & Hoffmann, A. (2010). Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *The FEBS journal*, 277(1), 174-185.
- Danielson, P. B., Foster, J. L. M., McMahon, M. M., Smith, M. K., & Fogleman, J. C. (1998). Induction by alkaloids and phenobarbital of Family 4 Cytochrome P450s in *Drosophila*: evidence for involvement in host plant utilization. *Molecular and General Genetics MGG*, 259(1), 54-59.
- David, J. P., Boyer, S., Mesneau, A., Ball, A., Ranson, H., & Dauphin-Villemant, C. (2006). Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(5), 410-420.
- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchozdoguy, T. J., Overstreet, J. W., & Crowe, J. H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265(4), 432-437.
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 507-533.
- García-Reina, A., Rodríguez-García, M. J., Ramis, G., & Galián, J. (2017). Real-time cell analysis and heat shock protein gene expression in the TcA *Tribolium castaneum* cell line in response to environmental stress conditions. *Insect Science*, 24(3), 358-370.
- Gosden, R. (2011). Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. *Fertility and Sterility*, 96(2), 264-268.
- Goto, S. G., & Kimura, M. T. (1998). Heat-and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*, 44(12), 1233-1239.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R., & Buchner, J. (1999). Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *The EMBO Journal*, 18(23), 6744-6751.
- Haubert, D., Häggblom, M. M., Scheu, S., & Ruess, L. (2008). Effects of temperature and life stage on the fatty acid composition of Collembola. *European Journal of Soil Biology*, 44(2), 213-219.
- Hayakawa, H., Tsutsui, H., & Goto, C. (1988). A survey of overwintering of the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linné, in the Tokachi district of Hokkaido. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, 39, 227-228.
- Hazel, J. R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation?. *Annual Review of Physiology*, 57(1), 19-42.
- Hazel, J. R., & Williams, E. E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research*, 29(3), 167-227.
- Hopkins, T. L., & Kramer, K. J. (1992). Insect cuticle sclerotization. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 273-302.
- Irshad, M., & Chaudhuri, P. S. (2002). Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(11), 1233-1239.
- Jee, H. (2016). Size dependent classification of heat shock proteins. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 12(4), 255-259.
- Kern, C., Wolf, C., Bender, F., Berger, M., Noack, S., Schmalz, S., & Ilg, T. (2012). Trehalose-6-phosphate synthase from the cat flea *Ctenocephalides felis* and *Drosophila melanogaster*: gene identification, cloning, heterologous functional expression and identification of inhibitors by high throughput screening. *Insect Molecular Biology*, 21(4), 456-471.
- Kim, M. H., & Lee, S. C. (1991). Bionomics of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in

- southern region of Korea. Korean Journal of Applied Entomology, 30(3), 169-173.
- Kim, Y. H., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2011). Determination of organophosphate and carbamate resistance allele frequency in diamondback moth populations by quantitative sequencing and inhibition tests. Journal of Asia-Pacific Entomology, 14(1), 29-33.
- Kim, Y., Kim, K., & Kim, N. (1999). Genetic difference between two field populations of *Plutella xylostella* (Linnée) based on four polymorphic allozymes. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2(1), 1-5.
- King, A. M., & MacRae, T. H. (2015). Insect heat shock proteins during stress and diapause. Annual Review of Entomology, 60, 59-75.
- Košťál, V., Šimek, P., Zahradníčková, H., Cimlová, J., & Štětina, T. (2012). Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(9), 3270-3274.
- 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. The FASEB Journal, 24(10), 3633-3642.
- Krobitsch, S., Brandau, S., Hoyer, C., Schmetz, C., Hübel, A., & Clos, J. (1998). Leishmania donovani heat shock protein 100 characterization and function in amastigote stage differentiation. Journal of Biological Chemistry, 273(11), 6488-6494.
- Kvist, J., Wheat, C. W., Kallioniemi, E., Saastamoinen, M., Hanski, I., & Frilander, M. J. (2013). Temperature treatments during larval development reveal extensive heritable and plastic variation in gene expression and life history traits. Molecular Ecology, 22(3), 602-619.
- Le Goff, G., Boundy, S., Daborn, P. J., Yen, J. L., Sofr, L., Lind, R., & French-Constant R. H. (2003). Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33(7), 701-708.
- 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). Korean Journal of Applied Entomology, 32(3), 323-329.
- Li X., Schuler M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Annual Review of Entomology, 52, 231-253.
- Li, J., Qian, X., & Sha, B. (2009). Heat shock protein 40: Structural studies and their functional implications. Protein & Peptide Letters, 16(6), 606-612.
- Li, N. G. (2016). Strong tolerance to freezing is a major survival strategy in insects inhabiting central Yakutia (Sakha Republic, Russia), the coldest region on earth. Cryobiology, 73(2), 221-225.
- Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F., & Debert, D. W. (1997). The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. Pharmacogenetics, 7(4), 255-269.
- Meech, R., & Mackenzie, P. I. (1997). Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 24(12), 907-915.
- Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. Journal of Experimental Biology, 206(24), 4393-4412.
- Michaud, M. R., & Denlinger, D. L. (2004). Molecular modalities of insect cold survival: current understanding and future trends. International Congress Series, 1275, 32-46.
- Mizokami, H., & Yoshitama, K. (2009). Sequestration and metabolism of host-plant flavonoids by the Pale Grass Blue, *Pseudaeschnia maha* (Lepidoptera: Lycaenidae). Entomological Science, 12(2), 171-176.
- Morton, R. A. (1992). Evolution of *Drosophila* insecticide resistance. Genome, 36(1), 1-7.
- Neven, L. G. (2000). Physiological responses of insects to heat. Postharvest Biology and Technology, 21(1), 103-111.
- Oppenoorth, F. J. (1984). Biochemistry of insecticide resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology, 22(2), 187-193.
- Ortelli, F., Rossiter, L. C., Vontas, J., Ranson, H., & Hemingway, J. (2003). Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochemical Journal, 373(3), 957-963.
- Palter, K.B., Watanabe, M., Stinson, L., Mahowald, A.P., & Craig, E.A. (1986). Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp70 cognate proteins. Molecular Cell Biology, 6, 1187-1203.
- Park, Y. J., & Kim, Y. G. (2013). RNA interference of glycerol biosynthesis suppresses rapid cold hardening of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Journal of

- Experimental Biology, 4196-4203.
- Park, Y. J., & Kim, Y. G. (2014). A specific glycerol kinase induces rapid cold hardening of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Insect Physiology*, 67, 56-63.
- Petersen, R. A., Niamsup, H., Berenbaum, M. R., & Schuler, M. A. (2003). Transcriptional response elements in the promoter of CYP6B1, an insect P450 gene regulated by plant chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1619(3), 269-282.
- Rausell, C., Llorca, J., & Dolores Real, M. (1997). Separation by FPLC chromatofocusing of UDP-glucosyltransferases from three developmental stages of *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34(3), 347-358.
- Real, M. D., Ferre, J., & Chapa, F. J. (1991). UDP-glucosyltransferase activity toward exogenous substrates in *Drosophila melanogaster*. *Analytic Biochemistry*, 194(2), 349-352.
- Sable, M. G., & Rana, D. K. (2016). Impact of global warming on insect behavior - A review. *Agricultural Reviews*, 37(1), 81-84.
- Scott, J.G. (1999). Cytochrome P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(9), 757-777.
- Sformo, T., Walters, K., Jeannet, K., Wowk, B., Fahy, G. M., Barnes, B. M., & Duman, J. G. (2010). Deep supercooling, vitrification and limited survival to-100 C in the Alaskan beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae) larvae. *Journal of Experimental Biology*, 213(3), 502-509.
- Sinclair, B.J., Addo-Bediako, A., & Chown, S.L. (2003). Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance. *Biological Reviews*, 78(2), 181-195.
- Sørensen, J. G., Nielsen, M. M., Kruhøffer, M., Justesen, J., & Loeschcke, V. (2005). Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress & Chaperones*, 10(4), 312-328.
- Štětina, T., Košťál, V., & Korbelová, J. (2015). The role of inducible Hsp70, and other heat shock proteins, in adaptive complex of cold tolerance of the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). *PLoS One*, 10(6), e0128976.
- Talekar, N. S., & Shelton, A. M. (1993). Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*, 38(1), 275-301.
- Thompson, S. N. (2003). Trehalose- the insect 'blood' sugar. *Advances in Insect Physiology*, 31, 205-285.
- Toxopeus, J., & Sinclair, B. J. (2018). Mechanisms underlying insect freeze tolerance. *Biological Reviews*, 93(4), 1891-1914.
- Wang, Q., Hasan, G., Pikielny, C.W. (1999). Preferential expression of biotransformation enzymes in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster*, the antennae. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 10309-10315.
- Watson, G. S., Watson, J. A., & Cribb, B. W. (2017). Diversity of cuticular micro- and nanostructures on insects: properties, functions, and potential applications. *Annual Review of Entomology*, 62, 185-205.
- Wei, S. H., Clark, A. G., & Syvanen, M. (2001). Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12), 1145-1153.
- Weisenburger, D. D. (1993). Human health effects of agricultural use. *Human Pathology*, 24(6), 571-576.
- Wen, Z., Pan L., Berenbaum, M. R., & Schuler, M. A. (2003). Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(9), 937-947.
- Wilson, T. G. (2001). Resistance of *Drosophila* to Toxins. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 545-571.
- Xiong, K. C., Wang, J., Li, J. H., Deng, Y. Q., Pu, P., Fan, H., & Liu, Y. H. (2016). RNA interference of a trehalose-6-phosphate synthase gene reveals its roles during larval-pupal metamorphosis in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Physiology*, 91-92, 84-92.
- Yamamura, K., & Kiritani, K. (1998). A simple method to estimate the potential increase in the number of generations under global warming in temperate zones. *Applied Entomology and Zoology*, 33(2), 289-298.
- 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.
- Zuo, D., Subjeck, J., & Wang, X. Y. (2016). Unfolding the role of large heat shock proteins: New insights and therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*, 7, 75.