

# 온도변화에 따른 담배나방 유충 지방체의 유전자 발현 비교 분석

차욱현 · 김광호<sup>1</sup> · 이대원\*

경성대학교 화학생명과학부 생명과학전공, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과

## Comparison of Gene Expression in Larval Fat Body of *Helicoverpa assulta* in Different Temperature Conditions

Wook Hyun Cha, Kwang Ho Kim<sup>1</sup> and Dae-Weon Lee\*

Department of Life Sciences, School of Chemistry and Life Sciences, Kyungsoo University, Busan 48434, Korea

<sup>1</sup>Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

**ABSTRACT:** Insects are known to live at wide range of temperature, but can not survive when they are exposed to over 40°C or below supercooling point. The larvae of *Helicoverpa assulta* have been reared at high (35°C), low (3 to 10°C), and room temperature (25°C; control). To identify stress-related genes, the transcriptomes of fat body have been analyzed. Genes such as cuticular proteins, fatty acyl  $\Delta$ 9 desaturase and glycerol 3 phosphate dehydrogenase were up-regulated whereas chitin synthase, catalase, and UDP-glycosyltransferase were down-regulated at low temperature. Superoxide dismutase, metallothionein 2, phosphoenolpyruvate carboxykinase and trehalose transporter have been up-regulated at high temperature. In addition, expressions of heat shock protein and glutathione peroxidase were increased at high temperature, but decreased at low temperature. These temperature-specific expressed genes can be available as markers for climate change of insect pests.

**Key words:** Climate change, *Helicoverpa assulta*, Transcriptome, Temperature, Marker

**초 록:** 곤충은 넓은 범위의 온도영역에 사는 것으로 알려져 있으나, 40°C가 넘는 고온이나 빙결온도 이하의 저온에서는 생존이 어렵다. 본 연구는 사육온도 조건이 다른 환경에서 대사중심 조직인 지방체의 유전자 발현을 분석하기 위해, 온도조건을 달리하여 담배나방을 저온 사육충 (3~10°C), 고온 사육충 (35°C)로 나누고 상온 사육충 (25°C)을 대조구로 사용하여 전사체 분석을 수행하였다. 저온에서 특이적으로 높은 발현을 보인 유전자는 표피단백질,  $\Delta$ 9 불포화효소, 글리세롤 3-인산 탈수소효소이며, 저온에서 발현이 낮아진 유전자는 키틴 합성효소, catalase, UDP-당전이 효소이다. 고온에서 특이적으로 높은 발현을 보인 유전자는 과산화물제거효소, metallothionein 2, phosphoenolpyruvate carboxykinase, 트레할로스 운반단백질이었다. 고온에서 높고 저온에서 낮은 대조적 발현을 보인 유전자는 열충격단백질, glutathione peroxidase이었다. 이들 온도 특이적이거나 대조적 발현을 보이는 유전자는 기후변화에 관련된 특이마커로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

**검색어:** 기후변화, 담배나방, 전사체, 온도, 마커

온도는 곤충의 생존에 가장 큰 영향을 미치는 물리적 요인이다. 곤충은 넓은 범위의 온도영역에 사는 것으로 알려져 있으나, 발육이 어려운 고온이나 빙결온도 이하의 저온에서는 생존에 위협을 받는다(Neven, 2000). 농업에서 중요한 해충의 활동은 온도가 상승함에 따라 더 활발해지고, 경제적 피해크기는 증가

한다. 온도가 2°C 상승할 때, 곤충은 연간 1~5세대 정도 생활환이 늘어난다(Yamamura and Kiritani, 1998). 목화진딧물(*Aphis gossypii* Glover) 생활환은 10~25°C에서는 20~22일 정도이지만, 30°C에서는 6~9일로 단축된다. 높은 온도는 phenoloxidase와 lysozyme-like enzymes의 활성을 높이고, 잠재적 병원체에 대한 저항성을 높인다(Sable and Rana, 2016). 또한 발달을 저해할 정도의 고온에 곤충이 노출되면 대사활성이 오히려 줄어들면서 성장이 지연되기 때문에, 열충격단백질 합성을 조절을 통해 고온의 환경을 극복한다(King and MacRae, 2015). 한편

\*Corresponding author: daewonlee@ks.ac.kr

Received May 18 2018; Revised June 27 2018

Accepted July 9 2018

곤충의 저온에 대한 노출은 생존을 위협하기도 한다. 온도와 동결과 같은 물리적 한계를 극복하기 위해, 곤충은 휴면이나 항동결단백질과 같은 생존 전략을 발전시켜왔다. 저온을 극복하기 위한 내한성(cold hardiness)은 동결감수성과 내동결성으로 나뉘며, 동결감수성은 월동하는 곤충에서 발견되는 낮은 동결점과 관련이 있다. 내동결단백질, 높은 수준의 내동결물질, 부분적 탈수는 동결감수성에 기여한다(Clark and Worland, 2008). 내동결성 기작은 세포바깥의 단백질 또는 빙핵에 의해 시작되는 얼음의 형성을 조절하며, 세포막의 지질층이 주된 역할을 한다(Zachariassen and Kristiansen, 2000; Duman, 2001).

담배나방(*Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae))은 고추 등의 작물에 손상을 주는 해충으로, 적절한 방제수단이 적용되지 않는다면 50% 정도의 생산성이 감소된다는 보고가 있다(Yang et al., 2004). 담배나방은 번데기 상태로 토양에서 월동하여, 다음해 6월에 우화하는 것으로 알려져 있어(Han and Lee, 1998) 내한성이 발달한 곤충으로 생각되고 있다. 또한 기온이 높은 여름동안 생활환을 유지하고 진행하기 때문에 고온에도 잘 적응된 곤충으로 파악되고 있다. 그러나 담배나방에서 저온에 대한 내한성 및 고온에서 생리적 반응을 유지하는데 관여하는 유전자를 동정하고 보고는 없다.

본 연구는 담배나방에서 내한성 및 고온 적응성에 기여하는 요인을 파악하고자, 유충을 고온, 저온, 상온으로 나누어서 사육하였다. 사육된 유충으로부터 얻은 지방체에 대해 전사체 분석을 통해, 저온에서 발현되는 유전자군이 고온과 상온과는 차이가 있음을 확인하였다. 저온에서 높은 발현을 보인 유전자는 구조단백질과 지질변형효소, 당대사관련 효소인 반면, 발현이 낮아지는 유전자군은 키틴 합성효소, 해독효소, 항산화 효소이다. 고온에서 특이적으로 높은 발현을 보인 유전자는 해독효소와 당대사관련 효소들이었다. 고온에서 높고 저온에서 낮은 대조적 발현을 보인 유전자는 열충격단백질, glutathione peroxidase 로 동정되었다.

## 재료 및 방법

### 담배나방 사육

농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 분양받은 담배나방 번데기를 곤충사육상(60 × 60 × 60 cm, 가이아, 수원)에서 우화시켰다. 일회용 화분에 파종한 담배를 곤충사육상에 넣어 산란을 유도하였고, 성충먹이로 10% 설탕물을 공급하였다. 담배잎에 산란한 알을 부화시키기 위해, 알이 있는 잎을 수거하여, 인공사료가 담긴 페트리 디쉬(10 × 4 cm, 직경 × 높이, SPL(주), 포천)

에 산란된 담배잎을 옮겼다. 페트리 디쉬에서 2령 이상 사육한 후, 초파리 먹이용 용기(10 ml, Model: FFV-11010, 한솔테크, 서울)에 인공사료(Product# F9781B, Bio-Serve, NJ, USA)를 2 × 1 cm (가로 × 세로)로 잘라 사육용기에 한 마리씩 개체 사육하였다. 시험구의 특성에 따라 음성 대조구는 25°C 항온 조건, 고온 사육충은 35°C 항온 조건, 저온 사육은 3~10°C 조건이 유지되도록 사육하였다.

### Total RNA 추출과 차세대 염기서열 분석법을 이용한 전사체 분석

저온(3~10°C), 고온조건(35°C)과 항온조건(25°C)에서 사육한 담배나방이 4령 유충 1일째가 되었을 때, 지방체를 분리하였다. RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, USA)를 사용하여 분리한 지방체로부터 total RNA를 추출하였다. Total RNA로부터 mRNA를 분리하기 위해, poly-T가 붙어 있는 magnetic bead를 사용하였고, mRNA를 절편화시켜 random primer를 이용하여 역전사 효소로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 RNaseH를 처리하고, DNA 중합효소를 사용하여 이중 가닥의 DNA를 만들었다. 두 가닥의 DNA는 end repair mix를 통해 말단을 blunt end로 변환시킨 다음, 3' 말단에 A 염기를 첨가하였다. 어댑터 서열을 이중 가닥의 DNA에 결합시키고, DNA를 PCR을 통해 증폭시켰다. Illumina 기술을 이용한 차세대 염기서열 분석법을 통해 DNA 절편의 서열을 읽고 HiSeq2000 통해 염기서열을 분석(Macrogen Inc., Seoul, Korea) 하였다.

### 자료 분석

확보한 염기서열에 대한 quality control 검정을 위해 FastQC를 수행하였고, Trimmomatic (Ver. 0.32)를 이용하여, raw data trimming과 adaptor 서열을 제거하였다. Trinity 프로그램을 이용하여 de novo assembly를 수행하여, 유전자 염기서열인 contig들을 확보하였다. Raw data로부터 전사체의 발현을 정량화하기 위해, RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization; Ver.1.2.15)를 이용하였다. 전사체에서 발현이 확인된 유전자는 BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하여 유전자를 동정하였고, BlastGO를 통해 gene ontology를 분석하였다. 각 전사체로부터 동정된 유전자군들에 대해 발현의 차이를 대조구와 비교하였다. 본 연구에 사용된 전사체 정보는 NABIC (<http://nabic.rda.go.kr>)에 등록하였다(NN-1653-000001, NN-1660-000001, NN-1862-000001).

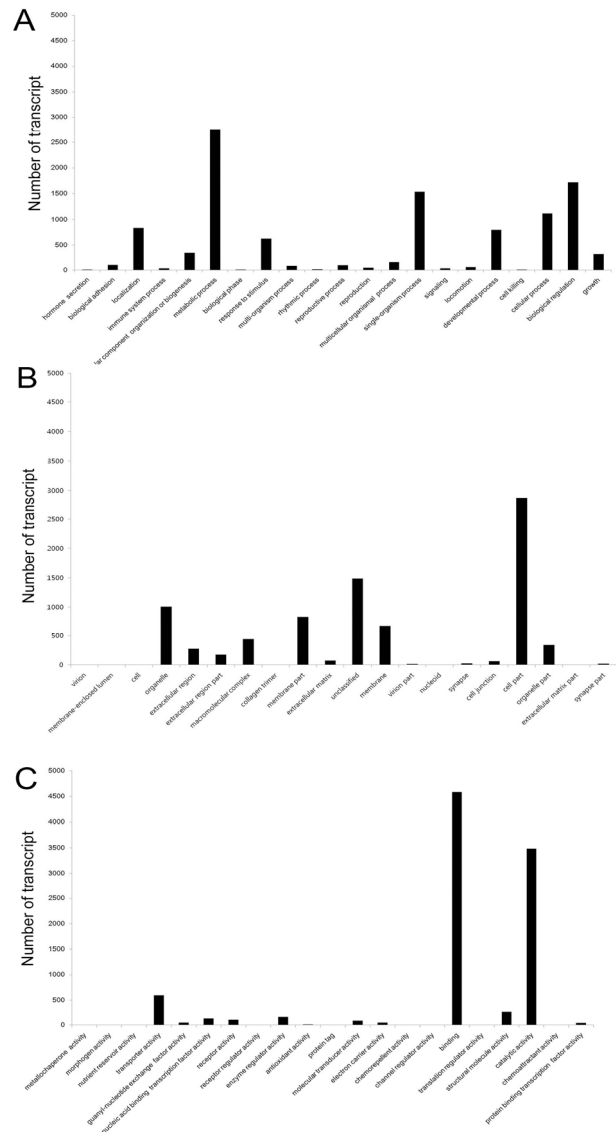
## 결과 및 고찰

저온(3~10°C), 고온(35°C) 및 상온(25°C)에 노출된 담배나방 4령 유충 지방체로부터 추출한 total RNA를 추출하고, mRNA를 정제하였다. 정제된 mRNA를 cDNA로 변환시킨 후, Illumina HiSeq2000 시스템을 이용하여 101 bp paired-end 시퀀싱을 통해 전사체 염기서열을 확보하였다. 얻어진 1차 서열(raw read)에서 얻은 공통 서열을 기반으로 Trinity 프로그램을 이용하여 총 70,557,160개의 염기로 구성된 85,445개의 contig를 얻었다 (Table 1).

발현 전사체를 기반으로 BlastGO 프로그램을 이용하여 Gene ontology (GO) 분석을 실시하였다. 전체 contig 중에서 64%는 GO 유전자들과 상동성을 보이지 않았으나, 36%의 contig는 각각 생물기능(14%), 분자기능(12%) 및 세포작용(10%)은 GO 분류군으로 확인되었다. 생물기능에서 가장 많은 기능군은 각각 대사, 조절, 단세포 작용 및 세포작용으로 나타났고, 분자기능에서는 결합, 촉매작용 및 수송 기능군으로 나타났다. 한편 세포작용에서는 세포영역과 세포소기관 및 세포막의 발현 유전체로 나타났다(Fig. 1).

필수 유전자에 대한 발현 분포 분석(Database of essential genes (DEG))을 이용한 온도 조건을 달리한 담배나방 유충 지방체의 유전자 발현 분포는 저온:상온 또는 고온:상온 간의 대략적인 유전자 발현 분포에서 큰 차이를 보이지는 않았다(결과 미제시).

또한 사육온도 조건을 달리한 담배나방의 전사체에 대한 상대적 발현분포 분석에서, 저온 사육충과 고온 사육충의 일부 유전자의 발현이 대조구에 비해 유전자 발현의 차이가 있음을 확인하였다. 25°C에서 발현되는 유전자들과의 차이를 보이는 유전자들은 사육온도 조건에 따라 특이적으로 발현되는 유전자일 개연성이 높다고 할 수 있다. 또한 각 발현유전체간의 발현 유사도는 상온(25°C)과 고온(35°C)는 0.92로 매우 높은 상관성을 보인 반면, 고온:저온, 상온:저온 간의 상관성은 각각 0.78과



**Fig. 1.** Gene ontology of the fat body transcriptome in *Helicoverpa assulta*. All contigs from cDNA of the fat body in *H. assulta* were converted into six-frame translational products and GO-annotated from protein sequence database of NCBI. The proteins with associated GO terms, molecular function, biological process and cellular component were grouped.

**Table 1.** Summary of the statistics of RNA-Seq and de novo assembly of *Helicoverpa assulta* fat body cells

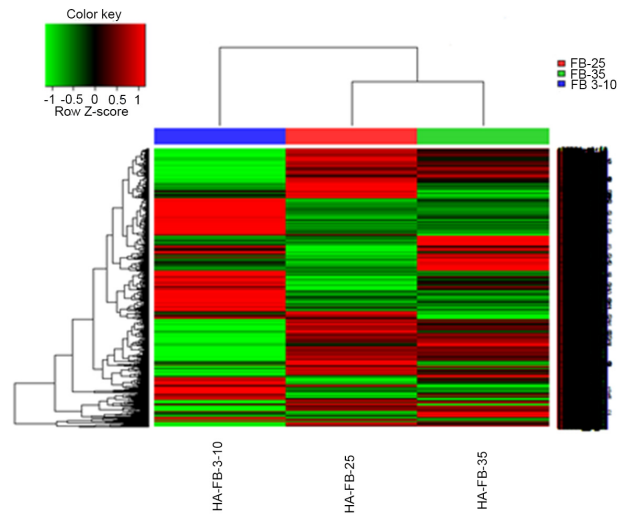
Sample	HAFB_3-10	HAFB_25	HAFB_35
Total obtained bp	12,228,744,680	12,225,454,504	13,624,518,422
Trimmed total base	11,498,191,108	11,515,646,818	12,790,123,799
Total assembled bases		70,557,160	
Total trinity transcripts		85,445	
Total trinity 'genes'		66,172	
Range of contig length		201-15,699	
Mean contig length		825	

0.77로 상대적으로 낮았다. 이것은 상온에서 발현되는 유전자가 저온보다는 고온에서 발현되는 유전자와 특성이 비슷하였다.

저온에서 사육된 담배나방의 지방체 전사체에서 정상온도 사육개체의 발현유전체에 비해 4,319개의 contig의 발현양이 높아지고, 발현양이 감소한 contig는 4,491개로 나타났다. 고온에서 사육된 개체의 지방체 발현유전체에서 정상온도 사육개체 발현 유전체에 비해 2,245개 contig가 발현이 증가한 반면, 발현양이 감소한 contig는 1,779개였다. 이것은 상대적으로 저온조건의 사육개체에서 발현되는 유전자의 발현차이가 클 수 있음을 보여주었다.

다른 사육온도 조건에서 얻은 지방체 발현 유전체를 hierarchical clustering을 한 결과, 대조구(25°C 사육)와 고온사육 개체의 지방체 발현 전사체는 같은 클러스터를 형성하였으나, 저온사육 개체의 지방체 발현 전사체는 outgroup처럼 떨어진 것으로 보아, 유전자 발현에서 차이가 있음을 추정할 수 있었다(Fig. 2). 사육된 개체의 지방체의 전체적인 유전자 발현 차이를 알아보기 위해서 heat map 분석을 수행하였다. 대조구(25°C 사육)에 비해, 저온 및 고온에서 사육된 개체의 지방체에서 온도 특이적인 유전자 발현이 있음을 확인할 수 있었다. 이것은 저온 또는 고온에 특이적인 유전자 발현이 있음을 보여주었다(Fig. 2).

온도조건에 따라 지방체에서 발현되는 유전자 탐색을 위해, 구조단백질(structural protein), 열충격단백질(heat shock protein), 항산화효소(antioxidant enzymes), 해독작용(Detoxification enzyme), 지질 변화(enzymes for lipid modification), 내동결성



**Fig. 2.** Heat map of two-way hierarchical clustering using Z-score for normalizing value among fat body transcripts in *H. assulta*. The red areas indicate temperature-specific gene expression.

물질 합성과 이동(cryoprotectant-related proteins)의 전사체를 동정하였다. 물리적 환경변화에 관련하여 구조단백질에 속하는 표피 단백질(cuticular protein)은 탈수에 대한 저항성 증가와 관련하여 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Andersen, 2010; Sugumaran, 2010; Vincent, 2009). 특히 스트레스에 대한 노출은 glycine이 풍부한 표피단백질의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다(Bouhin et al., 1992; Zhang et al., 2008). 담배나방 지방체의 전사체로부터 확인된 표피단백질의 contig는 58

**Table 2.** Structure-related protein genes identified from fat body transcriptome of *Helicoverpa assulta*

Contig	Expression <sup>a</sup>		Length (bp)	Description	Species	Coverage (%)	E-Value
	3 to 10°C	35°C					
<b>Cuticular protein</b>							
c65421_g1_i1	▲▲▲▲	-	726	Cuticular protein 49Aa	<i>Drosophila melanogaster</i>	66.0	1.00E-44
c13393_g1_i1	▲▲▲	-	1546	Cuticular protein 49Ah	<i>Drosophila melanogaster</i>	77.4	8.00E-43
c21578_g1_i2	▲▲▲▲	-	597	Cuticular protein 62Bc	<i>Drosophila melanogaster</i>	61.7	5.00E-40
c25150_g1_i1	▲▲	-	1492	Cuticular protein 65Az	<i>Drosophila melanogaster</i>	70.3	6.00E-18
c39411_g1_i1	▲▲▲▲	-	550	Cuticular protein 65Av	<i>Drosophila melanogaster</i>	62.2	4.00E-22
c25571_g3_i1	▲▲	-	1354	Cuticular protein 65Ax2	<i>Drosophila melanogaster</i>	78.4	7.00E-31
c30874_g1_i1	▲▲	-	881	Cuticular protein 97Ea	<i>Drosophila melanogaster</i>	73.0	1.00E-25
c27100_g1_i1	▲▲	-	1357	Cuticular protein 100A	<i>Drosophila melanogaster</i>	60.6	1.00E-41
<b>Chitin synthase</b>							
c35725_g2_i1	▼▼	-	1878	UDP-glycosyltransferase	<i>Drosophila melanogaster</i>	91.1	2.00E-82
c31686_g1_i1	▼	-	1938	Glucuronosyltransferase	<i>Drosophila melanogaster</i>	91.7	1.00E-83

<sup>a</sup>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.  $2 < \log_2 Fc < 10$ , ▲;  $10 < \log_2 Fc < 50$ , ▲▲;  $50 < \log_2 Fc < 100$ , ▲▲▲;  $100 < \log_2 Fc$ , ▲▲▲▲;  $-10 < \log_2 Fc < -2$ , ▼;  $-50 < \log_2 Fc < -10$ , ▼▼;  $-100 < \log_2 Fc < -50$ , ▼▼▼;  $\log_2 Fc < -100$ , ▼▼▼▼.

개이며, 저온전사체의 contig가 대조구나 고온 전사체의 contig보다 발현양이 대체로 높았다(Table 2). 이것은 표피단백질의 발현의 차이가 주로 저온에 관련된 스트레스와 더 밀접한 관련성이 있는 것으로 사료된다. 또한 표피층의 주성분이 키틴(chitin)의 생합성에 관련된 효소들도 동정되었는데, 저온 발현체의 키틴합성효소(chitin synthase)는 상온 또는 고온 발현체에 비해 낮았다. 이것은 저온에서 발육의 속도가 늦어지고, 탈피에 필요한 표피 합성이 활발히 일어날 필요가 없는 조건이기 때문인 것으로 파악된다(Table 2).

열충격단백질은 stress와 관련된 환경조건에 대한 반응으로, 세포가 만들어 내는 단백질을 말한다. 열충격단백질은 대부분의 생물체에서 발현되고, 곤충에서는 열과 탈수 stress에 대해 보호기능을 하는 것으로 알려져 있다(Goto and Kimura, 1998). 발견 초기에는 열충격에 주로 관련이 있는 것으로 보고되었으나, 저온, 자외선, 조직의 재구성 등에 관여하는 것이 밝혀졌다(Štětina et al., 2015; Colinet et al., 2010; Sang et al., 2012; García-Reina et al., 2017). 일반적으로 모든 생명체는 환경의 갑작스런 변화에 대응하는 방어체계가 있으며, 열충격단백질은 세포가 외부의 해로운 자극에 노출되면 생성되어 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다(Cai et al., 2017; Basha et al., 2012). 이 열충격단백질은 온도가 갑자기 상승했을 때, 세포에서 합성되는 단백질로 고온 이외에도 여러 가지 다양한 자극에 대한 반응으로 단백질을 합성할 수 있다고 하여 스트레스 단백질이라고도 한다. 열충격으로 인해 유도되는 유전자들로부터 발현되는 단백질은 분자량이 10~100 kDa로 다양하며, 크기에 따라 Hsp60, Hsp70 및 Hsp90 family 등으로 분류 한다(King and MacRae, 2015). 30 kDa 이하의 열충격단백질은 아직 생물학적 기능이 밝혀지지 않았으며, Hsp40은 Hsp70의 co-factor로 알려져 있고, Hsp60은 단백질 접힘, Hsp70은 단백질 접힘 뿐만 아니라 heat stress에 대해 내열성을 갖게 한다. Hsp90은

스테로이드 수용체 및 전사인자(transcription factor)로 작용하며, Hsp104와 Hsp110은 극한 온도의 내성을 갖게 한다. 이 중 가장 많이 연구된 Hsp70은 자극을 받았을 때만 급격하고 민감하게 반응하여 상당한 양의 증가를 보인다. 담배나방의 지방체에서 Hsp60, Hsp68, Hsp70, Hsp90의 contig가 확인되었다(Table 3). 저온 발현체보다는 고온 발현체에서 열충격단백질의 발현이 증가되는 경향을 보였는데(Table 3), 이것은 고온스트레스에 대한 효과를 완화시키기 위한 반응으로 이해할 수 있다.

활성산소는 주로 호기성 대사, 생식 및 환경적 요인에 의해 야기된다. 활성산소의 과도한 생성은 생체분자에 손상을 주는 산화스트레스를 일으키고 세포 손상과 수명에 영향을 주게 된다(Guarente and Kenyon, 2000; Cutler, 1991; Dröge, 2002; Finkel and Holbrook, 2000; Tasaki et al., 2017). 항산화효소의 기능을 가진 효소로는 catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase 등이 있으며, 이들은 주로 소포체나 세포질에서 생화학반응으로 인한 활성산소를 과산화수소로 변환시켜(SOD), 물로 전환(catalase, glutathione peroxidase)시켜 항산화작용에 참여 한다(Aucoin et al., 1991; Wang et al., 2001; Weirich et al., 2002; Lomate et al., 2015). 따라서 이들 효소들은 활성산소의 공격으로 나타난 생성물에 대한 방어와 관련된 중요인자로 여겨지고 있고(Halliwell, 2007), SOD는 직접적으로 superoxide 음이온 생성에 관여하기도 하지만, 독성을 가지는 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 생성하기도 한다(Tasaki et al., 2017). 담배나방의 온도 발현 전사체에서 항산화 관련 효소들은 확인하였다. 활성산소를 과산화수소로 전환시키는 SOD는 고온 전사체에서 발현이 증가하였고, 저온발현 전사체와 대조구는 큰 차이를 보이지 않았다(Table 4). 과산화수소를 물로 전환시키는 catalase는 1개의 contig가 동정되었고, 저온 전사체에서는 발현이 감소하였으나, 대조구와 고온 전사체에서 큰 차이를 보이지 않았다. 한편 catalase와 같이 과산화수소를 물로 전환시

**Table 3.** Heat shock proteins identified from fat body transcriptome of *Helicoverpa assulta*

Contig	Expression <sup>a</sup>		Length (bp)	Description	Species	Coverage (%)	E-Value
	3 to 10°C	35°C					
Heat shock protein							
c29154_g1_i1	-	▲	1690	Hsp90 cochaperone Cdc37	<i>Drosophila virilis</i>	100.0	5.00E-124
c26934_g1_i1	▼▼	-	1871	Heat shock protein 60	<i>Drosophila melanogaster</i>	94.8	0
c36411_g2_i1	▼	-	2230	Heat shock protein 68	<i>Drosophila melanogaster</i>	95.6	0
c30499_g1_i1	▼▼	-	2289	Heat shock protein 70	<i>Drosophila simulans</i>	100.0	0
c32345_g1_i1	-	▲	2078	Hsc/Hsp70-interacting protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	63.4	1.00E-58

<sup>a</sup>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.  $2 < \log_2 Fc < 10$ , ▲;  $10 < \log_2 Fc < 50$ , ▲▲;  $50 < \log_2 Fc < 100$ , ▲▲▲;  $100 < \log_2 Fc$ , ▲▲▲▲;  $-10 < \log_2 Fc < -2$ , ▼;  $-50 < \log_2 Fc < -10$ , ▼▼;  $-100 < \log_2 Fc < -50$ , ▼▼▼;  $\log_2 Fc < -100$ , ▼▼▼▼.

**Table 4.** Antioxidant enzymes identified from fat body transcriptome of *Helicoverpa assulta*

Contig	Expression <sup>a</sup>		Length (bp)	Description	Species	Coverage (%)	E-Value
	3 to 10°C	35°C					
Catalase							
c30877_g1_i1	▼	-	2040	Catalase	<i>Drosophila melanogaster</i>	98.4	0
Superoxide dismutase							
c27651_g1_i1	-	▲	630	Superoxide dismutase 2	<i>Drosophila melanogaster</i>	20.7	3.00E-10
Glutathione peroxidase							
c31932_g2_i2	▼	-	726	Glutathione peroxidase	<i>Drosophila melanogaster</i>	45.8	7.00E-22
c30224_g1_i5	▼	-	1003	Glutathione peroxidase	<i>Drosophila melanogaster</i>	77.1	3.00E-47
c24622_g1_i1	▼▼▼	▲▲▲	715	Glutathione peroxidase	<i>Drosophila melanogaster</i>	78.7	3.00E-27
c31788_g1_i1	▼	-	750	Glutathione peroxidase	<i>Drosophila melanogaster</i>	77.5	3.00E-30
c26468_g3_i1	▼	▲	860	Glutathione peroxidase	<i>Drosophila melanogaster</i>	78.3	3.00E-54
c31618_g2_i1	▼▼▼	▲	847	Glutathione peroxidase	<i>Drosophila melanogaster</i>	77.5	2.00E-30

<sup>a</sup>The expression level of each contig can be divided into up-regulation ( $\log_2 Fc > 2$ ), down-regulation ( $\log_2 Fc < -2$ ), and not meaningful ( $-2 < \log_2 Fc < 2$ ) compared to the control.  $2 < \log_2 Fc < 10$ , ▲;  $10 < \log_2 Fc < 50$ , ▲▲;  $50 < \log_2 Fc < 100$ , ▲▲▲;  $100 < \log_2 Fc$ , ▲▲▲▲;  $-10 < \log_2 Fc < -2$ , ▼;  $-50 < \log_2 Fc < -10$ , ▼▼;  $-100 < \log_2 Fc < -50$ , ▼▼▼;  $\log_2 Fc < -100$ , ▼▼▼▼.

키는 glutathione peroxidase는 6개의 contig가 확인되었고, 저온 전사체에서는 유전자 발현이 감소한 반면, 고온 전사체에서는 발현이 비슷하거나 증가되었다. 이것은 저온조건보다는 고온조건에서 물질대사가 활발히 일어남에 따라 관련유전자의 발현도 증가되는 것으로 이해할 수 있다(Table 4).

온도와 같은 물리적 환경변화와 관련된 해독작용에서는 Cytochrome P450, metallothionein 2 및 UDP-glycosyltransferase, Glutathione S transferase 등이 관여한다. cytochrome P450 효소는 곤충의 모든 조직에서 발현되는 단백질로, ecdysteroid와 유약호르몬의 합성과 분해로부터 외래물질의 대사(해독작용을 포함)에 이르는 다양한 생화학적 역할을 수행한다(Feyereisen, 1999). 이러한 다양한 기능은 다양한 구조에 의한 것으로 곤충의 유전체에 약 100여개의 유전자들이 존재한다. Cytochrome P450는 복잡한 조절을 통해 곤충의 저항성 발달에 중요한 역할을 한다(Li et al., 2007; Hemingway et al., 2004). 이것은 유전자의 다형성을 통해 다양한 물질에 대한 해독작용을 효과적으로 증대할 수 있는 분자기작으로 이해할 수 있다. 담배나방의 발현 전사체에서 Cytochrome P450의 10개 contigs를 확인하였다. 저온 전사체에서는 CYP4, 6a2, 12 family의 발현이 감소된 반면, 고온 전사체는 CYP6a17, 6d4, 9f2의 발현이 증가하였다. 고온 전사체에서 CYP9 family 발현은 대조구보다 높았으며, 저온 전사체는 대조구보다 높거나 비슷하였다.

Metallothionein은 cyteine이 풍부한 단백질로 골지체에 위치한다. 이 단백질은 생리적으로 중요한 금속이온(Cu, Zn, Se)과 외래 금속이온(Cd, Hg, Ag)등에 결합하여 산화스트레스로

부터 세포를 보호한다(Sharma, et al., 2013; Ruttkay-Nedecky et al., 2013; Andrews, 2000; Klaassen et al., 2009). 따라서 metallothionein은 superoxide나 hydroxy radical과 같은 위험한 산화물을 포획하여 해독과정에 관여한다. 담배나방의 전사체에서는 1개의 contig를 동정하였고, 저온과 고온 발현체 모두 대조구에 비해 유전자 발현이 증가함을 확인하였다(Table 5). UDP-glycosyltransferase (UGT)는 작고 다양한 소수성 분자를 가지는 활성화된 당(sugar) 공여자인 UDP-glycoside에서 당화(glycosylation) 촉진에 관여한다(Ahn et al., 2012). UDP-glycosyltransferase는 해독작용 뿐만 아니라 세포의 경화반응(Hopkins and Kramer, 1992), 색소화반응(Wiesen et al., 1994; Mizokami and Yoshitama, 2009) 및 감각(Robertson et al., 1999; Wang et al., 1999; Ahn et al., 2011)에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 담배나방의 전사체에서 2개의 UDP-glycosyltransferase contigs를 확인하였다. 고온전사체는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았으나, 저온 전사체에서는 유전자 발현이 감소하였다 (Table 5).

Glutathione S transferase (GST)는 해독작용을 위해 외래물질에 환원형 글루타치온이 붙도록 촉매한다. GST는 크게 6개의 subfamily (delta, epsilon, omega, sigma, theta, zeta)로 나눈다(Fang, 2012). GST의 주된 기능은 외래물질을 해독하여 세포에 중요한 단백질이나 핵산이 반응하지 못하도록 하는 것으로 알려져 있다(Ranson and Hemingway, 2005). 담배나방의 발현 전사체에서 9개 contig가 확인되었고, 저온 전사체는 D1, E2, E4, O3 isoform의 발현이 증가하였고, 고온 전사체는 D1, D7

**Table 5.** Detoxification genes identified from fat body transcriptome of *Helicoverpa assulta*

Contig	Expression <sup>a</sup>		Length (bp)	Description	Species	Coverage (%)	E-Value
	3 to 10°C	35°C					
Cytochrome P450							
c20019_g1_i1	▼	-	1785	Cyp4d2	<i>Drosophila melanogaster</i>	93.8	3.00E-127
c25536_g1_i1	▼	-	1839	Cyp4c3	<i>Drosophila melanogaster</i>	92.0	7.00E-118
c30646_g2_i1	▼	-	1480	Cyp4c3	<i>Drosophila melanogaster</i>	82.6	4.00E-100
c29324_g1_i2	▼	-	1188	Cyp4d2	<i>Drosophila melanogaster</i>	74.1	3.00E-72
c30209_g2_i1	▼	-	1063	Cyp6a2	<i>Drosophila melanogaster</i>	70.4	2.00E-53
c36089_g1_i4	▼	-	2108	Cyp6a2	<i>Drosophila melanogaster</i>	98.8	2.00E-102
c32700_g1_i1	-	▲	2292	Cyp6a17	<i>Drosophila melanogaster</i>	92.8	6.00E-72
c34345_g1_i1	-	▲▲	1764	Cyp6d4	<i>Drosophila melanogaster</i>	98.3	2.00E-75
c33152_g4_i1	-	▲▲▲	1641	Cyp9f2	<i>Drosophila melanogaster</i>	95.4	1.00E-109
c34276_g2_i1	▼	▲	3187	Cyp12a5	<i>Drosophila melanogaster</i>	97.0	7.00E-86
Metallothionein 2							
c36059_g8_i2	-	▲	1162	Metallothionein B	<i>Drosophila melanogaster</i>	74.4	6.00E-06
UDP-glycosyltransferase							
c33103_g1_i1	▼	-	1756	Ugt 35b	<i>Drosophila melanogaster</i>	85.5	1.00E-63
c35725_g2_i1	▼▼	-	1878	Ugt	<i>Drosophila melanogaster</i>	91.1	2.00E-82
Glutathione S transferase							
c32940_g1_i1	▲	▲	1323	GST D1	<i>Drosophila melanogaster</i>	97.6	6.00E-67
c31469_g2_i1	-	▲	996	GST D7	<i>Anopheles gambiae</i>	95.9	4.00E-70
c21622_g1_i1	▲	-	889	GST E2	<i>Drosophila melanogaster</i>	97.3	8.00E-38
c29540_g1_i1	▲	-	891	GST E4	<i>Drosophila melanogaster</i>	92.3	1.00E-57
c27857_g1_i1	▼	-	1117	GST E7	<i>Drosophila melanogaster</i>	90.0	5.00E-59
c25294_g1_i1	▼	-	960	GST E7	<i>Drosophila melanogaster</i>	93.0	2.00E-61
c23661_g1_i4	▼▼	-	1282	GST E11	<i>Drosophila melanogaster</i>	89.8	3.00E-37
c32932_g1_i2	▼	-	928	GST E12	<i>Drosophila melanogaster</i>	95.1	1.00E-39
c27066_g1_i1	▲	-	1005	GST O3	<i>Drosophila melanogaster</i>	94.6	2.00E-47

<sup>a</sup>The expression level of each contig can be divided into up-regulation ( $\log_2 Fc > 2$ ), down-regulation ( $\log_2 Fc < -2$ ), and not meaningful ( $-2 < \log_2 Fc < 2$ ) compared to the control.  $2 < \log_2 Fc < 10$ , ▲;  $10 < \log_2 Fc < 50$ , ▲▲;  $50 < \log_2 Fc < 100$ , ▲▲▲;  $100 < \log_2 Fc$ , ▲▲▲▲;  $-10 < \log_2 Fc < -2$ , ▼;  $-50 < \log_2 Fc < -10$ , ▼▼;  $-100 < \log_2 Fc < -50$ , ▼▼▼;  $\log_2 Fc < -100$ , ▼▼▼▼.

isoform의 유전자 발현이 증가하였다(Table 5).

지방체 내의 지질조성 변화와 관련하여 지방산  $\Delta 9$  불포화 효소 및 phospholipase A를 활성화시키는 단백질과 enoyl-CoA hydratase가 관여한다. 세포막 지방체가 액상 상태에서 고형화 되는 gel 상태로 변화하는 것은 비동결 상태에서 저온으로 인한 손상을 유발시키는 중요한 인자 중의 하나이다(Drobnis et al., 1993). 불포화지방산 농도 증가는 저온에서 세포막의 액상 결정 상태를 유지하는 데 중요한 역할을 한다. 또한 이러한 변화는 저온에 대한 곤충의 내한성(cold tolerance)과 휴면과 관련되어 있기 때문에 막 인지질의 구성이 매우 중요하다(Bashan, 2005). 지방산  $\Delta 9$  불포화효소는 세포막에 있는 포화지방산에 특정위

치에 탄소와 탄소간의 이중결합을 첨가함으로써 물질에 대한 불포화도를 증가시키는 역할을 한다(Chung and Carroll, 2015). 곤충 조직 내에서의  $\Delta 9$  불포화효소의 다양한 분포는 항상성 유지에도 중요한 역할을 한다(Eigenheer et al., 2002). 담배나방의 발현 전사체에서 4개 지방산  $\Delta 9$  불포화효소에 대한 contigs를 동정하였고, 앞서 기술한 바와 같이 내한성에 관여하는 유전자이기 때문에 이 유전자의 발현은 저온 전사체에서 모두 높게 나타났다(Table 6). 반면 고온 전사 발현체는 대조구와 차이가 없었다(Table 6). 이것은 지방산 대사가 내한성에 대한 여부를 결정하는 중요한 표적유전자가 될 수 있음을 시사해준다. Phospholipase A2 (PLA2)는 glycerol의 두 번째 탄소로부터 지

**Table 6.** Lipid modification genes identified from fat body transcriptome of *Helicoverpa assulta*

Contig	Expression <sup>a</sup>		Length (bp)	Description	Species	Coverage (%)	E-Value
	3 to 10°C	35°C					
Fatty acyl delta9 desaturase							
c26951_g1_i1	▲▲▲▲	-	1340	Desaturase 1	<i>Drosophila melanogaster</i>	87.5	3.00E-144
c29444_g1_i1	▲▲	-	2171	Desaturase 1	<i>Drosophila melanogaster</i>	82.3	9.00E-138
c37221_g1_i8	▲	-	1366	Desaturase 2	<i>Drosophila melanogaster</i>	69.8	8.00E-85
c34581_g1_i1	▲	-	2298	Stearoyl-CoA 9-desaturase	<i>Drosophila melanogaster</i>	83.6	2.00E-117
Phospholipase A2							
c30194_g1_i1	▲	-	2126	Phospholipase A2	<i>Drosophila melanogaster</i>	66.9	2.00E-74

<sup>a</sup>The expression level of each contig can be divided into up-regulation ( $\log_2 Fc > 2$ ), down-regulation ( $\log_2 Fc < -2$ ), and not meaningful ( $-2 < \log_2 Fc < 2$ ) compared to the control.  $2 < \log_2 Fc < 10$ , ▲;  $10 < \log_2 Fc < 50$ , ▲▲;  $50 < \log_2 Fc < 100$ , ▲▲▲;  $100 < \log_2 Fc$ , ▲▲▲▲;  $-10 < \log_2 Fc < -2$ , ▼;  $-50 < \log_2 Fc < -10$ , ▼▼;  $-100 < \log_2 Fc < -50$ , ▼▼▼;  $\log_2 Fc < -100$ , ▼▼▼▼.

방산을 분리하는데 관여하는 효소로 특히 인지질의 sn-2 acyl bond을 인지하여 arachidonic acid (AA)와 lysophospholipid을 방출하도록 가수분해를 촉진한다. AA는 cyclooxygenase에 의해 prostaglandin (PG)으로 변화되고, PG는 생식, 분비, 면역 등의 다양한 생리적 기능에 관여한다(Stanley and Kim, 2014; Kim et al., 2018). 1개의 contig를 확인하였고, 저온 전사체에서 발현이 증가하였다(Table 6).

내동결성물질의 합성과 이동에는 Glycogen phosphorylase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase, Trehalose transporter, Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 등이 관여한다. 내동결성 물질은 지방체에서 합성되며, 내동결성 물질을 만드는 중요한 생화학 반응은 저장된 glycogen을 활용하는 과정에서 시작하여, 내동결성 물질을 만드는데 관여하는 효소의 활성에 의해 혈립프 내의 폴리올들이 생합성 되는 것이다(Park and Kim, 2013; Cha and Lee, 2016). Glycogen phosphorylase 활성은 저온 적응성을 가지는 유충에서 glycerol부터 sorbitol 합성에 이르기까지 온도와 관련된 반응의 스위치 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Park et al, 2014; Park and Kim, 2013; Kim et al., 2017). 담배나방 지방체로부터 1개 glycogen phosphorylase contig를 확인하였고, 저온 및 고온 전사체에서 모두 발현이 감소하였다(Table 7). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPK)는 저온 및 고온 스트레스에서 포도당의 빠른 이동에 관여하며, triglyceride/fatty acid cycle을 조절한다. 담배나방 지방체로부터 1개 PEPK contig를 확인하였고, 고온전사체에서만 발현이 증가하였다(Table 7).

Trehalase (Treh)는 두 개의 glucose 분자 생성을 위해 trehalose를 가수분해하는데 관여하고 에너지 대사에서의 중요한 역할과 함께 chitin 생합성 경로에서 나타나는 첫 번째 효소로 성장, 탈피, 변태 및 생식 등의 다양한 생리대사에서 중요한 역할을 한다

(Thompson, 2003; Shukla, et al., 2015). 곤충에서는 수용성 형태(Tre-1)와 막에 결합된 형태(Tre-2)로 존재하며, trehalose와 trehalose 대사는 곤충의 생존에 결정적이다(Mitsumasu et al., 2005; Mori et al., 2009; Takiguchi et al., 1992). Trehalose 합성에서 가장 잘 알려진 경로는 trehalose-6-phosphate synthase (TPS)로 두 분자의 포도당이 UDP와 반응하여 uridine-5'-diphosphoglucose (UDPG)가 되고, UDP와 분리되어 포도당-6-인산이 된다. Trehalose-6-phosphate (T6P)의 생성경로는 T6P 탈수소효소에 의해 trehalose로 전환된 후, 이동단백질을 이용하여 체내 이동된다. 담배나방의 고온 전사체에서만 Tre1의 발현이 대체로 증가하였으며, 고온에 의한 활발한 물질대사와 관련이 있는 것으로 파악된다(Table 7). Glycerol-3-phosphate dehydrogenase는 dihydroxyacetone phosphate (DHAP)를 glycerol-3-phosphate (G3P)로 전환하거나 가역적으로 G3P를 DHAP로 전환시키는 효소이다. 따라서 저온 상태에서 지방체 내 글리세롤 생합성으로 가는 중요한 효소이기도 하지만, 에너지를 만드는 과정에서 글리세롤로부터 DHAP를 만들어 해당과정을 통해 에너지를 생성하여 글리세롤 농도를 낮출 수 있다. 저온 전사체에서 G3P dehydrogenase contig는 유전자 발현이 감소되었으나, 고온 전사체에서는 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다(Table 7).

이상의 결과를 종합하면, 온도조건을 달리한 환경에 노출된 담배나방의 유충은 특정온도 조건에 유전자의 발현 패턴이 달라짐을 알 수 있다. 저온에서 높은 발현을 보인 유전자는 표피 단백질,  $\Delta 9$  불포화효소, 글리세롤 3인산 탈수소효소이며, 저온에서 오히려 발현이 낮아진 유전자는 키틴 합성효소, catalase, UDP-당전이효소이다. 고온에서 높은 발현을 보인 유전자는 과산화물제거효소, metallothionein2, phosphoenolpyruvate carboxykinase, trehalose 운반체단백질이었다. 고온에서 높고 저온에서 낮은 대조적 발현을 보인 유전자는 열충격단백질, glutathione



**Table 7.** Cryoprotectant mobilization genes identified from fat body transcriptome of *Helicoverpa assulta*

Contig	Expression <sup>a</sup>		Length (bp)	Description	Species	Coverage (%)	E-Value
	3 to 10°C	35°C					
Glycogen phosphorylase							
c36713_g1_i1	▼	▼	3776	Glycogen phosphorylase	<i>Drosophila melanogaster</i>	99.1	0
Phosphoenolpyruvate carboxykinase							
c34585_g1_i1	-	▲	2164	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	<i>Drosophila melanogaster</i>	85.2	0
Trehalose transporter							
c38609_g1_i1	-	▲	3441	Trehalose transporter Tret1	<i>Apis mellifera ligustica</i>	88.3	4.00E-78
c32880_g1_i1	-	▲	1974	Trehalose transporter Tret1	<i>Aedes aegypti</i>	54.6	2.00E-48
c33833_g1_i1	-	▲	1597	Trehalose transporter Tret1	<i>Polypedilum vanderplanki</i>	88.9	6.00E-46
c35846_g1_i1	-	▲	2058	Trehalose transporter Tret1	<i>Apis mellifera ligustica</i>	84.9	4.00E-42
c32761_g1_i1	-	▲▲	1791	Trehalose transporter Tret1	<i>Polypedilum vanderplanki</i>	88.7	8.00E-47
Glycerol 3 phosphate dehydrogenase							
c33681_g1_i1	▼	-	2243	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase	<i>Drosophila melanogaster</i>	96.7	0

<sup>a</sup>The expression level of each contig can be divided into up-regulation ( $\log_2 Fc > 2$ ), down-regulation ( $\log_2 Fc < -2$ ), and not meaningful ( $-2 < \log_2 Fc < 2$ ) compared to the control.  $2 < \log_2 Fc < 10$ , ▲;  $10 < \log_2 Fc < 50$ , ▲▲;  $50 < \log_2 Fc < 100$ , ▲▲▲;  $100 < \log_2 Fc$ , ▲▲▲▲;  $-10 < \log_2 Fc < -2$ , ▼;  $-50 < \log_2 Fc < -10$ , ▼▼;  $-100 < \log_2 Fc < -50$ , ▼▼▼;  $\log_2 Fc < -100$ , ▼▼▼▼.

peroxidase이다. 이들 온도 특이적이거나 대조적 발현을 보이는 유전자는 기후변화에 관련한 특이마커로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ012307)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## Literature Cited

- Ahn, S.J., Badenes-Pérez, F.R., Reichelt, M., Svatoš, A., Schneider, B., Gershenzon, J., Heckel, D.G., 2011. Metabolic detoxification of capsaicin by UDP glycosyltransferase in three *Helicoverpa* species. Arch. Insect Biochem. Physiol. 78, 104-118.
- Ahn, S.J., Vogel, H., Heckel, D.G., 2012. Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 133-147.
- Andersen, S.O., 2010. Insect cuticular sclerotization. Insect Biochem. Mol. Biol. 40, 166-178.
- Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochem. Pharmacol. 59, 95-104.
- Aucoin, R.R., Philogene, B.J.R., Arnason, J.T., 1991. Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phototoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous Lepidoptera. Arch. Insect Biochem. Physiol. 16, 139-152.
- Basha, E., O'Neill, H., Vierling, E., 2012. Small heat shock proteins and  $\alpha$ -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. Trends Biochem. Sci. 37, 106-117.
- Bashan, M., Cakmak, O., 2005. Changes in composition of phospholipid and triacylglycerol fatty acids prepared from prediapausing and diapausing individuals of *Dolycoris baccarum* and *Piezodorus lituratus* (Heteroptera: Pentatomidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 98, 575-579.
- Bouhin, H., Charles, J.-P., Quenedey, B., Courent, A., Delachambre, J., 1992. Characterization of a cDNA clone encoding a glycine-rich cuticular protein of *Tenebrio molitor*. developmental expression and effect of a juvenile hormone analogue. Insect Mol. Biol. 1, 53-62.
- Cai, Z., Chen, J., Cheng, J., Lin, T., 2017. Overexpression of three heat shock proteins protects *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) from thermal stress. J. Insect Sci. 17, 1-11
- Cha, W.H., Lee, D.-W., 2016. Identification of rapid cold hardening-related genes in the tobacco budworm, *Helicoverpa assulta*. J. Asia-Pacific Entomol. 19, 1061-1066.
- Chung, H., Carroll, S.B., 2015. Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. Bioessays 37, 822-830.
- Clark, M.S., Worland, M.R., 2008. How insects survive the cold: molecular mechanisms. J. Comp. Physiol. B 178, 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*. FEBS J. 277, 174-185.
- Cutler, R.G., 1991. Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. Ann. N. Y. Acad. Sci. 621, 1-28.
- Drobnis, E.Z., Crowe, L.M., Berger, T., Anchordoguy, 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. J. Exp. Zool. 265, 432-437.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82, 47-95.
- Duman, J.G., 2001. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. Ann. Rev. Physiol. 63, 327-357.
- Eigenheer, R.A., Nicolson, S.W., Schegg, K.M., Hull, J.J., Schooley, D.A., 2002. Identification of a potent antidiuretic factor acting on beetle Malpighian tubules. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 99, 84-89.
- Fang, S.-M., 2012. Insect glutathione S-transferase: a review of comparative genomic studies and response to xenobiotics. Bull. Insectol. 65, 265-271.
- Feyereisen, R., 1999. Insect P450 enzymes. Ann. Rev. Entomol. 44, 507-533.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408, 239-247.
- 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 Sci. 24, 358-370.
- 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.
- Guarente, L., Kenyon, C., 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. Nature 408, 255-262.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. Inflammation 35, 1147-1150.
- Han, M.-W., Lee, J.-H., 1998. Survival and development of overwintering pupae of the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta*, from different locality. Korean J. Appl. Entomol. 37, 127-135.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect. Biochem. Mol. Biol. 34, 653-665.
- Hopkins, T.L., Kramer, K.J., 1992. Insect cuticle sclerotization. Ann. Rev. Entomol. 37, 273-302.
- Kim, Y., Ahmed, S., Stanley, D., An, C., 2018. Eicosanoid-mediated immunity in insects. Dev. Comp. Immunol. 83, 130-143.
- Kim, Y., Lee, D.-W., Jung, J.K., 2017. Rapid cold-hardening of a subtropical species, *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae), accompanies hypertrehalosemia by upregulating trehalose-6-phosphate synthase. Environ. Entomol. 46, 1432-1438.
- King, A.M., MacRae, T.H., 2015. Insect heat shock proteins during stress and diapause. Ann. Rev. Entomol. 60, 59-75.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 238, 215-220.
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Ann. Rev. Entomol. 52, 231-253.
- Lomate, P., Sangole, K., Sunkar, R., Hivrale, V., 2015. Superoxide dismutase activities in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae: identification and biochemical properties of a manganese superoxide dismutase. Open Access Insect Physiol. 5, 13-20.
- Mitsumasu, K., Azuma, M., Niimi, T., Yamashita, O., Yaginuma, T., 2005. Membrane penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*. Molecular cloning and localization in larval midgut. Insect Mol. Biol. 14, 501-508.
- Mizokami, H., Yoshitama, K., 2009. Sequestration and metabolism of host-plant flavonoids by the Pale Grass Blue, *Pseudaizeeria maha* (Lepidoptera: Lycaenidae). J. Entomol. Sci. 12, 171-176.
- Mori, H., Lee, J.H., Okuyama, M., Nishimoto, M., Ohguchi, M., Kim, D., Kimura, A., Chiba, S., 2009. Catalytic reaction mechanism based on alpha-secondary deuterium isotope effects in hydrolysis of trehalose by European honeybee trehalase. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 2466-2473.
- Neven, L.G., 2000. Physiological responses of insects to heat. Postharvest Biol. Technol. 21, 103-111.
- Park, Y., Kim, K.H., Kim, Y., 2014. Rapid Cold Hardening of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). Environ. Entomol. 43, 1076-1083.
- Park, Y., Kim, Y., 2013. RNA interference of glycerol biosynthesis suppresses rapid cold hardening of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. J. Exp. Biol. 216, 4196-4203.
- Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Glutathione transferases, in: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), Comprehensive molecular insect science/pharmacology. Elsevier, Oxford, UK, pp. 383-389.
- Robertson, H.M., Martos, R., Sears, C.R., Todres, E.Z., Walden, K.K.O., Nardi, J.B., 1999. Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. Insect Mol. Biol. 8, 501-518.
- Ruttkey-Nedecky, B., Nejd, N., Gumulec, J., Zitka, O., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. Int. J. Mol. Sci. 14, 6044-6066.
- Sable, M.G., Rana, D.K., 2016. Impact of global warming on insect behavior-A review. Agric. Rev. 37, 81-84.
- Sang, W., Ma, W.H., Qiu, L., Zhu, Z.H., Lei, C.L., 2012. The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle *Tribolium castaneum*. J. Insect Physiol. 58, 830-836.
- Sharma, S., Rais, A., Sandhu, R., Nel, W., Ebadi, M., 2013. Clinical significance of metallothioneins in cell therapy and nanomedicine. Int. J. Nanomed. 8, 1477-1488.
- Shukla, E., Thorat, L.J., Nath, B.B., Gaikwad, S.M., 2015. Insect trehalase: physiological significance and potential applications. Glycobiology 25, 357-367.

- 
- Stanley, D.W., Kim, Y., 2014. Eicosanoid signaling in insects: from discovery to plant protection. *Crit. Rev. Plant Sci.* 33, 20-63.
- 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, e0128976.
- Sugumaran, M., 2010. Chemistry of cuticular sclerotization. *Adv. Insect Physiol.* 39, 151-209.
- Takiguchi, M., Niimi, T., Su, Z.H., Yaginuma, T., 1992. Trehalase from male accessory gland of an insect, *Tenebrio molitor*. cDNA sequencing and developmental profile of the gene expression. *Biochem. J.* 288, 19-22.
- Tasaki, E., Kobayashi, K., Matsuura, K., Iuchi, Y., 2017. An efficient antioxidant system in a long-lived termite queen. *PLoS One* 12, e0167412.
- Thompson, S.N., 2003. Trehalose- the insect 'blood' sugar. *Adv. Insect Physiol.* 31, 205-285.
- Vincent, J.F.V., 2009. If it's tanned it must be dry: a critique. *J. Adhes.* 85, 755-769.
- Wang, Q., Hasan, G., Pikielny, C.W., 1999. Preferential expression of biotransformation enzymes in the olfactory organs of *Drosophila melanogaster*, the antennae. *J. Biol. Chem.* 274, 10309-10315.
- Wang, Y., Oberley, L.W., Murhammer, D.W., 2001. Antioxidant defense systems of two Lepidopteran insect cell lines. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1254-1262.
- Weirich, G.F., Collins, A.M., Williams, V.P., 2002. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33, 3-14.
- Wiesen, B., Krug, E., Fiedler, K., Wray, V., Proksch, P., 1994. Sequestration of host-plant-derived flavonoids by lycaenid butterfly *Polyommatus icarus*. *J. Chem. Ecol.* 20, 2523-2538.
- Yamamura, K., Kiritani, K., 1998. A simple method to estimate the potential increase in the number of generations under global warming in temperate zones. *Appl. Entomol. Zool.* 33, 289-298.
- Yang, C.Y., Jeon, H.Y., Cho, M.R., Kim, D.S., Yiem, M.S., 2004. Seasonal occurrence of oriental tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) male and chemical control at red pepper fields. *Korean J. Appl. Entomol.* 43, 49-54.
- Zachariassen, K.E., Kristiansen, E., 2000. Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* 41, 257-279.
- Zhang, J., Goyer, C., Pelletier, Y., 2008. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Mol. Biol.* 17, 209-216.