



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](#)

수 산 학 박 사 학 위 논 문

바다 송사리 *Oryzias dancena*와  
자바 송사리 *O. javanicus* 간 잡종의  
세포유전학적 및 생식생물학적 특징



2010년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

송 하 연

수 산 학 박 사 학 위 논 문

바다 송사리 *Oryzias dancena*와 자바 송사리 *O. javanicus* 간  
잡종의 세포유전학적 및 생식생물학적 특징



부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

송 하 연

송하연의 수산학박사 학위논문을 인준함.

2009년 12월



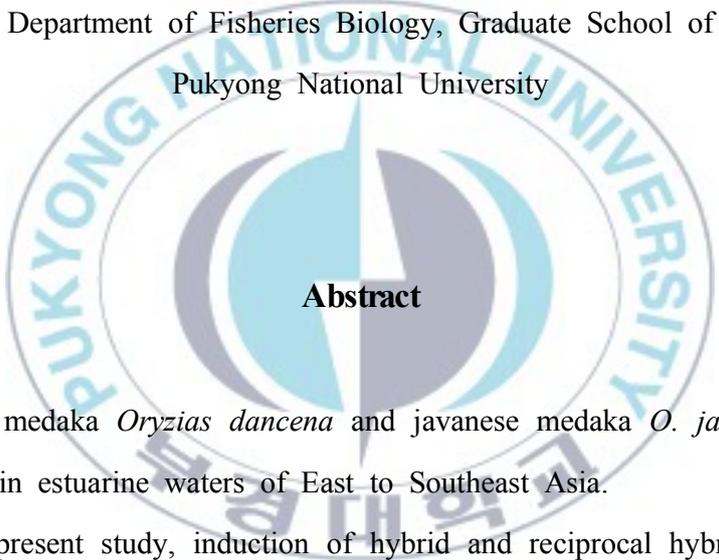
The logo of Pukyong National University is a circular emblem. It features a central stylized figure resembling a compass needle or a lightning bolt, with a blue and grey color scheme. The outer ring of the logo contains the text 'PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY' in English at the top and '부경대학교' in Korean at the bottom.

주	심	이 학 박사	조	재	윤	인
위	원	수산학박사	방	인	철	인
위	원	수산학박사	노	충	환	인
위	원	수산학박사	남	윤	권	인
위	원	이 학 박사	김	동	수	인

Cytogenetic and reproductive characteristics of  
interspecific hybrids between marine medaka *Oryzias dancena*  
and javanese medaka *O. javanicus*

Ha Yeun Song

Department of Fisheries Biology, Graduate School of  
Pukyong National University



**Abstract**

Marine medaka *Oryzias dancena* and javanese medaka *O. javanicus* are distributed in estuarine waters of East to Southeast Asia.

In the present study, induction of hybrid and reciprocal hybrid between *O. dancena* and *O. javanicus* (ODJ and OJD) were performed for biological and cytogenetic analysis and to induce sex reversal. Back cross hybrid between female *O. dancena* and male ODJ were produced for examine its effect on early embryogenesis.

The egg development and morphological changes of larvae, juveniles and adults of *O. dancena*, *O. javanicus* and their hybrids showed no difference in the parents group and hybrids. However, there were time

differences from the development stage. Fertilized eggs were incubated at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and embryonic development process was observed by light microscopy based on diagnostic features of the developing embryos. The time to blastodisc stage was almost identical in all experiment groups. The development time to the formation of tubular heart stage was 2 days 1 hour 30 minutes which were similar between *O. dancena* and ODJ. The time difference began to be observed from the development stage which is the heart beating stage, in *O. dancena* and ODJ. The time to reach this stage was 2 days (d) 4 hours (hr) and 2 d 5 hr 30 min for *O. dancena* and ODJ respectively. In *O. javanicus* and OJD, it took 22 hr 30 min from late gastrula stage which was similar in both species. However, the development of OJD becomes slower from the next stage to the beginning of early neurula stage. It took 1 d 6 hr 30 min for *O. javanicus* whereas, 1 d 7 hr for OJD. The time of the development stage was the fastest in *O. dancena* and ODJ, *O. javanicus* and OJD followed next. The *O. dancena* was hatched 11 d after fertilization, ODJ at 13 d, *O. javanicus* at 14 d and OJD at 15 d.

Osteological development of *O. dancena* was investigated using cartilage and bone staining. Newly hatched larvae attained a mean of  $4.4 \pm 0.2$  mm in total length (TL) and, at this stage, the lateral ethmoid, frontal, asupraoccipital and exoccipital already showed ossification. At this moment, ossification of the maxilla, premaxilla, pterotic was on process. In parietal and pterotic, the ossification took place 4 days after hatching at  $4.6 \pm 0.2$  mm TL. Calcification in the lateral ethmoid, frontal, supraoccipital,

exoccipital and vertebrae began 9 weeks after hatching (mean =  $22.6 \pm 2.7$  mm in TL). Calcification in maxilla, premaxilla and pterotic began 9 weeks after hatching at  $32.1 \pm 2.4$  mm TL. Simultaneously, calcification of caudal fin, dorsal fin and anal fin were observed. The calcified pectoral fin was first observed at 9 week after hatching and reached complete calcification at 12 week. Aggregate bone ossification and calcification of *O. dancena* was completed at week 12 after hatching.

Sex differentiation and gonad development were investigated in a marine medaka species, *O. dancena*. Primordial germ cell (PGC) was first observed at 5 dpf and migrated to presumptive gonadal area between the gut and pronephric duct at 9 dpf. The morphological differentiation between male and female gonads was identifiable at 12 days post-hatching (dph). Early oocytes at perinucleolus stage as well as the formation of spermatid and efferent duct were observed at 28 dph. At 6 weeks of age, the ovary exhibited the yolk granulation in many oocytes while testis possessed a considerable number of spermatogonium and spermatid. The first ovulation was observed in 9-week-old females, and at the same age, males contained fully-matured spermatozoa. Data obtained from this study indicates that the gonad differentiation of *O. dancena* is the typical type of differentiated gonochorism.

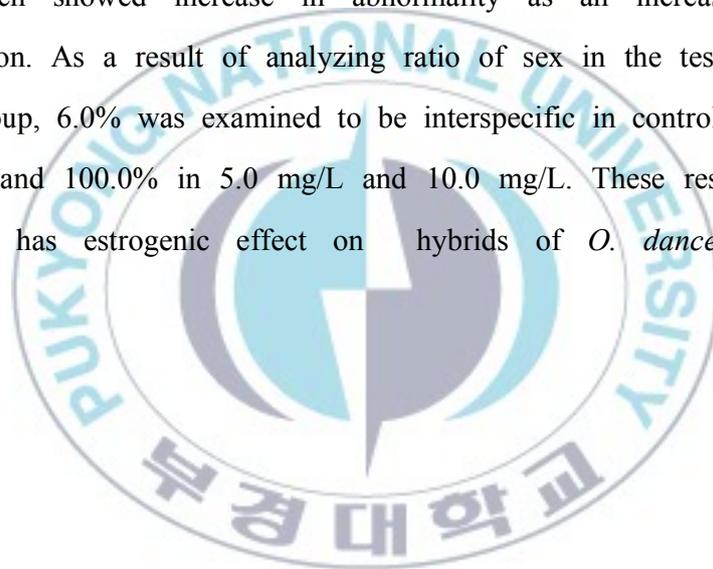
Cytogenetic analysis was performed to obtain basic information for genetic identification of *O. dancena*, *O. javanicus* and their hybrids. The karyotype of all experimental groups showed  $2n=48$  chromosomes consisting of 24 pairs of acrocentrics and fundamental number (NF) was 48 and the

first pair carried secondary constrictions near the centromeric regions. Erythrocyte area and volume of *O. dancena* were  $9.8 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$  and  $18.2 \pm 1.0 \mu\text{m}^3$  respectively,  $8.3 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$  and  $15.8 \pm 1.5 \mu\text{m}^3$  in *O. javanicus*, and  $18.3 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$  and  $15.7 \pm 1.3 \mu\text{m}^3$  in ODJ. The erythrocyte area and volume of ODJ were similar to those of *O. javanicus*. In the flow cytometric analysis, cellular DNA content was  $1.8 \pm 0.1 \text{ pg/cell}$  in *O. dancena*. Frequency distribution of erythrocyte nucleolar organizer regions (NORs) of *O. dancena* and *O. javanicus* showed 1 per cell (*O. dancena*: 20.5%, *O. javanicus*: 12.2%) or 2 per cell (*O. dancena*: 78.0%, *O. javanicus*: 88.8%) respectively.

The rate of abnormality in ODJ and OJD was 10.6% and 90.5%. OJD showed high degree of abnormality such as growth retardation and edema. The proportion of males was 90.0% and 31.3% for ODJ and OJD, respectively. Although the morphological characteristics of hybrids were similar to those of *O. javanicus*, there were no differences in the number of ray nodes and vertebrae between hybrids and parental species. As a result of observing early egg development of the back cross between female *O. dancena* and ODJ hybrids, all the embryos were dead at late gastrula stage.

Bisphenol A (BPA) is mainly used in the production of epoxy resins and polycarbonate plastics, which is a known endocrine disruptor and acutely toxic to aquatic organisms. In this study, estrogenic effect of BPA was investigated on ODJ. ODJ were exposed to various concentrations (eg. 2.5 mg/L, 5.0 mg/L and 10.0 mg/L) for 56 days. The growth rate,

abnormality and the ratio of female and male were observed in test group and control group. As a result, the growth was  $14.7 \pm 2.0$  mm in TL in 2.5 mg/L,  $13.7 \pm 2.5$  mm in 5.0 mg/L,  $12.8 \pm 2.5$  mm in 10.0 mg/L in test group while it was  $18.0 \pm 1.2$  mm in TL in control group which was not treated with bisphenol A. The result showed that the growth decreased as the concentration of BPA increased. The abnormality rate was 13.6% in control group, 65.4% in 2.5 mg/L, 81.3% in 5.0 mg/L and 98.1% in 10.0 mg/L which showed increase in abnormality as an increase of BPA concentration. As a result of analyzing ratio of sex in the test group and control group, 6.0% was examined to be interspecific in controls, 76.9% in 2.5 mg/L and 100.0% in 5.0 mg/L and 10.0 mg/L. These results suggest that BPA has estrogenic effect on hybrids of *O. dancena* and *O. javanicus*.



# 목 차

영문요약 (Abstract) .....	I
목차 (Content) .....	VI
표목차 (List of Tables) .....	XI
그림목차 (List of Figures) .....	XIV
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	8
1. 재료 .....	8
1) 실험어의 확보 및 사육 유지 .....	8
2. 방법 .....	8
1) 바다송사리 <i>O. dancena</i> 에 대한 발생·생물학적 연구 .....	8
(1) 난발생 및 자치어의 형태 발달 .....	8
1.1. 수정란의 수집과 관찰 .....	8
1.2. 자치어의 사육 관찰 및 성장 조사 .....	9
(2) 성장 .....	9
(3) 골격 형성 .....	10
3.1. 표본 고정 .....	10
3.2. 골격 염색 및 관찰 .....	10
(4) 성분화 및 초기 생식소 형성 .....	11

4.1. 산란 유도 및 사육 .....	11
4.2. 표본 채집 및 크기 측정 .....	11
4.3. 조직학적 분석 .....	11
(5) 세포유전학적 분석 .....	12
5.1. 적혈구 계측 .....	12
5.2. 적혈구의 nucleolar organizer regions (NORs) .....	12
5.3. DNA 함량 분석 .....	13
5.4. 염색체 수 및 핵형 분석 .....	13
2) 자바 송사리 <i>O. javanicus</i> 에 대한 발생·생물학적 연구 .....	14
(1) 난발생 및 자치어의 형태 발달 .....	14
1.1. 수정란의 수집과 관찰 .....	14
1.2. 자치어의 사육, 형태 발달 및 성장 조사 .....	14
(2) 세포유전학적 분석 .....	15
2.1. 적혈구 계측 .....	15
2.2. 적혈구의 nucleolar organizer regions (NORs) .....	15
2.3. 염색체 수 및 핵형 분석 .....	15
3) 바다 송사리와 자바 송사리 간의 잡종, 상반 잡종 및 역교배체 유도 .....	16
(1) 방법 .....	16
1.1. 바다 송사리와 자바 송사리 간의 잡종 .....	16
1.2. 상반 교배(reciprocal hybrid cross) 유도 .....	16
1.3. 역교배체(back cross) 유도 .....	16
(2) 난발생 조사 .....	18

(3) 수정율, 부화율 및 기형률 측정 .....	18
(4) 적혈구 계측, 염색체 수 및 핵형 분석 .....	18
4.1. 적혈구 계측 .....	18
4.2. 염색체 수 및 핵형 분석 .....	19
(5) 잡종의 성장 측정 .....	19
(6) 형태학적 조사 .....	19
6.1. 표본 채집 및 외형 조사 .....	19
6.2. 계측형질 및 계수형질 측정 .....	20
(7) 성비 .....	21
7.1. 형태학적 분석 .....	21
7.2. 조직학적 분석 .....	21
4) 비스페놀 A (Bisphenol A)에 의한 잡종의 성전환 .....	21
(1) 비스페놀 A 용액 제조 및 반수치사농도 평가 .....	21
(2) 성전환 유도를 위한 비스페놀 A 침지 처리 .....	23
(3) 성장률 및 기형률 측정 .....	23
(4) 조직학적 분석 .....	23
5) 통계 처리 .....	24
III. 결과 .....	25
1. 바다 송사리에 대한 발생·생물학적 연구 .....	25
1) 난의 형태 및 난발생 과정 .....	25
2) 자치어 및 성어의 형태 발달 과정 .....	31
3) 성장 조사 .....	40

4) 골격 형성 .....	40
5) 성분화 및 생식소 형성 .....	47
(1) 초기 생식소 형성 .....	47
(2) 난소의 분화 .....	48
(3) 정소의 분화 .....	49
6) 세포유전학적 분석 .....	54
(1) 적혈구 세포 및 핵의 크기 .....	54
(2) 적혈구의 nucleolar organizer regions (NORs) 분석 .....	54
(3) DNA 함량 분석 .....	54
(4) 염색체 수 및 핵형 분석 .....	54
2. 자바 송사리에 대한 발생·생물학적 연구 .....	58
1) 난의 형태 및 난발생 과정 .....	58
2) 성장 조사 .....	58
3) 세포유전학적 분석 .....	58
(1) 적혈구 세포 및 핵의 크기 .....	58
(2) 적혈구의 nucleolar organizer regions (NORs) 분석 .....	59
(3) 염색체 수 및 핵형 분석 .....	59
3. 바다 송사리와 자바 송사리 간의 잡종 유도, 상반 잡종 및 역교배체 유 도 .....	64
1) 바다 송사리와 자바 송사리 간의 잡종 및 상반 잡종 .....	64
(1) 난발생 과정 .....	64
(2) 수정율, 부화율 및 기형률 조사 .....	67
(3) 성장 조사 .....	67

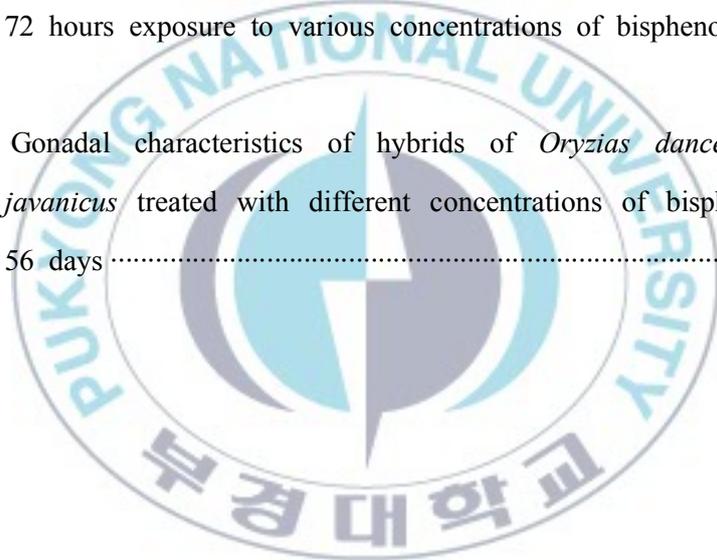
(4) 세포유전학적 분석 .....	68
4.1. 적혈구 세포 및 핵의 크기 .....	68
4.2. 염색체 수 조사와 핵형 분석 .....	68
(5) 형태학적 조사 .....	73
5.1. 외형 .....	73
5.2. 계측형질 및 계수형질 분석 .....	74
(6) 성비 .....	76
6.1. 형태학적 분석 .....	76
6.2. 조직학적 분석 .....	76
2) 바다 송사리와 자바 송사리 간의 역교배체 .....	77
(1) 수정율, 초기 난발생 및 부화율 .....	77
4. 잡종의 비스페놀 A (Bisphenol A)에 의한 성전환 유도 .....	88
1) 비스페놀 A 예비 농도 실험 .....	88
2) 성장률과 기형률 측정 .....	88
3) 비스페놀 A에 의한 성전환 .....	95
IV. 고찰 .....	96
국문요약 .....	115
감사의 글 .....	120
참고문헌 .....	122

## 표 목차(List of Tables)

Table 1. Genotype abbreviations .....	17
Table 2. Embryonic and morphological development of <i>Oryzias dancena</i> .....	27
Table 3. Growth in total length (A) and body weight increase (B) of <i>Oryzias dancena</i> .....	42
Table 4. Erythrocyte measurement of <i>Oryzias dancena</i> .....	55
Table 5. Genome size of <i>Oryzias dancena</i> determined by flow cytometry .....	56
Table 6. Embryonic and morphological development of <i>Oryzias javanicus</i> .....	60
Table 7. Growth in total length of <i>Oryzias javanicus</i> .....	61
Table 8. Erythrocyte measurement of <i>Oryzias javanicus</i> .....	62
Table 9. Characteristics of egg development in interspecific hybrids between <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> (ODJ & OJD) .....	65
Table 10. Percent fertilization, hatching and abnormality in <i>Oryzias dancena</i> (OD), <i>O. javanicus</i> (OJ) and interspecific hybrids between <i>O.</i>	

<i>dancena</i> and <i>O. javanicus</i> (ODJ & OJD) .....	66
Table 11. Erythrocyte measurement of hybrids (ODJ) of <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> .....	70
Table 12. Chromosome counts of reciprocal hybrids between <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> , along with their parental species .....	72
Table 13. Numbers of dorsal, pectoral, anal and caudal fin rays and vertebra of <i>Oryzias dancena</i> (OD), <i>O. javanicus</i> (OJ) and their hybrids (ODJ and OJD) .....	80
Table 14. Comparison of body proportion between <i>Oryzias dancena</i> (OD) and <i>O. javanicus</i> (OJ) .....	81
Table 15. Comparison of body proportion ratios of hybrid (ODJ) with their parental species, <i>Oryzias dancena</i> (OD) and <i>O. javanicus</i> (OJ) .....	82
Table 16. Comparison of body proportion ratios of hybrid (OJD) with their parent species, <i>Oryzias dancena</i> (OD) and <i>O. javanicus</i> (OJ) .....	83
Table 17. Sex ratios of <i>Oryzias dancena</i> (OD), <i>O. javanicus</i> (OJ) and their hybrids (ODJ and OJD) by outside sexual characteristic analysis .....	84

Table 18. Sex ratios of <i>Oryzias dancena</i> (OD), <i>O. javanicus</i> (OJ) and their hybrids (ODJ and OJD) by histological analysis of gonads .....	85
Table 19. Fertilization rates, late gastrula rates and hatching rates of ODDJ produced from crossed with <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. dancena</i> x <i>O. javanicus</i> (ODJ) .....	86
Table 20. Mortality rate of hybrids of <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> after 72 hours exposure to various concentrations of bisphenol A .....	89
Table 21. Gonadal characteristics of hybrids of <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> treated with different concentrations of bisphenol A for 56 days .....	92



## 그림 목차(List of Figures)

Fig. 1. Morphological measurements used to compare <i>Oryzias dancena</i> , <i>O. javanicus</i> and their hybrid .....	22
Fig. 2. Egg developmental stages of <i>Oryzias dancena</i> . stage 0 - stage 4 .....	33
Fig. 3. Egg developmental stages of <i>Oryzias dancena</i> . stage 5 - stage 10 .....	34
Fig. 4. Egg developmental stages of <i>Oryzias dancena</i> . stage 11 - stage 16 ..	35
Fig. 5. Egg developmental stages of <i>Oryzias dancena</i> . stage 17 - stage 22 ..	36
Fig. 6. Egg developmental stages of <i>Oryzias dancena</i> . stage 23 - stage 28 ..	37
Fig. 7. Morphological development of the larvae and juvenile of <i>Oryzias dancena</i> .....	38
Fig. 8. Morphological development of adult fish of <i>Oryzias dancena</i> .....	39
Fig. 9. Development of skull of <i>Oryzias dancena</i> .....	43
Fig. 10. Development of pectoral fin of <i>Oryzias dancena</i> .....	44
Fig. 11. Development of anal fin of <i>Oryzias dancena</i> .....	45

Fig. 12. Development of dorsal fin and caudal fin of <i>Oryzias dancena</i> .....	46
Fig. 13. Photographs for HE-stained cross sections of undifferentiated gonads from the <i>Oryzias dancena</i> .....	50
Fig. 14. Representative photographs for HE-stained cross sections of differentiated ovary from the <i>Oryzias dancena</i> .....	51
Fig. 15. Representative photographs for HE-stained cross sections of differentiated testis from the <i>Oryzias dancena</i> .....	52
Fig. 16. Photographs of fully matured ovary (A) and testis (B) in <i>Oryzias dancena</i> at 9 weeks after hatching .....	53
Fig. 17. Photographs of erythrocytes (A) and silver-stained erythrocytes (B) of <i>Oryzias dancena</i> .....	55
Fig. 18. Metaphase and idiogram of <i>Oryzias dancena</i> .....	57
Fig. 19. Photographs of erythrocytes (A) and silver-stained erythrocytes (B) of <i>Oryzias javanicus</i> .....	62
Fig. 20. Metaphase and idiogram of <i>Oryzias javanicus</i> .....	63

Fig. 21. Comparisons of growth in total length of <i>Oryzias dancena</i> (OD), <i>O. javanicus</i> (OJ) and <i>O. dancena</i> (♀) and <i>O. javanicus</i> (♂) hybrid (ODJ) .....	69
Fig. 22. Metaphase and idiogram of hybrid between <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> .....	71
Fig. 23. External morphology of <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> used in this experiment .....	78
Fig. 24. External morphology of hybrid of between <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> .....	79
Fig. 25. Egg development of <i>Oryzias dancena</i> and ODJ ( <i>O. dancena</i> x <i>O. javanicus</i> ), OD x ODJ .....	87
Fig. 26. Growth in total length (TL) of <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> hybrids (ODJ) treated with different concentrations of bisphenol A (BPA) for 56 days .....	90
Fig. 27. Rates of abnormalities of <i>Oryzias dancena</i> and <i>O. javanicus</i> hybrids (ODJ) treated with different concentration of bisphenol A (BPA) for 56 days .....	91

Fig. 28. Histological characteristics of gonads of *Oryzias dancena* and *O. javanicus* hybrids (ODJ) treated with different concentration of bisphenol A (BAP) for 56 days ..... 93

Fig. 29. Histological characteristics of gonads of *Oryzias dancena* and *O. javanicus* hybrids (ODJ) treated with different concentration of bisphenol A (BAP) for 56 days ..... 94



## I. 서론

송사리는 동갈치목(Beloniformes) 송사리과(Adrianichthyidae)에 속하는 경골어류로 인도와 일본에서부터 인도-오스트렐리아 군도 지역에 서식한다. 송사리과 중 *Oryzias* 속은 전 세계에 22종이 보고되어 있으며(Robert, 1998; Parenti and Soeroto, 2004; Nelson, 2006), 어종에 따라 담수, 기수 그리고 해수에서 서식하는 것으로 보고되어 있다(Naruse et al., 1993). 이 중 일본 송사리 *Oryzias latipes*는 담수에 서식하는 송사리로서 세대 주기(generation time)가 짧고, 실험실 소형 수조에서 전 생활사의 관리가 용이하며, 유전체 크기(genome size)가 작고, 또한 많은 유전자 정보가 발굴·축적되어 있기 때문에 척추동물의 발생유전학(developmental genetics), 생태독성학(ecotoxicology), 유전체학(genomics)에 실험 모델 동물로 유용하게 사용되고 있다(Naruse et al., 1993; Ishikawa, 2000; Wittbrodt et al., 2002). 그러나 담수 어인 *O. latipes*는 해수 조건에서 생존율, 산란력, 수정율 그리고 부화율 등이 현저히 떨어지므로 해양생태계 위해성 평가 연구에 직접 이용할 수 없다. 때문에 *Oryzias* 속에서 *O. latipes*의 장점을 공유할 수 있는 바다 송사리 모델을 개발할 필요성이 대두되었고, 이에 자바 송사리 *O. javanicus*와 바다 송사리 *O. dancena*가 해양 생태계 위해성 평가용 어류모델로서 그 가능성을 인정받고 있다(Kakuno et al., 2001; Inoue and Takei, 2003; Kang et al., 2008).

본 연구에 사용된 바다 송사리는 파키스탄, 인도, 미얀마, 방글라데시 및 태국 등지에 넓게 분포하고 있으며(Robert, 1998), 기수에 서식하고 있어 염분 농도에 대한 내성이 강한 광염성 어류이다(Inoue and Takei, 2003). 그리고 자바 송사리는 싱가포르, 말레이 반도 및 태국 등지의 해변에 서식하

고 있는 종으로(Robert, 1998), 바다 송사리와 같이 염분도 농도에 대한 내성이 강해 삼투압 적응 메커니즘(Inoue and Takei, 2003; Kang et al., 2008)의 연구에 많이 이용되고 있다. 이외에도 성결정 기작(Takehana et al., 2007b) 그리고 분류·계통학적 연구(Takehana et al., 2005)등에 관한 연구결과가 보고되었지만, 그 이외에 생물학 및 유전학적 특성에 관한 연구들은 거의 보고된 바 없다.

송사리류의 난발생과 자치어의 형태 발달은 *O. latipes*를 대상으로 이전부터 많은 연구가 이루어졌으며(Iwamatsu, 2004; Hiraki and Iwamatsu, 1979; Yamamoto, 1975), 대륙송사리 *O. sinensis* (박과 최, 1998)와 자바 송사리(Iwamatsu and Hirata, 1984)의 난발생과정 및 자어의 성장 등이 보고된 바 있다. 이에 본 연구에서는 바다 송사리와 자바 송사리 그리고 이들 간의 잡종군들의 난발생 과정과 발육단계에 따른 자치어와 성어의 형태 발달에 대하여 조사하였다.

척추동물의 골격은 개체의 형태형성에 필요한 기본 구조로 다양한 종류의 기관을 보호함으로써 개체의 생존은 물론 종의 진화를 추적하는데 중요한 지표가 된다(Weisel, 1967). 즉, 골격화(ossification)에 대한 연구는 구성골의 형태적 분화에 따른 수적 증감과 골질 축적 및 골질 변화에 의해 완성되며 그 양상이 분류군에 따라 특이하다. 따라서 어류의 골격 발생에 관한 자료는 종의 해부학적 이해뿐만 아니라 어류의 발생 및 계통 연구상 매우 중요하다(Weisel, 1967). 또한, 골격 발달은 그들의 생활 방식에 따라 골화 정도와 순서에 변화를 초래하여 종마다 다양한 양상을 나타내기 때문에 자치어의 골격 골화 과정의 관찰이 필요하다(Mook, 1977). 국내에서의 어류 자치어의 골격 발달에 대한 연구는 졸복 *Takifugu pardalis* (한 등, 2005), 복섬 *Takifugu niphobles* (한 등, 2003), 쏘가리 *Siniperca scherzeri* (명 등, 2001), 준치 *Ilisha elongata* (한 등, 2000), 점박이 송사리 *Rivulus ocellatus*

*marmoratus* (이 등, 1991) 등의 연구가 이루어졌다. 하지만, *Oryzias* 속에 속하는 종들 중에서는 *O. celebensis*, *O. melastigma*, *O. javanicus*, *O. minutillus*, *O. latipes*와 *O. mekongensis*의 ethmoid (두개골의 가운데 뼈) 부분에 대한 형태 비교 연구(Iwamatsu, 1986)와 *O. latipes*의 골격 연구(Iwamatsu et al., 2009; Yabumoto and Uyeno, 1984)가 되어 있으나, 자치어부터 이들의 골격화를 조사한 연구는 없다. 따라서 본 연구는 부화 직후부터 12주까지 개체의 성장에 따른 골격의 발달과정을 관찰함으로써 본 종의 골격에 관한 기초 해부학적 자료를 축적하고자 하였다.

어류는 자웅동체(hermaphroditism)에서 자웅이체(gonochorism)까지 다양한 성(sex) 유형을 가지고 있으며, 수온 등 물리적 환경조건이나 성호르몬 투여 등 내분비적 자극을 통해 어류의 성분화(sex differentiation) 방향 및 진행 등을 조절할 수 있기 때문에 하등 척추동물의 성분화 기작 연구에 매우 유용한 모델 시스템을 제공할 수 있다(Devlin and Nagahama, 2002). 대부분의 어류는 자웅이체형으로 개체 발생 후기에 성이 결정되며, 개체 발생을 하는 동안 미분화 생식소가 암컷 생식소 형태를 거쳐 정소 또는 난소로 분화하는 미분화형 자웅이체(undifferentiated type of gonochorism)와 직접 난소나 정소로 분화하는 분화형 자웅이체(differentiated type of gonochorism)로 구분된다. 그러나 어류는 미분화형과 분화형 간의 뚜렷한 구별이 매우 어렵고, 성의 분화 시기도 각 종에 따라 서로 다르게 나타난다(Yamamoto, 1969; Devlin and Nagahama, 2002). *Oryzias* 속 송사리들의 경우 *O. latipes*를 위시하여 성결정 기작, 원시생식세포(primordial germ cell; PGC) 등의 연구가 계속 진행되어 왔으나(Satoh and Egami, 1972; Hamaguchi, 1992; Herpin et al., 2007), 같은 *Oryzias* 속에 속하는 근연종들 일지라도 서식환경, 성분화 기작 그리고 성결정 유전자(sex determination gene) 등에 있어 서로 많은 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(Satoh and Egami, 1972; Takehana et al.,

2007b; Takehana et al., 2008). 특히, 바다 송사리의 경우 성분화, 성결정 유전자 및 난발생(embryogenesis) 등 기초적인 생리·생물학적 연구가 거의 이루어지지 못한 상태이다. 따라서 바다 송사리의 초기 성분화와 생식소발달에 관한 조사를 통하여 난발생 및 성결정에 대한 자료를 제시하고자 하였다.

어류에 있어 유전학적 종의 동정(genetic stock identification)은 그 생물의 기초 자료를 얻는 것뿐만 아니라, 유전·진화학적 측면에서 종간의 유연관계를 밝히는데 있어 매우 중요하며(Gold and Amemiya, 1987; Szarski, 1976), 현재 다음과 같은 몇 가지 방법이 사용되고 있다. 첫 번째로 적혈구 세포 및 핵의 크기 분석 방법은 세포 유전학적 분석에 있어 가장 손쉬운 방법으로 배수체의 판별 및 잡종 개체에 대한 세포유전학적 특성을 밝히는데 유용한 방법으로 사용되고 있으며, 어류의 세포 및 핵의 크기는 일반적으로 DNA 함량에 비례하여 그 크기가 증가하므로 세포 유전학적 측면에서 매우 중요시 되고 있다(Szarski, 1976). 또한 적혈구 세포의 크기는 genome size와 밀접한 관계가 있고(Cavalier-Smith, 1985; Szarski, 1976) 진화 유전학적 연구에서 중요한 의미를 갖는다고 보고된 바 있다(Gregory, 2001). 두 번째로 nucleolar organizer regions (NORs)의 수, 위치, 염색된 형태 등을 확인하는 방법이 있으며 silver stain banding 방법이 많이 사용된다. NORs는 인(nucleolus)을 형성하는 염색체의 특정 부위로서 rRNA 합성에 관여하는 ribosome 유전자를 형성하는 또한 이의 활성화가 일어나는 부위로 이를 banding 하여 종간 진화 과정을 밝히는데 중요시되고 있다(Howell and Black, 1979). 특히 어류에서도 18S+28S RNA 분자에 대한 gene cluster의 위치와 수가 보존적이기 때문에 분류학적인 마커로 또는 집단, 계통, 개체, 세포 간 염색체 다형현상(chromosomal polymorphism)을 규명하고자 NORs를 연구에 활용하고 있다(Maria et al., 2002). DNA 함량(genome size)의 측정방

법은 종에 따라 고유한 DNA 함량을 갖고 있으며 진화 정도에 따라 일반적으로 증가한다고 보고된 바 있으며(Byrappa, 2003), 특히 어류에 있어 DNA 함량이 가자미 *pleuronectes platessus*의 0.39 pg에서 폐어류 *Protopterus aethiopicus*의 132.83 pg (Animal genome size database, 2009)으로 종간에 매우 심한 차이를 나타내고 있어 그 유연관계를 규명하는데 많이 이용되고 있다. 염색체 수 및 핵형은 종에 따라 고유한 수 및 형태를 가지고 있어 세포 유전학적 분석을 통한 종의 분석에 매우 유용한 자료로 이용되고 있다(Gold, 1979). 현재까지 보고된 어류 염색체의 80%는  $2n=40\sim 56$ 개의 염색체 수를 가지고 있으며, 그 중에서 35~40%는  $2n=48$ 개의 염색체 수를 가지고 있다(Animal genome size database, 2009). 어류의 반수체 염색체 수( $n$ )는 *Myxine garmani*의 7개(Gold, 1979)에서 *Acipenser brevirostrum*의 186개(Kim et al., 2004) 까지 보고되고 있다. 어류의 염색체 수 및 핵형은 진화되고 종이 분화되면서 염색체 수가 줄어들어  $2n=48$ 이 기본 진화형으로 확립되었고, Robertsonian rearrangement, pericentric inversion 등의 기작을 통해 염색체의 다형성이 유도되었다고 보고하고 있다(Ohno et al., 1968). 본 연구는 바다 송사리와 자바 송사리 및 이들 간의 잡종 유도를 통해 이들의 수정율, 부화율 및 기형률을 조사하였으며, 적혈구의 세포와 핵의 크기 분석 및 NORs 분석, DNA 함량 및 염색체 수 및 핵형 분석 등을 통하여 세포 유전학적 분석을 실시하여 바다 송사리와 자바 송사리의 두 종간 유연관계에 대한 자료를 확립하고자 하였다.

비스페놀 A (Bisphenol A; 4,4'-isopropylidenediphenol)는 페녹시수지, 합성수지, 폴리카보네이트 등 플라스틱 제조의 원료로 쓰이며, 화장품의 향균제 및 곰팡이 제조에도 사용되는 내분비계 교란을 일으키는 물질이다. 또한, 이 물질은 통조림 내의 코팅제와 내용물의 액체에서도 검출된 바 있으며 (Brotons, 1995), 치과 치료에 사용되고 인체의 피부에 접촉 시 과민성 피부

염(atopic dermatitis)을 유발(Estlander et al., 1999)하는 것으로 알려져 있다. 또한 수계 환경의 다양한 폐수에서도 발견되고 있어 수계의 생태계에 미치는 영향이 매우 크다. 비스페놀 A가 환경에 퍼져있는 양은 퇴적물에 32%, 물속에 43%, 진흙에 24% 그리고 공기 중에 3.5%로 보고된 바 있다 (TemaNord, 1996). 또한, 인간과 무지개 송어를 대상으로 한 연구에서 성호르몬에 결합하는 단백질로 알려져 있으며(Milligan et al., 1998), 비스페놀 A가 에스트로겐 효과를 내는 것으로 보고되어 있다(Lindholm et al., 2000). 따라서 비스페놀 A는 인간만이 아닌 수계생물에도 내분비계 교란물질로서 위험성을 내포하고 있어 2000년도부터 척추동물과 무척추동물을 대상으로 수계생물에 대한 많은 연구들이 이루어지기 시작하였다. 비스페놀 A의 영향에 대한 연구는 무지개 송어(Van den Belt et al., 2003), zebrafish (Kishida et al., 2001), 대서양 연어(Arukwe et al., 2000), brown trout (Lahnstiner et al., 2005), turbot (Labadie and Budzinski, 2006), guppies (Haubruge et al., 2000) 및 *O. latipes* (Zha and Wang, 2006; Tabata et al., 2004; Kang et al., 2002; Pastva et al., 2001; Metcalfe et al., 2001; Yokota et al., 2000) 등 많은 종에서 보고되었다. 이들 연구에서 비스페놀 A가 수컷의 성전환, 생식능력 약화 및 생식기관의 기형 등을 유발한다고 보고되었다. 특히 담수산 송사리인 *O. latipes*에 있어서는 비스페놀 A에 노출 시 산란 및 수정 능력, 사망률, 다음 세대의 성장률과 암·수 비율 등 많은 연구가 되어 있지만, 바다 송사리를 대상으로 비스페놀 A가 해양 생물에 미치는 영향을 알아보기 위한 연구는 보고된 바 없다. 해산 어류에서 비스페놀 A의 영향에 대하여 연구된 종은 무지개놀래기(Alo et al., 2005), *Xiphophorus helleri* (Kwak et al., 2001), 대서양 연어(Arukwe et al., 2000) 등이 있다. 하지만 이들 종에 대한 연구는 비스페놀 A의 처리 기간이 3일 - 2주간 정도로 짧고, 주로 난황 단백질(vitellogenin)의 유도나 mRNA 발현 등에 대한 결과가 보고된 것 이외

에 어류의 성전환 및 생산 능력에 미치는 영향에 대한 연구는 부족한 실정이다. 송사리 속 어류의 성 전환을 위한 연구는 *O. latipes*를 대상으로 estrone을 경구투여 하여 수컷을 암컷으로 성전환(Yamamoto, 1953) 시킨 이래 지금까지 많은 연구가 이루어져 왔다. 성전환 호르몬의 처리 방법으로는 어체 근육으로 직접 주사하는 삽입법(implantation method), 사료에 호르몬을 첨가하여 처리하는 경구 투여법(feeding method)과 사육수에 직접 호르몬을 용해하여 희석해 처리하는 침지법(immersion method) 등이 있으며, 경구 투여법과 침지법이 가장 보편적으로 사용되고 있다(Pandian and Sheela, 1995). 그러나 성전환은 각 종간에 호르몬의 민감도가 크므로 어종간 대사 과정의 차이로 인하여 여러 가지 성 호르몬에 의한 다양한 처리 방법이 요구되고 있다(Hunter et al., 1982). 이전의 연구에서 바다 송사리를 대상으로 methyltestosterone을 0.001, 0.005, 0.025  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 침지처리한 결과 수컷화는 이루어졌으나, estradiol-17 $\beta$ 를 0.01, 0.04, 0.2  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 암컷화는 유도되지 않았다. 또한, 높은 농도인 0.2  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 모든 개체가 부화하기 전에 폐사하였다고 보고하였다(Takehana et al., 2007a). 따라서 바다 송사리는 *O. latipes*와 달리 estradiol 처리에 의해서 암컷화가 이루어지기 어려운 종으로 판단되어 본 연구에서는 바다 송사리의 암컷과 자바 송사리의 수컷을 교배하여 유도한 ODJ 잡종 개체에 비스페놀 A를 처리하여 해수에서의 비스페놀 A에 의한 폐사율과 기형률을 조사하고 수컷이 암컷으로 성전환 되는지 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험어의 확보 및 사육 유지

본 실험에 사용된 바다 송사리는 인도네시아로부터 자연산(wild-type) 개체들을 수산동식물 이식승인에 관한 규칙에 의거(농림수산식품부령 제1호)하여 수입하였으며, 실험실에서 6개월간 사육하여 친어로 사용하였다. 자바 송사리는 한국해양연구원(KORDI)에서 암컷 5개체와 수컷 3개체를 분양받아 실험실 내에서 교배시켜 부화 시킨 자어를 6개월간 사육하여 사용하였다. 사육수는 해수와 담수를 5  $\mu\text{m}$ 의 미세필터로 여과한 후 염분측정기를 이용 10‰ 기수를 제조하여 사용하였으며 20 L의 유리수조에서  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하면서 광주기(16L:8D)를 조절하였다. 매일 1/2씩 환수하였으며, 사료는 초기미립자사료(이화사료, 150  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ )와 brine shrimp (*Artemi. nauplius*) 유생을 공급하였다. 수정란을 확보하기 위하여 바다 송사리는 암컷 12마리(평균전장:  $39.1 \pm 3.0$  mm)와 수컷 8마리(평균전장:  $42.0 \pm 1.6$  mm)를 교배시켜 산란을 유도하였으며, 자바 송사리는 암컷 12마리(평균전장:  $30.3 \pm 0.9$  mm)와 수컷 8마리(평균전장:  $29.9 \pm 1.4$  mm)를 교배시켜 산란을 유도하였다.

### 2. 방법

#### 1) 바다 송사리의 발생·생물학적 연구

##### (1) 난발생 및 자치어의 형태 발달

##### 1.1. 수정란의 수집과 관찰

산란한 직후 바다 송사리의 암컷 개체에서 수정란을 분리하여 개체별

수정란을  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 20 L 항온 부화수조 안에 설치한 부화망(망목: 330 x 330  $\mu\text{m}$ , 크기: 12 x 5 x 5 cm)으로 옮겼으며, 환수는 친어관리와 마찬가지로 행하였다. 수정란은 광학현미경(Nikon, Japan)과 해부현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하면서 수정된 개체의 90% 이상이 동일한 단계에 도달하였을 때를 기준으로 각 단계별 발생과정과 시간을 기록하였으며 현미경에 부착된 디지털 카메라(ARTRAY, Japan)로 촬영하고 관찰하였다.

## 1.2. 자치어의 사육 관찰 및 성장 조사

부화한 자어는 친어 사육 조건과 동일한 조건 하에서 초기미립자사료(이화사료, 150, 350, 500  $\mu\text{m}$ )를 발달 단계별로 순차적으로 공급하였으며, brine shrimp 유생을 병행 공급하며 사육하였다. 각 발생 단계별 특징과 성장을 조사하기 위하여 부화 직후 ~ 부화 후 6일째까지, 부화 후 9일, 14일, 21일, 28일째의 자치어와 6주, 9주와 12주된 개체 12마리씩을 무작위로 선별하여 얼음에 마취한 후, 전장(total length)을 버어니어 캘리퍼스로 0.01 mm까지 측정하였고, 전중은 전자저울(Sartorius, USA)로 0.01 g 단위까지 측정하고, 외부형태는 사진촬영을 하였다. 최초 산란시기를 알아보기 위하여 암컷 20마리와 수컷 12마리를 함께 사육하며 산란 여부를 관찰하였다.

### (2) 성장

성장을 알아보기 위하여 6주째와 9주째의 암컷과 수컷을 각각 8마리씩 선별하여 초기미립자사료(이화사료, 500  $\mu\text{m}$ )와 brine shrimp 유생을 공급하며, 위와 마찬가지로 방법으로 전장과 무게를 측정하였다. 산란이 이루어지는 9주째 이후부터는 4주 간격으로 부화 후 1년째가 되는 48주째까지 전장과 무게를 측정하였다.

### (3) 골격 형성

#### 3.1. 표본 고정

자치어의 골격 발달과정 관찰을 위하여 부화직후의 자어부터 부화후 6일째 자어까지 매일 20마리씩, 9일째, 14일째, 21일째와 28일째 자어는 12마리씩, 6주, 9주 그리고 12주까지는 6마리씩 10% 포르말린에 고정하였다.

#### 3.2. 골격 염색 및 관찰

고정된 표본을 대상으로 alcian blue와 alizarin red S 용액을 사용하여 Park and Kim (1984)의 방법에 따라 골격 염색을 수행하였다. 먼저 멜라닌 색소를 완전히 제거하기 위하여 0.5% KOH 용액에 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 2:1의 비율로 넣어 각 개체들을 넣고 작은 방울들은 제거하면서, 눈의 색깔이 검은 색에서 노란갈색으로 변하고, 몸의 장기들이 하얗게 탈색될 때까지 두었다. 반응이 끝난 개체들은 하루 동안 수세시켜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 완전히 제거시켰다. 연골을 염색하기 위하여 0.01% alcina blue 8GX가 들어간 60 ml의 Et-OH에 40 ml의 glacial acetic acid 용액을 넣어 만든 시약을 개체가 잠길 정도로 부어 하루 동안 염색하였다. 남은 acetic acid를 완전히 제거하기 위하여 100% → 95% → 90% → 80% → 70% ethanol 과정을 순차적으로 1시간씩 수행하였으며, 흐르는 수돗물에 하루 동안 수세하였다. 다음으로 골격을 염색하기 위하여 5% KOH 용액 5 ml에 0.1% alizarin red s 용액을 15방울 떨어뜨려 16시간 동안 염색하였다. 염색한 개체의 투명화를 시키기 위하여 25% → 50% glycerol에 하루 동안 담가 둔 후, 다시 75% glycerol에 옮겨 이틀 동안 담가두었다. 개체가 가라앉으면, 100% glycerol에 담가 보관하면서 해부현미경으로 검경하면서 디지털 카메라로 촬영하였다.

#### (4) 성분화 및 초기 생식소 형성

##### 4.1. 산란 유도 및 사육

수정란과 부화자어를 수집하기 위하여 산란한 직후의 바다 송사리 암컷에서 수정란을 분리하여  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 20 L 항온 부화수조로 옮겨 부화시켰으며, 부화한 자어는 초기미립자사료(이화사료, 150  $\mu\text{m}$ )와 brine shrimp를 병행 공급하여 사육하였다. 이때 온도와 염분도는 친어 사육 조건과 동일하게 하였다. 환수는 미리 수온을 조절하고 여과한 10% 기수를 사용하여 매일 50%씩 교환하였고 부화 후 9주까지 사육하였다.

##### 4.2. 표본 채집 및 크기 측정

조직 관찰을 위한 시료는 수정 직후부터 수정 후 9일째까지 1일 간격으로 매회 10개씩 해부현미경(Nikon, Japan) 하에서 미세한 바늘을 이용, 난각을 제거한 후 Bouin's 용액에 24시간 고정시키고, 70% ethanol에 보존하였다. 자치어의 표본은 부화한 날부터 부화 후 6일째까지는 100마리씩 고정하였으며, 부화 후 9일째에는 50마리, 부화 후 12일째와 14일째에는 20마리씩 고정하였다. 그리고 부화 후 28일째와 6주째에는 15마리씩 고정하였고, 산란을 시작하는 부화 후 9주째의 개체는 12마리씩 수정란과 같은 방법으로 고정하였다.

##### 4.3. 조직학적 분석

조직학적 분석을 위하여 수정부터 부화 후 14일까지 고정한 수정란과 자치어 전체를 통상의 파라핀 절편법에 따라 고정 및 포매하였고, 부화 후 21일 이후의 자어들은 머리와 항문 이후의 꼬리부분을 제거한 몸통 부분만을 포매하였다. 수정 직후에서 부화 직전까지의 개체들은 6  $\mu\text{m}$ 의 두께로, 부화 직후부터의 자어들은 8  $\mu\text{m}$ 의 두께로 파라핀 연속 절편을 만들었으

며, Mayer's hematoxylin과 eosin을 사용하여 표본을 염색을 한 후, 광학현미경하에서 검경하였다(Kim et al., 1990).생식소 발달 과정 및 성분화에서의 각 단계별 특징적인 조직상은 광학현미경에 부착된 디지털 카메라로 촬영한 후 분석하였다.

## (5) 세포유전학적 분석

### 5.1. 적혈구 계측

적혈구 세포 및 핵의 크기를 측정하기 위해 바다 송사리의 암수를 각각 6마리를 추출하여 사용하였다. 개체 크기가 작아 주사기를 통한 혈액 채취가 어렵기 때문에 얼음물에 마취한 후, 미병부위를 면도칼로 잘라 슬라이드에 몸통의 잘라낸 단면을 대고 혈액을 떨어뜨린 후 도말하였다. 혈액이 다 마른 후, 100% ethanol로 고정한 후 sorenson buffer (ph 6.8)로 희석한 5% Giemsa 염색 용액(Fluka, Switzerland)에 10분간 염색하였다. 각 개체당 100개 이상의 적혈구를 측정하였으며, 적혈구 세포 및 핵의 장경과 단경을 광학현미경하에서 micrometer를 사용하여 400배의 배율로 측정하였다. 표면적은 장경(a)·(b)· $\pi/4$  (Sezaki and Kobayashi, 1978), 부피는  $4(a/2) \cdot (b/2)^2 \cdot \pi/3$  (Lemoine and Smith, 1980)의 공식에 의하여 계산하였다.

### 5.2. 적혈구의 nucleolar organizer regions (NORs)

NORs을 분석하기 위하여 바다 송사리의 각 실험군에서 암수 각각 5마리를 택해 상기 방법에 의거 적혈구를 슬라이드에 도말한 후 공기 중에서 건조시켰다. 100% ethanol에 10분간 고정 한 후, 2% gelatin 용액(gelatin solution in 1% formic acid) 300  $\mu$ l와 50% silver nitrate 용액(AgNO<sub>3</sub>) 150  $\mu$ l를 잘 혼합하여, 작성된 슬라이드에 떨어뜨리고 커버글라스를 덮었다. 57°C로 맞추어진 슬라이드 건조기에서 70초간 발색 반응을 수행하였다. 반응이

완료된 후 증류수로 조심스럽게 세척 후 광학현미경으로 NORs 수를 관찰 (1000배) 하였다.

### 5.3 DNA 함량 분석

DNA 함량을 분석하기 위하여 Flow cytometry를 수행하였다. 바다 송사리의 각 개체군의 가슴지느러미와 꼬리지느러미를 반 정도씩 잘라 마이크로 비커에서 곡선 가위로 세절한 후 70% ethanol에 고정하였다. 잘 흔들어 섞어 준 후, 30  $\mu\text{m}$  filter로 filtering하여 세포만 15 ml tube로 옮겼다. 1 ml를 따내어 1.5 ml tube로 옮긴 후 10  $\mu\text{l}$ 만 떨어뜨려 hemocytometer를 이용해 세포 수를 측정하여  $1\sim 2 \times 10^6$  cells/ml로 세포수를 계수하였다. 원심분리 후 상등액을 버리고 nucleic extraction buffer (Partec, Germany)를 200  $\mu\text{l}$  넣어 섞어준 후 암조건에서 20분간 반응시켜 핵막을 제거하였다. Staining buffer (Partec, Germany)를 1 ml 첨가하여 염색한 후 40분간 암조건에서 반응시켰다. DNA 함량을 측정하기 위해서 큐벳에 샘플들을 각각 옮겨 담았다. 기계의 기준을 맞추기 위하여 DNA control UV로 mean값을 100으로 맞추어 주었으며, peak는 100에 가도록 하고, CV% 값은 10 이하가 되도록 한 후 준비해 두었던 sample들을 측정하였다.

### 5.4. 염색체 수 및 핵형 분석

염색체 수 판별 및 핵형분석을 위하여 신장직접법을 사용하였다. 바다 송사리를 무작위로 20마리 잡아 0.025% 농도의 colchicine 용액에 넣어 에어를 강하게 하여 약 4시간 동안 방치하였다. 4시간 후 20마리를 잡아 얼음에 마취시키고 신장을 적출 세절한 후, 상온에서 저장액(0.075M KCl)에 10분간 처리하였다. 저장액 처리된 신장조직 세포는 찌꺼기가 생기지 않도록 상등액을 모아 고정액(ethanol : glacial acetic acid = 3 : 1)으로 3회에 걸

쳐 15분씩 고정하였다. 가아제로 잘 닦은 슬라이드에 3방울씩 떨어뜨린 후, 공기건조법으로 건조시켜 슬라이드 표본을 작성하였다. 작성된 슬라이드 표본은 5% Giemsa 용액에 15분간 염색하였다. 염색체 수는 광학현미경하에서 각 슬라이드 당 30여개의 판독 가능한 염색체 중기 분열상을 대상으로 계수하였으며, 분열상이 뚜렷한 시료를 대상으로 광학현미경에 부착된 디지털 카메라로 사진 촬영하여 핵형도를 작성하였다.

## 2) 자바 송사리에 대한 발생·생물학적 연구

### (1) 난발생 및 자치어의 형태 발달

#### 1.1 수정란의 수집과 관찰

산란 직후의 자바 송사리 암컷에서 수정란을 분리하여 바다 송사리와 같은 조건의 부화수조 안의 부화망으로 옮겼으며, 환수는 친어관리와 마찬가지로 행하였다. 수정란의 관찰 역시 바다 송사리와 마찬가지로 광학현미경과 해부현미경으로 관찰하면서 각 단계별 발생과정과 시간을 기록하였으며 현미경에 부착된 디지털 카메라로 촬영하고 관찰하였다.

#### 1.2. 자치어의 사육 및 형태 발달 및 성장 조사

부화한 자어는 친어 사육 조건과 동일한 조건 하에서 초기미립자사료 (이화사료, 150, 350, 500  $\mu\text{m}$ )를 발달 단계별로 순차적으로 공급하였으며, brine shrimp 유생을 병행 공급하였다. 자치어의 성장 단계별 형태 발달 과정을 조사하기 위하여 부화 직후 ~ 부화 후 6일째까지의 자어와 부화 후 9일, 14일, 21일, 28일째의 자치어 그리고 6주와 9주된 개체 12마리씩과 산란이 시작되는 13주째 개체 8마리를 무작위로 선별하여 전장(total length)을 버어니어 캘리퍼스로 0.01 mm까지 측정하였고, 외부형태는 사진촬영을 하였다.

## (2) 세포유전학적 분석

### 2.1. 적혈구 계측

적혈구 세포 및 핵의 크기를 측정하기 위해 자바 송사리의 암수를 각각 6마리를 무작위로 선별하였다. 바다 송사리와 마찬가지로 개체 크기가 작아 syringe를 통한 혈액 채취가 어렵기 때문에 미병부위를 면도칼로 잘라낸 후, 슬라이드에 도말하였다. 도말 후 100% ethanol로 고정한 후 5% Giemsa 염색 용액에 10분간 염색하였다. 적혈구 세포 및 핵의 장경과 단경을 광학현미경하에서 micrometer를 사용하여 400배의 배율로 측정하였으며, 표면적과 부피는 바다 송사리와 같은 공식을 이용하여 계산하였다.

### 2.2. 적혈구의 nucleolar organizer regions (NORs)

상기 방법에 의거 자바 송사리 암수를 각각 5마리를 택해 적혈구를 슬라이드에 도말한 후 공기 중에서 건조시켰다. 100% ethanol에 10분간 고정 후, 2% gelatin 용액 (gelatin solution in 1% formic acid) 300  $\mu$ l와 50% silver nitrate 용액(AgNO<sub>3</sub>)을 150  $\mu$ l를 잘 혼합하여, 57°C로 맞추어진 슬라이드 건조기에서 70초간 발색 반응을 수행하였다. 반응이 완료된 슬라이드는 3차 증류수로 조심스럽게 세척 후 광학현미경 하(1000배)에서 NORs 수를 관찰하였다.

### 2.3. 염색체 수 및 핵형 분석

염색체 수 및 핵형 분석을 하기 위하여 바다 송사리와 동일한 방법으로 수행하였다. 자바 송사리에서 20마리를 무작위로 잡아 0.025% 농도의 colchicine 용액에 넣어 에어를 강하게 하여 약 4시간 동안 방치하였다. 신장을 적출하여 세절한 후, 상온에서 저장액(0.075M KCl)에 처리한 후, 고정액(ethanol : glacial acetic acid = 3 : 1)으로 3회에 걸쳐 15분씩 고정하였다.

작성된 슬라이드 표본은 5% Giemsa 용액에 15분간 염색하였으며, 염색체 수는 광학현미경하에서 각 슬라이드 당 30여개의 판독 가능한 염색체 중기분열상을 대상으로 계수하였고, 핵형도를 작성하였다.

3) 바다 송사리와 자바 송사리 간의 잡종, 상반 잡종 및 역교배체 유도  
정상 교배와 중간 잡종, 상반 잡종 및 역교배를 나타내는 기호는 Table 1과 같다.

#### (1)방법

##### 1.1. 바다 송사리와 자바 송사리 간의 잡종

잡종군(ODJ)을 유도하기 위하여 바다 송사리 암컷 12마리(평균전장:  $37.1 \pm 1.4$  mm)와 자바 송사리 수컷 8마리(평균전장:  $39.8 \pm 1.1$  mm)를  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 20 L 항온 부화수조에서 사육하였으며, 환수는 매일 1/2씩 하였고, 초기미립자사료(이화사료,  $500 \mu\text{m}$ )와 brine shrimp를 병행 공급하였다.

##### 1.2. 상반교배(reciprocal hybrid cross) 유도

상반 잡종인 OJD을 유도하기 위하여 자바 송사리 암컷 12마리(평균전장:  $37.7 \pm 1.2$  mm)와 바다 송사리 수컷 8마리(평균전장:  $36.8 \pm 2.5$  mm)를 ODJ와 동일한 방법으로 사육하여 교배를 유도하였다.

##### 1.3. 역교배체(back cross) 유도

역교배체 유도를 위하여 바다 송사리 암컷과 ODJ 중 형태학적으로 수컷 형질을 가진 개체를 교배시켜 ODDJ 개체를 유도하였다. 바다 송사리 암컷 60마리와 ODJ 20 마리를 3 : 1로 유리수조 (36 x 22 x 26 cm)에서 ODJ와 OJD와 동일한 방법으로 사육하며 교배를 유도하였다.

Table 1. Genotype abbreviations

Species	Breeding
OD	<i>Oryzias dancena</i> ♀ x <i>O. dancena</i> ♂
OJ	<i>Oryzias javanicus</i> ♀ x <i>O. javanicus</i> ♂
ODJ	<i>Oryzias dancena</i> ♀ x <i>O. javanicus</i> ♂
OJD	<i>Oryzias javanicus</i> ♀ x <i>O. dancena</i> ♂
ODDJ	<i>Oryzias dancena</i> ♀ x ODJ ♂

## (2) 난발생 조사

ODJ와 OJD를 유도하기 위한 실험군의 산란한 직후의 바다 송사리와 자바 송사리의 암컷 개체에서 수정란을 분리하여 개체별 수정란을  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 20 L 항온 부화수조 안에 설치한 부화망(망목:  $330 \times 330 \mu\text{m}$ , 크기:  $12 \times 5 \times 5 \text{ cm}$ )으로 옮겼으며, 환수는 친어관리와 마찬가지로 행하였다. 수정란의 관찰은 바다 송사리와 자바 송사리와 동일하게 하였다.

ODDJ는 산란한 직후의 바다 송사리 암컷 개체에서 수정란을 분리하여  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 20 L 항온 부화수조로 옮긴 후 광학현미경하에서 초기 난 발생을 13회 산란으로 조사하였으며, 발생 단계별 과정을 디지털 카메라로 사진을 찍었다.

## (3) 수정율, 부화율 및 기형률 측정

수정율은 수정 후 약 5시간에 전체 수정란 중 백탁된 사란수를 제외하고 발생이 진행 중인 난수를 백분율로 나타내었다. 부화율과 기형률은 전체 수정란에 대한 부화 개체수와 기형 개체수의 백분율로 측정하였다.

## (4) 적혈구 계측, 염색체 수 및 핵형 분석

### 4.1. 적혈구 계측

적혈구의 핵 크기와 세포 크기를 측정하기 위하여 ODJ 개체 6마리를 무작위로 선별하여, 바다 송사리와 자바 송사리와 동일한 방법을 사용하여 슬라이드에 도말 후 5% Giemsa 염색 용액에 염색하였다. 적혈구 세포 및 핵의 장경과 단경을 광학현미경 400배의 배율 하에서 micrometer를 사용하여 측정하였으며, 표면적과 부피는 바다 송사리와 같은 공식을 이용하여 계산하였다.

## 4.2. 염색체 수 및 핵형 분석

염색체 수 및 핵형 분석을 하기 위하여 20마리의 OJD와 OJD 개체를 무작위로 선별하여, 바다 송사리와 동일하게 0.025% 농도의 colchicine 용액에 넣어 약 4시간 동안 방치하였다. 신장을 적출·세절한 후, 상온에서 저장액(0.075M KCl)에 처리하고 고정액(ethanol : glacial acetic acid = 3 : 1)으로 3회에 걸쳐 15분씩 고정하였다. 작성된 슬라이드 표본은 5% Giemsa 용액에 15분간 염색하였으며, 염색체 수는 광학현미경하에서 각 슬라이드 당 30여개의 판독 가능한 염색체 중기 분열상을 대상으로 계수하였고, 핵형도를 작성하였다.

### (5) 잡종의 성장 측정

성장을 알아보기 위하여 ODJ의 부화 직후부터 6일까지 개체를 매일 30마리씩, 부화 후 9일, 14일, 21일, 28일 개체를 15마리씩, 부화 후 6주와 9주 개체를 12마리씩 무작위로 선별하여 버어니어 캘리퍼스를 이용하여 0.01 mm까지 전장을 측정하였다.

### (6) 형태학적 조사

#### 6.1. 표본 채집 및 외형 조사

교배를 통해 생산된 수정란에서 부화한 개체들은 친어와 같은 조건에서 초기미립자사료(이화사료, 150  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ )를 순차 공급하고, brine shrimp 유생을 병행 공급하여 부화 후 12주까지 사육하였다. 부화 후 12주가 된 바다 송사리 (평균 전장:  $36.9 \pm 1.9$  mm)와 자바 송사리 (평균 전장:  $38.7 \pm 1.6$  mm)는 암·수 각각 5마리씩 사용하였으며, 잡종군들에서 ODJ (평균 전장:  $37.4 \pm 2.4$  mm)는 암수 구분 없이 10마리씩 사용하였고, OJD (평균 전장:  $38.9 \pm 1.2$  mm)는 기형이 아닌 개체 4마리를 사용하였다.

실험 대상어를 염산리도카인(Lidocain/NaHCO<sub>3</sub>) 300 ppm에 마취시킨 후 외형을 color 사진으로 찍어 체부위에 따른 측편 정도와 색깔 등 외형을 조사하였다.

## 6.2. 계측형질 및 계수형질 측정

조사가 끝난 표본은 10% 중성포르말린 용액(100 ml formalin, 6.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 4.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 900 ml distilled water)에 고정, 보관하면서 버어니어 캘리퍼스를 사용하여 0.01 mm까지 형태계측학적 및 계수형질 조사를 하였다.

계측형질 조사를 위하여 바다 송사리와 자바 송사리를 대상으로 박(1992)의 방법에 의거 Fig. 1과 같이 체장(standard length, SL), 두장(head length, HL), 미병고(caudal peduncle depth, CPD), 미병장(caudal peduncle length, CPL), 주둥이 길이(snout length, SNL), 체고(body depth, BD), 가슴지느러미와 배지느러미간 거리(distance of pectoral fin - ventral fin, P-V), 배지느러미와 뒷지느러미간 거리(distance of ventral fin - anal fin, V-A), 안경(eye diameter, ED), 등지느러미 기부 길이(length of origin of dorsal fin base, OB), 뒷지느러미 기부 길이(length of origin of anal fin base, AFB) 및 배지느러미 기부 길이(length of origin of ventral fin base, OV)를 측정하였다. HL, BD, CPD, CPL, P-V, V-A, DB, OD, OV 및 OA는 SL에 대하여 백분율로 나타내었고, SNL과 ED는 HL에 대하여 백분율로 나타내었다. 계측항목에서 바다 송사리와 자바 송사리의 유의한 차이를 보이는 몇 형질을 대상으로 암·수 구분 없이 ODJ와 OJD를 바다 송사리 및 자바 송사리와 t-test로 유의성을 검정하여 형태학적 연관성을 조사하였다.

계수형질을 측정하기 위하여 등지느러미, 뒷지느러미, 꼬리지느러미, 가슴지느러미를 계수하였다. 척추골수를 측정하기 위하여 형태분석이 끝난

바다 송사리, 자바 송사리, ODJ와 OJD를 삶아 척추뼈만을 분리한 후 해부 현미경 하에서 척추골수를 조사하였다.

## (7) 성비(sex ratio)

### 7.1. 형태학적 분석

유도된 잡종과 대조군의 성비를 형태학적 분석으로 조사하기 위해 부화 후 3개월째 개체를 무작위로 30 마리씩 3반복으로 표본 채집하여 뒷지느러미 형태로 성비를 조사하였다.

### 7.2. 조직학적 분석

조직학적 방법으로 성비를 분석하기 위하여 형태학적으로 암수가 분리된 잡종과 대조군에서 바다 송사리, 자바 송사리 그리고 ODJ는 15마리씩, OJD는 8마리씩 무작위로 표본 추출하여 머리와 항문 이후의 꼬리 부분을 제거한 몸통 부분을 Bouin's 용액에 고정한 후 평상의 paraffin 절편법으로 8  $\mu$ m 두께로 절편하였다. 염색은 Harris's hematoxylin과 eosin으로 하였으며, 광학현미경(Nikon, Japan) 하에서 성비를 관찰하였다.

## 4) 비스페놀 A (Bisphenol A)에 의한 잡종의 성전환

### (1) 비스페놀 A 용액 제조 및 반수치사농도 평가

비스페놀 A (Junsei, Japan)는 20 g/L의 농도로 100% ethanol에 용해하여 stock solution을 제조하여 4°C에 보관하며 사용하였다. 실험용 수용액을 만들기 위하여 여과한 10% 기수에 비스페놀 A의 stock solution을 용해시킨 다음 충분히 통기시킨 후 사용하였다. 반수치사농도(LD<sub>50</sub>)를 조사하기 위하여 예비 농도 실험을 하였다. 부화한 직후의 ODJ 자어를 비스페놀 A 농도 0 mg/L, 5.0 mg/L, 10.0 mg/L, 15.0 mg/L와 20.0 mg/L에서 24시간, 48시간과

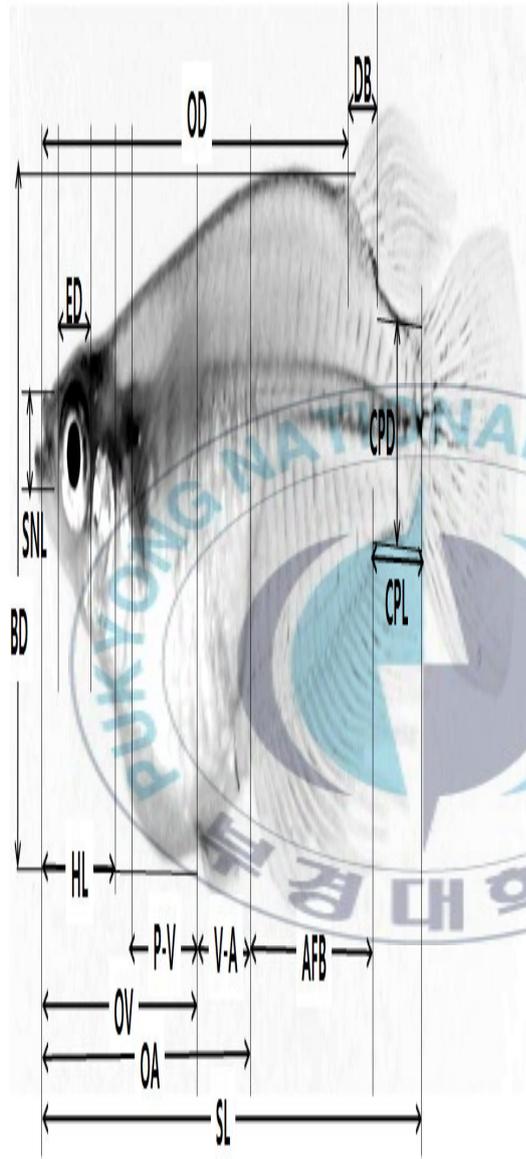


Fig 1. Morphological measurements used to compare *Oryzias dancena*, *O. javanicus* and their hybrid. SL: standard length, HL: head length, BD: body depth, P-V: distance of pectoral fin-ventral fin, V-A: distance of ventral fin-anal fin, ED: eye diameter, DB: length of dorsal fin base, OD: length of origin of dorsal fin, OV: length of origin of ventral fin, CPD: caudal peduncle depth, CPL: length of origin of anal fin, SNL: snout length, OA: length of origin of anal fin, AFB: length of origin of anal fin base.

72시간째 마다 확인하여 폐사율을 2반복으로 조사하였다.

#### (2) 성전환 유도를 위한 비스페놀 A 침지 처리

부화 직후의 자어부터 침지 처리법으로 비스페놀 A에 의한 ODJ의 성전환을 유도하였다. 비스페놀 A의 농도는 예비 실험 농도 결과를 토대로 처리 농도를 0 mg/L, 2.5 mg/L, 5.0 mg/L, 10.0 mg/L로 하여 56일간 처리하였으며, 대조군으로 비스페놀 A를 섞지 않고 다른 농도와 동일한 양의 100% ethanol을 첨가하여 만든 실험용 수용액을 제조하여 사용하였다. 실험 기간 동안 수온은  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며, 15 L 유리 수조에서 각 실험군 당 50마리씩 3반복으로 수행하였다. 1일 1회 사육수를 환수하였으며, 부화 후 5일째까지는 초기미립자사료(이화사료, 150  $\mu\text{m}$ )를 1일 5회에 걸쳐 공급하였으며, 그 이후로는 brine shrimp 유생과 함께 병행 공급하여 사육하였다.

#### (3) 성장률 및 기형률 측정

비스페놀 A가 성장에 미치는 영향과 기형률을 조사하기 침지 처리가 끝난 56일째에 각 농도별로 처리한 개체를 대상으로 버어니어 캘리퍼스로 0.01 mm까지 전장을 측정하였으며, 기형률을 조사하였다.

#### (4) 조직학적 분석

비스페놀 A를 처리한 실험군의 성전환율을 분석하기 위해 조직학적 방법에 의해 조사하였다. 성전환 처리군에서 무작위로 50 마리씩 선별하여 머리와 항문 이후의 꼬리부분을 제거한 몸통 부분만을 Bouin's 용액에 고정 한 후, 포매하였다. 평상의 파라핀 절편법에 따라 8  $\mu\text{m}$ 의 두께로 파라핀 연속 절편을 만들었으며, Mayer's hematoxylin과 eosin을 사용하여 표본을

염색 한 후, 광학현미경(Nikon, Japan)하에서 생식소의 암컷으로의 성전환 양상 및 성비를 검경하였다(Kim et al.,1990). 특징적인 조직상은 광학현미경에 부착된 디지털 카메라(ARTCAM-300MI, Japan)로 촬영한 후 분석하였다.

#### 5) 통계 처리

수정율, 부화율, 기형률 및 성비는 유의차 검정을 하기 위하여  $P < 0.05$  수준에서 ANOVA 검정을 하였다. 형태학적 조사를 위하여 각 항목들은  $P < 0.05$  수준에서 t-test를 수행하였으며 성비 분석은  $\chi^2$  test를 하였다.



### III. 결 과

#### 1. 바다 송사리에 대한 발생·생물학적 연구

##### 1) 난의 형태 및 난발생 과정

난의 형태를 관찰한 결과 바다 송사리의 난은 구형의 침성·점착성이었으며, 발생 과정 및 발육단계에 따른 자치어의 형태 발달 시간은 Table 2에 나타내었다.

##### (1) 수정(Fertilization)

수정 후 산란한 바다 송사리의 수정란의 난막은 무색투명하고, 난황은 옅은 황색이었다. 산란 직후의 수정란은 융모막(chorion)과 난막(embryonic membrane) 사이가 좁아 광학현미경 하에서 구분하기 어려우나, 약 10분 후에는 사이가 벌어져 확연히 구분되었다. 표층립 소포(cortical alveoli)와 유구(oil droplets)가 난황 전체에 퍼져 있으며, 유구의 크기와 수는 난의 발생 단계와 암컷 개체에 따라 다양하게 나타났다(Fig. 2, stage 0).

##### (2) 배반 형성(Blastodisc)

수정 후 30분이 지나면 표층립 소포가 식물극(vegetal pole)에서 동물극(animal pole) 쪽으로 응집되었고, 유구들은 이와 반대로 식물극 쪽으로 이동하였다. 수정 후 40분이 지나면 동물극 쪽에 배반이 형성되기 시작하여(Fig. 2, stage 1a), 수정 후 1시간 후에 완전히 배반이 형성되었다(Fig. 2, stage 1b).

##### (3) 난할과정(Cleavage)

### 3.1. 2 세포기(2 cell stage)

수정 후 1시간 30분, 첫 번째 난할(cleavage)이 이루어져 배반의 중앙 부위가 수직으로 이등분되어 2세포기가 되었으며(Fig. 2, stage 2), 두 번째 난할이 시작되기 전 할구(blastomere)의 높이가 이보다 더 편평해 지는 것이 관찰되었다.

### 3.2. 4 세포기(4 cell stage)

수정 후 2시간, 두 번째 난할이 완전히 이루어져 2 세포기의 할구들이 다시 이등분되어 4개의 할구로 나뉘었다(Fig. 2, stage 3).

### 3.3. 8 세포기(8 cell stage)

수정 후 3시간, 4 세포기의 난할들이 후에 첫 번째 난할 방향과 평행하게 이등분되어 8개의 할구로 나뉘었다(Fig. 2, stage 4).

### 3.4. 16 세포기(16 cell stage)

수정 후 3시간 30분, 8개의 할구에 난할이 수직과 수평 방향으로 이루어져 16세포기가 되었고 할구의 크기가 작아졌다(Fig. 3, stage 5).

### 3.5. 32 세포기(32 cell stage)

수정 후 4시간 30분, 16 세포기의 가장 자리에 있던 12개의 할구는 나뉘어 24개의 할구로 되었고, 가운데의 4개의 할구는 2점으로 겹치며 8개의 할구로 나뉘어 모두 32개의 할구로 나뉘었다(Fig. 3, stage 6).

## (4) 상실기(Morulation)

### 4.1. 초기 상실기(early morula stage)

수정 후 5시간 30분, 할구들이 3 - 4점으로 돔 형태를 이루며 분열되며, 배반 가장자리의 할구들(21 - 24)은 평평한 형태를 이뤘다. 할구의 수를 정확하게 세는 것은 힘들지만, 각각의 할구들을 광학현미경 하에서 관찰하는 것이 가능했다(Fig. 3, stage 7).

Table 2. Embryonic and morphological development of *Oryzias dancena*

Developmental stage	Time (after fertilization)
Blastodisc formation	01 hr
Two cells stage	01 hr 30 min
Four cells stage	02 hr
Eight cells stage	03 hr
Sixteen cells stage	03 hr 30 min
Thirty-two cells stage	04 hr 30 min
Morula stage	05 hr 30 min
Blastula stage	07 hr 45 min
Early gastrula stage	13 hr 15 min
Mid gastrula stage	16 hr 45 min
Late gastrula stage	21 hr 30 min
Early neurula stage	1 day 06 hr
Late neurula stage	1 day 07 hr
2 somite stage	1 day 08 hr
4 somite stage	1 day 10 hr 30 min
6 somite stage	1 day 13 hr
9 somite stage	1 day 22 hr
Formation of tubular heart stage	2 days 01 hr 30 min
Start of heart beating stage	2 days 04 hr
Onset of blood circulation stage	2 days 13 hr 30 min
Onset of retinal pigmentation stage	4 days
Gill blood vessel formation stage	4 days 20 hr
Formation of visceral blood vessels stage	6 days 12 hr
Heart and spleen development stage	8 days
Just hatched larvae	11 days
Juvenile stage	21 days
First ovulation stage	63 days

#### 4.2. 후기 상실기(late morula stage)

수정 후 6시간 45분, 할구의 크기가 초기 상실기에서 보다 더 작아지고 배반 가장자리의 할구의 수(35 - 40)가 증가되었으며, 할구들이 4 - 5겹으로 겹쳐졌다(Fig. 3, stage 8).

#### (5) 포배기(Blastulation)

##### 5.1. 초기 포배기(early blastula stage)

수정 후 7시간 45분, 할구의 크기가 후기 상실기에 비해 작아졌음에도 불구하고, 배반엽(blastoderm)이 높아지고 두꺼워짐이 관찰되었다(Fig. 3, stage 9).

##### 5.2. 후기 포배기(late blastula stage)

수정 후 9시간, 배반엽이 계속해서 높고 두껍게 유지되다 낭배기에 이르기 전인 수정 후 11시간에 배반의 가장자리(marginal cell)가 식물극 쪽으로 완만하게 기울어지며 확장되었다(Fig. 3, stage 10).

#### (6) 낭배기(Gastrulation)

##### 6.1. 초기 낭배기 이전 단계(pre-early gastrula stage)

수정 후 11시간 30분, 배반엽이 난황 쪽으로 확장되며 두께가 얇아졌다(Fig. 4, stage 11).

##### 6.2. 초기 낭배기(early gastrula stage)

수정 후 13시간 15분, 배반엽이 아래쪽으로 계속 확장되어 난황의 약 1/4을 덮어 피포(epiboly) 현상을 유지하였다(Fig. 4, stage 12).

##### 6.3. 중기 낭배기 이전 단계(pre-mid gastrula stage)

수정 후 14시간, 피복 현상이 진행되면서 배반엽이 난황의 약 1/3을 덮었다. 원구배순(dorsal lip)이 나타났으며 배순(embryonic shield)의 크기가 증가하였다(Fig. 4, stage 13).

6.4. 중기 낭배기(mid gastrula stage): 수정 후 16시간 45분, 배반이 난황의 1/2을 덮었다(Fig. 4, stage 14).

6.5. 후기 낭배기(late gastrula stage)

수정 후 21시간 30분, 배반이 난황의 3/4 를 덮었고, 배순이 좀더 명확한 선으로 관찰되었으며, 이 단계까지 배반이 계속해서 난황을 감싸 내려와 배체(embryonic body)가 나타났다(Fig. 4, stage 15).

(7) 기관형성과정(Organogenesis)

7.1. 초기 신경배(early neurula stage)

수정 후 1일 6시간, 얇은 배반엽이 식물극 쪽만 남기고 난황을 거의 다 덮었다. 배체가 명확하게 나타나고 배체의 머리가 형성되었다. Kuffer's vesicle이 배체의 꼬리쪽에서 관찰되었다(Fig. 4, stage 16).

7.2. 후기 신경배(late neurula stage)

수정 후 1일 7시간, 배체의 양쪽 두부 부분에 안포의 흔적(rudimentary eye vesicle)이 나타나고, Kuffer's vesicle의 크기가 좀 더 커졌다. 식물극 쪽에는 아직 난황 부분이 원구(blastopore)를 형성하고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 5, stage 17).

7.3. 2 체절기(2 somite stage)

수정 후 1일 8시간, 양쪽 시엽(optic lobe)에 패인 홈(groove)이 나타났고, 원구가 완전히 닫혔다(Fig. 5, stage 18).

7.4. 4 체절기(4 somite stage)

수정 후 1일 10시간 30분, 안포(optic vesicle)의 원기(placode) 쌍을 머리 쪽에서 관찰하였으며, 전뇌, 중뇌, 후뇌(the fore-, the mid- and the hind-brain)가 구별되었다(Fig. 5, stage 19).

7.5. 6 체절기(6 somite stage)

수정 후 1일 13시간, 안포가 발달되어 안배(optic cup)가 관찰되었다. 귀 소포(otic vesicle)와 렌즈(lens)가 형성되기 시작하였다. 뇌의 세 부분이 잘 구별되었으며, 체강(body cavity)이 난황구(yolk sphere)의 표면에 나타났다(Fig. 5, stage 20).

#### 7.6. 9 체절기(9 somite stage)

수정 후 1일 22시간, 체강이 안포 부근까지 확장되었으며, 흑색소포(melanophore)들이 난황구 위에 나타나기 시작하였고, 안포 내에 불완전한 렌즈가 나타났다(Fig. 5, stage 21).

#### 7.7. 심장기관 형성 단계(formation of tubular heart stage)

수정 후 2일 1시간 30분, 한 쌍의 반원형의 혈관(blood vessel)이 난황구 위에 형성되었고, 안포 안에는 둥근 구형의 렌즈가 완성되었다. Kuffer's vesicle의 크기가 조금 줄어들었으며, 혈액섬(blood island)을 관찰하였다(Fig. 5, stage 22).

#### 7.8. 심장박동 시작 단계(start of heart beating stage)

수정 후 2일 4시간, 꼬리가 신장되어 배체가 난황구의 거의 1/2을 둘러싸고, 심장 앞쪽 부분에서 미약하게 심장박동이 관찰되었다. Kuffer's vesicle이 거의 사라졌다(Fig. 6, stage 23).

#### 7.9. 혈액순환 시작 단계(onset of blood circulation stage)

수정 후 2일 13시간 30분, 심장박동에 의해 혈액 순환(Blood circulation)이 시작되었고, 혈액은 심장에서 나와 전주정맥(anterior cardinal vein)과 배대동맥(dorsal aorta)으로 흘렀다. 배체가 난황구의 거의 5/8를 둘러싸고, Kuffer's vesicle이 완전히 사라졌다(Fig. 6, stage 24).

#### 7.10. 망막색소 출현 단계(onset of retinal pigmentation stage)

수정 후 4일간, 꼬리 끝이 완전하게 난황에서 완전히 떨어졌고, 배체가 난황구를 거의 3/4까지 감쌌다. 망막색소(retinal pigment)가 생겼으며, 등쪽

(dorsal wall)에는 구아노포어(guanophore)가 퍼져 있는 것이 관찰되었다. 가슴지느러미(pectoral fin)와 미부에 막성지느러미(fin-fold)가 형성되고, 간(liver)과 아가미(gill)가 관찰되었으며, 혈구는 얇아지고 납작해졌다(Fig. 6, stage 25).

#### 7.11. 아가미 혈액 순환 단계(gill blood vessel formation stage)

수정 후 4일 20시간, 아가미에 혈액이 돌기 시작하였고, 부레(air bladder)가 관찰되었다. 눈은 멜라닌색소포에 의해 전 단계에 비해 더욱 짙어졌으며, 꼬리의 끝부분까지 혈액이 돌아나오기 시작하였다(Fig. 6, stage 26).

#### 7.12. 장기혈관 형성기(formation of visceral blood vessels stage)

수정 후 6일 12시간, 꼬리지느러미가 신장되어 난각에 의해 구부러져 안구 가장자리 끝까지 닿았고 난황의 부피가 2/3 정도로 줄어들었다. 신장이 관찰되었으며, 잘 발달된 황록색의 담낭(gallbladder)을 확인하였다. 혈액이 두부 내부 조직까지 순환하기 시작하였고, 가슴지느러미에 혈액이 순환되면서 미미하게 움직이는 것이 확인되었다. 구강(oral cavity)이 입까지 열렸으며, 눈은 완전히 검게 변해 빛이 통과되지 않았다. 구아노포어가 두부에서 꼬리 끝 부근까지 분포하였다(Fig. 6, stage 27).

#### 7.13. 심장·신장 발달기(heart and spleen development stage)

수정 후 8일간, 꼬리 끝이 안포를 지나서 몸통까지 확장되었다. 장(gut)이 뚜렷이 보였으며, 꼬리지느러미 기조(rays)와 둥글고 붉은 신장이 관찰되었다. 양 눈은 활발하게 움직였으며, 동시에 꼬리와 가슴지느러미도 활발하게 움직이면서 회전운동이 관찰되었다(Fig. 6, stage 28).

## 2) 자치어 및 성어의 형태 발달 과정

### (1) 자·치어기(Larval and juvenile stage)

수정 후 11일째 배체가 난각 안에서 매우 활발하게 회전하며 두부와 미부 부분의 난각을 압박하여 약화시킴으로써, 배체의 꼬리 부분이 먼저 난각을 뚫고 부화되었다. 부화 자어는 전장이 평균  $4.4 \pm 0.2$  mm ( $n = 12$ )였고, 두부와 체측 위쪽부터 꼬리 끝까지 구아노포어가 많이 분포해 있고 가슴지느러미와 꼬리지느러미를 사용하여 운동하였다. 가슴지느러미와 꼬리지느러미의 기초가 발달되었고, 꼬리지느러미에는 7 - 8개의 기초가 관찰되었다(Fig. 6, stage 29). 부화 후 3일째에 난황을 거의 다 흡수하였으며 이때 전장은 평균  $4.6 \pm 0.2$  mm ( $n = 12$ )였다(Fig. 7, stage 30).

부화 후 21일째에는 전장이 평균  $8.7 \pm 0.9$  mm ( $n = 12$ )로 신장하였고, 등쪽과 배쪽의 막지느러미로부터 등지느러미와 배지느러미가 각각 분리되어 막지느러미가 꼬리 자루 부분을 제외하고는 모두 소실되었다. 또한 이 시기에 꼬리지느러미에 18개, 등지느러미에 6 - 7개, 가슴지느러미에 9 - 10개, 뒷지느러미에 23 - 24개로 성어와 동일하게 지느러미 기초가 발달하였다(Fig. 7, stage 31).

## (2) 성어

부화 후 9주째가 되면 평균 전장이  $22.6 \pm 2.7$  mm ( $n = 12$ )로 자라 최초 산란이 이루어지고, 등지느러미와 뒷지느러미의 형태를 통해 암컷과 수컷을 쉽게 구분할 수 있었다. 평균 전장이  $33.1 \pm 2.3$  mm ( $n = 12$ )가 되는 부화 후 12주째 개체의 경우 암컷의 배 앞부분이 유선형으로 완만한 것과 비교하여 수컷의 배 앞부분이 크게 부풀어 올랐으며, 수컷의 등지느러미의 크기가 암컷보다 길게 신장되었다. 뒷지느러미의 경우 암컷의 지느러미 기초 끝이 2가닥으로 갈라져 발달하는 것과 달리 수컷의 경우 기초의 끝이 갈라지지 않고, 7 - 14번째 기초의 길이가 길게 신장되어 암컷에 비하여 크고 긴 뒷지느러미를 형성하였다(fig. 8, stage 32).

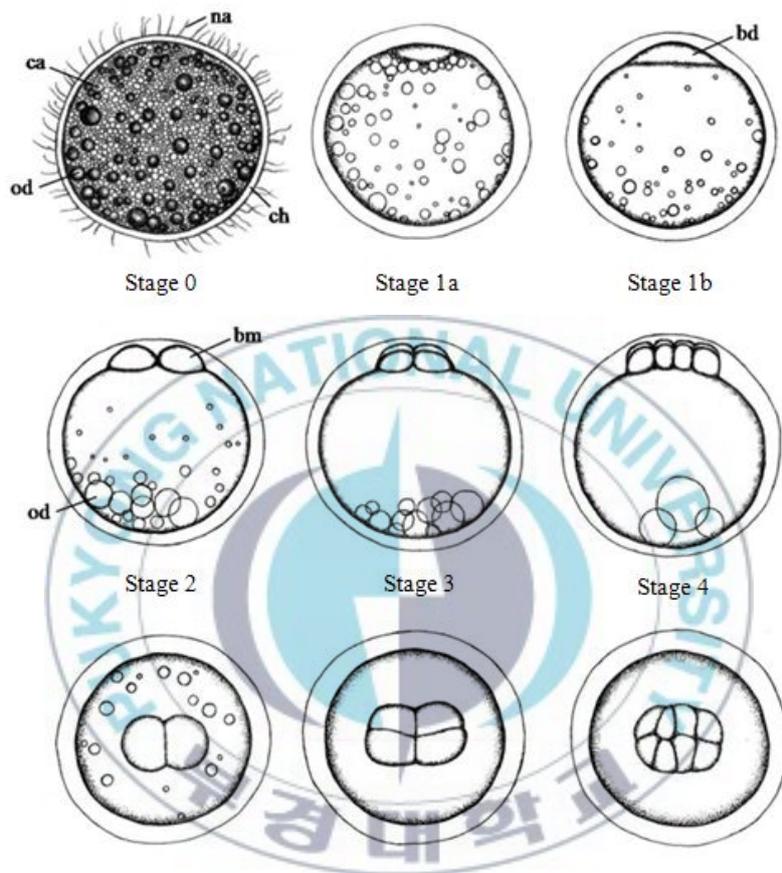


Fig. 2. Egg developmental stages of *Oryzias dancena*. Stage 0, Just fertilized egg; Stage 1, Formation of blastodisc; 1a, 40 min after fertilization (af); 1b, 1 hr af; Stage 2, 2 cell stage - 1 hr 30 min af; Stage 3, 4 cell stage - 2 hr af; Stage 4, 8 cell stage - 3 hr af; bd, blastodisc; bm, blastomeres; ca, corticalalveolus; ch, chorion; od, oil droplet; na, non-attaching filament.

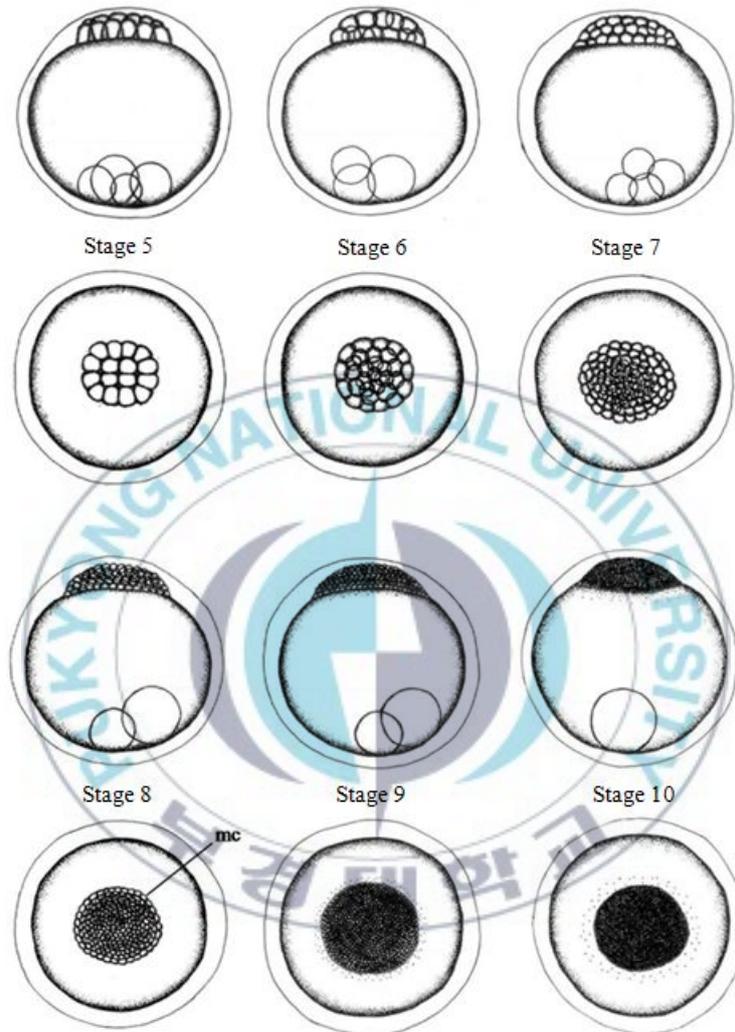


Fig. 3. Egg developmental stages of *Oryzias dancena*. Stage 5, 16 cell stage - 3 hr 30 min after fertilization (af); Stage 6, 32 cell stage - 4 hr 30 min af; Stage 7, Early morula stage - 5 hr 30 min af; Stage 8, Late morula stage - 6 hr 45 min af; Stage 9, Early blastula stage - 7 hr 45 min af; Stage 10, Late blastula stage - 9 hr af. mc, marginal cell.

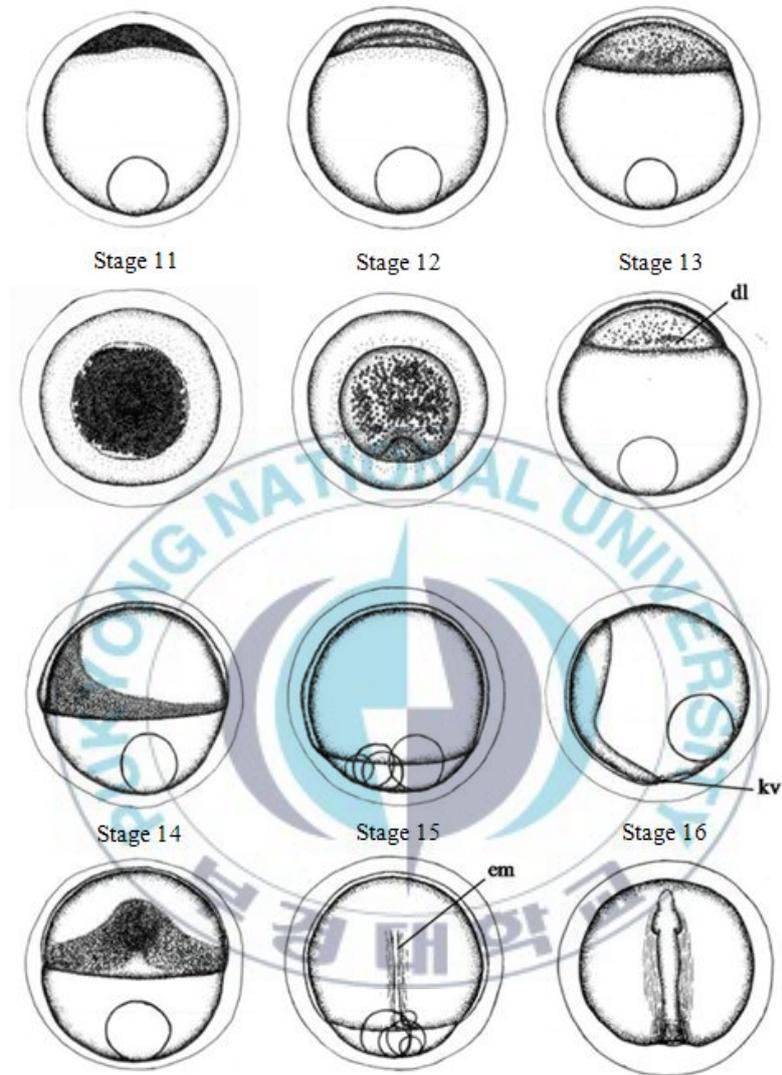


Fig. 4. Egg developmental stages of *Oryzias dancena*. Stage 11, Pre-early gastrula stage - 11 hr 30 min after fertilization (af); Stage 12, Early gastrula stage - 13 hr 15 min af; Stage 13, Pre-mid gastrula stage - 14 hr af; Stage 14, Mid gastrula stage - 16 hr 45 min af; Stage 15, Late gastrula stage - 21 hr 30 min af; Stage 16, Early neurula stage - 1 day (d) 6 hr af; dl, dorsal lip of blastopore; em, embryonic body; kv, Kuffer's vesicle.

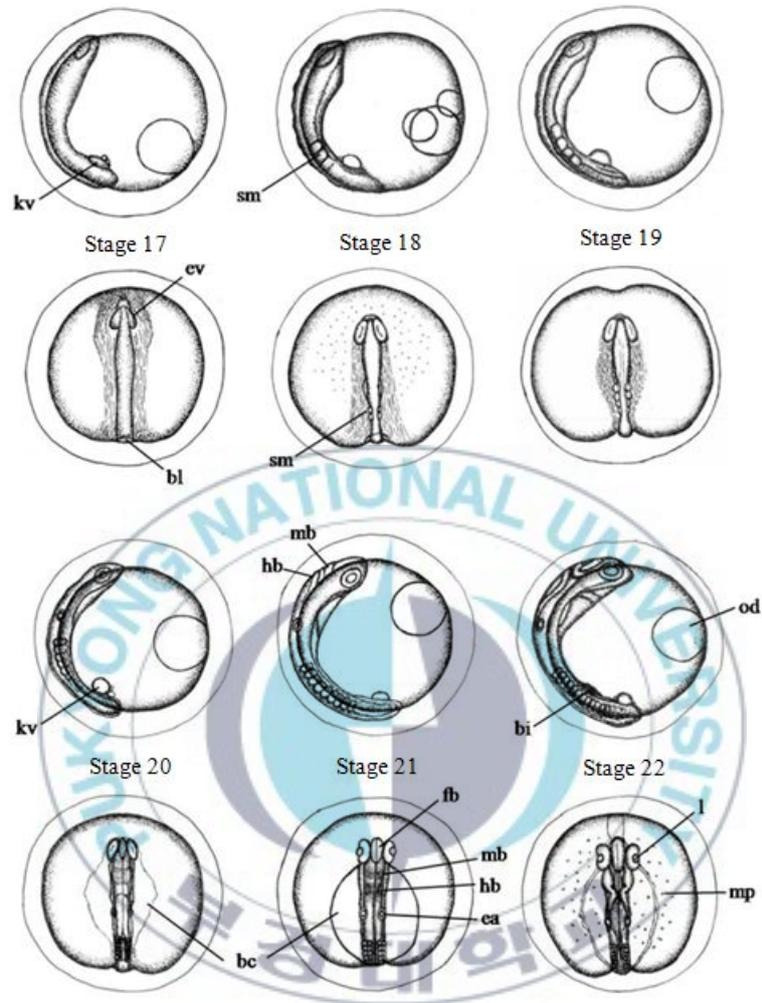


Fig. 5. Egg developmental stages of *Oryzias dancena*. Stage 17, Late neurula stage - 1 day (d) 7 hr after fertilization (af); Stage 18, 2 somite stage - 1 d 8 hr af; Stage 19, 4 somite stage - 1 d 10 hr 30 min af; Stage 20, 6 somite stage - 1 d 13 hr af; Stage 21, 9 somite stage - 1 d 22 hr af; Stage 22, Formation of tubular heart stage - 2 d 1 hr 30 min af; bc, body cavity; bi, blood island; bl, blastopore; ea, ear vesicle; ev, eye vesicle; fb, fore-brain; hb, hind-brain; kv, Kuffer's vesicle; mb, mid-brain; mp, melanophore; od, oil droplet; sm, somite; l, lens.

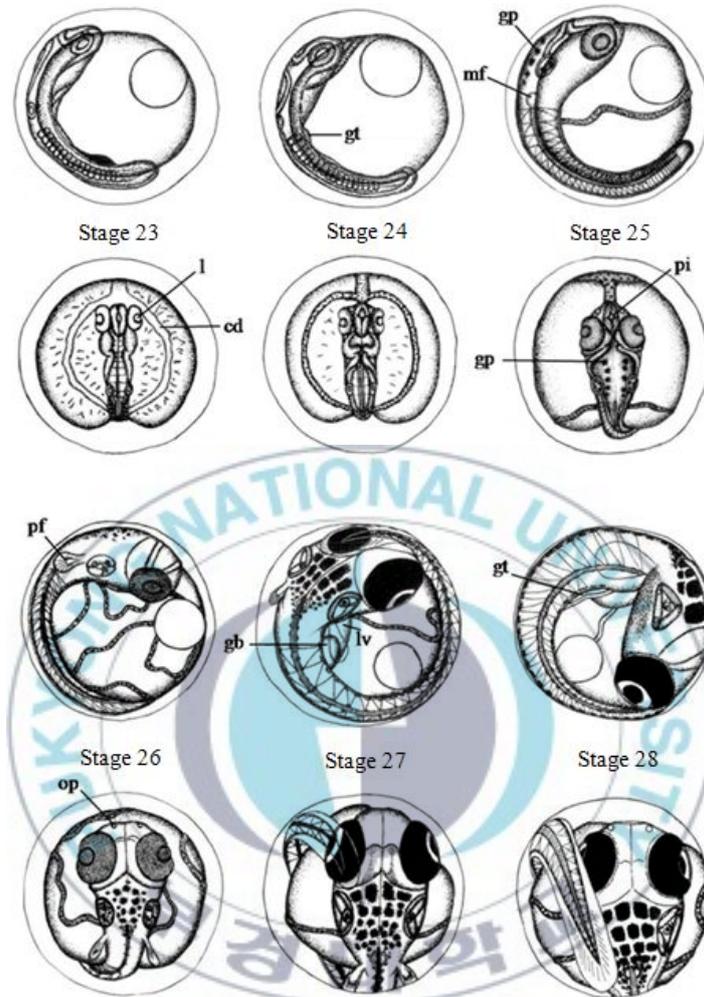


Fig. 6. Egg developmental stages of *Oryzias dancena*. Stage 23, Start of heart beating stage - 2 days (d) 4 hr after fertilization (af); Stage 24, Onset of blood circulation stage - 2 d 13 hr 30 min af; Stage 25, Onset of retinal pigmentation stage - 4 daf; Stage 26, Gill blood vessel formation stage - 4 d 20 hr af; Stage 27, Formation of visceral blood vessels stage - 6 d 12 hr af; Stage 28, Heart and spleen development stage - 8 daf; cd, Cuvierian duct; gb, gall bladder; gp, guanophore; gt, gut tube; l, lens; lv, liver; pf, pectoral fin; pi, pineal gland; op, olfactory pit; mf, membranous fin (fin fold).

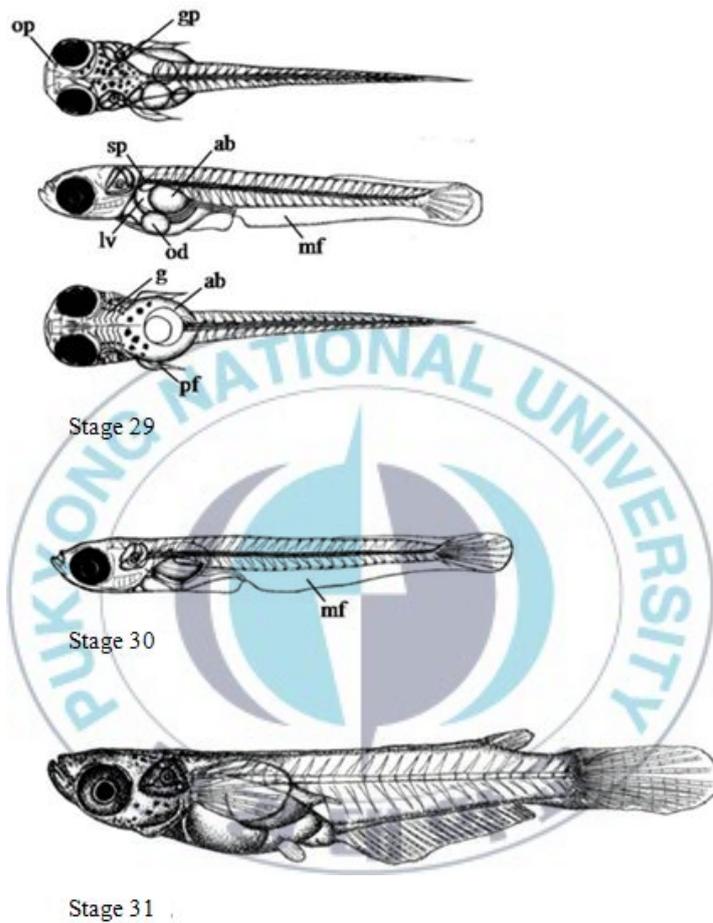


Fig. 7. Morphological development of the larvae and juvenile of *Oryzias dancena*. Stage 29, Just hatched out larva - 11 days (d) after fertilization (af); Stage 31 - 3 d post-hatching (ph); Stage 31, Juvenile stage - 21 dph; ab, air bladder; g, gill; gp, guanophore; lv, liver; mf, membranous fin (fin fold); od, oil droplet; op, olfactory pit; pf, pectoral fin; sp, spleen.

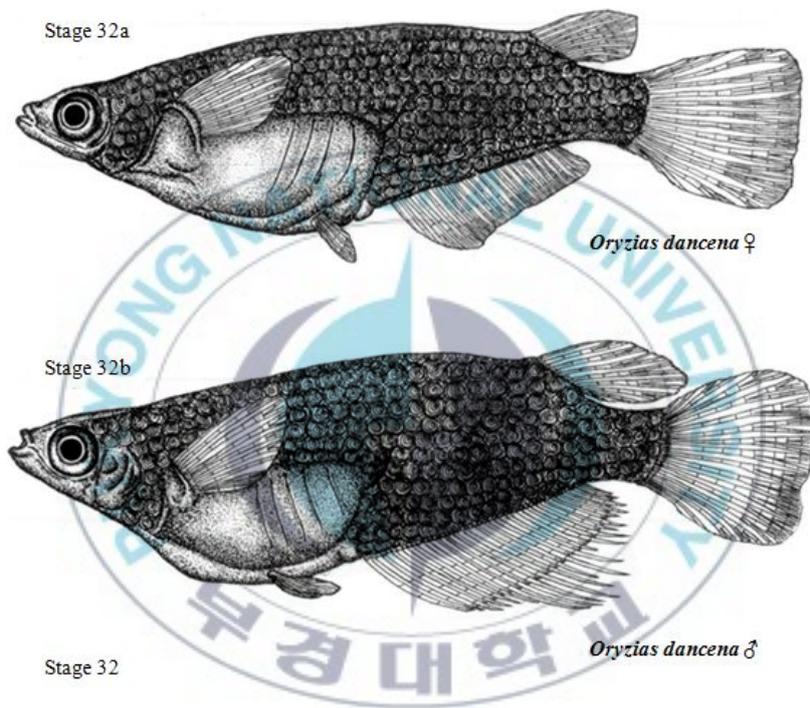


Fig. 8. Morphological development of adult fish of *Oryzias dancena*. Stage 32, First ovulation stage - 12 weeks post-hatching; 32a, Female, 32b, Male.

### 3) 성장 조사

성장과 산란 수명을 조사하기 위하여 바다 송사리의 성장률을 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 전장과 어체중을 측정한 결과 부화 후 21일째부터 성장이 증가하기 시작하여, 산란이 이루어지는 부화 후 9주째 이후 전장과 체장 모두 급격하게 증가하였다. 12주에서 16주 사이에 전장에 비하여 중 증가 비율이 높게 나타났는데, 이 시기에 체고가 급격하게 증가하였기 때문이다.

### 4) 골격 형성

골격 형성 조사 결과 바다 송사리의 골격을 중추골격(axial skeleton)과 부속지골격(appendicular skeleton)으로 구분하였고, 중추골격은 두골(skull)과 척추(vertebrae) 및 늑골(rib)로 구분하였다. 부속지골격에는 흉대(pectoral girdle)와 이들의 지느러미, 그리고 뒷지느러미(anal fin), 등지느러미(dorsal fin,) 및 꼬리지느러미(caudal fin)를 포함시켰다.

#### (1) 두개골 및 내장골

두부의 골격은 두개골(cranium)과 내장골(visceral skeletal)로 이루어져 있다. 두골의 경골화는 부화 후 6주째부터 시작되어 12주째에 이루어졌으며, 전장의 크기는 난발생과 자치어 발달에 기술되어 있는 것과 같다. 부화 직후의 자어는 두개골의 측사골(lateral ethmoid), 전두골(frontal), 상후두골(supraoccipital)과 외후두골(exoccipital)이 골화되어 있는 것을 관찰하였다. 턱이 섭취와 관련하여 턱뼈(maxilla)와 윗턱의 전상악골(premaxilla)이 골화되었고, 아래턱에서는 치골(dentary)이 골화되었다(Fig 9A). 두정골(parietal)과 익이골(pterotic)은 계속 발달하여 부화 후 4일째 자어에서 골화되었다(Fig. 9B). 부화 후 21일째부터 안와부에서 전두골과 함께 천정이 되어 안

구를 보호하고 받치는 연골인 안와접형골(orbitosphenoid)이 발달하기 시작하여, 28일째에 골화되었다(Fig 9C). 부화 후 6주째부터 상후두골(supraoccipital)이 경골화 되기 시작하며(Fig 9D), 부화 9주째에서는 경골화가 매우 진척되어 있었다. 또한, 상후두골 앞쪽의 전두골이 경골화 되기 시작하였고, 척주(vertebral column)와 새궁이 모두 경골화된 것을 관찰하였다(Fig 9E). 부화 후 12주째 개체에서는 대부분의 두개골과 내장골이 경골화되나 전상악골과 안와접형골의 일부 등이 연골성으로 남아있었다(Fig. 9F).

### (2) 가슴지느러미

연골인 원담기골(distal radial)은 1일자 자어에서부터 해부 현미경으로 확인할 수 있었으며, 부화 후 6주째 개체에서 하나로 융합된 상태의 골편으로 보이던 견갑골(scapula)과 오혜골(coracoid)이 확인되었으며, 방사기골(proximal radial)과 원담기골이 골화된 것이 뚜렷이 식별되었다(Fig. 10A). 부화 9주째 개체에서는 방사기골과 원담기골의 끝의 일부분을 남기고 모두 경골화되었으며(Fig. 10B), 부화 12주째에는 모두 경골화되었으며, 가슴지느러미의 기조는 끝부분만 경골화가 이루어졌다(Fig. 10C).

### (3) 뒷지느러미

원담기골, 방사기골 및 기조로 구성되어 있는 뒷지느러미는 부화 직후 자어에서 경골화된 상태는 아니었으나 부화 직후 지느러미의 형태는 모두 갖추어져 있었다(Fig. 11A). 부화 후 9일째부터 원담기골이 한쪽 끝에서부터 골화되기 시작하였으며(Fig. 11B), 28일째의 개체에서는 방사기골과 원담기골이 모두 골화되었다(Fig. 11C). 부화 9주차 개체에서는 아직 경골화가 이루어지지 않았으며, 28일자와 비교하여 방사기골의 수가 증가하지 않았으나, 기조의 끝부분이 골화되었다(Fig. 11D). 부화 후 12주째에는 방사기

Table 3. Growth in total length (A) and body weight increase (B) of *Oryzias dancena*

Age	Total length (mm)*	Body weight (g)*
0 d	4.4 ± 0.2	-
1 d	4.4 ± 0.1	-
2 d	4.5 ± 0.2	-
3 d	4.6 ± 0.2	-
4 d	4.6 ± 0.2	-
5 d	4.7 ± 0.1	-
6 d	4.7 ± 0.4	-
9 d	5.2 ± 0.3	-
12 d	6.2 ± 0.4	-
14 d	7.2 ± 0.7	-
3 w	8.7 ± 0.9	-
4 w	12.9 ± 1.0	-
6 w	18.4 ± 1.8	-
9 w	22.6 ± 2.7	0.1 ± 0.03
12 w	34.2 ± 1.7	0.4 ± 0.05
16 w	38.5 ± 1.9	0.6 ± 0.06
20 w	39.8 ± 1.5	0.7 ± 0.06
24 w	40.4 ± 1.0	0.8 ± 0.06
28 w	41.2 ± 2.8	0.8 ± 0.16
32 w	41.5 ± 2.7	0.9 ± 0.14
36 w	42.5 ± 1.5	0.9 ± 0.11
40 w	42.7 ± 1.2	0.9 ± 0.09
44 w	44.0 ± 1.0	1.0 ± 0.12
48 w	44.3 ± 1.5	1.0 ± 0.16

\* Mean ± SD

d, day; w, week

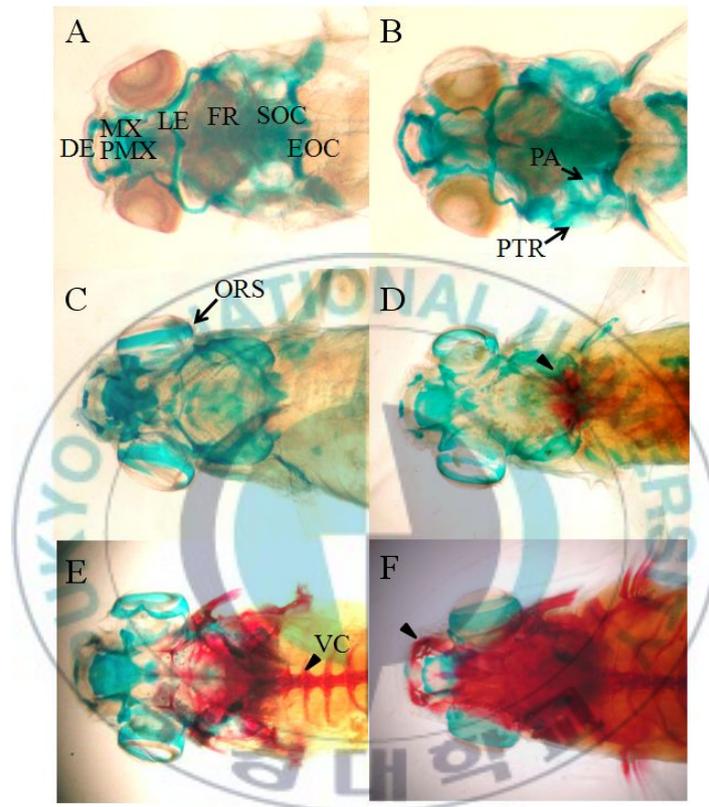


Fig. 9. Development of skull of *Oryzias dancena*. (A) Just hatched larva. (B) 4-day old larva. (C) 28-day old larva. (D) 6-week old adult. (E) 9-week old adult. (F) 12-week old adult. lateral ethmoid, LE; frontal, FR; supraoccipital, SOC; exoccipital, EOC; maxilla, MX; premaxilla, PMX; dentary, DE; parietal, PA; pterotic, PTR; orbitosphenoid, ORS; vertebral column, VC. Arrow heads indicate the calcification of cartilage.

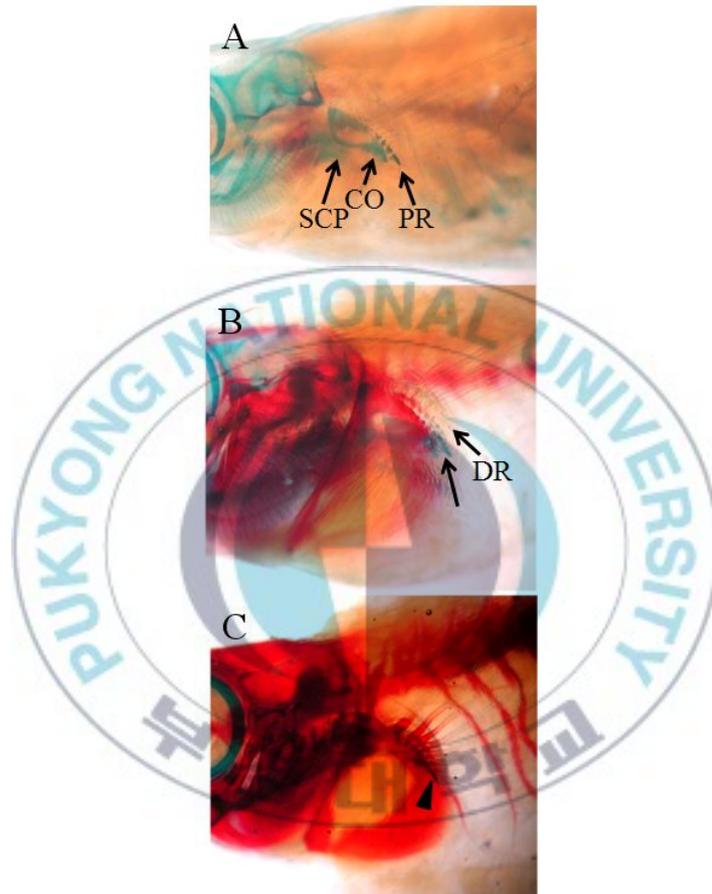


Fig. 10. Development of pectoral fin of *Oryzias dancena*. (A) 6-week old juvenile. (B) 9-week old adult. (C) 12-week old adult. distal radial, DR; scapula, SCP; coracoid, CO; proximal radial, PR. Arrow head indicates the calcification of cartilage.

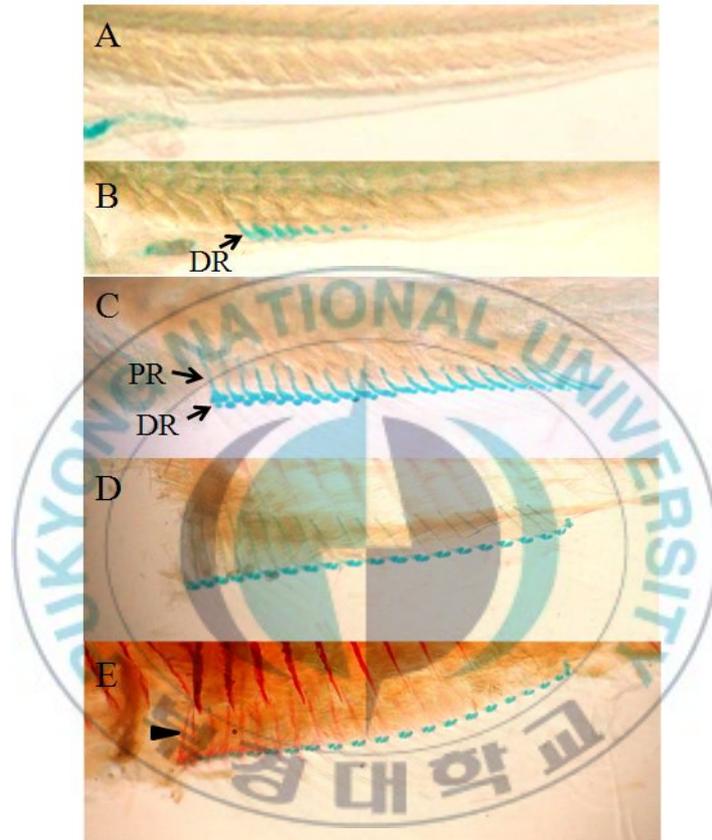


Fig. 11. Development of anal fin of *Oryzias dancena*. (A) Just hatched larva. (B) 9-day old larva. (C) 28-day old juvenile. (D) 9-week old adult. (E) 12-week old adult. distal radial, DR; proximal radial, PR. Arrow head indicates the calcification of cartilage.



Fig. 12. Development of dorsal fin and caudal fin of *Oryzias dancena*. (A) 5-day old larva. (B) 14-day old larva. (C) 9-week old adult. (D) 12-week old adult. distal radial, DR; proximal radial, PR; hypura, HP; epural, EP; phrhyural, PHP. Arrow heads indicate the calcification of cartilage.

꿀이 모두 경골화 되었으나, 원담기꿀은 연골인 상태로 관찰되었으며, 뒷지느러미의 기초의 끝부분의 경골화가 이루어진 것이 관찰되었다(Fig. 12E).

#### (4) 등지느러미와 꼬리지느러미

등지느러미와 꼬리지느러미는 부화 직후에 이미 형태를 갖추었으나, 구성꿀들은 경골화 되지 않은 상태였다(Fig. 12A). 등지느러미는 부화 후 14일째부터 방사기꿀과 원담기꿀의 골화가 진행되었으며(Fig. 12B), 부화 후 9주째의 개체에서는 방사기꿀의 골화가 더욱 진척되었다(Fig. 12C). 부화 12주째에는 방사기꿀이 모두 경골화되었으며, 원담기꿀은 연골인 상태로 관찰되었고, 등지느러미 기초 끝부분이 골화되기 시작하는 것이 관찰되었다(Fig. 12D). 꼬리지느러미는 미축꿀(hypural), 상미축꿀(epural) 및 하미축꿀(phrhypral)이 있었으며, 미축꿀은 2엽으로 분리된 상태였고, 모두 연골상태였다(Fig. 12A). 꼬리지느러미 기초들은 미축꿀을 포함하여 2개의 추체에 의하여 지지를 받는다. 경골화는 부화 후 9주째 개체에서 미축꿀을 중심으로 일어나기 시작하여(Fig. 12C), 부화 12주째에는 전체적으로 경골화 되었으며, 연조를 제외한 꼬리지느러미 기초도 모두 경골화되었다(Fig. 12D).

### 5) 성분화 및 생식소 형성

#### (1) 초기 생식소 형성

원시생식세포(PGC)의 출현과 원시생식세포를 구성하는 조직의 초기 분화는 수정 후 9일째부터 부화 후 9일을 전후한 자어에서 관찰되었다. 즉, 수정 후 5일째(부화 6일 전)에 원시생식세포가 가슴지느러미와 난황 사이에 부유하고 있는 것이 관찰되었고, 수정 후 9일째(부화 2일 전)에는 장(gut)과 앞신장관(pronephric duct) 사이의 생식소가 형성될 부위(presumptive gonadal area)로 이동한 것이 관찰되었다. 원시생식세포는 세포와 핵 크기가

크고 넓게 염색된 투명한 세포질과 둥근 핵을 포함하여 체세포와 확연히 구분되는 특징을 가지고 있었다(Fig. 13A).

부화 후 2일째(평균 전장:  $4.5 \pm 0.2$  mm)인 자어들의 생식세포에서는 세포 분열이 일어나기 시작한 것이 관찰되었으며, 부화 후 4일째(평균 전장:  $4.6 \pm 0.2$  mm)인 개체에서는 체세포 분열이 활발히 일어나 생식소의 크기도 신장되었다(Fig. 13B). 부화 후 6일째(평균 전장:  $4.7 \pm 0.4$  mm)인 개체에서는 활발한 체세포 분열이 일어났으며 생식소가 장(gut)과 분리되어 별도의 막에 감싸여 있었다(Fig. 13C). 부화 후 9일째(평균 전장:  $5.2 \pm 0.3$  mm) 되는 자어의 생식소에서는 자어의 성장과 함께 세포수가 더욱 증가하여 생식소의 크기가 더욱 증대되었으며 이 시기까지 암컷과 수컷 생식소의 형태적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 13D).

## (2) 난소의 분화

부화 후 12일째(평균 전장:  $6.2 \pm 0.4$ )에 최초로 1차 난모세포가 관찰되어 난소조직으로 확인되었으며(Fig. 14A), 부화 후 21일째(평균 전장:  $8.7 \pm 0.9$  mm)에 염색인기 난모세포(oocyte in the chromatin nucleolus, CNO)들이 나타나기 시작하였다(Fig. 14B). 부화 후 28일째(평균 전장:  $13.0 \pm 1.0$  mm) 개체의 암컷 생식소에서는 초기 난모세포(early oocyte in the peri-nucleolus, PNO)가 난소 내에 가득 차기 시작하여 생식소의 크기도 점차 증대되었다(Fig. 14C). 6주째(평균 전장:  $18.4 \pm 1.8$  mm)의 개체에서는 생식소의 크기가 더욱 신장하였으며, 난소 조직에서는 세포질 주변에 난황과립(yolk granule)이 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 14D). 부화 후 9주째(평균 전장:  $22.6 \pm 2.7$  mm)의 개체에서 처음으로 배란이 이루어졌으며 조직학적 관찰 결과 난황과립이 난 전체에 형성되는 성숙난과 산란 직후 성숙난이 빠져나간 것이 관찰되었다(Fig. 16A).

### (3) 정소의 분화

부화 후 12일째에 세포분열이 관찰되지는 않았지만, 세르토리 세포 (sertoli-like cell)와 정소엽(lobular) 구조가 생식소 내에서 관찰되었고 장과 따로 분리된 형태를 띄고 있지 않았다(Fig. 15A). 하지만 부화 후 21일째에는 장과 체강내벽에서 분리된 생식소의 형태를 관찰할 수 있었으며 정소 소관(efferent duct, ED)이 관찰되었고 정원세포(spermatogonia, SG)가 더욱 분열 증식하였다(Fig. 15B). 부화 후 28일째의 정소에서는 정소 소관 내의 정원세포의 분열이 활발히 일어나는 것과 정세포(spermatid)들이 관찰되었다(Fig. 15C). 부화 후 6주째의 정소에서는 생식소 전체에 정소 소관이 형성되며, 많은 수의 정원세포가 분열 증식되는 것과 정세포들이 관찰되었다 (Fig. 15D). 산란시기인 부화 후 9주째의 정소에서는 정원세포는 거의 관찰되지 않고 많은 수의 정세포가 관찰되었으며 산란 직후 정자가 빠져나간 부분이 관찰되었다(Fig. 16B).

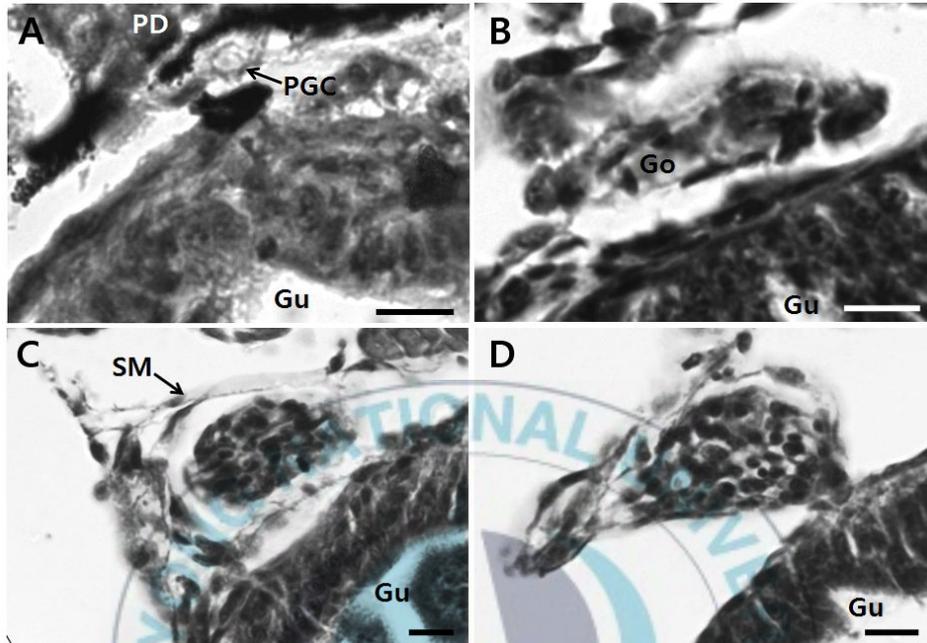


Fig 13. Photographs for HE-stained cross sections of undifferentiated gonads from the *Oryzias dancena*. (A) Primordial germ cells (PGC, arrow), were clearly distinguished from somatic cells. The sizes of PGC and their nucleus were larger than somatic cell and their cytoplasm were dyed lightly, and the PGC were migrated to the presumptive gonadal area between the gut (Gu) and pronephopie duct (PD) at 9 days after fertilization. (B) Showing the expansion of the size of gonads (Go) with rapidly increasing number of cells by active somatic cell division at 4 days after hatching. (C) The gonads were separated from the gut and enclosed with separate membrane (SM) at 6 days after hatching. (D) The gonads were expanded further with more number of cells at 9 days after hatching. However, there was no morphological difference between male and female gonads up to this stage. All the scale bars indicate 10 $\mu$ m.

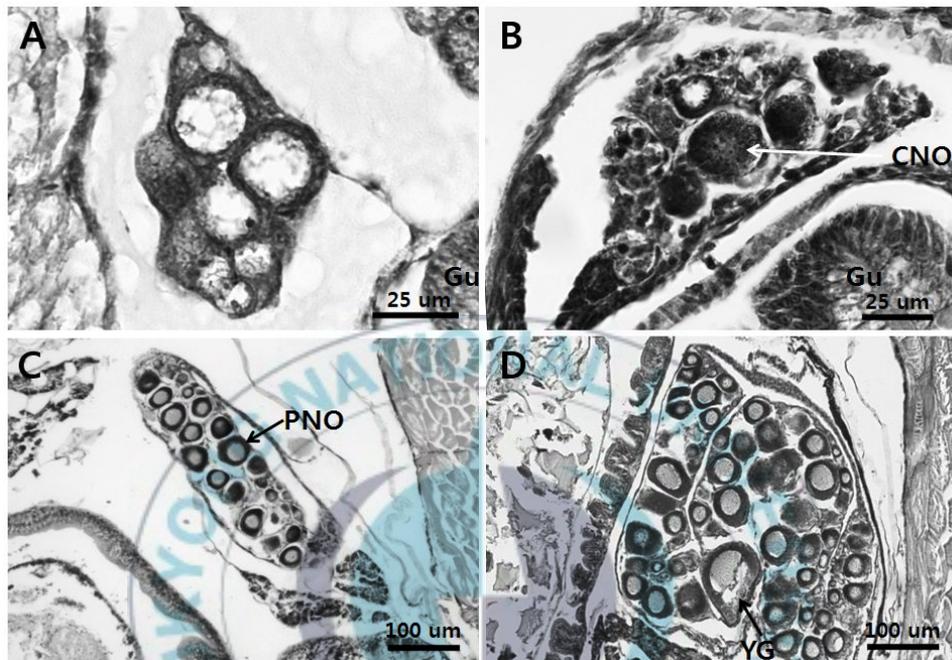


Fig 14. Representative photographs for HE-stained cross sections of differentiated ovary from the *Oryzias dancena*. (A) Male and female gonads were observed first at 12 days after hatching and primary oocytes were identifiable at this stage. (B) The oocytes in the chromatin nucleolus (CNO) were observed at 3 weeks after hatching. (C) Early oocytes of perinucleolus stage (PNO) were observed and ovary was expanded at 4 weeks after hatching. (D) The yolk granulations (YG) were observed around the cytoplasm at 6 weeks after hatching.

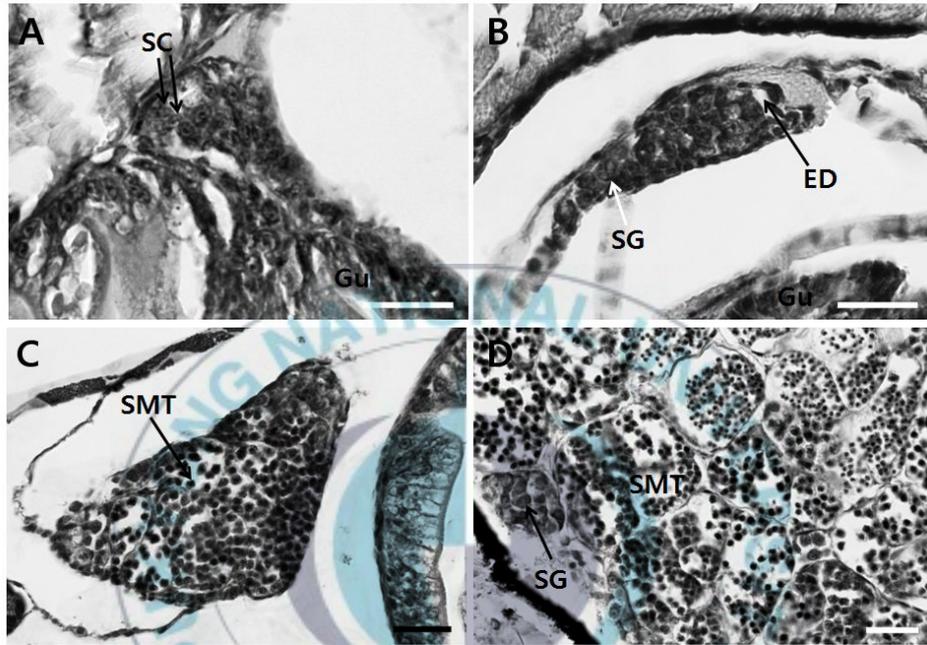


Fig 15. Representative photographs for HE-stained cross sections of differentiated testis from the *Oryzias dancena*. (A) Sertoli-like cells (SC) and lobular structures were observed at 12 days after hatching and testis was not separated from walls of the body cavity and gut. (B) The gonad was separated from the walls of body wall and gut at 3 weeks after hatching. spermatogonia (SG) and efferent duct (ED). (C) Spermatids (SMT) were observed at 4 weeks after hatching. (D) Many spermatogonia and spermatids were observed at 6 weeks after hatching. All the scale bars indicate 25  $\mu$ m.

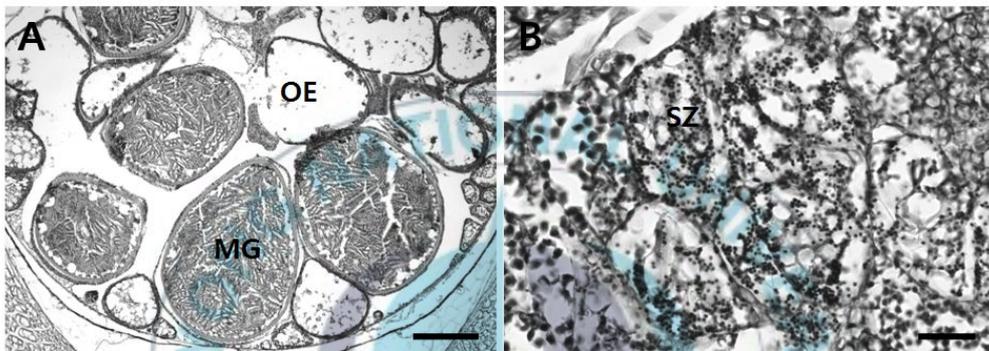


Fig 16. Photographs of fully matured ovary (A) and testis (B) in *Oryzias dancena* at 9 weeks after hatching. With the presence of mature eggs (MG), the sign of the first ovulated eggs (OE) are seen in the ovary. Many spermatozoa (SZ) in the testis were discharged after spawning. Scale bars, (A) 200  $\mu\text{m}$ , (B) 25  $\mu\text{m}$ .

## 6) 세포유전학적 분석

### (1) 적혈구 세포 및 핵의 크기

적혈구의 세포 장축은  $8.82 \pm 0.45 \mu\text{m}$ , 단축은  $7.60 \pm 0.37 \mu\text{m}$ 였으며, 표면적 및 부피는 각각  $52.57 \pm 1.22 \mu\text{m}^2$  및  $266.21 \pm 10.95 \mu\text{m}^3$ 였다. 적혈구 핵의 세포 장축은  $4.43 \pm 0.42 \mu\text{m}$ , 단축은  $2.80 \pm 0.13 \mu\text{m}$ 였으며, 표면적 및 부피는 각각  $9.75 \pm 0.45 \mu\text{m}^2$  및  $18.20 \pm 0.95 \mu\text{m}^3$ 였다(Table 4, Fig. 17A).

### (2) 적혈구의 nucleolar organizer regions (NORs) 분석

적혈구 NORs 분석 결과 바다 송사리는 세포 당 1개와 2개의 NORs가 나타났고, 그 빈도는 세포 당 1개가 20.5%, 2개가 78.0%로 나타났다(Fig. 17B).

### (3) DNA 함량 분석

미꾸라지의 꼬리지느러미( $2.8 \text{ pg/nucleus}$ )를 대조군으로 사용하여 바다 송사리의 genome size를 분석한 결과, 세포 당 DNA 함량은  $1.76 \pm 0.09 \text{ pg/cells}$ 로 나타났다(Table 5).

### (4) 염색체 수 및 핵형 분석

염색체수를 조사한 결과 바다 송사리의 분석된 개체는 모두  $2n = 48$ 로 나타났다. 핵형은 차단부동원체(acrocentric) 염색체가 24쌍으로 나타났으며, fundamental number (FN)는 48이었다. 차단부동원체 중 한 쌍에서 2차 수축(secondary constriction)이 나타났다. 암·수간 염색체수의 차이는 나타나지 않았고, 암·수간 heteromorphic한 염색체는 관찰할 수 없었다(Fig. 18).

Table 4. Erythrocyte measurement of *Oryzias dancena*

Item	Cell	Nucleus
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	$8.82 \pm 0.45$	$4.43 \pm 0.42$
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	$7.60 \pm 0.37$	$2.80 \pm 0.13$
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	$52.57 \pm 1.22$	$9.75 \pm 0.45$
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	$266.21 \pm 10.95$	$18.20 \pm 0.95$

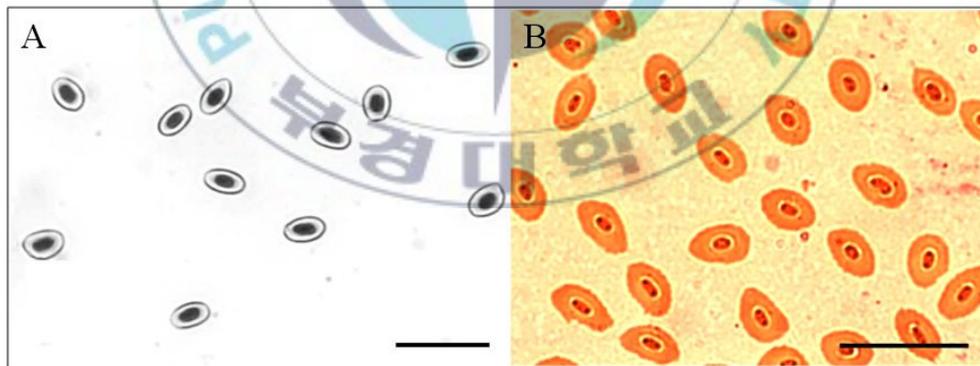


Fig. 17. Photographs of erythrocytes (A) and silver-stained erythrocytes (B) of *Oryzias dancena*. All scale bars indicate 20  $\mu\text{m}$ .

Table 5. Genome size of *Oryzias dancena* determined by flow cytometry

Species	DNA content (pg/cell)
<i>Misgurnus mizolepis</i> *	2.80
<i>Oryzias dancena</i>	1.76 ± 0.09

\* *Misgurnus mizolepis* (from Park et al., 1999)

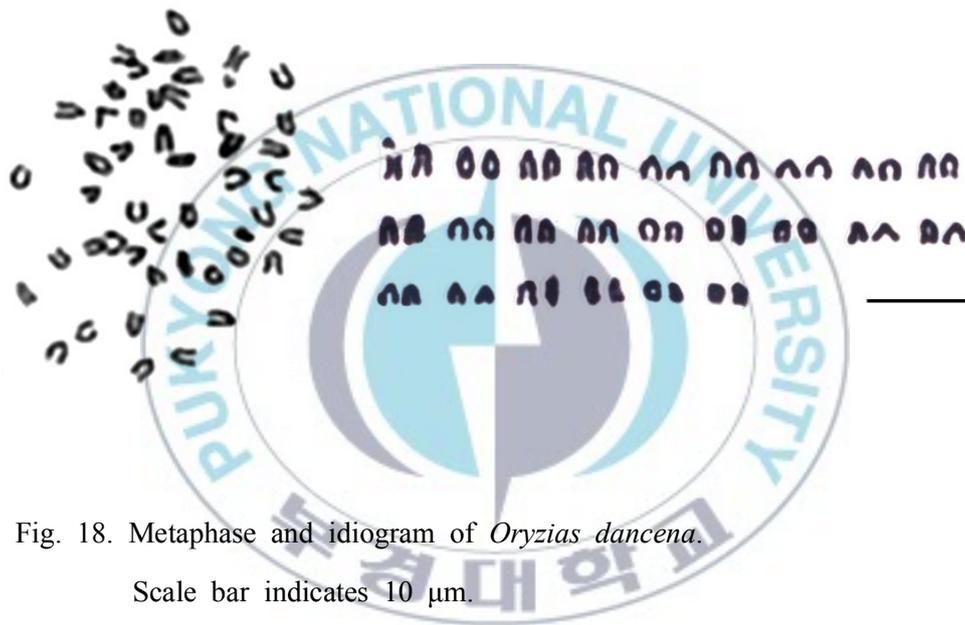


Fig. 18. Metaphase and idiogram of *Oryzias dancena*.

Scale bar indicates 10 μm.

## 2. 자바 송사리에 대한 발생·생물학적 연구

### 1) 난의 형태 및 난발생 과정

난의 형태를 조사한 결과 자바 송사리의 난은 바다 송사리와 같은 구형의 침성·점착성이었다. 난발생 과정 및 발육단계에 따른 자치어의 형태 발달 시간은 Table 6에 나타내었으며, 난발생에 따른 형태적 특징 및 발달 단계는 모두 바다 송사리와 같았다. 배반이 형성되는 시기는 수정 후 1시간째로 바다 송사리와 같았으나, 2세포기부터 자바 송사리의 발생 속도가 느려지기 시작하여 포배기까지 8시간 45분이 소요되어 발생 속도가 1시간 차이가 났다. 심장 박동 시기에 이르는 시간은 바다 송사리에 비해 2시간이 늦은 수정 후 2일 6시간째였다. 부화는 바다 송사리 보다 3일이 늦은 수정 후 14일째에 이루어졌다.

### 2) 성장 조사

성장을 조사하기 위한 자바 송사리의 부화 직후부터 9주까지의 전장은 Table 7에 나타내었다. 부화 직후 자어의 크기는  $5.0 \pm 0.2$  mm였으며, 부화 후 28일째부터  $12.5 \pm 0.7$  mm에서 6주째  $17.0 \pm 0.9$  mm로 급격하게 성장하였으며, 9주째에는  $21.5 \pm 0.7$  mm에 이르렀다. 최초로 산란이 이루어지는 부화 후 13주째에는  $29.2 \pm 1.1$  mm였다.

### 3) 세포유전학적 분석

#### (1) 적혈구 세포 및 핵의 크기

자바 송사리 적혈구의 세포 장축은  $7.71 \pm 0.40$   $\mu\text{m}$ , 단축은  $6.59 \pm 0.55$   $\mu\text{m}$ 였고, 표면적 및 부피는 각각  $41.73 \pm 1.11$   $\mu\text{m}^2$  및  $189.34 \pm 11.29$   $\mu\text{m}^3$ 였다. 적혈구 핵의 세포 장축은  $3.73 \pm 0.42$   $\mu\text{m}$ , 단축은  $2.83 \pm 0.18$   $\mu\text{m}$ 였으며, 표면적은  $8.33 \pm 0.45$   $\mu\text{m}^2$ , 부피는  $15.80 \pm 1.45$   $\mu\text{m}^3$ 로 나타났다(Table

8, Fig. 19A).

(2) 적혈구의 nucleolar organizer regions (NORs) 분석

자바 송사리의 NORs 분석 결과 세포 당 1와 2개의 NORs가 나타났고, 그 빈도는 세포 당 1개가 12.2%, 2개가 88.8%로 나타났다(Fig. 19B).

(3) 염색체 수 및 핵형 분석

염색체수는 모두  $2n = 48$ 로 나타났으며, 1쌍의 차간부염색체 (subtelocentric)와 23쌍의 차단부동원체를 가지고 있었다. FN은 48이었으며, 차단부동원체 중 한 쌍에서 2차 수축이 관찰되었다. 자바 송사리 역시 바다 송사리와 동일하게 암·수간 염색체수의 차이는 나타나지 않았고, 암·수간 heteromorphic한 염색체는 관찰할 수 없었다(Fig. 20).

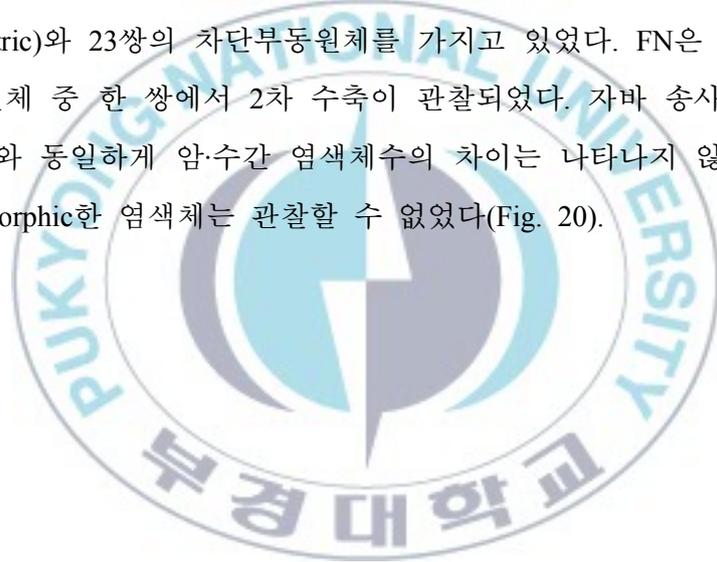


Table 6. Embryonic and morphological development of *Oryzias javanicus*

Developmental stage	Time (after fertilization)
Blastodisc formation	01 hr
Two cells stage	01 hr 45 min
Four cells stage	02 hr 30 min
Eight cells stage	03 hr 15 min
Sixteen cells stage	03 hr 45 min
Thirty-two cells stage	05 hr
Morula stage	06 hr 15 min
Blastula stage	08 hr 45 min
Early gastrula stage	14 hr 30 min
Mid gastrula stage	17 hr
Late gastrula stage	22 hr 30 min
Early neurula stage	1 day 06 hr 30 min
Late neurula stage	1 day 08 hr
2 somite stage	1 day 09 hr
4 somite stage	1 day 11 hr 30 min
6 somite stage	1 day 15 hr
9 somite stage	2 days
Formation of tubular heart stage	2 days 02 hr
Start of heart beating stage	2 days 06 hr
Onset of blood circulation stage	2 days 23 hr
Onset of retinal pigmentation stage	4 days 08 hr
Gill blood vessel formation stage	5 days
Formation of visceral blood vessels stage	8 days
Heart and spleen development stage	8 days
Just hatched larvae	14 days
First ovulation stage	93 days

Table 7. Growth in total length of *Oryzias javanicus*

Age	Total length (mm)*
0 d	5.0 ± 0.2
1 d	5.2 ± 0.2
2 d	5.2 ± 0.2
3 d	5.5 ± 0.3
4 d	5.6 ± 0.3
5 d	6.7 ± 0.2
6 d	7.5 ± 0.3
9 d	8.7 ± 0.4
14 d	10.0 ± 0.5
3 w	10.7 ± 0.3
4 w	12.5 ± 0.7
6 w	17.0 ± 0.9
9 w	21.5 ± 0.7
13 w	29.2 ± 1.1

\* Mean ± SD

d, day; w, week

Table 8. Erythrocyte measurement of *Oryzias javanicus*

Item	Cell	Nucleus
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	$7.71 \pm 0.40$	$3.73 \pm 0.42$
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	$6.59 \pm 0.55$	$2.83 \pm 0.18$
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	$41.73 \pm 1.11$	$8.33 \pm 0.45$
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	$189.34 \pm 11.29$	$15.80 \pm 1.45$

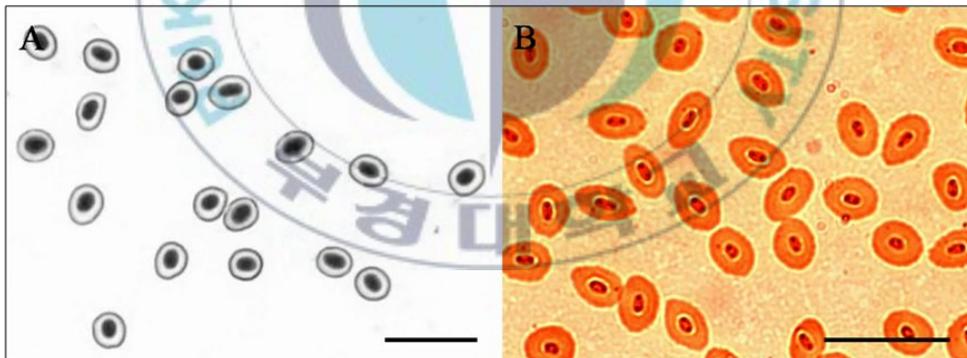


Fig. 19. Photographs of erythrocytes (A) and silver-stained erythrocytes (B) of *Oryzias javanicus*. All scale bars indicate 20  $\mu\text{m}$ .



Fig. 20. Metaphase and idiogram of *Oryzias javanicus*.  
Scale bar indicates 10 μm.

### 3. 바다 송사리와 자바 송사리 간의 잡종, 상반 잡종 및 역교배체 유도

#### 1) 바다 송사리와 자바 송사리 간의 잡종 및 상반 잡종

##### (1) 난발생 과정

ODJ와 OJD의 난발생 시간을 조사한 결과는 Table 9에 나타내었다. 발생 과정에 따른 형태적 변화를 관찰한 결과 바다 송사리와 자바 송사리의 형태와 발생 단계의 차이는 없었으며, 발생 시간에 차이가 있었다. ODJ와 OJD의 친어로 사용된 바다 송사리와 자바 송사리와의 난발생 시간과 비교한 결과 수정 후 1시간째 배반이 형성되는 속도는 같았지만, 그 이후 발생 단계부터 차이가 나타나기 시작하였다. 난발생 과정과 자치어의 형태발달에 관하여 관찰한 결과 발생 과정에 따른 형태적 변화에 있어 친어군과 잡종군 모두 차이는 없었으며, 발생 단계에서 시간 차이가 있었다. 수정 후 1시간째 배반이 형성되는 속도는 같았지만, 그 이후 발생 단계부터 차이가 나타나기 시작하였다. 심장 기관 형성 단계까지의 시간은 바다 송사리와 ODJ가 수정 후 2일 1시간 30분으로 발생 속도가 유사하였으나, 그 이후 단계인 심장 박동기부터 바다 송사리가 2일 4시간, ODJ가 2일 5시간 30분 소요되어 ODJ가 바다 송사리 보다 느려졌다. 자바 송사리와 OJD는 초기 낭배기까지는 수정 후 14시간 30분으로 발생 속도가 유사하였으나, 그 이후 단계부터 OJD의 발생 속도가 느려져 혈액순환 시작 단계까지 자바 송사리가 2일 22시간 소요된 반면, OJD는 3일이 소요되었다. 발생 속도는 바다 송사리가 가장 빨랐으며, 다음으로 ODJ, 자바 송사리 그리고 OJD의 순이었다. 부화 시간의 순서 역시 발생속도와 동일하였으며, 바다 송사리가 수정 후 11일째에, 자바 송사리가 14일째에, ODJ가 13일째에 부화하였으며, OJD가 가장 느린 수정 후 15일째에 부화하였다.

Table 9. Characteristics of egg development in interspecific hybrids between *Oryzias dancena* and *O. javanicus* (ODJ & OJD)

Developmental stage	Time (after fertilization)	
	ODJ	OJD
Fertilized eggs	00 hr	00 hr
Blastodisc stage	01 hr	01 hr
Two cells stage	01 hr 30 min	01 hr 45 min
Four cells stage	02 hr	02 hr 30 min
Eight cells stage	03 hr	03 hr 15 min
Sixteen cells stage	03 hr 30 min	03 hr 45 min
Thirty-two cells stage	04 hr 30 min	05 hr
Morula stage	05 hr 30 min	06 hr 15 min
Blastula stage	07 hr 45 min	08 hr 45 min
Early gastrula stage	13 hr 15 min	14 hr 30 min
Mid gastrula stage	16 hr 45 min	17 hr
Late gastrula stage	21 hr 30 min	22 hr 30 min
Early neurula stage	1 d 06 hr	1 d 07 hr
Late neurula stage	1 d 07 hr	1 d 08 hr 30 min
2 somite stage	1 d 08 hr	1 d 09 hr 30 min
4 somite stage	1 d 10 hr 30 min	1 d 13 hr
6 somite stage	1 d 13 hr	1 d 15 hr 30 min
9 somite stage	1 d 22 hr	2 d 02 hr
Formation of tubular heart	2 d 01 hr 30 min	2 d 03 hr
Start of heart beating	2 d 05 hr 30 min	2 d 07 hr
Onset of blood circulation	2 d 23 hr	3 d 00 hr
Onset of retinal pigmentation	4 d 06 hr	4 d 10 hr
Gill blood vessel formation	4 d 23 hr	6 d 00 hr
Formation of visceral blood vessel	7 d 06 hr	8 d 06 hr
Heart and spleen development	10 d	12 d
Just hatched larvea	13 d	15 d

Table 10. Percent fertilization, hatching and abnormality in *Oryzias dancena* (OD), *O. javanicus* (OJ) and interspecific hybrids between *O. dancena* and *O. javanicus* (ODJ & OJD)

Exp-group	No. of eggs used (females)	Fertilization rate (%)	Hatching (%)	Abnormality rate (%)
OD (♀) x OD (♂)	265 (7)	97.7	94.7	0.8
	309 (7)	97.4	93.5	0.0
	308 (8)	96.8	96.1	1.4
	242 (7)	97.1	88.0	1.9
	288 (9)	98.3	94.4	1.1
	254 (7)	96.5	94.9	0.0
	271 (8)	97.8	91.9	0.0
Total	1934 (53)	97.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	93.4 ± 2.7 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.8 <sup>a</sup>
OJ (♀) x OJ (♂)	81 (8)	93.8	75.3	1.6
	83 (10)	87.5	80.7	0.0
	123 (11)	94.3	78.9	2.1
	78 (8)	94.9	82.1	1.8
	73 (87)	93.1	83.9	0.0
	83 (10)	90.4	81.9	0.0
	38 (5)	92.1	78.9	0.0
Total	573 (62)	92.3 ± 2.4 <sup>b</sup>	80.3 ± 2.8 <sup>b</sup>	0.8 ± 1.0 <sup>a</sup>
OD (♀) xOJ (♂)	71 (3)	91.6	76.1	11.1
	48 (2)	89.6	81.3	8.8
	98 (3)	92.9	82.7	11.1
	70 (3)	85.7	78.6	14.6
	42 (3)	88.1	81.0	9.4
	95 (4)	91.6	82.1	7.7
	64 (4)	85.9	79.7	11.8
Total	488 (22)	89.4 ± 2.7 <sup>c</sup>	80.2 ± 2.3 <sup>b</sup>	10.6 ± 2.3 <sup>b</sup>
OJ (♀) X OD (♂)	71 (6)	77.5	8.5	83.3
	35 (4)	82.9	5.7	100.0
	76 (8)	80.3	6.6	100.0
	85 (8)	82.4	7.1	66.7
	68 (10)	83.8	7.4	100.0
	66 (9)	81.0	9.1	83.3
	76 (10)	80.3	7.9	100.0
Total	477 (55)	81.8 ± 2.6 <sup>d</sup>	7.4 ± 1.1 <sup>c</sup>	90.5 ± 13.1 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Means with different superscript within a column are significantly different (P < 0.05), based on ANOVA test. Values are mean ± SD.

### (2) 수정율, 부화율 및 기형률 조사

수정율, 부화율, 폐사율 및 기형률 조사하여 바다 송사리, 자바 송사리 및 유도된 잡종의 결과를 table 10에 나타내었다. 바다 송사리의 평균 수정율은  $97.3 \pm 0.6\%$ 이었고, 자바 송사리는  $92.3 \pm 2.4\%$ 로 나타났다. ODJ의 평균 수정율은  $89.4 \pm 2.7\%$ 였고, OJD의 평균 수정율은  $81.8 \pm 2.6\%$ 로 나타나 바다 송사리와 자바 송사리의 수정율에 비해 다소 낮았다. 부화율은 바다 송사리의 경우 평균  $93.4 \pm 2.7\%$ 였으며, 자바 송사리는  $80.3 \pm 2.8\%$ 였다. ODJ의 평균 부화율은  $80.2 \pm 2.3\%$ 로 바다 송사리와 자바 송사리 보다 다소 낮게 나타났다. OJD의 평균 부화율은  $7.4 \pm 1.1\%$ 로 나타나 바다 송사리와 자바 송사리 및 ODJ 보다 현저히 낮은 부화율을 보였다. 기형률은 바다 송사리와 자바 송사리는 각각  $0.7 \pm 0.8\%$ 와  $0.8 \pm 1.0\%$ 로 낮게 나타났으나, ODJ 잡종은  $10.6 \pm 2.3\%$ 로, 바다 송사리와 자바 송사리의 기형률 보다 높게 나타났다. OJD의 기형률은  $90.5 \pm 13.1\%$ 로 바다 송사리와 자바 송사리 및 바다 송사리와 자바 송사리 잡종군(ODJ) 보다 현저히 높은 기형률을 나타냈다.

### (3) 성장 조사

ODJ의 전장을 친어군으로 사용된 바다 송사리와 자바 송사리와 비교한 결과는 Fig. 21과 같다. 부화 직후의 치어의 길이는 바다 송사리는  $4.4 \pm 0.2$  mm였고, 자바 송사리는  $5.0 \pm 0.2$  mm, ODJ는  $4.3 \pm 0.4$  mm로, ANOVA test 결과 ODJ는 모계인 바다 송사리와 유사하였으며, 자바 송사리와는 차이가 있었다. 부화 후 14일째 되는 개체의 경우 바다 송사리, 자바 송사리 및 ODJ의 전장에서 모두 차이가 나타났다( $P < 0.05$ ). 전장의 길이는 자바 송사리가 가장 크고 다음으로 ODJ가 크며, 바다 송사리가 가장 작았다. 하지만, 부화 후 28일째가 되는 개체의 경우 이와 다르게 바다 송사리

의 성장이 급속히 증가하여  $P < 0.05$ 의 수준에서 세 실험군 모두에서 차이가 나타나지 않았으며, 6주째의 경우에도 성장 차이가 없는 것으로 조사되었다. 하지만 부화 후 9주째에 바다 송사리가 자바 송사리와 ODJ와 비교하여 가장 성장이 빠른 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

#### (4) 세포유전학적 분석

##### 4.1. 적혈구 세포 및 핵의 크기

ODJ의 적혈구의 세포 장축은  $7.81 \pm 0.20 \mu\text{m}$ , 단축은  $6.81 \pm 0.60 \mu\text{m}$ 였고, 표면적 및 부피는 각각  $40.13 \pm 3.46 \mu\text{m}^2$ 와  $177.07 \pm 22.88 \mu\text{m}^3$ 로 나타났다. 적혈구 핵의 장축은  $3.74 \pm 0.17 \mu\text{m}$ , 단축은  $2.84 \pm 0.19 \mu\text{m}$ 였으며, 표면적은  $8.30 \pm 0.50 \mu\text{m}^2$ , 부피는  $15.66 \pm 1.25 \mu\text{m}^3$ 로 나타났다(Table 11).

##### 4.2. 염색체 수 조사와 핵형 분석

ODJ와 OJD의 modal 염색체 수는 각각  $2n=48$ 이었고, 핵형은 24쌍의 차단부동원체로 구성되어 있었고 NF는 48이었다. 차단부동원체 중 한 쌍에서 2차 수축이 관찰되었으며, 암·수간 염색체수의 차이는 나타나지 않았고, 암·수간 heteromorphic한 염색체는 관찰할 수 없었고 개체 간 염색체 다형 현상도 관찰되지 않았다(Fig. 22, Table 12).



Fig. 21. Comparisons of growth in total length of *Oryzias dancena* (OD), *O. javanicus* (OJ) and *O. dancena* (♀) and *O. javanicus* (♂) hybrid (ODJ).

Table 11. Erythrocyte measurement of hybrids (ODJ) of *Oryzias dancena* and *O. javanicus*

Item	Cell	Nucleus
Major axis ( $\mu\text{m}$ )	$7.81 \pm 0.20$	$3.74 \pm 0.17$
Minor axis ( $\mu\text{m}$ )	$6.81 \pm 0.60$	$2.84 \pm 0.19$
Surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	$40.13 \pm 3.46$	$8.30 \pm 0.50$
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	$177.07 \pm 22.88$	$15.66 \pm 1.25$

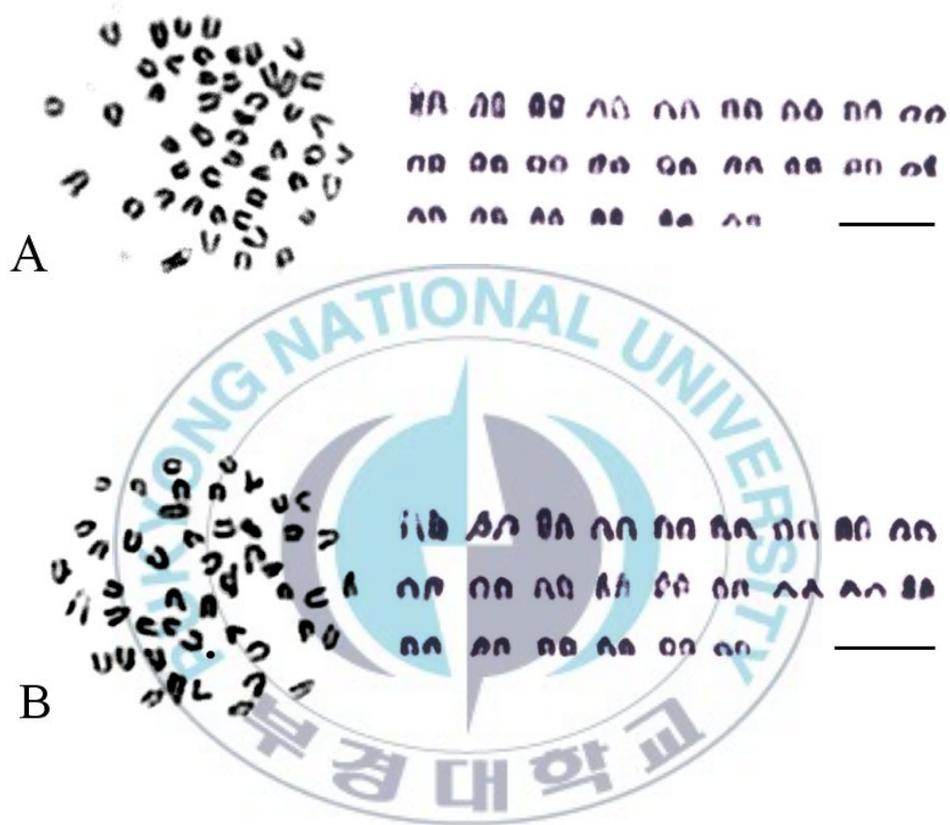


Fig. 22. Metaphase and idiogram of hybrid between *Oryzias dancena* and *O. javanicus*. (A) ODJ: *O. dancena* (♀) x *O. javanicus* (♂). (B) OJD: *O. javanicus* (♀) x *O. dancena* (♂). All scale bar indicates 10  $\mu$ m.

Table 12. Chromosome counts of reciprocal hybrids between *Oryzias dancena* and *O. javanicus*, along with their parental species

Species*	No. of Fish	No. of metaphase counted	Frequency of chromosome number				
			46	47	48	49	50
OD	17	100	13	14	67	5	1
OJ	18	100	9	15	72	4	0
ODJ	16	100	15	18	57	6	4
OJD	18	100	12	17	63	6	2

\* Genotype abbreviation

OD : *O. dancena* (♀) x *O. dancena* (♂)

OJ : *O. javanicus* (♀) x *O. javanicus* (♂)

ODJ: *O. dancena* (♀) x *O. javanicus* (♂)

OJD: *O. javanicus* (♀) x *O. dancena* (♂)

## (5) 형태학적 조사

### 5.1. 외형

외형 조사 결과 바다 송사리는 체색이 옅은 황색을 띠며, 꼬리지느러미와 뒷지느러미 끝이 하얀색을 나타내었고, 수컷의 경우 부화 후 9주가 지나면 가슴 부위가 부풀어 올랐다. 뒷지느러미의 경우 암컷의 지느러미 기초 끝이 2가닥으로 갈라져 발달하는 것과 달리 수컷의 경우 기초의 끝이 갈라지지 않고, 7 - 14번째 기초의 길이가 길게 신장되어 암컷에 비하여 크고 긴 뒷지느러미를 형성하였으며, 수컷의 뒷지느러미는 연조와 연조 사이의 틈니 모양이 날카롭게 갈라져 나타났다. 등지느러미에 있어서도 수컷이 암컷에 비해 넓고 길었다. 자바 송사리는 체색이 바다 송사리와 비슷하게 옅은 황색을 띠고 있으나, 성숙 연령이 되면 암·수 모두 꼬리지느러미와 뒷지느러미 끝이 검게 변하였으며, 수컷이 암컷보다 더 검게 변색되었다. 바다 송사리와 가장 큰 차이점은 꼬리지느러미 끝 부분에 노란색의 띠가 나타나는 점으로 암·수 모두에게서 나타났다. 뒷지느러미에 있어 수컷이 암컷에 비하여 연조 사이가 날카롭게 갈라져 나타났으나, 바다 송사리에 비하여 연조 길이와 갈라진 정도가 덜 하였다(Fig. 23).

잡종군인 ODJ와 OJD의 외형은 Fig. 24에 나타내었다. ODJ의 경우 전반적인 외형의 모습은 암컷으로 사용한 바다 송사리 보다 자바 송사리에 가까운 특성을 갖는 것으로 나타났으며, 뒷지느러미와 등지느러미 연조 사이가 암컷이 완만한 것에 비하여 수컷에서는 바다 송사리와 유사하게 날카롭게 나타났다. 하지만 꼬리지느러미 끝부분에 노란색의 띠가 연하게 나타나 자바 송사리와 비슷한 형질을 나타내었다. 기형 개체의 경우 척추 만곡 증상이 나타났으며, 만곡 형태가 일정하게 나타나지 않고 개체마다 조금씩 차이가 있었다. OJD의 경우 암컷으로 사용한 자바 송사리 집단 특성과 유사하게 나타났다. 자바 송사리와 유사한 형태와 체색을 가졌으며, 꼬리지

느러미 끝 부분에 노란색의 띠가 ODJ보다 좀 더 진하게 나타났다. 척추만곡 증상인 기형률이 잡종군인 ODJ에 비하여 현저하게 높았으며, 만곡 형태가 유사하지 않고 개체마다 차이가 났다.

## 5.2. 계측형질 및 계수형질 분석

계수형질 조사를 위하여 바다 송사리, 자바 송사리와 유도된 잡종군들의 계수형질을 측정된 결과는 Table 13과 같다. 등지느러미 기조수, 가슴지느러미 기조수, 뒷지느러미 기조수와 꼬리지느러미 기조수를 대상으로 ANOVA test를 한 결과 모든 실험군에서 차이가 조사되지 않았다. 척추골수를 측정된 결과 바다 송사리는 평균  $28.8 \pm 1.0$  (27-30)였으며, 자바 송사리는 평균  $28.5 \pm 1.1$  (27-30)였다. 잡종군인 ODJ는  $28.1 \pm 0.9$  (27-30)이었고, OJD는  $29.3 \pm 0.6$  (28-30)으로 나타났으며, 모든 실험군에서 차이는 나타나지 않았다.

암·수간 계측형질을 측정된 바다 송사리와 자바 송사리의 측정치는 Table 14에 나타내었다. 통계처리를 위한 t-test 결과 바다 송사리에서 암·수간 차이를 보이는 항목은 배지느러미 기점 길이/체장(OV/SL)과 뒷지느러미 기점 길이/체장(OA/SL)로 체장을 고려 시 암컷은 두부에서 배지느러미 기점까지와 뒷지느러미 기점까지의 길이가 수컷에 비해 긴 형태를 보였다. 하지만 이외 다른 항목에서는 차이가 나타나지 않았고, 자바 송사리는 암·수간 형태학적 차이가 없었다. 바다 송사리와 자바 송사리 간 뚜렷한 차이를 보이는 형질 계측학적 측정항목은 배지느러미 기점 길이/체장(OV/SL), 뒷지느러미 기점 길이/체장(OA/SL), 체고/체장(BD/SL), 미병고/체장(CPD/SL), 안경/두장(ED/HL) 및 주둥이 길이/두장(SNL/HL)이었다.

OV/SL인 경우 전장을 기준한 주둥이에서 배지느러미기점 앞까지의 비율로 바다 송사리가 평균  $42.1 \pm 2.1\%$ 를 보였으며, 자바 송사리가 평균  $38.3$

± 1.9%를 나타내어 바다 송사리가 배지느러미의 몸통 앞 부위의 길이가 자바 송사리 보다 긴 것으로 나타났다. OA/SL은 전장을 기준하여 주둥이에서 뒷지느러미기점 앞까지의 비율로 바다 송사리가 56.9 ± 2.5%, 자바 송사리가 53.2 ± 2.4%로서 OV/SL과 같이 뒷지느러미 전까지 앞부분의 길이가 바다 송사리가 자바 송사리 보다 긴 것으로 나타났다. BD/SL은 등지느러미 앞 부위의 중앙 몸부위 측편 정도를 나타내는 것으로서 바다 송사리가 34.3 ± 1.4%였고, 자바 송사리가 28.2 ± 1.1%로 나타나 바다 송사리가 자바 송사리에 비해 더 측편됨을 알 수 있었다. CPD/SL은 미병의 측편 정도를 나타내는 것으로 바다 송사리가 11.6 ± 0.5%였으며, 자바 송사리는 10.7 ± 0.8%로, 바다 송사리가 자바 송사리에 비해 더욱 측편되어 있는 것으로 나타났다. ED/HL은 두장을 기준한 안경의 길이의 비율로 바다 송사리와 자바 송사리는 각각 38.6 ± 2.8%와 45.5 ± 2.4%로 나타나, 자바 송사리의 안경이 길이가 바다 송사리에 비해 긴 것으로 나타났다. SNL/HL은 두장을 기준으로 한 주둥이 길이의 비율로 바다 송사리는 30.3 ± 4.3%, 자바 송사리는 26.1 ± 1.0%로 바다 송사리의 주둥이 길이가 자바 송사리에 비해 긴 것으로 나타났다.

ODJ를 바다 송사리와 자바 송사리 간 차이를 보이는 각 형태 계수학적 형질을 대상으로 친어와 유의성 검정을 한 결과 ODJ는 OV/SL와 OA/SL에서 자바 송사리와 P > 0.05 수준으로 닮았다. BD/SL은 P >0.05 수준으로 바다 송사리를 더 닮았고, CPD/SL은 P <0.05로 바다 송사리와 닮았다. ED/HL은 P >0.05 수준으로 자바 송사리를 닮았으며, SNL/HL은 P >0.05 수준으로 중간치를 나타내었다(Table 15).

OJD를 바다 송사리와 자바 송사리 간 차이를 보이는 각 형태 계수학적 형질을 대상으로 암수 친어와 유의성 검정을 한 결과 OV/SL에서 자바 송사리와 P >0.05 수준으로 닮았고, OA/SL에서 P <0.05 수준에서 자바 송사

리와 닮았다. BD/SL은  $P > 0.05$  수준으로 자바 송사리와 닮았고, 그 외 CPD/SL, ED/HL 및 SNL/HL은  $P > 0.05$  수준으로 중간치를 나타내었다 (Table 16).

## (6) 성비

### 6.1. 형태학적 분석

뒷지느러미를 조사하여 암컷과 수컷의 성비는 조사한 결과는 Table 17에 나타내었다. 바다 송사리는 암컷과 수컷의 비율이  $53.3 \pm 7.6\%$  대  $46.7 \pm 7.6\%$ 로 나타났으며, 자바 송사리의 경우  $48.3 \pm 7.6\%$  대  $51.7 \pm 7.6\%$ 로 두 종 모두 거의 1 대 1의 비율로 나타났다.  $\chi^2$  test 결과 바다 송사리와 자바 송사리 간의 암수 비율에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 유도된 잡종의 성비는 암컷과 수컷의 비가 ODJ는  $26.7 \pm 5.8\%$ 와  $73.3 \pm 5.8\%$ 로 나타나 암컷보다 수컷의 형질을 지닌 개체의 비율이 높게 나타났다. OJD에서는 암컷과 수컷의 비율이  $36.7 \pm 5.8\%$ 와  $63.3 \pm 5.8\%$ 로 나타나, ODJ에 비해서는 암컷에 비하여 수컷의 비율이 낮았지만, 바다 송사리와 자바 송사리와 비교해서는 수컷의 비율이 높게 나타났다.  $\chi^2$  test 결과 ODJ는 바다 송사리와 자바 송사리의 암컷에 대한 수컷의 성비보다 유의적으로 높게 나타났다. OJD는 바다 송사리, 자바 송사리 및 ODJ와 암수 성비에 차이가 없는 것으로 나타났다.

### 6.2. 조직학적 분석

조직학적 분석을 위하여 바다 송사리, 자바 송사리 및 그들의 잡종군에서 형태학적으로 암컷과 수컷을 분리한 후 생식소를 분석하여 성비를 조사하였으며, 그 결과는 Table 18에 나타내었다. 바다 송사리와 자바 송사리는 형태학적으로 구분된 암수의 결과가 조직학적으로 조사한 결과와 일치하였

다. ODJ의 경우 형태학적으로는 암컷이었으나, 생식소 검경 결과 암컷 15마리 중 1마리가 암컷 생식소를 가지고 있었으며, 2마리는 간성으로 나타났다. ODJ에서 형태학적으로 수컷인 개체의 생식소를 검경한 결과 모두 수컷 생식소를 가지고 있는 것으로 나타났으며, 정원세포와 정세포는 많이 관찰되었으나, 정자는 매우 조금 관찰되어, 정자부족증(oligospermia)인 것으로 나타났다. OJD의 경우 형태학적인 암수를 각각 8마리씩 조사한 결과 암컷 개체는 관찰되지 않았으며, 간성인 개체가 암컷의 형태를 지닌 개체에서 나타났다. 또한, 수컷의 생식소를 가진 개체는 총 16마리 중 5마리(31.3%)였으며, 나머지 10마리(62.4%)에서 생식소는 관찰되지 않았다.

## 2) 바다 송사리와 자바 송사리 간의 역교배체

### (1) 수정율, 초기 난발생 및 부화율

역교배체 유도를 위하여 바다 송사리 (♀)와 ODJ (♂)의 교배를 통해 유도된 잡종의 수정율과 부화율을 측정된 결과는 Table 19에 나타내었다.

초기 난발생과 발생과정에 따른 형태적 변화를 측정된 결과는 Fig. 25에 나타내었다. 수정 후 2시간 후 유구가 식물극 쪽으로 이동하기 시작하고, 수정 후 5시간 후 1세포기가 되었다(Fig 27A). 대부분의 수정난이 1세포기 까지 발생이 진행되는 속도와 형태가 비슷하였으나, 그 이후 발생단계부터 차이가 나타나기 시작하였다. 2세포기에 도달하는 시간은 수정 후 7시간부터 9시간 까지 다양하게 나타났으며, 세포 형태 또한 서로 크기가 다르게 나타났었다(Fig 27B). 2세포기부터 후기 낭배기가 되는 수정 후 40시간까지  $95.8 \pm 2.6\%$ 의 수정난이 발생도중 폐사하였으며, 세포 형태는 불규칙한 형태를 나타내었다(Fig 27C, 27D). 수정 후 40시간 이후에 후기 낭배기로 진행되었으며 3일째까지 더 이상 발생이 진행되지 않고 그대로 유지되다가 (Fig. 27E, 27F), 모든 수정난이 폐사하였다.

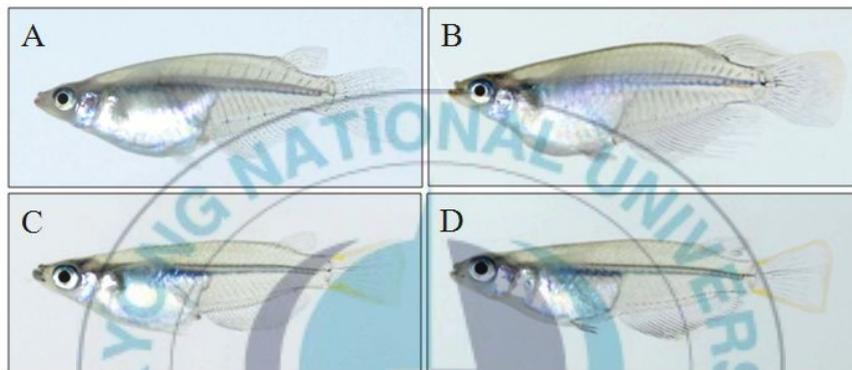


Fig. 23. External morphology of *Oryzias dancena* and *O. javanicus* used in this experiment. (A) *O. dancena* ♀. Total length (TL): 38.67 mm. (B) *O. dancena* ♂. TL: 42.18 mm (C) *O. javanicus* ♀. TL: 38.30 mm. (D) *O. javanicus* ♂. TL: 35.88 mm.

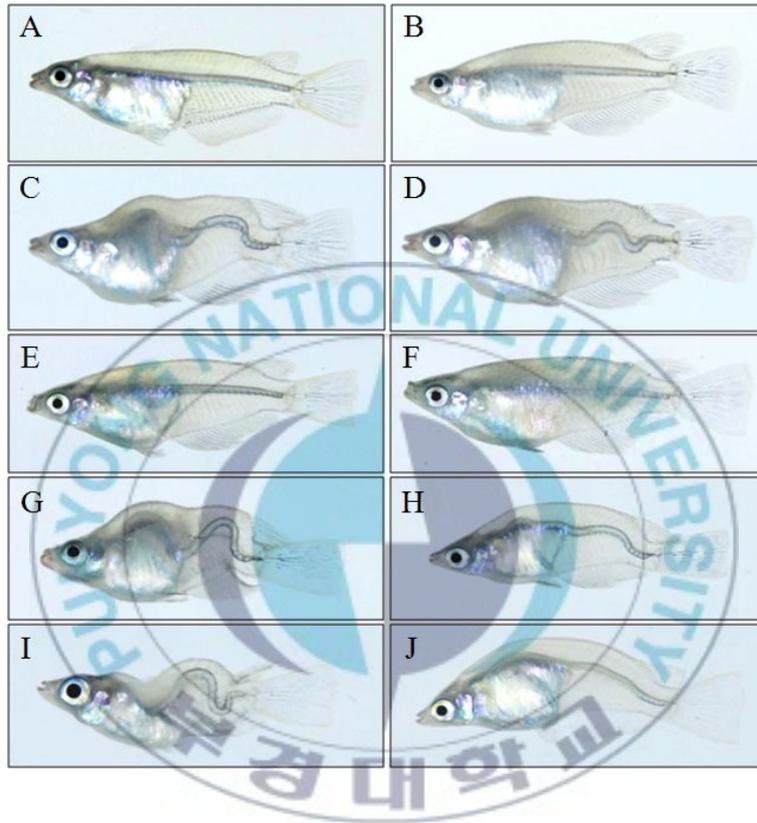


Fig. 24. External morphology of hybrid of between *O. dancena* and *O. javanicus*. A - D: *O. dancena* (♀) and *O. javanicus* (♂) hybrid (ODJ). (A) ODJ female (B) ODJ male (C, D) Abnormal ODJ. E - F: *O. javanicus* (♀) and *O. dancena* (♂) hybrid (OJD). (E) OJD female. (F) OJD male. (G - J) Abnormal OJD.

Table 13. Numbers of dorsal, pectoral, anal and caudal fin rays and vertebra of *Oryzias dancena* (OD), *O. javanicus* (OJ) and their hybrids (ODJ and OJD)

Exp. group	No. of fish examined	No. of dorsal fin rays	No. of pectoral fin rays	No. of anal fin rays	No. of caudal fin rays	No. of vertebra
OD	10 (6 <sup>*</sup> )	6-7	10	22-24	17-19	28-30
OJ	10 (5 <sup>*</sup> )	7-8	9-10	23-24	19-20	27-30
ODJ	10 (3 <sup>*</sup> )	7-8	9-10	23-25	18-19	28-30
OJD	4 (1 <sup>*</sup> )	6-7	10-11	24-25	18-19	27-30

\*: Number of female examined

Table 14. Comparisons of body proportion between *Oryzias dancena* (OD) and *O. javanicus* (OJ). Ranges in parenthesis (n=10)

Species	OV/SL (%)	OA/SL (%)	SNL/HL (%)	CPD/SL (%)	CPL/SL (%)	CPD/CPL (%)	AFB/SL (%)
OD (♀)	43.4±1.2 <sup>a</sup> (41.1-44.4)	58.5±1.6 <sup>a</sup> (56.4-61.0)	31.6±4.7 (25.3-34.6)	11.6±0.7 (10.5-12.4)	10.5±1.3 (8.9-12.4)	107.1±4.9 (99.7-112.2)	32.0±2.1 (30.3-35.6)
OD (♂)	40.1±1.4 <sup>b</sup> (38.2-41.7)	54.4±0.9 <sup>b</sup> (53.4-55.4)	28.3±3.2 (25.1-32.7)	11.4±0.3 (11.0-11.6)	11.0±1.1 (9.3-11.7)	107.2±7.9 (100.7-117.6)	32.0±3.1 (28.5-35.8)
OJ (♀)	39.7±1.0 (38.6-40.6)	55.0±0.7 (54.5-56.2)	25.7±0.5 (25.2-26.3)	10.4±0.9 (9.3-11.7)	10.4±0.8 (9.5-11.3)	100.5±14.5 (88.7-122.8)	31.3±0.4 (30.7-31.7)
OJ (♂)	37.0±1.6 (35.4-39.6)	51.4±2.1 (48.7-53.7)	26.6±1.3 (25.1-27.9)	11.0±0.6 (10.4-11.7)	10.8±0.3 (10.4-11.2)	102.5±6.8 (96.3-111.1)	35.0±1.6 (32.9-37.1)
Species	VA/SL (%)	HL/SL (%)	BD/SL (%)	PV/SL (%)	DB/SL (%)	OD/SL (%)	ED/HL (%)
OD (♀)	17.0±0.9 (16.0-18.3)	21.9±0.6 (20.9-22.6)	34.6±1.5 (33.2-37.3)	17.5±2.1 (14.8-21.0)	7.5±0.7 (6.7-8.4)	82.3±1.8 (79.6-84.1)	38.6±2.0 (35.5-41.0)
OD (♂)	15.4±1.8 (13.1-17.0)	21.2±0.5 (20.9-21.9)	33.9±1.4 (32.1-35.3)	16.6±1.3 (15.3-18.2)	7.5±0.3 (7.2-7.9)	81.2±1.8 (78.6-82.6)	38.5±4.2 (34.7-44.7)
OJ (♀)	15.1±1.0 (13.5-16.0)	21.6±0.6 (20.8-22.3)	27.8±1.1 (26.5-29.1)	16.9±1.0 (15.3-17.7)	7.4±0.9 (6.2-8.6)	82.2±1.5 (80.3-83.5)	46.2±2.9 (42.3-49.6)
OJ (♂)	14.8±1.0 (13.6-15.8)	21.4±0.9 (20.2-22.3)	28.5±1.0 (27.2-29.7)	15.2±1.1 (14.0-15.8)	7.9±0.8 (7.3-9.3)	80.3±0.7 (79.7-81.4)	45.0±1.9 (42.3-46.8)

<sup>1</sup>: Means with different superscripts within a column are significantly different (P <0.05), based on ANOVA test. Values are mean ± SD.

SL: standard length, HL: head length, BD: body depth, P-V: distance of pectoral fin-ventral fin, V-A: distance of ventral fin-anal fin, ED: eye diameter, DB: length of dorsal fin base, OD: length of origin of dorsal fin, OV: length of origin of ventral fin, CPD: caudal peduncle depth, CPL: caudal peduncle length, SNL: snout length, OA: length of origin of anal fin, AFB: length of origin of anal fin base

Table 15. Comparison of body proportion ratios of hybrid (ODJ) with their parental species, *Oryzias dancena* (OD) and *O. javanicus* (OJ)

Body proportion ratios	Mean value			't' value	
	OD	OJ	ODJ	OD & ODJ	OJ & ODJ
OV/SL	42.1	38.3	39.2	7.7*	0.9
OA/SL	56.9	53.2	52.5	18.4**	0.5
BD/SL	34.3	28.2	33.7	1.1	123.1**
CPD/SL	11.5	10.7	12.3	8.2*	24.3**
ED/HL	38.6	45.5	44.6	16.1**	0.3
SNL/HL	30.3	26.1	28.8	0.8	2.3

\* significant (P <0.05), \*\* highly significant (P <0.01)

ODJ: *Oryzias dancena* (♀) x *O. javanicus* (♂)

Table 16. Comparison of body proportion ratios of hybrid (OJD) with their parent species, *Oryzias dancena* (OD) and *O. javanicus* (OJ)

Body proportion ratios	Mean value			't' value	
	OD	OJ	OJD	OD & OJD	OJ & OJD
OV/SL	42.1	38.3	36.9	19.1**	1.7
OA/SL	56.9	53.2	50.4	24.2**	4.9*
BD/SL	34.3	28.2	29.2	22.0**	1.0
CPD/SL	11.5	10.7	11.2	1.7*	1.2
ED/HL	38.6	45.5	44.8	11.3	0.1
SNL/HL	30.3	26.1	28.1	0.8	0.6

\* significant (P <0.05), \*\* highly significant (P <0.01)

OJD: *Oryzias javanicus* (♀) x *O. dancena* (♂)

Table 17. Sex ratios of *Oryzias dancena* (OD), *O. javanicus* (OJ) and their hybrids (ODJ and OJD) by outside sexual characteristic analysis

Group	No. of fish analyzed	Female (%)	Male (%)	$\chi^2$ against* 1♀ : 1♂
OD	20	55.0	45.0	
	20	45.0	55.0	
	20	60.0	40.0	
Total	60	53.3 ± 7.6	46.7 ± 7.6	ns
OJ	20	55.0	45.0	
	20	40.0	60.0	
	20	50.0	50.0	
Total	60	48.3 ± 7.6	51.7 ± 7.6	ns
ODJ	20	30.0	70.0	
	20	20.0	80.0	
	20	30.0	70.0	
Total	60	26.7 ± 5.8	73.3 ± 5.8	z
OJD	8	40.0	60.0	
	8	30.0	70.0	
	8	40.0	60.0	
Total	30	36.7 ± 5.8	63.3 ± 5.8	z

\* ns: not significant, z: P <0.005

Values are mean ± SD.

Table 18. Sex ratios of *Oryzias dancena* (OD), *O. javanicus* (OJ) and their hybrids (ODJ and OJD) by histological analysis of gonads

Group	No. of fish Analyzed (morphological sex)	Female (%)	Male (%)	Intersex (%)
OD	30 (♀:15, ♂:15)	50.0	50.0	0.0
OJ	30 (♀:15, ♂:15)	50.0	50.0	0.0
ODJ	30 (♀:15, ♂:15)	3.3	90.0	6.7
OJD*	16 (♀:8, ♂:8)	0.0	31.3	6.3

\* Ten (62.4%) out of 16 not identified gonad by histological analysis.

Table 19. Fertilization rates, late gastrula rates and hatching rates of ODDJ produced from crossed with *Oryzias dancena* and *O. dancena* x *O. javanicus* (ODJ)

Days after Spawning	No. of spawning eggs	Fertilization rate (%)	Late gastrula rates (%)	Hatching rates (%)
1	86	73.3	4.7	0
2	131	41.2	6.9	0
3	284	21.5	3.2	0
4	241	24.5	2.5	0
5	186	62.4	7.5	0
6	148	29.1	3.4	0
7	143	44.8	10.5	0
8	342	41.8	4.1	0
9	314	35.7	1.9	0
10	294	3.7	2.7	0
11	323	40.9	0.6	0
12	253	28.1	3.6	0
13	261	24.1	3.8	0
Total	3,006	36.2 ± 18.0	4.3 ± 2.6	0

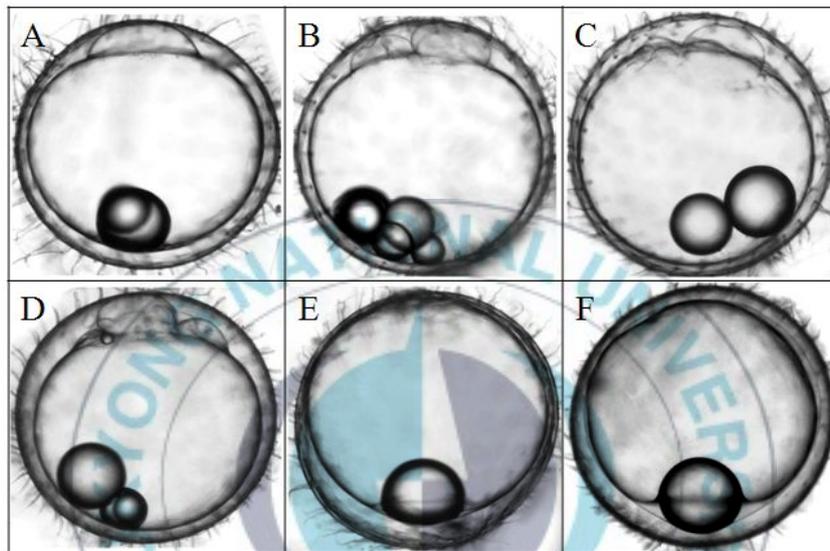


Fig 25. Egg development of *Oryzias dancena* and ODJ (*O. dancena* x *O. javanicus*), ODxODJ (water temperature:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). (A) Blastodisc at 5 hours after fertilization, (B) 2 cells stage at 7-9 hours after fertilization, (C, D) Abnormally developing eggs between 7 hours and 40 hours after fertilization, (E) Late gastrula stage at 40 hours after fertilization, (F) Late gastrula stage at 3 days after fertilization.

#### 4. 잡종의 비스페놀 A (Bisphenol A)에 의한 성전환 유도

##### 1) 비스페놀 A 예비 농도 실험

비스페놀 A의 처리 농도를 알아보기 위한 예비 실험 결과 농도에 따른 폐사율은 Table 20과 같다. 대조군과 비스페놀 A 농도 5 mg/L 처리군에서는 72시간까지 폐사한 개체가 없었으나, 10 mg/L의 경우 처리 72시간째에 36.0%가 폐사하였으며, 15 mg/L 처리군은 70.0%가 폐사하였다. 20 mg/L의 농도로 처리한 경우에는 모든 개체가 24시간 만에 폐사하여, 비스페놀 A의 반수치사농도(LD<sub>50</sub>)는 10 mg/L와 15 mg/L 사이인 것으로 나타났다.

##### 2) 성장률과 기형률 측정

부화 직후의 자어부터 비스페놀 A를 56일간 처리한 실험군의 성장률은 Fig. 26과 같다. 대조군의 경우 3반복 실험군의 전장을 모두 측정한 결과  $18.0 \pm 1.2$  mm로 나타났다. 비스페놀 A 처리군에서는 2.5 mg/L로 처리한 경우  $15.0 \pm 2.0$  mm로, 5.0 mg/L의 경우  $13.7 \pm 2.5$  mm로 나타났으며 10.0 mg/L 처리군에서는  $12.8 \pm 2.5$  mm로 나타나 대조군과 비스페놀 A 처리군에서 성장 차이가 관찰되었다. 또한, 처리군 간에서도 비스페놀 A의 농도가 높을수록 성장이 느린 것으로 나타났으며, ANOVA를 이용한 통계학적 분석 결과에서 대조군, 2.5 mg/L와 5.0 mg/L는 각각 유의한 차이가 나타났으나, 5.0 mg/L와 10.0 mg/L에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 기형률을 조사한 결과 대조군에서는 13.6%로 나타났으며, 비스페놀 A 처리군의 경우 2.5 mg/L로 처리한 그룹에서는 65.4%로 대조군에 비해 매우 높게 나타났다. 이보다 농도가 높은 5.0 mg/L와 10.0 mg/L에서는 각각 81.3%와 98.1%로 처리 농도가 높아질수록 기형률이 높게 나타났다(Fig. 27). ANOVA 통계 처리결과 대조군과 비스페놀 A 처리군 간 모두에서 유의한 차이가 나타났다.

Table 20. Mortality rate of hybrids of *Oryzias dancena* and *O. javanicus* after 72 hours exposure to various concentrations of bisphenol A

BPA Conc.	No. of larvae	Mortality (%)		
		24 hr	48 hr	72 hr
0 mg/L	15	0.0	0.0	0.0
	25	0.0	0.0	0.0
Total	40	0.0	0.0	0.0
5 mg/L	15	0.0	0.0	0.0
	30	0.0	0.0	0.0
Total	45	0.0	0.0	0.0
10 mg/L	8	0.0	24.0	36.0
	25	4.0	20.0	36.0
Total	33	2.0	22.0	36.0
15 mg/L	15	40.0	50.0	72.0
	25	32.0	48.0	68.0
Total	40	36.0	50.0	70.0
20 mg/L	8	100.0	-	-
	30	100.0	-	-
Total	38	100.0	-	-

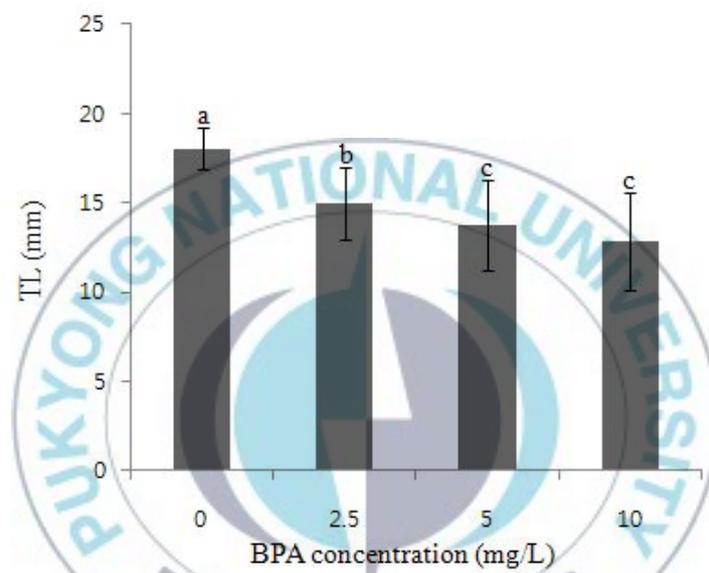


Fig 26. Growth in total length (TL) of *Oryzias dancena* and *O. javanicus* hybrids (ODJ) treated with different concentrations of bisphenol A (BPA) for 56 days.

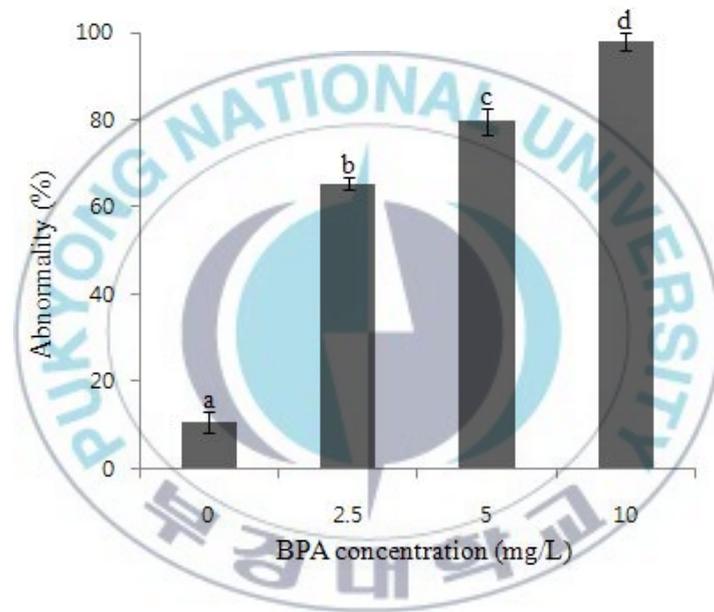


Fig. 27. Rates of abnormalities of *Oryzias dancena* and *O. javanicus* hybrids (ODJ) treated with different concentration of bisphenol A (BPA) for 56 days.

Table 21. Gonadal characteristics of hybrids of *Oryzias dancena* and *O. javanicus* treated with different concentrations of bisphenol A for 56 days

Bisphenol A concn. (mg/L)	Examined number of male medaka	Males attributes	
		Normal testis	Testis-ova
Control	50	47	3
2.5	52	12	40
5.0	52	0	52
10.0	52	0	52

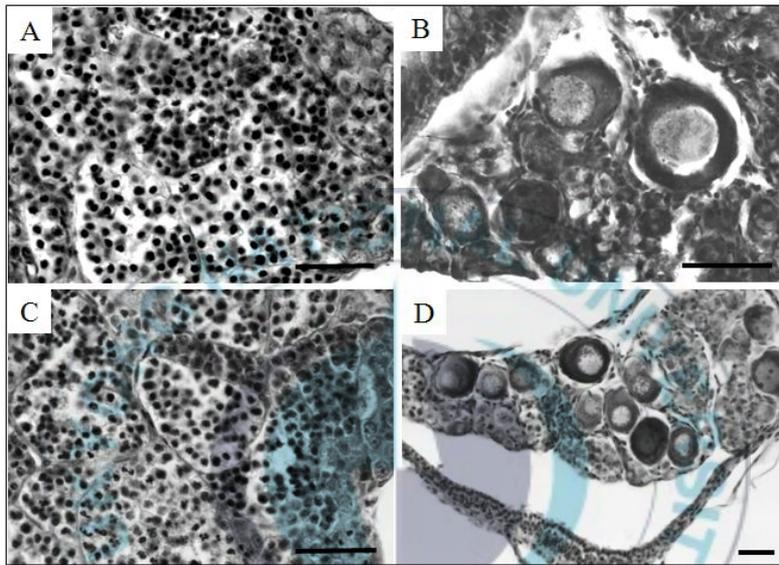


Fig. 28. Histological characteristics of gonads of *Oryzias dancena* and *O. javanicus* hybrids (ODJ) treated with different concentration of bisphenol A (BAP) for 56 days. (A, B) Development of gonads of ODJ exposed to BPA 0 mg/L (Control group). A, Normal testis; B, intersex testis group. (C, D) Development of gonads of ODJ exposed to BPA 5 mg/L. C, Normal testis; D, Occurrence of oocytes inside the testicular tissues. Hematoxylin and eosin. All scale bars indicate 30  $\mu$ m.

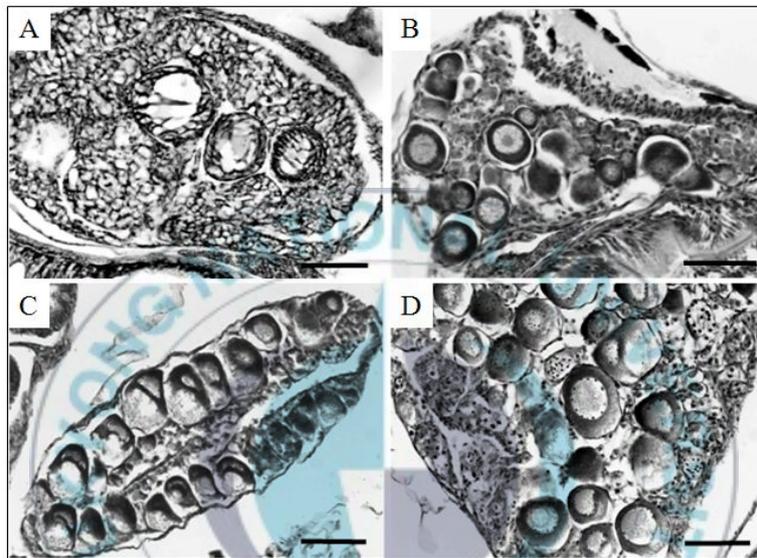
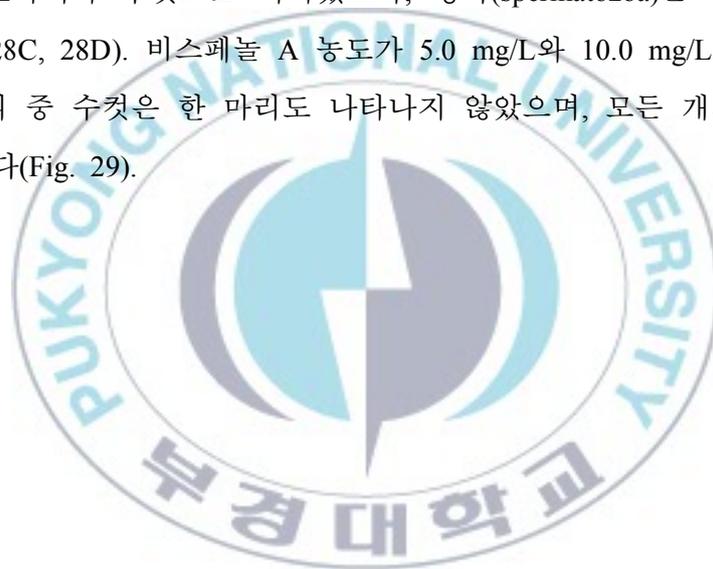


Fig. 29. Histological characteristics of gonads of *Oryzias dancena* and *O. javanicus* hybrids (ODJ) treated with different concentration of bisphenol A (BAP) for 56 days. (A, B) Development of testis-ova in gonads of ODJ exposed to BPA 10 mg/L. (C, D) Development of testis-ova in gonads of ODJ exposed to BPA 15 mg/L. Hematoxylin and eosin. All scale bars indicate 50  $\mu\text{m}$ .

### 3) 비스페놀 A에 의한 성전환

부화 직후의 자어부터 비스페놀 A를 처리한 실험군의 성전환을 분석하기 위하여 조직학적 분석을 하였으며, 그 결과는 Table 21에 나타내었다. 대조군에서 사용된 ODJ 50마리 중 정상 수컷이 47 마리였으나, 3 마리가 간성(intersex)을 나타내었으며, 비스페놀 A로 처리한 모든 실험군에서 간성이 나타났다(Fig. 28A, 28B). 비스페놀 A 농도가 2.5 mg/L인 그룹에서 52마리의 생식소를 검경한 결과 76.92%인 40 마리가 간성으로 나타났으며, 23.1%인 12마리가 수컷으로 나타났으나, 정자(spermatozoa)는 관찰되지 않았다(Fig. 28C, 28D). 비스페놀 A 농도가 5.0 mg/L와 10.0 mg/L인 그룹에서는 52 마리 중 수컷은 한 마리도 나타나지 않았으며, 모든 개체에서 간성이 나타났다(Fig. 29).



## IV. 고찰

본 연구에서 바다 송사리, 자바 송사리, 이들 두 종 간 잡종(ODJ) 및 상반 잡종(OJD)의 난발생을 조사한 결과 모든 실험군의 난은 구형으로 난각은 투명한 침성·점착성이었다. 이전의 연구에서 보고된 같은 *Oryzias* 속의 *O. latipes*와 대륙송사리 그리고 자바 송사리의 난과 형태적 특징이 동일하게 나타났다(Iwamatsu, 2004; 박과 최, 1998; Iwamatsu and Hirata, 1984).

수정란의 유구에 있어 바다 송사리는 여러 개의 유구가 하나의 큰 유구로 되는 시기가 수온  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 수정 후 11시간째인 후기 포배기에 관찰되었다. *O. latipes*의 경우 하나의 큰 유구로 되는 시기가 수정 후 38 시간째인 9 체절기에 관찰되었으며(Iwamatsu, 2004), 대륙 송사리 ( $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ )에서는 12 체절기(수정 후 31시간 짜)에 나타났다(박과 최, 1998). 자바 송사리는 수온  $26^{\circ}\text{C}$ 에서 수정 후 11시간째인 전기 낭배기에 유구가 하나로 모여(Iwamatsu and Hirata, 1984), 4종 모두 유구를 가지고 있으며, 여러 개의 유구들이 모여 하나의 커다란 유구가 되는 시기는 서로 달랐고, 바다 송사리에서 가장 빠른 시기에 나타났다. 유구의 유무는 가자미목 어류에 있어 큰 특징으로 알려져 있어(Mito, 1963) 대부분의 가자미목 어류가 유구를 가지고 있지 않은 반면, 도다리 *Pleuronichthys cornutus*는 1개의 유구를 가진다고 보고되었다(Takita and Fujita, 1964). 따라서 *Oryzias* 속에서도 유구를 가지고 있지 않은 종이 있는지 다른 종에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

부화에 있어 바다 송사리( $25^{\circ}\text{C}$ )는 수정 후 11일째에 부화하였다. *O. latipes* ( $25^{\circ}\text{C}$ )는 수정 후 9일만에 부화하였고(Iwamatsu, 2004), 대륙 송사리의 경우 수온  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 하에서 수정 후 7일째에 부화하였다(박과 최, 1998). 따라서 바다 송사리는 부화 시기가 *O. latipes*보다 2일, 대륙 송사리

보다 4일 늦게 나타났다. 바다 송사리와 같이 해수에 서식하는 자바 송사리의 부화 시기는 이전의 연구 결과와 동일한 온도인  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 수정 후 10일 정도에 이루어진다는 보고(Iwamatsu and Hirata, 1984)와 14일째에 이루어진다는 보고로(Kakuno et al., 2001), 연구 결과가 서로 상이하게 나타났다. 이는 수정란을 50%로 희석한 생리식염수(saline)에서 배양한 것(Iwamatsu and Hirata, 1984)과 해수에서 배양(Kakuno et al., 2001)한 차이로 보인다. 본 연구에서는  $25^\circ\text{C}$ 의 10‰ 기수에서 Kakuno et al. (2001)과 동일하게 14일째에 부화하였다. 따라서 바다 송사리의 경우 수정란을 염분도별로 비교하여, 난발생 시기와 부화시기가 빠른 조건을 연구할 필요가 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 유도한 잠종균인 ODJ와 OJD는 각각 13일과 15일로 ODJ는 바다 송사리와 자바 송사리의 중간 발달 단계를 나타내었으며, OJD는 다른 실험군들 보다 발생 속도가 느렸다. OJD는 난발생 도중 세포 분열 상에 기형적인 분열 형태를 보이는 개체가 대부분이었으며, 대부분의 개체가 난발생 도중에 폐사하여 부화율이 7.4%에 불과하였고, 기형을 역시 90.48%로 높게 나타나 염색체 분열 등 난발생 도중에 이상이 있는 것으로 사료되며, 이런 이유 때문에 난의 발생 속도 역시 다른 실험군들에 비해 느린 것으로 생각된다.

부화 직후 자어는 바다 송사리의 경우 전장이  $4.4 \pm 0.2$  mm로, *O. latipes*의 부화자어의 전장이 4.5 mm (Iwamatsu, 2004), 자바 송사리의 부화자어에서 전장이 약 4.5 mm (Kakuno et al., 2001)인 것과 비교하여 큰 차이가 없었다. 하지만, 본 실험에서 자바 송사리의 부화 자어의 크기는  $5.0 \pm 0.3$  mm로 이전 실험과 크기에서 차이가 있었고, 바다 송사리보다 큰 것으로 나타났다. ODJ의 부화 자어의 크기는  $4.3 \pm 0.4$  mm로 바다 송사리와 유사하였다. 대륙 송사리는 부화자어의 전장이  $3.7 \pm 0.2$  mm로 나타나 같은 속에 속하는 위의 4 종들 중 가장 작은 것으로 나타났다(박과 최,

1998).

난황의 흡수에 있어 바다 송사리는 전장이  $4.6 \pm 0.2$  mm인 부화 3일 후에 난황을 거의 흡수하였다. *O. latipes*는 바다 송사리와 같이 부화 3일 후에 거의 난황이 흡수되었지만, 대륙 송사리의 경우 4일이 소요되었으며 부화 자어의 크기도 작고 난황흡수 시기도 더 느린 것으로 나타났다 (Iwamatsu, 2004; 박과 최, 1998).

각 지느러미의 기조는 바다 송사리의 경우 전장이  $8.7 \pm 0.9$  mm가 되는 부화 후 21일째 개체에서 완전히 형성되었다. *O. latipes*에서 Iwamatsu (2004)는 stage 43단계인 전장 10.5 ~ 15.5 mm의 개체에서 각 지느러미의 기조가 형성된다고 보고하였는데, 박과 최 (1998)의 연구에서는 부화 후 28일째 전장 14.3 ~ 21.2 mm 범위의 개체에서 각 지느러미 기조가 완전하게 형성된다고 보고하여, 연구 결과가 다르게 나타났다. 하지만, 바다 송사리와 비교해서는 모두 전장의 길이가 더 큰 시기에 치어기에 도달하였다. 대륙 송사리는 바다 송사리와 같은 시기인 부화 후 21일째에 각 지느러미 기조가 완전하게 형성되어 치어기로 이행된다고 하였으며(박과 최, 1998), 이 시기에 전장은 13.0 ~ 15.8 mm 범위로 전장의 길이가 *O. latipes* 보다는 작지만 바다 송사리보다 더 컸다. 따라서 바다 송사리는 치어기로 이행되는 시기가 *O. latipes*보다는 7일 더 빠르게 나타났고, 대륙 송사리와는 차이가 없었다. 하지만 전장의 길이에서 바다 송사리가 앞의 두 종 보다 더 작은 시기에 치어기로 이행하는 것을 알 수 있었다.

최초 산란 시기에 있어 바다 송사리는 부화 후 약 9주가 소요되었다. *O. latipes*와 대륙 송사리는 부화 후 약 3개월이 지난 후에 최초 산란이 보고되었으며(박과 최, 1998), 자바 송사리는 약 100일 후에 산란을 시작한다고 하였다(Kakuno et al.,2001). 본 실험에서 자바 송사리는 93일째에 산란을 하여 이전 연구와 유사하게 나타났으며, 바다 송사리의 산란 도달 성장 기

간이 자바 송사리 보다 약 30일 정도 빠른 것으로 나타났다.

바다 송사리의 성장을 부화 직후부터 48주째까지 조사한 결과, 계속하여 조금씩 성장하고 있는 것으로 나타났으며, 산란 역시 부화 후 9주째부터 계속 이루어지는 것으로 나타났다. 앞으로 산란력에 대한 조사도 계속 이루어져야 할 것이다. 또한, 기존의 연구에서 같은 속에 속하는 바다 송사리의 난발생 연구는 자바 송사리 이외에는 없어(Iwamatsu and Hirata, 1984), 다른 종들에 대한 발생학적 연구가 부재하므로 앞으로 이에 대한 비교 연구가 진행되어야 할 필요성이 있다고 생각된다.

난발생과 자치어의 발달 이외에 바다 송사리의 자치어 발달에 따른 골격 발달 과정에 대하여 알아보기 위한 연구를 수행하였다. 어류의 골격 발달은 종에 따라 다양한 생태적 특성이 반영되어 골격의 생성과 골화 시기에 차이가 있다. 본 연구에서 바다 송사리의 골격은 부화 직후의 자어에서부터 갖추어져 있었으며, 경골화되는 시기는 부화 후 6주째에 두골의 상후 두골부터 시작하여 12주째에 대부분의 골격이 경골화되었다. 두골 중에 가장 골화가 먼저 진척되는 곳은 치골과 전상악골, 주상악골 등이 있으며, 이는 먹이 섭취와 호흡을 위한 적응현상으로 보고되고 있다(McElamn and Balon, 1979). 바다 송사리의 꼬리지느러미는 가슴지느러미와 유사한 시기에 발생이 완료되었다. 가슴지느러미에서 기조 발생이 제일 먼저 완료되어 만새기과 어류(Potthoff, 1980)의 경우와 점박이 송사리 *Rivulus ocellatus marmoratus* (이 등, 1991)와 유사하였다. 이는 흉기조의 발생이 가장 늦게 시작되어 가장 늦게 완료되는 통돔과 어류(Potthoff et al., 1988)와 대조를 이루었다. 등지느러미와 뒷지느러미 구성골의 경골화 진전방향은 종에 따라 차이가 있어 기조 및 담기골의 경우 골화개시 부위가 주둥이과 (Myung and Kim, 1984), 날치과(Park and Kim, 1987) 그리고 통돔과(Potthoff et al., 1988)와 같이 부속지 앞에서 뒤쪽으로 진전하는 유형이 있다. 또 다른 유

형은 만새기과(Potthoff, 1980)와 점박이 송사리(이 등, 1991)와 같이 골화 개시 부위가 부속지 중앙에 위치하여 앞뒤 양쪽으로 골화 진전이 나타난다. 바다 송사리는 전자의 경우와 유사하여, 등지느러미와 뒷지느러미 모두 부속지 앞에서 뒤쪽으로 나타났으며, 기조의 분지는 먼저 경골화된 기조에서부터 이루어졌다. 같은 *Oryzias* 속에서 자치어 부터의 골격 진행에 관한 연구가 없어 앞으로 다른 종들과의 비교 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

바다 송사리의 초기 생식소 발달과 성분화를 알아보기 위한 연구를 수행하였다. 원시생식세포는 발생이 진행되면서 생식소의 난원세포와 정원세포로 분화하게 되며 다른 조직세포와 구별되는 형태적 특징을 가진다. Takehana et al. (2005)은 *Oryzias* 속 13종을 대상으로 계통분류학적 분석을 실시하여 3개의 단계통(monophyletic species) 그룹, 즉, ‘latipes 그룹’, ‘javanicus 그룹’ 및 ‘celebensis 그룹’으로 나누었다. 그 중 *O. latipes* (latipes 그룹)는 수정 후 3일째에 수정란에서 원시생식세포가 앞신장관과 장 사이에 위치하고, 부화시기에 생식세포의 성분화가 이루어지며, 그 시기에 생식소 체내의 조직학적 구조상의 성분화는 관찰되지 않는 것으로 보고되었다(Satoh and Egami, 1972). 이후 *O. latipes*를 대상으로 원시생식세포에 특이적인 vasa 유전자 mRNA 탐침(probe)과 in situ hybridization (ISH) 기법을 이용하여 원시생식세포들의 이동(migration) 양상이 분석된 바 있다(Shinomya et al., 2000). 또한, vasa 유전자와 상동성을 가지는 medaka의 olvas 유전자를 이용하여 후기낭배기에서 germ line이 관찰되었으며(Tanaka et al., 2001), 최근에는 이보다 앞선 단계인 초기낭배기에서 원시생식세포로 추정되는 세포(presumptive PGC)에 대한 보고가 발표되었다(Kurokawa et al., 2006). 본 연구 결과 바다 송사리의 원시생식세포는 수정 후 5일째(Stage 33, Iwamatu, 2004)에 처음으로 관찰되어 *O. latipes* 보다 늦게 출현하였다. 앞으로 본 연

구를 바탕으로 분자생물학적 분석의 접목을 통한 바다 송사리 원시생식세포에 관한 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

자바 송사리는 바다 송사리와 함께 최근 삼투압 메커니즘과 생태 독성 실험을 위한 해양모델어류로 주목 받고 있다(Inoue and Takei, 2003; Kang et al., 2008). 본 실험과 유사한 온도(26°C)에서 조직학적 분석 방법에 의해서 생식소 발달을 조사한 결과(Kakuno et al., 2001), 자바 송사리에서 원시생식세포의 출현은 부화 후 5일째 자어에서 관찰되어 바다 송사리보다 느렸다. 또한, 생식소의 형태학적 성분화는 부화 후 14일째에 이루어져 성분화가 12일째에 이루어지는 바다 송사리보다 늦게 나타났다(Kakuno et al., 2001). 따라서 바다 송사리의 원시생식세포의 출현 시기는 *O. latipes*보다 느리고, 자바 송사리보다는 빨랐으며 성분화 역시 자바 송사리보다 일찍 이루어지는 것으로 나타나 성분화 및 생식소 발달 진행 속도가 이들 두 종의 중간인 것으로 나타났다.

어류의 성분화는 자웅이체와 암수동체 및 처녀생식에 의존하는 군으로 나눌 수 있다. 이들 중 자웅이체형 어류는 분화형과 미분화형으로 분류되며, 많은 어종이 미분화형 자웅이체이나 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss*와 *Perca flavescens* 등은 분화형인 것으로 보고되었다(Takashima et al., 1980; Malison et al., 1986). *O. latipes*는 분화형 자웅이체이며, 생식소가 양쪽에서 형성되는 *Oryzias* 속의 다른 어종들과는 달리 한쪽(오른쪽)에서 형성된다고 보고된 바 있고(Hamaguchi, 1992; Satoh and Egami, 1972), 자바 송사리는 한 쌍의 난소가 융합하여 하나의 생식소를 형성한다고 보고된 바 있다(Kakuno et al., 2001). 본 연구 결과 바다 송사리의 경우 생식소는 *O. latipes*와 같이 오른쪽에서 형성되기 시작하였으며, 부화 후 12일째 암·수간 서로 다른 형태의 생식세포가 조직학적으로 식별됨에 따라 본 어종의 생식소 분화는 분화형의 자웅이체로 판단된다.

잡종의 수정율은 사용된 종간의 진화학적 유연관계에 따라 크게 좌우된다(Arai, 1988; Purdom, 1976). 본 실험에서 유도된 바다 송사리와 자바 송사리 잡종(ODJ), 자바 송사리와 바다 송사리 잡종(OJD) 수정율은 각각 89.4%와 81.8%로 친어군으로 사용된 바다 송사리 (97.3%) 및 자바 송사리 (92.3%)의 수정율과 유사하여 두 종이 진화적으로 유연관계에 있는 것으로 사료된다. *Oryzias* 속에서 잡종 연구는 이전부터 많이 연구되어 왔다. *O. latipes*와 *O. celebensis*의 잡종을 유도하였을 때, *O. latipes*는 97.2%, *O. celebensis*는 91.2%, *O. latipes*와 *O. celebensis* 잡종은 79.2%, *O. celebensis*와 *O. latipes* 잡종은 94%로 나타나, *O. latipes*와 *O. celebensis* 잡종군이 대조군에 비해 낮게 보고된 바 있다(Iwamatsu et al., 1984). *O. melastigma*와 자바 송사리와의 잡종 연구에서 수정율이 *O. melastigma*와 자바 송사리 잡종, 자바 송사리와 *O. melastigma* 잡종에서 각각 90.0%와 93.0%로 나타났으며, 친어군인 *O. melastigma*가 97.0%, 자바 송사리가 94%로 보고되었다(Iwamatsu et al., 1986). 따라서 잡종군들과 친어군 간에 수정율이 유사한 것으로 나타났으며, 본 연구 결과와도 유사한 결과가 나타났다. *O. latipes*와 자바 송사리의 잡종 실험에서 *O. latipes*와 자바 송사리 잡종의 수정율은 90.0%, 자바 송사리와 *O. latipes* 잡종은 90.0%로 나타나 친어군과 유사하다고 보고되었다(Hori and Iwamatsu, 1996). *O. latipes*와 *O. melastigma*의 잡종 연구에서 *O. latipes*와 *O. melstigma* 잡종의 수정율은 89.0%로, *O. melastigma*와 *O. latipes* 잡종은 90.0%로 나타나 친어군과 유사하였다(Hori and Iwamatsu, 1996). *O. celebensis*와 자바 송사리의 잡종에서는 *O. celebaensis*와 자바 송사리 잡종은 61.2%, 자바 송사리와 *O. celebensis* 잡종은 75.2%로 친어군에 비하여 낮은 수정율을 나타내어(Iwamatsu et al., 1994) 진화적으로 유연관계가 적은 것으로 사료된다. 하지만 *O. celebensis*와 *O. melastigma*의 잡종군들은 친어들과 유사한 수정율을 나타내었다. *O. luzonensis*와의 연구에서 *O.*

*latipes*와 *O. luzonensis*의 잡종군은 100%의 수정율을 나타내어 진화적으로 유연관계가 높은 것으로 나타났다(Iwamatsu et al., 1994).

바다 송사리와 자바 송사리 및 잡종군들의 부화율을 조사한 결과 바다 송사리가 93.4%로 가장 높게 나타났으며, 자바 송사리가 80.3%로 조사되었다. ODJ는 80.2%로 자바 송사리와 유의한 차이가 없었으나, OJD의 경우 부화율이 7.4%로 친어군과 ODJ에 비하여 현저히 낮게 나타났다. 이전의 연구에서 *O. melastigma*와 자바 송사리의 잡종의 부화율이 7.0%, 자바 송사리와 *O. melastigma*의 잡종은 49.0%로 나타났다(Iwamatus et al., 1986). 본 실험에서 OJD의 경우 7.4%로 이전의 연구와 같이 낮은 부화율을 나타내었으나, ODJ의 부화율이 80.2%로 이전의 연구 결과와는 다르게 높게 나타났다. 이는 본 실험에서 이전 연구와 달리 인공 수정하지 않고 자연 산란시켰으며, 생리식염수로 배양하지 않고 10‰ 기수에서 배양한 차이로 사료된다. *Oryzias* 속의 다른 종들에서는 *O. latipes*와 자바 송사리 간의 잡종군과 *O. latipes*와 바다 송사리 간의 잡종들이 모두 부화하지 못하였다고 보고되었다(Iwamatus et al., 1994). 이는 *O. latipes*와 두 종(자바 송사리, 바다 송사리)이 진화학적으로 자바 송사리와 바다 송사리 간의 관계보다 더 먼 것으로 사료된다.

바다 송사리와 자바 송사리 및 그들의 잡종군의 기형률을 조사한 결과 바다 송사리는 자바 송사리는 각각 0.7%와 0.8%로 나타나 매우 낮게 나타났으며, 유의한 차이를 보이지 않았다. 하지만 ODJ는 기형률이 10.6%로 친어군 보다는 높게 조사되었으며, OJD는 90.5%가 모두 기형으로 나타나 가장 높은 기형률을 보였다. 잡종군에서의 척추기형은 두 친어군의 척추형성 과정 중에 발현하는 유전자의 서로 다른 메커니즘 때문에 나타나는 것으로 사료된다. *O. latipes*의 척추만곡 기형은 변형 유전자가 전달되고 발현되어 일어난다고 보고된 바 있으며(Takeuchi, 1960), 이 변형 유형은 본 실험에서

나타난 척추 변형과 그 형태가 거의 일치하고 있다. 잡종군들은 척추만곡 기형으로 인해 전장이 친어군 보다 짧고, 척추와 체절 간의 불균형적 발달에 의해 만곡 기형이 발생하는 것이라고 보고하였다(Takeuchi, 1960).

어류의 세포 유전학적 분석에서 적혈구 세포 및 핵의 크기 조사는 그 측정 방법이 용이하여 배수체의 판단 기준 및 잡종의 세포 유전학적 특징을 밝히는데 유용하게 사용되고 있다(Benfey, 1989). 참돔(♀) x 감성돔(♂) 간의 잡종(Park et al., 2004), 잉어와 붕어 간의 잡종 (남, 1998) 등의 연구에서 잡종 개체의 적혈구 세포 및 핵의 크기가 양친의 중간치를 나타내는 것으로 보고된 바 있다. 본 실험에서 바다 송사리 (♀) x 자바 송사리 (♂) 잡종인 ODJ의 경우 적혈구 세포 및 핵의 크기를 ANOVA로 검정 ( $P < 0.05$ ) 결과 바다 송사리와는 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났으며, 자바 송사리와 가까운 것으로 나타나, 친어로 사용된 수컷 개체의 형질과 유사한 것으로 나타났다.

NORs (nucleolar organizer regions)은 ribosomal RNA를 encode하는 ribosomal gene을 담고 있으나(Gall and pardeu, 1969), rDNA 함량의 차이나 ribosomal gene의 수와 관계없이 세포 분화 과정 중 활성도가 변함에 따라 전사의 활성도도 영향을 받아 동일 세포에서도 염색체의 분열 상태가 다름에 따라서 종 간, 개체 간, 세포 간에 다양한 양적 변이 양상이 있는 것으로 보고되었다(Dobigny et al., 2002; Derenzini, 2000; Mellink et al., 1994). 적혈구 세포의 NORs에서 2배체 interphase stage에서 NORs가 통상 1~2개 나타난다고 보고되고 있으며(Phillips and ihssen, 1985; Gold, 1984), 본 연구에서도 바다 송사리와 자바 송사리 간 구분 없이 1~2개의 적혈구 NORs/cell이 높은 빈도로 관찰되었다.

Flow cytometry에 의한 DNA 함량 측정은 각 생물의 고유한 DNA 함량을 단시간에 다량의 세포핵에서 정확하게 분석 가능하다는 장점이 있다

(Aldrige et al., 1990). 바다 송사리의 genome size를 flow-cytometry를 이용하여 측정한 결과  $1.76 \pm 0.09$  pg/cells로 나타났다. 이전의 연구에서 cytophotometry 방법을 사용하여 바다 송사리의 DNA 함량이 1.8 pg/nucleus로 보고된 바 있어(Uwa et al., 1983) 본 실험결과와 유사한 결과가 나타났다. 자바 송사리는 이전의 cytophotometry 방법을 이용하여 1.7 pg/nucleus라고 보고되어(Uwa and Iwata, 1981), 바다 송사리와 DNA 함량이 거의 유사하였다. *Oryzias* 속의 다른 종의 DNA 함량을 조사한 이전의 연구에서 *O. latipes*와 *O. celebensis*는 모두 1.7 pg/nucleus로 보고되어(Uwa and Iwata, 1981), 바다 송사리와 자바 송사리의 DNA 함량과 유사하였다. *O. luzonensis*의 경우는 1.9 pg/nucleus로 보고되어(Formacion and Uwa, 1984), DNA 함량이 *Oryzias* 속의 다른 종에 비하여 조금 더 높게 나타나 진화적으로 유연관계가 적은 것으로 사료된다.

잡종개체 판별을 위한 세포유전학적 분석방법 중 염색체 수 및 핵형 분석 방법은 직접적이고 정확성도 높다(Chevassus, 1983). 잡종개체의 염색체 수 및 핵형은 양친의 반수체 조합으로 이루어지며 yellowtail flounder와 winter flounder 간의 잡종(Park et al., 2003), 넙치와 범가자미 간의 잡종에 관한 연구(김, 1995)와 미꾸라지와 미꾸리 간 잡종에 관한 연구(Kim et al., 1995) 등에서 보고된 바 있다. 본 실험에서는 바다 송사리와 자바 송사리 및 잡종군들에서 암·수간 염색체 수의 차이, heteromorphic한 염색체 및 개체 간, 세포 간 염색체 다형현상은 관찰되지 않았으며, 모두  $2n=48$ 로 유사하게 나타났다.

*Oryzias* 속을 분류하기 위하여 Uwa et al. (1986)은 염색체 분석 방법을 이용하여 3 종류의 염색체 그룹으로 나눈 바 있다. *Oryzias* 속 중 12종의 염색체 핵형을 분석하여 차간부 염색체와 차단부동원체 염색체로 이루어진 바다 송사리, 자바 송사리, *O. hubbsi*의 'monoarmed 그룹'과 중부 염색체와

차중부 염색체로 이루어진 *O. latipes*, *O. curvinotus*, *O. luzonensis*, *O. mekongensis*의 ‘biarmed 그룹’으로 나누었다. 그리고 1 - 4쌍의 큰 중부 염색체나 차중부 염색체를 가지는 *O. celebensis*, *O. marmoratus*, *O. matanensis*, *O. nigrimas*인 ‘fused 염색체 그룹’으로 나누었다. Naruse (1996)는 mtDNA를 이용한 계통분류를 한 결과 이들 세 그룹을 지지하는 연구결과를 보고하였다. 또한, Takehana et al. (2005)은 *Oryzias* 속 중 13종을 대상으로 하여 계통분류학적 분석을 실시하여 3개의 단계통(monophyletic species) 그룹인 *latipes* 그룹, *javanicus* 그룹 및 *celebensis* 그룹으로 나누었으며, 이들 세 그룹 역시 염색체의 핵형 분석을 통하여 이루어진 monoarmed 염색체인 *javanicus* 그룹과, biarmed 염색체인 *latipes* 그룹 그리고 fused 염색체를 가지는 *celebensis* 그룹과 같은 결과로 나뉘었다.

*Javanicus* 그룹에 속하는 바다 송사리의 염색체 핵형 분석을 한 결과 바다 송사리의 경우 24쌍의 차단부동원체 염색체로 이루어져 있으며 1쌍의 동원체 근처에서 2차 협착 부위(secondary constriction)가 나타나 이전의 보고와 같은 결과를 나타내었다. 바다 송사리와 같은 바다 송사리인 자바 송사리의 실험 결과 1 쌍의 차간부 염색체와 23쌍의 차단부동원체 염색체로 이루어져 있으며, NF는 48로 나타나 바다 송사리와 매우 유사하였으며, 이 역시 이전의 연구결과와 같았다. 진화적인 관점에서 보았을 때, 이전의 연구에서 *latipes* 그룹의 *O. latipes*, *javanicus* 그룹의 자바 송사리 및 *celebensis* 그룹의 *O. celebensis*를 대상으로 염색체 핵형을 분석한 결과 *O. latipes*와 *O. celebensis*는 위성(satellite) 차중부 염색체를 가지고 있으나, 자바 송사리는 차단부동원체 염색체에 2차 협착 부위를 가지고 있는 것으로 보고되었다. 또한, *O. celebensis*는  $2n=36$ 으로 염색체 수는 적으나 염색체의 크기가 커서 이들 염색체가 Robertsonian 결합으로 인해 형성된 것으로 생각된다고 하여 자바 송사리와는 좀 더 다른 진화된 형태의 핵형을 가지고 있다고 보

고되었다. 경골어류의 대부분이  $2n=48$ 의 차단부동원체 염색체(NF=48)를 가지는 것이 핵형의 기본형으로 알려져 있어, 자바 송사리가 *O. latipes*와 *O. celebensis* 보다 원형에 가까운 핵형을 가지고 있다고 보고하였다(Uwa et al., 1981). 본 실험의 바다 송사리 역시 자바 송사리와 유사한 염색체 핵형을 가지고 있어 *latipes* 그룹과 *celebensis* 그룹 보다 *javanicus* 그룹에 속하는 종들이 핵형의 기본형을 가지는 진화가 늦은 그룹으로 사료된다.

성염색체(sex chromosome)에 있어 Uwa et al. (1983)의 연구와 본 실험의 연구에서 바다 송사리는 암·수간 염색체 이형현상이 관찰되지 않았으나, fluorescence *in situ* hybridization (FISH)법을 이용한 연구에서 바다 송사리의 수컷 염색체인 Y염색체를 확인하기 위하여 fosmid 클론을 프로브(prove)로 이용하여 한 쌍의 차단부동원체 염색체의 중간에 발현하는 것을 확인하여 암·수간 염색체 차이를 밝혀내었다. 하지만, 이 연구에서 역시 성염색체의 암·수간 형태적 차이는 보이지 않는 것으로 나타났다(Tekehana et al., 2007a). *O. latipes*와 바다 송사리는 XX/XY의 같은 성결정 기작을 가지지만, *O. latipes*의 성결정 유전자(sex determination gene)로 밝혀진 DMY (the DM-domain gene on the Y chromosome) 유전자는 바다 송사리에서 성결정 유전자로 확인되지 않아(Tekehana et al., 2007a) 앞으로 바다 송사리의 성결정 유전자를 밝히는 일이 척추동물의 성결정 메커니즘의 진화를 밝히는데 있어서 매우 중요한 연구가 될 것으로 생각된다.

본 연구에서 유도된 각 실험군의 계측형질을 친어로 사용한 바다 송사리와 자바 송사리 개체와 비교한 결과 바다 송사리와 자바 송사리의 잡종(ODJ)은 모계와 비교시 미병고/전장과 체고/전장은 유의성을 보이나, 배지느러미 기점 길이/전장과 뒷지느러미 기점 길이/전장 그리고 안경/두장에서는 부계의 형질이 많이 나타났으며, 주둥이길이/두장에서는 모계 및 부계 형질의 중간을 나타내었다. 자바 송사리와 바다 송사리의 잡종(OJD)은 모

계와 비교시 배지느러미 기점 길이/전장, 뒷지느러미 기점 길이/전장 그리고 체고/전장은 유의성을 보이거나, 그 외 형질에서는 모두 모계와 부계 형질의 중간을 나타내었다. ODJ와 OJD는 이러한 계수형질 외에 꼬리지느러미 끝부분이 노란색을 띄고 있고, 뒷지느러미 끝부분이 검은 색으로 변하는 특징이 모두 자바 송사리를 닮아 바다 송사리와는 쉽게 구별 가능하였다. 이전의 연구에서 잡종화시 양친으로 사용된 암수 중 어느 한쪽이 잡종의 성장과 체형에 더욱 영향에 미치는가에 대한 실험에서 부계의 우세는 blue catfish와 channel catfish 잡종에서 나타나며(Brooks, 1997; Dunham et al., 1982), catla, catla catla와 rohu, Labeo rohita의 잡종은 모계와 비교 시 체장/두장폭 및 가슴지느러미의 기초수가 1% 수준에서 매우 높은 유의성을 보이거나 그 외 형질에서는 중간 형질을 나타내었다(Bhowmic et al., 1981).

성비 조사를 위해 바다 송사리, 자바 송사리 그리고 잡종군들의 성비를 형태학적으로 조사한 결과 바다 송사리와 자바 송사리는 암수 성비가 각각 53.3% : 46.7%와 48.3% : 51.7%로 거의 1:1의 비율로 나타났으며, 이는 생식소를 조직학적으로 분석한 결과와 일치하였다. 하지만, ODJ의 성비를 형태학적으로 조사한 결과 암컷의 성비가 26.7%로 수컷에 비하여 매우 낮은 비율을 나타내었으며, 생식소를 조직학적 분석 방법으로 조사한 결과 형태학적 분석 결과와 다르게 암컷의 비율은 3.3%로 매우 낮게 나타났고 간성을 가지는 개체가 6.7%, 수컷이 90.0%로 수컷의 비율이 매우 높게 나타났다. 이전의 연구에서 *O. curvinotus*와 *O. latipes*의 잡종을 유도한 결과 형태학적으로 수컷을 가진 개체 중 조직학적으로 분석 시 21%가 암컷인 것으로 보고되었으며, *O. latipes*와 *O. curvinotus*의 잡종에서는 형태학적으로 수컷인 개체의 100%가 암컷인 것으로 밝혀졌다(Shinomiya et al., 2006). 이는 이 두 종의 성결정 유전자로 알려진 DMY 유전자가 친어로 사용된 암컷의 X 염색체와 수컷의 Y 염색체가 잡종군 수컷의 XY 염색체를 구성하면서

기원이 다른 DMY 유전자가 잡종 개체에서 낮은 수준으로 발현되거나 발현되지 않는 것으로 보고되었다(Shinomiya et al., 2006). 본 연구에서 사용된 바다 송사리와 자바 송사리의 경우 성결정 기작이 XX/XY와 ZZ/ZW로 서로 다르며(Takehana et al., 2007a; Takehana et al., 2008), 성결정 유전자가 아직 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서 ODJ에서 수컷의 비율 90%로 암컷에 비하여 현저하게 높게 나타나는 것으로 보아, 위의 잡종 유도시 암컷이 유도되는 이전의 연구 결과와는 상반되게 수컷을 유도하는 성결정 유전자의 발현율이 높게 발현되는 것으로 사료된다. OJD의 성비는 형태학적으로 분류 시 수컷의 비율이 63.3%로 매우 높게 나타났으며, 조직학적 분석 시 암컷은 0.0%로 전혀 나타나지 않았으며, 간성이 6.3%, 수컷이 31.3%로 나타났고, 나머지 62.4%에서는 생식소가 관찰되지 않았다. 성비뿐만 아니라 부화율도 7.44%로 대부분의 OJD 개체가 폐사하는 것으로 보아, 이는 자바 송사리 암컷의 ZW와 바다 송사리 수컷의 XY 염색체에서 각각의 염색체가 조합될 때에 성결정 유전자 뿐만 아니라 염색체 분열시 비정상적으로 분열하기 때문인 것으로 생각된다. 이전의 연구에서 근연종인 *O. hubbsi*와 바다 송사리가 서로 다른 ZZ/ZW와 XX/XY 성결정 기작을 가지고 있으며, ZW와 XY 성염색체가 서로 다른 기원을 가져 이들 두 종의 성염색체가 상동성을 가지지 않는다고 보고하였다(Takehana et al., 2007b). 또한, *O. hubbsi*와 자바 송사리가 동일한 ZZ/ZW 성결정 기작을 가지지만, 성염색체가 상동성을 가지지 않아, 이들 두 종의 성결정 유전자가 다른 것으로 사료된다고 보고된 바 있다(Takehana et al., 2008). 따라서 앞으로 이들 종의 성결정 유전자를 찾는 연구 뿐만 아니라, OJD 개체의 염색체 분열상에 대한 연구 역시 이루어져야 한다고 생각된다.

ODJ에서 형태적으로 수컷 형질을 가지는 개체의 생식소에서 적은 양의 정자가 관찰되어, 바다 송사리 암컷과 ODJ 수컷을 교배하여 ODDJ 개체를

생산하고자 하였다. 수정율, 초기 난발생 및 부화율을 조사한 결과 총 13회 산란 중 모든 개체가 난발생 도중 폐사하였다. 수정율은 평균  $36.2 \pm 18.0\%$ 였으나, 후기 낭배기까지의 생존율은  $4.3 \pm 2.6\%$ 에 불과하였으며, 그 이후 더 이상 난발생이 진행되지 않고 수정 후 3일만에 모두 폐사하였다. 수정이 이루어지는 것으로 보아 ODJ 수컷 개체가 생식 능력이 있음을 알 수 있었으나, 수정율이 매우 낮아, ODJ 생식소의 조직학적 분석결과와 같이 정자가 매우 적은 정자부족증으로 보인다. ODDJ 개체의 난발생 과정을 조사한 결과 세포 분열상도 기형적으로 발생하였으며, 그 시간도 일정하지 않아 이는 염색체가 비정상적으로 분열하여 생기는 것으로 생각된다. ODDJ 개체가 가질 수 있는 염색체 상은 바다 송사리 암컷에게서 온 X 염색체와 ODJ 수컷에게서 올 수 있는 X 염색체 혹은 Z 염색체이다. 이들 염색체의 조합은 XX 혹은 XZ로 이들 염색체 조합을 가지는 개체들이 본 연구에서 모두 폐사하였다. 앞으로 *Oryzias* 속들 중 성결정 기작이 알려져 있는 개체들과 교배시켜, 이들 기작이 수정율과 부화율, 생존율에 어떤 영향을 미치는지 그 메커니즘을 밝히는 연구가 염색체 분석을 통하여 이루어져야 할 것으로 생각되며, 이들 종들의 성결정 유전자를 밝혀내어 분자생물학적 관점에서도 그 원인을 밝히는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

조직학적 방법을 사용한 성비 조사 결과 바다 송사리와 자바 송사리 간의 잡종인 ODJ의 경우 앞의 실험에서 90.0%가 수컷으로 나타나, 이들 개체의 생식소 발달 및 성분화 기작이 친어군으로 사용된 바다 송사리와 자바 송사리와는 전혀 다른 것으로 나타났다. 따라서 새로운 잡종군을 유도하여 생물이 가지는 고유한 성질이 아닌 새로운 성결정, 성분화 및 내분비계 반응 기작을 대상으로 해양 생태계의 위해성을 평가하는 실험 모델로 사용하기 위하여 ODJ를 대상으로 비스페놀 A를 처리하여 에스트로겐 효과에 의한 성전환을 유도하고자 하였다. 이전의 연구에서 *O. latipes*에 한

달 동안 10 ng/L의 낮은 농도로 E2를 처리한 결과 모든 개체가 암컷으로 보고된 바 있어(Nimrod and Benson, 1998), 암컷화 효과를 갖는 화학 물질(estrogenic chemicals)이 매우 낮은 농도에서도 개체에 영향을 미칠 수 있어 그 위해성에 대해 많은 연구가 이루어졌다. 비스페놀 A는 수컷과 암컷의 재생산 시스템(reproductive systems)에 영향을 준다고 많은 연구에서 보고되고 있다. 비스페놀 A에 노출시킨 구피 *Poecilia reticulata* (Haubruge et al., 2000), fathead minnows *Pimephales promelas* (Sohoni et al., 2001)와 brown trout *Salmo trutta f. fario* (Lahnsteiner et al., 2005)에서 비정상적인 정자 형성 즉, 정자의 밀도, 정자의 운동과 유영속도가 감소한다고 보고된 바 있다. 또한, 비스페놀 A가 암컷과 수컷 생식소의 성장을 저해한다고 하였으며(Sohoni et al., 2001), 암컷의 배란이 비스페놀 A의 농도가 5 µg/L의 경우 이루어지지 않거나, 1.75 µg/L와 2.4 µg/L의 농도에서는 지연된다고 보고되었다(Lahnsteiner et al., 2005). *O. latipes*의 연구에서 비스페놀 A 농도 12,500 µg/L에 14일 동안 수정란을 노출시켰을 때, 부화율이 대조군에 비하여 현저하게 감소하였으며, 21일 동안 비스페놀 A에 수컷 개체를 노출시켰을 때, 간의 난황단백질(vitellogenin) 발현이 높아졌으며, 이때 비스페놀 A의 최소 농도는 1000 µg/L라고 하였다(Ishibashi et al., 2005). 또한, 부화 후 24시간 된 자어와 수정 후 24시간이 되지 않은 수정란을 사용하여 초기 생활사에 미치는 영향을 조사한 결과 부화 후 24시간 된 자어는 비스페놀 A의 96시간의 반수치사 농도가 13,900 µg/L였으며(Ishibashi et al., 2005), *O. latipes* 성어의 경우 13,000 µg/L로(Yokota et al., 2000), 비스페놀 A의 독성인 *O. latipes*의 자어와 성어에서 크게 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 수정란의 부화율을 조사한 결과 Yokota et al., (2000)은 비스페놀 A 농도 2.28, 13.0, 71.2, 355와 1820 µg/L에서 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나, 그 이후의 연구에서 비스페놀 A 농도 12,500 µg/L에서는 14일동

안 처리 시 대조군에 비하여 현저히 낮은 부화율을 나타내었다고 보고되어 (Ishibashi et al., 2005), 수정란에 영향을 미치는 비스페놀 A의 최저 농도는 12,500 µg/L인 것으로 보고하였다. ODJ의 비스페놀 A의 독성은 부화 직후의 자어에서 48시간째의 10 µg/L의 농도에서 나타났으며, 비스페놀 A의 농도가 증가함에 따라 기형률이 증가하고 성장률이 감소하였다. 하지만, 비스페놀 A 독성의 최저 농도에 대한 연구는 이루어져 있지 않아 앞으로 수정란과 부화 직후 자어를 대상으로 비스페놀 A에 의한 폐사율, 성장 저해와 기형률 등의 독성 연구를 수행해야 할 것으로 사료된다. 비스페놀 A의 암컷화 영향에 대한 연구는 많은 어류들에서 연구가 되어왔다. 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss*에서는 12일 동안 500 µg/L의 비스페놀 A에 노출시켰을 시 난황단백질의 합성이 현저하게 증가한다고 보고되었으며(Lindholst et al., 2000), Sohoni et al., (2001)은 fathead minnows *Pimephales promelas*의 수컷 개체에 640과 1280 µg/L의 비스페놀 A를 43일간, 160 µg/L의 농도를 71일간 처리시 난황단백질이 합성된다고 하였다. Tabata et al., (2003)은 성숙한 수컷 송사리를 1,000 µg/L의 비스페놀 A에 5주간 처리하였을 시, 난황단백질 농도가 현저히 증가한다고 보고하였다. 또한, 3,120 µg/L의 비스페놀 A에 수컷을 노출시켰을 때 간에서 난황 단백질의 농도가 증가되었다고 보고하였다(Kang et al., 2002). 본 연구에서도 ODJ의 부화 직후의 자어를 대상으로 비스페놀 A에 56일간 노출시켰을 시, 2.5 mg/L의 농도부터 간성이 나타나기 시작하여, 5.0 mg/L와 10.0 mg/L의 농도에서는 모든 개체가 암컷화 된 것을 조직학적 방법으로 조사하였다. 수컷 어류에 에스트로겐 유사물질(estrogenic compounds)을 노출시켰을 시 난황단백질의 과도한 유도로 인하여 간에 병변이 발생한다는 연구가 보고되었다. Gray et al. (1999)은 *O. latipes* 수컷에 octylphenol을 초기 생활사에 처리하였을 시, 복부팽만 증상(swollen abdomen)이 나타나며, 성숙되기 전에 모두 폐사하였다고 보고

하였다. 이와 유사한 증상이 수컷 성어 *O. latipes*를 에스트로젠 유사물질에 노출시켰을 시 나타났다(Kang et al., 2002; Seki et al., 2002). 이는 *O. latipes*의 수컷이 난황 단백질을 분비하도록 되어 있지 않음에도 불구하고, 이를 과도하게 분비함으로써 간에 병변에 생기고 이에따라 복부 팽창 증상이 일어나 폐사에 이르는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 ODJ의 대부분의 개체가 수컷 생식소를 가지고 있음에도 불구하고, 폐사하는 개체들에서 복부 팽창 증상은 관찰되지 않았다. 따라서 비스페놀 A의 농도별로 ODJ의 난황 단백질의 발현 정도를 조사하고, 그것이 *O. latipes*에서와 마찬가지로 폐사에 이르는 원인이 되는지 앞으로 연구해야 할 필요가 있다고 생각된다. 또한, 앞으로 비스페놀 A를 바다 송사리에 처리하여 ODJ에 처리하였을 시의 결과와 비교 연구해야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 바다 송사리와 자바 송사리의 생식생물학적 특징 및 세포유전학적 특징을 조사하고, 그들의 잡종군인 ODJ와 OJD 그리고 역교배를 하여 유도한 ODDJ 개체를 대상으로 생물학적 특징 및 세포 유전학적 분석을 하여 친어군과 비교 조사하였다. 많은 연구에서 사용되고 있는 *O. latipes*의 장점을 공유하면서도 바다에 서식하고 있는 바다 송사리의 난발생 및 초기 성분화와 생식소 발달 그리고 세포유전학적 분석 및 외형계측을 통해 이 종의 성전환 실험, 생태독성 실험과 발생유전학 연구 등 해양 생태계 위해성 평가를 위한 연구의 기초자료를 제공하고자 하였다. 또한, 해산 송사리인 자바 송사리의 생물학적 및 세포유전학적 연구를 통해 두 종간의 유연관계를 조사하였으며, 이들 종간의 잡종군을 유도하여 새로운 해양 생태계의 위해성을 평가할 수 있는 모델을 개발하고자 하였다. 잡종 개체는 본래 생물이 가지고 있는 고유한 성질이 아닌 새로운 생물학적 반응 기작을 가지므로, ODJ를 새로운 내분비계 교란 물질의 실험 모델로 평가하고자 하였으며, 그에 따라 ODJ 개체를 비스페놀 A에 처리하여 성장

를, 기형률과 성전환 유도 정도를 조사하여, 비스페놀 A의 독성과 에스트로젠 효과를 밝혀내었다. 앞으로 해양 생태계 위해성을 평가하기 위한 실험 모델로 본 연구에서 실험 모델로 제시한 바다 송사리와 ODJ 뿐만 아니라 *Oryzias* 속의 다른 종들과 그들 종간의 잡종을 유도하여 여러 가능성이 있는 실험 모델을 개발하여 다양한 생물학적 기작에서의 위해성 반응을 연구하여 평가해야 할 것으로 생각된다.



## 국문 요약

본 연구에서는 바다 송사리 *Oryzias dancena*와 자바 송사리 *O. javanicus*의 생식생물학적 특성을 분석하고, 이들 종간의 잡종, 상반 잡종 및 역교배체를 유도하여 비교 분석하였으며, 잡종군의 성전환을 유도하였다.

난발생 과정과 자치어의 형태발달에 관하여 관찰한 결과 발생 과정에 따른 형태적 변화에 있어 친어군과 잡종군 모두 차이는 없었으며, 발생 단계에서 시간 차이가 있었다. 수정 후 1시간째 배반이 형성되는 속도는 같았지만, 그 이후 발생 단계부터 차이가 나타나기 시작하였다. 심장 기관 형성 단계까지의 시간은 바다 송사리와 ODJ가 수정 후 2일 1시간 30분으로 발생 속도가 유사하였으나, 그 이후 단계인 심장 박동기부터 바다 송사리가 2일 4시간, ODJ가 2일 5시간 30분 소요되어 ODJ가 바다 송사리 보다 느려졌다. 자바 송사리와 OJD는 초기 낭배기까지는 수정 후 14시간 30분으로 발생 속도가 유사하였으나, 그 이후 단계부터 OJD의 발생 속도가 느려져 혈액순환 시작 단계까지 자바 송사리가 2일 22시간 소요된 반면, OJD는 3일이 소요되었다. 발생 속도는 바다 송사리가 가장 빨랐으며, 다음으로 ODJ, 자바 송사리 그리고 OJD의 순이었다. 부화 시간의 순서 역시 발생속도와 동일하였으며, 바다 송사리가 수정 후 11일째에, 자바 송사리가 14일째에, ODJ가 13일째에 부화하였으며, OJD가 가장 느린 수정 후 15일째에 부화하였다.

바다 송사리 자치어의 골격 발달 과정을 부화 직후부터 12주째까지 조사하였다. 부화 직후의 자어는 대부분의 두개골과 턱뼈(maxilla), 전상악골(premaxilla) 및 치골(dentary)이 골화되어 있었다. 부화 후 28일째에 안와접형골(orbitosphenoid)이 골화되었으며, 부화 후 12주째 개체에서는 대부분의 두개골과 내장골이 경골화되거나 전상악골과 안와접형골의 일부 등이 연골로

남아있었다. 가슴지느러미는 부화 12주째에는 모두 경골화되었다. 뒷지느러미는 부화 후 12주째에는 방사기골이 모두 경골화 되었으나, 원담기골은 연골인 상태로 관찰되었다. 등지느러미는 부화 12주째에는 방사기골이 모두 경골화되었으며, 원담기골은 연골인 상태로 관찰되었다. 꼬리지느러미는 부화 12주째에는 전체적으로 경골화 되었다.

바다 송사리의 초기 성분화와 생식소 발달 과정을 조직학적으로 조사하였다. 원시생식세포가 처음 관찰된 시기는 수정 후 5일째이고, 수정 후 9일째에 장과 앞신장관 사이의 생식소 형성 부근으로 이동한 것이 관찰되었다. 부화 후 12일째의 생식소는 암·수로 분화가 이루어졌다. 부화 후 28일째 난소에서는 주변인기의 난모세포가 관찰되었으며, 28일째의 정소에서는 정소 소관의 수와 정원세포의 증가를 확인할 수 있었다. 산란은 부화 후 9주째에 이루어졌으며, 이 시기의 난소에서는 난황과립이 난 전체에 형성되는 성숙난과 배란 직후 성숙난이 빠져나간 흔적이 관찰되었다. 수컷 생식소에서 역시 많은 수의 정세포가 관찰되었으며 사정 직후 정세포가 빠져나간 부분이 관찰되었다. 이상의 결과 본 종은 초기 성분화 과정에 자성 단계를 거치지 않고 정소와 난소로 분화하는 분화형 자웅이체에 속한다.

바다 송사리, 자바 송사리 및 유도된 잡종의 수정율, 부화율, 폐사율 및 기형률을 조사한 결과 바다 송사리의 평균 수정율은  $97.3 \pm 0.6\%$ 이었고, 자바 송사리는  $92.3 \pm 2.4\%$ 로 나타났다. ODJ의 평균 수정율은  $89.4 \pm 2.7\%$ 였고, OJD의 평균 수정율은  $81.8 \pm 2.6\%$ 로 나타나 바다 송사리와 자바 송사리의 수정율에 비해 다소 낮았다. 부화율은 바다 송사리의 경우 평균  $93.4 \pm 2.7\%$ 였으며, 자바 송사리는  $80.3 \pm 2.8\%$ 였다. ODJ의 평균 부화율은  $80.2 \pm 2.3\%$ 로 바다 송사리와 자바 송사리 보다 낮게 나타났다. OJD의 평균 부화율은  $7.4 \pm 1.1\%$ 로 나타나 바다 송사리와 자바 송사리 및 ODJ 보다 현저히 낮은 부화율을 보였다. 기형률은 바다 송사리와 자바 송사리는

각각  $0.7 \pm 0.8\%$ 와  $0.8 \pm 1.0\%$ 로 낮게 나타났으나, ODJ 잡종은  $10.6 \pm 2.3\%$ 로, 바다 송사리와 자바 송사리의 기형률 보다 높게 나타났다. OJD의 기형률은  $90.48 \pm 13.11\%$ 로 바다 송사리와 자바 송사리 및 바다 송사리와 자바 송사리 잡종군(ODJ) 보다 현저히 높은 기형률을 나타냈다.

성장을 조사 결과 부화 직후 치어의 길이는 바다 송사리는  $4.4 \pm 0.2$  mm였고, 자바 송사리는  $5.0 \pm 0.2$  mm, ODJ는  $4.3 \pm 0.4$  mm로, ODJ는 바다 송사리와 유사하였으며, 자바 송사리와는 차이가 있었다. 부화 후 6주째에는 세 실험군 모두에서 성장에 차이가 나타나지 않았지만, 부화 후 9주째에 바다 송사리가 자바 송사리와 ODJ와 비교하여 가장 성장이 빠른 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

적혈구 핵의 표면적 및 부피는 바다 송사리의 경우 각각  $9.75 \pm 0.45 \mu\text{m}^2$  및  $18.20 \pm 0.95 \mu\text{m}^3$ 였고, 자바 송사리는  $8.33 \pm 0.45 \mu\text{m}^2$ 과  $15.80 \pm 1.45 \mu\text{m}^3$ 로 나타났다. 이들의 잡종인 ODJ의 적혈구의 핵의 표면적은  $8.30 \pm 0.50 \mu\text{m}^2$ , 부피는  $15.66 \pm 1.25 \mu\text{m}^3$ 로 나타나, 바다 송사리 보다 자바 송사리와 유사한 결과를 나타내었다. 바다 송사리와 자바 송사리의 적혈구 NORs 분석 결과 세포 당 1개(바다 송사리: 20.5%, 자바 송사리: 12.2%), 2개(바다 송사리: 78.0%, 자바 송사리: 88.8%)였다.

미꾸라지의 꼬리지느러미( $2.8 \text{ pg/cell}$ )를 대조군으로 사용하여 바다 송사리의 genome size를 분석한 결과, DNA 함량은  $1.76 \pm 0.09 \text{ pg/cell}$ 로 나타났다.

바다 송사리, 자바 송사리와 이들의 잡종군의 염색체수는 모두  $2n = 48$ 로 나타났으며, fundamental number (FN)는 48이었다. 차단부동원체 중 한 쌍에서 2차 수축(secondary constriction)이 나타났다. 암·수간 염색체수의 차이는 나타나지 않았고, 암·수간 heteromorphic한 염색체는 관찰할 수 없었다.

형태 계수학적 형질 측정 결과 바다 송사리, 자바 송사리와 이들의 잡종군의 등지느러미 기조수, 가슴지느러미 기조수, 뒷지느러미 기조수, 꼬리지느러미 기조수 및 척추골수를 대상으로 ANOVA test를 한 결과 모든 실험군에서 차이가 조사되지 않았다.

형태 계수학적 측정항목 중 바다 송사리와 자바 송사리 간 뚜렷한 차이를 보이는 항목은 배지느러미 기점 길이/체장(OV/SL), 뒷지느러미 기점 길이/체장(OA/SL), 체고/체장(BD/SL), 미병고/체장(CPD/SL), 안경/두장(ED/HL) 및 주둥이 길이/두장(SNL/HL)이었다. ODJ를 바다 송사리와 자바 송사리 간 차이를 보이는 각 형태 계수학적 형질을 대상으로 친어와 유의성 검정을 한 결과 ODJ는 OV/SL와 OA/SL에서 자바 송사리와  $P > 0.05$  수준으로 닮았다. BD/SL은  $P > 0.05$  수준으로 바다 송사리와 유사하고, CPD/SL은  $P < 0.05$ 로 바다 송사리와 닮았다. ED/HL은  $P > 0.05$  수준으로 자바 송사리와 유사하고, SNL/HL은  $P > 0.05$  수준으로 중간치를 나타내었다. OJD를 바다 송사리와 자바 송사리 간 차이를 보이는 각 형태 계수학적 형질을 대상으로 암수 친어와 유의성 검정을 한 결과 OV/SL에서 자바 송사리와  $P > 0.05$  수준으로 닮았고, OA/SL에서  $P < 0.05$  수준에서, BD/SL은  $P > 0.05$  수준으로 자바 송사리와 닮았고, 그 외 CPD/SL, ED/HL 및 SNL/HL은  $P > 0.05$  수준으로 중간치를 나타내었다.

바다 송사리와 자바 송사리의 잡종(ODJ)과 상반 잡종(OJD)의 성비를 조직학적으로 분석한 결과 ODJ의 경우 90%가 수컷이었으며, 암컷이 3.3%, 간성이 6.7%로 나타났다. 수컷 생식소에서 정자는 매우 조금 관찰되어, 정자부족증(oligospermia)인 것으로 나타났다. OJD의 경우 31.3%가 수컷이었으며, 암컷은 없었고, 간성이 6.3%, 나머지의 생식소는 관찰할 수 없었다.

바다 송사리 (♀)와 ODJ (♂)의 상반교배를 통해 유도된 잡종의 수정율은  $36.2 \pm 18.0\%$ 로 매우 낮았다. 수정 후 5시간째에 1세포기가 되었으며, 후기

낭배기는 수정 후 40시간째에 나타났으며  $95.8 \pm 2.6\%$ 의 수정란이 폐사하였고, 수정 후 3일째에 모든 개체가 폐사하였다.

부화 직후의 ODJ에 비스페놀 A를 2.5 mg/L, 5.0 mg/L와 10.0 mg/L의 농도로 56일간 처리한 결과 대조군의 경우 평균 전장이  $18.0 \pm 1.2$  mm로 나타났고, 비스페놀 A 처리군에서는 2.5 mg/L로 처리한 경우  $15.0 \pm 2.0$  mm, 5.0 mg/L 처리군은  $13.7 \pm 2.5$  mm, 10.0 mg/L 처리군에서는  $12.8 \pm 2.5$  mm로 나타나 대조군과 비스페놀 A 처리군에서 성장 차이가 관찰되었다. 또한, 처리군 간에서도 비스페놀 A의 농도가 높을수록 성장이 느린 것으로 나타났다. 기형률을 조사한 결과 대조군은 13.6%였고, 비스페놀 A 처리군의 경우 2.5 mg/L는 65.4%로 대조군에 비해 매우 높게 나타났으며, 이보다 농도가 높은 5.0 mg/L와 10.0 mg/L에서는 각각 81.3%와 98.1%로 처리 농도가 높아질수록 기형률이 높게 나타났다.

성전환율을 분석하기 위하여 조직학적 분석을 한 결과 대조군에서 사용된 ODJ 50마리 중 정상 수컷이 47 마리였으나, 3 마리가 간성(intersex)을 나타내었으며, 비스페놀 A 농도가 2.5 mg/L인 그룹에서 76.9%인 40 마리가 간성으로 나타났으며, 23.1%인 12마리가 수컷으로 나타났다. 비스페놀 A 농도 5.0 mg/L와 10.0 mg/L인 그룹에서는 52 마리 중 수컷은 한 마리도 나타나지 않았으며, 모든 개체에서 간성이 나타났다.

## 감사의 글

본 논문이 나오기까지 지난 시간을 되돌아보면 너무나 감사해야 할 분들이 많습니다. 먼저 부족한 저에게 많은 충고와 격려를 아끼지 않으시고 학자로서 학문에 대한 자세와 열정을 몸소 가르쳐 주신 김동수 교수님께 깊은 존경과 감사를 드립니다. 부족한 논문의 심사를 위해 바쁘신 와중에도 세심한 교정과 충고를 아끼지 않아주신 조재운 교수님, 순천향대학교 방인철 교수님, 한국해양연구원 노충환 박사님과 남윤권 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 배움의 과정 동안 많은 가르침과 격려를 해주신 손철현 교수님, 허성범 교수님, 장영진 교수님, 배승철 교수님, 김창훈 교수님과 김종명 교수님께도 감사를 드립니다.

학위 과정 중 아낌없는 조언과 격려를 해주신 김근용 박사님, 조영선 박사님과 윤문근 박사님께 감사드리며, 항상 관심을 가지고 지켜봐 주시는 한국해양대학교 박인석 교수님, 국립수산물과학원 김봉석 연구관님과 임재현 박사님께도 감사를 드립니다. 또한, 졸업 후에도 걱정하고 챙겨주시는 이승기님, 최별님, 박지은님과 하은미님께 감사드리며 언제나 가까이에서 즐거웠던 시간, 힘들었던 시간을 함께하며 힘이 되어준 후배 상윤이, 연경이, 의성이, 창희, 주연이, 민지에게 고마움을 표합니다. 곁에서 함께 실험하며 동고동락한 해양수산형질전환생물연구소 연구원들 모두에게도 그간의 도움과 관심에 감사를 드리며 앞으로 좋은 결과 있기를 기원합니다.

항상 같은 자리를 변함없이 지켜주며 큰 힘과 용기가 되어주는 김승진님, 나윤이, 지민이, 지연이, 현희와 ECK 동기, 선후배님들께도 감사드립니다.

다.

바쁘다는 이유로 제대로 찾아뵙지도 못하는 할머니, 할아버님, 큰아버지, 큰어머니와 곁에서 항상 격려와 사랑을 주시는 큰 이모와 작은 이모께 감사를 드립니다.

부족한 딸을 항상 믿어주시고 공부할 수 있게 뒷바라지 해주시는 사랑하는 아버님과 어머니님, 멀리에서도 늘 걱정해 주고 힘을 주시는 언니와 형부, 이제 집을 떠나 떨어져 지낼 동생에게 말할 수 없는 고마움을 깊이 느끼며 사랑과 감사의 마음으로 이 논문을 바칩니다.



## V. 참고 문헌

- Aldridge, F.J., R.Q. Marston and J.V. Shireman, 1990. Induced triploids and tetraploids in bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*, verified by multi-embryo cytofluoremetric analysis. *Aquaculture*, 87: 121-131.
- Alo, R., R.M. Facciolo, M. Madeo, G. Giusi, A. Carelli and M. Canonaco, 2005. Effects of the xenoestrogen bispheno A in diencephalic regions of the teleost fish *Coris julis* occur preferentially via distinct somatostatin receptor subtypes. *Brain Res. Bull.*, 65: 267-273.
- Ari, K., 1988. Viability of allotriploids in salmonids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 54: 1695-1701.
- Arukwe, A., T. Celius, B.T. Walther and A. Goksøyr, 2000. Effects of xenoestrogen treatment on *zona radiata* protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.*, 49: 159-170.
- Benfey, T.J., 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1682: 33.
- Bhowmick, R.M., R.M. Jana, S.D. Gupta, G.V. Kowtal and M. Rout, 1981. Studies on some aspects of biology and morphometry of the intergeneric hybrid, *Catla catla* Hamilton x *Labeo rohita* Hamilton produced by hypophysation. *Aquaculture*, 23: 367-371.
- Brooks, M.J., 1977. A study of length variation in blue, *Ictalurus furcatus*, and

- channel, *I. punctatus*, catfishes. M.S. Thesis. Auburn Uni. Auburn, AL, pp. 53.
- Brotons, J.A., M.F. Olea-Serrano, M. Villalobos, V. Pedraza and N. Olea, 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans, *Environ. Health Perspectives*, 103: 608-612.
- Byrappa, V., 2003. Evolution and diversity of fish genomes. *Curt. Opin. Genet. Devel.*, 13: 588-592.
- Cavalier-Smith, T., 1985. Introduction: the evolutionary significance of genome size. In *the Evolution of Genome Size*. John Siley & Sons, Chichester, U.K., pp. 180-184.
- Chevassus, B., 1983. Hybridization in fish. *Aquaculture*, 33: 245-262.
- Derenzini, M., 2000. The AgNORs. *Micron*, 31: 117-120.
- Devlin, R.H. and Y. Nagahama, 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- Dobigny, G., C.O. Costaz, C. Bonillo and V. Volobouev, 2002. "Ag-NORs" are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytogenet. Genome Res.*, 98: 75-77.
- Dunham, R.A., R.O. Smitherman, M.J. Brooks, M. Benchakan and J.A. Chappell, 1982. Paternal predominance in reciprocal channel-blue hybrid catfish. *Aquaculture*, 29: 389-396,
- Estlander, T., R. Jolanki, M.L. Henriks-Eckerman and L. Kanerva, 1999. Occupational contact allergy to bisphenol A. *Contact Dermatitis*, 40:

52-53.

- Formacion, M.J. and H. Uwa, 1984. Cytogenetic studies on the origin and species differentiation of the Philippine medaka, *Oryzias luzonensis*. J. Fish Biol., 27: 285-291.
- Gall, J.G. and M.L. Pardue, 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64: 600-604.
- Gold, J.R. and C.T. Amemiya, 1987. Genomic size variation in North American minnows (Cyprinidae). II. Variation among 20 species. Genome, 29: 481-489.
- Gold, J., 1984. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolus organizer regions in North American Cyprinid fishes. Copeia, 232: 5-11.
- Gold, J., 1979. Cytogenetics. In fish Physiol. Vol. 8. Academic press, London. pp. 353-405.
- Gray, M.A., A.J. Niimi and C.D. Metcalfe, 1999. Factors affecting the development of testis-ova in medaka, *Oryzias latipes*, exposed to octylphenol. Environmental Toxicology and Chemistry, 18: 1835-1842.
- Gregory. T.R., 2001. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. Blood Cells, Molecules and Diseases, 27: 830-843.
- Hamaguchi, S., 1992. Sex differentiation of germ cells and their supporting cells in *Oryzias latipes*. The Fish Biology Journal Medaka, 4: 11-17.

- Haubruge, E., F. Petit and M.J.G. Gage, 2000. Reduced sperm counts in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol A. Proc. R. Soc. Lond. B., 267: 2333-2337.
- Herpin, A., S. Rohr, D. Riedel, N. Kluever, E. Raz and M. Schartl, 2007. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). BMC Developmental Biology, 7: 3.
- Hiraki, M. and T. Iwamatsu., 1979. Histological observations on developmental process of the medaka egg, Bull. Aichi Univ. Educ., 28: 73-78.
- Hori, R. and T. Iwamatsu., 1996. Experiments on interspecific hybridization among *Oryzias melastigma*, *Oryzias javanicus* and *Oryzias latipes*. Bull. Oraki Women's College, 37: 1-6.
- Howell, W.M. and D.A. Black, 1979. Localization of the nucleolus organizer regions on the sex chromosomes of the banded killifish, *Fundulus diaphanus*. Copeia, 544-546.
- Hunter, G.A., E.M. Donaldson, F.W. Goetz and P.R. Edgell, 1982. Production of all-female and sterile groups of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and experimental evidence for male heterogamety. Trans. Am. Fish. Soc., 111: 367-372.
- Inoue, K. and Y. Takei, 2003. Asian medaka fishes offer new models for studying mechanisms of seawater adaptation. Comp. Biochem. Physiol. B., 136: 635-645.
- Ishikawa, Y., 2000. Medaka fish as a model system for vertebrate developmental genetics. BioEssays, 22: 487-495.
- Ishibashi, H., N. Watanabe, N. Matsumura, M. Hirano, Y. Nagao, H.

- Shiratsuchi, S. Hohra, S. Yoshigara and K. Arizono, 2005. Toxicity to early life stages and an estrogenic effect of a bisphenol A metabolite, 4-methyl-2,4-bis (4-hydroxyphenyl) pent-1-ene on the medaka (*Oryzias latipes*). *Life Sciences*, 77: 2643-2655.
- Iwamatsu, T., 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, 121: 605-618.
- Iwamatsu, T., T. Mori and R. Hori, 1994. Experimental hybridization among *Oryzias* species I. *O. celebensis*, *O. javanicus*, *O. latipes*, *O. luzoensis* and *O. melastigma*. *Bull. Aichi Univ. of Edu.*, 43: 103-112.
- Iwamatsu, T., M. Sato and K. Nakane, 2009. Development of the first vertebra in *Oryzias latipes* and its morphology in beloniformes and cyprinodontiformes. *Bull. Aichi Univ. of Edu.*, 58: 69-79.
- Iwamatsu, T., T. Watanabe, R. Hori, T.J. Lam and O.P. Saxena, 1986. Experiments on interspecific hybridization between *Oryzias melastigma* and *Oryzias javanicus*. *Zool. sci.*, 3: 287-293.
- Iwamatsu, T., 1986. Comparative study of morphology of *Oryzias* species. *Bull. Aichi. Univ. Edu.*, 35: 99-109.
- Iwamatsu, T. and K. Hirata. 1984. Normal course of development of the Java medaka, *Oryzias javanicus*. *Bull. Aichi. Univ. Edu.*, 33: 87-109.
- Iwamatsu, T., H. Uwa, A. Inden and K. Hirata, 1984. Experiments on interspecific hybridization between *Oryzias latipes* and *Oryzias celebensis*. *Zool. sci.*, 1: 653-663.
- Kakuno, A., K. Fujii and J. Koyama, 2001. Histological studies on the gonadal development in Java medaka (*Oryzias javanicus*). *Bull. Fish.*

Res. Agen., 1: 35-37.

- Kang, C.K., S.C. Tsai, T.H. Lee and P.P. Hwang, 2008. Differential expression of branchial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to freshwater, brackish water and seawater. *Comp. Biochem. Physiol.*, 151: 566-575.
- Kang, I.J., H. Yokota, Y. Oshima, Y. Tsuruda, T. Oe, N. Imada, H. Tadokoro and T. Honjo, 2002. Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 2394-2400.
- Kim, D.S., I.C. Bang and I.B. Kim, 1990. Gonadal sex differentiation in *Misgurnus mizolepis*. *Korean J. Ichthyol.*, 2: 95-105.
- Kim, D.S., Y.K. Nam, J.K. Noh, C.H. Park and F.A. Chapman, 2004. Karyotype of North American shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* with the highest chromosome number in the Acipenseriformes. *Ichthyol. Res.*, 52: 94-97.
- Kim, D.S., Y.K. Nam and I.S. Park, 1995. Survival and Karyological analysis of reciprocal diploid and triploid hybrids between mud loach (*Misgurnus mizolepis*) and cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Aquaculture*, 135: 257-265.
- Kishida, M., M. McLellan, J.A. Miranda and G.V. Callard, 2001. Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 129: 261-268.

- Kurokawa, H., Y. Aoki, S. Nakamura, Y. Ebe, D. Kobayashi and M. Tanaka, 2006. Time-lapses analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*. *Develop. Growth Differ.*, 48: 209-221.
- Kwak, H.J., M.O. Bae, M.H. Lee, Y.S. Lee, B.J. Lee, K.S. Kang, C.L. Chae, H.J. Sung, J.S. Shin, J.H. Kim, W.C. Mar, Y.Y. Sheen and M.H. Cho, 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 787-795.
- Labadie, P. and H. Budzinski, 2006. Alteration of steroid hormone balance in juvenile turbot (*Psetta maxaxa*) exposed to nonylphenol, bisphenol A, tetrabromodiphenyl ether 47, diallylphthalate, oil, and oil spiked with alkylphenols. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 50: 552-561.
- Lahnsteiner, F., B. Berger, M. Kletzl and T. Weismann, 2005. Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquat. Toxicol.*, 75: 213-224.
- Lemoine, H.L. Jr and L.T. Smith, 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. *Trans. Fish. Soc.*, 109: 626-631.
- Lindholst, C., K.L. Pedersen and S.N. Pedersen, 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicol.*, 48: 87-94.
- Malison, J.A., T.B. Kayes, C.D. Best and C.H. Amundson, 1986. Sexual differentiation and use of hormones to control sex in Yellow Perch,

- Perca flavescens*. Can. J. fish. Aquat. Sci., 43: 26-35.
- Maria, A., A. Morescalchi, R. Lucia and S. Vincenzo, 2002. Cytogenetic and molecular studies in a lungfish, *Protopterus annectens* (Oseteichthyes, Dipnoi). Gene, 295: 279-287.
- Mellink, C., A. Bosma and N. Haan, 1994. Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA in situ hybridization signals in six breeds of domestic pig. Hereditas, 120: 141-149.
- McElamn, J.F. and E.K. Balon, 1979. Early ontogeny of walleye, *Stizostedion vitreum*, with steps of saltatory development. Env. Biol. Fish., 4: 309-348.
- Metcalf, C.D., T.L. Metcalfe, Y. Kiparissis, B.G. Koenig, C. Khan, R.J. Hughes, T.R. Croley, R.E. March and T. Rotter, 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environ. Toxicol. Chem. 20: 297-308.
- Milligan, S.R., O. Khan and M. Nash, 1998. Competitive binding of *xenobiotic oestrogens* to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. General and Comparative Endocrinology., 112: 89-95.
- Mito, S., 1963. Pelagic fish eggs from Japanese waters-IX. Echeneiformes and Pleuronectiformes. Jap. J. Ichthyol., 11: 81-102.
- Mook, D., 1977, Larvae and osteological development of sheep-head, *Archosgus probatocephalus*. Copeia, 1: 126-133.
- Myung, J.K. and Y.U. Kim, 1984. Morphology of larvae and juveniles of

- Leioganthus nuchalis*. Bull. Natl. Fish. Univ. Pusan, 24: 1-22.
- Naruse, K., A. Shima, M. Matsuda, M. Sakaizumi, T. Iwamatsu, B. Soeroto and H. Uwa, 1993. Description and phylogeny of rice fish and their relatives belonging to the suborder Adrianichthyoidei in Sulawesi, Indonesia. Fish. Biol. J. MEDAKA, 5: 11-15.
- Naruse K., 1996. Classification and phylogeny of fishes of the genus *Oryzias* and its relatives. Fish Biol. J. MEDAKA, 8: 1-9.
- Nelson, J.S. 2006. Fishes of the World. 4<sup>th</sup> edition. pp.276-277.
- Nimrod, A.C. and W.H. Benson, 1998. Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. Aquat. Toxicol. 44: 141-156.
- Ohno, S., U. Wolf and N.B. Atkin, 1968. Evolution from fish to mammals by gene duplication. Hereditas, 59: 169-187.
- Pandian, T.J. and S.G. Sheela, 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture. 138: 1-22.
- Parenti, L.R. and B. Soeroto, 2004. *Adrianichthys roseni* and *Oryzias nebulosus*, two new rice fishes (Atherinomorpha: Beloniformes: Adrianichthyidae) from Lake Poso, Sulawesi, Indonesia. Ichthyol. Res., 51: 10-19.
- Park, E.H. and D.S. Kim, 1984. A procedure for staining cartilage and bone of whole vertebrate larvae white rendering all other tissues transparent. Stain technology, 59: 269-272.
- Park, E.H. and Y.U. Kim, 1987. Studies on the larvae and juveniles of flying fishes, *Prognichthys agoo* (Temminck and Schlegel) (Pisces,

- Exocoetidae). II. Osteological development of larvae and juveniles. Bull. Korean Fish. Soc., 20: 447-456.
- Park, I.S., Y.K. Nam, S. Douglas, S. Johnson and D.S. Kim, 2003. Genetic characterization, morphometrics and gonad development of induced interspecific hybrids between yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus* (storer) and winter flounder, *P. americanus*. Aquacult. Res., 34: 389-396.
- Park, I.S., B.S. Kim, J.W. Hur, G.S. Iraida, D.S. Kim, J.H. Im and I.S. Park, 2004. Cytogenetic analysis of an artificial Red (♀) Black seabream (♂) Hybrid. Kor. J. Genet., 26: 283-288.
- Pastva, S.D., S.A. Villalobos, K. Kannan and J.P. Giesy, 2001. Morphological effects of bisphenol A on the early life stages of medaka (*Oryzias latipes*). Chemosphere, 45: 535-541.
- Phillips, R.B. and P.E. Ihssen, 1985. Chromosome banding in salmonid fishes; nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*. Can. J. Genet. Cytol., 27: 433-440.
- Pottohoff, T.S., S. Kelley and L.A. Collins, 1988. Osteological development of the red snapper, *Litjanus campechanus* (Lutjanidae). Bull. Mar. Sci., 43: 1-40.
- Pottohoff, T. 1980. Development and structure of fins and fin supports in dolphin fishes *Coryphaena hippurus* and *Coryphaena equiselis* (Coryphaenidae). Fish. Bull., 78: 277-312.
- Purdom, C.E., 1976. Genetic techniques in flatfish culture. J. Fish. Res. Can., 33: 1088-1093.

- Roberts, T.R., 1998. Systematic observations on tropical Asian medakas or ricefishes of the genus *Oryzias*, with descriptions of four new species. *Ichthyol. Res.*, 45: 213-224.
- Satoh, N. and N. Egami, 1972. Sex differentiation of germ cells in the teleost *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 28: 385-395.
- Seki, M., H. Yokota, H. Matsubara, Y. Tsuruda, M. Maeda, H. Tadokoro and K. Kobayashi, 2002. Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 1692-1698.
- Sezaki, K. and H. Kobayashi, 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 41: 851-854.
- Shinomiya, A., M. Kato, M. Yaezawa, M. Sakaizumi and S. Hamaguchi, 2006. Interspecific hybridization between *Oryzias latipes* and *Oryzias curvinotus* causes XY sex reversal. *J. Exp. Zool.*, 305: 890-896.
- Shinomiya, A., M. Tanaka, T. Kobayashi, Y. Nagahama and S. Hamaguchi, 2000. The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Development Growth differentiation*, 42: 317-326.
- Sohoni, P., C.R. Tyler, K. Hurd, J. Caunter, M. Hetheridge, T. Williams, C. Woods, M. Evans and J.P. Sumpter, 2001. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow

- (*Pimephales promelas*). Environ. Sci. Technol., 35: 2917-2925.
- Szarski, H., 1976. Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. Int. Rev. Cytol. 44: 93-112.
- Tabata, A., N. Watanabe, I. Yamamoto, Y. Ohnishi, M. Itoh, T. Kamei, Y. Magara and Y. Terao, 2004. The effect of bisphenol A and chlorinated derivatives of bisphenol A on the level of serum vitellogenin in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Water Sci. Technol., 50: 125-132.
- Tabata, A., N. Miyamoto, Y. Ohnishi, M. Itoh, T. Yamada, T. Kamei and Y. Magara, 2003. The effect of chlorination of estrogenic chemicals on the level of serum vitellogenin of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Water Science and Technology, 47: 51-57.
- Takashima, F., R. Patino and M. Nomura, 1980. Histological studies on the sex differentiation in Rainbow trout. Bull. Jap. Soc. Sic. Fish., 46: 1317-1322.
- Takehana, Y., S. Hamaguchi and M. Sakaizumi, 2008. Different origins of ZZ/ZW sex chromosomes in closely related medaka fishes, *Oryzias javanicus* and *O. hubbsi*. Chromosome research, 16: 801-811.
- Takehana Y., D. Demiyah, K. Naruse, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi, 2007a. Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*. Genetics, 175: 1335-1340.
- Takehana Y., K. Naruse, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi, 2007b. Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*.

Chromosoma, 116: 463-370.

- Takehana, Y., K. Naruse and M. Sakaizumi, 2005. Molecular phylogeny of the medaka fishes genus *Oryzias* (Belontiiformes: Adrianichthyidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.*, 36: 417-428.
- Takeuchi, K., 1960. A study of the mutant (wavy) in medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Japon.*, 33: 124-131.
- Takita, T. and S. Fujita, 1964. Egg development and prolarval stages of the turbot, *Pleuronichthys cornutus* (Temminck et Schlegel). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 30: 613-618.
- Tanaka, M., M. Kinoshita, D. Kobayashi and Y. Nagahama, 2001. Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in alive vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 98: 2544-2549.
- TemaNord, Nordic Council of Ministers, 1996. Chemicals with Estrogen-Like Effects. Copenhagen, pp. 35-51.
- Uwa H., T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and M. sakaizumi, 1986. Karyotype evolution and geographical distribution in the ricefish, genus *Oryzias* (Oryziidae) Indo-Pacific fish biology: proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishers. Ichthyological Society of Japan, Tokyo, pp. 867-876.
- Uwa H., T. Iwamatsu and O.P. Saxena, 1983. Karyotype and cellular DNA

- content of the Indian ricefish, *Oryzias melastigma*. Proc. Japan Acad., 59: 43-47.
- Uwa H. and A. Iwata, 1981. Karyotype and cellular DNA content of *Oryzias javanicus* (Oryziatidae, Piesces). Chromosome Inf. Serv., 31: 24-26.
- Van den Belt, K.R. Verheyen and H. Witters, 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. Ecotoxicol. Environ. Safety, 56: 271-281.
- Weisel, G.F., 1967. Early ossification in the skeleton of the sucker (*Catostomus macrocheilus*) and the guppy (*Poecilia reticulata*). J. Morphol., 121: 1-18.
- Wittbrodt, J., A. Shima and M. Schartl, 2002. Medaka-a model organism from the far east. Nat. rev. Genet., 3: 53-64.
- Yabumoto Y. and T. Uyeno, 1984. Osteology of the Rice Fish, *Oryzias latipes*. Bull. Kitakyushu Mus. Nat. Hist., 5: 143-161.
- Yamamoto, T., 1975. Stages in development. In: T. Yamamoto, Editor, Medaka (Killifish): Biology and Strains, Keigaku Publ. Co, Tokyo, pp. 30-58.
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: Fish Physiology (W. S. Hoar and D. J. Randall, editors), Vol. 3 Academic Press, New York, pp. 117-175.
- Yamamoto, T., 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka, *Oryzias latipes*, J. Exp. Zool., 123: 571-594.
- Yokota, H., Y. Tsuruda, M. Maeda, Y. Oshima, H. Tadokoro, A. Nakazono,

- T. Honjo and K. Kobayashi, 2000. Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environ. Toxicol. Chem., 19: 1925-1930.
- Zha, J. and Z. Wang, 2006. Acute and early life stage toxicity of industrial effluent on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Sci. Total Environ., 357: 112-119.
- 김경길, 1995. 유도된 넙치와 범가자미간 잡종 자어의 생존 및 성장에 관한 연구. 한국양식학회지, 8: 69-76.
- 남윤권, 1998. 잉어(*Cyprinus carpio*)와 붕어(*Carassius auratus*) 간 잡종의 세포 유전학적 분석. 한국양식학회지, 1: 77-81.
- 명정구 · 문진희 · 김진구 · 박경동 · 강충배 · 김용억 · 박준택, 2001. 쏘가리 (*Siniperca scherzeri*) 자치어의 골격 발달. 한국어류학회지, 13: 129-135.
- 박신석 · 최두신, 1998. 송사리와 대륙송사리의 산란, 난발생 및 자어의 성장 한국육수학회지, 31: 109-118.
- 박인석, 1992. 미꾸라지와 미꾸리의 잡종 및 잡종 3배체에 관한 연구. 부산수산대학교 박사학위 청구논문.
- 이승휘 · 복완근 · 박은호, 1991. 점박이송사리 *Rivulus ocellatus marmoratus* (진구아강: 점박이송사리과)의 부속지골격 발생에 관하여. 한국동물학회지, 34: 69-80.
- 정문기, 1977. 한국어도감. 일지사. 727 pp.
- 한경호 · 조재권 · 이성훈 · 황선영 · 윤성민 · 서원일 · 김춘철, 2005. 졸복 (*Takifugu pardalis*) 자치어의 골격발달. 한국어류학회지, 17: 29-35.
- 한경호 · 오성현 · 서원일, 2003. 복섬(*Takifugu niphobles*)자치어의 골격발달.

한국어류학회지, 15: 193-199.

한경호 · 김두용 · 노병율 · 오성현 · 김용민 · 진동수 · 김용억, 2000. 준치 *Ilisha elongata* (Bennett) 자치어의 형태 및 골격발달. 한국어류학회지, 12: 230-235.

