

Convict Cichlid *Amatitlania nigrofasciata*의 난발생

정효선 · 고민균¹ · 이효빈¹ · 노재구 · 김동수^{2*}

국립수산물품질관리원 생명공학과, ¹부경대학교 해양수산LMO위해성평가센터, ²부경대학교 해양바이오신소재학과

Embryonic Development of Convict Cichlid *Amatitlania nigrofasciata*

Hyo Sun Jung, Min Gyun Ko¹, Hyo Bin Lee¹, Jae-Koo Noh and Dong Soo Kim^{2*}

Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

¹Department of Fisheries Biology Center for Risk Assessment of Oceans and Fisheries Living Modified Organisms, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Department of Marine Bio-Materials & Aquaculture, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

We characterized egg development and investigated the effects of temperature on embryonic development time, in the convict cichlid *Amatitlania nigrofasciata*. Fertilized eggs of this species have an ovoid shape (horizontal axis, 1.56 ± 0.02 mm; vertical axis, 1.26 ± 0.04 mm) and smooth translucent chorion surrounded by a layer of mucous secretion. At $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$, the first cleavage, blastula, gastrula and 16-somite stages of *A. nigrofasciata* eggs began at 1.5, 4.83, 14 and 40 hours after fertilization, respectively. We measured the development rate of embryos at $12-33^\circ\text{C}$ and found that the time period from fertilization to hatching was 94 hours at 24°C , 64 hours at 27°C and 50 hours at 30°C . At temperatures of $12-21^\circ\text{C}$, all fertilized eggs died before hatching and those incubated at 33°C died immediately after hatching.

Key words: *Amatitlania nigrofasciata*, Embryonic development

서 론

시클리드과(Cichlidae) 어류는 농어목(Perciformes)에 속하며 105속 1300종을 구성하는 매우 큰 과로 다양하고 종이 풍부한 동물군 중의 하나이다(Salzburger and Meyer, 2004). 그러나 시클리드 어류에 대한 연구는 분류 및 산란행동 등이 중심을 이루고 있고, 초기 개체 발생에 대한 연구는 *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus*, *Labeotropheus fuelleborni* 및 *L. trewavasae* 등과 같은 아프리카 유래 종에 대하여 이루어져 있다(Meijide and Guerrero, 2000; Kratochwil et al., 2015). 상기과의 일종인 *A. nigrofasciata*는 중앙아메리카에 분포하는 종으로 야생형은 회색빛 몸체에 8-9개의 검은색 줄무늬를 띠고 있고, 흰색의 돌연변이 계통(leucistic strain)도 존재한다(Esmaeili et al., 2013; Chi et al., 2015). 본 종은 최대 12 cm 정도까지 성장하고, 일부일처제(monogamy) 및 기질산란(substrate brooding)의 특성을 가지며 사육 및 번식의 난이도가 낮아 인기 있는 관상어종으로 알려져 있다(Hopperdietzel et al., 2014). 특

히 시클리드과 어류 중 소형에 속하는 *A. nigrofasciata*는 연중 산란이 가능하므로 수정란의 확보가 쉽고, 사육의 난이도가 낮아 실험실수준의 연구용 어류 모델로써 적합한 종이다.

유전자변형어류는 관상어뿐만 아니라 유용 단백질생산을 위한 바이오리팩터로써 이용이 가능하며 기관의 형성 및 발달, 성장 및 생식과 관련된 매커니즘을 확인하기 위한 연구로써 이용이 되고 있다(Chen, 1995; Hwang et al., 2004; Liu et al., 2004; Liu et al., 2007). 이는 주입되는 외래유전자의 종류에 따라 다양한 목적으로 유전자변형어류를 생산할 수 있고, 이때 사용되는 외래유전자의 프로모터 종류에 따라 유전자의 발현 부위, 시기 및 조건 등이 달라지므로 실험어종의 난, 자치어 및 성체의 발생에 대한 기본적인 연구가 필요하다(Sin, 1997; Hwang et al., 2004).

이에 본 연구는 이들 어류를 중소형 유전자변형 어류모델로 개발하기 위한 기초생물학적 연구의 일환으로 *A. nigrofasciata*의 난발생과 수온별 발생 및 부화시간을 조사하였다.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0420>



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 51(4) 420-425, August 2018

Received 19 May 2017; Revised 8 June 2017; Accepted 28 June 2018

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

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

재료 및 방법

친어관리

본 연구에 사용된 *A. nigrofasciata*는 leucistic strain으로 실험실에서 생산한 F1 세대 7개월령 개체를 사용하였고 이들의 무게, 체장 및 전장은 암컷의 경우 3.44 ± 0.68 g, 4.44 ± 0.20 cm 및 5.65 ± 0.18 cm였고, 수컷은 4.75 ± 2.12 g, 4.88 ± 0.54 cm 및 6.27 ± 0.72 cm였다. 사육수는 부산시 시수를 2일간 폭기한 후 $5 \mu\text{m}$ 의 미세필터로 여과하여 사용하였고, 매일 50%씩 환수하였다. 본 종은 monogamy 특성을 가지므로 40 L의 투명 유리수조 10개에 각각 암수 1쌍씩 수용하여 $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 14L:10D 광주기 조건을 유지하여 자연산란을 유도하였다. 수정란 확보를 위해 수조 내에 부착 기질로 사용될 수 있는 화분을 1개씩 함께 넣어 사육하였고, 2% astaxanthin이 첨가된 부상 사료를 3회/일 공급하였다.

수정란의 수집

자연산란을 통해서 확보된 수정란은 산란한 직후 부착기질에

서 떼내어 항온 수조 안에 설치된 부화망(망목, $330 \times 330 \mu\text{m}$; 크기, $12 \times 5 \times 5$ cm)으로 옮겨 발생을 유도하였다. 사육수는 친어 관리와 동일한 사육수를 사용하였으며, 환수는 50%씩 1회/일 수행하였다.

난발생 관찰

A. nigrofasciata 수정란의 발생 및 부화 가능 수온을 확인하기 위해서 산란직후 부착기질에서 확보된 수정란을 12, 18, 21, 24, 27, 30 및 33°C 의 부화조에서 30알씩 발생을 유도하여 각 온도별 부화 시간을 관찰하였다.

상기의 수온에 따른 수정란의 발생 및 부화 관찰을 통해 확인된 본 종의 발생 수온인 27°C 을 대상으로 난발생 특징을 관찰하였다. Kimmel et al. (1995) 및 Kratochwil et al. (2015)의 발생 단계를 기준으로 관찰하였고, 수정 직후인 Zygote stage (Fig. 1a)를 0시(time 0)로 하여 수정란의 90% 이상이 동일한 단계에 도달하는 시기를 기준으로 각 발생단계별 소요 시간과 형태학적 특징을 기록하였으며, 해부현미경(AZ100; Nikon Co., Tokyo, Japan)과 이에 부착된 디지털 카메라(DS-Ril; Nikon Co.,



Fig. 1. External morphology of the egg development stages (a-l) and post hatched larva (m) of *Amatitlania nigrofasciata*. a, zygote stage; b, early 1-cell stage; c, 1-cell stage; d, 2-cell stage; e, 4-cell stage; f, 8-cell stage; g, 32-cell stage; h, 64-cell stage; i, high stage; j, dome stage; k, embryonic shield; l, 40% epiboly; m, 95% epiboly; n, 16-somites stage; o, Pre-hatching stage; p, post hatching stage. es, embryonic shield; ez, evacuation zone; ps, perivitelline space; yp, yolk plug. Scale bar=500 μm .

Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰과 촬영을 하였다. 본 종의 평균 산란알 수는 169.6 ± 71.5 개로써 한 수조에서 확보되는 수정란(수정률 $91.35 \pm 4.02\%$) 중 50알씩 확보하여 $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 난 발생 특징을 0.5-1시간 간격으로 관찰하였고, 동일 실험을 7회 반복하였으며, 수정란의 계측은 무작위로 20알을 선정하여 장경과 단경을 측정하였다.

수온별 난발생을 관찰하기 위해 한 수조에서 확보되는 수정란을 30알씩 24, 27 및 30°C 에서 발생을 유도하여 1-2시간 간격으로 관찰하였고, 동일 실험을 2회 반복하였다.

결과 및 고찰

*A. nigrofasciata*의 수정란은 타원형으로 융모막(chorion)이 한 층의 점액질로 둘러싸여 있어 기질 또는 다른 알에 붙는 성질을 가지는 침성점착란이었다(Fig. 1a). 난황은 다양한 크기의 갈색 globule들로 가득 차 있었고, 수정 시 정자의 통로가 되는 난문(micropyle)은 동물극 쪽에 위치하고 있었다. Riehl and Patzner (1998)은 경골어류의 점착란 형태는 각 종별 특이적인 알의 구조로 점착성 성질을 가지며, 시클리드과 수정란의 대부분은 점착란 성질을 가지고 있다고 보고한 바 있다. 시클리드과의 *Amphilophus xiloensis* 및 *Cichlasoma dimerus*는 타원형으로 수정란 표면에 점액질층을 가지고 있고 동물극 주변에 filament가 존재하는 침성점착란으로 보고된 바 있다(Pandolfi et al., 2009; Kratochwil et al., 2015).

수정란의 크기는 장경 1.56 ± 0.02 mm 및 단경 1.26 ± 0.04 mm이었다. 동일과 내의 기질산란군인 *C. dimerus*와 *Pterophyllum scalare*는 1.65 ± 0.05 mm, 1.25 ± 0.05 mm와 1.44 ± 0.05 mm, 1.17 ± 0.05 mm로 보고되어 본 종과 유사한 것으로 보고된 바 있다(Meijide and Guerrero, 2000; Korzelecka-Orkisz et al., 2012). 그러나 Fleig (1993)은 구강부화를 하는 시클리드과 수정란은 점착란을 산란하는 종보다 일반적으로 난의 크기가 크다고 보고한 바 있다. 실제 시클리드과 중 구강부화 특징을 가지는 *Haplochromis xenognathus*와 *O. mossambicus*는 4.5 mm, 3.0 mm과 3.04 ± 0.20 mm, 2.19 ± 0.16 mm으로 본 종보다 약 3배 이상 큰 것으로 보고되어 있다(Holden and Bruton, 1992; Kratochwil et al., 2015). 따라서 본 종은 기질에 산란하는 시클리드과 어류에 속하기 때문에 수정란의 크기가 여타 보고된 종들과 같이 작은 것으로 생각된다.

어류의 발생에서 수온은 발생의 속도 및 생존율에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나로 각 어종은 생태적인 특징에 따라 적정수온을 가지게 된다(Rana, 1990). 이에 *A. nigrofasciata*의 수온별 발생 및 부화시간을 관찰한 결과, 12°C 와 15°C 에서는 후기 포배기부터 초기 낭배기에 모두 폐사하였고, 18°C 와 21°C 에서는 낭배기의 피포 현상과정에서 폐사하였으며, 33°C 는 수정 40시간 후 부화하였으나 부화 직후 모두 폐사하는 것으로 관찰되었다. 24°C 는 수정 94시간, 27°C 는 수정 65시간, 30°C 는 수정 50시간 후 부화하는 것으로 관찰되어 본 종의 적정 발생 수

온은 $24-30^\circ\text{C}$ 로 확인되었다(Table 2). Rana (1986)과 Ogira et al. (2014)은 시클리드과 *O. niloticus*의 최적 발생 온도가 본 종과 유사한 $25-30^\circ\text{C}$ 로써, 20°C 와 34°C 에서도 각각 6일과 3일만에 부화를 하지만 부화 전후로 생존율이 급격히 낮아진다고 보고한 바 있고, Rana (1990)은 17°C 이하의 저온 및 39.5°C 의 고온에서 난할기 과정 중 모두 폐사한다고 보고한 바 있다. 또한 동일과의 *Pterophyllum scalare* 최적 발생 온도도 $27-31^\circ\text{C}$ 로 보고된 바 있어(Pérez et al., 2003; Abdolbaghian et al., 2010), 본

Table 1. Stage of embryonic development in *Amatitlania nigrofasciata*

Stages	Hours after fertilization at $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$	Corresponding figure
Zygote period		
Zygote	0	Fig. 1a
1 cell	1.2	Fig. 1c
Cleavage period		
2 cells	1.5	Fig. 1d
4 cells	1.8	Fig. 1e
8 cells	2.3	Fig. 1f
16 cells	2.8	-
32 cells	3.3	Fig. 1g
64 cells	3.8	Fig. 1h
Blastula period		
128 cells	4.8	-
high	6.8	Fig. 1i
dome	12	Fig. 1j
15% epiboly	13	-
Gastrula period		
Germ ring (30% epiboly)	14	-
Embryonic shield (30% epiboly)	15	Fig. 1k
40-45% epiboly	17	Fig. 1l
70% epiboly	21	-
90-95% epiboly	26	Fig. 1m
100% epiboly	28	-
Segmentation period		
16 somites	40	Fig. 1n
20 somites	44	-
Hatching period		
Hatching	65	Fig. 1o

종을 포함한 시클리드과 어류들은 아프리카, 남아메리카 및 동남아시아 등의 열대 지역에서 주로 서식하기 때문에 이들의 적정 수온은 25-31℃로 비교적 높은 것으로 보여진다.

자연산란을 통해 확보된 *A. nigrofasciata* 수정란을 $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 난발생 특징을 관찰한 결과는 Table 1 및 Fig 1과 같았다. 수정 전의 난모세포는 용모막과 난황 사이에 위란강(perivitelline space)이 거의 없으나 수정 후 위란강이 점차 형성되기 시작하고, 세포질(cytoplasmic)이 동물극(animal pole) 쪽으로 움직이기 시작하여 수정 1시간 10분 후에는 난황으로부터 배반이 명확하게 분리·형성되어 1세포기(1-cell stage)가 되었다(Fig. 1c). 이때 배반은 알의 약 12% 위치에서 형성되어 있었다. 여타 시클리드과 어류는 10-12%, 송사리과 어류는 10%, 잉어과 미꾸라지속 어류는 10%로 보고된 바 있어 대부분의 경골어류의 배반의 형성 위치가 본 종과 유사한 것으로 확인되었으나(Iwamatsu, 2004; Fujimoto et al., 2006; Pandolfi et al., 2009; Korzelecka-Orkisz et al., 2012), 잉어과 어류인 *Danio rerio*는 알의 약 17% 위치에서 형성되는 것으로 보고된 바 있다(Kimmel et al., 1995).

난할(cleavage)은 다른 경골어류들과 동일하게 난황세포의 위쪽부분에서만 난할이 일어나는 부분난할(meroblastic)법으로 이루어졌다. 첫 번째 난할은 수정 1시간 30분 후 배반의 중앙 부위가 수직으로 분할되면서 2개의 할구(blastomere)가 형성되었다(2세포기, Fig. 1d). 수정 1시간 50분 후 배반이 첫 번째 난할의 직각 방향으로 분할이 일어나 4세포기가 되었고(Fig. 1e), 수정 2시간 20분 후 두 번째 난할의 직각 방향으로 2개 면에서 난할이 일어나면서 8세포기가 되었다(Fig. 1f). 난할이 계속되어 수정 2시간 50분 후 16세포기, 3시간 20분 후 32세포기, 3시

간 50분 후 64세포기가 되었다(Fig. 1g, 1h). 난할기 동안 총 6번의 난할이 일어났고, 5번의 난할 동안 생성된 각 할구는 난황 세포 바로 위에 배열되어 있었으나, 6번째 분할에서는 처음으로 세포의 2번째 층이 생성되고 이전의 난할보다는 불규칙적인 방향으로 세포가 배열되었다. 본 종의 이러한 난할의 특징은 시클리드과에서 보고된 다른 종들 및 여타 경골어류의 난할과 동일한 과정으로 진행되었다(Kimmel et al., 1995; Meijide and Guerrero, 2000; Desnitskiy, 2015).

포배기(blastula period)의 난할은 명확한 방향성 없이 불규칙적으로 진행되어 세포의 규칙적인 배열을 확인하기 어려웠으며, 계속적인 난할로 세포가 형태가 명확하지 않을 정도로 작아지게 되고, 수정 6시간 50분 후 배반은 난황 위에 공 모양 형태로 두껍게 형성되어 배반엽(blastoderm)을 형성하였다(high stage, Fig. 1i). 이 시기의 배반은 알의 15%를 차지하는 것으로 확인되었고, *A. xiloensis*, *C. dimerus* 및 *O. niloticus* 등의 여타 시클리드과에서도 수정란의 최대 15%까지 배반이 형성되는 것으로 보고된 바 있어 여타 시클리드과 어류와 동일한 양상을 보였다(Fujimura and Okada, 2007; Pandolfi et al., 2009; Kratochwil et al., 2015). 수정 12시간 후 두꺼워졌던 배반은 납작해지기 시작하고 난황 세포가 동물극 쪽으로 확장되기 시작하여 난황이 돔 형태가 되는 dome stage에 도달하였고(Fig. 1j), 이후 배반엽은 계속해서 납작해지면서 식물극 쪽으로 확장되어 난황을 덮기 시작하여 수정 13시간 후에 15% 피포(epiboly)가 형성되었다.

낭배기(gastrula period)는 배반엽이 계속적으로 식물극 쪽으로 확장하여 난황을 덮으면서 낭배를 형성하는 시기으로써, 회절(involution), 수렴(convergence) 및 확장(extension)의 형태발생 세포 운동(morphogenetic cell movements)이 일어남으로써 배환(germ ring), 배순(embryonic shield) 및 배체(embryonic body)를 형성하게 된다(Jung et al., 2015). 30% 피포 시기에 배반엽의 가장자리에서 회절이 일어나면서 수정 14시간 후에 배환이 관찰되었고, 수정 15시간 후에는 배반엽에서 수렴이 일어나면서 배반엽의 배면(dorsal side)이 두꺼워져 배순이 형성되었다(Fig. 1k). 배환과 배순이 형성되는 시기에는 일시적으로 피포 현상이 중지되었다. 이러한 현상은 이미 보고된 여타 시클리드과, 송사리과 및 가자미과 어류와 동일하였으나(Meijide and Guerrero, 2000; Iwamatsu, 2004; Jung et al., 2015), 50% 피포 시기에 배환과 배순이 형성되는 잉어과 어류와는 다르게 나타났다(Kimmel et al., 1995; Fujimoto et al., 2004).

배환 및 배순이 형성된 이후부터 다시 피포 현상이 진행되고, 수정 21시간 후 45-50% 피포 시기에 evacuation zone이 관찰되었다(Fig. 1l). 이러한 evacuation zone은 배반의 동물극 부분이 일시적으로 비어 보이는 것으로, 피포 현상이 진행되면서 심층세포(deep cell)가 빠르게 식물극 쪽으로 이동하고, 동시에 계속적인 세포들의 수렴현상으로 배축(embryonic axis)으로 세포가 이동하면서 일시적으로 형성된다고 Ballard (1981)는 보

Table 2. Embryonic development of *Amatitlania nigrofasciata* at different water temperatures

Development stages	Hours after fertilization		
	24℃	27℃	30℃
Zygote period			
Zygote	0 h	0 h	0 h
Cleavage period			
4 cells	4 h	1.8 h	1 h
Blastula period			
128 cells	10 h	4.8 h	2 h
Gastrula period			
70% epiboly	31 h	21 h	14 h
100% epiboly	39 h	28 h	19 h
Segmentation period			
22 somites	57 h	44 h	28 h
Hatching period			
Hatching	94 h	65 h	50 h

고한 바 있다. 이후 피포 현상이 계속되면서 세포의 확장 운동으로 배순의 배면이 길어지면서 배체가 형성되었고, 수정 25시간 후 90-95% 피포 시기가 되어 배반엽으로 덮이지 못한 식물극의 난황이 돌출되어 yolk plug를 형성하였으며(Fig. 1m), 수정 28시간 후 배반엽을 100% 덮는 것으로 확인되었다(Table 1). 이처럼 피포 현상이 진행되면서 계속적인 형태발생 세포 운동으로 배체가 형성되는 본 종의 난배기 발생 형태는 시클리드과 뿐만 아니라 잉어과, 송사리과 및 넙치과 등의 경골어류 난배기의 발생 형태와 동일한 것으로 관찰되었다(Holden and Bruton, 1992; Fujimoto et al., 2006; Song et al., 2009; Jung et al., 2015).

체절기(segmentation period)는 체절(somite)이 분화되고, 꼬리 신장과 눈, 심장 및 귀소포(otic vesicle) 등이 형성되는 시기로서 수정 40시간 후 16개 체절의 분화 및 꼬리 신장이 관찰되었고(Fig. 1n), 수정 44시간 후에는 20개 체절이 분화되었다. 수정 59시간 후에는 부화직전의 단계로 이미 수정체, 심장 및 귀소포가 형성된 상태로 꼬리의 움직임이 관찰되었고(Fig. 1o), 수정 65시간 후부터 부화하기 시작하였다(Fig. 1p).

수온변화에(24, 27 및 30℃) 따른 난발생 결과는 Table 2와 같았다. 수정란에서 포배기의 128 세포기까지 소요시간은 24℃에서 10시간, 27℃에서 4.8시간, 30℃에서 2시간이 소요되었고, 난배기의 70% 및 100% 피포 형성시기는 24℃에서 31시간 및 39시간, 27℃에서 21시간 및 28시간, 30℃에서 14시간 및 19시간이 소요되었다. 또한 22체절기 및 부화까지 소요되는 시간은 24℃에서 57시간 및 94시간, 27℃에서 44시간 및 65시간, 30℃에서 28시간 및 50시간이 소요되었다.

*A. nigrofasciata*의 수정란 형태 및 난발생 특징은 시클리드과의 여타 종들과 유사한 것으로 관찰되었으나, 온도별 발생 시간 및 부화시간 등은 종에 따른 차이가 있는 것으로 확인되었다. 본 연구는 다양한 생태적 특징을 가지는 시클리드과 어류 중 하나인 *A. nigrofasciata*를 이용한 유전자변형 어류모델 개발의 기초생물학적 연구자료가 될 것으로 보이며, 자치어의 형태 및 생식소 등의 발달 특징에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

References

- Abdolbaghian S, Jamili S and Matinfar A. 2010. The effect of temperature and diet on the degrees of specific growth rate percentage (SGR %) and weight growth (WG %) of angel fish fry *Pterophyllum scalare*. J Fish Aquat Sci 5, 311-315. <http://dx.doi.org/10.3923/jfas.2010.311.315>.
- Ballard WW. 1981. Morphogenetic movements and fate maps of vertebrates. Am Zool 21, 391-399.
- Chen TT. 1995. Transgenic fish and aquaculture. In: Towards Sustainable Aquaculture in Southeast Asia and Japan: Proceedings of the Seminar-Workshop on Aquaculture Development in Southeast Asia. Bagarino TU and Flores EEC, eds. SEAFDEC Aquaculture Department, Iloilo, Philippines, 81-89.
- Chi JR, Liao LS, Wang RG, Jhu CS, Wu JL and Hu SY. 2015. Molecular cloning and functional characterization of the hepcidin gene from the convict cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*) and its expression pattern in response to lipopolysaccharide challenge. Fish Physiol Biochem 41, 449-461. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-014-9996-6>.
- Desnitskiy AG. 2015. On the Features of Embryonic Cleavage in Diverse Fish Species. Ontogeny 46, 385-392. <http://dx.doi.org/10.1134/S106236041506003X>.
- Esmaeili HR, Gholamifard A, Sayyadzadeh G, Parsi B, Mirghiyasi S and Ghasemian S. 2013. New record of the convict cichlid, *Amatitlania nigrofasciata* (Günther, 1867), from the Middle East (Actinopterygii: Cichlidae). Aqua Int J Ichthyol 19, 225-229.
- Fleig R. 1993. Embryogenesis in mouth-breeding cichlids structure and fate of the enveloping layer. Roux. Arch Dev Biol 203, 124-130. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00365051>.
- Fujimoto T, Kataoka T, Otani S, Saito T, Aita T, Yamaha E and Arai K. 2004. Embryonic stages from cleavage to gastrula in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Zoolog Sci 21, 747-755. <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.21.747>.
- Fujimoto T, Kataoka T, Sakao S, Saito T, Yamaha E and Arai K. 2006. Developmental stages and germ cell lineage of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Zoolog Sci 23, 977-989. <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.23.977>.
- Fujimura K and Okada N. 2007. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. Dev Growth Differ 49, 301-324. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00926.x>.
- Holden KK and Bruton MN. 1992. A life-history approach to the early ontogeny of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces, Cichlidae). S Afr J Zool 27, 173-191. <http://dx.doi.org/10.1080/02541858.1992.11448279>.
- Hopperditzel C, Hirschberg RM, Hünigen H, Wolter J, Richardson K and Plendl J. 2014. Gross morphology and histology of the alimentary tract of the convict cichlid *Amatitlania nigrofasciata*. J Fish Biol 85, 1707-1725. <http://dx.doi.org/10.1111/jfb.12530>.
- Hwang G, Müller F, Rahman MA, Williams DW, Murdock PJ, Pasi KJ, Goldspink G, Farahmand H and Maclean N. 2004. Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. Mar Biotechnol 6, 485-492. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-004-3121-2>.
- Iwamatsu T. 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. Mech Dev 121, 605-618. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.012>.
- Jung HS, Kim YK, Kim HC, Noh JK, Lee JH and Kim DS. 2015. Embryonic Development of Haploid Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean J Fish Aquat Sci 48, 696-

703. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0696>.
- 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>.
- Korzelecka-Orkisz A, Szalast Z, Pawlos D, Smaruj I, Tański A, Szulc J and Krzysztof F. 2012. Early ontogenesis of the angelfish, *Pterophyllum scalare* Schultze, 1823 (Cichlidae). *Neotrop ichthyol* 10, 567-576. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252012005000017>.
- Kratochwil CF, Sefton MM and Meyer A. 2015. Embryonic and larval development in the Midas cichlid fish species flock (*Amphilophus spp.*): a new evo-devo model for the investigation of adaptive novelties and species differences. *BMC Dev Biol* 15, 1-15. <http://dx.doi.org/10.1186/s12861-015-0061-1>.
- Lin CH, John JA, Ou LW, Chen JC and Lin CH. 2004. Cloning and characterization of metallothionein gene in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Aquatic toxicology* 66, 111-124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.06.003>.
- Liu WY, Wang Y, Qin Y, Wang YP and Zhu ZY. 2007. Sitedirected gene integration in transgenic zebrafish mediated by cre recombinase using a combination of mutant lox sites. *Marine biotechnology* 9, 420-428. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-007-9000-x>.
- Meijide FJ and Guerrero GA. 2000. Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. *J Zool Lond* 252, 481-493. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb01231.x>.
- Ogira PG, Liti D and Wanga J. 2014. Effects of Temperature on Embryonic Development Time and Yolk Absorption Period of *Oreochromis Niloticus*. *Internat J Sci Res* 3, 321-323.
- Pandolfi M, Cánepa MM, Meijide FJ, Alonso F, Vázquez GR, Maggese MC and Vissio PG. 2009. Studies on the reproductive and developmental biology of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Biocell* 33, 1-18.
- Pérez E, Díaz F and Espinac S. 2003. Thermoregulatory behavior and critical thermal limits of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein) (Pisces: Cichlidae). *J Therm Biol* 28, 531-537. [http://doi.org/10.1016/S0306-4565\(03\)00055-X](http://doi.org/10.1016/S0306-4565(03)00055-X).
- Rana HJ. 1986. Parental influences on egg quality, fry production and fry performance in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *O. mossambicus* (Peters). Ph. D. Thesis, University of Stirling, Scotland, U.K.
- Rana HJ. 1990. Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* egg and fry I. gross embryology, temperature tolerance and rates of embryonic development. *Aquaculture* 87, 165-181. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90273-P](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90273-P).
- Riehl R and Patzner RA. 1998. Minireview: The modes of egg attachment in teleost fishes. Behaviour, adaptation and morphology. *Ital J zool* 65, 415-420.
- Salzburger W and Meyer A. 2004. The species flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Naturwissenschaften* 91, 277-290. <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0528-6>.
- Sin FYT. 1997. Transgenic fish. *Rev Fish Biol Fish* 7, 417-441. <https://doi.org/10.1023/A:1018452214763>.
- Song HY, Nam YK, Bang IC and Kim DS. 2009. Embryogenesis and early ontogenesis of a marine medaka, *Oryzias danconena*. *Kor J Ichthyol* 21, 227-238.