

사육수의 고수온 스트레스가 벤자리(*Parapristipoma trilineatum*)에 미치는 생리학적 영향

김기혁 · 홍성원¹ · 문혜나 · 여인규*

제주대학교 해양생명과학과, ¹한화 호텔&리조트

Physiological Responses of the Chicken Grunt *Parapristipoma trilineatum* to High Water Temperature Stress

Ki-Hyuk Kim, Sung-Won Hong¹, Hye-Na Moon and In-Kyu Yeo*

Department of Marine life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

¹Hanwha Hotels and Resorts, Jeju 63642, Korea

We investigated the effects of water temperature on physiological parameters in the chicken grunt *Parapristipoma trilineatum*. At high temperature, the aspartate aminotransferase (AST) and the alanine aminotransferase (ALT) levels were increased, suggesting that high temperature induced hepatic damage. In addition, total protein (TP) was high at high water temperatures, which were considered stressful in the breeding environment. At high water temperatures, triglycerides (TG) were low due to increased metabolic activity, which decreased the blood TG levels as TG were used as an energy source. There was no significant difference in the plasma osmolality or the blood ion concentrations with water temperature. In generally, lysozyme, a factor in innate immunity, increased with water temperature. However, lysozyme activity tended to decrease with increasing water temperature, but the difference was not significant. These results suggested that the decrease of biophylaxis at high temperature was affect the growth or survival of the population.

Key words: High temperature, Physiological parameters, Osmolality, Lysozyme, Chicken grunt

서 론

최근 지구 온난화의 영향으로 인해 우리나라 서, 동, 남해 지역의 표층 수온의 지속적인 상승이 보고되었으며(Seong et al., 2010), 전 세계 평균 수온이 산업혁명 이전인 지난 세기와 비교하여 0.76℃ 증가하고 향후 100년 이내에는 2℃ 이상 해수 수온이 증가될 것으로 예측하고 있다(Brewer, 1997). 이러한 영향으로 제주 연안에서는 관찰되지 않았던 아열대성 어류들의 출현이 증가하는 추세이며, 이에 따라 기존의 제주 토속어종들의 분포가 점차 변화될 것으로 예측되고 있다.

특히 벤자리(*Parapristipoma trilineatum*)는 농어목 하스돔과에 속하고 온대성의 연안성 어종으로 쿠로시오해류의 영향을 받는 연안의 깊은 곳이나 해조류가 많은 바위 지대에 서식하며 제주도과 추자도, 전남 홍도 등 여름철에서 초가을에 주로 활동

하며 제주도의 토속어종으로 알려져 있으나, 그 수가 감소하는 추세에 있다. 최근, 제주 신양리 연안 인공 어초 주변해역에서 서식하는 어류의 종 조성 및 계절변동을 조사한 결과를 보면, 벤자리는 수온이 감소하는 9월, 12월 및 3월에 주로 소량이 출현하였으며 그 다음해의 출현 빈도가 감소하는 추세에 있다고 보고하고 있다(Kim et al., 2011). 이러한 출현 양상의 변화는 가속화 되어가고 있는 아열대 환경으로 인해 제주 인근해역에서의 개체수가 줄어들고, 고수온의 영향으로 서식지의 변화가 유발되었을 것으로 추정되나, 그 원인에 대해서는 알려진 바 없는 실정이다.

한편, 벤자리는 최근 수족관의 관상 대상어종으로도 각광 받는 어종으로, 이들의 생태학적 특성은 둥근 공 형태의 fish ball을 형성하여 유영함으로써 대형 수조의 전시 생물로서 그 가치가 증가하고 있다. 따라서 대형수족관 등의 새로운 관상생물로

*Corresponding author: Tel: +82. 64.754. 3474 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address:ikyeyo99@jeju.ac.kr



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

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0714>

Korean J Fish Aquat Sci 51(6), 714-719, December 2018

Received 20 September 2018; Revised 13 November 2018; Accepted 14 December 2018

저자 직위: 김기혁(대학원생), 홍성원(대학원생), 문혜나(대학원생), 여인규(교수)

서 자원의 조사 및 생리학적 연구의 필요성이 대두되고 있으나 이에 대한 연구는 거의 없는 상황이다.

일반적으로 수온은 어류에 있어 성장과 번식, 분포에 중요한 영향을 미치는 요인 중 하나로 각 종마다 최적의 수온에 적응하며 생활한다(Shamseldin et al., 1997). 어류에 있어 수온 변화는 생체내의 대사, 삼투압 조절 및 면역 등 같은 생명활동의 변화를 초래하며 최종적으로 생명 유지도 위협하는 것으로 알려져 있다(Logue et al., 1995). 또한 수온 상승은 해양생물인 진복(*Haliotis discus*)의 성 성숙을 억제하며(Portner et al., 2005; Mueter and Litzow, 2008; Parker et al., 2013), 대구(*Gadus macrocephalus*)에서는 스트레스 증가 및 면역력 감소를 유발하여 성장률의 저하 및 폐사율의 증가를 나타내는 것으로 보고되고 있다(Choi et al., 2011).

이에 본 연구에서는 제주해역에서 벤자리의 개체수 변화와 수온 관계를 파악함과 동시에 전지 대상 어류에 대한 기초자료를 확보하고자 6월 제주도 해역 평균 수온인 20℃를 대조구로 설정하여 저수온 15℃와 고수온 25℃ 및 30℃ 총 4가지의 수온 환경에서의 벤자리에 대한 면역활성 및 혈액생리학적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육조건

본 실험에서는 평균 무게 187.8±20.4 g인 벤자리를 사용하였으며, 각 실험구에 각각 20미씩 수용하여 실험을 실시하였다. 실험 사육수는 1 ton 유리 사육조에서 수중펌프로 이용하여 물리적 화학적 여과를 하는 sand filter (Astral, Spain)로 여과하여 사용하였다. 여과된 사육수는 수온 조절장치를 이용하여 15℃, 20℃, 25℃ 및 30℃의 수온을 유지하였다. 사육 시 용존산소 및 pH는 각각 35.0±0.0 %과 8.0±0.0 ppm으로 모든 실험군에서 동일하게 유지하였다. 실험은 총 15일간 진행되었으며, 사육기간 동안 수온에 따른 실험구별 먹이섭취의 정도 차이가 영양대사의 변화를 초래할 가능성이 있어 본 실험에서는 먹이공급을 하지 않고 수온에 따른 영양대사 변화에 따른 혈액생리학적 변화만을 분석하고자 하였다.

혈액생리학적 분석

혈액은 15일간의 사육실험 종료 후, 각 그룹의 10마리 실험어에 2-phenoxyethanol로 마취 후 3 mL 주사기로 개체들의 미부 정맥에서 채취하였다. 채취한 혈액은 2,500 rpm, 10분간 원심 분리하여 상층액인 혈청을 분리 후 새로운 1.5 mL e-tube로 옮겨 -50℃에 보관한 후 분석을 실시하였다.

수온변화에 따른 혈중이온농도의 변화를 파악하기 위하여 혈액내의 Na⁺, K⁺, Cl⁻, Mg²⁺ 그리고 Ca²⁺를 각각 분석하였으며, 혈액 내의 삼투압은 삼투압 측정기(Vapor Pressure Osmometer 5600, Wescor Inc, South logan, USA)를 이용하여 분석을 실

시하였다.

혈액생화학적 분석은 생화학분석기(VET TEST 8008, Idexx, Colorado, USA)를 이용하여 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein (TP), triglyceride (TG) 및 glucose를 각각 조사하였다.

면역활성 분석

면역활성 분석을 위해 lysozyme 활성은 혈액에서 분리한 혈청을 이용하여 흡광도를 측정 후 lysis 전 후의 흡광도 차이를 비교하여 측정하였으며, 활성 단위(U)는 흡광도 0.001/min의 감소치를 1 unit으로 확인하였다.

통계 처리

본 실험의 모든 결과는 SPSS version 21 (SPSS Inc., USA)을 활용하여 One-way ANOVA-test로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 사후분석을 실시하여 측정하였으며, P<0.05에서 유의성을 판단하였다.

결과 및 고찰

사육수온에 따른 체조성의 변화는 어종마다 다르게 나타나므로 대상어종마다 수온변화에 대한 영향을 각각 평가할 필요가 있는 것으로 알려져 있다(Kim and Lee., 2017). 현재 우리나라 연안에는 이미 다양한 형태의 해양 생태의 환경파괴가 일어나고 있어, 본 연구에서는 지구온난화로 인한 제주 인근 해역의 수온상승에 있어 벤자리(*P. trilineatum*)의 개체수가 감소한다는 보고를 인지하여 서로 다른 수온에서 벤자리의 생리학적 변화에 어떤 영향을 미치는지에 관하여 관찰하였다. 4개의 다른 수온 환경에서 벤자리를 15일간 절식시켜 사육 실시 후 개체들의 성장을 확인한 결과 전체적으로 절식에 의한 체중의 감소가 15℃, 20℃, 25℃ 및 30℃의 실험구에서 각각 98.4%, 97.4%, 97.8% 및 95.2%의 결과를 나타내 수온의 상승에 따라 에너지 소모의 증가로 인한 체중 감소가 가속화되는 것으로 나타났다(Data not shown).

일반적으로 혈중 이온 농도의 변화는 외부 스트레스로 인하여 나타나는 것으로 알려져 있어(Schreck, 1982), 본 연구에서도 수온변화에 따른 혈중 Na⁺, K⁺, Cl⁻, Mg²⁺ 및 Ca²⁺의 이온농도와 혈장 내 삼투압을 각각 분석하였다(Fig. 1). 그 결과, Ca²⁺의 농도를 제외한 나머지 이온들은 수온의 변화와 상관없이 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 고수온인 30℃에서 높은 수치를 나타내었다(Fig. 1). Ca²⁺ 농도의 결과는 15℃에서 12.42±2.85 mg/dL, 20℃에서 12.92±0.77 mg/dL, 25℃에서 12.4±1.20 mg/dL 및 30℃에서 15.85±0.21 mg/dL로 저수온인 15℃와 25℃에서는 대조구인 20℃와 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 고수온인 30℃에서는 유의적으로 높은 수치를 나타내었다(Fig. 1E). 이러한 혈중의 이온 농도의 변화가 최종적인 체내 삼투압에 영향을 미치는지에 대한 결과를 조사한 결과, 수온과

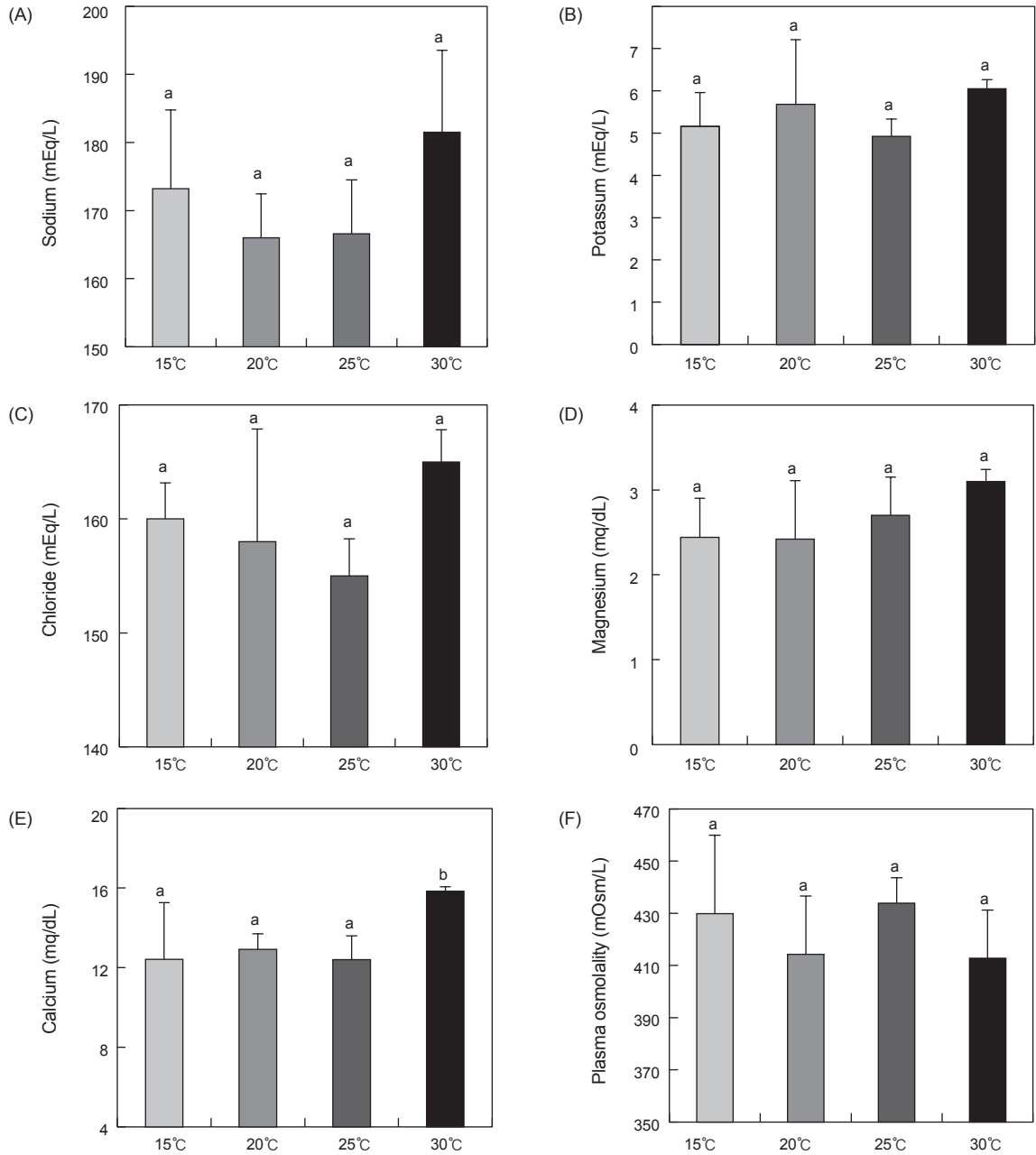


Fig. 1. Sodium (A), potassium (B), chloride (C), magnesium (D), calcium (E) and plasma osmolality (F) level in plasma of chicken grunt *Parapristipoma trilineatum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters (a, b) indicate significant difference between the values (P<0.05).

체내 삼투압과는 무관한 것으로 나타나 고수온의 환경 스트레스가 혈중 이온 항상성에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다(Fig. 1F). 그러나 Ca²⁺과 같은 2가 이온들은 생체 내에서 단백질 합성이 증가 되었을 때 혈중 Ca²⁺ 농도가 증가되는 것으로 보고되고 있어(Waring et al., 1996), 본 실험 결과에서 나타난 고수온에서의 Ca²⁺ 농도 또한 대사활동의 증대로 인하여 혈중

단백질 농도가 상승함에 따라 나타난 결과로 추정된다.

한편, 수온의 변화는 어류에게 1차적으로 스트레스 요인으로 작용하여 혈액 내 cortisol의 분비가 증가시키며, 2차적으로 간 세포 파괴에 의한 AST 및 ALT, glucose의 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Han et al., 2009). 본 연구 결과에서AST의 경우 15°C에서 33.5±11 U/L, 25°C에서 24.8±5.63 U/L로 대조

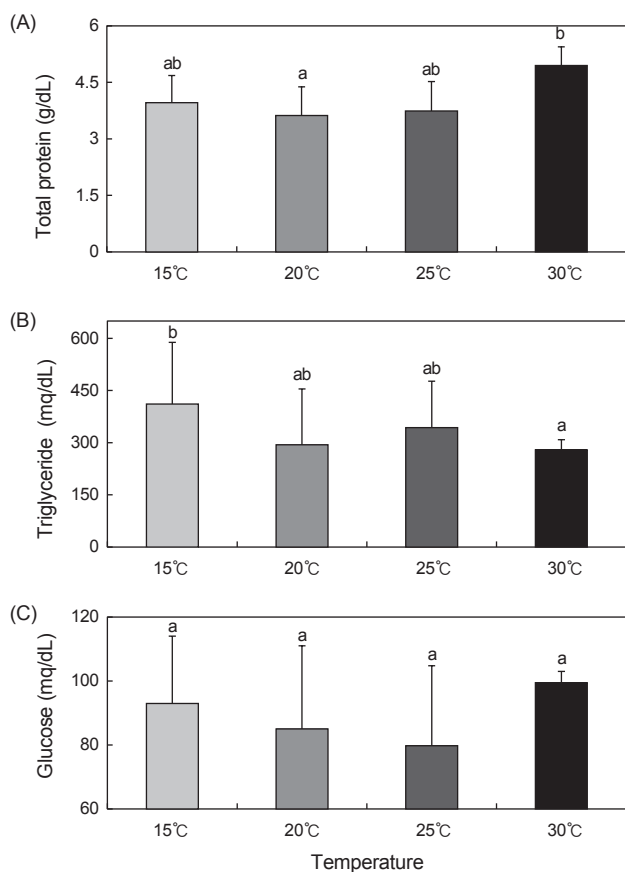


Fig. 2. Analysis of AST (A) and ALT (B) in serum of chicken grunt *Parapristipoma trilineatum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values (P<0.05). AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase.

구인 20°C의 62.25 ± 46.60 U/L에 비해 낮게 나타났고 고수온인 30°C에서는 125.5 ± 12.02 U/L로 타 실험구에 비해 유의하게 높게 나타났다(Fig. 2A). ALT에서도 AST의 결과와 유사하게 대조구에 비해 고수온인 30°C에서 유의하게 높은 수치를 나타냈다(Fig. 2B). 일반적으로 어체의 생리상태가 좋지 않을수록 간 손상이 유발되어 간 내의 아미노산 합성 효소인 AST 및 ALT의 혈중 농도가 증가하는 것으로 알려져 있어(Casillas et al., 1985; Rao, 1990), 본 실험에서 나타난 고수온에서의 혈중 AST 및 ALT 농도의 상승은 스트레스의 요인으로 작용하여 간 손상을 유발하는 것으로 판단된다.

수온의 변화에 따른 벤자리의 생체내 대사변화를 조사하기 위하여 total protein (TP), triglyceride (TRIG) 및 glucose를 각각 분석하였다(Fig. 3). 그 결과 TP는 대조구인 20°C에서 3.62 ± 0.71 g/dL를 나타냈으나, 고수온인 30°C에서 4.95 ± 0.49 g/dL로 나타나 타 실험구에 비해 유의하게 높은 수치를 나타냈다(Fig. 3A). 수온변화에 따른 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의

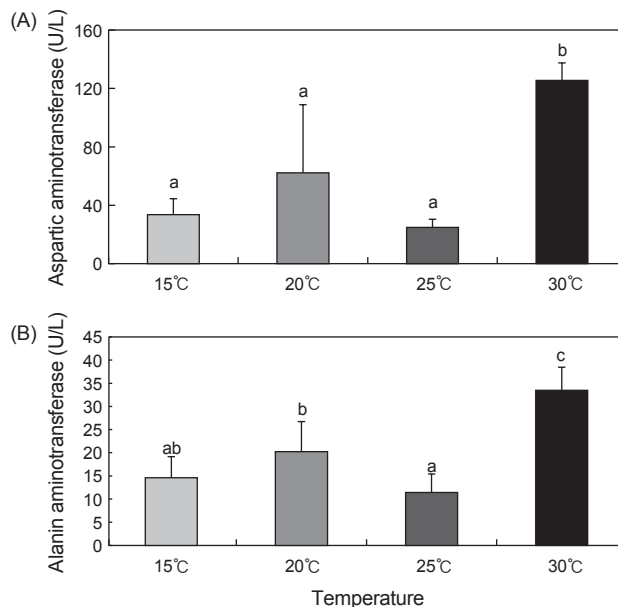


Fig. 3. Total protein (A), triglyceride (B) and glucose (C) level in plasma of chicken grunt *Parapristipoma trilineatum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters (a, b) indicate significant difference between the values (P<0.05).

혈중 TP는 일정한 변화 경향이 나타나지 않는 것으로 보고됐으며(Park et al., 1999), 고수온 사육 시 쏘가리(*Siniperca scherzeri*) 치어 성장 실험 결과 역시 실험 구간 유의한 차이를 나타내지 않았다고 보고됐다(Kim and Lee., 2017). 본 실험에서는 혈중 TP 농도의 상승을 유도하는 것으로 나타나 어종에 따른 수온 적응성이 차이를 가지며 이에 따라 개체군의 자원 변동에도 차이를 가질 수 있을 것으로 추정된다. 또한, TP는 어류의 건강 진단이나 영양 상태, 질병 진단에 이용되고 있으며 정상적인 경골어류의 경우 약 4-7 g/dL 농도 범위로 알려져 있다(Turner, 1937). 2016년 저수온 스트레스에 따른 능성어 혈액의 생리생화학적 반응 연구 결과에서 수온을 하강 시킨 실험구간에서 감소되는 경향을 보였다(Park et al., 2016). TRIG의 경우에는 저수온인 15°C에서 가장 높은 수치를 나타냈으며 수온이 상승함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3B). 일반적으로 TRIG는 수온, 먹이, 생식주기 및 성별 등에 의해 수치가 변화되는 것으로 보고되고 있으며, 생체내의 에너지 요구량이 증가하게 되면 혈중 TRIG가 세포내로 동원됨에 따라 감소하는 경향을 나타나게 된다(Lie et al., 1988). 본 실험의 결과에서도 고수온의 환경에서 에너지 요구량 증가에 따른 TRIG의 동원으로 인하여 혈중 농도가 타 실험구에 비해 감소된 것으로 판단된다. 그러나 혈중 glucose는 일반적으로 고수온과 같은 스트레스 작용으로 증가하는 경향을 보이는데 본 실험에서는 고수온인 30°C에서 99.5 ± 3.53 mg/dL로 다른 실험구에 비해 높은 수치를 나타내긴 하였으나, 개체 간의 편차가 심하여 유의한 차이는 나타나

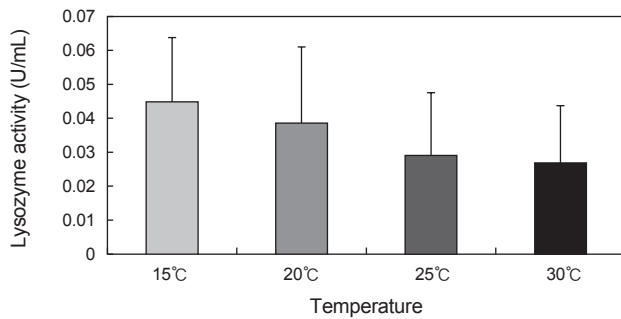


Fig. 4. Lysozyme activity in plasma of chicken grunt *Parapristipoma trilineatum*. Data are expressed as mean±SD, different superscript letters (a, b) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

지 않았다(Fig. 3C). 일반적으로 간손상이 발생하면 glucose의 수치가 높아지는데(Robertson et al., 1987), 넙치(*Paralichthys olivaceus*)와 쥐놀래미(*Hexagrammos agrammus*), 연어류의 수온 변화에 의한 스트레스 실험결과에서 저수온 보다 고수온에서 glucose의 혈중농도가 높게 측정되었으며(Chang et al., 2001), 수온 상승에 따른 스트레스 영향으로 glucose가 높게 나타난다고 보고되었다(Park et al., 1999). 이러한 결과로 추정하여 볼 때, 고수온 스트레스는 어류의 혈중 glucose 농도를 증가시켜 에너지 소비가 촉진되고 이에 따라 체중의 감소가 유발되는 것으로 판단된다. 또한, 수온 뿐 아니라 15일간의 절식에 의한 stress로 glucose의 농도가 증가한 것으로도 판단된다.

비특이적 면역활성 중 하나인 lysozyme은 어류 내재 면역시스템(innate immune system)의 중요한 방어체제로 작용한다고 보고되었으며, 세균 침입에 대한 초기방어 역할을 수행하며, 성별, 수온, pH, 독성물질노출, 감염 및 스트레스 정도에 따라 활성이 다양하게 나타난다(Saurabh and Sahoo, 2008). 또한, 스트레스 관련 호르몬인 cortisol과 마찬가지로 스트레스를 받을 경우 활성이 증가한 후 경시적으로 감소되는 것으로 보고되어 있다(Ma et al., 2013). 본 실험에서도 lysozyme활성을 측정된 결과 저수온인 15°C에서 $4.5 \times 10^2 \pm 1.8 \times 10^2$ U/mL로 나타났고 대조구인 20°C는 $3.4 \times 10^2 \pm 2.2 \times 10^2$ U/mL, 25°C는 $2.9 \times 10^2 \pm 1.8 \times 10^2$ U/mL 그리고 고수온인 30°C에서 $2.7 \times 10^2 \pm 1.6 \times 10^2$ U/mL로 수온상승에 따른 lysozyme 활성이 점차 감소하여, 저수온 실험구에 비해 고수온 실험구가 낮은 수치를 나타냈다(Fig. 4A). 본 실험의 결과를 종합하여 보면, 저수온 15°C와 고수온 25°C 및 30°C 총 4가지의 수온 환경에서의 벤자리에 대한 면역활성 및 혈액생리학적 변화는 고수온으로 수온이 증가함에 따라 lysozyme 활성은 감소하는 경향을 나타냈으며, AST 및 ALT 역시 고수온인 30°C에서 높은 수치를 나타냈다. 또한, 수온 상승에 따른 에너지 소모 증가로 체중 감소가 확인되었으며, 이온 농도 역시 증가되었다. 추후 면역 관련 유전자의 분석을 통해 고수온이 어떤 면역 인자를 자극하

는지에 대한 세부적인 검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2018년도 제주대학교 학술진흥연구 지원사업에 의하여 연구되었습니다.

References

- Brewer PG. 1997. Ocean chemistry of the fossil fuel CO₂ signal: The haline signal of “business as usual”. *GeoRL* 24, 1367-1369. <https://doi.org/10.1029/97GL01179>.
- Casillas E, Myers MS, Rhodes LD and McCain BB. 1985. Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. *J Fish Dis* 8, 437-449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb01277.x>.
- Chang YJ, Hur JW, Lim HK and Lee JK. 2001. Stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and fat cod (*Hexagrammos otakii*) by the sudden drop and rise of water temperature. *Korean J Fish Aquat* 34, 91-97.
- Han HK, Yoon SJ and Kim GH. 2009. Effects of compositae plants on plasma glucose and lipid level in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38, 674-682. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2009.38.6.674>.
- Choi YU, Oh SY and Park HS. 2011. Effects of stocking density and feeding frequency on the growth of the Pacific cod, *Gadus macrocephalus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 44, 58-63. <https://doi.org/10.5657/kfas.2011.44.1.058>.
- Kim JW, Kim HW, Hu SH and Kwak SN. 2011. Seasonal variation and species composition of fish species in artificial reefs in the Shinyang-Ri coastal waters off Jeju island, Korea. *J Kor Soc Fish Tech* 47, 118-127. <https://doi.org/10.3796/KSFT.2011.47.2.118>.
- Kim YO and Lee SM. 2017. Growth and body composition of mandarin fish *Siniperca scherzeri* reared at high water temperatures. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 756-761. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0756>.
- Lie Øyvind, Waagbø R and Sandnes K. 1988. Growth and chemical composition of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed dry and silage-based diets. *Aquacult Res* 69, 343-353. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90341-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90341-9).
- Logue JPT and Cossins AR. 1995. Heat injury and resistance adaptation in fish. *J Ther Biol* 20, 191-197. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(94\)00056-O](https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)00056-O).
- Ma Y, Liu Z, Yang Z, Li M, Liu J and Song J. 2013. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 34, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.005>.
- Mueter FJ and Litzow MA. 2008. Warming climate alters the

- demersal biogeography of a marginal ice sea. *Ecol Appl* 18, 309-320.
- Park MY, Chang YJ and Kang DY. 1999. Physiological response of the cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to the sharp changes of water temperature. *Aquacult Res* 12, 221-228.
- Parker LMR, Ross M, O'Connor WA, Pörtner HO, Scanes E and Wright JM. 2013. Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. *Biology* 2, 651-692. <https://doi.org/10.3390/biology2020651>.
- Pörtner HO, Langenbuch M and Michaelidis B. 2005. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. *JGR Oceans* 110. <https://doi.org/10.1029/2004JC002561>.
- Rao P. 1990. Histopathological and biochemical changes in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. *J Nat Conserv* 2 133-137.
- Robertson L, Thomas P, Arnold CR and Trant JM. 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling transport, rearing density, and disease outbreak. *Prog Fish-Cult* 49, 1-12. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1987\)49<1:PCASSR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1987)49<1:PCASSR>2.0.CO;2).
- Saurabh S and Sahoo PK. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture* 39, 223-239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>.
- Schreck CB. 1982. Stress and rearing of salmonids. *Aquacult Res* 28, 241-240. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90026-6).
- Seong KT, Hwang JD, Han IS, Go WJ, Suh YS and Lee JY. 2010. Characteristic for long-term trends of temperature in the Koreans waters. *J K Soc Mar Environ* 16, 353-360.
- Shamseldin A, Clegg JS, Friedman CS, Cherr GN and Pillai M. 1997. Induced thermotolerance in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Shellfish Res* 16, 487-489. <http://hdl.handle.net/10211.1/812>.
- Turner, C. L. 1937. Reproductive cycles and superfetation in poeciliid fishes. *Biol Bull* 72, 145-164.
- Waring CP, Stagg RM and Poxton MG. 1996. Physiological responses to handling in the turbot. *J Fish Biol* 48, 161-173. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01110.x>.