

# 소 체외수정란 및 체세포 복제란의 초자화 동결 후 생존성

권대진<sup>1</sup> · 박주희<sup>2</sup> · 박춘근<sup>1</sup> · 양부근<sup>1</sup> · 정희태<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 동물생명과학대학, <sup>2</sup>수의학부대학

## Survivability of *In Vitro* Fertilized and Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos Following Vitrification

Dae-Jin Kwon<sup>1</sup>, Joo-Hee Park<sup>2</sup>, Choon-Keun Park<sup>1</sup>, Boo-Keun Yang<sup>1</sup> and Hee-Tae Cheong<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Life Science and <sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to examine the development of *in vitro* fertilized (IVF) and nuclear transfer (NT) embryos following vitrification. IVF and NT embryos developed to the blastocyst stage were equilibrated by 3 steps, vitrified and thawed, and their survival and hatching rates were examined. In IVF embryos, higher survival (82.1%, 96/117) and hatching rates (64.1%, 75/117) were obtained respectively after thawing and culture in expanded blastocysts compared to blastocysts ( $p < 0.05$ ). High survival and hatching rates were also obtained by vitrification of NT blastocysts, especially in expanded and hatching blastocysts (81.1 and 78.3%, respectively). The result of this study shows that IVF and NT blastocysts, especially late stage blastocysts, are successfully cryopreserved by vitrification.

(Key words : Nuclear transfer, IVF, Vitrification, Bovine blastocyst)

### 요 약

본 연구는 소 체외수정란과 체세포 복제란의 초자화 동결 및 융해 후 생존능을 검토하였다. 배반포로 발육된 체외수정란 및 체세포 복제란을 초자화 동결법에 의해 동결하였다가 융해하여 생존율 및 배양 후 부화율을 검사하였다. 체외수정란 배반포를 초자화 동결 융해한 결과, 확장배반포가 배반포기 난자에 비하여 생존율(82.1%, 96/117)과 부화율(64.1%, 75/117)에서 모두 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 핵이식 배반포 복제란을 초자화 동결 융해한 경우도 체외수정란과 비슷한 경향을 보여 확장 및 부화배의 생존율과 부화율이 각각 81.1%(30/37)와 78.3%(29/37)로, 배반포(각각 71.8 및 53.8%)에 비하여 다소 높게 나타났다. 본 연구의 결과는 초자화 동결 방법에 의해서 소 체외수정란과 체세포 복제란을 성공적으로 동결할 수 있으며, 특히 후기 배반포기 단계에서 초자화 동결 시 높은 생존율과 부화배 형성율을 얻을 수 있음을 보여준다.

### 서 론

핵이식기술에 의한 복제동물 생산이 실용화되기 위해서는 생산된 복제란을 높은 생존성을 유지하면서 동결시키는 기술의 개발이 필요하다. 수정란 동결기에 의한 동결은 프로그램 되어 있는 동결방법에 의해 난자를 동결할 수 있다는 장점이 있으나, 액체질소의 낭비와 시간의 낭비가 크며, 때로는 생존율이 떨어지는 단점이 있다. 따라서 경제적, 시간적 손실을 최대한 줄이면서, 높은 생존율을 보장할 수 있는 초자화 동결법을 이용한 핵이식 복제란의 동결법이 확립되어야 한다.

포유동물 수정란의 초자화 동결은 1985년에 Rall과 Fahy가 DMSO(dimethyl sulfoxide), acetamide, propylene glycol 및 polyethylene glycol을 함유한 초자화 동결액을 이용하여 생쥐 8 세포기 수정란의 초자화 동결에 성공한 것이 최초이다. 그 후 생쥐(Scheffen 등, 1986; Kasai 등, 1990), 토끼(Smorag 등, 1989; Kobayashi 등, 1990),绵양(Schiewe 등, 1991; Ali와 Shelton, 1993), 돼지(Dobrinsky와 Johnson, 1993; Kuwayama 등, 1997) 및 소(Massip 등, 1986; Kuwayama 등, 1992)에서도 초자화 동결에 성공하였다. Massip 등(1987)은 소의 상실배기에서 초기 배반포기 수정란을 초자화 동결하여 산자를 얻는데 성공하였으나, 동해방지제로 사용한 glycerol과 1,2-propanediol의 혼

\* 본 연구는 2004년도 농림기술개발사업 기획연구과제의 연구지원(300012-5)에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8659, E-mail: htcheong@kangwon.ac.kr

합액은 소 배반포의 동결보존에는 비효과적인 것으로 나타났다. Kuwayama 등(1992)은 glycerol과 1,2-propandiol의 혼합물에 sucrose를 첨가하여 단계별 평형을 시키는 방법이 소 배반포의 초자화 동결에 효과적이라고 보고하였다. 비슷한 방법으로 Saito 등(1994)은 glycerol과 ethylene glycol의 혼합물에 sucrose와 dextrose를 첨가한 GESD액으로 소 체외수정 유래 배반포를 단계적으로 평형시켜 초자화 동결하는 방법으로 높은 생존율을 얻었다고 보고하였다. 한편, 초자화 동결과 일반적인 완만동결 후 수정란의 생존율을 비교한 경우, 차이가 없는 것으로 보고되었으며(van Wagtenonk-De Leeuw 등, 1995), 오히려 2단계 평형에 의한 초자화 동결과 완만동결에 의한 소 체외수정란의 생존율을 검토한 결과, 초자화 동결에 의하여 수정란의 생존율이 증가하였다(Mahmoudzadeh 등, 1994).

본 연구는 소 체외수정란과 체세포 복제란의 초자화 동결 및 융해 후 생존율을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 회수된 난포의 난소로부터 미성숙 난자를 채취하여 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 5% CO<sub>2</sub> 39°C의 조건하에서 18~20시간 성숙배양하였다. 난포란의 성숙배양액은 TCM-199액(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS(Gibco-BRL), 0.2 mM Na-pyruvate, 0.02 U/ml FSH(Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µg/ml 17β-estradiol(Sigma) 및 50 µg/ml gentamicin(Gibco-BRL)을 첨가한 것을 사용하였다.

### 체외수정란의 생산

체외수정은 한우의 동결정액을 사용하였다. 성숙 난포란은 5mM caffeine(Sigma), 10µg/ml heparin(Sigma), 3µg/ml BSA 및 2×10<sup>6</sup> 정자/ml가 함유된 BO 액(Brackett와 Oliphant, 1975)의 50 µl 소적 내에 난구세포가 둘러싸인 채로 10여개씩 투입하여 5% CO<sub>2</sub> 39°C의 조건하에서 12~20시간 배양하였다. 수정 후 난자는 난구세포가 붙어있는 채로 3 µg/ml BSA를 함유한 TCM-199액의 소적으로 옮겨 32~40시간 배양 후 난구세포를 제거하였다. 2 세포기 이상으로 발육된 수정란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내에서 5~7일간 추가 배양하여 배반포로 발육된 수정란 중 난자의 질이 우수하다고 판정되는 난자만을 초자화 동결 실험에 공시하였다.

### 체세포 복제란의 생산

핵이식은 Campbell 등(1996)의 방법에 준하여 한우의 피부세포를 동결 융해하였다가 배양한 후 사용하였다. 난자의 탈핵은 cytochalasin B(CB)를 함유한 TCM-199 + 3 mg/ml BSA의 배양소적(50 µl) 내에서 제 1극체와 주변의 세포질을 약 1/3 정도 흡입하여 제 2 유사분열 중기 염색체를 제거하는 방법으로 탈핵을 실시하였다. Donor 세포는 직접 injection pipette으로 흡입하여 탈핵란 세포질의 위관강 내로 주입하였다.

재구축란의 전기융합은 BTX 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA) 및 0.5-mm 폭의 wire chamber를 이용하여 실시하였다. 재구축란은 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 mg/ml BSA를 첨가한 0.3 M mannitol 용액을 넣은 wire chamber의 양 전극 사이로 옮겨, 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 µsec 간 1회 동전하여 융합을 유도하였다. 융합이 확인된 핵이식란은 융합 1시간 후 10 µM의 Ca<sup>++</sup> ionophore(A23187; Sigma)로 5분간 처리 후 즉시 10 µg/ml 농도의 2 mM의 6-dimethylaminopurine (6-DMAP, Sigma)을 함유한 체외배양액의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하여 활성화를 유도하였다. 활성화처리 후 핵이식란은 3 mg/ml BSA가 함유된 CR1aa 배양액의 50 µl drop으로 옮겨 5% CO<sub>2</sub> 및 39°C의 조건하에서 48시간 배양하여 분할된 핵이식란은 10% FBS를 함유한 CR1aa 내로 옮겨 5~7일간 추가 배양하였다. 생산된 배반포 복제란 중 난자의 질이 우수하다고 판단되는 수정란만을 초자화 동결 실험에 공시하였다.

### 초자화 동결액 및 희석액의 준비

초자화 동결액(vitrification solution; VS)은 Saito 등(1994)이 사용한 GESD를 수정하여 사용하였다(김 등, 1998). 동결액의 구성은 20% FBS(Gibco)가 첨가된 D-PBS(Dulbecco's PBS)를 기본액으로 하여, 20% glycerol, 20% ethylene glycol, 3/8 M sucrose 및 3/8 M dextrose가 함유되도록 조정하였다(VS3). 초자화 동결액 조제시, 먼저 동해방지제 및 sugar를 D-PBS액에 최종농도의 1.25배 농도로 용해하여 사용 전에 FBS와 4:1의 비율로 혼합하여 조제하였다. 또한, 동결 전 평형을 위하여 20% FBS가 함유된 D-PBS를 이용하여 VS3액을 각각 50% 및 25%로 희석하여 VS2 및 VS1을 만들었다. 한편, 융해 후 동해방지제의 희석액으로는 20% FBS를 함유한 D-PBS 액에 1/2 M sucrose를 첨가하여(S-PBS) 사용하였으며, 단계적 희석을 위하여 1/4 M sucrose액도 같은 방법으로 준비하였다.

### 수정란의 초자화 동결

체외수정란과 체세포 복제란은 각각 배반포(blastocyst)기 수정란과 확장배반포기~부화기배(expanded and hatching blastocyst)로 구분하여 초자화 동결을 실시하였다. 동결 전 배반포는 VS1, VS2 및 VS3에 각각 5분, 5분 및 1분간씩 각각 실온에서 평형을 실시하였다. 수정란은 VS3액에 평형하는 1분 이내에 0.25-ml 플라스틱 straw(FHK, Japan) 내로 봉입하였다. 봉입방법은 우선 straw내에 S-PBS 2층(~10 및 ~70 mm), VS3 2층(~3 및 10 mm)을 각각 0.5 mm의 공기층으로 분리하여 흡인한 뒤 수평으로 유지하였다. 1~3개의 체외수정 또는 체세포 핵이식 유래 배반포를 VS3액에 세척한 후 바로 10 mm의 VS3층에 옮겨 넣고 이어서 VS3 1층(~3 mm)과 S-PBS(~15 mm) 1층을 만든 후 straw의 끝을 불에 달군 겹자를 이용하여 봉인하였다(김 등, 1998). 수정란이 함유된 straw는 즉시 얼 봉인한 쪽부터 액체질소(LN<sub>2</sub>)내로 침지하였다. 처음 1/2 정도는 빠르게 침지하고, 나머지 1/2 부분은 서서히 침지하였으며, VS3에 평형개시부터 1분 이내에 수정란의 straw내 봉인 및 LN<sub>2</sub>내 침지 과정이 끝나도록 하였다. 동결 straw는 융해 시까지 LN<sub>2</sub> 용기 내에 보관하였다.

**동결란의 융해 및 희석**

수정란 융해 후 동해방지제의 희석을 위하여 0.25 및 0.5 M sucrose를 사용하였다. 동결 straw는 LN<sub>2</sub> 내에서 꺼내어 20°C 수조에서 약 10초간 융해 후 1 ml의 0.5 M sucrose가 들어있는 배양접시 내로 내용물을 배출시켜 혼합시켰다. 수정란은 즉시 0.5 M sucrose액 내로 옮겨 실온에서 5분간 유지 후 다시 0.25 M sucrose 액 내로 옮겨 5분간 유지한 다음 20% FBS를 함유한 D-PBS로 세척하여 배양하였다.

**융해란의 체외배양**

동결 융해란은 세척 후 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배지로 옮겨 5% CO<sub>2</sub>, 39°C의 조건하에서 2~3일간 배양하며 생존율 및 부화율(hatching rate)을 검사하였다. 수정란의 생존율은 배양 후 24시간 및 48시간에 동결 전 상태 이상으로 재 확장된 배반포의 수로 판정하였다.

**통계처리**

실험의 결과는 Chi-square test에 의하여 유의성을 검정하였다.

**결 과**

**체외수정란의 융해 후 생존능**

체외 수정란의 초자화 동결 및 융해 후 난자의 발육단계별 생존율은 배반포가 51.0%(53/104), 확장배반포가 82.1% (96/117)로 확장배반포의 경우가 유의적( $p < 0.05$ )으로 높았으며, 배양 후 부화배 형성율도 확장배반포가 64.1% (75/117)로 배반포의 26%(27/104)에 비하여 유의적( $p < 0.05$ )으로 높았다(Table 1).

**체세포 복제란의 융해 후 생존능**

체세포 복제란의 초자화 동결 및 융해 후 생존율은 배반포가 71.8%(28/39), 확장 및 부화배가 81.1%(30/37)로 유의적인 차이는 인정되지 않았으나 확장 및 부화배의 경우가 다소 높게 나타났으며, 부화배 형성율도 배반포에 비하여 확장 및 부화배의 경우가 78.3%(29/37)로 높게 나타났다. 그러나 두 구 간의 유의적인 차이는 없었다(Table 2).

**Table 1. Survival and hatching rates of vitrified IVF embryos after thawing\***

Embryo stage	No. (%) of embryos		
	Thawed	Survived(%)	Hatching(%)
Blastocyst(BL)	104	53(51.0) <sup>a</sup>	27(26.0) <sup>a</sup>
Expanded BL	117	96(82.1) <sup>b</sup>	75(64.1) <sup>b</sup>

\* Embryos were equilibrated in VS1, VS2 and VS3 each for 5, 5 and 1 min.

<sup>ab</sup> Values with different superscripts in the same column differ ( $p < 0.05$ ).

**Table 2. Survival and hatching rates of vitrified reconstituted embryos after thawing\***

Embryo stage	No. (%) of embryos		
	Thawed	Survived(%)	Hatching(%)
Blastocyst(BL)	39	28(71.8)	21(53.8)
Expanded and hatching BL	37	30(81.1)	29(78.3)

\* Embryos were equilibrated in VS1, VS2 and VS3 each for 5, 5 and 1 min.

**고 찰**

초자화 동결은 수정란 세포질의 결빙에 의한 손상을 최소화함으로써 동해를 방지할 수 있고, 고가의 장비가 필요 없으며, 시간을 절약할 수 있고, 비교적 높은 생존율을 얻을 수 있어서 소 체외수정란의 동결에 유용하게 이용되어져 왔다(Massip 등, 1986; Kuwayama 등, 1992; Saito 등, 1994; 김 등, 1998). 초자화 동결용액 및 구체적인 방법은 사용자에 따라 다양하나, 본 연구에서는 Saito 등(1994)의 방법을 보완하여 사용하였다. Saito 등(1994)은 GESD를 이용하여 소 체외수정란을 3단계 평형 후 초자화 동결한 결과, 배반포의 경우 83%가, 그리고 확장배반포의 경우는 96%가 융해 후 생존하였으며, 96시간 배양 후의 부화율도 각각 74%와 86%로 매우 높았다. 비록 이식 후 산자의 생산은 검증하지 않았지만, sucrose와 dextrose의 첨가가 수정란의 생존에 유리하였다고 보고하였다. Kasai 등(1990)도 ethylene glycol, Ficoll 및 sucrose를 혼합한 초자화 동결액으로 생쥐 상실패를 동결 후 높은 생존율을 얻었다. 동해방지제에 sucrose를 첨가하므로서 다른 동해방지제의 과도한 침투성을 완화하고(Szell과 Shelton, 1987), 세포질 내 단백질의 농도를 증가시킴으로써 세포 내 초자화를 돕는 것으로 보고되고 있다(Rall, 1987). Dextrose 도 동해방지제의 독성을 완화하는 것으로 여겨지며(Clark 등, 1984), sucrose와 함께 초자화 동결시의 냉각충격을 완화시키고(Sutton, 1992), 동해방지제의 불필요한 세포 내 침투를 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려지고 있다(Utsumi 등, 1992).

Kuwayama 등(1994)은 소 체외수정란을 glycerol과 1,2-propanediol의 혼합액으로 초자화 동결 시, 각 단계 당 5분씩 평형시킨 2단계 평형과 1분 정도씩 평형시킨 16단계 평형방법을 비교하였다. 실험 결과, 2단계평형의 경우는 수정란의 생존율이 0%인 반면, 16단계 평형의 경우는 83.3%로 현저한 차이를 보였다. 뿐만 아니라, 세포질의 미세구조에 있어서도 2단계 평형의 경우는 공포(vesicles)가 관찰되어, 초자화 동결 전 평형방법이 수정란의 생존성에 영향을 미칠 수 있음이 시사되었다. Ohboshi 등(1997)은 ethylene glycol, polyethylene glycol 및 sucrose의 혼합액으로 소 체외수정 배반포를 초자화 동결 시, 1단계 평형으로 13%의 생존율을 보인 반면, 2단계 평형에 의해서는 72.7%의 생존율을 얻어, 1단계와 2단계 평형 사이에도 현저한 차이를 나타내었다. 적절한 단계의 평형은 고농도의 동결액에 직접 노출함으로써 생길 수 있는 삼투

압 충격을 완화하여, 초자화 동결 시 세포막 손상을 최소화하고, 수정란의 초자화를 더욱 안정적으로 유지하는 것으로 사료된다.

김 등(1998)은 소 수정란의 초자화 동결 시 동결 전 평형방법 및 용해 후 회석방법을 검토하여 3단계 평형과 2단계 회석이 효과적임을 보고하였다. 본 연구에서도 ethylen glycol 및 당이 첨가된 초자화 동결액을 2단계로 회석하여 수정란을 동결 전 평형시키고, 동결하였다가 용해 후 sucrose 용액으로 2단계 회석하는 방법으로 비교적 높은 생존율과 부화배 형성율을 얻을 수 있었다. 또한 김 등(1998)의 보고에서와 마찬가지로 수정란의 발육단계가 진전된 확장배반포 시에 동결하는 것이 용해 후 배의 생존에 유리하다는 결론을 얻을 수 있었다. 복제란의 경우도 체외수정란의 결과와 비슷하나 배반포의 경우는 체외 수정란 보다 높은 생존율과 부화배 형성율을 나타내었다. 복제란은 투명대에 구멍이 뚫려있어 일반적으로 동해를 입기 쉬운 것으로 예상할 수 있으나 본 연구의 결과는 복제란에 대한 동해가 예상보다 크지 않다는 것을 시사한다. 이와 같은 결과는 이미 부화가 시작되는 복제란의 경우에서도 보였는데, 체외수정란의 경우는 부화배를 초자화 동결하면 용해 후 세포가 퇴행되는 비율이 높은 반면 (미 제시), 복제란의 경우는 부화 중의 수정란이라 할지라도 높은 생존율을 나타내었다.

결론적으로, 본 연구의 결과는 초자화 동결 방법에 의해서 소 체외수정란 및 체세포 핵이식 복제란을 성공적으로 동결할 수 있으며, 높은 생존율과 부화배 형성율을 얻을 수 있음을 보여준다.

## 인용문헌

- Ali J, Shelton JN (1993): Successful vitrification of day-6 sheep embryos. J Reprod Fertil 99:65-70.
- Brackett BG, Oliphant G (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol Reprod 12:260-274.
- Clark P, Fahy GM, Karow AM, Jr (1984): Factor influencing renal cryopreservation. II. Toxic effects of three cryoprotectants in combination with three vehicle solution in nonfrozen rabbit cortical slices. Cryobiology 21:260-273.
- Dobrinsky JR, Johnson LA (1993): Effect of vitrification media on the *in vitro* development of porcine embryos. Theriogenology 39:209 (abstr)
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T (1990): A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J Reprod Fertil 89:91-97.
- Kobayashi K, Nagashima H, Yamakawa H, Kato Y, Ogawa S (1990): The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. Theriogenology 33:777-788.
- Kuwayama M, Fujikawa S, Nagai T (1994): Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. Cryobiology 31:415-422.
- Kuwayama M, Hamano S, Nagai T (1992): Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. J Reprod Fertil 96:187-193.
- Kuwayama M, Holm P, Jacobsen H, Greve T, Callensen H (1997): Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification. Vet Rec 141:365(abstr).
- Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A (1994): Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. Theriogenology 42:1389-1397.
- Massip A, Van der Zwalmen P, Ectors F (1987): Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology 27:69-79.
- Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F (1986): Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. Cryo-Letters 7:270-273.
- Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomogane H (1997): Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of *in vitro*-derived bovine blastocysts. Anim Reprod Sci 48:27-36.
- Rall WF (1987): Factors affecting the survival of vitrified mouse embryos. Cryobiology 24:387-402.
- Rall WF, Fahy GM (1985): Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. Nature 313:573-575.
- Saito N, Imai K, Tomizawa M (1994): Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. Theriogenology 41: 1053-1060.
- Scheffen B, Van der Zwalmen P, Massip A (1986): A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. Cryo-Letters 7:260-269.
- Schiewe MC, Rall WF, Stuart LD, Wildt DE (1991): Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. Theriogenology 36:279-293.
- Smorag Z, Gadjia B, Wiczorek B, Jura J (1989): Stage-dependant viability of vitrified rabbit embryos. Theriogenology 31: 1227-1231.
- Sutton RL (1992): Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. Cryobiology 29:585-598.
- Sz ell AZ, Shelton JN (1987): Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solution on Day-3 mouse embryos. J Reprod Fertil 80:309-316.
- Utsumi K, Hochi S, Iritani A (1992): Cryoprotective effect of polyols on rat embryos during two-step

freezing. *Cryobiology* 29:332-341.  
23. 김정익, 유재원, 박춘근, 양부근, 정희태 (1998): 동결액의 평형방법과 회식방법이 초자화 동결된 소 체외

수정란의 생존성에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 13:313-321.  
(접수일자: 2007. 2. 2 / 채택일자: 2007. 3. 5)