

## 반수체 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 발생학적 특성 분석

정효선 · 김연경 · 김현철<sup>2</sup> · 노재구<sup>2</sup> · 이정호<sup>2</sup> · 김동수<sup>1\*</sup>

부경대학교 해양수산 LMO 위해성평가센터, <sup>1</sup>부경대학교 해양바이오신소재학과, <sup>2</sup>국립수산과학원 육종연구센터

### Embryonic Development of Haploid Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Hyo Sun Jung, Youn Kyoung Kim, Hyun Chul Kim<sup>2</sup>, Jae-Koo Noh<sup>2</sup>,  
Jeong-Ho Lee<sup>2</sup> and Dong Soo Kim<sup>1\*</sup>

Center for Risk Assessment of Oceans and Fisheries Living Modified Organisms, Pukyong National University,  
Busan 48513, Korea

<sup>1</sup>Department of Marine Bio-Materials & Aquaculture, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

<sup>2</sup>Genetics and Breeding Research Center, National Fisheries Research and Development Institute, Geoje 53334, Korea

We investigated the characteristics of embryonic and abnormal organ development in haploid olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by comparing egg development and histological sections in haploid and diploid individuals. After the mid-blastula transition, abnormal development was observed in haploid fish, including delayed epiboly and malformation of the germ ring and embryonic body. In haploid flounder, Kupffer's vesicles are irregularly shaped and of variable size compared to diploids. The embryonic body of haploids was shorter and broader than that of diploids and the tail length and size were variable. Most haploid embryos failed to hatch and the few larvae that did, did not survive for more than 6 h. The histological analysis of haploid larvae revealed deformed development in diverse organs, including the eye, otic vesicles, notochord, and neural tube. These results may be related to an abnormality in the axial system of haploid larvae. This study confirmed that the abnormalities of haploid olive flounder were similar to the reported characteristics of haploid syndrome. The abnormalities are caused by delayed epiboly and involution and deformity of Kupffer's vesicle during egg development.

Key words: Haploid, Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

## 서론

반수체(haploid)는 세포당 하나의 유전체 또는 염색체조가 존재하는 것으로, 자성발생성이배체(gynogenesis diploid) 또는 용성발생성이배체(androgenesis diploid) 유도 기술에 의해서 생산되어 왔다. 이들은 자외선에 의해서 유전물질이 불활성화 된 정자 또는 난자를 이용하여 유도됨으로써, 오로지 난자 또는 정자의 유전물질만으로 발생하게 된다(Tanaka et al., 2004; Yi et al., 2009).

경골어류의 반수체에 대한 연구는 금붕어(goldfish, *Carassius auratus*), 송사리(medaka, *Oryzias latipes*) 및 제브라피쉬(zebrafish, *Danio rerio*)에서 보고된 바 있다(Walker, 1999;

Araki, 2001; Luo and Li, 2003). 이들의 연구 결과 경골어류의 반수체는 일반적으로 해로운 열성치사 유전자 존재 또는 유전자 산물의 부족 때문에 부종(edema), 왜소증(dwarfism), 소두증(microcephaly) 및 소안구(microphthalmia) 등과 같은 이형적인 특징이 관찰되었고, 부화 전후 또는 난황 흡수 후 모두 사망하는 것으로 보고되어 왔으며(Felip et al., 1999; Luo and Li, 2003), 이러한 반수체의 특이적인 이상발생 현상은 반수체 증후군(haploid syndrome)으로 명명되어 왔다(Tvedt et al., 2006). 그러나 반수체는 한 개의 염색체조만을 가짐으로써 우성 유전자형 또는 열성 유전자형에 대한 표현형을 모두 관찰할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 분석 및 검색의 방법론으로 이용되고 있다(Yi et al., 2009). 이에 제브라피쉬는 반수체 배아의

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0696>



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

Korean J Fish Aquat Sci 48(5) 696-703, October 2015

Received 6 June 2015; Revised 30 August 2015; Accepted 16 September 2015

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5914 Fax: +82. 51. 629. 5908

E-mail address: dongskim@pknu.ac.kr

돌연변이 유발 유전자들에 대한 검색을 통해 심장(heart), 척색(notochord) 및 근육(muscle)의 발달에 필요한 유전자를 확인한 바 있으며(Wiellette et al., 2004), 반수체 배아에서 돌연변이 눈의 발생을 통해 눈이 정상적으로 발생되는데 필요한 유전자 발현조건을 금붕어에서 보고한 바 있다(Luo and Li, 2003).

넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)는 한국, 일본 및 중국을 포함하는 아시아에서 양식되는 중요한 어류로써(Zheng and Sun, 2011) 이들의 생산성 및 경제성을 높이기 위해서 성장, 면역체계 및 형태 등에 대한 유전자 연구가 이루어져 왔으나(Yang et al., 2013), 이는 이배체를 이용하여 이루어졌기 때문에 반수체를 이용한 더 정확하고 복합적인 유전자 검색 연구가 필요시 된다. 이를 위해 본 연구에서는 넙치의 반수체를 유도하여 그의 발생 과정 및 기형적인 발생 특징에 대하여 이배체와 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

본 연구에 사용된 넙치는 국립수산물과학원 육종연구센터에서 선발육종기법을 통하여 생산된 킹넙치(KingNupchi)가 사용되었으며, 복부 압박법으로 암컷 7미와 수컷 3미로부터 확보된 난과 정자를 실험에 사용하였다.

### 반수체 유도

반수체(haploid)는 자외선 조사에 의해 유전적으로 불활성화된 정자와 정상 난자를 수정함으로써 유도되었다. Kim et al. (1993)과 Yamamoto (1999)에서 보고된 자외선 조사량을 바탕으로, 넙치 정자의 완벽한 유전적 불활성화를 위해 5,400 ergs/mm<sup>2</sup>의 자외선을 조사한 후 습식법으로 인공수정시킨 뒤, 수정란은 18±1℃의 부화수조에서 발생을 유도하였다.

### DNA 함량분석

유도된 반수체의 DNA 함량 분석을 위하여 flow cytometry를 수행하였다. 반수체 증후군(haploid syndrome)의 형태를 가지고 있는 자어 10미를 모아 균질기로 세포를 파쇄한 후, Jung et al. (2014)의 방법론에 따라 핵막 제거 및 염색 과정을 수행하였다. 염색된 시료들은 PA II flow cytometry (Partec Co., Münster, Germany)를 이용 분석하였으며, 성체 넙치 꼬리지느러미 및 이배체 자어를 대조군으로 사용하였다.

### 난발생 관찰

넙치 반수체 및 이배체 배아는 18±1℃의 수온에서 부화시키며, 해부현미경(AZ100; Nikon Co., Japan)과 이에 부착된 디지털 카메라(DS-Ril; Nikon Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰과 촬영을 하였다. 각 발생 단계는 Kimmel et al. (1995)의 배발생 단계를 기준으로 정하였고, 수정된 개체의 90% 이상이 동일 단계에 도달하였을 시기를 기준으로 각 발생단계별 소요 시

간과 특징을 기록하였다. 또한 발생단계별 정확한 시간을 측정하기 위해 16±1℃와 20±1℃의 온도조건에서 발생시간을 비교하여 분석하였다.

### 조직학적 분석

반수체의 특이적인 기관 발생을 관찰하기 위해 부화 자어의 조직을 분석하였다. 형태학적으로 반수체 증후군의 형태를 가지고 있는 자어를 4% formaldehyde에 고정된 뒤, 통상의 조직학적 분석방법에 따라 탈수 및 파라핀을 이용한 포매 과정을 수행하였다. 준비된 표본은 6 µm 두께로 연속 절편하여 hematoxylin과 eosin으로 염색을 한 후, 광학현미경(Eclipse E400; Nikon Co., Japan) 하에서 검경하였고, 이배체와 비교하여 특이적인 조직상은 광학현미경에 부착된 디지털 카메라(MotivcampPro 205A; Motic Co., China)로 촬영하였다.

## 결과 및 고찰

하나의 염색체조만을 가지는 반수체는 효율적인 유전자 분석 및 검색의 방법론으로 이용되고 있다. 그러나 이들 분석방법에 반수체를 이용하기 위해서는 먼저 유도된 반수체의 발생학적 특징에 대한 연구가 선행되어야 한다. 이에 본 연구는 넙치 반수체를 유도하였고, 생물의 고유한 DNA 함량으로 배수성을 판단할 수 있는 flow cytometry 분석법을 이용하여 유도된 반수체 넙치의 DNA 함량을 측정하였다. 이에 이미 보고되어 있는 넙치의 DNA 함량(0.71 pg/cell; Animal genome size database, 2014)을 대조군으로 하여 측정한 결과, 이배체 부화 자어의 DNA 함량은 0.71±0.02 pg/cell으로 확인되었고, 반수체는 0.34±0.01 pg/cell으로 확인되었다(Fig. 1). 이는 이배체 넙치의 DNA 함량의 50%에 해당하는 것으로써 성공적으로 반수체가 유도된 것으로 확인할 수 있었다.

유도된 반수체 넙치의 배발생 시기 및 특징을 관찰한 결과, 2세포기에서 128 세포기에 해당하는 난할 및 초기 포배기 동안은 반수체와 이배체의 발생 시기 및 형태가 동일한 것으로 관찰되었다(Table 1). Walker (1999)는 제브라피쉬 반수체 배아에서도 초기 포배기까지 이배체와 발생시간이 동일함을 보고한 바 있다.

128 세포기 이후부터 반수체의 발생시간이 대조군에 비해 점차 느려져 30% 피포 형성이 이배체는 수정 후 12시간이 소요됨에 비하여 반수체의 경우 13시간이 소요되었다(Table 1). 이후 이배체에서는 수정 13시간 후 최초로 배환(germ ring)이 관찰되었고, 반수체 배아에서는 수정 14시간 후에 관찰되었다. 이때 반수체 배환은 이배체에 비하여 진하고 두껍게 형성되는 것으로 확인되었다(Figs. 2-4). 더욱이 피포 형성 비율이 높아질수록 이배체의 배환은 열리는 반면 반수체는 배환이 점차 진하고 두껍게 형성되는 것이 관찰되었으며 피포 형성 속도 또한 대조군에 비하여 점차 더 지연되어 90% 피포 형성은 반수체가 2시간 정도 늦게 관찰되었다(Table 1, Figs. 2-4). 배체(embryonic

body)의 형성은 이배체 배아의 경우 80% 피포 형성 단계에서 형태가 나타나기 시작하여 90% 피포 형성단계에서 뚜렷한 배체가 형성되었으나, 반수체 배아는 이들보다 늦어져 90% 피포 형성 단계에 도달해야 비로소 불명확한 형태의 짧은 배체가 넓게 형성됨이 관찰되었다(Fig. 4).

낭배기에 배환은 배반엽(blastoderm)이 난황을 감싸면서 일어나는 회절(involution), 수렴(convergence) 및 확장(extension)의 형태발생 세포 운동(morphogenetic cell movements) 중 가장 먼저 관찰되는 회절(involution)이 일어남으로써 형성된다(Kimmel et al., 1995). 본 연구 결과 반수체 배아의 배환이 대조군에 비하여 매우 진하고 두껍게 형성되며 피포 형성 시간 또한 늦어지는 것이 관찰되었다. Araki et al. (2001)는 송사리 반수체 배아가 이배체 배아보다 피포와 회절이 늦게 관찰되는 것은 반수체가 한쌍의 염색체조만을 가짐으로써 비특이적인 세포사멸이 일어나고, 정상적인 피포와 회절 발생에 영향을 주게 됨으로써 이배체에 비해 늦은 속도로 발생한다고 보고한 바 있다. 이에 넓치 반수체 배아도 비특이적으로 사멸된 세포들이 존재하게 되면서 이배체에 비해 두껍고 진한 배환이 형성됨으

로 피포 및 회절 발생이 지연되는 것으로 판단된다. 또한 배체의 발생은 배반엽 세포의 수렴과 확장 과정에 의해 형성되고 이 과정들이 진행될수록 배체는 점차 좁아지고 신장되면서 더 명확해지게 된다(Kimmel et al., 1995). 그러나 본 연구의 반수체 배아는 대조군에 비하여 배체의 형태가 넓고, 짧으며, 분명하지 않은 상태로 발생하는 것으로 관찰되었다. 송사리 반수체 배아에서도 초기 배체 형태가 짧고, 넓게 형성되었고 이것의 원인을 회절 지연현상으로 보고한 바 있어(Araki et al., 2001), 넓치 반수체 배아에서 이형적인 초기 배체 형태는 비정상적인 형태발생 세포 운동(회절, 수렴 및 신장) 과정에 의한 것으로 판단된다.

Kupffer's vesicle은 반수체 배아에서 이배체 보다 한시간 늦은 수정 후 27-28시간에 관찰되었고, 사라지는 시기는 거의 동일하여 이배체 배아에 비해 적은 시간 동안 존재하는 것으로 확인되었다(Table 1). 반수체 배아에서 Kupffer's vesicles은 이배체 배아와 동일한 위치인 꼬리싹(tail bud)에서 형성이 되지만, 그 형태와 크기가 개체에 따라 불규칙적으로 발달하는 것으로 관찰되었다(Fig. 5). 이에 꼬리 중배엽을 형성하는데 영향을 주는 Kupffer's vesicles이 이형적으로 형성됨으로써 배체의 꼬리

Table 1. Stage of embryonic development in diploid and haploid *Paralichthys olivaceus*

Stage name	Diploid		Haploid	
	Hours after fertilization at 18±1°C	Corresponding figure	Hours after fertilization at 18±1°C	Corresponding figure
<b>Cleavage period</b>				
2 cells	1.5 h	-	1.5 h	-
4 cells	2.0 h	-	2.0 h	-
8 cells	2.6 h	-	2.6 h	-
16 cells	3.3 h	-	3.3 h	-
32 cells	4.3 h	-	4.3 h	-
64 cells	5.3 h	-	5.3 h	-
<b>Blastula period</b>				
128 cells	6.3 h	-	6.3 h	-
30% epiboly	12.0 h	-	13.0 h	-
<b>Gastrula period</b>				
Germ ring	13.0 h	-	14.0 h	-
Embryonic shield	14.0 h	Fig. 2a, 2c	15.0 h	Fig. 2b, 2d
40-45% epiboly	16.0 h	Fig. 3a, 3c	17.0 h	Fig. 3b, 3d
80% epiboly	20.0 h	Fig. 4a	21.0 h	Fig. 4b
90% epiboly	22.0 h	Fig. 4c, 4e	24.0 h	Fig. 4d, 4e
<b>Segmentation period</b>				
Kupffer's vesicle appearance	26.0-27.0 h	Fig. 5a	27.0-28.0 h	Fig. 5b
Kupffer's vesicle disappearance	34.0-36.0 h	Fig. 5c	34.0-36.0 h	Fig. 5d
<b>Hatching period</b>				
Hatching	55.0 h	Fig. 7a	55.0 h	Fig. 7b

는 대조군과 비교하여 이형적으로 발생하는 것으로 관찰되었다(Fig. 7). Kupffer's vesicle은 경골어류의 배아에서만 일시적으로 관찰되는 구체 기관으로, 섬모세포를 이용하여 좌우비대칭을 조정하는 역할을 한다(Essner et al., 2005). 이에 Okabe et al. (2008)은 제브라피쉬 발생과정 중 Kupffer's vesicle 내에서 일어나는 유체역학적인 현상을 주사전자현미경, video microscopy 및 조직학적으로 밝혀 경골어류의 발생과정 중 그의 중요성을 입증한 바 있다. 본 연구에서 넘치의 반수체 배아의 Kupffer's vesicle은 모양과 크기가 다양하였으며, 배체의 형태도 대조군과 뚜렷하게 구별되었다. 이는 좌-우 축형성에 영향을 미치는 Kupffer's vesicle이 반수체 배아에서 이형적으로 발생함으로써, 이들의 후기 배발생 과정에서 다양한 기관들의 정상적인 발달에 부정적인 영향을 준 것으로 판단된다.

Kupffer's vesicle이 소실된 후 배체가 부화하기까지 두 실험 구간 발생 시간의 차이가 관찰되지 않아 최초의 부화는 반수체와 이배체 모두 수정 후 55시간으로 동일하였으나, 이배체 및

반수체 부화율이 각각  $80.0 \pm 9.4\%$  및  $6.9 \pm 3.0\%$ 로 반수체는 일부 개체만이 부화하는 것으로 관찰되었다. 반수체 부화 자어의 형태는 개체에 따른 차이가 존재하나 대부분 꼬리가 제대로 발달하지 못하였고, 몸체의 길이와 넓이가 이배체에 비하여 짧고, 넓은 것으로 관찰되었다(Figs. 6, 7). 반수체 처리군 1,000 알 중 꼬리 및 몸체가 기형적으로 발생한 개체는 962개로 그 중 꼬리가 발달되지 못한 형태를 띠는 개체(Fig. 7b)는 903개, 꼬리가 생성은 되었으나 제대로 발달되지 못한 개체(Fig. 7c)는 59개로 확인되었다. 이들 중 꼬리가 전혀 발달되지 않은 개체들은 부화를 하지 못하고 죽는 것으로 관찰되었으며, 꼬리가 이형적으로 발생된 개체는 부화하였을지라도 6시간 이내에 모두 죽는 것으로 관찰되었다. 금붕어, 송사리, 제브라피쉬, 터봇 (*turbot*, *Scophthalmus maximus*) 그리고 Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)에서도 반수체 배아의 낮은 부화율과 부화 자어의 짧은 몸체, 꼬리의 미발달 및 높은 치사율이 보고된 바 있으며(Luo and Li, 2003; Araki et al., 2001; Walker, 1999; Piferret et al., 2004; Tvedt et al., 2006), 이러한 현상을 Felip et al. (1999)는 반수체의 유전체 부족에 따른 부화효소(hatching enzyme)와 같은 발생과정 및 부화에 반드시 필요한 단백질 합성량의 부족 때문으로 추론 한 바 있다.

반수체의 다양한 배발생 단계에서 이상발생 및 발생의 지연

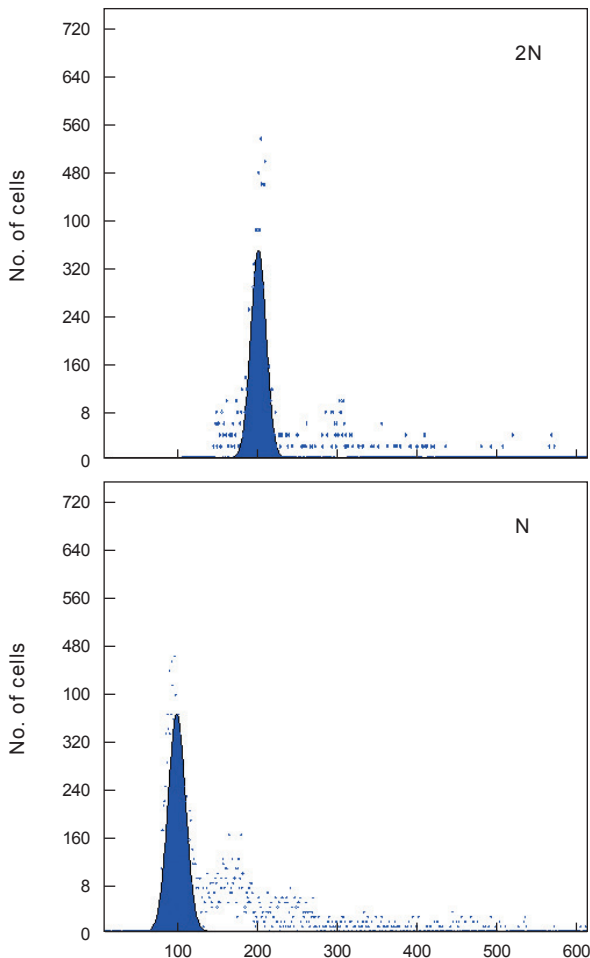


Fig. 1. Flow cytometric histograms for DNA content in diploid (2N) and haploid (N) *Paralichthys olivaceus*.

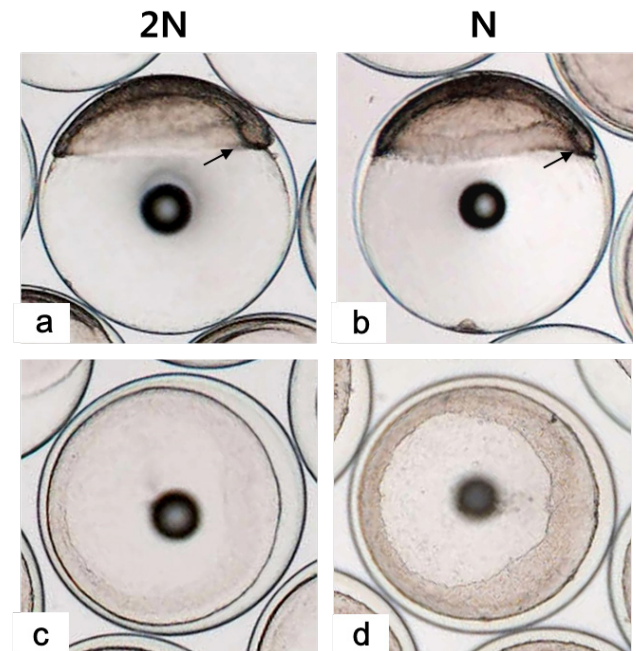


Fig. 2. External morphology of embryonic shield stage in diploid (a,c) and haploid (b,d) *Paralichthys olivaceus*. a, c: face view (a) and animal view (c) of embryonic shield stage in diploid at 14 h after fertilization. b, d: face view (b) and animal view (d) of embryonic shield stage in haploid at 15 h after fertilization. Embryonic shield, arrow.



현상이 관찰됨으로써 반수체에서 각 기관들이 발달되는 형태적 특징을 확인하고자 부화 자어의 횡단면 및 종단면에 대한 조직분석을 수행하였고 그 결과는 Fig. 8 및 Fig. 9와 같다. 수정체(lens)와 신경 망막(neural retina)이 정상적으로 발달된 눈이 분명하게 형성되어 있는 이배체 자어와는 달리, 반수체 자어는 수정체와 신경 망막이 불분명하고, 양쪽 눈이 비대칭적인 위치에서 형성되는 것으로 확인되었다(Fig. 8a, 8b). 또한 귀소포(otic vesicles)의 경우, 이배체에서는 양쪽에 각각 한 개씩 위치하지만(Fig. 8c), 반수체에서는 이형적인 형태와 개수로 비대칭적으로 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 8d). 금붕어 반수체 자어의 눈에서도 색소 망막(pigmented retina), 신경 망막, 수정체, 각막(cornea)과 같은 눈을 구성하는 세포들이 모두 형성은 되지만, 각 세포들이 비정상적인 위치에서 형성됨으로써 이형적인 눈의 형태로 발달된다고 보고된 바 있다(Luo and Li, 2003; Tanaka et al., 2004). 본 연구의 결과 역시 기존의 보고에서 기술된 결과들과 유사한 양상을 나타내었다. 이에 반수체에서도 각 기관을 구성하는 세포들이 형성은 되지만, 그 위치 및 형태가 비정상적으로 발달하는 것이 반수체 기관 발달의 특징인 것으로 판단된다.

신경관(neural tube)은 일반적으로 배발생과정에서 신경관

(neural plate)이 neural keel, neural rod 그리고 신경관의 순서대로 발달하지만(Clarke, 2009), 본 종의 이배체 부화자어는 신경관의 내부공간이 생성되지 않은 형태인 neural rod까지 발달하는 것으로 확인되었다(Fig. 8e). 이는 넓이가 짧은 배발생 기간을 가지기 때문에 신경관까지 발달하지 못하고 부화하는 것으로 보인다. 그러나 반수체에서는 구형의 형태조차 띄지 않는 neural keel의 형태로 관찰되어 신경 기관의 발생 지연현상이 관찰되었다(Fig. 8f). 또한 반수체에서 장(intestine)은 형태, 크기 및 내강(lumen)의 유무가 각 개체 별로 불규칙적으로 발달되는 것으로 관찰되었다(Fig. 8f).

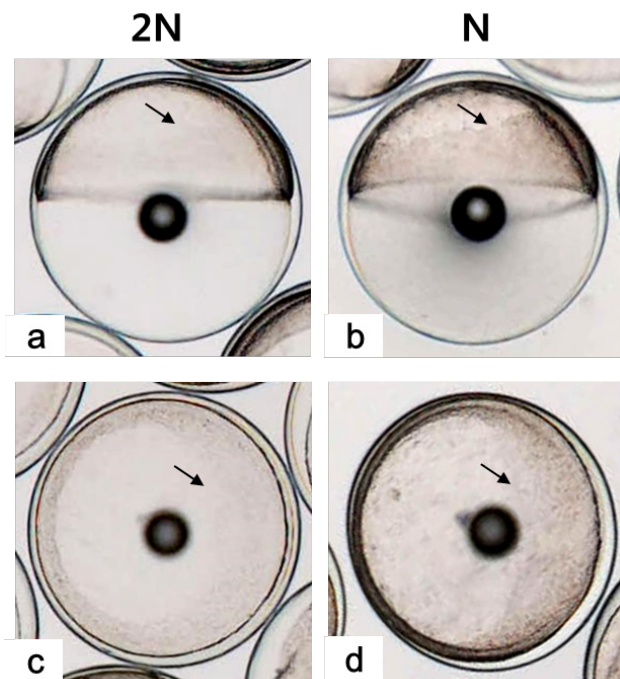


Fig. 3. External morphology of 40 - 45% epiboly stage in diploid (a,c) and haploid (b,d) *Paralichthys olivaceus*. a, c: face view (a) and animal view (b) of 40-45% epiboly stage in diploid at 16 h after fertilization. b, d: face view (b) and animal view (d) of 40-45% epiboly stage in haploid at 17 h after fertilization. Germ ring, arrow.

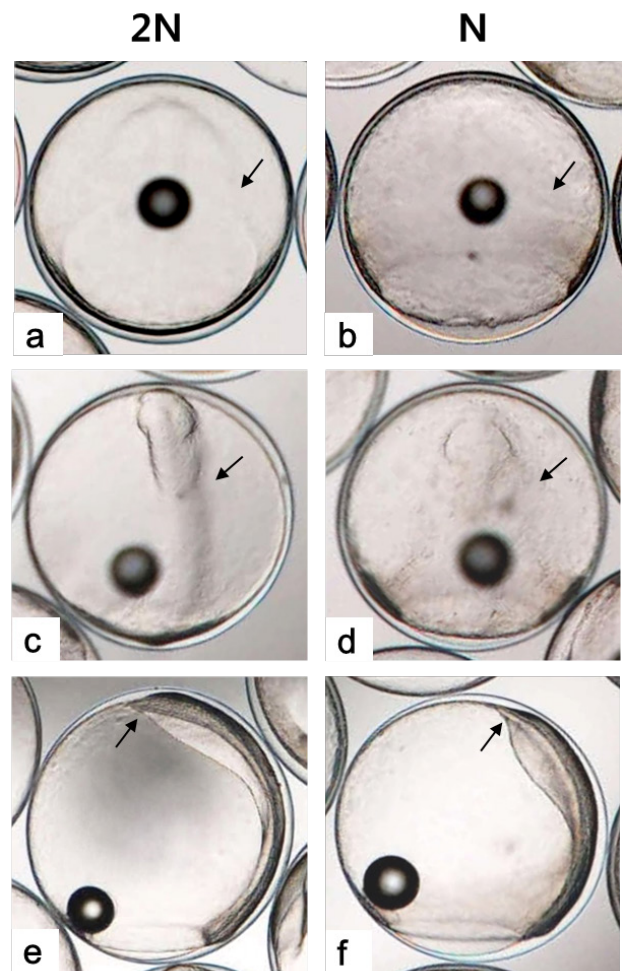


Fig. 4. Morphology of embryonic body in 80-90% epiboly stage of diploid (a, c, e) and haploid (b, d, f) *Paralichthys olivaceus*. a: Ventral view of 80% epiboly stage in diploid at 20 h after fertilization. b: ventral view of 80% epiboly stage in haploid at 21 h after fertilization. c, e: Ventral view (c) and left side view (e) of 90% epiboly stage in diploid at 21 h after fertilization. d, f: Ventral view (d) and left side view (f) of 90% epiboly stage in haploid at 24 h after fertilization. Embryonic body, arrow.

중요한 뼈대 역할을 하는 척색(notochord)은 배발생 과정에서 중심세포가 부풀게 되면서 액포가 있는 상태로 발달한 뒤, 길게 늘어진 형태가 되는 과정을 거치게 된다(Stemple et al., 1996; Anderson et al., 2007). 그러나 반수체에서 척색은 액포 세포가 길게 늘어지지 않고 둥그란 형태를 유지하고, 그 형태 및 크기가 균일하지 않게 발달하는 것으로 관찰되었다(Fig. 8f). 송사리 반수체에서도 본 종의 관찰결과와 동일하게 척색의 중심에 존재하는 액포 세포들이 길게 늘어나는 과정 없이 불규칙하게 둥근 형태를 유지하는 것이 확인된 바 있다(Araki et al., 2001).

부화 자어의 종단면 조직분석 결과, 반수체에서도 체절(somite)이 발달은 되지만, 그 형태가 불규칙하고 각 체절간의 구분이 불분명한 것으로 관찰되었다(Fig. 9). 또한 장이 몸통부(trunk)까지 발달되어 항문을 형성하는 이배체와는 달리, 반수체는 꼬리가 거의 형성되지 못함으로써 장이 몸통부까지 형성되지 못하고 항문 또한 형성되지 못하는 것으로 관찰되었다(Fig. 9).

이상의 연구 결과, 넘치 반수체 배아는 피부가 시작되는 후기 포배기부터 발생 지연 및 이상발생 현상 나타나기 시작하여 짧은 꼬리 및 넓은 몸통을 가진 배체로 발생하였다. 또한 부화단

계에서 일부 개체만이 부화하였으며 부화한 개체도 모두 치사함으로써, 넘치 반수체의 이상발생 현상은 다양한 경골어류에서 보고된 반수체 증후군(haploid syndrome)의 특징들과 유사한 것으로 확인되었다. 이러한 넘치 반수체 이상발생 및 치사 현상은 기존의 연구에서 보고된 바와 같이 한 개의 유전체만을 가지는 반수체 특성에 의한 열성 치사 유전자의 발현 또는 유전자 산물의 부족으로 인한 것으로 판단된다. 또한 반수체에서 이형적으로 발달된 기관들은 대부분 축 시스템(axial system)과 연관된 것들로 눈 및 귀소포와 같은 기관은 좌-우 비대칭적으로 발생하였고 신경관, 척색, 장 및 체절과 같이 몸체에서 중심을 이루는 기관들은 대부분 불완전하게 발생하거나 발생하지 않는 것으로 관찰되었다. 이는 반수체 배발생 과정에서 Kupffer's vesicle이 이형적으로 발생함으로써 정상적인 좌-우 축이 형성되지 못하여 눈 및 귀소포의 이상발생이 나타난 것으로 판단되고, 앞-뒤 축이 형성되는 낭배기 시기의 이상발생으로 신경관, 척색 및 장과 같은 기관들에서 이상발생이 관찰되는 것으로 보여진다.

앞으로 반수체 자어의 부화 전후 나타나는 조기 치사 현상으

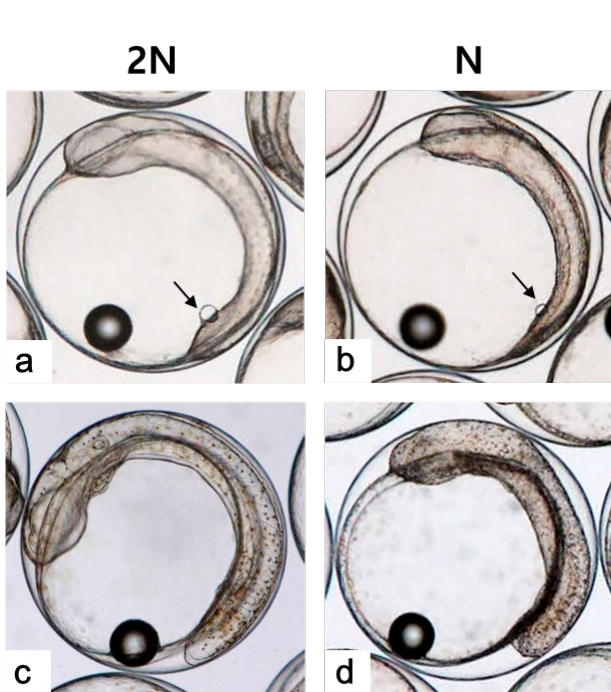


Fig. 5. Appearance and disappearance of Kupffer's vesicle in diploid (a,c) and haploid (b,d) *Paralichthys olivaceus*. a: Appearance of Kupffer's vesicle (arrow) in diploid at 25 h after fertilization. b: Appearance of Kupffer's vesicle (arrow) in haploid at 26 h after fertilization. c, d: Disappearance of Kupffer's vesicle in diploid (c) and haploid (d) at 34-36 h after fertilization. Kupffer's vesicle, arrow.

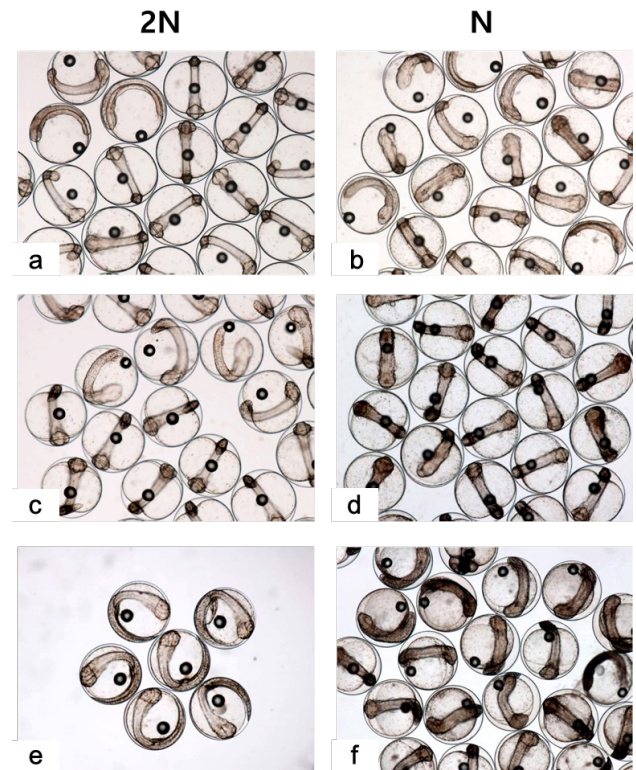


Fig. 6. Extension of tail bud in diploid (a, c, e) and haploid (b, d, f) *Paralichthys olivaceus*. a, b: The diploid (a) and haploid (b) embryo at 34 h after fertilization. c, d: The diploid (c) and haploid (d) embryo at 42 h after fertilization. e, f: The diploid (e) and haploid (f) embryo at 54 h after fertilization.



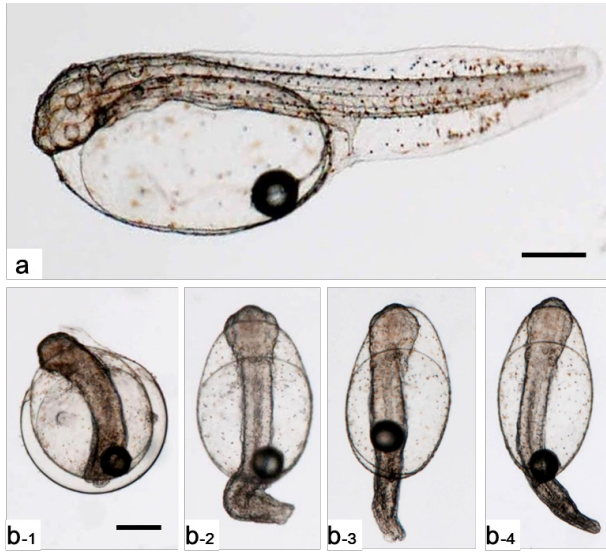


Fig. 7. The shape and length of tail in Just-hatched larva of diploid (a) and haploid (b) *Paralichthys olivaceus*. All scale bars indicate 0.25 mm

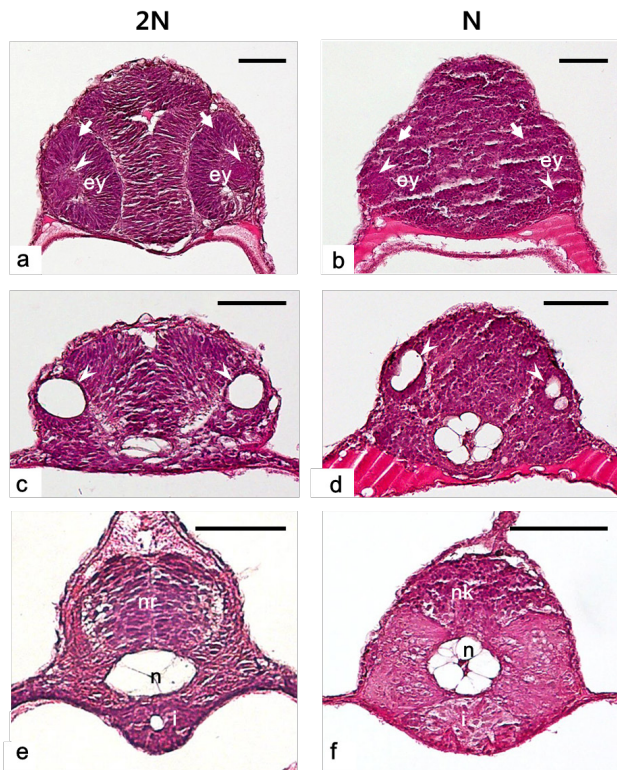


Fig. 8. Histological cross sections of head region in diploid and haploid *Paralichthys olivaceus* at hatching stage. a, b: Eyes (ey) of a diploid (a) and haploid (b) larva. Neural retina, arrows; lens, arrowheads. c, d: Otic vesicles of a diploid (c) and haploid (d) larva. Otic vesicles, arrowheads. e: Neural rod (nr), notochord (n) and intestine (i) of a diploid larva. f: Neural keel (nk), notochord (n) and intestine (i) of a haploid larva. All scale bars indicate 50  $\mu$ m.

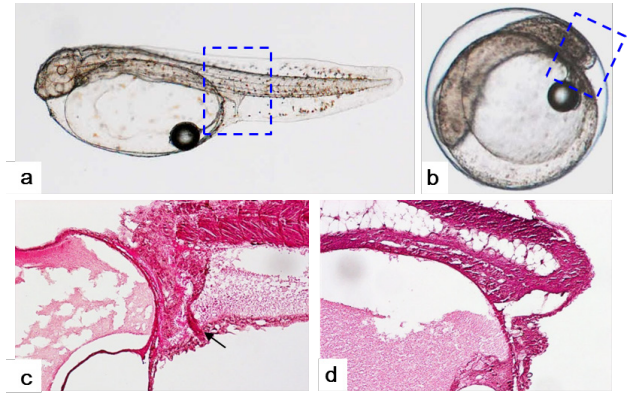


Fig. 9. Microphotography and histological section of diploid and haploid *Paralichthys olivaceus* at hatching stage. a: Microphotography of just-hatched larva in diploid. b: Microphotography of haploid embryo at hatching stage. c, d: Longitudinal section of just-hatched larva in diploid (c) and haploid (d). Anus (urogenital opening), arrow.

로 인하여 그 연구에 한계가 있는 넙치의 우성 및 열성 유전자 검색 연구를 위해 반수체-이배체 키메라(haploid-diploid chimera)의 유도 연구가 뒤따라야 할 것이다.

## 사 사

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청의 지원과제 수출용 킹넙치의 배수체 종자개발(과제번호 213004-04-3-1SB220)에 의해 수행되었습니다.

## References

- Anderson C, Bartlett SJ, Gansner JM, Wilson D, He L, Gitlin JD, Kelsh RN and Dowden J. 2007. Chemical genetics suggests a critical role for lysyl oxidase in zebrafish notochord morphogenesis. *Mol Biosyst* 3, 51-59. <http://dx.doi.org/10.1039/B613673G>.
- Animal Genome Size Database. 2014. Vertebrates-Fishes haploid C-value. Retrieved from <http://www.genomesize.com> on March 27.
- Araki K, Okamoto H, Graveson AC, Nakayama I, Nagoya H. 2001. Analysis of haploid development based on expression patterns of developmental genes in the medaka *Oryzias latipes*. *Develop Growth Differ* 43, 591-599. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-169X.2001.00601.x>.
- Clarke J. 2009. Role of polarized cell divisions in zebrafish neural tube formation. *Curr Opin Neurobiol* 19, 134-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2009.04.010>.
- Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB and Yost HJ. 2005. Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of

- the brain, heart and gut. *Dev* 132, 1247-1260. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01663>.
- Felip A, Piferrer F, Carrillo M and Zanuy S. 1999. The relationship between the effects of UV light and thermal shock on gametes and the viability of early developmental stages in a marine teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Heredity* 83, 387-397. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6886030>.
- Jung HS, Kim YK, Kim HC, Noh JK, Lee JH and Kim DS. 2014. Cytogenetic Analysis of Starry Flounder *Platichthys stellatus* from Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 431-434. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0431>.
- Kim DS, Kim JH, Jo JY, Moon YB and Cho KC. 1993. Induction of gynogenetic diploid in *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Genetics* 15, 179-186.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310. <http://dx.doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- Luo C and Li B. 2003. Diploid-dependent regulation of gene expression: a genetic cause of abnormal development in fish haploid embryos. *Heredity* 90, 405-409. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800263>.
- Okabe N, Xu B and Burdine RD. 2008. Fluid dynamics in zebrafish Kupffer's vesicle. *Dev Dyn* 237, 3602-3612. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21730>.
- Piferrer F, Cal RM, Gomez C, Alvarez-Blazquez B, Castro J and Martinez P. 2004. Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture* 238, 403-419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.009>.
- Stemple DL, Solnica-Krezel L, Zwartkruis F, Neuhauss SC, Schier AF, Malicki J, Stainier DY, Abdelilah S, Rangini Z, Mountcastle-Shah E and Driever W. 1996. Mutations affecting development of the notochord in zebrafish. *Dev* 123, 117-128. <http://dx.doi.org/10.5167/uzh-238>.
- Tanaka M, Yamaha E and Arai K. 2004. Survival capacity of haploid-diploid goldfish chimeras. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301, 491-501. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.a.48>.
- Tvedt HB, Benfey TJ, Martin-Robichaud DJ, McGowan C and Reith M. 2006. Gynogenesis and sex determination in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 252, 573-583. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.042>.
- Walker C. 1999. Haploid screens and gamma-ray mutagenesis. In: *Methods in Cell Biology*. Detrich HW and Westerfield M, eds. Academic Press, San Diego, U.S.A., 43-70.
- Wiellette E, Grinblat Y, Austen M, Hirsinger E, Amsterdam A, Walker C, Westerfield M and Sive H. 2004. Combined haploid and insertional mutation screen in the zebrafish. *Genesis* 40, 231-240. <http://dx.doi.org/10.1002/gene.20090>.
- Yamamoto E. 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* 173, 235-246. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00448-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00448-7).
- Yang H, Lee YM, Lee JH, Noh JK, Kim HC, Park CJ, Park JW, Hwang IJ and Kim SY. 2013. Expression of perforin gene for early development of nephrons in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Dev Reprod* 17, 321-327. <http://dx.doi.org/10.12717/DR.2013.17.4.321>.
- Yi M, Hong N and Hong Y. 2009. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science* 326, 430-433. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1175151>.
- Zheng WJ and Sun L. 2011. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol* 30, 638-645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.014>.