

염분 노출에 따른 *Chironomus riparius*의 성장지연과 Heat shock protein 70 유전자 발현

김원석 · 임병현 · 홍 철 · 최승원 · 박기연 · 곽인실*

전남대학교 해양기술학부

Gene Expression of *Chironomus riparius* Heat Shock Protein 70 and Developmental Retardation Exposure to Salinity. Kim, Won-Seok (0000-0003-3368-3891), Byeong-Hyeon Im (0000-0002-1971-6135), Cheol Hong (0000-0002-5444-7743), Seung-Won Choi (0000-0001-8570-8603), Kiyun Park (0000-0003-2965-6970) and In-Sil Kwak* (0000-0002-1010-3965) (Department of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea)

Abstract We investigate that the impact of freshwater organism exposed to the salinity environment by the frequent rainfall following climate change. To evaluate the stress response following salinity exposure, we assessed the survival rate, molting success rate, the developmental period and mouthpart deformities in *Chironomus riparius*. In addition, we measured the molecular responses of biomarker gene, gene expression of heat shock protein 70 (HSP70) in *C. riparius* exposed to salinity after 96 hour. The *C. riparius* survival rates were showed on time dependent manner and not observed survival organisms above 15 psu at day 4. The pupation and emergence of *C. riparius* were not seen above 15 psu, and the molting success rate was less than 20% at 10 psu. The developmental retardation of *C. riparius* was well observed in the pupation and emergence period and was delayed by 4 days at 10 psu compared to the control and 5 psu. The mouthpart deformities after salinity exposure at 96 or 72 hour were observed at 10 psu and 15 psu. The expression of *C. riparius* HSP70 level was significantly increased exposure to 5 psu and 10 psu. Thus, salinity has been caused to be various ecotoxicological and molecular stress responses on freshwater organisms similar to harmful substances such as EDCs and so on.

Key words: *Chironomus riparius*, salinity, developmental retardation, heat shock protein 70, mouthpart deformity

서 론

하구생태계는 담수와 해수의 유입과 교체가 빈번하게 이루어지며, 서식하는 생물상은 삼투작용이 뛰어나고 적응

이 이루어진 생물만이 서식할 수 있다. 해양생물에게 담수의 유입이 위협적인 것과 마찬가지로 담수생태계 내 해수의 유입은 서식 동물의 생리활동에 영향을 준다(Bervoets *et al.*, 1996). 특히 염분의 증가는 생물의 신진대사, 성장, 생활사와 행동 등에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Romano and Zeng, 2012; Davies *et al.*, 2014). 또한 염분에 노출된 식물에서 나트륨, 염화물 등이 세포 내로 유입되어 생리적인 불균형이 유발되어 스트레스 반응과 내성 기작

Manuscript received 30 May 2017, revised 5 September 2017, revision accepted 10 September 2017
* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-61-659-7149, E-mail: iskwak@chonnam.ac.kr

에 변화가 나타난다고 보고되기도 하였다(Hussain *et al.*, 2013; Zhang and Shi, 2013; Deinlein *et al.*, 2014). 최근에는 고염분이나 저염분에 노출된 해양생물에서 생존율 변화와 유전자 발현에 차이가 있는 것으로 나타났으며, 기후 변화와 맞물린 염분의 급격한 변화가 해양생물에게도 생리적인 스트레스로 작용한다는 연구가 이루어지고 있으나 염분 노출이 담수생물에 미치는 영향을 살펴본 연구는 전무하다(Nikapitiya *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

생물의 신진대사 활동, 세포의 성장과 분화, 세포 사멸과 같은 활동에 중요한 역할을 하는 열충격단백질(Heat shock proteins: HSPs)은 증금속, 살충제, 항생제와 같은 물질의 노출에 의해서도 세포 내 HSPs 합성이 유도되어 발현이 증가된다고 알려졌다(Cui *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Mouguelar and Coux, 2012). 외부 기인의 유해물질 노출과 체내 생리적 환경 변화에 반응하는 HSPs는 세포의 항상성 유지와 다양한 생리적 활동에 관여하는 특성을 지니고 있어 최근에는 생물의 스트레스 지표유전자로 활용하고자 하는 연구들이 이루어지고 있다(Park and Kwak, 2013; Kim *et al.*, 2015; Ricketts *et al.*, 2015). 양식장에서 사육된 이매패류(*Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*) 중 성장발육이 좋지 않은 개체에서 HSP70 유전자 발현이 크게 증가한다고 알려지기도 하였다(Kim *et al.*, 2016). 또한 항생제 fenbendazole에 노출된 갈따구 *C. riparius*에서는 HSP70뿐만 아니라 항산화에 관여하는 cytochrome p450, glutathione S-transferases 유전자 발현이 증가되기도 하였다(Park *et al.*, 2009). HSP70은 단백질 접합과 세포 보호에 기여하는 샤페론(Chaperones) 단백질로 병원체 감염, 온도, 삼투 스트레스에 대해 방어 작용에도 관여하여 다양한 원인물질에 의한 생물적인 반응을 반영할 수 있는 지표유전자라고 할 수 있다(Dong *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

파리목(Diptera)에 속하는 갈따구인 *Chironomus riparius*는 OECD 표준 시험생물로 알려져 있으며(OECD, 2004), 비교적 짧은 생활사를 가지며, 실내 사육의 용이성, 생활사 단계를 쉽게 구분할 수 있는 장점으로 실내 실험에 오랫동안 사용되고 있다(Anderson, 1977). 또한 *C. riparius*는 하상에 서식하는 특성을 지녀 저서환경을 반영할 수 있는 지표생물로도 사용되고 있다(Ibrahim *et al.*, 1998). 최근에는 활성탄(activated carbon)으로 인한 독성학적 영향을 *C. riparius*의 생활사를 이용하여 평가하기도 하였으며(Nybo *et al.*, 2016), 항경련제로 사용되는 carbamazepine의 유해성을 *C. riparius*를 대상으로 하여 분자생물학적인 관점에서 살펴보기도 하였다(Heye *et al.*, 2016). *C. riparius* 두부의 구강구조와 하순기절(mentum)은 환경 여건에 따

라 형태학적으로 변화가 나타나므로 오염원이나 유해물질에 의한 영향을 파악하기 위한 형태 판정점으로 제시되고 있다(Meregalli *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009).

이상 기후로 인한 강우의 패턴 변화와 여름의 집중강우는 담수생물을 일시적으로 강의 하구나 만 그리고 연안으로 유입시키기도 한다. 특히, 연안이나 준설매립지로 유입된 갈따구류는 다량으로 집중 번식하여 민원이 제기되기도 하였다. 이에 사육조건과 연구가 잘 축적된 실내 사육종인 *C. riparius*를 대상으로 염분 변화로 인한 담수생물의 잠재적인 피해를 파악하고자 생태독성학적인 반응과 HSP70 유전자 발현을 살펴보고자 한다. 생태독성학적인 반응으로 염분 노출기간 동안 *C. riparius*의 생존율, 탈피율, 성장기간과 하순기절을 관찰하고 스트레스 반응지표인 HSP70 유전자 발현을 측정하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 생물

실험대상종인 *C. riparius*는 OECD 표준 사육방법에 따랐으며, 배양액은 M4배지(0 psu)를 사용하였다(Elendt, 1990). 항온기 내부에서 온도는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 60%, 광도 500 lx, 광주기 명암은 16:8의 조건으로 사육하였다. 서식 환경 조성을 위해 하상에는 모래($< 63 \mu\text{m}$)를 투입하였으며, 먹이로는 Tetramin(Tetra-Werke, Melle, Germany)을 곱게 갈아 매일 유충당 0.5 mg/day씩 공급하였다.

2. 염분 노출 및 조건

염분 노출은 인공 염분(Instant Ocean, France)을 M4배지에 녹여서 사용하였다. 처리 농도는 0, 5, 10, 15, 20, 25 psu로, 실험이 진행되는 동안 수온, 염분, 생존율을 매일 측정하였다. 노출 실험을 위해 실내 사육 중인 *C. riparius* 4령기 개체를 선별하였다. 실험수조는 300 mL 비커를 사용하였으며, 각 수조당 16마리씩 배치하고 3반복 하였으며 노출 조건은 사육조건과 동일하게 항온기 내에서 하였다. 노출 실험하는 동안 개체 간 공식을 막기 위하여 tetramin을 공급하였다. 개체 성장과 치사는 육안으로 보았을 때 붉은 빛을 띠지 않고 스포이드의 물자극에 대해 움직임이 없는 경우 치사로 판단하였다. 또한, 염분에 따른 HSP70 유전자 발현을 측정하기 위하여 각 농도당 3마리씩 96시간 노출하여 샘플링하여 액체질소에 고정 후 -80°C 에 보관하였다.

Table 1. Primers used to amplify specific genes.

Gene name	Primer sequence (5' to 3')	Amplification size (bp)	Accession number
HSP70	F: CATGTGAACGAGCCAAGAGA R: TCGAGTTGATCCACCAACAA	300	AY163157
GAPDH	F: GGTATTTTCATTGAATGATCACTTTG R: TAATCCTTGGATTGCATGTACTTG	110	EU999991

3. 하순기절 관찰

구강의 하순기절 관찰은 염분 노출 96시간 후에 *C. riparius*를 대조군, 10, 15 psu에서 각각 3마리 샘플링하여 에틸알코올에 보관하였다. 보관된 *C. riparius*의 몸통과 머리를 분리 후, 머리를 슬라이드에 놓고 CMC-10 (Master Company, Inc., Wooddale, Illinois)을 처리 후 커버글라스로 고정하였다. 커버글라스를 이용하여 머리를 납작하게 만든 후 머리의 해부학적 구조를 현미경 (Olympus BX51, Japan)을 이용하여 하순기절을 관찰하였으며 하순기절 기형에 대한 기준은 Dickman *et al.* (1992) 자료를 이용하였다.

4. RNA 추출 및 cDNA 합성

Trizol[®] Regent (Life Technologies, USA)를 이용하여 -80°C에 보관된 *C. riparius*의 total RNA를 추출하였으며, total RNA 내 genomic DNA를 제거하기 위해 recombinant DNase I (Takara, Japan)을 사용하였다. 처리한 RNA는 purity를 확인하기 위해 1.2% agarose gel 전기영동장치를 통해 확인 후 RNA 정량을 위해 Gene-Quant 1300 (GE Healthcare, UK)과 Nuclease free water를 이용하여 정량 후, -80°C에서 보관하였다. cDNA합성은 Primer script[™] 1st strand cDNA synthesis Kit (Takara, Japan)를 통해 다음과 같은 방법에 따라 실험을 진행하였다 (Nikapitiya *et al.*, 2014). RNA 1.0 µg, reaction mixture 10.0 µL, oligo dT Primer (50 µM) 1.0 µL, dNTP mixture (10 mM) 1.0 µL와 nuclease free water를 이용하여 합성하고, 샘플들을 65°C에서 5분 배양 후 얼음 위에서 보관하였다. 그 후, 5x primer script buffer 4.0 µL, RNase inhibitor (20 units) 0.5 µL, primer script RTase (200 units) 1.0 µL, RNase free water 4.5 µL를 섞어서 전체 20.0 µL로 맞추어 incubator 내에서 42°C 1시간, 95°C에서 5분 진행하였다. 합성된 cDNA는 15배로 희석 후 유전자 발현실험 전까지 -20°C에서 보관하였다.

5. Real-Time RT-PCR을 통한 유전자 증폭

염분에 노출된 *C. riparius*의 HSP70 유전자 발현을 측정하기 위해 Real-Time RT-PCR을 하였다. NCBI에서 *C.*

*riparius*의 HSP70 nucleotide sequence를 검색하고 primer 3를 사용하여 primer를 디자인하였으며, 유전자 발현의 상대적 비교를 위해 GAPDH를 internal control로 설정하였다 (Table 1). Real-Time RT-PCR 증폭과 발현량 측정은 SYBR green mixture (Takara, Japan)와 AB7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하였다. Real-Time RT-PCR 조건은 94°C에서 20초, 55°C에서 40초, 72°C에서 40초로 38 cycles로 하였으며, HSP70 발현량은 AB7300 system SDS software를 이용하여 분석하였고 발현에 따른 측정 오차를 줄이기 위하여 3 반복하였다.

6. 계통진화적 분석

*C. riparius*의 HSP70 유전자의 계통학적 연관성을 확인하기 위해 Genebank ClustalX (version 1.8)로 아미노산 수준에서 중간 분포를 확인하였다. 다중배열은 GeneDoc (ver. 2.6)을 사용하였으며, 계통수 분석은 Mega6 (Tamura *et al.*, 2013) neighbor-joining으로, Bootstrap은 1,000으로 설정하여 분석하였다.

7. 통계적 자료 분석

C. riparius 유전자 발현 결과에 대해 분산 분석 (ANOVA, $\alpha=0.05$)을 실시하고, 모든 데이터는 평균±분산 값으로 표시하였다. 각 데이터들의 유의적 차이를 비교하기 위해 SPSS 12.0KO (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Tukey's test로 분석하고 통계적 유의수준 ($P<0.05$)으로 검정하였다.

결 과

1. 생존율

다양한 염분농도에 노출된 *C. riparius*의 생존율은 전체적으로 농도의존적인 감소를 보였다 (Fig. 1). 대조군과 5 psu는 염분 노출 day 7일 후 다른 노출군에 비해 높은 생

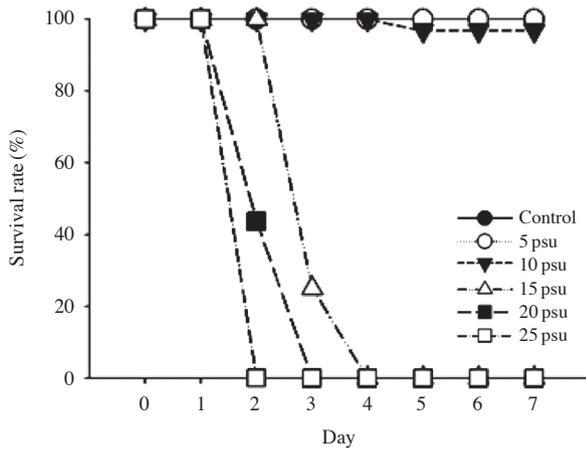


Fig. 1. Cumulative survival percentage (%) of *C. riparius* that had been exposed at different salinity levels of control, 5, 10, 15, 20, 25 psu up to 7 days.

존율을 보였다. 10 psu는 염분 노출 day 4일 때 생존율이 100%를 유지하였으나 이후 96%로 감소하였다. 15 psu는 염분 노출 day 2일 때 100% 생존율을 보였으나, day 3일 이후 생존율이 25%로 크게 감소하며 시간 의존적인 생존율 감소를 보였다. 20 psu는 염분 노출 day 2일 때 생존율이 43%로 감소하였으며 25 psu는 염분 노출 day 3일 때 생존율이 0%로 나타났다.

2. 탈피율과 발육기간

염분에 노출된 *C. riparius*의 탈피율을 관찰하였다(Fig. 2). 대조군에서는 pupation이 94%, emergence가 97%, 5 psu에서는 pupation과 emergence가 100%를 보였다. 10 psu에 노출된 *C. riparius*는 pupation이 16%로 대조군에 비해 크게 감소하였으며, emergence는 0%를 보였다. 15 psu 이상의 염분에 노출된 *C. riparius*에서는 pupation과 emergence가 관찰되지 않았다. 염분에 노출된 *C. riparius*의 발육기간을 관찰한 결과, 대조군의 발육기간은 pupation이 12일, emergence가 15일을 보였다(Fig. 3). 5 psu에 노출된 *C. riparius*는 pupation이 12일, emergence가 14일을 보이며, 대조군과 유사한 발육기간을 보였다. 그러나 10 psu에 노출된 *C. riparius*는 pupation이 지연되어 16일이 되었으며, emergence는 나타나지 않았다. 염분농도가 높아짐에 따라 *C. riparius*의 성장지연이 관찰되었으며 15 psu 이상의 염분에 노출된 *C. riparius*에서는 생존률이 없었으므로 성장기간을 관찰할 수 없었다.

3. 하순기절 기형 관찰

염분에 96시간 노출된 *C. riparius* 구강의 하순기절을 관

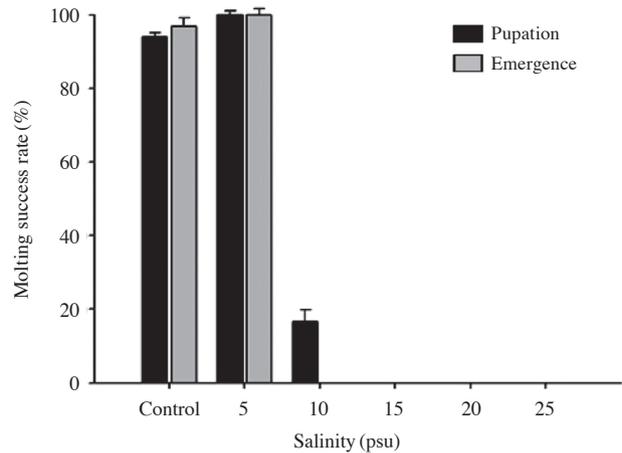


Fig. 2. The success rates of pupation and emergence after salinity exposure for 7 days. The experiment was performed in triplicate, and the data are mean \pm standard error. Differences between altered salinity concentration and control condition samples were considered to be statistically significant when $*P < 0.05$.

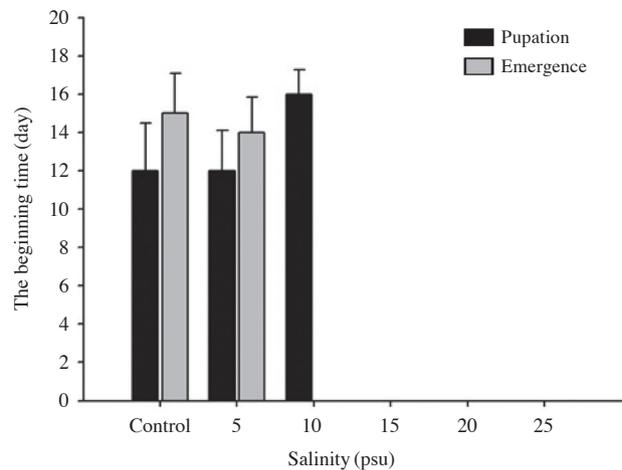


Fig. 3. The beginning time of pupation and emergence during exposure to the indicated salinity concentration. The experiment was performed in triplicate, and the data are mean \pm standard error. Differences between altered salinity concentration and control condition samples were considered to be statistically significant when $*P < 0.05$.

찰하였다(Fig. 4). *C. riparius* 하순기절은 중앙 순치(Median lateral teeth, MLT)와 2개의 순치(Lateral teeth, LT)로 총 3부분으로 구성되어 있다. 10 psu에 노출된 *C. riparius* 하순기절의 MLT가 갈라지는 것이 관찰되었다(Fig. 4B). 15 psu에서는 96시간 생존하는 개체가 없어 하순기절을 관찰하지 못하였으나, 72시간 노출된 개체에서 하순기절 MLT의 갈라짐과 MLT와 LT 사이의 틈이 커졌다(Fig. 4C).

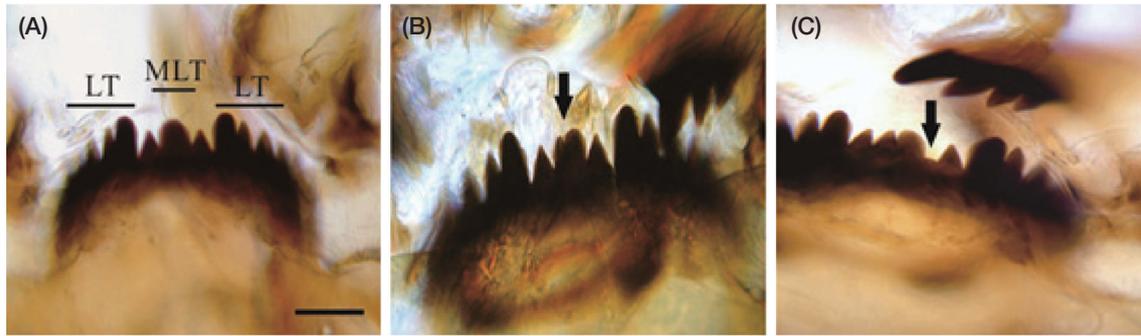


Fig. 4. Types of mentum deformity exposure to salinity after 96 hour. (A) Control: normal arrangement of teeth consists of three median lateral teeth (MLT) and two parts of the lateral tooth (LT), (B) split medial teeth, (C) split medial teeth of *C. riparius*. The black arrows indicate the region of deformity (A~C scale bar: 50 μ m).

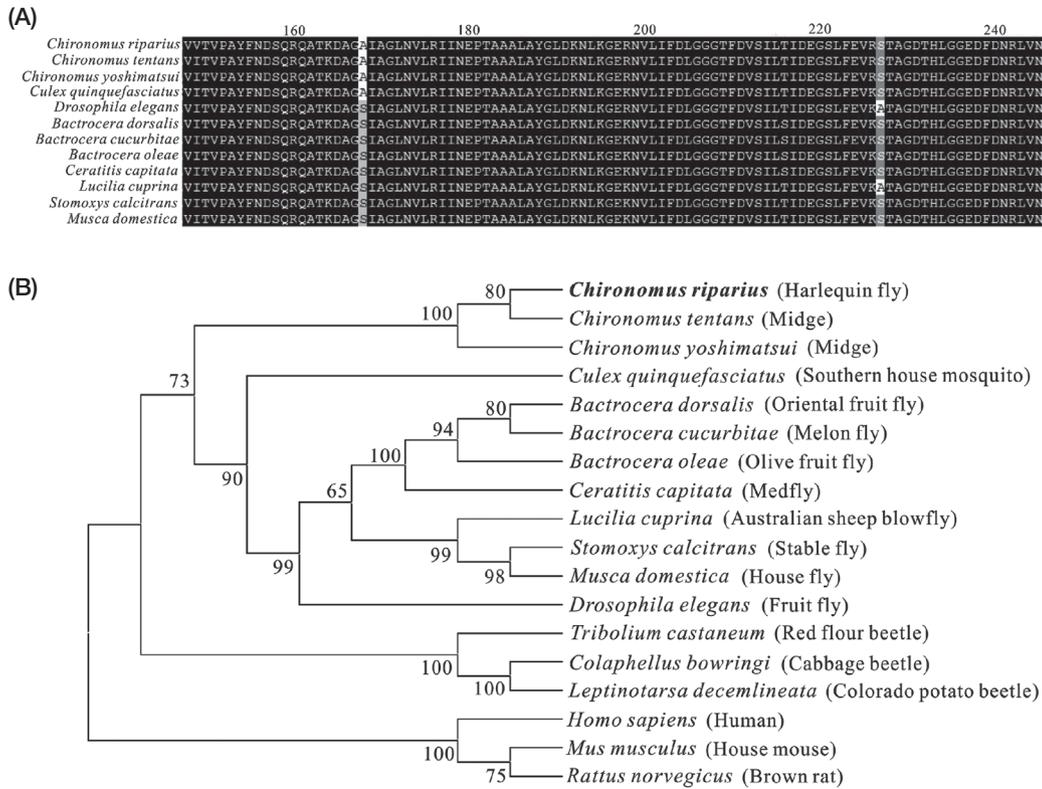


Fig. 5. Genome analysis of heat shock protein 70 (HSP70) gene in the *C. riparius*. (A) Multiple sequence alignment of the deduced *C. riparius* HSP70 with the sequence of other species. (B) Phylogenetic tree of the HSP70 gene constructed via neighbor-joining analysis (bootstrap value 1,000). The GeneBank accession numbers were as follows: *C. riparius* (ADL27420); *C. tentans* (AAN85117); *C. yoshimatsui* (BAD42358); *C. quinquefasciatus* (XP001864723); *B. dorsalis* (XP011211610); *B. cucurbitae* (XP011178245); *B. oleae* (XP014089867); *C. capitata* (XP004536638); *L. cuprina* (KNC33132); *S. calcitrans* (XP013099511); *M. domestica* (XP005183030); *D. elegans* (XP017111146); *T. castaneum* (XP973521); *C. bowringi* (AHF52926); *L. decemlineata* (AHA36970); *H. sapiens* (NP006588); *M. musculus* (NP112442); *R. norvegicus* (NP077327).

4. HSP70 계통진화적 분석과 유전자 발현

C. riparius HSP70 amino acid sequence와 다른 종 간의

서열 차이를 분석하였다(Fig. 5). 다중배열에서는 *C. riparius*와 같은 열대집모기 (*Culex quinquefasciatus*), 집파리 (*Musca domestica*), 노랑초파리 (*Drosophila melanogaster*)

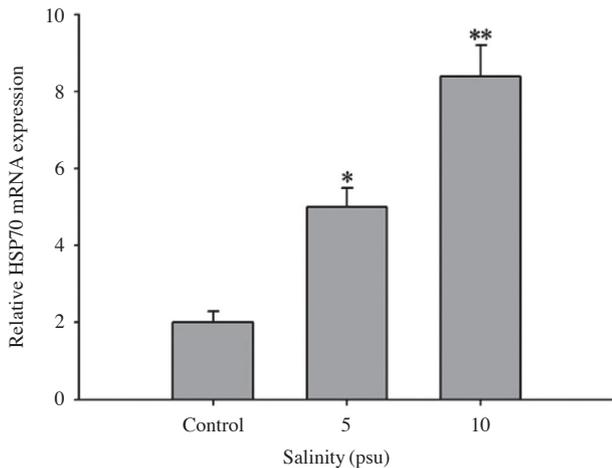


Fig. 6. Expression of the HSP70 genes in fourth-instar *C. riparius* larvae exposed to difference salinity concentration for 96 hour. HSP70 mRNA expression is shown relative to GAPDH expression following normalization. The experiment was performed in triplicate and the data are expressed as the means \pm the standard error of the mean. Differences between salinity treated sample and non-treated samples (control) were considered to be significant at * $P < 0.05$.

등의 곤충류와 96% 이상의 높은 상동성을 나타내었다 (Fig. 5A). 계통진화 분석 결과, *C. riparius*의 HSP70은 같은 깔따구에 속하는 *Chironomus tentans*, *Chironomus yoshimatsui*와 같은 클러스터 그룹을 형성하였으며, 실파리 (*Bactrocera dorsalis*), 침파리 (*Stomoxys calcitrans*), 감자잎벌레 (*Leptinotarsa decemlineata*) 등의 다양한 곤충류에서 HSP70이 존재하였다 (Fig. 5B). 인간 (*Homo sapiens*), 쥐 (*Mus musculus*) 등의 포유류 HSP70과 곤충류 HSP70은 다른 클러스터 그룹으로 구분되었다.

생물의 생리적 변화를 반영하는 HSP70 유전자를 이용하여 96시간 염분에 노출된 *C. riparius* 발현을 측정하였다 (Fig. 6). *C. riparius*의 HSP70 발현량은 5 psu가 대조군에 비해 약 2배 이상 높은 발현을 보였으며, 10 psu는 약 4배 이상 높은 발현량을 보였다. 또한 5와 10 psu는 통계적으로 유의한 수준으로 높은 HSP70 발현을 보였다 ($P < 0.05$).

고 찰

생물의 생리적 변화를 유도하는 환경변화 요인 중 염분 변화는 생물의 행동, 신진대사, 성장 등에 영향을 준다 (Fleury *et al.*, 2010; Chaney and Gracey, 2011). 최근 염분 노출에 의한 동·식물의 형태적 변화, 성장 지연, 내성 변화 등에 대한 분자생물학적인 연구가 보고되고 있다 (Zhang

and Shi, 2013; Davies *et al.*, 2014; Deinlein *et al.*, 2014; Farooq *et al.*, 2015). 해양 생물인 해삼 (*Apostichopus japonicus*)은 저염분 환경 내에서 HSPs와 활성산소 관련 유전자의 발현 변화가 보고되었으며 (Wang *et al.*, 2014), 저염분에 노출된 칠게 (*Macrophthalmus japonicus*)의 생존율과 prophenoloxidase 관련 유전자 발현에 변화가 나타남이 보고되었다 (Paital and Chainy, 2010; Nikapitiya *et al.*, 2014). 그러나 담수생물을 대상으로 염분 노출이 생물에 끼친 영향을 연구한 사례는 희소하다.

본 연구에서 염분 노출로 인한 *C. riparius*의 생물학적 반응을 살펴보면, 15 psu에서 25 psu에 노출된 *C. riparius*는 생존율이 급격히 감소하여 day 2~day 4에 모두 치사하였으며, 대조군과 5, 10 psu에서는 상대적으로 높은 생존율을 보였다 (Fig. 1). 따라서 대조군 5와 10 psu에서 탈피율과 성장기간은 관찰할 수 있었는데, 대조군은 pupation이 94%, emergence는 100%를 보였으며, 5 psu는 pupation과 emergence가 각각 100%를, 10 psu에서는 pupation이 16%, emergence가 0%로 매우 낮았다 (Fig. 2). 10 psu에서 성장기간은 16일로 대조군이 12일인 데 비해서 4일의 성장지연이 나타났다 (Fig. 3). Bervoets *et al.* (1996)은 *C. riparius*를 염분에 노출하여 성장지연이 나타남을 보고하였으며, Hassell *et al.* (2006)은 야외 Chironomidae종을 장기적인 염분에 노출하여 성장지연이 나타난다고 하여, 담수생물인 Chironomidae종에 대한 염분의 영향은 성장지연에 반영되어지는 것으로 볼 수 있다.

유해물질 노출로 인해 생물체 내에 발생한 활성산소 (reactive oxygen species)의 해독에는 지질동성호르몬 (adipokinetic hormone, AKH)이 사용되며 개체 간 성장 차이를 유발시키는 것으로 보고되었다 (Lorenz and Gäde, 2009; Velki *et al.*, 2011). 본 연구에서 나타난 *C. riparius*의 성장지연은 성장에 사용되어야 할 에너지를 염분 변화로 인한 삼투작용을 비롯한 생리적, 면역작용에 소모하여 성장에 차이가 나타날 수 있을 것으로 보여지며 추후 이에 연구가 필요할 것이다.

염분 노출 96시간 후 소수의 *C. riparius* 하순기절에 기형이 관찰되었는데 (Fig. 4), 저농도의 살충제 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)와 DEHP (di(2-ethylhexyl) phthalate) 노출 후 하순기절 MLT에 split이 나타났던 것과 유사하여, 담수생물에게 염분 노출은 EDCs와 같은 매우 큰 스트레스 원인물질이 될 수 있음을 시사하였다 (Dias *et al.*, 2008; Park and Kwak, 2008; Park *et al.*, 2010).

생물의 HSP70은 중금속, 온도 등에 노출 시 높은 발현을 보이는 특징으로 인해 분자지표 유전자로 다수 연구가 이루어지고 있다 (Lee *et al.*, 2006; Park and Kwak, 2008,

2014; Kim *et al.*, 2015). 세포 내 유전자 전사, 접합 등에 기여하는 HSP70은 스트레스 환경에 노출된 생물에서 발현량이 크게 증가되었으며 생리작용과 항상성 유지에 에너지를 소모함으로써 성장과 번식에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Somero, 2002). 염분(30 psu)에 노출된 톱날 꽃게 (*Scylla paramamosain*)에서 HSP70 유전자 발현이 대조군(15 psu)에 비해 약 2~3배 높게 나타남을 보였으며(Yang *et al.*, 2013), 염분에 노출된 해삼(*Apostichopus japonicus*)에서도 HSP70 발현이 증가한 것으로 보고되었다(Wang *et al.*, 2014). 또한 살충제, 자외선, 항생제 등에 노출된 *C. riparius*에서 HSP70 발현량이 증가되었다(Park *et al.*, 2009, 2010; Orez *et al.*, 2016). 본 연구에서 상대적으로 높은 염분인 15 psu 이상에서는 96시간 이내에 치사하여 *C. riparius* HSP70의 유전자 발현을 측정하지 못하였으나 10 psu에서 대조군보다 약 4배 정도 높은 발현 증가를 보여 염분 스트레스 반응을 파악할 수 있는 분자지표로도 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

기후변화로 잦아진 강우에 의해 염분 환경에 유입되는 담수생물의 영향을 파악해 보고자 하였다. 담수의 오염 지표생물인 갈따구과의 실내 실험종인 *C. riparius*를 대상으로 염분 노출에 따른 스트레스 반응으로 생존율과 탈피율, 성장기간, 하순기절 기형을 분석하였고, 분자생물학적으로 스트레스 분자마커로 연구가 이루어진 HSP70 유전자 발현을 측정하였다. *C. riparius*의 생존율은 노출시간에 따라 감소하였으며 15 psu에서 4일이 경과하면 생존개체가 관찰되지 않았다. *C. riparius*의 pupation과 emergence는 15 psu 이상에서는 보이지 않았고 탈피의 성공은 10 psu에서 20% 이하였다. 또한 *C. riparius*의 성장지연은 pupation과 emergence 기간에서 잘 반영되어, 대조군과 5 psu에 비해 10 psu에서 4일이 늦어졌다. 염분 노출 96시간 후 관찰한 *C. riparius* 하순기절 형태 이상은 10 psu와 15 psu에서 소수 관찰되었다. *C. riparius* HSP70 유전자 발현은 대조군에 비해 5, 10 psu에서 약 2.5~4배 이상 발현량이 크게 증가하였다. 따라서 염분은 담수생물에게 매우 큰 스트레스를 제공하는 원인물질로 유해물질과 유사한 생태독성학적 반응과 분자지표 반응을 보여주었다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 NRF-2016-R1D1A3B-03934515

지원을 받아 이루어졌습니다.

REFERENCES

- Anderson, R.L. 1977. Chironomidae toxicity tests - biological background and procedures. In: Buikema, A.L., Cairns, J. (Eds.), Aquatic Invertebrate Bioassays. American Society for Testing and Materials (ASTM). 209pp.
- Bervoets, L., C. Wils and R. Verheyen. 1996. Tolerance of *Chironomus riparius* larvae (Diptera: Chironomidae) to salinity. *Bulletin of environmental contamination and Toxicology* **57**: 829-835.
- Chaney, M.L. and A.Y. Gracey. 2011. Mass mortality in Pacific oysters associated with a specific gene expression signature. *Molecular Ecology* **20**(14): 2942-2945.
- Cui, Z., Y. Liu, W. Luan, Q. Li, D. Wu and S. Wang. 2010. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Fish & Shellfish Immunology* **28**(1): 56-64.
- Davies, S.A., P. Cabrero, G. Overend, L. Aitchison, S. Sebastian, S. Terhzaz and J.A. Dow. 2014. Cell signaling mechanisms for insect stress tolerance. *Journal of Experimental Biology* **217**(1): 119-128.
- Deinlein, U., A.B. Stephan, T. Horie, W. Luo, G. Xu and J.I. Schroeder. 2014. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science* **19**(6): 371-379.
- Dias, V., C. Vasseur and J.M. Bonzom. 2008. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: effects on survival, development time, growth and mouthpart deformities. *Chemosphere* **71**(3): 574-581.
- Dickman, M., I. Brindle and M. Benson. 1992. Evidence of teratogens in sediments of the Niagara river watershed as reflected by Chironomid (Diptera: Chironomidae) deformities. *Journal of Great Lakes Research* **18**(3): 467-480.
- Dong, Y., S. Dong and X. Meng. 2008. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Aquaculture* **276**(1): 179-186.
- Elendt, B.P. and W.R. Bias. 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing; effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *Daphnia magna*. *Water Research* **24**: 1157-1167.
- Farooq, M., M. Hussain, A. Wakeel and K.H.M. Siddique. 2015. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* **35**(2): 461-481.
- Fleury, E., J. Moal, V. Boulo, J.Y. Daniel, D. Mazurais, A. Henaut, C. Corporeau, P. Boudry, P. Favrel and A. Huvet. 2010. Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster se-

- lected to be resistant or susceptible to summer mortality. *Marine Biotechnology* **12**(3): 326-339.
- Hassell, K.L., B.J. Kefford and D. Nugegoda. 2006. Sub-lethal and chronic salinity tolerances of three freshwater insects: Cloeon sp. and Centropilum sp. (Ephemeroptera: Baetidae) and Chironomus sp. (Diptera: Chironomidae). *Journal of Experimental Biology* **209**(20): 4024-4032.
- Heye, K., D. Becker, C.L. Eversloh, V. Durmaz, T.A. Ternes, M. Oetken and J. Oehlmann. 2016. Effects of carbamazepine and two of its metabolites on the non-biting midge *Chironomus riparius* in a sediment full life cycle toxicity test. *Water Research* **98**: 19-27.
- Hussain, M., H.W. Park, M. Farooq, K. Jabran and D.J. Lee. 2013. Morphological and physiological basis of salt resistance in different rice genotypes. *International Journal of Agriculture & Biology* **15**: 113-118.
- Ibrahim, H., R. Kheir, S. Helmi, J. Lewis and M. Crane. 1998. Effects of organophosphorus, carbamate, pyrethroid and organochlorine pesticides and a heavy metal on survival and cholinesterase activity of *Chironomus riparius* Meigen. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **60**(3): 448-455.
- Kim, W.S., K. Park, C. Nikapitiya and I.S. Kwak. 2015. The molecular biomarker genes expression of rearing species *Chironomus riparius* and field species *Chironomus plumosus* exposure to heavy metals. *Korean Journal of Ecology and Environment* **48**: 86-94.
- Kim, W.S., K. Park, J.K. Kim and I.S. Kwak. 2016. Expression of the heat shock protein 70 gene and external developmental traits of two Bivalvia species, *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis*, under aquaculture environments. *Korean Journal of Ecology and Environment* **49**(1): 22-30.
- Lee, S.M., S.B. Lee, C.H. Park and J. Choi. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* **65**(6): 1074-1081.
- Lorenz, M.W. and G. Gäde. 2009. Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. *Integrative and Comparative Biology* **49**(4): 380-392.
- Meregalli, G., L. Pluymers and F. Ollevier. 2001. Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvaed exposed to 4-n-nonylphenol. *Environmental Pollution* **111**(2): 241-246.
- Mouguelar, V.S. and G. Coux. 2012. Amphibian oocytes release heat shock protein A during spawning: evidence for a role in fertilization. *Biology of Reproduction* **87**(2): 33.
- Nikapitiya, C., W.S. Kim, K. Park and I.S. Kwak. 2014. Identification of potential markers and sensitive tissues for low or high salinity stress in an intertidal mud crab (*Macrophthalmus japonicus*). *Fish & Shellfish Immunology* **41**(2): 407-416.
- Nybom, I., S. Abel, K. Mäenpää and J. Akkanen. 2016. Effects of activated carbon amended sediment on biological responses in *Chironomus riparius* multi-generation testing. *Journal of Hazardous Materials* **318**: 388-395.
- OECD. 2004. Test no. 219: sediment-water chironomid toxicity using spiked water. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Paris, France).
- Oráez, I., G. Morcillo and J.L. Martínez-Guitarte. 2016. Ultra-violet filters differentially impact the expression of key endocrine and stress genes in embryos and larvae of *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment* **557**: 240-247.
- Paital, B. and G.B.N. Chainy. 2010. Antioxidant defecses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **151**: 142-151.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2008. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di (2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* **74**(1): 89-95.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2013. Expression of stress response HSP70 gene in Asian paddle crabs, *Charybdis japonica*, exposure to endocrine disrupting chemicals, bisphenol A (BPA) and 4-nonylphenol (NP). *Ocean Science Journal* **48**(2): 207-214.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2014. The effect of temperature gradients on endocrine signaling and antioxidant gene expression during *Chironomus riparius* development. *Science of the Total Environment* **470**: 1003-1011.
- Park, K., H.W. Bang, J. Park and I.S. Kwak. 2009. Ecotoxicological multilevel-evolution of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere* **77**(3): 359-367.
- Park, K., J. Park and I.S. Kwak. 2010. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **151**(4): 439-446.
- Ricketts, C.D., W.R. Bates and S.D. Reid. 2015. The effects of acute waterborne exposure to sublethal concentrations of molybdenum on the stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Plos One* **10**(1): e0115334.
- Romano, N. and C. Zeng. 2012. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interaction with elevated ammonia exposure. *Aquaculture* **334**: 12-23.
- Somero, G.N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits and costs of living. *Integrative and Comparative Biology* **42**(4): 780-789.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis

- version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.
- Velki, M., D. Kodr k, J. Ve e a, B.K. Hackenberger and R. Socha. 2011. Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. *General and Comparative Endocrinology* **172**(1): 77-84.
- Wang, Q.I., S.S. Yu, C.X. Qin, S.I. Dong and Y.W. Dong. 2014. Combined effects of acute thermal and hypo-osmotic stresses on osmolality and hsp70, hsp90 and sod expression in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Aquaculture International* **22**(3): 1149-1161.
- Wu, R., Y. Sun, L. Lei and S. Xie. 2008. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (HSC70) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Molecular Biology* **42**(2): 234-242.
- Yang, Y.N., H. Ye, H. Huang, S. Li, X. Liu, X. Zeng and J. Gong. 2013. Expression of Hsp70 in the mud crab, *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress. *Cell Stress and Chaperones* **18**(4): 475-482.
- Zhang, J.L. and H. Shi. 2013. Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynthesis Research* **115**(1): 1-22.
- Zhou, J., W.N. Wang, W.Y. He, Y. Zheng, L. Wang, Y. Xin, Y. Liu and A.L. Wang. 2010. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology* **130**(3): 170-178.