

## Diazinon이의 鷄胚 기형 유발에 미치는 영향

### I. 鷄胚형태와 콜린성 봉쇄약물과의 관계

허정호, 손성기, 이주홍, 김종수\*

경남가축위생시험소 남부지소, 경상대학교 수의과대학\*

## Teratogenic Effects of Diazinon in Chick Embryos I. Effects of Diazinon Treatment on Morphology and Cholinergic Blocking Agents

Jung-Ho Heo, Sung-Gi Son, Ju-Hong Lee, Jong-Su Kim\*

Southern Branch of Gyeongnam Veterinary Service Laboratory, College of Veterinary Medicine\*

#### Abstract

Teratogenic effects of diazinon were assessed morphologically and cholinergic blocking agents. Diazinon at doses ranging from 25 to 2000 ug /egg, was injected on day 3 of incubation. TD50s were different for the various teratogenic signs(wry neck, micromelia, abnormal feathering, abnormal beak and curled claws). The threshold dose for wry neck was higher than threshold dose for other signs ; 40 ug /egg produced substantial micromelia, abnormal feathering, abnormal beak and curled claws, but gave no signs of wry neck.

In contrast to the teratogenic doses, the LD50 of diazinon was very high(above 2000 ug /egg). One of the characteristics of diazinon-induced teratogenesis was reduced body weight(78.7%) and body length(73.8%).

Maximal teratogenic effects, scored as signs of retarded growth, wry neck micromelia, abnormal feathering, abnormal beak, and curled claws, were produced when the insecticide was administered on the third or fourth day.

The threshold dose for type II teratogenic signs(such as wry neck and short neck) was higher than for type I (such as micromelia and abnormal feathering). Morphological studies, using atropine and gallamine, suggested that nicotine but not muscarinic receptors may be involved in the mechanism of diazinon induced type II malformations.

---

Key words : Diazinon, teratogenic, cholinergic blocking agents

## 서 론

Diazinon은 Parathion, Malathion 등과 함께 농약 또는 설치류 구제목적으로 가장 많이 사용되어지고 있는 것 중의 하나이다.<sup>1)</sup> 이러한 유기인계 살충제들은 생체 내에서 acetylcholinesterase(AchE)를 불 가역적으로 억제함으로써 급·만성 중독을 나타내는 것으로 알려져 있는데<sup>2)</sup> 중독상으로는 muscarine양, nicotinic양 증상을<sup>3)</sup> 비롯하여 신경독성 유발<sup>4)</sup> 심부전증<sup>5)</sup> 등과 같은 중독증상이 사람과 가축에서 보고되어져 있으며, 심하면 호흡마비로 사망하게 된다.<sup>6)</sup> 또한 유기인 살충제들은 기형을 유발하는 것으로 알려져 있는데<sup>7, 8)</sup>, Hoffman과 Sileo<sup>4)</sup>는 phenyl phosphonothioic acid-o-ethyl-(4-nitro phenyl), ester (EPN)를 처리한 오리에서 기형 유발을 보고 하였고, Meiniel<sup>9, 10)</sup>은 parathion을 처리한 鷄胚에서, Vanagy<sup>11)</sup>은 parathion을 처리한 메추라기에서 기형 유발을 보고하였다. acetylcholine과 cholinergic system은 유기인 살충제로 인한 기형유발 기전에는 관련하지 않는다고 하며<sup>12)</sup>, dicrotophos, physostigmine, carbary 등에 의한 기형 유발은 nicotinamide-adenine dinucleotide(NAD) 대사장애에 기인한다고 한다.<sup>13)</sup>

鷄胚에 유기인 살충제를 처리하면 다른 유형의 기형보다 micromelia가 더 많이 발생한다고 하나 그 원인은 정확하게 밝혀져 있지 않다. 본 실험은 diazinon을 처리한 鷄胚에서 기형 유발에 cholinergic 기능이 관여하는지 여부를 재확인하고자 하였으며, 또한 유기인 살충제와 cholinergic blocking agents와의 상호관계를 규명하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

공시재료 : 본 실험에 사용한 계배는 경상남도 종축장에서 분양받은 아베에이커 육계 종란을 사용하였으며, egg는 습도와 환기가 조절되는 부란기에서 37~39℃를 유지하면서 배양하였다. 배양 3일째에 무균적으로 난황에 약물을 주사하고 파라핀(m.p. 56~57℃)로 밀봉하였다. Diazinon(Labor Dr. Ehrenstoffer, Aug-

sburg)은 corn oil(sigma)에 녹여서 사용하였고, 그 외 용액은 생리적 식염수에 녹여 사용하였다.

egg에 주입하는 용량은 50ul/egg로 조정하였다. 기형유발량(teratogenic dose ; TD50)을 측정하기 위하여 diazinon 25, 30, 40, 50, 70, 80 ug/egg를 배양 3일째 난황에 주사하여 배양 19일에 관찰하였고, 계산은 Litchfield와 wilcoxon<sup>14)</sup>의 방법에 따랐다. 치사량(Lethal doses ; LD50) 측정을 위해 diazinon을 900, 1200, 1500, 2000 ug/egg를 배양 3일째 난황에 주사하고 배양 19일에 측정하였다. 계배의 체중 및 크기 변화를 측정하기 위해서 배양 3일에 diazinon(200 ug/egg)을 난황에 주사하고, 배양 19일에 체중, 체측길이(척추에서 두개골 상층까지), 다리길이(대퇴경골 관절에서 발톱끝까지), 발톱길이(오른쪽 뒷다리 가장 긴 발톱), 날개길이(상완척골 관절에서 날개끝까지)을 측정하였다. 계배 단계별 발달과정에 diazinon이 미치는 영향을 관찰하기 위해서 diazinon(200 ug/egg), Neostigmine(1.2mg/egg)을 처리한 두군에 각각 Nicotinamide(1 mg/egg), Pralidoxime(PAM ; 2 mg/egg), Atropine(0.5 mg/egg), Gallamine(1 mg/egg)을 단독 혹은 혼합하여 배양 3일에 주사하고 배양 19일에 관찰하였다.

## 결 과

Diazinon의 기형유발량과 치사량(teratogenic and Lethal doses of diazinon) : Curled claws의 TD50은 40 ug/egg으로서 가장 낮게 나타났고, micromelia, abnormal feathering, abnormal beak의 TD50은 각각 50ug/egg, wry neck의 TD50은 70ug/egg으로 가장 높게 나타났다(표 1). 치사량(LD50)은 기형 유발량과는 대조적으로 상당히 높은량(1200ug/egg)로 나타났다(표2).

계배의 체중변화 및 크기 변화에 미치는 diazinon의 영향 : Diazinon(200 ug/egg)을 배양 3일에 난황에 주사하여 19일에 관찰한 결과 계배의 다리가 굽어지는 것이 특징중의 하나였고, body weight, body length의 감소 비율은 대조군에 비해 처리군의 body weight,

Table 1. Teratogenic doses of diazinon in chick embryos

	Teratogenic dose(ug /egg)						TD50 (ug /egg)
	25	30	40	50	70	80	
Wry neck	0/5	0/5	0/5	1/5	4/5	5/5	70
Micromelia	1/5	1/5	2/5	4/5	4/5	5/5	50
Abnormal feathering	1/5	1/5	2/5	4/5	4/5	5/5	50
Curled claws	2/5	2/5	3/5	5/5	4/5	5/5	40
Abnormal beak	0/5	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5	50

Injection at day 3 ; Observation at day 19

Table 2. Lethal doses of diazinon in chick embryos

Dose(ug /egg)	Lethal dose (ug /egg)			
	900	1200	1500	2000
Mortality	2/5	3/5	4/5	5/5

Injection at day 3 ; Observation at day 19

body length은 78.7%, 73.8%로서 가장 영향을 많이 받았고, wing length, curled claws, leg length는 각각 60.9%, 58.3%, 50.3%로 나타났다.

Diazinon이 계배 발달 과정에 미치는 영향 : Diazinon(200 ug /egg)을 배양 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11일에

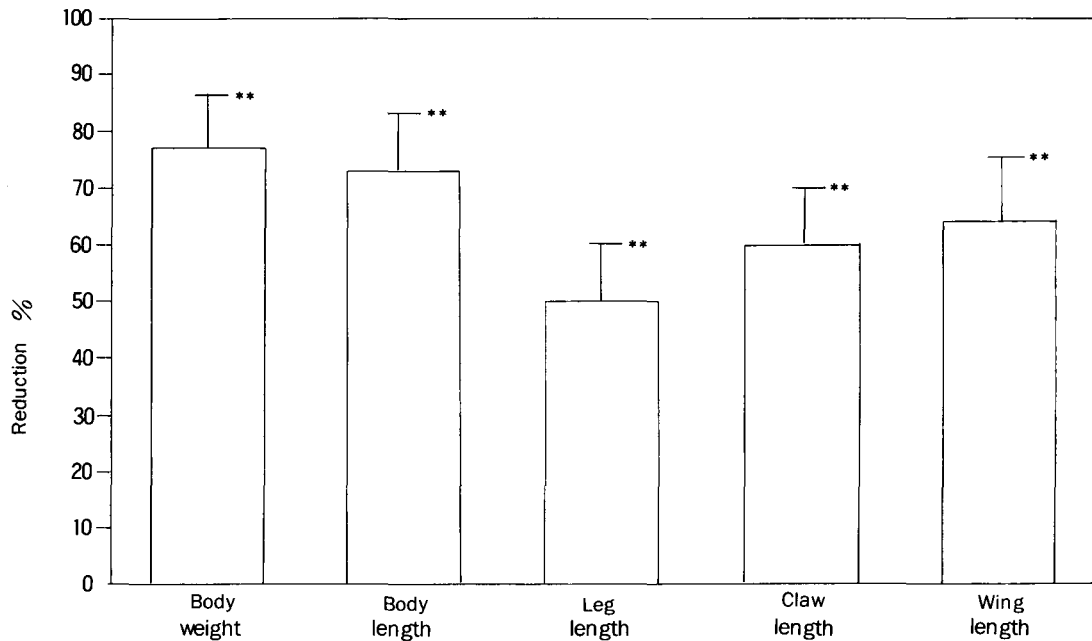


Fig 1. Reduction percentage of organ weight and sizes of diazinon-treated chick embryos. diazinon(200 ug) was injected at day 3 of incubation and observation was made at day 19 of incubation. Each column represents the mean with SE for five embryos.

\*\* . significantly different from control group at P=0.01.

난황에 주사하고, 배양 19일에 관찰한 결과 배양 3, 4일에 diazinon을 투여한 군에서 retarded growth, wry neck, micromelia, abnormal feathering, curled claws, abnormal beak 등의 기형이 가장 많이 나타났고, 배양 5일 후에는 기형출현율이 감소하는 경향을 나타내

었다. micromelia, abnormal beak은 배양 7일 후에는 나타나지 않았고, retarded growth, wry neck, abnormal feathering, curled claws은 배양 7~9일 이후에도 나타났으나, 배양 11일 이후 기형유발은 관찰할 수가 없었다.(표3)

Table 3. Critical period of diazinon<sup>a)</sup> teratogenicity in chick embryos<sup>b)</sup>

Injection	Number of experiments <sup>c)</sup>	Retarded growth	Wry neck	Micromelia	Abnormal feathering	Curled claws	Abnormal beak
Day 3	5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5
Day 4	5	3/5	2/5	3/5	3/5	3/5	3/5
Day 5	4	2/4	2/4	1/4	2/4	2/4	2/4
Day 7	5	2/5	2/5	0/5	1/5	2/5	0/5
Day 9	3	2/3	1/3	0/3	1/3	2/3	0/3
Day 11	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

- a Diazinon(200ug/egg) was injected into yolk sac
- b Observation at day 19
- c None of the embryos treated died

항 콜린성 약물이 diazinon 기형유발에 미치는 효과 : Diazinon 또는 neostigmine을 처리한군에 nicotineamide, PAM, atropine, gallamine을 단독 혹은 혼합하여 배양 3일에 난황에 주사하여 배양 19일에 이들 약물이 기형감소에 미치는 영향을 관찰한 결과 nicotineamide(1mg/egg) 처리군에서 diazinon 유발 micromelia은 완전히 발생하지 않았는 반면에 retarded growth, wry neck, abnormal feathering, curled claws 발생율은 낮게 나타났다. PAM(2 mg/egg) 처리군에서 diazinon 유발 기형 발생율은 wry neck을 제외하고는 높은 발생율을 보였다. nicotineamide와 PAM 혼합 처리군에서는 diazinon에 의한 기형 발생율이 전반적으로 낮았다. gallamine처리군에서 wry neck 발생율은 낮은 반면 atropine은 그렇지 못하였고, 다른 기형 발생을 차단시키지 못하였다. atropine과 gallamine 혼합 처리군에서도 단독처리시와 같은 경향을 나타내었다.(표4)

비교적 순수한 cholinesterase 억제제인 neostigmine(1.2mg/egg) 단독처리군에서는 wry neck, curled claws 발생율은 높고 retarded growth 발생율은 다소 낮은 반면 micromelia, abnormal feathering은 발

생하지 않았다. neostigmine과 nicotineamide 혼합처리군에서 micromelia와 abnormal feathering은 발생되지 않아서 diazinon 처리군에서와 비슷한 경향을 보였으며, 그외 retarded growth, wry neck, curled claws 기형유발은 다소 높았다. PAM처리군에서는 diazinon 처리군과 비슷하게 모든 기형이 다 발생하였으나, wry neck은 다소 낮은 경향을 보였다.

diazinon, PAM, nicotineamide 혼합처리군에 비하여 neostigmine, PAM, nicotineamide 혼합처리군에서 micromelia, abnormal feathering은 전혀 발생되지 않았고, 그외 기형발생율도 낮은 경향을 보였다. gallamine은 neostigmine 처리로 인한 curled claws 기형유발을 막지 못하였으나, 그외 기형유발의 발생을 억제하였는 반면 atropine 처리군에서는 abnormal feathering발생만 억제하였고, 다른 기형유발은 억제하지 못하였다. atropine과 gallamine 혼합 처리군에서도 abnormal feathering을 제외한 다른 기형은 발생하였으나 그 발생정도는 미약하였다.(표 4)

## 고 찰

일반적으로 쥐에서 diazinon의 독성은 dicrotophos,

Table 4. Alleviating effects of some agents on diazinon teratogenicity in chick embryos<sup>a)</sup>

Combination	Number of experiment <sup>b)</sup>	Retarded growth	Wry neck	Micromelia	Abnormal feathering	Curled claws
Diazinon ---	4	4/4	3/4	3/4	3/4	3/4
Nicotinamide	5	1/5	2/5	0/5	1/5	1/5
P A M	5	3/5	0/5	3/5	5/5	3/5
Nicotinamide + PAM	3	2/3	1/3	2/3	1/3	1/3
Atropine	4	4/4	4/4	3/4	3/4	4/4
Gallamine	3	3/3	0/3	2/3	3/3	3/3
Atropine + Gallamine	3	2/3	1/3	3/3	3/3	3/3
Neostigmine --	5	2/5	5/5	0/5	0/5	4/5
Nicotinamide	5	3/5	3/5	0/5	0/5	3/5
P A M	3	3/3	1/3	2/3	2/3	2/3
Nicotinamide +PAM	3	2/3	1/3	0/3	0/3	2/3
Atropine	3	1/3	2/3	2/3	0/3	2/3
Gallamine	3	1/3	0/3	0/3	0/3	2/3
Atropine + Gallamine	4	1/4	2/4	1/4	0/4	2/4

a Postive : ++ --- ++. Doses of the agents are as follows : diazinon(200 ug), neostigmine(1.2mg), nicotinamide(1mg), PAM(pralidoxime, 2mg), atropine(0.5mg), and gallamine(1mg). Injection at day 3, and observation at day 19.

b None of the embryos treated died.

EPN, methyl parathion, monocrotophos, parathion과 TEPP보다 약하다고 알려져 있다. 수컷에서 경구 치사량은 250mg/kg, 피하 치사량은 900mg/kg이며 암컷에서 경구 치사량은 285mg/kg, 피하치사량은 455mg/kg이라고 보고 되어져 있다.<sup>15)</sup> 본 실험에서 계배에 대한 diazinon의 LD50은 1200ug/egg로 나타났는데, Gaines가 쥐에서 285mg/kg을 보고한 것과 상당한 차이를 나타내었는데, 이는 동물의 품종차이에서 오는 결과로 생각되며, Misawa<sup>12)</sup>등이 계배에서 보고한 성적(1854 ug/egg)과는 다소 차이는 나지만은 그 차이는 극히 경미함으로 diazinon의 독성이 계배에서는 상당히 높다는 것을 알 수 있다. 반면 계배에서 diazinon의 배자기형발생은 dicrotophos와 monocrotophos와 비슷한 경향을 보이지만 EPN, methyl parathion, TEPP보다는 높게 나타나는 경향을 보였다.<sup>16, 17)</sup>

본 실험에서 teratogenic doses(TD50)은 40~70ug/egg으로 나타났는데, 이는 Misawa<sup>12)</sup>등의 보고

보다 역치량이 다소 높을뿐 거의 같은 경향을 나타내었다. diazinon의 LD50을 비교해 보면 상당한 차이를 나타내는데 이는 diazinon의 기형유발 효과가 diazinon 그 자체의 독성에 기인하는 것이 아니라 기형유발 작용의 어떤 특이한 기전에 의하는 것 같다고 추측된다.

계배에서 유기인 살충제로 인한 기형유발 형태는 micromelia, abnormal feathering, abnormal beak와 같은 제 1type과 wry neck, short neck, arthrogryposis등 제2type으로 나눈다.<sup>17)</sup> 유기인 살충제 기형유발 효과는 유기인살충제 종류에 따라 다른데 본 실험에서 curled claws, micromelia, abnormal feathering, abnormal beak의 TD50은 각각 40, 50, 50, 50, 70 ug/egg로 나타났다. wry neck의 역치량과 TD50은 micromelia, abnormal feathering, curled claws보다 상당히 높게 나타났으며, 이는 Misawa의 보고와 일치하는 경향을 나타내었다.

계배에서 diazinon을 처리한 결과 type I 기형과

type II 기형간의 기형유발 역치량은 상당한 차이를 나타내었는데, 이는 type I 기형유발기전과 type II 기형유발기전이 같지 않다는 것을 추측할 수 있다.

curled claws는 가장 흔히 볼 수 있는 기형 형태이지만 분류상 type I 기형이라고 볼 수가 없다. 왜냐하면 neostigmine 처리군에서도 curled claws 발생율이 높고 diazinon 처리군에서도 curled claws 발생은 nicotineamide 투여로 말미암아 그 발생율이 부분적으로 억제되었기 때문이다.

본 실험에서 diazinon 200ug/egg을 난황에 주사한 결과 처리군은 대조군에 비하여 body weight과 요 두가 78.7, 73.8%로서 가장 영향을 많이 받았고, 다리 길이가 가장 영향을 적게 받은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Proctor<sup>16)</sup> 등이 계배에서 보고한 성적과 Hoffman과 sileo가 오리 egg에 EPN을 투여한 결과의 성적과 일치하였으나 Misawa<sup>12)</sup> 등 Rugaaju과 Kitos<sup>7)</sup>가 보고한 성적과는 상이한 결과를 나타내었는데, 이는 본 실험에서는 19일에 관찰한 반면 다른 보고자들은 17일에 관찰하였으므로 관찰시기가 다르기 때문인 것 같다.

본 실험에서 diazinon 200 ug/egg을 배양 3, 4, 5, 7, 9, 11일에 난황내 주사하여 배양 19일에 관찰한 결과 type I, type II 기형유발이 가장 많이 발생하는 시기는 배양 3~4일이었다. micromelia와 abnormal beak는 배양 5일 이후에는 나타나지 않았다. Misawa<sup>12)</sup>등은 배양 7일에 주사한 경우 wry neck이 발생하지 않는다고 보고하였으나, 본 실험에서는 7일에 wry neck이 발생하였고 9일 이후에 발생하지 않았다.

Landauer<sup>18)</sup>은 carbachol 1.5mg을 배양 5일에 계배에 투여한 결과 척추기형이 적게 나타났다고 하였고, Roger<sup>19)</sup>등은 dicotophos 0.1mg을 배양 4일에 계배에 투여하면 micromelia, abnormal feathering, abnormal beak 등의 기형이 많이 나타나고 배양 3일에 투여하면 다리가 한개인 mesenchymal cell 형태로 나타난다고 한다. 또한 chevallier 등에 의하면 배양 4일째부터 이런 세포들은 근육, 연골, 뼈, 결체적으로 분화하기 시작한다고 함으로서 본 실험에서 배양 3, 4, 5, 9, 11일에 diazinon을 투여한 것은 이런 모든 세포들의 기관형성

(organogenesis) 기간을 망라한 것으로 생각된다.

Meiniel은 parathion과 dicotophos를 메추라기에, Moscion<sup>17)</sup>등은 parathion을 계배에, Ullivan<sup>21)</sup>은 physostigmine을 계배에 투여하여 발생된 척추기형과 Wry neck을 PAM(2-pyridinealdoxim)을 투여함으로써 두가지 기형이 발생하지 않았다고 보고하였는데, 본 실험에서도 diazinon을 투여하고 PAM을 투여한 군에서는 type II 기형(wry neck)이 발생하지 않았고, gallamine 투여로 인하여 diazinon 투여군과 neostigmine 투여군에서 각각 type II 기형(wry neck)은 역시 발생하지 않았지만, atropine은 이 기형을 차단시키지 못하였다. 이러한 결과로 보아 기형유발 효과는 무스카린성 수용체는 관여하지 않고 콜린성 니코틴 수용체가 관계되는 것으로 추측할 수 있겠다. 그러나 Landauer은 골격근 이완성 마비를 일으키는 gallamine과 d-tubocurarine은 기형을 유발시키지 않는 반면 수축성 마비를 일으키는 Isuccinylcholine과 decamethonium은 type II 기형을 유발한다고 보고하고 있으므로, 니코틴성 수용체의 흥분 이외에 다른 기전이 type II 기형유발에 관련하는 지 여부는 더 연구하여야 할 과제이다.

## 결 론

이상의 실험성적을 요약하면 계배에 diazinon 25~80ug/egg을 투여한 결과 기형유발량(TD50)은 40~70ug/egg로 나타났고, 치사량(LD50)은 900~2000ug/egg을 투여한 결과 1200ug/egg로 나타났다.

Diazinon을 200ug/egg을 투여시 body weight(78.7%)와 body length(73.8%)가 영향을 가장 많이 받았고, 기관형성에 영향을 많이 미치는 배양시간은 3일째였으며, type II 기형유발 역치량은 type I 기형유발보다 높았고, atropine, gallamine 효과로 보아 type II 기형유발 기전은 무스카린성 수용체가 관련하는 것이 아니라 니코틴성 수용체가 관여한다는 것을 추측할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Amdur MO, Doull J, and Klaassen CD. Casarett

- and Doull's Toxicology. 4th ed, Pergamon Press, New York. 191 : 883–885.
2. Mount ME. 1984. Comparison of measurement of dialkyl phosphates in milk /urine and blood cholinesterase and insecticide concentrations in goats exposed to the organophosphate insecticide, imian, *Toxicol Appl Pharmacol*, 72 : 236.
  3. Namba T, Nolte CT, Jackrel J et al. 1971. Poisoning due to organophosphate insecticides : Acute and chronic manifestations. *Am J Med*. 50 : 475.
  4. Hoffman DJ and Sileo L. 1984. Neurotoxic and teratogenic effects of an organophosphorus insecticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 73 : 284.
  5. Francis BM, Matcalf RL, and Fisher SW. 1983. Response of laboratory rodents to selected avian delayed neurotoxicants. *Arch Environ Contam Toxicol*, 12 : 731.
  6. Osweiler GD, Carson TL, Buck WB, et al. 1985. Clinical and diagnostic veterinary toxicology. 3th, ed, Kendall /Hunt Pub Iowa. 298–317.
  7. Ruggaju SK, and Kitos PA. 1985. Effects of diazinon on nucleotide and amino acid contents of chick embryos. I. Teratogenic considerations. *Biochemical Pharmacology*. 34 : 1937.
  8. Hoffman DJ and Albers PH. 1984. Evaluation of potential embryotoxicity and teratogenicity of 42 herbicides, insecticides and petroleum contaminants to mallard eggs. *Arch Environ Contam Toxicol*. 13 : 15.
  9. Meiniel R. 1977. Embryologic experimental activities cholinesterasiques et expression de la teratogenese axiale chez l'embryon de caille expose aux organophosphores. *CR Acad Sci Paris*, 285 : 401.
  10. Meiniel R. 1978. Agents anticholinesterasiques et teratogenese axiale chez l'embryon de caille. *Wilhelm Roux's Arch*. 185 : 209.
  11. Varnagy L. 1981. Teratogenicity testing of parathion 20WP, methyl parathion 18WP and wofatox 50EC in Japanese quail embryos by egg immersion technique. *Acta Vet Acad Sci Hung*. 29 : 85.
  12. Misawa M, Doull J, Kitos P, et al. 1981. Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 57 : 20.
  13. Kitos PA, Anderson DS, Edwin M et al. 1981. Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. *Biochemical Pharmacology*. 30 : 2225.
  14. Litchfield JT, and Wilcoxon F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther*. 96 : 99.
  15. Gains TB. 1969. Acute toxicity of pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol*. 14 : 515.
  16. Proctor NG, Moscioni AD, and Casida JE. 1976. Chicken embryo NAD levels lowered by teratogenic organophosphorus and methylcarbamate insecticides. *Biochem Pharmacol*. 25 : 757.
  17. Moscioni AD, Engee JL, and Casida JE. 1977. Kynurenine formamidase inhibition as a possible mechanism for certain teratogenic effects of organophosphorus and methylcarbamate insecticides in chick embryos. *Biochem Pharmacol*. 26 : 2251.
  18. Roger JC, Chambers H, and Casida JE. 1969. Nicotinic acid analogs : Effects on response of chick embryos and hens to organophosphate toxicants. *Science*, 144 : 539.
  19. Roger JC, Chambers H, and Casida JE. 1969. Nicotinic acid analogs : Effects on response of chick embryos and hens to organophosphate toxicants. *Science*, 144 : 539.
  20. Chevallier A, Kiney M, and Mauger A. 1977.

Limb-somite relationship : origin of the limb musculature. *J Embryol Exp Morph.* 41 : 245.

21. Ullivan GE, 1973 .Paralysis and skeletal anomalies in chick embryos treated with physostigmine. *J Anat* 116 : 463.