

# 자어기 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 사육 밀도에 따른 기형 발생과 스트레스 및 면역 유전자 발현 분석

이상현 · 박종원 · 정민환 · 정효선 · 김주란 · 김우진<sup>1</sup> · 이정호 · 이다인\*

국립수산과학원 양식산업연구부 육종연구센터, <sup>1</sup>국립수산과학원 양식산업연구부 생명공학과

## Effects of Rearing Density Stress on Malformation and Stress and Immune Related Gene Expression of Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Sanghyun Lee, Jong-Won Park, Minhwan Jeong, Hyo Sun Jung, Julan Kim, Woo-Jin Kim<sup>1</sup>, Jeong-Ho Lee and Dain Lee\*

Genetics and Breeding Research Center, National Institute of Fisheries Science, Geoje 53334, Republic of Korea

<sup>1</sup>Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

Stocking density is associated with *Paralichthys olivaceus* growth; thus, fish should be rapidly reared at high densities for commercial reasons. Studies have reported that high stocking density retards growth; however, few have investigated the malformations caused by stocking density stress. This study compared the growth and malformation rates of *P. olivaceus* at different densities and stress- and immune-related gene expression between malformed and normal fish. Forty days post-hatching, fish (total length, 1.49±0.02 cm) were reared at 800 (low density; LD), 1500 (medium density; MD), and 4000 (high density; HD) fish/m<sup>2</sup>, and the growth rate was measured weekly. On day 30, RNA was extracted from the kidneys, and the expression of stress-, immune-, and malformation-related genes was analyzed using qRT-PCR. The malformation rate in the HD groups was approximately three times higher (62%) than that in the LD and MD groups (approximately 20%), and growth was lower regarding length and weight. The stress-related (*HSP70* and *GPX*) and immune-related (*PIR* and *IgM*) genes showed higher mRNA expression in the HD group and malformed fish than in the LD group and normal fish. However, *TLR3* showed the opposite results. In summary, high stocking density suppressed growth and increased malformation risk in *P. olivaceus*.

Keywords: *Paralichthys olivaceus*, Breeding density, Malformation, Stress, Immune

## 서론

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 우리나라에서 상업적으로 중요한 양식 어종으로 연평균 양식 생산량이 4만톤을 육박하며, 천해 어류 생산량의 50%를 기록해 왔다(KOSIS, 2022). 이렇듯 넙치가 우리나라 양식 산업에서 중요한 만큼 양식 어가에서는 최대한 많은 양의 넙치를 생산하고자 사육밀도를 높이고자 노력하고 있으나, 국립수산과학원에서 발간한 넙치 양식 표준 매뉴얼에 따르면 넙치의 덮는율(넙치 체면적/수조 바닥 면적)이 상업적 규모에서는 0.5-1정도가 적절하다고 하였다(Kim et al., 2016). Meriono et al. (2007)의 연구에서는 넙치와 비슷

한 california halibut *Paralichthys californicus*은 덮는율이 1일 때 비해 덮는율 3에서 일일성장률(specific growth rate, SGR)이 더 낮음을 확인하여 덮는율 1-2가 적절하다고 하였다. 또한 넙치와 같은 저서성 어종인 california halibut과 turbot *Scophthalmus maximus*은 사육밀도가 높아질수록 성장이 저하되었으며(Irwin et al., 1999; Kim et al., 2015), 특히 turbot의 경우 사육 밀도가 높아짐에 따라 면역 반응이 억제되는 것을 확인하였다(Jia et al., 2016). 이렇듯 육상수조식 양식장에서 넙치의 사육밀도는 성장과 생존율에 직접적인 영향을 주는 매우 중요한 요인이다. 양식의 상품 가치는 어체의 외형에서 크게 영향을 받는다. 이때, 체형이 기형인 개체는 상품 가치가 매우 떨어

\*Corresponding author: Tel: +82. 55. 639. 5809 Fax: +82. 55. 639. 5813

E-mail address: gene419@korea.kr



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

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0380>

Korean J Fish Aquat Sci 56(4), 380-387, August 2023

Received 30 May 2023; Revised 12 July 2023; Accepted 18 August 2023

저자 직위: 이상현(연구원), 박종원(연구원), 정민환(연구원), 정효선(연구원), 김주란(연구원), 김우진(연구관), 이정호(연구관), 이다인(연구원)

지며, 생산성을 하락시키고 생산 단가를 상승시킨다(Han et al., 2003). 기형을 판단하는 기준에는 척추 만곡, 생식공 기형, 지느러미 처짐 등 다양하다(Han et al., 2003; Kim et al., 2016). 지금까지 넙치에 관한 연구는 질병, 사료, 생리 상태 등 다양한 분야에서 연구가 이루어져 왔으나(Kim, 2005; Min et al., 2009), 기형에 대한 연구는 채색 기형을 줄이기 위해 수조의 바닥 색과 바닥 기질에 대한 연구(Kang et al., 2011; Kim et al., 2016) 등 미비한 실정이다.

스트레스는 어류의 항상성을 위협하며, 이를 대처하기 위해 생리 및 행동 과정이 활성화가 과도하거나 장기화될 경우 생리적 장애, 면역 억제 및 성장 억제를 유발할 수 있다고 하였다(Jia et al., 2016). 이를 확인하고자 다양한 실험을 통해 여러 스트레스 요인에 관련된 유전자의 발현을 실험해 왔다. 가장 대표적인 스트레스 지표인 heat shock protein 70 (HSP70)은 다양한 스트레스 요인으로부터 항상성 유지(Iwama et al., 1999; Ackerman et al., 2000; Basu et al., 2003; Park and Min, 2018), 손상된 세포 또는 단백질의 회복을 돕는 것으로 알려져 있다(Becker and Craig, 1994; Currie et al., 2000).

항산화 메커니즘에 연관되어 있는 것으로 알려진 glutathione peroxidase (GPX)는 항산화에 관련된 스트레스를 측정하고자 사용한다(Choe et al., 2017). Immunoglobulin M (IgM), polymeric Ig receptor (PIR), toll-like receptor 3 (TLR3)는 면역관련 유전자로, IgM의 경우 B-림프구에서 생성되며 미성숙한 B 세포에서 항원과 결합하는 과정에 B세포의 수용체 역할을 하며, 병원체를 인식하고 제거하는 면역 반응의 능력을 향상시킨다(Grattendick and Pross, 2007). 또한 면역계통의 생리적 성숙도 판별에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2014). PIR은 상피세포로부터 외부 분비 시스템으로 IgM을 운반하는 전달체 역할을 하며, 점막 면역 보호에 중추적인 역할을 한다(Sheng et al., 2019; Leya et al., 2021). TLR3는 바이러스의 외피 당단백질 등 다양한 미생물 성분을 검출하는 것으로 알려진 막 결합 수용체이다(Avunje et al., 2013).

본 실험에서는 넙치의 종자 생산시, 자어의 사육 밀도에 따른 성장 및 기형 발생률을 비교하며 저밀도와 고밀도 실험군 사이와 기형 개체와 정상 개체간 스트레스 및 면역 관련 유전자의 발현을 비교하였다. 이를 통해 사육 밀도와 넙치의 기형 발생의 상관관계를 파악함과 더불어 사육 밀도와 체형 기형이 넙치의 생리적인 변화에 미치는 영향을 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

### 실험어 및 실험 조건

실험어는 경상남도 거제시 국립수산물연구원 어류육종연구센터에서 자체 생산한 부화 40일령 넙치 자어(1.5±0.05 cm, 0.04±0.003 g)를 실험에 사용하였으며, 사육 조건은 300 L 원형수조(바닥면적 0.35 m<sup>2</sup>)에 각각 800마리/m<sup>2</sup> (low density,

LD), 1600마리/m<sup>2</sup> (medium density, MD), 4000마리/m<sup>2</sup> (high density, HD)를 수용하여 수온 18.1±0.5°C에서 30일간 3반복으로 실험을 실시하였다. 이때 밀도별 넙치 자어의 적정 사육 밀도는 넙치 양식 표준 매뉴얼을 기준으로(MD, 1600마리/m<sup>2</sup>) 설정하였으며, 사료공급량은 실험구별 어체중에 대하여 5%로 명기(08:00-19:00)에 2시간 간격으로 일정하게 공급하였다. 용존산소량의 경우 매일 08:00, 17:00 사료 공급 전에 측정하여 8.0-9.0 mg/L로 유지하였다.

### 성장 및 기형률 조사

실험 개시일로부터 10일 간격으로 실험구별 반복구당 30마리씩 전장 및 체고를 측정하였으며, 전장을 이용한 체표면적(body shape area) 및 덮는율(covering rate)은 Eh (2011)의 논문에서 제시된 방법으로 계산하였다. 전장의 경우 실험 시작과 종료시에 측정하여 SGR을 측정하였다.

기형률 조사를 위해 실험 종료시 수조당 33마리씩(각 실험군 1번수조 34마리) 실험군 당 총 100마리씩 무작위로 선발하여 육안으로 확인 가능한 척추 만곡과 같은 체형 기형을 확인하여 계수하였다(Fig. 1). Fig. 1d와 같이 척추 모양이 바른 개체는 정상으로, Fig. 1e와 같이 척추 모양이 뒤틀린 개체는 기형으로 판단하였다.

#### Covering rate (%)

$$= \text{BSA} \times \text{Total fish population} / \text{Tank bottom surface} \times 100$$

#### Body shape area (BSA)

$$= 0.2473 \times \text{Total length}^{2.0247} (R^2=0.998)$$

$$\text{Deformity rate (\%)} = \text{Deformity fish} / \text{Total fish} \times 100$$

### 시료 샘플링 및 RNA 추출

각 밀도 조건별 스트레스 및 면역 지표 유전자 발현을 분석하기 위해 실험 종료시 각 실험구별 정상 개체 30마리씩 MS-222 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 300 ppm 마취시킨 후 신장을 분리하였다. 또한 정상 개체와 기형 개체 간 스트레스 및 면역 지표 유전자 발현을 비교하기 위해서 HD 실험군에서 정상 및 기형 개체 각 10마리로부터 신장을 채취하였다. 샘플링된 신장은 trizol reagent (Ambion, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였으며, RT&GO master mix (MPbio, Irvine, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하여 100 ng/μL 농도로 분석에 사용하였다.

### 실시간 유전자 정량 분석

실시간 유전자 정량 분석에 사용한 프라이머는 Table 1에 정리하여 표시하였다. House-keeping gene은 넙치 18S rRNA 프라이머(Gene bank, EF126037.1) 유전자를 사용하였으며 모든 분석값은 18S에 대한 cycle (Ct)값의 차이로 계산하였다. 분석

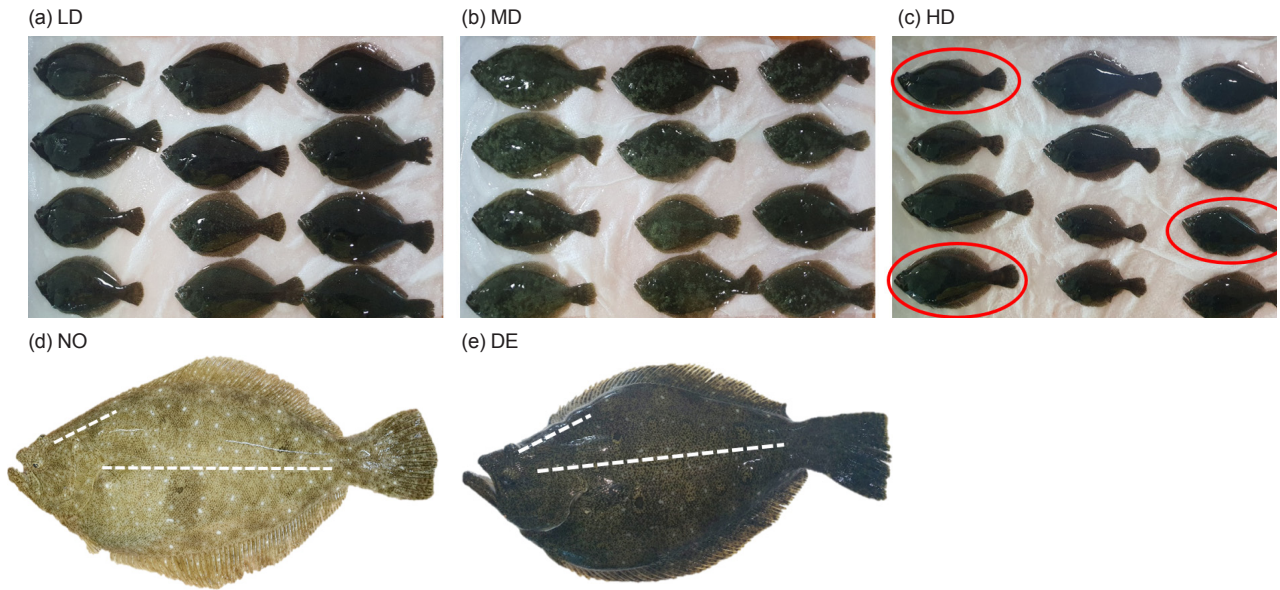


Fig. 1. (a), (b) and (c) show the results of identification of deformed fish by reared for 30 days in different densities. And deformed fishes are marked with red circles. Figures (d) and (e) show the criteria for distinguishing between normal and deformed fishes. LD, Low density; MD, Medium density; HD, High density; NO, Normal; DE, Deform.

에 사용된 cDNA는 100 ng/μL로 정량하여 사용하였으며, 실시간 유전자 정량 분석은 98°C에서 2분간 initial denaturation step을 가졌으며, 이후 denaturation 98°C 10초 → annealing 60°C 10초 → extension 68°C 30초의 과정을 40회 실시하여 분석하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3반복으로 진행되었으며 결과의 통계 처리는 One-way ANOVA-test (사육 밀도, LD, MD, HD; 기형, NO,

DE)와 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)을 R program 3.5.1 (R Development Core Team) 소프트웨어 통계 처리 프로그램으로 분산 분석을 실시하여, 성장 지표와 실시간 유전자 분석 결과 평균값의 통계적 유의성( $P < 0.05$ )을 검증하였다.

### 결 과

#### 성장 및 기형률

실험이 진행되는 동안 성장에 따른 덮는율은 실험 시작시

Table 1. Oligonucleotide primers used for quantitative real-time PCR

Taget	Sequence (5'-3')
HSP70 (Heat shock protein 70)	F.P = 5'-TCCTCATGGGTGACACTTCG-3'
	R.P = 5'-TTGTCCTTGGTCATGGCTCT-3'
GPX (Glutathione peroxidase)	F.P = 5'-GAAGGTGGATGTGAATGGGAAG-3'
	R.P = 5'-TCTGCCTCGATATCAATGGTAAGG-3'
IgM (Immunoglobulin M)	F.P = 5'-AATGGAGCCAGGGGATAAAG-3'
	R.P = 5'-TTTTGGAGACCTCCCCTCTT-3'
PIR (Polymeric Ig receptor)	F.P = 5'-AGCCTCAGTATGCCAGCAAT-3'
	R.P = 5'-GCACCTGTACCACCCAGAGT-3'
TLR3 (Toll-like receptor 3)	F.P = 5'-TCCGTCGTTTGTATGAGCAG-3'
	R.P = 5'-AGACGAACCAGGAGAGACCA-3'
18S	F.P = 5'-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3'
	R.P = 5'-CACACGTGATCCAGTCAGT-3'

PCR, Polymerase chain reaction.

LD, 10.76±1.37%; MD, 20.18±2.2%; HD, 53.82±6.71%, 실험 종료시 LD, 209.56±11.42%; MD, 311.45±12.63%; HD, 767.31±23.70%로 LD와 MD간의 차이는 2배 이하로 유지되었으나, MD와 HD의 차이는 2배 이상으로 유지되었다. 특히, HD는 LD에 보다 20일차까지 약 5배 높게 유지되었고, 30일차에는 약 3배 높게 유지되었다(Table 2). 전장 성장은 10일차에 모든 실험군에서 유의한 차이가 없었으나 20일차부터 HD와 MD 두 실험군과 LD간의 차이가 발생하였다. 30일차에서 HD<MD<LD 순으로 유의한 차이를 보였다(Table 3). 체중 성장 역시 전장 성장과 같이 30일차에서 HD는 LD에 비해 약 1.5배 적은 체중을 보였으며, SGR 역시 LD, 14.76±0.11; MD, 14.19±0.04; HD, 13.05±0.27로 HD에서 가장 낮은 성장을 보이며(Table 4), 실험 종료시 생존율은 LD, 98.33±0.11%; MD, 98.18±0.16%; HD, 95.13±0.16%로 HD를 제외한 두 실험군에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4). 기형률은 실험 종료시 3개 실험군 각각 100마리씩 척추 만곡 등과 같이 육안으로 뚜렷하게 관찰되는 체형 기형을 조사하였다. 각 밀도별 기형 조사 결과는 Fig. 1으로 나타내었으며 기형률의 수치는 Table 4에 표기하였다. 넙치 부화 후 30일차(전장 1.44±0.03 cm)에서 부화 후 60일차까지 LD와 MD에서 약 20%의 기형률을 보인 반면, HD에서는 63%로 LD와 MD 보다 기형률이 3배 이상 높았다(Table 4, Fig. 1).

**밀도별 스트레스 및 면역 관련 유전자 발현**

LD, MD 그리고 HD 실험군의 정상개체의 신장에서 추출한 RNA를 이용하여 스트레스 및 면역 관련 유전자 발현을 분석하였다. 대표적인 스트레스 지표인 HSP70과 항산화 스트레스 관련 유전자인 GPX는 HD (HSP70, 1.84±0.51; GPX, 3.23±1.17)가 LD (HSP70, 1±0.15; GPX, 1±0.1)와 MD (HSP70, 0.64±0.16; GPX, 1.32±0.02)에 비해 약 2배 높은 값을 보이며 유의하게 높았다(Fig. 2A). 면역 관련 유전자인 PIR과 IgM은 LD (PIR, 1±0.05; IgM, 1±0.31)와 MD (PIR, 0.92±0.09; IgM, 1.02±0.08)에 비해 HD (PIR, 1.85±0.23; IgM, 2.72±0.79)가 약 2배 높은 발현량을 보였으나, TLR3에서는 타 유전자와 반대로 LD (1±0.05)에서 MD (0.57±0.05)와 HD (0.45±0.08)의 약 2배 높은 발현량을 보이며 유의하게 높음을 확인하였다(Fig. 3A).

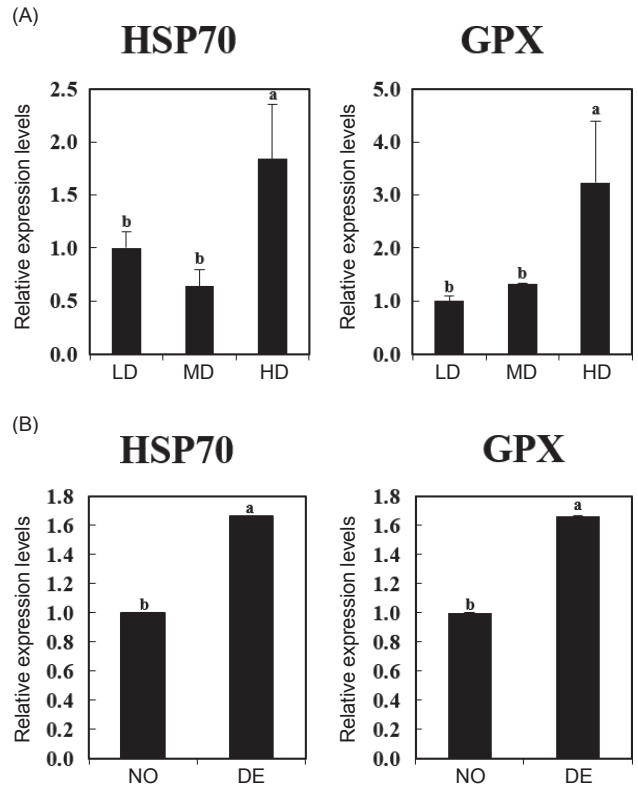


Fig. 2. Expressions of Stress related and Antioxidative stress genes in the kidney of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Values (means of triplicate±SD) in the same column sharing the same superscript letter are not significantly different (P<0.05). A, Reared under different stocking densities for 30 days. B, Normal or deformed olive flounder of HD group. LD, Low density; MD, Medium density; HD, High density; NO, Normal; DE, Deformed; GPX, Glutathione peroxidase; HSP70, Heat shock protein 70.

**정상 및 기형 개체간 스트레스 및 면역 관련 유전자 발현**

HD 실험군의 정상 및 기형 개체의 신장에서 추출한 RNA를 이용하여 스트레스 및 면역 관련 유전자 발현을 분석하였다. 스트레스 관련 유전자 중 HSP70과 GPX 유전자 발현에서 DE (기형 개체) (HSP70, 1.67±0.03; GPX, 2.06±0.09)에서 NO (정

Table 2. Covering rate of olive flounder *Paralichthys olivaceus* reared under different stocking densities for 30 days

Covering rate (%)	D0	D10	D20	D30
LD	10.76±1.37 <sup>c</sup>	35.60±2.73 <sup>c</sup>	81.76±2.08 <sup>c</sup>	209.56±11.42 <sup>c</sup>
MD	20.18±2.2 <sup>b</sup>	65.21±3.40 <sup>b</sup>	130.71±5.97 <sup>b</sup>	311.45±12.63 <sup>b</sup>
HD	53.82±6.71 <sup>a</sup>	152.67±3.25 <sup>a</sup>	419.42±9.49 <sup>a</sup>	767.31±23.70 <sup>a</sup>

Covering rate (%)= BSA×Total fish population/Tank bottom surface×100. Body shape area (BSA)=0.2473×Total length<sup>2.0247</sup> (R<sup>2</sup>=0.998). LD, Low density; MD, Medium density; HD, High density. Values (means of triplicate±SD) in the same column sharing the same superscript letter are not significantly different (P<0.05).

상 개체) (HSP70,  $1.0\pm 0.06$ ; GPX,  $1.0\pm 0.26$ )에 비해 약 2배 높은 발현량을 보이며 유의적으로 높았다(Fig. 2B). 면역 관련 유전자 중 PIR, IgM에서 DE (PIR,  $2.16\pm 0.12$ ; IgM,  $\pm 0.79$ )가 NO

(PIR,  $1.85\pm 0.23$ ; IgM,  $1.3\pm 0.1$ )에 비해 유의적으로 높았으나, TLR3에서는 이와 반대로 DE ( $0.7\pm 0.17$ )에서 NO ( $1.0\pm 0.12$ )에 비하여 낮은 발현량을 보이며 유의적으로 낮았다(Fig. 3B).

Table 3. Mean length of olive flounder *Paralichthys olivaceus* reared under different stocking densities for 30 days ( $P<0.05$ )

Length(cm)	D0	D10	D20	D30
LD	$1.44\pm 0.03$	$2.60\pm 0.03$	$3.92\pm 0.03$	$6.24\pm 0.08^a$
MD	$1.44\pm 0.03$	$2.57\pm 0.03$	$3.62\pm 0.03$	$5.56\pm 0.07^b$
HD	$1.44\pm 0.03$	$2.41\pm 0.03$	$3.97\pm 0.03$	$5.35\pm 0.11^c$

LD, Low density; MD, Medium density; HD, High density.

Table 4. Deformity rate and growth performance of olive flounder *Paralichthys olivaceus* reared under different stocking densities for 30 days

	Initial weight (g)	Final weight (g)	Mean growth (cm)	Specific growth rate (%/day)	Deformity rate (%)	Survival (%)
LD	$0.04\pm 0.003$	$3.07\pm 0.05^a$	$4.83\pm 0.11^a$	$14.76\pm 0.11^a$	$18.89\pm 1.25^b$	$98.33\pm 0.11^a$
MD	$0.04\pm 0.003$	$2.55\pm 0.03^b$	$4.23\pm 0.07^b$	$14.19\pm 0.04^b$	$20.00\pm 0.82^b$	$98.18\pm 0.16^a$
HD	$0.04\pm 0.003$	$1.96\pm 0.13^c$	$3.94\pm 0.15^c$	$13.05\pm 0.27^c$	$62.22\pm 6.60^a$	$95.13\pm 0.16^b$

Deformity rate=Deformity fish/Total fish $\times 100$ . Mean growth=Fish final total length-initial total length. Specific growth rate (%/day)=(Ln final weight-Ln initial weight) $\times 100$ /days. LD, Low density; MD, Medium density; HD, High density. Values (means of triplicate $\pm$ SD) in the same column sharing the same superscript letter are not significantly different ( $P<0.05$ ).

## 고 찰

넙치의 사육 밀도에 따른 성장 실험은 매우 많이 시도되었다. 하지만, 기형 발생과 연관 지은 연구는 극히 드물다. 본 연구에서는 영양학적인 측면에서 넙치 자어에 충분한 영양이 공급되고 있다는 가정하에 종자 생산시 자어의 사육밀도에 따른 기형 발생률을 알아보기 위해 실험을 진행하였으며, 스트레스와 면

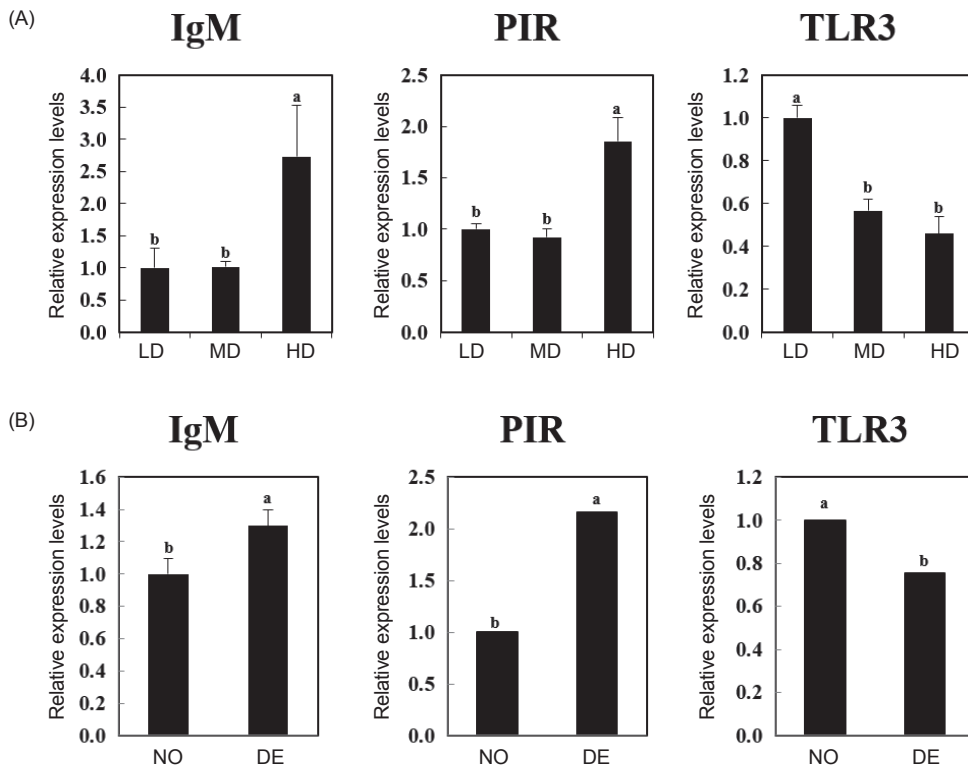


Fig. 3. Expressions of immune related genes in the kidney of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Values (means of triplicate $\pm$ SD) in the same column sharing the same superscript letter are not significantly different ( $P<0.05$ ). A, Reared under different stocking densities for 30 days. B, Normal or deformed olive flounder of HD group. LD, Low density; MD, Medium density; HD, High density; NO, Normal; DE, Deformed; PIR, Polymeric Ig receptor; IgM, Immunoglobulin M; TLR3, Toll-like receptor 3.

역 작용에 관련된 유전자들의 발현량을 분석하여 밀도 스트레스와 기형 발생간 연관성을 입증하고자 하였다. 본 연구의 밀도별 성장 실험에서 대조구인 MD는 국립수산물학원에서 발행된 넙치 양식 표준 매뉴얼에 서술된 넙치 자어 평균 전장 2-3 cm 시기의 적정 사육 밀도 1500-2000마리/m<sup>2</sup>이다. 따라서 넙치 양식 표준 매뉴얼을 참고하여 밀도 실험의 기준으로 MD를 1600마리/m<sup>2</sup> 설정하였다. 본 실험 결과 밀도가 낮을수록 SGR이 높은 것이 확인되었으며(LD, 14.76±0.11; MD, 14.97±0.04; HD, 13.05±0.27), HD에 비해서 밀도가 낮을수록 개체간 성장차 역시 일정한 것을 확인하였다. 기형 발생률 비교 결과 LD와 MD는 약 20%로 두 그룹간의 차이는 약 1%에 불과하였으나, HD와는 약 3배 이상의 차이가 있는 62%인 것을 확인할 수 있었다. 밀도가 낮은 LD와 MD에서 기형은 비록 HD에 비하여 적지만 발생하였다. 앞선 결과들을 종합한 결과 넙치 사육 어가에서는 고밀도 사육은 지양되어야 하며 넙치 부화 후 30일차(전장 1.44±0.03 cm) 시기 사육시 1600마리/m<sup>2</sup> 이하의 밀도가 기형 발생과 성장에도 영향을 적은 적절한 밀도로 판단된다.

밀도별 실험 및 기형 실험군의 신장에서 추출한 RNA를 이용하여 스트레스 관련 유전자인 HSP70, GPX에서 유전자 발현량을 비교한 결과, LD와 NO보다 HD와 DE에서 높은 수치를 나타남을 확인하였다. 면역 관련 유전자인 PIR 및 IgM 유전자의 경우 LD와 NO보다 HD와 DE에서 높은 수치를 나타남을 확인하였다. 이와 반대로 면역 관련 유전자인 TLR3 유전자에서는 LD와 NO에서 더 높은 경향을 보임을 확인할 수 있었다.

스트레스 지표로 알려진 HSP70 유전자는 이전 연구를 통해 california halibut과 rainbow trout을 이용한 연구에서도 역시 HD에서 LD보다 발현량이 높게 나타났다(Jia et al., 2016; Yarahmadi et al., 2016). 앞선 연구에서 밝혀진 바와 같이 HSP70 유전자는 밀도 스트레스와 밀접한 연관이 있는 것으로 판단된다. 특히, HSP70 유전자는 환경 등의 영향에 있어 어류의 생리 및 생태학적 조건에 영향을 미친다고 하며, 세포내 HSP70의 합성으로 다양한 생리학적 변화가 일어나는 것으로 알려져 있다(Ryan et al., 1992; Park and Min, 2018). 또한 다양한 스트레스 요인으로부터 항상성 유지에 중요한 역할을 수행하며(Iwama et al., 1999; Ackerman et al., 2000; Basu et al., 2003; Park and Min, 2018), 넙치에서 HSP70 유전자의 발현은 환경이 다른 물리학적 스트레스에 대한 저항성과 밀접한 관련이 있다고 하였다(Lindquist, 1986; Mahat et al., 2016).

앞선 연구 결과들을 통해 본 실험 결과를 분석한 결과, 고밀도와 기형 개체에서의 높은 HSP70 유전자의 발현량은 높은 사육 밀도와 신체 기형이 넙치에게 스트레스 요인으로 작용하였으며, LD보다 HD에서 그리고 정상 개체보다 기형 개체에서 스트레스에 저항하기 위해 HSP70 유전자의 발현량이 높은 것으로 보여진다.

HD와 기형 개체에서 GPX의 유전자 발현 결과가 LD와 정상 개체보다 유의적으로 높은 것을 확인하였다. GPX는 항산화 스

트레스 지표로 알려져 있으며, 상처가 치유되는 과정에서 발생하는 활성 산소를 제거하며, 상처 회복 시간 단축에 도움을 준다고 보고된바 있다(Ghosh and Gaba, 2013; Shin et al., 2020). 이를 통해 높은 밀도와 체형 기형은 넙치에게 스트레스로 작용하며, 스트레스에 저항하는 과정에서 발생된 활성 산소를 제거하기 위해 GPX 유전자가 발현되는 것으로 판단된다.

면역 관련 유전자에서는 IgM과 PIR에서는 LD와 정상 개체보다 HD와 기형 개체에서 높은 수치를 나타냈으며, TLR3 유전자에서는 반대로 LD와 정상 개체에서 더 높은 수치를 보였다. IgM은 병원체를 인식하고 제거하는 역할로 면역 반응의 능력을 향상시키며(Grattendick and Pross, 2007), PIR은 IgM과 같은 고분자 면역 글로불린과 결합하여 면역 보호에 중추적인 역할을 한다(Sheng et al., 2019; Leya et al., 2021). 이러한 앞선 연구 사례를 통해 면역 관련 유전자인 IgM과 PIR의 발현은 고밀도와 신체 기형으로 인한 스트레스로부터 보호를 위해 더 높은 발현량을 보인 것으로 판단된다.

TLR3 유전자는 LD와 정상 개체에서 유의적으로 더 높은 발현량을 보였다. TLR3는 패턴인지 수용체 중 가장 잘 알려진 수용체로 세포막성 소기관에 존재하며 면역 반응에서 중요한 역할을 하며(Moon et al., 2015; Jia et al., 2016), 바이러스의 dsRNA를 인지하여 type I interferon을 생성하는 것으로 알려져 있다(Uematsu and Akira, 2008). 특히 TLR 3 신호전달의 활성화를 통해 항바이러스 면역을 유도하는데 주요한 역할을 한다(Samanta et al., 2013). Jia et al. (2016)의 연구에서 turbot의 skin에서는 밀도에 따른 TLR3 유전자의 발현에서 차이를 보이지 않았다. 그러나 본 논문에서 실험한 넙치의 kidney에서는 고밀도인 HD 그룹에서 TLR3 유전자의 발현량이 낮음을 확인하였다. 이는 Hwang et al. (2012)의 연구에서 TLR3는 조직간 외부 자극에 대한 면역 반응의 차이가 발생한다고 하였다. 따라서 TLR3 유전자의 발현량에 대한 본 연구의 kidney에서의 결과와 Jia et al. (2016)의 연구에서 skin에서의 결과의 차이를 설명할 수 있을 것으로 판단된다.

인공 종묘 생산에 의해 양식되는 어류는 기형과 같은 열성 개체가 20-90% 발생하는 것으로 알려져 있으며, 원인으로는 환경과 영양적인 측면으로 추측하여 이를 개선하며 생산하고 있다(Han et al., 2003). 하지만 본 실험 결과 고밀도에 비하여 상대적으로 환경이 좋은 저밀도에서 역시 약 20%의 기형이 발생하였다. 이렇듯 밀도가 낮은 수조에서 기형이 발생하는 것에 대한 원인은 아직 명확히 규명되지 않았다. 다만 Han et al. (2003)의 서술과 더불어 낮은 밀도에서도 경쟁이 발생하여 경쟁에서 뒤쳐진 개체는 영양적인 측면에서 성장에 대한 보상이 충분한 먹이 섭취로 이어지지 않아 기형 발생에 영향을 미쳤으리라 판단된다.

본 연구에서 넙치 자어기에 고밀도는 기형 발생에 영향을 미쳤으며, 고밀도와 기형은 넙치 자어에게 분명한 스트레스원으로써 성장에 악영향을 미쳤음을 확인하였다. 이를 뒷받침하기

위해 스트레스 및 면역 관련 유전자의 발현량을 비교한 결과, 스트레스 관련 유전자인 HSP70, GPX와 면역 관련 유전자인 IgM, PIR 유전자의 발현량은 고밀도 사육 실험구와 기형 개체에서 높았으며, TLR3 유전자의 발현량의 경우 이와 반대로 고밀도와 기형 개체에서 낮았다. 이는 스트레스로 인해 붕괴된 항상성을 유지하고, 이로 인해 발생된 활성 산소를 제거하기 위함으로 판단되며, 면역 계통의 메커니즘이 무너짐으로 인해 이를 보완하고자 하는 생리적인 상호작용이 끊임없이 일어나는 것으로 해석하였다. 이를 통해 고밀도는 넙치 자어에게 스트레스로 작용하여, 기형을 초래하는데 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 따라서 전장 1.5±0.05 cm의 넙치 자어는 1600마리/m<sup>2</sup> 밀도까지가 기형 발생에 영향을 미치지 않는 밀도임을 확인하였다. 이 실험의 결과를 토대로 적정 밀도를 설정함으로써 양어가에서 기형 발생을 줄이며 생산량을 높일 수 있는 참고 자료로서 사용되길 기대하며, 기형 발생 원인에 대한 명확하게 밝힐 수 있는 점진적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 사 사

이 논문은 국립수산물학원(수산과학연구사업 R2023020)의 지원으로 수행되었습니다.

## References

- Ackerman PA, Forsyth RB, Mazur CF and Iwama GK. 2000. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiol Biochem* 23, 327-336. <https://doi.org/10.1023/A:1011107610971>.
- Avunje S, Oh MJ and Jung SJ. 2013. Impaired TLR2 and TLR7 response in olive flounder infected with viral haemorrhagic septicaemia virus at host susceptible 15°C but high at non-susceptible 20°C. *Fish Shellfish Immunol* 34, 1236-1243. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.012>.
- Basu N, Kennedy CJ and Iwama GK. 2003. The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 134, 655-663. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00372-0](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00372-0).
- Becker J and Craig EA. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219, 11-23. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19910.x>.
- Choe JR, Shin YS, Choi JY, Kim TH, Jung MM and Choi CY. 2017. Effect of different wavelengths of light on the antioxidant and immunity status of juvenile rock bream, *Oplegnathus fasciatus*, exposed to thermal stress. *Ocean Sci J* 52, 501-509. <http://dx.doi.org/10.1007/s12601-017-0051-2>.
- Currie S, Moyes CD and Tufts BL. 2000. The effects of heat shock and acclimation temperature on Hsp70 and Hsp30 mRNA expression in rainbow trout: *In vivo* and *in vitro* comparisons. *J Fish Biol* 56, 398-408. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02114.x>.
- Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11, 1-42. <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Eh YY. 2011. Productivity of the flounder stocking density on the flounder culture farms. *J Fish Bus Adm* 42, 85-96.
- Ghosh PK and Gaba A. 2013. Phyto-extracts in wound healing. *J Pharm Pharm Sci* 16, 760-820. <https://doi.org/10.18433/J3831V>.
- Grattendick K and Pross S. 2007. Immunoglobulins. In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Enna SJ and Bylund DB, eds. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1-6.
- Han JS, Lee WK, Kim MS and Choi SD. 2003. Proposal for the development of sea ranching business in Yeosu sea area I. A study on the production of healthy seedlings of black sea bream. *Korean Aquaculture* 15, 59-67.
- Hwang SD, Ohtani M, Hikima JI, Jung TS, Kondo H, Hirono I and Aoki T. 2012. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 3 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Dev Comp Immunol* 37, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.12.004>.
- Irwin S, O'Halloran J and Fitzgerald R. 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture* 178, 77-88. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00122-2).
- Iwama GK, Vijayan MM, Forsyth RB and Ackerman PA. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *Am Zool* 39, 901-909. <https://doi.org/10.1093/icb/39.6.901>.
- Jia R, Liu BL, Feng WR, Han C, Huang B and Lei JL. 2016. Stress and immune responses in skin of turbot (*scophthalmus maximus*) under different stocking densities. *Fish Shellfish Immunol* 55, 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.032>.
- Kang DY, Kim HC and Chang YJ. 2011. Effects of stocking density on the blind-side hypermelanosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Aqua Sci* 14, 123-129. <https://doi.org/10.5657/FAS.2011.0123>.
- Kim GG, Hwang HG, Kim HC, Kim KW, Do JW and Jeong MH. 2016. Standard manual of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) farming. National Institute of Fisheries Science, Busan, Korea.
- Kim GG. 2005. Ecology of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and early life history. *Korean Aquac* 17, 32-37.
- Kim SS, Lee JH, Kim KW, Kim KD, Lee BJ and Lee KJ. 2015. Effects of feed particle size, stocking density, and dissolved oxygen concentration on the growth of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 48, 314-321. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2015.0314>.
- KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2022. Status of Fish Culture. Retrieved from <https://kostat.go.kr/synap/skin/doc.html?fn=0daf903845390ae8046d4d1350e5c7145604b54b88a1773292ded72badb928b3&rs=/synap/preview/board/225/> on Apr 3, 2023.

- Lee JW, Yang H, Noh JK, Kim HC, Park CJ, Park JW, Hwang IJ, Kim SY and Lee JH. 2014. RAG-1 and IgM genes, markers for early development of the immune system in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Dev Reprod 18, 99-106. <https://doi.org/10.12717/DR.2014.18.2.099>.
- Leya T, Valappil RK, Tripathi G, Kurcheti PP and Bedekar MK. 2021. Expression of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) and immunoglobulin (IgM) gene in mucosal-associated lymphoid tissues (MALT) of Labeo rohita fingerlings immunized with pDNA (pGPD-IFN) vaccine. Aquaculture 535, 736343. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736343>.
- Lindquist S. 1986. The heat shock response. Ann Rev Biochem 55, 1151-1191.
- Mahat DB, Salamanca HH, Duarte FM, Danko CG and Lis JT. 2016. Mammalian heat shock response and mechanisms underlying its genome-wide transcriptional regulation. Mol Cell 62, 63-78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.025>.
- Merino GE, Piedrahita RH and Conklin DE. 2007. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. Aquaculture 265, 176-186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.028>.
- Min BH, Lee JH, Noh JK, Kim HC, Park CJ, Choi SJ and Myeong JI. 2009. Hatching rate of eggs, and growth of larvae and juveniles from selected olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Korean Soc Develop Biolo 13, 239-247.
- Moon JY, Park EH, Kong HJ, Kim YO, Kim DG, An CM and Nam BH. 2015. Molecular characterization and expression analysis of a toll-like receptor 2/6 gene from abalone (*Haliotis discus hannai*). Korean J Malacol 31, 233-241. <https://doi.org/10.9710/kjm.2015.31.3.233>.
- Park HJ and Min BH. 2018. Stress responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to salinity changes. Korean J Ichthyol 30, 1-8.
- Ryan C, Stevens TH, Schlesinger MJ. 1992. Inhibitory effects of HSP70 chaperones on nascent polypeptides. Protein Sci 1, 980-985. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010803>.
- Samanta M, Basu M, Swain B, Panda P and Jayasankar P. 2013. Molecular cloning and characterization of toll-like receptor 3, and inductive expression analysis of type I IFN, Mx and pro-inflammatory cytokines in the Indian carp, rohu (*Labeo rohita*). Mol Biol Rep 40, 225-235. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2053-6>.
- Sheng X, Chai B, Wang Z, Tang X, Xing J and Zhan W. 2019. Polymeric immunoglobulin receptor and mucosal IgM responses elicited by immersion and injection vaccination with inactivated *Vibrio anguillarum* in flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 505, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.045>.
- Shin JH, Lee CR, Kim YJ, Shin JB, Lim HW, Yun KS and Lee KJ. 2020. Dietary supplementation of phytosterol for olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean J Fish Aquat Sci 53, 191-202. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0191>.
- Uematsu S and Akira S. 2008. Toll-like receptors (TLRs) and their ligands. In: Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. Bauer S and Hartmann G, eds. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 183. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-72167-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-72167-3_1).
- Yarahmadi P, Miandare HK, Fayaz S and Caipang CMA. 2016. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol 48, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.007>.