

해산송사리(*Oryzias dancena*) 2배체와 유도 3배체 조직의 세포주기 비교

박인석*

한국해양대학교 해양과학기술대학 해양생명과학부

A comparative analysis of cell cycles in diploid and induced triploid tissues in marine medaka (*Oryzias dancena*)

In-Seok Park*

Division of Marine Bioscience, College of Ocean Science and Technology, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Republic of Korea

*Corresponding author

In-Seok Park
Tel. 051-410-4321
E-mail. ispark@kmou.ac.kr

Received: 26 November 2019

Revised: 17 December 2019

Revision accepted: 17 December 2019

Abstract: The aim of this study was to conduct a comparative analysis of the diploid and induced triploid cell cycles in marine medaka, *Oryzias dancena*, tissues. The mean fraction of cells in the G₁, S, and G₂ + M phases was 85.5%, 7.6%, and 6.9%, respectively, in the tail fin tissues of diploid fish and 91.2%, 3.6%, and 5.2%, respectively, in those of induced triploid fish. The mean fraction of cells in the G₁, S, and G₂ + M phases were 78.4%, 10.6%, and 11.0%, respectively, in the liver tissues of diploid fish; 86.2%, 5.9%, and 7.9%, respectively, in those of induced triploid; 79.3%, 9.4%, and 11.3%, respectively, in the gill tissues of diploid fish; and 85.7%, 5.4%, and 8.9%, respectively, in the induced triploid fish. The differences among the tissues were statistically significant within both the diploid and induced triploid fish ($p < 0.05$). Mitosis was more active in each tissue of the diploid fish than in the corresponding tissues of the induced triploid fish and mitosis was more active in the liver and gill tissues than in the tail fin tissues in both the diploid and induced triploid marine medaka.

Keywords: cell cycle, marine medaka (*Oryzias dancena*), diploid, induced triploid

서 론

해산송사리 (marine medaka, *Oryzias dancena*)는 담수와 기수에 서식하는 최대 전장이 3.1 cm에 이르는 소형 어류로, 인도, 방글라데시, 스리랑카, 미얀마 및 태국 등지에서 서식한다(Abraham 2011). 본 종은 전장 약 3 cm 정도의 소형이고, 미립자 시판사료나 먹이생물인 brine shrimp (*Artemia salina*)의 nauplius로도 수월한 사육(Lim *et al.*

2012; Im *et al.* 2016), 담수에서 해수까지에 이르며 사육 가능한 광역성(euryhaline) (Inoue and Takei 2003; Kang *et al.* 2008; Cho *et al.* 2010a), 손쉬운 산란유도 및 인공수정(Lim *et al.* 2012; Im *et al.* 2016), 부화 후 2~3개월에 생식 가담 가능함(짧은 generation time) (Lim *et al.* 2012) 및 암·수 성적이형(sexual dimorphism)이 명확함(Im *et al.* 2016)으로 인해 한국에서는 실험동물인 일본송사리(*O. latipes*)와의 관련 연구에 있어 그 특성이 비견하거나 월등하다고 가치

성이 인식되어 우수한 실험동물로 각광받고 있다. 이와 같은 연유로서 Institute of Marine Living Modified Organisms (iMLMO)에서 living modified organism (LMO) evaluation project의 검증 model animal로 선정·연구된 바 있다(Cho *et al.* 2010a, b, 2012; Im *et al.* 2016).

실험동물로서 가치성을 지닌 해산송사리를 대상으로 한 유도 3배체 관련 연구로는 유도 3배체와 2배체와의 세포 및 핵 크기 비교(Goo *et al.* 2015), 성장과 생식소 성숙 비교(Park *et al.* 2016a), 세포유전학적 연구(Park *et al.* 2016b), 유도 3배체에서의 amitosis-like 핵분열 현상(Park and Choi 2018), 배수화와 sex에 따른 비대칭(Park and Gil 2018) 및 유도 3배체의 계측형질 특성(Park *et al.* 2018)이 보고된 바 있다.

어류에서의 3배체(triploid)는 자연계에서도 발견되며, 수산양식 산업에서는 어류 유도 3배체가 생식세포분열(meiosis)시 상동염색체의 짝짓기의 이상에 기인되어 배우자를 형성하지 못함으로 인해 그 기능적 불임의 효과를 이용하고 있다(Thorgaard 1983; Yoo *et al.* 2018). 이와 같은 수산양식 대상 어류 유도 3배체는 그 자체의 불임으로 인한 생식에 사용되는 에너지를 체성장으로 재회수 함으로써 성적 성숙기나 산란기에 2배체에 비해 지속적인 성장을 보이며, 수산양식 산업의 관점에서 불리한 요소인 어류 2배체에서 나타나는 식욕 감퇴, 사료효율 감소, 육질 감소 및 1회 산란 후 사망하는 연어과 어류나 은어(*Plecoglossus altivelis*)의 산란 후 사망을 방지할 수 있는 방편으로 어류 3배체가 유도되고 있다(Thorgaard 1983; Park and Kim 1994; Kim *et al.* 1994; Kim *et al.* 2001; Goo *et al.* 2015; Yoo *et al.* 2018). 아울러 어류 유도 3배체 기법은 생산된 유도 3배체의 불임으로 인해 외래 유입종이나 LMO의 자연수계로의 탈출로 인한 수계 생태계로의 오염을 제거하거나 감소시키는 효과적인 방편으로도 사용되고 있다(Kim *et al.* 1994; Dunham and Devlin 1999; Cho *et al.* 2012).

유세포분석기(flow cytometry)는 유액 상태의 세포 집단을 대상으로 세포 크기, 세포 내부 조성 정도, 세포주기(cell cycle) 분석 및 세포 기능 인지 등과 같은 한 세포가 갖는 여러 특징을 분석 가능하다(Vanparys *et al.* 2006). 최근 기기 발전, 환산 방법 개선과 향상된 시약 기능 등으로 유세포분석기는 DNA 함량 분석에 그 사용 효과의 장래성을 보이고 있다(Estevam *et al.* 2011). 최근, Gil *et al.* (2017)은 2배체와 유도 3배체 메기(*Silurus asotus*)의 꼬리지느러

미 조직과 아가미 조직을 대상으로 세포주기를 조사, 분석 비교한 결과, 메기 2배체와 유도 3배체 조직에서의 세포주기가 유의한 차이를 보인다고 보고한 바 있다. 본 연구는 해산송사리 2배체와 유도 3배체에서의 세포주기를 유세포분석기를 사용하여 꼬리지느러미, 간 및 아가미 각 조직별 비교하여 그 차이를 2배체, 유도 3배체 및 조사된 각 조직들에서의 생리적인 물질대사 측면에서 분석·논의하고자 한다.

재료 및 방법

해산송사리(*Oryzias dancena*) 유도 3배체는 Goo *et al.* (2015)의 방법에 의거 수정 후 45분에 4°C의 수온으로 수정난을 2분간 처리하여 생산하였다. 이후, 유도 3배체 처리군과 2배체군은 Park *et al.* (2011)의 방법으로 사용하였으며, 부화 후 3개월에 유 세포분석기(PA-II, Partec, Germany)로 3배체 처리군을 대상으로 배수화 분석 후 유도 3배체를 선별하였다. Park *et al.* (2011)의 해산송사리 마취법을 기준으로 100 ppm의 clove oil (85% eugenol 포함; Sigma, St. Louis, MO, USA)로 2배체와 유도 3배체군에서의 각 개체들을 마취 후 꼬리지느러미 끝 일부분 조직을 표본하였다. 표본된 각 꼬리지느러미로부터의 10⁶개 세포를 모아서 상온, 암조건으로 15분간 high-resolution DNA staining kit (Partec, GmbH, Germany)로 염색하였다. 염색된 각 세포들은 유세포분석기로 상대적 DNA 함량을 파악하여 유도 3배체를 선별하였다.

부화 1년 후 해산송사리 2배체군과 유도 3배체군을 대상으로 100 ppm clove oil로 마취 후 꼬리지느러미, 간 및 아가미 조직을 각각 채취하였다. 표본된 꼬리지느러미, 간 및 아가미 조직은 10 mL의 냉 70% ethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 고정 후 부유된 세포들은 30 μm로 여과 후 4°C에서 냉장보관 하였다. 해산송사리 2배체군과 유도 3배체군의 각 개체로부터의 10⁶개의 세포들을 high-resolution DNA staining kit로 상온, 암조건 하에서 15분간 염색하였다. 세포주기 파악을 위하여 유세포분석기로 해산송사리 2배체군, 유도 3배체군 세포 집단에서의 gap 1 (G₁), synthesis (S) 및 gap 2 + mitosis (G₂ + M)기의 백분율을 각각 계산하였다. 각 실험군 간 유의성 차이는 SPSS (Spss 9.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)로 Student's *t*-test

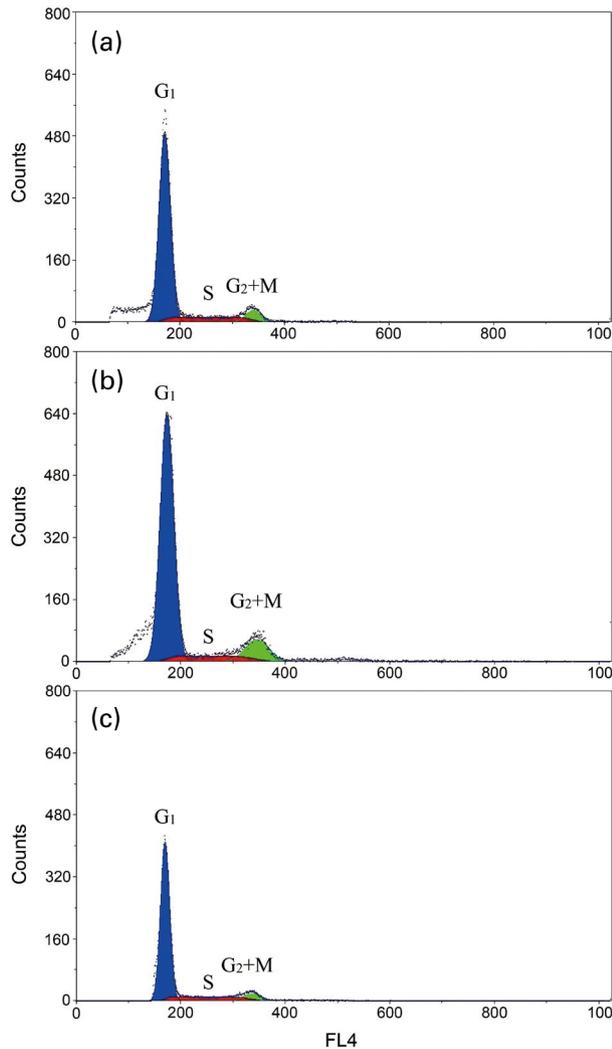


Fig. 1. DNA histograms of tail fin tissue, liver tissue, and gill tissue of the diploid marine medaka, *Oryzias dancena*. (a) Tail fin tissue, (b) liver tissue, and (c) gill tissue. Each cell cycle fraction is indicated, with background correction. FL4 is the analysis pattern of the flowcytometric analyzer. G₁: gap 1; S: synthesis; G₂: gap 2; M: mitosis.

($n=20$, 3반복 실험, $p<0.05$) 검증하였다.

결과 및 고찰

세포주기에 관한 대부분의 유세포분석기 기법은 G₁, S 및 G₂+M기에 세포들의 분포에 의해 결정된다(Dean and Jett 1974). Fig. 1과 Fig. 2는 2배체와 유도 3배체 해산송사리 (*Oryzias dancena*)의 꼬리지느러미 조직, 간 조직 및 아

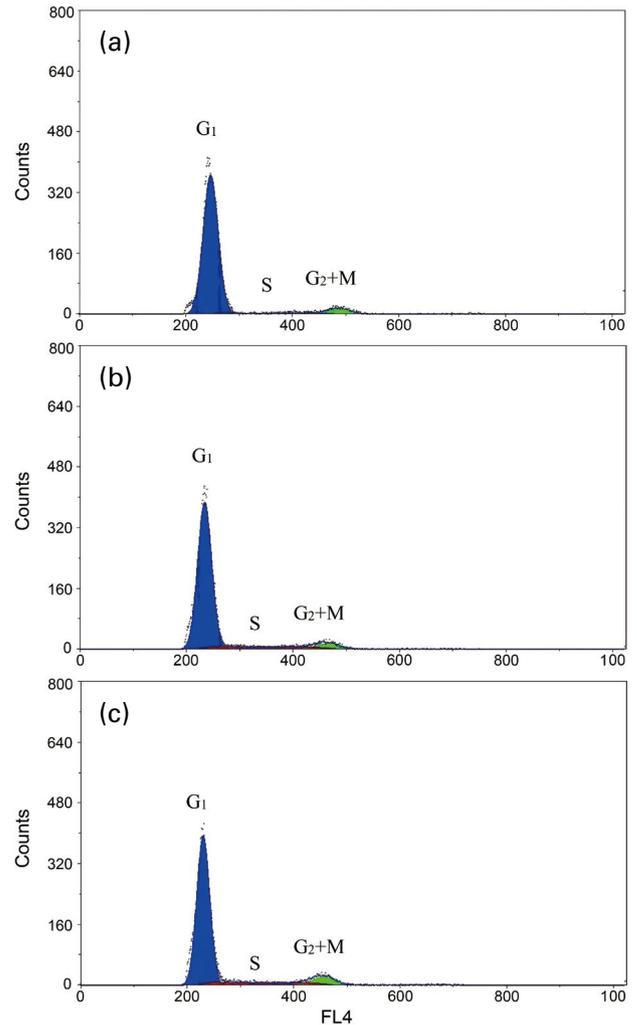


Fig. 2. DNA histogram of tail fin tissue, liver tissue, and gill tissue of the induced triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. (a) Tail fin tissue, (b) liver tissue, and (c) gill tissue. Each cell cycle fraction is indicated, with background correction. FL4 is the analysis pattern of the flow-cytometric analyzer. G₁: gap 1; S: synthesis; G₂: gap 2; M: mitosis.

가미 조직의 histogram을 각각 나타낸 것으로 background correction도 나타나 있다. Fig. 1에서 나타나듯이 해산송사리 2배체 세포의 G₁, S 및 G₂+M기 해당 빈도는 꼬리지느러미 조직, 간 조직 및 아가미 조직에서 80.5%, 12.6%, 6.9%와 79.0%, 8.9%, 12.0% 및 78.2%, 14.5%, 6.7%를 각각 보였다. Fig. 2에서 나타나듯이 해산송사리 유도 3배체 세포의 G₁, S 및 G₂+M기 해당 빈도는 꼬리지느러미 조직, 간 조직 및 아가미 조직에서 89.6%, 4.6%, 5.8%와 84.0%, 10.4%, 5.6% 및 80.2%, 11.7%, 8.1%를 각각 보였다.

Table 1. Cell fractions according to ploidy and tissue type in the marine medaka, *Oryzias dancena*

Mean fraction percentage (%)	Diploid ^a			Induced triploid ^a		
	G ₁	S	G ₂ +M	G ₁	S	G ₂ +M
Tail fin	85.5±5.58 ^a	7.6±2.71 ^a	6.9±3.87 ^a	91.2±5.71 ^a	3.6±0.74 ^a	5.2±1.05 ^a
Liver	78.4±3.69 ^b	10.6±2.66 ^b	11.0±3.52 ^b	86.2±5.98 ^b	5.9±0.58 ^b	7.9±1.51 ^b
Gill	79.3±3.69 ^b	9.4±2.66 ^b	11.3±3.52 ^b	85.7±5.98 ^b	5.8±0.58 ^b	8.5±1.51 ^b

^aValues are means ± SD. Values in the same row with different superscripts are significantly different ($n=20$, $p<0.05$). G₁: gap 1; S: synthesis; G₂: gap 2; M: mitosis.

꼬리지느러미 조직과 비교 시 간 조직과 아가미 조직은 G₁, S 및 G₂+M기 그리고 2배체 유도 3배체에서 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$) (Table 1). 유도 3배체 각 조직들은 2배체 각 조직들에 비해 세포주기 각 단계에서 Park *et al.* (2016b)의 결과와 동일하게 DNA함량 증가 경향을 보였으며, 세포주기를 고려 시 G₂+M기에서 2배체는 유도 3배체에 비해 1.3~1.4배를 보이고 특히, 조사된 조직 중 아가미 조직은 1.4배의 높은 G₂+M기 분포를 보였다 (Table 1). Gil *et al.* (2017)은 메기 (*Silurus astous*) 2배체와 유도 3배체를 대상으로 유세포분석기를 사용하여 꼬리지느러미 조직과 아가미 조직에서 본 실험과 같은 세포주기를 조사한 결과, 본 실험과 유사한 세포주기 경향을 보고한 바 있다. 메기 2배체와 유도 3배체의 모든 각 조직, 각 세포주기에서 본 실험 결과와 동일하게 꼬리지느러미 조직의 세포 분포 비율이 아가미 조직의 세포 분포 비율에 비해 유의하게 낮게 나타나서, 꼬리지느러미 조직이 아가미 조직, 간 조직에 비해 세포분열이 낮음을 보였다 (Gil *et al.* 2017).

어류에서 2배체에 대한 유도 3배체의 본 연구 결과와 같은 낮은 세포분열 경향은 여타 연구에서는 낮은 물질대사에 기인된 다양한 생리현상으로 나타나, 산천어 (*Oncorhynchus masou*) 유도 3배체는 2배체에 비해 적혈구 수는 감소되고 여러 혈액 성상은 높게 나타나고, 산소 소비량 및 호흡율에 있어 높은 값을 보인 바 있다 (Park and Kim 1994; Park and Park 1995). 이런 현상은 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)와 미꾸리 (*M. anguillicaudatus*)의 잡종 3배체화시 유도된 잡종 3배체는 3배체화에 기인되어 이들의 잡종에 비해 적혈구 세포 및 핵 크기, 망막 내과립층 horizontal cell 핵 크기, 망막신경절 신경세포층의 신경 세포, 시개과립층의 신경세포 핵 및 trunk kidney 2차 근위뇨세관 세포 및 핵 크기에서 증가한 반면, 망막 외과립층 수와 2차 근위뇨세관 핵 수에서는 감소를 보였다 (Park and Kim 2000). 이와 유사하게, 2배체에 대비한 유도 3배체의

낮은 생리현상은 메기 유도 3배체에서도 나타나, 메기 유도 3배체는 메기 2배체에 비해 적혈구 수는 감소된 반면, 여러 혈액 성상과 호흡 빈도에서 높은 수치를 보였으며, 낮은 혈장 cortisol과 glucose 농도를 보인 바 있다 (Seol *et al.* 2008; Lim *et al.* 2017, 2018; Lee *et al.* 2018). 이와 같이 어류 3배체에서 세포 크기 증가에도 불구하고 그 세포 수 감소와 이에 따르는 여러 낮은 생리 현상은 어류 3배체화시 배수화에도 불구하고 거대화 (gigantism) 효과가 나타나지 않는 이유이다 (Ueno 1984; Sezaki *et al.* 1988; Park and Park 1995). 이와 더불어 Wolters *et al.* (1982)와 Lincoln and Bye (1984)가 지적했듯이 어류 유도 3배체는 3배체화시 정상 2배체에 대비한 유도 3배체 자체의 유전물질 증가 (염색체 배수화: 돌연변이)에 따른 shy함에 따라 불가피하게 2배체와 유도 3배체를 혼합사육시 유도 3배체가 2배체와의 먹이경쟁에서 뒤처지기 때문에, 이를 극복하기 위해 3배체 유도 시 높은 3배체 유도율이 필요한 이유이기도 하다.

본 연구에 사용된 실험어 해산송사리 유도 3배체는 이미 Park *et al.* (2016a)이 보고한 연구 결과, 생식소속도 지수, 생식소의 조직학적 조사, testosterone과 estradiol-17 β 의 성호르몬 수준에서 불임을 보이며 아울러, 그 불임 정도가 수컷보다는 암컷에서 현저함을 보인 바 있다. 이와 같이 해산송사리 유도 3배체는 명확한 불임을 보이고는 있으나, 해산송사리 2배체에 비해 망막을 구성하는 각 층에서 크게 나타나며 망막의 outer layer cell nucleus 수는 2층으로 2배체의 3층에 비해 그 수가 적었으며 (Goo *et al.* 2015), 비정형 적혈구 출현 빈도가 높았고 (Park and Choi 2018), fluctuating asymmetry (발생 비대칭성)이 높게 나타난 바 있다 (Park and Gil 2018). 본 연구 결과, 해산송사리 유도 3배체는 2배체에 비해 세포주기가 늦어 생리적으로 지연됨을 보였으며, 세포주기 분석에 사용시 꼬리지느러미보다는 간 조직 및 아가미 조직이 세포분열 활성이 높아 꼬리지느러미보다는 간 및 아가미의 조직이 세포주기 분석에

더욱 유리함을 알 수 있었다. 본 연구와 더불어 어류 유도 3배체의 세포주기와 연관된 물질대사 측면에서의 차후 부가적인 생리학적 연구가 필요하리라 사료된다.

적 요

해산송사리, *Oryzias dancena* 2배체와 유도 3배체 각 조직에서의 세포주기를 비교, 분석하였다. G₁, S, G₂+M기의 분포 빈도에서 꼬리지느러미인 경우 2배체에서는 85.8%, 7.6% 및 6.9%이었으며 유도 3배체에서는 91.2%, 3.6% 및 5.2%이었다. 간 조직인 경우 2배체에서는 78.4%, 10.6%, 및 11.0%이었으며 유도 3배체는 86.2%, 5.9% 및 7.9%이었다. 아가미 조직인 경우 2배체에서는 79.3%, 9.4% 및 11.3%이었으며 유도 3배체는 85.7%, 5.4% 및 8.9%이었다. 2배체와 유도 3배체에서 조직 간 세포 주기 빈도에서 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). Mitosis (체세포분열)은 유도 3배체에 비해 2배체가 더욱 활성이 있었으며, 이러한 체세포분열은 2배체와 유도 3배체 모두에서 꼬리지느러미 조직 보다 간 조직과 아가미 조직에서 더욱 왕성하였다.

사 사

본 논문의 수준과 완성도를 높여 주신 익명의 심사자들에게 감사드립니다. 본 연구는 교육부의 연구윤리 확보를 위한 지침(교육부 훈령 제153호)과 식품의약품 안전처의 실험동물에 관한 법률(법률 제15278호) 기준을 준수하였으며, 아울러 한국해양대학교 연구윤리를 준수하였습니다.

REFERENCES

Abraham D. 2011. "*Oryzias dancena*." The IUCN Red List of Threatened Species. eT172326A6868382. International Union for Conservation of Nature. Gland, Switzerland.

Cho YS, SY Lee, DS Kim and YK Nam. 2010a. Tolerance capacity to salinity change in adult and larva of *Oryzias dancena*, a euryhaline medaka. Korean J. Ichthyol. 22:9-16.

Cho YS, SY Lee, DS Kim and YK Nam. 2010b. Spawning performance, embryonic development and early viability under different salinity conditions in a euryhaline medaka species,

Oryzias dancena. Korean J. Ichthyol. 22:25-33.

Cho YS, SY Lee, DS Kim and YK Nam. 2012. Characterization of stable fluorescent transgenic marine medaka (*Oryzias dancena*) lines carrying red fluorescent protein gene driven by myosin light chain 2 promoter. Transgenic Res. 22:849-859.

Dean PN and J Jett. 1974. Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. J. Cell Biol. 60:523-527.

Dunham RA and RH Devlin. 1999. Comparison of traditional breeding and transgenesis in farmed fish with implications for growth enhancement and fitness. pp. 209-229. In Transgenic Animals in Agriculture (Murray JD, GB Anderson, AM Oberbauer and MN McGloughlin eds.). CAB International, New York.

Estevam J, H Danaee, R Liu, J Ecsedy, W Trepicchio and T Wyant. 2011. Validation of a flow cytometry based G₂M delay cell cycle assay for use in evaluating the pharmacodynamic response to Aurora A inhibition. J. Immunol. Methods 363:135-142.

Gil HW, TH Lee, HJ Han and IS Park. 2017. Comparative analysis of tissue and cell cycle on the for eastern catfish, *Silurus asotus* between diploid and triploid. Dev. Reprod. 21:193-204.

Goo IB, JH Im, HW Gil, SG Lim and IS Park. 2015. Comparison of cell and nuclear size difference between diploid and induced triploid in marine medaka, *Oryzias dancena*. Dev. Reprod. 19:127-134.

Im JH, HW Gill, TH Lee, HJ Kong, CM Ahn, BS Kim, DS Kim, CI Zhang and IS Park. 2016. Morphometric characteristics and fin dimorphism between male and female on the marine medaka, *Oryzias dancena*. Dev. Reprod. 20:331-347.

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.

Kang CK, SC Tsai, TH Lee and PP 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. Comp. Biochem. Physiol. A 151:566-576.

Kim DS, HJ Cho, IS Park, GC Choi and YK Nam. 2001. Cytogenetic traits and gonad development of induced triploidy in far eastern catfish, *Silurus asotus*. Korean J. Genetics 23:55-62.

Kim DS, JY Jo and TY Lee. 1994. Introduction of triploidy in mud loach, *Misgurnus mizolepis* and its effect on gonad development and growth. Aquaculture 120:263-270.

Lee HB, DS Kim, HW Gil and IS Park. 2018. Physiological response of diploid and triploid far eastern catfish, *Silurus asotus* to water temperature stress. Dev. Reprod. 22:165-174.

Lim HB, DS Kim, HW Gil and IS Park. 2018. Physiological responses of diploid and triploid far eastern catfish, *Silurus*

- asotus* to water temperature stress. Dev. Reprod. 22:165-174.
- Lim SG, HK Han, KS Kim, BS Kim, HM Baek, IS Park and HW Gil. 2012. Observations on the reproductive behavior of the marine medaka, *Oryzias dancena*. Korean J. Ichthyol. 24:220-226.
- Lim SY, HW Gil and IS Park. 2017. Change of various characteristics between spawning and non-spawning season in diploid and induced triploid Far Eastern catfish, *Silurus asotus*. Dev. Reprod. 21:275-286.
- Lincoln RF and V Bye. 1984. Triploid rainbows show commercial potential. Fish Farmer 7:30-32.
- Park IS and CY Choi. 2018. Occurrence of amitosis-like nuclear division in erythrocytes of induced triploid Far Eastern catfish, *Silurus asotus* and marine medaka, *Oryzias dancena*. JFMSE 30:1519-1527.
- Park IS and DS Kim. 2000. Comparison of some tissues in diploid and triploid hybrid between mud loach, *Misgurnus mizolepis* and cyprinid loach, *M. anguillicaudatus*. Dev. Reprod. 4:19-28.
- Park IS and HB Kim. 1994. Induction of triploid cherry salmon, *Oncorhynchus masou*. J. Aquacult. 7:207-223.
- Park IS and HW Gil. 2018. Comparative analysis of fluctuating asymmetry between ploidy and sex in marine medaka, *Oryzias dancena*. Dev. Reprod. 22:275-281.
- Park IS and KY Park. 1995. Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid in cherry salmon, *Oncorhynchus masou*. J. Aquacult. 8:21-29.
- Park IS, HW Gil and DS Kim. 2018. Morphometric characteristics of diploid and triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. Dev. Reprod. 22:183-192.
- Park IS, HW Gil, TH Lee, YK Nam and DS Kim. 2016a. Comparative study of growth and gonad maturation in diploid and triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. Dev. Reprod. 20:305-314.
- Park IS, HW Gil, TH Lee, YK Nam, MG Ko and DS Kim. 2016b. Cytogenetic study of diploid and triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. Korean J. Ichthyol. 28:215-222.
- Park IS, SJ Park, HW Gil, YK Nam and DS Kim. 2011. Anesthetic effects of clove oil and lidocaine-HCl on marine medaka, *Oryzias dancena*. Lab Anim. 40:45-51.
- Seol DW, SY Im, WJ Hur, MO Park, DS Kim, JY Jo and IS Park. 2008. Haematological parameters and respiratory function in diploid and triploid Far Eastern catfish, *Silurus asotus*. Genes Genom. 30:205-213.
- Sezaki K, S Watbe and K Hashimoto. 1988. Haematological parameters and erythrocyte enzyme activities associated with increase in ploidy status of the spinous loach, *Cobitis biwae* Jordan and Snyder. J. Fish Biol. 32:149-150.
- Thorgaard GH. 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. pp. 405-434. In Fish Physiology (Hoar WS, DJ Randall and EM Donaldson eds.), Vol. IX B. Academic Press, New York.
- Ueno K. 1984. Induction of triploid carp and their haematological characteristics. Jpn. J. Genet. 59:585-591.
- Vanparys C, M Maras, M Lenjou, J Robbens, D van Bockstaele, R Blust and W de Coen. 2006. Flow cytometric cell cycle analysis allows for rapid screening of estrogenicity in MCF-7 breast cancer cells. Toxicol. Vitro 20:1238-1248.
- Wolters WR, GS Libey and CL Chrisman. 1982. Effects of triploidy on growth and gonad development of channel catfish. Trans. Am. Fish. Soc. 111:102-105.
- Yoo GY, TH Lee, HW Gil, SG Lim and IS Park. 2018. Cytogenetic analysis of hybrids and hybrid triploids between the river puffer, *Takifugu obscurus*, and the tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Aquacult. Res. 49:637-650.