



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](#)

수산학박사 학위논문

비선택성 제초제 Basta에 노출된 미꾸라지
*Misgurnus mizolepis*의 병리조직학적 분석
및 전사체 프로파일링

2018년 2월

부경대학교대학원

수산생물학과

황 세 원

수산학박사 학위논문

비선택성 제초제 Basta에 노출된 미꾸라지
*Misgurnus mizolepis*의 병리조직학적 분석
및 전사체 프로파일링

지도교수 김동수

이 논문을 수산학박사 학위논문으로 제출함.

2018년 2월

부경대학교대학원

수산생물학과

황 세 원

황세원의 수산학박사 학위논문을 인준함.

2018년 2월 26일

위원장 수산학박사 노 충 환

(인)

위 원 이 학 박 사 김 봉 석

(인)

위 원 수산학박사 남 윤 권

(인)

위 원 수산학박사 최 윤 희

(인)

위 원 이 학 박 사 김 동 수

(인)

목 차

목차	i
표 목차(List of Tables)	iv
그림 목차(List of Figures)	vi
Abstract	x
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 시험물질	7
2. Basta의 미꾸라지에 대한 독성평가	7
가. 시험생물	7
나. 독성시험	8
(1) 급성 독성시험	8
(2) 아만성 독성시험	9
(3) 조직학적 분석	10
(4) 병리조직학적 분석	10
다. 통계처리	11
3. Basta 노출에 대한 NGS 분석을 통한 전사체 프로파일링	13
가. Basta 노출 및 RNA sample	13

나. RNA-sequencing 및 assembly	13
(1) Total RNA isolation	13
(2) RNA-seq library 구축 및 Illumina sequencing	13
(3) Raw data 확보 및 Data trimming	14
(4) <i>De novo</i> Assembly 및 Clustering	14
(5) Differentially expressed gene analysis	14
다. Annotation	15
(1) Database 구축 및 annotation	15
(2) Functional annotation of unigenes	15
III. 결 과	16
1. Basta 독성시험	16
가. 급성독성	16
(1) 누적폐사율	16
(2) 반수치사농도	19
나. 아만성 독성시험의 조직학적 연구	26
(1) 아가미와 간의 병리조직학적 변화	26
(2) 아가미와 간의 병리조직학적 분석지수	34
2. Basta에 노출된 미꾸라지 조직의 전사체 분석	40
가. 전사체 분석	40
나. Unigenes의 annotation	40
(1) BLASTX 분석을 통한 annotation결과	42
(2) BLASTX 결과의 신뢰도 분석	44
다. Annotation 결과를 통한 유전자 기능 예측	46
(1) KEGG pathway 분석을 통한 annotation	46

(2) Blast2GO 분석을 통한 annotation	67
IV. 고 찰	97
감사의 글	109
참고문헌	110



표 목차(List of Tables)

Table 2-1. Importance factors assigned to gill and liver histological alteration for each reaction pattern	12
Table 3-1. Cumulative mortality rate of larvae <i>Misgurnus mizolepis</i> exposed to Basta herbicide for the acute toxicity test	17
Table 3-2. Cumulative mortality rate of juvenile <i>Misgurnus mizolepis</i> exposed to Basta herbicide for the acute toxicity test	18
Table 3-3. Cumulative mortality rate of sub-adult <i>Misgurnus mizolepis</i> exposed to Basta herbicide for the acute toxicity test	20
Table 3-4. Acute toxicity values of Basta herbicide to different growth stage of <i>Misgurnus mizolepis</i>	22
Table 3-5. Histopathological indices (HIs) after subchronic exposure to Basta in the larvae of mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i>	37
Table 3-6. Histopathological indices (HIs) after subchronic exposure to Basta in the sub-adult of mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i>	39
Table 3-7. Summary statistics of transcriptome sequencing for mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i> exposed to Basta	41
Table 3-8. Number of unigene annotations obtained from the different protein databases, using BLASTX search	43
Table 3-9. KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) pathway analysis associated with the transcriptome of mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i> exposed to Basta herbicide	47

Table 3-10. Up & down regulated contigs from KEGG pathway analysis associated with the transcriptome of mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i> exposed to Basta herbicide	55
Table 3-11. Candidate contigs from differently expressed genes analysis in brain tissues of mud loach exposed to Basta	57
Table 3-12. Candidate contigs from differently expressed genes analysis in gill tissues of mud loach exposed to Basta	59
Table 3-13. Candidate contigs from differently expressed genes analysis in liver tissues of mud loach exposed to Basta	61

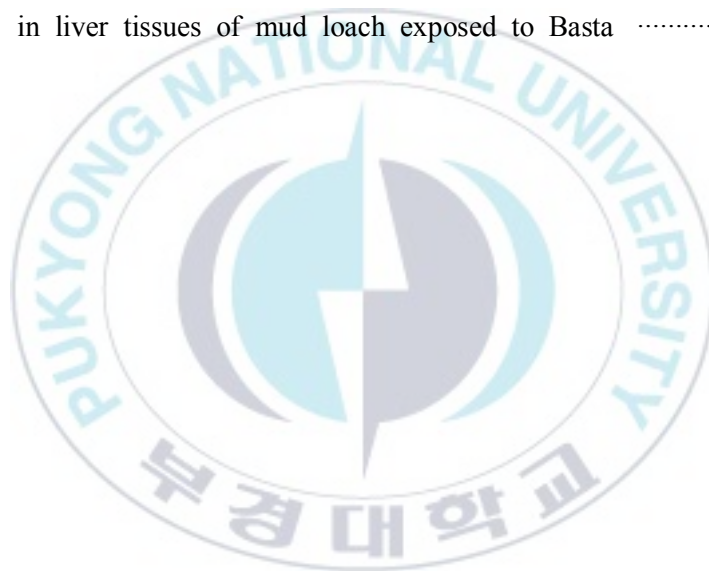


그림 목차(List of Figures)

Fig. 2-1. Structural formula of glufosinate ammonium.	7
Fig. 3-1. Linear relationship between the probit response and log concentration of Basta in the larvae A (48 h) and B (96 h) mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i>	23
Fig. 3-2. Linear relationship between the probit response and log concentration of Basta in the juvenile A (48 h) and B (96 h) mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i>	24
Fig. 3-3. Linear relationship between the probit response and log concentration of Basta in the subadult A (48 h) and B (96 h) mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i>	25
Fig. 3-4. Histological gill sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 14 days in the mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i> larvae.	27
Fig. 3-5. Histological gill sections from individuals after the chronic toxicity test performed for 28 days in the mud loach <i>Misgrnus mizolepis</i> larvae.	28
Fig. 3-6. Histological liver sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 14 days in the mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i> larvae.	29
Fig. 3-7. Histological liver sections from individuals after the chronic toxicity test performed for 28 days in the mud loach <i>Misgurnus mizolepis</i> larvae.	31

Fig. 3-8. Histological gill sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 14 days in the mud loach	
<i>Misgurnus mizolepis</i> sub-adult.	32
Fig. 3-9. Histological gill sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 28 days in the mud loach	
<i>Misgurnus mizolepis</i> sub-adult.	33
Fig. 3-10. Histological liver sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 14 days in the mud loach	
<i>Misgurnus mizolepis</i> sub-adult.	35
Fig. 3-11. Histological gill sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 28 days in the mud loach	
<i>Misgurnus mizolepis</i> sub-adult.	36
Fig. 3-12. E-value distribution of BLASTX hits against NCBI nr DB.	45
Fig. 3-13. Similarity distribution of BLASTX hits against NCBI nr DB. ...	45
Fig. 3-14. Venn diagram showing the contigs exclusive to control-brain (green circle) and exp-brain (blue circle) in the <i>Misgurnus mizolepis</i> transcriptome.	49
Fig. 3-15. Venn diagram showing the contigs exclusive to control-gill (green circle) and exp-gill (blue circle) in the <i>Misgurnus mizolepis</i> transcriptome.	50
Fig. 3-16. Venn diagram showing the contigs exclusive to control-liver (green circle) and exp-liver (blue circle) in the <i>Misgurnus mizolepis</i> transcriptome.	51
Fig. 3-17. Venn diagram showing the contigs exclusive to control and experimental tissues in the <i>Misgurnus mizolepis</i> transcriptome.	52
Fig. 3-18. KEGG pathway on the up & down regulation of DEG analysis	

in brain tissue.	56
Fig. 3-19. KEGG pathway on the up & down-regulation of DEG analysis	
in gill tissue.	58
Fig. 3-20. KEGG pathway on the up & down-regulation of DEG analysis	
in liver tissue.	60
Fig. 3-21. The top 20 most enriched GO-terms in brain. Gene Ontology	
(GO) annotation associated with the Basta-exposed brain tissue	
of transcriptome of <i>Misgurnus mizolepis</i>	68
Fig. 3-22. The top 50 most enriched GO-terms of biological process	
in brain.	70
Fig. 3-23. The top 50 most enriched GO-terms of molecular function	
in brain.	71
Fig. 3-24. The top 50 most enriched GO-terms of cellular component	
in brain.	72
Fig. 3-25. The top 20 most enriched GO-terms in gill. Gene Ontology	
(GO) annotation associated with the Basta-exposed gill tissue	
of transcriptome of <i>Misgurnus mizolepis</i>	74
Fig. 3-26. The top 50 most enriched GO-terms of biological process	
in gill.	75
Fig. 3-27. The top 50 most enriched GO-terms of molecular function	
in gill.	76
Fig. 3-28. The top 50 most enriched GO-terms of cellular component	
in gill.	77
Fig. 3-29. The top 20 most enriched GO-terms in liver. Gene ontology	
(GO) annotation associated with the Basta-exposed liver tissue	
of transcriptome of <i>Misgurnus mizolepis</i>	79

Fig. 3-30. The top 50 most enriched GO-terms of biological process in liver.	80
Fig. 3-31. The top 50 most enriched GO-terms of molecular function in liver.	81
Fig. 3-32. The top 50 most enriched GO-terms of cellular component in liver.	82
Fig. 3-33. Top orthologous groups from contigs of brain tissue.	84
Fig. 3-34. Top orthologous groups from contigs of gill tissue.	85
Fig. 3-35. Top orthologous groups from contigs of liver tissue.	86
Fig. 3-36. Overview of differently expressed contigs distribution trends in brain between control and experiment.	88
Fig. 3-37. Overview of differently expressed contigs distribution trends in gill between control and experiment.	90
Fig. 3-38. Overview of differently expressed contigs distribution trends in liver between control and experiment.	92
Fig. 3-39. Heat map generated from <i>Misgurnus mizolepis</i> transcriptome data displaying differential gene expression values in brain between the control and Basta-exposed group.	93
Fig. 3-40. Heat map generated from <i>Misgurnus mizolepis</i> transcriptome data displaying differential gene expression values in gill between the control and the Basta-exposed group.	95
Fig. 3-41. Heat map generated from <i>Misgurnus mizolepis</i> transcriptome data displaying differential gene expression values in liver between the control and the Basta-exposed group.	96

Histopathological analysis and transcriptome profiling on the organs of mud loach *Misgurnus mizolepis* exposed to non-selective herbicide Basta

Se-Won Hwang

Department Fisheries Biology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Basta herbicide, contains the active gradient of glufosinate ammonium, is widely used as a non-selective herbicide worldwide, and is rising concerns for potential environment and human health impacts. However, there has been no comprehensive investigation in the global molecular mechanism of glufosinate ammonium and Basta's toxicity for fish species.

This study, which has the ultimate goal of analysing the toxicity of Basta includes (1) analysis of acute toxicity and its lethal concentration (LC50) (2) histopathological analysis of gill and liver tissues exposed to subchronic toxicity from Basta (3) global transcriptome profiling of brain, gill and liver tissues from mud loach *Misgurnus mizolepis* exposed to Basta.

From the result of the analysis of acute toxicity, LC 50 values were 14.7 ppm (48 h) and 12.0 ppm (96 h) in larvae, 33.2 ppm (48 h) and 30.8 ppm (96 h) in juvenile, and 43.4 ppm (48 h) and 38.7 ppm (96 h) in sub-adult of mud loach.

In subchronic exposure tests, histological changes in gill and liver were evaluated with histopathological indices, allowing the damage quantification of fish which was exposed to different concentrations of Basta. Basta induced different histological alteration in a concentration - dependent manner. Clubshaping, epithelial lifting, and fusion of the lamella was observed in the gill, and lipidic vacuolization of the hepatocytes, nuclear pyknosis, leukocyte infiltration, hydropic degeneration and necrosis was found in liver.

In transcriptomics, identifying differentially expressed genes (DEGs) under a given condition was mainly performed by using RNA-seq data. To do this, the brain, gill and liver of mud loach sub adult exposed to 38.7 ppm (96 h) of Basta was used.

The RNA sequencing data was generated by using the main equipment of next generation sequencer (Illumina HiSeq 4000 NGS platform). After the NGS analysis was completed, Clustering and assembly were performed with unigenes by using the *de novo* assembly program Trinity and CD-HIT-est. Annotation was performed by using the Blast2Go program through the NCBI nr DB, KOG DB, GO, and KEGG databases.

As the result of sequencing, total of 59,666,606 raw reads of brain in control, 76,898,472 raw reads of brain in experimental group, 71,834,144 raw reads of gill in control, 62,847,956 raw reads of gill in experimental group, 53,836,300 raw reads of liver in control, and 62,803,310 raw reads of liver in experimental group were produced. As the result of trimming, assembly and clustering, 138,239 unigenes (average length of 764.9 bp) of brain in control, 157,017 unigenes (average length of 744.6 bp) of brain in experimental group, 104,035 unigenes (average length of 695.9 bp) of gill in control, 107,232

unigenes (average length of 606.9 bp of gill in experimental group, 82,805 unigenes (average length of 736.4 bp) of liver in control, 122,321 unigenes (average length of 668.5 bp) of liver in experimental group were generated.

Using the BLASTX program, sequences were blasted against NCBI nr, GO, KEGG and KOG databases. This process successfully annotated 77,081 unigenes (32.43%) in brain, 61,952 unigenes (37.45%) in gill and 76,169 (42.84%) in liver in NCBI nr databases. Total 18,004 unigenes (7.77%) in brain, 15,245 unigenes (9.22%) in gill, 16,949 unigenes (9.53%) in liver were annotated in KEGG.

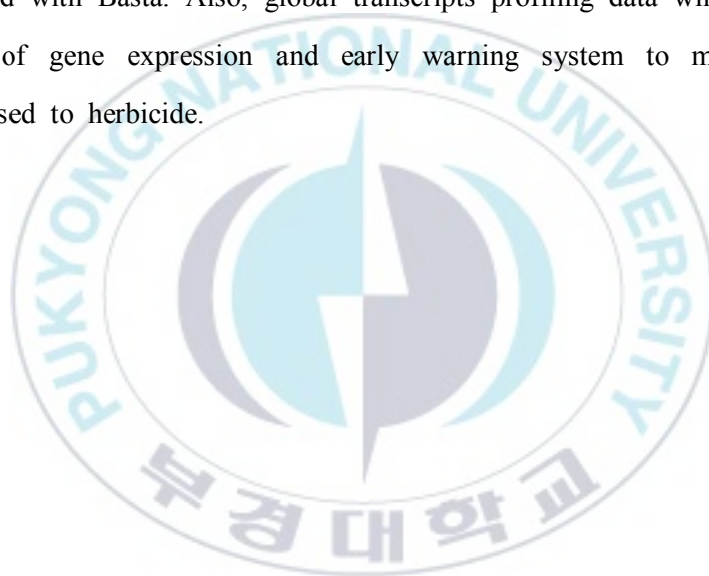
Analysis results in Egg NOG DB, 32,487 unigenes (13.6%) in brain, 27,128 unigenes (31.9%) in gill, 28,468 unigenes (16.01%) in liver were matched. GO terms were assigned to the predicted *M. mizolepis* genes to classify their function. Blast2GO successfully annotated 64,822 unigenes (27.27%) in brain, 52,693 unigenes (31.85%) in gill and 65,288 unigenes (36.72%) in liver according to the three main GO classifications (BP, biological process; CC, cellular component; MF, molecular function).

An overview of the number and ratio of assigned genes related to a specific term was provided by GO annotation. In the GO analysis of brain, unigenes involved in cellular process (GO:0009987, 15.6%) were most represented for the biological process. Regarding to the molecular function, binding (GO:0005488, 45.6%) was the most represented, followed by catalytic activity (GO:0003824, 28.3%). Genes related to the cell (GO:0005623, 19.9%) and cell part (GO:0044464, 19.8%) were highly represented for the cellular component.

TRLs, IRFs, ILs, CCLs, TNF, STAT1, fos, MYD88 and RAC1 genes related to toll-like receptor pathway of innate immune system were

differentially expressed. Also, CASPs, IKBKG, STATs, IL3 and FADD genes related to TNF, MAPK and NF- κ B signaling pathways in apoptosis were differentially expressed. Various genes related to arginine, proline, alanine, aspartate, glutamine, serine and threonine metabolism pathways and TCA cycle were differentially expressed in liver.

These results will be used for good biomarker to health condition analysis of freshwater fish in paddy field, stream and river that in natural environments contaminated with Basta. Also, global transcripts profiling data will be used to evaluation of gene expression and early warning system to monitoring of fishes exposed to herbicide.



I. 서론

전 세계적으로 오랜 기간 동안 무비판적으로 농약을 사용해 왔다. 화학 비료와 제초제를 이용하여 작물을 재배하는 경우 서식 생물들의 생식 호르몬의 불균형뿐만 아니라 대사장애를 일으킨다. 생태계에 직접적인 영향을 미쳐 다양한 생물종의 항상성에 치명적인 원인이 된다(Grisolia, 2005).

농화학 약품은 플랑크톤의 종 구성에 영향을 미치고 이에 따라 어류 군집 변동을 야기한다. 따라서 직간접적인 영향을 받는 대표적인 수서생물 지표종은 어류이다(Kime, 1995). 담수생태계는 농약의 침출, 유출 및 직간접적인 살포나 바람의 영향에 따라 오염되고 있다(WHO, 2005). Grisolia (2005)와 Udriou (2006)는 대규모 농장에서 대량으로 사용하는 농약은 생물 다양성의 감소에 직접적인 관련이 있다고 하였다. 이는 돌연변이율의 증가와 함께 민감한 유전자형이 제거됨으로써 환경변화에 적응할 수 있는 잠재력을 감소시키고 유전적 부하를 증가시킬 수 있다.

유엔식량농업기구(FAO)가 발간한 식량전망(Food Outlook) 보고서에 따르면 2017년 전 세계 쌀 생산 예상량은 50,260만톤이다(FAO, 2017). 세계 최대 쌀 생산국은 중국으로, 전년보다 0.4% 증가한 14,230만톤을 생산할 것으로 전망됐다. 2~5위는 인도 11,040만톤, 인도네시아 4,660만톤, 방글라데시 3,480만톤, 베트남 2,860만톤이다. 우리나라의 쌀 생산량은 이집트 420만톤과 비슷한 수준이다(FAO, 2017).

제초제 사용에 따라 쌀 생산이 증가되어 왔지만 인근수역의 오염, 생산 경비의 증가, 제초제에 대한 내성을 가진 해충의 진화 등의 결과를 초래할 수도 있다(Settle et al., 1996; Yoo et al., 2002; Köck et al., 2010).

우리나라 경작지의 50% 이상은 논으로 이곳에서 생산되는 쌀은 주요 농

작물이다. 한국의 쌀 자급률은 2014년 95.7%에 이른다. 최근 몇 년 동안 화학비료와 제초제 사용량은 감소하며 친환경 농법은 2000년도부터 빠르게 증가해왔다. 전통농법은 엄격한 환경과 동물복지 규칙에 따라 증가해왔으며 이는 통합농법과 같은 새로운 접근과 방법론의 발달을 의미한다(Ojeniyi, 2000).

농약의 과도한 사용에 따른 물의 오염으로 인해 어류 폐사율이 증가하지만 낮은 농도의 영향에 대해서는 대부분 잘 알려지지 않고 있다. 생태독성에 대한 개체의 생존, 성장과 생식은 실험실 수준의 연구들로 진행되고 있다(Oost et al., 2003). 우리나라에서 수서생물 지표종을 이용한 생태계 건강성 평가는 대부분 하천이나 호수를 대상으로 진행되었으며 농업지역의 수생태계 건강성 평가에 관한 연구는 미비한 실정이다(김 등, 2012).

제초제에 대한 어류의 독성 평가는 소형어류를 대상으로 진행된 바 있다. Butachlor의 송사리 *Oryzias latipes*에 대한 독성시험(박 등, 2007), molinate의 송사리에 대한 만성독성 영향(박 등, 2006)이 연구되었다. 또한 Shim and Self (1973)는 제초제인 PCP (pentachlorophenol)는 논에 서식하는 송사리와 피라미에 강한 독성을 가지는 것으로 보고하였다. 논에 살포된 농약의 활성성분이 물에 녹아 하천이나 호수에 유입될 수 있으므로 벼 재배용 농약 사용량이 전체 사용량의 50% 정도인 우리나라에서는 농약이 수서생물에 미치는 영향은 매우 크다(정과 박, 1990). 따라서 국내 벼 재배용 농약의 등록 시 미꾸리에 대한 급성독성 시험성적을 반드시 제출하도록 하고 있다(농촌진흥청, 2002). 벼를 재배하는 논에서 직접 수도용 농약은 종류에 따라 차이가 있지만 약 10~55% 치사율을 보이는 것으로 나타났다(박 등, 2003).

Basta는 현재 전 세계 80개국 이상에서 판매되고 있으며, Basta, Rely, Finale, Ignite, Challenge 및 Liberty라는 상품명으로 판매되고 있다(Shaner,

2000; Jewell and Buffin, 2001; Shipitalo et al., 2008). Basta의 원료인 glufosinate ammonium은 phosphinic acid 계의 1년생 및 다년생 잡초에 대하여 비선택적 비휘발성 제초제로서, 방선균 두 종으로부터 분리한 자연독소로 유기 인산계의 아미노산이다(Ferreira Nunes et al., 2010).

Glufosinate ammonium은 식물체 내에서 glutamine synthetase를 억제하여 암모니아를 생성하게 되고 이는 광합성 및 광호흡을 억제하여 단백질성분을 고갈시켜 식물체의 고사를 유발한다(Wendler and Wild, 1990). 그러나 동물의 경우 암모니아의 세포 내 축적이 전적으로 glutamine synthetase에 의존하지 않기 때문에 중독에 대한 영향은 적다(백 등, 2005). 또한 동물 중추신경계 조직에서 glutamine synthetase와 glutamate decarboxylase도 억제한다(Lacoste and Mansour, 1985; Fushiya et al., 1988; Logusch and Walker, 1989; Ebert and Leist, 1990; Hack et al., 1994). 이는 glutamate의 증가를 초래하고 이런 과도한 glutamate의 분비는 신경세포를 파괴하는 것으로 알려져 있다(Collingridge and Lester, 1989). Watanabe and Santo (1998)은 glufosinate ammonium이 glutamate의 구조적 유사체라는 점에 착안하여 glufosinate가 내인성 glutamate의 신경 전달 기능을 경쟁적으로 방해하여 신경학적 증상을 발생시킬 가능성이 있음을 제시하였다. 다른 연구들은 glufosinate ammonium이 중추신경계의 glutamate 수용체 중 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 수용체에 결합하여 산화질소 생성을 촉진하므로 신경세포의 괴사에 관여한다고 보고하고 있다(Michel and Agid, 1995; Nakaki et al. 2000). 아울러 rat을 대상으로 실험한 연구는 활성성분인 glufosinate ammonium보다 계면활성제, 전착제 등 다른 성분을 포함하고 있는 Basta가 더 높은 독성을 가진다는 결과를 보고하였다(Koyama et al, 1997). Basta는 2016년 기준 우리나라 비선택성 제초제 시장의 1/3을 차지하며 Roundup과 함께 시장을 양분하고 있다(한국작물보호협회, 2017). 제조사의 Basta 사용 매뉴얼에

의하면 잡초 제거를 위해서 60~133 ml/20 L의 농도(3,000~6,650 ppm)로 경작지 또는 논둑에 직접 살포하는 것을 권장하고 있다(Bayer crop science, 2018). 이는 Basta에 대한 무지개송어 LC50 (96 h)는 34 mg/L로 제시하고 있어, 잡초 제거용 Basta 권장량이 무지개송어 LC50의 88.2~195.6배 높은 농도이다(U.S. EPA, 1986, 1990b).

비선택성 제초제에 대한 독성평가 모델로 어류를 이용한 연구는 세계적으로 가장 많이 사용되고 있는 glyphosate (Roundup)에 대해 진행되었다. Jiraungkoorskul et al. (2002)은 틸라피아를 대상으로 glyphosate에 아만성 독성 실험 결과 아가미 새엽은 이상 증식하였으며, 새판은 비대해지거나 헐락되고, 동맥류가 관찰되었으며, 간세포가 공포화되거나 핵응축이 나타났다고 보고하였다. 또한 glyphosate formulation (Roundup)에 노출된 onesided livebearer, *Jenynsia multidentata*에 대한 간과 아가미 조직에 대한 조직학적 변화와 수컷의 성적 행동이 감소한다는 결과를 보고하였다(Hued et al., 2012). Langiano and Martinez (2008)는 열대어류 *Prochilodus lineatus*에서 glyphosate에 대한 단기 독성 및 생화학적, 생리학, 조직학적 연구를 수행한 바 있다. 한편 우리나라에서 두 번째로 사용량이 많은 비선택성 제초제 Basta에 대한 어류의 독성 연구는 marine medaka *Oryzias dancena*를 대상으로 조직학적 변화 연구만이 보고되고 있다(Kang et al., 2014).

미꾸리속(genus *Misgurnus*) 어류는 우리나라에서 식량과 불교의식에 중요한 어종으로(Kim et al., 1994) 내수면 어업 생산량은 약 831톤이며, 부족한 수요를 충당하기 위해 중국으로부터 매년 10,000톤 정도를 수입에 의존하고 있다(수산정보포털, 2018). 미꾸리속 어류는 동아시아에 광범위하게 분포하는 잉어목 담수어류이며, 중국에서는 식용과 전통 중의학에서 상업적으로 중요한 종이다. 중국대륙에서 미꾸리과 어류의 양식 생산량은 2010년에는 204,552톤에 이른다. 진흙 바닥에 잔잔하거나 부드럽게 흐르는 강, 호

수, 연못에서 발견된다. 이들 어종은 넓은 농경지와 논과 평야배수로에 많이 분포한다(Kano et al., 2010; Qin et al., 2010). 특히 미꾸라지는 빠른 배아발달, 짧은 세대기간, 많은 수의 난을 가지고 있어 형질전환 연구에 잠재적 모델 시스템으로 주목받고 있으며, 염색체 조작, 유전자 이식 등 실험모델로 이용되고 있다(Nam et al., 2003).

논은 미꾸리속 어류의 산란장소로 이용되며 산란 후 자치어의 성장 및 번식장소로서 매우 중요한 역할을 한다(Naruse and Oishi, 1996; Tanaka, 1999). 우리나라에서 벼농사를 위해 제초제를 처리하는 시기는 주로 4월말부터 6월 중순까지로 이 시기는 미꾸라지의 산란기와 일치하여 논과 하천에 서식하는 미꾸라지에게 치명적 악영향을 끼친다. 송사리의 생육단계별로 농약 등의 화학물질에 대한 어류의 감수성 변화를 조사한 결과, 발육 초기단계에는 감수성이 매우 민감한 것으로 조사되었다(신 등, 1987).

차세대 염기서열 분석기술을 이용한 RNA sequencing (RNA-seq)이 최초로 보고된 이후(Nagalakshmi et al., 2008; Wilhelm, et al., 2008), 실험 과정과 대용량 정보의 확보 및 분석에 대한 빠른 진보를 가져왔다(Marguerat and Bähler, 2010; Martin and Wang, 2011; Oszolak and Milos, 2011). *De novo* assembly는 transcriptome reconstruction을 위해 reference genome을 요구하지 않으므로 게놈 분석이 완료되지 않은 종의 연구에 유리하다(Grabherr et al., 2013). 또한 RNA sequencing은 주로 실험조건에 따른 유전자 발현을 비교하는데 사용하고 있으며, 각 실험조건에 따라 up 또는 down regulation된 차등 발현 유전자(DEG, differentially expressed genes)를 reads count를 통해 쉽게 분석 가능하다(Wang et al., 2009; Anders and Huber, 2010).

최근 위와 같은 장점으로 인해 농약 처리에 따른 전사체 프로파일링에 대한 연구가 진행되고 있다. 제초제 Atrazine에 대한 zebrafish의 전사체 분석(Weber et al., 2013), 연어의 피부에 기생하는 물이를 구제하기 위한 살충

제 Deltamethrin 처리에 따른 물이(louse)의 전사체 프로파일링 (Chávez-Mardones and Gallardo-Escárate, 2015), glyphosate와 Roundup에 노출된 brown trout의 산화스트레스 유도에 대한 전사체 프로파일링 등의 연구가 진행된 바 있다(Webster and Santos, 2015).

본 연구에서는 사용량이 많음에도 불구하고 다양한 연구가 이루어지지 않은 비선택성 제초제인 glufosinate ammonium을 원료로 하는 Basta에 대해 논과 하천 생태계의 중요한 생물 종인 미꾸라지를 대상으로 독성 평가와 유전자 발현 연구에 대한 유용한 가이드라인을 제공하기 위해 수행하였다. 이를 위해 첫째, 미꾸라지 성장단계별 Basta의 급성독성을 평가하기 위해 반수치사 농도를 구하였으며, 둘째, Basta의 아만성 독성 평가를 위해 조직학적 변화를 관찰하였으며, 마지막으로 Basta 노출에 따른 다양한 조직별 차등 발현하는 전사체 프로파일을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

Basta (2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl) butyric acid ammonium salt, DL-Phosphinothricin)는 1980년 이래로 적은 양으로 이용할 수 있는 광범위 제초제이다. 바이엘 크롭 사이언스에서 개발한 비선택성 제초제로 1970년대에 개발되었으며, 1984년에 영국에서 등록되었다. 시중에서 시판되고 있는 Basta는 glufosinate ammonium 18%, 표면활성제와 전착제를 포함하고 있다. 2016년 기준 우리나라 비선택성 제초제 사용량의 33%를 차지하고 있다(한국작물보호협회, 2017). 현재 연구에 사용한 Basta는 18.02% glufosinate-ammonium as the active ingredient and 9.91% surfactants (Bayer Crop Science, 2013)이다.

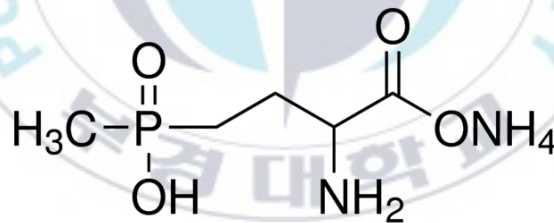


Fig 2-1. Structural formula of glufosinate ammonium.

2. Basta의 미꾸라지에 대한 독성평가

가. 시험생물

(1) 자어

급성 독성시험에 사용한 어류는 성숙한 암컷과 수컷 친어를 이용하여 HCG를 어체중 10 IU/g 농도로 주사하여 12시간 후에 복부를 압박하여 채란한 다음 정액을 섞어 인공 수정하였다. 부화자어는 로티퍼와 알테미아 부화유생을 공급하면서 사육하였다. 부화 후 10일째 자어(평균전장 1.37 ± 0.23 cm)를 대상으로 독성평가 실험을 수행하였다.

(2) 치어 및 미성어

치어(평균전장 4.42 ± 0.33 cm)와 미성어(평균전장 7.98 ± 0.46 cm)는 충남 태안군 남면에 소재하는 부남호 주변 농수로에서 미꾸라지 통발로 채집된 개체를 수집하여 실험에 이용하였다. 실험어는 실험실로 운반한 다음 항생제(OTC)와 포르말린 100 ppm 농도로 처리한 후 잉어용 배합 사료를 공급하면서 2주 동안 실험실 수조에서 순치하였다.

나. 독성시험

(1) 급성 독성시험

지수식 급성 독성시험(short-term static toxicity test)을 위해 자어, 치어, 미성어 미꾸라지를 각 크기별로 예비 실험을 통해 얻어진 농도에 따라 24, 48, 72, 96시간 동안 노출시켰다(24, 48, 72, 96 h, LC50). 현재 연구에 사용한 Basta는 18.02% glufosinate - ammonium as the active ingredient and 9.91% surfactants (Bayer CropScience, 2013)이다. 어류는 Basta nominal concentration에 따라 노출시켰다. 미성어 실험군의 48 h, LC50를 평가하기 위해서 초기 독성평가는 Basta 농도에 따라 각각 다르게 진행하였다. 대조군과 각 실험농도는 10 L 수조에서 실험군 당 20마리를 3반복 평가하였다. 각 개체는 실험 전에 24시간 동안 굶겼고 실험 동안 먹이를 공급하지 않았다. 어류는 아가미 움직임이 없거나 촉각자극에 반응이 없으면 즉시 제거

하였고, 죽은 것으로 기록하였다. 제초제에 대한 각각 48 h과 96 h의 LC50에 대해 치사율을 바탕으로 probit과 logit 분석을 통하여 계산하였고, 95% 신뢰한계를 산출하였다. 급성 독성평가는 미꾸라지를 각각 다른 Basta 농도로 24, 48, 72, 96시간 동안 노출시켰다. 자어 실험군은 0, 12, 14, 16, 18, 20 ppm으로, 치어 실험군은 0, 25, 30, 35, 40, 45 ppm, 미성어 실험군은 0, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ppm으로 설정하고 수조에 각각 20마리를 수용하였고, 3반복 실험하여 평가하였다.

자어 실험군은 2 L에서, 치어 실험군과 미성어 실험군은 10 L에서 실험하였고, 사육수는 지하수를 24시간 에어레이션한 후에 사용하였고, 광주기는 12 h : 12 h로 하였다. 모든 실험은 수온은 평균 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 이며, pH는 6.98~6.99 범위였고, 용존산소량은 6.0 mg/L였다. 또한 사육수는 매일 전량을 환수하고 실험군의 농도를 시작 시와 동일하게 하였다. 이 연구의 모든 과정들은 Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2011), U.S. EPA (1990b)의 지침에 따라 수행하였다. 24시간마다 치사어와 독성증상을 관찰하여 기록하였고 치사한 개체는 즉시 제거하였다.

(2) 아만성 독성시험

아만성 독성시험은 자어 실험군과 미성어 실험군을 Basta에 2주와 4주 동안 각기 다른 Basta 농도로 2주와 4주 동안 노출시켰다. 0, 2, 4, 8, 16 ppm과 0, 4, 8, 16, 32 ppm 실험군과 대조군을 수조에 각각 20마리를 수용하였고, 3반복 실험하여 분석하였다. 수조크기는 20 L에서 실험하였고 염소를 제거한 수돗물을 이용하였으며, 수조에 블로워를 이용하여 공기를 주입하였다. 광주기는 12 h : 12 h로 하였다. 모든 실험은 수온은 평균 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 였고, pH는 6.98~6.99 범위였고, 용존산소량은 6.8~7.2 mg/L였다. 이 연구의 모든 과정들은 Care and Use of Laboratory Animals (National Research

Council, 2011), U.S. EPA (1990b)의 지침에 따라 수행하였다. 죽은 어류의 수는 기록하고 나서 즉시 제거하였다.

(3) 조직학적 분석

아만성 독성평가한 미꾸라지들을 구간별 3개체씩 무작위로 선발하여 간, 아가미, 뇌 조직에 대해 파라핀 절편을 제작하여 광학현미경으로 관찰하였다. 농약독성 노출에 대한 미꾸라지 조직반응은 간, 아가미, 뇌 조직에 대해 파라핀 절편을 제작하여 광학현미경으로 관찰하였다. 파라핀 절편은 Presnell and Schreibman (1997)의 방법에 따라 실시하였으며, Basta 노출 후 얼음물에 마취한 다음, 10% 포르말데하이드에 고정하여 24시간 동안 보관하였다. 어류는 농도별 에탄올 시리즈에 탈수시켰고, xylene에 행구었다. 파라핀에 포매한 후 5 μ m 두께로 조직을 자른 후 hematoxylin-eosin (H&E)으로 염색하였다. 조직 병변은 광학 현미경으로 검사하였고(E400, Nikon Co., Tokyo, Japan), 디지털 카메라로 사진 촬영하였다(Moticam Pro 205A; Motic Co., Hong Kong, China).

(4) 병리조직학적 분석

아가미의 조직학적 분석을 위해서 각 어류마다 5개의 새엽을 검사하였다. 영향을 받은 새엽의 백분율을 계산하기 위해서 특이한 변화가 보여지는 2차 새판의 수를 기록하였고, 검사한 아가미 새판의 수로 나누었다. 간에서 조직학적 변화를 평가하기 위해서 병변의 형태는 모든 간에서 같이 나타나기 때문에 간의 중앙부분을 병변을 확인하였다. 변화의 형태와 이것은 존재는 각 부분에 대해 기록하였고 검사된 부분의 모든 수에서 나누었다. 그리고 영향을 받은 간의 부분에 대한 값은 백분율로 환산하였다. 병리조직학적 병변은 표준평가방법에 의해 평가하였고 Bernet et al. (1999)와

Hued et al. (2012)에 의한 방법을 이용하였다. 각 병리조직학적 변이는 4가지 반응형태의 하나로 분류하였다. 순환장애(reaction pattern 1 = Rp1)는 혈액과 조직액흐름의 병리학적 상태를 말하며, 퇴행성변이(reaction pattern 2 = Rp2)는 조직의 기능적 감소나 손실이 나타나는 과정이며, 진행성변이(reaction pattern 3 = Rp3)는 세포나 조직 활성화에 따른 과정을 말한다. 염증(reaction pattern 4 = Rp4)은 백혈구 침윤과 같은 다른 반응형태를 가지는 염증과정을 말한다. 중요인자(W; range, 1~3)는 병리학적 중요도에 의존하여 관련 있는 병변에 따라 각 변이를 나타냈다. 값이 높은 중요인자는 어류건강에 잠재적으로 큰 변이를 나타낸다(Bernet et al., 1999). 아가미와 간 조직은 아가미 새엽이나 영향을 받은 간 조직부분의 백분율은 특별한 변이의 단계와 존재에 따라 0~6까지 점수로 평가하였다. 0 = 변화없음, 2 = 경미한 양상, 4 = 경증양상, 6 = 중증양상. 각 변이에 대한 지수는 각 반응패턴(Rp_{org} = reaction pattern index for an organ)에 따라 주어진 지수를 합계하였다. 조직의 각 반응패턴에 대한 지수는 종합조직지수(HI_{Gills} = gill hitopathological index; HI_{Liv} = liver hitopathological index)를 주어 합계하였다. 전체 병리조직학적 지수(HI_{Tot})는 각 어류의 아가미와 간 지수를 더하여 계산하였다(Table 2-1, Bernet et al., 1999).

다. 통계처리

결과의 통계처리는 SPSS Version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program을 사용하여 One-way ANOVA-test를 실시한 후, Tukey's test로 평균간의 유의성을 검증하였다.

Table 2-1. Importance factors assigned to gill and liver histological alteration for each reaction pattern

Reaction pattern	Alteration	W
Gills		
Circulatory disturbances	lamellar aneurysm	1
Regressive changes	Epithelial lifting	1
	Fusion of the distal end of secondary lamellae	2
	secondary lamella shortening	2
	Necrosis	3
Progressive changes	Epithelial cell hyperplasia	1
	Mucous cell hyperplasia	2
Liver		
Circulatory disturbances	Sinusoid dilation	1
	Blood congestion	1
Regressive changes	Hydropic degeneration	1
	Lipid degeneration	2
	Hepatocyte picnosis	2
	Fibrosis	3
	Necrosis	3
Inflammation	Leukocyte infiltration	2

After Bernet et al. (1999) and Hued et al. (2012).

W: importance factor.

3. Basta 노출에 대한 NGS 분석을 통한 전사체 프로파일링

가. Basta 노출 및 RNA sample

Basta에 노출시킨 미꾸라지 *Misgurnus mizolepis* 미성어의 LC50 (48 h)를 평가 후 생존한 개체들 중 대조군과 50 ppm 처리 실험군 개체를 대상으로 각각 5마리에서 간, 뇌, 아가미 조직을 적출하여 액체질소를 이용해 급속 냉각하였다. 채취된 샘플은 분석 시까지 2 ml cryo-tube에 수용하여 -196℃의 액체질소 탱크에 보관하였다.

나. RNA sequencing 및 assembly

(1) Total RNA isolation

Total RNA는 TRIzol™ Reagent (Invitrogen, USA)와 RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 뇌, 아가미, 간 조직으로부터 추출하였다. 분리된 RNA의 quality와 quantity를 측정하기 위해 Nanodrop-2000 spectrophotometer (Thermo, USA)와 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 농도와 상태를 확인하였다.

(2) RNA-seq library 구축 및 Illumina sequencing

Total RNA에서 mRNA를 정제하기 위해 TruSeq RNA Sample Preparation Kit V2 (Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. mRNA의 poly-A는 poly-T oligo가 부착된 magnetic Oligo (dT) beads를 사용하여 정제하였고, mRNA는 sonication을 이용하여 단편화시켰다. 단편화된 후에 random hexamer priming으로 single-strand cDNA가닥으로 복제하였으며, DNA Polymerase I와 RNase H를 사용하여 double-stranded cDNA를 합성하였다. short ds-cDNA fragment의 end는 많이 손상되어 있으므로 합성된 cDNA 조각들은 하나의 A염기가 첨가되는 말단 복구과정을 거친 후 ligation하였다.

생산물들은 agarose gel electrophoresis를 이용하여 분리하고 정제한 다음 PCR 증폭 및 qPCR을 이용하여 cDNA library를 Agilent 2100 Bioanalyzer로 QC를 확인하였고, Illumina Hiseq 4000 platform (2×150 paired-end reads)으로 sequencing하였다.

(3) Raw data 확보 및 Data trimming

Illumina Hiseq 4000 sequencing 결과로 생산된 서열에서 adapter sequence와 같은 불필요한 서열을 제거하는 trimming 과정을 수행하기 위하여 cutadapt software (ver 1.11)을 사용하였으며, low-quality reads (quality score 28이하)를 제거한 clean reads (high-quality reads)를 생성하였다.

(4) De novo Assembly 및 Clustering

위의 clean reads (high-quality reads)로부터 Trinity program (V 2.4.0)을 이용하여 *de novo* assembly를 수행하였다. Trinity program의 옵션 값은 k-mer size 25, 최소 contig 길이 200 bp이상으로 하여 clean reads로부터 contigs로 assembly하였다. Trinity assembly 결과 생성된 contigs는 CD-HIT-est (CD-HIT version 4.7, 2017)를 사용하여 identity는 95% 조건으로 clustering하였다. Clustering된 서열들은 contigs와 singleton을 합쳐 각 샘플에 대한 unigene set으로 지정하였으며, BLASTX와 Blast2GO 분석에서의 annotation을 위해 사용되었다.

(5) Differentially expressed gene analysis

De novo assembly에 의해 생성된 unigene contig set들은 RNA-seq 발현분석에 의한 reference로 이용하였다. Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2>) software를 default parameters를 양질의 정리된 unigene contig

sequences를 정렬(index)하는데 이용하였고, Cuffdiff software (<http://cole-trapnelllab.github.io/cufflinks/>)는 fragments per kilobase of exon per million mapped fragments (FPKM)을 유전자 발현을 평가하는데 사용하였다. FPKM방법은 유전자 발현 평가는 유전자 길이 편차와 샘플 sequencing에 대한 정규화, 샘플간의 발현양 비교, 유전자의 비교를 제공한다. Basta에 노출되지 않은 미꾸라지와 Basta에 노출된 미꾸라지의 각 샘플에 대한 DEG 분석에서 얻은 유전자 발현 profiles을 R-package의 gplot을 이용하여 Scatter plot과 volcano plot을 작성하였으며 또한 DEG 분석에서 FC값 2이상 q값 0.05이하인 contig들을 이용하여 heatmap을 작성하였다.

다. Annotation

(1) Database 구축 및 annotation

대조군과 Basta에 노출된 미꾸라지의 unigene에 대한 annotation은 BLASTX program과 Blast2Go 프로그램을 사용하여 각 contig들의 유전자적 기능을 확인하기 위해서 수행하였다. Annotation된 unigene들에 대해 대조군과 실험군간 공통된 부분과 각각 다르게 발현되는 contigs를 확인하였고, annotation한 것을 ven diagram으로 나타내었다(Pirooznia et al., 2007).

(2) Functional annotation of unigenes

최종적으로 확보된 각 샘플들 unigene set의 annotation을 진행하기 위하여 NCBI BLASTX 프로그램 (e-value option: 1.0E-3)과 Blast2GO 프로그램 (ver 4.1.9) 을 이용하여 default 옵션으로 유전자를 기능별로 분류하는 GO (Gene Ontology) 분석을 수행하였으며, 그리고 metabolic pathway를 분석하는 KEGG (www.genome.jp/kegg/pathway.html, Kyoto Encyclopedia of genes and Genomes) pathway 분석을 실시하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Basta 독성시험

가. 급성독성

(1) 누적폐사율

(가) 자어

대조군의 실험어는 실험기간 중 폐사가 전혀 관찰되지 않았으나 모든 Basta 실험군에서 처리농도와 시간의 증가에 따라 폐사량이 증가하였다 (Table 3-1). 24시간째 가장 낮은 농도인 12 ppm 실험군이 16.7% 폐사하였고, 가장 높은 20 ppm 실험군은 43.3%가 폐사하였다. 48시간째는 각 실험군의 누적 폐사율이 소폭 증가였으며, 72시간째에는 20 ppm 실험군의 누적 폐사율이 98.3%까지 증가하였다($P<0.05$). 96시간째에는 12 ppm 실험군이 51.7%로 농도 증가에 따라 폐사율이 증가되었으며, 18 ppm과 20 ppm 실험군의 누적 폐사율이 각각 98.3%와 100%로 나타났다($P>0.05$).

(나) 치어

모든 Basta 실험군에서 처리농도와 시간의 증가에 따라 폐사량이 늘어났으나, 25 ppm 실험군에서는 처리시간 증가와 상관없이 5% 폐사율로 동일하였다(Table 3-2). 24시간째 25 ppm을 제외한 모든 실험군의 농도증가에 따라 폐사율이 증가하는 결과를 보였으며, 특히 가장 높은 농도인 45 ppm 실험군은 81.7%의 폐사율을 나타내었다 ($P<0.05$). 48시간 및 72시간째 30~45 ppm 실험군의 누적폐사율이 24시간째 보다 약간 증가였다. 96시간째 누

Table 3-1. Cumulative mortality rate of larvae *Misgurnus mizolepis* exposed to Basta herbicide for the acute toxicity test*

Duration of treatment (hours)	Concentration (ppm)					
	0	12	14	16	18	20
24	0 ^a	16.7±1.7 ^b	21.7±1.5 ^b	31.7±1.4 ^c	36.7±1.7 ^{cd}	43.3±1.8 ^d
48	0 ^a	21.7±3.3 ^b	50.0±5.0 ^c	63.3±2.2 ^d	68.3±1.7 ^d	68.3±2.2 ^d
72	0 ^a	45.0±2.9 ^b	58.3±1.7 ^c	71.7±1.8 ^d	83.3±1.8 ^e	98.3±1.7 ^f
96	0 ^a	51.7±3.3 ^b	68.3±1.8 ^c	83.3±2.2 ^d	98.3±1.7 ^e	100.0±0 ^e

*Values (mean±SE of three replications) in the same row not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

Table 3-2. Cumulative mortality rate of juvenile *Misgurnus mizolepis* exposed to Basta herbicide for the acute toxicity test*

Duration of treatment (hours)	Concentration (ppm)					
	0	25	30	35	40	45
24	0 ^a	5.0±0.0 ^a	30.0±2.9 ^b	50.0±2.9 ^c	71.7±1.7 ^d	81.7±1.7 ^e
48	0 ^a	5.0±0.0 ^a	43.3±1.7 ^b	53.3±4.4 ^b	86.7±3.3 ^c	91.7±1.7 ^c
72	0 ^a	5.0±0.0 ^a	48.3±1.7 ^b	56.7±3.3 ^b	96.7±1.7 ^c	98.3±1.7 ^c
96	0 ^a	5.0±0.0 ^a	63.3±1.7 ^b	75.0±5.0 ^b	96.7±3.3 ^c	100.0±0 ^c

*Values (mean±SE of three replications) in the same row not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

적폐사율은 72시간째와 큰 차이를 보이지는 않았으나 가장 높은 농도 구간인 45 ppm 실험군에서는 100% 폐사하였다. 40~45 ppm 실험군의 48~96 시간째 누적폐사율은 통계적으로 유의하지는 않았다($P>0.05$).

(다) 미성어

대조군은 체색의 변화 없이 바닥에서 거의 움직이지 않았지만 Basta의 처리농도에 따라 다양한 중독의 징후를 보였다. 실험군에서는 평형을 상실하거나, 수조바닥에서 수면으로 힘없이 올라와 유영하는 개체들이 관찰되었다.

모든 실험군에서 처리농도와 시간경과에 따라 누적폐사율이 증가하였으며, 특히 24시간째 가장 높은 처리농도인 50 ppm 실험군에서는 58.3%의 누적폐사율을 나타내었다(Table 3-3). 48시간째에는 24시간째보다 약간 증가하는 경향을 보였고, 96시간째에는 50 ppm 실험군에서는 95% 폐사율을 보였으나 45 ppm 실험군과 통계적으로 유의하지는 않았다($P>0.05$).

30 ppm 실험군의 누적폐사율은 24시간부터 72시간까지는 5.0%를 보여 차이가 없었으나 96시간째에는 11.7%를 보여 약간 증가하였다. 35 ppm 실험군은 누적폐사율이 약간 증가하는 경향을 보였고, 45 ppm 및 50 ppm 실험군에서는 시간 경과에 따라 누적폐사율이 증가되어 96시간째 각각 80.0%, 95.0%를 나타내었다.

(2) 반수치사농도

(가) 자어

미꾸라지 자어의 Basta 제초제 처리에 따른 48시간 및 96시간째의 누적폐사율 자료를 바탕으로 Probit 분석을 통해 반수치사농도(LC50)를 구하였다.

Table 3-3. Cumulative mortality rate of sub-adult *Misgurnus mizolepis* exposed to Basta herbicide for the acute toxicity test*

Duration of treatment (hours)	Concentration (mg/L)					
	0	30	35	40	45	50
24	0 ^a	3.3±1.7 ^a	5.0±0.0 ^a	31.7±1.7 ^b	43.3±1.7 ^{bc}	58.3±7.3 ^c
48	0 ^a	5.0±0.0 ^a	6.7±1.7 ^a	36.7±1.7 ^b	51.7±1.7 ^c	81.7±4.4 ^d
72	0 ^a	5.0±0.0 ^{ab}	11.7±1.7 ^b	41.7±4.4 ^c	63.3±3.3 ^d	93.3±1.7 ^e
96	0 ^a	11.7±3.3 ^{ab}	21.7±1.7 ^b	63.3±3.3 ^c	80.0±5.8 ^d	95.0±2.9 ^d

*Values (mean±SE of three replications) in the same row not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

48시간에서 반수치사농도는 14.7 ± 0.3 ppm이었으며, 96시간 반수치사농도는 12.0 ± 0.4 ppm이었다. 따라서 48시간째 LC50값에 대한 96시간째의 LC50 농도비는 1.2로 나타났다. 처리농도 log10 값(X축)과 Probit 값(Y축)간의 48시간 상관식은 $Y = 4.7974X - 0.5951$, 상관계수는 $R^2 = 0.8885$ 로 나타났으며, 96시간 상관식은 $Y = 7.4737X - 3.0457$, 상관계수는 $R^2 = 0.995$ 로 나타났다(Table 3-4, Fig. 3-1).

(나) 치어

전장 4 cm 치어 실험군은 48시간에서 반수치사농도는 33.2 ± 0.3 ppm이었으며, 96시간 반수치사농도는 30.8 ± 0.7 ppm이었다. 48시간째 LC50 값에 대한 96시간 LC50값의 농도비는 1.1 ± 0.0 ppm 이었다. 48시간 처리농도 log10 값(X축)과 Probit 값(Y축)간의 상관식은 $Y = 11.6X - 12.654$, 상관계수는 $R^2 = 0.9562$ 로 나타났으며, 96시간 상관식은 $Y = 7.6884X - 5.834$, 상관계수는 $R^2 = 0.8126$ 로 나타났다(Fig. 3-2, Table 3-4).

(다) 미성어

전장 8cm 실험군은 48시간에서 반수치사농도는 43.2 ± 0.9 ppm이었으며, 96시간 반수치사농도는 38.7 ± 0.9 ppm이었다. 48시간째 LC50 값에 대한 96시간째 LC50값의 농도비는 1.1 ± 0.0 ppm 이었다. 48시간 처리농도 log10 값(X축)과 Probit 값(Y축)간의 상관식은 $Y = 11.777X - 14.307$, 상관계수는 $R^2 = 0.9348$ 로 나타났으며, 96시간 상관식은 $Y = 13.146X - 15.8$, 상관계수는 $R^2 = 0.9737$ 로 나타났다(Fig. 3-3, Table 3-4).

Table 3-4. Acute toxicity values of Basta herbicide to different growth stage of *Misgurnus mizolepis*

Growth stage	LC50 (ppm)		Ratio (48 h/96 h -LC50)
	48 h	96 h	
Larvae	14.7±0.3	12.0±0.4	1.2±0.0
Juvenile	33.2±0.3	30.8±0.7	1.1±0.0
Sub-adult	43.4±0.9	38.7±0.9	1.1±0.0

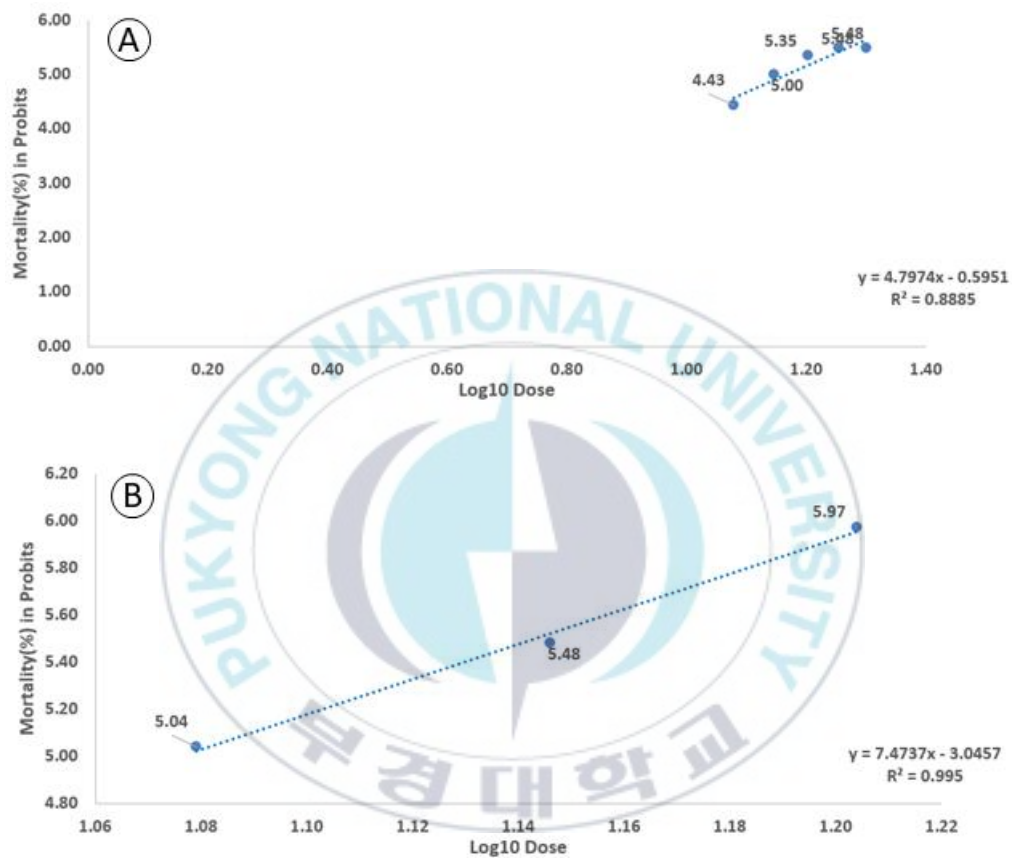


Fig. 3-1. Linear relationship between the probit response and log concentration of Basta in the larvae A (48 h) and B (96 h) mud loach *Misgurnus mizolepis*.

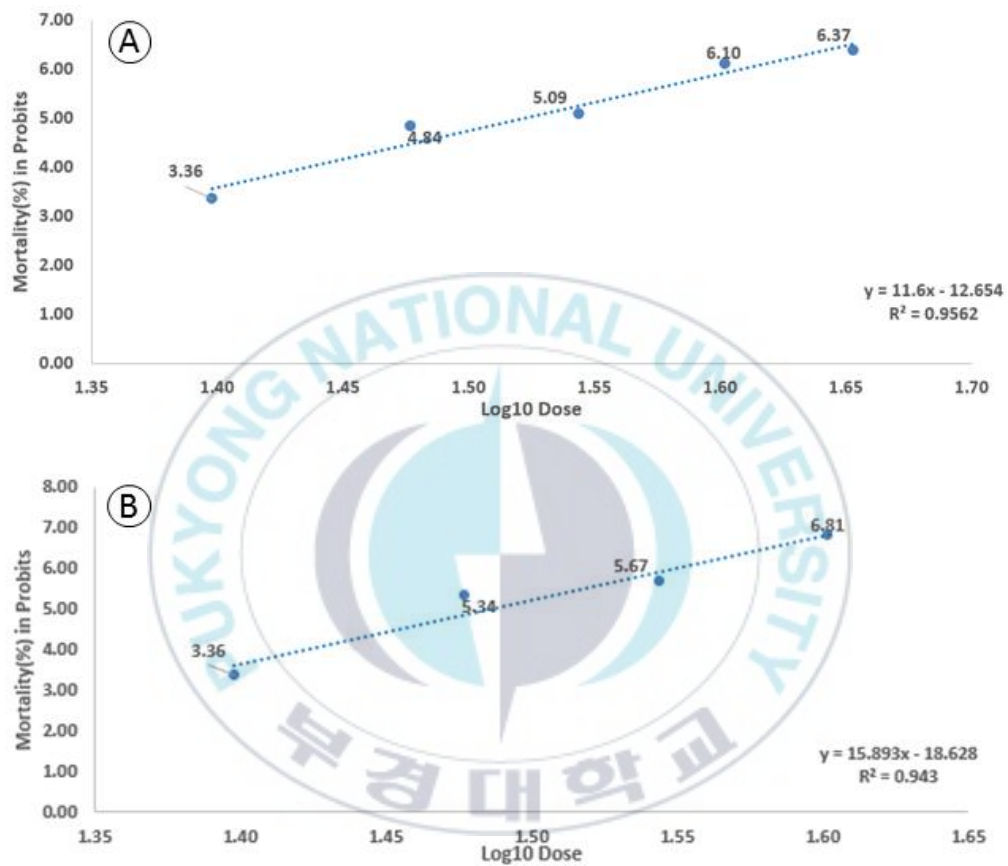


Fig. 3-2. Linear relationship between the probit response and log concentration of Basta in the juvenile A (48 h) and B (96 h) mud loach *Misgurnus mizolepis*.

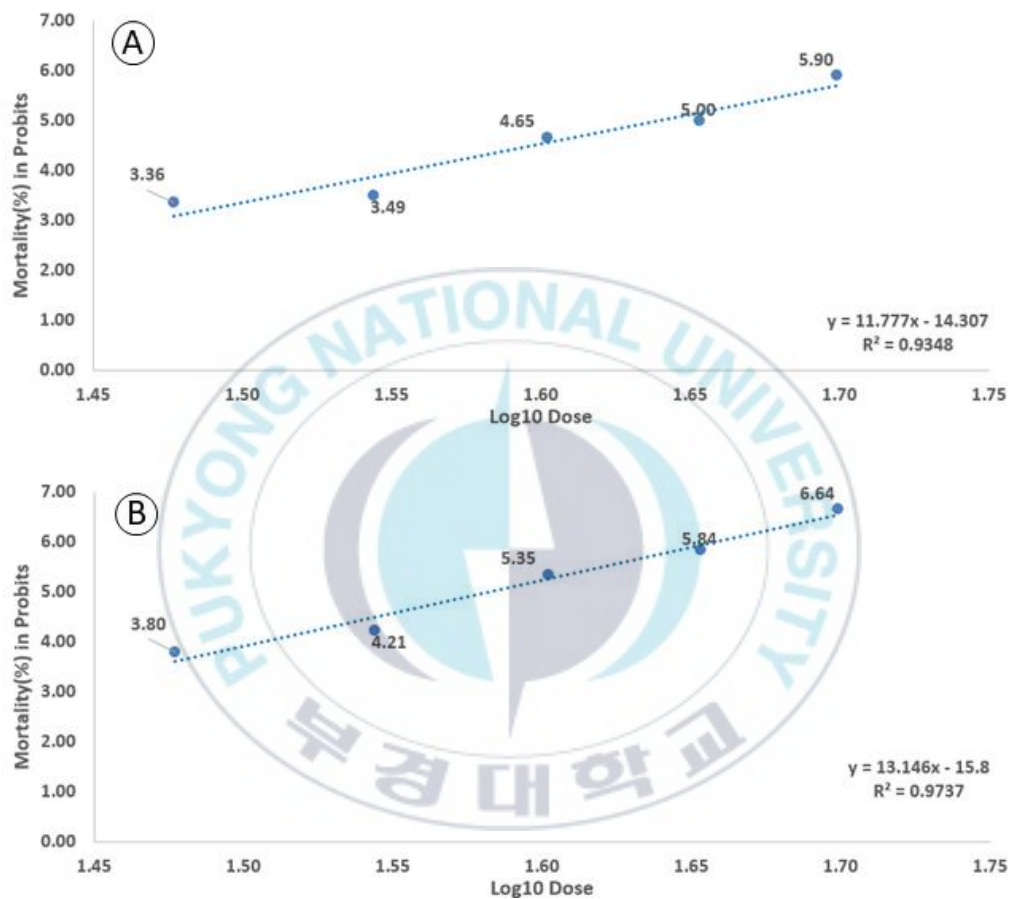


Fig. 3-3. Linear relationship between the probit response and log concentration of Basta in the subadult A (48 h) and B (96 h) mud loach *Misgurnus mizolepis*.

나. 아만성 독성시험의 조직학적 연구

(1) 아가미와 간의 병리조직학적 변화

(가) Basta에 노출된 자어의 아가미 조직

14일 동안 Basta에 노출에 따른 미꾸라지 자어에 대한 병리조직학적 변화는 Fig. 3-4에 나타내었다. 대조군과 마찬가지로 4 ppm Basta 실험군은 아가미의 형태가 유지되고 있었으나 새변에서 상피세포의 증식이 관찰되었다(Fig. 3-4B). 8 ppm 그룹에서는 2차 새변의 상피세포가 과증식되어 비대해지는 현상(hypertrophy)이 관찰되었으며, 2차 새엽들이 융합되는 현상이 나타났다(Fig. 3-4C). 16 ppm 그룹에서는 점액세포들이 나타났으며, 상피세포가 비대해지는 현상이 나타났다(Fig. 3-4D).

28일 동안 노출된 아가미 조직은 2 ppm에서 2차 새판의 끝이 융합되는 현상이 나타났으며(Fig. 3-5A), 4 ppm 실험군에서는 아가미 조직의 괴사가 나타났다(Fig. 3-5B). 8 ppm 실험군에서는 많은 2차 새판의 상피세포의 증식과 부종이 나타났다(Fig. 3-5C). 16 ppm 실험군에서는 2차 새엽이 짧아지며, 융합되는 현상이 나타났다(Fig. 3-5D).

(나) Basta에 노출된 자어의 간 조직

14일 동안 Basta에 노출된 미꾸라지 자어의 간 조직은 4 ppm 실험군에서는 간세포의 핵응축이 관찰되었으며 간세포의 수포변성이 나타났다(Fig. 3-6B). 8 ppm 실험군에서 공포성 지방증이 나타나기 시작하였으며(Fig. 3-6C), 16 ppm 실험군에서는 백혈구의 침입하는 부분이 보였고, 대부분의 세포에서 지방변성이 나타났다(Fig. 3-6D).

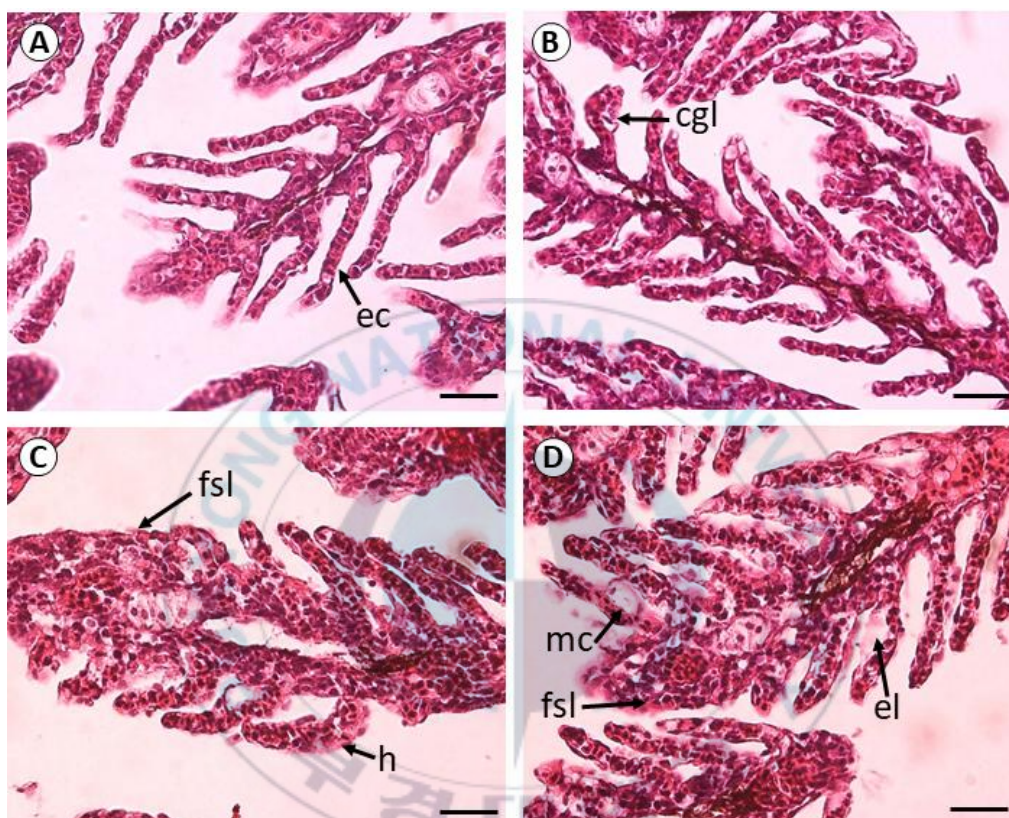


Fig. 3-4. Histological gill sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 14 days in the mud loach *Misgurnus mizolepis* larvae.

(A) Control, (B) 4 ppm Basta, (C) 8 ppm Basta, (D) 16 ppm Basta.

cgl, clubshaping of gill lamellae; ec, epithelial cell; el, epithelial lifting; fsl, fusion of the distal end of secondary lamellae; h, hypertrophy; mc, mucous cell. Hematoxylin and eosin staining. Scale bars indicate 10 μm .

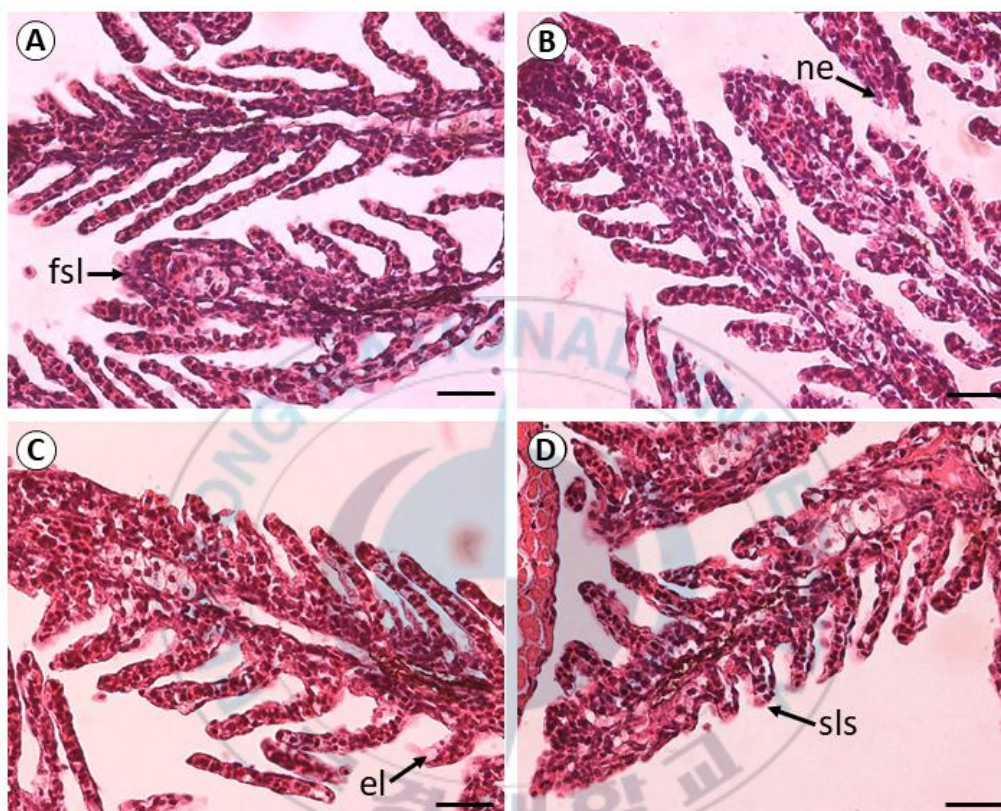


Fig. 3-5. Histological gill sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 28 days in the mud loach *Misgurnus mizolepis* larvae. (A) 2 ppm Basta, (B) 4 ppm Basta, (C) 8 ppm Basta, (D) 16 ppm Basta. el, epithelial lifting; fsl, fusion of the distal end of secondary lamellae; ne, necrosis. sls, secondary lamella shortening. Hematoxylin and eosin staining. Scale bars indicate 10 μ m.

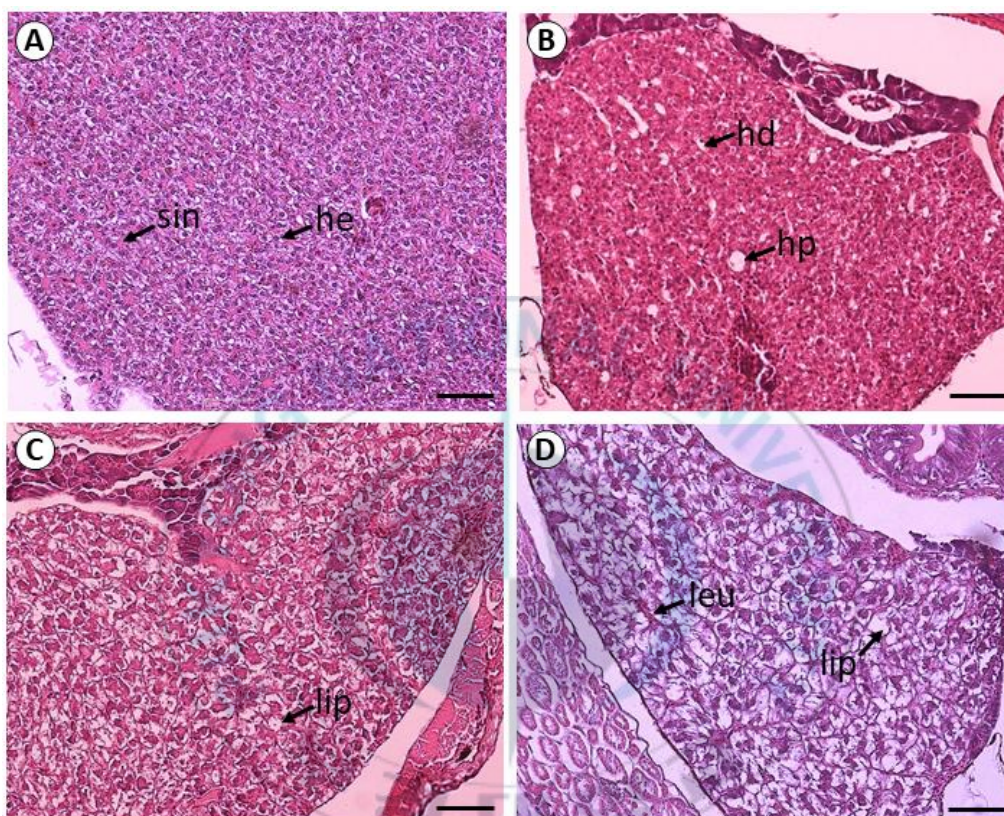


Fig. 3-6. Histological liver sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 14 days in the mud loach *Misgurnus mizolepis* larvae. (A) Control, (B) 4 ppm Basta (C) 8 ppm Basta, (D) 16 ppm Basta. hd, hydropic degeneration; he, hepatocytes; hp, hepatocyte picnosis; leu, leukocyte infiltration; lip, lipid degeneration; sin, sinusoids. Hematoxylin and eosin staining. Scale bars indicate 20 μ m.

28일 동안 노출된 2 ppm 실험군에서는 간 조직에서 간섬유화 현상이 나타났으며, 백혈구의 침윤이 나타났다(Fig. 3-7A). 4 ppm과 8 ppm 실험군에서 대부분의 세포질에 지방이 가득 차는 형태가 나타났으며, 간세포는 무질서하게 나열되어 있었다(Fig. 3-7B-C). 16 ppm 실험군에서는 간세포의 괴사가 나타났으며, 공포화 현상이 나타났다(Fig. 3-7D).

(다) Basta에 노출된 미성어의 아가미조직

대조군의 아가미에서는 어떠한 변화도 관찰되지 않았다(Fig. 3-8A). 14일 동안 Basta 처리했던 4 ppm 실험군들은 상피세포가 부풀어 올랐으며, 점액세포가 보이기 시작하였다(Fig. 3-8B). 20 ppm 실험군에서는 많은 점액세포와 2차 새엽이 부풀어 오르는 곤봉화 현상이 나타났으며 (Fig. 3-8C), 40 ppm 실험군에서는 대부분의 상피세포가 부풀어 오르거나 박리되는 현상이 나타났다(Fig. 3-8D).

28일 동안 4 ppm 처리했던 그룹에서는 점액질 세포가 관찰되었으며, 상피세포의 증식이 관찰되었으며(Fig. 3-9A), 8 ppm 처리했던 그룹에서는 곤봉화세포가 보였고, 상피세포는 부풀어 올랐고, 2차 새엽 융합현상이 나타났다 (Fig. 3-9B). 새엽이 괴사되거나 큰 점액세포가 16 ppm 실험군에서 관찰되었다(Fig. 3-9C). 32 ppm 처리했던 그룹에서는 2차 새엽이 짧아지거나, 새엽의 괴사, 비대가 나타났다(Fig. 3-9D).

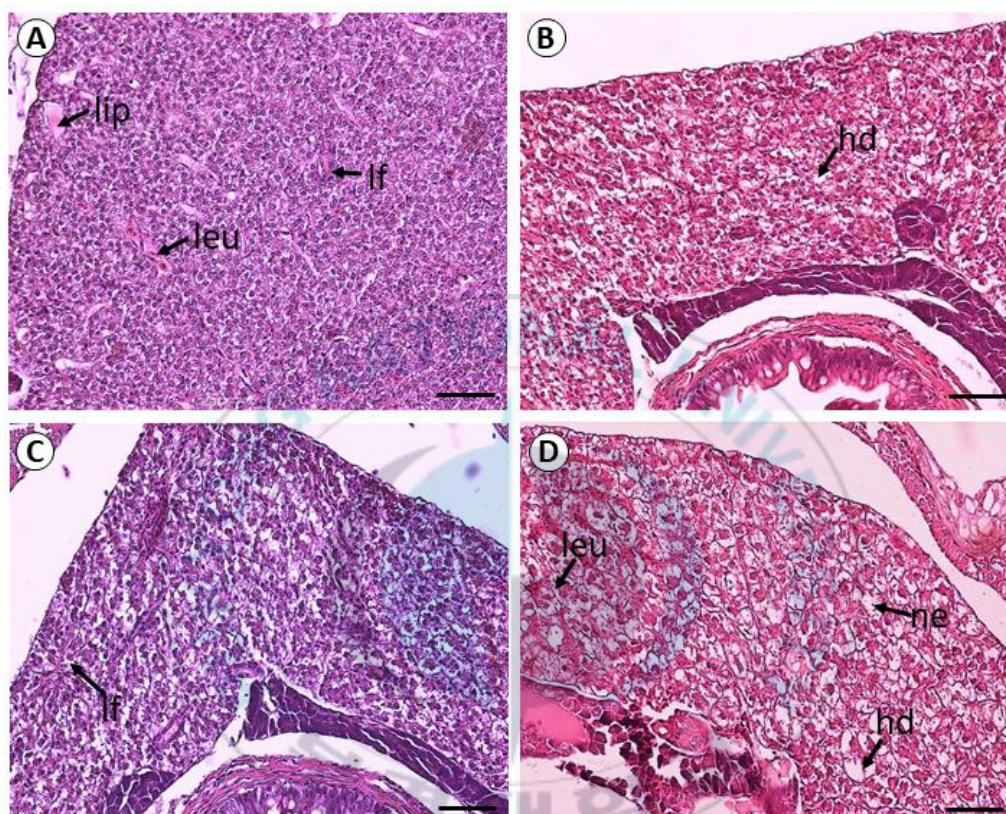


Fig. 3-7. Histological liver sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 28 days in the mud loach *Misgurnus mizolepis* larvae. (A) 2 ppm Basta, (B) 4 ppm Basta, (C) 8 ppm Basta, (D) 16 ppm Basta. hd, hydropic degeneration; leu, leukocyte infiltration; lf, liver fibrosis; lip, lipid degeneration; ne, necrosis. Hematoxylin and eosin staining. Scale bars indicate 20 μ m.

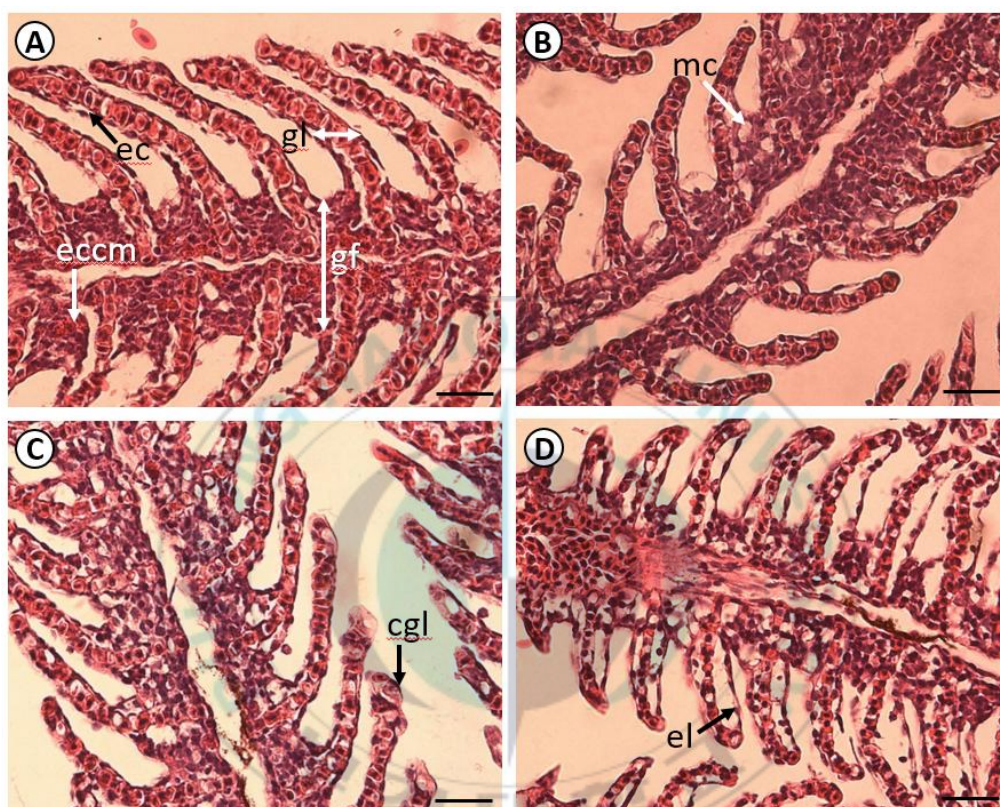


Fig. 3-8. Histological gill sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 14 days in the mud loach *Misgurnus mizolepis* sub-adult. (A) Control, (B) 8 ppm Basta, (C) 16 ppm Basta, (D) 32 ppm Basta. cgl, clubshaping of gill lamellae; ec, epithelial cell; eccm, extracellular certilagious matrix; el, epithelial lifting; gf, gill filament; gl, gill lamellae; mc, mucous cell. Hematoxylin and eosin staining. Scale bars indicate 10 μ m.

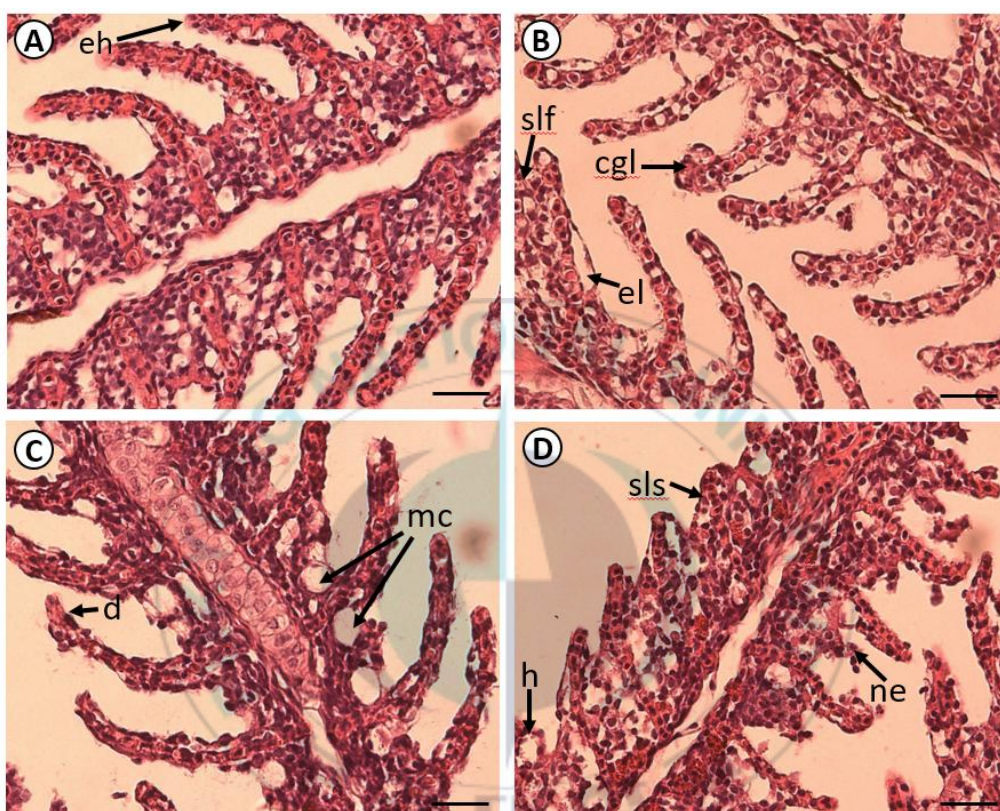


Fig. 3-9. Histological gill sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 28 days in the mud loach *Misgurnus mizolepis* sub-adult. (A) 4 ppm Basta, (B) 8 ppm Basta, (C) 16 ppm Basta, (D) 32 ppm Basta. cgl, clubshaping of gill lamellae; d, desquamation; el, epithelial lamella; eh, epithelial hyperplasia; h, hypertrophy; mc, mucous cell; ne, necrosis; slf, secondary lamella fusion; sls, secondary lamella shortening. Hematoxylin and eosin staining. Scale bars indicate 10 μ m.

(라) Basta에 노출된 미성어의 간 조직

대조군은 조직학적 변화가 없는 정상적인 형태로서 균질적인 세포질과 하나의 인을 포함하고 있는 구상의 핵이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 3-10A).

14일간 8 ppm 실험군에서는 동양혈관(blood sinusoid)이 팽창하였으며, 공포화현상이 나타났다(Fig. 3-10B). 16 ppm 실험군에서는 세포질내 공포성 지방증이 관찰되었다(Fig. 3-10C). 32 ppm 간세포가 서로 융합되어 응축된 상태로 괴사되었으며 공포변성된 간세포가 다수 관찰되었다(Fig. 3-10D).

28일동안 4 ppm 실험군에서는 간세포에서 울혈이 관찰되었으며 간섬유화가 빈번하게 관찰되었고 동양혈관이 확장되었다(Fig. 3-11A). 8 ppm 실험군에서는 대부분 간 조직에 백혈구가 침윤하는 현상이 나타났으며 (Fig. 3-11B), 16 ppm 실험군에서는 간세포괴사와 지방변성으로 인한 공포화가 많이 관찰되었고, 간세포의 핵은 응축되었다(Fig. 3-11C). 32 ppm 실험군에서는 공포변성에 의해 괴사된 간세포가 다수 출현하였으며, 핵 비대해지거나 핵용해가 보이는 간세포도 확인하였다. 비대한 간세포는 둥글고 명확한 공포가 다수 관찰되었다(Fig. 3-11D).

(2) 아가미와 간의 병리조직학적 분석지수

(가) 자어

14일과 28일에 대한 각기 다른 농도에 따른 미꾸라지의 아가미와 간에 대한 병리조직학적 지수는 (Table 3-5)에 정리하였다. Basta에 노출된 각 어류에 대한 아가미 HIs는 각각 다른 농도에 현저하게 다른 값이 나타났다. $HI_{Gill.Rp1}$ (circulatory disturbances)는 대조군과 실험군에서 큰 변화는 보이지 않았다. $HI_{Gill.Rp2}$ (regressive changes) $HI_{Gill.Rp3}$ (progressive changes) 값은 농도가 올라갈수록 대조군과 큰 차이를 보였다.

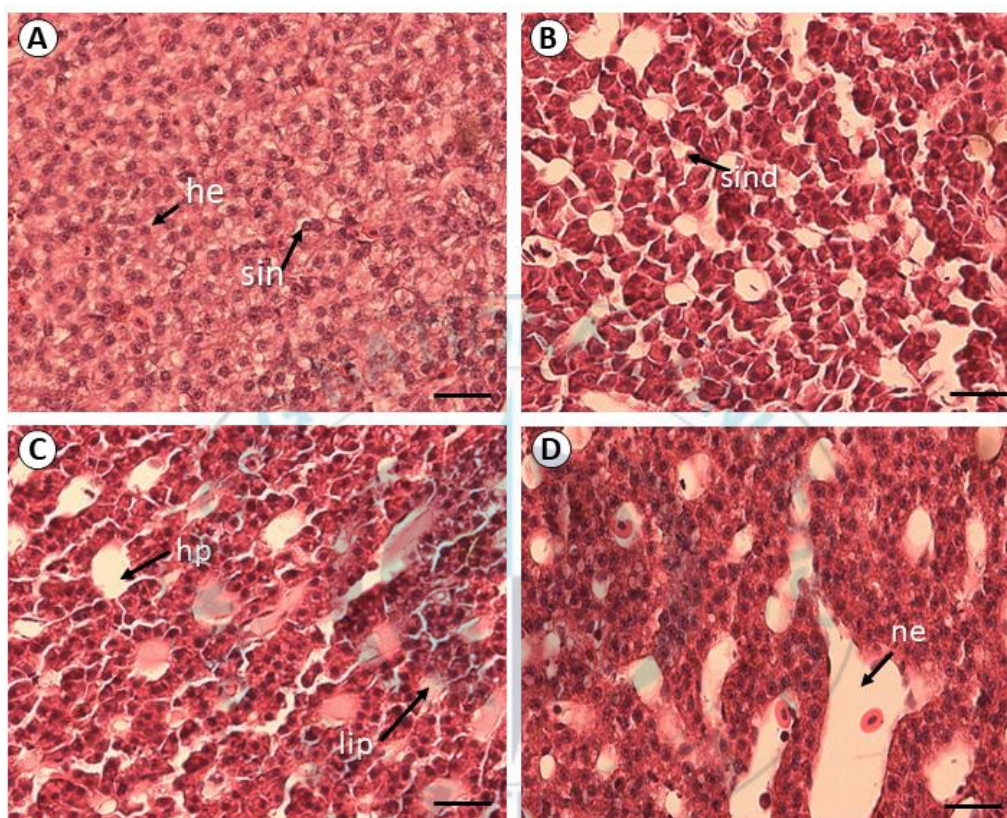


Fig. 3-10. Histological liver sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 14 days in the mud loach *Misgurnus mizolepis* sub-adult. (A) Control, (B) 8 ppm Basta, (C) 16 ppm Basta, (D) 32 ppm Basta. he, hepatocytes; hp, hepatocyte picnosis; lip, lipid degeneration; ne, necrosis; sin, sinusoids; sind. sinusoid dilation. Hematoxylin and eosin staining. Scale bars indicate 10 μ m.

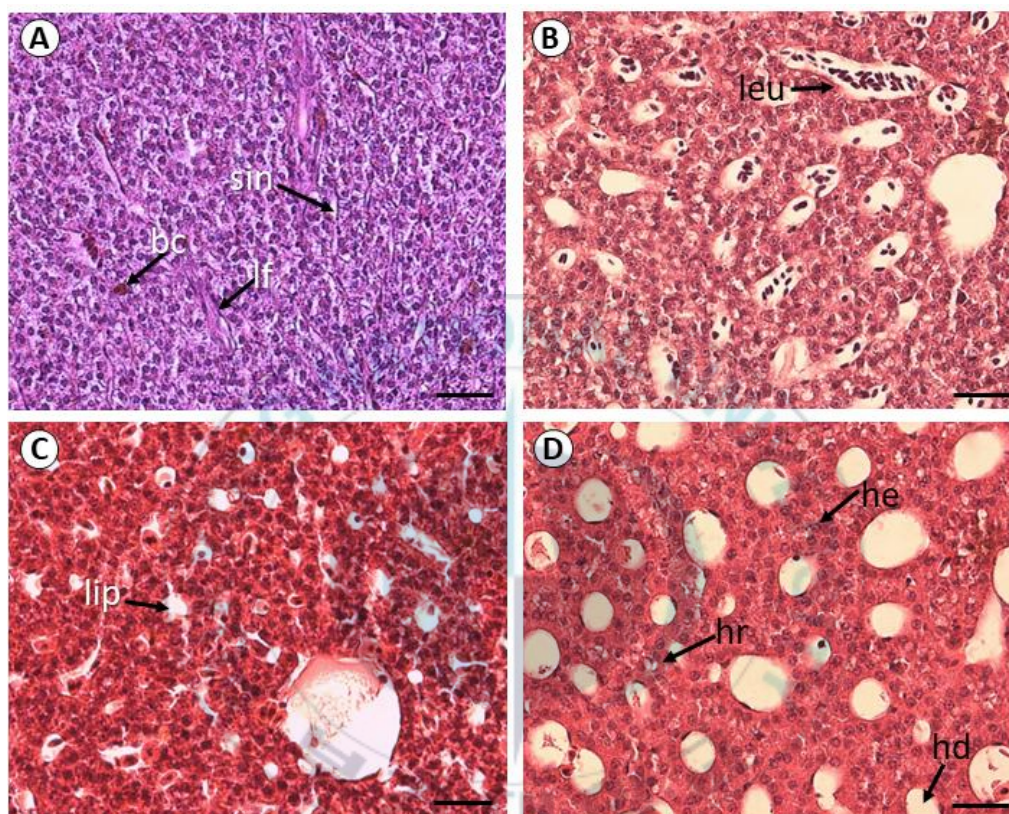


Fig. 3-11. Histological gill sections from individuals after the subchronic toxicity test performed for 28 days in the mud loach *Misgurnus mizolepis* sub-adult. (A) 4 ppm Basta, (B) 8 ppm Basta, (C) 16 ppm Basta, (D) 32 ppm Basta. bc, blood congestion; hd, hydropic degeneration; he, hepatocytes; hr, hyaline regeneration; leu, leukocyte infiltration; lip, lipid degeneration; lf, liver fibrosis; sin, sinusoids. Hematoxylin and eosin staining. Scale bars indicate 10 μ m.

Table 3-5. Histopathological indices (HIs) after subchronic exposure to Basta in the larvae of mud loach *Misgurnus mizolepis*

Treatment duration	HIs	Concentration (ppm)				
		0	2	4	8	16
2 weeks	HI _{Gill.Rp1}	0.8±0.4 ^a	0.8±0.4 ^a	1.9±1.3 ^a	1.0±0.0 ^a	1.8±1.1 ^a
	HI _{Gill.Rp2}	0.7±0.8 ^a	3.4±0.8 ^{ab}	3.4±0.3 ^b	3.5±1.0 ^b	7.5±0.2 ^d
	HI _{Gill.Rp3}	0.5±0.1 ^a	2.2±0.0 ^{ab}	2.7±0.8 ^{ab}	3.4±0.0 ^{bc}	5.3±1.1 ^c
	HI _{Gill}	1.9±0.3 ^a	6.3±1.2 ^b	8.1±0.8 ^b	7.9±1.0 ^b	14.6±0.2 ^c
	HI _{Liv.Rp1}	1.1±0.1 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a
	HI _{Liv.Rp2}	0.0±0.0 ^a	2.6±0.6 ^{ab}	6.1±0.1 ^{bc}	8.6±1.9 ^c	7.5±0.8 ^c
	HI _{Liv.Rp3}	0.3±0.5 ^a	3.2±0.1 ^{ab}	2.1±0.4 ^{ab}	6.9±3.0 ^c	3.0±1.2 ^{ab}
	HI _{Liv.Rp4}	2.0±0.0 ^a	2.0±0.0 ^{ab}	4.4±0.0 ^{ab}	9.6±0.0 ^b	2.0±0.0 ^{ab}
	HI _{Liv}	3.4±0.5 ^a	8.8±0.7 ^b	13.6±0.4 ^c	26.1±1.1 ^d	13.4±2.1 ^c
	HI _{Tot}	5.2±0.8 ^a	15.0±1.9 ^b	21.6±0.4 ^{bc}	34.0±2.1 ^d	28.0±2.3 ^{cd}
4 weeks	HI _{Gill.Rp1}	0.3±0.4 ^a	1.4±0.6 ^a	1.9±0.1 ^a	4.4±0.6 ^b	4.5±0.7 ^b
	HI _{Gill.Rp2}	1.1±0.1 ^a	6.8±1.5 ^b	7.2±0.8 ^b	8.3±1.2 ^b	9.2±0.8 ^b
	HI _{Gill.Rp3}	0.3±0.4 ^a	3.4±0.5 ^{ab}	4.9±1.2 ^b	6.3±0.5 ^b	6.0±1.0 ^b
	HI _{Gill}	1.6±0.8 ^a	11.5±1.4 ^b	14.0±1.9 ^{bc}	19.0±2.3 ^{bc}	19.7±2.5 ^c
	HI _{Liv.Rp1}	1.1±0.1 ^a	2.9±0.0 ^b	3.1±1.6 ^b	3.2±0.3 ^b	4.2±0.3 ^c
	HI _{Liv.Rp2}	0.8±1.1 ^a	9.0±1.4 ^b	9.4±1.9 ^b	9.8±1.2 ^b	10.2±0.9 ^b
	HI _{Liv.Rp3}	0.3±0.5 ^a	3.8±0.7 ^b	5.7±0.6 ^b	6.5±0.6 ^{bc}	9.0±1.4 ^d
	HI _{Liv.Rp4}	1.3±0.9 ^a	6.8±2.0 ^b	8.4±0.5 ^b	8.8±1.2 ^b	7.6±0.8 ^b
	HI _{Liv}	3.5±2.5 ^a	22.5±2.7 ^b	26.5±2.2 ^b	28.3±0.3 ^b	31.0±3.5 ^b
	HI _{Tot}	5.1±3.5 ^a	34.0±4.1 ^b	40.4±4.2 ^{bc}	47.3±2.0 ^{bc}	50.7±6.0 ^c

*Values (mean±SE of three replications) in the same row not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

14일 동안 노출된 간 조직에서는 대조군과 2 ppm의 병리학적 지수는 큰 차이를 보이지 않았지만, 농도가 높아질수록 $HI_{Liv.Rp2}$ (regressive changes) $HI_{Liv.Rp3}$ (progressive changes) 값이 높았다.

28일 처리 실험군에서 아가미 조직의 각 농도처리 구간의 $HI_{Gill.Rp2}$ (regressive changes) 값이 높게 나타났다. 또한 대조군을 제외한 모든 실험군에서 병리조직학적 분석지수가 높았다. 간 조직 역시 $HI_{Liv.Rp2}$ (regressive changes) $HI_{Liv.Rp3}$ (progressive changes) 값이 높았다. 처리기간이 길수록 농도가 높을수록 병리조직학적 지수가 높게 나와 상관관계를 확인할 수 있었다.

(나) 미성어

14일 동안 노출되었던 $HI_{Liv.Rp2}$ 값은 대조군과 현저한 차이가 있었지만, 각 농도 실험군 사이에서 다양하게 나타났다(Table 3-6, $P<0.05$). $HI_{Liv.Rp3}$ 값은 progressive changes가 관찰되지 않았으므로 나타내지 않았다. $HI_{Liv.Rp4}$ (inflammation)은 14일동안 노출된 실험군에서는 농도마다 값이 비슷하였으나 28일 노출된 실험군에서는 농도가 올라갈수록 높은 값을 보였다. HI_{Gill} 은 14일과 28일 농도 증가에 따라 지수가 상승하는 결과를 나타내었다. HI_{Liv} 은 14일 동안 노출된 다른 실험군과 대조군에서 현저하게 다르게 나타났다($P<0.05$).

병리조직학적 분석으로부터 어류건강을 판단할 수 있는 종합 병리조직지수(HI_{Tot})는 각 어류의 아가미와 간 조직 지수를 합하여 계산하였다. 아만성 노출된 HI_{Tot} 값은 실험군 사이에서 뿐만 아니라 대조군과 실험군 사이에서도 현저한 차이를 보였다($P<0.05$). HI_{Tot} 값은 농도의 증가에 따라 그 값도 비례하여 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 3-6. Histopathological indices (HIs) after subchronic exposure to Basta in the sub-adult of mud loach *Misgurnus mizolepis*

Treatment duration	HIs	Concentration (ppm)				
		0	4	8	16	32
2 weeks	HI _{Gill.Rp1}	0.8±1.1 ^a	0.9±0.2 ^a	2.0±0.0 ^{ab}	3.8±0.9 ^{ab}	5.1±1.0 ^b
	HI _{Gill.Rp2}	0.4±0.0 ^a	3.3±0.4 ^b	6.0±0.8 ^c	7.9±0.7 ^c	11.6±0.1 ^d
	HI _{Gill.Rp3}	0.2±0.3 ^a	2.7±1.4 ^a	6.7±0.6 ^b	7.6±1.5 ^b	8.8±0.3 ^b
	HI _{Gill}	1.3±0.8 ^a	6.9±1.6 ^a	14.7±1.4 ^b	19.3±3.1 ^{bc}	25.5±1.4 ^c
	HI _{Liv.Rp1}	0.6±0.1 ^a	1.0±0.6 ^a	1.8±0.4 ^{ab}	3.3±0.8 ^b	5.3±0.1 ^c
	HI _{Liv.Rp2}	0.4±0.5 ^a	4.7±0.7 ^b	5.7±0.3 ^b	9.3±0.3 ^c	9.8±0.3 ^c
	HI _{Liv.Rp3}	0.0±0.0 ^a	2.0±0.8 ^a	6.8±0.7 ^b	6.5±1.4 ^b	6.1±0.2 ^b
	HI _{Liv.Rp4}	0.0±0.0 ^a	2.0±0.1 ^b	3.6±0.1 ^d	2.6±0.2 ^{bc}	3.0±0.1 ^c
	HI _{Liv}	1.0±0.5 ^a	9.6±0.4 ^b	17.9±0.5 ^c	21.7±0.1 ^d	24.3±0.8 ^e
	HI _{Tot}	2.3±0.4 ^a	16.5±1.9 ^b	32.7±1.9 ^c	41.0±3.0 ^d	49.7±2.2 ^e
4 weeks	HI _{Gill.Rp1}	1.0±0.4 ^a	0.8±0.4 ^a	2.2±1.2 ^a	1.4±0.5 ^a	1.6±0.8 ^a
	HI _{Gill.Rp2}	2.1±0.4 ^a	10.7±0.3 ^b	11.0±0.1 ^b	11.5±0.1 ^b	12.0±1.4 ^b
	HI _{Gill.Rp3}	1.5±0.3 ^a	8.0±0.2 ^b	8.0±0.1 ^b	8.2±0.1 ^b	9.0±1.4 ^b
	HI _{Gill}	3.5±0.4 ^a	18.7±0.5 ^b	19.0±0.2 ^b	19.7±0.2 ^b	21.0±1.4 ^b
	HI _{Liv.Rp1}	1.0±0.3 ^a	1.8±0.4 ^{ab}	3.7±0.8 ^{bc}	3.9±0.5 ^c	5.2±0.1 ^c
	HI _{Liv.Rp2}	2.3±0.1 ^a	7.0±0.5 ^b	9.9±2.1 ^{bc}	12.3±0.0 ^c	11.3±0.9 ^c
	HI _{Liv.Rp3}	2.0±0.4 ^a	2.5±0.1 ^a	6.9±1.7 ^b	7.1±0.4 ^b	8.2±0.2 ^b
	HI _{Liv.Rp4}	2.0±0.4 ^a	3.5±0.7 ^a	3.3±1.0 ^a	8.3±1.0 ^b	10.9±0.2 ^b
	HI _{Liv}	7.3±0.1 ^a	14.7±1.6 ^{ab}	23.8±5.6 ^{bc}	31.6±1.1 ^{cd}	35.5±0.8 ^d
	HI _{Tot}	10.8±0.2 ^a	33.3±2.2 ^b	42.7±5.8 ^{bc}	51.4±0.9 ^{cd}	56.5±0.8 ^d

*Values (mean±SE of three replications) in the same row not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

2. Basta에 노출된 미꾸라지 조직의 전사체 분석

가. 전사체 분석

Basta에 노출된 미꾸라지의 뇌, 아가미, 간 조직에 대한 실험군과 대조군에서 RNA를 추출하여 Illumina HiSeq 4000 platform으로 염기서열을 분석한 결과와 assembly 결과를 Table 3-7에 나타내었다.

Sequencing 결과, 각 조직으로부터 8.1~11.6 Gbp (3.8~76.9 M reads)의 raw reads를 확보하였다. adaptor 서열 및 low-quality 서열을 제거하여 평균 길이가 53,411,383~76,249,116개의 clean reads (98.7% high-quality reads)를 생성하였다. Trinity 프로그램을 이용한 *De novo* assembly를 수행한 결과 103,516~213,013개(78,378,725~160,083,964 bp)의 contigs를 생성하였다. 그리고 CD_HIT_est를 이용하여 unigene set은 82,805~157,017 contigs를 각 조직으로부터 산출하였다. Unigene contigs의 평균길이는 606.9~764.9 bp였으며, N50는 797~1293 bp였다. DEG 분석을 위한 reference sequence 활용률은 73.2~88.9%였다(Table 3-7).

나. Unigenes의 annotation

Basta에 노출된 미꾸라지의 조직에 대한 차등발현 유전자를 annotation 하기 위하여 본 연구에 의해 구축된 NCBI에서 제공하는 UniGene DB를 이용하여 BLAST 검색을 실시하였다. 또한 Blast2GO 프로그램을 이용하여 GO term, KEGG pathway 분석을 실시하였다.

Table 3-7. Summary statistics of transcriptome sequencing for mud loach *Misgurnus mizolepis* exposed to Basta

		Brain		Gill		Liver	
		Con	Exp	Con	Exp	Con	Exp
Raw data	No. of paired-end reads (×1000)	59,667	76,898	71,834	62,848	53,836	62,803
	Q30 bases (%)	92.1	94.5	91.1	92.5	95.1	93.7
	No. of bases (10 ⁶ bp)	9,010	11,611	10,847	9,490	8,129	9,483
Raw sequences after trimming (with cutadapt)	No. of paired-end reads (×1,000) / rate (%)	58,638 / 98.3	76,249 / 99.2	70,655 / 98.4	61,793 / 98.3	53,441 / 99.3	62,042 / 98.8
	No. of bases (10 ⁶ bp) / rate (%)	8,233 / 91.4	10,763 / 92.7	9,732 / 89.7	8,572 / 90.3	7,548 / 92.9	8,693 / 91.7
	No. of assembled contigs	181,241	213,013	134,097	176,709	103,516	169,393
De novo assembly (with Trinity) / Unigene (with CD_HIT_est)	No. of bases (10 ³ bp)	138,239	157,017	104,035	107,232	82,805	122,321
	Smallest contig (bp)	141,758	160,084	93,546	97,364	78,379	120,566
	Largest contig (bp)	105,740	116,911	72,393	65,083	60,981	81,773
	Average length (bp)	224/224	224/224	224/224	224/224	224/224	224/224
	Median length (bp)	11,171/11,171	13,311/13,311	14,247/14,247	7,960/7,960	9,769/9,769	11,497/11,497
	N50 (bp)	782.2/764.9	751.5/744.6	697.6/695.9	551/606.9	757.2/736.4	711.8/668.5
	Mapping rate (%) / reference of the total samples	408/409	390/397	399/401	408/378	425/418	408/397
DEG analysis (with Tophat)		1368/1293	1305/1245	1073/1056	1368/797	1219/1158	1368/969
		82.8/84.7	82.3/83.3	87.4/88.9	78.8/79.8	83.0/87.1	72.0/73.2

(1) BLASTX 분석을 통한 annotation결과

미꾸라지 뇌, 아가미 그리고 간 조직의 NGS 결과로부터 생성된 각 샘플의 unigene set들의 annotation을 실시하기 위하여 NCBI nr database를 통하여 BLASTX ($E\text{-value} \leq 1.0e\text{-3}$)를 수행하였다. 그리고 Blast2Go 프로그램을 사용하여 gene ontology (GO)와 eukaryotic clusters of orthologous group (KOG)를 분석하였으며, 또한 Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway (KEGG pathway) 분석을 실시하여, 아래의 Table 3-8과 같은 결과를 얻었다.

이들 결과들로부터, NCBI nr DB로부터는 brain, gill 그리고 liver로부터 각각 77,081, 61,952 그리고 76,169 contig들이 검색되었으며, 이들은 각 샘플의 전체 unigene set에 포함 contig들 중에 각각 brain에서 32.43% (77,081/237,713), gill에서 37.45 % (61,952/165,438) 그리고 liver에서 42.84% (76,169/177,795) 가 검색되었다. KEGG pathway 분석에서, brain에서 7.77 % (18,004/237,713), gill에서 9.22 % (15,245/165,438) 그리고 liver에서 9.53 % (16,949/177,795)가 조사되었으며, 마지막으로 BLASTX를 기반으로 한 Blast2Go 프로그램에 의한 GO-term 분석은 brain에서 27.27 % (64,822/237,713), gill에서 31.85 % (52,693/165,438) 그리고 liver에서 36.72% (65,288/177,795) 로 검색되었다. Orthologous Group Annotation을 실시하기 위하여 Blast2GO에 포함되어 있는 tool을 사용하였으며, 이 tool은 Egg NOG DB를 이용한다. Brain에서는 총 13.67 % (32,487/237,713) 그리고 gill에서는 31.85% (27,128/165,438) 그리고 liver에서는 16.01% (28,468/177,795)로 검색되었다.

Table 3-8. Number of unigene annotations obtained from the different protein databases, using BLASTX search

Size	Tissues	Database			
		NCBI nr DB	Egg NOG DB	GO DB	KEGG DB
All	Brain	77,081	32,487	64,822	18,004
	Gill	61,952	27,128	52,693	15,245
	Liver	76,169	28,468	64,288	16,949
≤ 300 bp	Brain	10,198	3,927	8,120	331
	Gill	10,943	4,967	8,879	657
	Liver	12,342	3,626	9,801	557
300-1,000 bp	Brain	31,651	12,645	25,820	3,343
	Gill	29,689	12,307	24,816	4,494
	Liver	36,339	11,899	29,869	4,564
≥ 1,000 bp	Brain	35,232	15,915	30,882	14,331
	Gill	21,320	9,854	18,998	10,094
	Liver	27,488	12,943	24,618	11,828

(2) BLASTX 결과의 신뢰도 분석

BLASTX를 통하여 분석된 각 샘플의 unigene set들의 annotation 결과들의 신뢰도를 분석하기 위하여 E-value와 similarity 분포를 분석하였다. E-value 분포는 각 샘플들에서 $1.0e-50 \sim 1.0e-5$ 사이에서 brain 30,349 contigs (39.37%), gill 26,548 contigs (42.85%) 그리고 liver 35,440 contigs (46.53%)로써 가장 많이 분포를 보였고, E-value 값이 0에서 brain은 15,801 contigs (20.50%), gill은 9,786 contigs (15.80%) 그리고 liver는 10,990(14.3%)를 보였다(Fig. 3-12). Similarity 분포에서 81~100%가 brain은 39,735 contigs (51.55%), gill은 32,670 contigs (52.73%) 그리고 liver는 39,354 contigs (51.67%)이고, 다음으로 많은 분포를 보인 구간은 61~80%으로 brain에서 30,930 contigs (40.13%), gill에서 24,447 contigs (39.46%) 그리고 liver에서 30,524 contigs (40.07%)였다(Fig. 3-13).

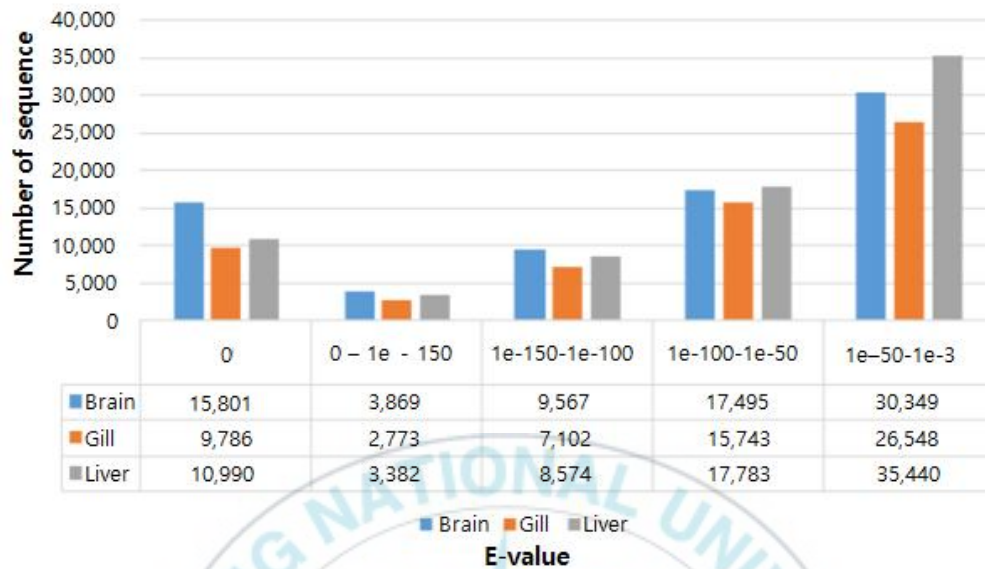


Fig. 3-12. E-value distribution of BLASTX hits against NCBI nr DB.

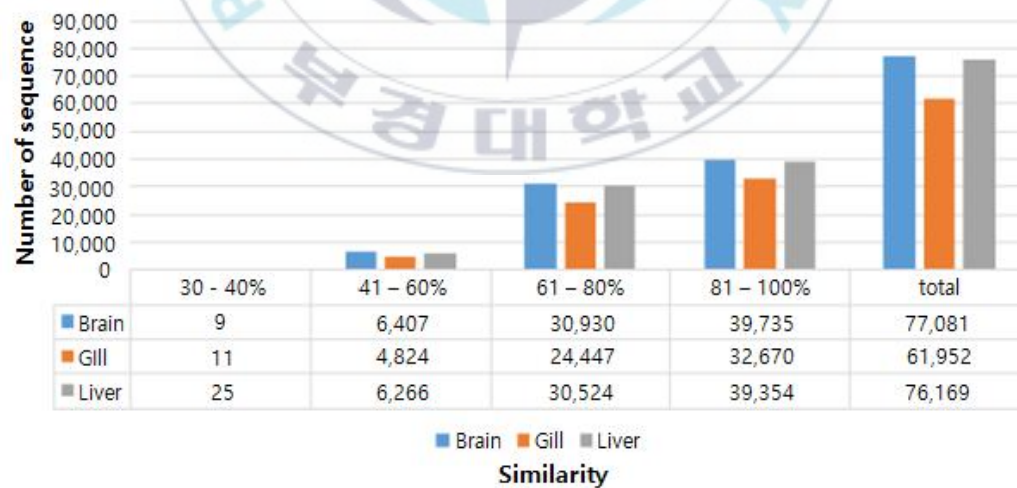


Fig. 3-13. Similarity distribution of BLASTX hits against NCBI nr DB.

다. Annotation 결과를 통한 유전자 기능 예측

(1) KEGG pathway 분석을 통한 annotation

생성된 각 샘플의 unigene contig set들은 KEGG pathway mapping (<http://www.genome.jp>) 에 의한 metabolic pathway map 분석에 활용되었으며, 또한 contig를 DEG 분석의 reference 서열 구축에 활용하였다. DEG 결과로부터 유효한 발현의 차이를 보이는 contigs는 BLAST2GO software에 의해 유전자의 annotation에 사용되어 각 샘플군의 metabolic pathway와 각 관련 유전자의 예측 및 기능적 차이를 분석하였다.

KEGG pathway 분석에서 종합적으로 50,198개의 unigenes이 다양한 DB에 annotation됨을 확인할 수 있었다. 300 bp 이하에서 1,545개, 300-1,000 bp에서 12,401개, 68

1,000 bp 이상에서 36,253개의 annotation 결과를 확인할 수 있었다. 뇌 조직 대조군에서 16,823개, 실험군에서 16,856개, 아가미 조직 대조군에서 15,992개, 실험군에서 15,568개, 간 조직 대조군에서 14,905개, 실험군에서 15,035개의 unigene이 pathway에 검색되었다. Metabolism, genetic information processing, environmental information processing, cellular processes, organismal systems, human diseases의 6가지의 카테고리에서 46개의 KEGG pathway가 매치되는 것을 확인할 수 있었다. Metabolism 카테고리에서 12개의 pathway로 가장 많은 결과를 얻었으며, global and overview maps 1,455~1,557개, environmental information processing 카테고리에서 signal transduction 1,798~2,167개로 많은 결과를 얻을 수 있었다(Table 3-9).

Table 3-9. KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) pathway analysis associated with the transcriptome of mud loach *Misgurnus mizolepis* exposed to Basta herbicide

Function Category		Brain		Gill		Liver	
		Con.	Exp.	Con.	Exp.	Con.	Exp.
Metabolism	Global and overview maps	1,522	1,557	1,455	1,472	1,457	1,508
	Carbohydrate metabolism	324	336	328	319	309	333
	Energy metabolism	162	165	165	168	159	165
	Lipid metabolism	276	287	270	272	277	291
	Nucleotide metabolism	203	198	194	196	192	190
	Amino acid metabolism	311	311	274	291	291	294
	Metabolism of other amino acids	72	74	72	76	68	65
	Glycan biosynthesis and metabolism	226	231	189	191	185	187
	Metabolism of cofactors and vitamins	140	135	129	126	135	139
	Metabolism of terpenoids and polyketides	35	36	32	33	35	33
	Biosynthesis of other secondary metabolites	36	33	31	27	33	28
Xenobiotics biodegradation and metabolism	57	62	58	65	63	64	
Genetic Information Processing	Transcription	166	167	173	169	171	171
	Translation	383	389	392	395	388	387
	Folding, sorting and degradation	374	382	377	373	371	366
	Replication and repair	210	210	209	219	185	188
Environmental Information Processing	Membrane transport	28	29	26	25	25	26
	Signal transduction	2,160	2,167	2,001	1,939	1,798	1,830
	Signaling molecules and interaction	337	325	282	249	233	230
Cellular Processes	Transport and catabolism	586	595	580	578	582	583
	Cell growth and death	661	651	664	664	584	581
	Cellular community: eukaryotes	368	374	340	346	315	308
	Cellular community: prokaryotes	6	7	7	6	6	6
	Cell motility	108	110	102	104	94	88
Organismal Systems	Immune system	988	969	1013	940	921	890
	Endocrine system	899	890	778	755	738	742
	Circulatory system	174	172	148	141	129	133
	Digestive system	228	233	191	192	220	224
	Excretory system	94	95	78	79	79	84
	Nervous system	599	589	420	405	388	402
	Sensory system	102	105	78	80	73	80
	Development	182	178	167	167	141	143
	Aging	143	138	121	124	130	137
	Environmental adaptation	96	96	70	71	71	69
Human Diseases	Cancers: Overview	769	771	767	746	676	670
	Cancers: Specific types	684	672	658	665	591	581
	Immune diseases	169	166	177	149	151	153
	Neurodegenerative diseases	436	427	418	418	411	412
	Substance dependence	208	208	129	120	110	115
	Cardiovascular diseases	228	235	234	212	193	194
	Endocrine and metabolic diseases	279	281	272	245	262	265
	Infectious diseases: Bacterial	406	412	416	405	399	400
	Infectious diseases: Viral	970	961	1010	953	896	896
	Infectious diseases: Parasitic	245	255	261	233	211	228
	Drug resistance: Antimicrobial	0	0	0	0	0	1
	Drug resistance: Antineoplastic	173	172	166	165	159	155

예측된 유전자의 annotation을 위하여 sequence homology를 기반으로 하는 BLAST검색을 실시하였다. DEG 분석한 reference unigene과 UniGene DB 대해 annotation을 진행하였고, 대조군과 실험군에 대한 공통된 부분과 각각 다르게 발현되는 contigs를 확인하였고, annotation한 것을 ven diagram으로 나타내었다. 대조군과 Basta에 노출된 뇌 조직 실험군에서 각각 446개 contigs와 493개 contigs가 단독 발현되었고, 6,969개가 대조군과 실험군에서 공통으로 발현되었다(Fig. 3-14)

대조군과 Basta에 노출된 아가미 실험군에서 각각 634개 contigs와 463개 contigs가 단독 발현되었고, 6,351개 contigs 공통으로 발현되었다(Fig. 3-15).

대조군과 Basta에 노출된 간 조직 실험군에서 각각 537개 contigs와 592개 contigs가 단독 발현되었고, 5,976개 contigs가 공동 발현되었다(Fig. 3-16). 이들 공동으로 나누어져 있는 transcripts는 대조군과 실험군의 전사체 발현을 비교하는 RNA-seq분석에 reference로 이용되었다.

뇌 조직 대조군에서 가장 많은 7,415 contigs가 발현되었으며, Basta에 노출된 간 조직 실험군에서 6,568 contigs가 발현되었으며, 실험한 모든 그룹에서 나누어져 있는 contig는 5,183개였다(Fig. 3-17).

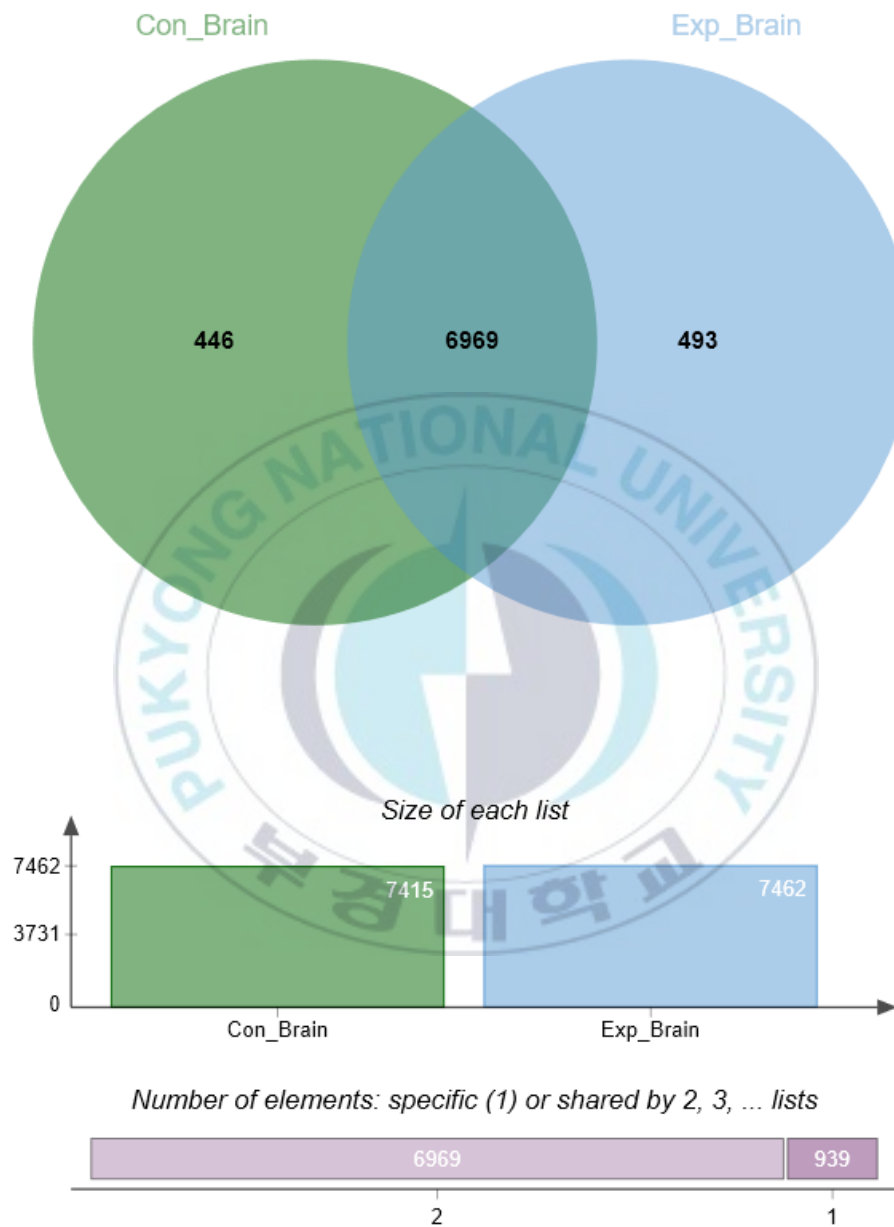


Fig. 3-14. Venn diagram showing the contigs exclusive to control-brain (green circle) and exp-brain (blue circle) in the *Misgurnus mizolepis* transcriptome.

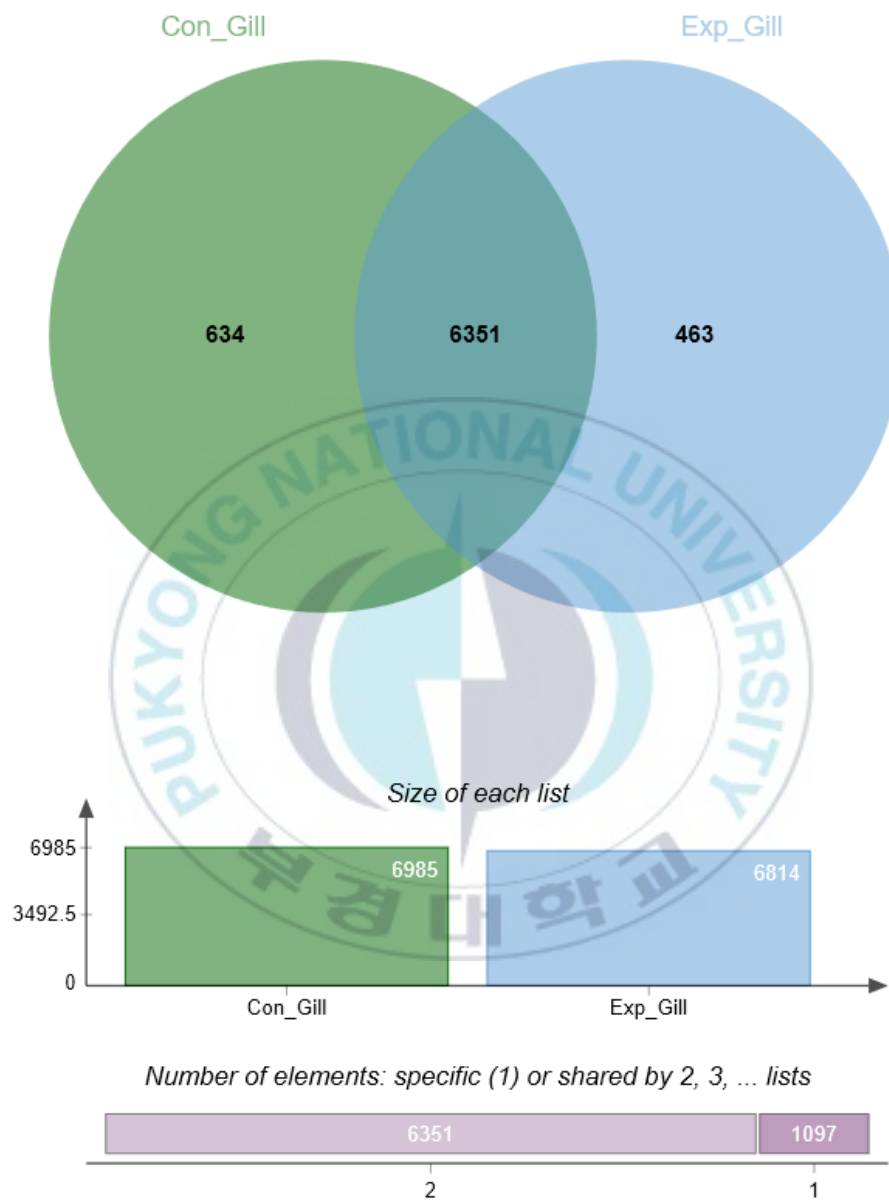


Fig. 3-15. Venn diagram showing the contigs exclusive to control-gill (green circle) and exp-gill (blue circle) in the *Misgurnus mizolepis* transcriptome.

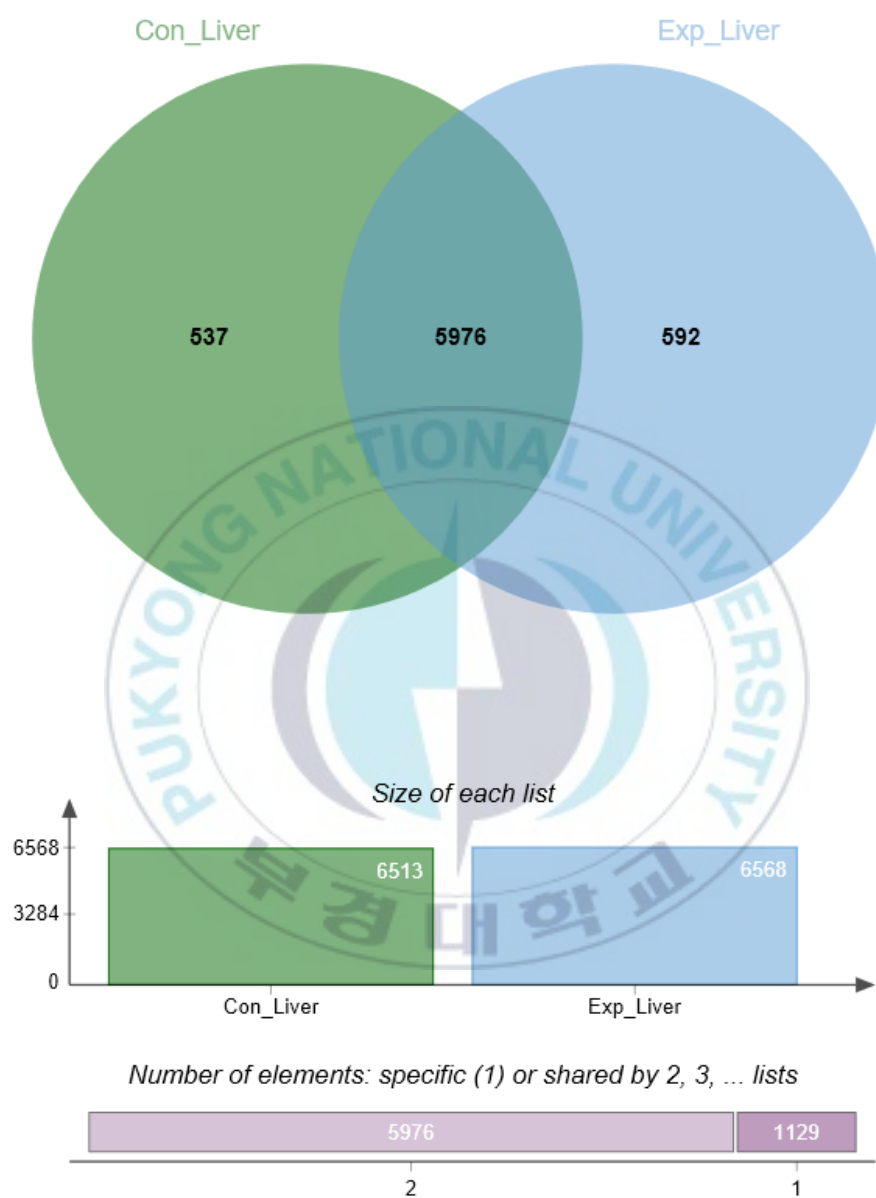


Fig. 3-16. Venn diagram showing the contigs exclusive to control-liver (green circle) and exp-liver (blue circle) in the *Misgurnus mizolepis* transcriptome.

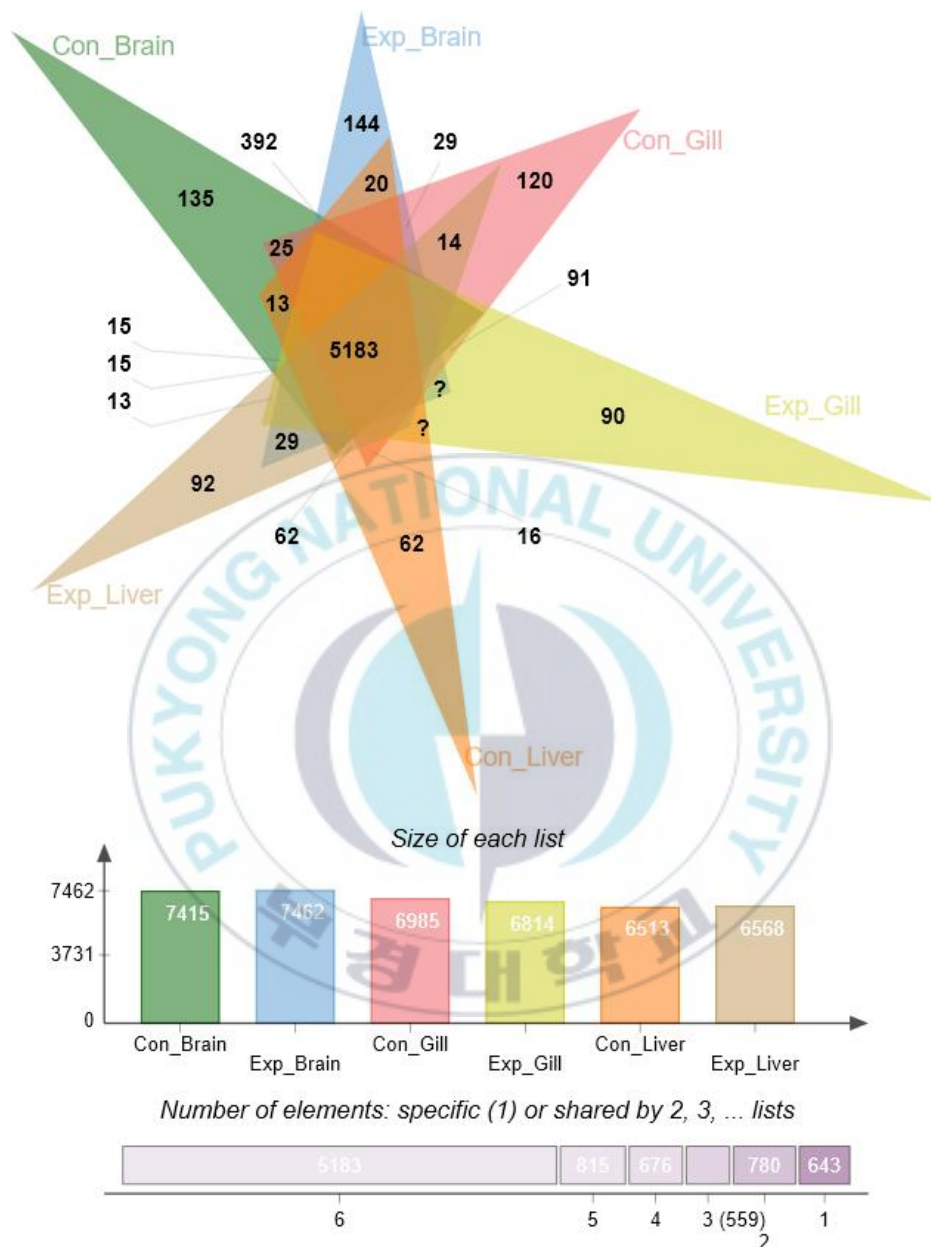


Fig. 3-17. Venn diagram showing the contigs exclusive to control-brain (green circle), exp-brain (blue circle), control-gill (red circle), exp-gill (yellow circle), control-liver (orange circle) and exp-liver (brown circle) in the *Misgurnus mizolepis* transcriptome.

KEGG pathway 분석에서 각 조직별 up & down regulation한 contig 들을 Table 3-10에 나타내었다.

KEGG 분석한 결과 각 카테고리들이 차지하는 전체적인 비율은 각 실험군 조직별로 유사한 양상을 보였다. 뇌 조직에서는 Environmental information processing 카테고리의 경우 signal transduction group에서 up-regulation과 down-regulation의 발현차이가 컸으며, organismal systems 카테고리는 immune system, nervous system, endocrine system에서 차등 발현하였다(Fig. 3-18). 이 결과를 바탕으로 후보 유전자들을 DEG 분석에서 FC 값이 4이상, 그리고 q값이 유의한 통계 값인 0.05이하의 값을 가진 contig들과 그리고 KEGG 분석에서 대조군과 실험군에서 그 관련 유전자의 수의 차이가 나는 contig들을 선택하여 위의 목록을 작성하였다. 이 때 KEGG 분석에서 그 각각의 pathway의 관련 유전자들의 수가 차이나는 KEGG pathway category는 chemokine signaling pathway, neuroactive ligand-receptor interaction, RNA transport였다. 총 27개 후보 유전자를 탐색하였다(Table 3-11).

아가미 조직에서 KEGG 분석한 결과 역시 각 카테고리 들이 차지하는 전체적인 비율은 큰 변동이 없이 비슷한 양상을 보였다. Metabolism 카테고리에서 global and overview maps에서 up-regulation과 down-regulation의 발현 차이가 컸으며, genetic information processing 카테고리에서 대부분의 group에서 큰 차이가 있었지만, 특히 translation group의 발현차이가 컸다. Environmental information processing 카테고리에서는 signal transduction에서 가장 큰 발현차이가 확인되었으며, organismal systems 카테고리 중 immune system 에서 아가미 조직에서 차등 발현이 높게 나타났다(Fig. 3-19). 이 결과를 바탕으로 후보 유전자들은 우선 DEG 분석에서 FC 값이 4이상, 그리고 q값이 유의한 통계 값인 0.05이하의 값을 가진 contig들과 그리고 KEGG

분석에서 대조군과 실험군에서 그 관련 유전자의 수의 차이가 나는 contig들을 선택하여 위의 목록을 작성하였다.

이 때 KEGG 분석에서 각각의 pathway의 관련 유전자들의 수가 차이나는 KEGG pathway category는 chemokine signaling pathway, cytosolic DNA-sensing pathway, hematopoietic cell lineage, ribosome 였으며 총 20개 후보 유전자를 탐색하였다(Table 3-12).

간 조직에서 KEGG 분석한 결과 역시 각 카테고리들이 차지하는 전체적인 비율은 다른 실험군 조직과 비슷한 양상을 보였다. Metabolism 카테고리의 global and overview maps 에서 up regulation과 down regulation의 발현차이가 컸으며, genetic information processing 카테고리에서 대부분 차이가 컸지만, translation group의 발현차이가 컸고, environmental information processing 카테고리에서는 signal transduction이 발현차이가 확인되었으며, organismal systems 카테고리 중 endocrine system에서 차등 발현되었다(Fig. 3-20). 이 결과를 바탕으로 이들 후보 유전자들은 우선 DEG 분석에서 FC 값이 4이상, 그리고 q값이 유의한 통계 값인 0.05이하의 값을 가진 contig들과 그리고 KEGG 분석에서 대조군과 실험군에서 관련 유전자 수의 차이가 나는 contig들을 선택하여 위의 list를 작성하였다. 이때 KEGG 분석에서 그 각각의 pathway의 관련 유전자들의 수가 차이나는 KEGG category들은 metabolic pathways와 ribosome이었으며 총 280개 후보 유전자를 탐색하였다 (Table 3-13).

Table 3-10. Up & down regulated contigs from KEGG pathway analysis associated with the transcriptome of mud loach *Misgurnus mizolepis* exposed to Basta herbicide

Function Category		Brain		Gill		Liver	
		Up	Down	Up	Down	Up	Down
Metabolism	Global and overview maps	1,202	1,219	1,097	1,166	1,325	1,141
	Carbohydrate metabolism	304	271	271	265	308	251
	Energy metabolism	120	126	111	137	146	106
	Lipid metabolism	229	247	250	221	260	228
	Nucleotide metabolism	165	154	134	174	179	163
	Amino acid metabolism	254	274	229	240	268	257
	Metabolism of other amino acids	63	64	66	60	68	60
	Glycan biosynthesis and metabolism	193	170	151	164	167	171
	Metabolism of cofactors and vitamins	110	117	99	115	126	124
	Metabolism of terpenoids and polyketides	26	34	21	26	32	28
	Biosynthesis of other secondary metabolites	26	33	18	26	28	28
	Xenobiotics biodegradation and metabolism	56	54	52	43	62	51
Genetic Information Processing	Transcription	154	95	89	156	153	131
	Translation	321	276	233	373	366	275
	Folding, sorting and degradation	313	270	251	320	325	309
	Replication and repair	188	164	127	200	176	152
Environmental Information Processing	Membrane transport	24	27	21	18	26	24
	Signal transduction	1,787	1,936	1,606	1,815	1,759	1,643
	Signaling molecules and interaction	244	300	182	254	210	215
Cellular Processes	Transport and catabolism	491	511	484	494	538	522
	Cell growth and death	551	569	519	582	540	515
	Cellular community: eukaryotes	292	334	292	303	286	290
	Cellular community: prokaryotes	6	6	5	5	4	5
	Cell motility	88	93	89	87	85	85
Organismal Systems	Immune system	751	857	662	913	834	820
	Endocrine system	751	788	666	683	700	665
	Circulatory system	141	149	122	133	125	108
	Digestive system	203	202	180	178	214	205
	Excretory system	83	83	62	68	81	76
	Nervous system	449	519	341	374	398	341
	Sensory system	89	91	67	74	76	67
	Development	153	158	133	144	130	134
	Aging	122	121	109	99	124	112
	Environmental adaptation	79	85	60	63	70	69

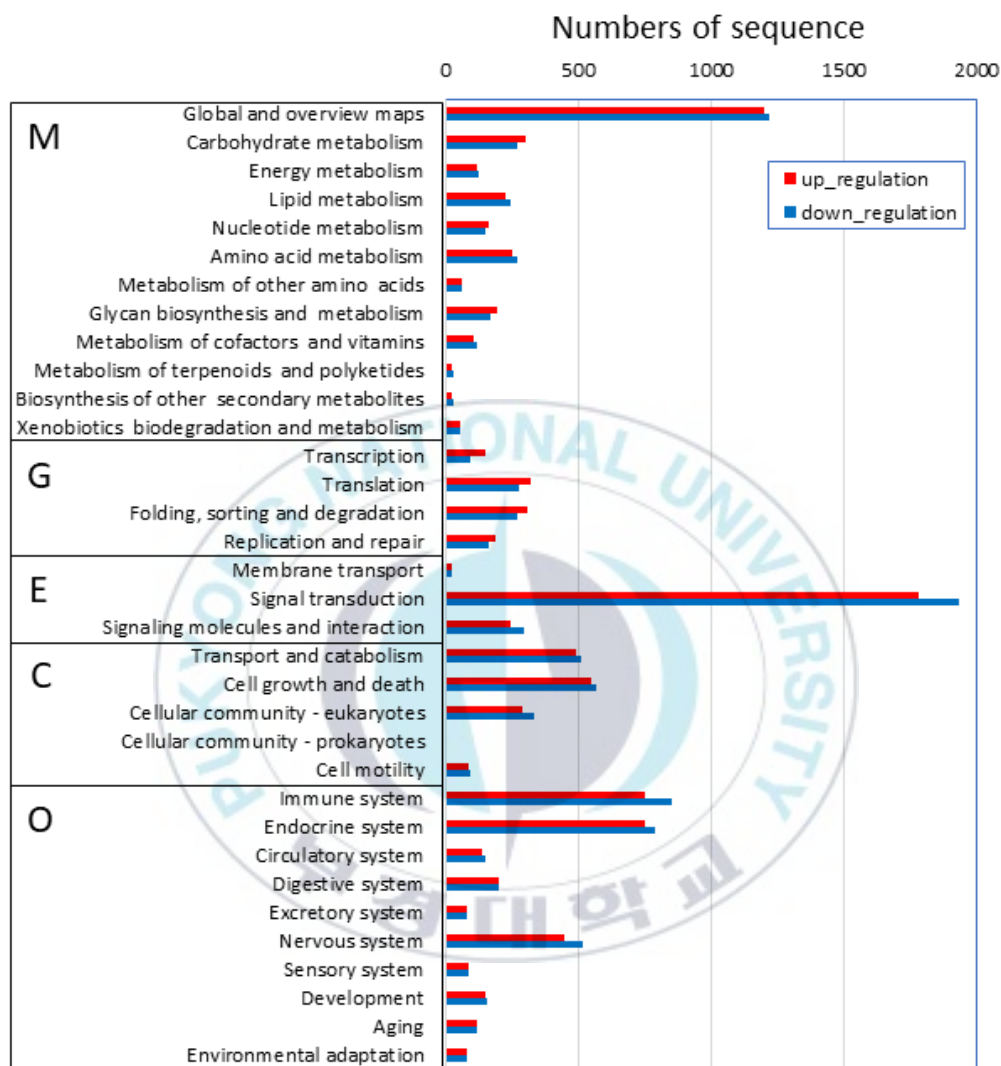


Fig. 3-18. KEGG pathway on the up & down-regulation of DEG analysis in brain tissue. M: Metabolism, G: Genetic information processing, E: Environmental information processing, C: Cellular processes, O: Organismal systems.

Table 3-11. Candidate contigs from differently expressed genes analysis in brain tissues of mud loach exposed to Basta

Contigs	Con_Brain (FPKM)	Exp_Brain (FPKM)	log2(FC)	up/ down	test stat	p_value	q_value
Exp_Brain_TR46907 c4_g1_i1	1.34933	43.1973	5.00062	up	6.02923	0.00005	0.008705
Exp_Brain_TR41995 c0_g3_i2	3.92707	116.128	4.88612	up	5.87075	0.00005	0.008705
Exp_Brain_TR37267 c1_g1_i1	4.40185	96.0179	4.44712	up	5.26506	0.00005	0.008705
Exp_Brain_TR45368 c4_g3_i1	3.05855	96.2276	4.97553	up	4.95446	0.00025	0.026542
Exp_Brain_TR46968 c11_g4_i1	4.52174	95.4855	4.40033	up	5.2231	0.00025	0.026542
Exp_Brain_TR43973 c1_g1_i1	3.90169	63.9031	4.03372	up	4.7971	0.00025	0.026542
Exp_Brain_TR45896 c4_g1_i1	0.743497	40.9195	5.78232	up	6.18081	0.0003	0.031186
Con_Brain_TR21830 c1_g1_i1	1578.64	97.9302	-4.01078	down	-6.13323	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR36786 c1_g1_i1	200.613	11.9765	-4.06613	down	-5.26699	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR26987 c2_g1_i1	1289.4	61.6035	-4.38755	down	-6.56178	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR34559 c0_g1_i1	183.111	6.60201	-4.79367	down	-6.28626	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR33868 c2_g2_i1	1085.52	24.2839	-5.48224	down	-6.59554	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR34784 c0_g1_i3	50.0949	0.708342	-6.14408	down	-6.2369	0.0001	0.013692
Con_Brain_TR38385 c10_g3_i2	324.493	8.66988	-5.22603	down	-6.26969	0.00015	0.018192
Con_Brain_TR39268 c1_g1_i3	25.6897	0.681107	-5.23716	down	-5.52932	0.00015	0.018192
Con_Brain_TR39037 c5_g1_i4	192.249	2.19013	-6.45582	down	-7.07762	0.00025	0.026542
Con_Brain_TR26774 c0_g1_i1	35.4279	1.1271	-4.97419	down	-5.18166	0.0003	0.031186
Con_Brain_TR35282 c0_g3_i1	100.657	1.87225	-5.74853	down	-6.15701	0.00035	0.03564
Con_Brain_TR29128 c0_g1_i1	49.6307	1.50212	-5.04616	down	-5.05087	0.0005	0.048841
Exp_Brain_TR36015 c0_g1_i2	0	5.31102	inf	up	nan	0.00005	0.008705
Exp_Brain_TR40000 c1_g3_i8	0	16.0183	inf	up	nan	0.00005	0.008705
Exp_Brain_TR59486 c0_g1_i1	0	3.44668	inf	up	nan	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR34559 c0_g1_i1	183.111	6.60201	-4.79367	down	-6.28626	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR38291 c1_g5_i1	45.6803	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR38877 c2_g5_i1	3.21056	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR11736 c0_g2_i1	5.09743	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008705
Con_Brain_TR36973 c7_g1_i1	1.25284	0	-inf	down	-nan	0.0002	0.021991

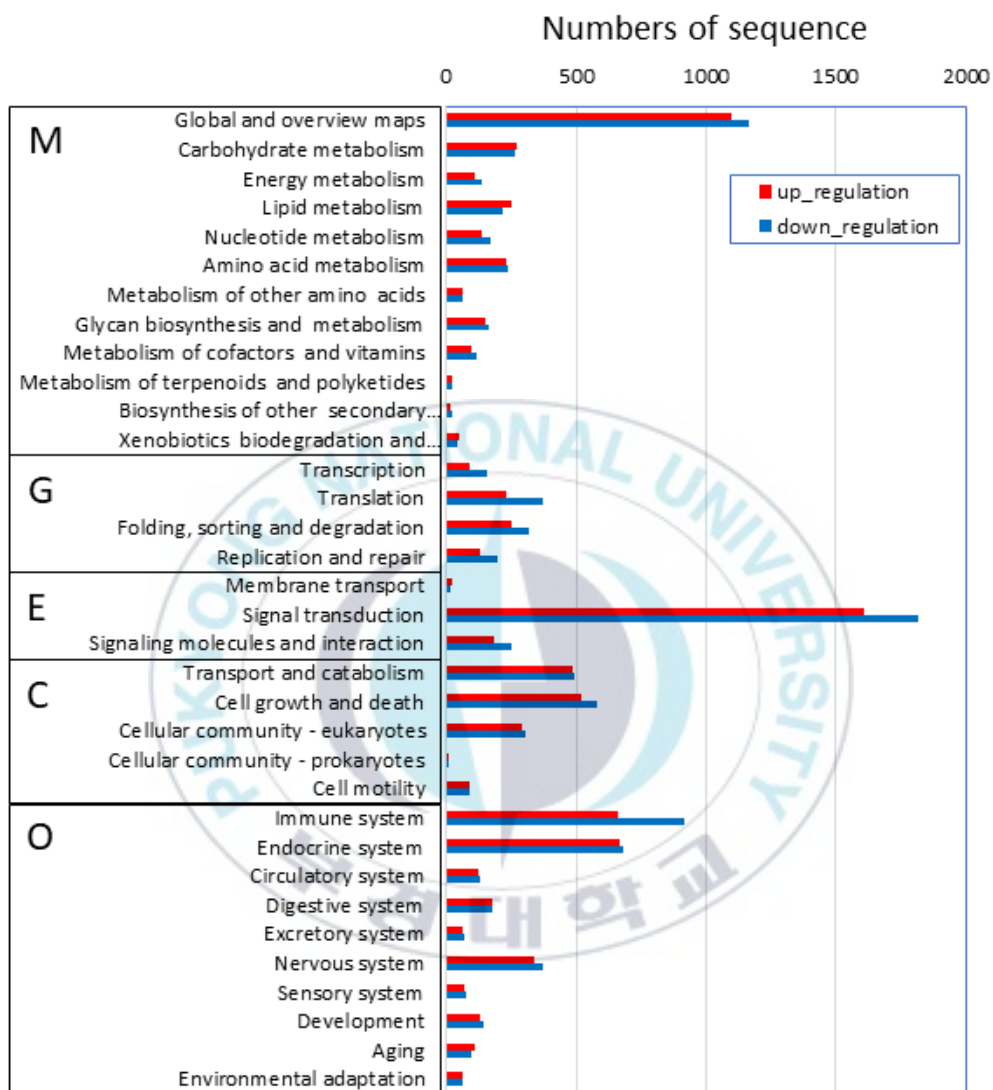


Fig 3-19. KEGG pathway on the up & down-regulation of DEG analysis in gill tissue. M: Metabolism, G: Genetic information processing, E: Environmental information processing, C: Cellular processes, O: Organismal systems.

Table 3-12. Candidate contigs from differently expressed genes analysis in gill tissues of mud loach exposed to Basta

Contigs	Con_Brain (FPKM)	Exp_Brain (FPKM)	log2(FC)	up/down	test_stat	p_value	q_value
Con_Gill_TR19866 c0_g1_i1	42.181	798.683	4.24296	up	4.85052	0.00015	0.023948
Exp_Gill_TR28004 c3_g10_i1	3.12923	80.4622	4.68443	up	4.88553	0.00025	0.038382
Con_Gill_TR24255 c0_g1_i1	317.338	18.4091	-4.10753	down	-4.70422	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR67958 c2_g1_i1	5824.46	332.635	-4.13011	down	-5.46653	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR32567 c6_g1_i1	174.264	6.17201	-4.81939	down	-5.54649	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR10609 c0_g1_i1	988.912	7.55923	-7.03146	down	-7.47058	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR29374 c6_g11_i2	1012.74	13.4982	-6.22935	down	-6.50433	0.0001	0.016681
Con_Gill_TR23997 c0_g1_i2	10.2543	0	-inf	down	-nan	0.0001	0.016681
Con_Gill_TR23290 c0_g1_i2	9.49411	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR10839 c0_g2_i1	16.5639	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR24268 c0_g1_i1	14.6915	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR19963 c0_g1_i1	35.523	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR18601 c0_g1_i2	15.775	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR32295 c1_g1_i4	43.0385	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR21661 c0_g1_i2	14.9612	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR10285 c0_g1_i1	11.2131	0	-inf	down	-nan	0.0001	0.016681
Con_Gill_TR20645 c0_g1_i1	31.7302	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR17232 c0_g1_i1	42.5073	0	-inf	down	-nan	0.0002	0.031072
Con_Gill_TR26621 c0_g1_i3	8.61545	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532
Con_Gill_TR21312 c0_g2_i1	10.6429	0	-inf	down	-nan	0.00005	0.008532

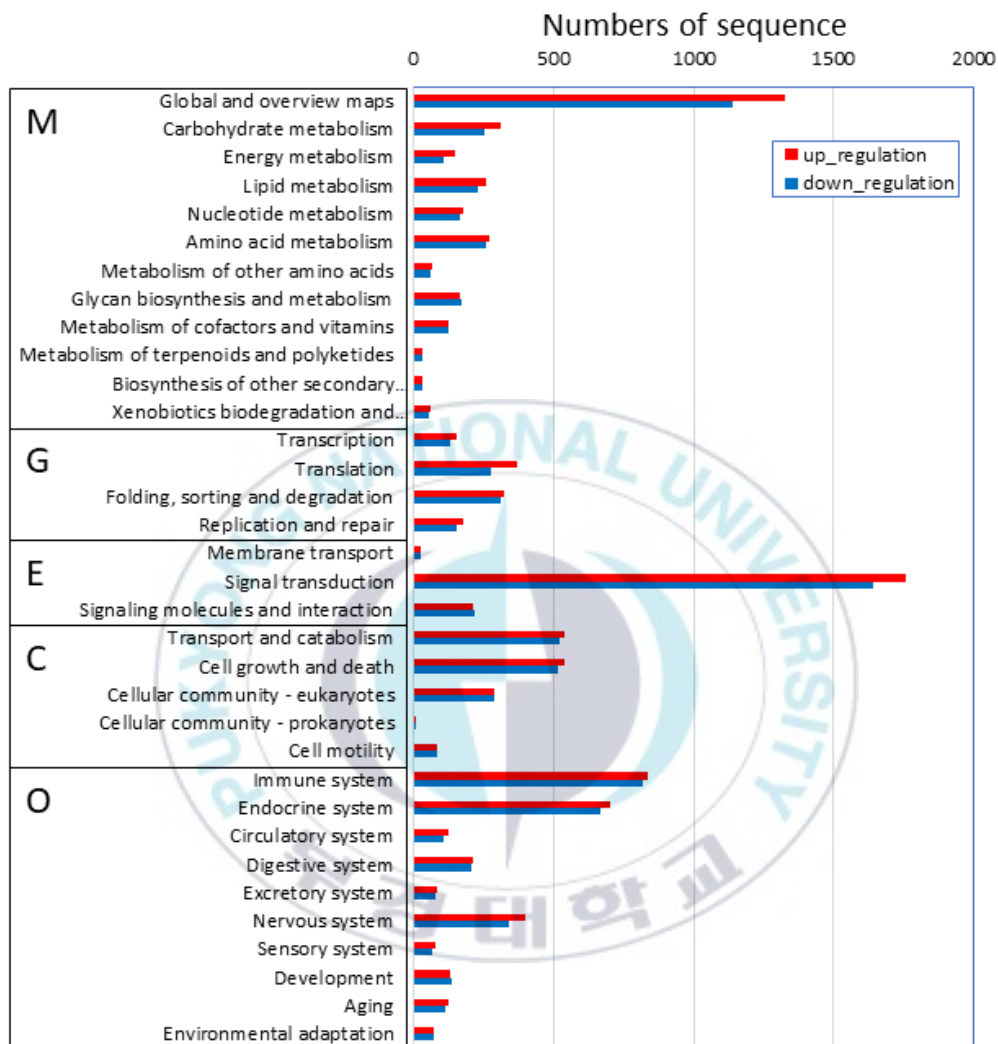


Fig. 3-20. KEGG pathway on the up & down-regulation of DEG analysis in liver tissue. M: Metabolism, G: Genetic information processing, E: Environmental information processing, C: Cellular processes, O: Organismal systems.

Table 3-13. Candidate contigs from differently expressed genes analysis in liver tissues of mud loach exposed to Basta

Contigs	Con_Brain (FPKM)	Exp_Brain (FPKM)	log2(FC)	up/ down	test_stat	p_value	q_value
Exp_Liver_TR25947 c3_g1_i3	2.08392	32869.3	13.9452	up	6.78383	0.0013	0.02161
Exp_Liver_TR20592 c0_g3_i1	4.30351	3307.17	9.58587	up	4.7903	0.0015	0.02161
Exp_Liver_TR33245 c1_g2_i2	1.37955	626.941	8.82799	up	4.59329	0.00235	0.02161
Exp_Liver_TR30645 c0_g1_i3	0.623198	209.886	8.3957	up	4.20744	0.00205	0.02161
Exp_Liver_TR29545 c16_g4_i2	34.0193	6308.22	7.53474	up	3.98567	0.0031	0.02161
Exp_Liver_TR26374 c0_g1_i2	0.550301	78.9245	7.16411	up	3.58999	0.0029	0.02161
Exp_Liver_TR26607 c0_g1_i1	0.793421	73.3298	6.53017	up	3.28469	0.00375	0.02161
Exp_Liver_TR21915 c0_g1_i1	0.785436	65.4535	6.38083	up	3.19392	0.0043	0.02309
Exp_Liver_TR17813 c0_g1_i1	12.7546	2652.32	7.7001	up	4.01526	0.0044	0.023325
Exp_Liver_TR21170 c1_g1_i1	21.9857	1818.15	6.36976	up	3.39457	0.0045	0.02385
Exp_Liver_TR24046 c4_g1_i1	11.2651	1764.28	7.29108	up	3.83979	0.0048	0.025215
Exp_Liver_TR24450 c1_g5_i4	17.4562	2170.15	6.95792	up	3.66878	0.0048	0.025215
Exp_Liver_TR68456 c0_g1_i1	9.39546	1243.02	7.04767	up	3.68314	0.005	0.025454
Exp_Liver_TR22792 c0_g1_i1	3.23341	363.728	6.81366	up	3.58729	0.0051	0.025961
Exp_Liver_TR21359 c0_g1_i1	34.0437	3209.51	6.55882	up	3.49516	0.00515	0.026213
Exp_Liver_TR25745 c0_g2_i1	17.5692	1295.49	6.20431	up	3.3051	0.0053	0.026974
Exp_Liver_TR29094 c9_g3_i1	6.39957	934.402	7.18992	up	3.79339	0.00535	0.026993
Exp_Liver_TR27645 c1_g1_i1	10.2098	908.728	6.47581	up	3.44341	0.00535	0.026993
Exp_Liver_TR32045 c0_g2_i3	9.52875	601.559	5.98028	up	3.18029	0.0059	0.029132
Exp_Liver_TR14911 c0_g1_i1	22.1927	2051.74	6.53062	up	3.41175	0.006	0.029374
Exp_Liver_TR21258 c1_g1_i1	3.40824	995.024	8.18956	up	4.25625	0.00625	0.030529
Exp_Liver_TR35640 c0_g3_i2	0.400957	17.865	5.47755	up	2.73365	0.0065	0.031359
Exp_Liver_TR20666 c0_g1_i1	5.22205	445.135	6.41348	up	3.35905	0.0066	0.031839
Exp_Liver_TR35214 c1_g3_i1	1.67241	135.352	6.33865	up	3.30656	0.0072	0.032351
Exp_Liver_TR26745 c2_g1_i1	19.6662	1481.99	6.23567	up	3.32625	0.0068	0.032351
Exp_Liver_TR33362 c0_g1_i3	1.24649	133.314	6.74081	up	3.49416	0.00765	0.033349
Exp_Liver_TR24945 c1_g1_i2	4.55097	670.639	7.20322	up	3.7325	0.008	0.034393
Exp_Liver_TR35401 c0_g1_i1	0.530296	32.9958	5.95934	up	3.13571	0.0081	0.034673
Exp_Liver_TR35181 c0_g4_i1	0.338507	12.0086	5.14874	up	2.58267	0.0082	0.034673
Exp_Liver_TR26645 c3_g1_i1	2.26566	7115.75	11.6169	up	5.82907	0.012	0.035281
Exp_Liver_TR28745 c1_g8_i1	1.63096	1850.04	10.1476	up	5.13802	0.01285	0.035281
Exp_Liver_TR29546 c1_g1_i2	0.627929	657.635	10.0325	up	5.08019	0.0129	0.035281
Exp_Liver_TR34737 c4_g2_i1	1.45214	562.331	8.59709	up	4.37862	0.01315	0.035281
Exp_Liver_TR175 c0_g1_i1	4.56813	1193.77	8.02971	up	4.10253	0.013	0.035281
Exp_Liver_TR26644 c0_g3_i1	2.79251	466.572	7.38439	up	3.81705	0.0092	0.035281
Exp_Liver_TR6124 c1_g1_i1	12.3653	1022.59	6.36978	up	3.29844	0.0102	0.035281
Exp_Liver_TR28841 c1_g1_i2	2.18895	170.761	6.2856	up	3.26878	0.0084	0.035281
Con_Liver_TR23045 c0_g1_i2	2.6928	184.57	6.09892	up	3.17564	0.00975	0.035281
Exp_Liver_TR25116 c0_g1_i1	2.8403	192.868	6.08543	up	3.18727	0.0097	0.035281
Exp_Liver_TR25081 c0_g1_i1	8.04441	501.051	5.96083	up	3.13726	0.00975	0.035281
Exp_Liver_TR32797 c1_g3_i1	1.95963	120.446	5.94166	up	3.10963	0.0085	0.035281
Exp_Liver_TR22536 c1_g1_i1	5.96783	360.556	5.91687	up	3.05861	0.01235	0.035281
Exp_Liver_TR34510 c2_g1_i1	10.3481	579.319	5.80693	up	3.09766	0.00875	0.035281
Exp_Liver_TR26845 c0_g2_i1	15.6222	768.81	5.62096	up	3.01006	0.0115	0.035281
Exp_Liver_TR33244 c13_g21_i2	6.54843	321.991	5.61973	up	2.95982	0.0104	0.035281

Contigs	Con_Brain (FPKM)	Exp_Brain (FPKM)	log2(FC)	up/ down	test_stat	p_value	q_value
Exp_Liver_TR29342 c0_g2_i1	3.46151	166.294	5.58619	up	2.94232	0.0101	0.035281
Exp_Liver_TR31569 c0_g1_i1	0.400833	18.1343	5.49957	up	2.75722	0.0084	0.035281
Exp_Liver_TR33744 c1_g1_i2	2.22482	92.4238	5.3765	up	2.82263	0.0121	0.035281
Exp_Liver_TR24823 c0_g1_i1	34.9307	1418.28	5.3435	up	2.85021	0.0118	0.035281
Exp_Liver_TR33443 c2_g1_i2	4.41359	176.328	5.32017	up	2.82951	0.0132	0.035281
Exp_Liver_TR29684 c3_g1_i1	9.93038	362.756	5.19101	up	2.77177	0.01275	0.035281
Exp_Liver_TR34632 c0_g2_i1	0.640748	22.0661	5.10593	up	2.56093	0.0084	0.035281
Exp_Liver_TR31930 c1_g1_i2	0.655335	22.063	5.07325	up	2.54433	0.00855	0.035281
Exp_Liver_TR35666 c1_g1_i1	0.273703	8.58444	4.97104	up	2.49214	0.0111	0.035281
Exp_Liver_TR31928 c1_g2_i8	0.827904	23.6139	4.83403	up	2.41917	0.0108	0.035281
Exp_Liver_TR34041 c0_g1_i1	0.459061	13.0772	4.83222	up	2.40696	0.01255	0.035281
Exp_Liver_TR32134 c5_g1_i2	0.500219	13.6491	4.7701	up	2.37806	0.01195	0.035281
Exp_Liver_TR25445 c0_g1_i1	1.90546	754.248	8.62876	up	4.38563	0.01355	0.035482
Exp_Liver_TR27554 c4_g1_i2	2.24243	795.168	8.47005	up	4.21019	0.01345	0.035482
Exp_Liver_TR30045 c1_g4_i2	1.1767	283.125	7.91055	up	4.04522	0.0135	0.035482
Exp_Liver_TR32739 c0_g2_i1	2.08006	304.286	7.19266	up	3.69175	0.01375	0.035543
Exp_Liver_TR31345 c6_g1_i2	0.684787	64.3587	6.55434	up	3.37213	0.0137	0.035543
Exp_Liver_TR28745 c1_g1_i1	2.30631	196.877	6.41556	up	3.28847	0.0138	0.035543
Exp_Liver_TR32945 c3_g1_i1	2.29241	435.363	7.56921	up	3.76378	0.01385	0.03567
Exp_Liver_TR28887 c0_g1_i1	0.623647	117.93	7.56299	up	3.75976	0.0141	0.036309
Exp_Liver_TR25342 c0_g1_i1	2.54069	230.607	6.50408	up	3.33688	0.0141	0.036309
Exp_Liver_TR24845 c0_g2_i1	5.68213	11787.2	11.0185	up	5.43836	0.01415	0.036434
Exp_Liver_TR35007 c1_g6_i2	0.628663	24.3471	5.27532	up	2.74013	0.01415	0.036434
Exp_Liver_TR35766 c14_g30_i1	0.432757	17.686	5.35291	up	2.78131	0.0143	0.036819
Exp_Liver_TR26052 c0_g2_i1	2.88925	127.411	5.46265	up	2.8061	0.01435	0.036946
Exp_Liver_TR33645 c5_g3_i8	12.9927	572.4	5.46126	up	2.83463	0.01445	0.037018
Exp_Liver_TR21204 c3_g5_i1	0.142989	3283.14	14.4869	up	6.96577	0.01495	0.037518
Exp_Liver_TR30120 c0_g1_i2	0.753702	96.5065	7.00049	up	3.48012	0.0151	0.03789
Exp_Liver_TR28333 c0_g1_i1	0.824516	19.9367	4.59574	up	2.28624	0.0151	0.03789
Exp_Liver_TR34845 c0_g1_i1	0.254021	55.8782	7.7812	up	3.87955	0.0152	0.038122
Exp_Liver_TR15141 c0_g1_i1	4.4395	1043.91	7.87739	up	3.9276	0.01525	0.038246
Exp_Liver_TR35630 c0_g2_i1	0.150479	10.1464	6.07527	up	3.0089	0.0153	0.038369
Exp_Liver_TR32047 c4_g4_i4	0.226736	98.2226	8.75889	up	4.34362	0.01535	0.038491
Exp_Liver_TR35260 c16_g17_i1	1.02351	1048	9.99989	up	4.94516	0.0154	0.038611
Exp_Liver_TR33108 c9_g1_i3	0.668879	150.642	7.81517	up	3.89652	0.0154	0.038611
Exp_Liver_TR29350 c0_g1_i2	0.540515	381.039	9.46139	up	4.6692	0.01545	0.038735
Exp_Liver_TR29250 c13_g1_i2	1.13847	4685.86	12.007	up	5.95842	0.01585	0.038897
Exp_Liver_TR30566 c5_g12_i1	1.64054	727.67	8.79297	up	4.36041	0.01565	0.038897
Exp_Liver_TR35838 c9_g4_i4	0.352093	59.9735	7.41222	up	3.69036	0.0156	0.038897
Exp_Liver_TR35840 c2_g4_i1	0.396327	35.6854	6.4925	up	3.31718	0.01585	0.038897
Exp_Liver_TR33853 c18_g11_i4	4.64269	178.535	5.2651	up	2.76285	0.01595	0.038897
Exp_Liver_TR32919 c0_g1_i1	6.98808	266.919	5.25536	up	2.81695	0.0157	0.038897
Exp_Liver_TR29941 c0_g1_i3	0.816032	19.5687	4.58378	up	2.28338	0.01565	0.038897
Exp_Liver_TR35482 c0_g1_i2	0.133541	16.2713	6.9289	up	3.42307	0.0164	0.039372
Exp_Liver_TR35705 c0_g1_i4	0.164498	10.2034	5.95484	up	2.93581	0.0164	0.039372
Exp_Liver_TR35443 c0_g1_i2	0.159479	9.5095	5.89793	up	2.92646	0.0164	0.039372
Exp_Liver_TR27005 c1_g1_i1	0.508499	98.0394	7.59097	up	3.76407	0.01645	0.039487
Exp_Liver_TR32738 c0_g1_i2	0.719753	14.3846	4.32088	up	2.14968	0.01645	0.039487
Exp_Liver_TR34010 c6_g2_i1	0.398696	38.2543	6.58419	up	3.25961	0.0165	0.039602

Contigs	Con_Brain (FPKM)	Exp_Brain (FPKM)	log2(FC)	up/ down	test_stat	p_value	q_value
Exp_Liver_TR29182 c1_g1_i1	0.580711	12.1888	4.39159	up	2.19404	0.0165	0.039602
Exp_Liver_TR24214 c0_g1_i3	0.324918	14.6546	5.49513	up	2.72135	0.0168	0.04032
Exp_Liver_TR35376 c2_g5_i3	2.35687	96.3352	5.35312	up	2.80735	0.01695	0.040677
Exp_Liver_TR31344 c0_g1_i6	1.96736	132.403	6.07253	up	3.10182	0.01705	0.040911
Exp_Liver_TR29663 c4_g2_i5	1.28579	77.952	5.92186	up	2.92604	0.01705	0.040911
Exp_Liver_TR28001 c0_g1_i1	3.45022	112.481	5.02685	up	2.61432	0.01705	0.040911
Exp_Liver_TR34559 c0_g1_i1	0.359013	6.85467	4.25498	up	2.11135	0.01715	0.041148
Exp_Liver_TR34547 c0_g1_i4	2.22852	70.3756	4.98092	up	2.62398	0.0173	0.041504
Exp_Liver_TR33193 c0_g2_i1	0.405886	44.8936	6.78929	up	3.3628	0.0174	0.04162
Exp_Liver_TR27476 c0_g2_i1	1.30117	61.375	5.55977	up	2.85776	0.0174	0.04162
Exp_Liver_TR32388 c0_g1_i1	1.62046	48.3255	4.89831	up	2.53113	0.0178	0.04162
Exp_Liver_TR21260 c1_g1_i1	175.83	5053.32	4.84498	up	2.58105	0.01755	0.04162
Exp_Liver_TR18988 c0_g1_i2	1.36603	134.171	6.61794	up	3.27664	0.01815	0.042196
Exp_Liver_TR24450 c1_g5_i3	63.1242	1832.19	4.85923	up	2.60336	0.0182	0.04231
Exp_Liver_TR35260 c16_g24_i1	41.9784	1421.68	5.08181	up	2.6631	0.01825	0.042425
Exp_Liver_TR31816 c1_g1_i2	0.532905	40.6848	6.25447	up	3.08747	0.01835	0.042652
Exp_Liver_TR32930 c0_g4_i1	0.688083	12.6519	4.20063	up	2.0885	0.0185	0.042999
Exp_Liver_TR28720 c0_g1_i1	0.982622	30.7484	4.96773	up	2.5753	0.0188	0.043669
Exp_Liver_TR34346 c2_g2_i2	0.219852	14.6818	6.06135	up	2.99475	0.01885	0.043782
Exp_Liver_TR34792 c1_g3_i2	0.448828	21.7778	5.60055	up	2.78314	0.01885	0.043782
Exp_Liver_TR33435 c1_g2_i1	0.295017	17.6547	5.90311	up	2.91856	0.0191	0.044359
Exp_Liver_TR23250 c0_g1_i1	5.52348	155.652	4.8166	up	2.56404	0.0195	0.045276
Exp_Liver_TR34871 c2_g2_i2	0.841475	51.216	5.92753	up	2.9308	0.01965	0.045375
Exp_Liver_TR29340 c4_g5_i1	2.99837	177.196	5.88502	up	2.98124	0.02	0.045375
Exp_Liver_TR34743 c0_g1_i3	0.730714	33.9692	5.53878	up	2.73394	0.01985	0.045375
Exp_Liver_TR34252 c0_g1_i2	0.245681	10.9589	5.47917	up	2.72206	0.02045	0.045375
Exp_Liver_TR32345 c4_g1_i1	0.480975	21.4125	5.47635	up	2.77073	0.02035	0.045375
Exp_Liver_TR31390 c0_g1_i1	0.431427	18.007	5.3833	up	2.6639	0.01965	0.045375
Exp_Liver_TR28102 c4_g16_i4	1.00256	41.1164	5.35795	up	2.64208	0.0205	0.045375
Exp_Liver_TR35071 c1_g1_i6	1.0929	42.436	5.27905	up	2.61525	0.02005	0.045375
Exp_Liver_TR31646 c6_g1_i2	1.0217	32.6948	5.00002	up	2.46767	0.02095	0.045375
Exp_Liver_TR35703 c1_g4_i1	0.218752	6.5346	4.90073	up	2.42055	0.02045	0.045375
Exp_Liver_TR35612 c1_g2_i3	0.919331	26.3168	4.83925	up	2.55025	0.02	0.045375
Exp_Liver_TR29946 c0_g1_i1	1.72935	48.3531	4.80531	up	2.51498	0.02075	0.045375
Exp_Liver_TR25744 c0_g1_i1	14.638	363.361	4.63361	up	2.47336	0.02055	0.045375
Exp_Liver_TR34171 c0_g1_i4	0.258363	4.45023	4.10641	up	2.0517	0.0206	0.045375
Exp_Liver_TR33200 c1_g2_i1	0.433943	7.41718	4.09529	up	2.0349	0.02095	0.045375
Exp_Liver_TR33514 c0_g1_i6	0.380386	14.8496	5.28682	up	2.62518	0.0212	0.045586
Exp_Liver_TR24857 c0_g1_i1	1.2734	45.4669	5.15805	up	2.55162	0.0212	0.045586
Exp_Liver_TR35699 c0_g1_i2	0.475254	22.7039	5.5781	up	2.82404	0.0216	0.046347
Exp_Liver_TR21204 c4_g1_i1	0.274663	6303.13	14.4861	up	6.53224	0.02165	0.046448
Exp_Liver_TR33075 c3_g4_i2	0.82934	15820.7	14.2195	up	6.43287	0.02165	0.046448
Exp_Liver_TR24847 c4_g1_i1	0.130647	1471.3	13.4591	up	6.11169	0.02165	0.046448
Exp_Liver_TR27147 c1_g3_i1	0.457596	1194.32	11.3498	up	5.19259	0.02165	0.046448
Exp_Liver_TR24153 c0_g1_i1	2.01503	106.667	5.72617	up	2.89955	0.0217	0.04655
Exp_Liver_TR27554 c4_g1_i1	0.324422	2230.4	12.7471	up	5.8025	0.02175	0.046655
Exp_Liver_TR34635 c11_g3_i1	0.138261	1932.91	13.7711	up	6.24312	0.0218	0.046757
Exp_Liver_TR30608 c0_g1_i2	0.771184	35.6364	5.53013	up	2.7892	0.0218	0.046757
Exp_Liver_TR35164 c0_g1_i4	0.327612	10.7895	5.04149	up	2.49681	0.0218	0.046757

Contigs	Con Brain (FPKM)	Exp Brain (FPKM)	log2(FC)	up/ down	test_stat	p_value	q_value
Exp_Liver_TR27045 c0_g1_i1	0.085628	283.878	11.6949	up	5.35425	0.02185	0.046861
Exp_Liver_TR33160 c0_g1_i1	0.199894	144.607	9.49868	up	4.36129	0.02185	0.046861
Exp_Liver_TR32142 c0_g1_i4	0.151216	108.144	9.48213	up	4.35269	0.0219	0.046966
Exp_Liver_TR35625 c0_g2_i3	0.24603	10.2315	5.37803	up	2.65161	0.02195	0.047072
Exp_Liver_TR32896 c6_g7_i3	0.280775	212.811	9.56594	up	4.39229	0.02205	0.047284
Exp_Liver_TR23146 c0_g1_i1	0.04409	26.6959	9.24197	up	4.23928	0.02215	0.047493
Exp_Liver_TR31442 c0_g1_i1	0.142082	31.1834	7.77791	up	3.55558	0.02215	0.047493
Exp_Liver_TR32273 c3_g2_i2	6.29683	174.735	4.7944	up	2.48794	0.0222	0.047597
Exp_Liver_TR33920 c2_g11_i2	45.3249	1226.03	4.75755	up	2.5428	0.0222	0.047597
Exp_Liver_TR31544 c3_g1_i2	0.531564	14.853	4.80437	up	2.37569	0.0223	0.047804
Exp_Liver_TR33405 c5_g10_i1	0.255217	67.3081	8.04291	up	3.67422	0.02235	0.047909
Exp_Liver_TR30858 c1_g1_i1	0.519227	350.472	9.39872	up	4.30141	0.02255	0.048329
Exp_Liver_TR35837 c4_g3_i1	0.054558	24.4585	8.80833	up	4.03789	0.0226	0.048329
Exp_Liver_TR33216 c9_g1_i1	0.186842	56.0852	8.22965	up	3.77303	0.0226	0.048329
Exp_Liver_TR32944 c2_g1_i2	0.095366	21.0486	7.78604	up	3.55949	0.0226	0.048329
Exp_Liver_TR32408 c1_g2_i3	0.285649	40.1187	7.13389	up	3.60532	0.02255	0.048329
Exp_Liver_TR33428 c1_g1_i3	0.116548	15.2374	7.03054	up	3.21521	0.02275	0.048645
Exp_Liver_TR32691 c0_g4_i3	0.602296	19.6393	5.02713	up	2.56497	0.02275	0.048645
Exp_Liver_TR29399 c0_g1_i1	0.151795	52.671	8.43874	up	3.87051	0.02285	0.048851
Exp_Liver_TR35021 c5_g1_i2	3.30329	419.429	6.98838	up	3.1965	0.02285	0.048851
Exp_Liver_TR27443 c0_g1_i1	0.183386	29.1735	7.31363	up	3.34777	0.0229	0.048919
Exp_Liver_TR29562 c0_g1_i2	0.161136	20.6764	7.00356	up	3.2034	0.02295	0.049022
Exp_Liver_TR34281 c0_g1_i7	0.358527	11.6107	5.01723	up	2.4693	0.02295	0.049022
Exp_Liver_TR24644 c0_g1_i1	2.23873	84.7262	5.24205	up	2.65199	0.023	0.049127
Exp_Liver_TR28645 c17_g10_i2	1.46022	34.6769	4.56972	up	2.40763	0.02305	0.049232
Exp_Liver_TR34544 c0_g4_i2	0.189263	24.8124	7.03452	up	3.21669	0.0231	0.049333
Exp_Liver_TR32528 c6_g4_i1	11.4662	297.682	4.69831	up	2.4733	0.0231	0.049333
Exp_Liver_TR32655 c2_g8_i3	2.6101	64.788	4.63355	up	2.39313	0.0231	0.049333
Exp_Liver_TR35205 c0_g1_i1	0.038261	9.2578	7.91864	up	3.61652	0.02315	0.049434
Exp_Liver_TR25856 c1_g1_i1	0.433507	99.1198	7.83697	up	3.94254	0.02315	0.049434
Exp_Liver_TR32169 c0_g1_i3	0.132139	19.4406	7.20087	up	3.29185	0.02315	0.049434
Exp_Liver_TR34205 c1_g2_i8	0.114908	24.487	7.7354	up	3.54371	0.0232	0.049537
Exp_Liver_TR26509 c0_g1_i1	1.07204	118.337	6.7864	up	3.43541	0.0232	0.049537
Exp_Liver_TR31976 c1_g1_i5	0.540329	16.1413	4.90078	up	2.43031	0.02325	0.049642
Exp_Liver_TR33074 c3_g1_i1	0.152546	13.2328	6.43874	up	2.93932	0.0233	0.049747
Exp_Liver_TR35629 c1_g2_i4	0.083591	16.7125	7.64337	up	3.49977	0.02335	0.04985
Exp_Liver_TR35562 c2_g2_i2	0.208593	5.95591	4.83556	up	2.39144	0.0234	0.049955
Con_Liver_TR20826 c6_g8_i1	29942.4	395.991	-6.24058	down	-3.28773	0.0036	0.02161
Con_Liver_TR20826 c6_g3_i1	5412.38	56.4838	-6.58228	down	-3.49439	0.00375	0.02161
Con_Liver_TR15881 c1_g1_i1	1831.54	12.1141	-7.24022	down	-3.80951	0.00295	0.02161
Con_Liver_TR18426 c2_g4_i1	11117.6	37.704	-8.20391	down	-4.26133	0.0031	0.02161
Con_Liver_TR4615 c0_g1_i1	115.418	1.91196	-5.91567	down	-2.94663	0.00445	0.023588
Con_Liver_TR19707 c0_g1_i1	179.261	2.11151	-6.40764	down	-3.36706	0.0062	0.030288
Con_Liver_TR41421 c0_g1_i1	606.258	1.28653	-8.8803	down	-4.4284	0.007	0.032351
Con_Liver_TR22987 c6_g9_i1	3186.31	1.72983	-10.847	down	-4.77002	0.0077	0.033564
Con_Liver_TR19326 c2_g4_i1	2041.66	1.33244	-10.5815	down	-4.65548	0.00785	0.033839
Con_Liver_TR22416 c1_g1_i1	10.3828	0.389202	-4.73753	down	-2.35506	0.01115	0.035281
Con_Liver_TR15773 c0_g1_i1	6.63205	0.176697	-5.2301	down	-2.27116	0.013	0.035281
Con_Liver_TR22941 c4_g1_i1	74.0621	1.6836	-5.45911	down	-2.87403	0.01325	0.035281

Contigs	Con_Brain (FPKM)	Exp_Brain (FPKM)	log2(FC)	up/ down	test_stat	p_value	q_value
Con_Liver_TR20776 c0_g1_i1	126.475	2.87136	-5.46097	down	-2.88941	0.01125	0.035281
Con_Liver_TR3791 c0_g2_i1	9234.99	204.549	-5.49659	down	-2.90927	0.01015	0.035281
Con_Liver_TR5949 c0_g1_i1	99.7776	1.95821	-5.67111	down	-2.46976	0.0129	0.035281
Con_Liver_TR23429 c1_g1_i1	20053.6	384.758	-5.70376	down	-3.01094	0.00835	0.035281
Con_Liver_TR22438 c0_g1_i1	3.9126	0.074498	-5.71479	down	-2.48967	0.01255	0.035281
Con_Liver_TR12593 c0_g2_i1	12.8641	0.231863	-5.79393	down	-2.52532	0.0123	0.035281
Con_Liver_TR23334 c1_g1_i6	9.1943	0.16212	-5.82561	down	-2.53717	0.01255	0.035281
Con_Liver_TR20023 c0_g1_i1	10.6385	0.182207	-5.86757	down	-2.55616	0.0114	0.035281
Con_Liver_TR10293 c0_g2_i1	8.53669	0.13559	-5.97636	down	-2.60567	0.01165	0.035281
Con_Liver_TR18766 c0_g2_i2	3.9386	0.057621	-6.09494	down	-2.65398	0.0109	0.035281
Con_Liver_TR14652 c0_g1_i2	4.18865	0.057428	-6.18859	down	-2.7032	0.0101	0.035281
Con_Liver_TR12197 c0_g1_i1	23.7576	0.309398	-6.26278	down	-2.73658	0.0123	0.035281
Con_Liver_TR13803 c0_g1_i1	3.29522	0.042283	-6.28417	down	-2.74505	0.0101	0.035281
Con_Liver_TR15118 c1_g1_i1	8.56936	0.100765	-6.41012	down	-2.80293	0.011	0.035281
Con_Liver_TR22920 c0_g1_i1	9.38377	0.107185	-6.45199	down	-2.82177	0.0117	0.035281
Con_Liver_TR18991 c0_g1_i1	20.8006	0.226656	-6.51997	down	-2.85234	0.00905	0.035281
Con_Liver_TR16494 c1_g1_i2	44.2029	0.478874	-6.52835	down	-2.85607	0.0102	0.035281
Con_Liver_TR21563 c0_g1_i1	39.7335	0.403828	-6.62047	down	-3.41112	0.01025	0.035281
Con_Liver_TR22472 c0_g1_i1	8.03439	0.075001	-6.74314	down	-2.94396	0.01095	0.035281
Con_Liver_TR22426 c10_g1_i6	24.5191	0.209942	-6.86778	down	-3.0086	0.00895	0.035281
Con_Liver_TR21465 c4_g2_i1	261.666	2.06395	-6.98618	down	-3.56603	0.0132	0.035281
Con_Liver_TR23017 c0_g1_i3	10.0514	0.067174	-7.22529	down	-3.16538	0.00975	0.035281
Con_Liver_TR16400 c0_g2_i1	48.5246	0.315106	-7.26674	down	-3.18499	0.0093	0.035281
Con_Liver_TR287 c0_g1_i1	100.238	0.521609	-7.58625	down	-3.3239	0.0092	0.035281
Con_Liver_TR22447 c0_g1_i2	33.0925	0.447952	-6.20701	down	-3.16118	0.0135	0.035482
Con_Liver_TR19746 c0_g1_i1	5.43386	0.098748	-5.78208	down	-2.5176	0.01395	0.035926
Con_Liver_TR18694 c1_g2_i2	7.9363	0.213782	-5.21425	down	-2.25909	0.01455	0.037018
Con_Liver_TR21726 c7_g1_i3	2.51758	0.05922	-5.40982	down	-2.35128	0.01505	0.037767
Con_Liver_TR19339 c0_g1_i3	4.89465	0.121031	-5.33776	down	-2.31967	0.01515	0.038013
Con_Liver_TR12203 c0_g1_i2	589.827	12.1321	-5.60339	down	-2.84226	0.01535	0.038491
Con_Liver_TR23192 c0_g2_i1	21.4502	0.603819	-5.15073	down	-2.23535	0.0154	0.038611
Con_Liver_TR14178 c0_g1_i1	12.8366	0.409923	-4.96877	down	-2.15323	0.0157	0.038897
Con_Liver_TR23257 c6_g6_i1	2.92568	0.086649	-5.07745	down	-2.20178	0.01595	0.038897
Con_Liver_TR20559 c0_g1_i2	2.98155	0.088303	-5.07746	down	-2.20179	0.01595	0.038897
Con_Liver_TR23277 c2_g8_i9	25.4751	0.634852	-5.32653	down	-2.31076	0.0156	0.038897
Con_Liver_TR19526 c8_g1_i1	3235.87	24.9644	-7.01814	down	-3.59329	0.01555	0.038897
Con_Liver_TR7572 c0_g1_i1	54.312	1.91905	-4.82281	down	-2.39407	0.01645	0.039487
Con_Liver_TR13852 c0_g1_i2	19.8808	0.428926	-5.5345	down	-2.40835	0.0165	0.039602
Con_Liver_TR20947 c9_g1_i1	179.706	5.83704	-4.94426	down	-2.58435	0.01695	0.040677
Con_Liver_TR21792 c1_g1_i1	4.08666	0.124074	-5.04165	down	-2.18619	0.0171	0.04103
Con_Liver_TR13615 c0_g1_i2	12.8754	0.422399	-4.92986	down	-2.13562	0.0173	0.041504
Con_Liver_TR22060 c0_g1_i1	9.972	0.401676	-4.63378	down	-2.30059	0.018	0.04185
Con_Liver_TR22421 c5_g2_i2	18.9272	0.300715	-5.97592	down	-2.95411	0.01815	0.042196
Con_Liver_TR20953 c0_g1_i2	70.2125	2.26396	-4.95481	down	-2.60152	0.01835	0.042652
Con_Liver_TR19526 c7_g4_i1	89.7457	0.838985	-6.74105	down	-3.42306	0.01835	0.042652
Con_Liver_TR22426 c9_g1_i1	11.5618	0.587542	-4.29854	down	-2.13386	0.01865	0.043324
Con_Liver_TR21938 c3_g3_i1	32.349	0.815528	-5.30984	down	-2.72569	0.0188	0.043669
Con_Liver_TR19684 c0_g1_i6	3.37749	0.115732	-4.86709	down	-2.10366	0.01905	0.044244

Contigs	Con_Brain (FPKM)	Exp_Brain (FPKM)	log2(FC)	up/ down	test_stat	p_value	q_value
Con_Liver_TR15309 c0_g1_i1	6.10583	0.261334	-4.54622	down	-1.96227	0.01925	0.044705
Con_Liver_TR19172 c0_g2_i1	3.59293	0.148562	-4.59603	down	-1.98477	0.01945	0.045162
Con_Liver_TR54112 c0_g1_i1	4.20368	0.173793	-4.59621	down	-1.98485	0.01945	0.045162
Con_Liver_TR21521 c0_g1_i1	4.62783	0.191312	-4.59634	down	-1.9849	0.01945	0.045162
Con_Liver_TR5343 c0_g1_i1	5.22739	0.21607	-4.59652	down	-1.98498	0.01945	0.045162
Con_Liver_TR23006 c3_g1_i3	6.49163	0.324463	-4.32245	down	-2.13521	0.0204	0.045375
Con_Liver_TR19828 c0_g1_i3	2.29331	0.107862	-4.41018	down	-1.90071	0.02095	0.045375
Con_Liver_TR10089 c0_g2_i1	2.4518	0.115312	-4.41023	down	-1.90073	0.02095	0.045375
Con_Liver_TR15985 c0_g7_i1	18.7222	0.877163	-4.41576	down	-1.90311	0.02095	0.045375
Con_Liver_TR22464 c0_g2_i1	2.00686	0.089154	-4.4925	down	-1.93796	0.0201	0.045375
Con_Liver_TR22533 c6_g2_i3	11.2887	0.500455	-4.49549	down	-1.93925	0.0201	0.045375
Con_Liver_TR55399 c0_g1_i1	24.8732	1.07942	-4.52627	down	-1.95299	0.02	0.045375
Con_Liver_TR20376 c0_g1_i3	1.45743	0.061346	-4.5703	down	-1.97109	0.01955	0.045375
Con_Liver_TR10915 c0_g4_i1	6.48222	0.272561	-4.57184	down	-1.97176	0.01955	0.045375
Con_Liver_TR14969 c0_g1_i1	4.55444	0.185092	-4.62095	down	-1.99603	0.0208	0.045375
Con_Liver_TR22533 c6_g18_i1	15.053	0.610451	-4.62403	down	-1.99736	0.0208	0.045375
Con_Liver_TR1138 c0_g2_i1	12.7738	0.509641	-4.64756	down	-2.00584	0.0198	0.045375
Con_Liver_TR9141 c0_g1_i1	1.78007	0.068882	-4.69166	down	-2.02544	0.0196	0.045375
Con_Liver_TR35617 c0_g1_i1	7.41542	0.286634	-4.69325	down	-2.02612	0.0196	0.045375
Con_Liver_TR13852 c0_g1_i3	11.6456	0.449777	-4.69443	down	-2.02663	0.0196	0.045375
Con_Liver_TR20119 c2_g4_i2	26.0325	1.0026	-4.69849	down	-2.02839	0.0196	0.045375
Con_Liver_TR22478 c1_g2_i5	2.26381	0.083552	-4.75994	down	-2.05744	0.0201	0.045375
Con_Liver_TR20826 c6_g9_i1	7216.91	13.1353	-9.10179	down	-4.57748	0.0215	0.046223
Con_Liver_TR22926 c17_g1_i5	47.7957	1.49475	-4.99891	down	-2.631	0.01995	0.045375
Con_Liver_TR255 c0_g1_i1	85.4762	2.54901	-5.06751	down	-2.60573	0.021	0.045375
Con_Liver_TR13991 c0_g1_i1	97.3949	2.62881	-5.21137	down	-2.67688	0.02075	0.045375
Con_Liver_TR16528 c0_g1_i1	3.32821	0.153491	-4.43852	down	-1.91357	0.02135	0.045907
Con_Liver_TR12418 c0_g1_i1	4.93831	0.251849	-4.29339	down	-1.84794	0.02145	0.046119
Con_Liver_TR22126 c5_g11_i1	5.74768	0.293065	-4.29369	down	-1.84807	0.02145	0.046119
Con_Liver_TR53744 c0_g1_i1	1.77018	0.090351	-4.29221	down	-1.84744	0.0215	0.046223
Con_Liver_TR20095 c0_g1_i2	2.27807	0.103104	-4.46564	down	-1.92579	0.0217	0.04655
Con_Liver_TR18847 c0_g1_i6	3.43258	0.155316	-4.46602	down	-1.92596	0.0217	0.04655
Con_Liver_TR23116 c5_g12_i6	43.6999	1.69571	-4.68767	down	-2.4491	0.02215	0.047493
Con_Liver_TR15189 c0_g2_i1	3.42277	0.164157	-4.38202	down	-1.88622	0.02225	0.0477
Con_Liver_TR23064 c1_g1_i1	4.43296	0.212554	-4.38237	down	-1.88637	0.02225	0.0477
Con_Liver_TR12081 c0_g1_i1	80.8112	3.93182	-4.36129	down	-2.16222	0.0223	0.047804
Con_Liver_TR15846 c0_g1_i1	49.5617	1.76008	-4.81551	down	-2.46802	0.0227	0.048541
Con_Liver_TR20826 c6_g1_i1	765.989	18.0484	-5.40738	down	-2.73166	0.0228	0.04875
Con_Liver_TR19526 c7_g12_i5	744.723	30.7203	-4.59944	down	-2.45774	0.02285	0.048851
Con_Liver_TR22412 c0_g1_i1	9.61686	0.327896	-4.87425	down	-2.47373	0.02335	0.04985

(2) Blast2GO 분석을 통한 annotation

(가) Blast2GO 분석

Contig들은 KEGG pathway mapping, Blast2GO에 의한 gene ontology 분석 그리고 Blast 검색에 의한 유전자의 annotation에 사용되어 각 조직의 대조군과 실험군의 metabolism pathway와 각 유전자의 예측 및 기능적 차이를 분석하였다. 또한 이들 contigs를 DEG 분석의 reference 서열 구축에 활용하였으며, 그 결과 각 조직에 대한 대조군과 실험군의 unigene contigs를 취합한 reference로부터 DEG 분석을 위한 mapping rate는 72.0~87.4%였으며, 모든 조직의 실험군과 대조군의 unigene contigs를 취합한 reference로부터 DEG 분석을 위한 mapping rate는 73.2~88.9%를 보였다.

(나) GO distribution by level 2

BLAST2GO software를 통해 GO분석 결과 뇌 조직에서 64,882개 unigenes 중 ≤ 300 bp에서 8,120개, 300-1,000 bp에서 25,820개, $\geq 1,000$ bp에서 30,882개의 GO terms 결과를 얻었다,

GO 분석결과 term group 중 결과를 살펴보면 3개의 카테고리 biological process, cellular component, molecular function으로 분류하였으며, 뇌 조직에서 biological process 카테고리에서 27 groups을 가지며 249,257개(50.2%)로 가장 많았으며, molecular function 카테고리에서 17 group 76,444개(15.4%), cellular component에서 20 groups, 170,784개(34.4%)가 확인되었다. 주요 그룹은 cellular process (GO:000987)가 38,957개(15.63%), single - organism process (GO:0044699)가 31,952개(12.82%), metabolic process (GO:0008152)가 27,419개(11%) 순으로 확인되었다(Fig. 3-21).

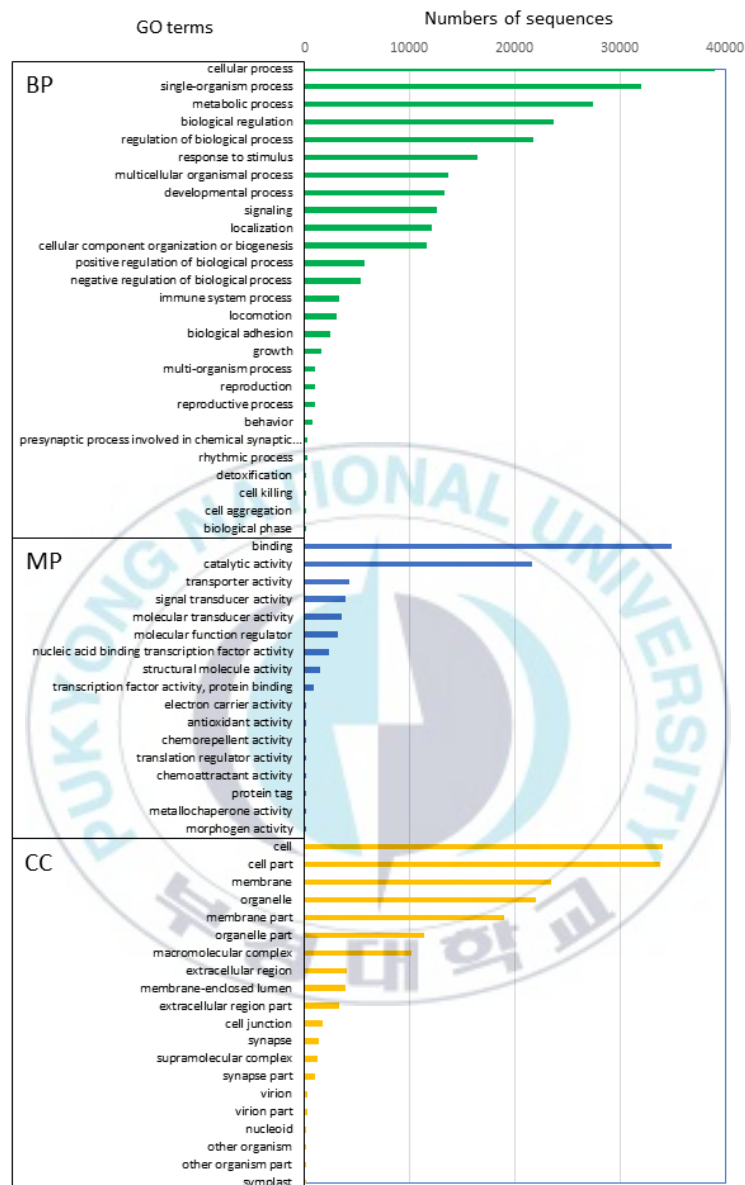


Fig. 3-21. The top 20 most enriched GO-terms in Brain. Gene Ontology (GO) annotation associated with the Basta - exposed brain tissue of transcriptome of *Misgurnus mizolepis*. Horizontal axis show the GO terms in the next level of the three main GO classification, the vertical axis show the number of the genes annotated in the term, the sub-term and the ratio between this number and the total number of annotated genes. From left to right are the GO three main classifications; biological process, molecular function and cellular component.

Biological process 카테고리에서 sequence distribution 상위 50을 차지하는 것 중 regulation of transcription, DNA-templated 가 가장 높게 확인되었으며, oxidation-reduction process와 transcription, DNA-templated가 다음으로 확인되었다(Fig. 3-22).

Molecular function 카테고리에서 sequence distribution 상위 50을 차지하는 것 중 ATP binding 관련 sequence가 가장 높게 확인되었으며, metal ion binding, zinc ion binding 순으로 확인되었다(Fig. 3-23).

Cellular component 카테고리에서 integral component of membrane이 가장 높게 나타났으며, nucleus, cytoplasm 순으로 확인되었다(Fig. 3-24).

GO분석 결과 대조군의 아가미 조직에서 52,693개 unigenes 중 ≤ 300 bp에서 8,879개, 300-1,000 bp에서 24,816개, $\geq 1,000$ bp에서 18,998개의 GO terms 결과를 얻었다. GO terms 결과를 살펴보면 3개의 카테고리 biological process, cellular component, molecular function으로 분류하였으며, 아가미 조직 biological process 카테고리에서 27 group을 가지며 204,380개(49.7%) molecular function 카테고리에서 17 group을 가지며 63,617개(15.5%), cellular component에서 19group을 가지며 143,088개(34.8%)가 확인되었다. Biological process에서 cellular process(GO:000987)가 32,341개(15.82%), single-organism process (GO:0044699)가 25,929개(12.69%), metabolic process (GO:0008152)가 23,755개(11.62%) 순으로 확인되었다.

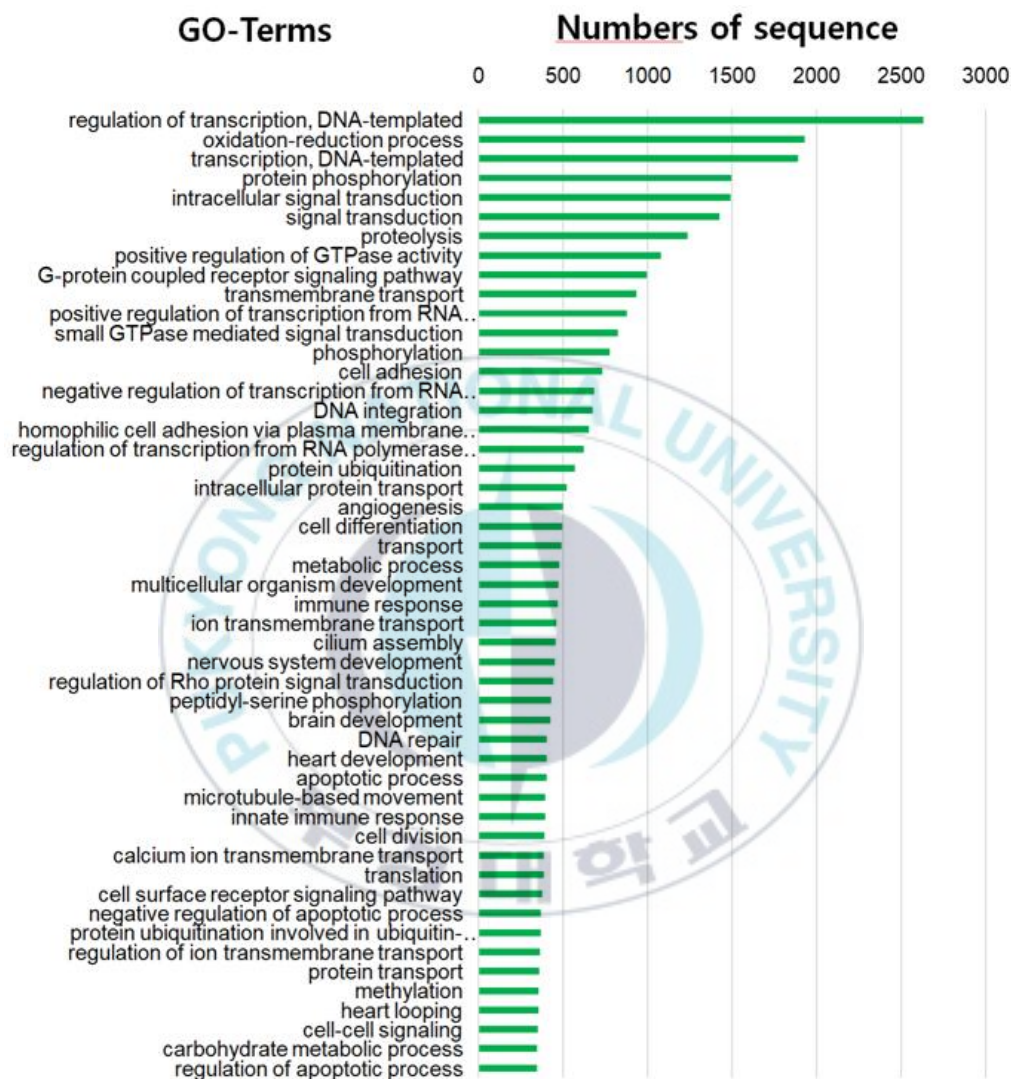


Fig. 3-22. The top 50 most enriched GO-terms of biological process in Brain. The x-axis is the corresponding number of sequence and y-axis is sequence distribution of biological process.

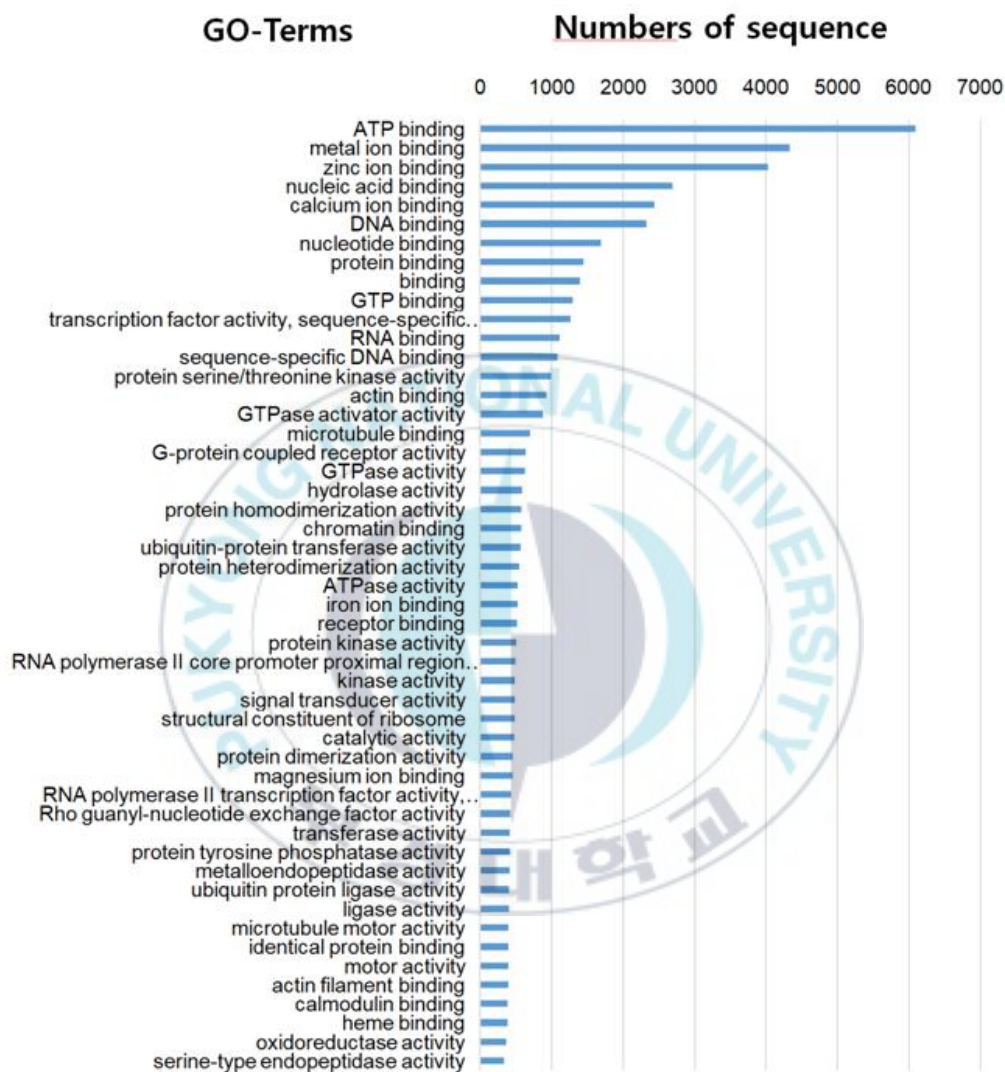


Fig. 3-23. The top 50 most enriched GO-terms of molecular function in brain. The x-axis is the corresponding number of sequence and y-axis is sequence distribution of molecular function.

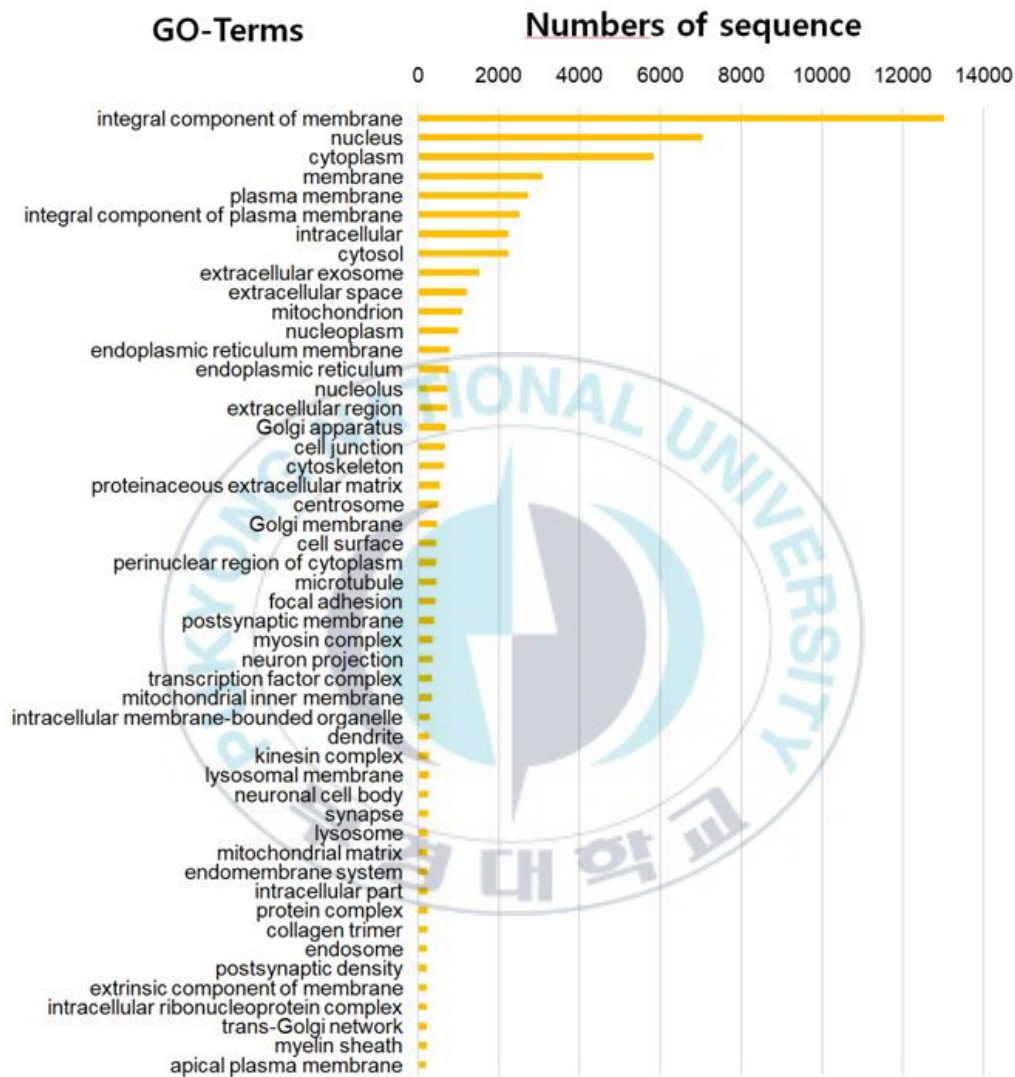


Fig. 3-24. The top 50 most enriched GO-terms of cellular component in brain. The x-axis is the corresponding number of sequence and y-axis is top 50 sequence distribution of cellular component.

Molecular function 카테고리에서 binding group (GO:0005488)은 29,255개 (45.99%), catalytic activity group (GO:0003824)은 18,943개(29.78%), transporter activity group (GO:0005215)은 2,831개(4%) 순으로 나타났다. Cellular component 카테고리에서 cell group (GO:0005623)은 28,864개 (20.17%), cell part group (GO:0044464)은 28,752개(20.09%), organelle group (GO:0043226)은 19,817개(13.85%) 순으로 나타났다(Fig. 3-25).

Biological process 카테고리에서 sequence distribution 상위 50을 차지하는 것 중 regulation of transcription과 DNA-templated가 가장 높게 확인되었으며, oxidation-reduction process와 transcription, DNA-templated가 다음으로 확인되었다(Fig. 3-26).

Molecular function 카테고리에서 sequence distribution 상위 50을 차지하는 것 중 ATP binding 관련 sequence가 가장 높게 확인되었으며, 뇌 조직과 달리 아가미 조직에서는 metal ion binding, zinc ion binding, DNA binding 순으로 확인되었다(Fig. 3-27).

Cellular component 카테고리에서 integral component of membrane이 가장 높게 나타났으며, nucleus, cytoplasm, membrane 순으로 확인되었다(Fig. 3-28).

GO분석 결과 간 조직에서 64,288개 unigenes 중 ≤ 300 bp 에서 9,801개, 300-1,000 bp에서 29,869개, $\geq 1,000$ bp에서 24,618개의 GO terms 결과를 얻었다. GO terms 결과를 살펴보면 3개의 카테고리 biological process, cellular component, molecular function으로 분류하였으며, 간 조직에서 biological process 카테고리에서 27 group으로 220,120개(50.2%), molecular function 카테고리에서 16 group으로 67,778개(15.4%), cellular component에서 19 group으로 150,867개(34.4%)가 확인되었다.

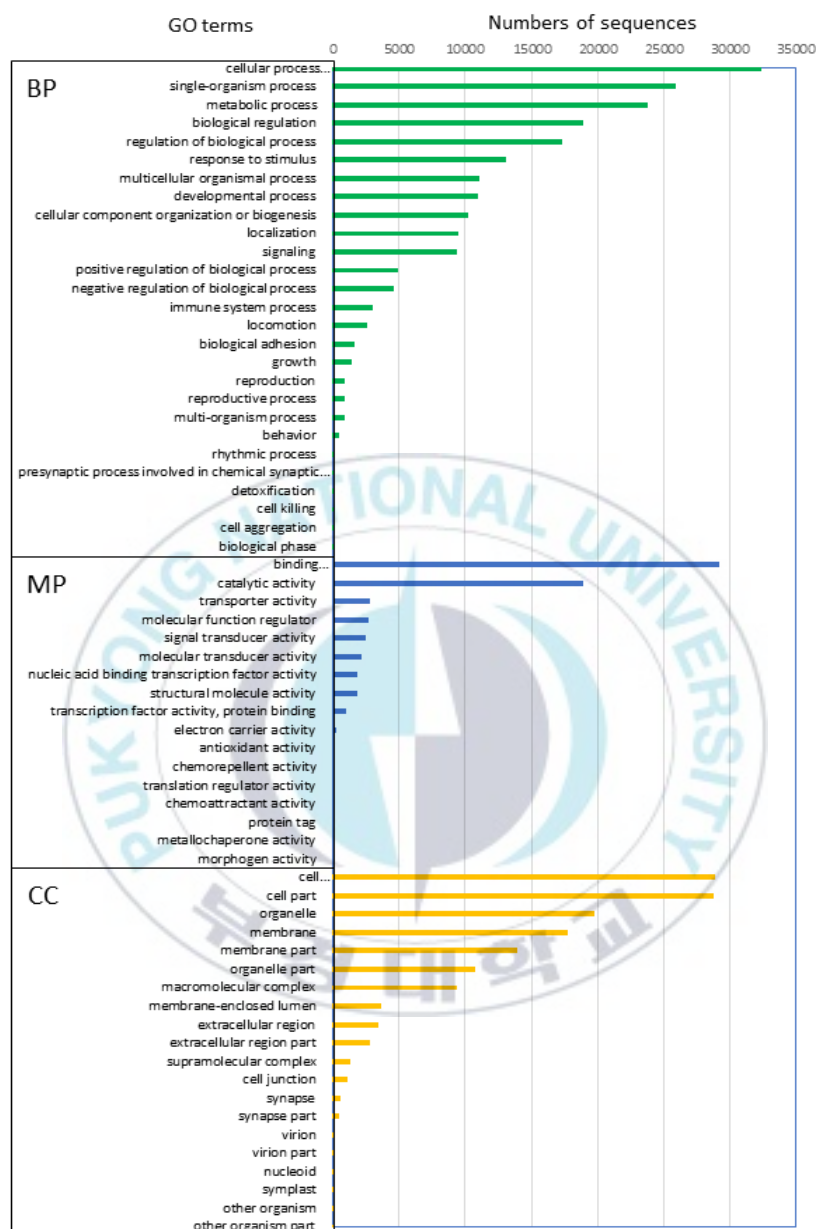


Fig. 3-25. The top 20 most enriched GO-terms in gill. Gene Ontology (GO) annotation associated with the Basta - exposed gill tissue of transcriptome of *Misgurnus mizolepis*. Horizontal axis show the GO terms in the next level of the three main GO classification, the vertical axis show the number of the genes annotated in the term, the sub-term and the ratio between this number and the total number of annotated genes. From left to right are the GO three main classifications; biological process, molecular function and cellular component.

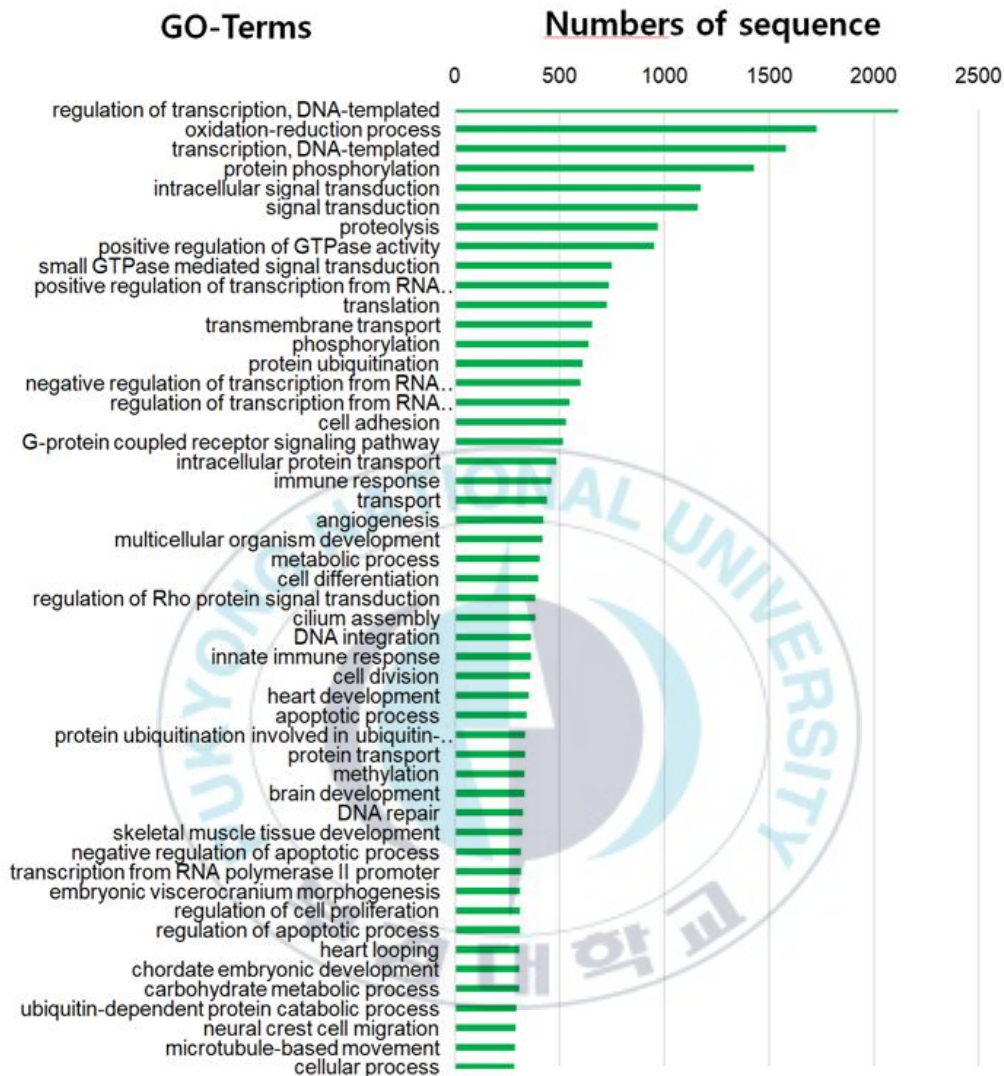


Fig. 3-26. The top 50 most enriched GO-terms of biological process in gill. The x-axis is the corresponding number of sequence and y-axis is sequence distribution of biological process.

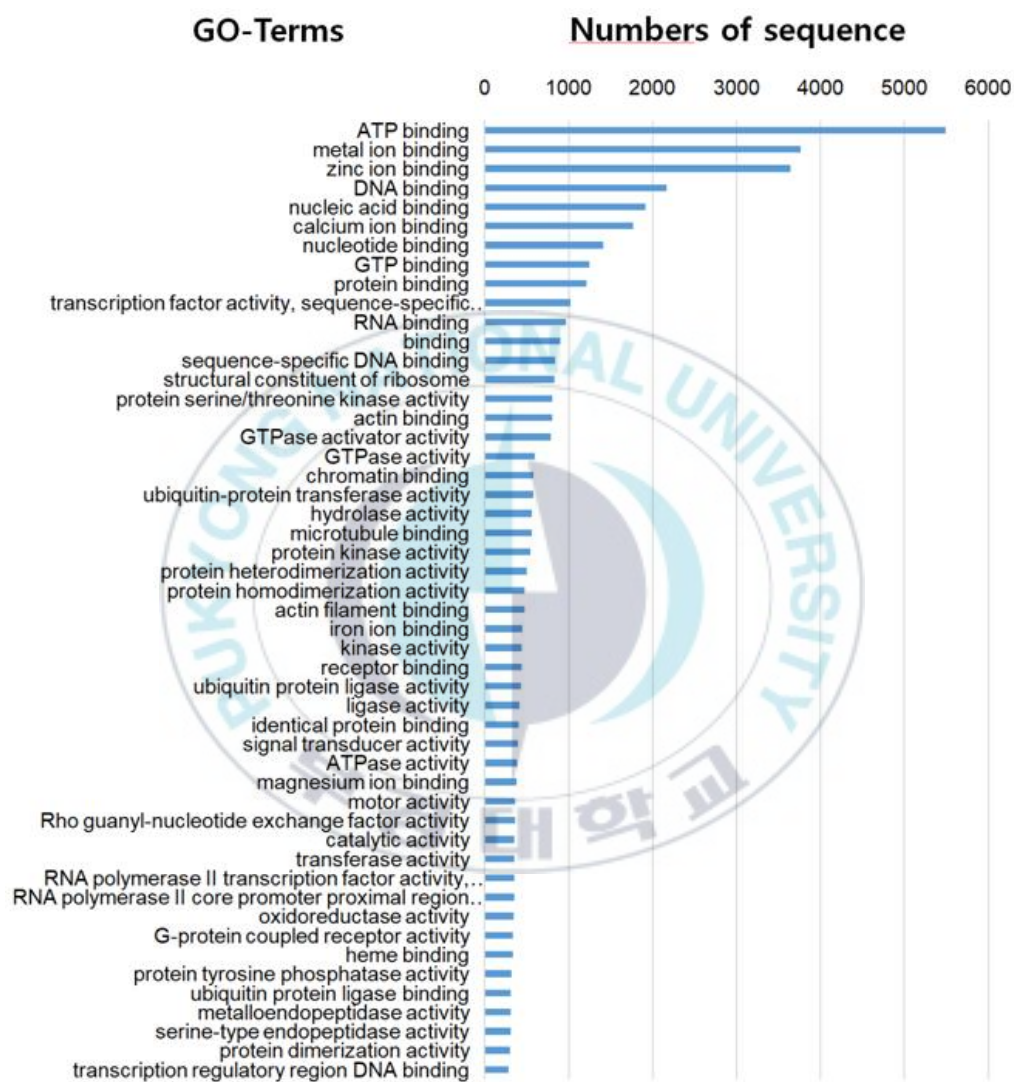


Fig. 3-27. The top 50 most enriched GO-terms of molecular function in gill. The x-axis is the corresponding number of sequence and y-axis is sequence distribution of molecular function.

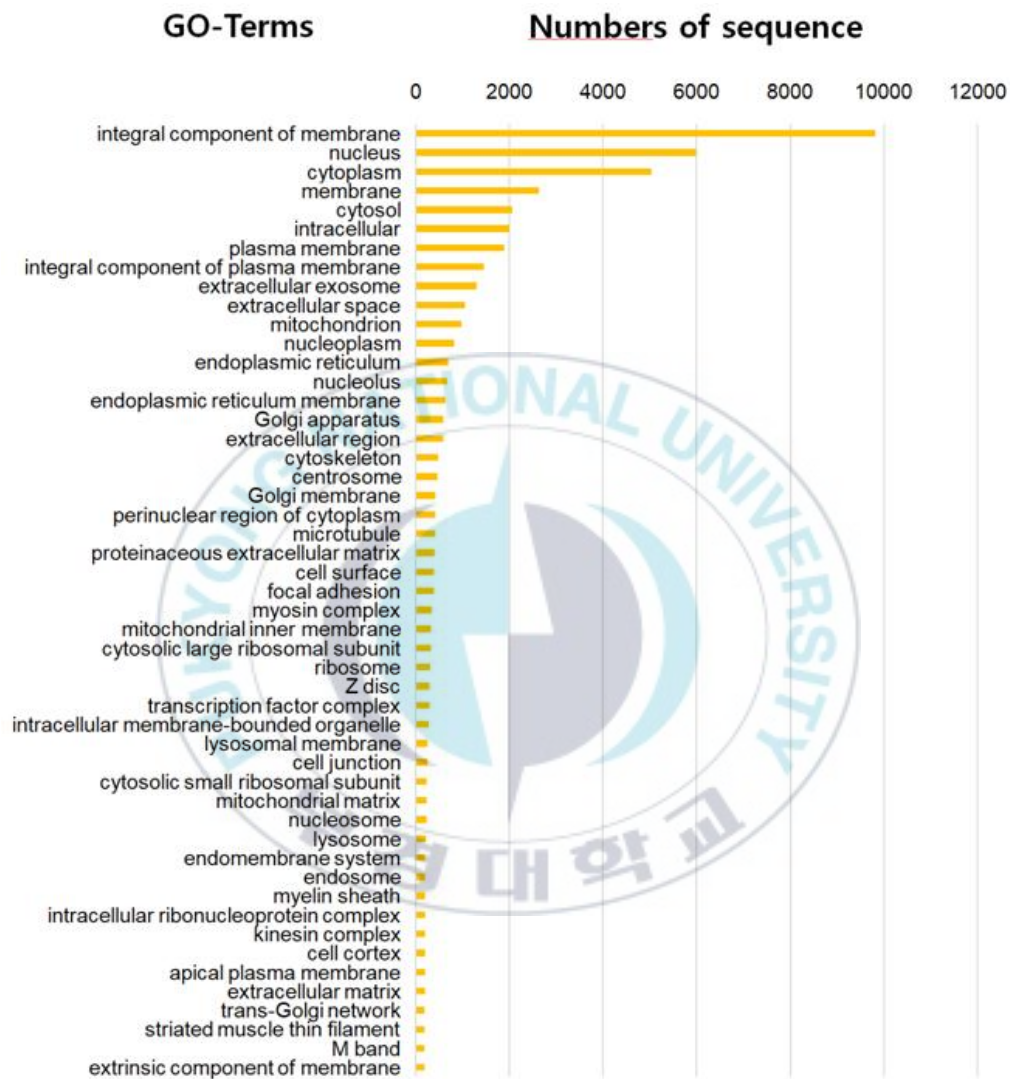


Fig. 3-28. The top 50 most enriched GO-terms of cellular component in gill. The x-axis is the corresponding number of sequence and y-axis is sequence distribution of cellular component.

Biological process에서 cellular process (GO:0009987)가 34,711개(15.77%), single-organism process (GO:0044699)가 28,453개(12.93%), metabolic process (GO:0008152)가 26,991개(12.26%) 순으로 확인되었다.

Molecular function 카테고리에서 binding group (GO:0005488)은 31,119개 (45.91%), catalytic activity group (GO:0003824)은 21,234개(31.33%), molecular function regulator group (GO:0098772)은 3,234개(4.8%) 순으로 나타났다. Cellular component 카테고리에서 cell group (GO:0005623)은 30,429개 (20.2%), cell part group (GO:0044464)은 30,308개(20.1%), organelle group (GO:0043226)은 20,852개(13.8%) 순으로 나타났다(Fig. 3-29).

Biological process 카테고리에서 sequence Distribution 상위 50을 차지하는 것 중 oxidation-reduction process가 가장 높게 확인되었으며, regulation of transcription, DNA-templated와 transcription, DNA-templated가 다음으로 확인되었다(Fig. 3-30).

Molecular function 카테고리에서 sequence distribution 상위 50을 차지하는 것 중 ATP binding 관련 sequence가 가장 높게 확인되었으며, 뇌 조직과 아가미 조직에서와 달리 간 조직에서 zinc ion binding, metal ion binding, nucleic acid binding 순으로 확인되었다(Fig. 3-31).

Cellular component 카테고리에서 integral component of membrane이 가장 높게 나타났으며, nucleus, cytoplasm, membrane 순으로 확인되었다(Fig. 3-32).

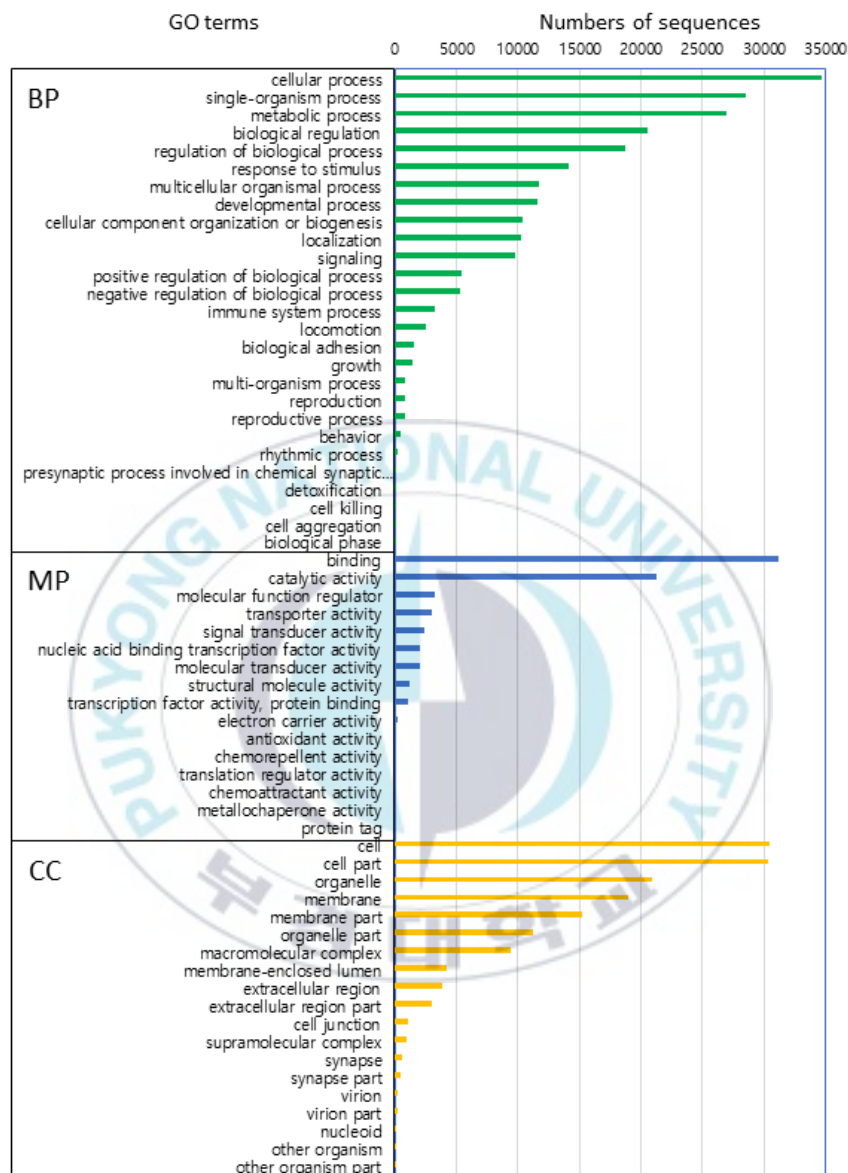


Fig. 3-29. The top 20 most enriched GO-terms in liver. Gene Ontology (GO) annotation associated with the Basta - exposed liver tissue of transcriptome of *Misgurnus mizolepis*. Horizontal axis show the GO terms in the next level of the three main GO classification, the vertical axis show the number of the genes annotated in the term, the sub-term and the ratio between this number and the total number of annotated genes. From left to right are the GO three main classifications; biological process, molecular function and cellular component.

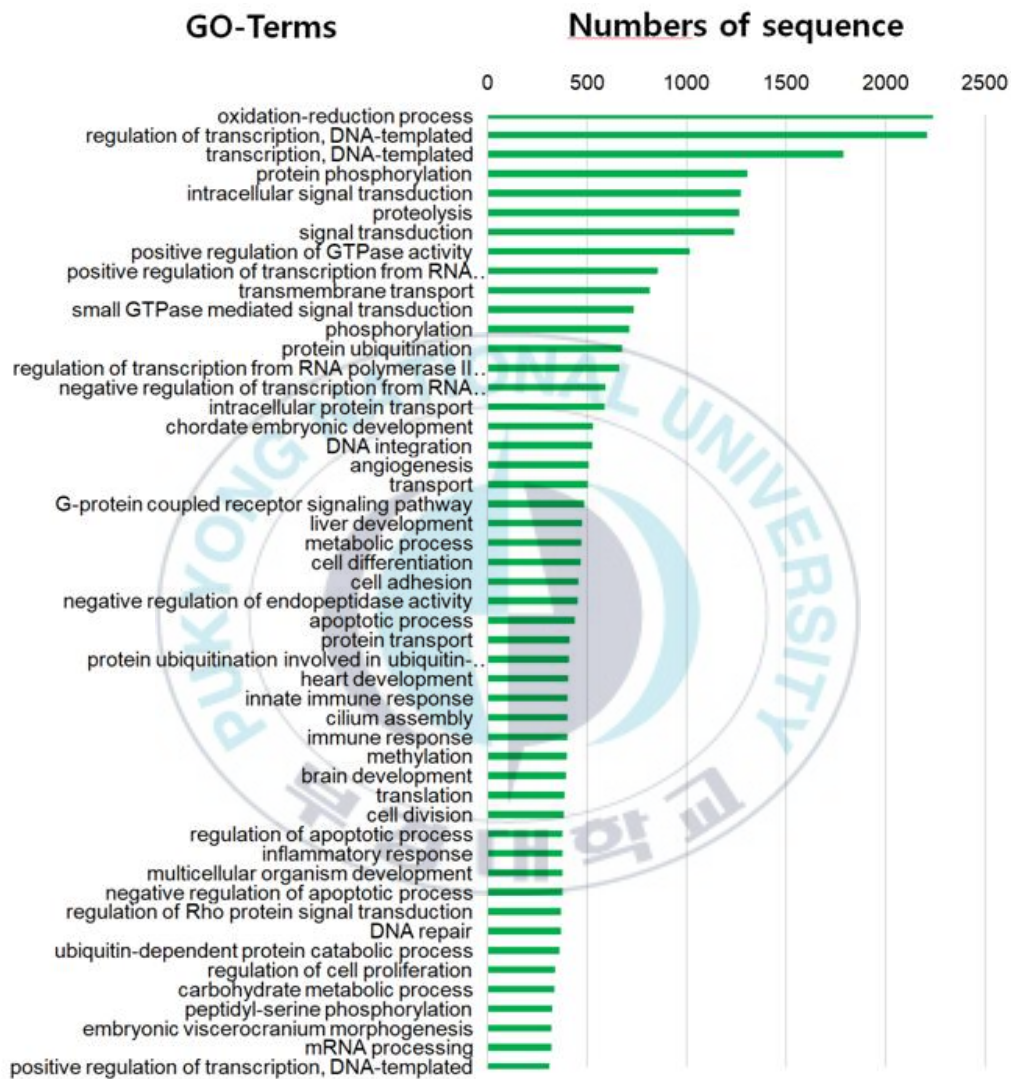


Fig. 3-30. The top 50 most enriched GO-terms of biological process in liver. The x-axis is the corresponding number of sequence and y-axis is sequence distribution of biological process.

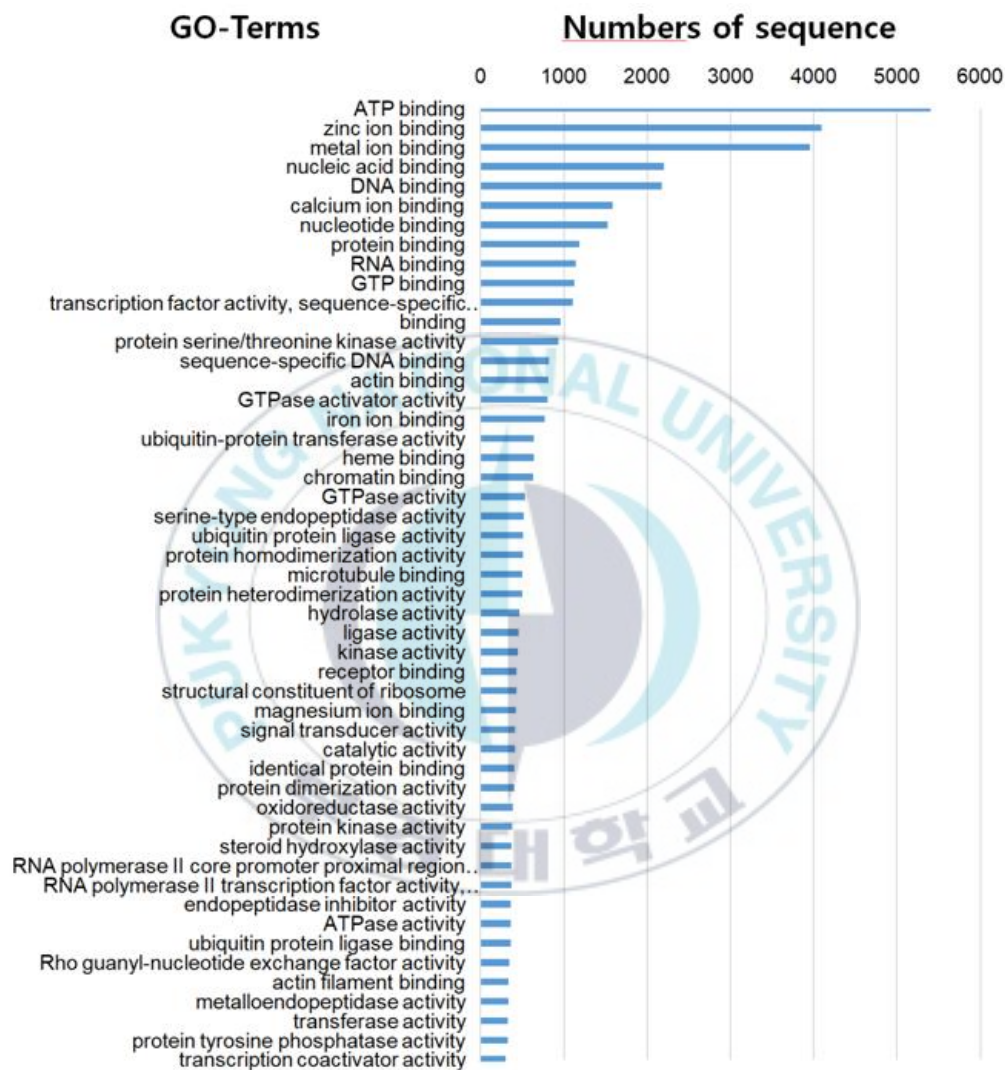


Fig. 3-31. The top 50 most enriched GO-terms of molecular function in liver. The x-axis is the corresponding number of sequence and y-axis is sequence distribution of molecular function.

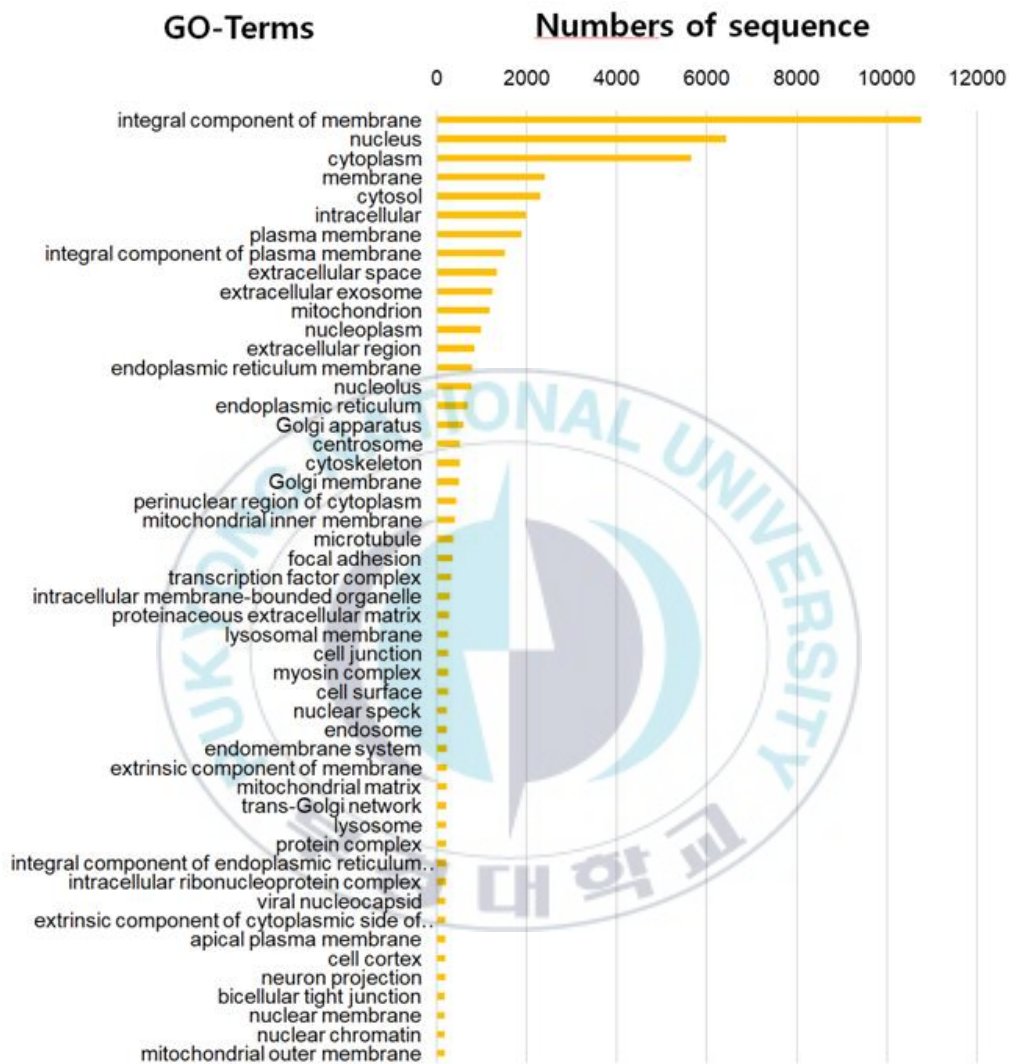


Fig. 3-32. The top 50 most enriched GO-terms of cellular component in liver. The x-axis is the corresponding number of sequence and y-axis is sequence distribution of cellular component.

(다) Orthologous groups from contigs

대조군과 Basta에 노출된 실험군 으로부터 얻어진 contig 서열들을 이들 실험군의 공통 reference 서열로 사용하였으며, 이들 공통 contig 서열들을 BLASTX로 검색하였고, 그 자료를 바탕으로 COG와 blast2GO를 실행하였다. EggNOG database로부터 eukaryotic clusters of orthologous group (COG) 분석 결과, 뇌 조직에서는 32,487개(36.9%) unigene을 아가미에서 27,128개 (30.8%), 간 조직에서는 28,468개(32.3%)의 unigene을 찾아 orthologous group 을 구축하였다. 300 bp 이하는 뇌 조직에서 3,927개였고, 아가미 조직에서 4,967개, 간 조직에서 3,626개를 찾았다. 300~1000 bp 구간에서는 뇌 조직 은 12,645개였고, 아가미 조직은 12,307개, 간 조직에서 11,899개였다.

뇌 조직에서는 기능이 알려지지 않은 서열은 13,783개(22.15%)이었으며, signal transduction mechanism은 8,195개(13.17%), posttranslational modification, protein turnover, chaperones은 6,306개(10.13%), intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport은 5,796개(9.31%), transcription은 5,215개(8.38%)였다 (Fig. 3-33).

아가미 조직에서는 기능이 잘 알려지지 않은 서열은 11,324개(21.53%) 였 으며, signal transduction mechanism은 6,260개 (11.9%)였고, posttranslational modification, protein turnover, chaperones은 5,774개(10.98%), intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport은 4,285개(8.15%), transcription은 4,250개 (6.27%)였다(Fig. 3-34).

간 조직에서는 기능이 알려지지 않은 서열은 12,106개 (22.1%)였으며, signal transduction mechanism은 6,194개(11.3%)였고, posttranslational modification, protein turnover, chaperones은 6,093개(11.1%), intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport은 4,819개(8.8%), transcription은 4,419개 (8.1%)였다(Fig. 3-35).

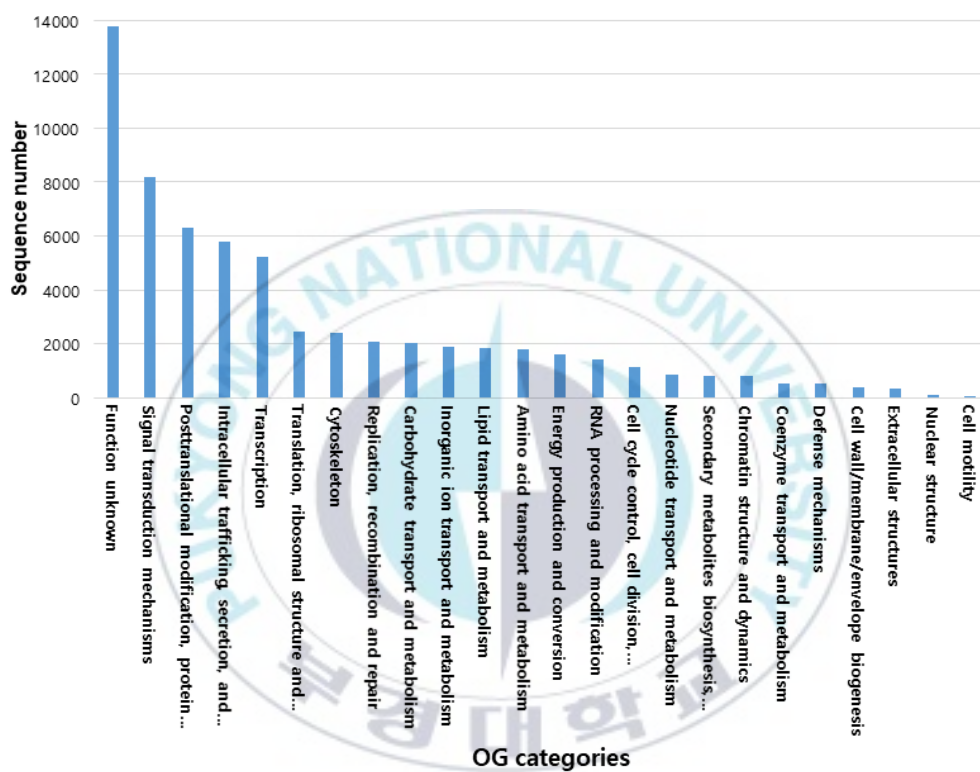


Fig. 3-33. Top orthologous groups from contigs of brain tissue.

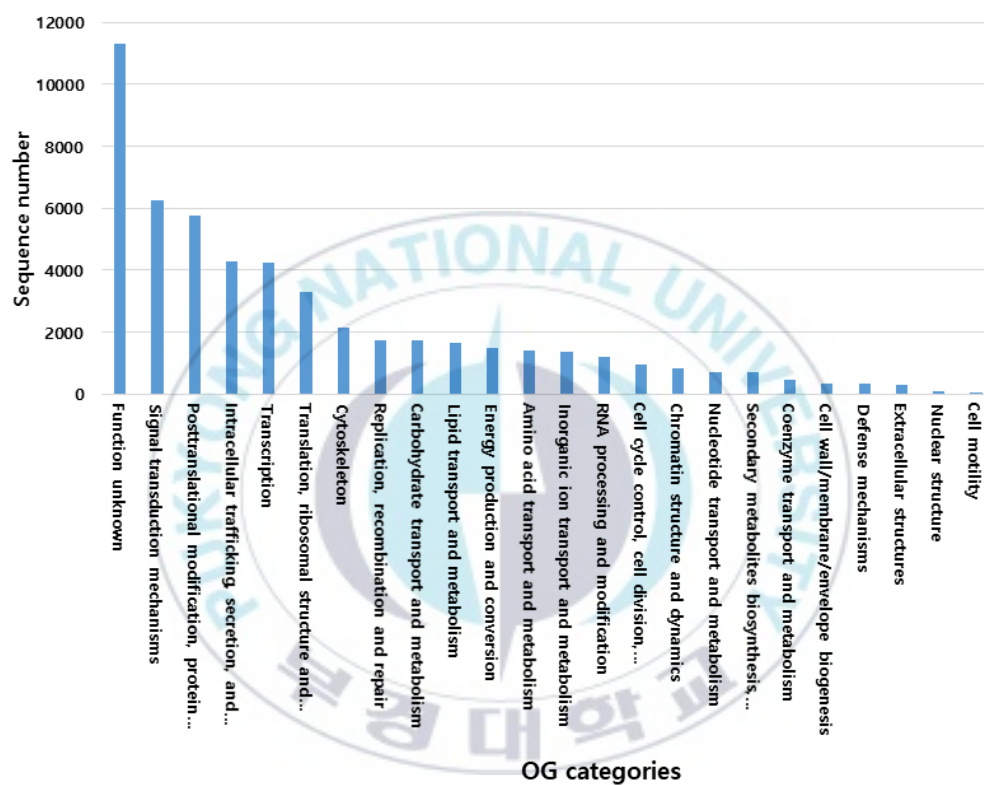


Fig. 3-34. Top orthologous groups from contigs of gill tissue.

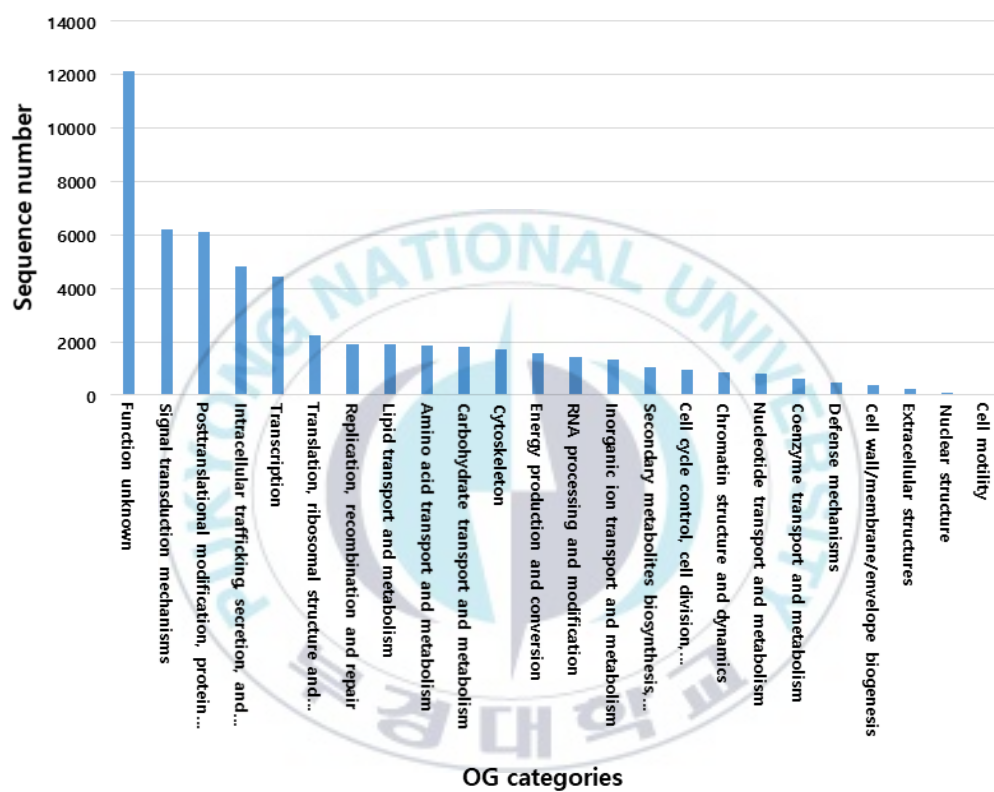


Fig. 3-35. Top orthologous groups from contigs of liver tissue.

(라) Differentially expressed gene analysis

Mapping된 RNA-Seq reads의 발현량을 TopHat과 CummenRbund를 이용하여 평가하였다. Unigene data의 통계분석에 의하여 대조군과 Basta에 노출된 실험군 사이에서 현저하게 다른 발현을 보이는 unigene contigs를 확인하였다. 그 결과 대조군과 실험군의 뇌 조직에서 생성된 unigene contigs를 reference gene으로 하여 각 실험군에서 현저하게 다른 contigs group을 scatter plot과 volcano plot으로 나타내었다. Scatter plot에서 빨간 점들은 대조군보다 실험군에서 $\log_2$ (FPKM)값이 큰 값을 나타내며, 파란 점들은 실험군보다 대조군에서 $\log_2$ (FPKM)값이 큰 값을 나타낸다. 초록 점들은 대조군과 실험군 값의 차이가 $\log_2$ 이내의 값들을 나타내며, 검은 점들은 대조군과 실험군 값에서 q값이 통계적으로 유의한 값들을 표시한다(Fig. 3-36A).

뇌 조직에서 전체 110,114 개의 unigene contigs에서 발현되지 않은 것은 98,256개였고, 4,929개 contigs가 up-regulation되었으며, 6,929개 contigs가 down-regulation되었다. 이중 통계적으로 유의한 contigs는 663개였다. 이중 up-regulation은 321개였고, down-regulation은 341개였다.

Volcano plots은 Y축은 p value $\log_{10}$ 값을 나타내며, X축은 $\log_2$ fold를 나타내며, 이 값들을 이용하여 filtering을 하면 유의성 있으며 발현차이가 많이 나는 유전자 혹은 transcript만 골라낼 수 있다. Q value cutoff는 0.05에서 하였고, 빨간 점은 q value가 0.05의 FPKM값을 나타낸다. 초록색 점은 현저하게 발현되지 않는 것을 나타내며, 빨간 색 점은 현저하게 발현되는 것을 나타낸다. 빨간 네모는 현저하게 차등 발현된 contigs를 나타내고 있다. 전체 110,114개의 unigene contigs에서 차등발현되지 않은 contigs는 98,256개였으며, up regulation contigs는 4,929개였고, down regulation contigs는 6,929개였다.

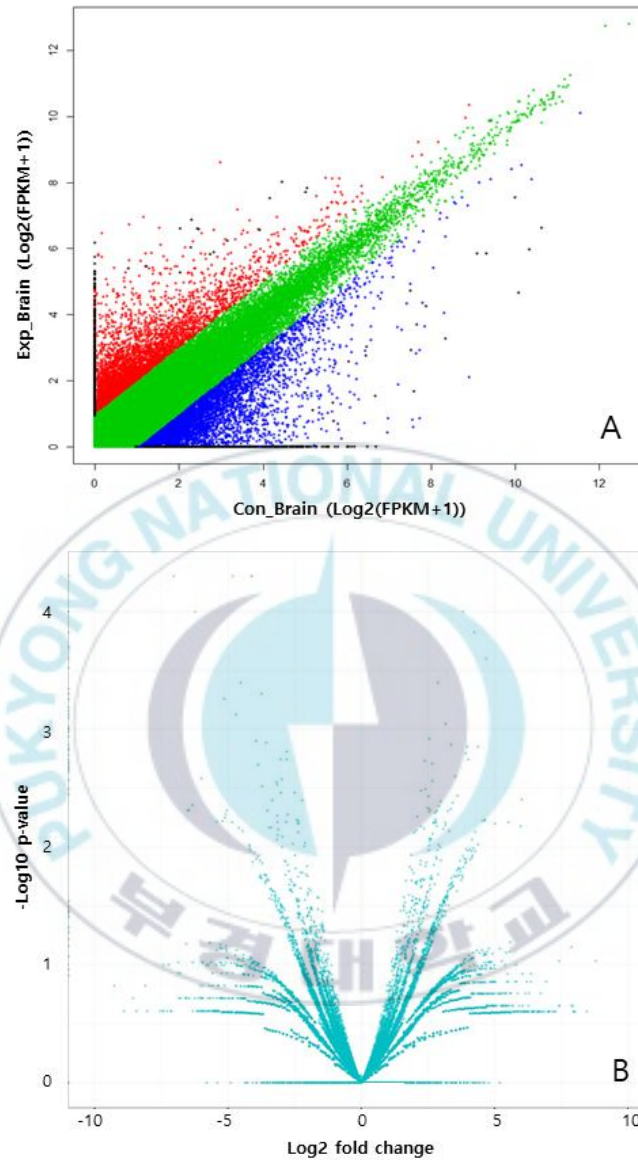


Fig. 3-36. Overview of differently expressed contigs distribution trends in brain between control and experiment. (A) Scatter plot. The x-axis is gene expression quantities (in logs) of control group and y-axis is gene expression quantities of exposed to Basta. (B) Volcano plot. The red rectangle and red dots indicates contigs with differences in expression. The log2fold of brain tissue from control and exposed to Basta group is indicated the mean expression level for each contigs. Each dot represents one contigs.

통계적으로 유의한 값을 나타내는 contigs는 663개였다. 이중 up regulation contigs는 321개였고, down regulation contigs는 341개였다. 이것은 빨간 점으로 나타냈다(Fig. 3-36B).

아가미 조직에서 전체 80,860 개의 unigene contigs에서 발현되지 않은 것은 72,580개였고, 3,220개 contigs가 up regulation되었으며, 5,060개 contigs가 down regulation되었다. 이중 통계적으로 유의한 contigs는 347개였다. 이중 up regulation은 109개였고, down regulation은 238개였다. Volcano plots은 Y축은 p value log10 값을 나타내며, X축은 log2fold를 나타내며, 이 값을 이용하여 filtering을 하면 유의성 있으며 발현차이가 많이 나는 유전자 혹은 transcript만 골라낼 수 있다. Q value cutoff는 0.05에서 하였고, 빨간 점은 q value가 0.05의 FPKM값을 나타낸다. 초록색 점은 현저하게 발현되지 않는 것을 나타내며, 빨간 색 점은 현저하게 발현되는 것을 나타낸다. 빨간 네모는 현저하게 차등 발현된 contigs를 나타내고 있다. 전체 80,860개의 unigene contigs에서 차등 발현되지 않은 contigs는 72,580개였으며, up regulation contigs는 3,220개였고, down regulation contigs는 5,060개였다. 통계적으로 유의한 값을 나타내는 contigs는 347개였다. 이 중 up regulation contigs는 109개 였고, down regulation contigs는 238개였다. 이것은 빨간 점으로 나타내었다(Fig. 3-37).

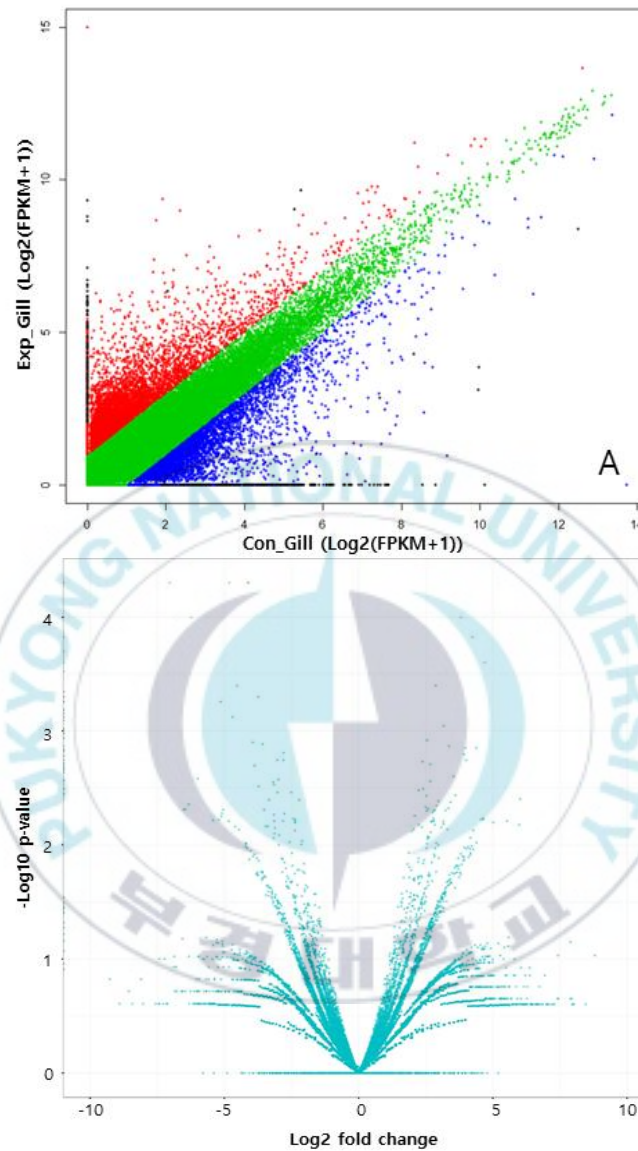


Fig. 3-37. Overview of differently expressed contigs distribution trends in gill between control and experiment. (A) Scatter plot. The x-axis is gene expression quantities (in logs) of control group and y-axis is gene expression quantities of exposed to Basta. (B) Volcano plot. The red rectangle and red dots indicates contigs with differences in expression. The log2fold of gill tissue from control and exposed to Basta group is indicated the mean expression level for each contigs. Each dot represents one contigs.

간 조직에서 전체 92,118개의 unigene contigs에서 발현되지 않은 것은 81,019개였고, 6,684개 contigs가 up-regulation되었으며, 4,415개 contigs가 down regulation되었다. 이중 통계적으로 유의한 contigs는 26,391개였다. 이중 up regulation은 20,853개였고, down regulation은 5,538개였다. Volcano plots은 Y축은 p value log10 값을 나타내며, X축은 log2fold를 나타내며, 이 값을 이용하여 filtering을 하면 유의성 있으며 발현차이가 많이 나는 유전자 혹은 transcript만 골라낼 수 있다. Q value cutoff는 0.05에서 하였고, 빨간 점은 q value가 0.05의 FPKM값을 나타낸다. 초록색 점은 현저하게 발현되지 않는 것을 나타내며, 빨간 색 점은 현저하게 발현되는 것을 나타낸다. 빨간 네모는 현저하게 차등 발현된 contigs를 나타내고 있다. 전체 92,118개의 unigene contigs에서 차등 발현되지 않은 contigs는 81,019개였으며, up regulation contigs는 6,684개였고, down regulation contigs는 4,415개였다. 통계적으로 유의한 값을 나타내는 contigs는 26,391개였다. 이중 up regulation contigs는 20,853개였고, down regulation contigs는 5,538개였다. 이것은 빨간 점으로 나타내었다(Fig. 3-38).

미꾸라지에서 Basta 처리한 그룹과 대조군의 전체 유전자 발현 profile은 발현 유전체를 이해하는데 좋은 도구로 사용된다. RNA-seq 분석을 이용하여 대조군과 Basta에 노출된 조직들에서 유의하게 차등 발현된 유전자들 (DEGs)을 발현 패턴별로 묶어 RPKM values를 바탕으로 up 또는 down regulation 패턴을 heatmap으로 나타내었다.

뇌 조직의 DEG에서 log2 (Fold change) 값이 4이상이고, q값이 0.05 이하인 값들과 KEGG분석의 pathway에서 up & down regulation이 많은 차이를 보이는 category인 chemokine signaling pathway, neuroactive ligand -receptor interaction, RNA transport를 DEG의 유효한 값들을 포함하여 heat map으로 나타내었으며, cluster는 6개로 구분되었다(Fig. 3-39).

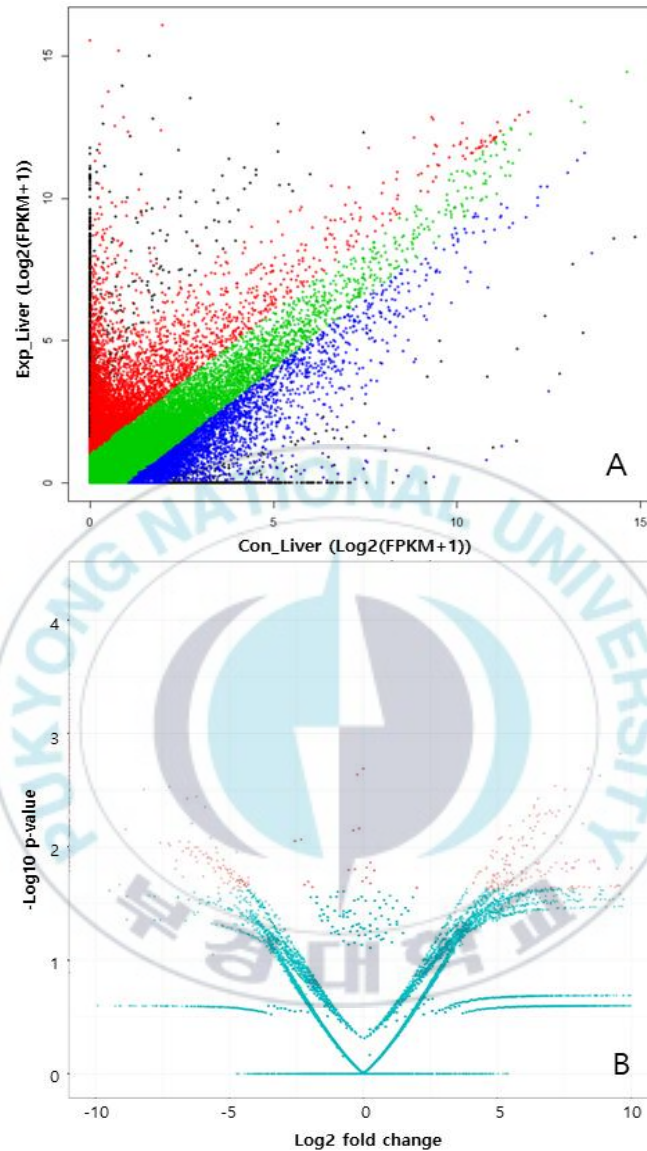


Fig. 3-38. Overview of differently expressed contigs distribution trends in liver between control and experiment. (A) Scatter plot. The x-axis is gene expression quantities (in logs) of control group and y-axis is gene expression quantities of exposed to Basta. (B) Volcano polt. The red rectangle and red dots indicates contigs with differences in expression. The log2fold of liver tissue from control and exposed to Basta group is indicated the mean expression level for each contigs. Each dot represents one contigs.

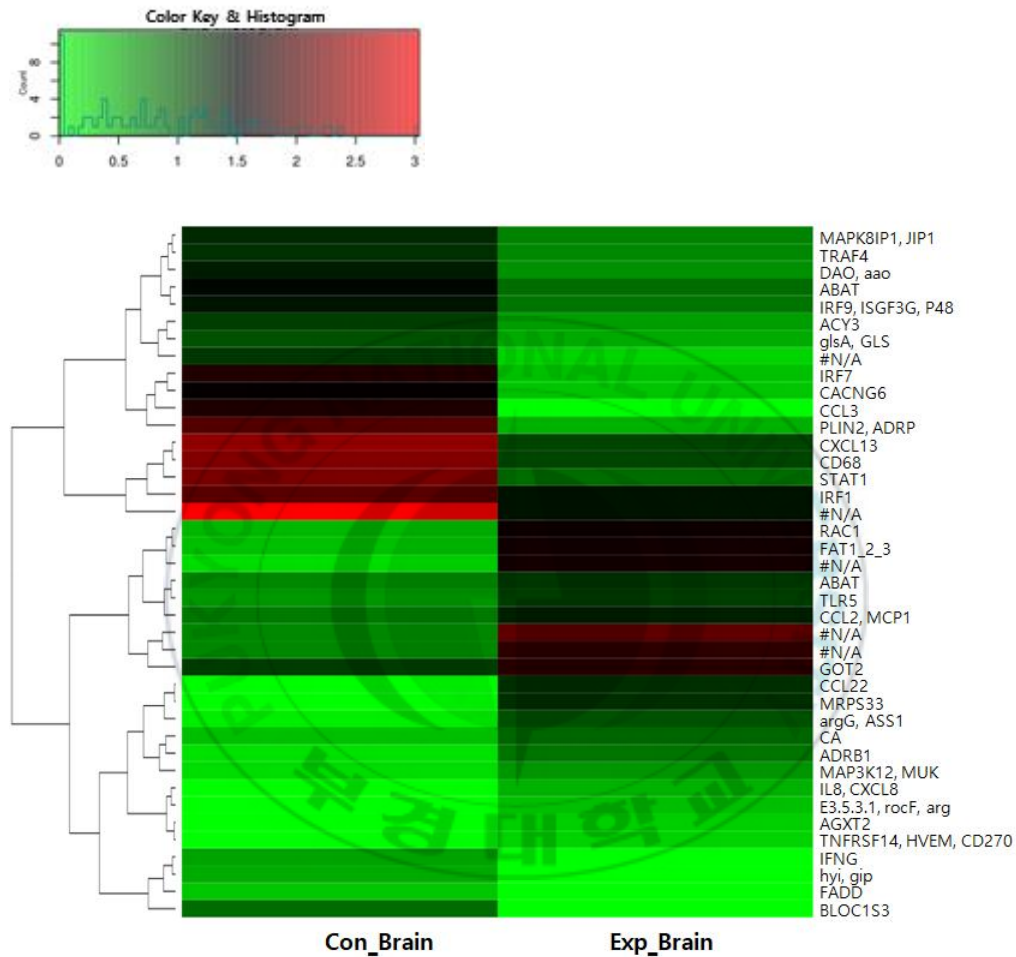
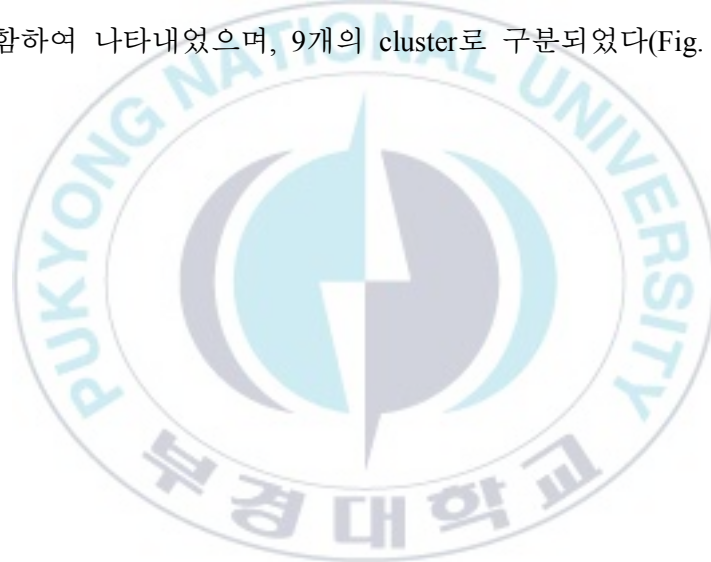


Fig. 3-39. Heat map generated from *Misgurnus mizolepis* transcriptome data displaying differential gene expression values in brain between the control and the Basta-exposed group. Dendrograms indicate formation of clusters according to statistical analysis. The *bar color* reflects gene expression level.

아가미 조직의 DEG에서 $\log_2$ (Fold change) 값이 4이상이고, q값이 0.05 이하인 값들과 KEGG 분석의 pathway중 up & down regulation에서 많은 유전자 차이를 보였던 chemokine signaling pathway, cytosolic DNA-sensing pathway, hematopoietic cell lineage, ribosome에서 DEG 값들 중에 유효한 값들을 포함하여 나타내었으며, 4개의 cluster로 구분되었다(Fig. 3-40).

간 조직 역시 DEG에서 $\log_2$ (Fold change) 값이 4이상이고, q값이 0.05 이하인 값들과 KEGG 분석의 pathway 중 up & down regulation에서 많은 유전자의 차이를 보였던 metabolic pathways, ribosome에서 DEG의 유효한 값들을 포함하여 나타내었으며, 9개의 cluster로 구분되었다(Fig. 3-41).



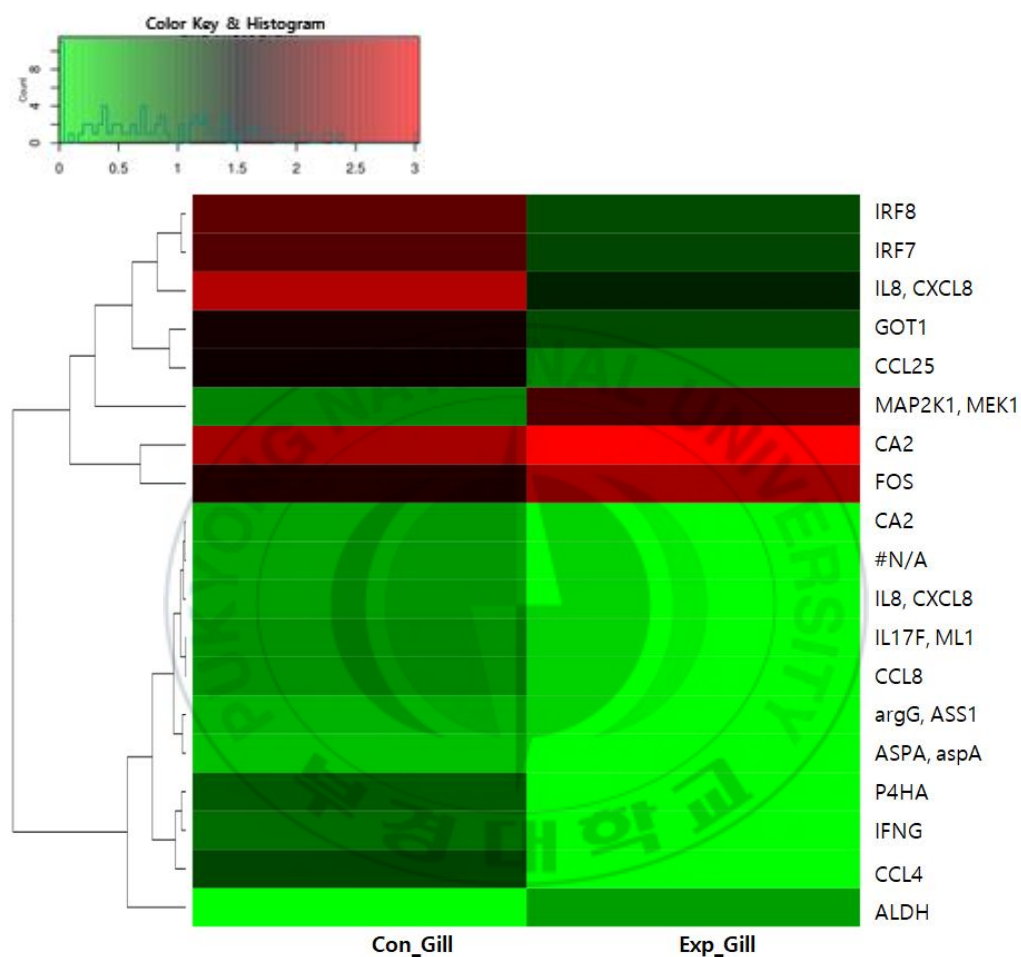


Fig. 3-40. Heat map generated from *Misgurnus mizolepis* transcriptome data displaying differential gene expression values in gill between the control and the Basta-exposed group. Dendrograms indicate formation of clusters according to statistical analysis. The *bar color* reflects gene expression level.

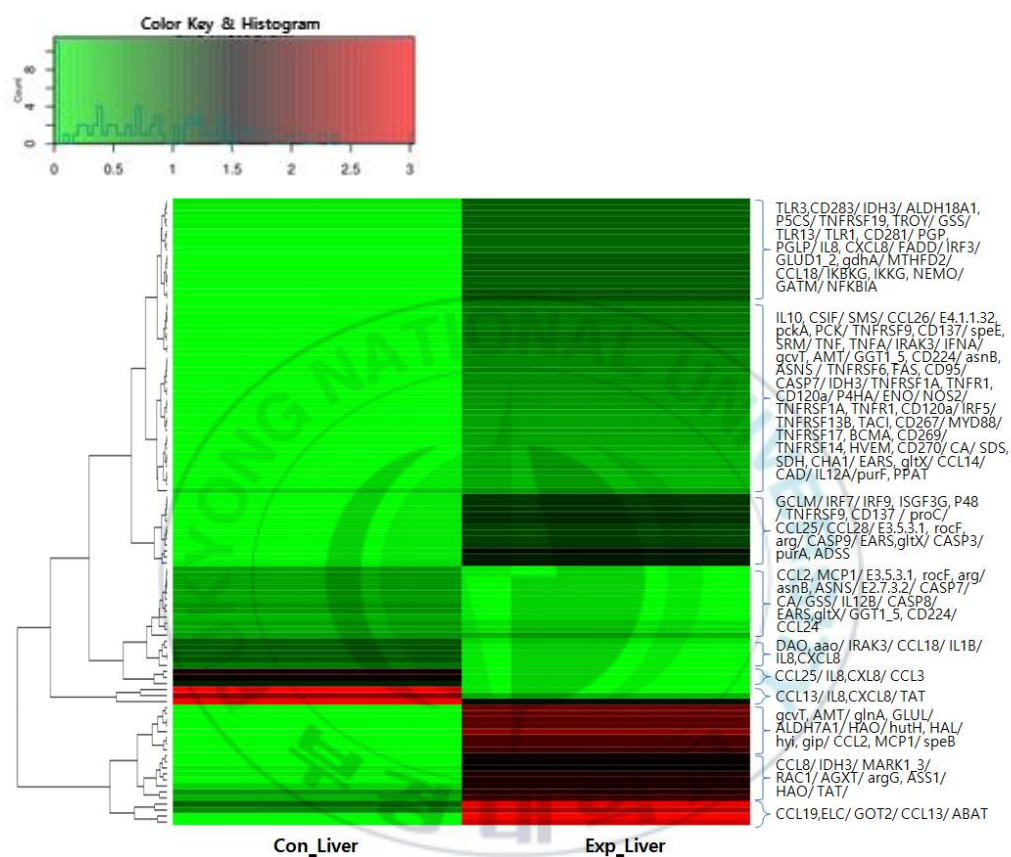


Fig. 3-41. Heat map generated from *Misgurnus mizolepis* transcriptome data displaying differential gene expression values in liver between the control and the Basta-exposed group. Dendrograms indicate formation of clusters according to statistical analysis. The *bar color* reflects gene expression level.

IV. 고 찰

본 연구는 phosphinic acids계 제초제인 Basta를 대상으로 하여 미꾸라지에 미치는 급성 독성을 농도별로 평가하고 조직학적 분석을 실시하였다. 또한 Basta에 노출 시 나타나는 RNA sequencing을 통해 발현 유전자를 대량 발굴하고 차등 발현하는 유전자를 분석하여 향후 제초제에 의한 수서생태계에 서식하는 담수 어류의 위해성을 평가하기 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

미꾸라지는 수서생태계 먹이연쇄의 중요성뿐만 아니라 실내사육 용이 등 시험생물종으로 적합하기 때문에 농약을 포함한 화학물질의 수서생태계 영향을 평가하는 데 반드시 포함되는 지표생물 중의 하나이다. 또한 본 종은 우리나라의 논, 하천, 강, 저수지 등의 담수수계에 널리 분포하는 대표적인 종(한국수자원공사, 2001)이면서 사육방법이나 생활사가 가장 잘 알려져 있는 미꾸라지를 대상으로 하여 Basta에 대한 급성독성과 아만성 노출에 따른 조직학적 영향 및 NGS 분석에 따른 차등 발현한 유전자를 확인하였다.

Basta에 노출된 미꾸라지의 독성평가 결과 환경에 따른 영향을 많이 받았다. 특히 온도에 따라 폐사율이 다르게 나왔으며, 특정 농도를 넘어서면 100% 폐사가 나타나는 특성을 보였다. Basta 유효농도 구간의 스펙트럼이 매우 좁아 유효농도 구간이 낮거나 높았을 때 그 범위를 벗어나면 독성에 대한 효과가 없다. 수온 변화는 어류독성시험에 있어서 가장 민감함 요인으로서 생물종의 성장이나 생식 활동에 영향을 미치기 때문에 실험 세부 조건 중에서 가장 뚜렷한 차이를 보이며, 생물종에 따라 최적 온도를 설정하여 독성평가에 대한 연구(남 등, 2007)와 유사한 결과를 보였다. 어류 생육단계에서 농약의 독성은 성장에 따른 다양한 대사과정의 변화에 따라 감수성 정도가 다르게 나타났다(Seikai, 1982).

Basta의 활성성분은 glufosinate ammonium 18.02%이며, 비활성분은 1-methoxy-2-propanol (propylene glycol mono methyl ether)과 기타 다른 성분으로 구성되어 있다. Koyama et al. (1997)은 계면활성제 sodium polyoxyethylene alkyl ether sulphate가 포함되어 있다고 하였으며 이 성분은 토끼에서 LD50 1,600 mg/kg의 독성평가가 되었다. 또한 Genapol은 Basta와 Liverty에서 용제로 사용되었으며 다른 성분도 첨가되었다고 하였다(KEMI, 2002a&b). 또한 OXD-080버전으로 논에서 매우 낮은 농도로 처리를 했을 때 mosquito fish에 해를 끼친다는 보고가 있다(Cabral et al., 2001).

경골어류에서 Basta의 치사농도는 96시간 LC50 value는 13.1~65 ppm까지 광범위하다(U.S. EPA, 1986, 1990b). 다른 어종의 Basta LC50는 sheepshead minnow는 13.5 ppm (U.S. EPA, 1990b), rainbow trout은 27 ppm (96 h)로 보고되었다(U.S. EPA, 1986). Roundup에 노출된 나일틸라피아의 LC50는 36.8 ppm였으며, 5 ppm과 15 ppm에 노출된 실험군에서 아가미 1차 새엽의 상피세포가 비대해지고 2차 새엽은 협착이 일어났다(Jiraungkoorskul et al., 2002). 본 연구에서 미꾸라지의 96시간 반수치사농도는 자어 12 ppm, 치어 30 ppm, 미성어 38.7 ppm으로 나타나, 일반적으로 알려진 경골어류의 반수치사농도와 크게 차이나지 않았지만, Heger et al. (1995)의 농약의 수생생물에 대한 독성은 용해도와 노출 시간과 관계가 있다는 보고와 일치하였다.

아가미는 넓은 표면적을 가지고 있으며 바깥쪽에 위치하고 있기 때문에 아가미 상피세포는 많은 화합물에 대한 영향평가의 적합한 생체지표로 인식되어 왔다(You et al., 1978; Perera, 1993; Ballesteros et al., 2007; Ayoola, 2008; Albinati et al., 2009).

제초제에 노출된 아가미 상피세포의 비대나 부종은 가스의 교환에 영향을 미치고, 새판의 협착은 아가미의 전체 호흡부분의 감소를 야기하여 아

가미의 산소 유입을 감소시키게 된다. 이는 전체 대사활성능력에 대한 적절한 산소공급이 힘들게 한다(Nowak, 1992). 또한 피부와 아가미에서 점액 질생성이 증가되는 것은 수서환경의 오염에 따른 어류의 반응으로 잘 알려져 있다(Bols et al., 2001, Strazyszewska et al., 2016). 아가미 점액질 과잉 분비는 독성과 병균을 회식화하거나 삼투압조절이 감소, 비활성화하는 방어 기작이다(Ferguson et al., 1992, Movahedinia et al., 2012). 또한 가스교환이 더 어렵게 되며, 독성물질에 의해 상피세포의 괴사, 탈락, 상피층의 박리된다(Bols et al., 2001, Muller et al., 1991).

조직학적 변화 양상은 독성에 대한 노출 농도와 기간에 따라 상이함을 확인할 수 있었다. 본 연구에서도 Basta 농도의 증가에 따라 아가미에서 주요한 변화는 2차 새엽 상피세포가 부풀어 오르거나 짧아지는 퇴행성 병변과 2차 새엽 끝부분이 협착 및 증식되거나 점액세포가 많이 형성되는 진행성 병변이 관찰되었다. Basta노출에 따른 조직병변의 HI_{gill} 지수 또한 농도가 높을수록 증가하였으며, $HI_{gillRp2}$ 와 $HI_{gillRp3}$ 지수는 8 ppm과 16 ppm에서 증가되었다. 조직병변에 따라 지수로 구분한 다른 논문의 결과와 유사한 양상을 보였다(Nero et al., 2006).

따라서 본 연구의 미성어 실험군은 모든 아가미 조직에서 점액세포가 관찰되었으며, 이는 외부 스트레스에 대한 1차적인 방어기작이며, 염증과 괴사 같은 심각한 상태가 아니더라도 아가미를 통한 가스교환 능력을 상실하여 폐사에 이르렀을 것으로 판단된다.

간은 일반적으로 순환계의 중요한 역할을 담당하기 때문에 외부의 화학물질에 노출되었을 때 가장 먼저 조직 손상이 관찰되는 기관이다(Hinton et al., 2001). Risbourg and Bastide (1995) 연구에 따르면, Atrazin 제초제를 어류에 노출시켰을 때 간에서 지방과립이 비정상적으로 커졌으며, 공포화 현상이 나타났다. 또한 수포변성이 관찰되었으며 간세포의 크기와 모양은 비

정상적으로 나타났다. 이것은 간에서 해독 작용하는 동안 체내에 독성 제거에 따른 과잉작용으로 생각된다. 고등척추동물에서 간세포 비대는 간에서 산소를 비롯한 다양한 대사물질들을 수송하는 동양혈관과 Disse공간을 압박하여 간의 미세혈액순환(microcirculation)에 장애를 초래하여 간 손상이 발생한다(Ijaz et al., 2003; McCuskey et al., 2004). 어류 또한 동양혈관과 이를 통한 각종 물질의 이동 및 대사는 고등척추 동물과 유사하다(Takashima and Hibiya, 1995).

또한 간세포의 공포화는 parenchyma cell(유세포)에서 물질의 합성과 혈액순환에서 분비되는 비율의 불균형에 의해 발생된다(Gingerich, 1982). 몇몇 어류에 대한 제초제의 독성 연구에서 간세포의 hyaline droplet, 지질 공포화와 백혈구 침윤과 같은 비정상적인 변화들이 보고되었다(Szarek et al., 2000; Jiraungkoorskul et al. 2002, 2003; Albinati et al., 2007, 2009; Langiano and Martinez, 2008). 본 연구에서도 Basta에 노출된 미꾸라지에서 간 조직학적 변이는 Hued et al. (2012)의 연구결과와 같이 저농도에서 수중변성이 일어나는 것부터 고농도에서 세포괴사가 나타나 농도의 증가에 따라 다양한 조직학적 변화가 있었다. 또한 2주간 처리한 실험군보다 4주간 처리한 실험군에서 HI_{Liv} 지수가 높게 나타났는데 이는 처리기간이 길어짐에 따라 간의 병변이 더욱 심화된 것으로 판단된다. 한편 본 연구의 자어 2주간 8 ppm 실험군에서 HI_{Liv} 지수가 16 ppm 실험군보다 오히려 높게 분석된 것은 백혈구 침입 등 조직학적 변화가 HI_{LivRp2} 와 HI_{LivRp3} 지수에서 더 많이 확인되었기 때문이다. 이러한 현상은 Kang et al. (2014)이 바다송사리를 대상으로 한 Basta 노출실험에서도 관찰된 바 있다.

Basta의 활성성분인 glufosinate ammonium의 단일성분의 피해보다 계면활성제첨가에 따라 2.5배 독성이 더 강하게 나타날 수 있다(U.S. EPA, 1990a). 또한 활성성분인 glufosinate ammonium만 사용했을 때보다 용제를 포함한

제초제는 수서환경이나 생활에서 독성이 더 강한 결과를 나타낸다(KEMI, 2002a). 본 연구에서는 glufosinate ammonium과 Basta에 대한 비교실험을 수행하지 않아 추후 이에 대한 검토가 필요할 것이다.

Glufosinate ammonium의 유전독성에 대한 연구에 대한 유전적 시스템이나 분석에 따른 다양한 결과가 있다(Schulte-Herman et al., 2006). 200 ppm에서 glufosinate ammonium의 안정성에 대해 평가하였고, 사람에서 유전독성의 위험은 없는 것으로 알려졌다. 이 결과는 돌연변이 유발에 대한 다른 연구와 일치한다(Ebert, et al., 1990; Lajmanovich, 2014).

본 연구에서 Basta를 처리한 미꾸라지의 전사체를 분석한 결과 oxidative stress response, immune response, energy metabolism 관련 유전자가 현저하게 차등 발현되었다. 이는 Atrazin과 nonylphenol을 처리한 무지개송어 치어에 대한 독성에 따른 건강 및 병에 대한 감수성 영향에 따른 유전자 발현 연구, 자리돔과 어류의 환경독성에 따른 전사체 분석, 메틸수은을 처리한 대서양 대구의 전반적인 전사체 분석결과 유사하다(Kassahn et al, 2007; Shelley et al, 2012; Yadetie et al, 2013).

최근 양식어종에서 병원균 침입에 반응하는 면역관련 유전자 toll-like receptors (TLRs: Zhao et al., 2013; Zhang et al., 2014a; Pietretti et al., 2014), interferon regulatory factors (IRFs: Santana-de Anda et al., 2011; Zhang et al., 2015), interleukin (IL; Uribe et al., 2011), tumor necrosis factor (TNF; Aoki et al., 2008) 등의 다양한 기능에 대한 연구가 증가하고 있다. 본 연구에서도 innate immune system에 핵심역할을 하는 toll-like receptor pathway 관련 유전자들은 TLRs (TLR1, TLR3, TLR5, TLR13), IRFs (IRF1, IRF3, IRF5, IRF7), ILs (IL8, IL12A, IL12B), CCLs (CCL3, CCL4, CCL14), TNF, STAT1, fos, MYD88, FADD, IKBKG, RAC1이 분석되었다.

Toll-like receptor (TLR)은 병원균에 관련된 분자패턴에 특이적으로 인식

하고 면역세포의 구성과 cytokine 생성에 이르게 하는 상호작용에 관여한다 (Janeway, 2002; Kawai, 2008). 본 연구결과 뇌 조직에서는 TLR5가 FC 2로 높게 발현되었으며, 간 조직에서는 TLR1, TLR3, TLR13가 발현되었으며 특히 TLR3은 실험군의 간 조직에서 FC 4로 높게 발현되었다. Glyphosate와 Roundup에 노출된 brown trout에서도 실험군의 간 조직에서 5~24배 높게 발현된 것으로 보고하여 본 연구 결과와 비슷하였다(Webster and Santos, 2015).

IRF7은 모든 조직에서 발현되었으며 특히 실험군의 간 조직에서 높게 발현되었다. 뇌 조직에서는 IRF1과 IRF9가, 아가미 조직에서는 IRF8이 낮게 발현되었고, 간 조직에서는 IRF3, IRF5, IRF9 모두 높게 발현되었다. IRFs (interferon regulatory factors)는 세포증식, 분화, 세포사멸, 종양형성을 유발하는 유전자 발현과 DNA 전사에 관여하는 JAK-STAT signaling pathway의 주요역할을 하며(Aaronson and Horvath, 2002), innate immune response에서 바이러스성 감염에 대한 방어를 하는 기능을 하고 있다 (Santana-de Anda et al., 2011).

Tumour necrosis factor (TNF)는 glyphosate와 Roundup을 mouse에 노출시켰을 때 oxidative stress를 유도한다는 보고가 있다(El-Shenawy, 2009). Glyphosate나 Roundup에 노출하였을 때 TNF- α 가 생성되었으며, TNF- α 와 TNF- β 같은 cytokine은 간세포와 혈장사이의 용질의 확산((Benedetti et al., 2004)하게 할 수 있는 간 조직에서 콜라겐이 침적하도록 자극한다(Pratt and Kaplan, 2001). 간 조직에서 TNF와 tumor necrosis factor receptor superfamily member인 TNFRSFs (TNFRSF1A, TNFRSF6, TNFRSF9, TNFRSF13B, TNFRSF14, TNFRSF17, TNFRSF19)가 실험군의 간 조직에서 높게 발현되었다.

Interferons (IFNs)는 면역시스템 조절에 다양한 역할을 가지며 바이러스에 반응하는 많은 다른 세포형태에 의해 생성되는 강력한 다면발현성

cytokine이다(Samuel, 2001). Interferon gamma (IFN- γ)는 interferon type II이며, 면역세포활성화에 기여하며, NK세포 활성화, macrophage 활성화, IgG 항체 동형 전환 유도, Th2 억제, MHC 발현 증가시키는 역할을 하는 모델로 알려져 있다(Robertsen, 2006). IFN- γ 는 무지개 송어와 대서양 연어를 포함한 몇몇 어류에서 확인된 바 있다(Zou et al., 2004; Zou et al., 2005; Igawa et al., 2006; Milev-Milovanovic et al., 2006; Robertsen, 2006; Stolte et al., 2008). Grayfer and Belosevic (2009)는 IFN- γ 는 아가미, 신장 및 비장에서 다른 조직보다 더 높게 발현되었다고 보고하였다. 무지개송어와 잉어의 IFN- γ 는 포유동물에서 일어나는 대식세포에서 박테리아 식균작용, 산화질소 생성, 호흡폭발활성과 같은 일반적인 기능을 하고 있다(Sun et al., 2009; Arts et al., 2010; Grayfer et al., 2011). 본 연구에서는 아가미와 뇌 조직에서 IFN- γ 가 차등 발현하였으며, 간 조직에서는 IFN- α 는 높게 발현하였다.

Chemokine은 면역시스템에 중요한 역할을 하며 N-terminal cystein-motifs에 따라 C, C-C, C-X-C, C-X3-C 4가지로 분류된다(Rollins, 1997). 백혈구와 대식세포 활동에 분비되는 CCL4는 활성화된 대식세포의 지질다당류로부터 분리되었다(Wolpe et al., 1988). 무지개송어의 경우 지질다당류는 CCL4 전사체의 높은 발현을 유도하였다(Mackenzie et al., 2004). 다른 연구에서도 CCL4가 상처나 감염부위 조직에 대식세포를 모으는 역할을 하는 것으로 나타났다(Hasegawa et al., 1999; Kitaya et al., 2003; Yadav et al., 2010). 잉어과 어류에서 CCL4는 염증에 대해 중심축이 되는 역할을 유추할 수 있었으며 더 나아가 CCL4 전사체는 잠재적으로 염증을 유발하는 아질산염에 강하게 기능을 하는 것으로 보고되었다(Zhang et al., 2014b). 본 연구에서는 대조군에서 16배 정도 높은 발현을 보였으나 실험군에서는 전혀 발현되지 않았다.

CCL25는 흉선과 소장에서 주로 발현하며 T-cell 발달과 장에서의 면역에

관여하고 있다(Zabel et al., 1999; Vicari et al., 1997). Zebra fish에서 CCL25는 흉선에서 주로 발현되지만 가물치에서는 신장, 아가미, 비장에서 발현되는 것으로 보고된 바 있다(Lu et al., 2012; Arockiaraj et al., 2015). 본 연구에서는 뇌 조직에서 CCL2, CCL3, CCL22, CXCL13이 차등 발현되었고, 아가미 조직에서는 CCL4, CCL8, CCL25가 차등 발현되었으며, 간 조직에서 CCL2, CCL3, CCL8, CCL13, CCL14, CCL18, CCL19, CCL24, CCL25, CCL26, CCL28이 차등 발현되었다. CCL13과 CCL25는 각각 up 또는 down regulation 결과를 보였는데, cDNA 염기서열이 매우 유사한 특성으로 볼 때 어류 특유의 duplicated gene일 것으로 판단된다.

Caspases는 포유동물에서 15개 family로 구성되어있으며 casp2, casp8, casp9, casp10은 개시자의 역할을 하는 반면 casp3, casp6, casp7은 downstream을 조절하는 역할을 한다. 이 유전자는 크게 2가지 신호경로에서 중요한 역할을 하는데 FAS를 포함한 death receptors라 불리는 세포표면의 수용기와 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)를 연결하여 시작하는 외인성 경로와 미토콘드리아에서 세포기질로 cytochrome C에 의해 내인성 경로에 관여하며 FADD, casp8, FAS와 함께 pro apoptotic activity에 관여한다(Sakamaki et al., 2007). 연어와 농어에서 casp3, casp6, casp7, casp9가 확인되었다(Takle et al., 2006; Reis et al., 2007), 실험결과 간 조직에서 casp3, casp7, casp8, casp9가 높게 발현되었는데 특히 casp3, casp9의 경우 대조군에서는 전혀 발현되지 않았고, 실험군에서 각각 8.3배, 5.5배 높게 발현되었다.

FADD는 mouse의 배 발생과정 중 knockout되면 치사에 이르며, NFkB pathway를 통해서 심장의 이상발달을 가져온다(Sakamaki et al., 2012). 또한 zebrafish에서는 눈 발생과 관련이 있다고 보고된 바 있으며(Gregory-Evans et al., 2007), FADD는 세포사멸과 밀접한 관련이 있을 뿐만 아니라 과다발

현 시 인간의 난소암의 원인이다(Razaghi, 2017). 본 연구에서는 대조군에서는 발현되지 않았고, 실험군의 간 조직에서 4배 정도 높게 발현되었다.

STATs는 세포사멸, 세포증식, 세포분화와 생존을 포함한 다양한 생물학적 반응들에 관여하고 있다. STAT family에서 STAT1은 세포사멸에 다양한 형태로 중요한 역할을 하고 있다. 세포 형태나 자극에 따라 STAT1은 세포사멸과 비세포사멸과정 모두 광범위하게 세포사멸을 조절하고 있다(Kim and Lee, 2007; Kostanian et al., 2010). 본 연구에서는 실험군의 뇌 조직에서 STAT1의 발현량이 대조군에 비해 FC -4.8로 낮아졌다.

RAC1은 GTP 결합단백질의 RAS super family에 속하는 GTPase이며, 세포성장의 조절, 세포골격 재구성 및 단백질 키나아제의 활성화에 관련이 있다(Ridley, 2006; Xiang, 2016). 분석결과 실험군 뇌 조직에서 높게 발현되었었다.

실험결과 amino acid metabolism에 관련한 unigene들이 차등 발현되었으며, arginine and proline metabolism pathway, alanine, aspartate and glutamate metabolism pathway, glycine, serine and threonine metabolism pathway에서 다양한 기능을 하고 있다. 그 외에 glutathione metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, citrate cycle (TCA cycle)에 관련된 unigene 들을 확인할 수 있었다.

Arginine and proline metabolism pathway는 glutamate로부터 arginine과 proline의 생합성을 위한 중요한 pathway 중 하나로, 본 연구에서 이러한 pathway와 관련있는 전사체들은 AGXT, AMT, ALDH 7A1, ALDH 18A1, arg, creatine kinase, DAO GATM, GOT1, GOT2, NOS2, P4HA, proC, SMS, speB, speE, alanine이었으며, 대부분 간 조직에서 차등 발현되었다.

GOT (glutamic-oxaloacetic transaminase, aspartate aminotransferase: AST)는 간 질환의 지표로 사용되는 효소이며, 환경적 스트레스 요인에 따른 생화

학적 지표의 변화는 생물체의 대사와 생화학적 과정에 대한 변화를 확인할 수 있으며, 이들 지표를 측정하는 것은 제초제에 노출된 기관의 손상을 확인할 수 있으며 어류 건강상태를 측정할 수 있는 어류 독성학적 진단의 도구로 이용할 수 있다(Zikic et al., 2001). GOT1은 아가미에서, GOT2는 뇌 조직에서 FC 2로 높게 발현되었으며 실험군의 간 조직에서 FC 5로 높게 발현되었다.

ALDH는 알콜 대사 경로에 영향을 미치는 유전자로 일본산 송사리의 난 발생과정 중 에탄올 처리가 ALDH 전사체 수준을 감소시키는 결과가 보고되었다(Wang et al., 2007). 본 연구에서는 실험군의 아가미 조직에서 2.3배 높게 발현되었다.

DAO (D-amino acid oxidase)는 실험군의 간 조직에서 낮은 발현량을 나타내었는데, 생물학적 기능은 알려져 있지 않지만 mouse에서 NMDA receptor와 상호작용하여 D-serine을 분해하는 것으로 알려져 있다(Duffy et al., 2008).

Alanine, aspartate and glutamate metabolism pathway에서는 asnB, ABAT, argG, AGXT, ASPA, CAD, glsA, GOT1, GOT2, glnA, GLUD1_2, PPAT, purA가 차등 발현되었다.

본 연구에서 Basta에 노출된 실험군의 간 조직에서 glnA가 대조군에 비해 30배 높게 발현되었다. Glufosinate ammonium은 glutamine synthetase (glnA)를 억제하여 체내 암모니아 농도를 증가시킨다. 또한 glufosinate ammonium은 쥐의 뇌, 신장, 간조직과 개의 심장에서 glutamate synthetase를 억제시키고, 소의 간에서 glutamate carboxylase가 억제되며, glutamate dehydrogenase는 쥐의 뇌에서 억제된다고 보고되었다(FAO, WHO and IPCS, 1992; Cox, 1996). 또한 인간에서도 glutamate synthetase가 억제되었다고 보고된 바 있다(HSD 2003).

Glycine, serine and threonine metabolism pathway에서는 ALDH7A1, DAO, gcvT, SDS가 발현되었다. Serine과 glycine은 단백질, 핵산, 지질합성의 전구체로서 해당작용의 대사물질로 잘 알려져 있다. 세포의 항산화능 확보에 관련있고, 최근에는 종양발생경로에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Amelio et al., 2014). threonine은 threonine dehydrogenase (TDH)와 glycine C-acetyltransferase (GCAT)에 의해 glycine으로부터 합성된다. Threonine 감소는 histone methylation의 현저한 감소를 통해 세포를 죽게 한다. 본 실험 결과 이 경로의 유전자 중 특히 DAO는 대조군 간 조직에서 FC 4로 낮은 발현값을 나타내었다.

Glutathione metabolism pathway에서 GGT1_5, GSS, GCLM이 분석되었으며, GGT1_5는 대조군 간 조직에서 FC 2로 down regulation되었으며, GSS는 실험군 간 조직에서 FC 4.5로 up regulation되었다. Glyoxylate and dicarboxylate metabolism pathway에서 HAO, hyi, pgp가 발현되었고, 모두 실험군 간 조직에서 차등 발현되었다.

Citrate cycle (TCA cycle) pathway에서는 IDH3와 PCK가 실험군 간 조직에서 발현되었다. Aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway에서는 gltX가 발현되었고, nitrogen metabolism pathway에서는 CA, one carbon pool by folate pathway에서는 MTHFD2가 발현되었다. Carbonic anhydrase (CA)는 어류에서 산염기조절(Randall, 1982; Henry and Heming, 1998; Tufts and Perry, 1998; Henry and Swenson, 2000; Tufts et al., 2003; Evans et al., 2005; Esbaugh and Tufts, 2006)과 이온조절(Maetz, 1971; Maetz and Bornancin, 1975; Haswell et al., 1980; Pelis and Renfro, 2004; Evans et al., 2005; Tresguerres et al., 2006)에 관여한다. BLOC1S3는 혈소판 과립, 멜라닌소체, 리소좀 등 세포 소기관의 생체 형성에 중요한 역할을 하고 있으며, 본 연구에서는 뇌 조직에서 발현되었다.

이와 같이 제초제 노출에 따른 전사체 분석 결과는 glyphosate에 노출에 따른 면역관련 transcripts의 차등 발현에 대한 연구(Tanguy et al., 2005; Marchand et al., 2006; Evrard et al, 2010)와 glyphosate formulation이 어류와 열대 악어의 면역계를 바꾸고(El-Gendy et al., 1998; Kreutz et al., 2010; Latorre et al, 2013) 감염에 따른 감수성에 따라 변화할 수 있는(Kelly et al, 2010; Kreutz et al, 2010) 근거를 보여준 기존연구 결과를 뒷받침하였다.

제초제에 대한 노출은 후생유전자 변형을 일으킬 수 있다. 후성학적 변화의 실험적으로, 만성적, 역학적 연구는 유전자 발현의 변형에 의해 활성 메카니즘의 이해를 증가시킬 수 있다. Collotta et al. (2013)은 제초제 노출 시 단기적으로 폐사, 외부표현형 및 조직학적 변형뿐만 아니라 내분비 교란과 더불어 다음 세대로까지의 유전자 돌연변이와 같은 잠재적인 위험성을 경고하고 있다. 따라서 본 연구에서 관찰된 다양한 유전자들은 앞으로 제초제에 대한 후생유전학적 연구를 수행하는데 이용될 수 있을 것이다.

분석결과로 나타난 전사체들에 대한 유전자들이 실제로 어떻게 발현되는지에 대해서는 추후 real time Q-PCR을 이용한 발현량 분석이 필요할 것이다. 또한 Basta의 메카니즘 관련 유전자는 다양한 스트레스에 대해 생리학적 반응을 이해하는데 정보를 제공할 수 있을 것이다. 본 연구에서 대량으로 발굴된 미꾸라지 전사체 분석 자료는 농약관련 독성에 대한 수서동물 생태 연구에 있어 기초 유전자 자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

박사학위 과정을 시작해서 마칠 때까지 짧지 않은 기간 동안 어려움을 때마다 도움을 주신 많은 분들이 계셨기에 학위 논문을 잘 마무리할 수 있었습니다.

항상 제자의 입장에서 생각해주시고, 격려와 사랑을 베풀어 주신 지도교수 김동수 교수님께 마음 속 깊이 감사드립니다.

그리고 부족한 논문의 완성을 위해 세심한 가르침과 조언을 해 주신 학위논문 심사위원 노충환 박사님, 김봉석 박사님, 남윤권 교수님, 최윤희 교수님께도 감사드립니다.

실험 결과를 꼼꼼하게 검토해주시고 격려를 아끼지 않은 김무상 박사님께 감사드립니다. 학위과정 중 논문에 대한 자료와 함께 많은 도움을 준 부경대학교 분자유전공학연구실 정효선 박사님, 고민균님, 그리고 논문실험을 위해 꼭 필요한 실험어류를 시기에 맞게 손수 챙겨주신 유전자원공학연구실 이상윤 박사님, 김은정님께도 감사드립니다.

논문을 위해 여러 실험의 시작과 마무리를 함께 해 준 순천향대학교 보전유전학연구실 대학원생들에게 고마움을 전합니다.

끝으로 이해와 배려로 옆에서 도움을 준 남편과 잘 자라준 아들 그리고 평생 자식들을 위해 헌신하신 부모님께 이 논문을 바칩니다.

참고문헌

- Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. Science. 2002; 296(5573):1653-5.
- Albinati ACL, Moreira ELT, Albinati RCB, Carvalho JV, Santos GB, Lira AD. Toxicidade aguda do herbicida Roundup parapiaçu (*Leporinus macrocephalus*). Rev Bras Saúde Prod Anim 2007; 8:184-192.
- Albinati ACL, Moreira ELT, Albinati JRBC, Carvalho JV, De Lira AD, Santos GB, Vidal LVO. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). Arq Bras Med Vet Zootec 2009; 61:621-627.
- Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. Trends Biochem Sci. 2014; 39:191-198.
- Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol 2010; 11:R106.
- Aoki T, Takano T, Santos MD, Kondo H, Hirono I. Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives, in: Fisheries for Global Welfare and Environment. Memorial Book of the 5th World Fisheries Congress, Terrapub, Tokyo, Japan, 2008; 263-276.
- Arockiaraj J, Bhatt P, Kumaresan V, Dhayanithi NB, Arshad A, Harikrishnan R, Arasu MV, Al-Dhabi NA. Fish chemokines 14, 20 and 25: a comparative statement on computational analysis and mRNA regulation upon pathogenic infection. Fish Shellfish Immunol. 2015; 47:221-230.
- Arts JA, Tijhaar EJ, Chadzinska M, Savelkoul HF, Verburg-van Kemenade

- BM. Functional analysis of carp interferon-gamma: evolutionary conservation of classical phagocyte activation. *Fish Shellfish Immunol.* 2010; 29:793-802.
- Ayoola SO. Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African J Agric Res* 2008; 3:825-834.
- Ballesteros ML, Bianchi GE, Carranza M, Bistoni MA. Edosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *J Environ Sci Health B* 2007; 42: 351-357.
- Bayer CropScience. Safety Data Sheet. Basta® Non-selective herbicide. Version 1/AUS. Bayer CropScience. Monheim am Rhein, DE. 2013.
- Bayer crop science, 2018. <https://www.cropscience.bayer.com/>.
- Benedetti AL, Lourdes Vituri C, Trentin AG, Domingues MAC, Alveraz-Silva M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide glyphosate-Biocarb *Toxicol. Lett.* 2004; 153:227-232.
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Diseases* 1999; 22:25-34.
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LE. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol.* 2001; 25:853-873.
- Cabral JA, Marques JC, Nielsenc SN. Modelling mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) responses to Genapol OXD-080, a non-ionic surfactant, in rice fields. *Ecolog Enginner* 2001; 16(4):537-544.
- Chávez-Mardones J, Gallardo-Escárate C. Next-generation transcriptome profiling of the salmon louse *Caligus rogercresseyi* exposed to deltamethrin (AlphaMax™):

- Discovery of relevant genes and sex-related differences. *Mar Biotech.* 2015; 17:793-810.
- Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V. Epigenetics and pesticides. *Toxicology.* 2013; 307: 35-41.
- Collingridge GL, Lester RA. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nerve system. *Pharmacol Rev.* 1989; 40:143-210.
- Cox C. Glufosinate. *J Pestic Reform.* 1996; 16(4):15-19.
- Duffy S, Labrie V, Roder JC. D-Serine augments NMDA-NR2B receptor-dependent hippocampal long-term depression and spatial reversal learning. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33: 1004-1018.
- Ebert E, Leist KH, Mayer D. Summary of safety evaluation toxicity studies of glufosinate ammonium. *Food Chem Toxicol.* 1990; 28(5):339-349.
- El-Gendy K, Aly N, El-Sebae A. Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *J Environ Sci Health Part B.* 1998; 33(2):135-49.
- El-Shenawy NS. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009; 28(3):379-85.
- Esbaugh A, Tufts BL. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol.* 2006; 154:185-198.
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and

- excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev.* 2005; 85:97-177.
- Evrard E, Devaux A, Bony S, Burgeot T, Riso R, Budzinski H, et al. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: Load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers.* 2010; 15(2):111-27.
- FAO. Food outlook. Biannual report on global food market. 2017; 152pp.
- FAO, WHO, IPCS. Pesticide Residues in Food-1991: Toxicology Evaluation. Food and Agriculture Organisation, World Health Organisation and the International Programme on Chemical Safety, Geneva. 1992.
- Ferguson HW, Morrison D, Ostland VE, Lumsden J, Byrne P. Responses of mucus-producing cells in gill disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Comp Pathol* 1992; 106:255-265.
- Ferreira Nunes B.V., Durán R, Alfonso M, de Oliveira I.M and Ferreira Faro L.R. Evaluation of the effects and mechanisms of action of glufosinate an organophosphate insecticide, on striatal dopamine release by using in vivo microdialysis in freely moving rats, *Arch. Toxicol.* 2010; 84:777-785.
- Fushiya S, Maeda K, Funayama T, Nozoe S. 4-N-hydroxy-L-2, 4- diaminobutyric acid: A strong inhibitors of glutamine synthetase. *J Med Chem.* 1988; 31:480-483.
- Gingerich WH. Hepatic toxicology of fishes. In: WeberLJ, editor. *Aquatic Toxicology*. New York: Raven Press. 1982; 55-105.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, Palma F, Birren BW, Nusbaum C,

- Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat Biotechnol.* 2013; 29(7):644-652.
- Grayfer L, Belosevic M. Molecular characterization, expression and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interferon gamma. *Dev Comp Immunol.* 2009; 33:235-246.
- Gregory-Evans CY, Moosajee M, Hodges MD, Mackay DS, Game L, Vargesson N, Bloch-Zupan A, Rüschenhoff F, Santos-Pinto L, Wackens G, Gregory-Evans K. SNP genome scanning localizes oto-dental syndrome to chromosome 11q13 and microdeletions at this locus implicate FGF3 in dental and inner-ear disease and FADD in ocular coloboma. *Human Molecular Genetics.* 2007; 16(20):2482-2493.
- Grisolia CK. Editora da UNB; Brasília: Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução. 2005;392.
- Hack R, Ebert E, Ehling G, Leist KH. Glufosinate ammonium some aspects of its mode of action in mammals. *Food Chem Toxicol.* 1994; 32:461-70.
- Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 1999; 117:159-165.
- Haswell MS, Randall DJ, Perry SF. Fish gill carbonic anhydrase: acid-base regulation or salt transport? *Am J Physiol.* 1980; 238:R240-R245.
- Heger W, Jung SJ, Martin S, Peter H. Acute and prolonged toxicity to aquatic organisms of new and existing chemicals and pesticides. *Chemosphere.*

- 1995; 31:2707-2726.
- Henry RP, Heming TA. Carbonic anhydrase and respiratory gas exchange. *Fish Physiol* Vol. 1998; 17:75-111.
- Henry RP, Swenson ER. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Respir Physiol*. 2000; 121:1-12.
- Hinton DE, Segner H and Braunbeck T. Toxic responses of the liver. In: Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. Vol. 1. Schlenk D and Benson WH, eds. Taylor & Francis, London, GB. 2001; pp 224-268.
- HSD. Glufosinate-ammonium. Hazardous Substances Databank. United States National Library of Medicine. 2003. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?/temp/~87maWG:1>.
- Hued AC, Oberhofer S, Bistoni MD. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch Environ Contam Toxicol*. 2012; 62(1):107-117.
- Igawa D, Sakai M, Savan R. An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. *Mol. Immunol*. 2006; 43:999-1009.
- Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver. *Microcirculation* 2003; 10:447-56.
- Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*.

- 2002; 20(1):197-216.
- Jewell T, Buffin D. Health and environmental impacts of glufosinate ammonium pesticide action network UK. Report prepared for friends of the earth UK. Pesticide action network UK, London, GB. 2001. 37 pp.
- Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri - Grams S, Pokethitiyook P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sci Asia. 2002; 28:121-127.
- Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri - Grams S, Pokethitiyook P. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Environ Toxicol. 2003; 18:260-267.
- Kano Y, Kawaguchi Y, Yamashita T, Shimatani Y. Distribution of the oriental weatherloach, *Misgurnus anguillicaudatus*, in paddy fields and its implications for conservation in Sado Island, Japan. Ichthyol Res. 2010; 57:180-188.
- Kassahn KS, Crozier RH, Ward AC, Stone G, Caley MJ. From transcriptome to biological function: environmental stress in an ectothermic vertebrate, the coral reef fish *Pomacentrus moluccensis*. BMC Genomics. 2007; 8:358.
- Kang GR, Song HY, Kim DS. Toxicity and effects of the herbicide glufosinate-Ammonium (Basta) on the marine medaka *Oryzias dancena*. Fish Aquat Sci. 2014; 17:105-13.
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-1-like receptor signaling. Ann NY Acad Sci. 2008; 1143(1):1-20.

- Kelly DW, Poulin R, Tompkins DM, Townsend CR. Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *J Appl Ecol*. 2010; 47(2):498-504.
- KEMI. Draft Assessment Report (DAR) - public version. Initial risk assessment provided by the rapporteur member state Sweden for the existing active substance glufosinate (based on the variant glufosinate - ammonium) of the second stage of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC. Vol 1. National Chemicals Inspectorate, Sweden. 2002a. <http://www.efsa.europa.eu/en/science/praper/conclusions/895.html>. Accessed 18/01/07.
- KEMI. Draft assessment report glufosinate-ammonium. Vol 3 Appendix B.6a: Toxicology and metabolism. National chemicals inspectorate. Sweden. 2002b. <http://www.efsa.europa.eu/en/science/praper/conclusions/895.html>. Accessed 18/01/07.
- Kim DS, Jo JY, Lee TY. Induction of triploidy in mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and its effect on gonad development and growth. *Aquaculture*. 1994; 120:263-270.
- Kim HS, Lee M. STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal*. 2007; 19:454-465.
- Kime. The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev Fish Biol Fish*. 1995; 5:52-96.
- Kitaya K, Nakayama T, Okubo T, Kuroboshi H, Fushiki S, Honjo H. Expression of macrophage inflammatory protein-1 β in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab*.

2003; 88(4):1809-1814.

- Köck M, Farré M, Martínez E, Gajda-Schranz K, Ginebreda A, Navarro A, López de Alda M, and Barceló D. Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *J. Hydrol.* 2010; 383:73-82.
- Kostanian IA, Vonarshenko AV, Lipkin VM. STAT1: a many-sided transcription factor. *Bioorg khimiia.* 2010; 36:15-28.
- Koyama K, Koyama KY, Goto K. Cardiovascular effects of a herbicide containing glufosinate and a surfactant: in vitro and in vivo analyses in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 145:409-14.
- Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, Marteninghe A, Davi dos Santos E, Zanatta R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 2010; 29(4):694-7.
- Lacoste AM, Mansour S, Cassaigne A, Neuzil E. Effect of phosphonic analogues of glutamic acid on glutamate decarboxylase. *Experientia.* 1985; 41:643-644.
- Lajmanovich RC, Cabagna-Zenklusen MC, Attademo AM, Junges CM, Peltzer PM, Bassó A, Lorenzatti E. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014; 769:7-12.
- Langiano VC, Matinez CBR. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide

- on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp Biochem Physiol C. 2008; 147:222-231.
- Latorre MA, Lopez Gonzalez EC, Larriera A, Poletta GL, Siroski PA. Effects of in vivo exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*. J Immunotoxicol. 2013; 10(4):349-54.
- Logusch EW, Walker DM, McDonald JF, Franz JE. Substrate variability as a factor in enzyme inhibitor design: Inhibition of ovine brain glutamine synthetase by phosphinothricins. Biochem. 1989; 28:3043-3051.
- Lu IN, Chiang BL, Lou KL, Huang PT, Yao CCJ, Wang JS, Lin LD, Jeng JH, Chang BE. Cloning, expression and characterization of CCL21 and CCL25 chemokines in zebrafish. Dev Comp Immunol. 2012; 38: 203-214.
- Maetz J. Fish gills: mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water. Philos Trans B Biol Sci. 1971; 262:209-249.
- Maetz J, Bornancin M. Biochemical and biophysical aspects of salt excretion by chloride cells in teleosts. Fortschr Zool. 1975; 23:322-362.
- Marchand J, Tanguy A, Charrier G, Quiniou L, Plee-Gauthier E, Laroche J. Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the European flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. Mar Biotechnol. 2006; 8(3):275-94.
- Mackenzie S, Liarte C, Iliev D, Planas JV, Tort L, Goetz FW. Characterization of a highly inducible novel CC chemokine from differentiated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. Immunogenetics. 2004; 56:611-615.

- Marguerat S, Bähler J. RNA-seq: from technology to biology. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67:569-579.
- Martin JA and Wang Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(10):671-682.
- McCuskey RS, Ito Y, Robertson GR, McCuskey MK, Perry M, Farrell GC. Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2004; 40:386-393.
- Michel PP, Agid Y. Death of septal cholinergic neurons produced by chronic exposure to glutamate is prevented by the non-competitive NMDA receptor/channel antagonist, MK-801:role of nerve growth factor and nitric oxide. *J Neurosci Res.* 1995; 40:764-75.
- Milev-Milovanovic I, Long S, Wilson M, Bengten E, Miller NW, Chinchar VG. Identification and expression analysis of interferon gamma genes in channel catfish. *Immunogenetics.* 2006; 58:70-80.
- Movahedinia A, Abatachi B, Bahmani M. Gill histopathological lesions of sturgeons. *Asian J Anim Vet Adv* 2012; 7:710-717.
- Muller ME, Sanchez DA, Bergman HL, McDonald DG, Rhem RG, Wood CM. Nature and time course of acclimation to aluminium in juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). II. histology. *can J Fish Sci.* 1991; 48:2016-2027.
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, and Snyder M. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science.* 2008; 320:1344-1349.
- Nakaki T, Mishima A, Suzuki E, Shintani F, Fujii T. Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through N-methyl D-aspartate receptors in rat cerebellum. *Neurosci lett.* 2000; 290(3):209-12.

- Nam YK, Park JE, Kim KK, Kim DS. A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Res* 2003; 12:523-525.
- Naruse M, Oishi T. Annual and daily rhythms of loaches in an irrigation creek and ditches around paddy fields. *Environ Biol Fish*. 1996; 47: 93-99.
- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8thed. National Academies Press, Washington, DC, US. 2011.
- Nero V, Farwell A, Lister A, Van Der Kraak G, Lee LEJ, Meer V, MacKinnon MD, Dixon DG. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol Environ safety*. 2006; 63:365-377.
- Nowak B. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. *Aquat Toxicol*. 1992; 23:65-84.
- Qin B, Zhu G, Gao G, Zhang Y, Li W, Paerl H, Carmichael W. A drinking water crisis in Lake Taihu, China: linkage to climatic variability and lake management. *Environ Manag*. 2010; 45:105-112.
- Ojeniyi SO. Effect of goat manure on soil nutrient and okra yield in a rainforest area of Nigeria. *App Tropi Agricul*. 2000; 5:20-23
- Oost RVD, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ toxicol pharm*. 2003; 13:57-149.
- Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Rev Genet*. 2011; 12:87-98.

- Pelis RM, Renfro JL. Role of tubular secretion and carbonic anhydrase in vertebrate renal sulfate excretion. *Am J Physiol.* 2004; 287:R491-R501.
- Perera KML. Ultrastructure of the primary gill lamellae of *Scomber australasicus*. *J Fish Biol.* 1993; 43:45-59.
- Pietretti D, Wiegertjes GF. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies. *Dev Comp Immunol.* 2014; 43:205-222.
- Pirooznia M, Nagarajan V, Deng Y. Gene Venn - a web application for comparing gene lists using Venn diagrams. *Bioinformatics.* 2007; 420-422.
- Pratt DS, Kaplan MM. Liver and biliary tract disease, evaluation of liver function. E. Braunwald, A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Professional. 2001; 1711-1714.
- Presnell JK, Schreibman MP. *Humanson's animal tissue techniques*. The Johns Hopkins Univ. Press, London, 1997; 572.
- Randall DJ. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. *J Exp Biol.* 1982; 100:275 -288.
- Razaghi A, Villacrés C, Jung V, Mashkou N, Butler M, Owens L, Heimann K. Improved therapeutic efficacy of mammalian expressed-recombinant interferon gamma against ovarian cancer cells. *Experimental Cell Research.* 2017; 359(1): 20-29.
- Reis MI, do Vale A, Pinto C, Nascimento DS, Costa-Ramos C, Silva DS, Silva MT, Dos Santos NM. First molecular cloning and

- characterisation of caspase-9 gene in fish and its involvement in a gram negative septicemia. *Mol Immunol.* 2007; 44:1754-1764.
- Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology.* 2006; 16(10): 522-529.
- Risbourg SB, Bastide J. Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, teleostei) : an ultra structural study. *Aquat Toxicol.* 1995; 31:217-229.
- Robertsen B. The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20:172-191.
- Rollins, B.J. Chemokines. *Blood.* 1997; 90:909-928.
- Sakamaki K, Nozaki M, Kominami K, Satou Y. The evolutionary conservation of the core components necessary for the extrinsic apoptotic signaling pathway, in Medaka fish. *BMC Genom.* 2007; 8141.
- Sakamaki K, Takagi C, Kitayama A, Kurata T, Yamamoto TS, Chiba K, Kominami K, Jung SK, Okawa K, Nozaki M, Kubota HY, Ueno N. Multiple functions of FADD in apoptosis, NF-kappa B-related signaling, and heart development in *Xenopus* embryos. *Genes to Cells.* 2012; 17(11): 875-896.
- Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4): 778-809.
- Santana-de Anda K, Gómez-Martín D, Díaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J. Interferon regulatory factors: beyond the antiviral response and their link to the development of autoimmune pathology. *Autoimmun Rev.* 2011; 11:98-103.
- Schulte-Hermann R, Wogan GN, Berry C, Brown NA, Czeizel A, Giavini E,

- et al. Analysis of reproductive toxicity and classification of glufosinate-ammonium Regul Toxicol Pharm, 2006; 44(3):1-76.
- Seikai T. Acute toxicity of organophosphorous insecticides on the developmental stages of eggs, larvae and juveniles of Japanese striped knifejaw *Oplegnathus fasciatus*. Bull Jap Soc Sci Fish. 1982; 48:599-603.
- Settle WH, Ariawan H, Astuti ET, Cahyana W, Hakim AL, Hindayana D and Lestari AS. Managing Tropical Rice Pests Through Conservation of Generalist Natural Enemies and Alternative Prey. Ecology. 1996; 77: 1975-1988.
- Shaner DL. The impact of glyphosate-tolerant crops on the use of other herbicide sand on resistance management. Pest manag Sci. 2000; 56:320-326.
- Shelley LK, Ross PS, Miller KM, Kaukinen KH, Kennedy CJ. Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on general health, disease susceptibility and gene expression. Aquat Toxicol. 2012; 124:217-226.
- Shim JS, Self LS. Toxicity of agricultural chemicals to larvivorous fish in Korean rice fields. Trop Med. 1973; 15:123.
- Shipitalo MJ, Malone R W, Owens L.B. Impact of glyphosate-tolerant soybean and glufosinate-tolerant corn production on herbicide losses in surface runoff, J Environ Qual. 2008; 37:401-408.
- Stolte EH, Savelkoul HF, Wiegertjes G, Flik G, Lidy Verburg-van Kemenade BM. Differential expression of two interferon-gamma genes in common

- carp (*Cyprinus carpio* L.). Dev Comp Immunol. 2008; 32:1467-1481.
- Strazyewska E, Szarek J, Babinska I. Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment : a review. Veterinarni Medicina. 2016; 61(3): 123-132.
- Sun B, Robertsen B, Wang Z, Liu B. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. Dev Comp Immunol. 2009; 33:547-558.
- Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Terech-Majewska E, Banaszkiewicz T. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). Mar Environ Res. 2000; 20:263-266.
- Takashima F, Hibya T. An atlas of fish histology: normal and pathological features, 2nd ed. Tokyo, Kodansha. 1995.
- Takle H, McLeod A, Andersen O: Cloning and characterization of the executioner caspases 3, 6, 7 and Hsp70 in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2006; 144:188-198.
- Tanaka, M. Influence of different aquatic habitats on distribution and population density of *Misgurnus anguillicaudatus* in paddy fields. Japan J Ichthyol. 1999; 46:75-81.
- Tanguy A, Boutet I, Laroche J, Moraga D. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. FEBS J. 2005; 272(2):390-403.

- Tresguerres M, Katoh F, Orr E, Parks SK, Goss GG. Chloride uptake and base secretion in freshwater fish: a transepithelial ion-transport metabolon? *Physiol Biochem Zool.* 2006; 79:981-996.
- Tufts BL, Perry SF. Carbon dioxide transport and excretion. *Fish Physiol.* 1998; 17:229-281.
- Tufts BL, Esbaugh A, Lund SG. Comparative physiology and molecular evolution of carbonic anhydrase in the erythrocytes of early vertebrates. *Comp Biochem Physiol.* 2003; 136:259-269.
- Udroiu I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aqua Toxicol.* 2006; 79(2):201-204.
- Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review, *Vet Med.* 2011; 56:486-503.
- U.S. EPA. Freshwater Fish Acute Toxicity. Soluble Concentrate 200 g/ l. Data Evaluation Record Reviewed by Carol Natella, Health Effects Div. (Oct.21). U.S. EPA, Washington, DC, US. 1986.
- U.S. EPA. EEB Review. 128850. 8340-EI, EO, ET, GR (Dec. 20).1990a.
- U.S. EPA. Estuarine Fish Toxicity Test. HOE 039866 200 g/ l Soluble Concentrate. Data Evaluation Record Reviewed by K.D. Rhodes, KBN Eng. Appl. Sci., Inc (May 18). U.S. EPA, Washington, DC, US. 1990b.
- Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster JS, Singh KP, Menon S, Copeland NG, Gillbert Dj, Jenkins NA, Bacon KB, Zlotnik A. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity.* 1997; 7: 291-301.

- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009; 10:57-63.
- Wang X, Zhu S, Khan IA, Dasmahapatra AK. Ethanol attenuates Aldh9 mRNA expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryogenesis. *Comp Biochem Physiol B.* 2007; 146:357-363.
- Watanabe T, Santo T. Neurological effects of glufosinate poisoning with a brief review. *Human Exp Toxicol.* 1998; 17:35-9.
- Weber GJ, Sepulveda MS, Peterson SM, Lewis SS, Freeman JL. Transcriptome alterations following developmental atrazine exposure in zebrafish are associated with disruption of neuroendocrine and reproductive system function, cell cycle, and carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2013; 132:458-466.
- Webster TMU, Santos EM. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics.* 2015; 16:32.
- Wendler C, Wild A. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration. *Z Naturforsch.* 1990; 45:535-7.
- Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, Schubert F, Wood V, Goodhead I, Penkett CJ, Rogers J, Bähler J. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature.* 2008; 453:1239-1243.
- WHO. Glyphosate and AMPA in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. WHO, Geneva, Switzerland. 2005.
- Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A. Macrophages secrete

- a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med.* 1988; 167:570-581.
- Xiang RF. Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate (Rac) and Src Family Kinases (SFK) Are Proximal and Essential for Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Activation in Natural Killer (NK) Cell-mediated Direct Cytotoxicity against *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem.* 2016; 291(13): 6912-6922.
- Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*, 2010; 411:1570-1579.
- Yadete F, Karlsen OA, Lanzén A, Berg K, Olsvik P, Hogstrand C, Goksøyr A. Global transcriptome analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver after in vivo methylmercury exposure suggests effects on energy metabolism pathways. *Aquat Toxicol.* 2013; 126:314-325.
- Yoo JK, Lee SW, Ahn YJ, Nagata T and Shono T. Altered acetylcholinesterase as a resistance mechanism in the brown planthopper (Homoptera: Delphacidae), *Nilaparvata lugens* Stål. *App Entomol Zool.* 2002; 37:37-41.
- You KH, Choi CK, Choe RS, Deung YK. Ultrastructural Studies on Cadmium Poisoning in the Liver, Kidney and Gills of *Carassius carassius*. *J Electron Microscopy.* 1978; 33-38.
- Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, Ebert EC, Kassam N, Qin S, Zovko M, LaRosa GJ, Yang LL, Soler D, Butcher EC, Ponath PD, Parker CM, Andrew DP. Human G protein-coupled receptor Gpr-9-6/Cc chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes,

- and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med.* 1999; 190:1241-1256.
- Zhang J, Kong XF, Zhou C, Li L, Nie GX, Li XJ. Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: ligand specificity and signal pathways, *Fish Shellfish Immunol.* 2014a; 41:380-388.
- Zhang J, Chen L, Wei X, Xu M, Huang C, Wang W, Wang H. Characterization of a novel CC chemokine CCL4 in immune response induced by nitrite and its expression differences among three populations of *Megalobrama amblycephala*. *Fish Shellfish Immunol.* 2014b; 38:88-95.
- Zhang J, Li YX, Hu YH. Molecular characterization and expression analysis of eleven interferon regulatory factors in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015; 44:272-282.
- Zhao F, Li YW, Pan HJ, Shi CB, Luo XC, Li AX, Wu SQ. Expression profiles of toll-like receptors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2013; 35:993-997.
- Zikic RV, Stajn S, Pavlovic Z, Ognjanovic BI, Saicic ZS. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocyte and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiological Research.* 2001; 50:105-111.
- Zou J, Bird S, Truckle J, Bols N, Horne M, Secombes C. Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced

- form in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Eur J Biochem. 2004; 271(10):1913-1923.
- Zou J, Carrington A, Collet B, Dijkstra JM, Yoshiura Y, Bols N, Secombes C. Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. J Immunol. 2005; 175:2484-2494.
- 김자현, 한선영, 염동혁. 미꾸리의 생물지표를 이용한 농업지역의 수생태계 건강성 스크리닝 평가(사례연구). 한국농약과학회지. 2012; 16(1): 62-68.
- 남선화, 양창용, 안윤주, 이재관. 국내 생물종을 이용한 생태독성평가 기반 연구 : (I) 어류. Korean J. Limnol. 2007; 40(2):173-183.
- 농촌진흥청. 농약의 등록시험기준과 방법 (농촌진흥청 고시 2002_1호). 2002.
- 박연기, 박경훈, 주진복, 경기성, 김병석 신진섭, 류갑희, 배철한, 이규승. 벼 재배 논 서식 미꾸리에 대한 농약의 영향. 한국농약과학회지. 2003; 7(2):131-138.
- 박연기, 김병석, 신진섭, 배철한, 박경훈, 이제봉, 홍순성, 조경원, 이규승. 뷰타클로르의 송사리에 대한 독성시험. 한국농약과학회지. 2007; 11(4):254-260.
- 박연기, 김동수, 신진섭, 이제봉, 김병석, 박경훈, 배철한, 이규승. 벼재배용 제초제 molinate의 송사리에 대한 만성독성 영향. 한국농약과학회지. 2006; 4:92-92.
- 백진휘, 김준식, 이현규, 박현주, 하충진, 노형근. 다양한 신경학적 이상을 나타낸 glufosinate ammonium(바스타®) 급성 경구 중독 1례. 대한임상독성학회지. 2005; 3(2):103-106.

수산정보포털. 해양수산부. 2018. <https://portal.fips.go.kr/p/Main/>.

신천철, 이성규, 김영배, 김용화, 노정구. 농약에 대한 송사리의 생육단계별
감수성의 변화. 한국환경농학회지. 1987; 6(1):50-60.

정영호, 박영선. 농약학. 전국농업기술협회. 1990; 576 pp.

한국수자원공사. 하천환경 조사체계 구축방안 조사 보고서. 출현빈도순에
따른 국내 담수어류. 문선기획, 2001;522 pp.

한국작물보호협회. 농약연보. 2017; 522 pp.

