

무당벌레(*Harmonia axyridis*) 초시색상 패턴의 유전 및 이의 관련유전자 탐색

김세희¹ · 서미자¹ · 박민우¹ · 유용만¹ · 윤영남^{1*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Molecular cloning of Prophenoloxidase (PPO) gene related to melanin formation of elytra of *Harmonia axyridis*

Sae-Hee Kim¹, Mi-Ja Seo¹, Min-Woo Park¹, Yong-Man Yu¹, Young Nam Youn^{1*}

¹Dept. Applied Biology, Chungnam National University, Daejeon, 305-764

Received on 10 February 2012, revised on 22 February 2012, accepted on 23 March 2012

Abstract : In order to cloning of PPO gene as a melanin formation related genes involved in hardening and pigmentation of insect integument or wing, we cloned cDNA and analyzed the sequence of PPO gene of *H. axyridis*. PPO2 primer were designed based on the sequences of PPO genes of *Tribolium castaneum* and *Drosophila melanogaster*, and then plasmid DNA were cloned from PCR products obtained from different two color patterns. When the plasmid DNA band pattern were digested by restriction enzymes, BamH1, Xba1, and EcoR1, we found same size band pattern. However, this sequence was not homologous to sequence of *T. castaneum* PPO gene. Using the primer designed based on the sequence of *D. melanogaster*, 209 bp PCR product was observed.

Key words : *Harmonia axyridis*, PPO (prophenoloxidase), Color polymorphism

I. 서론

곤충의 동종 내에서의 다양한 색상패턴과 그에 연관된 유전자를 탐색하는 일은 다양한 각도에서 이루어질 수 있다. 딱정벌레목(Coleoptera) 무당벌레과(Coccinellidae)에는 전 세계적으로 약 490속 4,200여 종이 기록되어 있으며(Iperti, 1999), 이들 중 국내에 보고된 것은 74종(ESK와 KSAE, 1994), 북미대륙에는 400여 종(Belicek, 1976), 유럽에는 110종이 분포하고 있는 것으로 보고되어 있으며(Iperti, 1986), 아시아 지역에 넓게 분포하는 토착종으로(Hodek, 1973; Kauffman과 Schwalbe, 1991; Ferran과 Dixon, 1993; Seo와 Youn, 2000; Seo 등, 2007) 전 세계에 걸쳐서 넓게 분포하고 있는 것으로 보고되어 있다(Dobzhansky, 1933; Chapin과 Brou, 1991; Day 등, 1994; Tedders와 Schaefer, 1994; Kidd 등, 1995; Nalepa 등, 1996; Kuznetsov, 1997;

Brown과 Miller, 1998; LaMana와 Miller, 1998; Seo 등, 2007). 이러한 무당벌레과(Coccinellidae)에 속하는 무당벌레(*H. axyridis*)는 우리 생활 속에서 어렵지 않게 볼 수 있는 곤충 중 하나이다. 무당벌레는 다양한 종류의 곤충들을 포식할 뿐만 아니라, 여러 작물의 흡즙 해충인 진딧물에 대한 주요 포식자로서 알려져 있고(Brown, 1972; Hodex 1973; Kauffman과 Schwalbe, 1991; Ferran와 Dixon, 1993; Ives 등, 1993; Ferran 등, 1996; Seo와 Youn, 2000), 작물에 가해를 하는 해충들에 대한 생물학적 방제인자로서도 기능이 뛰어난 곤충 종으로서 오래전부터 알려져 왔다(Sweetman, 1958; Hagen, 1962; Hodek, 1973; Majerus, 1994; Seo와 Youn, 2000; Koch, 2003; Youn 등, 2003; Roy와 Wajnberg, 2008). 이처럼 무당벌레는 생물적 방제인자로서 폭넓게 이용되고 있지만, 다른 면으로 무당벌레의 초시의 색상 패턴의 변이가 다양하여 분자 유전학적 연구의 대상이 되고 있다(Seo 등, 2007).

Komai(1956)는 앞날개의 색상 패턴에 따라서 적색 또는

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5769

E-mail address: youngnam@cnu.ac.kr

황색을 띠는 *Succinea* 그룹과 검은 색을 띠는 *Conspicua*, *Spectabilis*, *Axyridis* 총 4가지 그룹으로 나뉘어 보고하였고, 이를 바탕으로 *Succinea* 그룹을 앞날개에 위치한 점의 개수에 따라서 *Succinea* 1, *Succinea* 2로 나뉘어 보고하였다(Seo 등 2007). 또 이러한 무당벌레 앞날개 색상패턴의 다양성은 개체군의 생존과 관련되기도 하며, 분자유전적으로 분석이 시도되기도 하였다.(Tan과 Li, 1932; Hodex와 Honek, 1996). 또한 Dobzhansky(1951)은 무당벌레의 색상과 형태가 서로 다른 환경에 의해서 나타나게 된다고 보고하였다. 뿐만 아니라, Stewart와 Dixon(1989)는 멜라닌 색상을 나타내는 주요한 원인이 태양 에너지라고 보고하였으며, Komai(1956)은 번데기 동안의 온도와 습도조건에 따라서 무당벌레의 성충의 색상의 차이가 발생한다는 것을 보고하였다. 이렇게 다양한 무당벌레의 앞날개 색상패턴에 따른 연구가 다각도로 이루어져 왔으나, 아직까지도 무당벌레의 다형성의 실제적인 원인이 무엇인가에 대한 질문의 명확한 답은 밝혀지지 않고 있다. 본 연구에서는 동종 내 색상다형현상을 보이는 무당벌레의 앞날개가 검은색과 적색 또는 황색으로 되어 있는 특징을 이용하여 멜라닌 색소 형성과 관련된 유전자에 의해 색상발현이 조절될 것이라 가정하였다. Phenoloxidase는 곤충의 상처회복과 관련된 새로운 큐티클 형성과 멜라닌 형성 과정에 의한 다양한 방어기작과 관련된 것 알려져 있다(Ratcliffe 등, 1985; Gotz, 1986). Phenoloxidase의 다른 기능으로서 멜라닌 생합성과 관련된 두 가지 반응단계를 촉매작용을 한다고 보고된 바 있으며, 곤충에 있어서는 일반적으로 불활성 상태인 prophenoloxidase(PPO)로 존재한다고 알려져 있는데, 곤충의 혈구와 곤충류에서는 체액 내에서 발견이 되었다고 보고되어 있다(Ratcliffe 등, 1984,1985; Leonard 등, 1985; Soderhall과 Smith, 1986; Tsukamoto 등, 1986; Kang, 2009). 그러므로 이러한 내용을 바탕으로, Prophenoloxidase가 이미 밝혀진 다양한 곤충들을 이용하여 무당벌레에 멜라닌 합성에 관련된 prophenoloxidase 관련된 유전자의 존재 유무를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시충

2010년 10월 중순부터 12월 초까지 충남 금산군 월동처에서 채집한 무당벌레 월동개체군을 앞날개 패턴에 따라 분리하였으며, 지름 15 cm 페트리디쉬에 낙엽과 함께 넣어 15°C 인큐베이터 보관하였다. 이듬해 4월, 보관중인 무당벌레 월동개체군을 실내에서 닭간으로 사육하였으며, 이후 산란을 위한 사육시에는 복숭아혹진딧물과 목화진딧물을 공급하였다.

2. cDNA 합성

붉은 바탕색에 검은 점이 없는 앞날개패턴의 *succinea* 그룹 개체와 검은 바탕색에 2개의 붉은 점이 있는 *spectabilis* 그룹의 개체를 각각 마쇄하여 RNases Mini Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 RNA를 분리하였다. 이 후 first strand cDNA synthesis kit(RNA 4µl, RNase-free H₂O 7µl, 5X RT buffer 4µl, dNTP mixture 2µl, RNase inhibitor 1µl, primer 0.5pmol/µl, ReverTra Ace 1µl)를 이용하여 cDNA를 합성하였다(TOYOBO, Japan).

3. PCR

무당벌레의 검은색 형성과 관련된 PPO 관련 유전자 확인을 위해 사용한 프라이머는 NCBI에서 확인한 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)와 갈색거저리(*Tribolium castaneum*)의 검은색 형성과 관련된 PPO(propolyoxidase) 관련 유전자의 염기서열을 통해, Primer 3프로그램에서 디자인하여 Bioneer에 제작 의뢰하였다 (Table 1). 10X Ex Tag Buffer (TaKaRa) 5µl, dNTP Mix (TaKaRa) 2µl, primer 각각 3µl(Bioneer), Tag 0.25µl (TaKaRa), template 1µl, 총 50µl volume으로 Table 2에 제시한 조건으로 PCR을 수행하였다.






Table 1. Sequences of primer for this study.

Primer	sequence(5'→3')
PPO2	5'-TGG CAC TGG CAC CTG GTG TAC CC-3'
oligo dT	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'
<i>D.melanogaster</i> L	5'-GGC GTA CTT CCG TGA GGA CA-3'
<i>D.melanogaster</i> R	5'-CCA CAC GCA GAT TGT TCA GC-3'

Table 2. PCR condition of primers used for this study.

primer	Initial denaturation	Step cycle			Cycles
		Denaturation	Annealing	Extension	
PPO2 set		94°C / 1min	58°C / 1min	72°C / 2min	40
<i>D.melanogaster</i> set	94°C / 5min	94°C / 30s	47.5°C / 30s	72°C / 1min	5
		94°C / 30s	59°C / 30s	72°C / 1min	24

Table 3. The color patterns of five main types of the multicolored asian ladybird.

	Succinea 1 (YBM19)	19 black spots on yellow or red elytra with M-shaped marking on the pronotum
	Succinea 2 (YBM00)	0~18 black spot(s) on yellow or red elytra with M-shaped marking on the pronotum
	Conspicua (BRA02)	2 red spots on black elytra without M-shaped marking on the pronotum
	Spectabilis (BRA04)	4 red spots on black elytra without M-shaped marking on the pronotum
	Axyridis	Inexpressible and rare patterns in overwintering population

4. Plasmid DNA와 염기서열 분석

PCR산물은 PCRquick-spin™ PCR product purification kit(Intron)를 이용하여 purification하였고, TOPO isomerase I 을 이용한 클로닝을 위해 Solgent™ T-Blunt PCR cloning kit(Solgent)를 이용하였다. 이 후 LB배지(kanamycin 1:10 v/v)에 도말하여 37°C에서 12시간 이상 배양하여 자란 콜로니를 LB 2 ml에 8시간 이상 배양하였다. 이 후 Mini prep kit(INTRON)를 사용하여 plamid DNA를 분리한 후 BamHI 과 XbaI, EcoRI 효소를 이용하여 digestion한 후 전기영동하였다.

III. 결과 및 고찰

무당벌레의 월동개체군을 채집하여 그들의 앞날개 색상과 패턴을 조사해보면 동종 내의 색상변이 패턴이 매우 다양한 것을 확인할 수 있다. 현재까지 무당벌레 종 내에서 확인된 패턴만 해도 100여가지 이상이 되는 것으로 보고될 만큼 색상패턴에 있어 높은 유전적 다형성을 보여주고 있다(Soares 등, 2001, 2003). Hosino(1936)의 연구에서부

터 시작해서 Tan(1946), Oshima(1956)등이 무당벌레의 색상패턴형성 기작을 유전적 측면에서 연구하여 분류 하였으며, Komai(1956)는 무당벌레를 4가지 주요 패턴으로 나누기도 하였다. 이러한 무당벌레의 색상패턴은 바탕색과 무늬, 점의 수에 따라서 그 표현형이 상당히 많은데, 본 연구에서는 크게 다섯 가지 주요 패턴으로 구분하였으며, 각각의 주요 패턴별로 점의 수나 색, 바탕색의 차이에 의해 다양한 표현형으로 나타나 부득이 정확한 표현형 구분을 위해, 황적색 바탕에 검은 점을 가지고 있는 succinea 패턴 개체들을 YBM이라 부르며 뒤에 점의 수를 붙여 기재하였으며, 검은색 바탕에 붉은 점을 가지고 있는 conspicua나 spectabilis 패턴의 개체들은 BRA라 부르고 마찬가지로 붉은 점의 수를 붙여 기재하여 표시하였다(Table 3), 2007년과 2008년 2년 동안 각기 다른 야외 월동처에서 채집한 이들 색상패턴 중 황색이나 주황색 바탕에 검은점이 없거나 19개 까지 있는 succinea 패턴인 YBM패턴들이 야외 채집 개체군 중 80% 이상을 차지하는 것으로 확인되어 무당벌레의 색상패턴에 있어 우세한 패턴이 확인되었다(Fig. 1). Seo 등 (2007)등이 야외 월동개체군을 채집하여 색상패턴별로 조사한 결과에서도 succinea, conspicua, spectabilis 세가지 패

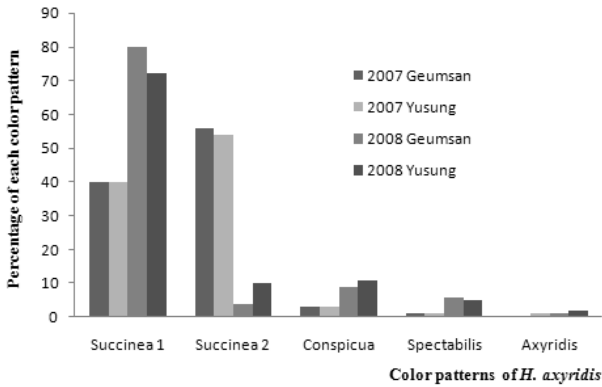


Fig. 1. Percentage of each color pattern of *H. axyridis* collected at different aggregation sites in 2007 and 2008.

턴이 주요 패턴으로 나타났으며, 그 중에서도 succinea 패턴 중 검은점이 19개인 YBM19패턴이 우점하는 것으로 확인되었다.

지금까지 색상패턴발현에 영향을 주는 요인을 찾기 위해 노력한 많은 학자들의 연구결과가 보고되어 있지만, 이러한 색상패턴에 있어 다형현상을 뒷받침 해 줄 수 있는 명확한 요인을 찾지 못하였다. Komai & Hosino(1951)는 아시아에 분포하고 있는 무당벌레의 경우는 지리적 요인과 계절적 요인이 색상패턴발현에 영향을 준다고 보고했는데, 무당벌레가 분포하고 있는 지역의 먹이인 진딧물의 기주식물을 결정적 요인으로 추론하기도 하였다. Sakai 등 (1974)는 사육온도와 같은 환경요인이 무당벌레의 색상패턴발현에 영향을 줄 수 있음을 시사하기도 하였다. 하지만 특정 환경요인이 무당벌레 앞날개 패턴발현에 영향을 미치는 특정 유전자형의 발현에 영향을 미쳐 색상변이가 나타난다고 추측하고 있기도 하다(Soares 등, 2003, 2005).

본 연구에서 무당벌레의 앞날개가 검은색과 적색 또는 황색으로 되어 있는 특징을 통해, 멜라닌 색소형성과 관련된 유전자에 의해 색상발현이 조절될 것이라 가정하고, 곤충의 체벽이나 날개의 경화 및 색소침착에 관여하는 것으로 알려진 prophenoloxidase(PPO) 유전자의 존재유무를 확인하고자 하였다. 현재 무당벌레 내에서 색상 변이에 관하여 알려진 유전자가 거의 없기 때문에, 무당벌레와 같은 딱정벌레목에 속하는 곤충 중 *Tribolium castaneum*의 PPO 유전자의 염기서열과 *D. melanogaster*의 PPO 염기서열을 바탕으로 임의의 primer를 design하였다(Table 1). 각 primer에서의 PCR을 Table 2의 조건에 따라 수행하여 얻은 PCR 산물을 확인하였다. 이를 바탕으로 PPO2 primer를 발현시킨 두 타입의 plasmid DNA를 대상으로 BamHI

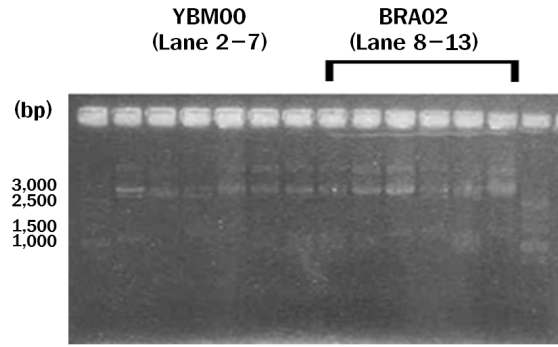


Fig. 2. Plasmid DNA inserted PCR product with PPO2 digested by restriction enzyme using BamHI and Xba 1.

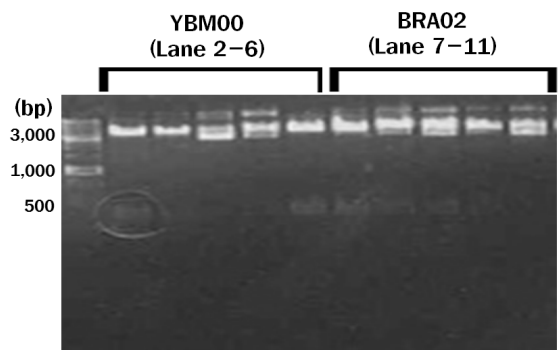


Fig. 3. Plasmid DNA inserted PCR product with PPO2 digested by restriction enzyme using EcoRI.

과 Xba1으로 digestion한 결과에서는 희미하게나마 같은 크기의 band가 관찰됨에 따라 plasmid DNA가 각 enzyme site에서 절단됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 뿐만 아니라, EcoRI으로 digestion을 실시한 결과에서도(Fig. 3) plasmid DNA가 enzyme site에서 절단됨을 확인하였다. 하지만, 이러한 결과를 바탕으로 염기서열을 분석한 결과에서는 *Tribolium castaneum*내의 PPO 관련 염기서열과는 일치하지 않는 것이 확인되었다.

*D. melanogaster*의 염기서열을 바탕으로 제작한 primer를 사용하여 만든 PCR product를 이용하여 전기영동한 결과 209bp 밴드가 형성되었으며(Fig. 4), 현재 cloning을 거친 sequence 확인 단계의 실험을 수행하고 있다. 그러나 본 논문에서는 결과를 제시하지 않았지만, *T. molitor*의 PPO 염기서열을 바탕으로 제작한 primer로는 PCR band가 확인되지 않는 것으로 볼 때, 만약 무당벌레 내에 PPO 물질이 존재한다 하더라도 *T. molitor*의 PPO 염기서열과 무당벌레 내의 PPO 염기서열이 일치하지 않을 것으로 예상되어 진다. 현재까지 수행된 실험에 의하면 무당벌레 내에서 PPO 관련 물질이 없다고 추정할 수도 있지만, 이러한

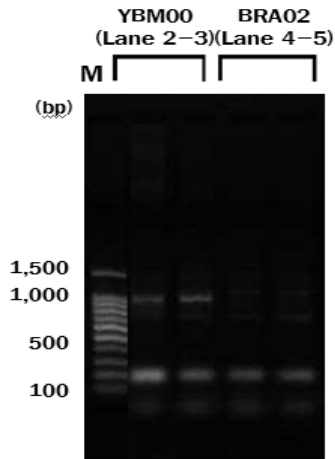


Fig. 4. Electrophoresis results of PCR product using *D. melanogaster* primer.

결과는 *T. castaneum*과 무당벌레 내의 enzyme site의 차이점 등을 고려해 볼 때 추가적인 실험이 필요한 매우 관심 있는 결과라고 생각된다. 무당벌레의 앞날개 색상 패턴 발현과 관련될 것이라 추정되는 PPO 관련 유전자를 확인하기 위하여 추가적인 primer design이 필요할 것으로 판단된다.

IV. 결론

곤충의 체벽이나 날개의 경화 및 색소침착에 관여하는 것으로 알려진 prophenoloxidase(PPO) 유전자의 존재 유무를 확인하고자 하였다. *Tribolium castaneum*과 *D. melanogaster*의 PPO 염기서열을 바탕으로 제작한 PPO2 primer를 발현시킨 두 색상패턴의 plasmid DNA를 대상으로 BamH1, Xba1, EcoR1으로 digestion한 결과에서는 희미하게나마 같은 크기의 band가 관찰됨에 따라 plasmid DNA가 각 enzyme site에서 절단됨을 확인할 수 있었다. 하지만, *Tribolium castaneum*내의 PPO 관련 염기서열과는 일치하지 않았다. *D. melanogaster*의 염기서열을 바탕으로 제작한 primer를 이용하여 209bp PCR산물을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 2011년 충남대학교 학술연구비를 지원받아 연구 과제를 수행하는 과정에서 얻은 결과를 바탕으로 작성되었습니다.

참고 문헌

- Belicek J. 1976. Coccinellidae of Western Canada and Alaska with analyses of the transmontane zoogeographic relationship between the fauna of British Columbia and Alberta. *Questiones Entomol.* pp. 283-409.
- Brown HD. 1972. The behaviour of newly hatched coccinellid larvae (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Entomol. Soc. S. Afr.* 35: 149-157.
- Brown MW, Miller SS. 1998. Coccinellidae(Coleoptera) in apple orchards of eastern west virginia and the impact of invasion by *Harmonia axyridis*. *Ent. News.* 109: 136-142.
- Chapin JB, Brou BA. 1991. *Harmonia axyridis* (Pallas), The Third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 93: 630-635.
- Day WH, Prokrym DR, Ellis DR, Chianer RJ. 1994. The Known distribution of the predator *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) in the United States, and thoughts on the origin of this species and five other exotic lady beetles in eastern North America. *Entomol. News* 105: 244-256.
- Dobzhansky T. 1933. Geographical variation in ladybeetles. *Am. Nat.* 67: 97-126.
- Dobzhansky, T. 1951. *Genetics and the origin of Species*. 3rd. (ed.). Columbia Univ. Press. New York.
- ESK and KSAE. 1994. *Check List of Insects from Korea* (eds). Kon-Kuk Univ. Press. Seoul. pp. 744.
- Ferran A, Dixon AFG. 1993. Forging behaviour of ladybird larvae (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur. J. Entomol.* 90: 383-402.
- Ferran A, Iperiti G, Kreiter S, Quilicci S, Shaderl S. 1996. Preliminary results of a study of the potentials of some aphidophagous coccinellids for use in biological control. *Ecology of Aphidophaga Vol. 2. I. Hodex* (ed.). Academia. Praha. pp. 479-484.
- Gotz P. 1986. Encapsulation in arthropods, in *Immunity in Invertebrates*(Edited by Brehelin M.), Springer-verlag, Berlin., pp. 153-170.
- Hagen KS. 1962. Biology and ecology of predacious Coccinellidae. *Annu. Rev. Entomol.* 7: 289-326.
- Hodek I. 1973. *Biology of Coccinellidae*. Acad. Sci. Prague.
- Hodek I, Honěk A. 1996. *Ecology of Coccinellidae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Hosino Y. 1936. Genetic studies of the lady-bird beetle, *Harmonia axyridis* Pallas. Rep II. *Jpn. J. Genet.* 12: 307-320.
- Iperiti G. 1986. Les coccinellidae de France. *Phytoma.* 377: p.14.
- Iperiti G. 1999. Biodiversity of predacious coccinellidae in relation to bioindication and economic importance. *Agricul. Ecosys. Environ.* 74: 323-342.
- Ives AR, Kareiva P, Perry R. 1993. Response of a predator to variation in prey density at three hierarchical scales: ladybeetles feeding on aphids. *Ecology* 74: 1929-1938.

- Kang EJ, Jo CW, Park CR, Yoon KS, Kang MA, Kwon HR, Seo MJ, Yu YM, Youn YN. 2009. Effects of environmental factors on Elytra colored patterns of multicolored asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Kor. J. Appl. Entomol. 48(4): 459-466.
- Kauffman WC, Schwalbe CP. 1991. Plant growth responses to aphid fabae injury: importance of predation by: *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). In L. Polgar, R. J. Chambers, A. F. G. Dixon and I. Hodex, Editors, *Behaviour and Impact of Aphidophaga*, SPB Academic Publishing, The Hague. pp. 167-175.
- Kidd KA, Nalepa CA, Day ER, Waldvogel MG. 1995. Distribution of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in North Carolina and Virginia. Proc. Entomol. Soc. Wash. 97(3): 729-731.
- Koch RL. 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. J. In sect Sci. 3:1-16.
- Komai T. 1956. Genetics of ladybeetles. Adv. Genetics. 8: 155-189.
- Oshima C, Seki T, Ishizaki H. 1956. Studies on the mechanism of pattern formation in the elytra of lady beetle. Genetics. 41: 4-20.
- Komai T, Hosino, Y. 1951. Contributions to the evolutionary genetics of the lady-beetle, *Harmonia* II. Microgeographic variations. Genetics 36: 382-390.
- Kuznetsov VN. 1997. *Lady Beetles of Russian Far East*. (ed.) The sandhill Crane Press, Gainesville, Florida.
- Nalepa CA, Kidd KA, Ahlstron KR. 1996. Biology of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in winter aggregations. Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 681-685.
- Ratcliffe NA, Rowley AF, Filzgerald SN, Rhodes CP. 1985. Invertebrate immunity-basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol., 97: 183-349.
- Ratcliffe NA, Leonard C, Rowely AF. 1984. Prophenoloxidase activation: nonself recognition and cell cooperation in insect immunity. Science 226: 557-559.
- Roy H, Wajnberg E. 2008. From biological control to invasion: the ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. Bio-Control. 53:1-4.
- Sakai T, Uehara Y, Matsuka M. 1974. The effects of temperature and other factors on the expression of elytra pattern in lady beetle, *Harmonia axyridis* Pallas. Bull. Facul. Agricul., Tamagawa Univ. 14: 33-39.
- Seo MJ, Youn YN. 2000. The Asian ladybird, *Harmonia axyridis*, as biological control agents: I. Predacious behaviour and feeding ability. Kor. J. Appl. Entomol. 39: 59-71.
- Seo MJ, Kang EJ, Kang MK, Lee HJ, Seok HB, Lee DH, Park SN, Yu YM, Youn YN. 2007. Phenotypic variation and genetic correlator of elytra colored patterns of multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Korea. Kor. J. Appl. Entomol. 46(2): 235-249.
- Soares AO, Coderre D, Schanderl H. 2001. Influence on phenotype on fitness parameters of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). Eur. J. Entomol. 98: 287-293.
- Soares AO, Coderre D, Schanderl H. 2003. Effect of temperature and intraspecific allometry on predation by two phenotypes of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). Environ. Entomol. 32: 939-944.
- Söderhäll K, Smith VJ. 1986. The prophenoloxidase activating system: the biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity with special reference to crustaceans. In *Immunity in Invertebrates* (Brehelin M. eds.). Springer, Berlin, pp. 208-223.
- Stewart LA, Dixon AFG. 1989. Why big species of ladybird beetles are not melanic. Funct. Ecol. 3: 165-177.
- Sweetman HL. 1958. *The Principle of Biological Control*. (ed.) W.C. Brown Co. Dubuque, Iowa.
- Tan. CC. 1946. Mosaic dominance in the inheritance of color patterns in the lady-bird beetle, *Harmonia axyridis*. Genetics. 31: 195-210.
- Tan CC, Li JC. 1932. Variations in the color patterns in the lady-bird beetle, *Ptychanatis axyridis* Pall. Pek. Nat. Hist. Bull. 7: 175-193.
- Tedders WL, Schaefer PW. 1994. Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in the south-eastern United States. Entomol. News 105: 228-243.
- Tsukamoto T, Ishiguro M, Funatsu M. 1986. Isolation of latent phenoloxidase from prepupae of the housefly, *Musca domestica*. Insect Biochem., 16: 573-581.
- Youn YN, Seo MJ, Shin JG, Jang C, Yu YM. 2003. Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Biol. Con. 28: 164-170.