

# 인간의 태반성 성선자극호르몬 또는 성선자극호르몬-방출호르몬 유도체와 Pimozide에 의한 황복의 배란유도

장 선 일

국립수산진흥원 보령수산종묘배양장

## Induced Ovulation by using Human Chorionic Gonadotropin and Gonadotropin-Releasing Hormone Analogue plus Pimozide in Yellow Puffer, *Takifugu obscurus*

Seon Il Jang

*Poryoung Hatchery, National Fisheries Research and Development Agency,  
Chungnam 355-860, Korea*

Ovulation of maturing female yellow puffer, *Takifugu obscurus*, was induced by using single injection of human chorionic gonadotropin (HCG) or gonadotropin releasing hormone-analogue (GnRH-A) des-Gly<sup>10</sup> [D-Ala<sup>6</sup>] GnRH-ethylamide plus pimozide. The response was evaluated using the fertilization and embryo-formation rate after insemination and the gonadotropin (GTH) level in blood plasma using radioimmunoassay. In the fertilization and embryo-formation, maximal effects were recorded by using 1,000 IU/kg HCG or 10 µg/kg GnRH-A plus 5 mg/kg pimozide. Pimozide (1, 5 mg/kg) or GnRH-A treatment alone was not effective in elevation of GTH level, however combinations of these treatments were particularly effective. Injection of dopamine blocked the rapid elevation of plasma GTH levels of blood. These data suggest that yellow puffer secrete GnRH and gonadotropin-releasing-inhibiting factor during the spawning or the other period.

Key words : HCG, GnRH-A, Pimozide, Dopamine, Ovulation, Yellow puffer

### 서 론

황복(*Takifugu obscurus*)은 복어목(Tetraodontiformes)의 참복과(Tetraodontidae)에 속하는 어류로서 우리나라의 서남해와 중국의 동남해 등 황해에 주로 분포하며 산란시기에는 큰 하천이나 강의 중류까지 거슬러 올라와 산란하는 소하성 어류이다(정, 1977 ; 이, 1993).

황복은 맛과 육질이 뛰어나 중국에서는 허둔이라 했으며 최근 우리나라에서도 기호식품으로 크게 각광을 받고 있다. 그러나 하천의 오염

로 산란을 하기 위해서 소상하는 성숙 어류가 현저히 줄어들고 있으며 그마저 무분별한 남획으로 인해서 멸종위기에 직면해 있는 종이기도 하다. 따라서 종 보존적인 차원에서 뿐만 아니라 자원증식과 기호식품으로서 충분한 양을 조달하기 위해서는 인위적인 성성숙과 종묘생산을 해야 한다.

본 종을 양식하기 위해서는 우선 자연산 성체에서 산란을 유도해야 하나 산란기인 5~6월사이에 포획된 어류에 있어서도 양질의 난을 얻기가 어려울 뿐만 아니라, 어획량도 매년 줄어들고 있기 때문에

종묘생산에 있어서 많은 문제점을 야기하고 있다. 다른 어종에 있어서는 이러한 문제점을 극복하고자 호르몬을 어체에 처리하여 산란을 유도하기 위한 연구가 끊임없이 이루어져 왔다.

예컨대, 양서류와 어류의 뇌하수체, 인간의 태반성 성선자극호르몬(human chorionic gonadotropin, HCG), 성선자극호르몬-방출호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 성선자극호르몬-방출호르몬 유도체(GnRH analoge, GnRH-A) 등에 의한 어류의 배란유도가 보고되어 왔다(Hettler, 1981; Donaldson and Hunter, 1983; Kreiberg et al., 1987; Billard et al., 1987). 그러나 모든 어류에서 이들 호르몬 및 호르몬 유도체에 대해서 좋은 반응을 보이는 것은 아니다. 특히 잉어에서는 HCG에 대한 반응성이 낮아 산란유도에 문제점이 보고 되었고, 송어에서는 성성숙 이외의 side effects가 나타난다(House et al., 1979). 이런 경우에는 GnRH와 Gly<sup>10</sup> [D-Ala<sup>6</sup>] LH-RH-ethylamine, pimozone 등과 같은 GnRH-A를 이용하여 산란을 유도한 많은 보고가 있다(Peter, 1980; Weil et al., 1980; Weil and Crim, 1983).

이러한 호르몬 및 호르몬 유도체 처리에 의한 배란유도 방법은 양식산업에 있어서 기본이 되는 종묘생산을 목적으로 하고 있을 뿐만 아니라 인공수정에 의한 육종학적 연구에 활발히 이용되고 있다. 그러나 같은 종에 있어서는 시기와 환경조건에 따라서 호르몬의 반응성이 다르며, 호르몬의 종류와 양에 있어서는 각기 반응이 다르게 나타나기 때문에 호르몬의 종류와 처리시기 및 적정농도를 결정하는 것은 매우 중요한 일이다. 본 연구는 앞으로 종보존과 자원증식 및 양식산업 분야에서 유망하게 이용될 수 있는 황복을 대상으로 난질이 좋은 성숙난을 얻기 위해서 HCG, GnRH-A, pimozone, dopamine 등을 어체에 처리하여 배란유도방법의 확립과 가능한 기전에 대해서 논의했다.

## 재료 및 방법

### 실험어류

군산근해 및 강화도에서 1995년 5월에 포획된

성체(600~1,000 g)를 군산 및 강화도의 상점으로 부터 30여 마리를 구입하여 배란유도 실험에 사용하였다. 실험어류는 2.5% 염분 해수가 들어있는 2톤 수조에 수용한 후 낮과 밤의 주기를 13~14 L : 11~10 D로 조절하고 지하담수를 소량씩 주입하면서 최종 배란유도시까지 염분의 최종농도가 0.5% 이하로 되게하여 수온 16~20°C에서 실험하였다.

### 호르몬처리

HCG, 1-[1-(4,4-bis[4-Fluorophenyl]-butyl)-4-piperidiny]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one, pimozone, (4-[2-Anioethyl]-1,2-enzonediol; 3,4-dihydroxy-phenethylamine, dopamine), Des-Gly<sup>10</sup> [10-Ala<sup>6</sup>]-LHRH-ethylene (LHRH-A 또는 GnRH-A) 등은 Sigma사로 부터 구입했다. 성선자극호르몬, 성선자극호르몬 유도체 및 성호르몬 분비억제물질 등은 모두 암컷을 대상으로 복강에 처리했다. HCG는 어체중 kg 당 500, 1000, 1500 IU를, GnRH-A (10 µg/kg)에 1, 5 mg/kg의 pimozone을 어류의 복강에 주사하여 수정율 95%와 배체형성율이 90% 이상되는 1,500 IU/kg HCG과 5 mg/kg pimozone을 선택하여 여기에 dopamine을 1, 5 mg/kg을 같이 어류 복강에 주사하였다.

### 수정율과 배체형성을 조사

배란은 12시간 마다 복부를 압박하여 확인하였고, 호르몬의 효과는 7일까지 배란이 완료된 경우에만 한정하여 결정하였다. 배란된 난은 200 µm 나일론 메쉬로 만든 채란용기(직경 20 cm)에 주입한 후 즉시 수컷의 복부를 압박하여 정액을 첨가한 다음 부드러운 붓으로 가볍고도 고르게 난에 흡착시킨 후 약 2~3분간 방치했다. 그 후 1 µm 필터로 여과된 담수로 잔여 정액을 깨끗하게 세척했다. 세척된 난은 직경 10 cm 페트리디쉬에 옮긴 다음 난이 충분히 잠기게 여과수를 넣은 후 18.0±1.0°C로 유지하면서 비디오가 부착된 해부현미경(Olympus)과 만능투영기(Nikon) 하에서 수정율과 배발생율을 계산하였다.

PL I A는 GnRH-A+Pimozide을 처리한 후 7일이 경과된 배란직전의 암컷을 나타낸 사진으로서 복부가 매우 팽만되어 있다. 또한 이들 호르몬 및 유도체의 배란유도 효과를 판단하기 위해서 수정율(PL I B)과 배형성율(PL I C)을 관찰하여 호르몬의 효과를 판단했다. PL I D는 이들 호르몬에 의해 배란된 난에서 부화된 자어를 나타내었다.

**Gonadotropin의 radioimmunoassay**

배란유도실험시 황복의 GTH가 plasma 내에 어느 정도 분비되는지 알아보기 위해서 대조군은 생리식염수만 복강에 주사하고, 실험군은 10 µg/kg GnRH-A 또는 1 mg/kg Pimozide을 단독 처리했거나 이들을 조합하여 주사하였다. 이들 호르몬 유도체를 처리하기 직전과 처리한 후 48시간 방치한 다음 각 어류로부터 혈액을 미정맥에서 1 ml 취하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻은 다음 -70°C 냉동고에 보관한 후 방사면역측정에 사용하였다. GTH의 측정은 Bereton 등(1971)의 방법에 따라 측정하였다. 요약하면 <sup>125</sup>I가 표지되어 있는 GTH kit (ICN)를 이용하여 어류의 plasma 또는 표준 GTH 100 µ에 방사능이 표지된 항체를 반응시켜 18~20시간 동안 방치한 후 완충용액을 첨가하여 2,000 g로 15분간 4°C에서 원심시켜 그 침전물내의 방사능을 감마 카운터로

측정하였다.

**통계처리**

통계 자료의 유의성 검증을 위해 t-test에 의거하여 0.05이하를 유의성의 한계로 정했다.

**결 과**

**인공 산란 유도에 미치는 호르몬의 영향**

산란시기인 5월에 구입한 암컷을 대상으로 대조구는 0.5 ml의 DPBS (pH 7.2)을 주입한 결과 주사후 10일이 경과해도 배란되지 않았다. 어체 중 kg당 3가지 다른 농도로 인간의 태반성 성선자극 호르몬(HCG)을 처리한 결과는 Table 1에서 나타낸 바와 같다. 500 IU 농도에서는 주사한 2마리 중에서 1마리만 7일 째 유도되었고 수정율과 배형성율은 각각 85, 80%로 나타났다.

1,000 IU로 주사한 3마리에서는 모두 7일 이내에 배란되었고 수정율과 배형성율이 각각 95, 97%로 나타나 매우 양호하였다. 1,500 IU에서는 주사한 어류가 6일과 7일째 모두 배란되었고, 수정율이 93%로 양호하였으나, 배형성율은 75%로 낮았다.

GnRH-A (10 µg/kg)에 Pimozide 2가지 다른 농도로 암컷에 처리한 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 어체 중 kg당 1 mg을 처리한 2마리의 암컷

**Table 1. Effects of various hormone treatments for induction of ovulation in female yellow puffer**

Treatment groups	No. of fish injected	No. of fish ovulated*	Fertilization rate (%)**	embryo-formation rate (%)***
Control (0.5 ml saline/kg)	-	-	-	-
HCG (IU/kg)				
500	2	1	85	80
1,000	3	3	95	97
1,500	2	2	74	52
GnRH A (10 µg/kg) +Pimozide (mg/kg)				
1	2	1	90	88
5	3	3	98	96
10	2	2	93	75

\*The detection of ovulation was carried out by the method in which a gentle pressure of abdomen. This method was applied every 12 hrs for 7 days after intraperitoneal injection with hormones.

\*\*Percent of fertilization was calculated in 1,000 eggs of the 1st cleavage stage.

\*\*\*Percent of embryo-formation was calculated in 1,000 eggs of gastula stage.

중에서 1마리만 배란되어 수정율과 배형성율이 각각 90, 88%로 나타났다. 5 mg을 주사한 3마리는 7일 이내에 모두 배란되어 수정율과 배형성율이 각각 98, 96%로 매우 높게 나타났다. 10 mg을 주사한 어류에 있어서도 모두 배란되어 수정율은 93%로 높았으나 배체형성율은 75%로 낮았다.

**Dopamine의 산란 억제효과**

호르몬 또는 호르몬 유도물질에 성호르몬 분비 억제물질로 알려진 dopamine을 사용하여 그 효과를 알아보았다. 수정율과 배체형성율이 가장 좋은 500 IU/kg의 HCG에 dopamine을 처리한 결과 Fig. 1에서 나타낸 바와 같다. 1 mg/kg 주사한 실험구에서는 66.9%로 배란율이 감소되었고, 5 mg/kg 실험구에서는 모두 배란되지 않았다. GnRH-A (10 µg/kg) + pimozone (5 mg/kg)에 dopamine을 처리한 경우 5 mg/kg을 처리한 실험구에서 배란율은 33.3%로 현저히 감소되었다.

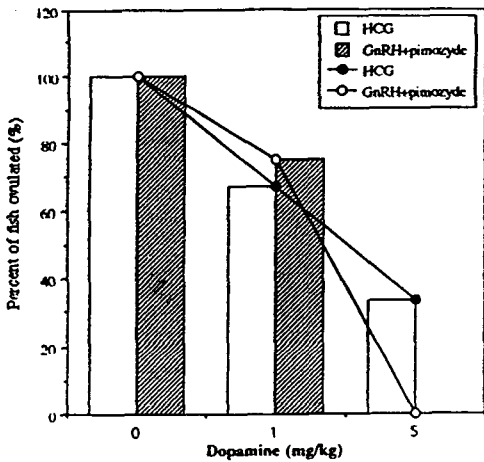


Fig. 1. Inhibition of ovulation rate by dopamine in yellow puffer. Fish were treated with 1,000 IU/kg HCG, 10 µg/kg GnRH+5 mg/kg pimozone, or hormones plus 1, 5 mg/kg dopamine. The detection of ovulation was carried out by the method in which a gentle pressure of abdomen was applied every 12 hrs for 7 days after injection. Data were the mean from 3 fish.

**성호르몬 분비에 있어서 pimozone의 효과**

GnRH-A에 pimozone을 암컷의 복강에 처리했을

때 plasma 내에 분비된 성선자극호르몬(gonadotropin, GTH)의 양을 알아보기 위해서 방사면역측정(RIA)법을 이용해 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. Pimozone만 처리한 실험구에서는 0.5 ml/kg의 DPBS를 처리한 대조구에서 분비된 GTH량(7.53±1.70 ng/ml)과 차이가 없었지만, GnRH-A에 1 mg/kg의 pimozone을 처리한 실험구에서는 GTH가 15.47±1.45 ng/ml로 나타나 대조구에서 보다 유의하게 증가되었다(p<0.05)였고, 5 mg/kg의 pimozone 처리구에서는 18.64±3.50 ng/ml로 대조구에 비해 현저히 증가되었다(p<0.01).

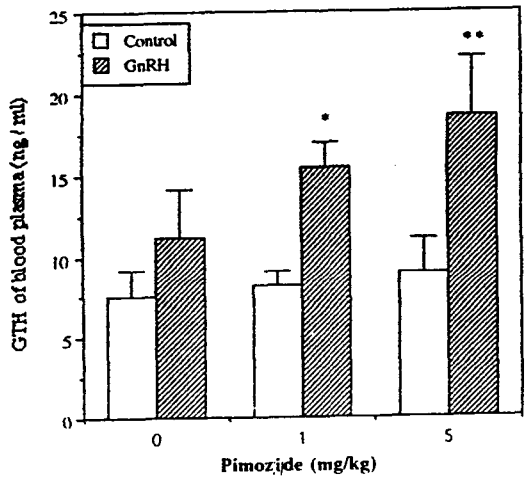


Fig. 2. Immunoreactive plasma gonadotropin (GTH) concentration in yellow puffer. Fish were intraperitoneally injected with saline (control) or 10 µg/kg GnRH-A plus 1, 5 mg/kg pimozone. GTH amounts were determined by radioimmunoassay (RIA) method from plasma treated with hormones for 48 hrs. Data were the mean±S.E. from 3 fish. \*; p<0.05, \*\*; p<0.01 compared with control.

**성호르몬 분비에 있어서 dopamine의 억제효과**

GnRH-A와 pimozone가 황복의 성선자극 호르몬분비에 대한 기전을 알아보기 위해서 dopamine을 처리하여 방사면역측정법에 의해 GTH양을 측정된 결과 Fig. 3에서 나타낸 바와 같다. GnRH-A+pimozone에 dopamine이 처리되지 않은 대조구(18.64±3.50 ng/ml)에 비하여 1 mg/kg의 dopamine을 처리한 실험구에서는 10.04±3.02 ng/ml로 나타나

GTH량이 유의하게 감소되었고( $p<0.05$ ), 5 mg/kg의 dopamine을 처리한 실험구에서는  $4.09\pm 1.09$  ng/ml로 현저히 감소되었다( $p<0.001$ ).

### 고 찰

본 연구는 호르몬이 황복의 난성숙에 어떠한 영향을 주고 궁극적으로는 종묘양산시 산업적으로 활용할 수 있는지에 대해서 조사하였다. HCG의 경우 사용된 농도에서 모두 양성반응을 보였으나, 어체중 kg당 1,000 IU를 주사한 실험구에서 가장 좋은 수정율과 배형성율이 좋았다. 저농도의 경우 10일 이후에도 배란된 개체가 있었으나 발생율이 현저히 떨어졌다(이 논문에서는 보여주지 않았음). 따라서 HCG를 사용하여 성숙난 유도를 목적으로 할 때 주사할 양의 결정은 산란시기에 있어서 최소한 7일 이내에 반응을 보여야만 하는 것으로 사료된다. 황복이 HCG에 대해 반응하는 속도는 미꾸리(Lin et al., 1985), 차넬메기(김 등, 1990), 연어(Van Der Kraak et al., 1985) 등에서 보다 매우 느렸다.

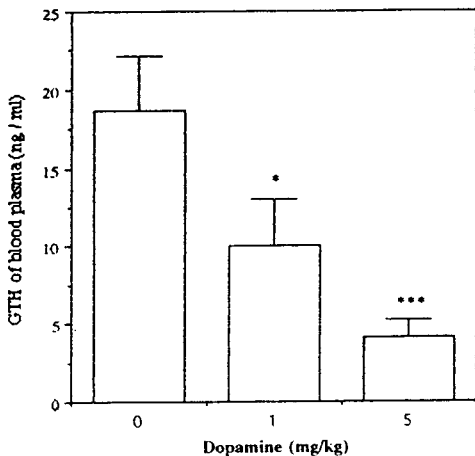


Fig. 3. Inhibition of immunoreactive plasma gonadotropin (GTH) levels yellow puffer. Fish were treated with GnRH-A (10  $\mu$ g/kg) + pimozide (5 mg/kg) or hormones plus 1, 5 mg/kg dopamine. GTH amounts were determined by radioimmunoassay (RIA) method from the treated fish plasma. Data were the mean  $\pm$  SE from 3 fish. \* ;  $p<0.05$ , \*\*\* ;  $p<0.001$  compared with GnRH-A + pimozide group.

한편 산란기에 있어서 경골어류의 뇌에서는 GnRH를 분비한다는 많은 보고가 있다(Potts and Wootton, 1984). 본 결과에 GnRH-A 또는 pimozide 단독 처리구에서는 배란유도와 plasma내 성선자극호르몬의 양을 증가시키지 않았으나, GnRH-A와 pimozide을 동시에 처리했을 때 배란유도가 좋았고 plasma내 성선자극호르몬의 양도 크게 증가되었다. 그러나 지금까지도 이러한 호르몬 및 호르몬유도체의 역할에 대한 기전은 상세히 알려지지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 이들 호르몬의 기전을 알아보기 위해서 HCG 또는 GnRH-A + pimozide와 dopamine을 처리했던 바 배란유도와 plasma내 성선자극호르몬의 양이 크게 억제됨을 확인하였다. 따라서 이와 같은 결과는 최소한 황복에 있어서도 산란기 또는 이시기 이외에 여러 가지 다른 성선자극호르몬과 성선자극호르몬 억제물들이 분비될 수 있음을 시사해 주었다. 또한 호르몬이 이 표적기관에 특이적이라는 측면에서 종간에 상호호차반응을 할 수 있고, 이런 현상은 진화적으로 성선자극호르몬의 구조적인 상동성이 있음을 제시해준다(Potts and Wootton, 1984).

난이 성숙되는 기전을 알아보기 위하여 면역방사 측정방법을 이용해 황복의 plasma내에 분비된 성선자극호르몬의 양을 측정했다. 그 결과 매우 흥미로운 결과를 얻었다. 5월에 구입된 수컷은 성적으로 완숙했으나, 암컷의 경우는 단지 복부가 팽만된 상태였다. Fig. 3에서 황복의 성선자극호르몬을 측정해 본 결과 잉어류(Kreiberg et al., 1987)에서 측정된 양보다는 약간 높았지만 인간의 태반성 성선자극호르몬과 pimozide을 동시에 처리한 실험구에서 보다 현저히 낮았다. 아마도 이와 같은 결과는 산란시기에 성선자극호르몬을 측정했기 때문이라 사료된다.

앞으로 종 보존과 자원증식 및 양식산업 분야에서 유망하게 이용될 수 있는 황복을 대상으로 본 실험에서 사용하지 않은 여러가지 다른 호르몬과 이들 호르몬의 유도체를 이용하여 많은 개체에서 실험이 이루어져야 성성숙에 대한 확실한 기전을 알 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

인간의 태반성 성선자극호르몬(HCG) 또는 성선자극호르몬-방출호르몬 유도체(GnRH-A)와 pimozide를 이용하여 산란시기의 암컷황복에서 인공산란을 유도하였다. 호르몬 또는 호르몬유도체의 효과는 배란 후 인공수정시켜 수정율과 배체형성을 및 면역방사측정법으로 혈액의 plasma 내 성선자극호르몬(GTH) 양을 측정하여 결정하였다. 수정율과 배체형성율이 가장 좋은 HCG 농도는 어체중 kg 당 1,000 IU이었다. 또한 GnRH-A (10 µg/kg)와 pimozide를 동시에 처리했을 때 수정율과 배체형성율이 좋은 pimozide의 농도는 5 mg/kg이었다. Pimozide (1, 5 mg/kg)를 단독으로 처리한 어류에서는 plasma 내 GTH양에 영향을 줄 수 없었지만, GnRH-A와 동시에 처리했을 때 GTH양은 현저히 증가되었다. GnRH-A와 pimozide 및 dopamine을 동시에 처리했을 때 혈액의 plasma 내 GTH양은 크게 감소되었다. 이상의 결과는 산란시기 또는 이시기 이외에 황복의 뇌로부터 여러가지 성선자극호르몬과 성선자극억제호르몬을 분비됨을 시사해 준다.

## 감 사

이 연구는 수산진흥원 AF-03 연구비에 의해 실시되었으며, 본 연구의 결과가 나오기 까지 여러가지 도움을 준 보령배양장 직원 여러분께 감사한다.

## 인 용 문 헌

- Bereton, B., G. Kann, E. Burzawa-Gerard and R. Billard, 1971. Dosage radioimmunologique d'une hormone gonadotrope de carpe *Cyprinus carpio*. C. R. Acad. Sci., 272 : 1515-1517.
- Billard, R., K. Bieniarz, W. Poper, P. Epler, B. Breton and K. Alagarwami, 1987. Stimulation of gonadotropin in carp by pimozide-LHRH-A treatment : Effects of dose and time of day. Aquaculture, 62 : 161-170.
- Van Der Kraak G., H. M. Dye, E. M. Donaldson, and G. A. Hunter, 1985. Plasma gonadotropin 17β-estradiol, and 17α, 20β-dihydroxy-4-[pregnen-3-one levels during luteinizing hormone-releasing hormone analogue and gonadotropin induced ovulation in coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*) Can. J. Zool., 63 : 824-833.
- Donaldson, E. M. and G. Hunter, 1983. Induced final maturation, ovulation and spermination in cultured fish. In : W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (eds.). Fish Physiology Vol. IX : Reproduction, Part B, Behaviour and fertility control. pp. 351-403. Academic Press. London.
- Hettler, W. F., 1981. Spawning and rearing Atlantic menhaden, Prog. Fish Cult., 43 : 80-84.
- House, E. W., R. J. Dornauer and B. J. Lenten, 1979. Production of coronary arteriosclerosis with sex hormones and human chorionic gonadotropin (HCG) in juvenile steelhead and rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Atherosclerosis, 34 : 197-206.
- Kreiberg, H., G. A. Hunter, E. M. Donaldson, W. C. Clarke and I. Baker, 1987. Induced ovulation and spermination in the pacific herring (*Clupea harengus Pallasi*) using salmon pituitary preparations and a synthetic gonadotropin-releasing hormone analogue. Aquaculture, 61 : 155-161.
- Lin, H. R., C. Peng, L. Z. Lu, X. J. Zhon, G. Van Der Kraak and R. E. Peter, 1985. Induction of ovulation in the loach (*Paramisgurnus dabryanus*) using pimozide and [D-Ala, Pro<sup>9</sup>-N-ethylamide]-LHRH. Aquaculture, 46 : 333-340.
- Peter, V. E., 1980. Serum gonadotropin levels in mature male goldfish in response to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) and des-Gly<sup>10</sup>[D-Ala<sup>6</sup>]-LH-RH ethylamide.. Can. J. Zool., 58 : 1100-1104.
- Potts, G. W. and R. J. Wootton, 1984. Fish Reproduction : Strategics and Tactics. Academic Press, 403 pp.
- Weil, C. and L. W. Crim, 1983. Administration of LHRH analogues in various way : Effect on the advancement of spermination on prespawning landlocked salmon *Salmo salar*. Aquaculture, 35 : 103-115.
- Weil, C., A. Foatier, L. Horvath, S. Marlot, and M. Berscermy, 1980. Profiles of plasma gonadotropin and 17β-estradiol in the common carp

인간의 태반성 성선자극호르몬 또는 성선자극호르몬-방출호르몬 유도체와 Pimozide에 의한 황복의 배란유도

- Cyprinus carpio* L. as related to spawning induced by hypophysation or LH-RH-treatment. *Reprod. Nutr. Dev.*, 20 : 1041 - 1050.
- 김동수·최경철·김인배, 1990. 차넬메기의 산란유도. *한국양식학회지*, 3 : 25 - 30.
- 명정구·김형선·박철원·이순길·김종만·허형택·김용익, 1994. 황복, *Fugu obscurus*의 초기생활사에 관한 연구-I. 난 및 치어의 외부형태. *한어지*, 6 : 89 (국문요지).
- 이완옥, 1993. 한국산 참복과(복어목) 어류의 계통분류학적 연구. 박사학위논문. 전북대학교 대학원, 171 pp.
- 정문기, 1977. 한국어류도감. 일지사. 서울. 727 pp.

Plate I

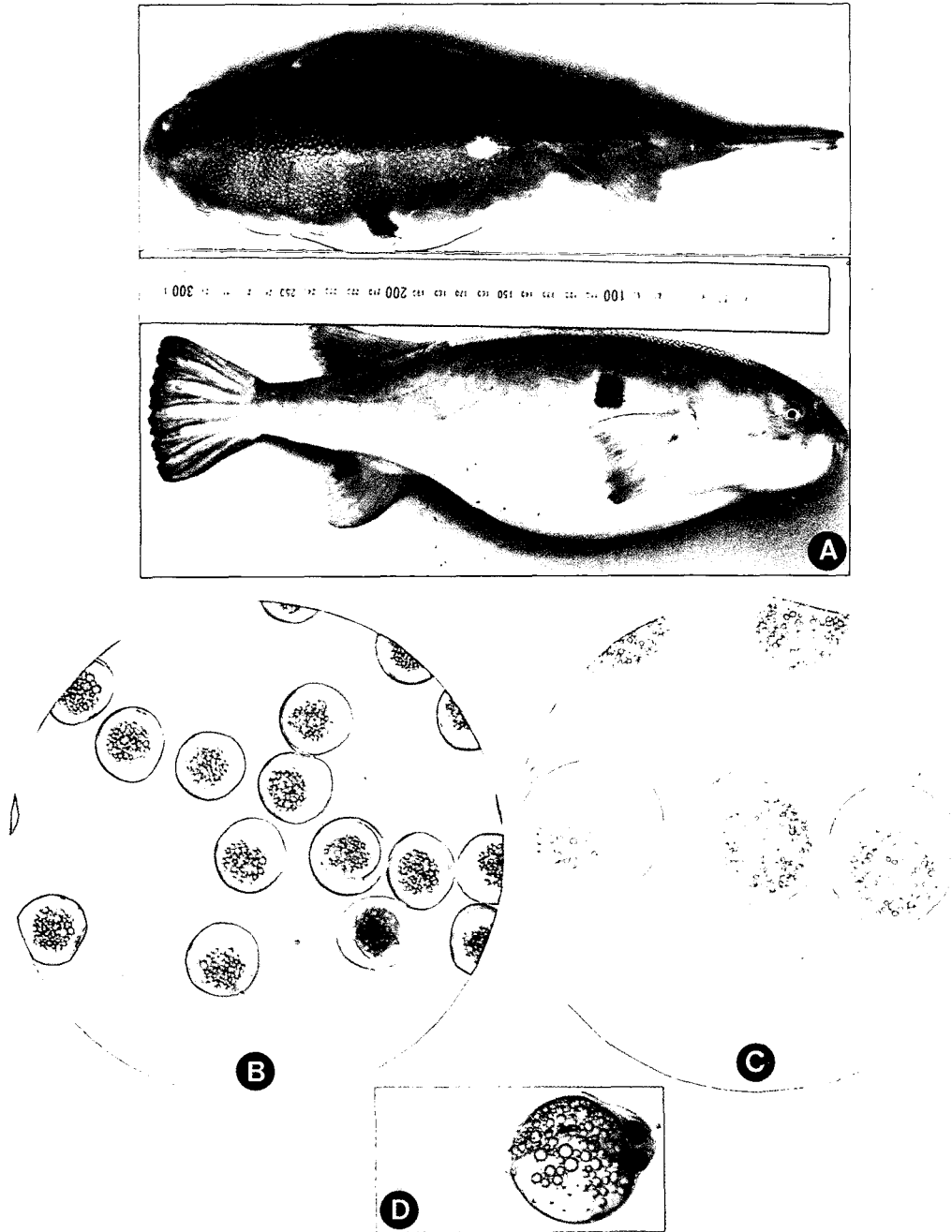


Plate I. External morphology of ripening female (A), eggs of the cleavage stage (B,  $\times 25$ ), eggs of the gastrula stage (C,  $\times 50$ ), and hatched larva (D,  $\times 50$ ) in the yellow puffer, *T. obscurus*.