

체세포 복제 한우 수송아지의 성장 특성과 번식생리적 변화

배성훈¹, 양병철², 고응규², 오진봉², 성환후³, 민관식⁴, 박응우², 박수봉², 황성수^{2*}

¹서울우유 생명공학연구소, ²농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과, ³농촌진흥청 국립축산과학원 가축개량평가과, ⁴한경대학교 생물환경정보통신전문대학원

Growth Characteristics and Variation of Reproductive Physiology in SCNT Cloned Male Hanwoo Calves

Seong-Hun Bae¹, Byoung-Chul Yang², Yeoung-Gyu Ko², Keon Bong Oh², Hwan-Hoo Seong³, Kwan-Sik Min⁴, Eung-Woo Park², Soo-Bong Park² and Seongsoo Hwang^{2*}

¹Biotechnology Institute, Seoulmilk, Gyeonggi 476-851, Korea

²Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Suwon 441-706, Korea

³Animal Genetic Improvement Division, National Institute of Animal Science, Cheonan 331-801, Korea

⁴Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the variation of growth characteristics and reproductive physiology in cloned Hanwoo male calves during growing stage. The hematological parameters, body weight, and plasma hormonal levels, birth to 12 months, were analyzed in the cloned calves ($n=3$). Differences among treatment means were determined by a student *t*-test. A probability of $P<0.05$ was considered statistically significant. The hematological parameters, such as white blood cell, red blood cell, and platelet, were not different in both normal and cloned calves. The difference of body weight, however, was significantly higher in the cloned calves, 5~6 months ($p<0.05$) and 7~12 months ($p<0.01$), than that of the comparators, respectively. The plasma IGF-1 level was statistically significant in the cloned calves, 5~10 months, compared to that of the normal calves ($p<0.05$). However, the plasma testosterone level was not different in both normal and clone calves according to growing stage. Taken together, the cloned Hanwoo male calves are growing faster and maintaining a normal reproductive physiology.

(Key words : cloned Hanwoo male calves, hematological parameters, body weight, IGF-1, testosterone)

서 론

체세포 복제 기법은 우량 형질 개체의 증식과 멸종 위기 특수 동물의 복원 등에 유용하게 활용되는 새로운 기술로서 재생의학(Zawada 등, 1998), 형질전환동물(McCreath 등, 2000) 및 발생학적 기초 연구(Dean 등, 2001) 등 새로운 분야에 접목되어 활용 가능성은 더욱 다양하다. 하지만 현재까지 핵이식 과정의 비효율성(Wilmot 등, 1997), 비정상적 임신 또는 유산(Hill 등, 2000), 분만 지연(황 등, 2008a,b) 및 출생 후의 생존 기간 또는 건강 이상(Hill 등, 1999) 등 해결해야 할 문제들이 아직 남아 있는 실정이다.

최근 정상적으로 성장한 복제소의 경우는 번식 능력에 문제가 없다는 결과들이 보고되고 있다. 복제소와 복제소 또는 복제소와 일반소 사이에 인공수정 또는 체외수정란을 이용하여

정상적으로 후대가 생산되었다고 보고되었으며(Yonai 등, 2005; Faber 등, 2004; Wells 등, 2004; Lanza 등, 2001), 국내에서도 농촌진흥청 국립축산과학원에서 체세포 복제 수소의 정액을 이용하여 복제 암소에 인공수정 실시하여 일반소와 다름없이 정상적으로 복제 후대가 태어났다고 보고가 있었으며(배 등, 2007), 복제소 생산 효율 향상을 위한 연구가 보고되었다(황 등, 2008c).

최근 유럽연합 식품안전청(European Food Safety Authority)과 미국의 식품의약품안전청(U.S. Food and Drug Administration)에서 복제 소, 돼지, 양 및 그들의 후대로부터 생산된 식육과 우유가 정상동물로부터 생산된 식품들처럼 안전하다고 보고하였다. 이들 복제동물이 육종에도 사용이 가능하지만, 이들의 가격이나 희소성을 감안하면 우수개체 번식용이나 특이 형질 동물 생산 등에 이용하는 것이 바람직하다고 보고

* 본 과제는 국립축산과학원 경상과제 및 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20080401034074)에서 연구비를 지원받았습니다.

* Correspondence : E-mail : hwangss@korea.kr

하여 향후 복제동물생산 연구의 새로운 방향을 제시하였다고 할 수 있다. 또한 최근 한우에서 외래 유전자가 도입된 체세포를 이용한 복제동물의 생산 가능성이 보고되어(Yang 등, 2008), 형질전환 복제소의 생산을 통한 유용유전자 생산도 가능할 것으로 사료된다.

하지만 여전히 이들 복제동물에 대한 번식생리학적 기초 자료는 부족한 것이 사실이다. 따라서 본 연구는 한우 체세포 복제 수송아지 후대의 성장 단계에 따른 체중이나 호르몬을 분석하여 이들의 성장 특성에 대한 생리학적 기초 자료를 확보하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

본 연구에 사용된 체세포 복제 수송아지는 농촌진흥청 축산과학원에서 생산한 체세포 복제 한우 수소($n=3$)로서 이들의 출생에 대한 정보는 Table 1과 같다. 대조군으로 연령이 비슷한 일반 한우 수소 3마리를 사용하였다. 공시된 동물에 대한 사양은 축산과학원의 일반 사양 프로그램에 준하여 동일한 조건으로 사육하였다.

2. 혈액 채취 및 체중 측정

체세포 복제 수송아지와 일반 수송아지의 혈액은 매 한달 간

Table 1. Information about second generation of SCNT male calves

	Birth date	Birth weight (kg)	Sire	Dam
302 (♂)	2005-04-15	26.0	Normal	Clone
304 (♂)	2005-04-05	27.9	Normal	Clone
307 (♂)	2006-08-05	30.2	Clone	Clone

Table 2. Hematological parameters in normal and cloned male Hanwoo calves

		Months after birth							
		5	6	7	8	9	10	11	12
WBC (K/ μ l)	Normal	8.2	10.1	9.8	8.2	9.8	10.2	9.7	8.6
	Clone	10.0	10.6	10.8	9.7	10.4	9.9	11.7	9.1
RBC (M/ μ l)	Normal	8.8	10.1	9.9	10.0	10.1	8.9	8.9	9.2
	Clone	9.2	10.9	9.6	9.0	8.6	7.5	8.7	8.5
PLT (K/ μ l)	Normal	403	504	439	413	434	503	372	484
	Clone	360	409	359	437	440	416	443	354

Normal range: WBC (4~12 K/ μ l); RBC (5~10 M/ μ l); PLT (200~800 K/ μ l)

격으로 경정맥에서 해파린 처리된 튜브(BD Vacutainer® and CPT™, NJ, USA)를 이용하여 채혈하였다. 혈장은 2,000 ×g로 4℃에서 15분간 원심분리한 후 -80℃에 보관하였다. 체중은 채혈 직후 측정하였다.

3. 혈장 호르몬 측정

혈장 내 IGF-1(AC-27F1, Immunodiagnosics Systems Ltd, Tyne & Wear, UK) 및 Testosterone(ERK B1016, Endocrine Technologies, Newark, CA, USA) 수준은 ELISA 키트를 이용하여 450 nm 파장의 ELISA reader (Microplate Autoreader, Bio-Rad, USA)로 측정하였다. 본 분석에 사용한 제품은 상호반응(cross-reactivity)이나 방해(interference) 작용이 크지 않은 것으로 나타났다.

4. 통계적 유의성 검정

복제소와 정상소 간의 체중 및 혈중 호르몬 농도 차이는 엑셀 프로그램을 이용하여 student *t*-test로 분석하였다. 통계적 유의차는 $p<0.05$ 를 기준으로 하였다. 데이터는 mean±standard deviation으로 나타내었다.

결 과

본 연구는 한우 체세포 복제 수송아지 후대의 번식생리학적 기초 자료를 확보하기 위하여 성장 단계별로 체중 및 혈중 호르몬 등을 측정하였다.

일반 또는 복제 수송아지의 혈액성상 분석 결과는 Table 2와 같다. 백혈구(정상 범위 4~12 K/ μ l), 적혈구(5~10 M/ μ l) 및 혈소판(200~800 K/ μ l) 등의 주요 혈액 성분뿐만 아니라 헤모글로빈 등의 일반 혈액 성분에서도 모두 일반 또는 복제 수송아지에서 정상 범주에 포함되어 복제 수송아지의 성장 단계에 따른 혈액성상의 차이는 없는 것으로 확인되었다.

복제 또는 일반 수송아지의 성장 단계에 따른 체중 변화는

Fig. 1과 같다. 생시 체중은 두 그룹에서 차이가 나타나지 않았으나, 5개월째부터 복제 수송아지의 체중이 일반 수송아지에 비하여 통계적으로 유의하게 높게 나타나기 시작하여($p < 0.05$), 7개월째부터는 그 차이가 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.01$). 또한 동일한 사양 조건에서 복제 수송아지의 일당 증체량(average daily gain)은 0.78~1.42 kg으로 대조군의 0.47~1.12 kg보다 높은 것으로 나타났다. 동일한 사양 조건 하에서 복제 수송아지의 성장이 빠른 이유를 살펴보고자 혈액에서 혈중 IGF-1 농도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 복제 수송아지의 성장 단계에 따른 혈중 IGF-1 농도를 측정된 결과 생후 5개월부터 10개월까지 일반 수송아지에 비하여 유의하게 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 하지만 그 이후에는 정상과 복제소간에 통계적 차이가 나타나지 않았다.

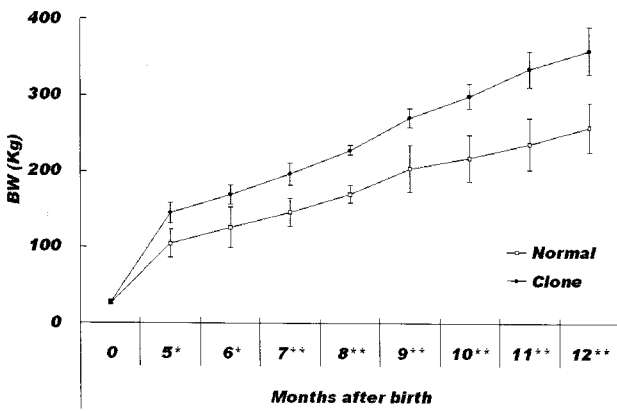


Fig. 1. Body weight of normal and SCNT cloned Hanwoo male calves, birth to 12 months. Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

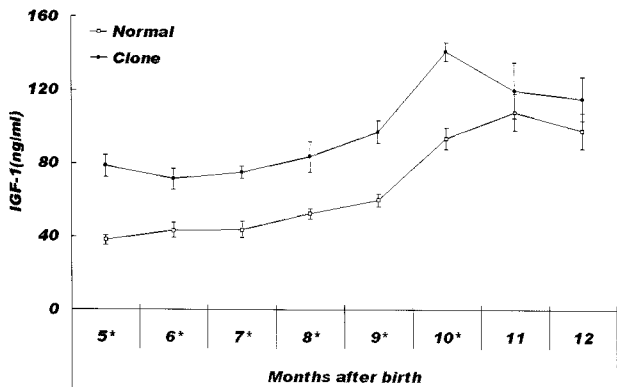


Fig. 2. Plasma IGF-1 concentration in normal and SCNT cloned Hanwoo male calves, 5 to 12 months after birth. Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD). $p < 0.05$.

한편 복제 수송아지의 성장 단계에 따른 testosterone의 발현 양상을 살펴본 결과는 Fig 3과 같다. 정상 수송아지의 경우 생후 9개월부터 혈중 testosterone 농도가 5 ng/ml 수준에서 유지되었으나, 복제 수송아지의 경우 9개월을 기점으로 약 3 ng/ml 수준까지 낮아졌다가 12개월 경에 다시 증가하는 경향을 보였다.

복제 수소의 연령에 따른 testosterone 농도를 비교한 실험 결과는 Fig. 4와 같다. 10일 간격으로 3회 채혈하여 측정된 결과 복제 당대 및 후대 모두 testosterone 분비에 별다른 문제점은 없는 것으로 확인되었다.

고찰

복제 동물의 성장 단계에 따른 혈액성상 분석은 보고된 바가 많지 않다. Wells 등(2004)은 2년생 복제소 9마리의 혈액

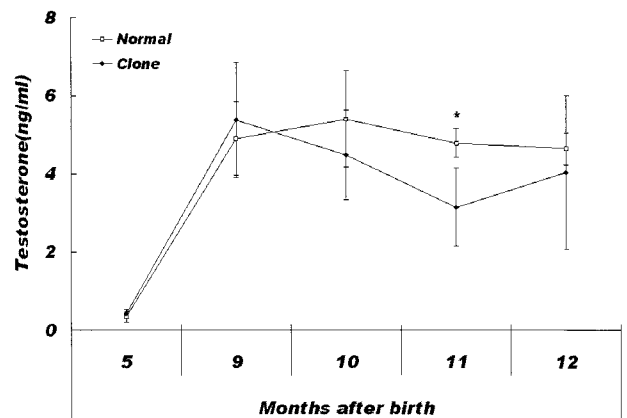


Fig. 3. Plasma testosterone concentration in normal and SCNT cloned Hanwoo male calves, 5 to 12 months after birth. Values are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$.

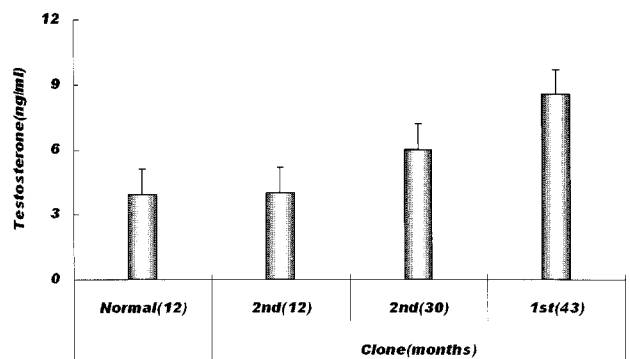


Fig. 4. Plasma testosterone concentration in SCNT cloned Hanwoo male according to age. Values are expressed as mean \pm SD.

성분을 분석한 결과, 대조군과 차이가 나타나지 않는다고 보고하였다. 또한 Kasai 등(2007)도 체세포 복제 당대와 후대의 혈액성상에서 차이가 나타나지 않았다고 보고하였다. 하지만 이러한 혈액 성분이나 또는 기타 간 기능, 대사 상태 등이 특별한 이상이 없거나 또는 정상 범주에 들어간다 하더라도, 처치가 필요한 질병이 발생한다고 보고하여 지속적인 관찰과 연구가 필요하다는 것을 제시하였다.

Wells 등(2004)의 보고에 의하면, 11마리의 Friesian 복제 젖소의 체중은 15개월령에 331 kg 정도였으며, 일당 증체량은 평균 0.68 kg 정도라고 하였다. 또한 Kasai 등(2007)은 복제 일본 화우(cloned Japanese black cow)에서의 체중 증가 양상을 보고하였는데, 본 연구 결과와 유사한 체중 변화 양상을 보였다. 이상의 결과를 종합하여 보면, 복제 수송아지는 일반 수송아지와 비교하여 빠른 성장이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

대사 호르몬의 일종인 IGF-1은 섭취와 대사에 밀접한 연관이 있으며, 성선자극호르몬(gonadotropin)의 분비에도 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다(Brito 등, 2007a,b). 또한 Leydig 세포의 호르몬 분비에 영향을 미칠 뿐만 아니라 정소 세포(testicular cells)의 증식과 분화에도 관여하는 것으로 보고되었다(Lin, 1995; Caprio 등, 2003; Wang 등, 2003). 권 등(2000; 2001)은 비육우에 성장 촉진제를 첨가하여 급여한 처리구에서 체중의 증가와 함께 IGF-1의 농도가 유의하게 높아진다고 보고하여 체중증가와 IGF-1 발현이 밀접한 연관이 있음을 나타내주었다. 본 연구에서도 복제소의 체중 증가가 정상에 비하여 유의하게 높았고, 그 기간에 혈중 IGF-1의 농도 또한 복제소 그룹에서 유의하게 높게 나타나는 경향을 보여 위의 연구 결과와 유사한 결과를 얻었다. 하지만 성장 단계에 따른 체중 증가와 IGF-1의 발현과의 상관관계를 살펴본 결과, 일반 수송아지에서는 매우 높은 상관관계($r=0.92$)를 나타냈으나, 복제 수송아지의 경우는 체중 증가와 IGF-1 농도 사이에 연관성이 매우 낮은 것으로 나타났다. Brito 등(2007a)은 영양적인 측면에서 적절한 영양소를 공급할 경우 성장 단계별 체중증가와 IGF-1의 발현 사이의 직접적인 상관관계가 있다고 보고하였다. 이상의 결과를 볼 때, 복제송아지의 경우 정상 수송아지에 비하여 외형적으로 빠른 성장이 이루어지고 있지만, 내분비적인 조절이 적절하게 일어나지 못할 가능성이 있음을 나타낸다고 할 수 있겠다.

Testosterone은 연령, 거세 유무 및 영양 성분에 많은 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(Bruckmaier 등, 1998; 이 등, 1998; 흥 등, 1998). Brito 등(2007a,b)은 앵거스(Angus)와 앵거스 교잡종의 송아지에서 성장 단계에 따른 체중 증가와 호르몬 변화에 대한 보고에서 7~9개월 경에 일시적으로 증가하였다가 점차 4~5 ng/ml 수준으로 안정화 된다고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 양상을 나타내었다. 또한 이들은 보고에서

체중 증가와 testosterone 발현간에 별다른 상관관계가 없었다고 보고하였다. 하지만 Bruckmaier 등(1998)은 홀스타인 교잡종에서 체중의 증가에 따라 testosterone의 발현도 영향을 받는다고 보고하여 종에 따라 차이가 나타날 수 있음을 알 수 있었다.

특히 당대의 경우 자연 종부 또는 인공수정 방법을 통하여 후대를 생산하여 번식 능력에 이상이 없는 것으로 확인되었다(배 등, 2007).

본 연구의 연구 결과를 종합하여 보면 체세포 복제 수송아지의 성장은 정상에 비하여 다소 빠른 체중 증가와 높은 IGF-1 농도를 나타내었지만 호르몬의 변화는 다소 변이가 나타나는 경향을 보였다. 본 연구에 사용된 체세포 복제 한우 수소의 수적 제약성에도 불구하고 본 연구의 결과는 체세포 복제 수송아지의 성장 단계에 따른 혈액성상, 체중 변화 및 혈중 호르몬 발현 양상을 확인하였다는 측면에서 향후 체세포 복제 또는 형질전환 동물 등의 특수 가축 생산 및 번식생리 연구에 중요한 기초 자료가 될 수 있으리라 사료된다.

결론

본 연구는 한우 체세포 복제 수송아지 후대의 성장 단계에 따른 체중이나 호르몬을 분석하여 이들의 성장 특성에 대한 생리학적 기초 자료를 확보하기 위하여 실시하였다. 3마리의 복제 수송아지를 이용하여 혈액성상, 체중 변화 및 혈장 호르몬 수준을 생후부터 12개월까지 분석하였다. 비슷한 연령의 일반 송아지를 대조군으로 사용하였다. 각 분석에 대한 유의차는 student *t*-test 방법으로 분석하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다. 백혈구, 적혈구 및 혈소판 등의 주요 혈액 성분은 일반 송아지와 차이는 없는 것으로 확인되었다. 하지만 복제 수송아지의 성장 단계별 체중은 5~6개월 ($p < 0.05$)과 7~12개월 ($p < 0.01$)에서 일반 수송아지보다 유의적으로 높게 나타났다. 복제 수송아지의 성장 단계에 따른 혈중 IGF-1 농도를 측정할 결과 생후 5개월부터 10개월까지 일반 수송아지에 비하여 유의하게 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 복제 수송아지의 성장 단계별 혈장 testosterone 농도는 9개월을 기점으로 점차 낮아졌다가 12개월 경에 다시 증가하는 경향을 보였다. 복제 당대 및 후대 모두 testosterone 분비에 별다른 문제점은 없는 것으로 확인되었다. 이상의 결과를 종합하여보면, 체세포 복제 한우 수송아지는 빠른 성장에도 불구하고 정상적인 생리 현상을 나타냄을 확인하였다.

참고문헌

Brito LFC, Barth A, Rawlings N, Wilde R, Crews D Jr, Mir P and Kastelic J. 2007a. Circulating metabolic hormones

- during the peripubertal period and their association with testicular development in bulls. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 502-508.
- Brito LFC, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews Jr DH, Mir PS and Kastelic JP. 2007b. Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. *Domestic Animal Endocrinology* 33:1-18.
- Bruckmair RM, Lehann E, Hugi D, Hammon HM and Blum JW. 1998. Ultrasonic measurement of *longissimus dorsi* muscle and backfat, associated with metabolic and endocrine traits, during fattening of intact and castrated male cattle. *Livestock Production Science* 53:123-134.
- Caprio M, Fabbrini E, Ricci G, Basciani S, Gnassi L, Arizzi M, Carta A, Martino M, Isidori A and Frajese G. 2003. Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells. *Biol. Reprod.* 68:1199-1207.
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E and Reik W. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13734-13738.
- Faber DC, Ferre LB, Metzger J, Robl JM and Kasinathan P. 2004. Agro-economic impact of cattle cloning. *Cloning Stem Cells* 6:198-207.
- Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA and Westhusin ME. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.* 63:1787-1794.
- Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM and Stice SL. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theor. Genet. 51:1451-1465.*
- Kasai K, Sano F, Miyashita N, Watanabe S and Nagai T. 2007. Comparison of the growth performances of offspring produced by a pair of cloned cattle and their nuclear donor animals. *J. Reprod. Dev.* 53:135-142.
- Lanza RP, Cibelli JB, Faber D, Sweeney RW, Henderson B, Nevala W, West MD and Wettstein PJ. 2001. Cloned cattle can be healthy and normal. *Science* 294:1893-1894.
- Lin T. 1995. Regulation of Leydig cell function by insulin-like growth factor-I and binding proteins. *J. Androl.* 16:193-196.
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE and Kind AJ. 2001. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405: 1066-1069.
- Wang GM, O'Shaughnessy PJ, Chubb C, Robaire B and Hardy MP. 2003. Effects of insulin-like growth factor I on steroidogenic enzyme expression levels in mouse Leydig cells. *Endocrinology* 144:5058-5064.
- Wells DN, Forsyth JT, McMillan V and Oback B. 2004. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells* 6:101-110.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Yang BC, Im GS, Kim DH, Yang BS, Oh HJ, Park HS, Seong HH, Kim SW, Ka HH and Lee CK. 2008. Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 103: 25-37.
- Yonai M, Kaneyama K, Miyashita N, Kobayashi S, Goto Y, Bettpu T and Nagai T. 2005. Growth, reproduction, and lactation in somatic cell cloned cows with short telomeres. *J. Dairy Sci.* 88:4097-4110.
- Zawada WM, Cibelli JB, Choi PK, Clarkson ED, Golueke PJ, Witta SE, Bell KP, Kane J, Ponce de Leon FA, Jerry DJ, Robl JM, Freed CR and Stice SL. 1998. Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinsonian rats. *Nat. Med.* 4:569-574.
- 권응기, 김현섭, 남기택, 윤상기, 김종복, 홍병주. 2001. Holstein 수소와 거세우 및 Zeranol 투여 거세우의 성장 단계별 혈액상과 혈청 대사물질 및 호르몬 농도의 변화. *동물자원과학회지* 43:503-512.
- 권응기, 김현섭, 윤상기, 남기택, 김종복, 안병석, 김준식. 2000. rbST 투여가 Holstein 비육우의 혈중 및 도체 호르몬 농도 변화에 미치는 영향. *동물자원과학회지* 42:451-458.
- 배성훈, 황성수, 양병철, 고응규, 김동훈, 임기순, 최화식, 진동일, 양보석, 성환후. 2007. 체세포 복제 한우 수소의 정액 성장, 정자의 활동성 및 수정 능력 분석. *한국동물번식학회지* 31:139-143.
- 이성수. 1998. 거세 한우의 혈청성분과 경제형질의 상관관계에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문
- 홍성규, 성환후, 고응규, 박찬국, 신기준, 장원경, 박용윤. 1998. 거세한우의 성장 단계별 혈중 Testosterone, Cortisol 및 Insulin-like growth factor-1(IGF-1) 농도의 변화. *축산기술연*

구보고서 312-460.

- 황성수, 양병철, 임기순, 고응규, 최선호, 민관식, 윤종택, 성환후. 2008c. hCG 투여가 복제란 이식 한우 대리모의 임신과 progesterone 농도에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 23:177-181.
- 황성수, 장유민, 고응규, 양병철, 임기순, 김명직, 민관식, 윤종택, 김창근, 성환후. 2008a. 체세포 복제란 이식우의 분만 전·후 TGF- β_1 단백질 농도. 한국동물번식학회지 32:27-

31.

- 황성수, 최선호, 장유민, 고응규, 양병철, 임기순, 민관식, 성환후. 2008b. 체세포 복제란 이식 한우의 분만 전 혈장 Progesterone과 Estradiol-17 β 농도 변화. 한국동물번식학회지 32:199-203.

(접수일: 2009. 8. 28 / 채택일: 2009. 9. 4)