

해산 송사리 *Oryzias dancena*의 초기 생식소 형성 및 성분화

송하연 · 남윤권¹ · 방인철² · 김동수^{1,*}

부경대학교 양식학과, ¹부경대학교 해양수산형질전환생물연구소, ²순천향대학교 해양생명공학과

Early Gonadogenesis and Sex Differentiation of a Marine Medaka, *Oryzias dancena* (Beloniformes; Teleostei) by Ha Yeun Song, Yoon Kwon Nam¹, In-Chul Bang² and Dong Soo Kim^{1,*} (Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea; ¹Institute of Marine Living Modified Organisms (iMLMO), Pukyong National University, Busan 608-737, Korea; ²Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea)

ABSTRACT Sex differentiation and gonad development were investigated in a marine medaka species, *Oryzias dancena* (Beloniformes; Teleostei). The average time to hatch was 11 days post-fertilization (dpf) at 25°C. 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. Male and female gonads were morphologically differentiated 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 yolk granulation in many oocytes, while testis possessed a considerable number of spermatogonia and spermatids. The first ovulation was observed in 9-week-old females, and at the same age, males contained fully-matured spermatozoa. Data obtained in this study indicate that the gonad differentiation of *O. dancena* is the typical type of differentiated gonochorism.

Key words : Gonad development, gonochoristic type, *Oryzias dancena*, sex differentiation

서 론

송사리는 동갈치목 송사리과에 속하는 경골어류로 인도에서 일본에 이르는 지역, 인도네시아와 필리핀 등 다양한 지역에 서식한다. 송사리과 중 *Oryzias* 속은 전 세계에 20 종이 보고되어 있으며 (Robert, 1998; Parenti and Soeroto, 2004), 어종에 따라 담수, 기수 그리고 해수에서 서식하는 것으로 보고되어 있다 (Naruse *et al.*, 1993). 이 중 일본 송사리 *Oryzias latipes*는 담수 송사리로서 세대 주기 (generation time)가 짧고, 실험실 소형 수조에서 전 생활사의 조작이 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 연구되고 있다 (Naruse *et al.*, 1993; Ishikawa, 2000; Wittbrodt

et al., 2002). 그러나 담수어인 *O. latipes*는 해수 조건에서 생존율, 산란력, 수정률 그리고 부화율 등이 현저히 떨어지므로 (Inoue and Takei, 2003; Kang *et al.*, 2008) 해양생태계 위해성 평가 연구에 직접 이용할 수 없다. 때문에 *Oryzias* 속에서 *O. latipes*의 장점을 공유할 수 있는 해산 송사리 모델을 개발할 필요성이 대두되었고, 이에 *O. javanicus*와 *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 *O. dancena*는 파키스탄, 인도 버마, 방글라데시, 미얀마, 태국 등지에 넓게 분포하고 있으며 (Robert, 1998), 해변에 서식하고 있어 염분 농도에 대한 내성이 강한 광염성 어류이다 (Inoue and Takei, 2003). 본 종에 대해서는 최근 삼투압 적응 메커니즘 (Inoue and Takei, 2003; Kang *et al.*, 2008), 성결정 기작 (Takehana *et al.*, 2007) 그리고 분류·계통학적 연구 (Takehana *et al.*, 2005) 등에 관한 연구결과가 보고되었지만, 그 이외에 생물학 및 유전학적

*교신저자: 김동수 Tel: 82-51-629-5914, Fax: 82-51-629-5908,
E-mail: dongskim@pknu.ac.kr

특성에 관한 연구들은 거의 보고된 바 없다.

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 근연종들일지라도 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.*, 2007; Takehana *et al.*, 2008). 특히, *O. dancena*의 경우 그 중요성에도 불구하고 성분화, 성결정 유전자 및 난발생 (embryogenesis) 등 기초적인 생리·생물학적 연구가 거의 이루어지지 못한 상태이다.

따라서 본 연구는 *O. dancena*를 해양생태계 위해성 평가용 모델 송사리로 개발하기 위한 연구의 일환으로 본 종의 초기 성분화와 생식소발달에 관한 자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 산란유도

본 실험에 사용된 *O. dancena*는 수산동식물 이식승인에 관한 규칙에 의거 (농림수산식품부령 제1호) 인도네시아에서 수입한 자연산 개체를 실험실에서 6개월간 사육하여 친어로 양성한 것이다. 사육수는 5 µm의 미세필터로 여과한 해수를 담수로 희석하여 10%기수를 제조하여 사용하였으며, 20 L의 유리수조에서 25 ± 1°C로 유지하면서 광주기 (16L : 8D)를 조절하여 산란을 유도하였다. 수정란과 부화자어를 수집하기 위하여 암컷 12마리 (평균전장: 39.08 ± 2.97 mm), 수컷 8마리 (평균전장: 41.99 ± 1.58 mm)를 교배시켰다.

2. 사육

수정란은 25 ± 1°C의 20 L 항온 부화수조로 옮겨 부화시켰으며, 부화한 자어는 초기미립자사료 (이화사료, 150 µm)와 brine shrimp (*A. nauplius* 유생)를 병행 공급하여 사육하였으며, 이때 온도와 염분도는 친어 사육 조건과 동일하게 하였다. 환수는 미리 수온을 조절하고 여과한 10% 기수를 사용하여 매일 50%씩 교환하였고 부화 후 9주까지 사육하였다.

3. 표본 채집 및 측정

조직 관찰을 위한 시료는 수정 직후부터 수정 후 9일째까지 1일 간격으로 매회 10알씩 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 고정하였다. 고정하기 전, 각 단계별 12마리씩의 자·치어를 무작위로 선별하여 전장 (total length)을 버어니어 캘리퍼스 0.01 mm까지 측정하였으며, 측정이 끝난 표본은 수정란과 같은 방법으로 고정하였다.

4. 조직학적 분석

조직학적 분석을 위하여 수정부터 부화 후 14일까지 고정한 수정란과 자·치어 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 µm의 두께로, 부화 직후부터의 자어들은 8 µm의 두께로 파라핀 연속 절편을 만들었으며, Mayer's hematoxylin과 eosin을 사용하여 표본을 염색을 한 후, 광학현미경 (Nikon, Japan) 하에서 검경하였다 (Kim *et al.*, 1990). 생식소 발달 과정 및 성분화에서의 각 단계별 특징적인 조직상은 광학현미경에 부착된 디지털 카메라 (ARTCAM-300MI, Japan)로 촬영한 후 분석하였다.

결 과

1. 사육기간에 따른 어체 성장

*O. dancena*의 수정란은 수온 25 ± 1°C에서 부화까지 평균 11일이 소요되었다. 부화 직후 개체 크기는 4.40 ± 0.24

Table 1. Total length growth of *Oryzias dancena* with function of age up to 63 days post hatching

Age (day)	Total length (mm)*
0	4.40 ± 0.24
1	4.43 ± 0.15
2	4.48 ± 0.16
3	4.55 ± 0.23
4	4.61 ± 0.22
5	4.69 ± 0.12
6	4.72 ± 0.38
9	5.22 ± 0.28
12	6.23 ± 0.41
14	7.23 ± 0.73
21	8.67 ± 0.87
28	12.95 ± 0.99
42	18.41 ± 1.81
63	22.58 ± 2.73

* Mean ± SD

mm 였으며, 8.67 ± 0.87 mm인 21일 이후로 급격히 성장하여, 부화 후 6주째에는 18.41 ± 1.81 mm에 이르렀고, 산란하는 시기인 9주째에는 22.58 ± 2.73 mm로 성장하였다. 부화 직후의 자어에서 산란까지 전장은 Table 1에 나타내었다.

2. 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 형성 부위(presumptive gonadal area)로 이동한 것이 관찰되었다.

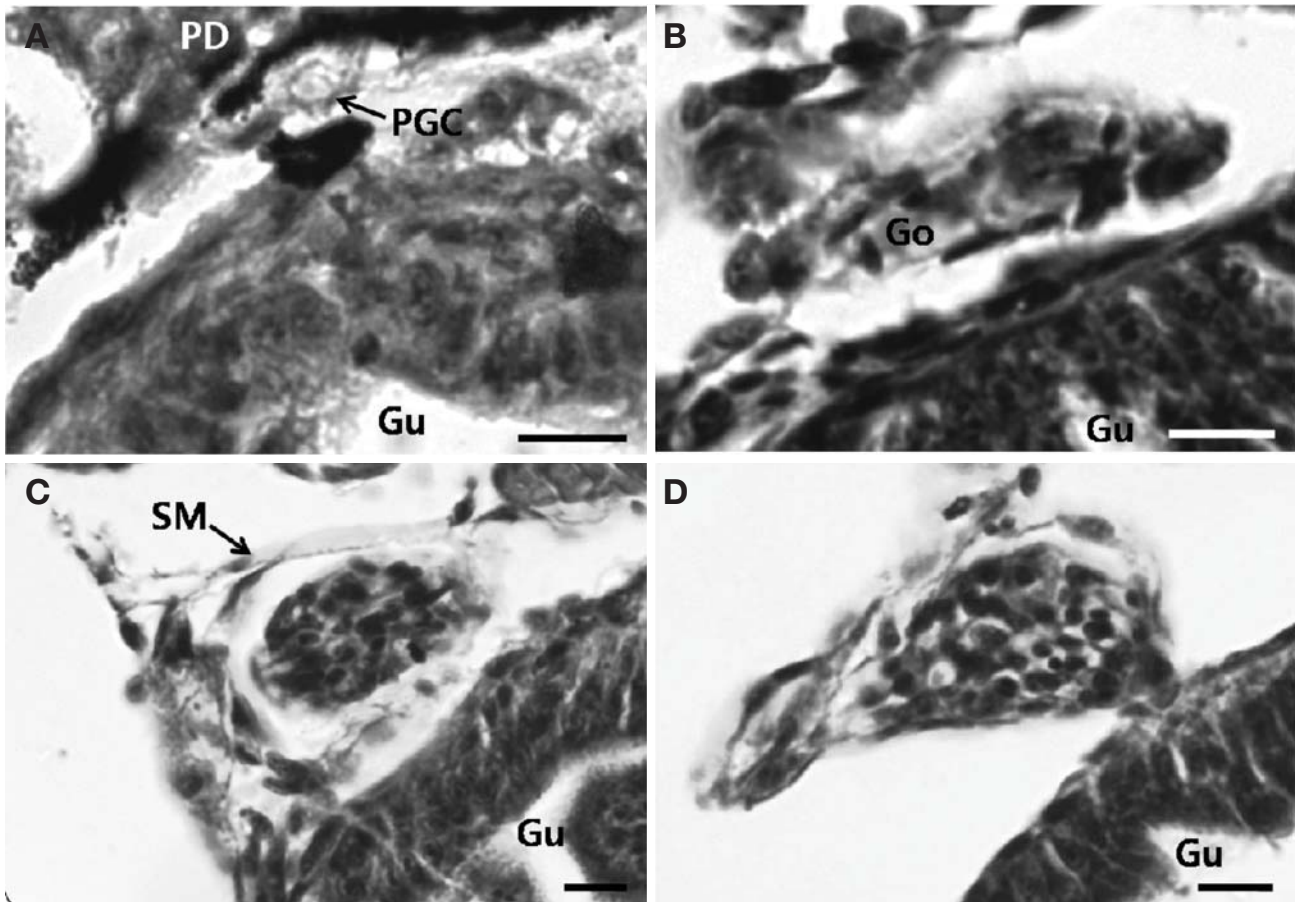


Fig. 1. Representative photographs for HE-stained cross sections of undifferentiated gonads from the *Oryzias dancena*. (A) Primordial germ cells (arrow), clearly distinguished from somatic cells, which the size of the cells and nucleus is large and the cytoplasm is dyed lightly, were migrated to the presumptive gonadal area between the gut (Gu) and pronephric duct (PD) at 9 days after fertilization. (B) Showing active somatic cell division and the number of cells increased and resulted in expansion of the size of gonads (Go) at 4 days after hatching. (C) The gonads were separated from the gut with separate membrane (SM) at 6 days after hatching. (D) The gonads were expanded with more increase in number of cells at 9 days after hatching; however, there was no morphological difference between male and female gonads until this period. All the scale bar indicate 10 μm.

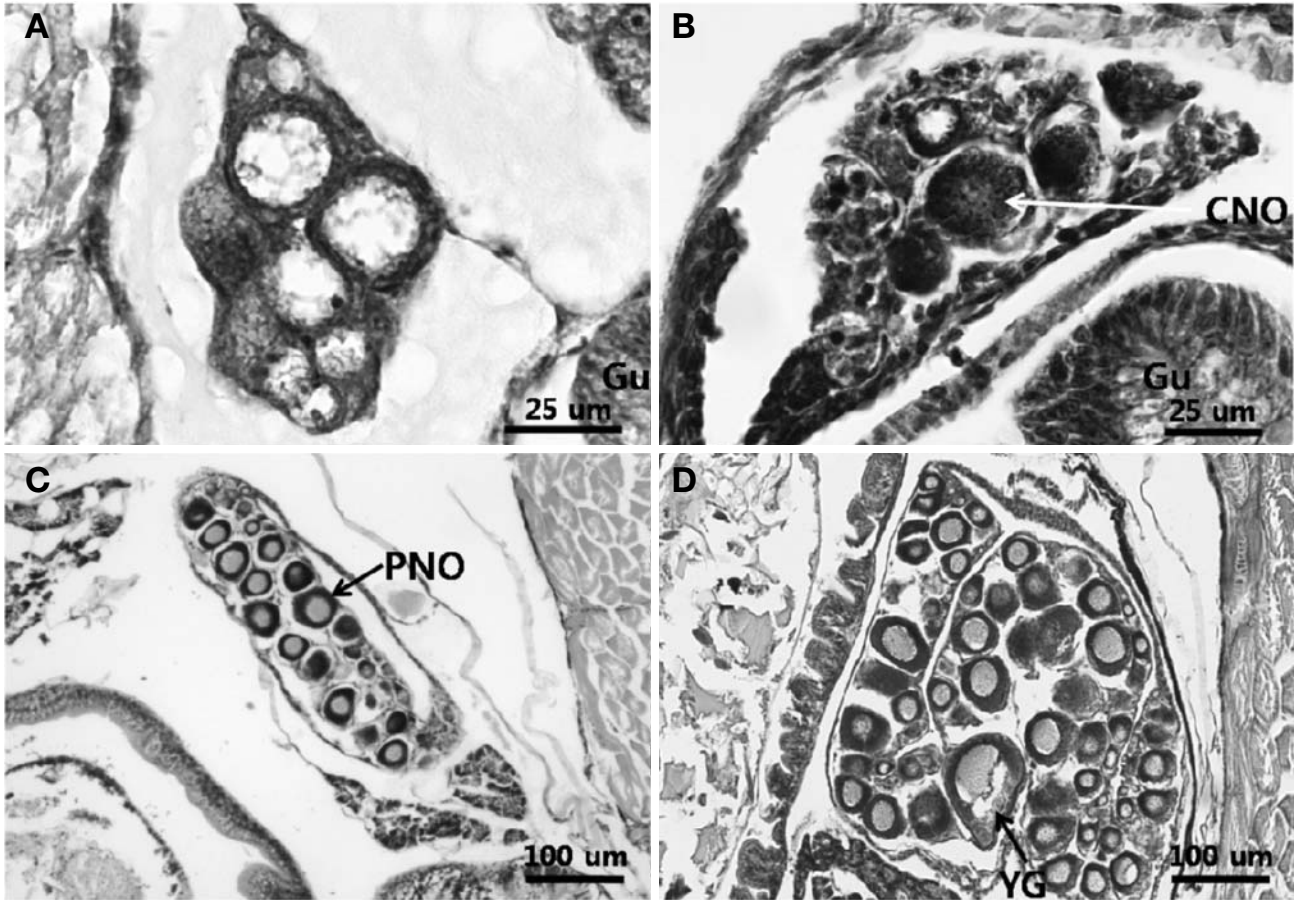


Fig. 2. Representative photographs for HE-stained cross sections of differentiated ovary from the *Oryzias dancena*. (A) The morphological differentiation of male and female gonads was first observed at 12 days after hatching and primary oocytes were identifiable at this stage. Scale bar indicates 25 μ m. (B) The oocytes in the chromatin nucleolus (CNO) were observed at 21 days after hatching. Scale bar indicates 25 μ m. (C) Early oocytes of perinucleolus stage (PNO) were observed and ovary was expanded at 28 days after hatching. Scale bar indicates 100 μ m. (D) The yolk granulations (YG) were observed around the cytoplasm at 6 weeks after hatching. Scale bar indicates 100 μ m.

원시생식세포는 세포와 핵 크기가 크고 넓게 염색된 투명한 세포질과 둥근 핵을 포함하여 체세포와 확연히 구분되는 특징을 가지고 있었다(Fig. 1A).

부화 후 2일째(평균 전장: 4.48 ± 0.16 mm)인 자어들의 생식세포에서는 체세포 분열이 일어나기 시작한 것이 관찰되었으며, 부화 후 4일째(평균 전장: 4.61 ± 0.22 mm)인 개체에서는 체세포 분열이 활발히 일어나 생식소의 크기도 신장되었다(Fig. 1B). 부화 후 6일째(평균 전장: 4.72 ± 0.38 mm)인 개체에서는 활발한 체세포 분열이 일어났으며 생식소가 장(gut)과 분리되어 별도의 막에 감싸여 있었다(Fig. 1C). 부화 후 9일째(평균 전장: 5.22 ± 0.28 mm) 되는 자어의 생식소에서는 자어의 성장과 함께 세포수가 더욱 증가하여 생식소의 크기가 더욱 증대되었으며 이 시기까지 암컷과 수컷 생식소의 형태적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1D).

3. 난소의 분화

부화 후 12일째(평균 전장: 6.23 ± 0.41)에 최초로 형태가 다른 두 종류 발달 단계의 생식소가 관찰되었다. 이때 다른 유형 중 한가지에서는 1차 난모세포가 관찰되어 난소조직으로 확인되었으며(Fig. 2A), 부화 후 21일째(평균 전장: 8.67 ± 0.87 mm)에 염색인기 난모세포(oocyte in the chromatin nucleolus, CNO)들이 나타나기 시작하였다(Fig. 2B). 부화 후 28일째(평균 전장: 12.95 ± 0.99 mm) 개체의 암컷 생식소에서는 초기 난모세포(early oocyte in the peri-nucleolus, PNO)가 난소 내에 가득 차기 시작하여 생식소의 크기도 점차 증대되었다(Fig. 2C). 6주째(평균 전장: 18.41 ± 1.81 mm)의 개체에서는 생식소의 크기가 더욱 신장하였으며, 난소 조직에서는 세포질 주변에 난황과립(yolk granule)이 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 2D). 부화 후 9주째(평균 전

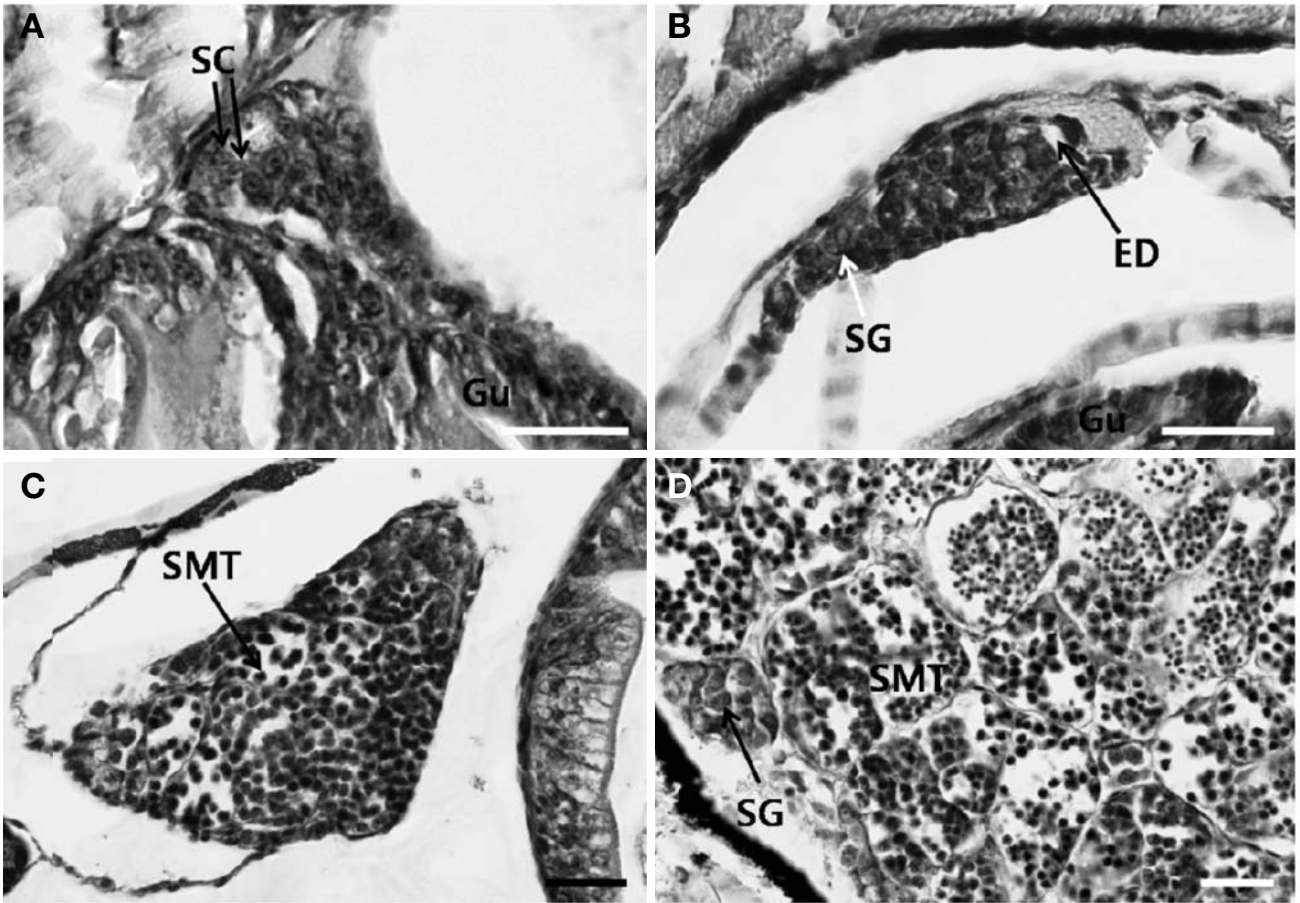


Fig. 3. Representative photographs for HE-stained cross sections of differentiated testis from the *Oryzias dancena*. (A) Sertoli-like cell (SC) and lobular structure were observed at 12 days after hatching and was not separated from the body wall and gut. (B) The gonad was separated from the body wall and gut at 21 days after hatching. Note the presence of spermatogonia (SG) and efferent duct (ED). (C) Spermatids (SMT) were observed at 28 days after hatching. (D) Many number of spermatogonium and spermatid were observed at 6 weeks after hatching. All the scale bar indicate 25 μ m.

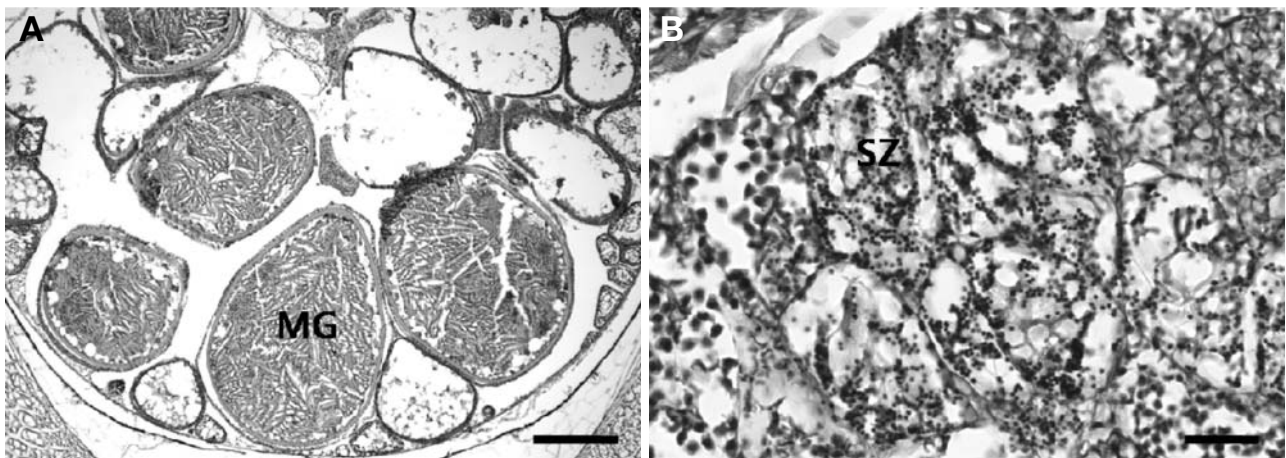


Fig. 4. Representative photographs for fully matured ovary (A) and testis (B) in *Oryzias dancena* at 9 weeks after hatching. Note the presence of mature eggs (MG) and the sign of the first ovulation in the ovary, while discharge of many spermatozoa (SZ) in the testis after spawning. Scale bar, (A) 200 μ m, (B) 25 μ m.

장: 22.58 ± 2.73 mm)의 개체에서 처음으로 배란이 이루어졌으며 조직학적 관찰 결과 난황과립이 난 전체에 형성되는 성숙난과 산란 직후 성숙난이 빠져나간 것이 관찰되었다(Fig. 4A).

4. 정소의 분화

생식소의 2가지 발달 단계 중 나머지 유형에서는 부화 후 12일째에 감수분열이 관찰되지는 않았지만, 세르토리 세포(sertoli-like cell)와 정소엽(lobular) 구조가 생식소 내에서 관찰되었고 장과 따로 분리된 형태를 띄고 있지 않았다(Fig. 3A). 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. 3B). 부화 후 28일째의 수컷 생식소에서는 정소 소관 내의 정원세포의 분열이 활발히 일어나는 것과 정세포(spermatid)들이 관찰되었다(Fig. 3C). 부화 후 6주째의 정소에서는 생식소 전체에 정소 소관이 형성되며, 많은 수의 정원세포가 분열 증식되는 것과 정세포들이 관찰되었다(Fig. 3D). 산란시기인 부화 후 9주째의 수컷 생식소에서는 정원세포는 거의 관찰되지 않고 많은 수의 정세포가 관찰되었으며 산란 직후 정자가 빠져나간 부분이 관찰되었다(Fig. 4B).

고 찰

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 *O. dancena*의 원시생식세포는 수정 후 5일째(Stage 33, Iwamatu, 2004)에 처음으로 관찰되어 *O. latipes*보다 늦게 출현하였다. 앞으로 본 연구를 바탕으로 분자생물학적 분석의 접목을 통한 *O. dancena* 원시생식세포에 관한 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

*O. javanicus*는 *O. dancena*와 함께 최근 삼투압 메커니즘과 생태 독성 실험을 위한 해양모델어류로 주목 받고 있다. 본 실험과 유사한 온도(26°C)에서 조직학적 분석 방법의 의해서 생식소 발달을 조사한 결과(Kakuno *et al.*, 2001), *O. javanicus*에서 원시생식세포의 출현은 부화 후 5일째 자어에서 관찰되어 *O. dancena*보다 느렸다. 또한, 생식소의 형태학적 성분화는 부화 후 14일째에 이루어져 성분화가 12일째에 이루어지는 *O. dancena*보다 늦게 나타났다. 따라서 *O. dancena*의 원시생식세포의 출현시기는 *O. latipes*보다 느리고, *O. javanicus*보다는 빨랐고 성분화 역시 *O. javanicus*보다 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(Satoh and Egami, 1972; Hamaguchi, 1992), *O. javanicus*는 한 쌍의 난소가 융합하여 하나의 생식소를 형성한다고 보고된 바 있다(Kakuno *et al.*, 2001). 본 연구 결과 *O. dancena*의 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.

해양에 서식하는 *Oryzias* 속 종들 중 최소 성숙년령이 보고된 종은 *O. javanicus*로서, 26°C에서 부화 후 90일째에 산란한다고 보고된 바 있다(Kakuno *et al.*, 2001). *O. dancena*의 경우는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 부화 후 60일경인 9주째에 산란을 시작하여 *O. javanicus*와 비교하여 산란 도달 성장 기간이 30일 정도 빠른 것으로 나타났다.

*Oryzias dancena*의 초기 성분화와 생식소 발달을 조직학적으로 관찰한 결과 이 종의 형태학적 성분화는 부화 후 12일째에 나타났으며, 최초 산란은 부화 후 9주째에 가능한 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과는 앞으로 이 종의 성전환 실험, 생태독성 실험과 발생유전학 등 해양생태계 위해성 평가를 위한 연구의 기초자료를 제공할 것으로 생각된다.

요 약

*Oryzias dancena*를 해양생태계 위해성 평가를 위한 해양 생물모델로 연구하기 위한 기초적인 연구로 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 정자가 빠져나간 부분이 관찰되었다. 이상의 결과 본 종은 초기 성분화 과정에 자성 단계를 거치지 않고 정소와 난소로 분화하는 분화형 자웅이체에 속한다.

사 사

본 연구는 국토해양부 해양환경복원기술개발사업 (과제번호 20088033-1)의 지원에 의해 수행되었습니다.

인 용 문 헌

- 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.
- Hamaguchi, S. 1992. Sex differentiation of germ cells and their supporting cells in *Oryzias latipes*. *The Fish Biology Journal Medaka*, 4: 11-17.
- Herpin, A., S. Rohr, D. Riedel, N. Kluever, E. Raz and M. Schartl. 2007. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Development Biology*, 7: 3.
- 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. Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. *BioEssays*, 22: 487-495.
- Iwamatsu, T. 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, 121: 605-618.
- 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⁺/K⁺-ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 151: 566-575.
- Kim, D.S., I.C. Bang and I.B. Kim. 1990. Gonadal sex differentiation in *Misgurnus mizolepis*. *Korean J. Ichthyol.*, 2: 95-105.
- Kurokawa, H., Y. Aoki, S. Nakamura, Y. Ebe, D. Kobayashi and M. Tanaka. 2006. Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*. *Develop. Growth Differ.*, 48: 209-221.
- 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.
- 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.
- Parenti, L.R. and B. Soeroto. 2004. *Adrianichthys roseni* and *Oryzias nebulosus*, two new ricefishes (Atherinomorpha: Belontiiformes: Adrianichthyidae) from Lake Poso, Sulawesi, Indonesia. *Ichthyol. Res.*, 51: 10-19.
- 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.
- 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.
- 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., D. Demiyah, K. Naruse, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi. 2007. Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*. *Genetics*, 175: 1335-1340.
- 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.
- 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.
- 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 a live vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 98: 2544-2549.

Wittbrodt, J., A. Shima and M. Schartl. 2002. Medaka-a model organism from the far east. *Nat. Rev. Genet.*, 3: 53-64.

Yamamoto, T. 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S. and D.J. Randall (eds.), *Fish Physiology*, Vol. 3 Academic Press, New York, pp. 117-175.