

북방전복, *Haliotis discus hannai* 3배체의 생식능력

지영주, 남보혜, 이정용¹, 장영진²

국립수산과학원 생명공학과, ¹국립수산과학원 연구기획과, ²부경대학교 해양바이오신소재학과

Maturity and Spawning of the Triploid Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*

Young Ju Jee, Bo Hye Nam, Jeong Yong Lee¹ and Young Jin Chang²

Biotechnology Research Division, National Fisheries Research and Development Institute, Gijang-gun, Busan 619-705, Korea

¹Research and Planning Division, National Fisheries Research and Development Institute, Gijang-gun, Busan 619-705, Korea

²Department of Marine Bio-materials and Aquaculture, Pukyong National University, Nam-gu, Busan 608-737, Korea

ABSTRACT

The gonadal development of triploid and diploid Pacific abalones, *Haliotis discus hannai* was histologically investigated in spawning season. Diploid abalones had matured oocytes and spermatozoa, but most triploid had spermatocytes or developing oocytes that was slightly retarded in gonadal development compared to diploid abalones. In spawning experiment of triploid and diploid abalones, spawning rates of diploid male and female were 100%, but those of triploid female was 50% and male was 25% respectively. Investigation of spawned abalone eggs and spermatozoa revealed that length of diploid sperms head were 17.47 μm , breadth of head were 10.31 μm , length of spermatozoa were 130.72 μm , but those of triploid spermatozoa were 11.83 μm , 7.89 μm and 103.36 μm respectively. Triploid spermatozoa were significantly small to diploid spermatozoa ($p < 0.05$). The eggs of diploid and triploid were not different in size. The cross experiment between oocytes produced by triploids and spermatozoa by diploids ($3n \times 2n$ cross) revealed that no fertilization were occurred, and $2n \times 3n$ cross also revealed same result.

Keywords: Pacific abalone, Triploid, Maturity, Spawning, fertilization

서론

염색체 조작에 의해 생산된 3배체 수산동물 성체의 생식세포는 감수분열 동안 상동염색체가 짝을 짓기 못하기 때문에 염색체 3쌍의 분리는 부정확하게 되거나 중지되어 3배체는 보통 불임이 된다고 Beaumont and Fairbrother (1991) 는 밝히고 있다. 이러한 불임으로 인해 성적 성숙에 쓰일 대사 에너지가 체성장에 이용될 수 있어 3배체는 2배체보다 크게 성장되는 장점이 있다. Stanley *et al.* (1981) 은 3배체 버지니아굴,

*Crassostrea virginica*에 대한 연구에서, Tabarini (1984) 는 가리비, *Argopecten irradians*에 대한 연구에서 3배체 성체는 정상 2배체보다 높은 육중량 및 좋은 육질을 얻을 수 있고, 산란기 동안 폐사율을 낮출 수 있다는 결과를 보고하고 있다.

북방전복, *Haliotis discus hannai*의 3배체 유도에 대한 연구는 Arai *et al.* (1986) 의 물리적 자극에 의한 3배체 유도, Jee and Chang (1995) 의 저온 및 고온처리에 의한 3배체 유도가 있고 최근에는 Okumura *et al.* (2007) 이 카페인 처리에 의해 91-100%의 좋은 3배체 유도율을 얻은 결과가 보고되어 있다. 전복류의 하나인 오분자기에 대한 3배체 유도는 Yang *et al.* (1998a) 이 수온처리에 의해 마대오분자기, *Haliotis diversicolor*에 대해, 역시 Yang *et al.* (1998b) 이 cytochalasin B로 오분자기, *Haliotis diversicolor supertexta* (Lischke) 에 대해 3배체를 유도한 바 있다.

3배체 패류의 성성숙을 살펴보면, 굴의 경우 Akashige and Fushimi (1992) 가 참굴의 인위 3배체는 산란기가 되어도 성장이 지속되고 산란기 말에는 2배체 연체부 중량의 1.8-2.5배에 달하는 것과 동시에 글리코겐의 소모가 억제된다고 보고하

Received: June 10, 2013; Accepted: June 25, 2013

Corresponding author : Young Ju Jee

Tel: +82 (51) 720-2450 e-mail: philaqua@korea.kr
1225-3480/24476

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

고 있고, 赤繁村上 (1992) 는 3배체 참굴의 생식소 내 알과 정자 밀도는 2배체에 비해 현저하게 낮다는 성숙도의 특징에 대해 보고하였고, Allen (1987) 은 버지니아굴과 참굴에서도 배우자 형성은 상당히 억제 된다고 보고했다. Komaru and Wada (1989) 는 3배체 가리비, *Chlamys nobilis*의 극소수 수컷에서 여포 내부가 정모세포로 충만한 개체가 보였지만 제 1감수분열 전기의 단계에서 중단된 상태였고, 대부분의 수컷은 생식소의 소낭 내부가 공포상으로 되어 있어 생식 세포가 거의 인정되지 않는 상태였으며 3배체 암컷은 대부분의 개체에서 미발달 혹은 퇴행한 난모세포가 겨우 인정될 수 있을 정도였다고 보고하고 있다. Allen *et al.* (1986) 은 3배체 우럭, *Mya arenaria*의 비정상적인 배우체 형성과 성비에 대해 보고했다. 그러나 정자와 난을 형성하는 개체가 있는 경우도 참굴 (赤繁村上, 1992) 과 진주조개 (Komaru and Wada, 1990) 에서 보고하고 있다.

전복의 성숙도에 관한 연구는 북방전복의 난소 성숙 (Tomida, 1967) 과 정소 성숙 (Tomida, 1968) 에 관한 보고가 있고, Lee (1974) 가 한국산 전복류의 생식세포 형성과정 및 생식주기에 대해 보고한 바 있지만, 3배체 북방전복의 성숙도 특징에 관한 보고는 없을 뿐만 아니라 3배체 북방전복의 산란 및 교차수정에 관한 연구도 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 북방전복 3배체에 관한 일련의 연구인, 3배체 전복의 유도 (Jee and Chang, 1995), 3배체 전복의 성장 (Jee and Chang, 1997), 3배체 전복의 세포유전학적 연구 (Jee and Chang, 2012) 및 3배체 전복의 식품성분 (Jee *et al.*, 2008) 연구에 이어 3배체 북방전복의 성숙도, 산란유도 및 교차수정에 대한 실험을 하고 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 3배체 전복의 생산

실험에 사용한 전복은 부산광역시 기장군 소재 국립수산물학원 실험실에서 저온처리에 의해 3배체로 유도되어 (Jee and Chang, 1995) 유수식 육상수조 (Chung *et al.*, 1994)에서 다시마 (*Laminaria japonica*) 를 먹이로 하여 51개월 동안 사육한 성패 (Jee and Chang, 1997) 이었다. 실험전복의 3배체 여부를 확인하기 위해 flow cytometry를 사용한 DNA 함량 측정을 하였는데 (Jee and Chang, 2012), 전복의 hemolymph를 채취한 다음 Allen (1983) 과 Komaru *et al.* (1988) 의 방법을 약간 변형한 방법을 사용하여 FACStar PLUS (Becton Dickinson Immuno cytometry System, BDIS; Mountain View (A) flow cytometry) 를 이용하였으며 3배체로 확인된 전복을 대상으로 실험에 사용하였다.

2. 생식소의 조직학적 조사

flow cytometry를 사용하여 DNA 함량을 측정한 후 3배체로 확인된 전복과 대조구로 사육하던 정상 2배체 전복에 대해 Kikuchi and Uki (1974a) 의 성숙유효 적산수온 개념을 적용하여 생식소가 성숙기에 달한 상태가 되는 적산수온 1,500°C 이상에서 생식소 조직표본을 만들어 성숙도 여부를 조사했다.

생식소의 조직 표본은 전복 생식소의 중앙 부분을 절단하여 10% 중성포르말린으로 고정했으며, 파라핀 절편은 상법에 의해 두께 6-10 μm로 만들고 Harris' hematoxylin-eosin 이중 염색을 해서 현미경 하에서 조직학적 검사와 아울러 생식소 조직의 현미경 사진 촬영을 하였다.

3. 3배체 전복의 산란

3배체로 유도된 전복 성패가 산란을 하는지 알아보기 위하여 flow cytometry에 의해 3배체로 확인된 전복 중, 생식소가 성숙기에 달해 모든 개체가 방란·방정할 수 있는 상태로 되는 적산수온 1,500°C 이상에서 각 배수체 별로 생식소 지수가 가장 좋은 것을 골라 산란 유발 실험에 사용하였다. 생식소 지수 (Visual Gonad Index) 는 Kikuchi and Uki (1974a) 의 방법에 따라 육안적으로 생식소의 팽창 정도에 의해 0-3의 4단계로 나누었다. 전복의 생식소는 소뿔 모양의 간장부위를 에워싸듯이 형성되고 성숙이 진행됨에 따라 비대해지므로 전복에 상처를 내지 않고 육안적으로 관찰할 수 있는데, 생식소의 팽창이 전혀 없고 간장만의 상태로 되어 암·수 구분이 불가능한 것을 0으로, 생식소가 완전히 성숙해서 패각 바깥으로 빠져나올 정도로 팽창하면 3으로 하고 그 중간의 단계를 1과 2로 설정한다. 산란유발은 실험 모패를 1마리씩 분리하여 Kikuchi and Uki (1974b) 의 방법에 의해 간출자극, 자외선 조사 해수 자극과 수온 상승 자극의 복합 자극을 주었다.

3배체 전복이 방란·방정한 알과 정자는 각각 2배체 전복이 방란·방정한 알 및 정자와 교차 수정시켜 수정 여부 및 발생 과정을 관찰하였으며 대조구로 2배체 전복이 산란한 알 및 정자와 수정시켜 비교하였다. 아울러 3배체 전복의 알과 정자에 대해 모양과 크기를 측정하고 2배체 알과 정자의 모양과 크기와 비교하였는데, 알은 4% 포르말린으로 고정한 후, 광학 현미경하에서 직경을 측정하였으며, 정자는 slide에 도말, 건조시킨 후 4% Giemsa 용액으로 20분간 염색하고 광학현미경 하에서 정자의 장경 (length of head), 단경 (breadth of head) 그리고 정자의 길이 (length of spermatozoa) 및 형태를 측정하고 현미경 사진 촬영을 하였다.

결 과

1. 생식소의 조직학적 검사

2배체와 3배체 전복 생식소의 조직 검사 결과를 Fig. 1, 2

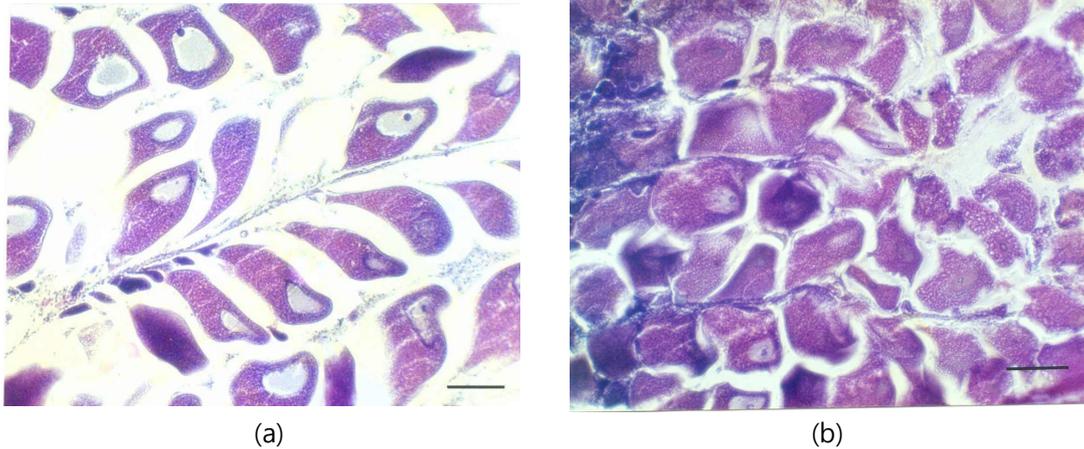


Fig. 1. Transverse sections of gonad from female diploid and triploid Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. a) diploid ovary. b) triploid ovary. Bars indicate 100 µm.

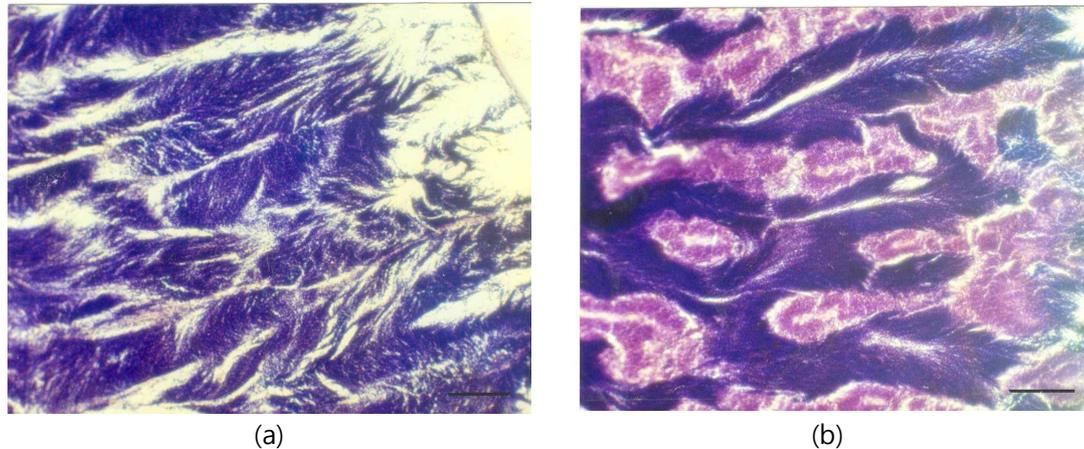


Fig. 2. Transverse sections of gonad from male diploid and triploid Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. a) diploid testis. b) triploid testis. Bars indicate 100 µm.

에 나타났다. 2배체 암컷 참전복의 난소는 성숙기의 상태로 난모세포들이 소엽과 소엽 사이 내강 내로 유리되어 차츰 원형으로 되고 있으며 난모 세포 주위에 젤라틴 상 물질의 피막으로 둘러싸여 있다 (Fig. 1a). 3배체 암컷의 난소는 난소 소엽이 보다 신장되고 난원세포들은 차츰 세포질이 증대하면서 소엽 기부 측에 세장된 난병을 부착 난모세포로 성장해 가는 단계이다 (Fig. 1b). 2배체 수컷 참전복의 정소는 방출기의 상태로 정소 소엽 상피 상의 대부분의 세포가 정세포와 변태된 완전한 정자들로 발달하여 소엽 사이 내강의 방을 가득 채우고 있으며 정자의 방출이 일어나고 있는 상태이다 (Fig. 2a). 3배체 정소는 소엽 상피 상에서 많은 정모 세포들의 증상 배열을 볼 수 있으며 내강 쪽에는 일부 변태를 마친 정자들이 보인다 (Fig. 2b).

2. 3배체 전복의 산란

Table 1에 산란 유발에 사용한 전복 및 산란 유발 결과를 나타냈다. 산란 유발에 사용된 2배체 전복은 암컷 4마리 (평균 각장 85.0 mm, 평균 체중 89.6 g) 와 수컷 5마리 (평균 각장 87.3 mm, 평균 체중 84.8 g) 였으며, 3배체는 암컷 4마리 (평균 각장 70.7 mm, 평균 체중 47.6 g) 와 수컷 4마리 (평균 각장 65.1 mm, 평균 체중 35.6 g) 이었다. 생식소 지수는 2배체가 암수 다 같이 약 3.0의 양호한 성숙도를 보였고, 3배체가 2.0의 성숙도를 보였다 산란 유발에 반응한 개체는 2배체는 암수 전부 반응해서 산란율 100%를 나타냈으며, 3배체는 암컷이 4마리 중 2마리가 산란하여 50.0%의 산란율을 나타냈으며 수컷이 4마리 중 1마리가 반응을 해서 산란율 25.0%를 나타냈다.

2배체 알과 정자 및 3배체 알과 정자를 현미경 하에서 관찰

Table 1. Biometric data and spawning rate of the diploid and triploid Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* in spawning experiment (mm, g)

Ploidy	Nos. of abalone	Shell length	Total weight	Visual gonad index	Nos. of spawned abalone	Spawning rate (%)
Diploid	♀ 4	85.0 ± 12.2 ¹	89.6 ± 33.1 ¹	3.0	4	100.0
	♂ 5	87.3 ± 7.0	84.8 ± 19.8	2.8	5	100.0
Triploid	♀ 4	70.7 ± 4.8	47.6 ± 10.1	2.0	2	50.0
	♂ 4	65.1 ± 4.8	35.6 ± 9.5	2.0	1	25.0

¹Values are mean ± SD.

Table 2. Comparison of size differences of spermatozoa and egg in diploid and triploid Pacific abalone *Haliotis discus hannai* (µm)

Ploidy	Length of head (A)	Breadth of head (B)	Length of spermatozoa (C)	B/A	C/A	Diameter of egg
Diploid	17.47 ^a ± 3.23 ¹	10.31 ^a ± 1.41	130.72 ^a ± 12.35	0.61	7.73	195.50 ± 8.65
Triploid	11.83 ^b ± 2.24	7.89 ^b ± 1.18	103.36 ^b ± 12.89	0.69	9.02	192.50 ± 7.22

¹Values are mean ± SD.

²Values in same columns having the different superscripts are significantly different (P < 0.05).

한 결과는 Table 2와 같다. 2배체의 정자는 두부 장경 17.47 µm, 두부 단경 10.31 µm 및 정자의 길이 130.72 µm이었던 데 비해 3배체 정자는 두부 장경 11.83 µm, 두부 단경 7.89 µm 및 정자의 길이 103.36 µm로서 2배체 정자가 3배체 정자보다 장경, 단경, 정자의 길이 모두에서 유의적으로 길었다 (P < 0.05). 정자 두부의 형태는 장경에 대한 단경의 비가 2배체는 0.61인데 비해 3배체는 0.69로서 3배체의 두부가 약간 둥근 형태였으며 두부 장경에 대한 전장의 비는 2배체가

7.73인데 비해 3배체는 9.02로서 3배체가 두부 크기에 비해 꼬리의 길이가 길었다.

알의 직경은 2배체가 199.50 µm, 3배체가 192.50 µm로서 2배체가 컸으나 유의한 차는 없었다 (P > 0.05).

Giemsa 염색한 2배체 정자와 3배체 정자를 Fig. 3에 나타냈고 정상적인 2배체 수정란과 3배체 알과 2배체 정자로 매정시킨 수정란을 Fig. 4에 나타냈다. 2배체 수정란은 정자들이 정상적으로 알에 부착하여 수정이 정상적으로 되었고 3배체

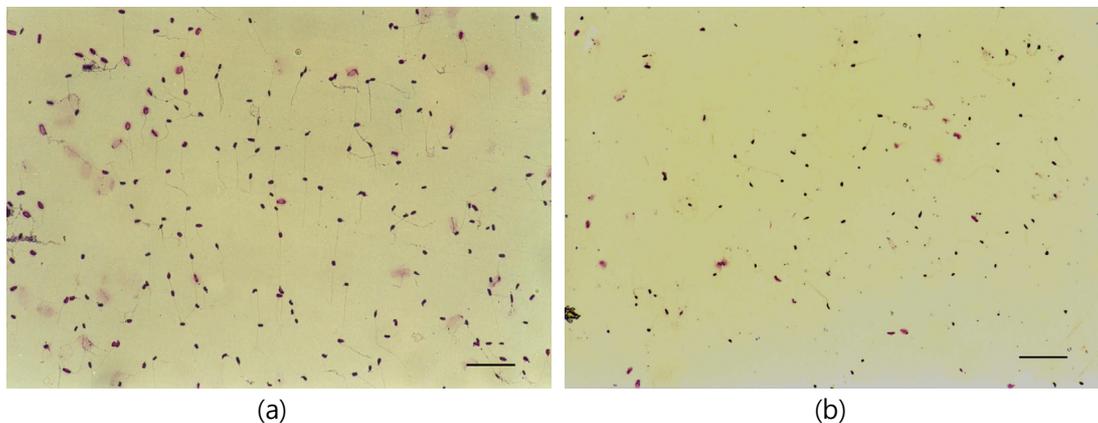


Fig. 3. Diploid and triploid spermatozoa in Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. a) diploid spermatozoa. b) triploid spermatozoa. Bars indicate 100 µm.

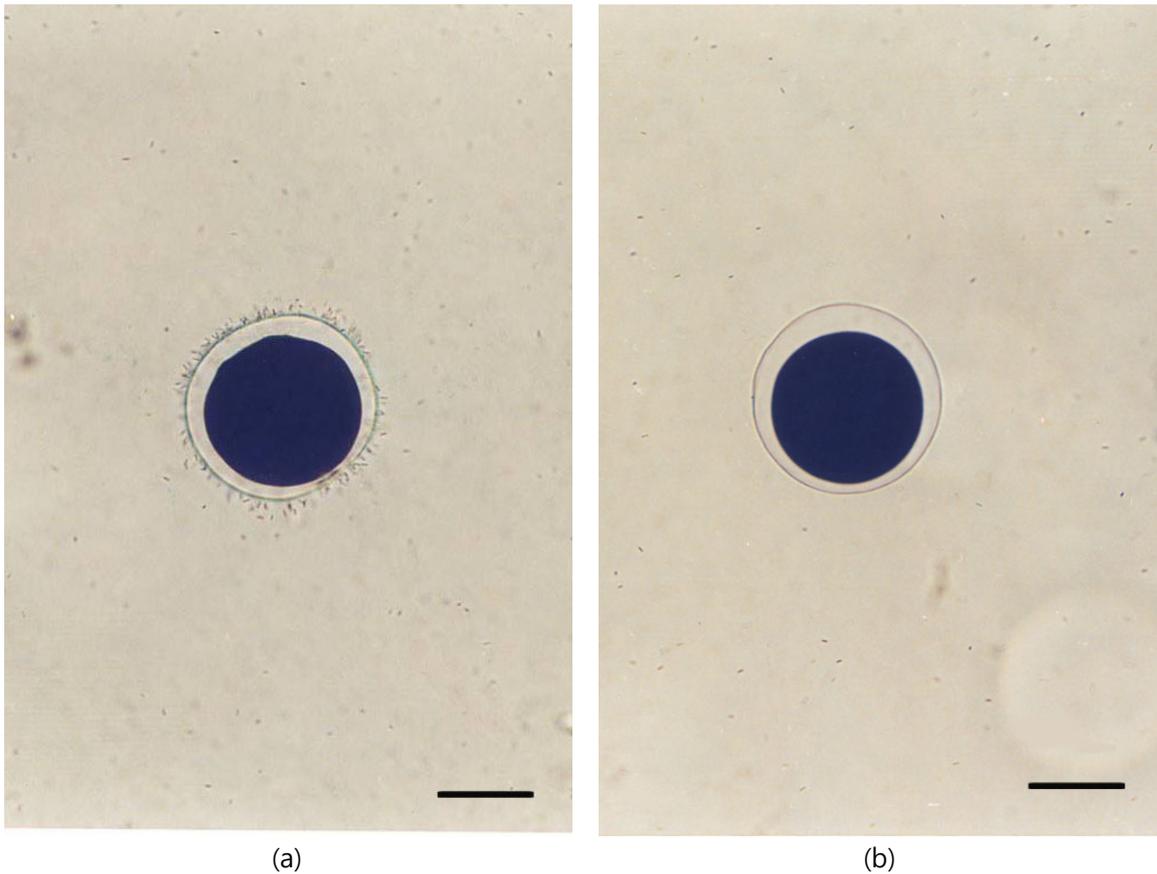


Fig. 4. Fertilized egg of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*.
a) diploid ♀ × diploid ♂; spermatozoa were attached in the egg membrane, fertilization was occurred and normal development was observed. **b)** triploid ♀ × diploid ♂; In spite of numerous normal spermatozoa, which were not attached in the triploid egg membrane and no fertilization was occurred. Bars indicate 100 µm.

알과 2배체 정자로 매정된 난은 정상적 2배체 정자들이 3배체 알에 부착을 하지 못해 수정이 이루어지지 않았다. 2배체 알과 3배체 정자의 경우에도 마찬가지로 정자들이 알에 부착을 하지 못해 수정이 이루어지지 않았다.

고 찰

Komaru and Wada (1989) 는 가리비류, *Chlamys nobilis* 3배체의 배우자 형성에 관한 연구에서 산란기에 2배체는 정상적으로 난과 정자를 생성 방출하지만 3배체는 대부분이 난모세포와 정모세포를 가지고 있는 상태지만 성숙한 배우자는 가지지 않는다고 보고하고 있으며, Komaru (1994) 는 3배체 진주조개, *Pinctada fucata martensii*에서 생식세포의 수는 급격하게 줄어들지만 생식소의 조직을 검경한 결과, 성숙한 난모세포와 정자를 가지고 있다고 보고하고 있다. 본 연구에서 2배체 전복의 생식소는 정상적으로 발달하여 난소의 경우에는 성숙기를 거쳐 방출기로 들어가고 있는 상태이며, 정소

의 경우에는 방출기의 상태였다. 이에 비해 3배체 전복의 생식소는 발달이 억제되어 난소는 성장기의 상태이고, 정소는 성숙기의 단계에 머물고 있다. 따라서 전복은 완전한 불임이 되는 것은 아니고 어느 정도 성숙이 억제된다고 생각할 수 있다. 赤繁村上 (1992) 은 3배체 참굴, *Crassostrea gigas*의 생식소 조직을 조사한 결과, 3배체 참굴은 산란시기에 2배체에 비해 성숙이 지연되고 산란시기가 끝나면 지연된 상태에서 생식소가 퇴축한다고 보고하고 있어 3배체 전복도 이와 유사한 패턴을 가지는 것으로 생각된다.

赤繁村上 (1992) 은 3배체 참굴, *C. gigas*의 산란 유발 실험에서 2배체 암컷의 산란 유발율은 100%이고 수컷은 88.9%였는데 비해, 3배체 암컷의 산란 유발율은 28.6%, 수컷은 14.3%로 2배체보다 낮았다고 보고하고 있는데 본 실험에서도 2배체는 암수 전부 반응해서 100%의 산란율을 나타냈으나, 3배체는 암컷 4마리 중 2마리가 산란하여 50.0%의 산란율을 나타냈으며 수컷 4마리 중 1마리가 반응을 해서 25.0%의 산란율을 나타내 赤繁村上 (1992) 의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

Dunstan *et al.* (2007) 은 호주산 greenlip 전복, *Haliotis laevigata*에 대해 3배체를 유도하고 48개월 동안 68.3 mm까지 키운 다음 성숙도와 산란유도실험을 하였는데 3배체 암컷은 visual gonad index가 1에 머물렀고 3배체 수컷은 visual gonad index가 1-2에 머물러 성숙이 되지 않았고 산란유발에도 반응하지 않아 본 실험의 북방전복 3배체와는 조금 다른 결과를 나타내었다.

어류의 생식 능력 평가는 생식소 수준, 배우자 수준 및 접합자 수준에서 논의 되어야 한다고 보고 (Chevassus, 1983; Yamazaki, 1983) 하고 있다. 생식소 수준의 불임은 생식소 자체가 성숙되지 않는 것으로서 3배체 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 난소 조직은 단지 일부만 제1난포 세포 단계에 머물러 있어 생식소 수준의 불임을 보인 예 (Kim *et al.*, 1990) 이며, 배우자 수준의 불임은 생식소는 정상적으로 성숙을 하지만 배우자인 알이나 정자나 기형이거나 수정 능력이 없는 경우로서 초어 3배체에서 형성된 정자는 그 DNA 함량이 반수체로부터 6배체까지의 비정상적인 분포를 보여 배우자 수준 불임의 좋은 예를 나타내고 있다 (Allen *et al.*, 1986).

본 실험에서 북방전복 3배체의 경우에는 알은 외부 형태 및 크기를 비교해 봤을 때 2배체 알과 다름이 없었으나 정자는 두 부 장경과 단경, 전체 길이에서 정상 2배체보다 유의적으로 작았으며 이러한 3배체 알과 정자로 수정 실험을 했을 때 전혀 수정이 이루어지지 않았다. 따라서 3배체 북방전복은 배우자 수준의 불임인 것으로 판단된다.

한편, 3배체의 알과 정자로 교배실험을 했을 때 수정, 발생이 되는 경우도 있는데, Komaru (1994) 는 3배체 진주조개, *Pinctada fucata martensii*에서 정자와 알이 산란되고, 2배체 정자와 3배체 알의 교배 실험에서 정상적인 수정, 발생이 되는데 여기서 부화하는 대분의 유생은 기형이고 이러한 유생의 핵형 분석 결과, 염색체 수가 넓은 범위로 분포하는 aneuploidy가 높은 빈도로 나타났고 4개월 후의 생존율은 매우 낮게 나타났는데 생존한 것은 2배체와 3배체로 판명되어 aneuploidy는 유생단계에서 폐사하는 걸로 밝혀졌다고 보고하고 있다.

赤繁村上 (1992) 은 패류 3배체에 있어서 배우자 형성 억제와 상해한 기구에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만 정자는 정자 형성 과정에서 제1 내지 제2 감수분열을 거치기 때문에 이 두 단계에서 염색체의 분리 중에 장애가 일어나 정세포나 정자에까지 영향을 주는 것으로 말하고 있고, 암컷에서는 감수분열이 방란 후에 일어나기 때문에 그 불임성의 원인이 염색체의 분리 장애로 생각하기에는 곤란하다고 밝히고 있어 앞으로 패류의 3배체 알에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

참전복의 배수체별 생식소 조직 관찰에서 2배체 난소의 경우에는 성숙기를 거쳐 방출기로 들어가고 있는 상태이며, 2배체 정소의 경우에는 방출기의 상태였다, 이에 비해 3배체 전복의 생식소는 발달이 억제되어 난소는 성장기 혹은 성숙기의 상태이고, 정소는 성숙기의 단계에 머물고 있다. 따라서 전복은 완전한 불임이 되는 것은 아니고 어느 정도 성숙이 억제된다고 생각된다.

3배체 참전복의 산란 유발 실험에서 산란 유발에 반응한 개체는 2배체는 암수 전부 반응해서 100%의 산란 유발율을 나타냈고, 3배체는 암컷 50%, 수컷은 25%의 산란 유발율을 나타냈다.

산란된 알과 정자를 배수체별로 조사한 결과, 2배체의 정자는 장경 17.47 μm , 단경 11.40 μm 및 정자의 길이 103.94 μm 이었던 데 비해 3배체 정자는 장경 10.86 μm , 단경 8.47 μm 및 정자의 길이 85.06 μm 로서 2배체 정자가 3배체 정자보다 장경, 단경, 정자의 길이 모두에서 유의적으로 길었다 ($P < 0.05$). 알의 직경은 2배체가 199.50 μm , 3배체가 192.50 μm 로서 2배체가 컸으나 유의한 차는 없었다 ($P > 0.05$).

배수체별 교배 실험에서 2배체 \times 2배체는 정상적으로 수정되어서 발생을 했으나 2배체 알 \times 3배체 정자와 3배체 알 \times 2배체 정자의 경우에는 수정이 되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 연구사업비 (RP-2013-BT-044) 지원에 의해 수행된 연구결과입니다.

REFERENCES

- Akashige, S., and Fushimi, T. (1992) Growth, Survival, and Glycogen Content of Triploid Pacific Oyster *Crassostrea gigas* in the Waters of Hiroshima, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**: 1063-1071.
- Allen, S. K. Jr. (1987) Gametogenesis in three species of triploid shell fish: *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. Selection, and Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture (K. Tiews ed.), Vol II, Heeneman, 207-217.
- Allen, S. K. Jr., Hidu, H., and Stanley, J. G. (1986) Abnormal gametogenesis and Sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *The Biological Bulletin*, **170**: 198-210.
- Allen, S. K. Jr., Thiery, R. G., and Hägstrom, N. T. (1986) Cytological evaluation of the likelihood that triploid grass carp will reproduce. *Transactions of the American Fisheries Society*, **115**: 841-848.

- Arai, K., Naito, F., and Fujino, K. (1986) Triploidization of the Pacific abalone with Temperature and Pressure treatments. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**: 417-422.
- Beaumont, A. R., and Fairbrother, J. E. (1991) Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *Journal of Shellfish Research*, **10**: 1-18.
- Chevassus, B. (1983) Hybridization in fish. *Aquaculture*, **33**: 245-262.
- Chung, S. C., Jee, Y. J., and Son, P. W. (1994) Indoor Tank Culture of the Abalone *Haliotis discus hannai*, I. Effect of tank shape and stocking on the growth of young abalone. *Journal of Aquaculture*, **7**: 9-20. [in Korean]
- Dunstan, G. A., Elliott, N. G., Appleyard, S. A., Holmes, B. H., Conod, N., Grubert, M. A., and Cozens, M. A. (2007) Culture of triploid greenlip abalone (*Haliotis laevigata* Donovan) to market size: *Commercial implications*. *Aquaculture*, **271**: 130-141.
- Jee, Y. J., and Chang, Y. J. (1995) Induction of triploid abalone, *Haliotis discus hannai*, and Its biological characteristics I. Induction of Triploid Abalone. *Journal of Aquaculture*, **8**: 159-170. [in Korean]
- Jee, Y. J., and Chang, Y. J. (1997) Induction of triploid abalone, *Haliotis discus hannai*, and Its biological characteristics III. Growth and Survival rate of Triploid abalone. *Journal of Aquaculture*, **10**: 123-131. [in Korean]
- Jee, Y. J., and Chang, Y. J. (2012) Cytogenetic Analysis of the Triploid Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Korean Journal of Malacology*, **28**: 37-43. [in Korean]
- Jee, Y. J., Chang, Y. J., and Yoon, H. D. (2008) Studies on the Food Components of Triploid Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **41**: 452-457. [in Korean]
- Johnson, O. W., Dickhoff, W. W., and Utter, F. M. (1986) Comparative Growth and Development of Diploid and Triploid Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, **57**: 329.
- Kikuchi, S., and Uki, N. (1974a) Technical study on artificial spawning of abalone, genus *Haliotis* I: Relation between water temperature and advancing sexual maturity of *Haliotis discus hannai* Ino. *Bulltin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory*, **33**: 69-78.
- Kikuchi, S., and Uki, N. (1974b) Technical study on artificial spawning of abalone, genus *Haliotis* II: Effect of irradiated sea water with ultraviolet rays on inducing to spawn. *Bulltin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory*, **33**: 79-86.
- Kim, D. S., Choi, G. C., and Park, I. S. (1990) Triploidy Production of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquaculture*, **3**: 135-144. [in Korean]
- Komaru, A. (1994) Better growth and sterility in the induced triploid scallop, *Chlamys nobilis* and the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. The 1st Korean-Japan joint symposium on aquaculture abstracts, pp. 5.
- Komaru, A., and Wada, T. (1989) Gametogenesis and Growth of Induced Triploid Scallops *Chlamys nobilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 447-452.
- Komaru, A., and Wada, T. (1990) Gametogenesis of triploid Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, in "Advances in Invertebrate Reproduction 5" ed. by Hoshi, M. and Yamashita, O., Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam, pp. 461-468.
- Lee, T. Y. (1974) Gamatogenesis and reproductive cycle of abalones. Publ. *Marine laboratory Busan Fisheries College*, **7**(21): 21-50. [in Korean]
- Lincoln, R. F., and Scott, A. P. (1983) Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture*, **30**: 375.
- Okumura, S., Arai, K., Harigaya, Y., Eguchi, H., Sakai, M., Senbokuya, H., Furukawa, S., And Yamamori, K. (2007) Highly efficient induction of triploid Pacific abalone *Haliotis discus hannai* by caffeine treatment. *Fisheries Science*, **73**: 237-243.
- Stanley, J. G., Allen, S. K. Jr., and Hidu, H. (1981) Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, **23**: 1-10.
- Tabarini, C. L. (1984) Induced Triploidy in the bay Scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, **42**: 151-160.
- Taniguchi, N., Kijima, A., Tamura, T., Takegami, K., and Yamasaki, I. (1986) Color, growth and maturation in ploidy-manipulated fancy carp. *Aquaculture*, **57**: 321-328.
- Tomita, K. (1967) The maturation of the ovaries of the abalone, *Haliotis discus hannai* INO, in Rebun island, Hokkaido, Japan. *Science reports of Hokkaido fisheries experimental station*, **7**: 1-7
- Tomita, K. (1968) The maturation of the testes of the abalone, *Haliotis discus hannai* INO, in Rebun island, Hokkaido, Japan. *Science reports of Hokkaido fisheries experimental station*, **9**: 56-61
- Yamazaki, F. (1983) Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, **33**: 329-354.
- Yang, H. S., Chen, H. C., Ting, Y. Y. (1998a) Induction of polyploidy and embryonic development of the abalone, *Haliotis diversicolor*, with temperature treatment. *Amerian Malacological Bulletin*, **14**: 139-147.
- Yang, H. S., Ting, Y. Y., Chen, H. C. (1998b) Blocking polar body with cytochalasin B in the fertilized eggs of the small abalone, *Haliotis diversicolor* supertexta (Lischke), and the development and ploidy of the resultant embryos. *Aquaculture Research*, **29**: 775-783.
- 赤繁 悟村上恭祥. (1992) 三倍體マガキにおける性成熟の特徴. 水産育種, **18**: 41-51.