# cox1 분자마커를 이용한 한국산 패류 천공성 다모류 Polydora haswelli (Polychaeta, Spionidae) 유전자 다양성 발굴

이순정 · 김승민 · 권문경1 · 이상래2\*

국립수산물품질관리원 목포지원. 1국립수산물품질관리원 수산방역과 2부산대학교 해양연구소

## Genetic Diversity of Polydora haswelli (Polychaeta, Spionidae) in Korean Shellfish using cox1 Marker

Soon Jeong Lee, Seung Min Kim, Mun Gyeong Kwon<sup>1</sup> and Sang-Rae Lee<sup>2\*</sup>

Mokpo Regional Office, National Fishery Products Quality Management Service (NFQS), Mokpo 58746, Korea <sup>1</sup>Aguatic Life Disease Control Division, National Fishery Products Quality Management Service (NFOS), Busan 49111, Korea <sup>2</sup>Marine Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Harmful shell-boring species of the genus *Polydora* (Polychaeta: Spionidae) were frequently reported from commercially important mollusk species in Korea, Japan and China. The traditional approach based on the morphological characteristics showed limitations for species discrimination among shell-boring species. Therefore, DNA barcoding was adopted to identify Polydora species using molecular markers. Two Polydora species (P. haswelli and P. hoplura) in abalone shells were reported from our previous molecular phylogenetic study. In this study, we additionally reported the presence of shell-boring *Polydora haswelli* in commercially sold shellfish. The taxon-specific *cox*1 marker used in this study successfully allowed the isolation of *P. haswelli* from cockle *Scapharca subcrenata*, mussel *Mytilus* galloprovincialis, oyster Crassostrea gigas and scallop Argopecten irradians. Polydora hoplura was not found in these shellfish species. The genetic variations were found on the intraspecific level of *P. haswelli* and the same genotype was also detected in different shellfish species. This result can provide information on a new host and accurate parasitic Polydora species. Moreover, this report can be used as the biodiversity data of Polydora species on the invasion and transition of harmful *Polydora* species in mollusk aquaculture farms.

Keywords: Abalone shell-boring, cox1, Polydora, P. haswelli, shellfish

#### 서 론

Polydora속(긴얼굴갯지렁이속- Polychaeta 다모강: Spionida 얼굴갯지렁이목: Spionidae 얼굴갯지렁이과) 다모류는 패류의 껍데기에 기생하여 숙주(host)의 생육에 영향을 끼치는 유해 생 물종으로, 한국, 일본, 중국 및 아메리카 대륙 등에서 보고된 바 있다(Sato-Okoshi and Abe, 2012; Sato-Okoshi et al., 2012; Won et al., 2013; National Institute of Biological Resources, 2015; Radashevsky and Migotto, 2017; Ye et al., 2017). 국내 에는 지금까지 Polydora aura (광택긴얼굴갯지렁이), P. brevipalpa (건얼굴갯지렁이), P. haswelli (두이빨긴얼굴갯지렁이), P. limicola (한이빨긴얼굴갯지렁이), P. hoplura (= P. uncinata) (갈 고리긴얼굴갯지렁이) 등 5종의 서식이 알려져 있다[National Institute of Biological Resources, 2015; 분류군의 한글 명칭 은 국립생물자원관의 한반도의 생물다양성 데이터베이스(National Institute of Biological Resources, 2021)에 근거하였다]. 이러한 패류 천공성 다모류는 국내 전복 양식장에서 전복의 생장을 저해하고 폐사율을 증가시키며, 상품가치 저하 등의 문 제를 일으키는 것으로 알려져 있다(Won et al., 2013). 또한 양 식 등을 통한 전 세계로의 인위적인 확산 가능성이 알려져 있어, Polydora속에 대한 정확한 종 동정과 분포에 대한 연구 필요성 이 제기되었다(Simon and Sato-Okoshi, 2015; Williams et al.,

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 510. 1774 Fax: +82. 51. 581. 2963 E-mail address: antithamnion@gmail.com



provided the original work is properly cited.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licens (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium,

Received 13 July 2021; Revised 4 September 2021; Accepted 15 September 2021 저자 직위: 이순정(연구사), 김승민(연구사), 권문경(연구관, 과장), 이상래

https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0685

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 685-690, October 2021

(전임연구원)

2016; Lee et al., 2020a).

그럼에도 불구하고 지금까지 한국산 Polydora속 종에 대한 분류학적 연구는 매우 드물었으며, 기존의 연구는 대부분 형 태 동정에 의한 생물상의 분포 기재를 중심으로 이루어져 왔다 (National Institute of Biological Resources, 2015). Lee (1998) 는 거제도 연안에서 P. ciliata [간얼굴갯지렁이; P. brevipalpa 의 이명(synonym), National Institute of Biological Resources (2015) 기재 종 정보]를 보고한 바 있으나, 이 종은 패류 껍질 에 천공하는 종이 아니라 10 m 수심에서 free-living하는 개체 를 채집하여 보고하였다. Sato-Okoshi et al. (2012)은 한국의 양식 및 자연산 패류에서 P. aura, P. haswelli 및 P. hoplura (as P. uncinata) 등 Polydora속 천공성 다모류 3종을 보고하였으 며, Won et al. (2013)은 완도 전복 양식장에서 천공성 다모류 P. uncinata의 발생을 보고한 바 있다. 이러한 선행 연구들은 형 태 형질에 의하여 종 판별이 이루어졌으나 생활사에 따른 형태 변이 등으로 정확한 종 실체(species boundary)의 파악에 어려 움이 따르므로, 형태학적 형질보다는 유전자 정보에 기반한 새 로운 검증방법이 요구된다(Teramoto et al., 2013; Simon and Sato-Okoshi, 2015).

따라서 최근 Polydora속의 분포에 관한 연구에서는 유전자 정보를 이용하여 정확한 종 판별을 수행하고 있다(Sato-Okoshi and Abe, 2012; Teramoto et al., 2013; Williams et al., 2017; Ye et al., 2017; Lee et al., 2020a). 본 연구진은 선행 연구로 전복 패각에서 Polydora속 종을 특이적으로 검출할 수 있는 미토콘드리아 coxl 유전자 기반 분자마커를 개발하였다. 이를 이용하여 완도 전복 양식장에서 확보한 다모류 감염의심 전복 패각에서 P. haswelli와 P. hoplura를 최초로 확인하였다(Lee et al., 2020a). 그후, Lee et al. (2020b)도 유전자 서열을 이용하여 전복 패각에 존재하는 P. hoplura를 포함한 다모류의 종 동정을 보고한 바 있으나, 전복 패각에서 P. haswelli 감염은 확인하지 못하였다.

본 연구는 전복 이외의 패류 패각에서 발견되는 천공성 다모류에 대한 유전자 분석을 수행하였으며, 가리비, 굴, 지중해담치 및 새꼬막 등의 국내 양식산 패류에 감염된 Polydora종의 유전자 다양성을 발굴하였다. 이를 통하여, Polydora속 종에 대한 정확한 종 동정과 함께 숙주의 다양성을 조사하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

시판 중인 새꼬막(cockle Scapharca subcrenata; 부산 Sep 18, 2016), 가리비(scallop Argopecten irradians; 통영 Mar 15, 2016), 지중해담치(mussel Mytilus galloprovincialis; 여수 Sep 22, 2016) 및 굴(oyster Crassostrea gigas; 통영 Jan 22, 2016) 시료를 확보하여 패각 내 다모류 감염 흔적을 조사하였다(Fig. 1; 새꼬막 3개체, 지중해담치 3개체, 굴 2개체, 가리비 2개체). 분석법은 전복 패각 감염 다모류 분석에서 사용된 방법과 동일하게 하였으며(Lee et al., 2020a), 패각 안쪽 표면의 감염 흔적

(trace of infestation)을 핀셋으로 분해하고 시료를 채취하였다 (Lee et al., 2020a). 대부분의 시료는 숙주의 패각 조직과 함께 섞여 있었으며, 독립된 개체로 확인하기 어려웠다. 따라서 숙주의 패각 조직을 포함한 감염 부위를 함께 채취하여 유전자 분석을 실시하였다(Fig. 1E).

채취된 시료의 total genomic DNAs 추출은 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 진행하였다. 종 동 정에 필요한 유전자 마커는 국제 DNA barcoding의 표준마커 인 cox1 유전자 부위를 이용하였고(Hebert et al., 2003), cox1 증폭을 위한 프라이머 조합은 Polydora속에 대한 특이성이 검 증된 cox1-Polyd-F1/cox1-Polyd-R2 (Lee et al., 2020a) 조합을 채택하였다.

Polymerase chain reaction (PCR) 조건은 95°C에서 2분 1회 처리하고, 94°C 30초, 50°C 30초, 72°C 1분 과정을 40회 반복하 였으며, 최종 72°C에서 7분간 final extension 과정을 수행하였 다. PCR 조성은 amfiXpand (GenDEPOT, Barker, TX, USA) 를 이용하여 20 μL volume으로 Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)을 이용하여 cox1 부 위 증폭을 수행하였다. 염기서열은 상업 시컨싱서비스(Macrogen, Seoul, Korea)를 통하여 엮기서열의 chromatogram 을 확보하였다. Chromatogram은 Sequencher 5.4.6 프로그램 (Gene Codes; Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 분석하였고, 확보된 cox1 염기서열에 대한 유사도 분석은 GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; http://blast.ncbi.nlm. nih.gov/Blast.cgi)을 이용하였다. 분자계통분석은 MEGA 6 program으로 neighbor-joining method [Kimura 2-parameter option, bootstrap analysis (2000 replicates)]를 채용하여 분자 계통수를 확보하였다(Tamura et al., 2013).

### 결 과

숙주로 이용된 패류의 종류에 따라 다양한 형태의 패각 내 다모류 감염 양상이 나타났다(Fig. 1). 패각 내 천공성 다모류 감염의 흔적으로 추정되는 부위에 대하여 cox1 분자마커를 이용하여 유전자 분석을 실시한 결과 10개의 P. haswelli 유전자서열을 발굴하였다. 가리비(scallop 2개; GenBank accession numbers MZ532488, MZ532489), 굴(oyster 2개; MZ532496, MZ532497), 새꼬막(cockle 3개; MZ532490, MZ532491, MZ532492) 및 지중해담치(mussel 3개; MZ532493, MZ532494, MZ532495)에서 P. haswelli 감염을 확인하였다 (Primers 서열 제외 424 bp의 cox1 염기서열이 결정됨; Fig. 2). 선행 연구인 전복의 경우 P. haswelli와 P. hoplura 2종이 검출되었으나(Lee et al., 2020a), 본 연구에서 조사된 패류 시료에서는 모두 P. haswelli만 검출되었다.

발견된 한국산 *P. haswelli* 종내 변이는 0-3.7%를 보였으며, 기존 전복에서 발견된 *P. haswelli*와는 0-3.4%의 염기변이를

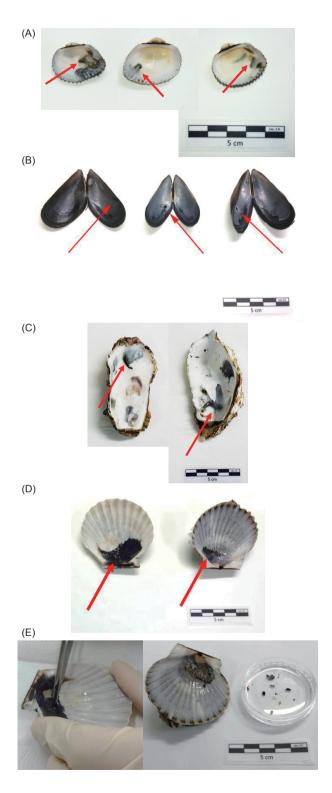


Fig. 1. Korean shellfish infected by *Polydora* species. Arrows indicated the infected regions by *Polydora* species A) cockles, B) mussel, C) oyster, D) scallop and E) *Polydora haswelli* was scraped out from the infected scallop shell and samples were mixed with scallop shell debris.

나타내었다. GenBank에 수록되어 있는 중국의 pearl oyster에서 발견된 *P. haswelli*는 국내 종과 0.24-3.7%를 염기변이를 보였다. 계통분석결과 *P. haswelli*는 크게 두 개의 group으로 나누어졌다[Fig. 2; group A (가리비, 굴, 새꼬막, 지중해담치, 전복, pearl oyster (진주조개, 중국), group B (가리비, 지중해담치)] Group A와 B간에는 3.2-3.7%로 뚜렷한 차이를 보였으며, group A내 한국산 개체들 간에는 0-0.24%의 염기변이(1개 차이)를 나타내었다. Group B의 개체 간에는 0.7%의 염기변이(3개 차이)를 나타내었다. 반면에 *P. hoplura*의 경우 종내 유연관계에서 남아프리카 공화국의 1개 시료(KY677865)를 제외하고는 한국과 남아프리카 공화국 시료 간에 0-1.4%의 염기변이를 보였다. 이러한 한국산 *Polydora*속 종에서 존재하는 높은 종내 변이에 대해서는 차후 후속 연구를 통하여 종 이하의 분류학적 검토의 필요성이 제시된다.

### 고 찰

Sato-Okoshi et al. (2012)은 한국산 시료의 분석에서 양식산과 자연산 전복(Haliotis discus discus) 모두에서 P. haswelli가 존재하는 것으로 보고하였으나, 국내 연구진인 Won et al. (2013)은 양식 전복에서 P. hoplura의 존재를 확인하였다. 이후 Lee et al. (2020a)은 Polydora 특이적 분자마커를 이용하여 동일 양식장의 다른 전복 개체에서 P. haswelli와 P. hoplura의 감염을 확인하였다(Fig. 2). 반면에 Lee et al. (2020b)은 유전자 분석을 통하여 전복 패각에서 P. hoplura의 검출만 성공한 바 있다.

Sato-Okoshi et al. (2012)이 한국의 양식산 및 자연산 전복에서 *P. hoplura* (as *P. uncinata*)의 존재를 확인하지 못한 것은 형태 동정에 기반한 연구의 한계 혹은 관찰 시료의 특성으로 판단된다. 본 연구에서는 굴에서 *P. haswelli*의 감염을 보고한 Sato-Okoshi et al. (2012)의 결과를 유전자 수준에서 재확인하였다(Fig. 2).

Sato-Okoshi et al. (2012)은 형태분류를 통하여 키조개(Atrina pectinata, 자연산), 굴(Crassostrea gigas, 양식산), 비단가리비(Chlamys farreri, 자연산), 전복(Haliotis discus discus, 양식산 및 자연산), 보말고둥(Omphalius rusticus, 자연산), 진주조개(Pinctada fucata, 양식산) 및 피뿔고둥(Rapana venosa, 자연산)에서 P. haswelli의 존재를 보고하였다. 본 연구에서는 P. haswelli의 새로운 숙주로 지중해담치(mussel)와 새꼬막(cockle)을 새로이 보고하였다. 지중해담치는 기존 형태분석 연구에서 Dipolydora giardi가 기생하는 것으로 보고된 바 있다(Sato-Okoshi et al., 2012). 따라서 차후의 연구에서는 지중해담치를 대상으로 전복과 같은 다모류 여러 종의 동시 감염 여부를 확인할 필요가 있다.

cox1 유전자 부위는 생물종 동정을 위한 DNA barcoding의 표준 분자마커로서 세계적으로 널리 이용되고 있다(Hebert et al., 2003). 따라서 국내외의 선행연구에서 Polydora속의 지역

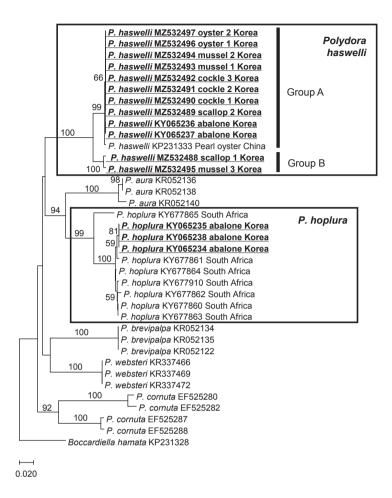


Fig. 2. Molecular phylogenetic relationship of the Korean *Polydora* species using *cox*1 region. *Boccardiella hamata* (GenBank accession no. KP231328) was adopted as an outgroup. The numbers on each branch represent bootstrap values (>50).

간 변이의 비교분석과 외래종 유입 모니터링에 필수적인 분자마커로 사용되고 있다(Williams et al., 2017; Rice et al., 2018; Lee et al., 2020a). 그러나 종 동정을 위한 높은 분류학적 해상력에도 불구하고, 기존의 cox1 증폭을 위한 범용 프라이머 (universal primers)는 PCR과정에서 많은 문제점을 보였다(유전자 부위 미증폭; Ye et al., 2017; Lee et al., 2020a). 그러나 본연구에서는 Polydora속 종 동정을 위한 특이적인 cox1 분자마커 적용으로 다양한 패류에서 감염이 발견된 Polydora의 종 판별에 매우 높은 효율성을 나타내었다.

유전자 정보에 따른 본 연구결과는 지금까지 보고된 형태적 종 동정에 근거한 자료와는 달리, 정확한 종 동정과 함께 새로운 숙주생물의 발견 등 다양한 Polydora 종 감염 패류 양상을 보여주고 있다. 또한 같은 패류 종 내에도 Polydora의 종내 유전자 다양성이 존재함도 밝히고 있다(Fig. 2; 가리비, 지중해담치 in group A/B). 특히 동일한 유전자형을 가지거나(가리비, 굴, 새꼬막, 지중해담치), 결정된 cox1 염기서열 424 bp 중에서 1개의 차이를 나타내었다. 전복 감염 P. haswelli와 다른 개체들

과는 4번째 염기서열에서 차이가 나타나서, 전복은 염기서열 C를 가지고 있었고 다른 개체들은 염기서열 T를 나타내었다. 특히 새꼬막 감염 P. haswelli 1개 시료(MZ532490)의 경우 cox1 4번째 염기서열에서 C/T가 모두 존재하는 Y peak을 나타내어서 두 가지 유전자형을 가지는 개체에 의한 동시 감염의 가능성을 보여주고 있다.

이렇게 동일한 형태나 유사한 유전자 변이를 가지는 *P. haswelli*가 다양한 숙주 생물에서 발견되는 것은 패류 종간의 교차 감염 가능성을 제시할 수 있다. 뿐만 아니라 한국산 패류와 중국 pearl oyster에서 발견된 유사한 *cox*1 유전자형의 존재는 지역간 및 국가간의 기생 다모류의 이동 가능성도 내포하고 있다(Fig. 2). 남아프리카 굴 양식장에서 발견된 굴 천공성 다모류의 존재는 양식산업을 통한 지역간 및 국가간 이동가능성을 제시한다(Williams et al., 2016).

그러므로, 이러한 다양한 감염 패턴을 분석하기 위해서는 유전자 정보에 기반한 DNA barcoding 기법의 도입이 필수적이다(Williams et al., 2017). 특히 굴, 가리비 및 홍합 등 여러 종

류의 패류를 함께 양식하는 복합양식(integrated multi-trophic aquaculture, IMTA)의 경우 이종 패류 간의 천공성 다모류의 교차감염 가능성이 심각한 문제점으로 대두될 수 있다. 최근의 연구에서 이러한 IMTA와 양식생물-기생 유해 생물종 사이의 이종간 교차감염과 그에 따른 피해를 예상한 바 있다(Bouwmeester et al., 2021).

한국 양식산업에서 품종별 패류 생산은 전복류(2만톤, 6,103억원), 굴류(30만톤, 2,634억원), 홍합류(6.1만톤, 275억원), 바지락(1.8만톤, 500억원), 꼬막류(6.7천톤, 213억원)에 이르고 있다(Statistics Korea, 2021). 이런 양식 산업에서 다모류의 감염은 양식 패류의 생육과 생산 품질 저하를 가져와 양식산업에 큰 영향을 끼칠 수 있다. 그러므로 패류 감염 다모류에 대한 체계적인 모니터링 기법 마련이 절실히 요구되는데, 본 연구에서 적용된 분자마커는 천공성 다모류 Polydora종의 완전한 개체뿐만 아니라 패각 시료가 혼입된 상태에서도 패각의 유전자 정보와는 구별되는 Polydora만의 유전자 정보를 발굴할 수 있음을 보여주었다. 차후 다양한 패류의 다모류 감염 의심 시료에 대한 폭넓은 적용이 가능할 것으로 보이며, 감염 초기 상태에서도 정확하게 천공성 Polydora의 감염 여부를 판단할 수 있을 것으로 예상한다. 따라서 패류 양식장내 천공성 다모류 감염에 대한 효과적인 모니터링 기법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 사 사

이 논문은 국립수산물품질관리원의 "수산생물방역체계 구축"사업 (R2021071)의 지원으로 수행된 연구입니다.

#### References

- Bouwmeester MM, Goedknegt MA, Poulin R and Thielt-ges DW. 2021. Collateral diseases: aquaculture impacts on wildlife infections. J Appl Ecol 58, 453-464. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13775.
- Hebert PD, Cywinska A and Ball SL. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Royal Soc B 270, 313-321. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218.
- Lee JW. 1998. Systematic study of polychaetes (Annelida) from offshore waters of Geojedo Island, Korea. Korean J Syst Zool 14, 243-255.
- Lee SJ, Kwon MG and Lee SR. 2020a. Molecular detection for two abalone shell-boring species *Polydora haswelli* and *P. hoplura* (Polychaeta, Spionidae) from Korea using 18S rDNA and *cox*1 markers. Ocean Sci J 55, 459-464. https://doi.org/10.1007/s12601-020-0028-4.
- Lee DC, Kim KY, Han J, Kim D and Kim BH. 2020b. Genetic classification of polychaetes isolated from cultured abalone *Haliotis discus hannai* shells. Korean J Malacol 36, 157-165. https://doi.org/10.9710/kjm.2020.36.4.157.
- National Institute of Biological Resources. 2015. National list of

- species of Korea. Invertebrate-VII. Ministry of Environment and National Institute of Biology Resources, Seoul, Korea. 107
- National Institute of Biological Resources. 2021. Korea biodiversity. Retrieved from https://species.nibr.go.kr/index.do on Jul 12, 2021.
- Radashevsky VI and Migotto AE. 2017. First report of the polychaete *Polydora hoplura* (Annelida: Spionidae) from North and South America and Asian Pacific. Mar Biodivers 47, 859-868. https://doi.org/10.1007/s12526-016-0515-0.
- Rice LN, Lindsay S and Rawson P. 2018. Genetic homogeneity among geographically distant populations of the blister worm *Polydora websteri*. Aquac Environ Interact 10, 437-446. https://doi.org/10.3354/aei00281.
- Sato-Okoshi W and Abe H. 2012. Morphological and molecular sequence analysis of the harmful shell boring species of Polydora (Polychaeta: Spionidae) from Japan and Australia. Aquaculture 368-369, 40-47. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.046.
- Sato-Okoshi W, Okoshi K, Koh BS, Kim YH and Hong JS. 2012. *Polydora* species (Polychaeta: Spionidae) associated with commercially important mollusk shells in Korean waters. Aquaculture 350-353, 82-90. https://doi.org/10.1016/j. aquaculture.2012.04.013.
- Simon CA and Sato-Okoshi W. 2015. Polydorid polychaetes on farmed molluscs: distribution, spread and factors contributing to their success. Aquac Environ Interact 7, 147-166. https://doi.org/10.3354/aei00138.
- Statistics Korea. 2021. The result of 2020 fishery production trend survey (provisional). Statistics Korea Press Release, Daejeon, Korea.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30, 2725-2729. https://doi.org/10.1093/ molbev/mst197.
- Teramoto W, Sato-Okoshi W, Abe H, Nishitani G and Endo Y. 2013. Morphology, 18S rRNA gene sequence and life history of a new *Polydora* species (Polychaeta: Spionidae) from northeastern Japan. Aquat Biol 18, 31-45. https://doi.org/10.3354/ab00485.
- Williams L, Matthee CA and Simon CA. 2016. Dispersal and genetic structure of *Boccardia polybranchia* and *Polydora hoplura* (Annelida: Spionidae) in South Africa and their implications for aquaculture. Aquaculture 465, 235-244. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.001.
- Williams LG, Karl SA, Rice S and Simon C. 2017. Molecular identification of polydorid polychaetes (Annelida: Spionidae): is there a quick way to identify pest and alien species?. Afr Zool 52, 105-117. https://doi.org/10.1080/15627020.20 17.1313131.
- Won KM, Kim BH, Jin YG, Park YJ, Son MH, Cho MY, Park MA and Park MW. 2013. Infestation of the abalone *aliotis*

*discus hannai*, by the *Polydora* under intensive culture conditions in Korea. J Fish Pathol 26, 139-148. https://doi.org/10.7847/jfp.2013.26.3.139.

Ye L, Cao C, Tang B, Yao T, Wang R and Wang J. 2017. Morphological and molecular characterization of *Polydora websteri* (Annelida: Spionidae), with remarks on relationship of adult worms and larvae using mitochondrial COI gene as a molecular marker. Pakistan J Zool 49, 699-699. https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.2.699.710.