

# 강도다리(*Platichthys stellatus*) 변태 과정에서 안구 이동의 방향에 관여하는 환경적 요인

김태민<sup>1</sup> · 장현석<sup>2</sup> · 박종열<sup>3</sup> · 이효빈<sup>4</sup> · 임한규<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>국립목포대학교 바이오의약보건생명융합학협동과정, <sup>2</sup>국립목포대학교 수산생명의학과, <sup>3</sup>국립군산대학교 해양생명과학과, <sup>4</sup>한국생명공학연구원 디지털바이오혁신센터

## Effects of Environmental Factors on the Eye Direction in Juvenile Starry Flounder *Platichthys stellatus*

Tae Min Kim<sup>1</sup>, Hyun Seok Jang<sup>2</sup>, Jung Yeol Park<sup>3</sup>, Hyo bin Lee<sup>4</sup> and Han Kyu Lim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Program of Biomedicine, Health and Life Convergence Sciences, Mokpo National University, Muan 58554, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Fisheries Life Medicine, Mokpo National University, Muan 58554, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Aquaculture and Aquatic Science, Kunsan National University, Gunsan 54150, Republic of Korea

<sup>4</sup>Digital Biotech Innovation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 34141, Republic of Korea

The direction of eye movement in Pleuronectiformes is species-specific. In farmed flounder, deviations in eye direction can reduce marketability. Therefore, we explored the effects of genetic and environmental factors on the direction of eye movements in the starry flounder *Platichthys stellatus* to address this economic challenge. Four pairs of female and male starry flounder broodstock, with eyes positioned to the right or left, were used in a mating experiment. The experimental groups were established with breeding seawater temperatures set at 10, 14, and 18°C for the water temperature experiment. Whole-body samples of juveniles were collected to analyze the expression of genes related to eye movement and direction. The mating experiment results showed no significant differences in abnormal eye movement. In the water temperature experiment, the rate of abnormal eye movement was significantly higher at 32.19±1.33% in the 18°C group than in the 10 and 14°C groups. Genetic analysis of eye movement related to water temperature revealed that the expression of eye migration genes was significantly higher at 10°C. Moreover, no significant differences were observed in mating experiments. In conclusion, water temperature and not mating affected the eye movement of starry flounder.

Keywords: Starry flounder, Eye migration, Eye direction, Deformity rate, *Platichthys stellatus*

### 서 론

강도다리(*Platichthys stellatus*)는 가자미목(Pleuronectiformes) 가자미과(Pleuronectidae)에 속하는 어종으로, 북태평양 연안부터 캘리포니아 만에 이르는 지역에 걸쳐 분포하는 것으로 알려져 있다. 가자미목 어류의 가장 큰 형태적 특징은 비대칭성으로, 대칭적인 부화 자어 시기에서 치어기로 성장하는 변태 과정 동안 한쪽 안구와 입의 이동이 이루어진다. 안구 이동에 관여하

는 조절 기구는 여전히 알려지지 않은 상태이며, 이러한 비대칭성에 대한 진화적 기원을 밝히고자 여러 연구가 수행되었다. 가자미류의 안구 이동에 대한 진화론적 가설로는 먹이 획득 및 섭식 행동을 위한 환경 적응 시스템이 가장 유력하다. 가자미류는 저서성 어류로 먹이 획득에 넓은 시각적 파노라마가 필요했기 때문에 점차 두 개의 눈이 위쪽으로 향하는 비대칭적인 형태로 진화된 것으로 알려졌다(Schreiber, 2006). 저서 어류의 표적 먹이는 소형 저서성 무척추동물과 소형 어류로(Orcutt, 1950), 시

\*Corresponding author: Tel: +82. 61. 450. 2395 Fax: +82. 61. 452. 8875

E-mail address: limhk@mnu.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0448>

Korean J Fish Aquat Sci 57(4), 448-458, August 2024

Received 20 June 2024; Revised 23 July 2024; Accepted 4 August 2024

저자 직위: 김태민(대학원생), 장현석(대학원생), 박종열(연구원), 이효빈(연구원), 임한규(교수)

각 및 후각 신호를 혼합하여 사용하는 경향이 있기 때문에 눈이 중앙에서 멀리 이동한 정도가 양안 시야에 영향을 미칠 수 있다고 알려졌다(De Groot, 1971; Gibson et al., 2014).

또한 강도다리 형태의 다른 비대칭성도 먹이 활동에 영향을 줄 수 있는데, 콧구멍의 위치가 후각에 영향을 미칠 가능성이 있으며, 등지느러미와 뒷지느러미의 위치와 길이 차이는 한 방향으로 회전하는 능력에 영향을 미칠 수 있다(Bergstrom and Palmer, 2007). 이 비대칭성은 치어의 변태 과정동안 이루어지는데, 다른 척추동물과 달리 가자미류의 변태 기간에는 안구의 축(axis)과 내이(inner ear)의 수평 반고리관(horizontal semi-circular canals)이 서로 수직으로 향하게 되면서 일반적인 유영을 하는 표영성 어류(pelagic fish)와 달리 저서성 어류(benthic fish)의 측면화된 행동의 발달이 이루어질 수 있다(Graf and Baker, 1983). 그 외에 가자미류 내이의 후두뇌(Meyer et al., 1981)와 이석(otoliths of inner)의 비대칭성도 이에 기여한다는 연구결과가 있다(Helling et al., 2005; Schreiber et al., 2010). 척추동물은 배아 발생 동안에 측면화된 내장 기관의 발달이 이루어지지만, 가자미류는 척추동물 중 유일하게 배아 발생 후에 비대칭 발달을 겪는 어류로(Youson, 1988), 그 특이성에 대한 여러 추정과 가설이 오랜 기간 동안 연구되어 보고되고 있다(Policansky, 1982; Brewster, 1987; Okada et al., 2001, 2003a, 2003b; Friedman, 2008; Guerrero-Peña et al., 2024).

가자미류의 안구 이동에 대한 메커니즘을 밝히고자 두개골의 비대칭성이 눈의 이동을 주도한다는 가설의 연구에서는 비대칭적인 두개골에 따라 안면 재구조화(remodeling)가 발생하여 눈과 입의 위치가 이동하는 가능성에 대해 보고되었다(Schreiber, 2006; Sæle et al., 2006). 다른 연구로는 변태 과정 동안 눈을 다른 쪽으로 밀어내는 안구 하부 조직의 세포 증식이 눈의 이동을 주도하는 주요 요인임을 제시하는 연구가 수행되었다(Bao et al., 2011; Schreiber, 2013; Sun et al., 2015; Shao et al., 2017). 안와화 조직의 세포 증식과 관련한 대다수의 연구에서 갑상선호르몬(thyroid hormone, TH)이 이러한 세포 증식과 안구 이동을 촉진하는 것에 영향이 큰 것으로 제시되었다. 따라서 TH 억제제가 안구의 불완전한 이동과 대칭적인 형태의 치어를 유도할 수 있음이 보고되었다(Schreiber, 2013; Campinho et al., 2015, 2019; Shi et al., 2023). 최근에는 유전체나 전사체 분석을 통해 가자미류의 안구 이동에 관여하는 유전자들을 밝히고자 하는 연구가 이루어지고 있으며(Shao et al., 2017; Bao, 2023; Guerrero-Peña et al., 2024), 안와화 세포 증식과 관련하여 splicing factor arginine/serine rich-3 (SFRS3) (Bao et al., 2005)이나 prolactin (PRL) (Si et al., 2021)이 관련 핵심 유전자로 제시되었다. 특히 prolactin의 경우 가자미류의 초기 발달에서 변태 과정 동안 세포 증식을 촉진하고 TH와 상호작용하여 안구 이동을 유도할 수 있다고 밝혀졌기 때문에(Si et al., 2021), 여러 화합물들의 연관성이 시사되고 있다. 가자미류의 안구 이동 기전을 명확하게 밝히기 위해 진화적 관점에서 분자 유전학

적 관점에 이르기까지 많은 연구에도 불구하고, 여전히 가자미류의 안구 이동에 대한 정확한 메커니즘은 풀리지 않고 있다.

가자미목 어류 중 특히 강도다리는 비정상적인 안구 방향을 가진 개체가 많이 출현하기 때문에, 안구가 왼쪽에 있는(sinistral morph) 개체와 오른쪽에 있는(dextral morph) 개체 둘 다 다수 존재하여 안구의 방향이 일관적이지 않다(Hubbs and Kuronuma, 1942; Orcutt, 1950; Forrester, 1969; Boklage, 1984; Bergstrom and Palmer, 2007). 안구의 방향은 가자미 종마다 다르지만, 종 내에서 강도다리와 같은 두가지 모두 출현을 드물게 나타나고 있다(Munroe, 2005). 이러한 안구의 다른 방향은 지역에 따라 다르게 나타나는데, 캘리포니아 연안은 왼쪽(sinistral)과 오른쪽(dextral)이 50% 비율이며, 한국과 일본을 포함한 동북아 연안에서는 왼쪽 유안측 개체가 거의 100%에 가까운 비율을 보인다(Hubbs and Kuronuma, 1942; Bergstrom, 2007; Bergstrom and Palmer, 2007; Kang et al., 2012; Kim et al., 2013). 강도다리는 2000년대 초반부터 국내에서 양식대상 어종으로 대량 사육된 이후로 국내 양식 산업에서 넙치를 대체할 수 있는 어종으로 주목받고 있으며, 저온에서 먹이 섭식이 가능하고 질병에 강해 점차 생산량이 증가하고 있는 추세이다(Lim et al., 2013; Lim, 2016; Shin and Lee, 2023). 최근에는 완전한 종자 생산 기술이 확립되어 양식 대표 어종으로 자리매김하고 있으나, 인공적인 대량생산 과정에서 비정상적인 안구 방향을 가진 개체의 비율이 증가하고 있다. 한국에서는 통상적으로 왼쪽 유안측 개체가 정상 개체로 인식되기 때문에, 강도다리의 안구 방향이 다를 경우(오른쪽 유안측 개체)에는 시장 가치가 하락하고 상품성이 저하된다(Seikei, 1991; Kang et al., 2012; Kang and Kim, 2024).

따라서 양식 어가에서는 변태 과정이 끝난 치어들을 대상으로 출하 전에 기형으로 판단하여 선별 후 제거하는 작업이 필수적으로 이루어져 안구 방향이 비정상적인 치어를 사육하는 양식 어가의 경제적 부담이 증가하고 있다. 본 연구에서는 강도다리 양식에서의 이러한 경제적 문제를 해결하여 양식 생산성을 개선하고, 더불어 강도다리 치어의 변태 과정에서 안구 이동과 그 방향에 관여하는 요인을 밝히고자 하였다. 따라서 양식 강도다리를 대상으로 정상 어미와 비정상 어미의 교배 실험과 사육 수온 실험을 수행하여 유전적 또는 환경적 요인이 안구 이동 방향에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 윤리성명서

모든 절차는 동물의 윤리적 대우에 대한 지침에 따라 수행되었으며 목포대학교 동물관리 및 이용위원회 제 1183호(2013년 12월 17일)의 승인을 받았습니다. 2013년부터 *P. stellatus*를 이용한 동물실험 승인을 받았으며, 목포대학교 동물실험시이 용위원회의 동물실험계획 심의과정에 따라 매년 재승인 신청

서를 제출하고 있습니다.

### 실험어 및 사육관리

자·치어의 사육실험은 전라남도 여수시 돌산읍에 위치한 강도다리 종자 배양장에서 실시하였다. 교배 실험구를 위한 강도다리 암컷과 수컷 어미(평균 전장  $34.08 \pm 0.81$  cm, 평균 중량  $477 \pm 1.14$  g)는 해당 배양장에서 사육된 개체들을 사용하였으며 사육 먹이는 수협침강골드 5호(Suhyup, Seoul, Korea)를 사용하였으며 조단백질 50.0% 이상, 조지방 10.0% 이상, 조회분 17.0% 이하, 조섬유 3.0% 이하, 인 2.7% 이하였다. 수온 실험구를 위한 강도다리 수정란 또한 해당 배양장에서 인공 수정된 수정란을 사용하였다. 교배 실험구의 경우, 강도다리 암컷과 수컷 어미에서 각각 채란 및 채정을 하여 인공 수정시킨 후, 수정란은 각 실험구 별로 구분된 200 L 수조에 입식하였고 부화 후 착저 전까지 로티퍼와 알테미아를 강도다리 사육 매뉴얼대로 급이하면서 사육하였다. 수온 실험구의 경우, 강도다리 수정란을 동일한 방식으로 수온 실험구 별로 구분된 200 L 수조에 입식하였다. 실험구 별 통계분석을 위해 각각 수조 3개씩 배치하여 실험을 진행하였다.

### 교배 실험

안구 방향이 다른 암수를 각각 채정·채란하여 인공수정을 실시하였다. 암수 어미의 생식소 성숙은 육안으로 확인하여 성숙한 개체를 선별하였고 안구의 위치별로 구분하였다.

교배 실험구의 구분은 A, B, C 및 D 실험구로 나누었으며, A 실험구는 정상(왼쪽) 암컷과 정상(왼쪽) 수컷을 교배하였고, B 실험구는 정상(왼쪽) 암컷과 비정상(오른쪽) 수컷을 교배하였다. C 실험구는 비정상(오른쪽) 암컷과 정상(왼쪽) 수컷을 교배하였고, D 실험구는 비정상(오른쪽) 암컷과 비정상(오른쪽) 수컷을 교배시켰다. 인공 수정된 수정란은 부상률과 수정률을 측정하였고, 각 실험구 별로 수조를 구분하여 200 L 수조에서 자연 수온으로 관리하였다. 부화 후 샘플 채취는 7일 간격으로 진행하였으며 유전자 분석을 위해 자어 약 100 mg을 2 mL cryovial (Thermo, MA, USA)에 RNAlater (Invitrogen, MA, USA)를 넣어 24시간동안 4°C에 보관 후 RNA (ribonucleic acid) 추출 시까지 액체 질소(-196°C)에 보관하였다.

변태과정이 끝나고 착저까지 완료된 F1 개체는 교배실험구 별로 100마리씩 플레이트에 담아 3번씩 촬영하여 ImageJ (LOCI, University of Wisconsin, Madison, WI, USA) 안구 방향 비율을 확인하였다.

### 수온 실험

사육 수온이 안구이동에 미치는 영향을 파악하기 위해서 수정란을 입식한 수조의 해수 수온을 1일 1°C씩 상승시켜 실험구 별로 수온을 10°C, 14°C, 및 18°C로 맞추었다. 수온을 유지하기 위해 티타늄 히터와 온도조절기를 사용하였으며, 용존산소량은 7.0 mg/L 이상을 유지하였다. 유전자 분석을 위한 시료 처리나

비정상 안구비율 측정은 상기한 방법과 동일하게 진행하였다.

### 유전자 발현 분석

강도다리의 변태 과정 동안 어미의 안구위치와 사육 수온이 치어의 안구 위치에 미치는 유의적인 영향을 파악하기 위하여, 어류에서 안구 위치와 유전자 발현에 관한 문헌 조사를 실시하였고, Itoh et al. (2010), Wei et al. (2017) 논문을 참고하여, Bmpr1B, FGF7, Six, TgfBr2, Dio1, Dio2, Dio3, Otx2, Wnt1 을 분석하였다. qRT-PCR에 사용되는 프라이머는 Table 1에 나타내고 있다. 실험에 사용된 프라이머는 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank에 등록되어 있는 염기서열을 사용하여 제작하였다.

Total RNA는 TRIzol® 프로토콜(Invitrogen)을 사용하여 자·치어 샘플에서 추출되었다. 강도다리 자·치어를 1mL TRIzol® 용액에서 균질기로 균질화하고 chloroform 200  $\mu$ L를 첨가하여 -20°C에서 5분간 반응시킨 후, 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하고 상층액과 동일한 양의 isopropanol과 혼합하여 10분간 반응시켰다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 80% 에탄올 100  $\mu$ L를 첨가하여 펠렛을 세척하고, 에탄올은 원심분리기를 사용하여 완전히 제거한 후, 100  $\mu$ L의 DEPC water를 첨가하였다.

DNA 오염을 방지하기 위해 DNase I (Qiagen, Hilden, Germany)을 처리하였고, 1%의 아가로스 젤에서 RNA 분해 및 오염을 평가하였다. cDNA (complementary deoxyribonucleic acid)는 Maxima First Strand cDNA 합성 키트(Thermo, MA, USA)를 사용하여 정제된 total RNA로부터 합성되었다. RT-qPCR (real-time polymerase chain reaction, PCR)을 위해 Maxima Enzyme Mix 2  $\mu$ L, 5x Reaction Mix 4  $\mu$ L, RNA 14  $\mu$ L를 혼합하였다. cDNA 합성조건은 10분 동안 25°C, 30분 동안 65°C, 5분 동안 85°C였다. 합성된 cDNA는 Nanodrop One C (Thermo, MA, USA)를 사용하여 정량화되었으며, 이후 -80°C에서 보관하였다.

qRT-PCR은 안구이동 과정에서 환경적·유전적 요인에 의한 유전자 차등 발현을 조사하기 위해 crocoSTARTM 96 Real-Time PCR System (TaKaRa, Kusatsu, Japan)을 사용하여 수행되었다. cDNA 농도는 500 ng/ $\mu$ L로 조정하였으며, 각 시료의 발현은 각 프라이머(10 pM)의 0.5  $\mu$ L, cDNA의 2  $\mu$ L, 멸균수의 9  $\mu$ L를 혼합한 TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), Bulk (TaKaRa, Kusatsu, Japan)를 사용하여 2  $\mu$ L의 반응량을 3번씩 측정하였다. qRT-PCR 조건은 95°C에서 30초, 95°C에서 5초, 60°C에서 30초로 40 사이클로 설정하여 수행하였다. Housekeeping 유전자는 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 사용하였고, 해당 레퍼런스 유전자의 발현 수준은 실험구의 상대적인 유전자발현 수준을 Ct 값으로 산출하는데 사용되었으며, 발현 수준은 평균 Ct 값을 사용하여 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 방법으로 계산되었다.

Table 1. Primer sequences used in this study

Gene	Accession number	Primer (5'-3')
Bone morphogenetic protein receptor type-1B- like (Bmpr1B)	XM_020101059.1	F: TGAAGGGTCGGTAGGAACCTG R: GTCTCGTCCAGAACCTCTGG
Fibroblast growth factor7- like (FGF7)	XM_020099474.1	F: TTGTAGGTTTCCTCGCCTTG R: AGTCGGTGGCATCTTGAGTC
Homeobox protein six 1- like (Six1)	XM_020084923.1	F: TTGAGGACGCTCTCGTTCTT R: CCACTTGCTCCTGCGTAAAG
Tgf- beta receptor type-2-like (TgfBr2)	XM_020102424.1	F: CTCGTCCTGTGGGAGATCAT R: AGCATGAAGGACAGCGTTCT
Iodothyronine deiodinase type-1 (Dio1)	AB362421.1	F: AGGCTACGCTGAGATTTG R: AGCAGTTATAGACGGAGGT
Iodothyronine deiodinase type-2 (Dio2)	AB362422.1	F: CTGGTGCCAGGATGCGAAAT R: AAGTCCTCAACCAACTGTCG
Iodothyronine deiodinase type-3 (Dio3)	AB362423.1	F: GGATTTCTTGTGCATCAGGA R: GGGACTCCAAGGTGAACATC
Ortodenticle homeobox2 (Otx2)	NW_017859650.1	F: CTGCATGCAGAGGTCTACC R: GGTAAGAGCCGCAGTCCATG
Wingless-type MMTV integration site family. member1 (Wnt1)	NW_017859655.1	F: CCAAGAACGTGCAGTTGGTC R: GCCACTTGCACTCCTTTATG
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	MH588515.1	F: CCAGAACATCATCCCAGCTT R: GGCCTTACAACCTTCTTGA

통계 분석

각 실험에서 얻어진 측정값은 평균과 표준오차(mean±SE)로 표시하였으며, 측정값들 사이의 유의차 유무는 SPSS-통계 프로그램(version 26)을 이용하여 one-way ANOVA, Duncan's multiple range test로 사후검정하였다(P<0.05).

결 과

현장 조사

실험에 앞서, 강도다리 종자생산 시에 발생하는 안구 방향 기형 현황 조사를 우선적으로 실시하고자 하였다. 정상적인 강도다리의 안구 위치는 왼쪽으로, 이와 다르게 오른쪽에 눈이 위치한 기형 개체들의 출현 빈도를 조사하기 위하여 2020년 2월부터 3월까지 국내 강도다리 양식장들에서 기형 비율을 조사하였다. 전남, 전북 및 제주 지역의 양식장들에서 강도다리 종자의 안구 위치를 조사한 결과, 오른쪽으로 눈이 돌아간 기형 개체는 평균 7.4±2.0% 비율로 확인되었다(Table 2).

교배 실험

교배 실험구는 네 그룹으로 나누어 진행되었으며, 각각의 그룹은 암컷과 수컷 강도다리의 안구위치(왼쪽 또는 오른쪽)에 따

라 분류되었다. 정상(왼쪽) 암컷과 정상(왼쪽) 수컷, 정상(왼쪽) 암컷과 비정상(오른쪽) 수컷, 비정상(오른쪽) 암컷과 정상(왼쪽) 수컷, 및 비정상(오른쪽) 암컷과 비정상(오른쪽) 수컷을 각각 A, B, C 및 D 실험구로 나누었다. 실험구 별로 인공수정시킨 수정란은 수조를 구분하여 육란하였으며, 실험구 별로 수정란의 부상률과 수정률을 측정하여 결과 부상률은 각각 44%, 52%, 56%, 56%로 나타났으며 수정률은 63%, 67%, 66%, 69%로 확인되었다.

강도다리 교배실험구의 F1 치어의 착저가 완료되고 난 후, 4개 실험구의 F1 개체의 안구 방향을 확인한 결과는 Fig. 1에 나타났다. 정상(왼쪽) 암컷 과 정상(왼쪽) 수컷을 교배한 A 실험구

Table 2. Abnormal rate of eye position in starry flounder *Platichthys stellatus* (n=300)

Aquaculture farm	Location	Abnormal rate (%)
A	Jeonbuk Buan-gun	10.4
B	Jeonbuk Gochang-gun	4.3
C	Jeonbuk Gochang gun	8.6
D	Jeonnam Goheung gun	7.7
E	Jeju	5.3
F	Jeonam Yeosu	6.3
G	Jeonbuk Buan-gun	9.0

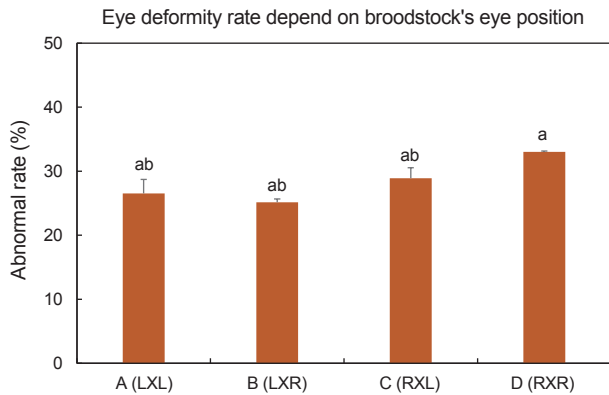


Fig. 1. The eye deformity rate in F1 juveniles varies based on the eye position of the broodstock. LXL, left-eye female×left-eye male; LXR, left-eye female×right-eye male; RXL, right-eye female×left-eye male; RXR, right-eye female×right-eye male. Different letters indicate significant differences based on ANOVA followed by Duncan's multiple ranged test (n=300, P<0.05).

는 오른쪽으로의 안구 이동 비율(기형률)이  $26.52 \pm 2.18\%$ 이었으며, 정상(왼쪽) 암컷과 비정상(오른쪽) 수컷을 교배한 B 실험구는  $25.13 \pm 0.52\%$ , 비정상(오른쪽) 암컷과 정상(왼쪽) 수컷을 교배한 C 실험구는  $28.9 \pm 1.65\%$ , 비정상(오른쪽) 암컷과 비정상(오른쪽) 수컷을 교배한 D 실험구는  $33.02 \pm 0.13\%$ 로 확인되었다. 모든 실험 결과의 평균값과 표준오차를 사용하여 SPSS 통계 프로그램(version 24)로 one-way ANOVA와 Duncan's multiple range test를 수행한 결과, 4개 실험구 간에 안구 기형률에서 유의한 차이는 나타나지 않았다(n=300, P>0.05).

### 수온 실험

착저 후 강도다리 F1 개체의 그룹별 안구 위치 비율을 조사한 결과, 10°C 실험구의 비정상(오른쪽) 안구 위치 비율은  $14.54 \pm 1.62\%$ 였고, 14°C 실험구는  $27.65 \pm 3.92\%$ , 18°C 실험구는  $32.19 \pm 1.33\%$ 로 나타났다(Fig. 2). 통계 분석 결과, 10°C 실험구에 비해 14°C와 18°C 실험구에서 유의적으로 안구 기형률이 높은 것으로 확인되었다(P<0.05).

### 일자별 유전자 발현 분석

안구 이동과 방향에 미치는 유전적 요인을 분석하기 위해 각 그룹별 교배실험구의 유전자 발현을 비교 분석하였다. 사육 도중 자치어의 폐사로 인해 샘플 채취에 한계가 있어 모든 주차별 발현 비교는 수행하지 못했으나, 강도다리 치어의 착저 시기인 14일과 28일 샘플을 통해 주요 시기의 유전자 발현을 분석하였다.

14일차 샘플에서 실험구 별 유전자 발현을 비교 분석한 결과, Bmpr1B는 A 실험구가 다른 실험구보다 다소 낮은 발현을 보였다(Fig. 3). 반면에 Fgf7, Six1, 및 TgfBr2 유전자의 경우 다

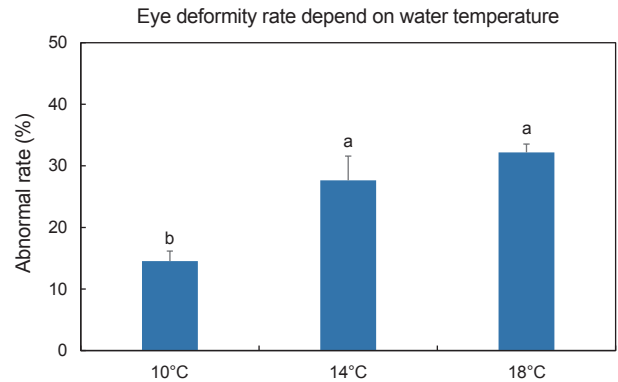


Fig. 2. Eye deformity rate of F1 juvenile depend on rearing water temperatures. Different letters indicate significant differences based on ANOVA followed by Duncan's multiple ranged test (n=300, P<0.05).

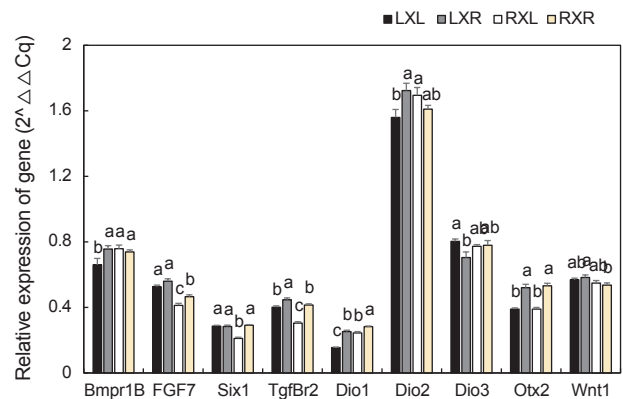


Fig. 3. Relative expression of genes in different breeding experimental groups (A, B, C, D) at 14 days, focusing on genetic factors influencing eye migration. The genes analyzed include *Bmpr1B*, *FGF7*, *Six1*, *TgfBr2*, *Dio1*, *Dio2*, *Dio3*, *Otx2*, and *Wnt1*. Different letters indicate significant differences based on ANOVA followed by Duncan's multiple ranged test (n=9, P<0.05).

른 실험구에 비해 C 실험구에서 낮은 발현을 보였으며, 갑상선 호르몬 관련유전자인 Dio1-3에서는 각 실험구에서 발현값이 유사하였다. Otx2는 정상(왼쪽)수컷과 교배한 A, C 실험구에서 다른 실험구에 비해 낮은 발현을 보였으며, wnt1는 모든 실험구에서 유사한 발현을 보였다. 결론적으로 실험구 간의 유전자 발현에 차이는 있었지만 모두 유의적인 차이는 보이지 않았다(P>0.05).

28일차 샘플에서 실험구 별 유전자 발현을 비교 분석한 결과, 14일차에 비해 각 유전자들의 발현이 다소 낮아진 결과를 볼 수 있었다(Fig. 4). Bmpr1B, Fgf7 및 Six1 유전자의 경우 C 실험구에서 다른 실험구들에 비해 낮은 발현을 보였고, Dio1와 Wnt1 유전자는 B 실험구에서 낮은 발현을 보였다. 그 외 유전자에서

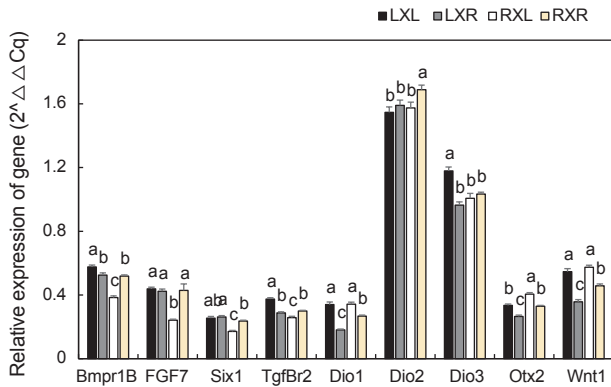


Fig. 4. Relative expression of genes in different breeding experimental groups (A, B, C, D) at 28 days, focusing on genetic factors influencing eye migration. The genes analyzed include *Bmpr1B*, *FGF7*, *Six1*, *TgfBr2*, *Dio1*, *Dio2*, *Dio3*, *Otx2*, and *Wnt1*. Different letters indicate significant differences based on ANOVA followed by Duncan's multiple ranged test ( $n=9$ ,  $P<0.05$ ).

는 모두 유사한 발현을 보였다. 14일차와 마찬가지로 28일차 샘플에서도 교배실험구간의 유전자 발현은 유의적인 차이는 보이지 않았다( $P>0.05$ ).

14일차와 28일차 샘플에서 특정 유전자의 발현에는 실험구간 차이가 있었으나 통계적으로 유의적인 차이는 나타나지 않았다( $P>0.05$ ). 안구 이동과 방향에 미치는 환경적 요인인 수온에 의한 관련 유전자들의 발현 변화를 관찰하기 위해, 부화 이후부터 49일차까지 자치어와 치어를 대상으로 수온별 유전자 발현을 비교 분석하였다.

*Bmpr1B* 유전자의 경우 초기에 모든 실험구에서 다소 높게 발현되는 모습을 보였으나 주차가 경과됨에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5). 7일차와 14일차에서는 10°C, 14°C, 18°C로 수온이 증가할수록 순차적으로 차등발현 되는 양상을 보였고 21일차에는 10°C, 14°C에서 유의하게 높은 발현을 보였고( $P<0.05$ ), 49일차에서 14°C 실험구가 다른 실험구보다 더 높은 발현을 보였으나, 21일차 이후 외에는 유의적인 차이를 보이지 않았다( $P>0.05$ ).

*FGF7* 유전자 발현의 경우, 10°C와 18°C 실험구에서 각각 초기에 다소 높게 발현이 되다가 시간이 경과하면서 점차 감소하였고, 14°C 실험구는 7일차부터 49일까지 높은 발현을 보였다가 점차 감소하는 모습을 보였다(Fig. 5). 7일차부터 28일을 제외한 42일차까지 10°C 실험구가 14°C와 18°C 실험구에 비하여 유의적으로 높게 발현되었으며, 49일차에서는 14°C 실험구가 다른 실험구보다 유의적으로 높은 발현을 보였다( $P<0.05$ ).

*Six1* 유전자 발현의 경우, 10°C와 18°C 실험구에서 부화 후 초기에 다소 높게 발현이 되다가 시간 경과에 따라 감소하였고, 14°C 실험구는 49일차에 가장 높게 발현하는 모습을 보였다(Fig. 5). 14일차와 21일차에서 10°C, 14°C 및 18°C 순서로 수

온이 높을수록 차등발현을 보였고, 7일차, 35일차에서 10°C 실험구가 유의적으로 높은 발현을 보였다( $P<0.05$ ). 다른 주차에서는 각 수온별 유전자 발현에서 유의한 차이가 나타나지 않았다( $P>0.05$ ).

*TgfBr2* 유전자는 10°C 실험구에서는 부화 후 초기에 높게 발현이 되다가 시간이 점차 지나면서 감소하는 경향을 보였고, 14°C와 18°C 실험구는 모든 주차에서 꾸준하게 일관된 발현을 보였다(Fig. 5). 14일차까지 10°C 실험구가 14°C와 18°C 실험구보다 유의적으로 높게 발현되었으며( $P<0.05$ ), 다른 주차에서는 유의한 차이를 보이지 않았다( $P>0.05$ ).

*Dio1* 유전자 발현의 경우, 모든 실험구에서 초기에 다소 높게 발현이 되다가 점차 감소하는 모습을 보였다(Fig. 5). 7일차부터 42일차까지 10°C 실험구가 14°C와 18°C 실험구보다 유의적으로 높은 발현을 보였으며, 14일차부터 28일차까지는 각각 실험 온도별로 유의한 차등발현을 보였다( $P<0.05$ ). 다른 주차에서는 수온별 유전자 발현의 유의한 차이를 보이지 않았다( $P>0.05$ ).

*Dio2* 유전자 발현은 모든 실험구가 유사한 발현을 보였다(Fig. 5). 14일차에 10°C 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높게 발현되었으며 35일차에는 18°C 실험구가 다른 실험구에 비해 발현량이 유의적으로 높은 것으로 나타났다( $P<0.05$ ). 다른 주차에서는 수온별 유전자 발현의 유의한 차이를 보이지 않았다( $P>0.05$ ).

*Dio3* 유전자 발현의 경우, 10°C 실험구가 21일까지 다소 높게 발현이 되다가 점차 감소하는 양상을 보였고, 14°C와 18°C 실험구는 각각 35일차와 42일차에서 가장 높은 발현을 보였으나 이후 점차 감소하는 모습을 보였다(Fig. 5). 7일, 21일, 42일차에서 10°C 실험구가 14°C와 18°C 실험구보다 유의적으로 높게 발현되었으며, 35일차에서는 18°C에서 유의하게 높은 발현을 보였다( $P<0.05$ ).

*Otx2* 유전자 발현의 경우, 10°C 실험구에서 부화 후 7일차와 14일차에 높게 발현이 되다가 실험이 진행될수록 급격하게 감소하는 경향이 나타났으며, 14°C와 18°C 실험구는 낮은 발현을 나타냈다(Fig. 5). 14일차까지는 10°C 실험구가 실험구보다 높은 발현을 보였으며( $P<0.05$ ), 다른 주차에서는 유의한 차이를 보이지 않았다( $P>0.05$ ).

*Wnt1* 유전자는 모든 실험구에서 부화 후 초기에 다소 높게 발현이 되다가 점차 감소하는 모습을 보였다(Fig. 5). 7일, 14일, 21일, 35일차에서 10°C 실험구가 14°C와 18°C 실험구보다 유의하게 높은 발현을 보였고, 14일차에서는 실험 수온 별로 차등발현을 보였다( $P<0.05$ ).

## 고 찰

강도다리는 한국을 포함한 동북아시아에서 각광받고 있는 양식대상 어종으로 고부가가치가 높은 어류이다. 강도다리의 표준 종자생산기술은 최근 확립되고 있으나, 여전히 강도다리 종

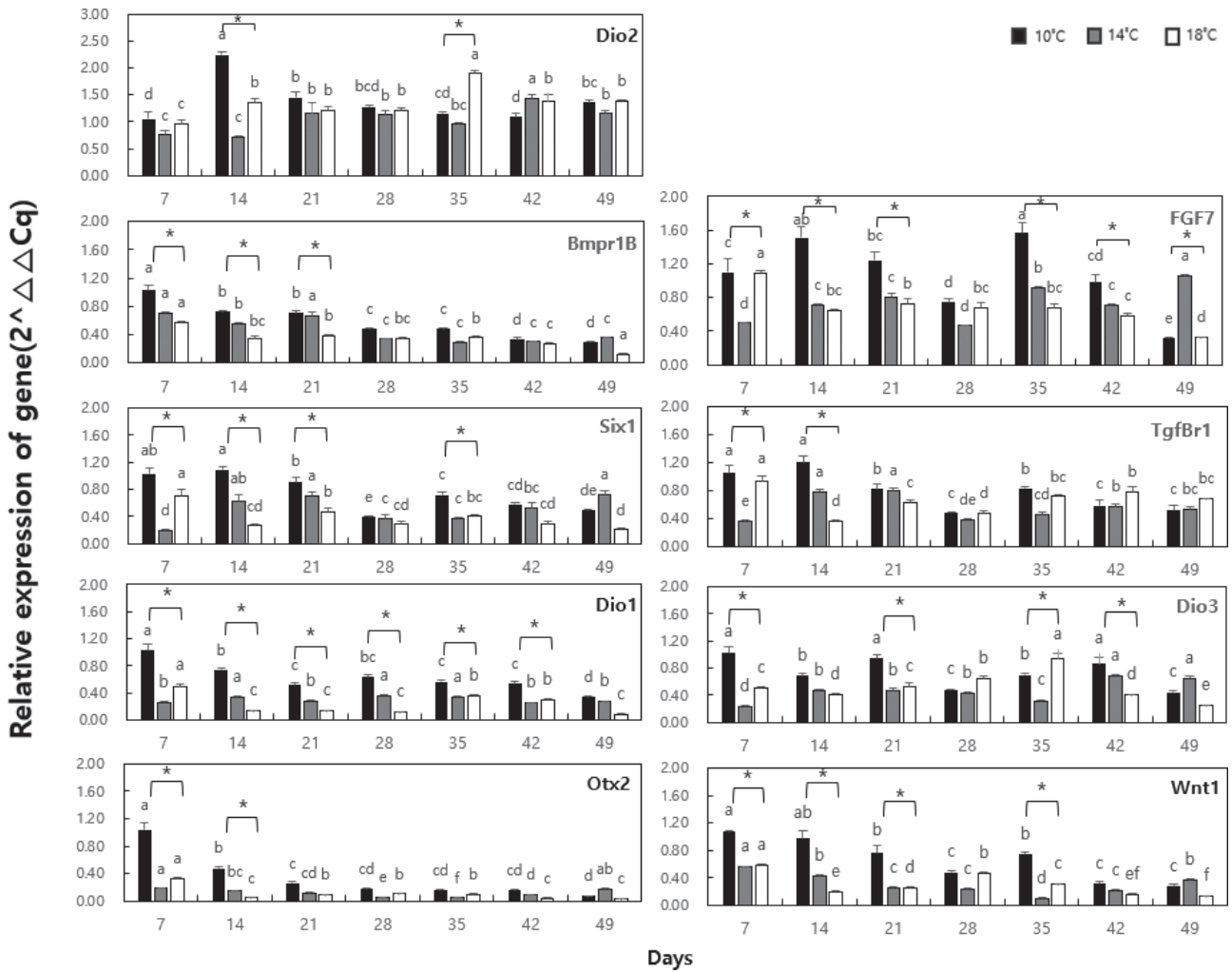


Fig. 5. Relative expression of eye migration gene normalized to GAPDH in starry flounder *Platichthys stellatus* at different temperatures (10°C, 14°C, 18°C) over 49 days. Different letters indicate significant differences based on ANOVA followed by Duncan’s multiple range test (n=7, P<0.05). Asterisks indicate significant statistical differences between experimental groups on the difference temperature (n=9, \*P<0.05). GAPDH, Glyceraldehyde3- phosphate dehydrogenase.

자생산 과정에서 다양한 요인들로 인해 안구 이동 및 체색 등에 다양한 비정상개체가 다수 발생하고 있다. 강도다리 양식어가에서는 강도다리 치어의 눈 위치가 우측에 있는 개체는 기형으로 간주하고 미판매 대상으로 선정하여, 출하 전 선별 작업을 통해 제거하기 때문에 시간적·경제적인 피해를 입게 된다. 치어의 변태 과정에서 안구이동은 가자미 어류의 특징인 비대칭성 진화로 인해 발생하게 된다. 툰돔(*Scophalmus maximus*), *Solea senegalensis* 등 많은 가자미류의 안구 방향은 종에 따라 다르고 심지어 종 내에서도 다를 수 있다(Xing et al., 2020). 많은 연구에서 서로 다른 유전자형에 따라 이동하는 눈의 방향이 달라질 것이라고 예상하지만 가자미류의 눈 위치에 대한 유전적인 정보는 여전히 불분명하다.

본 연구에서는 강도다리 치어의 안구 이동 방향에 영향을 미

치는 유전적·환경적 요인을 조사하기 위해 현장 조사, 교배 실험, 수온 실험 및 유전자 발현 분석을 수행하였다. 강도다리의 안구 이동은 부화 후 약 24일이 지나는 시기에 이루어진다는 기존의 연구(Iwanicki et al., 2017; Gao et al., 2022)를 참고하여 실험을 진행하였다.

국내 강도다리 양식장에서 수행된 안구 방향 비정상 현황 조사 결과, 오른쪽에 눈이 위치한 기형 개체는 평균 7.4 ± 2.0%로 나타났고, 이는 강도다리 양식 과정에서 일정 비율의 비정상 개체가 지속적으로 발생함을 시사하며, 이러한 비정상 개체의 출현 빈도를 줄이기 위한 방안이 필요함을 제시하였다.

교배 실험 결과, 각각 좌안구와 우안구를 가진 강도다리 암수 교차 교배로 발생한 치어들의 안구 이동 기형률에는 유의미한 차이가 나타나지 않았으며, 관련 유전자 발현 등 모든 실험에서

유의적인 차이를 볼 수 없었다. 수정 후 수정란의 부상율과 수정율은 A-D 각 실험구별로 차이를 보이지 않았으며, 안구 이동률을 비교한 결과 A-D 각각  $26.52 \pm 2.18\%$ ,  $25.13 \pm 0.52\%$ ,  $28.90 \pm 1.65\%$ ,  $33.02 \pm 0.13\%$ 으로 수치상으로는 C와 D 실험구에서 더 높은 안구 비정상상을 보였으나 통계적으로 유의적인 차이는 보이지 않았다. 또한 안구이동과 수정률과 부상률도 서로 연관성을 보이지 않았다. 이는 안구 이동 방향에 대한 유전적 요인이 영향을 미치지 않는다는 사실을 시사한다.

교배 실험구 유전자 발현에는 모든 유전자에서 14일차보다 28일차에서의 발현이 모두 감소하는 모습을 볼 수 있었다. 14일차에서는 각각 교배한 A-D 실험구 내에서 서로 다른 발현을 보였다. Bmpr1B, Otx2는 A 실험구에서 낮은 발현을 보였고 Fgf7, Six1, TgfBr2의 유전자의 경우 C 실험구에서 낮은 발현을 보였지만 9개의 유전자에서 각 실험구 간에 유의한 차이는 보이지 않았다. 28일차에서도 C 실험구에서 Bmpr1B 등 3개의 유전자에서 낮은 발현을 보였으며, B 실험구에서도 Dio1, Wnt1에서 낮은 발현을 보였다. 그 외 유전자에서는 비슷한 발현을 보였지만 14일차 결과와 마찬가지로 실험구 간에 유의한 차이는 보이지 않았다.

수온 실험을 통해 안구이동 비율을 확인한 결과, 10°C에서 사육된 F1 치어의 안구 기형률은  $14.54 \pm 1.62\%$ 로 가장 낮았고, 비교적 수온이 높은 14°C, 18°C가 10°C보다 안구 이동 비율이 각각  $27.65 \pm 3.92\%$ ,  $32.19 \pm 1.33\%$ 으로 유의하게 높게 나타났다. 이는 높은 수온이 안구 기형률을 증가시킬 수 있는 가능성을 제시할 수 있다. 수온 실험구 샘플에서 안구 이동과 관련된 유전자 발현 결과, Bmpr1B, FGF7, Six1, TgfBr2, Dio1-3, Otx2 및 Wnt1 유전자들이 치어의 발달 초기 단계에서 수온에 따라 다르게 발현됨을 확인할 수 있었다. 10°C 실험구에서 초기 발달 단계에서 높은 유전자 발현이 관찰되었으며, 이는 낮은 수온이 초기 발달에 긍정적인 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 특히, Bmpr1B는 전체적인 실험 기간 49일까지 유의미한 차이는 없었지만 10°C에서의 발현이 14°C, 18°C 보다 더 높게 나타난 것을 볼 수 있었다. Bmpr1B는 골격 형성 단백질로 골격 기형은 주로 광주기, 용존 산소, 이산화탄소, 높은 수류 및 해양 환경으로 인해 크게 영향을 받는다(Haga et al., 2011). Bolla and Holmefjord (1988)는 *Hippoglossus hippoglossus* 자어의 골격 기형이 온도가 높을수록 더 많이 발생되었다고 보고하였다. 본 실험에서도 온도가 높을수록 Bmpr1B이 낮게 발현된 것을 보아 온도가 높을수록 골격 기형에 의한 안구이동이 더 증가하는 것으로 생각된다. 망막생성세포의 분화나 눈의 위치 지정 및 분열에 관여하는 Wnt1, FGF7, Six1, Otx2 등 다른 유전자들에도 강도다리 자어의 변태 중 안구이동 시기로 파악되는 2-28일차에서 유의적으로 14°C, 18°C가 감소하였다.

실험에 사용되었던 Wnt, Otx 외 Rx 유전자는 망막 전구 세포의 형성과 렌즈 유도에 필요한 몇 가지 중요한 기능을 수행한다. 신경조직에서 Wnt의 경로가 분자에 의해 억제되면 신경 외배

엽이 형성되고 이 신경 외배엽은 Otx2를 전사한다. Otx2는 Rx의 발현을 활성화하여 눈에 필요한 유전자의 전사를 활성화한다. 이는 어류뿐만 아니라 여러 척추동물 중의 눈 발달에 중요한 역할을 하는데 비정상적인 조절을 할 때 눈 형성 및 기능의 심각한 이상을 초래한다. 온도에 민감한 *medaka*의 경우 외부 환경 요인으로 인한 Rx3 유전자의 전사 억제 시 눈 형성이 작게 되거나 형성이 이루어지지 않은 돌연변이가 자주 발생한다(Balley et al., 2004). 이번 연구에는 다루어지지 않았지만 실험에 사용하였던 상호유전자들의 발현이 비슷한 양상을 보였으므로, 앞으로 가자미류에서 Rx3와 Wnt, Otx의 상호작용에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. FGF 또한 외부 열 스트레스로 인해 변형되어 *Danio rerio*의 꼬리의 체절 수가 감소하는 골격 기형과 색소 침착 등의 기형을 발생시켰고 이는 높은 온도에서의 유전자 변형으로 부정적인 영향을 받은 것으로 예상된다(Connolly, 2008).

TH와 연관된 유전자 발현의 분석 결과, Dio1에서 변태 초기에 10°C가 수온이 높은 14°C, 18°C 보다 유의미하게 높게 발현되었고, Dio2, 3 또한 시간별로 10°C에서의 발현이 더 높게 나타났다. TH는 안구이동에 관여하는 필수 요소이다(Manchado et al., 2008). TH는 척추동물의 성장, 발달 및 신진대사의 주요 조절자이며 어류의 초기 발달에 영향을 미친다(Marchand et al., 2004; Walpita et al., 2007). Little et al. (2013)는 높은 온도에서 사육된 zebrafish *Danio rerio*가 낮은 온도에서 사육된 zebrafish 보다 TH에 대해 민감하게 반응하였다고 보고하였다. 높은 온도에서의 체내 TH반응이 환경 변화에 적응하는 어류의 생리활동에 부정적인 영향을 미친 것이라고 생각된다. 또한 TH 교란물질인 propylthiouracil (PTU), tetrabromobisphenol-A (TBBPA)는 zebrafish 치어의 눈의 전사 변화에 더 강한 영향을 미쳤다는 연구가 있어(Baumann et al., 2019), TH가 안구이동과 관련된 중요한 역할을 할 수 있음을 의미한다. 안구이동을 관여하는 유전자의 발현은 42일차 이후에는 실험구 간의 유의한 차이는 나타나지 않았다. 또한 실험이 주차별로 진행함에 따라 유전자 발현 또한 점차 감소하는 추세를 보였고, 다른 어종에서도 시간이 지남에 따라 발현량이 감소하는 경향을 보였다. 본 연구의 결과와 마찬가지로 안구나 골격 형성에 관여하는 유전자의 경우 초기 변태 과정에서 높게 발현되었고 변태가 끝나자 발현량이 감소한다는 보고(Bao, 2023)와 같이 초기 사육 중 발생하는 여러 조건들이 어류 기형의 원인이 되는 것으로 생각된다.

본 연구 결과, 강도다리 치어의 안구 이동 방향에 유전적 요인보다는 환경적 요인인 수온이 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 높은 수온에서 안구 비정상상이 증가하는 경향을 보였으며, 회유성 어종인 *Coregonus lavaretus*에서는 수온이 9°C로 올라가자 난황에서부터 기형률이 36%로 증가하였고 폐사율 또한 증가하였다. 기형 또한 주로 배아의 눈에서 발견되었으며 한쪽 눈이 작거나 눈에 색소 침착을 보였다(Cingi et al., 2010).

이는 양식 환경에서 수온 관리를 통해 기형 발생을 줄일 수 있



는 가능성을 보여주었다. 유전자 발현 분석을 통해 갑상선 호르몬 및 기타 관련 유전자들의 발현이 수온에 따라 달라질 수 있음을 확인하였으며, 이러한 유전자들이 안구 이동에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사하였다. 따라서, 강도다리 양식에서 적절한 수온을 유지하는 것이 안구 비정상 개체를 줄이고 생산성을 높이는 데 중요한 요소로 작용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 안구 이동 메커니즘에 대한 더 구체적인 유전적 및 분자적 연구가 필요하며, 이러한 연구는 향후 강도다리 및 기타 가자미류의 양식 효율성을 높이는 데 기여할 수 있을 것이다.

최근에도 경골어류의 안구이동에 관한 연구는 지속되고 있으며, 아직 유전적인 요소는 명확하게 밝혀지지 않았지만 최근 연구결과에 따르면 면역 관련 유전자가 변태 중 안구 이동이 이루어진 개체에서 상향 조절되었다는 연구(Guerrero-Peña et al., 2024)와 자가포식 억제제(3-MM)를 안와조직에 주입하고 자가포식이 감소함에 따라 안구이동이 줄어들었다는 연구 등이 보고되었다(Gao et al., 2022). 이러한 연구들은 가자미류의 눈 이동 메커니즘에 새로운 연구 방법을 제공해줄 수 있을 뿐만 아니라, 양식 산업의 관점에서 가자미류 종자 생산의 경제성에 큰 이점을 줄 것이라고 판단된다.

환경적 요인에 관한 실험 또한 고수온 뿐만 아니라 다른 다양한 해양 환경 조건에서의 연구가 필요할 것으로 보인다. 최근 해양은 해양산성화와 같은 이상 요인들이 어류의 성장에 영향을 미치고 있으며(Gavilk and Specker, 2004; Kim et al., 2015; Wen et al., 2013; Xiao et al., 2023), 해양산성화로 인한 pH변화와 염분 등의 조건들이 가자미류의 안구 이동에 영향을 줄 수 있기 때문에, 추후 다양한 해양 조건에서의 추가 연구가 필요하다.

## 사 사

이 논문은 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구입니다(RS-2022-KS221671, 수산종자산업 디지털 혁신기술개발).

## References

- Bailey TJ, El-Hodiri H, Zhang L, Shah R, Mathers PH and Jamrich M. 2004. Regulation of development by Rx genes. *Int J Dev Biol* 48, 761-770. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041878tb>.
- Bao B. 2023. Genetic basis for eye migration in flatfish. In: *Flatfish Metamorphosis*. Springer, Singapore, 249-267. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-7859-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-19-7859-3_9).
- Bao B, Ke Z, Xing J, Peatman E, Liu Z, Xie C, Xu B, Gai J, Gong X, Yang G, Jiang Y, Tang W and Ren D. 2011. Proliferating cells in suborbital tissue drive eye migration in flatfish. *Dev Biol* 351, 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.032>.
- Bao B, Yang G, Liu Z, Li S, Wang Z and Ren D. 2005. Isolation of SFRS3 gene and its differential expression during metamorphosis involving eye migration of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1725, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.04.032>.
- Baumann L, Segner H, Ros A, Knapen D and Vergauwen L. 2019. Thyroid hormone disruptors interfere with molecular pathways of eye development and function in zebrafish. *Int J Mol Sci* 20, 1543. <https://doi.org/10.3390/ijms20071543>.
- Bergstrom CA. 2007. Morphological evidence of correlational selection and ecological segregation between dextral and sinistral forms in a polymorphic flatfish, *Platichthys stellatus*. *J Evol Biol* 20, 1104-1114. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01290.x>.
- Bergstrom CA and Palmer AR. 2007. Which way to turn? Effect of direction of body asymmetry on turning and prey strike orientation in starry flounder *Platichthys stellatus* (Pallas) (Pleuronectidae). *J Fish Biol* 71, 737-748. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01531.x>.
- Boklage CE. 1984. On the inheritance of directional asymmetry (sidedness) in the starry flounder, *Platichthys stellatus*: Additional analyses of Policansky's data. *Behav Brain Sci* 7, 725-730. <https://doi.org/10.1017/S0140525X00028326>.
- Bolla S and Holmefjord I. 1988. Effect of temperature and light on development of *Atlantic halibut* larvae. *Aquaculture* 74, 355-358. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90379-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90379-1).
- Brewster B. 1987. Eye migration and cranial development during flatfish metamorphosis: A reappraisal (Teleostei: Pleuronectiformes). *J Fish Biol* 31, 805-833. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1987.tb05281.x>.
- Campinho MA. 2019. Teleost metamorphosis: The role of thyroid hormone. *Front Endocrinol* 10, 448915. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00383>.
- Campinho MA, Silva N, Roman-Padilla J, Ponce M, Manchado M and Power DM. 2015. Flatfish metamorphosis: A hypothalamic independent process?. *Mol Cell Endocrinol* 404, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.025>.
- Cingi S, Keinänen M and Vuorinen PJ. 2010. Elevated water temperature impairs fertilization and embryonic development of whitefish *Coregonus lavaretus*. *J Fish Biol* 76, 502-521. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02502.x>.
- Connolly MH. 2008. Stress-induced variation in zebrafish (*Danio rerio*): The influence of heat shock on the development of the phenotype. *Zebrafish* 5, 364+.
- de Groot SJ. 1971. *Bothriocephalus scorpii* (Müller) (Cestoda: Pseudophyllidea) in turbot *Scophthalmus maximus* (L.) and brill *S. rhombus* (L.) from the southern North Sea. *J Fish Biol* 3, 147-149. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1971.tb03658.x>.
- Forrester CR. 1969. Sinistrality in *Platichthys stellatus* off British Columbia. *J Fish Board Canada* 26, 191-196. <https://doi.org/10.1139/f69-023>.

- Friedman M. 2008. The evolutionary origin of flatfish asymmetry. *Nature* 454, 209-212. <https://doi.org/10.1038/nature07108>.
- Gao L, Huang Y, Sun M and Bao B. 2022. The role of autophagy on eye migration during the metamorphosis of *Paralichthys olivaceus*. *Cell Dev* 169, 203751. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203751>.
- Gavlik S and Specker JL. 2004. Metamorphosis in summer flounder: Manipulation of rearing salinity to synchronize settling behavior, growth and development. *Aquaculture* 240, 543-559. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.07.007>.
- Gibson RN, Stoner AW and Ryer CH. 2014. The behaviour of flatfishes. In: Flatfishes: Biology and Exploitation. Gibson RN, Nash RDM, Geffen AJ and van der Veer HW, eds. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ, U.S.A., 314-345. <https://doi.org/10.1002/9781118501153.ch12>.
- Graf W and Baker R. 1983. Adaptive changes of the vestibulo-ocular reflex in flatfish are achieved by reorganization of central nervous pathways. *Science* 221, 777-779. <https://doi.org/10.1126/science.6603656>.
- Guerrero-Peña L, Suarez-Bregua P, Sánchez-Ruiloba L, Méndez-Martínez L, García-Fernández P, Tur R and Rotllant J. 2024. Unraveling the transcriptomic landscape of eye migration and visual adaptations during flatfish metamorphosis. *Commun Biol* 7, 253. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-05951-x>.
- Haga Y, Du SJ, Satoh S, Kotani T, Fushimi H and Takeuchi T. 2011. Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bone deformity model. *Aquaculture* 315, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.026>
- Helling K, Scherer H, Hausmann S and Clarke AH. 2005. Otolith mass asymmetries in the utricle and saccule of flatfish. *J Vestib Res* 15, 59-64. <https://doi.org/10.3233/VES-2005-15201>
- Hubbs CL and Kuronuma K. 1942. Hybridization in nature between two genera of flounders in Japan. *Mich Acad Sci Arts Lett* 27, 267-306.
- Itoh K, Watanabe K, Wu X and Suzuki T. 2010. Three members of the iodothyronine deiodinase family, dio1, dio2 and dio3, are expressed in spatially and temporally specific patterns during metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool Sci* 27, 574-580. <https://doi.org/10.2108/zsj.27.574>
- Iwanicki TW, Flamarique IN, Ausió J, Morris E and Taylor JS. 2017. Fine-tuning light sensitivity in the starry flounder (*Platichthys stellatus*) retina: Regional variation in photoreceptor cell morphology and opsin gene expression. *J Comp Neurol* 525, 2328-2342. <https://doi.org/10.1002/cne.24205>.
- Kang DY and Kim HC. 2024. Functional relation of agouti signaling proteins (ASIPs) to pigmentation and color change in the starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 291, 111524. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.111524>.
- Kang DY, Lee JH, Kim WJ and Kim HC. 2012. Morphological specificity in cultured starry flounder *Platichthys stellatus* reared in artificial facility. *Fish Aquat Sci* 15, 117-123. <https://doi.org/10.5657/FAS.2012.0117>.
- Kim KS, Shim JH and Kim S. 2015. Effects of CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification on the growth of the larval olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Ocean Sci J* 50, 381-388. <https://doi.org/10.1007/s12601-015-0035-z>.
- Kim SK, Yoon SC, Youn SH, Park SU, Corpus LS and Jang IK. 2013. Morphometric changes in the cultured starry flounder, *Platichthys stellatus*, in open marine ranching areas. *J Environ Biol* 34, 197-204.
- Lim HK. 2016. Effect of exogenous hormones on ovulation and gonadal steroid plasma levels in starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Aquac Int* 24, 1061-1071. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-9971-6>.
- Lim HK, Min BH, Kwon MG, Byun SG, Park MS, Jeong MH, Kim YS and Chang YJ. 2013. Blood physiological responses and growth of juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus* exposed to different salinities. *J Environ Biol* 34, 885-890.
- Little AG, Kunisue T, Kannan K and Seebacher F. 2013. Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Biol* 11, 26. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-26>.
- Manchado M, Infante C, Asensio E, Planas JV and Canavate JP. 2008. Thyroid hormones down-regulate thyrotropin  $\beta$  subunit and thyroglobulin during metamorphosis in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gen Comp Endocrinol* 155, 447-455. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.07.011>.
- Marchand O, Duffraisie M, Triqueneaux G, Safi R and Laudet V. 2004. Molecular cloning and developmental expression patterns of thyroid hormone receptors and T3 target genes in the turbot (*Scophthalmus maximus*) during post-embryonic development. *Gen Comp Endocrinol* 135, 345-357. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2003.10.012>.
- Meyer DL, Seydlitz-Kurzbach UV and Fiebig E. 1981. Bilaterally asymmetrical uptake of [<sup>14</sup>C] 2-deoxyglucose by the octavo-lateralis complexes in flatfish. *Cell Tissue Res* 214, 659-662. <https://doi.org/10.1007/BF00233505>.
- Munroe TA. 2005. Distributions and biogeography. In: Flatfishes: Biology and Exploitation, 1st edn. Gibson RN, ed. Blackwell Science, Ltd., Ames, IA, U.S.A., 42-67. <https://doi.org/10.1002/9781118501153.ch3>.
- Okada N, Takagi Y, Seikai T, Tanaka M and Tagawa M. 2001. Asymmetrical development of bones and soft tissues during eye migration of metamorphosing Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Cell Tissue Res* 302, 59-66. <https://doi.org/10.1007/s004410100353>.
- Okada N, Takagi Y, Tanaka M and Tagawa M. 2003a. Fine

- structure of soft and hard tissues involved in eye migration in metamorphosing Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Anat Rec A* 273A, 663-668. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10074>.
- Okada N, Tanaka M and Tagawa M. 2003b. Histological study of deformity in eye location in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Sci* 69, 777-784. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00686.x>.
- Orcutt HG. 1950. Fish bulletin No. 78. The life history of the starry flounder *Platichthys stellatus* (Pallas). Ph.D. Desserations, University of San Diego, San Diego, CA, U.S.A.
- Policansky D. 1982. Flatfishes and the inheritance of asymmetries. *Behav Brain Sci* 5, 262-265. <https://doi.org/10.1017/S0140525X0001181X>.
- Sæle Ø, Smáradóttir H and Pittman K. 2006. Twisted story of eye migration in flatfish. *J Morphol* 267, 730-738. <https://doi.org/10.1002/jmor.10437>.
- Schreiber AM. 2006. Asymmetric craniofacial remodeling and lateralized behavior in larval flatfish. *J Exp Biol* 209, 610-621. <https://doi.org/10.1242/jeb.02056>.
- Schreiber AM. 2013. Chapter six-Flatfish: An asymmetric perspective on metamorphosis. *Curr Top Dev Biol* 1-3, 167-194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00006-X>.
- Schreiber AM, Wang X, Tan Y, Sievers Q, Sievers B, Lee M and Burrall K. 2010. Thyroid hormone mediates otolith growth and development during flatfish metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol* 169, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.08.008>.
- Seikai T. 1991. Influences of fluorescent light irradiation, ocular side pigmentation, and source of fishes on the blind side pigmentation in the young Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzoshoku* 39, 173-180. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.39.173>.
- Shao C, Bao B, Xie Z, Chen X, Li B, Jia X, Yao Q, Orti G, Li W, Li X, Hamre K, Xu J, Wang L, Chen F, Tian Y, Schreiber A M, Wang N, Wei F, Zhang J, Dong Z, Gao L, Gai J, Sakamoto T, Mo S, Chen W, Shi Q, Li H, Xiu Y, Li Y, Xu W, Shi Z, Zhang G, Power D M, Wang Q, Scharl M and Chen S. 2017. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nat Genet* 49, 119-124. <https://doi.org/10.1038/ng.3732>.
- Shi Y, Shi Y, Ji W, Li X, Shi Z, Hou J and Fu Y. 2023. Thyroid hormone signaling is required for dynamic variation in opsins in the retina during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Biology* 12, 397. <https://doi.org/10.3390/biology12030397>.
- Shin SP and Lee J. 2023. Infection of *Enteromyxum leei* in cultured starry flounder *Platichthys stellatus*. *Fish Aquat Sci* 26, 234-240. <https://doi.org/10.47853/FAS.2023.e20>.
- Si Y, Li H, Gong X and Bao B. 2021. Isolation of prolactin gene and its differential expression during metamorphosis involving eye migration of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Gene* 780, 145522. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145522>
- Sun M, Wei F, Li H, Xu J, Chen X, Gong X, Tian Y, Chen S and Bao B. 2015. Distortion of frontal bones results from cell apoptosis by the mechanical force from the up-migrating eye during metamorphosis in *Paralichthys olivaceus*. *Mech Dev* 136, 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.01.001>.
- Walpita CN, Van der Geyten S, Rurangwa E and Darras VM. 2007. The effect of 3, 5, 3'-triiodothyronine supplementation on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development and expression of iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors. *Gen Comp Endocrinol* 152, 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.02.020>.
- Wei F, Chen J, Chen X and Bao B. 2017. Comparative analysis of the neurula transcriptomes of two species of flatfishes: *Platichthys stellatus* and *Paralichthys olivaceus*. *Gene* 596, 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.020>.
- Wen W, Huang X, Chen Q, Feng L and Wei L. 2013. Temperature effects on early development and biochemical dynamics of a marine fish, *Inimicus japonicus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 442, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.01.025>.
- Xiao Z, Cao L, Liu J, Cui W and Dou S. 2023. pCO<sub>2</sub>-driven seawater acidification affects aqueous-phase copper toxicity in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*: Metal accumulation, antioxidant defenses and detoxification in livers. *Sci Total Environ* 858, 160040. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160040>.
- Xing J, Ke Z, Liu L, Li C, Gong X and Bao B. 2020. Eye location, cranial asymmetry, and swimming behavior of different variants of *Solea senegalensis*. *Aquac Fish* 5, 182-186. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.11.003>.
- Youson JH. 1988. 2 First Metamorphosis. In: *Fish Physiology*. Vol. 11. Hoar WS and Randall DJ, eds. Academic Press, Canbrudge, MA, U.S.A., 135-196. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60214-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60214-9).