



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

붉바리 (*Epinephelus akaara*) 초기 성장
단계에 따른 망막의 발달과 opsin 유전자의
발현 양상

제주대학교 대학원

해양생명과학과

김 은 수

2017년 8월



Retinal development and opsin gene
expression during the juvenile development
in red spotted grouper (*Epinephelus akaara*)

Eun-Su Kim

(Supervised by Professor Young-Don Lee)

A thesis submitted in partial Fulfillment of the requirement
for the Degree of Master of Science

MARINE LIFE SCIENCE GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

AUGUST 2017

붉바리 (*Epinephelus akaara*) 초기 성장
단계에 따른 망막의 발달과 opsin 유전자의
발현 양상

지도교수 이 영 돈

김 은 수

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2017년 8월

김은수의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 여 인 규 (인)

위 원 김 기 영 (인)

위 원 이 영 돈 (인)

제주대학교 대학원

2017년 8월

목차

목차.....	I
List of Figure.....	III
List of Table.....	V
Abstract.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료 및 방법	
1. 실험어.....	6
2. 붉바리 초기 성장 단계에 따른 망막의 발달	
1) 붉바리 자치어의 형태 발달 및 행동 특성.....	7
2) 붉바리 자치어 망막의 발달.....	7
3. Opsin 유전자의 발현 양상	
1) Opsin 유전자 partial cloning.....	8
2) Opsin 유전자의 조직발현 및 성장단계별 발현 양상 분석을 위한 Total RNA 추출 및 cDNA 합성.....	10
3) Opsin 유전자의 발현 양상 분석을 위한 Real-time quantitative PCR.....	14
4. 통계처리.....	14
III. 결과	

1. 붉바리 자치어의 형태 발달과 행동특성.....	15
2. 붉바리 자치어 망막의 구조와 발달.....	18
3. Opsin 유전자의 partial cloning.....	21
4. Opsin 유전자의 조직별 발현.....	30
5. 성장단계에 따른 Opsin 유전자의 발현 양상.....	33
IV. 고찰.....	39
참고문헌.....	42

List of Figure

Fig. 1. Photographs in each growth stage of red spotted grouper.....	16
Fig. 2. Retinal pigmentation of early growth stage in red spotted grouper.....	17
Fig. 3. Retinal development of each growth stage in red spotted grouper by HE stain.....	19
Fig. 4. Nucleotide sequence of SWS2 opsin in red spotted grouper.....	22
Fig. 5. Phylogenetic relationship of SWS2 opsin in red spotted grouper and other fishes.....	23
Fig. 6. Nucleotide sequence of MWS opsin in red spotted grouper.....	24
Fig. 7. Phylogenetic relationship of MWS opsin in red spotted grouper and other fishes.....	25
Fig. 8. Nucleotide sequence of LWS opsin in red spotted grouper.....	26
Fig. 9. Phylogenetic relationship of LWS opsin in red spotted grouper and other fishes.....	27
Fig. 10. Nucleotide sequence of Rod opsin in red spotted grouper.....	28
Fig. 11. Phylogenetic relationship of Rod opsin in red spotted grouper and other fishes.....	29
Fig. 12. Tissue expression in adult red spotted grouper.....	31
Fig. 13. SWS2 opsin mRNA expression of each growth stage red spotted grouper by real-time quantitative PCR.....	34
Fig. 14. MWS opsin mRNA expression in each growth stage of red spotted grouper	

by real-time quantitative PCR.....	35
Fig. 15. LWS opsin mRNA expression in each growth stage of red spotted grouper by real-time quantitative PCR.....	36
Fig. 16. Rod opsin mRNA expression in each growth stage of red spotted grouper by real-time quantitative PCR.....	37
Fig. 17. Compared opsin genes expression in each growth stage of red spotted grouper.....	38

List of Table

Table 1. Primer sequence for opsin gene cloning.....	9
Table 2. Primer sequence for RT-PCR.....	12
Table 3. Primer sequence for real-time quantitative PCR.....	13
Table 4. Relative changes in thickness of retinal layers in each growth stage red spotted grouper.....	20
Table 5. The homologies of SWS2 opsin gene protein sequence of red spotted grouper.....	22
Table 6. The homologies of MWS opsin gene protein sequence of red spotted grouper.....	24
Table 7. The homologies of LWS opsin gene protein sequence of red spotted grouper.....	26
Table 8. The homologies of Rod opsin gene protein sequence of red spotted grouper.....	28
Table 9. Tissue expression in brain and peripheral tissue of red spotted grouper.....	32

Abstract

In fish, photoreceptors including rods and cones are the membrane receptors that receive the light and transmit the light-induced signals to the brain regions to make an image of the outside world. Rod photoreceptors recognize the light and darkness, while cone photoreceptors respond to different wavelengths of light depending on their subtypes. To produce healthy and stable seed production, we need to obtain information and understand vision that affects behavior of red spotted grouper. We cloned their opsin genes here and examined their expression during the juvenile development. Using TA cloning method, we successfully partial cloned SWS2 (Short wavelength sensitive opsin), MWS (middle wavelength sensitive opsin), LWL (long wavelength sensitive opsin) and rod opsin in this fish species. Then, their tissue expression levels were determined by RT-PCR in various adult tissues including forebrain, midbrain, hindbrain, retina, kidney, heart, intestine, muscle, gonad and gill. We found that all opsin genes were strongly expressed in the retina. To examine their expression during the eye development, we isolated tissue samples at different developmental stages (lens and ear vesicle formation stage, 1, 2, 3, 5, 10, 21, 50 days after hatched) and determined their expression level by real-time quantitative PCR. SWS2, a cone photoreceptor, began to be expressed from lens and ear vesicle formation stage and its expression gradually increased until 10 dah. In case of MWS, its expression was

detected 3 dah and reached the highest level at 21 dah. The expression of LWS was first observed from 3 dah and their expression decreased thereafter. Rhodopsin, a rod photoreceptor, was found to be expressed from 2 dah and its expression reached the highest level at 50 dah. The outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer (INL) and ganglion cell layer began to differentiate at 2 dah, while choroid first appeared at 4 dah so that the eyes became black. These results indicate that the development of retina mostly completes around 4 dah. It seems that the development of the retina and the expression of the opsin genes are closely related to the behavior such as hunting prey, considering that the timing of the completion of the development of the retina, the timing of gene expression, and the timing of completion of yolk absorption are similar.

I. 서론

어류 양식의 사양관리에서 빛, 수온, 먹이 등은 중요한 외부 환경요인이다. 특히, 빛은 배 발달부터 성성숙까지 어류의 모든 생활사에 동기화되는 주요한 외부 환경요인이다(Villamizar et al., 2011). 망막을 통해 빛 정보를 획득하는 시각(視覺)은 먹이를 탐색하고, 방향을 잡고, 포식자를 인식하는데 중요한 감각이다(Richard et al., 1982, Rodriguez et al., 2001).

어류의 망막은 상피층과 여러 신경세포층으로 구성된다. 색소층(pigment epithelium; PE), 광수용체가 존재하는 시세포층(rods and cones layer; PR), 광수용체의 세포 핵 부분이 있는 외과립층(outer nuclear layer; ONL), 광수용체 세포와 bipolar cell, horizontal cell이 시냅스 결합을 하고 있는 외망상층(outer plexiform layer; OPL), bipolar cell, horizontal cell, amacrine cell이 있는 내과립층(inner nuclear layer; INL), bipolar cell, amacrine cell이 ganglion cell과 시냅스 결합을 하고 있는 내망상층(inner plexiform layer; IPL) 그리고 신경절세포층(ganglion cell layer; GCL)로 구분된다. 광수용체를 통해 들어온 시각정보는 bipolar cell, ganglion cell을 거쳐 시신경을 통해 시엽으로 전달된다(Stenkamp, 2015).

광수용체는 빛을 받아들여 신경전달을 통해 뇌에서 상이 멎히도록 하는 막 수용체이다. 대부분 경골어류의 광수용체는 rod와 cone 광수용체 세포를 가지고 있고, rod는 빛의 명암을 인식하며, cone은 subtype에 따라 각각 다른 광파장을 수용한다. Cone subtype에서 SWS2는 짧은 파장대를, MWS는 중간 파장대를, LWS는 긴 파장대를 인식한다(Carleton, 2009). 또한, 어류에서 광수용체는 시각 뿐만 아니라 자어의 섭이와 성장, 발달에 중요한 역할을 한다(Boeuf &

Le, 1999, Jon & Walther, 1993, Villamizar et al., 2011).

어류의 망막 발달에 관한 연구는 청어(Sandy & Blaxter, 1980)를 비롯하여 심해성 발광어(Bozzano et al., 2007), 불락(Park et al., 2012) 등 많은 어종에서 진행되고 있다.

실험에 사용된 어류는 붉바리(*Epinephelus akaara*)로 농어목 바리과에 속한다. 바리류(*Epinephelus* 속)는 자바리(*E. bruneus*), 붉바리(*E. akaara*), 능성어(*E. septemfasciatus*)를 비롯한 15속 159종이 대서양 동쪽과 지중해에 분포하고 있다(Harikrishnan et al., 2011). 붉바리는 정착성 어류로 연안의 암초지대에 주로 서식하며, 야행성으로 갑각류, 어류 등을 잡아먹는 육식성이다(Kim et al., 1994). 붉바리는 연안 자원량이 급감하는 자원관리 대상 어종이며(Lee et al., 2016), 시장수요가 매우 높은 고가 어류로 양식 상용화 개발에 지속적인 투자가 이루어지고 있다.

붉바리의 종묘생산에서 부화 자어의 개구시기에 대량 폐사가 발생하여 이를 개선하기 위해 사육수조의 조도, 오일필름 형성, 기포를 이용한 수류 형성 등 초기 생존율 향상을 위한 연구가 수행되었다(Yamaoka et al., 2000). 최근 제주대학교 해양과학연구소에서 붉바리의 성성숙 제어를 통한 수정란 생산과 종묘생산을 수행하고 있으며 초기 부화 자어의 생존율 향상과 치어의 골격계 이상발달 저감 등 건강 종묘생산을 위한 연구가 진행 중이다.

붉바리 자어는 먹이섭취 시기에 빛에 반응하면서 다양한 행동 양상을 보인다. 조명이 수조 벽면에 반사되면 먹이생물들이 군집 되어 자어가 먹이생물을 쫓아 먹는 행동에서 주둥이가 벽면에 부딪혀 두부골격계 충격을 받기 쉽다. 따라서 이 시기에 두부 및 척추 골격계 이상발달 개체가 증가하여 먹이를 제대로 먹지 못

하거나 공식현상 등으로 인하여 폐사하는 개체가 늘어난다. 붉바리는 광과장에 따른 성장과 성숙에 관한 연구들이 진행되고 있지만, 자치어의 행동생태와 관련성이 깊은 광수용체에 대한 연구는 부족한 실정이다. 이 연구는 붉바리 자치어의 행동에 영향을 주는 시각에 대한 정보를 얻고 자치어의 행동을 이해하기 위해 망막의 상피층을 비롯한 신경세포층의 분화 발달과 이에 따른 광수용체의 opsin 유전자 클로닝과 함께 성장 단계별 발현양상을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

불بار리 자치어는 제주대학교 해양과학연구소 종묘생산 시설에서 사육중인 개체를 사용하였다. 불بار리 어미에서 배란과 방정 유도는 cannulation으로 성숙한 암컷과 수컷 개체를 선발하여 체중 kg당 500 IU의 HCG(Human Chorionic Gonadotropin)를 주사하였다. 수정란은 호르몬 주사 후 48시간 뒤에 복부압박법을 통하여 각각 난과 정액을 얻어 습식법으로 인공수정 하였다. 자어 사육은 상층에 부유한 수정란을 수거하여 12톤 사육수조에 입식 하였으며, 사육기간동안 수온 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, DO 7~8, pH 7.0~8.0의 환경조건을 유지하였다. 부화 후 자치어의 먹이 공급은 개구 시기인 부화 후 3일경부터 부화 후 35일경 까지 로티퍼 (*Branchionus rotundiformis*)를 급이 하였고 부화 후 20일경부터는 알테미아 (*Artemia nauplii*)를 공급하였다.

2. 붉바리 초기 성장 단계에 따른 망막의 발달

1) 붉바리 자치어의 형태 발달 및 행동 특성

형태 발달 및 행동 특성을 조사하기 위해 붉바리 자치어는 실체현미경(2000-C, ZEISS)를 이용하여 시기별로 3마리 이상을 관찰하고 사진촬영 하였다. 조사 시기는 안포형성기(수정란), 부화 후 1일, 부화 후 2일, 난황흡수가 완료 되는 부화 후 3일, 부화 후 5일, 부화 후 10일, 극조가 형성된 부화 후 21일, 변태가 완료 된 부화 후 50일에 조사하였다.

2) 붉바리 자치어 망막의 발달

붉바리 자치어의 망막 발달과 Opsin 유전자의 발현 양상은 붉바리의 형태 발달 및 행동 특성 조사와 동일한 시기에 샘플링하였다. 조직학적 분석용 샘플은 Bouin' s solution에 고정하였다. 고정 된 조직은 에탄올을 이용하여 농도 단계 별로 탈수한 후 파라핀 포매 하였다. 파라핀 블록은 5 μ m 두께로 절편 하여 표본을 만들었으며, 조직 표본은 haematoxylin과 0.5% eosin으로 비교염색 하여 광학현미경(BX53, Olympus)과 Imaging Software (Olympus cellSens™ Microscope Imaging Software)를 이용하였다.

3. Opsin 유전자의 발현 양상

1) Opsin 유전자 partial cloning

Partial cloning은 성장단계에 따른 opsin유전자들의 발현 양상을 비교하기 위하여 수행하였다. Opsin 유전자들은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 사이트에 보고된 정보를 이용하여 Short-wavelength sensitive opsin (SWS2), Middle-wavelength sensitive opsin (MWS), Long-wavelength sensitive opsin (LWS), Rod opsin 인자를 선택하여 TA cloning 방법을 이용해 cloning 하였다.

degenerate primer는 NCBI에서 농어목을 비롯한 어류의 opsin 유전자 정보를 이용하여 제작하였으며 (Table 1), PCR을 통하여 유전자를 증폭시켜 T-BluntTM PCR Cloning Kit (SolGent)에 삽입하여 ligation 하였다. Opsin 유전자의 부분 염기서열은 형질전환 후 plasmid DNA를 분리하여 Genotech (Korea)에 분석을 의뢰하였다. Opsin 유전자들의 부분 염기서열은 NCBI의 Blast를 통하여 확인하였다. 클로닝 한 유전자는 MEGA7 프로그램을 이용하여 계통분석 하였다.

Table 1. Primer sequence for opsin gene cloning

Gene	Primer information		Amplification size (bp)
	Primer	5' - 3' sequence	
SWS2	SWS2 F	CATGCACCATCCAGAACAAG	470
	SWS2 R	CACAGCAAAGCAGAATCCAA	
MWS	MWS F	CCAACAGGACTGGGATTGTT	553
	MWS R	AAGCCTGGAGCCAGAGTGTA	
LWS	LWS F	TGCAATTGCTGATCTTGGAG	535
	LWS R	CATGACAACGACCATTCTGG	
Rod	Rod F	CTGCGGACCCCTCTAAACTA	440
	Rod R	CCCTCTGGTCACTGGTTGTT	

2) Opsin 유전자의 조직발현 및 성장단계별 발현 양상 분석을 위한 Total RNA 추출 및 cDNA 합성

붉바리 성어의 조직 샘플들은 부화 자어와 조직 별 발현을 위해 적출하여 600 μl 의 RiboExTMLS (GeneAll, Korea)를 첨가하여 분쇄하고 RiboExTMLS 100 μl 당 chloroform 20 μl 를 첨가하여 4°C, 12,000 g 에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액에 iso-propanol을 첨가하여 원심분리하고 RNA를 침전 시켜 상층액을 버리고 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 첨가한 75% 에탄올로 수세하였다. 침전된 RNA는 RNase-free 증류수에 용해하였다. 추출된 Total RNA는 Nano Vue (GE Healthcare, UK)를 이용하여 농도를 측정하였으며, A260/A280 nm의 비율이 1.7~2.1인 샘플을 사용하였다.

cDNA는 RQ1 RNase-Free DNase Kit (Promega, USA)를 이용하여 DNase 처리한 후 PrimeScriptTM 1st strand cDNA synthesis Kit (Takara, Japan)를 사용하여 합성하였다. DNase 처리한 Total RNA에 RNase-free H₂O를 첨가하여 8 μl 의 부피를 맞추고 Random 6 mers 1 μl , dNTP mixture 1 μl 를 넣어 65°C에서 5분간 반응시켰다. 반응물 10 μl 에 5X PrimeScript Buffer 4 μl , RNase Inhibitor 0.5 μl , PrimeScript RTase 1 μl , RNase free dH₂O 4.5 μl 를 넣고 섞어준 뒤 30°C에서 10분, 42°C에서 60분 반응하고 95°C에서 5분간 효소 활성화 하여 합성했다.

합성된 cDNA는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록된 opsin 유전자의 염기서열을 참고하여 제작된 primer를 사용하여 붉바리의 opsin 유전자를 partial 클로닝 하였다. Primer는 클로닝 된 붉바리 opsin 유전자의 염기서열로 제작하여 opsin 유전자들의 조직 별 발현을 위한 RT-PCR과

Real-time quantitative PCR 분석을 위해 사용하였다 (Table1).

Table 2. Primer sequence for RT-PCR to investigate opsin genes tissue expression in adult of red spotted grouper

Gene	Primer information		Amplification size(bp)
	Primer	5' -3' sequence	
SWS2	SWS2 F	CATGCACCATCCAGAACAAG	470
	SWS2 R	CACAGCAAAGCAGAATCCAA	
MWS	MWS F	CCAACAGGACTGGGATTGTT	553
	MWS R	AAGCCTGGAGCCAGAGTGTA	
LWS	LWS F	TGCAATTGCTGATCTTGGAG	535
	LWS R	CATGACAACGACCATTCTGG	
Rod	Rod F	CTGCGGACCCCTCTAAACTA	440
	Rod R	GTGAGGAAGTGGCATGTGAA	
β -actin	β -actin F	GAGCGTGGCTACTCCTTCAC	390
	β -actin R	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	

Table 3. Primer sequence for Real-time quantitative PCR to investigate opsin genes expression in each growth stage of red spotted grouper

Gene	Primer information		Amplification size(bp)
	Primer	5' -3' sequence	
SWS2	SWS2 F	CGGTCCCACCTCAACTACAT	250
	SWS2 R	GGTCAGGCTTGAAAGCAAAG	
MWS	MWS F	TGGAGGTGAAGTCGCTCTCT	237
	MWS R	AAGCCTGGAGCCAGAGTGTA	
LWS	LWS F	GTGTGGTGTTCTCCGCCTAT	276
	LWS R	CATGACAACGACCATTCTGG	
Rod	Rod F	CCCTCTGGTCACTGGTTGTT	270
	Rod R	TCATGAAGTGGCAGCAGAAC	
β -actin	β -actin F	GAGCGTGGCTACTCCTTCAC	390
	β -actin R	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	

3) Opsin 유전자의 발현 양상 분석을 위한 Real-time quantitative PCR

Opsin 유전자의 성장 단계별 발현 양상을 비교하기 위하여 안포형성기(수정란), 부화 후 1일, 부화 후 2일, 난황흡수가 완료 되는 부화 후 3일, 부화 후 5일, 부화 후 10일, 극조가 형성된 부화 후 21일, 변태가 완료된 부화 후 50일에 샘플하였으며 분석 전까지 -80°C 에 보관하였다. 정량분석은 BioRad CFX96™ Touch™ Real Time PCR (BioRad, Hercules, CA)장비를 이용하여 분석하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 EvaGreen 2X qPCR MasterMix (abm, Canada) $5\ \mu\text{l}$, forward primers $0.3\ \mu\text{l}$ (10uM) and reverse primers $0.3\ \mu\text{l}$ (10uM), RNase free H_2O $2.4\ \mu\text{l}$ 를 혼합하여 total $10\ \mu\text{l}$ volume으로 맞추고 β -actin과 denaturation (45s, 94°C), annealing (45s, 58°C) 그리고 extension (1m, 72°C)에서 40 cycle 증폭하여 상대 정량 하여 평균값을 이용하였다.

4. 통계처리

유전자 발현 양상 결과는 One-Way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 유의성 검정을 실시하였다.

III. 결과

1. 붉바리 자어의 형태 발달과 행동 특성

부화 자어의 형태적인 특징은 성장 단계에 따라 실체현미경을 이용하여 조사하였다. 부화 후 1일경 부화 자어는 난황이 몸의 대부분을 차지하고 있고, 부화 후 2일경 부화 자어는 복강내 항문과 연결된 소화관이 관찰되었다. 부화 후 3일경에 부화 자어는 난황 흡수가 완료되었으며, 눈이 흑화 되는 것을 확인하였다. 또한 부화 후 4일 이전에는 자어의 유영력이 부족하기 때문에 포기에 의한 물의 흐름에 따라 부유하였다. 부화 후 4일경 부화자어는 개구 되어 소화관 내강의 직경이 점차 확장되며, 유영력이 생김에 따라 물의 표면에서 아래쪽으로 하강하는 경향을 보였다. 붉바리 자어는 부화 후 10일경에 등지느러미 제 2극과 가슴지느러미 극이 돌출 되었으며, 자어들이 군집하는 경향을 보였다. 부화 후 21일째 부화 자어는 등지느러미와 가슴지느러미 극조가 꼬리 지느러미까지 확대 되는 것이 관찰되었고, 군집한 자어들이 유영하였다. 부화 후 50일째의 부화 자어는 변태가 완료되어 형태적으로 붉바리 성어와 유사한 모습을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1).

붉바리 망막의 착색은 사육수온 21℃에서 부화 후 27시간부터 색소포가 보이기 시작하여 부화 후 46시간이 지나면서 자어의 눈이 가장자리부터 검게 착색되는 개체가 출현하기 시작하였으며 완전히 착색된 개체도 나타났다(Fig. 2).

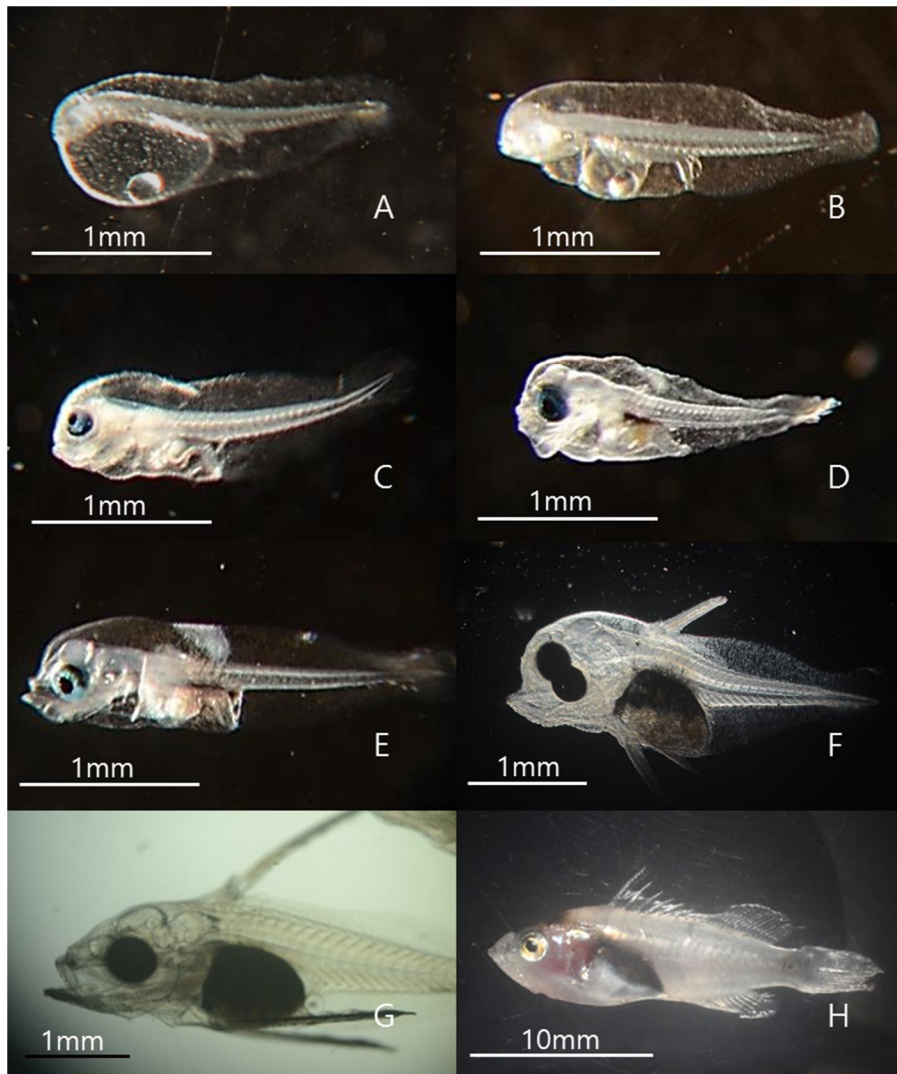


Fig. 1. Photographs of each growth stage red spotted grouper. A, 1 DAH; B, 2 DAH; C, 3 DAH; D, 4 DAH; E, 5 DAH; F, 10 DAH; G, 21 DAH, H, 50 DAH(Post-metamorphosis). DAH=days after hatched.

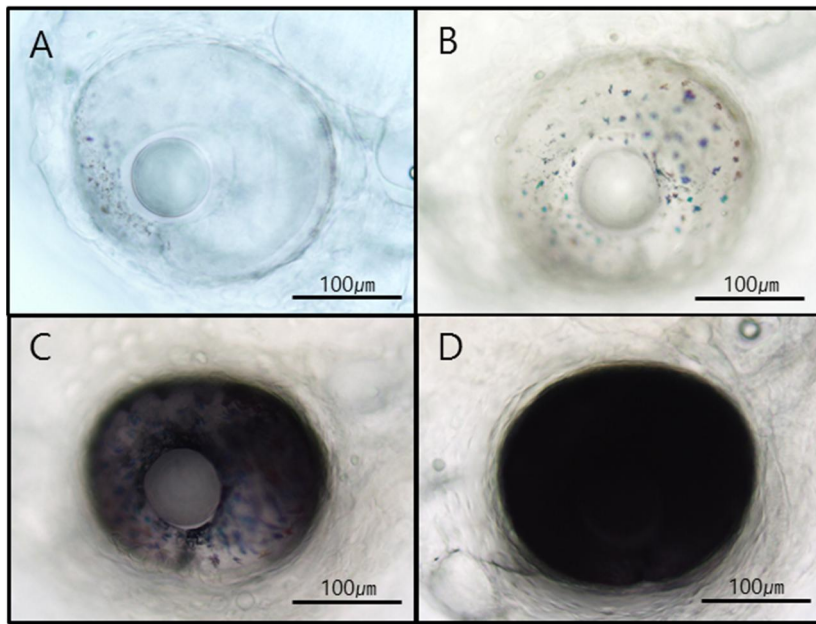


Fig. 2. Retinal pigmentation of early growth stage in red spotted grouper. A, 27HAH; B, 36HAH; C,D, 46HAH. HAH=hours after hatched.

2. 붉바리 자치어 망막의 구조와 발달

부화자어는 부화 후 2일째부터 외과립층(outer nuclear layer; ONL), 내과립층(inner nuclear layer; INL) 그리고 신경절세포층(ganglion cell layer; GCL)이 관찰 되었으며, 부화 후 4일째에는 맥락막이 형성되었다. 눈의 망막층을 비교하였을 때 모든 층의 분화정도는 부화 후 4일째부터 12개월까지 유사하였으나 각 층의 두께는 단계별로 차이를 보였다(Fig. 3). 또한, 각 성장단계별 망막 층의 두께는 자어가 성장함에 따라 망막의 전체 두께가 점차적으로 증가하는 경향을 보였으며 각각의 층 역시 대체적으로 증가하였다. 신경절세포층은 부화 후 50일 이후에 감소하는 경향을 보였다(Table 4).

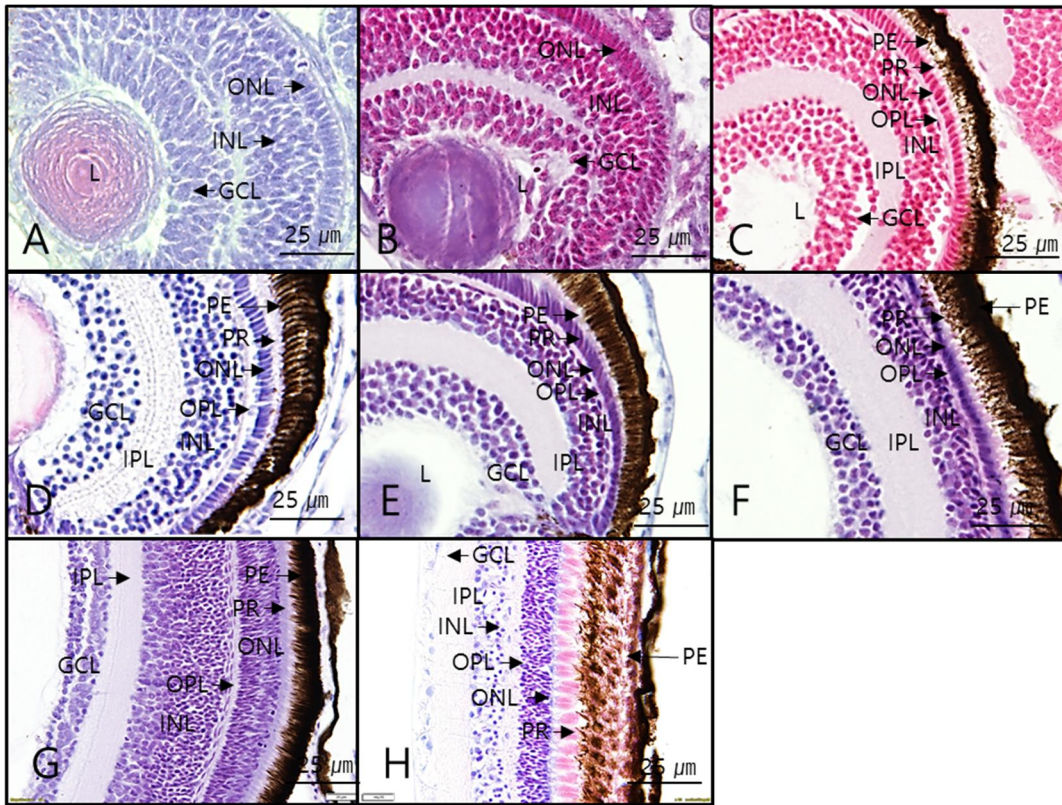


Fig. 3. Retinal development of early growth stage in red spotted grouper by HE stain. A, 2 DAH; B, 3 DAH; C, 4 DAH; D, 5 DAH; E, 10 DAH; F, 21 DAH; G, 50 DAH; H, 12 months after hatching. The eye show the thick pigment epithelium (PE), photoreceptors (PR), outer nuclear layer (ONL), outer plexiform layer (OPL), inner nuclear layer (INL), inner plexiform layer (IPL), ganglion cell layer (GCL) and lens (L). DAH=days after hatching.

Table 4. Relative changes in thickness of retinal layers in each growth stage of red spotted grouper

	PE	ONL	OPL	INL	IPL	GLE	Total
2 dah (n=5)		6.2±0.3		23.0±1.3		16.7±1.1	48.3±1.2
3 dah (n=4)		6.9±0.6		17.2±0.9		13.6±1.7	40.8±1.5
4 dah (n=3)	5.8±0.6	4.7±0.4		11.0±0.8		12.2±1.9	40.9±1.7
5 dah (n=2)	15.0±0.3	5.9±0.2	3.0±1.0	19.5±2.6	12.7±1.7	22.9±0.5	85.1±6.1
10 dah (n=2)	15.3±1.3	4.8±0.4	4.4±0.3	17.8±6.3	25.4±5.3	18.3±2.3	93.9±4.2
21 dah (n=2)	20.8±2.0	8.2±0.1	3.4±0.5	24.4±1.1	26.0±4.6	21.0±2.6	113.0±13.6
50 dah (n=2)	26.1±14.3	25.4±5.6	6.8±0.1	48.6±1.1	55.3±0.2	14.2±2.6	209.8±9.5
12 M (n=2)	38.4±3.6	26.5±7.3	11.3±0.9	26.3±3.5	30.9±5.6	13.1±5.4	185.2±43.2

3. Opsin 유전자의 partial cloning

Partial cloning은 성어의 눈을 적출하여 붉바리 opsin 유전자를 cloning 하였다. Partial cloning된 SWS2 opsin은 총 445 bp 길이의 부분 염기서열과 165개의 아미노산서열이 확인되었(Fig. 4), 자바리(*E. bruneus*)와 99%로 가장 높은 상동성을 보였다(Table 5, Fig. 5). MWS opsin은 561 bp 길이의 부분 염기서열과 187개의 아미노산 서열이 확인되었고(Fig. 6), 농어목에 속하는 벵에돔(*Girella punctata*)와 96%로 상동성이 가장 높았다(Table 6, Fig 7). LWS opsin은 696개의 부분 염기서열과 232개의 아미노산 서열이 확인되었고(Fig. 8), 자바리(*E. bruneus*)와 96%로 상동성이 가장 높았다(Table 7, Fig. 9). 그리고 Rod opsin은 552개의 부분 염기서열과 184개의 아미노산 서열이 확인되었으며(Fig. 10), 바리과에 속하는 갈색둥근바리(*E. coioides*)와 100%의 상동성을 보였다(Table 8, Fig. 11).

```

1 ACUCAGUCCUUUUCU GGUUCCUCAGGACCA CCUGGGGGGCACGGG CACCUUCUACAUCAU GGCAGGAUUAUGUU
1 T Q S F S G S S G P P G G H G H L L H H G R I H V
76 CUUUUUUAUUCACAGU UGGCACUAGCAUUA CGUCCUACCAUUGC AUGCACCAUCCAGCA CAAGAAGCUCCGGUC
26 L F I H S W H * H * R P H H C M H H P A Q E A P V
151 CCACCUCAACUACAU CCUGGUGAACUUGGC UGUGGCAAACCUUCU UGUGUCCUGUGUGGG CUCCUUCACUGCCUG
51 P P Q L H P G E L G C G K P S C V L C G L L H C L
226 CUGCUCUUUGCAAC CAGAUUUUCAUCUU UGGACCUCUAGCAUG CAAGAUUGAGGGUUU UAUGGCGACACUUGG
76 L L L C N Q I F H L W T S S M Q D * G F Y G D T W
301 CGGUAUGGUAAGCCU GUGGUCUCUUGCUGU GGUAGCGUUUGAAAG AUGGCUUGUACUCUG CAAACCACUUGGAAA
101 R Y G K P V V S C C G S V * K M A G H L Q T T W K
376 CUUUGCUUUAAGCC UGACCAUGCCAUAGC UUGCUGUGCAUUUAC CUGGGUGUUUGCACU GAUUGCCUCGCUACC
126 L C F Q A * P C H S L L C I Y L G V C T D C L A T
451 UCCACUGUUCGGAUG GAGCAGGUUAUCC AGAAGGCCUGCAGUG
151 S T V R M E Q V Y P R R P A V

```

Fig. 4. Nucleotide sequence of SWS2 opsin in red spotted grouper.

Table 5. The homologies of SWS2 opsin gene protein sequence of red spotted grouper and other species

Species	%	source
<i>Epinephelus bruneus</i>	99	BAU70603.1
<i>Ostorhinchus cyanosoma</i>	90	AJD38900.1
<i>Monocentris japonicus</i>	90	AHJ08688.1
<i>Myripristis jacobus</i>	86	AJD38765.1
<i>Limia vittata</i>	85	AQZ42250.1
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	84	AAM17920.1
<i>Verasper variegatus</i>	83	BAW35584.1

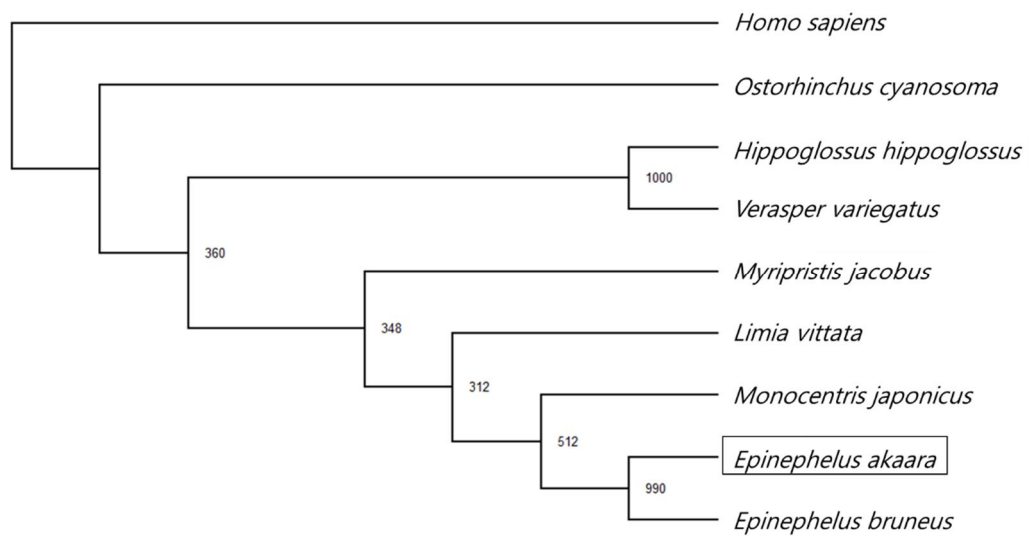


Fig. 5. Phylogenetic relationship of SWS2 opsin between red spotted grouper and other fishes.

```

1   UGGAUUCACCAUCAC CUUCACAUCUGCUGU GAACGGCUACUUCAU CCUGGGAGCCACUGC CUGCGCUGUCGAGGG
1   W I H H H L H I C C E R L L H P G S H C L R C R G
76  AUUCAUGGCCACACU UGGAGGUGAAGUCGC UCUCUGGUCACUGGU CGUGCUGGCUAUUGA GAGAUACAUUGUUGU
26  I H G H T W R * S R S L V T G R A G Y * E I H C C
151 CUGCAAACCAUGGG AAGCUCAAUUCAC UGGAACUACUGCAGG AGCUGGAGUCCUUUU CACCUGGAUCAUGGC
51  L Q T H G K L Q I H W N S C R S W S P F H L D H G
226 UCUGGCUUGUCUGU UCCUCCUUGCUGG CUGGUCCAGGUACCU UCCUGAGGGCAUGCA GUGCUCCUGUGGACC
76  S G L C C S S S C W L V Q V P S * G H A V L L W T
301 CGACUACUACACUCU GGCUCCAGGCUCAA CAACGAAUCAUAUGU GAUCUACAUGUUUGU CGUUCACUUCUUCAU
101 R L L H S G S R L Q Q R I I C D L H V C R S L L H
376 UCCCGUAUUCUCAU UUUUCUACUUAUGG AAGCCUUGUCUGAC AGUCAAGCUGCUGC AGCCCAGCAGCAGGA
126 S R I P H F L H L W K P C A D S Q S C C S P A A G
451 GUCAGAGUCUACCCA GAAGGCCGAGAGGGA AGUGACACGCAUGUG CAUCCUGAUGGUCUU CGGCUUCCUGGUAGC
151 V R V Y P E G R E G S D T H V H P D G L R L P G S
526 UUGGGUGCCAUAUGC CUCUUUCGUCUGCUUG GAUCUU
176 L G A I C L F R C L D L

```

Fig. 6. Nucleotide sequence of MWS opsin in red spotted grouper.

Table 6. The homologies of MWS opsin gene protein sequence of red spotted grouper and other species.

Species	%	source
<i>Girella punctata</i>	96	BAD80828.1
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	95	AGL76515.1
<i>Dascyllus trimaculatus</i>	91	AEO00724.1
<i>Microstomus achne</i>	91	BAW35577.1
<i>Thunnus orientalis</i>	91	BAG14283.1
<i>Pagrus major</i>	90	AFJ44216.1
<i>Mylochromis lateristriga</i>	88	AAY26071.1
<i>Paralichthys olivaceus</i>	87	BAW35580.1
<i>Homo sapiens</i>	43	NP_001041646.1

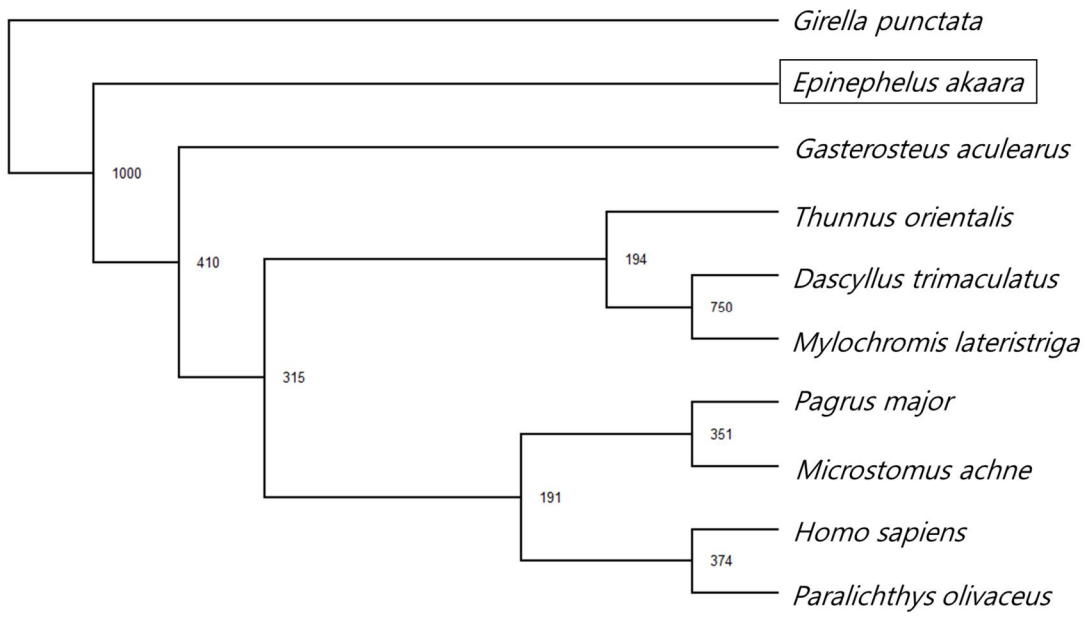


Fig. 7. Phylogenetic relationship of MWS opsin between red spotted grouper and other fishes.

```

1 GGUCCCAAUACCACAUUGCUCCUCGAUGGGUUUACAACGUUGCAACAGUUUGGAUGUUU AUAGUGGUUUAUCUUAUCAGUCUUCACCAAC
1 G P N Y H I A P R W V Y N V A T V W M F I V V I L S V F T N
91 GGUCUCGUCUUGGUGGCCACAGCAAAGUUCAAGAAACUGCGUCACCCUCCGAACUGGAUC UUGGUCAAUCUUGCAGUUGCUGAUUCUUGGA
31 G L V L V A T A K F K K L R H P P N W I L V N L A V A D L G
181 GAGACAGUUUUUGCCAGCACCAUCAGUGUAUGCAACCAGGUUUUCGGUUACUUCAUUCUA GGACACCCAAUGUGUGUCUUGAGGGCUAC
61 E T V F A S T I S V C N Q V F G Y F I L G H P M C V F E G Y
271 AUUGUCUCAGUUUGUGGCAUAAACUGCUCUCUGGUCUCCUGACUAUCAUCUCCUGGGAGAGA UGGGUAGUUGUGUCAAAACUUUUGGAAAC
91 I V S V C G I T A L W S L T I I S W E R W V V V C K P F G N
361 AUCAAGUUUGAUGCCAAAUGGGCUACAGCUGGAAUUAUUGUUCUUGGAUCUGGGCAGCA GUGUGGUUUCUCCGCCUAUCUUGGAUGG
121 I K F D A K W A T A G I L F S W I W A A V W C S P P I F G W
451 AGCAGGUACUGGCCUCAUGGACUAAAGACUUCUGUGGACCUAGUAUUCAGUGGAAGU GACUACCCUGGAGUCCAGUCCUACAUGAUU
151 S R Y W P H G L K T S C G P D V F S G S D Y P G V Q S Y M I
541 GUUCUUAUGAUUACAUGUUGUCUCAUUCUUGGCUAUAUCAUCUUGUGCUACCUUGCA GUCUGGUUGGCUAUCGUGUCUUGCCAUG
181 V L M I T C C L I P L A I I I L C Y L A V W L A I R A V A M
631 CAGCAGAAGGAAUCAGAGUCAACCCAGAAAGCUGAGAAAGAAUUAUCCAGAAUGGUCGUU GUCAUG
211 Q Q K E S E S T Q K A E K E V S R M V V V M

```

Fig. 8. Nucleotide sequence of LWS opsin in red spotted grouper.

Table 7. The homologies of LWS opsin gene protein sequence of red spotted grouper and other species.

Species	%	source
<i>Epinephelus bruneus</i>	96	BAU70605.1
<i>Lepidonotothen nudifrons</i>	93	BAL15680.1
<i>Pomacentrus amboinensis</i>	91	AEO00734.1
<i>Dascyllus trimaculatus</i>	90	AEO00738.1
<i>Maylandia phaeos</i>	89	ADI72299.1
<i>Pseudotropheus fainzilberi</i>	89	ADI72291.1
<i>Danio rerio</i>	86	AAD20549.1
<i>Homo sapiens</i>	84	NP_064445.2

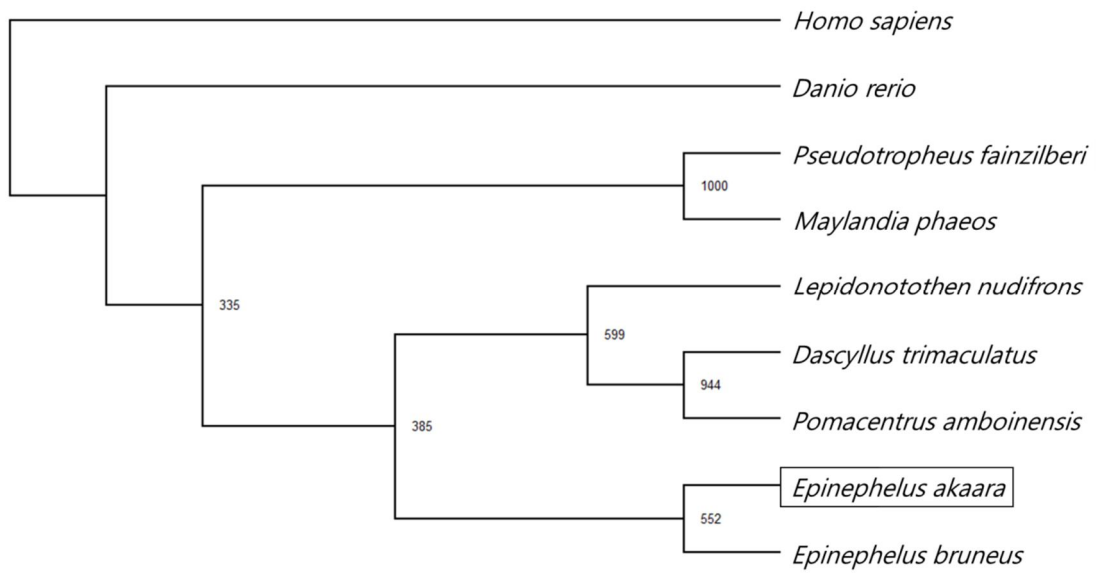


Fig. 9. Phylogenetic relationship of LWS opsin between red spotted grouper and other fishes.

```

1 AAGCUGCGGACACCUCUAAACUACAUCUG CUGAACCUUGCGGUGGCUAACCCUUCUUG GUGUUUGGAGGAUUCACCACAACGAUGUAC
1 K L R T P L N Y I L L N L A V A N L F M V F G G F T T T M Y
91 ACCUCAUUGCAUGGCUACUUGUCCUGGGG CGCCUUGGCGUCAAUUUGGAAGGAUUCUUU GCUACCCUCGGCGGUGAGAUAGCCUCUGG
31 T S M H G Y F V L G R L G C N L E G F F A T L G G E I A L W
181 UCACUGGUUGUUCUGGCGUUGAAAGGUGG GUGGUCGUCUGCAAGCCCAUCAGCAACUUC CGCUUCGGGGAGAAUCACGCCAUUAUGGGU
61 S L V V L A V E R W V V V C K P I S N F R F G E N H A I M G
271 UUGAGCCUACCCUGGCGAUGGCCUUAAGCU UGUUCUGUACCCUUCUUGUCGGGUGGUCU CGUUACAUUCCUGAGGGCAUGCAGUGCUCU
91 L S L T W L M A L A C S V P P L V G W S R Y I P E G M Q C S
361 UGUGGAGUCGACUACACACGUGCAGAG GGCUUCAUAACGAGUCCUUUGUUAUCUAC AUGUUCUGCUGCCACUUCUUGAUUCCACUG
121 C G V D Y Y T R A E G F N N E S F V I Y M F C C H F M I P L
451 ACUGUCAUUUUCUUGCUACGGCCGUCUG CUCUGUGUCUGCAAGGAGGCGUCUGCGCC CAGCAGGAGUCUGAGACCACCCAGAGGGCU
151 T V I F F C Y G R L L C A V K E A A A A Q Q E S E T T Q R A
541 GAGAGGGAAGUC
181 E R E V

```

Fig. 10. Nucleotide sequence of Rod opsin in red spotted grouper.

Table 8. The homologies of Rod opsin gene protein sequence of red spotted grouper and other species.

Species	%	source
<i>Epinephelus coioides</i>	100	AIJ19695.1
<i>Saloptia powelli</i>	98	AGF35137.1
<i>Mullus surmuletus</i>	94	ABO86519.1
<i>Lopholatilus chamaeleonticeps</i>	94	ACI00525.1
<i>Triodon macropterus</i>	94	AGN55058.1
<i>Arothron stellatus</i>	93	AGM51090.1
<i>Danio rerio</i>	84	NP_571159.1
<i>Bos taurus</i>	81	NP_001014890.1
<i>Homo sapiens</i>	76	NP_000530.1

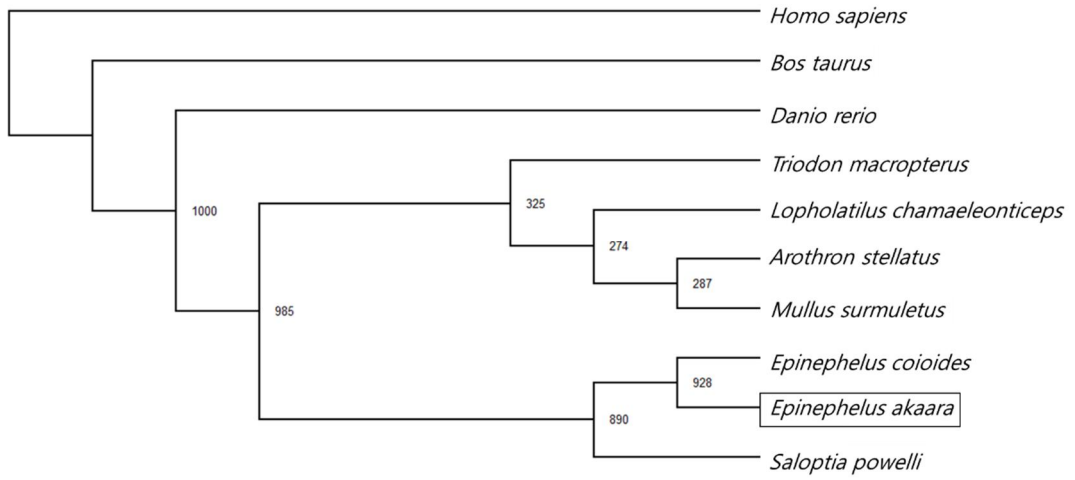


Fig. 11. Phylogenetic relationship of Rod opsin between red spotted grouper and other fishes.

4. Opsin 유전자의 조직별 발현

cloning한 opsin 유전자의 조직별 발현은 붉바리 성어에서 적출된 전뇌, 중뇌, 후뇌, 눈, 뇌하수체, 혀, 간, 비장, 신장, 심장, 장, 근육(측선 포함), 생식소, 아가미 조직을 대상으로 분석하였다. 대부분의 opsin 유전자는 눈에서 강하게 발현하였다(Fig. 12). SWS2는 뇌하수체를 비롯한 뇌의 모든 부위에서 발현하였고 MWS는 전뇌와 후뇌, LWS는 후뇌, Rod는 전뇌에서 발현되었다(Fig. 12의 A). SWS2는 말초조직인 생식소에서 약하게 발현하였으며 나머지 조직에서는 비슷하게 발현되었다. MWS, Rod는 망막에서만 강하게 발현하였으며, LWS는 신장, 비장에서 약하게 발현되었고 망막에서 강하게 발현하였다(Fig. 12의 B).

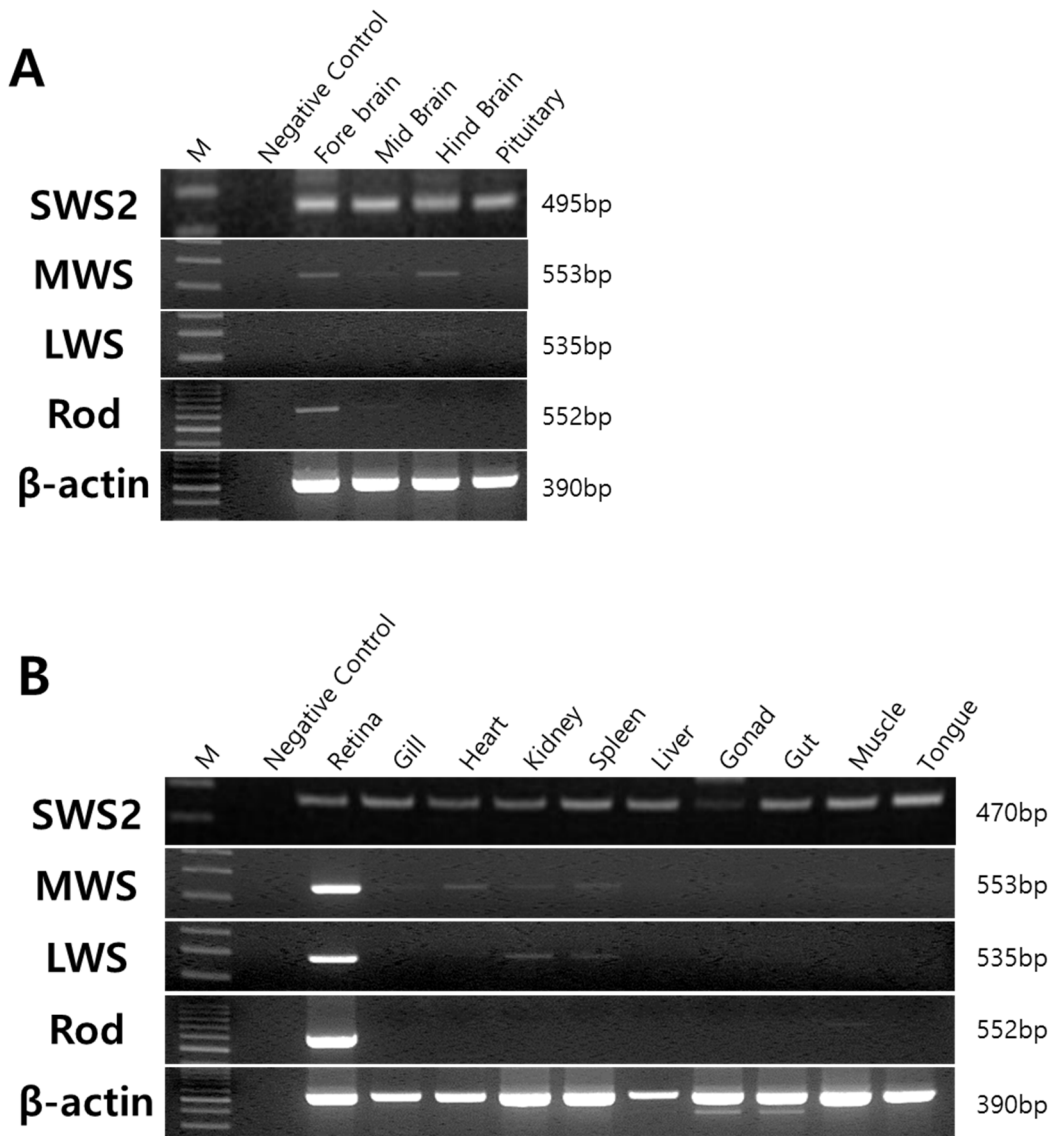


Fig. 12. Tissue specific expression of opsin genes in adult red spotted grouper. A; brain, B; peripheral tissues. M, 100 bp DNA ladder marker. All photoreceptor genes were strongly expressed in the retina.

Table 9. Tissue expression in brain and peripheral tissue of red spotted

	RB	MB	FB	Pt	Re	Gi	H	Ki	Sp	Go	G	Mu	T
SWS2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MWS	+	-	+	-	++	-	+	+	+	-	-	-	-
LWS	-	-	+	-	++	-	-	+	+	-	-	-	-
Rod	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-

grouper

++ : high expression
 + : low expression
 - : none expression

5. 성장 단계에 따른 opsin 유전자의 발현 양상

Opsin 유전자의 Real-time quantitative PCR을 수행한 결과 SWS2는 부화 후 1일째에 발현되기 시작하여 부화 후 10일째 까지 발현 값이 점차적으로 증가하다가 이후 감소하였다(Fig. 13). MWS는 부화 후 3일째부터 발현이 되기 시작하여 부화 후 21일째에 가장 높게 발현하였다(Fig. 14). LWS는 부화 후 3일째부터 발현이 되기 시작하여 3일째에 가장 높았다(Fig. 15). Rod는 부화 후 2일째부터 발현되어 부화 후 50일째에 가장 높은 발현을 보였다(Fig. 16). MWS는 부화 후 21일, LWS는 부화 후 3일, Rod는 부화 후 50일로 광수용체가 각각 다른 시기에 분화가 이루어 지는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 각 성장단계에 따른 유전자 간의 발현양은 LWS opsin유전자의 발현양이 다른 opsin유전자의 발현양보다 훨씬 높았다(Fig. 17).

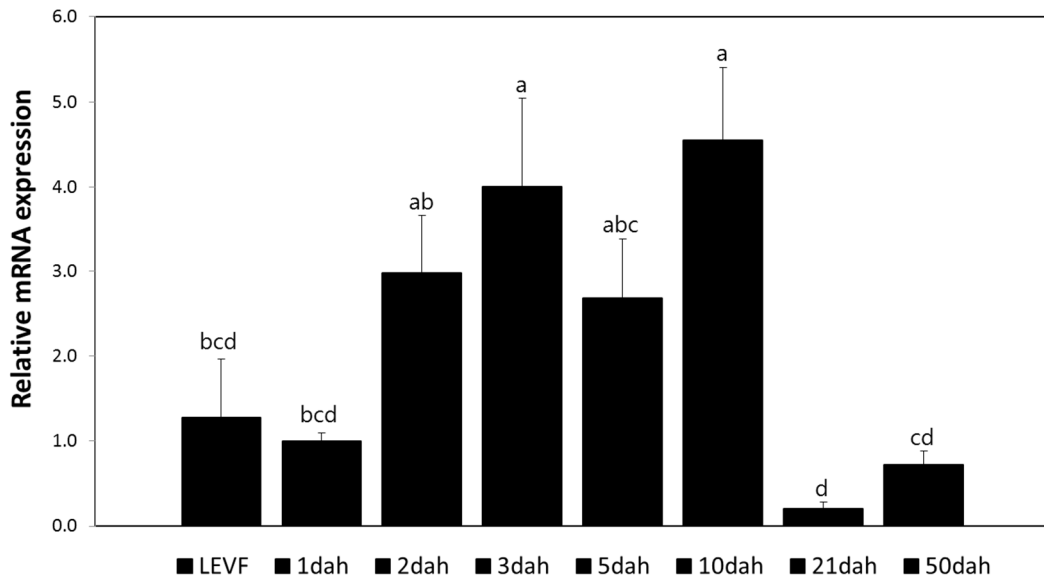


Fig. 13. SWS2 opsin mRNA expression in each growth stage of red spotted grouper by real-time quantitative PCR. The results are represented as means \pm SEM and different letters are significant ($p < 0.05$). LEVF, Lens and ear vesicle formation stage of fertilized egg; DAH, days after hatching.

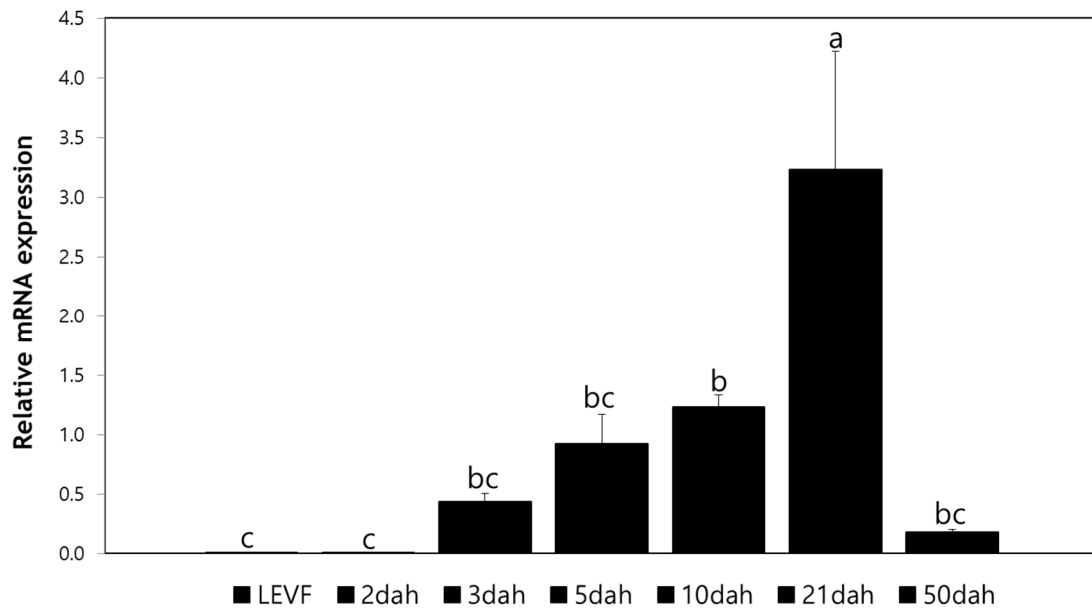


Fig. 14. MWS opsin mRNA expression in each growth stage of red spotted grouper by real-time quantitative PCR. The results are represented as means \pm SEM and different letters are significant ($p < 0.05$). LEVF, Lens and ear vesicle formation stage of fertilized egg; DAH, days after hatching.

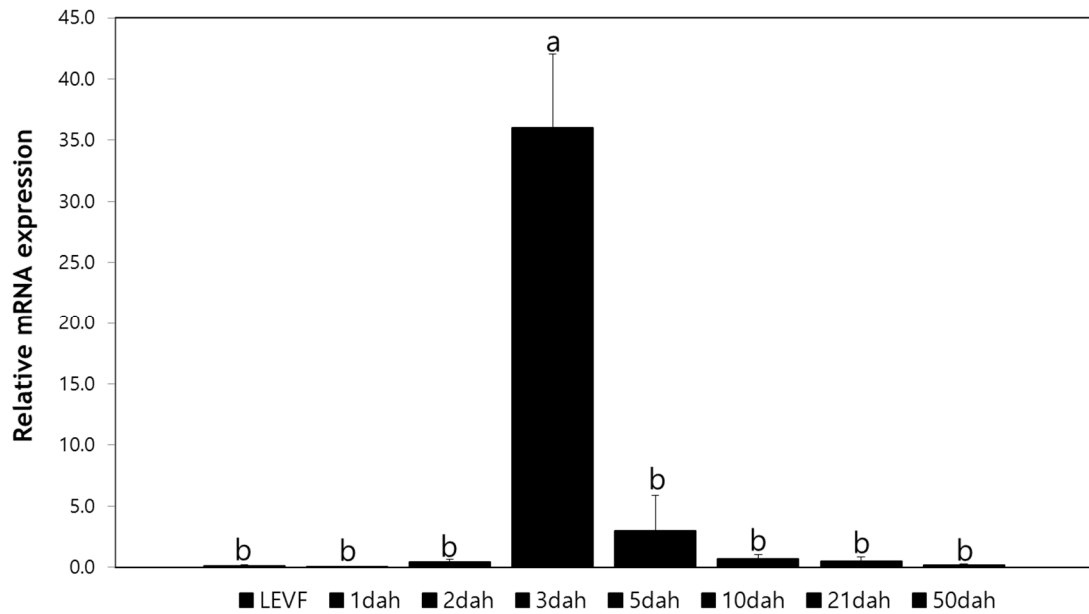


Fig. 15. LWS opsin mRNA expression in each growth stage red spotted grouper by real-time quantitative PCR. The results are represented as means \pm SEM and different letters are significant ($p < 0.05$). LEVF, Lens and ear vesicle formation stage of fertilized egg; DAH, days after hatching.

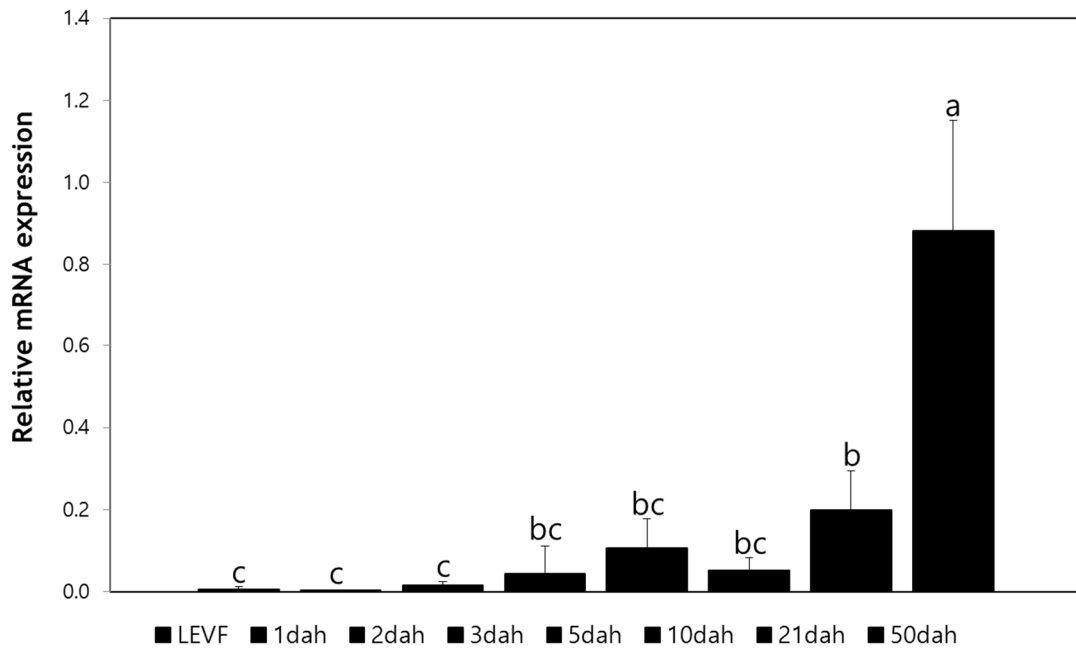


Fig. 16. Rod opsin mRNA expression in each growth stage of red spotted grouper by real-time quantitative PCR. The results are represented as means \pm SEM and different letters are significant ($p < 0.05$). LEVF, Lens and ear vesicle formation stage of fertilized egg; DAH, days after hatching.

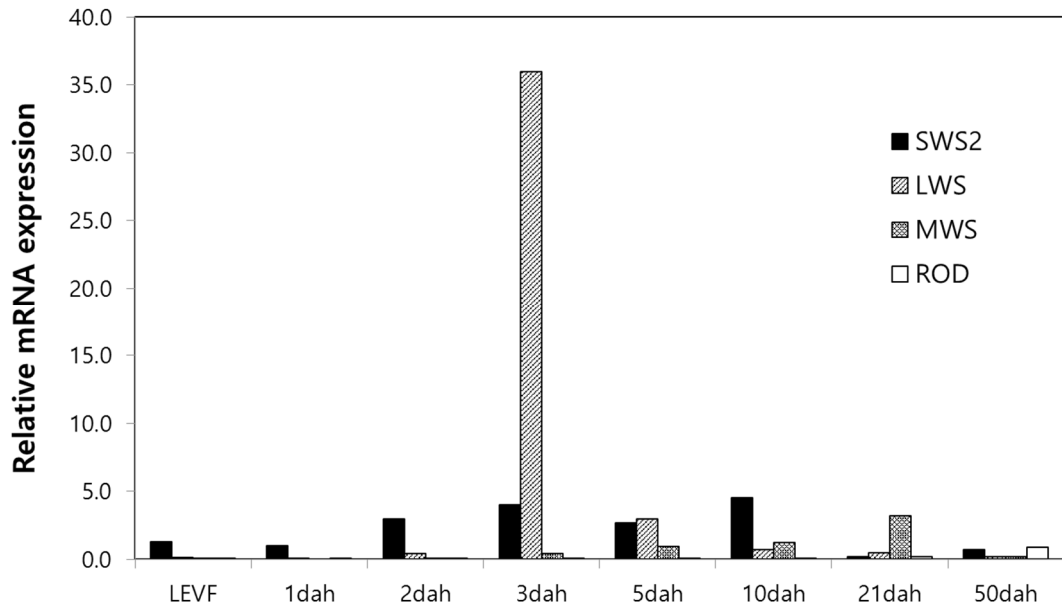


Fig. 17. Compared opsin genes expression in each growth stage of red spotted grouper. The results are represented as means \pm SEM and different letters are significant ($p < 0.05$). LEVF, Lens and ear vesicle formation stage of fertilized egg; DAH, days after hatching.

IV. 고찰

어류의 눈은 먹이활동과 포식자를 피하는 행동을 하는 데에 중요한 역할을 한다(Cerri, 1983, Rodriguez & Gisbert, 2001). 또한, 어류의 망막 분화는 변태와 밀접한 관련이 있으며 변태시에 rod가 분화되어 시력이 향상되기도 한다(Rahman, Jeserich, and Zeutzius, 1979).

어류의 망막 분화 시기는 종 특이적이다. 해수어인 전어의 눈은 부화 후 5일 렌즈가 형성되었으며 부화 후 9일에 망막이 완전하게 형성되었다(Park et al., 2006). 서대의 눈은 부화시 망막이 착색되지 않았으며 광수용체의 존재를 확인할 수 없었으나, 첫 급이 이후 눈이 착색되며 pure-cone 망막이 형성되었고 변태 초기에 rod-like 과정이 시작되었다(Sandy et al., 1980).

이 연구에서 실제 현미경 사진을 통한 붉바리 눈 구조를 조사한 결과, 부화 후 3일째에 난황흡수가 완료되며 눈이 검게 착색되었다. 또한 부화 후 21일째에는 극조가 형성되고, 50일째에는 변태가 완료되었다. 성장단계에 따라 샘플링한 부화 자어의 HE염색을 통한 망막의 층 분화는 부화 후 2일과 3일에는 외과립층, 내과립층, 신경절세포층이 구분되나 맥락막은 착색(pigmentation)되지 않았다. 부화 후 4일이 되면 맥락막이 착색된 것을 확인할 수 있고 색소층, 시세포층, 외과립층, 외망상층, 내과립층, 내망상층, 신경절세포층으로 층이 분화된 것을 확인할 수 있다. 또한 부화 후 4일부터는 층의 두께는 다르지만 12개월 된 붉바리의 망막의 층과 유사하게 구분되어 눈의 분화가 거의 진행된 것으로 보인다. 이전 연구에 따르면 대서양 가자미 자어의 눈이 착색되고 분화됨에 따라 먹이를 사냥하고 소화할 수 있는 여건이 준비된다(Kvenseth et al., 1996).

척추동물은 변태 시 망막에서 3가지 변화가 일어난다. 광수용체는 outer

segment에 포함된 시각 색소를 바꿔 과장 민감도를 변경하고, 새로운 망막 세포를 추가하며 재배치된다(Evans BI & Fernald RD, 1990).

경골어류의 개체발생 동안의 망막 발달은 cone photoreceptor가 먼저 발달하고 rod photoreceptor가 발달하며, rod의 발달 시기는 다양하다. 어류의 망막은 rod photoreceptor의 분화 시기에 따라 indirect development, intermediate development, direct development로 구분한다(Evans BI & Fernald RD, 1990). Indirect development는 대부분의 해양 표영계 어류에서 나타나며 부화하면서 cone이 분화되며 변태시기에 rod가 분화된다. Intermediate development는 연어과 어류에서 보여지며 부화시기에 cone이 분화되고 변형 전에 rod가 분화된다. direct development는 담수어종과 연안해 어종에서 나타나는 특징이며 부화 전에 cone과 rod가 분화된다. 붉바리의 real-time qPCR 결과를 보았을 때, 부화시기에 cone photoreceptor가 발달하고 변태시기에 rod가 발달하는 indirect development에 해당하는 것으로 사료된다. 또한 cone opsin 유전자들의 최초 발현 시기와 rod opsin의 최초 발현시기를 비교하였을 때도 rod opsin 유전자의 발현이 부화 후 50일 경에 눈에 띄게 나타나는 것을 확인하였다.

이러한 결과들을 종합하여 볼 때, 모든 opsin 유전자가 부화 후 3일째에 발현 값을 나타냈으며, 이 시기는 부화 자어의 난황흡수가 완료되는 시기와 일치한다. 대서양 가자미(Hippoglossus hippoglossus)는 눈의 발달이 천천히 이루어 졌으며 눈 발달 시기와 기관분화, 먹이 섭취 등의 시기가 하는데(Kvenseth et al., 1996), 이는 붉바리와 유사하다. 붉바리의 형태 발달에 관한 이전 연구를 보았을 때 부화 후 4~5일 경에 개구 되며 소화관 내강의 직경이 확장 되는 등 소화기관의 분화가 이루어지는 것을 확인하였다. 따라서 이번 연구에서 붉바리의 형태 발달, 망막의 발달 그리고 opsin 유전자의 발현 양상에서 망막의 층이 분화

되는 시기와 opsin 유전자의 최초 발현 시기 그리고 난황흡수 시기가 유사한 것이 섭이 활동과 밀접하게 연관되는 것으로 사료된다. 어류의 cone과 rod의 분화는 청어, 서대(Sandy JM & Blaxter JHS, 1980), Winter flounder, (Mader MM & Cameron DA, 2004), 홍연어 *Oncorhynchus nerka*(Flamarique IN & Hawryshyn CW, 1996)등 대부분의 어류에서 cone이 rod보다 먼저 분화되는데 붐바리에서도 유사하였다. 붐바리에서 opsin 유전자들이 발현 최대값을 보이는 시기는 각각 다른데, 이는 사육환경 조건에 따른 행동 적응 특성과 관련한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Boeuf G & Lee BP(1999). Does light have an influence on fish growth?
Aquaculture 177:129–152.
- Bozzano A, Pankhurst PM, Sabatés A(2007). Early development of eye and
retina in lanternfish larvae. Visual Neuroscience 24:423–436.
- Cerri RD(1983). The effect of light intensity on predator and prey behavior
in cyprinid fish: factors that influence prey risk. Anim Behav 31:736–
742.
- Carleton Karen(2009). Cichlid fish visual systems: mechanisms of spectral
tuning. Integrative Zoology 4: 74–86.
- Evans BI & Fernald RD(1990). Metamorphosis and fish vision. Journal of
Neurobiology 21 : 1037–1052.
- Flamarique IN & Hawryshyn CW(1995). Retinal development and visual
sensitivity of young pacific sockeye salmon(*Oncorhynchus nerka*). The
Journal of Experimental Biology 199 : 869–882.
- Harboe T, Næss T, Naas KE, Rabben Hand and Skjolddal LH(1990). Age of
atlantic halibut larvae(*Hippoglossus hippoglossus* L.) at first feeding.
ICES

- Helvik JV & Walther BT(1993). Development of hatchability in halibut(*Hippoglossus hippoglossus*) embryos. Int. J. Dev. Biol 37 : 487–490.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS(2011). Fish health aspects in grouper aquaculture. Aquaculture 320 : 1–21.
- Kvenseth AM, Pittman K, Helvik JV(1996). Eye development in Atlantic halibut(*Hippoglossus hippoglossus*): differentiation and development of the retina from early yolk sac stages through metamorphosis. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53 : 2524–2532
- Kared, C.(2009). Cichlid fish visual systems: mechanisms of spectral tuning. Integrative Zoology 4: 75–86.
- Luiz OJ, Woods RM, Madin EMP, Madin JS(2016). Predicting IUCN extinction risk categories for the world ' s data deficient grouper(Teleostei: Epinephelidae). Conservation Letters, 9(5) : 342–350.
- Mader MM & Cameron DA(2004). Photoreceptor differentiation during retinal development, growth, and regeneration in a metamorphic vertebrate. The Journal of Neuroscience 24(50) : 11463–11472 · 11463
- Okumura S, Okamoto K, Oomori R, Nakazono A (2001). Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Aquaculture 206 : 165–173.

- Park IS, Seol DW, Cho SH, Song YC, Choi HJ, Noh CH, Myoung JG, Kim JM(2006). Morphogenesis of the eye of brown croaker(*Miichthys miiuy*). Ocean and Polar Research 28(3) : 287–290.
- Park IS, Im SY, Seol DW, Lee JH, Hur JW, Jeong GS(2006). Early growth and development of eye in dotted gizzard shad, *Konosirus punctatus*. Dev. Report 10(2) : 93–96.
- Park IS, Park HJ, Gil HW, Goo IB(2012). Early growth and characteristic of histological eye development in post parturition dark banded rockfish, *Sebastes inermis*. Dev. Report 16(2) : 101–106.
- Rodríguez and E. Gisber(2001). Morphogenesis of the eye of Siberian sturgeon. Journal of Fish Biology 59 : 1427–1429.
- Sandy JM & Blaxter JHS(1980). A study of retinal development in larval herring and sole. J. mar. boil. Ass. U.K. 60 : 59–71.
- Stenkamp DL(2015). Development of the vertebrate eye and retina. Progress in Molecular Biology and Translational Science 134 : 1877–1173.
- Yamaoka K, Nanbu T, Miyagawa M, Isshiki T, Kusaka A(2000). Water surface tension–related deaths in prelarval red–spotted grouper. Aquaculture 189 : 165–176.
- Villamizar N, Blanco–Vives B, Migaud H, Davie A, Carboni S, Sánchez–Vázquez FJ(2011). Effects of light during early larval development of

some aquacultured teleosts: A review. *Aquaculture* 315 : 86–94.

Vallés Roser, Estévez Alicia (2013). Light conditions for larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* 376–379 : 15–19.