



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

사육수온에 따른 붉바리(*Epinephelus
akaara*)와 넙치(*Paralichthys
olivaceus*)의 반응인자 비교

임 강 희

제주대학교 대학원

해양생명과학과

2024년 2월



사육수온에 따른 붉바리(*Epinephelus
akaara*)와 넙치(*Paralichthys
olivaceus*)의 반응인자 비교

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

임 강 희

제주대학교 대학원

해양생명과학과

지도교수 이 영 돈, 여 인 규

임강희의 이학석사 학위논문을 인준함

2023년 11월

심사위원장 허 성 표 (인)

위 원 이 영 돈 (인)

위 원 여 인 규 (인)

목 차

목차	i
List of figure	iii
List of table	iv
ABSTRACT	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 불바리 HSP90과 MC2R 유전자 클로닝 및 조직별 발현.....	3
1) 실험어	
2) Total RNA 추출 및 cDNA 합성	
3) HSP90과 MC2R cloning	
4) 염기서열 계통 분석	
5) Real-time quantitative RT-PCR	
6) 통계처리	
2. 계절별 수온에 따른 불바리와 넙치의 생리반응인자들의 발현 변화	15
1) 실험어	
2) 조직학적 분석	
3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성	
4) Real-time quantitative RT-PCR	
5) 통계처리	

3. 사육수온 상승 조절에 따른 붉바리와 넙치의 생리반응인자들의 발현 변화	20
1) 실험어	
2) 조직학적 분석	
3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성	
4) Real-time quantitative RT-PCR	
5) 통계처리	
III. 결과	22
1. 붉바리 HSP90과 MC2R 유전자의 클로닝 및 조직별 발현	22
1) 붉바리에서의 HSP90, MC2R cDNA 분리 및 상동성 비교	
2) <i>HSP90</i> 과 <i>MC2R</i> mRNA의 조직별 발현	
2. 계절별 수온에 따른 붉바리와 넙치의 사육수온 반응인자들 발현 변화	35
1) 사육환경 및 성장	
2) 붉바리의 계절별 수온에 따른 사육수온 반응인자들의 발현 변화	
3) 넙치의 계절별 수온에 따른 사육수온 반응인자들의 발현 변화	
4) 붉바리와 넙치의 계절별 수온에 따른 간중량지수 및 간세포 변화	
3. 사육수온 상승조절에 따른 붉바리와 넙치의 사육수온 반응인자들의 발현 변화	48
1) 사육수온 상승조절에 따른 붉바리의 사육수온 반응인자들의 발현 변화	
2) 사육수온 상승조절에 따른 넙치의 사육수온 반응인자들의 발현 변화	
3) 사육수온 상승조절에 따른 붉바리와 넙치의 간중량지수 및 간세포 변화	
IV. 고찰	57
V. 참고문헌	68

List of figures

- Fig. 1. The HSP90 partial nucleotide and deduced amino acid sequence obtained from *E. akaara*.
- Fig. 2. The MC2R partial nucleotide and deduced amino acid sequence obtained from *E. akaara*.
- Fig. 3. Phylogenetic tree of HSP90 between *E. akaara* and other fishes.
- Fig. 4. Phylogenetic tree of MC2R between *E. akaara* and other fishes.
- Fig. 5. Electrophoresis of all tissue *HSP90* and *MC2R* mRNA expression Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) products.
- Fig. 6. Tissue specific expression of *HSP90* mRNA in the *E. akaara* by Real-time qPCR.
- Fig. 7. Tissue specific expression of *MC2R* mRNA in the *E. akaara* by Real-time qPCR.
- Fig. 8. Annual change of (A) body weight and (B) total length in *E. akaara*.
- Fig. 9. Annual change of (A) body weight and (B) total length in *P. olivaceus*.
- Fig. 10. Differentially expressed genes in *E. akaara* on natural water temperature seasonal changes under year-round conditions.
- Fig. 11. Differentially expressed genes in *P. olivaceus* on natural water temperature seasonal changes under year-round conditions.

Fig. 12. Photomicrographs of liver tissues in *E. akaara* by HE stain.

Fig. 13. Photomicrographs of liver tissues in *P. olivaceus* by HE stain.

Fig. 14. Differentially expressed genes in *E. akaara* on water temperature increasing control conditions.

Fig. 15. Differentially expressed genes in *P. olivaceus* on water temperature increasing control conditions.

Fig. 16. Photomicrographs of liver tissues in *E. akaara* by HE stain.

Fig. 17. Photomicrographs of liver tissues in *P. olivaceus* by HE stain.

List of tables

- Table 1. Degenerated primer sets used in heat shock protein genes cDNA partial sequencing in *E. akaara*
- Table 2. Gene information of HSP90 used for multiple alignment
- Table 3. Gene information of HSP90 used for multiple alignment
- Table 4. Gene information of *MC2R* used for multiple alignment
- Table 5. Gene information of MC2R used for multiple alignment
- Table 6. Primer sets used in real-time qPCR in *E. akaara*
- Table 7. Primer sets used in real-time qPCR in *E. akaara*
- Table 8. Primer sets used in real-time qPCR in *P. olivaceus*
- Table 9. Overall amino acid identities of HSP90 between *E. akaara* and other fish
- Table 10. Overall amino acid identities of HSP90 between *E. akaara* and other fish
- Table 11. Overall amino acid identities of MC2R between *E. akaara* and other fish
- Table 12. Overall amino acid identities of MC2R between *E. akaara* and other fish
- Table 13. Environmental conditions during rearing experiment
- Table 14. Changes in the monthly Hepatosomatic index(HSI) in *E. akaara* and *P. olivaceus*

Table 15. Alternation in the seasonal hepatocyte diameter (μm) in *E. akaara* and *P. olivaceus*

Table 16. Changes of Hepatosomatic index(HSI) in *E. akaara* and *P. olivaceus* under artificially elevating the water temperature condition

Table 17. Alternation of hepatocyte diameter (μm) under artificially elevating the water temperature condition in *E. akaara* and *P. olivaceus*

사육수온에 따른 붉바리(*Epinephelus akaara*)와 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 반응인자 비교

임 강 희

제주대학교 대학원 해양생명과학과

요약

이 연구는 아열대성 양식어종인 붉바리와 온대성 양식어종인 넙치를 대상으로 사육수온에 따른 반응인자의 발현을 비교 조사하였다. 계절별 사육수온 반응인자의 발현 비교를 위해 실험어는 양식산 붉바리 (n=443, 평균 전장 7.9 ± 0.1 cm, 평균 체중 9.0 ± 0.1 g)와 양식산 넙치 (n=80, 평균 전장 20.1 ± 0.1 cm, 평균 체중 75.3 ± 1.2 g)를 이용하여 제주대학교 해양과학연구소에서 2022년 2월부터 2022년 12월까지 사육하였다. 실험어의 사육방법은 자연수온과 자연광주기 조건으로 해양과학연구소 주변 연안수를 이용한 유수식 사육시스템(FRP 사각수조 : $150 \times 150 \times 150$ cm, 1일 환수율 22~24회전)에서 사육하였다. 또한, 수온 상승 조절에 따른 사육수온 반응 인자의 발현 비교를 위해 양식산 붉바리 (n=40, 평균 전장 22.6 ± 0.03 cm, 평균 체중 196.5 ± 0.11 g)와 양식산 넙치 (n=40, 평균 전장 14.5 ± 0.04 cm, 평균 체중 26.0 ± 0.11 g)를 18°C에서 10일간 순치시킨 이후 일일 1°C씩 사육수온을 상승시키며 30°C까지 원형 수조 ($37 \times 37 \times 81$ cm)에서 순환여과 사육시스템(1일 환수율 2회전)에서 자연광주기 조건으로 사육하였다. 실험어는 실험기간동안 상업용 배합사료를 하루에 두 번(09:00 & 17:00) 공급하면서 사육하였다.

사육수온에 따른 반응인자로서 열충격단백질(heat shock proteins, HSP70, HSP90)과 뇌하수체-시상하부-신간 (hypothalamus-pituitary-interrenal, HPI) 축 기전에 관련된 부신피질자극호르몬방출호르몬 (corticotropin releasing

hormone, CRH)과 멜라노코르틴 2 수용체 (melanocortin receptor 2, MC2R), 그리고 항산화 효소(SOD, CAT) 유전자들의 mRNA 발현을 분석하였다. 적정 수온 범위가 다른 붉바리와 넙치를 대상으로 사계절의 수온 변화에 따른 수온 스트레스 관련 반응인자 발현 양상을 탐색한 결과, 붉바리는 사계절 중 특히 저수온 시기인 2월($12.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$)에 수온 스트레스 반응인자의 발현이 높았고, 넙치는 사계절 중 특히 고수온 시기인 8월($27.8 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$)에 수온 스트레스 관련 반응인자가 높게 발현하였다.

이 연구는 붉바리와 넙치의 사육수온에 대한 반응을 비교함으로써 아열대성 어종인 붉바리와 온대성 어종인 넙치의 적정 사육시스템을 구축하는데 기초자료를 제공할 것으로 판단된다.

I. 서론

어류사육과정에서 사육수온 변화에 따른 어류의 생리적 반응은 냉수성 어종인 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)의 경우 겨울철에 비해 여름철에 해수온이 상승하면서, 아열대성 어종인 나일틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)의 경우 여름철에 비해 겨울철 수온이 감소하면서 스트레스를 받아 변성된 단백질의 복구 및 분해 등의 세포 항상성 유지를 위해 열 충격 단백질 (heat shock proteins, HSPs)의 합성이 유도되어 서식지 어종에 따라 생리 반응 양상의 다양성을 보여주고 있다(Ananthan et al., 1986; Farjam, 2011; LeBlanc et al., 2012; Cascarano et al., 2021).

HSPs는 분자량(kilodaltons, kDa)을 기준으로 Hsp90 (85-90 kDa), Hsp70 (68-73 kDa), Hsp60, Hsp47 및 small Hsps (12-43 kDa)와 같이 분류된다(Nover & Scharf, 1997; Hallare et al., 2004; Park et al., 2007). 열충격은 어류의 세포에서 *HSP90* mRNA 발현의 강한 유도체이다(Čvoro et al., 1998). HSP90은 세포질 단백질의 1-2%를 구성하여 스트레스를 받지 않는 세포에서도 잘 보존되며 풍부하게 존재하고, 특히 글루코코르티코 스테로이드 수용체 (glucocorticosteroid receptor, GR)를 포함한 스테로이드 수용체와 상호작용하여 수용체 안정성을 증가시켜준다(Pratt, 1997; Segnitz & Gehring, 1997). HSPs 계열 중 HSP70은 세포의 정상적인 기능에 있어서도 중요하나(Hartman & Gething, 1996), 세포가 스트레스 요인에 노출되면 HSP70 수치가 급격히 증가하여 변성된 단백질의 재형성, 단백질 응집 방지, 손상된 단백질의 분해 표적화, 단백질 합성 촉진 및 단백질의 전위 촉진을 포함한 세포 단백질 메커니즘을 보호한다(Feder & Hofmann, 1999; Fink, 1999; Kregel, 2002; Wang et al., 2007).

어류의 시상하부-뇌하수체-간신 (hypothalamus-pituitary-interrenal axis, HPI) 축 활성의 주요 단계는 HS에 대한 반응으로 시상하부의 뇌실 주위 핵 (paraventricular nucleus, PVN)에서 부신피질자극호르몬방출호르몬 (corticotropin releasing hormone, CRH)의 방출로 시작된다(Vijayan et al., 1996; Wendelaar & Sjoerd., 1997; Charmandari et al., 2005; Gorissen &

Flik, 2016). 방출된 CRH는 뇌하수체 전엽의 피질 자극 세포 수용체에 결합하여 부신피질자극호르몬 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)의 합성을 유도하고(Mommsen et al., 1999; Eachus et al., 2022), 혈관계를 통해 방출된 ACTH는 두부 신장 조직에 간신샘에 존재하는 멜라노코르틴 2 수용체 (melanocortin receptor 2, MC2R)에 결합하여 스테로이드 생합성을 자극하게 된다(Noon et al., 2002; Bernier, 2006; Alsop & Vijayan., 2009; Alderman et al., 2012; Herget et al., 2014; Eachus et al., 2022).

국내 양식산업은 1980년대 이후 양식기술의 발전 및 규모화와 기계화가 도입되면서 급격하게 성장하였다. 국내 양식어류의 생산량은 2022년 기준 약 91,000톤이며 그 중 넙치가 약 46,000톤으로 전체 양식어류 생산량의 50.5%를 차지하고 있는 중요한 양식품종이다(통계청 2022). 붐바리를 포함한 바리과 어류는 아시아-서태평양 지역에서 가장 선호되는 고가의 어종으로써 국내에서도 고부가가치 양식대상 어종으로 친어관리 및 수정란 생산, 종자생산을 시도하고 있다(Kim et al., 2005; Harikrishnan et al., 2011; Rahman et al., 2019; Boo et al., 2020; Choi et al., 2020; Lee et al., 2020; Kim et al., 2023). 양식어류는 외부환경 요인 특히 수온에 직접적인 영향을 받는다(Mugwanya et al., 2022). 넙치의 적정 사육수온은 18~24°C이며(NFRDI, 2006), 붐바리를 포함한 바리과 어류의 적정 사육수온은 24~28°C 이다(Das et al., 2021). 따라서 넙치는 여름철 고수온 시기에, 바리과 어류는 겨울철 저수온 시기에 성장 둔화, 질병 발생, 생존율 감소 등 생리학의 여러 측면에 영향을 미치면서 넙치와 바리과 어류를 양식하는데 애로 사항이 발생하고 있으나 이와 관련된 생리적 반응에 관한 연구들은 미미한 실정이다(Makrinos & Bowden, 2016; Maulvault et al., 2017; Chang et al., 2018; Wong et al., 2018; Islam et al., 2021).

이 연구는 적정 사육 수온 범위가 다른 양식어종인 붐바리와 넙치를 대상으로 HSPs의 발현 특성과 HPI 축의 활성 변화, 항산화 효소 반응 등 사육수온에 따른 반응 비교를 위해 계절별 자연수온 조건과 수온 상승 조건에 따른 열 충격 단백질 (HSP70과 HSP90), 부신피질자극호르몬분비호르몬 (CRH), 멜라노코르틴 2 수용체 (MC2R), 항산화 효소인 SOD(superoxide dismutase)와 CAT(catalase)의 mRNA 발현 변화를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 붉바리 HSP90과 MC2R 유전자 클로닝 및 조직별 발현

1) 실험어

실험어는 제주대학교 해양과학연구소에서 사육 중인 붉바리(n=3, 평균 전장 28.3 ± 0.1 cm, 평균 체중 404.0 ± 0.1 g)를 대상으로 수행하였다. Heat shock protein (HSP)와 Melanocortin 2 receptor (MC2R)의 유전자 cloning 및 조직별 발현을 탐색하기 위하여 실험어는 0.01%의 2-phenoxyethanol (JUNSEI, Japan)을 이용하여 마취시킨 후 샘플링 하였다. 유전자 클로닝을 위해 간과 신장을 적출하였으며, HSP와 MC2R mRNA의 조직별 발현을 위하여 중추신경조직(후엽, 종뇌, 시엽, 간뇌, 소뇌, 연수, 망막)과 주변조직(뇌하수체, 아가미, 심장, 신장, 간, 비장, 위, 장, 생식소, 근육, 피부, 지느러미)을 적출하였다. 적출된 조직들은 액체질소에 냉동하여, 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 두 유전자들의 조직별 발현은 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)과 Real-time quantitative RT-PCR을 이용하여 분석하였다.

2) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

Total RNA는 샘플링을 통하여 적출된 조직들에서 추출되었다. 적출된 조직들은 RiboEx™ (GeneAll, Korea) 600 μl 를 첨가하여 homogenizer로 완전히 균질화시켰다. 균질화된 tube에 RiboEx™ 1.0 μl 당 0.2 μl 의 chloroform을 첨가 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 이후, 원심분리기를 이용하여 4°C , 12,000 rpm의 조건으로 15분간 원심분리시켜 RNA가 포함된 상층액만을 새로운 microtube로 옮겼다. 상층액과 동일량의 iso-prpanol을 microtube에 첨가 후 상온에서 5분간 반응시켰으며, 원심분리기를 이용하여 4°C , 12,000 rpm의 조건으로 10분간 원심분리하여 total RNA pellet을 침전시켰다. 침전된 total RNA pellet을 제외한 상층액을 제거한 후 Diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 첨가된

H₂O로 희석시킨 75% EtOH를 이용해 total RNA pellet을 수세하였다. 수세 후 DEPC-DW (BIONEER, Korea)를 이용하여 RNA pellet을 용해시켜 total RNA를 획득하였다. 획득한 total RNA는 Nano Vue(GE Healthcare, Ver.1.0.1, UK)를 이용하여 농도를 측정하였으며, A260/A280nm의 ratio가 1.7~2.1 범위 내의 값을 갖는 RNA만을 선택해 실험에 사용하였다.

RNA를 추출한 후 genomic DNA에 의한 contamination을 방지하기 위하여 DNase 처리를 진행하였다. Total RNA 1.7~2.1 µg을 주형으로 RQ1 RNase-Free DNase Kit (Promega Madison, WI, USA)를 이용하였다. Total RNA와 RNase free water 8.0 µl, RQ RNase-Free DNase 10 x Reaction buffer 와 RQ RNase-Free DNase 각 1.0 µl씩을 분주하여 총 volume 10 µl가 되도록 첨가하였으며, 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 1.0 µl Stop Solution을 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시켰다.

cDNA 합성은 DNase 처리된 total RNA 2.0 µg를 주형으로 PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis Kit (Takara, Japan)를 사용하여 합성하였다. DNase 처리된 RNA와 RNase-free water 8.0 µl, Random 6 mers 1.0 µl, dNTP mixture 1.0 µl를 첨가한 후 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후 5 x PrimeScript Buffer 4.0 µl, RNase inhibitor 0.5 µl, PrimeScript RTase 1.0 µl, RNase free dH₂O 4.5 µl를 첨가하여 30°C에서 10분, 42°C에서 60분, 95°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성이 끝난 후 각각의 cDNA를 총 volume 90 µg/µl이 되도록 Nuclease-free water 70 µl 를 첨가하여 희석시켰다.

3) HSP90과 MC2R cloning

불바리의 HSP90과 MC2R 유전자 cloning을 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 보고된 다른 어종들의 HSP 관련 유전자들의 정보를 이용하여 degenerated primer를 제작하였다 (Table 1). *HSP90*과 MC2R 유전자는 불바리 전조직 cDNA와 degenerated primer의 RT-PCR을 통하여 증폭되었다. PCR은 95°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 90초의 조건

으로 총 35 cycle을 수행하였으며, 이를 통해 증폭된 PCR 산물들은 1.5% agarose gel의 전기영동을 통하여 유전자 band를 확인하였다. 확인된 유전자 band를 cutting 후, Dyne Power Gel Extraction Kit (Dyne Bio, Korea)를 사용하여 Elution하여 PCR산물을 추출하였다. 추출된 PCR 산물은 Genotech (Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였으며, 확인된 염기서열은 NCBI의 BLASTX를 이용하여 아미노산 서열을 확인하였다.

Table 1. Degenerated primer sets used in heat shock protein genes cDNA partial sequencing in *E. akaara*

Gene	Primer	Sequence(5'-3')
<i>HSP90</i>	Forward	TCAGAGTCGACAACGGTGAG
	Reverse	TGCGGGTCAAGTACTCTGTG
<i>MC2R</i>	Forward	ACCACAGCCAATCAGTCAGA
	Reverse	GCTCATCAGCAGTACCACGT

4) 염기서열 계통 분석

유전자 cloning을 통해 확인된 붉바리 HSP90과 MC2R의 부분염기서열들은 NCBI에 등록된 다른 어종들의 HSP90과 MC2R 유전자 정보들을 이용하여 어종 간 상동성을 비교 분석하였다 (Table 2-5). 상동성 분석은 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)를 이용하여 분석하였다.

붉바리 HSP90 및 MC2R 유전자의 계통수는 다른 어종들의 유전자 정보 (Table 2-5)와 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version X(MEGA X) (Tamura, Stecher, and Kumar 2021)를 이용하여 분석하였다.

Table 2. Gene information of HSP90 used for multiple alignment

Gene	Species	GenBank Accession No.
	<i>Epinephelus akaara</i>	OR378291
	<i>Epinephelus moara</i>	XP_049914343.1
	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	XP_049446734.1
	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	XP_033504245.1
	<i>Epinephelus coioides</i>	ACV04938.1
	<i>Scatophagus argus</i>	XP_046229077.1
HSP90	<i>Anabas testudineus</i>	XP_026197018.1
	<i>Channa striata</i>	AIL82444.1
	<i>Scortum barcoo</i>	UVH33430.1
	<i>Xiphias gladius</i>	XP_039980884.1
	<i>Lates japonicus</i>	GLD49552.1
	<i>Plectropomus leopardus</i>	XP_042358810.1
	<i>Perca flavescens</i>	XP_028461567.1

Table 3. Gene information of HSP90 used for multiple alignment

Gene	Species	GenBank Accession No.
	<i>Amphiprion ocellaris</i>	BAK20463.1
	<i>Poeciliopsis prolifica</i>	XP_054910301.1
	<i>Lepomis macrochirus</i>	BAF57908.1
	<i>Danio rerio</i>	AAI54424.1
	<i>Maylandia zebra</i>	XP_004550507.2
	<i>Micropterus salmoides</i>	XP_038583717.1
HSP90	<i>Thunnus maccoyii</i>	XP_042247202.1
	<i>Paralichthys dentatus</i>	AVN89841.1
	<i>Xenopus laevis</i>	AAI30149.1
	<i>Homo sapiens</i>	7ULJ_A
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	AVN89842.1
	<i>Bos taurus</i>	AAI02945.1
	<i>Gallus gallus</i>	CAG31600.1

Table 4. Gene information of MC2R used for multiple alignment

Gene	Species	GenBank Accession No.
	<i>Epinephelus akaara</i>	OR947936
	<i>Epinephelus moara</i>	XP_049903691.1
	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	XP_033497562.1
	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	XP_049440325.1
	<i>Sebastes umbrosus</i>	XP_037639604.1
	<i>Cottoperca gobio</i>	XP_029307757.1
MC2R	<i>Anoplopoma fimbria</i>	XP_054477921.1
	<i>Siniperca chuatsi</i>	XP_044063882.1
	<i>Sander lucioperca</i>	XP_031134296.1
	<i>Etheostoma cragini</i>	XP_034729763.1
	<i>Etheostoma spectabile</i>	XP_032367339.1
	<i>Perca flavescens</i>	XP_028437136.1
	<i>Plectropomus leopardus</i>	XP_042346340.1

Table 5. Gene information of MC2R used for multiple alignment

Gene	Species	GenBank Accession No.
MC2R	<i>Cyclopterus lumpus</i>	XP_034384384.1
	<i>Micropterus dolomieu</i>	XP_045901937.1
	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	ALF99995.1
	<i>Seriola dumerili</i>	XP_022609213.1
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	CCA95110.1
	<i>Thunnus maccoyii</i>	XP_042280406.1
	<i>Chelmon rostratus</i>	XP_041798842.1
	<i>Larimichthys crocea</i>	XP_010746136.1
	<i>Centropristis striata</i>	XP_059194986.1
	<i>Xiphias gladius</i>	XP_039973873.1
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	XP_034467136.1
<i>Paralichthys olivaceus</i>	BAK61810.1	

5) Real-time quantitative RT-PCR

불바리에서 분리된 *HSP90*과 *MC2R* mRNA의 조직별 발현 분석을 위하여 primer는 각각의 염기서열을 바탕으로 specific primer를 제작하였다 (Table 6). Real-time quantitative RT-PCR을 위하여 TB Green® Premix Ex Taq™ II kit (Tli RNaseH Plus) (Takara, Japan)와 CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, USA)을 이용하였다. 반응 조건은 95°C에서 30초간 initial denaturation 시킨 후 95°C에서 0.05초, 60°C에서 30초간 annealing elongation 하였으며 총 40 cycle을 수행하였다. 그 후 95°C에서 10초, 65°C에서 0.05초, 95°C에서 0.5초간 반응시켜 주었다. 각 샘플은 3 반복으로 수행되었으며, *HSP90*과 *MC2R* mRNA 발현은 β -actin을 internal control로 사용하여 상대정량 하였다.

Table 6. Primer sets used in real-time qPCR in *E. akaara*

Gene	Primer	Sequence(5'-3')
<i>β-actin</i>	Foward	GAGCGTGGCTACTCCTTCAC
	Reverse	ACAGGTCCTTACGGATGTCG
<i>HSP90</i>	Foward	CCTGAAGGAGGACCAGACAG
	Reverse	ATGGGGTAGCCAATGAACTG
<i>MC2R</i>	Foward	CTGGTTGTGGTGGCTGTTT
	Reverse	CACGCTGGCAAACACAAT

6) 통계처리

통계분석에는 SPSS version 21을 이용하였으며, One-Way analysis of variance (ANOVA)의 Tukey's HSD (honestly significant difference) test를 통해 측정된 평균값끼리의 유의성을 검정하였다. 평균값은 \pm 표준편차를 이용하여 나타내었으며, 유의차는 $P < 0.05$ 일 때 통계적인 유의성을 인정하였다.

2. 계절별 수온에 따른 붉바리와 넙치의 사육수온 반응인자들의 발현 변화

1) 실험어

실험어는 제주대학교 해양과학연구소에서 사육 중인 붉바리와 넙치를 이용하였다. 양식산 붉바리 (n=443, 평균전장 7.9 ± 0.1 cm, 평균체중 9.0 ± 0.1 g)는 1개의 FRP수조 (150×150×150 cm)에 수용하였으며, 양식산 넙치 (n=80, 평균 전장 20.1 ± 0.1 cm, 평균 체중 75.3 ± 1.2 g)는 동일한 크기의 FRP수조 2개에 각각 40마리씩 무작위로 수용하였다. 모든 실험어는 유수식 사육시스템(1일 환수율 22~24회전)에서 자연광주기 및 자연수온조건으로 2022년 2월부터 2022년 12월까지 총 10개월간 사육하였고 실험기간 동안 상업용 배합사료 (Daebong LF Fishery Association Corp., Jeju, South Korea)를 하루에 두 번 공급하였다 (09:00 & 17:00). 샘플링은 2월, 5월, 8월 그리고 11월 중순마다 오전 9시에 전날 절식시킨 붉바리와 넙치 각각 6마리씩 무작위로 선택하여 수행하였다. 사육수온 반응 유전자들의 발현변화를 분석하기 위해 뇌, 두신, 간을 적출하여 분석하기 전까지 -80°C 에 보관하였다. 간중량지수(Hepatosomatic index, HSI)의 월별 변화를 조사하기 위해 적출된 간 조직의 무게를 측정 후, (간중량/체중)×100 공식을 이용하여 HSI를 계산하였다. 조직학적 분석을 위해, 적출 한 간은 즉시 Bouin's solution에 고정하였다.

2) 조직학적 분석

Bouin's solution에 24시간 고정된 간 조직은 수세 후 70% EtOH에서 보관되었다. 이후 간 조직은 조직학적 처리를 위하여 Tissue-Tek[®] VIP™ 5 processor (Sakura, Japan)를 이용하여 다음의 과정을 수행하였다. 탈수를 위하여 70%, 80%, 90%, 95%(I), 95%(II), 100%(I), 100%(II), 100%(III) ethanol을 단계별로 1시간씩 처리하였으며, 이후 EtOH을 xylene으로 치환시키기 위하여 1시간씩 총 3번의 xylene 처리를 수행하였다. 마지막으로 파라핀 치환을 위하여 1시간씩 총 4단계의 파라핀 처리를 수행하였다. 파라핀으로 치환된 간 조직들은 파라핀 포매

를 위하여 Histomix (Tissue-Tek® TEC™ 5 station for paraffin embedding; Sakura, Japan)을 이용하여 간 조직의 파라핀 블록을 제작하였다.

파라핀으로 포매된 조직 블록들은 마이크로톰 (Leica RM2235, Germany)을 사용하여 5µm 두께로 박절하여 조직절편을 만들었으며, 각각의 절편들은 슬라이드 위에서 신전되었다. 이후 간 조직의 조직학적 특성을 분석하기 위하여 슬라이드를 Gill's Hematoxylin과 0.5% eosin(H & E)으로 대비 염색을 수행하였다.

염색을 하기 이전에 조직을 둘러싼 파라핀을 제거하기 위하여 xylene I, xylene II, xylene III 단계를 각 30분씩 탈파라핀 과정을 수행하였다. 함수를 위하여 100%, 95%, 90%, 80%, 70% EtOH 단계를 각 15분씩 처리 후, 흐르는 물에 수세하였다. 조직을 영구적으로 보관하기 위함과 염색상태를 유지해 주기 위한 목적으로 70%, 80%, 90%, 95%, 100%(I), 100%(II) EtOH 단계를 각 10초씩 탈수 과정을 수행하였다. 조직 내 EtOH을 Xylene으로 치환시키기 위하여 Xylene(I), Xylene(II) 단계를 각각 30분 이상씩 투명화 과정을 수행하였다.

염색된 슬라이드는 봉입 후 건조시켰으며, 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)과 cellSens Standard software(Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 간 세포의 형태와 크기 변화를 검경 하였다.

3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

실험 1 에서의 방법과 동일

4) Real-time quantitative RT-PCR

뿔바리에서 분리된 HSP90과 MC2R primer는 각각의 염기서열을 바탕으로 specific primer를 제작하였으며, HSP70 primer는 NCBI에 등록되어있는 정보를 이용하여 제작하였다. CRH, CAT, SOD는 Kim et al., 2023의 연구에서 보고된 primer 정보를 이용하여 제작하였다 (Table 7). 넙치의 CRH, CAT, SOD, HSP70, HSP90, MC2R는 NCBI에 등록되어있는 primer 정보를 이용하여 제작하였다 (Table 8). Real-time quantitative RT-PCR을 위하여 TB Green®

Premix Ex Taq™ II kit (Tli RNaseH Plus) (Takara)와 CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, USA)을 이용하였다. 반응조건은 95°C에서 30초간 initial denaturation 시킨 후 95°C에서 0.05초, 60°C에서 30초간 annealing elongation 하였으며 총 40 cycle을 수행하였다. 그 후 95°C에서 10초, 65°C에서 0.05초, 95°C에서 0.5초간 반응시켜 주었다. 각 샘플은 3 반복으로 수행되었으며, 모든 유전자의 발현은 β -actin을 internal control로 사용하여 상대정량하였다.

5) 통계처리

실험 1 에서의 방법과 동일

Table 7. Primer sets used in real-time qPCR in *E. akaara*

Gene	Primer	Sequence(5'-3')
<i>β-actin</i>	Forward	GAGCGTGGCTACTCCTTCAC
	Reverse	ACAGGTCCTTACGGATGTCG
<i>HSP70</i>	Forward	GGAGGATGAAAAGCTTGCTG
	Reverse	TTCTCGGCAGTCTGGTTCTT
<i>HSP90</i>	Forward	CCTGAAGGAGGACCAGACAG
	Reverse	ATGGGGTAGCCAATGAACTG
<i>CRH</i>	Forward	AGCGGCTTGGAGAGGAGTAT
	Reverse	AGCTGGAGTTGCAATGCTCT
<i>MC2R</i>	Forward	CTGGTTGTGGTGGCTGTTT
	Reverse	CACGCTGGCAAACACAAT
<i>SOD</i>	Forward	GTCCTACTGATGCGGAAAGG
	Reverse	CCATTGAGGGTGAGCATCTT
<i>CAT</i>	Forward	TCTGTACGAACCAGCCACAG
	Reverse	TTCTTGGGCATTGGTAGAGG

Table 8. Primer sets used in real-time qPCR in *P. olivaceus*

Gene	Primer	Sequence(5'-3')
<i>β-actin</i>	Forward	GCTGTGTTACGTTGCTCTGG
	Reverse	GGAACCTCTCGTTTCCAATG
<i>HSP70</i>	Forward	GAGAGGCTCATTGGAGATGC
	Reverse	GGACTGGACGATGGAGTCAT
<i>HSP90</i>	Forward	GATCTGCCCCTCAACATCTC
	Reverse	GTGGATTCCCAGCTTGATGT
<i>CRH</i>	Forward	CCTGATGTTCCCAACTTTC
	Reverse	GGAGTACTTCGTCCGACTGG
<i>MC2R</i>	Forward	TGGGTGAGAACTTCCTGGTT
	Reverse	ATCAGGGTCTCCCAGGTTTT
<i>SOD</i>	Forward	AACAGGAACCCGGTCAACTA
	Reverse	GTCGGTGTGTGTCTGGGTAA
<i>CAT</i>	Forward	AACAGGCCAAAGGTCAACTA
	Reverse	GTCGGTGTGTGTCTGGGTAA

3. 사육수온 상승 조절에 따른 사육수온 반응인자들의 발현 변화

1) 실험어

실험어는 제주대학교 해양과학연구소에서 사육 중인 붉바리와 넙치를 이용하였다. 양식산 붉바리 (n=40, 평균전장 22.6 ± 0.03 cm, 평균체중 196.5 ± 0.11 g)와 양식산 넙치 (n=40, 평균 전장 14.5 ± 0.04 cm, 평균 체중 26.0 ± 0.11 g)는 각각 2개의 원형 수조 (37×37×81 cm)에 수용되어 실험에 이용하였다. 모든 실험어들은 순환여과사육시스템(1일 환수율 2회전)에서 자연광주기 조건으로 사육하였으며, 상업용 배합사료 (Daebong LF Fishery Association Corp., Jeju, South Korea)를 하루에 두 번 공급했다(09:00 & 17:00). 실험 시작 전 실험어를 수온은 18°C에서 10일간 순치시킨 이후, 하루에 1°C씩 사육수온을 증가시켜 최종적으로 30°C까지 노출 시킨 후 실험을 종료하였다. 실험기간동안 두 실험 수조의 용존산소는 6 mg/ℓ 수준을 유지하였다.

샘플링은 18°C, 22°C, 26°C 그리고 30°C 조건에서 오전 9시에 전날 절식시킨 붉바리와 넙치 각각 8마리씩 무작위로 선택하여 수행하였다. 사육수온 반응 관련 유전자들의 발현 변화를 분석하기 위해 뇌, 두신, 간을 적출 하여 분석하기 전까지 - 80°C에 보관하였다. 수온 증가에 따른 간중량지수(Hepatosomatic index, HSI)의 변화를 조사하기 위해 적출된 간 조직의 무게를 측정 후, (간중량/체중)×100 공식을 이용하여 HSI를 계산하였다. 조직학적 분석을 위해, 적출한 간은 즉시 Bouin's solution에 고정하였다.

2) 조직학적 분석

실험 2 에서의 방법과 동일

3) Total RNA 추출 및 cDNA 합성

실험 1 에서의 방법과 동일

4) Real-time quantitative RT-PCR

실험 2 에서의 방법과 동일

5) 통계처리

실험 1 에서의 방법과 동일

Ⅲ. 결과

1. 붉바리 HSP90과 MC2R 유전자의 클로닝 및 조직별 발현

1) 붉바리에서의 HSP90, MC2R cDNA 분리 및 상동성 비교

붉바리의 전조직에서 HSP90과 MC2R 유전자의 cDNA를 분리하여 염기서열을 분석한 결과, HSP90과 MC2R은 각각 총 537 bp (179 aa)와 총 633bp (211aa)의 부분염기서열이 확인되었다(Fig. 1-2).

붉바리에서 확인된 HSP90과 MC2R 유전자와 다른 어종간의 아미노산 상동성 분석 결과, *HSP90* 아미노산 서열은 바리과(Serranidae)의 자바리(longtooth grouper, *Epinephelus moara*)와 가장 높은 100.0%의 상동성을 보였고, 넙치과(Paralichthyidae)의 넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)와 가장 낮은 91.1%의 상동성을 보였다(Table 9-10). MC2R 아미노산 서열은 바리과(Serranidae)의 자바리(longtooth grouper, *Epinephelus moara*)와 가장 높은 98.6%의 상동성을 보였고, 넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)와 가장 낮은 81.1%의 상동성을 보였다(Table 11-12).

종간 계통 유연관계를 분석한 결과, 붉바리의 HSP90과 MC2R 아미노산 서열은 자바리와 가장 인접한 유연관계에 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3-4).

TTT TAT TCC AAC AAA GAG ATC TTC CTC AGG GAG TTG ATC TCC AAC GCC TCT GAT GCT TTG 60
 F Y S N K E I F L R E L I S N A S D A L 20
 GAC AAA ATT CGC TAT GAA AGC TTG ACT GAC CCC TCC AAG CTG GAC AGC GGC AAG GAT CTG 120
 D K I R Y E S L T D P S K L D S G K D L 40
 AAA ATT GAC ATC ATC CCC AAC CAG TTT GAG CGC ACC TTG ACC ATC ATC GAC ACT GGA ATT 180
 K I D I I P N Q F E R T L T I I D T G I 60
 GGC ATG ACC AAA GCC GAC CTC ATC AAC AAC CTG GGT ACC ATC GCC AAG TCT GGC ACC AAG 240
 G M T K A D L I N N L G T I A K S G T K 80
 GCC TTC ATG GAG GCC CTG CAG GCT GGA GCT GAC ATT TCC ATG ATC GGT CAG TTT GGT GTG 300
 A F M E A L Q A G A D I S M I G Q F G V 100
 GGT TTC TAC TCT GCC TAC CTT ACT GCT GAG AGG GTG GTC GTC ATC ACT AAA CAC AAT GAT 360
 G F Y S A Y L T A E R V V V I T K H N D 120
 GAT GAA CAG TAC GCC TGG GAG TCC TCC GCC GGA GGT TCC TTC ACA GTC AGA GTC GAC AAC 420
 D E Q Y A W E S S A G G S F T V R V D N 140
 GGT GAG CCC ATT GGC CGT GGA ACA AAG ATC ATC CTG CAC CTG AAG GAG GAC CAG ACA GAG 480
 G E P I G R G T K I I L H L K E D Q T E 160
 TAC ATT GAG GAG AAG AGG ATC AAG GAA ATT GTC AAG AAG CAC TCT CAG TTC ATT GGC 537
 Y I E E K R I K E I V K K H S Q F I G 179

Fig. 1. The HSP90 partial nucleotide and deduced amino acid sequence obtained from *E. akaara*. It was 537 base pairs long and encoding 179 amino acids.

CCA TCG GTG CAG TGA GCC TGG CCG AGA ACC TGC TGG TTG TGG TGG CTG TTT TAT GGA ACA 60
 I G A V S L A E N L L V V V A V L W N R 20
 GGA ACC TCC ACT CGC CCA TGT ACT GCT TCA TCT GCA GCC TGG CGG CTT TTA ACA CCA TCG 120
 N L H S P M Y C F I C S L A A F N T I A 40
 CCA GCC TCA CCA AAA CCT GGG AGA ACC TAA TGA TTG TGT TTG CCA GCG TGG GAC ACC TAA 180
 S L T K T W E N L M I V F A S V G H L K 60
 AGA AGA CGG GCT CCT CTG AGT TGA ACC TGG ACG ATG TGA TGG ACT CCC TGC TGT GTA TGT 240
 K T G S S E L N L D D V M D S L L C M S 80
 CGT TTG TGG GCT CCA TTT TCA GTT TCC TGG CTA TTG CTG TGG ACC GTT ACA TCA CCA TCT 300
 F V G S I F S F L A I A V D R Y I T I F 100
 TCC ATG CGC TTC GAT ACC ACA ACA TCA TGA CAA TGA GGC GCA CAA AGG CCA TCT TGG GTG 360
 H A L R Y H N I M T M R R T K A I L G V 120
 TCA TCT GGT TAA TAT GTG GGT TGT CAG CAG TGC TCA TGG TGA AGT TCT TCG ACT CCA ACT 420
 I W L I C G L S A V L M V K F F D S N F 140
 TCA TCA AGA TCT GCT TTG TTG TTT TCT TTG TCG CCT CCG TGG CAA TTA TCT GTT TCC TTT 480
 I K I C F V V F F V A S V A I I C F L Y 160
 ATG TCT ATA TGT TCA TGC TGG CAC GCA TCC ACG CCA GGA AGA TTG CTG CTC TGC CTG CCA 540
 V Y M F M L A R I H A R K I A A L P A S 180
 GTG GCG TAC CAA AGT GTC GCC GTC AGC GAT GGT GGG GCA GAA GCA GGA GAG GGG CGC TGA 600
 G V P K C R R Q R W W G R S R R G A L T 200
 CTG TCA CTA TCC TGT TTG GGG TGT TTG TGG TGT 633
 V T I L F G V F V V C 211

Fig. 2. The MC2R partial nucleotide and deduced amino acid sequence obtained from *E. akaara*. It was 633 base pairs long and encoding 211 amino acids.

Table 9. Overall amino acid identities of HSP90 between *E. akaara* and other fish

	Species	Homology(%)
<i>Teleostei</i>		
Perciformes	<i>Epinephelus akaara</i>	100.0
	<i>Epinephelus moara</i>	100.0
	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	99.4
	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	99.4
	<i>Epinephelus coioides</i>	99.4
	<i>Scatophagus argus</i>	96.7
Anabantiformes	<i>Anabas testudineus</i>	96.1
	<i>Channa striata</i>	95.5
Perciformes	<i>Scortum barcoo</i>	95.0
Istiophoriformes	<i>Xiphias gladius</i>	95.0
Perciformes	<i>Lates japonicus</i>	95.0
	<i>Plectropomus leopardus</i>	95.0
	<i>Perca flavescens</i>	94.4

Table 10. Overall amino acid identities of HSP90 between *E. akaara* and other fish

	Species	Homology(%)
<i>Teleostei</i>		
Perciformes	<i>Amphiprion ocellaris</i>	94.0
Cyprinodontiformes	<i>Poeciliopsis prolifica</i>	93.9
Perciformes	<i>Lepomis macrochirus</i>	93.3
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i>	93.3
Cichliformes	<i>Maylandia zebra</i>	93.3
Perciformes	<i>Micropterus salmoides</i>	93.3
Scombriformes	<i>Thunnus maccoyii</i>	93.3
Pleuronectiformes	<i>Paralichthys dentatus</i>	92.7
Anura	<i>Xenopus laevis</i>	92.2
Primates	<i>Homo sapiens</i>	92.2
Pleuronectiformes	<i>Paralichthys olivaceus</i>	91.7
Artiodactyla	<i>Bos taurus</i>	91.7
Galliformes	<i>Gallus gallus</i>	91.1

Table 11. Overall amino acid identities of MC2R between *E. akaara* and other fish

	Species	Homology(%)
<i>Teleostei</i>		
Perciformes	<i>Epinephelus akaara</i>	100.0
	<i>Epinephelus moara</i>	98.6
	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	98.3
	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	97.5
Scorpaeniformes	<i>Sebastes umbrosus</i>	88.9
Perciformes	<i>Cottoperca gobio</i>	88.7
Scorpaeniformes	<i>Anoplopoma fimbria</i>	88.4
Perciformes	<i>Siniperca chuatsi</i>	88.4
	<i>Sander lucioperca</i>	88.2
	<i>Etheostoma cragini</i>	87.6
	<i>Etheostoma spectabile</i>	87.6
	<i>Perca flavescens</i>	87.4
	<i>Plectropomus leopardus</i>	87.1

Table 12. Overall amino acid identities of MC2R between *E. akaara* and other fish

	Species	Homology(%)
<i>Teleostei</i>		
Scorpaeniformes	<i>Cyclopterus lumpus</i>	87.0
Perciformes	<i>Micropterus dolomieu</i>	86.0
Scorpaeniformes	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	85.9
Carangiformes	<i>Seriola dumerili</i>	85.2
Moroniformes	<i>Dicentrarchus labrax</i>	85.2
Scombriformes	<i>Thunnus maccoyii</i>	84.9
Perciformes	<i>Chelmon rostratus</i>	84.9
Acanthuriformes	<i>Larimichthys crocea</i>	84.3
Perciformes	<i>Centropristis striata</i>	84.0
Istiophoriformes	<i>Xiphias gladius</i>	83.5
Pleuronectiformes	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	82.2
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	81.1

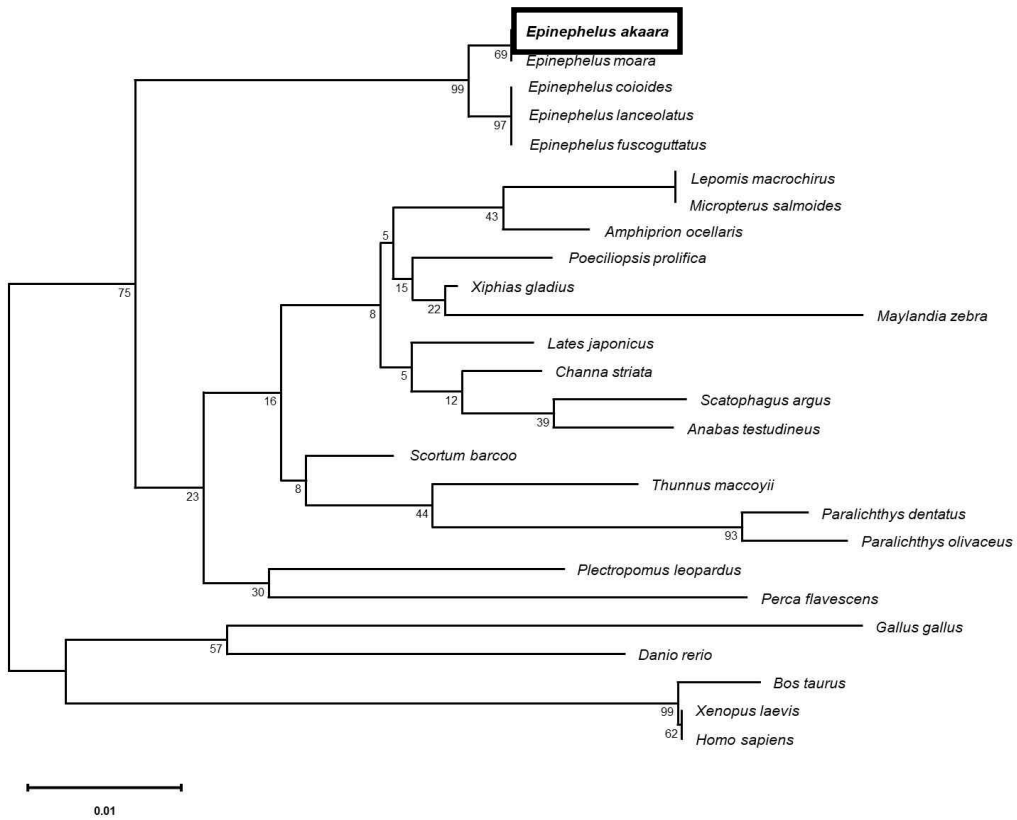


Fig. 3. Phylogenetic tree of HSP90 between *E. akaara* and other fishes. Thousand bootstrap repetitions were performed, and values are shown at the inner nodes.

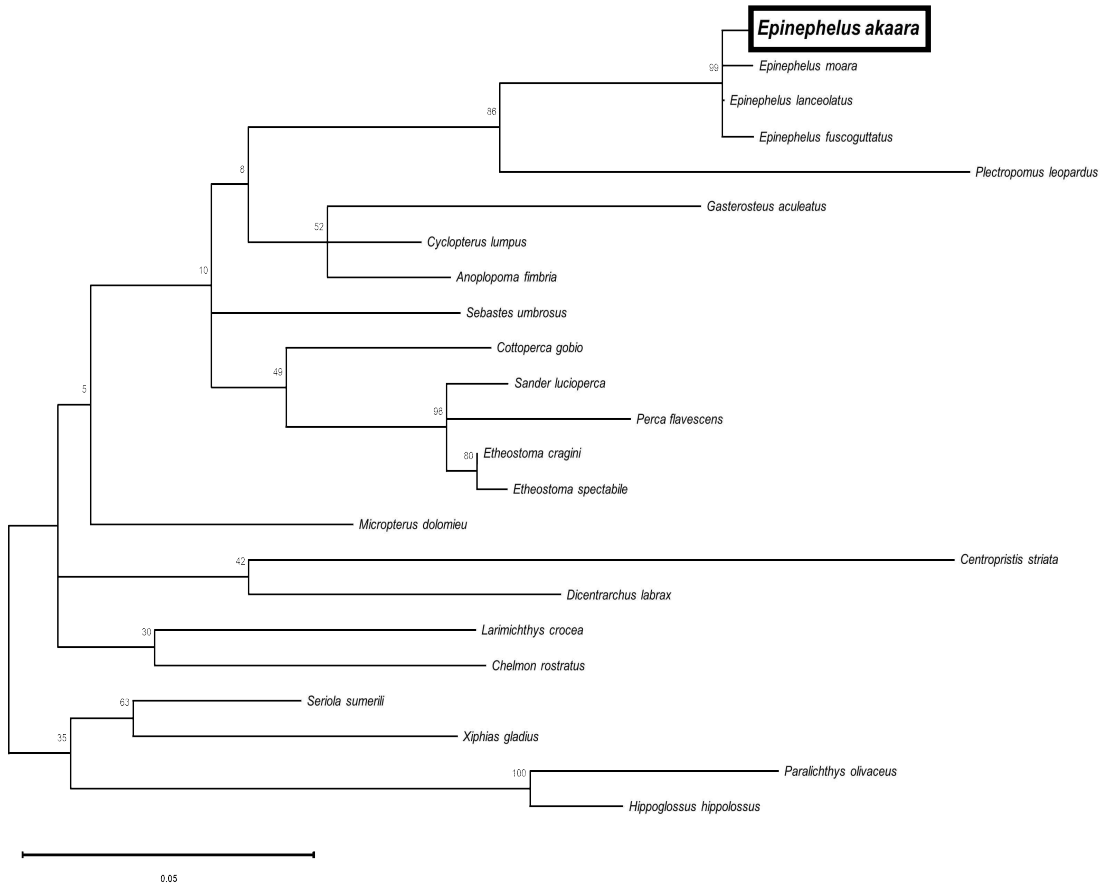


Fig. 4. Phylogenetic tree of MC2R between *E. akaara* and other fishes. Thousand bootstrap repetitions were performed, and values are shown at the inner nodes.

2) *HSP90*과 *MC2R* mRNA 조직별 발현

붉바리의 중추신경조직과 주변조직에서 *HSP90* 과 *MC2R*의 mRNA 발현을 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)로 확인한 결과, *HSP90* mRNA의 발현은 대부분의 조직에서 확인되었으며, *MC2R* mRNA의 발현은 일부 중추신경조직(Of, olfactory lobe; Op, optic loge; Di, diencephalon)과 주변조직(Pt, pituitary)에서 확인되었다(Fig. 5).

Real-time quantitative RT-PCR (qPCR)로 확인한 결과, *HSP90* mRNA는 대부분의 조직에서 발현이 확인되었으며, 특히 주변조직에서의 간 (Liver, Li)에서 특이적으로 발현이 높았다(Fig. 6). *MC2R* mRNA의 발현은 중추신경조직에서의 연수 (Medulla oblongata, Me)에서 높은 발현이 나타났다(Fig. 7).

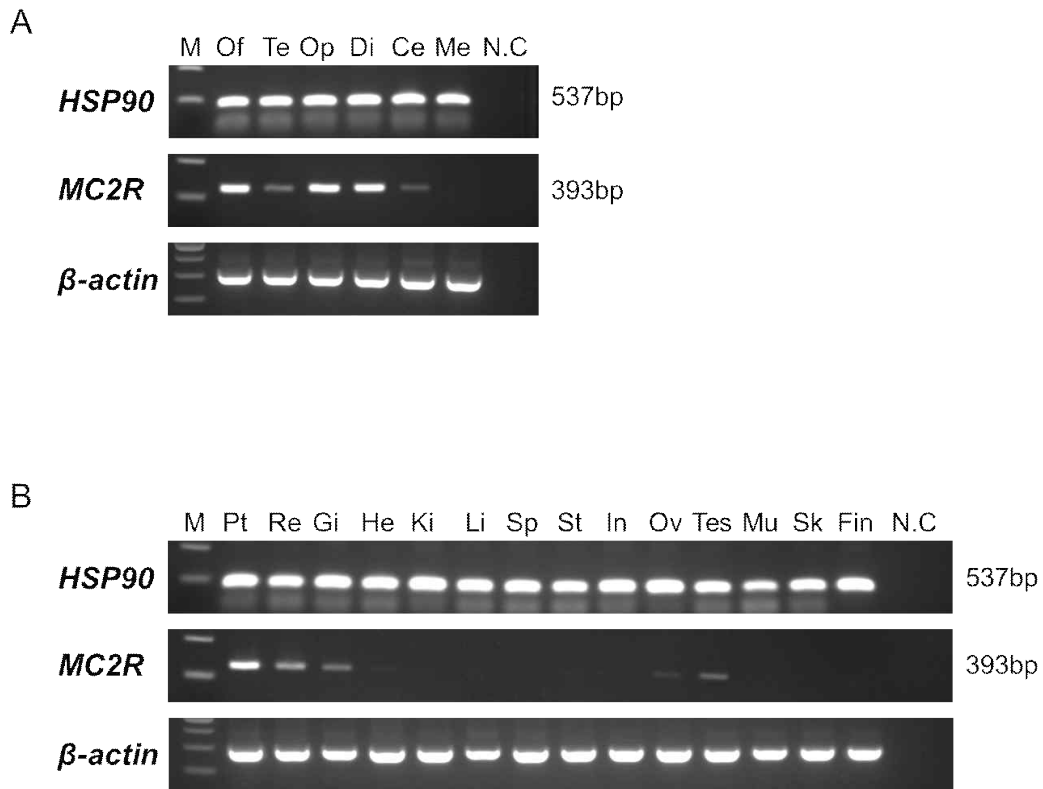


Fig. 5. Electrophoresis of all tissue *HSP90* and *MC2R* mRNA expression Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) products. Nervous tissues(A); Peripheral tissues(B); M, 100bp DNA ladder marker; Of, olfactory lobe; Te, telencephalon; Op, optic loge; Di, diencephalon; Ce, cerebellum; Me, medulla oblongata; Pt, pituitary; Re, retina; Gi, gill; He, heart; Ki, kidney; Li, liver; Sp, spleen; Lane 8: St, stomach; In, intestine; Ov, ovary; Te, testicle; Mu, muscle; Sk, skin dosal; Fin, caudal fin; N.C, negative control.

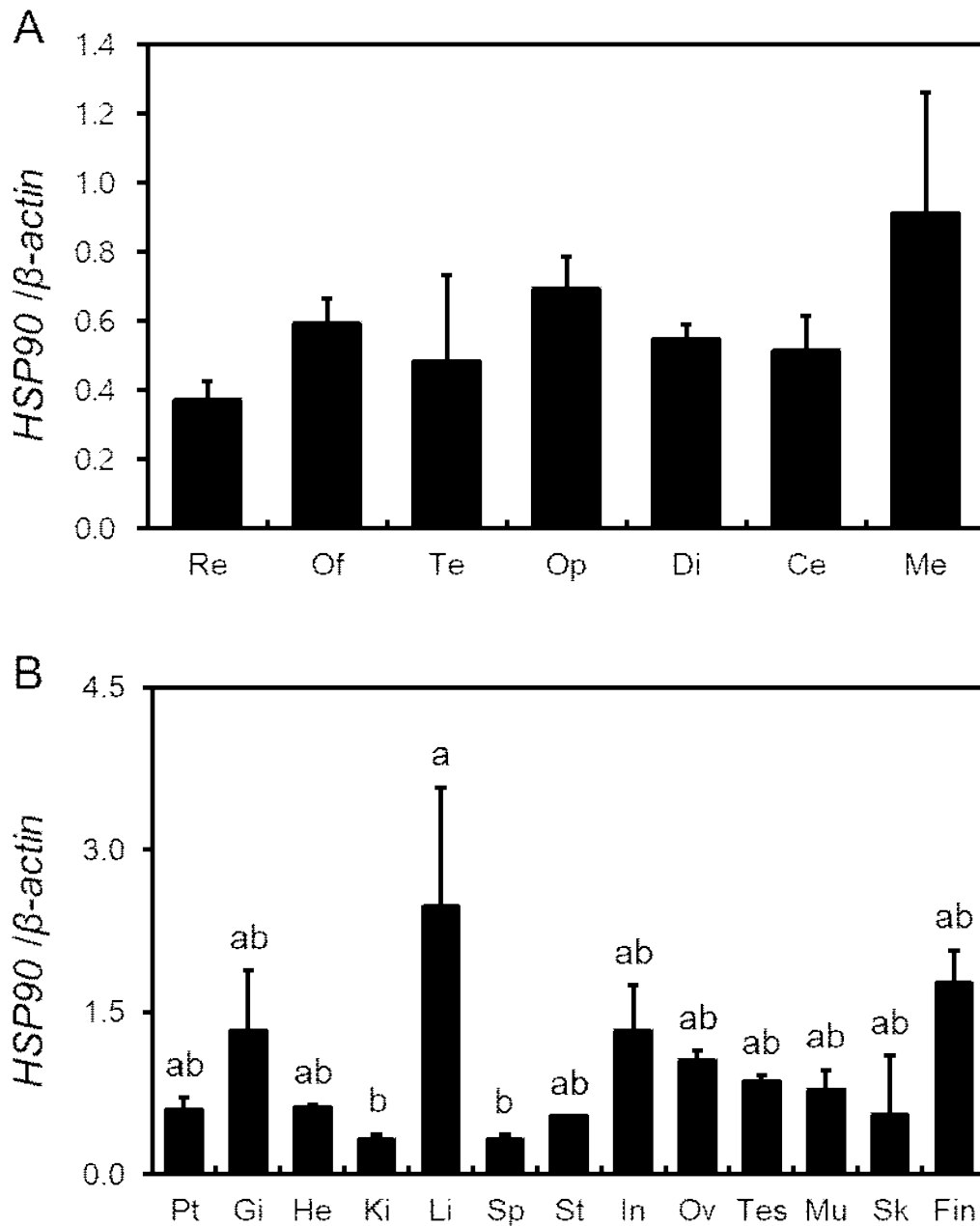


Fig. 6. Tissue specific expression of *HSP90* mRNA in the *E. akaara* by Real-time qPCR. Nerve tissue (A) and peripheral tissue (B). Re, retina; Of, olfactory bulb; Te, telencephalon; Op, optic lobe; Di, diencephalon; Ce, cerebellum; Me, medulla oblongata; Pt, pituitary; Gi, gill; He, heart; Ki, kidney; Li, liver; Sp, spleen; St, stomach; In, intestine; Ov, ovary; Tes, testicle; Mu, muscle; Sk, skin dorsal; Fin, caudal fin.

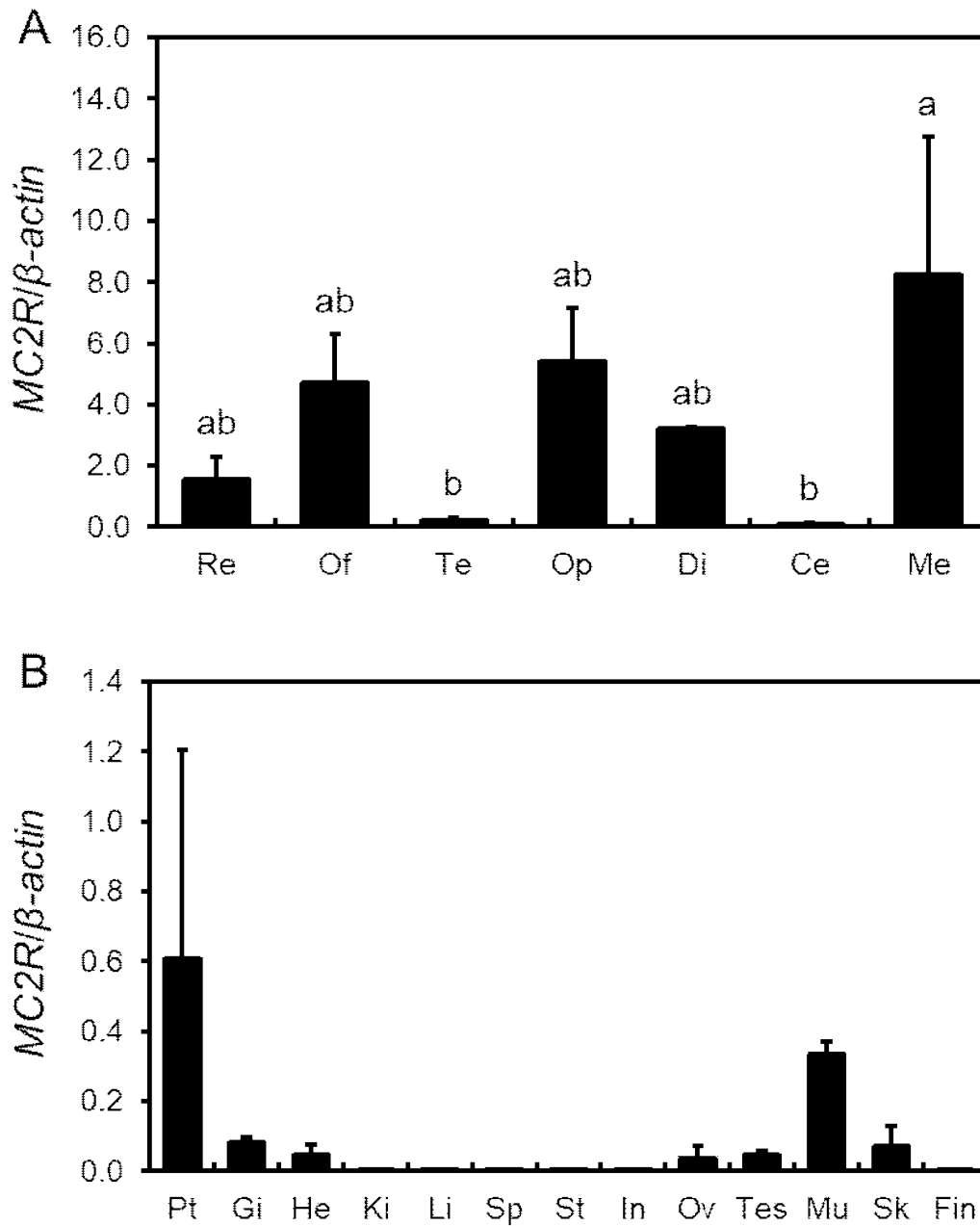


Fig. 7. Tissue specific expression of *MC2R* mRNA in the *E. akaara* by Real-time qPCR. Nerve tissue (A) and peripheral tissue (B). Re, retina; Of, olfactory lobe; Te, telencephalon; Op, optic lobe; Di, diencephalon; Ce, cerebellum; Me, medulla oblongata; Pt, pituitary; Gi, gill; He, heart; Ki, kidney; Li, liver; Sp, spleen; St, stomach; In, intestine; Ov, ovary; Tes, testicle; Mu, muscle; Sk, skin dorsal; Fin, caudal fin.

2. 계절별 수온에 따른 붐바리와 넙치의 사육수온 반응인자들의 발현 변화

1) 사육환경 및 성장

실험기간동안 사육수온은 2월 평균 $12.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ 로 가장 낮았고, 5월 평균 $17.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 로 증가하기 시작하였으며, 8월 평균 $27.8 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 로 가장 높게 나타났다. 이후 사육수온은 11월 평균 $19.2 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 로 다시 감소하였다(Table 13).

실험기간동안 용존산소량은 2월 평균 $9.3 \pm 0.2 \text{ mg}/\ell$ 로 가장 높았고, 5월 평균 $6.6 \pm 0.1 \text{ mg}/\ell$ 로 감소하기 시작하였으며, 8월 평균 $4.5 \pm 0.1 \text{ mg}/\ell$ 로 가장 낮게 나타났다. 이후 용존산소량은 11월 평균 $6.0 \pm 0.1 \text{ mg}/\ell$ 로 다시 증가하였다(Table 13).

실험기간동안 붐바리의 체중 변화는 2월 평균 $6.6 \pm 0.5 \text{ g}$ 이었으며, 5월 평균 $8.9 \pm 0.8 \text{ g}$ 에서 8월 평균 $49.0 \pm 2.9 \text{ g}$ 으로 급격하게 체중이 증가하였으며, 11월에는 평균 $81.9 \pm 9.1 \text{ g}$ 을 나타냈다(Fig. 8A). 전장 변화는 2월에 평균 $7.8 \pm 0.2 \text{ cm}$, 5월에 평균 $9.0 \pm 0.3 \text{ cm}$, 8월에 평균 $15.1 \pm 0.4 \text{ cm}$, 11월에 평균 $17.7 \pm 0.4 \text{ cm}$ 이었다(Fig. 8B). 넙치의 체중은 2월 평균 $55.0 \pm 1.7 \text{ g}$, 5월 평균 $91.2 \pm 4.6 \text{ g}$ 이었으며, 8월 평균 $253.2 \pm 20.3 \text{ g}$ 에서 11월 평균 $664.3 \pm 18.9 \text{ g}$ 으로 급격한 체중 증가가 나타났다(Fig. 9A) 전장 변화는 2월 평균 $7.9 \pm 0.2 \text{ cm}$, 5월 평균 $21.3 \pm 0.3 \text{ cm}$, 8월 평균 $29.8 \pm 0.7 \text{ cm}$, 11월 평균 $39.5 \pm 0.4 \text{ cm}$ 으로 나타났다(Fig. 9B).

Table 13. Environmental conditions during rearing experiment

Day	Feb	May	Aug	Nov
Water temperature (°C)	12.1±0.4	17.7±0.1	27.8±0.3	19.2±0.1
Dissolved oxygen (mg/ℓ)	9.3±0.2	6.6±0.1	4.5±0.1	6.0±0.1

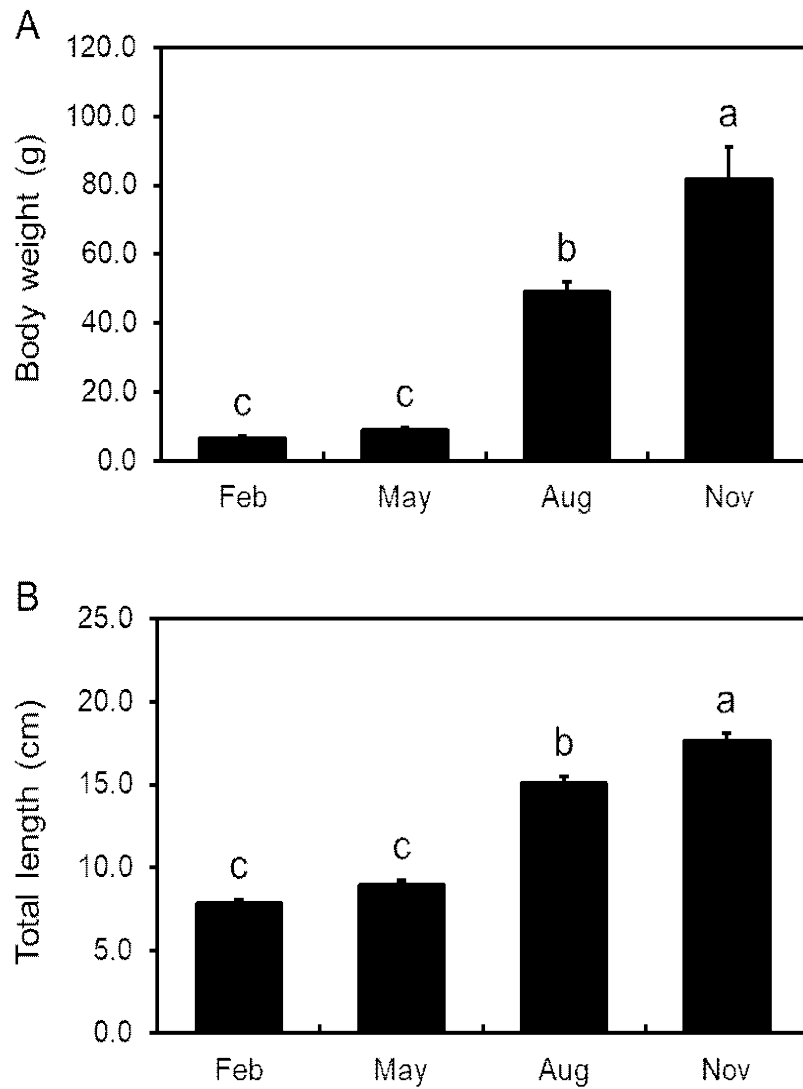


Fig. 8. Annual change of (A) body weight and (B) total length in *E. akaara*. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). All values are mean \pm S.E (n=6).

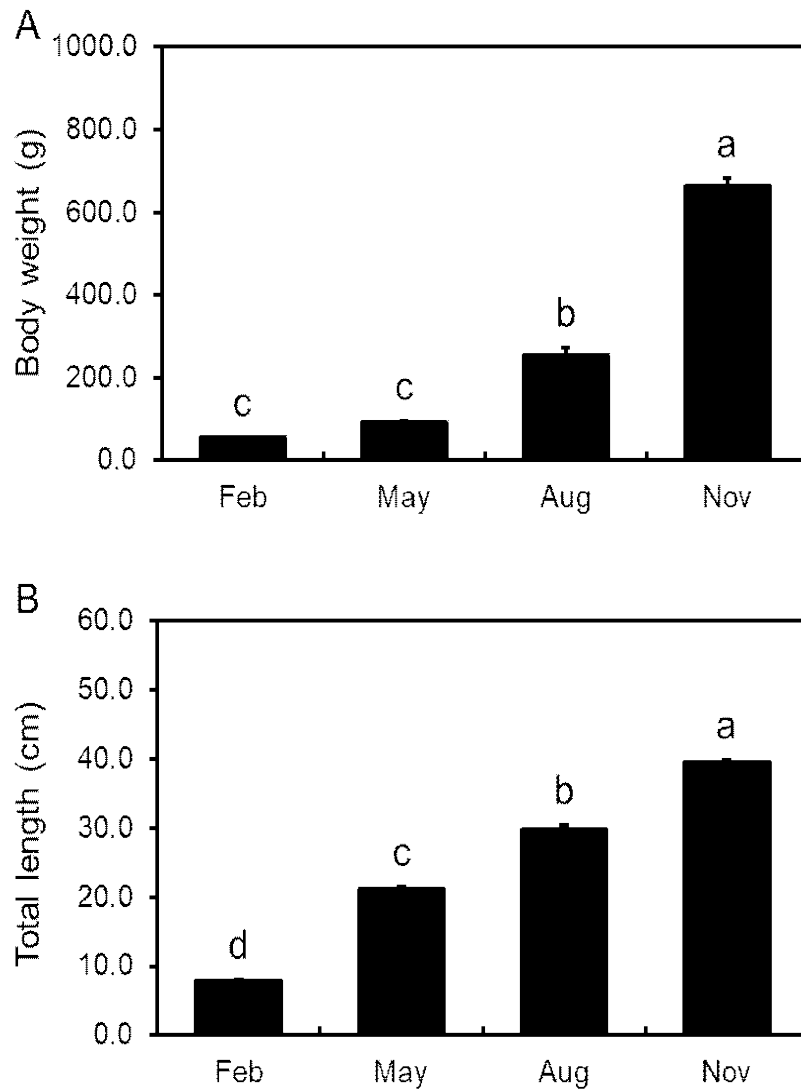


Fig. 9. Annual change of (A) body weight and (B) total length in *P. olivaceus*. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). All values are mean \pm S.E (n=6).

2) 붉바리의 계절별 수온에 따른 사육수온 반응인자들의 발현 변화

계절별 수온 변화에 따른 붉바리의 사육수온 반응인자들의 발현 변화를 분석한 결과, 실험기간동안 간에서 *HSP70* 과 *HSP90* mRNA의 발현은 계절별 유의적인 차이는 없었으나 *HSP70* mRNA의 발현이 저수온 시기인 2월에 높은 경향이 나타났다(Fig. 10A and B). *CRH* mRNA와 두신에서 *MC2R* mRNA 발현 역시 계절별 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 수온이 급격히 하강하는 11월에 *CRH* mRNA의 발현이 증가하는 경향이 나타났으며, 저수온 시기인 2월에 *MC2R* mRNA의 발현이 높은 경향을 나타냈다(Fig. 10C and D). 항산화 효소인 *SOD* mRNA는 2월이 5월에 비해 유의적으로 높게 나타났고, *CAT* mRNA는 2월이 5월과 11월에 비해 유의적으로 높게 발현하였다($P < 0.05$) (Fig. 10E and F).

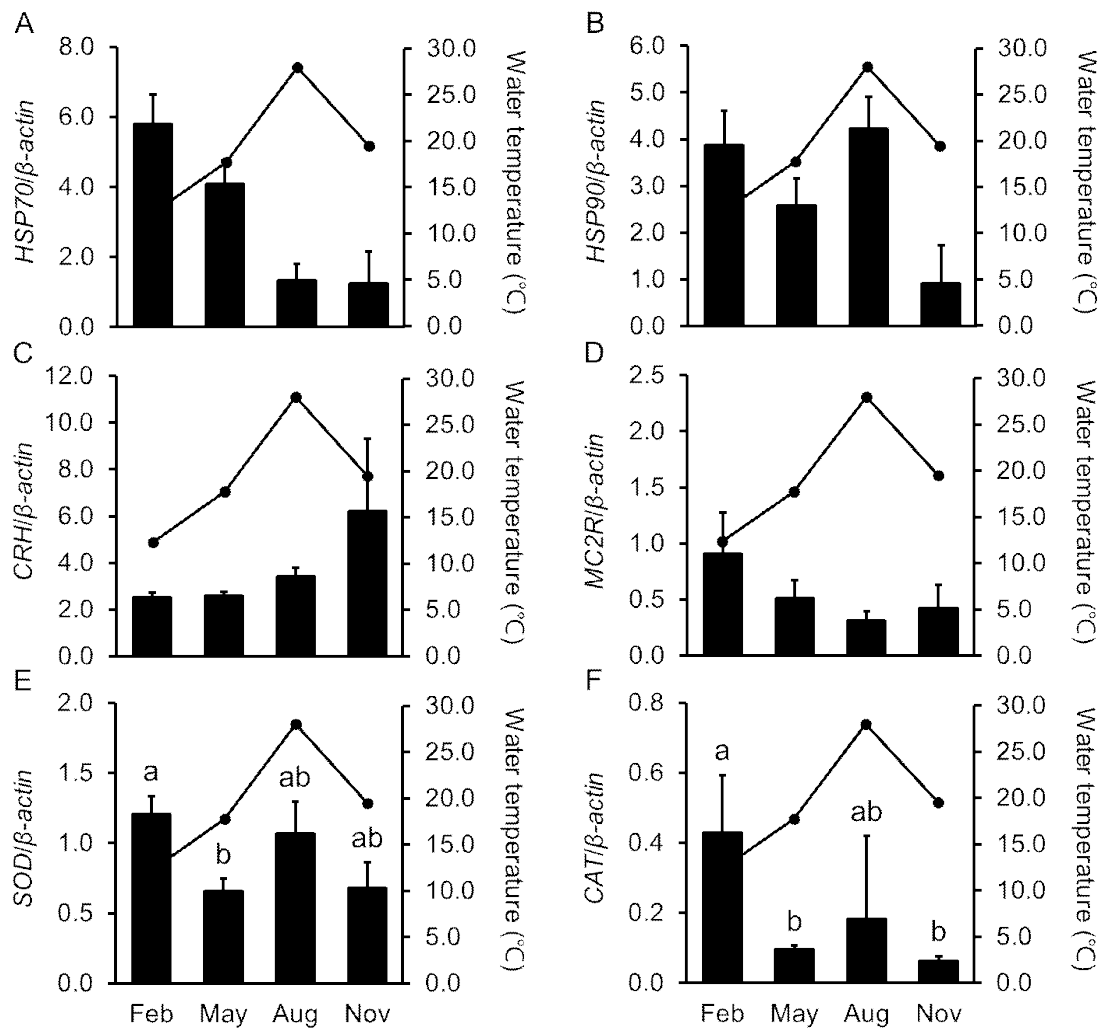


Fig. 10. Differentially expressed genes in *E. akaara* on natural water temperature seasonal changes under year-round conditions. (A) *HSP70* mRNA, (B) *HSP90* mRNA, (C) *CRH* mRNA, (D) *MC2R* mRNA, (E) *SOD* mRNA, (F) *CAT* mRNA. The axis located on the left represents the level of gene expression seen through the bar graph, and the axis on the right represents the level of water temperature seen through the line graph. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). Values are mean \pm S.E (n=6).

3) 넙치의 계절별 수온에 따른 사육수온 반응인자들의 발현 변화

계절별 수온에 따른 넙치의 사육수온 반응인자들의 발현 변화를 분석한 결과, 실험기간동안 *HSP70* 과 *HSP90* mRNA의 발현은 2월과 5월에 낮은 수준을 유지하다 8월에 유의적으로 급격히 증가하였으며($P < 0.05$), 이후 11월에 다시 낮은 발현을 나타냈다(Fig. 11A and B). *CRH* mRNA와 *MC2R* mRNA 발현은 계절별 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 11C and D). 항산화 효소인 *SOD* mRNA 발현은 2월과 8월에서 5월과 11월에 비해 유의적으로 높았고($P < 0.05$), *CAT* mRNA의 발현은 8월이 2월에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$) (Fig. 11E and F).

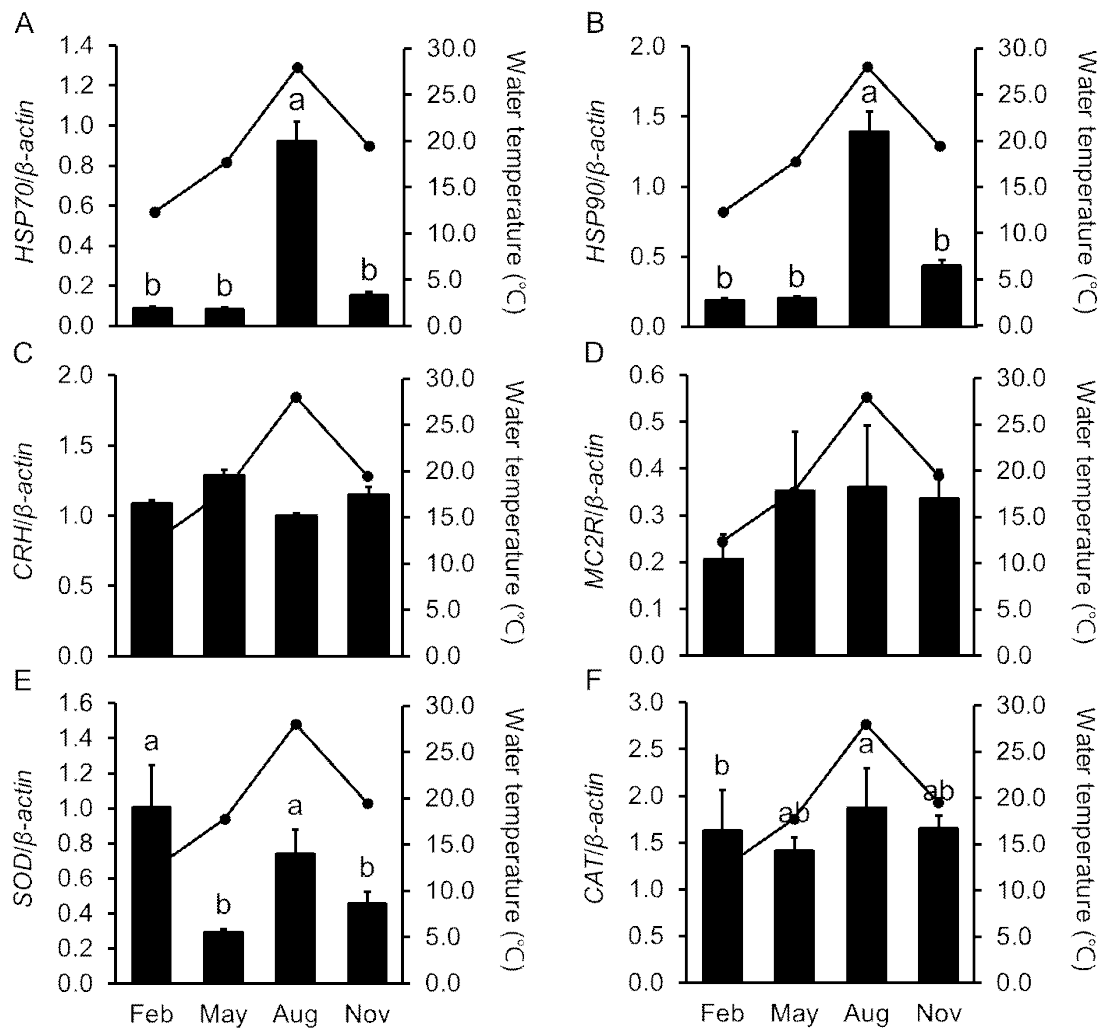


Fig. 11. Differentially expressed genes in *P. olivaceus* on natural water temperature seasonal changes under year-round conditions. (A) *HSP70* mRNA, (B) *HSP90* mRNA, (C) *CRH* mRNA, (D) *MC2R* mRNA, (E) *SOD* mRNA, (F) *CAT* mRNA. The axis located on the left represents the level of gene expression seen through the bar graph, and the axis on the right represents the level of water temperature seen through the line graph. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). All values are mean \pm S.E (n=6).

4) 붉바리와 넙치의 계절별 수온에 따른 간중량지수 및 간세포 변화

계절별 수온 변화에 따른 붉바리와 넙치의 HSI 변화를 조사한 결과, 붉바리는 2월과 8월에 평균 1.1 ± 0.1 로 유의적으로 가장 작았으며, 5월에 평균 2.0 ± 0.3 로 2월과 8월에 비해 유의적으로 컸다($P < 0.05$). 넙치는 2월과 8월 HSI 값이 1.4 정도로 5월과 11월에 비해 유의적으로 낮았고, 5월과 11월에서 HSI는 2.1 정도로 2월과 8월에 비해 유의적으로 높게 나타났다(Table 14). 실험기간동안 붉바리와 넙치 간의 조직학적 변화를 분석한 결과, 중심 정맥과 동양모세혈관이 관찰되었으며, 일부 간세포의 경우 세포질에서 하나 또는 여럿의 지방방울을 포함하고 있는 특징이 관찰되었다(Fig. 12-13). 간의 조직학적 변화를 조사하기 위하여 간세포의 크기를 분석하였으며, 분석 결과 붉바리는 간세포의 크기가 다른 시기에 비해 2월에 평균 $15.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 로 유의적으로 가장 작았다($P < 0.05$). 5월 간세포의 직경은 평균 $18.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 이었고, 8월에 평균 $16.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 로 감소하였으나 특이적으로 간세포에서 지방방울이 다수 관찰되었다. 11월에는 간세포 평균 $23.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 으로 유의적으로 가장 컸다($P < 0.05$) (Table 15). 넙치도 2월에 간세포 직경이 평균 $10.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 으로 유의적으로 가장 작았다($P < 0.05$). 5월에서는 평균 $10.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 이었으며, 8월 간세포는 평균 $6.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 에 특이적으로 지방방울이 많이 형성되어 있는 것을 관찰하였다. 11월에서 간세포 직경이 평균 $14.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 으로 유의적으로 가장 컸다($P < 0.05$) (Table 15).

Table 14. Changes in the monthly Hepatosomatic index(HSI) in *E. akaara* and *P. olivaceus*

	Feb	May	Aug	Nov
<i>Epinephelus akaara</i>	1.1±0.1 ^b	2.0±0.3 ^a	1.1±0.1 ^b	1.7±0.2 ^{ab}
<i>Paralichthys olivaceus</i>	1.4±0.1 ^b	2.0±0.1 ^a	1.3±0.1 ^b	2.2±0.2 ^a

* Different lowercase letters above the bars indicate that there are significant differences between groups($P < 0.05$). All values are mean \pm S.E (n=6).

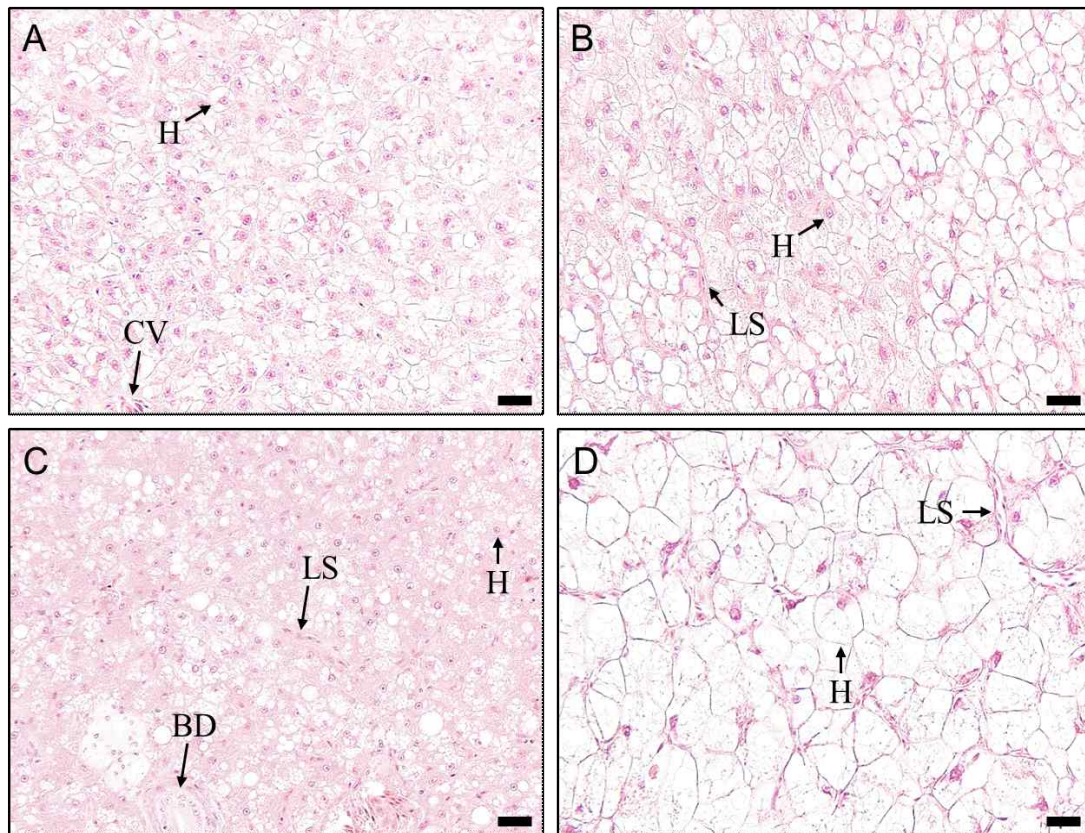


Fig. 12. Photomicrographs of liver tissues in *E. akaara* by HE stain. February (A: $12.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$); May (B: $17.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$); August (C: $27.8 \pm 0.3^\circ\text{C}$); November (D: $19.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$). LS, liver sinusoid; CV, central vein; BD, bile duct; Scale bar: 20 μm .

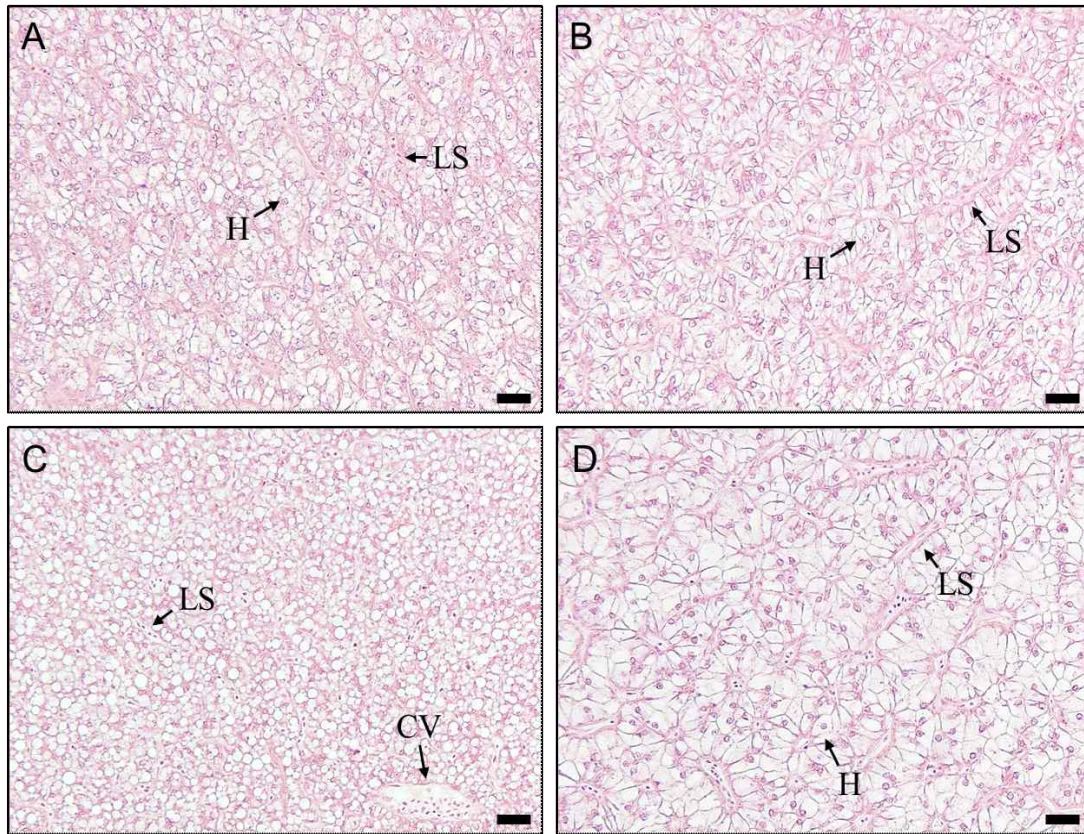


Fig 13. Photomicrographs of liver tissues in *P. olivaceus* by HE stain. February (A: $12.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$); May (B: $17.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$); August (C: $27.8 \pm 0.3^\circ\text{C}$); November (D: $19.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$). H, hepatocyte; LS, liver sinusoid; PV, portal vein; CV, central vein; LV, lipid vacuoles; Scale bar: 20 μm .

Table 15. Alternation in the seasonal hepatocyte diameter (μm) in *E. akaara* and *P. olivaceus*

	Feb	May	Aug	Nov
<i>Epinephelus akaara</i>	15.1 \pm 0.1 ^d	18.9 \pm 0.2 ^b	16.7 \pm 0.1 ^c	23.1 \pm 0.2 ^a
<i>Paralichthys olivaceus</i>	10.0 \pm 0.1 ^c	10.6 \pm 0.1 ^b	6.9 \pm 0.1 ^d	14.4 \pm 0.1 ^a

* Different lowercase letters above the bars indicate that there are significant differences between groups ($P < 0.05$). All values are mean \pm S.E (n=400).

3. 사육수온 상승 조절에 따른 붉바리와 넙치의 사육수온 반응인자들의 발현 변화

1) 사육수온 상승 조절에 따른 붉바리의 사육수온 반응인자들의 발현 변화

사육수온 상승 조절에 따른 붉바리의 사육수온 반응인자들의 발현을 분석한 결과, *HSP70* mRNA는 유의적인 차이가 없었으나 26°C에서 높게 발현되는 경향을 확인할 수 있었고, *HSP90* mRNA의 발현은 수온 상승에 따라 발현이 증가되는 경향을 보였으며 26, 30°C에서 18°C에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$) (Fig. 14A and B). *CRH* mRNA의 발현은 18°C부터 26°C까지 수온이 증가함에 따라 감소하여 수온 26°C에서 가장 낮은 값을 나타냈고($P < 0.05$) 이후 30°C까지 급격하게 증가하였다(Fig. 14C). *MC2R* mRNA 발현은 수온이 증가함에 따라 서서히 증가하는 경향을 보이다가, 30°C에서 가장 높은 값을 나타냈다($P < 0.05$) (Fig. 14D). *SOD* mRNA의 발현은 26°C에서 유의적으로 높게 나타났고, *CAT* mRNA는 수온이 상승함에 따라 발현이 증가하는 경향을 보였으며 26, 30°C에서 유의적으로 높게 발현하였다($P < 0.05$) (Fig. 14E and F).

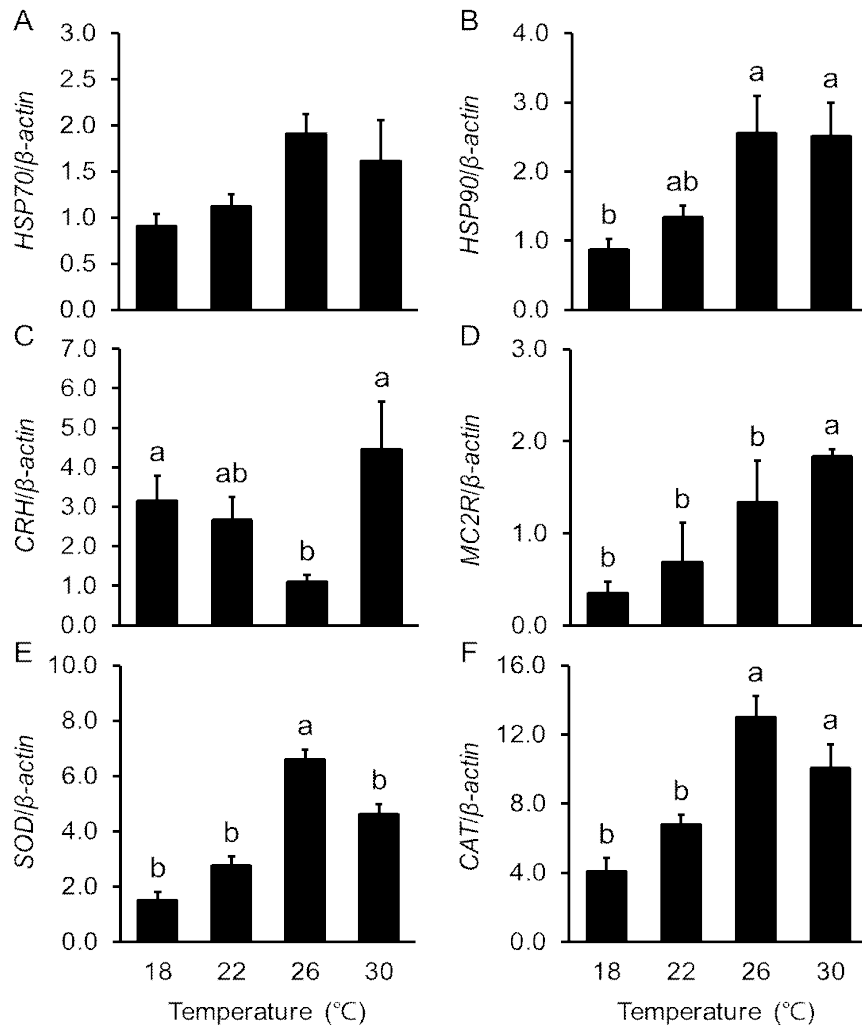


Fig. 14. Differentially expressed genes in *E. akaara* on water temperature increasing control conditions. (A) *HSP70* mRNA, (B) *HSP90* mRNA, (C) *CRH* mRNA, (D) *MC2R* mRNA, (E) *SOD* mRNA, (F) *CAT* mRNA. The axis located on the left represents the level of gene expression seen through the bar graph. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). All values are mean \pm S.E (n=8).

2) 사육수온 상승 조절에 따른 넙치의 사육수온 반응인자들의 발현 변화

사육수온 상승 조절에 따른 넙치의 사육수온 반응인자들의 발현을 분석한 결과, *HSP70* mRNA의 발현은 18°C에서 26°C까지 낮은 값을 보이다가 30°C 조건에서 유의적으로 급격하게 증가하였고($P < 0.05$), *HSP90* mRNA는 수온이 상승함에 따라 발현이 증가하였다(Fig. 15A and B). *CRH* mRNA의 발현은 실험기간 동안 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, *MC2R* mRNA 발현은 18°C부터 22°C까지 증가하였다가 26°C에서 유의적으로 급격히 감소하고 30°C까지 다소 증가하는 경향이 확인되었다. *SOD* mRNA는 18°C부터 26°C까지 유의적으로 감소하다가 30°C에서 발현이 다시 증가하였고($P < 0.05$), *CAT* mRNA 발현도 18°C부터 26°C까지 지속적으로 감소하다가 30°C에서 비슷한 수준을 유지하였다($P < 0.05$) (Fig. 15E and F).

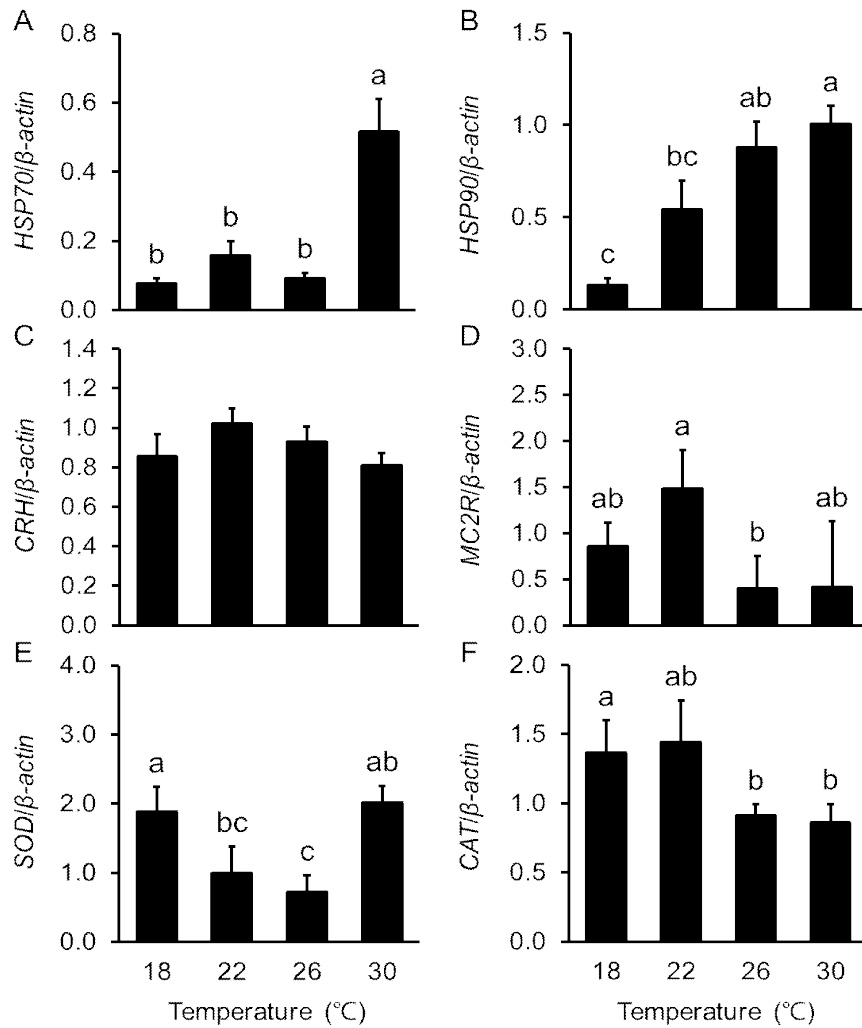


Fig. 15. Differentially expressed genes in *P. olivaceus* on water temperature increasing control conditions. (A) *HSP70* mRNA, (B) *HSP90* mRNA, (C) *CRH* mRNA, (D) *MC2R* mRNA, (E) *SOD* mRNA, (F) *CAT* mRNA. The axis located on the left represents the level of gene expression seen through the bar graph. Means represented by different letters are significant ($P < 0.05$). All values are mean \pm S.E (n=8).

3) 사육수온 상승 조절에 따른 붉바리와 넙치의 간중량지수 및 간세포 변화

사육수온 상승 조절에 따른 붉바리와 넙치의 HSI 변화를 조사한 결과, 붉바리의 경우 수온이 상승함에 따라 감소하는 경향이 나타났다. 실험 시작 시(18°C) 평균 1.7 ± 0.3 으로 26, 30°C에 비해 유의적으로 가장 컸으며, 26°C와 30°C에서 0.8 정도로 18°C에 비해 유의적으로 가장 작았다($P < 0.05$). 넙치는 18°C에서 평균 0.7 ± 0.1 로 유의적으로 가장 작았고, 26°C에서 평균 1.3 ± 0.1 로 가장 크게 나타나면서($P < 0.05$) 수온이 상승함에 따라 HSI가 커지는 경향이 나타나다가 30°C에서 다시 감소한 경향을 보였다(Table 16). 실험기간동안 붉바리와 넙치 간세포 형태를 조직학적으로 관찰한 결과, 중심 정맥과 동양모세혈관이 확인되었으며, 일부 간세포의 경우 세포질에서 하나 또는 여럿의 지방방울을 관찰할 수 있었다(Fig. 16-17). 사육수온 상승 조절에 따른 간의 조직학적 변화를 조사하기 위하여 간세포의 직경을 분석한 결과, 붉바리의 경우 간세포 직경은 실험 시작 시(18°C) 평균 $22.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 으로 가장 컸으며, 이후 22°C 평균 $17.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 으로 간세포 직경이 감소하기 시작하여, 26°C에 평균 $15.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$, 그리고 30°C에서는 평균 $13.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 으로 간세포 직경이 가장 작게 나타나 수온이 증가함에 따라 간세포 직경이 감소하는 경향이 관찰되었다(Table 17). 넙치는 간세포 직경이 18°C에 평균 $7.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 였으며 이후 22°C에서 평균 $8.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 으로 증가하는 경향을 보였다. 26°C에서는 평균 $10.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 으로 간세포 직경이 가장 크게 나타났고, 30°C에서는 크기가 감소하여 평균 $6.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 으로 가장 작았다(Table 17).

Table 16. Changes of Hepatosomatic index(HSI) in *E. akaara* and *P. olivaceus* under artificially elevating the water temperature condition

Day	initial	4 days	8 days	12 days
	18°C	22°C	26°C	30°C
<i>Epinephelus akaara</i>	1.7±0.3 ^a	1.1±0.1 ^{ab}	0.7±0.1 ^b	0.9±0.1 ^b
<i>Paralichthys olivaceus</i>	0.7±0.1 ^c	1.0±0.1 ^b	1.3±0.1 ^a	1.0±0.1 ^b

* Different lowercase letters above the bars indicate that there are significant differences between groups($P < 0.05$). All values are mean \pm S.E (n=8).

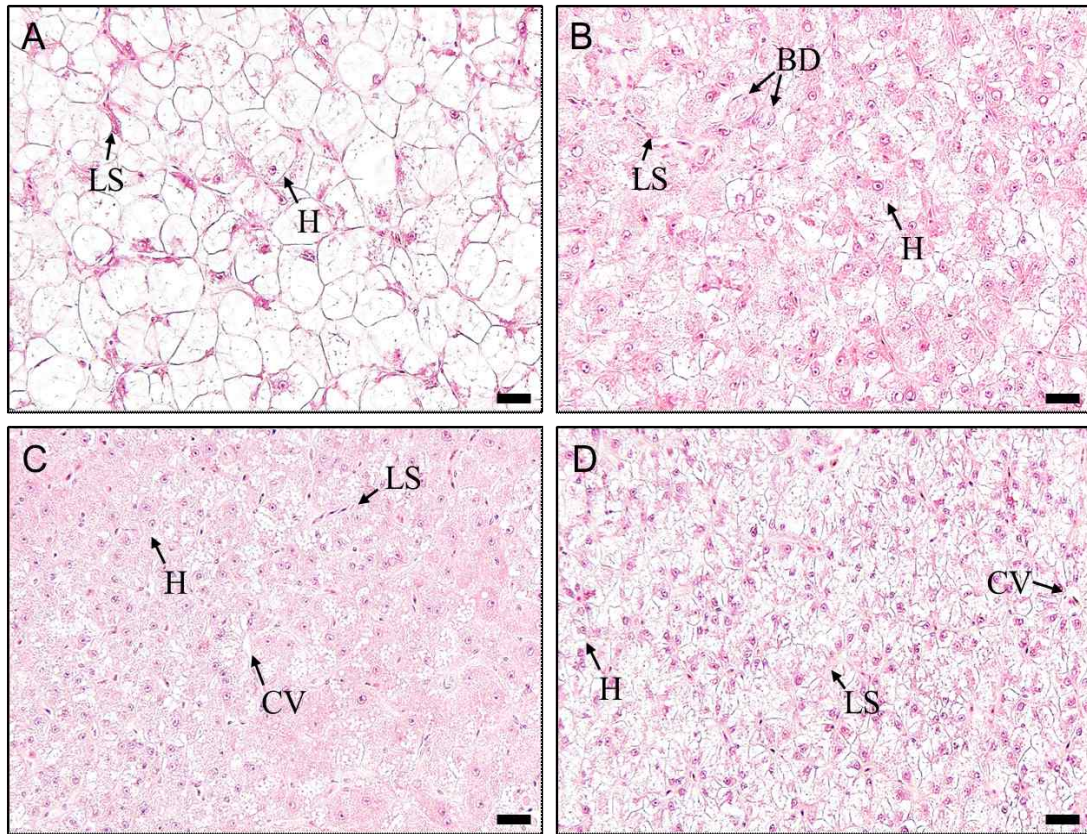


Fig. 16. Photomicrographs of liver tissues in *E. akaara* by HE stain. Initial (A: 18.3°C); 4 days (B: 22.1°C); 8 days (C: 26.1°C); 12 days (D: 30.3°C). H, hepatocyte; LS, liver sinusoid; CV, central vein; BD, bile duct; Scale bar: 20 μ m.

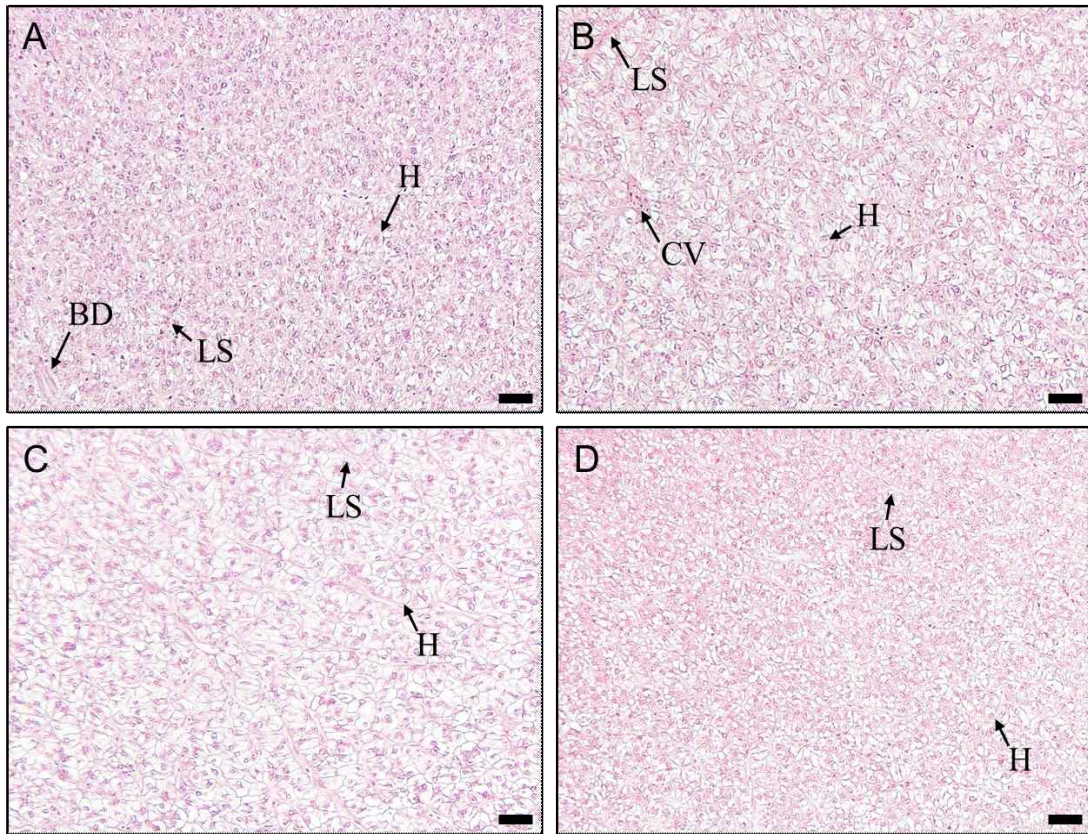


Fig. 17. Photomicrographs of liver tissues in *P. olivaceus* by HE stain. Initial (A: 18.9°C); 4 days (B: 22.4°C); 8 days (C: 26.8°C); 12 days (D: 30.1°C). LS, liver sinusoid; CV, central vein; BD, bile duct; Scale bar: 20 μm .

Table 17. Alternation of hepatocyte diameter (μm) under artificially elevating the water temperature condition in *E. akaara* and *P. olivaceus*

Day	initial	4 days	8 days	12 days
	18°C	22°C	26°C	30°C
<i>Epinephelus akaara</i>	22.1±0.2 ^a	17.9±0.1 ^b	15.5±0.1 ^c	13.6±0.1 ^d
<i>Paralichthys olivaceus</i>	7.5±0.1 ^c	8.3±0.1 ^b	10.3±0.1 ^a	6.1±0.1 ^d

* Different lowercase letters above the bars indicate that there are significant differences between groups ($P < 0.05$). All values are mean \pm S.E (n=400).

IV. 고찰

1. 붉바리 *HSP90*과 *MC2R* 유전자의 클로닝 및 조직별 발현

어류의 성장과 발달은 사육수온, 사육밀도, 먹이공급 등 사육환경 조건에 따라 의존성을 가지고 있으며, 특히 사육 수온은 양식어류의 성장과 생존에 영향을 미치는 가장 중요한 외부환경인자 중 하나로 어종에 따른 적정수온 범위를 벗어나게 되면 스트레스를 유발하고 HSPs 등 관련 유전자 발현 및 HPI 축의 활성화 등 생리적 변화에 영향을 준다. 이 연구는 붉바리와 넙치를 대상으로 사육수온 반응인자 발현을 조사하기 위하여 붉바리에서 *HSP90*과 *MC2R* 유전자의 partial sequencing을 수행하였다. 열충격단백질(Heat Shock Protein, HSP)은 어류에 있어 다양한 환경 스트레스에서 세포의 손상으로부터 보호하며, 체내 항상성을 조절함에 있어 중요한 역할을 수행하는 유전자 집단으로 잘 알려져 있다(Jahan et al., 2023). HSP는 세포 스트레스에 노출될 때 모든 세포 유기체에서 생성되는 다양한 분자량(16-100 kDa)의 고도로 보존된 단백질 집합체이다(Welch 1993). 이 연구에서 붉바리 *HSP90* 유전자를 클로닝한 결과, *HSP90* 유전자의 부분염기서열의 길이는 총 537 bp으로 확인되었다. 확인된 서열은 바리과(Serranidae)의 자바리(longtooth grouper, *Epinephelus moara*)와 가장 높은 100.0%의 상동성을 보였고, 넙치과(Paralichthyidae)의 넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)와 가장 낮은 91.1%의 상동성을 보였다. 분자량의 크기가 90 kDa인 HSP90은 고온 또는 저온 충격과 같은 다양한 스트레스 요인에 의해 상향 조절되며(Palmisano et al., 1999; Hermesz et al., 2001; Wu et al., 2012), 대부분의 세포에서 발현이 보고된다(Csermely et al., 1998). 이 연구에서 분리된 붉바리 *HSP90* 유전자의 조직별 발현 특성을 분석하기 위하여 중추신경조직과 주변조직을 이용하였다. 분석 결과 HSP90은 주변조직 중 간에서 특히적으로 높은 발현을 보였으며, 중추신경조직과 간 이외의 주변조직에서는 발현이 나타났으나 낮은 수준을 보였다. HSP90은 넙치와 점박이 농어, 초어에서 뇌와 간을 포함한 모든 주변조직에서의 발현이 보고된다(Manchado et al., 2008; Shin et al., 2018; Wu et al., 2012). Lai et al., 2014의 연구에서 *HSP90*

mRNA는 Orange-spotted grouper(*Epinephelus coioides*) 간에서 높은 발현을 보이고 뇌와 눈, 비장, 신장에서 낮은 발현을 보였다. 이러한 결과는 *HSP90* mRNA가 붉바리 간에서 가장 높은 발현을 보이고 다른 모든 조직에서도 발현이 나타난 결과와 유사하였다. 멜라노코르틴 2 수용체(MC2R)는 스트레스 반응 과정에서 핵심 신호 분자이며(Aluru & Vijayan, 2008), (포유류에서의 부신피질과 유사한) 간신샘에서 ACTH에 매우 특이적으로 반응하여 활성화된다(Cerdá-Reverter et al., 2011). 이 연구에서 붉바리 MC2R 유전자의 부분염기서열을 클로닝하여 분석한 결과, MC2R은 총 633 bp로 확인되었다. 다른 어종과 아미노산 상동성을 분석한 결과, 바리과(Serranidae)의 자바리(longtooth grouper, *Epinephelus moara*)와 가장 높은 98.6%의 상동성을 보였고, 넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)와 가장 낮은 81.1%의 상동성을 보였다. ACTH 수용체로도 알려진 MC2R은 두부 신장 조직에 간신세포의 원형질막에 존재한다(Mommsen et al., 1999). 이 연구에서 붉바리 MC2R의 부분염기서열을 클로닝 한 후 조직별 발현을 조사한 결과, 중추신경조직인 연수에서 유의적으로 높게 발현되었으며($P < 0.05$), 주변조직에서는 뇌하수체와 아가미, 심장, 난소와 정소, 근육에서 발현을 확인할 수 있었으나 신장에서의 발현이 미비하였다. 포유류에서 MC2R은 부신 스테로이드 합성 및 분비를 조절하는 부신피질에서 주로 발현된다. 경골어류에서 스테로이드 생성 세포는 크로마핀 세포와 함께 두신에 내장되어 포유류 부신의 상동인 신간 기관을 형성한다(To et al., 2007). MC2R은 무지개송어(Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*)에서 간신 조직 외에도 시상하부와 뇌하수체, 안구, 간, 정소, 난소 등의 조직에서 발현되었고(Aluru & Vijayan, 2008), 농어(Sea bass, *Dicentrarchus labrax*)의 경우 뇌, 심장, 아가미, 위에서는 MC2R의 발현이 없었으나 간, 생식소, 두신, 비장, 뇌하수체, 근육, 피부 등에서 발현되며(Agulleiro et al., 2013), 제브라피쉬(Zebrafish, *Danio rerio*)도 정소, 난소, 비장, 두신, 피부에만 발현되었다(Agulleiro et al., 2010). 이와 같이 MC2R은 두신 뿐 아니라 간, 비장, 정소에서 상대적으로 높게 발현되며 잉어와 넙치에서도 유사한 결과가 보고되었다(Metz et al., 2005; Kobayashi et al., 2011).

이 연구에서 붉바리의 *MC2R* mRNA의 조직발현을 조사한 결과 무지개송어,

잉어, 넙치와 유사한 결과를 보였으나, 두신에서 *MC2R* mRNA의 발현 차이가 관찰되었고, 이러한 결과는 붉바리의 종 특이적인 발현 차이로 판단된다.

이 연구결과는 사육환경에 따른 붉바리의 스트레스 반응 메커니즘을 연구하기 위한 기초자료로서 활용될 수 있을 것이라 생각되며, 추후 HSP90과 *MC2R* 유전자들의 조직별 발현 특성과 스트레스 반응에 대한 상관관계를 이해하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

2. 사육수온에 따른 붐바리와 넙치의 생리반응인자들의 발현 변화

어류는 다양한 환경적 요인 중 수온에 가장 민감하며 면역력, 신진대사율, 산소요구량에 직접적인 영향을 미치기 때문에 어류 양식에 있어 사육수온은 성장과 생존을 좌우하는 가장 중요한 환경적 요인 중 하나이다(Yu et al., 2007; Cheng et al., 2018; Mugwanya et al., 2022). 이처럼 사육수온은 양식어류의 건강도에 영향을 미치며 적정 수온의 범위를 벗어나면 스트레스 요인으로 작용하고 이에 대한 적응 전략으로 생리학적 활성 변화가 일어난다(Chrousos & Gold, 1992). 대표적인 생리학적 변화는 열 충격 단백질(heat shock proteins, HSPs)의 합성과 시상하부-뇌하수체-간신(hypothalamus-pituitary-interrenal axis, HPI) 축의 활성화에 따른 코티졸 분비, 활성산소(reactive species, ROS) 생성과 이에 대응하기 위한 항산화 효소 활성화 등이 있다(Barton & Iwama, 1991; Wendelaar & Sjoerd., 1997; Holmblad & Söderhäll 1999; Aluru & Vijayan, 2008; Barton et al., 2002; Evans & Claiborne, 2005; Lesser 2011). 산화 스트레스에 대한 생물학적 반응에 관여하는 항산화 방어에는 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제(superoxide dismutase, SOD)와 카탈라아제(catalase, CAT)와 같은 효소 메커니즘이 있으며(Wilhelm, 1996), ROS의 증가에 따라 SOD와 CAT의 활성화는 여러 연구를 통해 보고되어 있다(Hermes-Lima et al., 1998; Campa-córdova et al., 2002; Mruk et al., 2002; Pörtner, 2002). 이 연구는 붐바리와 넙치를 대상으로 계절별 자연수온 조건과 수온 상승 조건에 따른 사육수온 반응인자의 발현양상을 조사하였다.

연중 조건에서 붐바리와 넙치의 계절적 수온 변화에 따른 사육수온 반응 인자의 발현 변화를 조사한 결과, 붐바리는 저수온 시기인 2월에 열 충격 단백질인 *HSP70* mRNA의 발현이 높았으며 이와 같은 결과는 붐바리를 대상으로 한 이전 연구와 나일틸라피아를 대상으로 한 연구 결과와 유사하였다. Min et al. (2018)은 히터와 냉각기가 설치된 수조에 12, 15, 18, 21°C로 구간을 나누어 각각 붐바리(평균 체중 75.0±10.5 g, 평균 전장 11.2±1.5 cm)를 20마리씩 수용해 48시간 각각의 수온조건에 노출 시켰다. 이후 각 실험조건 내 붐바리의 간에서 *HSP70*의 발현을 분석한 결과 12°C와 15°C 그룹에서 21°C 그룹에 비해 유의적

인 차이를 보였으며 낮은 수온으로 갈수록 높은 발현 값을 보였다. Yilmaz et al., (2021)의 연구에서는 28°C에서 시간당 1°C씩 사육수온을 낮추어 최종 12°C까지 냉각시키는 조건에서 적정 사육수온이 27-30°C인 나일틸라피아 (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*)(평균 체중: 37.05±0.04 g)(Azaza et al., 2008)를 사육한 결과, 사육수온이 낮아짐에 따라 간에서 HSP70과 HSP90 mRNA의 발현이 높게 나타났다. 이러한 연구 결과는 적정 사육수온이 26-30°C인 어류는 고수온 보다 저수온 시기에 스트레스를 더 많이 받으며 HSP70과 HSP90을 사용하여 이에 대응하는 것으로 사료 된다.

넙치를 대상으로 수행했던 계절적 수온변화에 따른 HSP 발현 연구 결과에서는 평균 수온 27.8±0.3°C인 8월에 HSP70, HSP90 mRNA가 간에서 높게 발현하는 것을 관찰하였다. Bildik et al., (2019)는 700-800g 정도 되는 적정 사육수온 14-16°C인 도미과 어류(Gilthead sea bream, *Sparus aurata*)를 터키에 한 양식장에서 1월부터 7월까지 (18-27°C)에 사육한 결과, 수온이 증가하면서 *S. aurata*의 간에서 HSP70과 HSP90 단백질 합성을 유도하는 것을 확인하였다. Kim et al., (2019)은 20°C에서부터 30°C에 도달할 때까지 일일 1°C씩 수온을 상승시키는 조건에서 넙치(평균 체중 27.96±3.07 g, 평균 전장 13.4±1.4 cm)를 사육하였고 각 20, 22, 24, 26, 28, 30°C에 노출된 넙치를 대상으로 간에서 HSP70의 발현을 조사하였다. 그 결과 수온 28, 30°C 조건에서 HSP70의 수치가 유의하게 증가했다고 보고하였다. 이를 통해 도미과 어류와 넙치를 비롯한 저수온 적정 어류는 고수온 조건에서 스트레스를 받는 것으로 판단하였다. 이러한 연구 결과들은 어종에 따라 HSP의 활성화에 미치는 수온조건이 다름을 제시하고 있으며, 이를 바탕으로 이 실험에서 붉바리와 넙치는 각각 저수온 시기와 고수온 시기에 수온스트레스에 대한 세포 방어기전 활성화를 위하여 HSP70과 HSP90 mRNA의 발현이 증가한 것으로 사료 된다. 하지만 사육수온을 상승 조절시킨 조건에서 사육된 붉바리와 넙치 모두 수온이 증가함에 따라 HSP70과 HSP90 mRNA의 발현이 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 사육수온의 급격한 상승이 급성 스트레스를 유발시켰을 것이며, 이에 대응하기 위하여 HSP70과 HSP90 mRNA의 발현이 증가된 것으로 사료 된다. Deane & Woo (2005)는 적정사육수온이 14-16°C인 도미과 어류(Silver sea bream, *Sparus sarba*)를 2

5°C에서 사육한 control 그룹, 히터봉을 사용하여 사육수온을 25°C에서 시작해 0.12°C/min씩 상승시켜 32°C까지 높여준 후, 2시간동안 노출시킨 heat-shock 그룹, 그리고 이후 히터봉을 빼주어 수온이 다시 25°C로 감소하는 조건에서 하루간 사육한 heat-shock/recovery 그룹에서 사육하였고, 실험어의 간에서 *HSP70* mRNA의 발현을 조사한 결과 *HSP70*이 급성 열 스트레스에 의해 발현이 높게 나타난 것으로 보고하였다. Qin et al., (2023)은 점박이 농어 (Spotted Seabass, *Lateolabrax maculatus*)를 대상으로 23°C에서 3°C/h 조건으로 32°C까지 수온을 상승시킨 후 노출 시간이 지남에 따른 급성 열 스트레스에 대한 생리적 반응을 조사한 결과, 노출 시간이 지속될수록 간에서 *HSP70*과 *HSP90* mRNA의 발현이 높게 나타났다. 강도다리를 대상으로 16°C에서 34°C까지 12시간마다 1°C씩 상승시켜주어 급성 열 스트레스 반응을 조사한 결과, 간에서 *HSP70*과 *HSP90* mRNA의 발현은 수온이 높아짐에 따라 증가하여 28°C에서 유의적으로 발현이 높았고($P < 0.05$), 이후 30°C에서는 다시 급격히 감소하는 경향이 나타났다(Lee et al., 2021). 추후 급성스트레스와 *HSP70*과 *HSP90* mRNA의 상관관계를 규명하기 위한 연구가 필요하다고 생각된다.

부신피질자극호르몬분비호르몬 (CRH)에 의해 유도된 부신피질자극호르몬 (ACTH)이 두신에 있는 간신샘에 도달하면 멜라노코르틴 2 수용체(MC2R)와 결합하고 활성화하여 간신 조직에 의한 코티졸의 합성 및 방출을 초래한다(Wendelaar & Sjoerd., 1997; Mommsen et al., 1999). 계절에 따른 수온조건에서 붉바리의 경우, *CRH*와 *MC2R* mRNA는 각각 저수온 시기인 11월과 2월에 높게 발현하였다. 이와 대조적으로 넙치에서 고수온 시기인 8월에 *CRH*와 *MC2R*의 발현이 높을 거라는 예상과 달리 *CRH*와 *MC2R* mRNA 발현이 고수온 시기에 하향 조절되었다. Luo et al., (2014)은 적정 수온 범위가 25-31°C인 제브라피쉬(Sfakianakis et al., 2011)의 자어(n = 200; 평균 전장 2.8~3.9 cm)를 대상으로 28°C에서 각각 18°C와 38°C로 수온을 조절하여 노출 시켰고, 저온스트레스(18°C)에서와 고온스트레스(38°C) 조건에서 *CRH* mRNA의 발현은 모두 28°C에 비해 감소하는 경향이 나타났다. Goikoetxea et al., (2021)의 연구에서는 적정 수온 범위 22-25°C인 유럽 농어(European seabass, *Dicentrarchus labrax*) (Barnabé, 1991)를 16°C과 21°C에서 사육한 결과, 21°C에서보다 16°C

에서 두신에서의 *MC2R* mRNA의 발현이 증가했다. 스트레스 반응 중 CRH와 MC2R은 어류의 발달 상태와 스트레스 요인의 크기 또는 기간(장기, 단기)에 따라 발현 수준이 달라지는 것으로 사료 된다.

한편 사육수온 상승 조절 조건에서 붉바리의 경우, CRH는 18°C에서 발현이 높았다가 이후 수온이 증가할수록 감소하는 경향을 보였고, 30°C에서 다시 높게 발현하였다. 반면 MC2R는 18°C에서 발현이 낮게 나타났고, 30°C에서 높게 발현하였다. 넙치에서 CRH는 18°C에서 22°C로 수온이 상승하면서 발현이 높아진 경향이 나타났으나 이후 수온상승에 따른 발현 변화를 확인할 수 없었고, MC2R은 22°C에서 26°C로 수온이 증가할수록 감소된 발현 경향을 보였다. 그러나 Uchimura et al.,에서 메다카를 대상으로 각 26°C와 33°C 조건에서 14시간의 명기와 10시간의 암기 속에서 사육한 결과에서는 시상하부에서 CRH와 HSP70의 발현 모두 세포의 열 충격으로 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

붉바리와 넙치를 대상으로 한 이 연구 결과는 CRH와 MC2R이 직접적인 관계에 있지 않아 발현 결과가 상이하게 나타난 것으로 사료 되며, 수온과 CRH, 그리고 MC2R 발현 메커니즘 간의 상관관계에 대해서 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 사료 된다.

급격한 수온 변화는 과도한 활성산소(ROS)를 유발하여 어류의 건강 상태를 악화시킬 수 있다(Pottinger et al., 1992). 생성된 ROS는 SOD와 CAT를 포함한 항산화 효소에 의해 제거된다(Cohen, 1994). 이 연구에서 붉바리의 경우, *SOD*, *CAT* mRNA 발현은 5월, 8월, 11월에 비해 2월에 높게 발현되었으며, 넙치의 같은 경우 8월에 유의하게 높은 발현 값을 나타냈다. 항산화 효소의 수온에 따른 변화를 보면 붉바리를 대상으로 자연 수온 조건(12.9~19.0°C)과 20, 26, 32°C 조건에서 12주간 붉바리를 사육한 결과, 고수온 그룹보다 저수온 그룹에서 사육된 붉바리의 간에서 *SOD*와 *CAT* mRNA 발현이 증가했으며(Kim et al., 2023), 넙치는 사육수온 20, 25, 30°C 조건에서 *SOD*와 *CAT* mRNA 발현을 비교한 결과, 25°C와 30°C에서 사육한 넙치 간 조직에서 항산화 효소 *SOD*, *CAT* mRNA가 유의적으로 높은 발현 값을 나타냈다(Shin et al., 2010). He et al., (2015)에서는 저수온(13°C)에서 나일틸라피아 (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*)를 사육한 결과, 간에서 *SOD*와 *CAT* mRNA의 발현이 높았고, Jiang

et al., (2021)가 3 가지 수온 조건(13°C, 17°C, 21°C)에서 적정 수온 범위 15-16°C인 무지개송어를 사육한 결과(Jalabert & Fostier, 2010), 13, 17°C에 비해 21°C에서 *SOD*와 *CAT* mRNA가 높게 발현하였다. 열 스트레스 중 ROS 형성은 고열의 직접적인 결과로 발생할 수 있지만(Abele et al., 2002; Freire et al., 2011; Lushchak, 2011) 항상성 회복 중 조직 재산소화의 결과로도 발생할 수 있다(Halliwell & Gutteridge, 2015). 또한 ROS는 HSP를 유도한다고 알려져 있는데(Scarpecci et al., 2008; Lesser, 2011) 이 연구에서 붉바리가 저수온 시기에 *SOD*와 *CAT*의 발현이 높게 나타난 결과가 *HSP70*과 *HSP90*의 발현 결과와 일치한 점, 넙치가 고수온 시기에 *SOD*와 *CAT*의 발현이 높았을 때 *HSP70*과 *HSP90*도 마찬가지로 발현이 높게 나타난 결과를 볼 때, 붉바리는 저수온 조건에서, 넙치는 고수온 조건에서 세포 내 변성이 일어나 항산화 인자와 열충격단백질을 통해 항상성 조절이 일어나는 것으로 사료 된다. 하지만 사육수온 상승 조절 실험 결과에서 *SOD*와 *CAT* mRNA의 발현이 붉바리는 수온에 따라 증가하는 경향이 나타났는데, 붉바리의 경우 26°C로 증가하는 것이 적정 수온조건으로의 증가일 수 있으나 단기간동안 수온을 증가시킴으로서 급성 스트레스를 유발하여 계절별 수온 변화에 따른 발현 결과와 다른 결과가 나타났다. 그러므로 지속적인 수온 증가에 따른 항상성, ROS 생성에 대응하기 위하여 항산화 효소의 발현이 증가한 것으로 사료 된다. 넙치는 오히려 수온이 증가함에 따라 항산화 효소 유전자의 발현이 감소하는 경향이 관찰되었으며, 이는 계절적 수온 변화에 따라 나타난 결과와 반대의 경향을 나타냈다. 저수온도 어류에 있어 산화적 스트레스를 유발하는 요인으로 작용할 수 있다. Cheng et al., (2017)은 적정 수온이 23-32°C인 복어류(*Takifugu obscurus*)를 대상으로 25°C에서부터 13°C까지 시간당 1°C씩 수온을 감소 시키는 조건에서 항산화 효소 발현을 조사하였다. 그 결과, 복어 간에서 *SOD* mRNA의 발현은 21°C와 17°C에서 유의적으로 높게 발현하였으며, *CAT* mRNA는 25°C에서 17°C까지 수온이 감소되는 동안 비슷한 발현 수준을 유지하다가 13°C에서 유의적으로 높은 발현을 나타냈다($P < 0.05$). 이 연구에서는 저온스트레스가 ROS 생성을 증가시킬 수 있으며, 이로 인해 과잉 생산된 ROS에 의해 세포 DNA 손상을 유발하여 저수온 조건에서 항산화 효소의 발현이 높았음을 제시하고 있다. 터봇 (turbot, *Scophthalmus maximus*)의 적정 사육

수온은 16-19°C이다(Imsland et al., 2001; Imsland et al., 2008). Gerreiro et al. (2014)은 터봇(평균 체중 31.6±0.02 g)을 15.2±0.7°C 및 20.4±0.8°C 수온 조건에서 사육하여 산화 스트레스 반응을 조사하였으며, 고온(20°C)이 간의 항산화 능력을 손상시켜 항산화 효소의 발현이 낮았다고 제시하였다. Jia et al., (2020)에서도 터봇(106.96±15.71 g)을 가지고 18°C에서부터 27°C로 일일 1°C씩 사육수온을 상승시키는 조건에서 산화 스트레스 반응을 조사한 결과, 27°C에서 SOD 및 CAT의 활성을 현저하게 감소시켰음을 시사하였다. 비록 넙치를 대상으로 수행했던 연구 결과에서 수온증가에 따른 항산화 효소 유전자의 발현 감소에 대한 원인을 확인할 수 없었지만, 터봇의 연구 결과와 같이 수온스트레스가 정상적인 항산화 효소 유전자 발현 활성에 영향을 미칠 수 있었을 것으로 생각된다.

탄수화물과 지질을 저장하는 주요 장기 중 하나인 간은 소화 및 대사 과정에 직접 관여하며 다양한 생리적 기능(성장, 면역, 독성, 영양상태, 생식 등)을 조절하는 어류의 핵심 기관으로 다양한 생리적 작용과 관련된 반응을 확인하기 위한 지표로 많은 실험에 이용되어왔다(Hatlen et al., 2005; Zeng et al., 2010; Maharajan et al., 2016; Maftuch et al., 2018; Sun et al., 2019). 고수온 사육환경이 어류의 간 구조에 변화를 일으키고 기능에 영향을 미칠 수 있다는 사실은 많은 연구를 통해 보고되었다(Liu et al., 2016; Wang et al., 2019; Dawood et al., 2022). Kim et al., (2023)에서 *E. akaara*의 간 조직의 연중 조직학적 특성 변화를 조사한 결과, 6월과 10월에 간세포 직경이 가장 컸으며 고수온 시기인 8월에 간세포 직경의 감소가 확인되었고, 이후 12월부터 다음 해 4월까지 간세포 직경이 감소하는 양상을 나타냈다. Islam et al., (2020)도 적정 사육 수온범위 22-24°C인 유럽 농어(European seabass, *Dicentrarchus labrax*)(Claridge & Potter, 1983)를 8°C, 16°C, 24°C 및 32°C에서 사육하였을 때 8°C에서 사육된 어류의 간세포에 비해 32°C에서 큰 지방방울이 형성되며 직경이 증가한 간세포가 확인되었으며, 이는 적정 수온이 27-28°C인 파이크퍼치(pikeperch, *Sander lucioperca*)(Deelder & Willemsen, 1964, Hokanson, 1977)를 각각 23, 30, 32, 34°C에서 사육한 결과, 수온이 증가함에 따라 34°C에서 과한 지방방울이 확인되면서 간세포 직경이 커진 결과와도 유사하였다(Liu et al., 2022). 그러나 계절적 수온 변화에 따라 붉바리와 넙치를 조사하였을 때, 두

어류 모두 수온이 증가함에 따라 간세포 직경은 감소하고 저수온 시기에 간세포 직경이 커지는 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 종에 따른 계절적인 번식 특성에 따라 나타난 것으로 사료 된다. 붐바리는 고수온 시기인 7~8월이 산란시기이므로(Lee et al., 2020) 난모세포 성숙 및 산란에 따른 에너지 소비로 인해 간세포가 작게 나타나며, 저수온 시기에는 체내 항상성을 유지하기 위해 간세포 내 지방을 축적하여 간세포 직경이 크게 나타난 것으로 판단된다. 넙치는 여름철 고수온에 의해 대사가 빨라져 간세포의 직경이 작게 나타난 것으로 생각되며, 11월 저수온 시기에는 3-4월 산란을 위한 난황 형성 준비를 위해 간세포 내 지방 축적을 하므로(Kim et al., 2013) 간세포 크기가 크게 나타나는 것으로 생각된다. 한편 사육수온 상승 조절 조건에서 붐바리와 넙치의 간세포 직경의 변화를 조사한 결과, 붐바리는 수온이 증가함에 따라 직경이 감소하여 계절적 수온에 따른 변화에 대한 결과와 일치하였다. 반면 넙치의 경우, 수온이 증가함에 따라 간세포 직경이 증가하여 26°C에서 유의적으로 크게 나타났고, 이후 30°C에서 크기가 감소하여 간세포 직경이 가장 작게 나타났다. 고수온이 과도한 사료 섭취, 이로 인한 과도한 영양분 섭취로 인한 이상지방방울이 형성된 것으로 생각되며, 추후 사료 섭취량 또는 사료 영양성분에 따른 간세포 크기에 변화를 규명하기 위한 연구가 필요하다고 생각된다.

모든 어류는 적정 수온 범위를 갖고 있으나 살아가면서 다양한 수온 변화를 통해 스트레스에 노출되며, 이러한 스트레스에 대한 대응이나 적응은 어류의 생존과 성장에 있어 중요하다. 어류는 스트레스에 대한 대응이나 적응의 방편으로서 다양한 방어기작을 보유하고 있으며, 열충격단백질 (Heat shock protein, HSP)은 여러 방어기작 중 모든 생물 종에서 공통적으로 나타나는 기작이다. 어류에 대한 적정 사육 수온을 제시하는 증거로서 성장률, 사료 섭취 및 사료 전환 효율, 혈중 코티졸 농도 조사 등 다양한 연구들이 이루어졌으나 적정수온에 대한 HSP의 발현 수치 기준에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.

이 연구에서 붐바리는 저수온 조건에서, 넙치는 고수온 조건에서 HSP 등 사육수온 반응 인자들이 더 민감하게 반응하였다. 이러한 연구결과는 수온 내성이 다른 두 어종 붐바리와 넙치의 적정 사육 시스템 개발을 위한 기초 정보로서 사용될 수 있을 것이라 생각된다. 추후 대상 어류의 개체 크기별 및 사육밀도, 먹

이, 환경조건, 생식소 발달 상태 등 다양한 사육조건 및 생리적 상태 정보를 기반으로 HSP 등 관련 반응인자들의 발현 메커니즘을 조사함으로써 수온에 따른 성장과 대사 작용을 저해하는 수온 조건을 밝힐 수 있는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

- Abele, D., Heise, K., Portner, H. O., & Puntarulo, S. (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology*, 205(13), 1831-1841.
- Agulleiro, M. J., Roy, S., Sánchez, E., Puchol, S., Gallo-Payet, N., & Cerdá-Reverter, J. M. (2010). Role of melanocortin receptor accessory proteins in the function of zebrafish melanocortin receptor type 2. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 320(1-2), 145-152.
- Agulleiro, M. J., Sánchez, E., Leal, E., Cortés, R., Fernández-Durán, B., Guillot, R., Davis, P., Dores, R. M., Gallo-Payet, N., & Cerdá-Reverter, J. M. (2013). Molecular characterization and functional regulation of melanocortin 2 receptor (MC2R) in the sea bass. A putative role in the adaptation to stress. *PLoS One*, 8(5), e65450.
- Alderman, S. L., McGuire, A., Bernier, N. J., & Vijayan, M. M. (2012). Central and peripheral glucocorticoid receptors are involved in the plasma cortisol response to an acute stressor in rainbow trout. *General and comparative endocrinology*, 176(1), 79-85.
- Alsop, D., & Vijayan, M. M. (2009). Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(1), 49-54.
- Aluru, N., & Vijayan, M. M. (2008). Molecular characterization, tissue-specific expression, and regulation of melanocortin 2 receptor in rainbow trout. *Endocrinology*, 149(9), 4577-4588.
- Ananthan, J., Goldberg, A. L., & Voellmy, R. (1986). Abnormal proteins

- serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*, 232(4749), 522-524.
- Azaza, M. S., Dhraief, M. N., & Kraiem, M. M. (2008). Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *Journal of thermal Biology*, 33(2), 98-105.
- Barnabé, G. (1991). Grossissement des poissons en élevage intensif. Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Lavoisier-Tec & Doc, Paris, 422-451.
- Barton, B. A., & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of fish diseases*, 1, 3-26.
- Barton, B. A., Morgan, J. D., & Vijayan, M. M. (2002). Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*, 111-148.
- Bernier, N. J. (2006). The corticotropin-releasing factor system as a mediator of the appetite-suppressing effects of stress in fish. *General and comparative endocrinology*, 146(1), 45-55.es and *Aquatic Sciences*, 53(4), 506-514.
- Bildik, A., Asıcı Ekren, G., Akdeniz, G., & Kiral, F. (2019). Effect of enviromental temperature on heat shock proteins (HSP30, HSP70, HSP90) and IGF-I mRNA expression in *Sparus aurata*.
- Boo, M. S., Lee, C. H., Kim, B. H., Kim, M. S., Kim, D. G., Baek, H. J., Kim, H. B., & Lee, Y. D. (2020). Management and development of seed rearing in red spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Korean Journal of Fisheri*
- Campa-córdova, A. I., Hernandez-Saavedra, N. Y., & Ascencio, F. (2002). Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative*

- biochemistry and physiology part C: *Toxicology & pharmacology*, 133(4), 557-565.
- Cascarano, M. C., Stavrakidis-Zachou, O., Mladineo, I., Thompson, K. D., Papandroulakis, N., & Katharios, P. (2021). Mediterranean aquaculture in a changing climate: temperature effects on pathogens and diseases of three farmed fish species. *Pathogens*, 10(9), 1205.
- Cerdá-Reverter, J. M., Agulleiro, M. J., Guillot, R., Sanchez, E., Ceinos, R., & Rotllant, J. (2011). Fish melanocortin system. *European journal of pharmacology*, 660(1), 53-60.
- Chang, C. H., Huang, J. J., Yeh, C. Y., Tang, C. H., Hwang, L. Y., & Lee, T. H. (2018). Salinity effects on strategies of glycogen utilization in livers of euryhaline milkfish (*Chanos chanos*) under hypothermal stress. *Frontiers in Physiology*, 9, 81.
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 259-284.
- Cheng, C. H., Ye, C. X., Guo, Z. X., & Wang, A. L. (2017). Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. *Fish & shellfish immunology*, 64, 137-145.
- Cheng, C. H., Guo, Z. X., Luo, S. W., & Wang, A. L. (2018). Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 150, 190-198.
- Choi, S. H., Kim, B. H., Lee, C. H., & Lee, Y. D. (2020). Response of body color change rearing under different light intensity conditions in farmed red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 23(1), 1-9.
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis.

- Jama*, 267(9), 1244-1252.
- Chu, P., Wang, S., Yu, W., Wang, A., Zong, Y., Yin, S., Zhao, C., & Wang, T. (2024). The impact of extremely low-temperature changes on fish: A case study on migratory bony fishes (*Takifugu fasciatus*). *Aquaculture*, 579, 740155.
- Claridge, P. N., & Potter, I. C. (1983). Movements, abundance, age composition and growth of bass, *Dicentrarchus labrax*, in the Severn Estuary and inner Bristol Channel. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 63(4), 871-879.
- Cohen, G. (1994). Enzymatic/Nonenzymatic Sources of Oxyradicals and Regulation of Antioxidant Defenses a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738(1), 8-14.
- Čvoro, A., Dundjerski, J., Trajković, D., & Matić, G. (1998). Association of the rat liver glucocorticoid receptor with Hsp90 and Hsp70 upon whole body hyperthermic stress. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 67(4), 319-325.
- Das, S. K., Xiang, T. W., Noor, N. M., De, M., Mazumder, S. K., & Goutham-Bharathi, M. P. (2021). Temperature physiology in grouper (*Epinephelinae: Serranidae*) aquaculture: A brief review. *Aquaculture Reports*, 20, 100682.
- Dawood, M. A., Noreldin, A. E., & Sewilam, H. (2022). Blood biochemical variables, antioxidative status, and histological features of intestinal, gill, and liver tissues of African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to high salinity and high-temperature stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(37), 56357-56369.
- Deane, E. E., & Woo, N. Y. (2005). Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochemical and biophysical research communications*, 330(3),

776-783.

- Deelder, C. L., & Willemsen, J. (1964). *Synopsis of Biological Data on Pike-perch: Lucioperca Lucioperca (Linnaeus) 1758*. Fisheries Division, Biology Branch, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Eachus, H., Ryu, S., Placzek, M., & Wood, J. (2022). Zebrafish as a model to investigate the CRH axis and interactions with DISC1. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 100383.
- Evans, D. H., & Claiborne, J. B. (2005). *The physiology of fishes*. CRC press.
- Farjam, A. S. (2011). *Heat Shock Proteins as Modifying Factors in Physiological Stress Responses in Poultry* (Doctoral dissertation, Universiti Putra Malaysia).
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61(1), 243-282.
- Fink, A. L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological reviews*, 79(2), 425-449.
- Freire, C. A., Welker, A. F., Storey, J. M., Storey, K. B., & Hermes-Lima, M. (2011). Oxidative stress in estuarine and intertidal environments (temperate and tropical). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, 41-57.
- Goikoetxea, A., Sadoul, B., Blondeau-Bidet, E., Aerts, J., Blanc, M. O., Parrinello, H., Barrachina, C., Pratlong, M., & Geffroy, B. (2021). Genetic pathways underpinning hormonal stress responses in fish exposed to short-and long-term warm ocean temperatures. *Ecological Indicators*, 120, 106937.
- Gorissen, M., & Flik, G. (2016). The endocrinology of the stress response in fish: an adaptation-physiological view. In *Fish physiology* (Vol.

- 35, pp. 75-111). Academic Press.
- Guerreiro, I., Pérez-Jiménez, A., Costas, B., & Oliva-Teles, A. (2014). Effect of temperature and short chain fructooligosaccharides supplementation on the hepatic oxidative status and immune response of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 40(2), 570-576.
- Hallare, A. V., Kohler, H. R., & Triebkorn, R. (2004). Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*, 56(7), 659-666.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine. *Oxford university press*, USA.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2011). Fish health aspects in grouper aquaculture. *Aquaculture*, 320(1-2), 1-21.
- Hartman, D., & Gething, M. (1996). Normal protein folding machinery. *Stress-inducible cellular responses*, 3-24.
- Hatlen, B., Grisdale-Helland, B., & Helland, S. J. (2005). Growth, feed utilization and body composition in two size groups of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in protein and carbohydrate content. *Aquaculture*, 249(1-4), 401-408.
- Herget, U., Wolf, A., Wullimann, M. F., & Ryu, S. (2014). Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *Journal of Comparative Neurology*, 522(7), 1542-1564.
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M., & Storey, K. B. (1998). Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 120(3), 437-448.

- He, J., Qiang, J., Yang, H., Xu, P., Zhu, Z. X., & Yang, R. Q. (2015). Changes in the fatty acid composition and regulation of antioxidant enzymes and physiology of juvenile genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), subjected to short-term low temperature stress. *Journal of thermal biology*, 53, 90-97.
- Hermesz, E., Abraham, M., & Nemcsok, J. (2001). Identification of two hsp90 genes in carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 129(4), 397-407.
- Hokanson, K. E. (1977). Temperature requirements of some percids and adaptations to the seasonal temperature cycle. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 34(10), 1524-1550.
- Holmblad, T., & Söderhäll, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172(1-2), 111-123.
- Imsland, A. K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M. H., FitzGerald, R., Bonga, S. W., Ham, E. V., Nævdal, G., & Stefansson, S. O. (2001). The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 198(3-4), 353-367.
- Imsland, A. K., Gunnarsson, S., Asgeirsson, A., Roth, B., Schram, E., & Foss, A. (2008). Commercial-scale validation of temperature-step rearing on growth physiology in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(5), 684-691.
- Islam, M. J., Kunzmann, A., Bogner, M., Meyer, A., Thiele, R., & Slater, M. J. (2020). Metabolic and molecular stress responses of European seabass, *Dicentrarchus labrax* at low and high temperature extremes. *Ecological Indicators*, 112, 106118.
- Islam, M. J., Kunzmann, A., Henjes, J., & Slater, M. J. (2021). Can dietary manipulation mitigate extreme warm stress in fish? The case of

- European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 545, 737153.
- Jahan, K., Nie, H., & Yan, X. (2023). Revealing the potential regulatory relationship between HSP70, HSP90 and HSF genes under temperature stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 134, 108607.
- Jalabert, B., & Fostier, A. (2010). La truite arc-en-ciel: De la biologie à l'élevage. Editions Quae.
- Jia, Y., Chen, X., Wang, Z., Meng, Z., Huang, B., & Guan, C. (2020). Physiological response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*. L) during hyperthermal stress. *Aquaculture*, 529, 735645.
- Jiang, X., Dong, S., Liu, R., Huang, M., Dong, K., Ge, J., Gao, Q., & Zhou, Y. (2021). Effects of temperature, dissolved oxygen, and their interaction on the growth performance and condition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Thermal Biology*, 98, 102928
- Kim, B. H., Choi, S. H., Lee, Y. D., & Lee, C. H. (2023). Annual changes in ovarian development stages of farmed female red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*, and inducing sexual maturity using photoperiod manipulation. *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(4), 1040-1053.
- Kim, B. H., Hur, S. P., Choi, S. H., Lee, Y. D., & Lee, C. H. (2023). Exploring Rearing Water Temperature Conditions for Inducing Body Growth without Water Temperature Stress in Red-Spotted Grouper (*Epinephelus akaara*). *Ocean Science Journal*, 58(4), 25.
- Kim, I. S., Choi, Y., Lee, C. L., Lee, Y. J., Kim, B. J., & Kim, J. H. (2005). Illustrated book of Korean fishes. *Kyo-Hak Publishing Co., Seoul*, 615.
- Kim, B. H., Lee, C. H., Hur, S. W., Hur, S. P., Kim, D. H., Suh, H. L., Kim, S. Y., & Lee, Y. D. (2013). Long photoperiod affects gonadal development in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Development*

& *Reproduction*, 17(3), 241.

- Kim, J. H., Kim, S. K., & Hur, Y. B. (2019). Temperature-mediated changes in stress responses, acetylcholinesterase, and immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* in a bio-floc environment. *Aquaculture*, 506, 453-458.
- Kobayashi, Y., Chiba, H., Yamanome, T., Schiöth, H. B., & Takahashi, A. (2011). Melanocortin receptor subtypes in interrenal cells and corticotropic activity of α -melanocyte-stimulating hormones in barfin flounder, *Verasper moseri*. *General and Comparative Endocrinology*, 170(3), 558-568.
- Kregel, K. C. (2002). Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of applied physiology*, 92(5), 2177-2186.
- Lai, Y. X., Jin, B. L., Xu, Y., Huang, L. J., Huang, R. Q., Zhang, Y., Kwang, J., He, J. G., & Xie, J. F. (2014). Immune responses of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, against virus-like particles of betanodavirus produced in *Escherichia coli*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 157(1-2), 87-96.
- LeBlanc, S., Hoglund, E., Gilmour, K. M., & Currie, S. (2012). Hormonal modulation of the heat shock response: insights from fish with divergent cortisol stress responses. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(1), R184-R192.
- Lee, C. H., Hur, S. W., Kim, B. H., Soyano, K., & Lee, Y. D. (2020). Induced maturation and fertilized egg production of the red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*, using adaptive physiology of photoperiod and water temperature. *Aquaculture Research*, 51(5), 2084-2090.
- Lee, H. B., Yoon, J. H., Park, J. Y., Lee, I. Y., & Lim, H. K. (2021). A

- comparison of the physiological responses to heat stress of juvenile and adult starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 73, 1-15.
- Lesser, M. P. (2011). Oxidative stress in tropical marine ecosystems. *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, 7-19.
- Liu, B., Xu, P., Brown, P. B., Xie, J., Ge, X., Miao, L., Zhou, Q., Ren, M., & Pan, L. (2016). The effect of hyperthermia on liver histology, oxidative stress and disease resistance of the Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala*. *Fish & Shellfish Immunology*, 52, 317-324.
- Liu, E., Zhao, X., Li, C., Wang, Y., Li, L., Zhu, H., & Ling, Q. (2022). Effects of acute heat stress on liver damage, apoptosis and inflammation of pikeperch (*Sander lucioperca*). *Journal of thermal biology*, 106, 103251.
- Luo, L., Chen, A., Hu, C., & Lu, W. (2014). Dynamic expression pattern of corticotropin-releasing hormone, urotensin I and II genes under acute salinity and temperature challenge during early development of zebrafish. *Fish physiology and biochemistry*, 40, 1877-1886.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.
- Maftuch, M., Sanoesi, E., Farichin, I., Saputra, B. A., Ramdhani, L., Hidayati, S., Fitriyah, N., & Prihanto, A. A. (2018). Histopathology of gill, muscle, intestine, kidney, and liver on *Myxobolus* sp.-infected Koi carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of parasitic diseases*, 42, 137-143.
- Maharajan, A., Kitto, M. R., Paruruckumani, P. S., & Ganapiriya, V. (2016). Histopathology biomarker responses in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) exposed to copper. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 77, 21-30.

- Makrinos, D. L., & Bowden, T. J. (2016). Natural environmental impacts on teleost immune function. *Fish & Shellfish Immunology*, 53, 50-57.
- Maulvault, A. L., Barbosa, V., Alves, R., Custodio, A., Anacleto, P., Repolho, T., Ferreira, P. P., Rosa, R., Marques, A., & Diniz, M. (2017). Ecophysiological responses of juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to increased temperature and dietary methylmercury. *Science of the Total Environment*, 586, 551-558.
- Ma, X. Y., Qiang, J., He, J., Gabriel, N. N., & Xu, P. (2015). Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 937-950.
- Metz, J. R., Geven, E. J., van den Burg, E. H., & Flik, G. (2005). ACTH, α -MSH, and control of cortisol release: cloning, sequencing, and functional expression of the melanocortin-2 and melanocortin-5 receptor in *Cyprinus carpio*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(3), R814-R826.
- Min, B. H., Hur, J. W., & Park, H. J. (2018). Molecular Cloning and Expression Analysis of Red-spotted Grouper, *Epinephelus akaara* Hsp70. *Journal of Life Science*, 28(6), 639-647.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in fish biology and fisheries*, 9, 211-268.
- Mruk, D. D., Silvestrini, B., Mo, M. Y., & Cheng, C. Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase—a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65(4), 305-311.

- Mugwanya, M., Dawood, M., Kimera, F., & Sewilam, H. (2022). Anthropogenic temperature fluctuations and their effect on aquaculture: A comprehensive review. *Aquaculture and Fisheries*, 7 (3), 223-243.
- National Fisheries Researches and Development Institute. (2006) Standard Manual of Olive Flounder Culture. *National Fisheries Researches and Development Institute, Busan, Korea.*
- Nover, L., & Scharf, K. D. (1997). Heat stress proteins and transcription factors. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53, 80-103.
- Noon, L. A., Franklin, J. M., King, P. J., Goulding, N. J., Hunyady, L., & Clark, A. J. (2002). Failed export of the adrenocorticotrophin receptor from the endoplasmic reticulum in non-adrenal cells: evidence in support of a requirement for a specific adrenal accessory factor. *Journal of Endocrinology*, 174(1), 17-25.
- Palmisano, A. N., Winton, J. R., & Dickhoff, W. W. (1999). Sequence features and phylogenetic analysis of the stress protein hsp90 α in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), a poikilothermic vertebrate. *Biochemical and biophysical research communications*, 258(3), 784-791.
- Park, H., Ahn, I. Y., & Lee, H. E. (2007). Expression of heat shock protein 70 in the thermally stressed Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Cell stress & chaperones*, 12(3), 275.
- Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 739-761.
- Pottinger, T. G., Pickering, A. D., & Hurley, M. A. (1992). Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout,

- Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 103(3-4), 275-289.
- Pratt, W. B. (1997). The role of Thehsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via map kinase. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 37(1), 297-326.
- Qin, H., Long, Z., Huang, Z., Ma, J., Kong, L., Lin, Y., Lin, H., Zhou, S., & Li, Z. (2023). A Comparison of the Physiological Responses to Heat Stress of Two Sizes of Juvenile Spotted Seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Fishes*, 8(7), 340.
- Rahman, M. M., Kim, H. B., & Baek, H. J. (2019). Changes in blood cell morphology and number of red spotted grouper, *Epinephelus akaara* in response to thermal stress. *Development & reproduction*, 23(2), 139.
- Scarpeci, T. E., Zanol, M. I., & Valle, E. M. (2008). Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. *Plant signaling & behavior*, 3(10), 856-857.
- Segnitz, B., & Gehring, U. (1997). The function of steroid hormone receptors is inhibited by the hsp90-specific compound geldanamycin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18694-18701.
- Sfakianakis, D. G., Leris, I., & Kentouri, M. (2011). Effect of developmental temperature on swimming performance of zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Environmental Biology of Fishes*, 90, 421-427.
- Shin, H. S., An, K. W., Kim, N. N., & Choi, C. Y. (2010). Antioxidant defenses and physiological changes in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in response to oxidative stress induced by elevated water temperature. *Korean Journal of Ichthyology*, 22(1), 1-8.
- Sun, S., Wu, Y., Yu, H., Su, Y., Ren, M., Zhu, J., & Ge, X. (2019). Serum biochemistry, liver histology and transcriptome profiling of bighead

- carp *Aristichthys nobilis* following different dietary protein levels. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 832-839.
- Sun, Z., Tan, X., Liu, Q., Ye, H., Zou, C., Xu, M., Zhang, Y., & Ye, C. (2019). Physiological, immune responses and liver lipid metabolism of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) under cold stress. *Aquaculture*, 498, 545-555.
- To, T. T., Hahner, S., Nica, G., Rohr, K. B., Hammerschmidt, M., Winkler, C., & Allolio, B. (2007). Pituitary-interrenal interaction in zebrafish interrenal organ development. *Molecular Endocrinology*, 21(2), 472-485.
- Uchimura, T., Hara, S., Yazawa, T., Kamei, Y., & Kitano, T. (2019). Involvement of heat shock proteins on the transcriptional regulation of corticotropin-releasing hormone in medaka. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 529.
- Vijayan, M. M., Mommsen, T. P., Glemet, H. C., & Moon, T. W. (1996). Metabolic effects of cortisol treatment in a marine teleost, the sea raven. *Journal of Experimental Biology*, 199(7), 1509-1514.
- Wang, J., Wei, Y., Li, X., Cao, H., Xu, M., & Dai, J. (2007). The identification of heat shock protein genes in goldfish (*Carassius auratus*) and their expression in a complex environment in Gaobeidian Lake, Beijing, China. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(3), 350-362.
- Wang, Y., Li, C., Pan, C., Liu, E., Zhao, X., & Ling, Q. (2019). Alterations to transcriptomic profile, histopathology, and oxidative stress in liver of pikeperch (*Sander lucioperca*) under heat stress. *Fish & shellfish immunology*, 95, 659-669.
- Welch, W. J. (1993). How cells respond to stress. *Scientific American*, 268(5), 56-64.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological*

- reviews*, 77(3), 591-625.
- Wen, X., Chu, P., Xu, J., Wei, X., Fu, D., Wang, T., & Yin, S. (2021). Combined effects of low temperature and salinity on the immune response, antioxidant capacity and lipid metabolism in the pufferfish (*Takifugu fasciatus*). *Aquaculture*, 531, 735866.
- Wilhelm Filho, D. (1996). Wilhelm Filho, D. (1996). Fish antioxidant defenses--a comparative approach. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research= Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 29(12), 1735-1742.
- Wong, V. N., Walsh, S., & Morris, S. (2018). Climate affects fish-kill events in subtropical estuaries of eastern Australia. *Marine and Freshwater Research*, 69(11), 1641-1648.
- Wu, C. X., Zhao, F. Y., Zhang, Y., Zhu, Y. J., Ma, M. S., Mao, H. L., & Hu, C. Y. (2012). Overexpression of Hsp90 from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) increases thermal protection against heat stress. *Fish & shellfish immunology*, 33(1), 42-47.
- Yilmaz, S., Ergün, S., Çelik, E. Ş., Banni, M., Ahmadifar, E., & Dawood, M. A. (2021). The impact of acute cold water stress on blood parameters, mortality rate and stress-related genes in *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. *Journal of Thermal Biology*, 100, 103049.
- Yu, D., Wang, G., Xie, J., Guan, S., Hu, Z., & Wu, L. (2007). Activity change of protease and amylase in digestive organs of grouper, *Epinephelus coioides*. *J Zhejiang Ocean Univ (Nat Sci)*, 26, 246-251.
- Zeng, D., Mai, K., Ai, Q., Milley, J. E., & Lall, S. P. (2010). Lipid and fatty acid compositions of cod (*Gadus morhua*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Journal of Ocean University of China*, 9, 381-388.

Comparison between red spotted grouper, *Epinephelus akaara* and olive flounder, *Paralichthys olivaceus* of reaction factors expression according to rearing water temperature

Kang-Hee Im

Department of Marine Life Sciences
The Graduate School Jeju National University

Abstract

This study compared subtropical fish red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) and temperate fish olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) the expression of response factors according to rearing water temperature. To compare the expression of response factors according to seasonal rearing water temperature, the experiment was performed using farmed red spotted grouper (n=443, total length 7.9 ± 0.1 cm, body weight 9.0 ± 0.1 g) and olive flounder (n=80, total length 20.1 ± 0.1 cm, body weight 75.3 ± 1.2 g) at Marine Science Institute, Jeju National University from February to December 2022. Fish were reared under natural water temperature and photoperiod conditions in an indoor flow-through culture system (FRP square tank: $150\times 150\times 150$ cm, about 1.6 m.t./1 h).

To compare the expression of response factors according to water

temperature increasing manipulation, the experiment was performed using farmed red spotted grouper (n=40, total length 22.6 ± 0.03 cm, body weight 196.5 ± 0.11 g) and olive flounder (n=40, total length 14.5 ± 0.04 cm, body weight 26.0 ± 0.11 g). Fish were reared by recirculating aquaculture system and acclimated to experimental conditions (18°C) for 10 days prior to heat shock experiments. After, the water temperature was increased to 30°C by appropriately changing 1°C every days. The commercial pellets were provided twice daily (09:00 & 17:00). The mRNA expression of heat shock protein (HSP70, HSP90) and genes related to the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis mechanism ; corticotropin releasing hormone (CRH) & melanocortin 2 receptor (MC2R), and antioxidant enzyme (SOD, CAT) were analyzed as response factors to water temperature. As a result of the expression patterns of water temperature stress-related response factors according to seasonal rearing water temperature, the red spotted grouper showed higher expression patterns of water temperature stress response factors in February ($12.1\pm 0.4^{\circ}\text{C}$), which is a low water temperature period among the four seasons. In olive flounder, water temperature stress-related response factors expression were found to be higher in August ($27.8\pm 0.3^{\circ}\text{C}$), especially during high water temperature, in comparison to February, May and November.

By comparing the responses to the rearing water temperature of red spotted grouper and olive flounder, this study may provide basic data for establishing an appropriate rearing system for subtropical fish species such as red spotted grouper and temperate fish species such as olive flounder.

감사의 글

아무것도 몰랐던 대학 새내기 시절, 이 연구소와의 인연은 대학에 들어와 첫 학기를 마치고 육지에 있는 본가에 막 도착한 동시에 학과 사무실에서부터 온 문자 한 통으로 시작되었습니다. 함덕에 있는 해양과학연구소에서 연구보조를 모집한다는 글이었고, 저는 왜인지 마음이 끌려 비행기를 다시 예매해 면접을 보러 갔습니다. 그때부터 주중에는 학교생활을, 주말에는 연구소 생활을 보내다가 정신 차려보니 어느덧 학부를 졸업하고선 주중과 주말을 여기 연구소에서 보내며 석사 학위과정을 수행하고 있었습니다. 새로운 도전이라 생각하며 즐거운 마음으로 시작한 석사 생활, 그러나 시작한 지 1년도 채 못가 체력적 한계와 부족한 역량으로 매 순간이 한계처럼 느껴지며 모든 것이 벅차게 되었습니다. 그 당시 제 대학원 동기들이 모두 학위과정을 중도 포기함에 저도 마음이 동했으나 그만두지 않고 무사히 끝마치며 이렇게 감사의 글을 쓰는 순간이 오게 된 것은 많은 분들이 보내주신 따뜻한 격려와 응원, 그리고 이영돈 교수님과 여인규 교수님, 허성표 교수님의 각별한 지도 덕분이었습니다. 어떤 말로도 담을 수 없을 만큼으로 모든 분들에게 감사 인사를 드립니다.

실험실을 지켜주시는 저희의 아버지 이치훈 박사님, 인생에 있어 필요한 조언을 많이 해주신 문영건 박사님, 저 때문에 스트레스를 많이 받으시며 힘들어 하셨지만 저를 포기하지 않으시고 아껴주시며 지도해주신 김병훈 박사님, 뭐든 다 잘 고쳐주시는 부문수 선배님, 존경할 정도로 힘든 티 하나 안 내고 묵묵히 종묘 일을 하시는 수민오빠와 희경언니, 그리고 실험실 분위기를 밝혀주는 귀여운 연구실 막내 다은이 모두 감사합니다.

송희 언니, 제게 있어 많이 애뜻한 사람. 언니에게는 감사하고 죄송한 마음을 드려요. 연구소 생활을 하며 제가 기댈 수 있는 어깨를 내어주시고, 언제나 제 옆을 지켜주시며 석사 학위 과정이라는 험난한 길에서 안내자 역할을 해주신 감사한 나의 언니. 이 은혜는 평생 잊지 않을게요. 제가 좀 많이 까다로웠을 텐데 사랑으로 감싸주시고 지켜주셔서 너무 감사합니다.

석사 1학기과 2학기를 보낼 때 내 옆을 지켜준 고마운 형록오빠, 그리고 석현오

빠 내 응석을 다 받아주어 고마워.

연구소가 원활히 가동되도록 항상 도움을 주시는 고영진 선생님과 김은수 선생님께도 감사 인사를 드립니다.

학위과정을 포기하지 않게 옆에서 조언과 도움을 주시며 믿음을 주신 존경하는 나의 아버지 임만규님, 어머니 황인아님 많이 사랑하고 축복합니다. 태어나기 전부터 옆을 지켜준 나의 쌍둥이 강호야, 고민 상담 잘 들어준 막내 동생 도희야, 너희에게 많이 의지하면서 힘을 얻을 수 있었어. 고맙고 많이 사랑한다.

나의 사랑하는 친구들 상지, 윤정이, 현서야. 내 학위과정을 ZOOM을 통해 응원 해주며 지켜봐 준 고마운 나의 친구들. 너희 덕에 웃음을 잃지 않고 학위과정을 마칠 수 있었어. 우리 앞으로도 같이 행복 하자.

육지에 언제 올라오느냐며 응원과 격려를 해준 내가 많이 아끼는 친구들아. 일일이 표현하진 않았지만 언제나 고맙고, 감사해. 앞으로도 잘 부탁한다.

아직 미흡한 저를 아껴주시며 응원해주시는 모든 분들에게 앞으로 더더욱 열심히, 치열하게 살아가며, 받은 은혜를 보답할 수 있는 사람이 될 수 있게 노력하겠습니다. 모두 감사하고 사랑합니다.