

*Bacillus thuringiensis*의 주입에 따른 담배나방의 혈림프 단백질, 가수분해효소 및 무기이온의 변화

유종명, 조시형, 황석연, 이형철
한남대학교 이과대학 생물학과

Changes in Haemolymph Proteins, Hydrolases, and Inorganic Ions of *Heliothis assulta* Injected with *Bacillus thuringiensis*

Chong Myung Yoo, Si Hyung Jo, Seok Yeoun Hwang and Hyung Chul Lee
Dept. of Biology, Han Nam Univ., Taejon 300-791, Korea

ABSTRACT : Changes in haemolymph proteins, hydrolases such as esterase(EST), acid phosphatase(ACP) and alkaline phosphatase(ALP), and inorganic ion(Na^+ , K^+ and Cl^-) contents were induced by the injection of *Bacillus thuringiensis* into haemocoel of the last instar larva of *Heliothis assulta*. Protein concentration of haemolymph was increased until 24 hrs after injection, and decreased thereafter. Among the 8 basic protein bands identified through acid-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE), 2 bands(bands a and b) became stronger by the bacterial infection. Activities of EST and ALP increased until 12 hrs after injection and then fell down, whereas ACP activity was decreased continuously with time after injection. Contents of inorganic ions were all increased by the bacterial injection, showing slow rate of increase in the chloride ion, but rapid in the sodium and potassium ions.

서 론

세균을 이용한 해충방제에 있어서 entomopathogen의 살충효과를 높이기 위한 균주 선발 및 생리, 생화학적 연구와 유전학적인 연구가 활발히 이루어지고 있다^{6, 17, 19, 28, 31}. 곤충을 치사시키는 대표적인 entomopathogen으로 알려진 *Bacillus thuringiensis*는 spore 형성시기에 결정 단백질을 생성하며 이 물질은 나비목, 파리목, 딱정벌레목 등의 곤충 장내로의 이입시에 독성을 나타낸다^{6, 15}. 살충성 단백질로 δ -endotoxin이나 Cry III A 등은 곤충의 중장 상피세포

막의 lipid layer상에 작용하여 막 투과성에 큰 변화를 일으킨다고 밝혀졌다^{9, 29}.

한편 *B. thuringiensis*의 혈강 내 주입에 따른 방어기전과 곤충의 생리 생화학적 반응 특성이 세균에 대한 곤충의 내성과 관련하여 관심의 대상이 된다. 곤충의 체액성 면역(humoral immunity) 기전에서 작용하는 attacin, cecropin, lysozyme, lectin, dipterin, sarcotoxin 등의 방어 인자들이 여러 연구자들에 의해 밝혀졌다^{1, 3, 4, 5, 8, 13, 16, 26}. 그러나 *Bacillus*의 경우는 *Locusta migratoria*의 혈강으로 *B. thuringiensis*의 주입시에 비록 *Escherichia coli*나 *Pseudomonas aerugi-*

nosa 같은 다른 세균의 주입시 보다는 낮으나 항세균적 활성이 나타나며 이러한 방어기전과 관련한 생화학적 변화가 수반된다는 보고¹¹⁾ 이외에는 연구가 진행된 바 없다.

본 연구에서는 담배 및 고추 등에 피해를 주는 담배나방(*Heliothis assulta*)의 종령 유충 혈장으로 *B. thuringiensis* 주입시에 나타나는 방어 특성 및 유도 물질의 특성을 알기 위한 기초연구로서 혈림프의 단백질, 가수분해효소 그리고 ion 함량 변화를 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 곤충

담배나방(*Heliothis assulta*)은 한국인삼연초연구원으로부터 분양받은 계통을 본 실험실에서 계대사육 하였으며 종령 유충을 실험재료로 사용하였다. 담배나방은 인공사료(옥수수가루, 콩가루, 고추기름, skim milk, yeast extract, vitamin mixture, agar)를 먹이로 하여 growth chamber(Temp. $26 \pm 1^\circ\text{C}$; RH, $65 \pm 5\%$; Photoperiod, 16L:8D)에서 사육하였다.

2. 세균 배양 및 주입

Nutrient broth(NB)에서 *Bacillus thuringiensis* KCTC 1508을 37°C 에서 18시간 배양한 다음 1,600g로 10분동안 원심분리하여 얻은 pellet을 insect saline²²⁾으로 부유시킨 후 다시 1,600 g로 10분 동안 원심분리하였다. 최종 pellet에 insect saline을 가해 3×10^8 cells/ml로 희석한 *B. thuringiensis* 부유물을 Hamilton syringe를 이용하여 2일된 종령 유충의 복부 4째 마디에 $5 \mu\text{l}$ 씩 주입하였고 출혈과 미생물들의 감염을 막기 위해 vaselin을 발라 주었다.

3. 혈림프 채취

*B. thuringiensis*를 주입한 후 12, 24, 48, 72시간에 종령 유충의 다리를 절단하여 용출되는 혈림프를 채취하였고, melanization을 방지하기 위해 phenylthiourea(PTU)를 첨가하였다. 채취된 혈림프에서 혈구 및 조직 절편을 제거하기 위해 4°C 에서 2,000 g로 10분동안 원심분리하였으며, 또한 세균을 제거하기 위해 멸균필터($0.2 \mu\text{m}$)로 여과한 후 -20°C 에 보관하였다. 대조군은 세균을 주입하지 않고 정상적

으로 사육한 동일 발생 단계의 곤충 40개체 씩으로부터 혈림프를 채취하여 사용하였다.

4. 단백질 농도 측정

단백질 농도는 Lowry등의 방법¹⁸⁾을 일부 변형하여 실시하였다. Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 흡광도를 측정, 표준곡선을 작성하고 시료의 단백질 흡광도를 측정된 후 표준곡선과 비교 환산하여 함량을 측정하였다. 흡광도는 Beckman DU-8B Spectrophotometer를 이용하여 750 nm에서 측정하였다.

5. Native - PAGE

7.5% 농도의 polyacrylamide gel에 각 시간별 시료 $10 \mu\text{l}$ 씩을 loading하여 처음 1시간은 5mA로 그 이후는 10mA로 4°C 에서 전기영동을 실시하였으며, running buffer는 2.5 mM tris-glycine buffer(pH 8.6)를 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 12% trichloroacetic acid(TCA) 용액에서 2시간동안 고정시킨 후 0.2% coomassie brilliant blue R-250 염색액으로 2시간동안 염색시킨 다음 ethanol:acetic acid:D.W (25:10:65, V/V/V) 혼합액에서 탈색시킴으로써 단백질 band를 확인하였다.

6. Acid - PAGE

Reisfeld 등²⁷⁾과 Hultmark 등¹⁴⁾의 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 10% polyacrylamide gel(pH 4.3)에 시료 $10 \mu\text{l}$ 를 loading하여 350 mM β -alanine buffer(pH 4.5)로 4°C 에서 30V로 1시간, 그리고 80V로 1시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.25% coomassie brilliant blue R-250으로 2시간 염색한 후 7% acetic acid로 탈색하여 관찰하였다.

7. Hydrolase의 Zymogram 조사

Native - PAGE를 실시한 gel 상에서, esterase band의 발색은 Pasteur와 Kastritsis의 방법²⁵⁾을 일부 변형하여 실시하였는데, gel을 0.1M phosphate buffer (pH 6.6) 120ml, α -naphthyl acetate 48 mg, fast blue RR 84 mg의 혼합액에 담가 1시간 동안 37°C 에서 incubation 시킨 후 다시 37°C 에서 ethanol:10% acetic acid(3:2, V/V)의 혼합액에서 30분간 incubation시켜 확인하였다. Acid phosphatase(ACP) band의 발색은 Pasteur와 Kastritsis의 방법²⁵⁾으로 alkaline pho-

sphatase(ALP)의 발색은 Hubby와 Lewontin의 방법¹²⁾에 따라 실시하였다. 즉 전기영동이 끝난 gel을 ACP의 경우에는 0.05M sodium acetate buffer(pH 5.0) 100ml에 fast garnet GBC salt 100 mg과 α -naphthyl phosphate 100 mg을 용해시킨 액에서, ALP는 0.2 M veronal buffer(pH 10.5) 100ml에 fast blue B salt 100 mg을 가하여 만든 액에서 각각 incubation 시켜 효소 band들을 확인하였다.

8. Esterase 활성도 측정

β -Naphthyl acetate 기질액²³⁾에 혈림프를 가하여 20분간 incubation(37°C)시킨 후, 여기에 naphtol diazo blue B 용액 1ml을 가하여 발색시킨 다음 40% trichloroacetic acid 1ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 다시 여기에 ethyl acetate 10ml을 가하여 3,500rpm에서 10분간 원심분리시켜 얻은 상등액의 O.D. 값을 Backman DU-8B spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 측정하고 이를 β -naphtol 방출량으로 환산하여 활성도를 측정하였다.

9. Phosphatase의 활성도 측정

Phosphatase의 활성도 측정은 Pant와 Lacy의 방법²⁴⁾에 준하여 실시하였다. 각 효소액 0.5ml에 5.5×10^{-3} M p -nitrophenyl phosphate가 포함되어 있는 pH 5.0과 10.5의 0.05M glycine buffer를 1ml씩 각각의 시료에 가하여 30분간 incubation(37 °C) 시킨 다음, 0.1N NaOH 4ml를 가하여 반응을 정지시키고 각 반응액의 O.D. 값을 측정하였다. 측정된 O.D. 값을 p -nitrophenol을 용해시켜 준비한 표준액 O.D. 값과 비교 환산하여 활성도를 측정하였다.

10. 무기이온 농도 측정

시료 400 μ l를 Na/K/Cl/Li analyzer(NOVA 13 : NOVA Biomedical Co.)에 주입하여 ion농도를 측정하였다.

결 과

담배나방 종령 유충의 혈장으로 *B. thuringiensis*를 주입한 후 채취한 혈림프의 단백질 농도를 측정한 결과는 Table 1과 같다.

세균을 주입하지 않은 대조군의 단백질 농도는 33.1

Table 1. Concentration of haemolymph protein in the last instar larva of *Heliothis assulta* injected with *B. thuringiensis*

Time after injection (hours)	Haemolymph Protein (mg/ml \pm SD)*
Non-treated control**	33.1 \pm 0.5
12	35.4 \pm 0.6
24	38.4 \pm 0.9
48	36.8 \pm 0.7
72	35.7 \pm 0.3

* Each values represents the mean \pm SD obtained from three replicate experiments.

** Non-treated control, non-treated normal haemolymph

mg/ml이었고 *B. thuringiensis*를 주입한 혈림프의 단백질 농도는 증가하여 주입 후 24시간에 38.4 mg/ml로 가장 높았으며 24시간 이후에는 감소 양상을 보였으나 주입 후 72시간 까지는 정상 혈림프보다 높게 나타났다.

Native protein의 분리상에서는 gel의 중간부와 양극 부위 사이에서 분리되는 일부 band들의 염색 강도 변화 만이 미약하게 관찰되었다(Fig. 1). 염기성 단백질은 acid-PAGE를 통해 분리하였는데, 총 8개

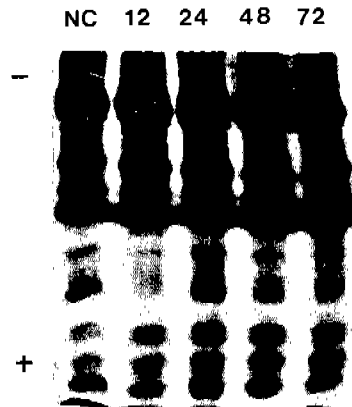


Fig. 1. Native - PAGE of haemolymph protein in the last instar larva of *Heliothis assulta* injected with *Bacillus thuringiensis*. NC, non-treated control haemolymph ; The numbers represent time(hours) after bacterial injection into haemocoel.

의 band들이 구분되었으며 band a 와 b는 *B. thuringiensis* 주입 후 24시간과 48시간에서 강하게 검출되었고 band c와 d는 큰 변화가 없었으나 72시간째에 약화되었다. band g와 h는 12시간에서 미약하게 검출되었으나 이후 점진적으로 강하게 나타났다(Fig. 2).

가수분해효소의 활성도를 조사한 결과(Table 2),

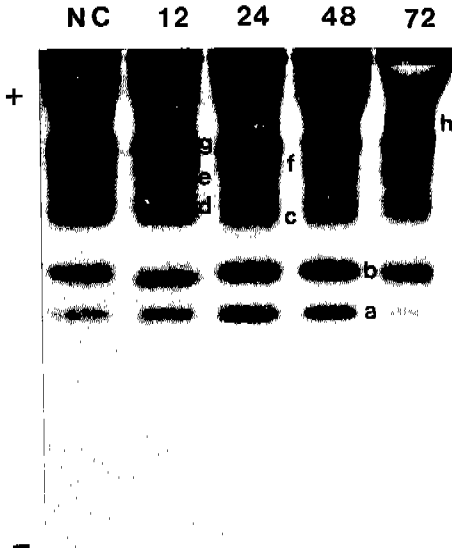


Fig. 2. Acid - PAGE of haemolymph protein in *Heliothis assulta* injected with *Bacillus thuringiensis*. The abbreviations as in Fig. 1.

esterase의 활성도는 주입후 증가하여 12시간에서 최대 수준(233 μ g/ml)을 나타낸 후 감소하여 48시간과 72시간에는 대조군(15 μ g/ml)에 비해 낮게 나타났다. Acid phosphatase(ACP)는 주입 후 점진적인 감소 양상을 보였으며, alkaline phosphatase(ALP)는 12시간에서 증가하여 95 μ g/ml로 최대 값을 나타낸 후 점진적으로 감소하여 대조군에 비해 낮은 수준을 보였다.

한편 Native - PAGE 상에서 분리된 band들의 가수분해효소(EST, ACP, ALP)활성 여부를 확인한 결과(Fig. 3), esterase band는 총 6개로 확인되었는데 EST 1, 2, 3, 4, 5는 점진적으로 소실되어 48시간째에서는 아주 미약하게만 확인되었고 EST 6은 *B. thuringiensis*주입한 시료에서만 나타났다. Acid phosphatase(ACP)는 조사된 모든 단계에서 3개의 band가 검출되었는데 ACP 1은 정상 발생 혈림프에서만 검출되었고 감염된 시료에서는 소실되었으며 ACP 2와 3은 24시간까지 검출된 후 소실되었다. Alkaline phosphatase(ALP)는 2개의 band만이 확인되었는데 ALP 1은 정상 발생 혈림프에서 강하게 검출되었으나 처리군에서는 약화되면서 48시간 부터는 완전히 소실된 반면 ALP 2는 *B. thuringiensis*주입후 24시간 째에 처음으로 확인 되었다.

Sodium, potassium 그리고 chloride 이온 함량은 주입에 따라 전반적으로 증가하는 양상으로 나타났는데(Table 3), Cl⁻의 변화 pattern은 대조군에 비해 완만한 증가율을 보인 반면 Na⁺과 K⁺은 급증하였다. Na⁺, K⁺, 그리고 Cl⁻의 함량이 모두 세균 주입후 72

Table 2. Hydrolase(EST, ACP, ALP) activity of haemolymph in last instar larva of *Heliothis assulta* injected with *B. thuringiensis*

Time after injection(hours)	Hydrolase Activity**		
	EST ^{a)}	ACP ^{b)}	ALP ^{b)}
Non - treated control*	151 \pm 2.5	1030 \pm 6.4	80 \pm 2.5
12	233 \pm 3.7	712 \pm 5.7	95 \pm 3.3
24	178 \pm 2.4	530 \pm 5.5	68 \pm 3.1
48	106 \pm 1.8	288 \pm 4.6	70 \pm 2.2
72	105 \pm 0.5	220 \pm 4.7	63 \pm 2.3

a) μ g of β -naphthol liberated by enzyme action/ml of haemolymph ;

b) μ g of p-nitrophenol liberated by enzyme action/mo of haemolymph ;

* Non-treated control, non-treated normal haemolymph ;

** Each values represents the mean \pm SD obtained from three replicate experiments.

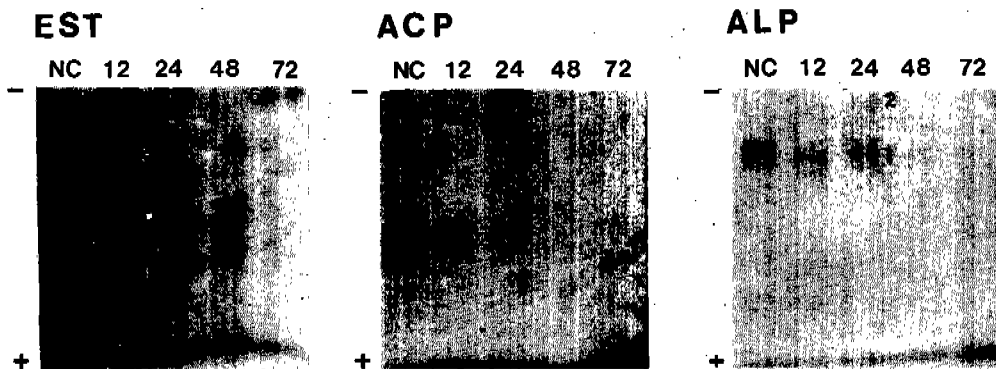


Fig. 3. Zymograms of haemolymph esterase(EST), acid phosphatase(ACP) and alkaline phosphatase(ALP) in last instar larva of *Heliothis assulta* injected with *Bacillus thuringiensis*. The abbreviations are as in Fig. 1.

Table 3. Ion(Na⁺, K⁺, Cl⁻) contents of haemolymph in last instar larva of *Heliothis assulta* injected with *Bacillus thuringiensis*

Time after injection(hours)	Inorganic Ion Content(mEq/L± SD)*		
	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Non-treated control	78± 1	32± 2	194± 4
12	94± 2	37± 1	214± 3
24	84± 1	38± 2	210± 4
48	94± 2	41± 1	240± 5
72	120± 3	45± 2	244± 5

* Each values represents the mean± SD obtained from three replicate experiments.

시간에 최대값을 나타내었다.

고 찰

많은 곤충에 pathogen으로 작용하는 *Bacillus thuringiensis*를 직시목 곤충인 *Locusta migratoria*의 혈강내로의 주입시에 각종 생화학적 변화와 함께 미약하나마 혈림프에서 항세균적 활성이 유도됨이 확인되었다¹¹⁾.

본 연구에서는 *B. thuringiensis*의 혈강내 이입에 따른 인시목 곤충에서의 반응양상을 알아보기 위해 담배나방(*Heliothis assulta*) 혈강으로의 *B. thuringiensis*주입시에 일어나는 혈림프 단백질의 변화를 조

사한 바, 단백질의 농도는 24시간까지는 증가하다가 이후 72시간까지 계속적인 감소양상을 나타내었다 (Table 1). 이것은 *B. thuringiensis*에 의해 초기에는 체액성 면역 관련 단백질이 유도되나 이후 *B. thuringiensis*에 의한 조직 손상²⁾과 함께 항세균성 단백질 형성의 억제가 일어나기 때문인 것으로 생각된다⁷⁾. Acid-PAGE를 이용하여 *Phormia terranova*의 혈림프로부터 5개의 염기성 단백질 band들을 분리하였으며¹⁶⁾ *Mamestra brassica*의 용에서 3개의 염기성 단백질 band들을 확인하였는데²⁰⁾, 본 연구에서는 총 8개의 band들이 분리되었으며 (Fig. 2) 그중 band a와 b가 감염 혈림프에서 강하게 출현하여 체액성 면역과 깊은 관련성을 시사해 준다.

담배나방 혈강으로의 *B. thuringiensis* 주입 후 시간 경과에 따라 혈림프 가수분해효소(EST, ACP, ALP) band들은 일반적으로 그 활성이 약화되는 양상으로 관찰되었으나 EST 6는 감염 혈림프에서만 관찰되었다(Fig. 3). 비병원성 그람 음성균의 주입에 의해 면역된 *Galleria mellonella* 유충 혈림프 가수분해효소들의 변화를 조사한 바 대조군에서는 관찰되지 않은 많은 non-specific carboxylesterase와 L-leucyl specific aminopeptidase isozyme들의 출현을 보고하여¹⁰⁾ 본 연구에서와는 다른 결과가 나타나는데, 이러한 현상은 주입 세균의 병원성 여부에 따라 가수분해효소의 변동상이나 유도성이 달라지기 때문인 것으로 생각된다. Non-specific esterase가 이물질 이입시 detoxification mechanism에 관여한다고 하였으나¹⁰⁾ 가수분해효소들의 구체적인 면역작용에 관련되는 기전과 특성에 대하여는 아직 구체적으로 밝혀진 바 없다.

혈림프내 이온들은 diet에 따라, dehydration이나 temperature stress시 그리고 disease 등에 의해 조성 및 함량의 변화를 일으킨다고 하였으며²⁰⁾, *Pieris rapae*에서 *B. thuringiensis*의 δ -endotoxin 주입시 K^+ 수준이 정상 혈림프보다 2배 이상 증가한 반면 Mg^{2+} 에서는 점진적인 감소가 그리고 Na^+ , K^+ 그리고 Cl^- 의 농도를 측정해 본 결과 주입후 시간 경과에 따라 증가하는 양상으로 나타났다(Table 3). 본 실험에서 이온의 증가 정도는 Na^+ , K^+ , Cl^- 의 순서였는데 단백질을 직접 주입한 것과는 다소 차이가 있었다.

본 연구를 통해 *B. thuringiensis*의 주입시 담배나방에서 humoral immunity가 나타남이 주입 후 초기에서 단백질 농도의 증가 및 acid-PAGE 상에서의 유도단백질의 출현에 의해 간접적으로 시사되고 있으나, 이에 관하여는 혈림프 단백질의 항균활성 검정 및 유도 단백질의 정제를 통한 유도 단백질의 특성과 toxic crystal protein에 대한 면역성등의 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다.

결론

담배나방(*Heliothis assulta*) 혈강으로의 *Bacillus thuringiensis* 주입에 따른 단백질, 가수분해 효소 및 무기이온 함량의 변화를 연구한 결과는 다음과 같다.

혈림프 단백질의 농도는 주입 후 24시간까지 증가한 이후 계속적인 감소 양상을 나타내었다. Acid-PAGE 를 통해 분리된 8개의 basic protein 가운데 2개의 band(band a, b)가 세균 주입에 의해 강하게 유도되었다. Esterase와 alkaline phosphatase의 활성도는 주입 후 12시간 후에 증가 양상을 보인 후 감소하는데 비해, acid phosphatase의 활성도는 계속적인 감소 현상만을 보였다. 무기이온(Na^+ , K^+ , Cl^-)들의 함량은 전반적으로 증가하는 양상으로 관찰되었는데, Na^+ 과 K^+ 은 높은 증가율을 보였으며 Cl^- 은 완만한 상승 폭을 나타내었다.

참고문헌

1. Ando, K., M. Okada, and S. Natori. *Biochem.* 26 : 226 - 230(1987).
2. Aronson, A. I., W. Beckman, and P. Dunn. *Microbiol. Rev.* 50(1) : 1 - 24(1986).
3. Baba, K., M. Okada, T. Kawano, H. Komano, and S. Natori. *J. Biochem.* 102 : 67 - 74(1987).
4. Boman, H. G. *Cell.* 65 : 205 - 207(1991).
5. Castro, V.M., H.G. Boman, and S. Hammarstrom. *Insect Biochem.* 17(4) : 513 - 523(1987).
6. Chilcott, C.N. and P.J. Wigley. *J. Invert. Pathol.* 61 : 244 - 247(1993).
7. Dalhammar, G. and H. Steiner. *Eur. J. Biochem.* 139 : 247 - 252(1984).
8. Dunn, P.E. *Ann. Rev. Entomol.* 31 : 321 - 339 (1986).
9. English, L. and S.L. Slatin. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22(1) : 1 - 7(1992).
10. Gupta, A. P. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* Pergamon Press, Oxford. 3 : 401 - 451(1985).
11. Hoffmann, D. J. *Insect Physiol.* 26 : 539 - 549 (1980).
12. Hubby, J.L. and R.C. Lewontin. *Genetics.* 54 : 577 - 594(1966).
13. Hultmark, D., A. Engstrom, K. Anderson, H. Steiner, H. Bennich and H.G. Boman. *EMBO J.* 2(4) : 571 - 576(1983).
14. Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson, and H.G.

- Boman. *Eur. J. Biochem.* 106 : 7 - 16(1980).
15. Jarrett, P. J. *Appl. Bacteriol.* 58 : 437 - 448(1985).
 16. Keppi, E., D. Zachary, M. Robertson, D. Hoffmann, and J.A. Hoffmann. *Insect Biochem.* 16(2) : 395 - 402(1986).
 17. Lemos, F.J.A., A.F. Ribeiro, and W. R. Terra. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23(4) : 533 - 541(1993).
 18. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. *J. Biol. Chem.* 193 : 265 - 275(1951).
 19. Matha, V. *Microbios Letters.* 36 : 43 - 46(1987).
 20. Mullins, D. E. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* Pergamon Press, Oxford. 3 : 468 - 469(1985).
 21. Nishiitsutsuji - Uwo, J. and Y. Endo. *Appl. Ent. Zool.* 16(3) : 225 - 230(1981).
 22. Okada, M. and S. Natori. *Biochem. J.* 211 : 727 - 734(1983).
 - 26 : 525 - 536(1971).
 26. Reichhart, J.M., M. Meister, J. L. D. Zachary, D. Hoffmann, C. Ruiz, G. Richards, and J.A. Hoffmann. *EMBO J.* 11(4) : 1469 - 1477(1992).
 27. Reisfeld, R. A., U.J. Lewis, and D.E. Williams. *Nature.* 195 : 281 - 283(1962).
 28. Sekar, V., D. V. Thompson, M.J. Maroney, R.G. Bookland, and M.J. Adang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 7036 - 7040(1987).
 29. Slaney, A. C., H.L. Robbins and L. English. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22(1) : 9 - 18(1992).
 30. Slovak, M., V. Repka, and L. Slovakova. *Acta Entomol. Bohemoslov.* 89 : 107 - 112(1992).
 31. Wilson, G.R. and T.G. Benoit. *J. Invert. Pathol.* 62 : 87 - 89(1993).
 23. Ozaki, K. and H. Koike. *Appl. Ent. Zool.* 9(1) : 53 - 59(1965).
 24. Pant, R. and P.S. Lacy. *Indian J. Exp. Biol.* 6 : 208 - 284(1969).
 25. Pasteur, N. and C.D. Kastritsis. *Develop. Biol.*