

체세포 복제란 이식 한우의 분만 전 혈장 Progesterone과 Estradiol-17β 농도 변화

황성수¹ · 최선호² · 장유민¹ · 고응규¹ · 양병철¹ · 임기순¹ · 민관식³ · 성환후^{1,*}
 농촌진흥청 축산과학원 ¹응용생명공학과, ²축산기술지원과, ³한경대학교 생물환경정보통신전문대학원

The Expression of Plasma Progesterone and Estradiol-17β Level before Parturition in the Recipients Pregnant by Hanwoo SCNT Embryos

Seongsoo Hwang¹, Sun-Ho Choi², Yoo-Min Chang¹, Yeoung-Gyu Ko¹, Byong-Chul Yang¹,
 Gi-Sun Im¹, Kwan-Sik Min³ and Hwan-Hoo Seong^{1,*}

¹Animal Biotechnology Division, ²Technology Application Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea
³Hankyong University, Anseong 456-749, Korea

ABSTRACT

This study was performed to analyze the characterization of plasma hormonal levels during pregnancy in the Hanwoo recipients pregnant by artificial insemination (AI) or somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. The synchronized recipients pregnant by SCNT embryos produced by Hanwoo fetal fibroblast cells (n=8) and by AI (control, n=5) were used. The plasma hormonal levels were measured by RIA (P4 and E2) and ELISA (cortisol), respectively. In control, the increase of E2 and the decrease of P4 were occurred immediately before the initiation of parturition. The expression pattern of plasma P4 was similar in both groups from 50 to 10 days before parturition, however, it did not decrease even at the expected date of labor in the SCNT recipients. The plasma cortisol was expressed a lower level during pregnancy in the SCNT recipients. But, the cortisol was increased in the cow aborted around 100 days of pregnancy (n=1). Based on these results, it can be postulated that the failure of the hormonal changes immediately before parturition in the SCNT recipients may be one of the most important reasons for a delayed parturition in clone calving.

(Key words : E2, P4, Cortisol, Initiation of parturition, SCNT)

요 약

본 연구는 한우 체세포를 이용하여 생산된 복제란을 한우 대리모에 이식하여 임신이 확인된 개체에서 임신 기간 중 주요 호르몬의 발현 특성을 인공수정으로 임신된 대리모와 비교·분석하고자 실시하였다. 한우 섬유아세포를 이용하여 생산된 체세포 복제란을 자연발정으로 동기화된 한우 대리모에 이식하여 임신이 확인된 개체를 공시하였으며(n=8), 대조군으로는 인공수정으로 임신된 대리모를 사용하였다(n=5). 발정 관찰 후 60일경에 직장검사로 임신을 확인하였다. 주요 스테로이드 호르몬인 progesterone(P4)와 estradiol-17β (E2) 농도는 방사선동위원소 면역분석시험(RIA) 방법을 이용하였으며, 혈중 cortisol 농도는 ELISA 방법으로 측정하였다. 인공수정한 대리모의 경우 E2 농도가 분만 시기에 급격하게 증가하였으나, P4 농도는 분만 시기에 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다. 이에 반해 복제란 이식우의 혈장 P4 농도는 분만 50일 전부터 분만 10일전까지는 대조군과 유사하게 유지되었으나, 분만예정일에는 전혀 떨어지지 않고 높은 수준으로 유지되었다. 한편, 복제란 이식우에서 분만 때까지 정상적으로 임신이 유지된 대리모들의 경우는 임신 기간 동안 cortisol 농도는 임신 후반기까지 낮게 유지되며 별다른 변화를 나타내지 않았다. 반면에 유산이 일어난 개체의 경우에는 임신 100일경에 cortisol의 농도가 급격하게 증가하는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하여 보면, 복제란 이식우의 경우 분만 예정일 전·후에 일어나는 급격한 호르몬의 변화가 일어나지 않음을 확인할 수 있었으며, 이러한 현상은 복제란 이식우의 분만 지연과 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다.

* 본 과제는 농촌진흥청 축산과학원 경상과제 연구비 및 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20080401034074) 연구비로 실시되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-31-290-1621, E-mail: seonghh@rda.go.kr

서론

포유동물에서 임신 기간 중에 태아가 건강하게 자라기 위해서는 다양한 호르몬 또는 관련 물질이 시기 적절하게 발현 또는 감소가 되어야만 한다(Ogasawara 등, 2000; Schuler 등, 2006; Ayad 등, 2007).

소에서 체세포 복제란을 이식한 대리모의 경우, 임신 초기 태반의 부적절한 발달로 인한 조기 유산과 임신 말기 양수과다증 또는 거대산자증후군 등으로 인해 분만과정에서 난산 또는 분만 지연 등이 일어난다고 알려지고 있다(De Sausa 등, 2001; Wells 등, 2003; Heyman 등, 2004).

황 등(2008)은 체세포 복제송아지의 분만 지연이 거대 태반 분엽 형성, 호르몬 및 cytokine의 부적절한 발현 등이 중요한 요소들이라고 보고하였다. 소 또는 설치류 등의 복제란 이식 대리모에서 거대 태반 분엽이 형성되었음을 보고하였고, 이러한 요인들로 인하여 호르몬이 적절하게 분비되지 못하여 분만이 원활하게 이루어지지 못한 이유가 되었으리라 추정하였다(Hill 등, 2000; Constant 등, 2006; Wakisaka-Saito 등, 2006). 하지만 아직까지 이러한 물질들의 조절기전에 대해서 많은 부분을 이해하지 못하고 있는 것이 사실이다. 특히 복제란을 이식한 대리모에 대한 연구는 거의 없다고 해도 과언이 아니다.

따라서 본 연구에서 인공수정된 대리모에서 임신 기간 중 호르몬 변화와 임신말기 동안 복제란 이식우에서 분만 개시에 중요한 호르몬의 발현 특성을 살펴보고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시동물

농촌진흥청 축산과학원에서 보유하고 있는 출산 경력이 있는 한우 암소(4~7세)를 대리모로 사용하였다. 체세포 복제란을 이식한 대리모는 8마리이며, 대조군으로 인공수정된 소는 5마리를 사용하였다.

체세포 복제란 생산 및 이식

공여세포의 준비 및 핵이식 과정은 Yang 등(2008)과 동일한 방식으로 실시하였다. 간단히 요약하면 임신 45일경의 태아를 적출하여 세포주로 확립하여 공여세포로 사용하였다. 융합이 끝난 핵이식 난자는 10 μ M calcium ionophore에 5분간 처리한 다음 2 mM 6-DMAP에서 3시간 동안 배양을 실시하였다. 재구축된 난자는 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액에서 38.5°C, 5% O₂ 및 5% CO₂ 조건의 배양기에서 7일 동안 배양을 실시하였다. 한 개 내지 두 개의 복제란을 동기화 처리된 대리모에 이식하였다.

발전동기화 및 혈액 채취

대리모에 대한 발전동기화는 발정 주기와 상관없이 1.9 g의 progesterone이 함유된 controlled internal drug release (CIDR; InterAg, Hamilton, New Zealand) device를 사용하였다. CIDR 삽입 후 6일째 아침과 오후에 각각

22.5 mg 용량의 prostaglandin F₂ α (PGF₂ α , im; Lutalyse, Pharmacia, Kalamazoo, MI, USA)를 주사하여 발정을 유기시켰다. 대조군의 경우 혈액은 발정유도 후 0~1일째인 발정기(estrus phase), 약 10일째인 황체기(luteal phase), 발정유도 후 50일과 150일 및 분만 시에 각각 채혈을 실시하였다. 복제란 이식우에서 분만 전 progesterone의 변화 양상을 측정하기 위하여 분만예정일을 기준으로 약 50일전부터 3~5일 간격으로 헤파린 처리된 튜브 (BD Vacutainer® and CPT™, NJ, USA)를 이용하여 채혈하였다. 혈장은 2,000 \times g로 4°C에서 15분간 원심 분리한 후 -80°C에 보관하였다.

호르몬 분석

Estradiol-17 β (E2)와 progesterone(P4) (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA)의 농도 분석은 radioimmunoassay(RIA) 방법으로 3반복하여 측정하였다. 동위원소(¹²⁵I) 측정은 γ -counter(Titertek, Gamma 4, USA)를 이용하였다. 혈액 내 cortisol 수준은 ELISA 키트(Endocrine Technologies Inc. Newark, CA, USA)를 이용하여 450 nm 파장의 ELISA reader(Microplate Autoreader, Bio-Rad, USA)로 각 샘플당 2반복하여 측정하였다.

통계적 유의성 검정

대조군과 복제란 이식우 간의 발현 차이는 Starview 4.0 프로그램을 이용하여 Welch's *t*-test로 분석하였다. 통계적 유의차는 $p < 0.05$ 를 기준으로 하였다. 결과는 mean \pm standard deviation(SD)으로 나타내었다.

결과

대조군에서 발정기, 황체기 및 임신 기간 동안의 E2 및 P4 농도 변화는 Fig. 1과 같다. Estradiol-17 β 농도는 발정기나 황체기 및 임신 기간 동안 지속적으로 낮은 수치를 유지하다가 분만 시기에 약 230 pg/ml 수준으로 급격하게 증가하는 경향을 나타내었다. 한편, P4는 황체

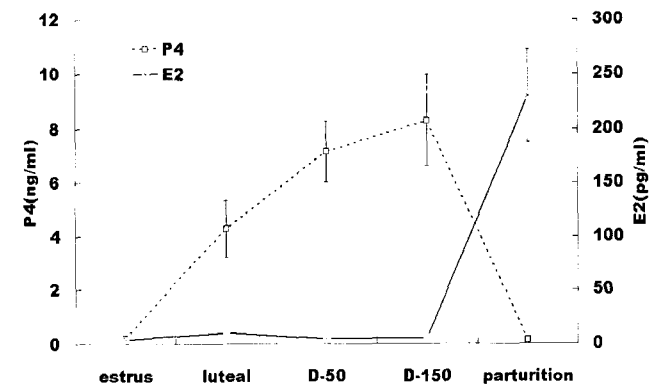


Fig. 1. The plasma progesterone and estrogen level during pregnancy. The blood was collected from the recipients pregnant by AI, respectively. The concentration of plasma P4 and E2 level were measured by RIA(¹²⁵I). Data was expressed as mean \pm standard deviation(S.D.).

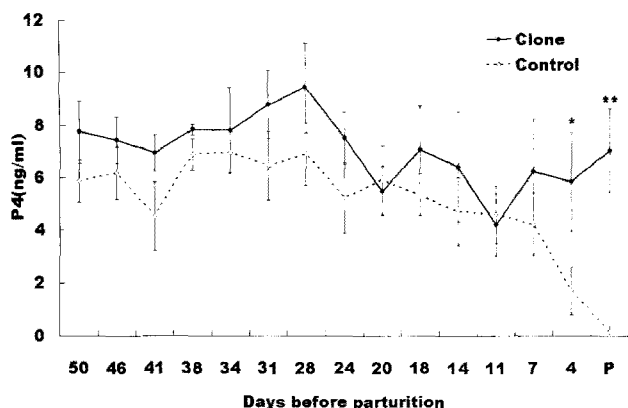


Fig. 2. The plasma progesterone level during late pregnancy. The blood was collected from the recipients pregnant by AI and SCNT embryos, respectively. The concentration of plasma P4 were measured by RIA(¹²⁵I). Data was expressed as mean±SD. P: parturition, * p<0.05, ** p<0.01.

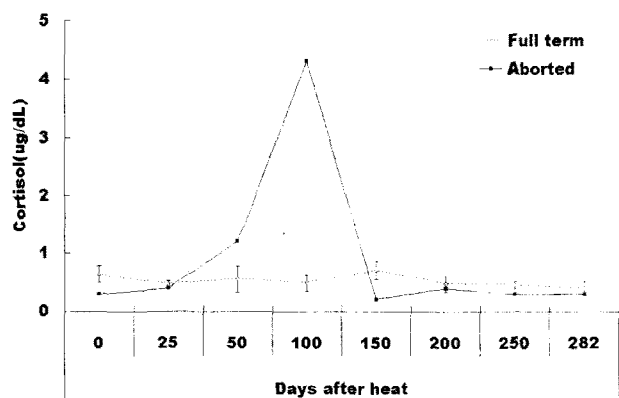


Fig. 3. The plasma cortisol level during pregnancy in the recipients pregnant by SCNT embryos. The concentration of plasma cortisol level was analyzed by ELISA. Data was expressed as mean±SD. The recipient was aborted around 100 days of pregnancy (aborted).

기부터 점차 증가하여 분만 직전까지 약 7~9 ng/ml 수준으로 유지하다가 분만 시기에 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다.

분만 전 대리모의 혈액에서 호르몬의 변화 상태를 주기적으로 확인하고자 분만 50일 전부터 3~5일 간격으로 복제란 이식우와 대조구에서 채혈을 실시하여 P4의 농도 변화를 측정하였다(Fig. 2). 분만 50일 전부터 분만 10일 전까지 복제란 이식우의 혈장 P4 농도는 대조구에 비하여 다소 높은 경향을 보였으나, 대조군의 경우 분만 일주일 전부터 점차 P4 농도가 감소하여 분만 시기에는 기저부 수준까지 급격히 떨어졌다. 하지만 복제란 이식우의 경우 P4 농도가 지속적으로 높은 수준에서 유지되었으며, 분만 시기에도 떨어지지 않고 오히려 증가하는 경향을 보이기도 하였다(p<0.05, p<0.01).

복제란 이식 한우에서 임신 기간 중 혈장 cortisol 농도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 분만 때까지 정상적으로 임신이 유지된 4마리의 대리모들의 경우는 임신 기간 동안 cortisol 농도는 임신 후반기까지 낮게 유지되며

별다른 변화를 나타내지 않았다. 하지만 임신 약 100일 경에 유산한 1마리의 복제란 이식우 대리모에서는 유산이 일어난 시기 직전부터 cortisol의 농도가 급격하게 증가하는 것을 확인하였다.

고찰

본 연구의 목적은 일반소의 임신 기간 동안 주요 호르몬의 변화 양상과 복제란 이식우에서 분만 개시와 직접적인 관련이 있다고 알려진 주요 호르몬 및 cytokine에 대한 발현 양상을 측정하였다.

포유동물에서 E2는 임신 초기 동안에 자궁강이 단백질, 이온, 탄수화물 및 프로스타글란딘 등을 분비하도록 자극하며, 또한 황체퇴행을 방지하고 자궁내막이 착상에 원활한 환경이 되도록 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Kryzowski 등, 2004; Spencer 등, 2004; Ziecik 등, 2006). 소에서는 태아 부분의 용모(villi) 또는 태반엽(cotyledon)이 임신말기 E2의 주 공급원이라고 알려져 있다(Hoffmann 등, 1979; Evans와 Wagner, 1981). 이는 임신말기 분만과 관련하여 태아가 적극적으로 분만 개시에 주도적으로 참여한다는 것을 나타낸다고 할 수 있다. Smith 등(1973)은 소에서 E2의 농도는 임신 후반기에 점차적으로 증가하며, 특히 분만 24~48시간 전에 최고조에 달한다고 보고하였다. 이는 본 연구 결과에서 E2 농도는 발정기나 황체기 및 임신 기간 동안 지속적으로 낮은 수치를 유지하다가 분만 시기에 급격하게 증가하는 결과와 일치한다고 하겠다.

호르몬 또는 cytokine의 적절한 발현은 임신의 유지(Hoffmann과 Schuler 등, 2002)와 분만을 조절하는 가장 중요한 요인들 중의 하나이다. 포유동물에서 분만이 시작 되려면 분만 때에 P4 농도는 급격하게 감소되고, E2 농도는 증가한다고 보고하였다(Romero 등, 1988; Grunert 등, 1989). 이는 태반 또는 태아 부신 유래 P4 생산 활동이 태아와 태반의 발달 거부뿐만 아니라 임신의 유지를 위한 자궁내막의 안정적 상태를 저해하는 모체의 면역체계를 억제하는 역할을 하기 때문이다(Pepe와 Albrecht, 1995). 본 연구 결과에서 임신 기간 특히 임신 후반기의 P4의 급격한 감소는 다른 연구자들이 보고한 결과와 유사한 양상을 나타내었다(Peter과 Bosu, 1987; Wischral 등, 2001). 이것은 본 연구에 사용된 대조군이 정상적인 임신과 분만 과정이 이루어졌음을 나타낸다고 하겠다.

하지만 지나치게 높은 P4 수치는 오히려 자궁 방어기전(uterine defense mechanism)에 해가 될 수도 있다고 보고하였다(Wango 등, 1992; Wooding 등, 1996). 황 등(2008)은 복제란 이식우에서 분만 시에 대조구와 달리 P4의 농도가 떨어지지 않았다고 보고하였다. 대조구와 비교하여 정상적인 분만 개시 기전이 일어나지 않았음을 나타내는 결과라 할 수 있다. 즉, 복제란 이식우의 경우, 분만 10일전까지 혈장 P4 농도는 대조구에 비하여 별다른 차이를 보이지 않았으나, 분만 일주일 전부터는 대조군과 달리 P4 농도가 지속적으로 높은 수준에서 유지되었으며, 분만 시기에도 떨어지지 않는 양상을 나타내었다. 이는 결과적으로 체세포 복제란 이식 대리모와 복제태아 모두가 분만 기전에서 정상적인 역할을 하지 못하

였다는 것을 추측할 수 있다.

Cortisol은 태아 부신에서 분비되어 태반에 직접 또는 간접적으로 작용하여(Jenkin과 Thorburn, 1985; Poore 등, 1998), 모체의 자궁 내 prostaglandin 생산 증가에 의해 P4의 감소와 임신 후반기 모체와 태아 E2 농도의 증가를 유발하고 궁극적으로는 자궁근 수축(myometrial contractility)을 일으킨다고 보고되었다(Hatthachote와 Gillespie, 1999; Thomson 등, 1999; Power 등, 2002).

본 연구에서 임신이 유지되지 못하고 유산하였던 복제란 이식우의 경우, 유산이 일어났던 시기에 cortisol 농도가 일시적으로 급격하게 증가하는 양상을 보였다. 또한, 본 연구 결과에는 포함시키지 않았지만 유산이 일어났던 시기에 P4 농도의 급감이 일어났다. 이는 P4에 의해 억제되고 있던 조산 또는 황체 기능에 영향을 미치는 성선 자극호르몬의 분비가 cortisol-cascade의 내분비적 기전에 변화가 일어났음을 나타내는 결과라 하겠다(Li와 Wanger, 1983; Dobson 등, 2000). 하지만 복제란 이식우 모두에서 임신 말기 cortisol 농도가 낮게 유지되어 분만 개시가 정상적으로 이루어지지 않았음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 복제란 이식우의 경우, 인공수정란 대리모와 비교하여 분만 시기에 호르몬의 분비가 비정상적으로 나타나며, 이러한 비정상적인 호르몬의 분비가 분만 개시에 직접적인 영향을 미쳐 복제 송아지의 분만 지연 등을 일으키는 주요한 원인으로 사료된다.

인용문헌

1. Ayad A, Sousa NM, Sulon J, Hornick JL, Watts J, Lopez-Gatiús F, Iguer-Ouada M, Beckers JF (2007): Influence of progesterone concentrations on secretory functions of trophoblast and pituitary during the first trimester of pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 67:1503-1511.
2. Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely L, Renard JP, Chavatte-Palmer P (2006): Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies. *Biol Reprod* 75:122-130.
3. De Sousa PA, King T, Harkness L, Young LE, Walker SK, Wilmut I (2001): Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol Reprod* 65:23-30.
4. Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR (2000): Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J Reprod Fertil* 120:405-410.
5. Evans G, Wagner WC (1981): *In vitro* oestrogen synthesis by bovine placenta during pregnancy and induced parturition. *Acta Endocrinol (Copenh)* 98: 119-125.
6. Grunert E, Ahlers D, Heuwieser W (1989): The role of endogenous estrogens in the maturation process of the bovine placenta. *Theriogenology* 31: 1081-1091.
7. Hatthachote P, Gillespie JI (1999): Complex interactions between sex steroids and cytokines in the human pregnant myometrium: evidence for an autocrine signaling system at term. *Endocrinology* 140: 2533-2540.
8. Heyman Y, Richard C, Rodriguez-Martinez H, Lazzari G, Chavatte-Palmer P, Vignon X, Galli C (2004): Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. *Cloning Stem Cells* 6: 111-120.
9. Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME (2000): Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 63:1787-1794.
10. Hoffmann B, Schuler G (2002): The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domest Anim Endocrinol* 23:309-320.
11. Hoffmann B, Wagner WC, Hixon JE, Bahr J (1979): Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow. *Anim Reprod Sci* 2:253-266.
12. Jenkin G, Thorburn GD (1985): Inhibition of progesterone secretion by a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor in late pregnant sheep. *Can J Physiol Pharmacol* 63:136-142.
13. Krzymowski T, Stefańczyk-Krzybowska S (2004): The oestrous cycle and early pregnancy—a new concept of local endocrine regulation. *Vet J* 168:285-296.
14. Li PS, Wagner WC (1983): *In vivo* and *in vitro* studies on the effect of adrenocorticotrophic hormone or cortisol on the pituitary response to gonadotropin releasing hormone. *Biol Reprod* 29:25-37.
15. Ogasawara MS, Aoki K, Aoyama T (2000): Elevation of transforming growth factor-1 is associated with recurrent miscarriage. *J Clin Immunol* 20:453-457.
16. Pepe GJ, Albrecht ED (1995): Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev* 16:608-648.
17. Peter AT, Bosu WT (1987): Periparturient endocrine changes associated with retained placenta in dairy cows. *Theriogenology* 28:383-394.
18. Poore KR, Young IR, Canny BJ, Thorburn GD (1998): Studies on the role of ACTH in the regulation of adrenal responsiveness and the timing of parturition in the ovine fetus. *J Endocrinol* 158:161-171.
19. Power LL, Popplecules EJ, Holloway JA, Diaper ND, Warner JO, Jones CA (2002): Immunoregu-

- latory molecules during pregnancy and at birth. *J Reprod Immunol* 56:19-28.
20. Romero R, Scoccia B, Mazor M, Wu YK, Benveniste R (1988): Evidence for a local change in the progesterone/estrogen ratio in human parturition at term. *Am J Obstet Gynecol* 159:657-660.
 21. Schuler G, Teichmann U, Kowalewski MP, Hoffmann B, Madore E, Fortier MA, Klisch K (2006): Expression of cyclooxygenase-II (Cox-II) and 20 β hydroxysteroid dehydrogenase (20 β HSD)/prostaglandin F-synthase (PGFS) in bovine placentomes: implications for the initiation of parturition in cattle. *Placenta* 27:1022-1029.
 22. Smith VG, Edgerton LA, Hafs HD, Convey EM (1973): Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy, parturition and early lactation. *J Anim Sci* 10:391-396.
 23. Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW (2004): Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod* 71:2-10.
 24. Thomson TJ, Telfer JF, Young A, Campbell S, Stewart CJR, Cameron IT, Greer IA, Norman JE (1999): Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod* 14:229-236.
 25. Wakisaka-Saito N, Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hikichi T, Mizutani E, Wakayama T, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F (2006): Chorionic-llantoic placenta defects in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commun* 349:106-114.
 26. Wango EO, Heap RB, Wooding FBP (1992): Regulation of steroid synthesis and metabolism in isolated binucleate cells of the placenta in sheep and goats. *J Reprod Fert* 94:203-211.
 27. Wells DN, Laible G, Tucker FC, Miller AL, Oliver JE, Xiang T, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, L' Huillier PJ, Tervit HR, Oback B (2003): Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology* 59:45-59.
 28. Wischral A, Verreschi IT, Lima SB, Hayashi LF, Barnabe RC (2001): Pre-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal membrane retention. *Anim Reprod Sci* 67:181-188.
 29. Wooding FBP, Morgan G, Monaghan S, Hamon M, Heap RB (1996): Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. *Placenta* 17:75-86.
 30. Yang BC, Im GS, Kim DH, Yang BS, Oh HJ, Park HS, Seong HH, Kim SW, Ka HH, Lee CK (2008): Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 103:25-37.
 31. Ziecik AJ, Blitek A, Kaczmarek MM, Waclawik A, Bogacki M (2006): Inhibition of luteolysis and embryo-uterine interactions during the peri-implantation period in pigs. *Soc Reprod Fertil Suppl* 62:147-161.
 32. 황성수, 장유민, 고웅규, 양병철, 임기순, 김명직, 민관식, 윤종택, 김창근, 성환후 (2008): 체세포 복제란 이식우의 분만 전·후 TGF- β 1 단백질 농도. *한국동물번식학회지* 31:27-31.
(접수일자: 2008. 9. 5 / 채택일자: 2008. 9. 12)