

발 간 등 록 번 호

11-1543000-003962-01

육종 참전복 배수체 종자 개발과 국내외 산업화

2022.3.25.

프로젝트연구기관 / 국립수산물과학원 수산종자육종연구소
세부프로젝트연구기관 / 국립수산물과학원 수산종자육종연구소
세부프로젝트연구기관 / 부경대학교 산학협력단

2022

제 출 문

농림축산식품부 장관·해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “Golden Seed 프로젝트사업”(기간 : 2017. 1.~2021. 12.) 육종 참전복 배수체 종자 개발과 국내외 산업화 프로젝트의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 3. 25.

프로젝트연구기관명 : 국립수산과학원 수산종자육종연구소 (대표자)	황 미 숙 (인)
세부프로젝트연구기관명 : 국립수산과학원 수산종자육종연구소 (대표자)	황 미 숙 (인)
세부프로젝트연구기관명 : 부경대학교 산학협력단	(대표자) 오 정 환 (인)
참여기관명 : 해성전복양식	(대표자) 최 영 태 (인)
참여기관명 : 연일수산	(대표자) 박 기 연 (인)
참여기관명 : 입암포영어조합법인	(대표자) 오 영 희 (인)

프로젝트연구책임자 : 박 철 지
세부프로젝트연구책임자 : 박 철 지
세부프로젝트연구책임자 : 남 윤 권
참여기관책임자 : 최 영 태
참여기관책임자 : 박 기 연
참여기관책임자 : 오 영 희

국가연구개발혁신법 시행령 제33조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	213008-05 -5-CG600	해당단계 연구기간	2017.1.1. ~ 2021.12.31.	단계구분	(2)/(2)
연구사업명	단위사업	Golden Seed 프로젝트사업			
	사업명	GSP수산종자사업단			
프로젝트명	프로젝트명	육종 참전복 배수체 종자 개발과 국내외 산업화			
	세부프로젝트명	육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매			
		배수체 생산기술 개량연구 및 특성조사			
프로젝트 책임자	박철지	해당단계 참여연구원 수	총: 87명 내부: 65명 외부: 22명	해당단계 연구개발비	정부: 1,605천원 민간: 290천원 계: 1,895천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 87명 내부: 65명 외부: 22명	총 연구개발비	정부: 1,605천원 민간: 290천원 계: 1,895천원
연구기관명 및 소속부서명	국립수산과학원 수산종자육종연구소 부경대학교 산학협력단			참여기업명 늘품수산, 해성전복양식, 연일수산, 입암포영어조합법인, 제주광어, 씨로드수산	
국제공동연구	-			-	
위탁연구	연구기관명: 마린씨드			연구책임자: 이윤아	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	2234-1757 0736-6205 1225-3480 1932-6203 2671-4639 1874-7787 0374-8111 2352-5134	10-1995-130 10-2002-294 10-2311-743	11-1192000 -000830-01								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- (목적)
 - 육종개발된 전복 품종의 수출 시 배타적 기술 권리 보호를 위한 배수체 유도 기술 확립
 - 육종 배수체 전복 종자의 효과적인 산업화를 위해 대량생산 및 관리와 수출 지원 시스템 구축으로 배수체 참전복의 글로벌 시장 진출
- (연구내용 및 결과)
 - 품종개발 6건, 특허 6건, 논문 10건, 유용유전자원 등록 8건, 기술이전 2건, 인력양성 23건, 국내 판매 5.5억 원, 국외 수출 20.6만 달러 달성
 - 배수체 육종 참전복 유생 약 10억 마리 생산하여 참여기업으로 분양
 - 배수체 전복 유도기술, 대량처리기술, 배수체 판정기술, 사양관리 기술 및 주요 형질 특성에 관한 표준 프로토콜 및 매뉴얼 제작
 - 중국, 일본, 홍콩 등을 포함한 동아시아 지역 판매전략 수립 및 현지 시장조사
 - 현장 맞춤형 3배체 대량처리 조건 정립 및 개량
 - 배수체 종자의 유전적 구성에 대한 안정성과 배수화에 따른 유전자발현 차등성 자료 제시
- (연구결과 활용계획)
 - 참전복 이외 여타 패류의 육종 신품종 개발 시 핵심 참고지침으로 활용
 - 생태계 위해성 품종의 산업화를 위한 생식학적격리 품종에 대한 대량생산 프로토콜로 활용
 - 배수체 참전복 생산 기반기술의 산업체 이전(실용화) 및 수출전략 공동 추진
 - 배수체의 특성 분석을 통한 실용화 제품의 규격 및 성능 평가 지원
- (기술 확산 및 산업화계획)
 - 본 프로젝트의 참여기업을 비롯하여 전복 종자 생산업체에 배수체 전복 생산 및 사양 관리 매뉴얼 보급과 산학연 협의체 구성을 통한 기술 세미나 및 설명회를 개최하여 배수체 기술을 소개하여 배수체 생산 기술의 확산
 - 참여기업인 민간으로 배수체 생산 기술을 이전하여 참여기업 주도하에 자체적으로 배수체 전복을 생산하여 현장에 공급하고, 배수체 생산 기술의 완성도를 높이기 위하여 프로젝트 수행기관에서는 지속적인 기술 지원

보고서
면수
456면

보고서 요약문

연구의 목적 및 내용	<p>육종·개량된 전복 품종의 산업화 및 수출 시 수출된 품종의 비승인 형태의 재생산 및 육종 형질의 복제를 방지할 수 있는 배수체 기술을 참전복에서 확립하고, 육종 배수체 전복 종자의 효과적인 산업화를 위해서 대량 종자생산, 관리 시스템 및 수출 지원 시스템을 구축하고자 함.</p>				
연구개발성과	<p>본 프로젝트의 수행으로 최종 품종개발 출원 6건, 특허 6건(출원 3건, 등록 3건), 논문 10건(SCI: 4, KCI: 6), 유용유전자 등록 8건, 기술이전 2건, 인력양성 23명의 실적을 달성. 연구기간동안 배수체 육종 참전복 유생 약 10억 마리를 생산하여 참여기업으로 분양하였으며, 배수체 전복을 효과적으로 생산하기 위한 유도 프로토콜(대량처리, 유도, 판정 및 주요 형질평가) 및 종자생산/사양관리 표준 매뉴얼을 제작하였음. 일본, 대만 등 국외 수출과 국내 판매를 통해 20.6만 달러, 5.5억 원의 판매 실적을 달성하였음. 배수체 유도 대량처리 조건의 현장 적용성을 개량하여 유도 효율 95-99%의 수준을 유지하는 배수체 유도 기술을 개발·개량하여 기술 수준이 세계 선두권에 도달함. 배수체 유도 기술의 개선 효과와 처리 안정성(유도 효율)을 민간 치패장에서 검증하여 현장 맞춤형 간편화 3배체 대량처리 조건 정립과 함께 ‘4배체 유도 가능 조건’을 확보하였음. 배수체화에 따른 양적형질 및 생식기능의 이배체 대비 차등 형질 발현을 조사, 배수체가 갖는 종자생산 및 생식생태학적 측면의 스펙과 규격을 구체화함. 배수체 종자의 유전적 구성에 대한 안정성(핵형, DNA 함량)과 배수화에 따른 유전자발현 차등성 자료를 제시함.</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>배수체 처리로 수출된 육종 참전복의 비승인된 재생산 및 기술복제 방지를 통한 국내 육종 기술을 보호하고자 함. 배수체 육종 참전복 대량생산을 위한 어미관리, 생산 시스템 관리 및 실용화 관리 체제 구축에 활용이 가능함. 또한 우량 배수체 참전복의 생산 기반 및 기술의 산업체(참전복 종자생산 업체) 이전 및 수출전략을 공동 추진하여 시장 개척 및 수출을 진행하고자 함.</p> <p>향후 기술 개선 및 최적화를 통한 배수체의 현장 적용성 및 편리성을 증대시키고 배수체의 특성 분석을 통한 실용화 제품의 규격 및 성능 평가를 지원하고자 함. 고효율 간편 배수체 유도 기술의 실용화를 공동 추진하여 배수체 특성이 탑재된 우량 참전복의 수출을 추진하고, 더 나아가 전복 이외 여타 수산종자프로젝트의 신품종 개발 시 불임화 기술을 지원하고자 함.</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	전복	육종	3배체	생식제어	특성평가
영문핵심어 (5개 이내)	Abalone	Breeding	Triploid	Reproductive confinement	Trait evaluation

〈 목 차 〉

제출문	1
보고서 요약서	3
보고서 요약문	5
목 차	7
제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1 절 연구개발의 필요성	11
1. 배수체 전복 종자개발의 필요성	11
2. 육종 참전복 배수체 종자 대량생산 기술개발의 필요성	12
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	13
1. 연구개발목표	13
2. 연구개발내용	13
3. 연구 성과목표 대비 실적	13
제 2 장 연구수행 내용 및 결과	15
제 1 절 연차별 연구목표 및 수행 내용	15
제 2 절 연구수행 결과	20
1. 제1세부프로젝트 연구수행 결과	20
1-1. 배수체 육종 참전복 대량생산 기반구축	20
가. 배수체 육종 참전복 생산을 위한 산업화용 어미확보 및 성숙관리	20
나. 육종 참전복 배수체 종자의 대량생산을 위한 조건 검토	27
다. 배수체 육종 참전복 대량생산	34
라. 육종 참전복 배수체 종자생산 및 사양관리를 위한 표준 매뉴얼 제작	39
마. 배수체 육종 참전복의 관리기술지원	49
바. 배수체 육종 참전복의 품질관리 및 안정성 검증	51
1-2. 민간협력체제 구축	64
가. 민간업체를 활용한 배수체 육종 참전복의 시험생산 및 적응력 평가	64
나. 참여기업을 활용한 배수체 육종 참전복 대량생산	69
다. 배수체 육종 참전복의 사양관리 기술 지원	73
1-3. 수출 및 산업화 기반구축	78
가. 중국 전복 산업 현황	78
나. 중국 전복종자 시장 및 유통시장 조사	90
다. 국내외 전복종자 마케팅 전략 수립	98
라. 국내외 판매망 확보	110
마. 전복 종자시장개척 및 수출	113

1-4. 제1세부프로젝트 연구결과 종합 고찰 및 결론	124
가. 배수체 육종 참전복 대량생산 및 실용화 기반 구축	124
나. 배수체 육종 참전복 종자 수출	126
2. 제2세부프로젝트 연구수행 결과	127
2-1. 배수체 유도 및 처리기술 개량	127
가. 현장 적용성 개선	127
나. 4배체 유도 기술 가능성 평가	143
2-2. 배수체의 세포유전학적 특징 평가	204
가. 세포 당 DNA 함량 및 nucleolar organizer region 측정	204
나. 배수체 전복의 염색체 표본 분석 및 핵형	207
2-3. 배수체 전복의 발생 성장 단계별 전사체 발현 DB의 체계화	221
가. 2배체 및 3배체 전복의 참조 전장 전사체 DB 구축	223
나. 배수체 전사체 발달·성장 단계별 DB 구축	230
다. 발달·성장 단계별 배수체 특이 차등발현 유전자 탐색	238
라. 3배체 참전복의 발달·성장 단계별 특이 차등 발현 전사체의 동정 및 발현패턴검증	262
2-4. 배수체의 환경 스트레스에 대한 발현반응 특징평가	267
가. 환경(고수온 및 저산소) 스트레스에 대한 배수체 차등발현유전자(differentially expressed genes) NGS 분석	268
나. 고수온 자극에 대한 HSP 유전자들의 발현 반응분석	280
다. 다양한 환경스트레스에 대한 저산소 유도인자-1 α (HIF-1 α) 유전자의 발현 특징	292
2-5. 배수체의 체조성 및 형태학적 특징 조사	301
가. 배수체의 체조성 특징	301
나. 배수체의 형태학적 특징	308
2-6. 배수체의 생식학적 특징 및 생식력 조사	322
가. 생식소의 외형적 발달 및 조직학적 특징	323
나. 성숙관련 유전자 정량발현 분석조건 최적화	332
다. 배수체의 생식소 유전자발현 특징	378
라. 인공 방란·방정 자극 처리에 대한 반응	395
2-7. 민간 현장 보급 배수체 시료의 평가	400
가. 현장 보급 배수체의 배수성 유지 조사	400
나. 현장 보급 배수체의 주요 형질 추적평가 지원	401
2-8. 배수체 유도·분석 표준 매뉴얼(프로토콜) 제작	414
2-9. 제2세부프로젝트 연구결과 종합 고찰 및 결론	426
가. 배수체 대량생산 기술	426
나. 배수체의 세포, 유전 및 생리학적 특성	426

다. 배수체의 생식 능력	427
라. 향후 활용 및 연계 방향	427
제 3 절 연구개발 성과	428
1. 연구개발 성과목표 대비 실적	428
2. 품종개발	428
3. 특허	429
4. 논문	429
5. 유전자원	430
6. 국내매출액	431
7. 종자수출액/수입대체효과	431
8. 기술이전	431
9. 인력양성	432
10. 매뉴얼 제작	432
11. 기술적 및 경제적 성과	433
가. 기술적 성과	433
나. 경제적 성과	433
제 3 장 목표 달성도 및 관련분야 기여도	435
제 1 절 연구개발목표 및 목표 달성도	435
1. 프로젝트의 연구개발목표	435
2. 평가 착안점 및 목표 달성도	435
3. 연차별 연구목표 및 달성도	436
4. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책	441
제 2 절 기술발전 기여도	442
1. 과학기술적 측면 기여도	442
2. 사회경제적 측면 기여도	442
제 4 장 연구개발 성과 및 성과 활용 계획	443
1. 2단계 연구개발 결과를 기반한 추가 연구과제 발굴	443
2. 기술확산 및 산업화 추진 계획	443
<붙임> 참고문헌	444
<별첨 1> 연구개발보고서 초록	446
<별첨 2> 자체평가보고서	447
<별첨 3> 연구성과 활용계획서	453

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 배수체 전복 종자개발의 필요성

- 전복은 우리나라를 비롯하여 동아시아(중국 포함) 국가들에서 매우 중요시되는 고가의 수산물 중 하나이며, 중국의 고가 수산물에 대한 소비 증가(2008년 이후)와 함께 전 세계적으로 전복 생산량 및 시장 규모는 지속적으로 증가하고 있음.
- 이러한 시장규모의 증가 추세에 따라 전복 종자의 수요 역시 급증할 것으로 예상되며, 특히 양식수산업의 성패가 원자재에 해당하는 우량 종묘의 확보에 크게 영향 받는다는 점을 고려할 때 양질의 전복 종자를 생산할 수 있는 기반 구축은 매우 중요시 됨.
- 그러나 전 세계적인 기후변화, 수산식량부족분 문제 대두, 양식환경의 악화 및 자유무역(시장개방)체제로의 수산교역질서 재편 추세 등은 자국의 식량안보 및 국제시장 진출 등과 같은 국가적 중요 이슈와 맞물리게 되었음.
- 때문에 여러 수산 선진각국은 우량 수산물 종묘의 개발을 통한 기술의 종속화 및 국제 수산물 시장에서의 배타적 권리 행사를 위해 노력하고 있으며, 우량 신품종 개발 연구에 방대한 연구개발비를 투입하고 있음.
- 전복 또한 동아시아, 호주, 일본, 중국 등에서 육종신품종 및 관련 기술개발을 위한 연구가 추진 중이며, 우리나라도 전복품종에 대한 육종·개량 등에 관한 연구를 2004년부터 국가적 차원에서 수행하고 있음. 그러나 산업규모에 비해 연구개발비 투입정도는 매우 미미한 수준임.
- 이에 2013년부터 부처 간 협동 GSP 프로젝트의 일환으로 출범한 GSP 수산종자사업단은 전복을 GSP 품목 중 하나로 선정, 육종된 전복 신품종 개발을 추진하고 있으며, 이를 통해 수산분야에서 글로벌 전복 종자시장을 선점을 목표로 하고 있음.
- 그러나 개발기술이 집적된 최종 제품이 살아있는 생물인 종자산업의 경우 그 산업 특성상 종자의 수출과 함께 개발기술이 함께 유출될 가능성이 높으며, 이는 육종 품종을 수출 시 상대 수입국에서 종묘를 모패로 양성, 비승인형태의 기술복제와 재생산이 가능하기 때문임.
- 따라서 종자가 수출되더라도 단순한 생식교배 등을 통해 유사 계통이 쉽게 재생산되거나 이를 통한 육종 기술이 유출되는 것을 방지하기 위해서는 개량종자에 불임기능을 탑재함으로써, 종자의 생물학적 재생산을 방지할 수 있는 기술이 함께 구비되어야 함.
- 육종 개량 전복의 수출을 추진하기 위해서는 보다 고효율의 처리 방법의 개발, 대량 처리기술의 확보, 고효율의 배수체 종자 판독 방법, 그리고 불임화 유도에 따른 육종효과 및 생식 특성의 분석 등에 관한 기술개발이 필요하여 GSP 1단계 연구개발을 통해 고효율 처리 기법 등을 개발하였음.

- 따라서 1단계에서는 고효율 배수체 처리조건 등을 확립하기 위한 연구개발을 중심으로 하였으며, 2단계에서는 1단계 연구개발을 통해 확보된 고효율 배수체 유도 처리 조건들이 서로 다른 전북 종묘생산 지역(다른 산란 시기 및 수온 조건)에서도 효과적으로 현장 적용될 수 있도록 기술 개량과 최적화가 필요함
- 이에 본 프로젝트는 기 확립된 유도 조건을 기반으로, 서로 다른 수온 조건이 배수체 유도 효율에 미치는 영향을 조사하며, 이때 변동 요인으로 작용할 수 있는 최초 처리 시점(초기 배양 시간) 및 처리 시간 등 세부 기술 요인을 모의 현장 조건에서 최적화 하고자 함.

2. 육종 참전복 배수체 종자 대량생산 기술개발의 필요성

- 육종 참전복 배수체 종자를 개발하여 수출을 추진할 경우 수입국 요구 및 시장 선호도에 따라 육종형질, 종묘의 크기, 물량 등 다양한 제품 규격에 관한 요구가 예상되며, 안정적인 국내 수출용 종자 생산 체계를 유지하기 위해서는 불임종자의 특성을 고려하여 다양한 측면에서의 실용화 기반이 구축되어 있어야 함.
- 그러나 아직 우리나라는 전북 성패의 수출 경험이 풍부함에도 불구하고, 아직 종자를 수출한 사례는 거의 전무하기 때문에 상기 언급한 수출용 국내 기반을 구축하기 위한 연구 결과들이 확보되어야 함은 물론, 수출을 위해서 전북 치패를 대용량으로 안정적으로 해외에 수출할 수 있는 효율적인 수송방법이 함께 개발되어야 함.
- 따라서 국내 육종 참전복 배수체 종자 생산 기반을 안정적으로 구축되도록 유도하기 위해서는 육종 기술의 우위를 지속적으로 점유할 수 있는 선발가계의 지속 관리 및 생산, 불임화 유도용 어미의 관리시스템(수정란 대량생산 동기화 등) 구축, 배수체 처리의 현장 적용성을 위한 대량 간편 처리 기법의 개발, 현장 민간협력 체계에서 직접 활용 가능한 불임 종자 치패 생산 매뉴얼 및 사양 품질 관리 매뉴얼 등이 마련되어야 함.
- 따라서 2단계 연구에서는 배수체 육종 참전복을 세계일류 상품으로 수출할 수 있는 체계적인 수출 마케팅 및 산업화 전략 수립이 필요하며, 이는 궁극적으로 수출 지향적 전문 신품종 종묘회사들의 발굴·개발되어 글로벌 시장을 선도할 수 있는 능력을 갖추 수 있도록 국내 기반의 구축이 중요함.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표

- 최종목표: 2021년까지 수출액 1,000만 달러 달성
- 연구목표
 - 배수체 기술이 탑재된 육종 종자의 생산 및 사양관리 최적화와 표준화
 - 배수체 종자의 대량 생산과 공급으로 국내외 산업화
 - 배수체 참전복 생산 기술을 개량함으로써 보다 효과적인 실용화를 추진함
 - 배수체 참전복의 특성을 연구, 조사함으로써 산업화 제품의 성능을 평가함

2. 연구개발 내용

【제1세부】

- 배수체 육종 참전복 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매
 - 배수체 육종 참전복 계통 생산 및 관리
 - 배수체 종자의 최적 생산(밀도, 사료 급여, 선별 등 사육 조건) 기술개발 및 표준매뉴얼 제작
 - 국내외 판매전략 수립 및 판매망(유통 채널) 확보
 - 국내외 시장 확대를 통한 육종 배수체 종자 판매

【제2세부】

- 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사
 - 배수체 (3배체) 유도 기술 및 현장 적용성 개선
 - 배수체 (3배체 및 4배체) 기술개발 및 표준 프로토콜 제작
 - 배수체 종자의 생리.생태학적 특성 조사
 - 배수체 종자의 유전학적 특성 조사

3. 연구 성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	품종개발		특허		논문		분자 마커	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전	마케팅 전략 수립 보고서	인력 양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
최종목표	2		4	4	3	4		2			1,000	1		20
최종실적	목표	2		4	4	3	4		2	-	1,000	1		20
	실적	6		3	3	4	6		8	546,788	20.6	2		23
달성율(%)	300		75	75	133	150		400		-	2.1	200		115

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연차별 연구목표 및 수행 내용

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	연구개발 수행 내용
1차 년도 (2017)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	배수체 육종 참전복 대량생산 기반구축	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 육종 참전복 생산을 위한 산업화용 어미성숙관리 ▪ 배수체 육종 참전복 종자의 대량시험 생산 ▪ 배수체 종자생산을 위한 표준매뉴얼 제작(1)
		수출 및 산업화 기반구축	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 국내외 판매전략 수립 및 판매망 확보
		민간협력체제 구축	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 참전복의 현장적응력 평가
	【제2세부】 배수체 생산기술 개량연구 및 특성조사	배수체 생산기술 개량: 3배체 유도 기술의 현장 적용 조건 조사	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 수온 요인을 고려한 최초 처리 온도 및 처리 시점 최적화 ▪ 현장 맞춤형 간편화 대량 처리 세부 조건의 평가 및 개선 ▪ 배수체 전복 유도 대량처리(현장 시험) 및 효율 검정
		배수체 생산기술 개량: 4배체 유도 가능성 및 기반 조건 조사	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 관련 시험을 위한 공통 기반 사항 마련 및 정립 ▪ 세포 분열 억제 기반 조건 조사 및 기술 평가 ▪ 기반 기술 조건의 개선 및 4배체 유도 가능성 조사
2차 년도 (2018)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	배수체 육종 참전복 대량생산	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 일반집단 및 육종가계 모패 선발관리 ▪ 성숙 산란 환경 조절 ▪ 배수체 전복 대량생산 ▪ 배수체 전복 표준매뉴얼 제작
		수출 및 산업화 기반구축	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 국내외 판매전략 수립 및 판매망 확보 지속
		민간협력체제 구축	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 참전복의 현장적응력 평가 지속 ▪ 참여민간업체 선정 및 협의체 구성
	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	3배체 유도 기술의 현장 적용 조건 정립	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체(3배체) 유도를 위한 대량 처리 조건의 적용, 재현성 평가 및 최적화 ▪ 배수체 유도 효율의 재검증 ▪ 배수체 유도 수율의 재검증
		4배체 유도 및 초기 특징조사	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 다양한 처리 조건들의 탐색 및 4배체 유도 가능 조건의 확보 ▪ 4배체 유도 조건의 개선 ▪ 4배체 처리군의 초기 생존 특성(부화, 유생 생존, 유생 정상성) 평가

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	연구개발 수행 내용
3차 년도 (2019)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	대량생산체제 구축	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 생산용 육종 어미 생산 및 관리
		민간협력 체제 구축	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 참여기업 주도의 배수체 전복 대량생산 ▪ 배수체 종자의 품질관리 및 안전성 검증 ▪ 배수체 전복의 관리 기술 지원
		수출 및 산업화 기반구축	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 국내외 판매망 확보 및 수출 - 중국 판매망 확보를 위한 현지 양식환경 조사와 전복 가격 동향 분석 - 마케팅 전략 수립(SWOT 분석) - 국내 판매망 확보
	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	배수체 종자의 특성 조사 (1): 배수체 참전복의 유전학적 특징조사	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 참전복의 세포유전학적 검증 - 배수체(3배체)의 염색체조 (chromosome set) 구성 조사 및 검증 - 배수체(3배체)의 세포, 핵 크기, 인 형성 부위 (nucleolar organizer region) 평가 및 검증 - 배수체(3배체) DNA 함량 검증 ▪ 배수체(3배체) 참전복의 분자유전학적 특성 검증 - 발현 전사체 DB 구축 및 체계화 - 배수체 전복의 생물발달(성장) 단계별(발생, 치패, 미성숙, 성숙연령) 발현 전사체 특징평가 (비자극 조건에서 이배체와의 동등 및 차등발현 유전자 평가) - 분자발현 마커를 이용한 배수체 수컷의 생식 기구 분석 및 검증
		배수체 종자의 특성 조사 (1): 배수체 참전복 기술의 표준 프로토콜 제작	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 참전복 유도 표준 프로토콜 제작 - 유도 원리 및 고려 사항 - 시약, 재료 기구, - 3배체 대량 처리 프로토콜 - 3배체 판정 프로토콜 - 문제해결 가이드 - 안전 취급 사항 - 4배체 유도 프로토콜

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	연구개발 수행 내용
4차 년도 (2020)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	대량생산 기반구축	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체생산용 모패 성숙관리 - 자동수온 조절장치를 이용하여 조기성숙유도 - 4차년도 생산목표량 생산 ▪ 지속적인 대량생산용 육종참전복 사육관리 - 지속적인 생산을 위한 모패 생산 및 확보
		민간협력 체제유지	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 전복 대량생산 - 참여기업 추가 확보를 통한 생산량 확대 - 참여기업 주도의 배수체 전복 대량생산 ▪ 배수체 전복 현장 모니터링 - 배수체 전복 성장 형질 측정 - 배수체 전복 관리기술 지원 ▪ 지속적인 배수체 종자의 품질관리 및 안전성 검증
		배수체 종자 중국 수출 및 국내 산업화	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 중국 판매망 확보 - 중국 수출을 위한 판매 전략 수립 - 종자 수출을 위한 현지 유통망 확보 및 활용 ▪ 국내 판매망 확보 - 배수체 종자 우수성 홍보 - 국내 배수체 종자 판매
	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	배수체-이배체 비교 평가용 생식소 발현 마커 발굴	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 발현 마커 유전자 서열 및 기초 발현 특징 조사 - 수컷 생식소 발현 마커 확보 - 암컷 생식소 발현 마커 확보 - 기초발현 특징(조직 발현 집중도 등) - 생물정보학분석 및 서열 분석 ▪ 조직학적 특징 조사 - 2년산 배수체 암수 생식소 특징 - 4년산 배수체 암수 생식소 특징 ▪ 유전자 발현 정량분석 조건 개선 - 개선 프로토콜 정립 - Yield, 순도, 오염도 평가 - 유전자발현 평가 개선 유효성 - 재현성, 활용성, 확장성 평가 ▪ 배수체-이배체간 차등 발현 평가 - 수컷 생식소 차등 발현(2N-3N) - 암컷 생식소 차등 발현(2N-3N)
		배수체 외부 형질 및 체조성 특징	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 형태(계측, 계수) 형질에 대한 배수체-이배체간 비교 평가 - 형질평가 기준 마련 - 성장단계별 지표값 비교 - 배수체 특징적 계측형태 요인 파악 ▪ 배수체-이배체간 체조성 평가 - 시료 확보 및 특성 평가(비만도, 중량, 체형 특성) - 체조성에 영향요인, 변동요인, 분석 세부전략 수립(현재 및 평가 진행 중)

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	연구개발 수행 내용
4차 년도 (2020)	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	환경 조건에 대한 배수체 발현 반응 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 고수온 처리에 대한 배수체-이배체의 발현 반응 조사 - 분석 기반 및 세부조건 수립 - NGS기반 차등 발현 전사체 평가 - 핵심 마커 기반 차등 발현 패턴 평가 ▪ 저산소 처리에 대한 배수체-이배체의 발현 반응 조사 - 분석 기반 및 세부조건 수립 - NGS기반 차등 발현 전사체 평가 - 핵심 마커 기반 차등 발현 패턴 평가 ▪ 현장 적응 배수체 시험군들 간 발현반응 특성 조사 - 민간분양 배수체 종자 및 대조군 시료 확보 - 차등발현 분석 대상 유전자 확보 (면역 및 대사) 및 분석조건 확립 - 이배체 및 3배체 간 차등 발현 분석
		배수체 매뉴얼 업데이트	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 매뉴얼 업데이트 - 목차 재구성(유도, 판정, 생식소 평가 부분: 5개 chapter, 3개 부록 및 1개 부속 매뉴얼: 총 40면) - 신규 내용 추가(배수체의 생식소 외형 발달 및 조직학적 분석, 암수별) - 기타 매뉴얼 포맷 및 세부 내용 수정
5차 년도 (2021)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	시장개척 및 수출	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 시장개척 및 수출 - 상품가치 향상을 위한 안전성 검정 체계구축 - 배수체 전복 생산 및 사양관리 매뉴얼 개발 - 배수체 식별용 마커 개발 및 활용 - 지속적 수출 활성화를 위한 후속 전략 수립
		배수체 전복의 생식 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체(3N) 전복의 불임·부분성숙 기전 및 작동원리 분석 - 성숙 및 생식 관련 molecular pathway 내 관련 유전자들 발현의 상관관계 분석 ▪ 배수체 전복의 생식 가능성 평가 - 인공 산란 방정 가능성 조사 - 배수체 생성 배우자의 특징 조사 - 배수체의 자손 생성 가능성 조사(배우자의 수정능력 및 수정란의 발생 능력)

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	연구개발 수행 내용
5차 년도 (2021)	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	<p>민간 현장 보급 배수체 전복의 형질 특성 조사(지속)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 민간 현장 사육·생산된 배수체 전복의 형질 특성 평가 - 종자 및 최소 상품크기 도달 전복을 대상 ※4차년의 경우 치패에 대해서 평가하였으므로 종자 및 상품크기 도달 전복에 대한 분석을 5차년에 실시 - 외부형질 특성(계측형질 및 관련 특징) - 유전학적·생리학적 특성(핵심 마커 유전자들의 발현 profile - 대사, 면역, 성숙관련 발현 특징을 이배체 동일 현장 시료와 비교 평가)
		<p>배수체 최종 매뉴얼 업데이트</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 전복 생산 및 평가를 위한 표준 지침서 형태로 업데이트 ※제1세부프로젝트와 공동 제작 추진 - 배수체 전복 유도 - 배수체 전복 판정 및 분석 - 배수체 전복의 대표적 형질 특성 - 배수체 전복의 사육 및 생산 관리

제 2 절 연구수행 결과

1. 제1세부프로젝트 연구수행 결과

1-1. 배수체 육종 참전복 대량생산 기반구축

가. 배수체 육종 참전복 생산을 위한 산업화용 모패확보 및 성숙관리

(1) 배수체 생산용 모패 확보

○ 배수체 육종 참전복 생산용 모패는 제1세부프로젝트에서 국내 참전복을 대상으로 개발한 속성장 육종 참전복으로서 유전자표지를 이용하여 육종집단의 유전적 다양성 및 친자확인 기술을 거쳐 속성장 형질을 가진 가계 및 개체를 4세대에 걸쳐 선발한 육종 품종임.

○ 배수체 대량생산용 모패는 제1세부프로젝트에서 보유한 속성장 육종 참전복 핵집단에서 생산한 산업화 3가계(A그룹, B그룹, C그룹)로 현장 대량생산을 위해서 온도제어를 통한 성숙 조절을 실시하여 생산에 사용하였음[그림 1-1-1].

(2) 모패성숙 및 산란 환경조절

○ 경남 거제의 (구)육종연구센터에서 자연수온(9.0-11.5°C)으로 사육 중이던 모패를 1월에 전남 해남의 (구)육종전복보급센터로 옮겨 수온조절시스템(아쿠아트론)을 이용하여 사육수온을 15±0.5°C로 유지하여 적산 수온의 조기 획득을 유도하였고, 이때 먹이는 완도 지역에서 구입한 생미역을 ad libitum basis로 충분한 양을 공급하였으며, 매주 2회 사육 수조 및 가두리 청소를 수행하였고 폐사 개체를 제거하였음.

○ 배수체 육종 참전복의 생산을 위하여 적산 수온 조절에 의한 암·수 모패는 모두 충분히 성숙한 생식소를 보유하고 있었으며, 암컷은 진한 녹색의 난소를 그리고 수컷은 진한 유백색의 정소를 잘 나타내었음[그림 1-1-2].

(3) 지속적인 모패확보를 위한 가계 생산

(가) 모패그룹 선발

○ 지속적인 프로젝트 진행을 위해 2단계 4, 5차년도 사업에 이용할 참전복 모패를 확보하기 위해 가계를 생산하였음.

○ 가계를 생산하기 위한 교배지침은 속성장 육종 참전복 4세대 핵집단의 최종 각장의 육종가를 기준으로 각 가계당 최상위 개체들을 모패후보로 선발하고 근친교배를 회피할 수 있는 유전적 다양성 및 유전적 유연관계 등을 고려하여 자체 개발한 양식생물 교배지침 작성 시스템을 통하여 교배지침을 작성하였음.

(나) 모패용 가계 생산

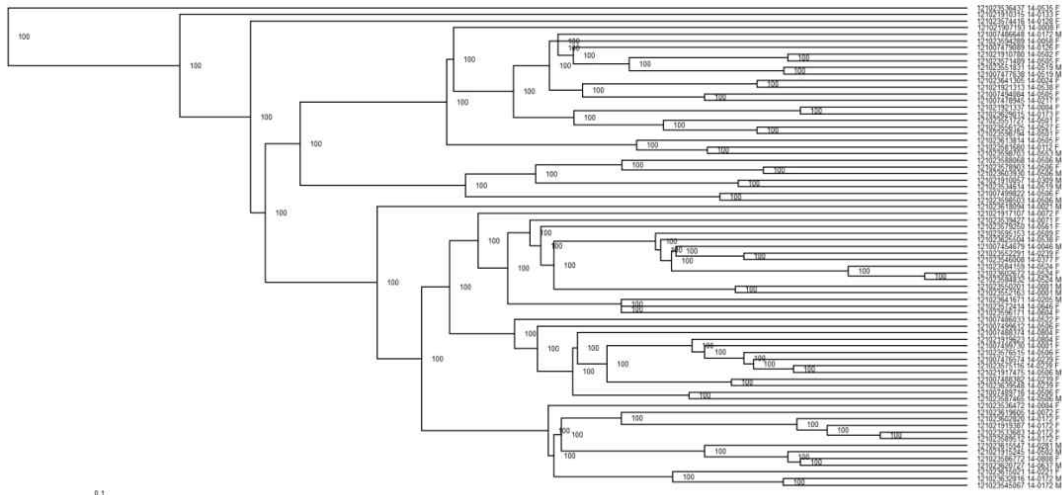
- 각 개체의 유전능력평가 및 유전적 유연거리를 토대로 하여 최종 교배지침을 작성하였으며 교배지침에 의거 암·수 각 2그룹 간의 교차교배(모패그룹 암컷 A: 25마리 X 수컷 B: 6마리, 암컷 B: 26마리 X 수컷 A: 16마리)를 통하여 모패용 가계를 생산하였음[그림 1-1-3].
- 선발된 모패는 인공산란 유발을 위해서 그늘진 곳에서 1시간 30분간 간출 자극을 주고 자외선 조사해수가 담긴 채란통에 수용하여 1시간마다 자외선 조사해수를 교체하고 방란, 방정 여부를 확인하였음.
- 교배지침에 따라 수정되어 부화한 유생은 가계별로 분리하여 부화유생을 관리하고 규조를 배양한 파판에 채묘하여 관리하였음.
- 교배지침에 따라 생산한 산업화 2가계의 18개월째 성장은 산업화A 가계 평균 각장 59.94 ± 2.62 mm, 평균 각폭 40.26 ± 1.51 mm, 평균 중량이 22.88 ± 2.99 g이며 (약 2,500마리), 산업화B 가계의 평균 각장은 62.32 ± 2.05 mm, 평균 각폭 41.86 ± 0.41 mm, 평균 중량은 25.25 ± 2.45 g으로 약 2,000마리로 모두 양호한 성장을 나타내었음[그림 1-1-4].
- 매년 우수한 가계 및 개체를 선발하여 배수체 생산을 위한 산업화 모패를 확보하고 있음[그림 1-1-5].

<p>속성장 육종 참전복개발 현황</p>	<p>산업화가계(A그룹)</p>
<p>산업화가계(B그룹)</p>	<p>산업화가계(C그룹)</p>
<p>자동 수온조절 시스템(아쿠아트론)</p>	<p>모패 사육관리동</p>

[그림 1-1-1]
대량생산용 참전복 모패 확보 및 관리

<p>육종전복 계통 선발</p>	<p>수온조절시스템(아쿠아트론)</p>
<p>조기 성숙 유도 암컷</p>	<p>조기 성숙 유도 수컷</p>

[그림 1-1-2]
 배수체 생산을 위한 산업화용 모패성숙관리









0 1

[그림 1-1-3]
교배지침 작성을 위한 모패 후보의 유전적 유연관계분석



[그림 1-1-4]
산업화 가계 성장형질 모니터링

<p>모패 간출 작업</p>	<p>개별 자외선조사 해수 자극</p>
	
<p>수정</p>	<p>유생사육</p>
	
<p>채묘</p>	<p>산업화 가계 치패</p>
	

[그림 1-1-5]

배수제 전복 생산을 위한 산업화 가계 생산 및 관리

나. 육종 참전복 배수체 종자의 대량생산을 위한 조건 검토

(1) 대량생산을 위한 조건 검토

- 대량처리를 위해서는 과도한 용량의 CF(Caffeine, 카페인) 용액이 필요하여 현장 적용이 어렵기 때문에 단위 농도당 처리할 수 있는 수정란의 개수를 확인하였고 2회에 걸쳐 각 200만 개 내외의 수정란을 4가지 조건(CF 10 mM-20 min, 8 mM-18 min, 8 mM-18 min, 6 mM-16 min)으로 대량처리 실험을 실시하여 배수체 유도율을 검토한 결과 모든 조건에서 유도율이 높게 나타남을 확인하였음.
- 실제 현장에서는 한 번의 산란으로 약 1억 마리 이상의 수정란을 생산하는데, 1단계에서 개발한 대량처리 방법으로는 배수체 처리를 위한 시간적인 어려움이 있음.
- 배수체 육종 참전복 종자 산업화를 위해서는 1회에 수천만 개의 수정란을 즉석에서 바로 배수체를 유도할 수 있는 간편화된 배수체 처리장치와 그 조건이 필요함.

(2) 배수화 대량처리 장치개발 및 처리조건 검토

- 수정란 수용 용기는 CF 용액 처리 시 다량의 수정란을 효과적으로 처리할 수 있도록 이동이 용이한 플라스틱 용기에 75 um 밀러가제를 사방으로 부착하여 CF 용액 처리과정과 세척과정에서 수정란의 유실을 최소화하되 용액과 해수는 자유롭게 통과가 되도록 고안하였음[그림 1-1-6].
- CF 용액 처리 용기는 모든 수정란에 동일한 자극이 가해지도록 내부에 33 W 수중펌프를 설치하여 지속적으로 용액이 순환하도록 하였고, 가열기와 자동온도 조절기를 설치하여 처리 기간 중 일정한 온도를 유지하였음.
- 잔존 CF에 의한 기형 유생의 발생을 막기 위해 외부의 깨끗한 해수를 43 W 수중펌프를 사용하여 세척용기 하부로 지속적으로 공급하여 여분의 CF가 효과적으로 씻겨나가도록 수정란 전용 세척용기를 개발하였음[그림 1-1-7].
- 처리 조건은 1단계에서 정립한 최적조건에 다량의 수정란 처리 시 유입되는 해수를 고려하여 CF의 농도를 0.5 mM 증가시킨 6.5 mM 농도로 사용하였고, 처리시간은 동일하게 수정 후 12분부터 16분간 처리하도록 계획하였음.
- 또한 현장 적용 시 처리 비용을 최소화 할 수 있도록 CF용액의 재사용 가능 여부를 확인하기 위하여 1차로 사용을 마친 CF 용액에 동일한 개수(1000만 개)의 수정란을 다시 처리하여 배수체 유도 효율을 확인하였음.

(3) 배수화 대량처리 장치를 이용한 배수체 유도율 검토

- 제1세부프로젝트 기관에서 유지하고 있는 모패를 사용하여 간출과 자외선 조사 해수자극을 통해 인공산란 유도를 하였고, 수컷 10마리와 암컷 23마리를 사용하여 총 2,000만개의 수정란을 생산하여 실험에 사용함.
- CF 용액 재사용 가능 여부를 확인하기 위해 수정을 2차에 걸쳐 실시해야 하기 때문에 2차 수정용 정자는 비커에 담아서 냉장보관하여 정자의 활성도가 떨어지지 않도록 유지하였음.
- 산업화용으로 개발한 대량처리 장치를 이용하여 수정란의 수거, 세란, CF 처리 및 세척에 사용하였고 처리를 마친 수정란 중 약 30만 개를 깨끗한 해수 10 L 가 담긴 부화조에 넣어 실온에서 부화시켰음.
- 1차 처리에 사용한 기구는 CF 용액이 담긴 처리용기를 제외하고 모두 세척하여 2차 처리에 다시 사용하였고 처리 방법은 1차 처리와 동일하게 실시하였음[그림 1-1-7].
- 배수체의 유도 여부는 부화유생으로 유세포 분석을 통하여 확인하였고 무처리 대조군과 비교하여 첫 번째 대량처리와 두 번째 CF 용액을 재사용한 대량처리의 모든 실험구에서도 높은 배수체 유도율이 확인되었음. 1차 처리에서는 99%, 2차는 95% 배수체가 유도되었음을 확인하였음[그림 1-1-8].

(4) 산업화용 용기를 사용한 배수체 유도

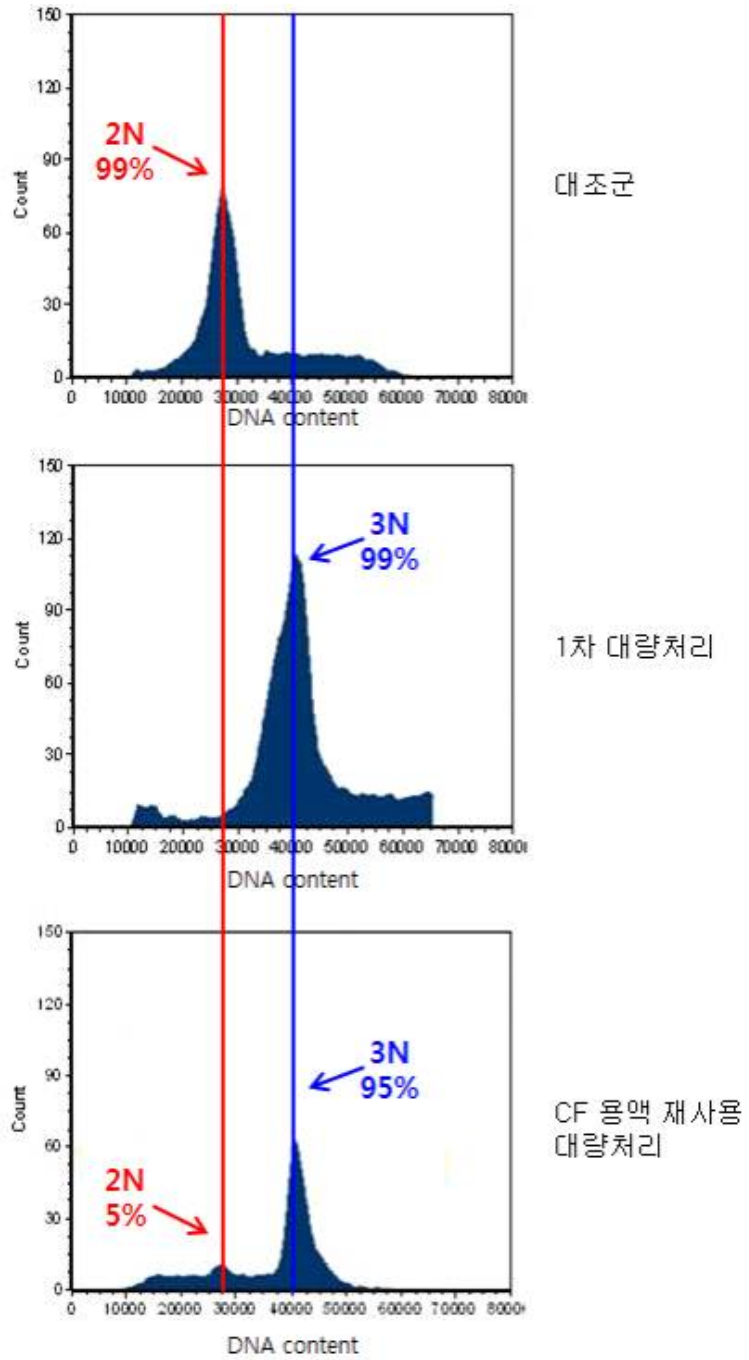
- 산업화용으로 제작한 전용 용기를 사용하여 1,000만 개의 수정란 처리에 성공하였으나 산업화를 위해서는 처리 용기의 대형화가 필요하여, 두 배 이상의 수정란을 수용할 수 있는 용기를 제작함.
- 기존의 산업화 용기와 비교하여 용도는 동일하며 용기의 크기를 35 L에서 75 L로 늘리고 세척용 수중펌프를 120 W 고출력 펌프로 교체하였음.
- 배수체 유도에 사용한 모패는 제1세부프로젝트 기관에서 유지하고 있는 수컷 24마리와 암컷 35마리를 사용하여 간출과 자외선 조사해수 자극을 통해 인공산란 유도를 하였고, 총 2,000만개의 수정란을 생산하였음.
- 배수체 유도는 모든 수정란을 사용하여 지난 대량처리 과정과 동일하게 진행하였고 CF 세척을 마친 수정란은 깨끗한 해수와 함께 부화조에 넣어 미리 준비한 사육 수조에 띄워서 부화시킴[그림 1-1-9].
- 배수체의 유도 여부는 부화유생으로 유세포 분석을 통하여 확인하였고 무처리 대조군과 비교하여 99%의 배수체 유도율을 보였음[그림 1-1-10].



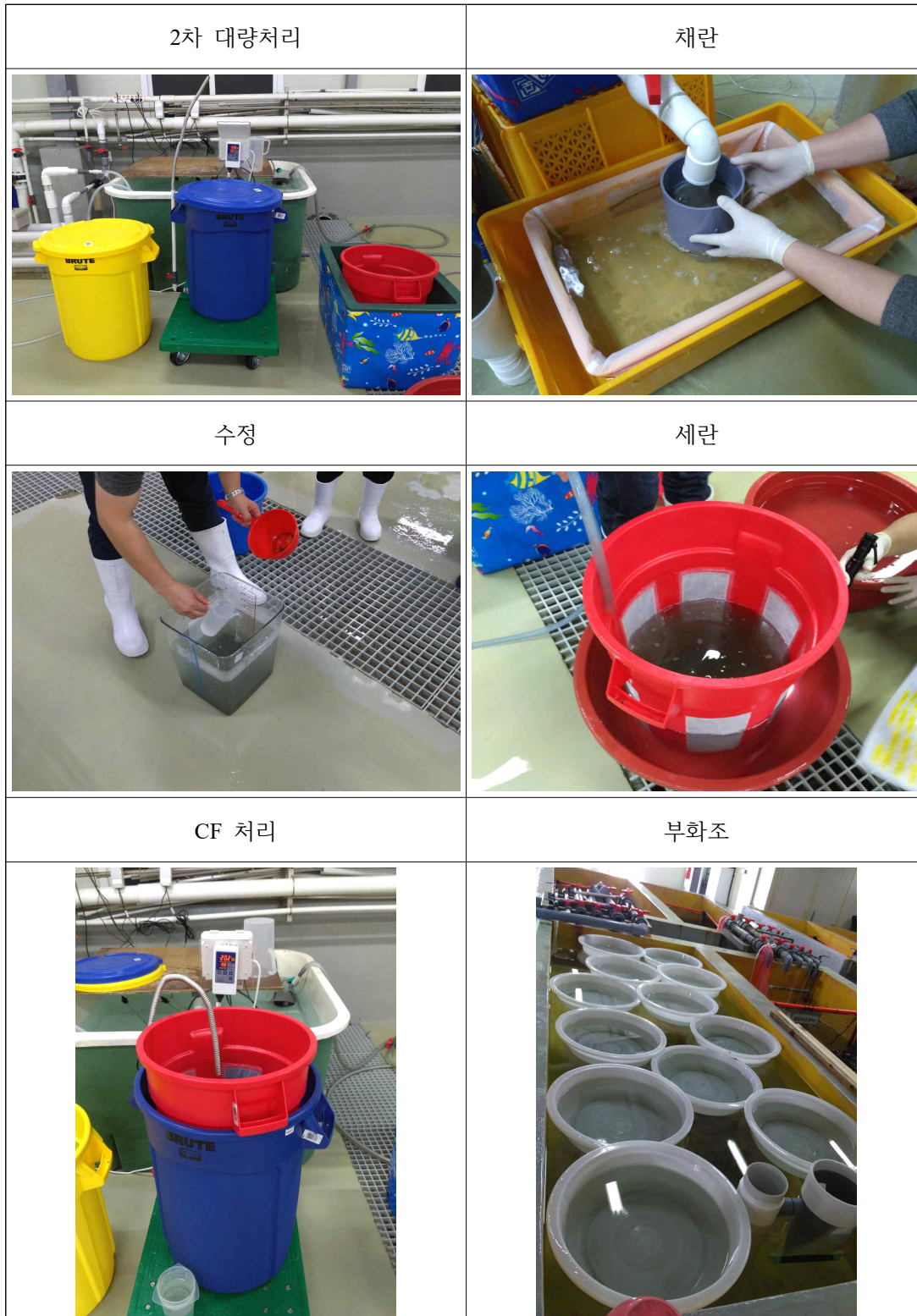
[그림 1-1-6]
배수체 대량처리용 기구

<p>간출자극</p>	<p>처리 용기로 이동</p>
	
<p>세란</p>	<p>CF 처리과정</p>
	
<p>CF 세척과정</p>	<p>부화 유생</p>
	

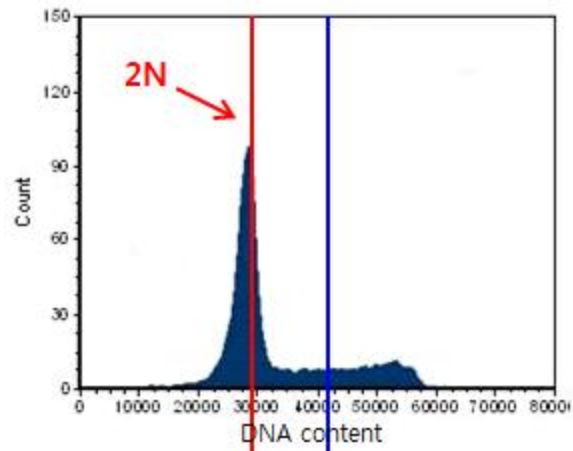
[그림 1-1-7]
배수체 대량처리 과정



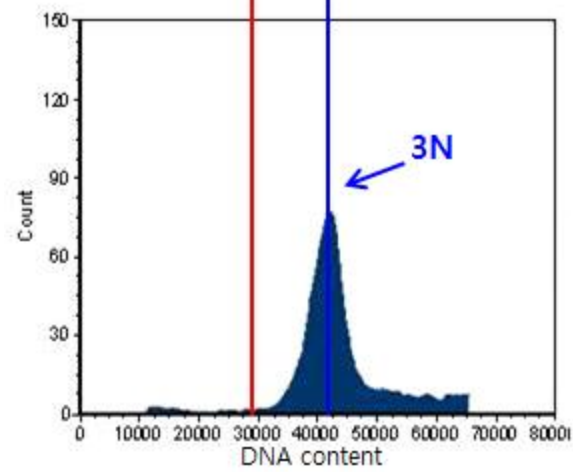
[그림 1-1-8]
대량처리 배수체 유도 효율



[그림 1-1-9]
 산업화용 용기를 사용한 배수체 대량처리



대조군



실험군

[그림 1-1-10]

산업화용 용기를 사용하여 대량처리한 배수체의 유도 효율

다. 배수체 육종 참전복 대량생산

(1) 배수체 생산용 육종 참전복 모패

- 제1세부프로젝트 기관에서 선발육종을 통해 생산한 속성장 육종 참전복 산업화가계로 전년도 12월부터 수온조절시스템으로 사육수를 가온하여 조기 성 성숙시키고 간출 및 자외선 조사 해수 자극을 통해 방란·방정을 유도하였음.
- 참여업체에 부착기 유생을 보급하기 위해 1차 대량생산에 사용한 모패는 육종 참전복 산업화가계 모패그룹 A의 암컷(41마리)과 B의 수컷(7마리), B의 암컷(21마리)과 A의 수컷(15마리)을 교차로 교배하여 생산하였음.
- 2차 대량생산에 사용한 모패는 육종 참전복 산업화가계 모패그룹 A의 암컷(100마리)과 B의 수컷(11마리), B의 암컷(100마리)과 A의 수컷(11마리)을 교차교배하여 생산하였음[그림 1-1-11].

(2) 배수체 대량처리

- 사전에 준비해 놓은 고농도 CF 용액(42 mM)은 깨끗한 여과 해수에 희석하여 7 mM 농도로 90 L 준비하고 용액 순환을 위한 수중펌프와 처리가 끝날 때까지 20°C 항온을 위한 자동온도 조절기를 설치하였음.
- 수정 후 2분간 세란한 수정란은 CF 처리까지 난할 시간을 조절하기 위해 20°C 항온을 유지하고, 수정 12분 후에 준비한 CF 용액에 수정란을 침지시켜 자극을 시작하여 16분간 처리 후 세척용 100 L 수조로 신속하게 옮겨 처리를 마치고 신선한 해수를 10분 이상 공급하여 잔여 CF 용액을 완전히 세척하였음[그림 1-1-12].

(3) 유생 부화 및 사육

- 일정한 온도의 해수를 공급하여 외부 기온에 영향을 받지 않는 18°C 항온수조에 플라스틱 용기를 준비하고 세척을 마친 배수체 처리 수정란이 바닥에 겹쳐지지 않도록 분주하여 수용하였음.
- 부화가 시작되고 3시간 후 부화용기의 상층부에서 유영하는 유생을 항온수조에 사육하고 주기적으로 수조 표면의 유막을 제거하였음.
- 18-20°C로 유생수조 온도를 유지하였고 3일째에 바닥에 가라앉은 유생은 에어호스로 제거하였으며 채묘기 적산수온인 1030°C에 도달하였을 때 유생을 수거하였음[그림 1-1-13].

(4) 부착기 유생 분양

- 참여업체 2곳에 부착기 유생 상태로 분양하기 위해 산란 유발과 수정, 배수체 처리는 전남 해남 소재의 (구)육종전복보급센터에서 실시하여 부화 유생을 부착기까지 사육한 뒤 참여업체에 각각 약 1억 마리씩을 분양하였음. `18년에는 2개

의 참여업체에, `19년에는 3개소, `20년에는 4개소, `21년에는 3개소에 분양하여 본 사업기간동안 총 10억 마리의 유생을 분양하였고, 분양한 유생은 참여업체에서 준비한 구조류가 배양된 유생사육 수조에 수용하였음.



- 유생 분양 후 판매 가능한 크기로 성장하기까지는 참여업체에서 수행해 온 방식과 동일하게 사육하여 현장 사육 조건이 배수체 종자 생산에 적합한지 확인하였음 [그림 1-1-13].

<p>모패 간출 자극</p>	<p>자외선 조사 해수 자극</p>
	
<p>암컷 방정 확인</p>	<p>수컷 방정 확인</p>
	
<p>난 수거</p>	<p>불량난 제거</p>
	

[그림 1-1-11]
 배수체 대량처리를 위한 모패의 인공산란 유도

<p>고농도 CF 용액</p>	<p>CF 처리 용기</p>
	
<p>수정란의 CF 자극</p>	<p>배수체 유도 후 세척</p>
	
<p>부화용 항온 수조</p>	<p>배수체 유도 수정란 분주</p>
	

[그림 1-1-12]
배수체 대량 처리과정

부화조 내 부화유생	정상 발생중인 유생
	
부착기 유생 수거	수거용기 내 유생
	
부착기 유생 분양	채묘
	

[그림 1-1-13]
배수체 육종 참전복 유생 사육 및 수거

라. 육종 참전복 배수체 종자생산 및 사양관리를 위한 표준 매뉴얼 제작

- 전복을 대상으로 한 3배체 유도 방법에 관한 실험자료들이 일부 학계에 보고된 바 있으나, 각 연구 보고마다 그 처리 방법과 효과(유도율 및 수율 등)가 크게 다르고 또한 실제 종자생산 현장에서 바로 적용하여 사용하기 위해서는 처리 방법의 완성도와 처리 효과의 재현성이 온전히 확보되어 있지 못한 실정임.
- 따라서 본 프로토콜은 그간의 GSP 전복 품목의 연구개발 자료를 토대로 3배체 전복을 고효율·고수율로 유도할 수 있는 매뉴얼을 제공함으로써 배수체 전복을 생산 시험연구 하고자 하는 연구단체, 보급기관 및 민간 기업에 도움을 주기 위하여 제작하였음[그림 1-1-15].

(1) 육종 참전복 배수체 종자생산 개요

- 육종 참전복 배수체 종자생산을 위한 모패 선발 및 관리

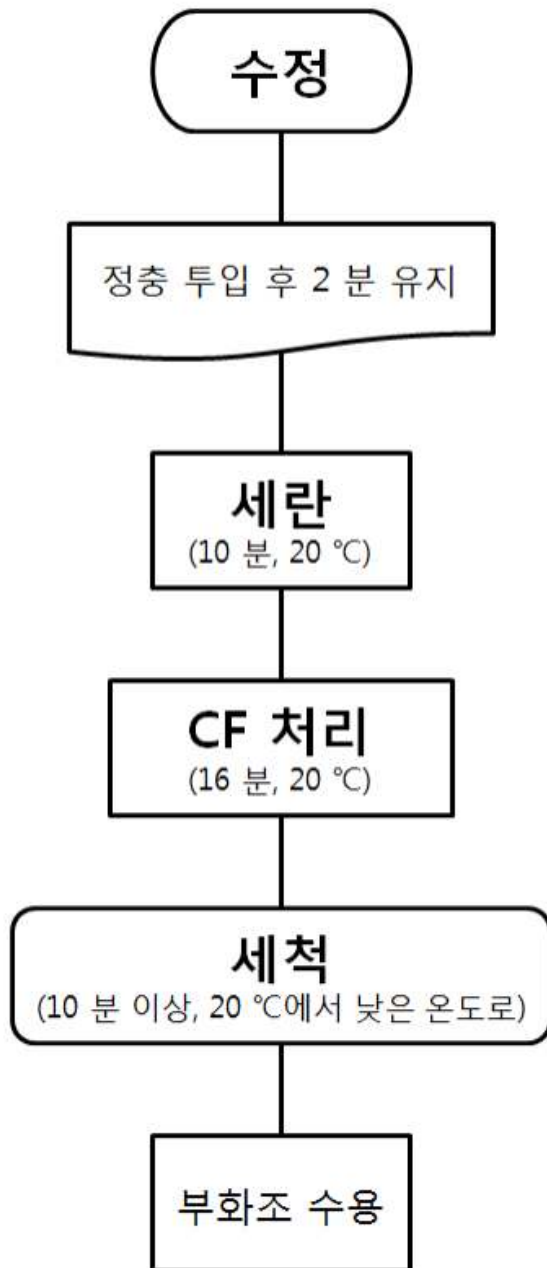
<p>사육수조</p>	 <p>(A): 5톤 사각수조, (B): 주수구, (C): 모패용 육상 가두리, (D): 모패용 쉘터, (E): 에어배관, (F): 배수구</p>
<p>성 속 도</p>	 <p>(A): 암컷, (B): 수컷</p>
<p>크 기</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 각장 10cm 이상의 모패를 사용 ▶ 각장이 작더라도 연체부(가식부)가 비대한 개체를 선발
<p>개 체 수</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 암컷 : 방란수를 고려하여 목표하였던 모패의 배수를 준비 ▶ 수컷 : 암컷 모패개수의 반수를 준비
<p>조 도</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 수조 저면의 조도가 150 lux가 되게 유지 - 조명시간 : 암기가 13:00~1:00, 명기가 1:00~13:00
<p>수 온</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 실용적으로 채란이 가능한 적산수온이 1,300℃~2,000℃ 이므로 4월에 채란을 목표로 하면 1월부터 가온을 하여 늦어도 2월부터는 18~20℃의 수온을 유지 ※ 생산 지역 수온에 따라 조절 필요

○ 배수체 육종 참전복 생산을 위한 수정

<p>산란유발</p>	<p>▶ 실내간출 : 30°C에 1시간 ▶ 야외간출 : 통풍이 잘되는 장소에서 1시간 30분 ▶ 자외선 조사해수 : 300-500ml/분의 유량으로 담아둔 자외선 조사해수 사용</p>												
<p>수 정</p>	<p>▶ 암조건의 자외선 조사해수에 수용한 암컷과 수컷은 1-2시간 간격으로 불순물 제거를 위해 물갈이를 해준다. 그리고 산란을 하게 되면 난은 수거하여 채란을 하여 두고 정자는 방정한지 1-2시간 이내에 수정을 시켜야 활성도가 떨어지지 않고 수정율을 높일 수 있다. 수정을 한 후 2-3번의 세란작업을 하여 미수정란 또는 남아있는 정자를 제거하는 작업을 한다.</p>												
<p>배수화 처리</p>	<p>▶ 수정 후 20°C에서 카페인(CF)을 10 mM 이상 처리하고, CF를 완전히 제거하기 위하여 5회 이상 해수로 세척 후 부화용기에 수용한다 [그림 1-1-14].</p>												
<p>부 화</p>	<p>▶ 수정 후 20°C에서 12시간에서 14시간이면 부화를 하기 시작한다. 부화율이 70% 이상 나올 때까지 4-5시간 정도 대기한 후 유생사육 수조에 부화해서 유영하는 개체들만 수용한다.</p>												
<p>유생사육</p>	<p>▶ 부유유생은 부화 후 20°C에서 적산수온이 400°C(시간)에 이르기 전까지는 유각형성이 되지 않아 연체부에 상처가 날 수 있으므로 밀도 등을 적절히 조절한다. ▶ 유생사육수조 관리조건</p> <table border="1" data-bbox="587 1234 1241 1485"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>유수사육</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>유효해수용적</td> <td>1톤 수조</td> </tr> <tr> <td>수용유생수</td> <td>1,500만-1600만</td> </tr> <tr> <td>급수량(환수량)</td> <td>2000ml/min(40회전/일)</td> </tr> <tr> <td>환수개시시간</td> <td>부화직후</td> </tr> <tr> <td>수온</td> <td>15-20°C</td> </tr> </tbody> </table>	항목	유수사육	유효해수용적	1톤 수조	수용유생수	1,500만-1600만	급수량(환수량)	2000ml/min(40회전/일)	환수개시시간	부화직후	수온	15-20°C
항목	유수사육												
유효해수용적	1톤 수조												
수용유생수	1,500만-1600만												
급수량(환수량)	2000ml/min(40회전/일)												
환수개시시간	부화직후												
수온	15-20°C												
<p>채 묘</p>	<p>▶ 참전복의 경우 부화 후 20°C에서 약 3일(적산수온 1,000°C)이 되면 부착기에 접어들어 채묘를 한다. 채묘 시 먹이는 부착규조류이며 천연해수에 풍부하게 포함되어 있으므로 종자생산을 시작하기 1-2달 전에 부착용 파판을 부착기 유생수조에 설치하여 파판에 부착규조류가 골고루 잘 부착될 수 있도록 관리해준다. 부착규조류가 파판에 잘 부착되어 유생을 수용할 준비가 되면 부유유생수조에서 유생을 이동한다. 유생을 이동할 시에는 요각 등이 파손되지 않게 주의하여 이동한다. 부유유생의 사육밀도는 저서초기 치패의 생존률과 관계가 크며 적정 밀도는 L당 100-200개체가 적당하다.</p>												

○ 배수체 육종 참전복 치패관리

<p>수조관리</p>	<p>▶ 채묘 직후에는 사육수조를 1-2일간 지수로 관리해야 하므로 비나 눈 등 외부의 영향이 없는 실내에 설치하는 것이 좋다. 또한 수조에 적정량의 조도가 없으면 부착규조류가 떨어지므로 천정은 빛이 투과하되 차광막(75%) 등으로 적절히 조절할 수 있는 장소가 적당할 것이다. 유생 사육수조의 급수량은 시간당 0.5회전(1m³/시간)이 적당하며 적절히 수조청소를 해주어 양질의 규조가 자랄 수 있도록 관리해 준다(펌프수압에 주의).</p>
<p>먹 이</p>	<p>▶ 채묘 후 유생이 호흡공이 형성되기 전까지는 부착규조류의 섭이량이 적지만 호흡공이 생기는 0.5 mm 이후 부터는 섭이량이 급격하게 증가한다. 그러므로 부착규조류가 떨어지지 않게 조도를 적절히 조절해 주면서 사육하며 2-5 mm 이상이 되면 소형해조류나 배합사료(시판되는 0-1호 사료)등을 투여하여 먹이가 떨어지지 않도록 유지한다. 또한 급수량도 2-3m³/시간으로 늘이고 산소공급도 충분히 해줄 수 있도록 한다.</p>
<p>선 별</p>	<p>▶ 채묘 후 100일이 경과하게 되면 치패는 각장 1 cm 전후로 크기차이가 눈에 보일정도로 성장한다. 그러므로 보다 효율적인 치패사육을 위해서 선별을 해주어 개체 수 보존과 빠른 성장을 할 수 있게 한다. 선별은 파판 장당 100마리 기준으로 개체 수를 맞춰주는 것이 치패의 성장에 유리하다.</p> <p>▶ 선별은 이른 봄이나 가을에 하는 것이 좋으나 봄에는 종자생산과 겹치므로 가을에 하는 것이 효율적이다. 여름과 겨울에는 수온의 영향으로 대량폐사가 일어날 가능성이 높으므로 피한다.</p>
<p>사육관리</p>	<p>▶ 선별 후에는 시판되는 2-3호 사료 및 건사료를 혼합하여 투여하며 사료잔여물이 쌓이지 않게 주 3회 수조 청소 등 사육관리에 주의해야 한다. 사료 잔여물이 부패하여 폐사가 일어날 수 있으므로 청소는 최소 주 2회 이상은 해야한다.</p>



[그림 1-1-14]
배수체 처리 순서도

(2) 모패 성숙유도 및 산란유발

- 자연에서의 참전복은 5-7월에 17-20°C 내외의 수온에서 산란하지만 산란시기를 앞당기기 위해 사육해수를 가온하여 적산수온을 조기 획득하도록 하여 암수 모두 생식소 부분이 부풀어 올라 완벽하게 성숙한 개체들을 선발함.
- 선발한 암컷 모패를 1시간 동안 공기 중에서 간출자극을 실시하고 간출 중에는 모패를 뒤집힌 상태로 유지하여 지속적으로 습기를 제거해 충분한 산란자극이 가해지도록 한다. 암컷의 자극이 끝나면 자외선 조사해수에 수용하고 수컷 또한 동일한 간출 자극을 실시함.
- 자외선 역가가 1.0-1.5 W/L가 되도록 유수량을 조절하여 자외선 조사해수를 산란수조에 준비함. 방란된 알의 순환을 위하여 포기를 실시한 뒤, 간출 자극을 마친 모패를 산란수조에 수용하여 산란이 일어날 때까지 1시간마다 방란을 확인하며 자외선 조사해수를 교환해 줌.

(3) CF 용액 준비

- 해수 중 미생물의 작용으로 CF이 분해되는 것을 막기 위해 해수 15 L를 0.45 μm 크기 필터로 진공 필터 시스템을 사용하여 불순물과 미생물들을 여과해줌.
- 여과한 15 L 해수와 122.34 g의 CF로 42 mM의 CF 용액을 제작하여 4°C에 보관함.

(4) 수정 및 세란

- 채란통에 수용한 암·수 모패는 1시간마다 자외선 조사해수를 교환해주고, 이때 방란·방정을 확인하고 높은 수정률을 위해 첫 산란이 관찰된 이후 2시간 이내에 수정을 실시함.
- 방출된 난은 250 μm 거름망으로 불순물을 제거하여 수정용 용기로 이동시키고 2-3 회 반복하여 해수로 세척한 뒤 늦게 가라앉는 비정상란을 제거하여 수정률을 높임.
- 충분한 양의 정자를 알이 담긴 수정용기에 넣어 충분한 수정이 일어나도록 2분 간 조심스럽게 교반시켜주고 남은 정충을 제거하기 위해 신선한 20°C 해수를 공급하여 세란을 실시하고 수정란의 난할 시간이 일정하도록 수정용기의 온도는 20°C로 유지해줌.

(5) CF 처리

- 사전에 제작해 놓은 42 mM CF 용액을 90 L의 여과 해수로 희석하여 7 mM의 처리용 CF 용액을 제작하고 20°C를 유지시킴.
- 수정 후 12분에 20°C의 7 mM CF 용액에 침지시켜 처리하고, 이때 CF 용액이 희석되어 배수체 유도율이 낮아지는 것을 막기 위해 최대한 해수를 제거할 수 있도록 함.

- 처리시간은 16분으로 처리기간 중 모든 수정란에 골고루 CF 용액이 작용할 수 있도록 소형펌프(30 W 내외)를 이용하여 CF 용액을 순환시켜주고 수정란의 극체 방출시간을 조절하기 위해 자동온도조절기를 사용하여 처리용액의 온도를 20°C로 유지함.

(6) 수정란 세척 및 부화조 설치

- CF 처리한 수정란은 빠르게 해수에 세척하여 수정란 주변의 CF 용액을 최대한 제거해야 배수체 유도 수정란의 부화율을 높일 수 있고, 부화 유생의 기형률을 낮출 수 있음.
- 부화조는 일정한 온도의 해수를 공급하여 기온의 영향을 받지 않는 항온 수조에 준비하고 세척을 마친 수정란이 겹치지 않도록 분주하여 수용함.

(7) 유생 사육

- 20°C 수온 조건에서 부화까지 약 13시간 소요되며 부화가 완료되면 정상적으로 부화조 상층부에서 유영하는 유생만을 유생사육 수조에 수용함.
- 유생사육 수조는 수 차례 여과된 일정한 온도의 해수를 계속 공급하고 배수구에 밀러가제를 부착하여 유생의 손실을 막아야하며, 이때 유생이 밀러가제를 막지 않도록 배수구 주변에 포기를 실시함.
- 부화 후 이틀까지 다량의 유막이 수조 표면에 생기므로 주기적으로 유막을 제거하고 유생의 밀도가 높은 경우 유막이 생기지 않을 때부터 사육 수조에 포기장치를 설치하여 산소를 공급함.

(8) 채묘

- 채묘용 수조는 유생을 생산하기 최소 1개월 전부터 준비하고 빛의 투과성이 좋은 합성수지 파판에 부착 유생의 먹이가 되는 규조류를 배양함.
- 부착기 유생의 밀도는 채묘용 수조의 파판 수와 크기를 고려하여 수용하고 유생이 파판에 충분히 부착할 수 있도록 수용 후 24시간 동안 해수의 공급과 포기는 중지함.

**배수체 육종
참전복**

Pacific Abalone
Haliotis discus hannai

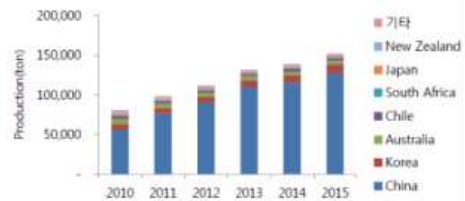


세계전복의 종류 및 분포

- 전세계적으로 56 종과 18 아종이 분포(Geiger & Owen, 2012)



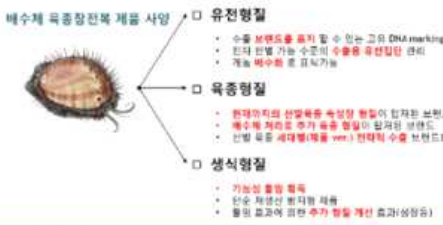
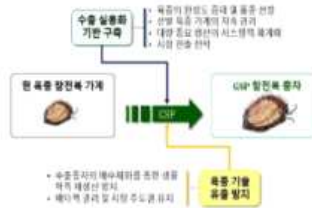
세계전복 생산 현황



- 전세계 전복시장의 수요는 지속적으로 증가 (FAO 2015 : 총 생산량 151,974 톤)
- 중국생산량은 127,967톤으로 전체 생산량의 대부분 차지

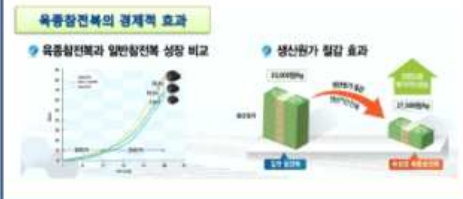
1. 배수체 육종 참전복 개발 개요 및 제품 사양

- 육종참전복의 수확에 따른 육종핵심기술 유출방지 전략 필요
 - 최종제품인 성룡자체에 육종기술이 집적되어 있어 손쉬운 복제가능
 - 미숙인 방식의 생물학적 재생산을 통한 육종기술 유출 가능
 - 단순한 제품 복제를 방지할수 있는 termination 전략 필요



2. 첨단 선발육종 기술을 이용한 육종 참전복 개발

- 전통적인 선발육종기술과 최신 분자육종기술을 결합
 - 유전자표지를 이용하여 육종집단의 유전적 다양성 및 친자확인 기술을 거쳐 육성장 형질을 가진 개체 및 개체를 선발하여 육종품종을 개발



[그림 1-1-15]
배수체 전복 표준매뉴얼

3. 핵심 육종 기술의 유출 방지를 위한 배수체와 처리기술 개발

- 고효율 배수체 잠전복 유도기술 개발 (배수체 유도율 99%)
- 배수체 유도기술의 고효율 재현성 및 안정성 확인

고효율 배수체 전복 개발

♂
♀

수정
화학물질 억제
배수체 생성

DNA content
대조구

DNA content
배수체

4. 배수체 육종잠전복의 특징

- 육종형질
 - 이배체(2N)와 배수체(3N)의 성장비교 결과 배수체가 유의적으로 큼
 - 생식소 발달 조사결과 배수체 전복의 생식소 발달 미비함
 - 고수온내성(31℃) : 배수체 육종 잠전복 고수온내성 형질 보유

배수체 잠전복의 육성장형질

배수체 잠전복의 생식소 발달 억제

성장률 (%)

42.7
57.4
P < 0.05

2N 3N

Female Male

배수체 잠전복의 고수온내성 실험

생존률 (%)

200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

30도수 온도 시간(일)

○ 2N
○ 3N

5. 국내 및 국외 판매전략 수립 및 수출시장 확대

- 민간협력 체제 구축
 - 전복 종자 생산 업체를 대상으로 배수체 전복 설명회 개최
 - 배수체 시험생산 참여기업 선정
 - 배수체 현장 적용력 평가
- 해외시장 개척 및 수출시장 확대
 - 현지 종자 가격 조사
 - 수입 희망 업체 방문 및 수출 협의회
 - 배수체 전복의 브랜드 개발에 따른 수출시장 확대

6. 전복 배수체 유도 방법

산란유발

수정 및 세란

카페인 처리

카페인 세척 및 부화

유생 사육

채묘

[그림 1-1-15]
배수체 전복 표준매뉴얼

산란 유발

모래 선발

- 수은 자극으로 조기 성숙을 유도하여 생식소가 잘 발달된 모래 선발




수컷 암컷

간질 자극

- 선발한 모래를 통풍이 잘되는 곳에서 1시간 동안 건조
 - * 간질 중 모래는 뒤집힌 상태 유지



간질자극

자외선 조사 해수 자극

- 음간 간질을 마친 모래는 자외선 등을 통과시킨 해수로 2차 자극




자외선조사 해수 암컷 제란통 수용

수정 및 세란

발란-방정 확인

- 제란통에 수용한 모래는 자외선조사 해수로 1시간마다 환수
- 방출된 알은 250 μm 거름망으로 불순물을 거른 후 상층부에 부유하는 비정상란 제거




발란 방정

수정

- 산란 확인 후 높은 수정률을 위해 2시간 이내에 수정
- 정자 투입 후 수정이 충분히 일어나도록 2분간 정치



인공수정

세란

- 수정란의 난황 시간 조절을 위해 20 °C 해수로 세란
 - * 알과 정자의 크기를 고려하여 70-100 μm 크기의 필터가재 사용





세란

카페인 처리

카페인 용액 제작


- 진공여과시스템을 통해 해수를 여과하여 고농도 카페인용액 제작

해수 진공여과 시스템 카페인 용액

수정란 카페인 자극

- 고농도 카페인용액을 처리 농도인 7 mM로 희석
 - * 수정란 발생 조절을 위해 20 °C로 유지
- 수정 12분 후에 수정란을 카페인 용액에 정치
- 처리시간: 16분
 - * 소형 펌프를 이용하여 처리용액 순환




카페인 처리

카페인 세척 및 부화

카페인 세척

- 카페인 처리를 마친 수정란은 신속하게 대량의 해수에 세척
- 펌프를 사용하여 10분 이상 신선한 해수 공급
 - * 카페인 잔존 시 부화율과 기형률에 악영향



카페인 세척

부화조 설치

- 부화유생과 미수정란을 분리하기 위한 부화용기 사용
- 부화 시까지 온도유지를 위해 부화용기는 항온수조에 부유
- 처리를 마친 수정란은 100-200만 개/20 L 밀도로 부화용기에 수용



배수채 유도 수정란 분배

[그림 1-1-15]
배수채 전복 표준매뉴얼

유생 사육

부화유생 수훈

- 전복 수정란은 20℃에서 13시간 만에 부화
- 정상적인 유생만 수조에 수훈

* 정상 유생은 해수 표면에서 활발한 유영을 보이고 미수정란이나 기형 유생은 부화용기의 바닥에 분포



부화 중인 유생



정상 유생 사육

유생 사육

- 부화 직후부터 이틀까지 다량의 유막이 수조 표면에 생기므로 주기적으로 유막 제거
- 유생 수조는 청운을 위해 여과해수를 계속적으로 공급해주고 배수구에 탈리가재를 부착하여 유생 손실 방지



수조 표면의 유막 제거



배수구 유생 거름망

유생 수거 및 채묘

유생 수거

- 채묘 시까지 유생수조 온도를 18-20℃로 유지
- 채묘기 적산수는 1030℃에 도달 시 사이펀으로 유생 수거



정상 발생 유생



유생수거

채묘

- 채묘용 수조는 빛의 투과성이 좋은 합성수지 파관에 유생의 먹이가 되는 규조류를 배양하여 준비
- 부착기 유생의 접촉 밀도는 채묘용 수조의 파관 수와 파관의 크기를 고려하여 수명
- 유생이 파관에 충분히 부착하도록 24시간 동안 해수와 공기 공급 중단



합성수지 파관



채묘

7. 배수체 육종잡전복 현장 대량생산 체제 구축

배수체 대량처리 자동화 장치 개발



배수체 육종잡전복 현장 대량시험 생산 (2017-2018)


간송 처리


수훈


배수체 처리


유생 사육


급조파관에 부착


배수체 육종잡전복 체제

★ 2018년 배수체 육종잡전복 유생 2억 마리 생산

[그림 1-1-15]
배수체 전복 표준매뉴얼

마. 배수체 육종 참전복의 관리기술 지원

(1) 먹이생물 배양과 사료 공급

- 육종 참전복 배수체 종자생산에 있어서 양질의 규조류 배양은 사전에 준비해야 할 가장 중요한 제반작업으로 채묘시기에 규조류가 잘 배양되어 있어야 높은 채묘율을 기대할 수 있으며, 부착기 치패의 먹이가 되기 때문에 치패의 성장에도 큰 영향을 줌. 부착 규조류의 배양은 투명한 염화비닐판을 일정한 간격으로 배열한 뒤 알맞은 수온과 조도가 공급되면 자연적으로 이루어짐.
- 규조류 배양에 필요한 수온은 보통 16-21°C지만 전복 종자 생산의 산업화로 채묘시기가 앞당겨져 10°C 내외의 수온에서 규조류 배양이 이루어지고 있음. 따라서 질산칼륨이나 인산염 등의 화학비료를 시비하여 규조류의 성장 속도를 향상시키도록 함.
- 규조류는 광합성을 통해서 영양분을 생산하기 때문에 배양에 있어 가장 중요한 요소인 광선의 강도는 25,000 lux 이하로, 배양 수조의 천장에 차광망을 설치하여 날씨에 따라 광량을 조절해야 함. 치패가 부착된 후에는 먹이로 소모되는 규조류가 부족하지 않도록 관리하여야 함.
- 파판의 치패가 규조류를 섭취하여 2 mm 이상 자라면 김가루 등 소형 해조류나 시판되는 0-1호의 배합사료 등을 공급해 먹이가 부족하지 않도록 유지하고 수질 악화를 막기 위해 급수량을 2-3 m³/시간으로 늘리고 산소를 충분히 공급해야 함 [그림 1-1-16].

(2) 선별 작업

- 치패가 성장함에 따라 개체간의 차이가 발생하고 먹이가 부족할 수 있기 때문에 치패를 성장에 따라 크기별로 선별하여 사육하면 개체 수를 보존할 수 있고 빠른 성장을 기대할 수 있음.
- 부착판에서 치패를 분리하는 박리 작업은 여러 가지 약품을 사용하는 화학적 방법과 수온 처리 등의 물리적인 방법이 있음. 종자생산 현장의 상황이나 효율성을 고려하여 화학적 방법을 선호하는 편이고 최근 연구 결과에서는 구연산이나 포도산, 개미산 등의 유기산을 이용한 박리가 독성이 없고 효과가 뛰어나며, 회복도 빠른 것으로 밝혀졌음.
- 선별 작업은 보통 고수온기에 접어들기 전과 후에 약 2-3회 실시하는데 일정한 크기의 구멍이 뚫린 용기에 박리된 치패를 넣고 천천히 흔들어서 용기에 남은 치패는 선두 그룹으로 분류하고 아래로 통과된 치패는 후발 그룹으로 분류하여 사육함.
- 선별을 마친 치패는 시판되는 2-3호의 사료를 매일 공급하고 사료가 남아 부패하지 않도록 매일 수조 청소를 실시하여야 함[그림 1-1-16].



[그림 1-1-16]
규조류 배양 및 선별작업

바. 배수체 전복의 품질관리를 위한 기술개발 및 안정성 검증

(1) 배수체 육종 참전복 생산관리를 위한 유전마커 개발 및 활용

(가) 배수체 전복 식별용 마커 개발의 필요성

- 우리나라 전복 생산량의 대부분을 차지하는 북방전복, *Haliotis discus hannai* 은 한류계 전복으로 성장이 느려 상품 크기까지 약 3-5년을 필요로 함. 이에 전복 양식 생산성 향상을 위해 선발 육종연구를 비롯하여 다양한 방법의 육종 연구가 진행되고 있으며, 최근 염색체 공학을 이용한 3배체(triploidy) 전복의 개발 연구와 경제 형질평가 연구 등이 진행되고 있음.
- 3배체는 정자와 난을 인공수정하고 그 수정란에 물리적 또는 화학적 자극을 주어 제1극체 또는 제2극체의 방출을 억제하여 생산할 수 있음. 염색체 공학적 방법으로 생산된 3배체는 3개의 상동염색체를 가지기 때문에 제1감수분열 중기에서 상동염색체 간 짝짓기 및 등분리가 원활하게 진행되지 못해 불임성을 나타내며, 불임성을 가진 3배체는 성 성숙에 사용할 에너지를 체성장으로 전환하여 사용함에 따라 2배체(diploidy) 보다 성장 속도가 빠르다는 장점을 가지고 있음.
- 인위적으로 유도된 3배체의 배수성은 적혈구 및 세포핵의 크기를 측정하는 방법, 염색체 수를 검사하는 방법, 핵형 분석 방법 및 DNA 함량을 측정하는 방법 등으로 확인할 수 있음. 그러나 이와 같은 방법으로 배수성을 평가하는 것은 대략적인 예측만 가능하며, 초기 유생 단계 및 초기 치패와 같은 적은 시료로는 분석이 어려울 뿐만 아니라 많은 시간과 노동력을 필요로 하는 단점이 있음.
- 따라서 인위적으로 배수성을 유도한 품종을 전복 양식산업에 적용하기 위해서는 인공수정을 하여 배수체 처리 직후 발생단계 초기에 배수성을 신속하고 정확하게 판별할 수 있는 기술개발이 필요함.
- 생산성 및 수익성이 기대되는 배수체 전복의 양식현장 적용을 위해 인공수정 직후 반복 염기서열을 가진 microsatellite 마커에 대한 다중 분석이 가능한 multiplex PCR을 이용하여 발생단계 초기에 배수성을 신속하게 판정할 수 있는 기술을 개발하고자 하였음.

(나) 배수체 식별용 마커 개발 방법

- **실험생물 및 Genomic DNA 추출:** 실험에 사용한 전복 중 2배체 북방전복, *Haliotis discus hannai*은 경상남도 거제지역에서 해녀가 채집한 자연산 전복 48개체이며, 3배체 북방전복은 국립수산과학원 수산종자육종연구소에서 골든시드프로젝트(Golden Seed Project) 과제 수행으로 생산된 배수체 전복 14개체를 사용하였음. 모든 시료의 total genomic DNA는 외투막 조직 일부를 절제하여 chelating resin method를 이용하여 추출하였음.

- **Microsatellite locus의 증폭범위:** Multiplex PCR 디자인을 위하여 [표 1-1-1]에 나타난 5개의 microsatellite locus를 선택하였음. 5개의 microsatellite locus에 대한 PCR 증폭은 chelating resin method로 얻은 2배체 및 3배체 각각의 DNA 10 ng, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% Triton X-100, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 U *f-Taq* DNA polymerase (Solgent), 0.5 pmol microsatellite primer pairs를 혼합하여 사용하였고, PTC-200 Thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 이용하여 95°C에서 10분간 개시변성(initial denaturation) 시킨 후, 95°C에 20초, 55°C에 40초, 72°C에 1분으로 35회 반복하여 반응시킨 다음 72°C에 30분간 최종연장(final extension)하여 PCR 반응을 진행하였음. PCR에 의해 증폭된 microsatellite DNA 단편은 표준크기(size standard) 마커로 GeneScan 400HD ROX (ABI, USA), HiDi formamide와 혼합한 후 유전자형 분석기(3100 genetic analyzer; ABI, USA)를 이용하여 분석하였음. 분석 후에 나타난 피크 정보를 GeneMapper v3.7 software를 이용하여 유전자형을 분석하고 각 microsatellite locus의 증폭범위를 확인하였음.

- **Multiplex design:** 5개의 microsatellite locus의 증폭범위를 확인하고 증폭범위의 중복유무에 따라 6-FAM, PET, NED and VIC의 4가지 형광표식(ABI, USA)을 붙였음. Multiplex design을 위하여 기본적으로 증폭범위가 중복되지 않은 locus는 같은 형광표식(fluorescent dye)을 사용하였으며, 반면에 같은 증폭범위를 나타낸 locus는 서로 다른 형광표식을 사용하여 실험하였음.

- **Multiplex PCR을 이용한 2배체와 3배체의 판별:** 2배체의 경우 microsatellite 마커는 공우성(co-dominant) 마커로서 멘델의 유전방식을 따르고 있으며, 2개의 대립유전자를 가지고 있어 대립유전자가 같을 경우 1개이며, 서로 다른 대립유전자를 가지고 있으면 2개의 피크를 나타냄. 반면에 3배체(triploid)의 경우 일반적으로 2배체보다 1개의 반수체 염색체조를 부가적으로 가지고 있어 3개의 대

립유전자로 1에서 3개까지의 피크를 나타냄. 따라서 각 microsatellite locus에 대한 대립유전자 수를 기반으로 5개의 마커에 대한 다형분석을 통해 3배체와 2배체를 판별함.

[표 1-1-1] Multiplex PCR을 위한 5개의 microsatellite 마커

Locus	Repeat type	Primer sequences (5'-3')
<i>HDSC8054</i>	ATC	F: CGGTCGCAGTCAGCAATTTT R: AATAGCACCACTGCCAACCT
<i>HDSC0615</i>	GT	F: ACACTTTCGCCTTTGTCCAC R: TGGGGACTTTTCGGAACAGA
<i>EAngs4-14</i>	TAGA	F: ATTAGGGGTGGATGGATAGAGG R: TTGACGAACAGTCATTTTACGG
<i>EAngs5-70</i>	GTGAG	F: AGAGCATCAATCAGTTGCTGTG R: TGACTTGATTACGTATGGGCAG
<i>Hd601</i>	CGCA/CA	F: ACATGGAACTGCGAGTCCTAGAAGC R: TGATTATTTTCAGATCGCCGTCATA

(다) 배수체 식별용 유전마커 개발

○ **Multiplex design:** Multiplex PCR의 최적 조건을 확인하기 위하여 2배체 자연산 전복 48개체를 이용하여 [표 1-1-1]의 5개 microsatellite locus에 대한 각각의 PCR 증폭범위를 확인함. HDSC8054는 257-299 bp, HDSC0165는 145-163 bp, EAngs4-14는 221-269 bp, EAngs5-70은 282-342 bp 그리고 HD601는 152-196 bp로 확인됨[표 1-1-2]. 5개의 각 microsatellite locus 증폭범위의 중복을 확인하고 정방향 프라이머에 각각 다른 형광라벨을 이용하여 표지하였음. HDSC8054는 PET, HDSC0165 및 EAngs4-14는 증폭범위가 없어 같은 6-FAM으로 표지하였으며, EAngs5-70은 NED, HD601는 VIC으로 표지하였음. PCR 증폭온도는 55°C로 하였으며, 프라이머 농도는 0.5 pmol를 기준으로 하여 각 프라이머 세트의 피크가 증폭 시 비슷한 수준으로 나타나도록 농도를 조절하여 PCR 조건을 최적화하였음. Multiplex PCR 증폭은 각 microsatellite locus 증폭범위 확인을 위한 조건과 동일하게 수행하였으며, 최적의 프라이머 농도는 5개를 혼합하여 사용하였음[표 1-1-2]. 그 결과 1회의 PCR을 통하여 5개의 microsatellite locus를 분석할 수 있었음[그림 1-1-17]. 이는 1회의 PCR 증폭에 필요한 작업 및 고가의 시약으로 5회의 PCR 증폭 결과를 얻을 수 있는 경제적 효율성이 매우 높은 방법임.

○ **Multiplex PCR을 이용한 배수성 판별:** 국립수산과학원에서 생산한 배수체 전복 14개체에 대하여 위의 multiplex PCR 방법을 이용하여 배수체 여부를 판별하였다. 배수체 개체에 대한 유전자형 판별 전기영동분석 결과를 [그림 1-1-17]

및 [표 1-1-3]에 나타내었음. 그 결과 분석한 모든 개체가 3배체 전복임을 확인할 수 있었음(n=14). 3개의 대립유전자를 가지고 있는 하나의 microsatellite locus만으로도 다형성을 충분히 판별할 수 있었음. 단일 microsatellite locus로 분석할 경우 HDSC8054는 78.6%, HDSC0165 및 EAngs4-14는 50.0%, EAngs5-70은 57.1%, HD601은 21.4% 비율로 배수체를 확인할 수 있으나, 5개의 microsatellite locus를 조합하여 분석할 경우 100%의 비율로 배수체 판별이 가능하였음.

(라) 배수체 식별용 유전 마커 활용

- 배수성의 판정을 위해서는 적혈구 및 세포핵의 크기를 측정하는 방법, 염색체 수를 검사하는 방법, 핵형을 분석하는 방법 그리고 flow cytometry를 이용한 DNA 함량 측정방법 등이 있음.
- 어류는 적혈구 및 핵의 크기를 측정하여 배수체 판정이 가능함. 하지만 전복과 같은 패류는 적혈구 대신 혈림프구가 존재하고 있으며, 이들은 모양이 일정하지 않고 크기도 다양하여 배수성 판정을 위한 분석에는 적합하지 않음.
- 염색체 수 및 핵형 조사를 이용한 배수체의 유전자 분석은 특별한 기기 및 고가의 분석 비용이 들지 않는 방법으로 배수성을 구별하는 가장 확실한 방법임. 즉, 2조의 모계 반수체 유전자와 1조의 부계 반수체 유전자로 구성되어 있는지를 확인하는 방법임. 하지만 이 방법은 세포의 분열 증식이 활발한 시기 외에는 세포 배양을 하여 염색체 표본을 얻어야 하는 단점을 가지고 있음.
- 최근에는 flow cytometry 기기를 이용하여 배수체를 판정하는 방법을 많이 사용하고 있는데 이 방법은 세포핵 내의 DNA 함량을 측정하여 단시간에 다량의 시료를 분석할 수 있으며, 실험동물을 죽이지 않고 분석이 가능함. 하지만 이 분석을 위해서는 고가의 flow cytometry 기기 및 시약 등을 구매하여 실험을 진행해야 하는 단점이 있음.
- 본 과제에서는 microsatellite 마커를 이용하여 1회의 multiplex PCR 반응으로 대량의 배수체 시료의 판별이 가능한 방법을 개발하였음. 유전자 기반의 분석기술의 핵심인 DNA를 이용한 유전자 마커는 생물 종에 대한 유전적 특성을 분석할 수 있는 기술로 유전자원 보존을 위한 연구 등에 활용되고 있음. 초기의 DNA 마커는 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), inter-simple sequence repeat (ISSR) 등의 우성마커 (dominant marker)가 주로 이용되었

으나 RAPD 및 ISSR의 경우 재현성이 떨어지며, 우성마커의 특성상 2배체에서 우성 동형접합체(homozygote)와 이형접합체(heterozygote) 간의 유전자형 구분이 불가능한 단점이 있음.

○ 최근에는 생물체 게놈(genome)상에 존재하는 염기서열 반복 횟수 차이로 다형성(polymorphism)이 나타나는 simple sequence repeat(SSR)을 microsatellite 유전자 마커로 생물종의 유전적 다양성, 유연관계 분석, 친자확인 등에 활용하고 있음. 또한 microsatellite 마커는 공우성(co-dominant) 마커로서 멘델의 유전방식을 따르고 있으며, 대립유전자의 다양성, 전체 게놈상에 균등하게 분포되어 있는 점, 작은 microsatellite locus의 크기, 그리고 높은 다형성을 가지고 있음. 또한 3배체 판별에 있어 microsatellite 마커의 유용성은 극체 방출 억제에 의해 1개의 암컷 염색체조가 더 많아 암컷 내에 존재하는 이형접합성 유전자 좌위 및 2개의 암컷 대립유전자와 수컷으로부터 유전되는 크기가 다른 유전자 좌위로 분석이 가능함. 이러한 다양한 수의 유전자 좌위는 개체의 3배체 특성을 판별하는데 유용하게 적용이 가능하였음.

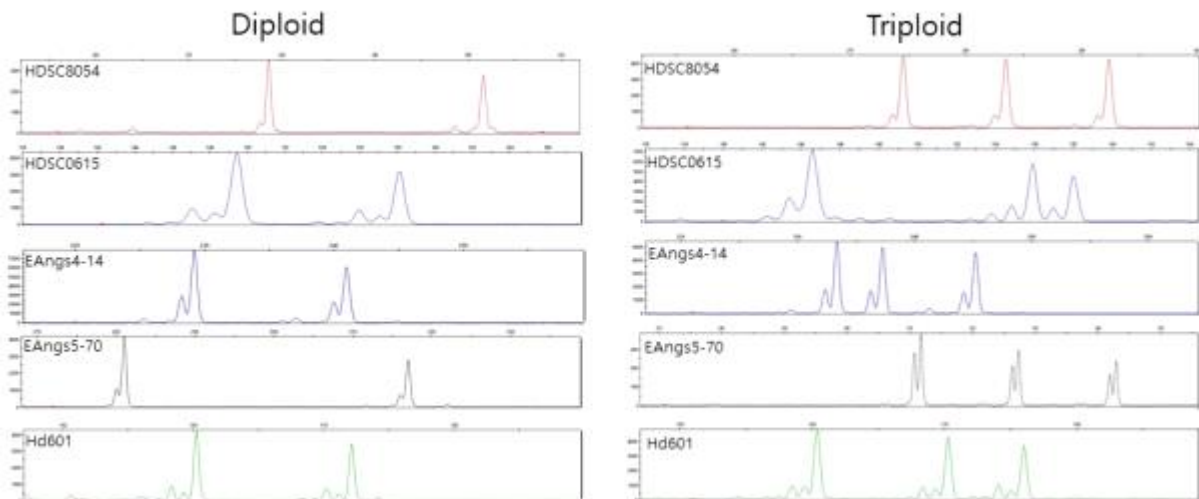
○ 본 과제에서는 생산성 및 수익성이 기대되는 배수체 전복의 양식현장 적용을 위해서 배수성을 발생단계 초기에 신속하게 판정할 수 있는 기술개발과 그 유용성을 검토한 결과 5개의 microsatellite locus를 이용하여 multiplex PCR로 확인했을 때 100% 3배체의 배수성을 확인할 수 있었음. 또한 본 연구를 통해 개발된 3배체 판별을 위한 multiplex PCR 기술은 시간 및 비용이 절약되어 대량의 배수성 판별을 신속 정확하게 판별할 수 있을것이라 생각됨.

[표 1-1-2] 5개의 microsatellite 마커의 형광라벨 및 대립유전자의 범위

Locus	Allele Size Range(bp)	Number of alleles	Dye label	Primer concentration(pmol/ul)
<i>HDSC8054</i>	257 - 299	9	PET	0.50
<i>HDSC0615</i>	145 - 163	8	6-FAM	0.30
<i>EAngs4-14</i>	221 - 269	5	6-FAM	0.30
<i>EAngs5-70</i>	282 - 342	7	NED	0.40
<i>Hd601</i>	152 - 196	6	VIC	0.30

[표 1-1-3] 5개의 microsatellite 마커에 의한 3배체 전복의 유전자형

Individual No.	Locus				
	<i>HDSC8054</i>	<i>HDSC0615</i>	<i>EAngs4-14</i>	<i>EAngs5-70</i>	<i>Hd601</i>
Triploid-1	279/290/299	145/147/153	233/237/245	307/327	152/170
Triploid-2	284/296	145/149/163	233/237	312/337/342	160/170/176
Triploid-3	275/284/293	145/147/163	221/233/237	312/327/342	160/170
Triploid-4	275/299	147/155/157	221/233/237	317/327	152/170
Triploid-5	275/279/299	147/157	221/233/245	307/317/327	152/170
Triploid-6	284/293/296	155/163	233/241	312/337/342	160/170/176
Triploid-7	269/290/299	145/147/153	233/237/245	307/327	152/170
Triploid-8	284/293/296	155/155	221/233/241	312/337/342	160/176
Triploid-9	275/293	149/155	221/233/245	322/337/342	160/172/176
Triploid-10	257/275/284	155/159/163	221/237	312/327	170/176
Triploid-11	269/275/299	147/157	221/245	317/327	152/170
Triploid-12	257/275/284	155/159/163	221/237	312/327	170/176
Triploid-13	275/284/293	147/155	221/233	312/327/342	174/176
Triploid-14	257/284/296	155/159	233/237	312/327/337	170/176



[그림 1-1-17]

이배체와 삼배체의 5개 microsatellite 마커에 따른 전기영동상

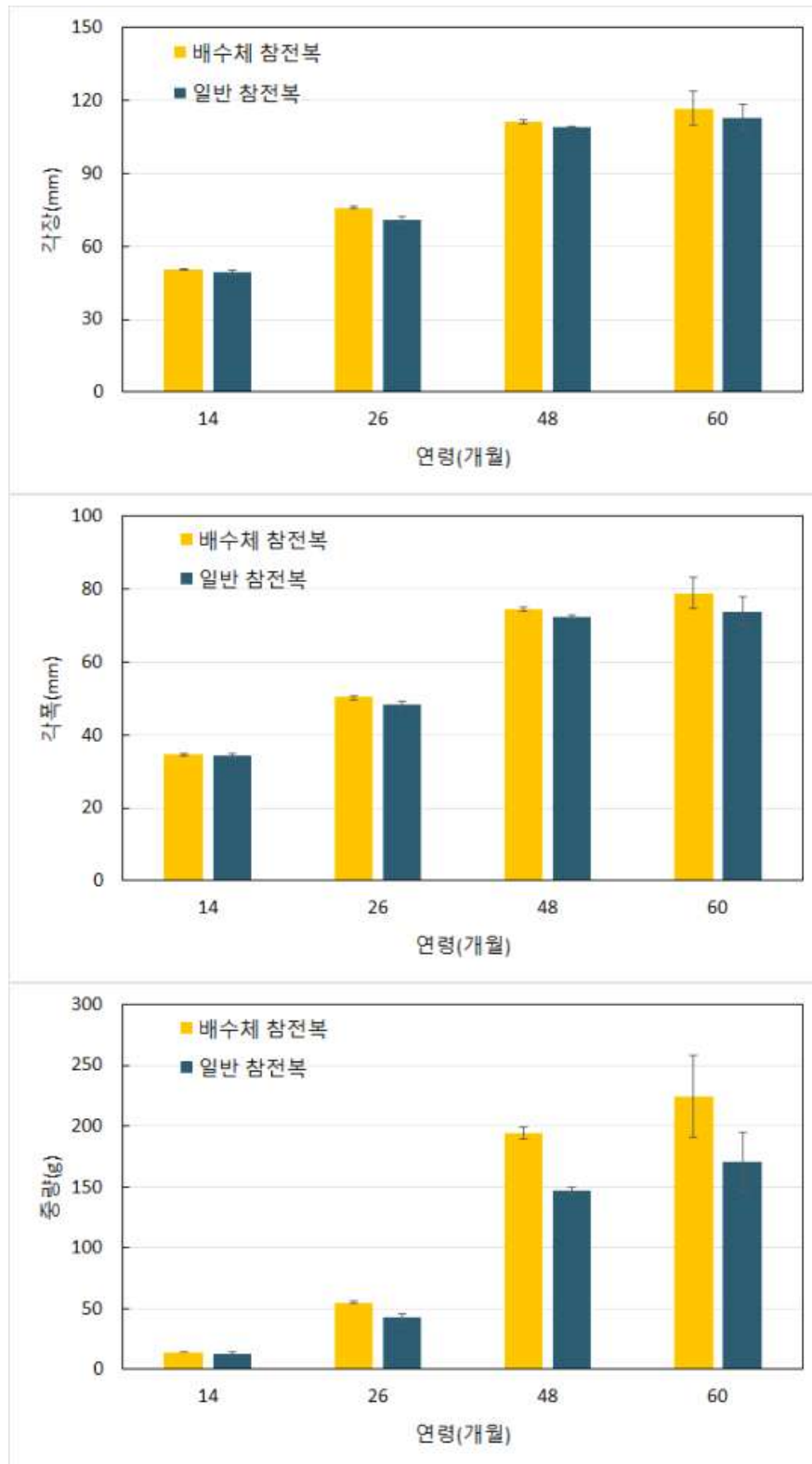
(2) 지속적인 육종 참전복 배수체 종자의 품질관리(성장) 및 안정성(불임여부) 검증

(가) 배수체 육종 참전복의 성장형질 모니터링

- 배수체 육종 참전복(3배체)과 일반 참전복(2배체)의 성장도 조사를 위해 같은 날에 생산하여 동일한 양식현장에서 사육하였으며, 매년 지속적인 선별작업을 거쳐 모니터링을 실시하고 있음.
- 동일한 수조에서 사육 중인 14개월령과 26개월령, 48개월령 및 60개월령의 개체를 실험구별로 각장과 각폭을 0.01 mm 단위까지, 중량을 0.01 g 단위까지 측정하였음.
- 3배체와 2배체 간의 성장도 조사 결과는 14개월령에 3배체는 평균 각장 50.30 ± 0.30 mm, 각폭 34.60 ± 0.22 mm, 중량 14.28 ± 0.28 g으로 2배체의 각장 49.49 ± 0.80 mm, 각폭 34.44 ± 0.60 mm, 중량 13.23 ± 0.75 g과 차이를 보이지 않았으나, 26개월령에는 3배체가 평균 각장 75.85 ± 0.55 mm, 각폭 50.32 ± 0.38 mm, 중량 55.06 ± 1.26 g으로 2배체의 평균 각장 70.68 ± 1.23 mm, 각폭 48.14 ± 0.90 mm, 중량 42.69 ± 2.44 g과 비교하여 각장과 각폭, 중량 모두 높게 나타나 유의적으로 차이를 보였음.
- 성장이 가속화된 48개월령에는 3배체가 평균 각장 111.21 ± 0.73 mm, 각폭 74.24 ± 0.52 mm, 중량 194.03 ± 4.61 g으로 2배체의 평균 각장 108.69 ± 0.38 mm, 각폭 72.38 ± 0.52 mm, 중량 147.15 ± 2.69 g과 비교하여 높은 성장을 나타냈으며 특히 중량에서는 30% 이상의 높은 성장 속도를 보였음.
- 이러한 성장 경향은 60개월령에도 3배체가 평균 각장 116.57 ± 7.03 mm, 각폭 78.71 ± 4.54 , 중량 223.85 ± 33.81 g으로 2배체의 평균 각장 108.76 ± 5.38 mm, 각폭 73.78 ± 3.98 , 중량 170.14 ± 24.24 g과 비교하여 높은 성장을 나타냈으며 중량 또한 30% 이상의 높은 성장을 보였음[표 1-1-4][그림 1-1-18, 19].

[표 1-1-4] 배수체 육종 참전복과 일반 참전복의 성장 비교

연령	성장형질	배수체 참전복	일반 참전복
14 개월령 (2016)	각장(mm)	50.30±0.30	49.49±0.80
	각폭(mm)	34.60±0.22	34.44±0.60
	중량(g)	14.28±0.28	13.23±0.75
26 개월령 (2017)	각장(mm)	75.85±0.55*	70.68±1.23
	각폭(mm)	50.32±0.38*	48.14±0.90
	중량(g)	55.06±1.26*	42.69±2.44
48 개월령 (2019)	각장(mm)	111.21±0.73*	108.69±0.38
	각폭(mm)	74.24±0.52*	72.38±0.52
	중량(g)	194.03±4.61*	147.15±2.69
60 개월령 (2020)	각장(mm)	123.12±5.80	112.76±5.38
	각폭(mm)	82.16±4.75	73.78±3.98
	중량(g)	223.85±33.81	170.14±24.24



[그림 1-1-18]
 배수체 육종 참전복과 일반 참전복의 성장 비교



[그림 1-1-19]

배수체 육종 참전복과 일반 참전복의 성장 비교(좌: 배수체, 우: 일반)

(나) 배수체 육종 참전복의 안정성(불임여부) 확인을 위한 인공산란 실험

- 제1세부프로젝트 기관에서 개발한 배수체 육종 참전복의 수출을 위해서는 수출된 종자의 비승인된 재생산 및 기술복제를 방지하기 위해 배수화를 통한 불임기능 획득을 목적으로 연구를 진행해오고 있음.

- 대부분의 배수체 패류는 생식소의 성숙이 일어나지 않거나 불완전 성숙으로 불임을 나타내지만 일부 종에서는 보통의 생식소 성숙이 나타나거나, 시간이 경과하여 다시 2배체로 돌아가는 경우 등이 발생하여 산란과 수정이 가능한 것으로 보고되었음.

- 본 프로젝트의 1단계 사업에서 생산한 배수체 육종 참전복 중 육안으로 생식소가 성숙한 개체를 선별하여 인공산란 자극을 통하여 일반 참전복이 산란하는 조건에서 배수체 육종 참전복의 산란 가능 여부를 확인하였음.

- 불임여부 확인에 사용한 배수체 육종 참전복은 2015년 생산한 55개월령 암컷 19마리와 수컷 25마리로 2019년 RFID 인식표를 부착한 개체로 외투막 조직을 채취하여 유세포 분석으로 배수성 여부를 확인한 전복임[그림 1-1-20].

- 산란유발 자극은 3배체와 2배체 모두 동일한 조건으로, 통풍이 잘 되는 그늘진 곳에서 전복 체표면의 수분을 제거하여 1시간 30분간 간출 자극한 후 자외선 조사 해수에 암컷 19마리 및 수컷 25마리를 수용하여 산란 여부를 확인하였음 [그림 1-1-21].

- 자외선 조사 해수에 의한 산란자극은 암조건에서 실시하였고 1시간마다 산란 여부를 확인하며 새로운 자외선 조사 해수로 교환하였음.

- 산란자극을 시작하고 2배체에서는 2시간 후에 암·수 모두 산란이 확인되었지만, 3배체에서는 암·수 모두 실험 종료 시까지 산란활동이 확인되지 않았음[그림 1-1-21].

RFID 인식칩과 고정용 시멘트	배수성 판정용 조직 채취
	
형질측정	산란유발 간출 자극
	
개체 인식번호 확인	개별수용 및 자외선 조사해수 자극
	

[그림 1-1-20]
배수체 육종 참전복 인공산란 실험



[그림 1-1-20]
 배수체 육종 참전복 인공산란 실험

1-2. 민간협력체제 구축

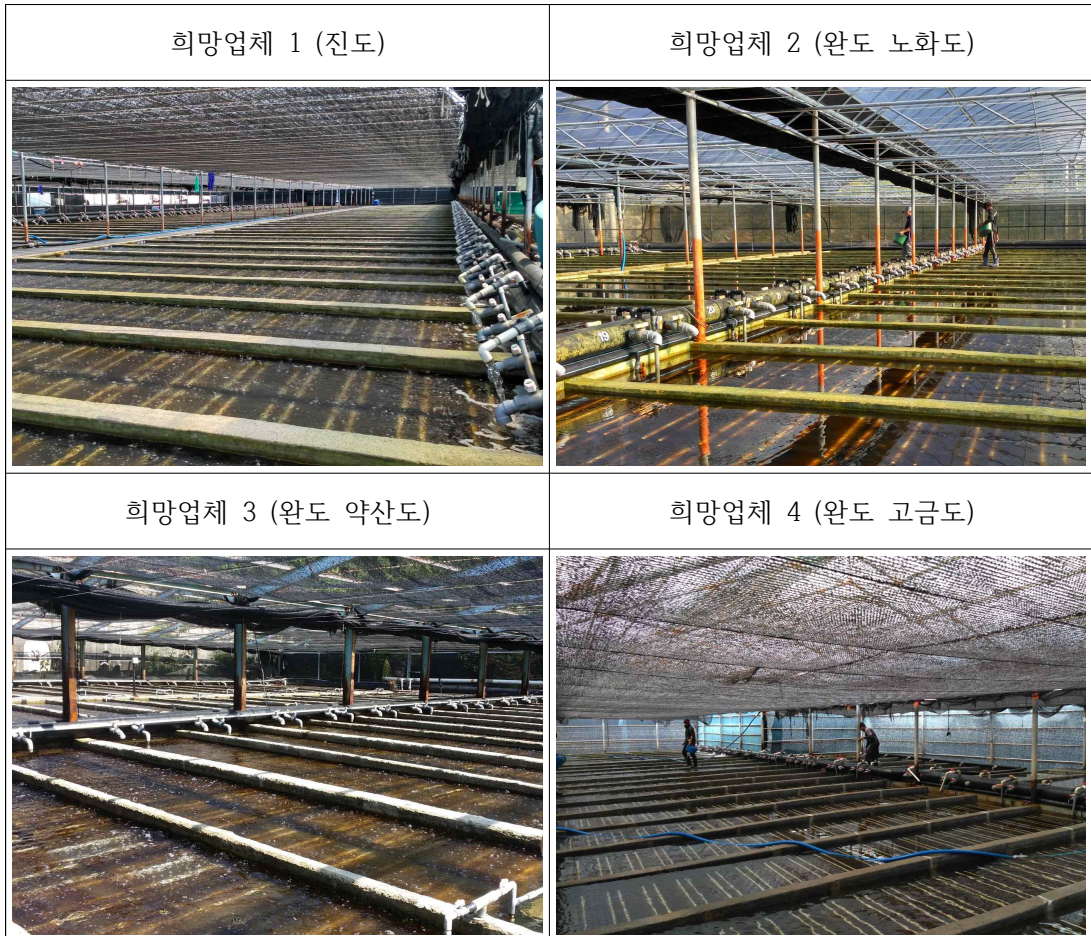
가. 민간업체를 활용한 배수체 육종 참전복의 시험생산 및 적응력 평가

(1) 배수체 육종 참전복 시험생산을 위한 종자업체 선정

- 제1세부프로젝트 기관에서는 (사)한국전복산업연합회, 완도지회, 해남지회, 전북 종자협회 등을 방문하여 성장둔화 및 고수온 대량폐사 등 전복양식 현안에 대한 해결방안으로 속성장 형질 및 생식소 발달억제 등 배수체의 일반적인 특징을 설명하였으며, 현장 적용 기반구축을 위한 협의회를 개최하고 협회로부터 희망업체를 추천 받음[그림 1-2-1].
- 배수체 육종 참전복 설명회 개최 후 시험생산을 희망하는 업체를 방문하여 생산 규모, 방식 및 시기 등을 재검토하여 2단계 사업 2차년도부터 완도군 1개 업체 선정을 시작으로 3차년도에는 3개소, 4차년도에는 4개소로 늘렸으나 5차년도에는 완도업체가 연구 참여를 중단하여 3개소로 참여기업 수를 조절하였음.

(2) 배수체 육종 참전복 현장 대량시험 생산

- 배수체 육종 참전복 현장 대량시험 생산에는 속성장 육종 참전복 산업화계통에서 성장이 우수한 개체들로 선발 후 (구)육종연구센터에서 수온조절시스템(아쿠아트론)을 이용하여 조기 성 성숙을 유도한 개체를 사용함(수컷 7마리, 암컷 30마리).
- 산란 유도를 위해 수분을 제거한 후 간출 자극을 90분 동안 실시하였고, 자극이 끝난 뒤 자외선 조사 해수(18°C)로 충분히 세척 후 암조건 처리가 된 수조에 암·수 각 10마리 내외로 수용하였음.
- 수용 후 1시간 간격으로 자외선 조사 해수를 교환하였으며, 산란 및 방정을 수시로 확인하였고, 암·수 모두 수용 2시간 30분 후에 산란이 관찰되었음.
- 배수체 유도는 7 mM CF, 16 min 조건으로 2회에 걸쳐 실시하였으며, 1회당 각 750만 개의 수정란을 사용하였고 CF 처리 후 잔여 CF를 해수로 세척하고 부화조에 분주하여 16-17°C에서 인공부화를 유도하였음.
- 수정 후 18시간째 첫 부화가 관찰되었고 23시간 후에 대부분의 수정란이 부화 되면 16°C에서 사육을 시작하고 적산수온이 1,030°C에 도달하였을 때 유생을 수거하여 규조류가 잘 배양된 파판에 채묘를 실시함.



[그림 1-2-1]

배수체 육종 참전복 시험생산 희망업체

(3) 배수체 육종 참전복 현장 적응력 평가

(가) 현장 적응력 모니터링

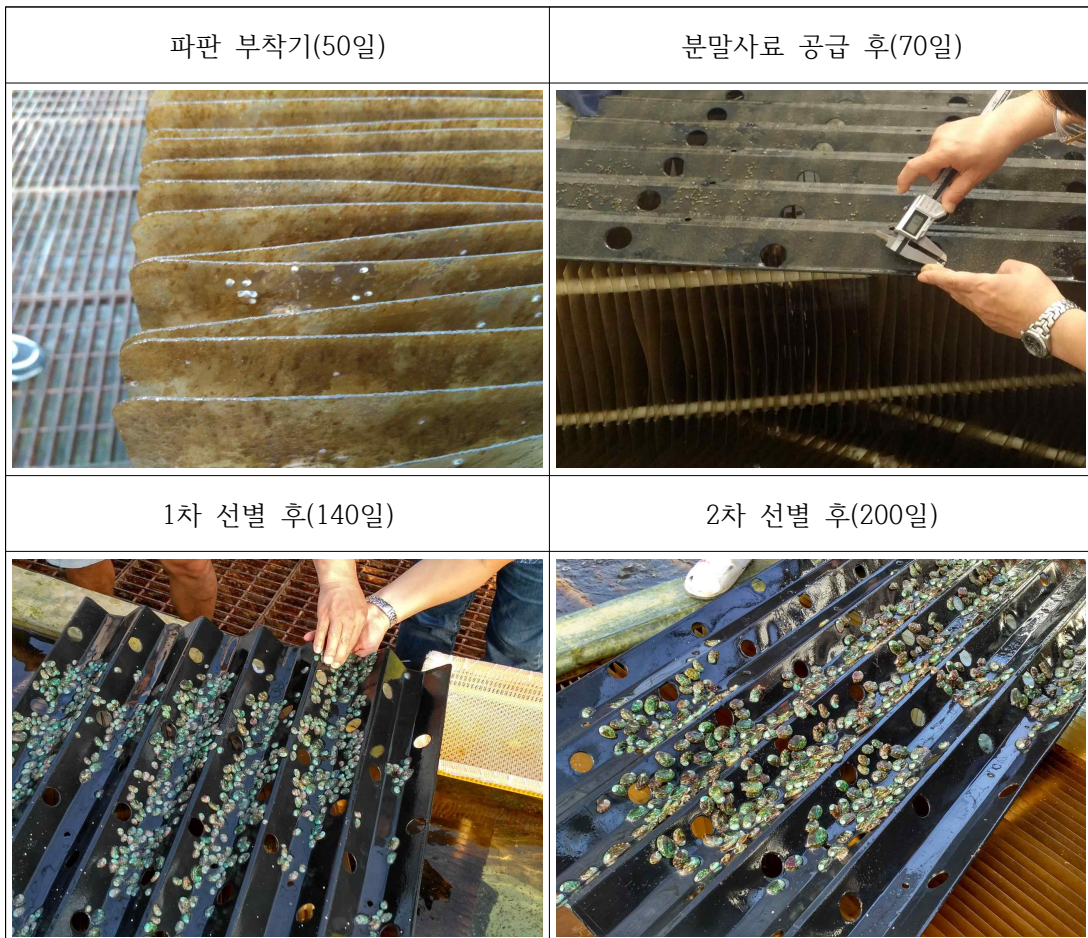
- 채묘 후 치패의 양성은 2배체 치패와 함께 시험생산 업체에 일임하였음[표 1-2-1].
- 채묘 후 50일째 유생의 부착상태를 확인한 결과 파판 1장에 약 50마리 정도의 유생이 부착되어 있었으며, 2배체와 비슷한 수준임을 확인함.
- 채묘 후 85일째 7 mm 선별기로 1차 선별 후 각장 1 cm의 배수체 육종 참전복 치패 약 8만 마리를 확보하였음.
- 3배체와 2배체의 채묘 후 140일째 성장을 측정한 결과 3배체의 평균 각장은 14.43 ± 1.32 mm, 2배체의 평균 각장은 12.93 ± 1.07 mm로 나타났으며, 유세포 분석 결과 3배체는 97.1%가 배수체로 유도됨을 확인하였음.
- 채묘 후 150일째 10.5 mm 선별기로 2차 선별 후 평균 각장 1.7 mm의 3배체 치패 약 5만 마리를 생산하였으며, 2배체와 동일한 현장 적응력을 확인하였음 [그림 1-2-2].

(나) 고수온 내성 특징

- 최근 기후변화에 대응하기 위해 3배체의 고수온내성 형질을 검토하고자 3배체와 2배체를 대상으로 고수온내성 실험을 실시하였음.
- 실험은 직사각형 콘크리트 수조(길이 3 m x 폭 1.2 m x 높이 0.8 m)에 2배체 150마리(평균 각장 77.39 ± 3.18 mm) 및 3배체 150마리(평균 각장 70.35 ± 2.89 mm)를 수용하고 22°C 해수를 1일 1°C 상승시켜 31°C에 도달하면 항온 조건으로 고수온 노출 실험을 진행하였음.
- 수온 조절은 자동수온조절장치(아쿠아트론)를 이용하였고, 실험은 9월 13일부터 폐사 개체를 확인하여 누적 생존율을 계산하였고, 실험구(3배체)의 폐사 개체는 유세포 분석을 통해 배수성을 재확인하였음.
- 대조구(2배체)는 노출 9일째부터 폐사가 발생하여 26일째 50%(77마리)의 폐사율을 나타냈지만, 실험구의 경우 노출 18일째 폐사가 확인되었고 실험 종료 시까지 대조구에 비해 적은 폐사율을 보였으며, 대조구의 50%가 폐사하는 시점에 실험구는 7%(11마리)의 폐사율을 확인하였고 이는 대조구와 유의적인 차이를 보였음[그림 1-2-3].

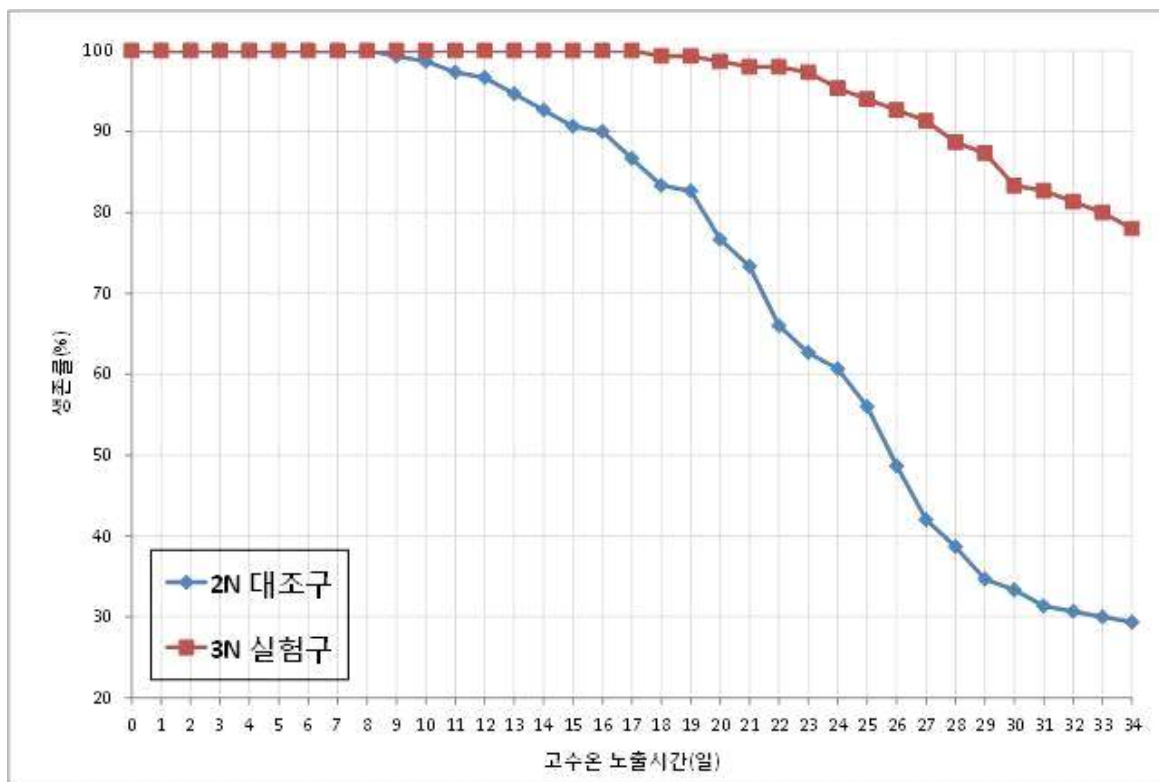
[표 1-2-1] 시험생산 참여기업 배수체 육종 참전복 치패 사육 일정표

날짜	사육일수	내용	비고
4월 5일	0 일	수정 및 배수체 조작	1,500만 개 수정란
4월 10일	5 일	채묘	
5월 20일	45 일	분말사료 공급 시작	
6월 15일	70 일	알갱이사료 공급 시작	
7월 20일	85 일	1차선별	폭 7 mm 채 사용
9월 4일	150 일	2차선별	폭 10.5 mm 채 사용
11월 26일	230 일	3차선별 예정	
1월 20일(2018)	290 일	출하 예정	



[그림 1-2-2]

배수체 육종 참전복 현장 모니터링



[그림 1-2-3]

고수온 실험에 따른 3배체(3N)와 2배체(2N)의 누적 생존율 비교

나. 참여기업을 활용한 수출용 배수체 전복 대량생산

(1) 완도 참여기업: 늘품수산

- 제1세부프로젝트기관에서 사육환경 조절을 통해 적산수온을 조기 획득하여 성숙한 산업화계통 모패로 배수체 참전복 유생을 생산하였음.
- 1차 대량생산에 사용한 모패는 암컷 300마리와 수컷 40마리로, 암컷을 먼저 2시간 동안 간출 자극하여 자외선 조사해수가 담긴 산란통에 수용한 후 수컷은 1시간 40분간 간출 후 역시 자외선 조사해수가 담긴 산란통에 수용하였음.
- 수용 후 매 시간마다 방란 및 방정을 확인하면서 자외선 조사해수를 교환해주었고 방란과 방정이 확인된 산란통은 1시간 후 충분한 알과 정충이 방출된 것을 확인하고 수거하였음.
- 회수한 난은 상층부에 부유하는 부유물과 비정상난을 2-3회 정도 제거한 후 약 2,500만 개씩 2개의 수정용 용기에 분주하고 운동성이 활발한 정자를 이용하여 인공수정을 실시하였음.
- 수정란은 수정 후 즉시 프로젝트 1단계에서 확립된 배수체 유도 조건으로 배수화 처리하여 16°C에 5일 간 유생을 관리하여 적산수온 1030°C 전후의 적정 채묘 시간에 유생 약 1억 마리를 수거하여 완도 참여기업으로 수송 후 채묘작업을 하였음[그림 1-2-4].

(2) 진도 참여기업: 연일수산

- 전남 진도군 고군면에 위치한 참여기업은 종자 생산시설을 보유하지 않아 육종 참전복 배수체 종자 대량생산은 제1세부프로젝트 기관의 종자생산 시설에서 산업화계통 모패 암컷 150마리와 수컷 20마리를 사용하여 방란 및 방정을 유도하였음. 수정란은 즉시 배수화 처리를 하였고 16°C에서 부착기 유생까지 사육을 실시하여 채묘시기에 도달했을 때(적산수온 1030°C) 참여기업의 종자 사육시설로 운반하여 규모류가 배양된 사육수조에 약 5천만 마리를 채묘하였음[그림 1-2-5].

(3) 해남 참여기업: 해성전복양식 / 입암포영어조합법인

- 해남군 참여기업의 육종 참전복 배수체 종자 대량생산은 암컷 300마리와 수컷 40마리를 사용하여 약 1억 마리의 유생을 생산하였음.
- 배수체 유도 과정을 마친 수정란은 16°C의 부화조에서 부착기 유생까지 사육을 실시하여 채묘시기에 도달했을 때 2개의 참여기업의 종자 사육시설로 각각 5천만 마리씩 사육수조에 채묘하였음[그림 1-2-6].

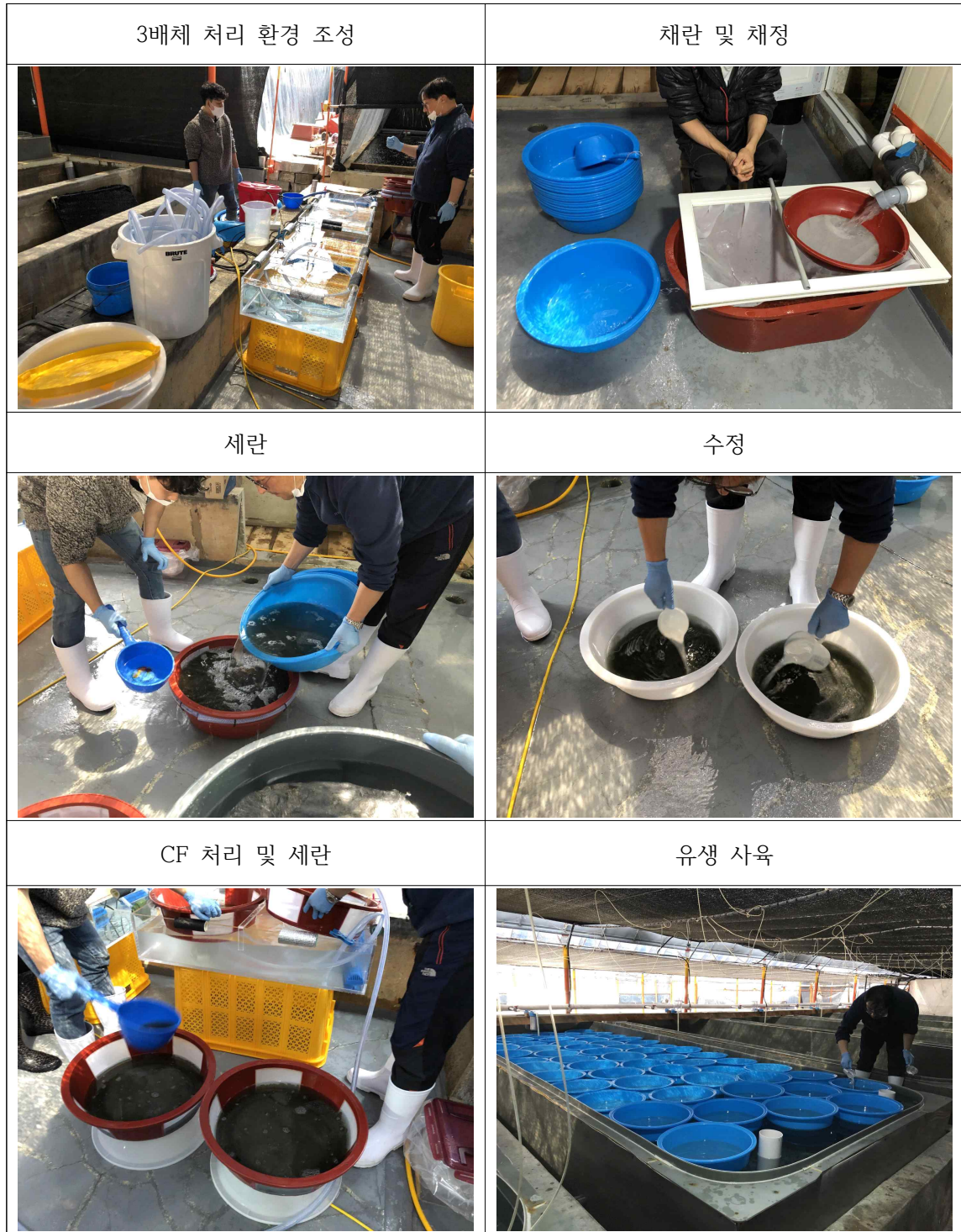


[그림 1-2-4]
 완도군 참여기업 육종 참전복 배수체 종자 대량생산



[그림 1-2-5]

진도군 참여기업 육종 참전복 배수체 종자 대량생산



[그림 1-2-6]

해남군 참여기업 육종 참전복 배수체 종자 대량생산 및 유생관리

다. 배수체 육종 참전복의 사양관리 기술 지원

(1) 배수체 육종 참전복의 환경조건에 따른 사양관리

- '18년에 배수체 육종 참전복을 대량으로 생산하여 각장 4 cm까지 대량 탈락 및 폐사가 없이 빠른 성장을 나타내어 매우 좋은 성과를 얻었음.
- 생산된 배수체 육종 참전복 치패(각장 4 cm 이상)의 출하시기까지의 성장을 포함한 다양한 특성을 조사하고자 참여기업의 해상가두리에 입식('18년 12월)하였음. 모니터링 진행 중 '19년 10월 일부지역에서 폐사가 발생하였음[그림 1-2-7].
- 폐사원인 규명을 위해 '19년 생산한 배수체 육종 참전복 치패(각장 4 cm 이상)를 이용하여 수온, 염분 및 용존산소 조건에 따른 실내·외 사육환경 특성 조사를 진행하였음[그림 1-2-8, 9, 10].

가) 배수체 육종 참전복의 실내 사육환경 특성 조사

- 수온: 23°C(대조구), 27°C 및 31°C 노출 실험 결과, 27°C 실험구에서 27일간 생존율이 100%로 나타났으며, 31°C 실험구에서 배수체 육종 참전복은 노출 5일째부터 폐사가 발생하여 27일째 생존율이 약 1%로 나타났음.
- 염분: 염분농도 31-33psu(대조구), 27psu, 25psu, 23psu, 20psu, 17psu, 14psu의 노출 실험 결과, 대조구를 포함한 27, 25psu 실험구에서는 생존율이 100%였으며, 23psu, 20psu, 17psu 실험구에서는 90% 이상의 높은 생존율을 나타냄. 반면 14psu 실험구에서는 노출 4일째부터 폐사가 발생하여 실험 종료 시 생존율이 55.7%로 확인되었음.
- 용존산소: 용존산소농도 7~8mg/L(대조구)를 기준으로 4mg/L, 3mg/L, 1mg/L에서 각각 12시간 노출 후 용존산소농도 7~8mg/L로 회복시키는 방법으로 진행하였으며, 그 결과 생존율이 90%로 나타났음.

나) 배수체 육종 참전복의 실외(해상가두리) 사육환경 특성 조사

- 실외(해상가두리) 사육환경 특성 조사를 위하여 4개소(A-D 지역)를 대상으로 '19년에 생산된 배수체 육종 참전복 치패(각장 4 cm 이상)를 해상가두리 한 칸당 1,300~1,500마리를 입식하고, 대조구로 동일한 수의 일반전복을 수용하여 5개월('20.5.~11.)동안 해상가두리 환경 모니터링(수온, 염분, 용존산소농도) 및 생존율을 조사하였음.
- 모니터링 결과 B 지역에서는 8월 14일에 최고 수온 26.4°C, 염분 농도는 10월 27일과 10월 30일에 2psu로 매우 낮게 확인됨. D 지역은 8월 16일 최고 수온이 26.3°C, 최저 염분 농도는 10월 29일에 10.4psu로 확인되었고, 8월 21일 및 9월 11일에는 용존산소농도가 0.2 mg/L로 가장 낮음을 확인하였음.

- 실험지역에 대한 배수체 육종 참전복의 생존율은 A 지역 69.4%, B 지역 49.2%, C 지역 56.9%, D 지역 65.1%로 대조구는 90% 이상의 생존율을 나타냄.

다) 배수체 육종 참전복의 사육환경 권고

- 본 프로젝트의 배수체 육종 참전복은 참전복 순수계통만을 이용하여 선발 육종된 모패로 생산한 품종이며, 현재 대부분의 양식현장에서 사육 중인 교잡전복 대비 저염분에 다소 취약한 것으로 보여짐.
- 따라서, 배수체 육종 참전복은 가능한 저염분 영향이 적은 외해의 해상가두리 사육을 권고함.

배수체전복 폐사 A지역



배수체전복 폐사 B지역-1



배수체전복 폐사 B지역-2

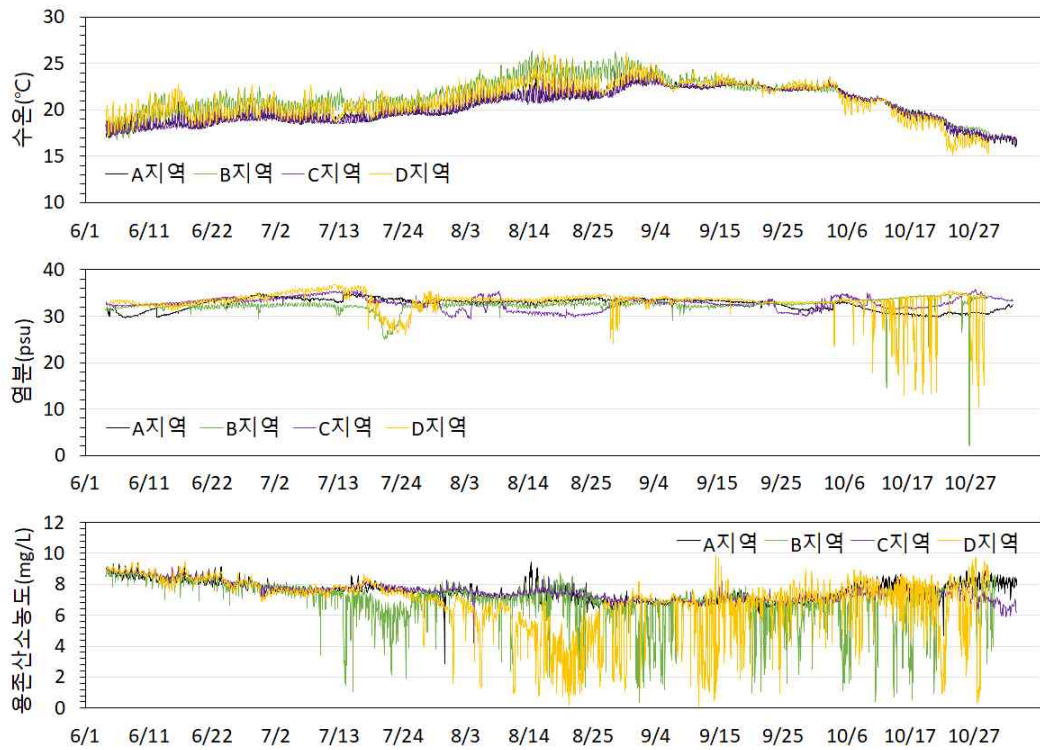


[그림1-2-7]

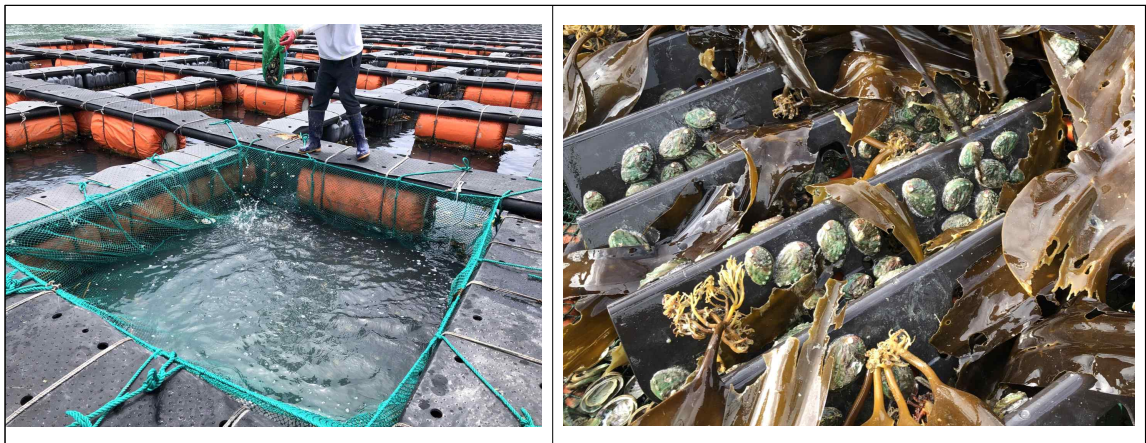
해상가두리 배수체 육종 참전복 폐사



[그림 1-2-8]
배수체 육종 참전복의 실내 환경 특성 실험



[그림 1-2-9]
실외 해상가두리의 사육환경 변화



[그림 1-2-10]
배수체 육종 참전복의 실외 해상가두리 환경 특성 실험

1-3. 수출 및 산업화 기반구축

가. 중국 전복 산업 현황

(1) 중국 전복산업의 최근 동향조사

- 우리나라에서 생산된 전복은 우리나라 내에서 소비되거나 일본으로 활전복이 수출되는 등 과거 수출국이나 수출상품이 다양화되지 못하고 편중된 양상을 나타내고 있음.
- 최근 중국의 경제성장으로 중국 내 전복수요의 증가, 세계적인 전복양식산업의 발달, 한중 FTA 체결 등 중국으로 우리나라의 활전복 수출이 실현되고 중국 수출용 전복 가공상품이 개발되는 등 한국전복산업의 새로운 전기를 맞고 있음.
- 따라서 최우선으로 육종 참전복 배수체 종자의 수출대상국을 중국으로 정하고 이를 위해 중국 전복산업 심포지엄에 참여함. 이는 중국 전복종자시장 조사와 판매망 확보를 위하여 전반적인 시장상황을 파악하고 후에 산업계의 직접 방문을 통하여 조사를 실시하였음.
- 최근에는 전복 산업의 큰 틀이 기존의 중국전복산업 중심지였던 북쪽해역에서 중국전복종자산업의 중심지인 남쪽해역으로 이동 중임. 그에 따라 푸젠성을 주 타겟지역으로 선정하여 시장조사를 실시하였고 이를 기반으로 한 판매전략을 수립하고 육종 참전복 배수체 종자의 판매망을 확보하고자 함.
- 중국의 주요 전복산지인 푸젠성 내의 렌장, 동산, 진장, 평탄 등을 방문, 현지의 대기업과 중견기업, 중소기업, 어민부터 학계, 연구계, 중국 정부의 수산관련 공무원, 수산연구원과의 직접 미팅 인터뷰를 통해 정보를 수집함.
- 또한 지속적으로 중국 내외의 뉴스 및 정부 정책 변화 등 모니터링을 통해 중국의 주요 수산 정책 변화와 중국 전복산업의 현황을 파악하고 이에 적합한 참전복 종자의 중국 수출을 위한 전략 수립에 필요한 정보를 수집함.
- 중국의 전복산업은 지난 5년간 급격한 생산 확대로 전복의 과잉생산과 이에 따른 가격 하락을 거쳐 일시적 생산부족, 가격 상승의 현상을 나타나고 있음.
- 2017년 전반기에는 대체적으로 전복양식 물량의 증가로 전복과 종자 모두 과잉생산되었으며, 경기침체로 인한 수요 하락으로 가격 하락이 동반되면서 중국전복산업이 위기의 조짐을 보였음.
- 현재는 체계적이지 못한 전복종자 교배로 교잡전복종자의 난립으로 중국전복종자의 질과 생산성이 전반적으로 저하되어 중국정부가 이를 인식해 우량전복종자 생산을 위한 예산을 집중 지원하고 있으며, 종자 관련 관리제도의 도입 등 정부 주도하의 강도 높은 전복산업육성책을 준비 중임.
- 2016년부터 수출되기 시작한 우리나라 전복은 동일종이지만 중국전복보다 저렴하게 거래되는 것으로 조사되어 우리나라의 덤핑 수출의 문제점과 우리나라 전복 브랜드 가치의 저하가 우려됨.

- 최근에 새롭게 떠오른 전자상거래를 통한 수산물 판매는 중국 수산물시장의 새로운 돌풍을 일으키고 있고, 중국정부 역시 이를 제도적으로 지원하며, 전자상거래업체와 각 지역의 수산물생산업체와 협업 및 통합을 추진하고 있음.
- 전복산업 역시 이러한 지원에 힘입어 활전복을 비롯한 다양한 전복상품이 전자상거래 시장에서 조만간 크게 활성화될 것으로 조사됨.

※ 국제사회의 무역 거래 측면에서 COVID-19로 인한 국경봉쇄 및 지역 간 이동 등이 크게 제한됨으로서 주요 수출 대상국들인 중국과 일본으로의 수출이 용이하지 못하며, 주변 각 국들은 수출입 등 국가 간 무역 활동에 있어 각 국가들은 자국의 권리 보호 강화를 확대하고 있고, 때문에 생물 제품의 수출 등 산업화 추진 시 기술보호를 위한 최소한의 조치 마련의 필요성은 점점 더 중요시되고 있음. 아직 전 세계적으로 COVID-19의 확산세가 온전히 제어되지 못하고 있으나 국내의 경우 점차 안정화될 것으로 예상되는 바, 국내 전복양식 현장의 수요가 조금씩 회복될 수 있으리라 기대됨. 단, 국제시장의 경우 수출 대상 주변국과의 국제정세 변화 및 COVID-19 영향권에 있는 수산물 국제 시장의 동향에 대한 면밀한 검토와 조사가 더욱 중요할 것으로 판단됨.

(2) 중국 전복양성 및 종자 생산 현황

- 최근 중국의 전복양식 생산량은 2013년에 110,380톤, 2014년에는 115,397톤, 2015년에는 127,967톤으로 매년 증가하는 추세를 나타냈으며, 이 중 복건성에서의 생산량이 전체생산량의 약 79%를 차지하고 있음[표 1-3-1].
- `13-`14년 중국전복산업은 시장에서의 수요 감소로 급격히 쇠퇴하여 이로 인해 가격이 하락하였음. 특히 전복 가격의 하락으로 전복양식의 생산성이 저하됨에 따라 전복종자 입식량이 감소했고 전복종자 가격도 하락하였음.
- 그러나 `15년부터 중국전복양식산업 경기가 다소 회복함에 따라 전복가격이 상승하였고, 이에 전복종자산업의 수익성도 상승하여 전복 종자 생산을 위한 신규 종자 생산장이 다수 건립되어 2016년에는 전복종자가 과잉 생산되었음.

[표 1-3-1] 2015년 중국의 지역별 전복생산량 및 양식

지역	전국	복건성	산둥성	광둥성	요녕성	절강성	해남성
생산량(톤)	127,967	100,979	15,165	8,482	3,050	168	123

- 중국 남부지역에서는 전복 종자생산을 봄철과 가을철 2번에 걸쳐서 하고 있음. 대부분이 가을철에 수정하여 4-6개월 간의 사육관리를 거쳐 각장 크기가 1.5 cm 치패로 생산하고 한 마리에 약 0.35-0.45위안에 거래되고 있으며, 각장크기 3 cm 이상은 1.5-2.0위안에 거래되고 있음.
- 현재 중국내의 전복종자 입식량을 보면 공급과잉으로 인해 전복가격 및 종자가 격도 하락할 것으로 예상. 이러한 문제를 해결하기 위해서 중국 전복산업계 및 정부에서는 계획생산 및 계획판매 등의 방법으로 문제점을 적극적으로 통제관리 하고자 정책적으로 추진주에 있음.
- 2015년 중국내의 전복종자 생산량은 약 69억 마리이며, 이중 복건성에서의 생산량이 약 57억 마리로 전체 생산량의 대부분을 차지하고 있음[표 1-3-2].

[표 1-3-2] 2015년 중국의 지역별 전복종자 생산량

지역	전국	복건성	광둥성	요녕성	산둥성	광서성	기타
생산량 (만마리)	696,118	571,772	75,667	32,277	15,970	240	192

(3) 중국 전복시장의 변화

- 전 세계 전복산업 국가들은 최대의 전복시장인 중국을 공략하기 위해 다양한 홍보 마케팅으로 시장개척에 집중 투자하고 있음. 특히 호주, 뉴질랜드, 남아공 등 기존 중국시장에 이미 진출한 해외의 전복양식 국가들이 자국의 청정이미지를 적극적으로 홍보하고 있으며, 선진국의 인증된 수산물(노르웨이 연어, 알래스카 연어 등)이 프리미엄 제품으로 팔리는 것처럼 자국의 자연산 전복제품을 중국산 양식전복과 차별화하여 중국 내 프리미엄 수산물 시장을 개척하고 있음.
- 세계적 수산기업의 인수 및 합병 등으로 거대 기업화되는 추세에 따라 전복산업의 가장 큰 시장인 중국에서의 경쟁력을 갖추기 위해 국경을 넘어 합병이나 협업하는 사례가 늘고 있음. 특히 서로의 장점을 활용하는 생산기업과 가공기업, 수출과 유통기업 간 협업을 통해 전복 산업분야에서 경쟁력을 갖는 거대기업의 탄생이 가속화되고 있으며 치열한 국제경쟁에서 우리나라는 더 이상 경쟁력을 갖기 어려워지고 있음.
- 중국 내 전복기업 역시 정부의 적극적인 지원과 협업, 합병을 통한 거대 기업화 되어가고 있으며, 외국기업에 대항하여 시장지배력을 선점하기 위해 총력을 기울이고 있음. 또한 중국 정부의 일대일로 정책 발표 이후 해상 신 실크로드의 중심지로 선언된 푸젠성 등 주요 전복산업지에 대한 해외투자가 활발하게 이루어지고 있음.
- 대만과 중국 양안관계 회복으로 인해 대만화교들의 고향인 푸젠성에 대한 투자가

크게 늘었고, 국제전복산업을 선도하는 싱가포르를 통해 세계의 화교자본이 중국 전복산업에 활발히 투자되어 중국전복산업 발전의 큰 전환기를 맞고 있음.

(4) 중국 전복종자 신품종 개발 연구 현황

- 현재 중국 전복종자는 현장에서 무분별한 전복 중간 교배를 통해 체계적으로 관리되지 않는 경우가 대부분이고 부르는 이름마저 통일되지 않음.
- 중국 전복 종자연구소에서 분양한 초기 품종은 몇 세대에 걸친 교잡 등으로 본래의 우량형질은 없어지고 열성형질이 나타나고 있음.
- 때문에 중국정부도 전복종자를 체계적으로 관리하고 무분별한 교배를 단속하는 등 관련 법규와 제도를 강화하려는 준비를 하고 있으며, 국가인증 전복종자를 통해 우량전복종자의 보급을 집중 지원하고 있음. 그러나 이종 간 교배가 쉽게 가능한 현장 특성상 체계적인 전복종자 육종기술이 현장에 적용되기까지는 시간이 걸릴 것으로 예상됨.
- 중국이 지금 보유하고 있는 주요 전복 교배 품종은 대련1호(大连1号), 뤼판바오(绿盘鲍), 동이오1호(东优1号), 남일바오(南日鲍), 씨판바오(西盘鲍), King-abalone(皇金鲍) 등이 있으며, 이 중 국가 전복종자 품종 인정을 받은 것은 대련1호(大连1号), 동이오1호(东优1号), 씨판바오(西盘鲍) 3가지임. 현재 하문대학교의 주력 품종인 King-abalone이 4번째 국가 전복종자 품종으로 신청하여 인증 중에 있음.
 - **대련1호(大连1号) 교잡전복:** 대련1호(大连1号) 전복은 일본 이와테 참전복(*H. discus hannai*) 수컷과 중국 대련산 둥근전복(*H. discus discus*) 암컷 간의 교잡으로 만들어진 품종임. 중국과학원 해양연구소에서 개발한 제1위의 국가급 동물 신품종으로서 국가 신품종 및 우량종 승인위원회에서 중국 최고의 패류 신품종으로 2005년에 승인됨. 특징으로는 생존율이 높고 내성이 강하고 성장도 빠르고 품질이 좋음. 모패 집단과 비교하여 성장 속도가 평균 20% 이상을 향상되었고 생존율은 1.8-2.3배 향상되었음[그림 1-3-1].
 - **뤼판바오(绿盘鲍) 교잡전복:** 뤼판바오(绿盘鲍) 교잡전복은 뤼판바오(*H. fulgens*)와 참전복(*H. discus hannai*)을 교잡해서 만든 교잡품종. 현재 뤼판바오(绿盘鲍)가 성장속도와 생존율 면에 참전복보다 우수하여 주요 양식품종인 참전복을 대체해가고 있음. 참전복과 같이 키울 때 뤼판바오(绿盘鲍)는 상품 규격에 도달하는데 1년을 필요하지만 참전복은 1년 반의 시간이 필요함. 또한 생존율은 전복양식업자가 뤼판바오(绿盘鲍)를 선택하는 중요한 원인 중 하나로 고수온내성 형질을 보유하고 있어 안전하게 여름을 보낼 수 있기 때문임. 하문대학교 전복연구팀이 바다에서 2년간 양성실험 결과 뤼판바오(绿盘鲍)의 생존율이 참전복보다 26.8% 높았고 특히 여름철 고온 내성이라고 밝힘[그림 1-3-1].

- **동이오1호(东优1号) 교잡전복:** 동이오1호(东优1号) 교잡전복은 일본 도쿄도 오지마에서 4세대 까지 선발육종하여 고수온에서 높은 생존율을 나타내는 오분자기(*H. diversicolor*)집단의 암컷과 중국 대만에서 4세대까지 성장을 위주로 선발육종 한 오분자기(*H. diversicolor*)집단의 수컷을 이용하여 만든 교잡품종임. 이 품종의 특징은 사육 단계별 생존율과 생산량 모두 기존 대조군보다 35% 이상 향상됨.
- **남일바오(南日鲍) 교잡전복:** 남일바오(南日鲍) 교잡전복은 참전복과 둥근전복의 교잡 품종으로 해조류가 풍부한 남일도(지역명)에서 생산한 품종으로 지역명을 이용하여 남일바오(南日鲍)라 명명함[그림 1-3-1].
- **씨판바오(西盘鲍) 교잡전복:** 씨판바오(西盘鲍) 교잡전복은 일본산 말전복(*H. gigantea*)과 중국산 참전복(*H. discus hannai*)과의 교잡품종으로 최근 현장에 많은 보급이 되었으나, 다른 교잡품종과 혼재되어 단순히 이름만으로는 전복을 구분하거나 확인하기가 어려움[그림 1-3-2].
- **King-abalone(皇金鲍) 교잡전복:** King-abalone(皇金鲍) 교잡전복은 현재 중국전복종자시장에서 새롭게 만들어낸 신상품으로 모두가 자신의 상품이 King Abalone 이라고 주장하지만, King-Abalone 전복종자는 하문대학교에서 개발하여 이미 상표등록을 마치고 국가전복품종 인증을 신청하여 등록 진행 중인 품종임. 이 품종은 푸젠성의 전복양식 대기업과 협약을 맺어 독점 공급하기로 결정되어 일정기간의 시범 양식을 마치고 조만간 대규모 양식에 들어갈 예정이며, 교배품종은 아직 알려지지 않음. 중국 국내에 흔한 전복 규격은 통상 30-100 g 이지만, King-abalone 규격은 150-400 g 까지 키울 수 있으며, 껍질 표면이 윤이 나고 깨끗하고 겉모양이 최상급을 나타내고 있음. 또한 복면이 황금색으로 복면에 색깔과 광택이 없는 일반 전복과 구별되는 특징이 있어 이 때문에 바로 King-abalone 이름을 붙임[그림 1-3-2].

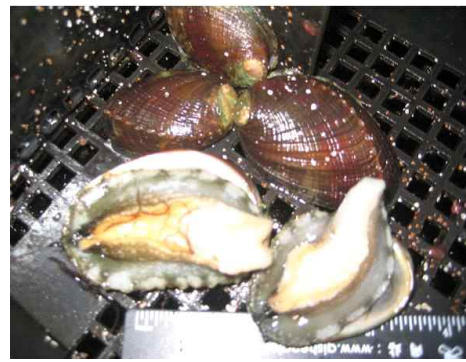
대련 1호



교잡품종 뿔판바오



동이오 1호 교잡품종



[그림 1-3-1]
중국의 전복 교배 품종-1

교잡품종 남일바오



교잡품종 King Abalone



[그림 1-3-2]

중국의 전복 교배 품종-2

(5) 중국 전복종자 생산지역 및 종자산업의 현황

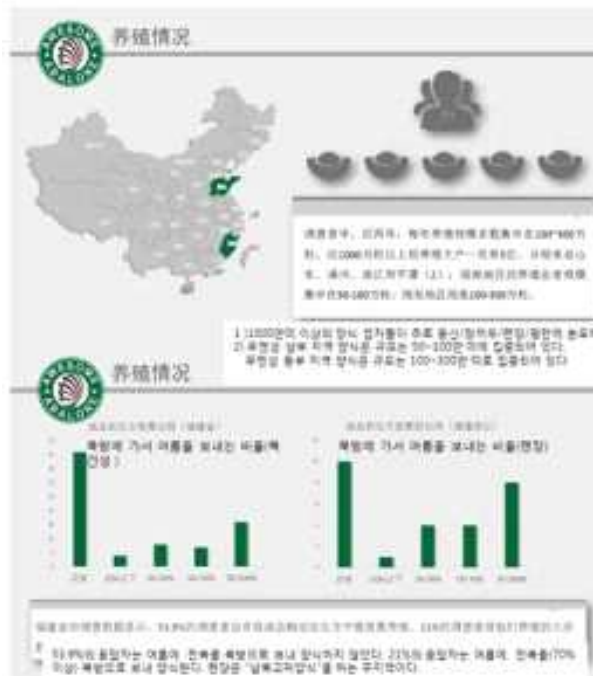
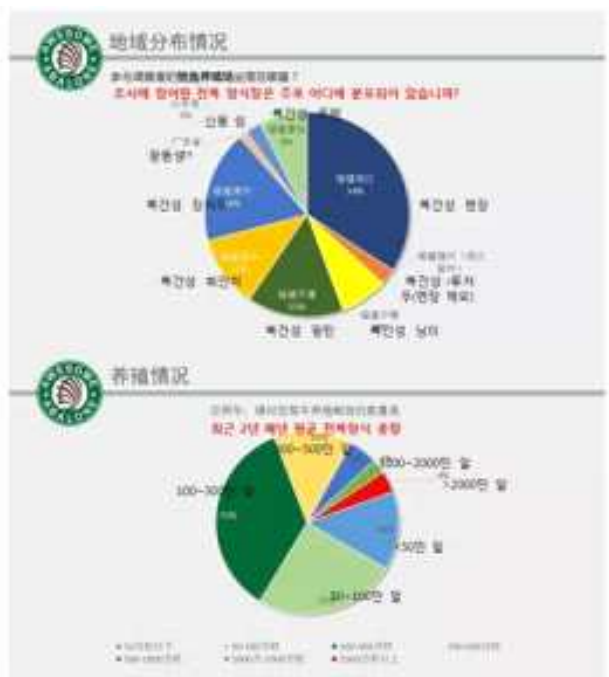
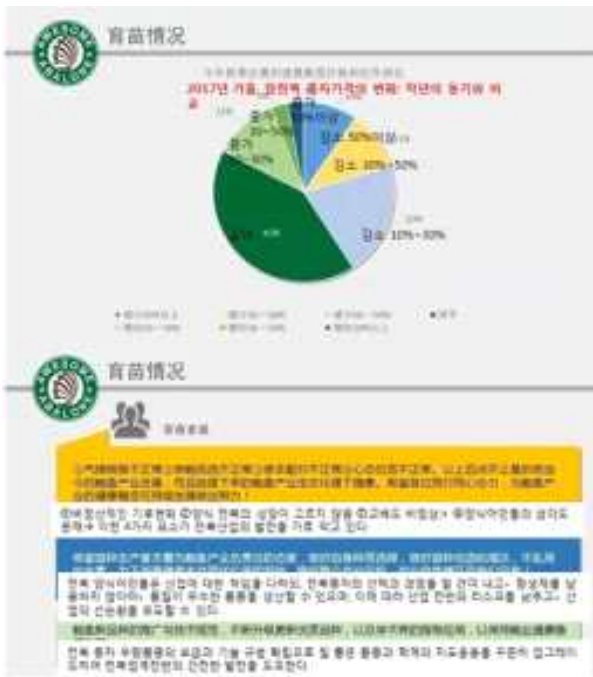
- 중국 최대 전복종자 산지는 푸젠성 동산현으로 푸젠성 최남단 지역, 광둥성과 인접하고 있으며, 중국 최대의 전복양식 생산지역이었으나 오랜 밀식과 기후변화로 인해 해상 양식에서 육상 양식으로 탈바꿈하게 되었음. 현재 중국 전복종자의 79% 이상이 여기에서 생산되는 것으로 알려져 있으며, 대부분의 중국전복양식대기업이 자체 전복종자양식장을 이 지역 부근에 소유하고 있고 직접 전복종자를 양식해 중국 다른 지역(푸젠성, 산둥성 등)의 자체 전복양식장에 공급하고 있음[그림 1-3-3].
- 이외에 전복종자 산지로는 푸젠성의 평탄현이 있으며, 중소규모의 전복종자양식장들이 혼재하고 있음. 대부분 자체 소유의 전복양식장에서 사용하기 위해 전복종자를 직접 생산하지만, 일부 업체는 대규모 기업형 양식으로 인접국인 대만에 전복종자를 수출하거나 다른 지역에 전복종자를 판매하고 있음.
- 중국의 남쪽지역은 1년에 2회 종자를 생산하며, 우리나라처럼 1년에 1번 가을에만 출하하는 경우도 있음. 2번 출하하는 곳은 선별을 2회 거쳐 국내외 시장에 크기별로 나누어 판매하고, 1번 출하하는 곳은 대부분 자체 소비용이거나 계약생산 형식으로 우량종자만을 판매하는 형태로 운영되고 있음.
- 다양한 교잡품종의 전복종자가 난립해서 중국전복종자 시장의 혼란이 가중되고 있고 이는 중국전복산업 발전의 저해 요인이 되고 있음. 따라서 중국정부는 전복에 품질인증제를 도입하여 품질에 따른 전복의 등급을 나누고 이에 따라 가격과 유통을 달리하여 전복산업을 체계화하고자 함. 이는 전복종자에도 도입되어 품종별, 규격별 전복종자의 상품화를 가속화 시킬 것으로 예상되며, 특히 주목해야 할 것은 중국은 일찍이 전복종자의 국가인증제도를 만들어 현재까지 총 3종의 전복종자에 대해 국가인증을 부여해 우량종자로 관리하고 있음.

2017秋季 鮰鱼育苗养殖 问卷调查报告

2017년 가을 전복종자 양식에 관한 설문 조사 보고서



[그림 1-3-3] 중국 2017년 가을 전복 종자 양식에 관한 설문 조사 보고서-1



[그림 1-3-3]

중국 2017년 가을 전복 종자 양식에 관한 설문 조사 보고서-2



1. 고품질 전복종자를 키워야 한다. 또한 더욱 생산량을 늘려 전복 양식여가의 수입을 높여야 한다.
2. 전복양식 업자는 양식 방법을 합리적으로 조정하여 자기 경쟁력을 높여야 한다.
3. 올해는 전복종자를 사기 적당하지 않음. 높은 가격 대비 낮은 생산을 이끌어 왔다.
4. 올해는 전복 양식 가격이 낮고, 작년 대비 전복 출자율이 비싸고, 미역 가격도 비싸서 전복 양식으로 이익을 보기 매우 어렵다.

[그림 1-3-3]
중국 2017년 가을 전복 종자 양식에 관한 설문 조사 보고서-3

(6) 중국 전복종자 유통시장 조사

(가) 중국 전복 유통시장 현황

- 중국 전복 유통시장 현황조사를 위하여 중국 전복 산업계, 학계, 정부 등의 담당자와 중국에서 회의를 통하여 정보를 수집하였으며, 이메일, 전화, 인터넷 뉴스 등을 검색하여 정보를 수집하였음.

<정보수집 대상기업>

- 대련 장자도어업그룹, 푸젠성 중신영풍주식회사, 핑탄현 란순기업, 동산현 푸다전복양식기업, 대련 해양도, 천진 DK, 청도CSCS 등

<정보수집 대학교 및 정부관계자>

- 중국 하문대학교, 중국 집미대학교, 중국해양과학원 해양연구소 등

(나) 중국 전복 생산방법 및 소비패턴 변화

- 2017년에 전 세계 전복 양식 총 생산량은 160,987톤이고 이 중 중국에서의 생산량이 139,997톤으로 전체의 87%에 달함.
- 전복생산 지역으로는 푸젠성이 전체의 80% 이상을 차지하며, 다음으로 광둥성, 산둥성, 랴오닝성 순으로 생산되고 있음.
- 최근 중국에서 유행하는 전복양식 방법으로는 남북릴레이 방법으로 수온 상승 등의 환경여건에 맞추어 겨울에는 남방(푸젠)에서 여름에는 북방(산둥, 랴오닝)에서 양식하여 전복의 생존율 및 성장률을 높이는 방법을 사용하고 있음. 이 방법으로 2017년 양식한 전복 생산량은 약 18,000톤으로 추정됨.
- 북방에서 전복양식은 해삼, 미역 등과 함께 생산하는 혼합 양식법을 사용하여 이윤을 증가시키고 있음.
- 중국 전복 산업계는 다양한 전복 요리와 제품 형태를 개발하고 있으며, 활전복 뿐만 아니라 가공상품 및 주변 부산물도 가공하여 시장에 판매하고 있음.

나. 중국 전복종자 시장 및 유통시장 조사

(1) 중국 수산종자 수입현황

- 2010년대에 들어 중국에서 수입하는 대표적인 수산종자는 연어로 중국에서 가장 많이 소비되는 수산물 중 하나이며, 노르웨이에서 대부분 수입되고 있음. 중국의 소비 특성상 냉동이나 선어보다는 활어를 선호하기 때문에 산동성에 위치한 “동방해양”에서 연어 발안란을 수입하여 양식하고 있음. 노르웨이에서 수입된 연어 발안란은 3배체로 들어오기 때문에 자발적인 생산 확대는 불가능함.

(2) 중국 전복종자 생산현황

- 중국 전복 양식은 주로 푸젠(福建), 산둥(山東), 랴오닝(辽宁), 저장(浙江), 광둥(廣東), 하이난(海南) 등 6개 지역에서 이루어짐. 양식 품종별로는 참전복이 현재 중국의 주요 양식 품종이며, 하이난과 광둥지역에서 소량의 오분자기를 양식하고 지역에 따라 시볼트전복과 녹색전복을 양식하고 있음. 어업 통계에 따르면 2016년 중국의 전복 생산량 139,697톤 중 푸젠이 112,611톤으로 총 생산량의 81%를 차지하고 있음[그림 1-3-4].
- 중국에는 약 4,600여 곳의 종자생산장이 있으며, 통계에 따르면 2018년 봄철 전복 치패 생산량이 약 95.75억 마리로 전년 대비 33.5% 증가하였고 이 중 푸젠성 약 49.9억 마리, 광둥성 약 39억 마리, 산둥성 엔타이와 룡청, 랴오닝성 다렌 등 북부 연해 지역이 약 6.85억 마리를 생산하였음. 남부 종자생산장은 푸젠성 장저우, 광둥성 산터우, 후이저우 등 연해지역 양식지구에 집중되어 있음 [그림 1-3-5, 6][표 1-3-3].

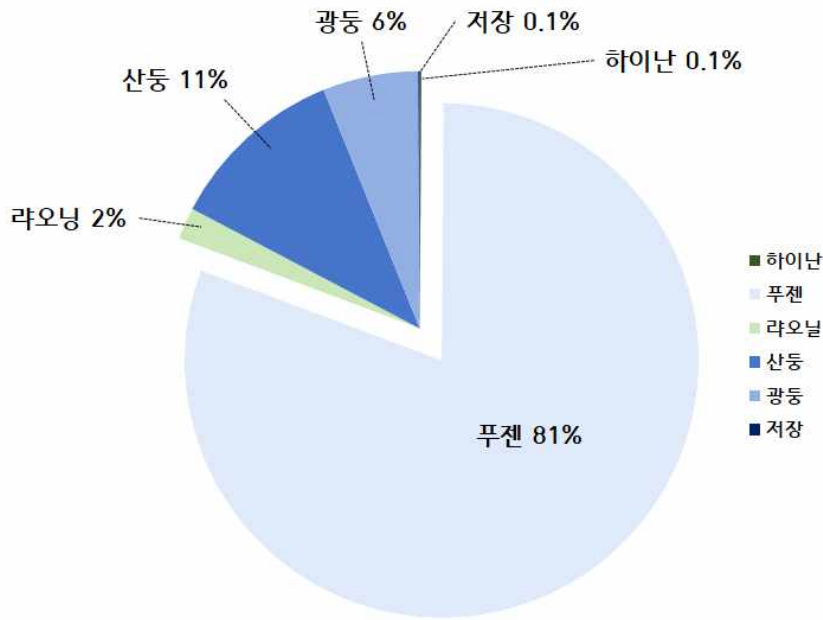
(3) 중국 전복종자 가격하락 현상

- 2017년부터 최근까지 낮은 가격을 유지하고 있는 전복 성패의 가격은 현재 86~100위안(15,000~17,000원)/kg으로 이익이 거의 없는 것으로 생각됨.
- 2월 참전복의 치패 크기가 0.8 cm면 0.1~0.13위안(한화 17~22원)/마리이고, 3~4월에 크기가 1.5 cm 이상이면 가격이 0.15~0.23위안(한화 25~39원)/마리로 작년 같은 시기의 가격은 0.45~0.56위안(한화 76~94원)/마리로 가격하락 현상을 나타냄. 녹색전복 규격 0.8 cm 이상의 가격이 0.3~0.38위안(한화 50~63원)/마리이고, 작년 같은 시기의 가격은 0.5~0.68위안(한화 84~114원)/마리로 뚜렷한 가격 하락 현상이 있음.
- 종패 가격이 심각하게 하락하여 수익성이 급속도로 떨어지고 일부 종자장에서는 손해가 발생하고 있으며, 종자의 전반적인 형세는 수익성이 낮은 편으로 전망이 밝지 않음.
- 전체적으로 볼 때 2018년 봄철 전복 종패 생산량 증가 폭이 매우 크며, 양식

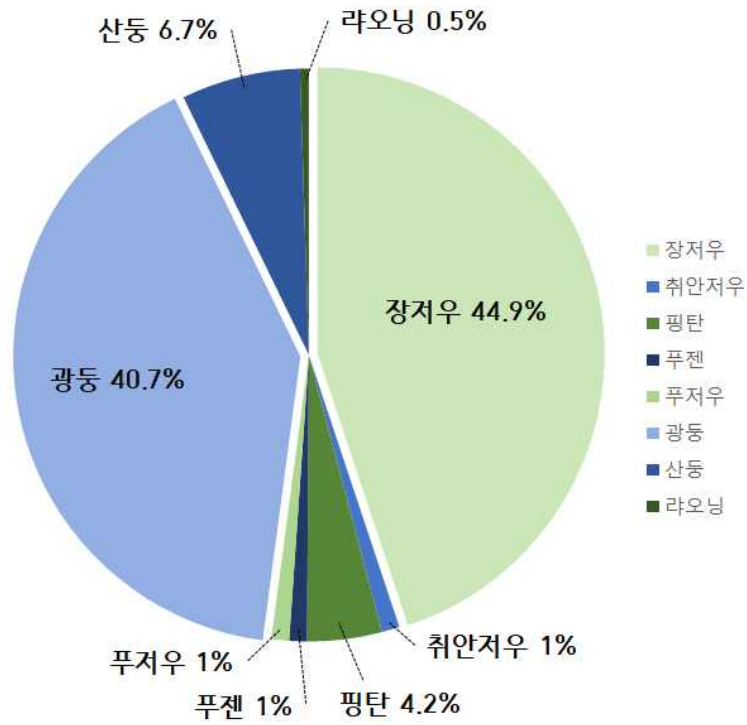
수요를 초과하였기에 종패 가격의 하락이 예상됨. 이는 내년 양식량이 많아질 것으로 예상되며 상품 전복의 가격 또한 하락할 것으로 예상됨.

(4) 중국 전복품종 생산현황

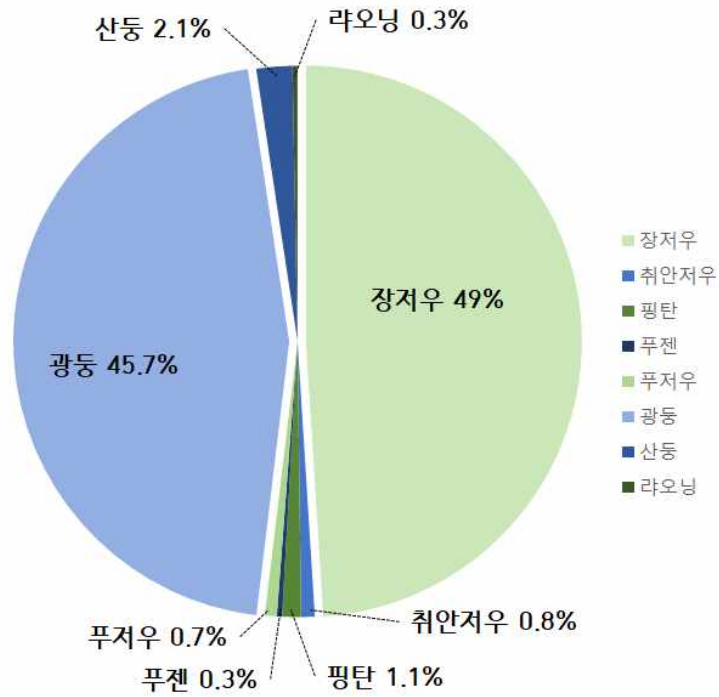
- 중국은 참전복을 주요 품종으로 생산하며, 최근 품종개량으로 시볼트전복과 녹색전복이 양식업자로부터 각광을 받고 있음. 하지만 이 개량 품종의 생산은 기술적 문제점이 완전히 해결되지 않아 품질이 고르게 생산되지 않음. 따라서 아직까지 현장보급은 지연되고 있음. 올해 시볼트전복과 녹색전복의 종자생산량은 다소 증가하여 전복 총 종자생산량의 25%를 차지하였으며, 규격 1.5 cm 이상의 가격이 0.3위안(한화 50원)/마리 이상으로 판매가 되어 수익성이 좋아 종자생산 중의 리스크를 비교적 적게 받는 품목임.
- 중국에서 교잡육종법을 이용하여 개발한 주요 전복 교배 품종은 대련1호(大连1号), 뤼판바오(绿盘鲍), 동이오1호(东优1号), 남일바오(南日鲍), 씨판바오(西盘鲍), King-abalone(皇金鲍) 등이 있음.



[그림 1-3-4]
중국 전복양식 분포 현황



[그림 1-3-5]
2018년 봄철 중국 전복 종자업체 분포



[그림 1-3-6]
2018년 4월 중국 전복 종자생산량 분포

[표 1-3-3] 2018년 4월 중국 전복종자 생산현황

번호	지역	육묘량(만미)	육묘장(개소)
1	푸젠 장저우(등산, 장푸, 자오안, 원샤오)	430,000	2,250
2	푸젠 취안저우(진장, 후이안)	9,000	40
3	푸젠 핑탄	40,000	50
4	푸젠 슈위	10,000	15
5	푸젠 렌장	10,000	30
6	광둥 산터우, 후이저우	390,000	2,100
7	산둥 룽청, 옌타이	64,000	100
8	랴오닝 다렌	4,500	15
합계		957,500	4,600

(5) 중국 전복종자 유통시장 조사

(가) 중국 수산물 냉장 냉동식품 및 활어 유통현황 파악

- AT 칭다오 사무소 및 수협 칭다오 사무소의 물류센터는 냉장·냉동식품의 중국 시장개척을 위해 저온유통(Cold-Chain) 인프라 및 물류운송 지원 목적으로 한국 수출업체 및 수입바이어 마케팅과 물류서비스를 지원하고자 2015년 5월 한국농수산물유통공사 법인으로 설립되었음[그림 1-3-7].
- 칭다오는 물류인프라가 우수하며 통관의 신속성으로 수출활성화에 유리한 거점으로 베이징, 상하이, 청두 등 대도시를 비롯하여 고속도로, 항공 등 접근성이 매우 우수함.
- 한국 수산식품의 저온인프라 지원으로 수출경쟁력을 강화하고 시장진출을 확대하고자 한국산 식품 수입바이어(유통업체) 및 수출업체를 대상으로 한국산 냉장·냉동 수산식품과 활어의 입출고·재고관리·물류비용 등을 지원하고 있음.
- 냉장 냉동창고(활어): ‘입출고료 + 창고 보관료’의 80%
- 물류비: 통관 후 ‘항구 → 창고 물류비’ + ‘물류센터 → 내륙운송’의 80%
- 단, 조미김·미역 등 상온제품은 지원 제외임.
- 전복 등 패류의 경우 웨이하이 시에 있는 수조에서 보관·유통하고 있으며, 어류는 활어로 수입되지 않고 있음.
- 중국 내에서 우리나라 수산물은 청결하고 믿고 먹을 수 있는 식품이라는 인식이 강함. 때문에 국내 전복 종자가 중국 시장에 진입하기 위해서는 가격 경쟁력을 갖추는 것보다 질적 경쟁력을 확보하는 것이 유리하며, 이를 활용하여 전복 종자뿐만 아니라 전복의 크기나 맛 등의 품질을 향상시키고 유통과정에서의 위생을 강조하여 프리미엄 식품으로 부각할 필요가 있음.

나) 중국산 전복의 수입량 및 수입액 조사

- 대한무역투자진흥공사(KOTRA)에서 중국 국내 전복 수입금액 및 수입량(2016~2018년)을 조사한 결과에 따르면 중국 국내 활·신선·냉장 전복의 수입액과 수입량은 모두 호주 다음으로 2위를 차지했으며, 가공한 전복 통조림류는 태국, 호주, 세네갈, 뉴질랜드, 남미에 이어 6위를 차지했음[그림 1-3-8].



칭다오 한국농수산물 물류센터 현황

2019. 8



1. 칭다오 aT 물류 현황

1. 칭다오 aT 물류 현황

■ 일반사항

- 한국농수산물유통공사 100% 출자법인
- 2011. 10. 12 법인설립
- 기능: 한국 수출업체 및 수입바이어 마케팅과 물류서비스 지원
- 칭다오는 물류인프라 우수, 통관의 신속성으로 수출활성화 유리

○ 애칭: aT의 중국어 발음 aite

■ 지입업무

- 물류지원사업(농수산물 공동물류 및 클드체인) 중국지역 총괄

칭다오 aT 물류유한공사

■ 설립 배경

중국인 한국의 제 2위 수출대상국으로 급성장

대 중국 한국식품 수출은 지속 확대 추세: 2007년 이후 2위로 지속 성장
- 수출 상위 3개국(일본, 중국, 미국) 중 2위로 중요성이 날로 부각

한국식품 주요 수출국가



칭다오 aT 물류유한공사

■ 설립 배경

- 중국 냉장 냉동식품 시장은 2010년을 전후하여 급속 성장
- aT에서는 냉장 냉동식품의 성장 가능성을 높게 평가 2010년부터 공동물류센터 지원사업(창고 보조비 지원)을 시작
- 저온유통(Cold-Chain) 인프라 구축을 통한 유통과정 중 발생하는 손실 최소화
- 칭다오 물류센터 설립(15년 5월)은 적극적인 냉장 냉동식품의 중국시장 개척을 위해 인프라 및 물류운송 지원(내륙운송비 지원, 16년 5월) 목적으로 설립
- 19 한중 FTA 체결에 따른 적극적인 시장개척 활동과 취약한 물류여건에 대응한 효율적 유통체계 구축으로 물류센터 설립 및 물류지원

칭다오 aT 물류유한공사

■ 칭다오 한국농수산물 물류센터 개요

인근개요

- 시 명: 한국 농수산물 수출단지지 지원
- 역: 칭다오시 칭양구 유양가도 공영로영업내
- 부지용도: 공업용지
- 건설기간: 2013.02~2014.11 (13개월)
- 지용면적: 2015.9.13
- 용적내용: 냉동/냉장(상온) 사용물류창고

공시개요

- 전체 부지면적: 25,719㎡ (3,793평)
- 물용면적: 신축 12,853㎡ (1,933평)
- 사용면적: 15,866㎡ (2,386평)
- 공사내용:
 - 냉동·냉장창고 1개동 (1,783평)
 - 상온창고 1개동 (1,962평)
 - 부속동(냉장실, 냉장실, 냉동실 2개동,내외벽)
 - 적하창/관제하네바저장수직장치실/충당구역

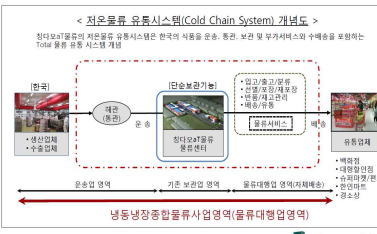
■ 부지 접근성

- 주요지역과의 접근성 양호
 - 류팅광항: 4km
 - 칭다오항: 20km
 - 칭다오항: 40km
- 주요 대도시와의 거리
 - 베이징: 600km(10시간)
 - 상하이: 700km(12시간)
 - 칭 주: 1,915km(40시간)
- 주요 고속도로와의 접근성
 - 칭 인 (칭다오 - 인촨)
 - 칭 란 (칭다오 - 란저우)
 - 퉁 쑤 (퉁장 - 쑤이)
 - 칭 주 (베이징 - 상하이)

칭다오 aT 물류유한공사

- 주요 고속도로와 접근성
 - 칭인: 칭다오-인촨(남서회차지구)
 - 칭란: 칭다오-란저우(간수선)
 - 퉁쑤: 퉁장(헤이룽강성)-싼이(하이난도)
 - 칭주: 베이징-상하이

■ 칭다오 한국농수산물 물류센터 저온물류 유통시스템



칭다오 aT 물류유한공사

■ 칭다오 물류센터 운영 개요

- 추진방향
 - 보관기능에 한정된 물류센터의 기능을 보완할 수 있는 종합물류업체를 선정하여 물류사업 위탁
 - 지원업체 선정 및 지원금액 배정은 칭다오 aT 물류에서 직접 추진하고 물류서비스 운영은 칭다오 물류센터 위탁운영사인 현대어를 시행
- 위탁운영내용
 - 보관기능 및 유지보수·운영 등 시설관리 전담, 물류지원사업 대행
 - * 단, 통관부분은 위탁사와 화주간 계약으로 추진
- 위탁 운영 대상
 - 장고동 및 물류서비스: 냉동·냉장, 상온 운영 및 관리
 - 중국 공동물류센터 지원사업 지정 창고 (13개 도시 15개소)

칭다오 aT 물류유한공사

[그림 1-3-7]

칭다오 한국농수산물 물류센터 현황

중국 전복(HS 0307.81.90, 활·신선·냉장 전복) 수입액

단위: 천불, %

Rank	Partner Country	Thousands United States Dollars			% Share			% Change
		2016	2017	2018	2016	2017	2018	2018/2017
	World	30,340	44,149	66,009	100.0	100.00	100.00	49.5
1	Australia	21,194	43,278	60,970	69.9	98.0	92.4	40.9
2	Korea South	8,499	156	3,453	28.0	0.4	5.2	2113.5
3	New Zealand	470	525	1,354	1.6	1.2	2.1	158.0
4	South Africa	166	154	205	0.6	0.4	0.3	33.0
5	Japan	10	18	18	0.0	0.0	0.0	0.5
6	Malaysia	0	4	6	0.0	0.0	0.0	41.3
7	Indonesia	0	0	1	0.0	0.0	0.0	0.0
8	United States	1	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	Philippines	1	14	0	0.0	0.0	0.0	-100.0

자료원: 중국 해관총서

중국 전복(HS 0307.81.90, 활·신선·냉장 전복) 수입량

단위: 톤, %

Rank	Partner Country	Unit	Quantity			% Share			% Change
			2016	2017	2018	2016	2017	2018	2018/2017
	World	T	968	794	1,334	100.0	100.0	100.0	67.9
1	Australia	T	404	764	926	41.8	96.2	69.5	21.3
2	Korea South	T	548	12	368	56.6	1.6	27.6	2869.5
3	New Zealand	T	12	12	33	1.3	1.6	2.5	166.9
4	South Africa	T	3	3	5	0.3	0.4	0.4	51.0
5	Malaysia	T	0	1	1	0.0	0.1	0.1	32.4
6	Indonesia	T	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	Japan	T	0	0	0	0.0	0.0	0.0	3.9
8	United States	T	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	Philippines	T	0	1	0	0.0	0.2	0.0	-100.0

자료원: 중국 해관총서

중국 전복통조림(HS 1605.57.00, 조제하거나 보존처리한 전복) 수입액

단위: 천불, %

Rank	Partner Country	Thousands United States Dollars			% Share			% Change
		2016	2017	2018	2016	2017	2018	2018/2017
	World	225	420	569	100.0	100.0	100.0	35.7
1	Taiwan	62	130	304	27.6	31.0	53.4	133.8
2	Australia	111	137	133	49.4	32.6	23.3	-2.9
3	Senegal	0	0	40	0.0	0.0	7.1	0.0
4	New Zealand	5	140	40	2.4	33.4	7.0	-71.6
5	South Africa	29	1	38	12.8	0.2	6.7	4738.5
6	Korea South	12	9	14	5.3	2.2	2.5	53.3
7	Mexico	6	2	0	2.6	0.6	0.0	-100.0
8	Chile	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-100.0
9	Philippines	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-100.0

자료원: 중국 해관총서

중국 전복통조림(HS 1605.57.00, 조제하거나 보존처리한 전복) 수입량

단위: 톤, %

Rank	Partner Country	Unit	Quantity			% Share			% Change
			2016	2017	2018	2016	2017	2018	2018/2017
	World	T	13	9	18	100.0	100.0	100.0	99.9
1	Taiwan	T	10	6	10	74.9	68.6	57.5	67.6
2	Australia	T	3	2	4	19.6	17.3	23.2	167.7
3	Senegal	T	0	0	2	0.0	0.0	12.7	0.0
4	New Zealand	T	0	1	1	0.3	9.8	4.4	-9.46
5	South Africa	T	0	0	0	1.6	0.1	1.7	3020.0
6	Korea South	T	0	0	0	2.5	3.3	0.5	-73.2
7	Mexico	T	0	0	0	1.2	0.7	0.0	-100.0
8	Chile	T	0	0	0	0.0	0.1	0.0	-100.0
9	Philippines	T	0	0	0	0.0	0.1	0.0	-100.0

자료원: 중국 해관총서

수입관세율('19년 기준) 비교

연번	품목	HS CODE	관세율(%)			
			MFN (최혜국세율)	잠정세율	한중 FTA	APTA (아-태 5국 협정세율)
1	활·신선·냉장 전복	0307.81.90	10	7	7	-
2	조제하거나 보존처리한 전복	1605.57.00	5	-	0	3.9

주: 전복(HS 0307.81.90)의 한중 FTA 양허유형은 '10', 2024년부터 한국산 전복의 수입관세율은 완전 철폐됨
2020년 한중 FTA세율은 잠정세율보다 낮은 5.6%로 인하됨.

자료원: 중국 수출입세칙

[그림 1-3-8]

중국산 전복 수입현황

다. 국내외 전복종자 마케팅 전략 수립

(1) 국내외 전복시장 현황분석 및 마케팅 기초 전략 수립

○ 마케팅을 위한 고객 시장조사 및 경쟁사 분석

- 중국의 전통적 전복양식산업 중심지인 대련을 중심으로 넓은 지역에 전복양식 산업과 유통가공업이 발달했으나 최근 육지의 급격한 산업화로 인한 환경오염 물질의 유입과 이로 인한 적조의 빈번한 발생 등의 해양양식환경 악화로 점차 전복양식산업이 급격히 쇠퇴하고 있고 일부는 다시마, 해삼, 굴 양식 등 다른 양식품종으로 대체되고 있음. 특히 수요가 늘고 있는 해조류양식에 관심이 높고 일부 현은 양식주력품목으로 다시마나 김을 새롭게 집중 육성하고 있어, 앞으로 전복양식의 주 사료로 기존의 인공사료를 대체할 천연사료인 해조류의 생산이 늘어나 이 역시 남쪽 푸젠성의 전복산업이 질적으로도 성장할 수 있는 기반이 되고 있음.
- 산동성은 전통적인 바다전복양식의 중심지에서 새로운 기후변화에 걸맞는 남북교차릴레이 양식산업의 주요한 일부분을 담당하고 있는데, 주로 남쪽 복건성의 수온이 높아지는 여름철에 전복종자와 성패가 양식되고 성패의 경우 다시 복건성으로 내려가는 것이 아니라 산동성의 유통상을 통해 직접 판매 전복소비지역으로 유통되는 양이 늘어나고 있음.
- 여전히 중국북부 전복유통의 중요 중심지이기도 하며 육상전복종자양식 또한 다양하게 시도되고 있는 곳이기도 해서, 전복양성업체마다 고유의 전복교배기술과 다양한 교잡종을 가지고 있으며, 이런 점을 보완하기 위해 체계적인 전복종자관리를 제도적으로 뒷받침할 정책과 제도가 청도의 중국 해양과학국 등 정부 소속 연구기관을 통해 연구되고 있음
- 현재 중국 전복 전체의 약 70% 이상이 생산되는 새로운 중국전복양식산업의 중심지인 남쪽의 푸젠성은 기존의 오분자기 양식업에 이어 비교적 북쪽보다 늦게 참전복 양식산업이 활성화되었지만, 새로운 양식기술도입과 넓은 양식적지 등의 주변환경에 힘입어 매년 폭발적인 성장세를 보이고 있음.
- 특히 2015년 이후 매년 약 30%이상의 전복양식지가 늘어나고 생산량 역시 비약적으로 늘어나고 있으나, 주요 위험요인인 여름철 수온 상승으로 인한 전복폐사 증가와 잦은 태풍의 피해가 크다는 약점을 가지고 있음. 이를 남북교차릴레이양식으로 극복하는 새로운 양식방법이 늘어나고 있는 추세임. 또한 가까운 대만과 싱가포르 등 외국의 화교자본이 일대일로 정책에 따른 개발 붐을 타고 전복양식산업과 연관 산업에 대거 투자되고 있어 가장 활발하게 전복양식장 및 연구기관, 가공공장, 보관 창고 등의 전반 산업이 빠르게 성장하고 있음. 최근엔 각 지역 정부가 나서서 지역의 대표적인 전복산업기업을 집중 지원하는 지역별 경쟁도 발생하였음.

○ 수출시장의 수요와 기호 분석

- 현재 중국종자시장에서 가장 필요로 하는 전복 종자의 특성은 빠른 성장, 대형 전복 그리고 고수온내성으로 여름철 폐사가 적은 3가지를 기본조건으로 함.
- 오히려 전복종자의 품종은 그리 중요하지 않고, 다만 가공용 전복의 경우, 가공이후 소비자가 선호하지 않는 색상이나 형태가 나오지 않아야 한다는 등의 조건이 있으나, 이 점은 오히려 우리의 참전복 종자에게 불리한 점으로 나타날 수 있으며, 생각보다 중국 현지에서 전통 참전복 품종에 대한 선호도가 크지 않고 오히려 일반적인 보통의 중국산 전복종자와 동일하게 간주되어 품질이 보장되지 않는 대중용 전복으로 치부될 수 있음.
- 중요한 점은 기존 시장에서 중국산 일반전복이 차지한 중저가 시장을 공략할 것인지, 대부분의 수입산 대형전복이 점유한 프리미엄 고가 시장을 공략할 것인지 시장 선점 전략을 선택하는 것임. 우리나라 참전복 종자의 경우, 이러한 두 가지 형태의 시장에서 일반 중저가 전복이나 프리미엄 전복으로도 상품성이 높은 것으로 연구되었지만, 어느 시장이 더 적합하고 경쟁력을 가질지는 시범 생산을 통해 수익성이 나온 후 판단할 수 있음. 또한 각각의 시장에 맞는 다른 전복종자를 개발해 함께 공략하는 것도 한 가지 방법임.
- 종자의 경우, 이것은 안정적인 품질의 지속적인 공급이 가능한가의 문제가 가장 기본적으로 요구되는 조건임. 이를 위해 안정적인 전복종자의 대량 생산기반 구축이 필수적이며, 또한 전략적으로 전복종자의 대량생산 기반지역을 선택하여 마케팅에 활용해야 함.
- 현재 중국전복시장은 계속 발전하면서 다른 수산물과 마찬가지로 식품의 안전, 위생, 품질 등이 더욱 중요시되는 추세로 변화하며, 이를 보증할 각종 인증과 브랜드 가치 등 마케팅적 요소가 강조되고 있음. 따라서 한국산 참전복 종자의 국가인증 전복종자 지정이나 전복종자양식장의 친환경인증 등의 요소 역시 다른 전복 종자와의 차별화를 위한 상품화 전략에 필수적인 부분임.
- 또한 한국산 참전복 종자가 실제 중국해역에서 양식되어 얻은 결과가 없는 점에서 볼 때 소비자의 신뢰를 이끌어 낼 수 있는 적정 시범 양식장을 선정해 시범양식의 우수한 결과가 나온 후에야 상품으로서 판매가 가능하고 최소 1년 이상의 시범 양식을 통한 양식결과 도출이 필요함.

(2) 마케팅 전략 수립

- 현재 중국은 국가 주도로 수산양식업 전반에 걸친 대대적 혁신을 꾀하고 있음. 대표적인 것이 기존 자유 양식 제도에서 양식 면허제와 생산유통에 있어 다양한 쿼터제를 도입하는 등 선진국의 수산자원 관리체계와 비슷한 계획생산관리를 위한 제도와 법률을 준비 중임.
- 해조류와 전복 등 수산분야에서 기존 단순 무게만이 아니라 품질에 따른 등급제 도입, 생산 이력제 등 다양한 제도와 규정을 통한 생산유통전반 통합관리제도를 준비하고 있고 이는 김 미역 등 해조류부터 시작 후 다양한 수산물로 확대할 예정임.
- 전북양식업을 비롯하여 수산업 분야에서 기존 전통적인 수산업 발달 지역인 산동성 등 북부지역이 환경오염 등으로 쇠락해가고 있는 반면, 복건성을 중심으로 한 남부지역이 지리적 이점을 바탕으로 대만과 싱가포르 등 외국 화교자본의 투자와 정부의 전폭적인 수산업발전 지원정책에 힘입어 날로 수산양식업이 규모화 조직화되며 크게 발전하고 있음. 특히 전북산업의 경우는 이미 복건성이 중국 전체 전복 생산량의 79%를 차지했는데 앞으로 그 규모는 더욱 확대될 것으로 예상됨.
- 최근 사드사태로 촉발된 중국수출산업 전반의 피해는 앞으로 중국이 계속 국가 주도 하의 경제발전정책을 계속해나가는 한 더욱 커질 것으로 예상되며 이를 타개할 유일한 방법은 중국 국내 기업과 파트너십을 통한 연합 등, 철저한 현지화 전략 외에는 다른 방법은 없어 보임. 따라서 시시각각 변화하는 중국정부의 수산정책과 관련 제도의 상시 모니터링이 필요하고 이에 따른 한국수산품의 중국 시장 맞춤 수출상품화, 지역별 품목별 성장이 예상되는 대표기업과의 합자를 통한 공동 발전전략 모색 등이 필수적임.
- GSP 육종 참전복 배수체 종자 수출의 경우, 중국 내 전복 치패의 과잉생산으로 인한 가격 하락과 기술면에서 전 세계 교잡전복을 비롯한 육종전복 품종의 치열한 각축이 벌어지는 중국치패시장 내 한국 치패의 경쟁력을 인정받을 수 있는지 여부를 파악할 필요가 있음.
- 특히 대부분의 전복 생산 기업이 치패에서부터 성패까지의 양성을 포함하여 유통, 가공, 수출에 이르기까지 전 산업분야를 통틀어 조직화 되어있음. 복건성 역시 각 지역 별로 대표기업들이 지방정부의 지원과 외부자본의 투자를 받아 서로 세계전복시장에서의 각 산업분야의 우위를 점하기 위해 치열한 경쟁을 벌이고 있어 이것을 기회요인으로 우리나라가 우위에 있는 기술(육종기술, 가공기술 등)을 우수한 대표기업들과 파트너십을 맺고 합자해 동반성장을 모색하는 전략이 필요할 것임.
- 따라서 기존 출장에서 조사된 지역의 대표적 전복기업과 구체적 MOU 파트너십을 맺고 공동 시범 생산 같은 초기단계의 공동 협력방안을 조속히 실현시켜 육종 참전복 배수체 종자의 중국 수출 전략을 현실화시키는 것이 필수적임.

- 중국 내 우량 파트너사를 선정, 공동 시범 생산부터 시작해 마케팅 등 단계적 협력사업을 통한 관계를 강화하는 동시에 육종 참전복 배수체 종자의 경쟁력을 홍보하고 가치를 높이는 방안이 필요함.

(3) 판매(유통)망 조사 및 확보

- 렌장현 중신영풍주식회사: 복건중신영풍실업유한회사(中新永丰实业有限公司)는 중국전복의 고향 렌장이라고 부르는 지역에 소재하고 있으며, 1999년에 창립되어 몇 십 년 간 발전을 통해 경영 규모를 확장해왔으며 현재까지 총 투자액은 2.5억 위안, 회사 직원은 약 500여 명이며, 이 회사는 수산 생태 양식, 수상과 농업 관광 개발 등에 관한 현대적인 어업 기업으로 회사 창립 이래로 "최고 품질, 고객 만족"의 서비스를 시종일관 목표로 삼고 있음[그림 1-3-9].
- 평탄현 란순푸드: 란순푸드는 대형크기의 전복은 주로 대만으로 수출하고 중간크기는 활전복과 냉동전복으로 중국 국내시장에 유통하고 있음. 수조 약 1,000칸의 치패양성장과 해상 가두리 전복양식장을 보유하고 있음. 일 년에 두 번 출하하며 출하량은 평균 1천만 마리이며, 치패는 보통 수정 후 6~11개월 정도 양성하여 연간 약 1,000만 마리를 판매하거나 자체 양식장에서 양식함[그림 1-3-9].
- 진장현 복대수산전복유한회사: 진장복대전복수산유한회사는 진장시 진징읍 난지양 마을에 소재함. 전복종자육성작업장, 치패종자번식육성작업장, 순환수 양식작업장 등이 있음. 본 회사는 전복신품종 연구개발, 우량종자번식을 하는 대형전복 종자전문기업임. 주요제품은 "씨판바오", "뤼판바오"과 참전복 등 치패종자와 모패를 생산하고 있음[그림 1-3-10].

<p>패류 교역장</p>	<p>전복 전문 도매상</p>
<p>렌장현 전복 가두리양식장</p>	<p>중신영풍주식회사 전복 운반선</p>
<p>란순푸드 출하 직전의 교잡전복 치패</p>	<p>배수체 특성 설명 및 수출 상담</p>

[그림 1-3-9]
중국 렌장현과 핑탄현 현장 조사

<p>진장현 복대전복수산유한공사</p>	<p>유생 채묘용 비닐막</p>
	
<p>채묘 중인 유생</p>	<p>하문대학교 실험 사육장</p>
	
<p>패각색 유도 실험군</p>	<p>교잡전복</p>
	

[그림 1-3-10]

중국 진장현 복대전복수산유한회사


(4) 전복종자 중국 수출 통관, 제도, 법령 등 수출에 필요한 실질적 여건 조사

- 수출업체 준비사항 : 전복 종자 수출 코드 발급필요[표 1-3-4][그림 1-3-11].
 - 활전복 중국 관세율 2018년 기준 8.4% (종자코드의 경우 관세 0% 적용)
 - 중국산 전복종자에 비해 높은 생산단가 + 수입비용(관세)등으로 가격상승

- 수입업체 준비사항 : 중국수출 활수생동물 양식장 등록 후 업체코드 필요
 - 평탄 란순 주식회사 업체 등록하여 코드 발급 완료함
 - 중화 인민 공화국 농업 농촌부 동/식물 종자 수입신청서(원본)
 - 수입 계약서나 구매의향서(복사본),
 - 중국어 번역본(복사본)을 동시에 제공해야 함
 - 수산물 종자 생산 허가증(양식증),
 - 영업 허가증, 수출/수입 기업 자격증서
 - 수출/수입권이 없는 신청자는 위임계약서(복사본)를 제공해야 함
 - 수입신청 보고서(종자 수입 목적과 용도, 수입 수산물 종자의 생물학적 특성, 원산지 생태표기)

- 종자생산업체 준비사항
 - 수산물품질관리지원에 종자수출업체 등록 필요
 - 검역시행장 코드 수령 필요
 - 물류업체 확인 등

[표 1-3-4] 품목분류 사전 신청서

품목분류사전심사 신청서			처리기한 15일/30일		
① 신청인구분	<input checked="" type="checkbox"/> 수출입자 <input type="checkbox"/> 관세사 <input type="checkbox"/> 수출 제조자	② 수출입구분	<input checked="" type="checkbox"/> 수출 <input type="checkbox"/> 수입		
신청인	③ 회사(업체)명	마린씨드	④ 대표자 성명	이윤아	
	⑤ 사업자등록번호		⑥ 관세사부호		
	⑦ 주 소	우)14566 경기도 부천시	부천로 136번길 27 경기벤처센터 404호		
	⑧ 담당자성명	이윤아	⑨ 전 화 번 호		
	⑩ 휴대 폰 번 호		⑪ FAX 번 호		
	⑫ 전 자 메 일	marinseedkr@gmail.com	⑬ 처리과정수신방법	<input checked="" type="checkbox"/> 이메일과 SMS <input type="checkbox"/> 통보안함	
수출입자등	⑭ 수출입업체명	마린씨드	⑮ 담당자 성명	이윤아	
	⑯ 사업자등록번호		⑰ 전 화 번 호		
	⑰ 홈 페이지	www.marinseed.com	⑱ 전 자 메 일	marinseedkr@gmail.com	
	⑳ 주 소	우)14566 경기도 부천시	부천로 136번길 27 경기벤처센터 404호		
	해 외 거 래 처	㉑ 상 호	중신영풍유한회사(중국)	㉒ 홈페이지	http://www.fjzxyf.com/
신청 물 품	㉓ 품 명	배수체참전복종자 Triploid Abalone(<i>Haliotis discus hannai</i>) seed			
	㉔ 모 델	배수체참전복종자 Triploid Abalone(<i>Haliotis discus hannai</i>) seed			
	㉕ 규 격	각장 Shell length 15mm ~ 50mm			
	㉖ 원 산 지	한국 Korea	㉗ 거 래 가 격		
	㉘ 물 품 설 명	물품설명서(별지 제1호서식의 을지)에 기재			
	㉙ 검 토 품 목 번 호	030781 10	㉚ 통 관 예 정 세 관	인천세관	
기 타	㉛ 신 청 사 유	<input type="checkbox"/> 세율·세액 확인 <input type="checkbox"/> 관세환급 <input type="checkbox"/> 수출입요건 확인 <input type="checkbox"/> 원산지 확인 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(신규 HS코드 신청)			
	㉜ 신속심사요청유	<input type="checkbox"/> 해외 관세당국의 FTA 원산지 검증 확인 요청 <input type="checkbox"/> 수출입신고 임박물품 <input checked="" type="checkbox"/> 막대한 경제적 불이익 예상			
	㉝ 견본제출여부	<input type="checkbox"/> 제 출	㉞ 견본반환	<input type="checkbox"/> 반환불요 <input type="checkbox"/> 반환요	
		<input checked="" type="checkbox"/> 미제출	㉟ 사 유	생물로 제출 어려움	
	㊱ 결과 비공개 (제10조제1항 제1호에 한함)	사유	<input type="checkbox"/> 신규·계획단계물품 <input type="checkbox"/> 성분·제조비법 물품 <input type="checkbox"/> 그 밖의 비공개 정당사유 물품		
	내용	비공개 사유를 구체적으로 설명			
㊲ 수 수 료	품목당 ₩30,000(분석을 필요로 하는 물품에 한함)				
「관세법」 제86조제1항에 따라 품목분류사전심사를 신청합니다.					
2018년 7월 3일					
신청인 이윤아 (서명 또는 					
관세평가분류원장 귀하					
※ 필수 구비서류 1. 신청대상 물품의 견본 1점(견본 미제출 시 대체사진 3장) 2. 제조회사의 성분표(분석물품에 한함), 제조사양 설명서 1부. 3. 물품설명서 - 별지 제1호서식 을지					

청정! 관세평가분류원, 고객에 대한 약속입니다.



관세평가분류원

ONE-PASS

수신자 수신자참조
(경유)

제 목 품목분류 사전심사 회신(통보)

마린씨드의 2018년 07월 03일 품목분류 사전심사를 신청한 건(품명 : 배수체참전복종자 Triploid Abalone(Haliotis discus hannai) seed)에 대하여 아래와 같이 회신(통보)합니다.

- 아 래 -

1. 신청사항

- 신청인 성명 : 이운아
- 신청인 상호 : 마린씨드
- 신청인 주소 : 경기도 부천시 부천로136번길 27 (원미동)경기벤처센터 404호
- 수출입자 상호 : 마린씨드
- 통관예정지세관 :

2. 물품설명

- 품명·규격
Live, fresh or chilled abalone (Haliotis spp.): Triploid Abalone(Haliotis discus hannai) seed; R.KOREA
- 물품설명
성패 양성용의 참전복(Haliotis discus hannai) 치패
(크기 약 15~50mm)
- 용도 : 전복 양식장에서 성패양성용으로 사용
* 품목분류는 수출입신고 당시의 물품상태에 따라 변경될 수 있음

3. 결정내용

- 품목번호
0307.81-0000
- 분류이유
 - 관세율표 제0307호에는 '연체동물[껍데기가 붙어 있는지에 상관없으며 살아 있는 것과 신선한 것·냉장이나 냉동한 것·건조한 것·염장이나 염수장한 것, 훈제한 것(껍데기가 붙어 있는 것인지 또는 훈제 전이나 훈제과정 중에 조리한 것인지에 상관없다), 연체동물의 고운 가루·거친 가루와 펠릿(pellet)(식용에 적합한 것으로 한정한다)을 포함한다]' 이 분류되며, 제0307.8호에서 '전복[할리오티스(Haliotis)종]과 수정고둥류[스트롬버스(Strombus) 종]' 를 세분류하고 있음.

[그림 1-3-11]

관세평가분류원 답변 공문

- 같은 호 해설서에서 “연체동물의 대표적인 종류는 굴·가리비과의 조개·홍합·갑오징어·오징어·문어·달팽이·클램·새조개·피조개·전복·수정고동류이다. 또 이 호에는 굴 치패(稚貝 : 양식용의 새끼굴)와 식용에 적합한 연체동물의 고운 가루·거친 가루와 펠릿(pellet)도 분류한다.” 라고 설명하고 있음.

○ 따라서 본 물품은 성패 양식용의 살아있는 전복 치패이므로 관세율표의 해석에 관한 통칙 제1호와 제6호에 따라 제0307.81-0000호에 분류함.

※ 유의사항

- 상기 품목분류번호는 제시된 자료를 근거로 결정하였으므로 허위자료 제출 등의 하자가 있는 경우에는 무효가 됩니다.
- 통관지 세관장은 수출입물품이 품목분류사전심사 회신된 물품과 동일한 물품인 경우에 한하여 본 품목분류사전심사서의 품목번호를 적용합니다.
- 본 사전심사 결과의 유효기간은 통지받은 날로부터 3년이며, 재심사 결과 품목분류가 변경된 경우에는 변경된 통지를 받은 날부터 3년입니다.
- 이 결정에 이의제기 할 때에는 관세법 제86조제3항에 따라 이 회신(통보)을 받은 날로부터 30일 이내에 관세평가분류원에 재심사를 신청 할 수 있습니다.

KOREA CUSTOMS SERVICE

관세평가분류원

관세평가분류원장

수신자 품목분류관련그룹,마린씨드

관세청장 박건형 담당 김영희 과장 김동근

협조자

시행 품목분류2과-5478 (2018-08-07) 접수 ()

우 (34027) 대전광역시 유성구 테크노2로 214 / http://www.customs.go.kr

전화 042-714-7545 / 전송 042-936-3527 / park213@korea.kr / 공개

[그림 1-3-11]
관세평가분류원 답변 공문

(3) 배수체 육종 참전복의 SWOT 분석

(가) 강점(Strength)

- 한국의 고유 품종인 참전복.
- 검증된 시장 확장성(활전복부터 가공전복까지 활용가능).
- 선발육종연구를 통하여 경제형질 획득(속성장 및 고수온내성).
- 가식부 수율이 높음.
- 독보적인 육종기술 보유.
- 지속적인 제품개발 기술 보유.

(나) 약점(Weakness)

- 참전복 선호도의 약화.
- 생산원가 및 경쟁력 약화.
- 취약한 마케팅 기반.
- 불임전복에 대한 인식부족.
- 시험육성 검증데이터 부족.
- 수출통관 및 검역문제 발생가능.

(다) 기회(Opportunity)

- 중국 전복양식산업에 있어 새로운 품종 수요증가.
- 프리미엄 전복의 수요증가 및 소비수요의 다양화.
- 한중 경제관계로 인한 교류 확대.
- 명확한 타겟고객 시장보유.

(라) 위협(Threat)

- 다양한 신품종 개발확대로 경쟁압력 증가.
- 중국 현지 전복종자의 과잉생산으로 가격하락.
- 타겟고객인 중국기업의 협상력 증대.
- 한중간 비관세 무역장벽.
- 새로운 소비수요와 시장에 맞는 상품개발 부족.

(마) SWOT분석의 결과

- 아직 한국 참전복 종자는 여러 가지 뛰어난 강점(S)에도 불구하고 준비되지 않은 많은 약점(W)을 안고 있으며 외부의 경쟁시장의 위협요인(T) 또한 상당히 큰 편임. 이러한 많은 약점과 위협요인을 다양한 아이디어로 극복하고 동시에 강점을 활용한 선명한 공격적 마케팅 전략을 추진하는 것이 유일한 성과 창출 방법임.

따라서 SO전략을 활용하여 차별화된 장점을 적극적으로 홍보하고 빨리 시장에 진입할 필요가 있으며, 독특하고 차별화된 마케팅을 지속적으로 유지해 나아갈 필요가 있음[표 1-3-5].

[표 1-3-5] 배수체 육종 참전복의 SWOT 분석

내부환경 외부환경	S 강점	W 약점
O 기회	<p>1. SO전략 공격전략 강점활용 외부기회 극대화 -> 경쟁우위를 극대화해 성과창출</p>	<p>WO전략 약점을 보강 외부기회를 활용 -> 리스크 감소를 위한 아이디어 고민</p>
T 위협	<p>ST전략 강점활용 외부위협 최소화 -> 기회를 이용해 약점을 보완할 방법을 고민</p>	<p>2. WT전략 방어전략 약점을 보강 위협요인을 극복 -> 강점의 극대화가 아닌 외부위협의 최소화</p>

라. 국내외 판매망 확보

(1) 중국 판매망 확보

(가) 중국 수출을 위한 판매 전략 수립

- 배수체 육종 참전복의 수출 확대를 위해서는 SWOT 분석으로 도출된 항목 중 현지에서 선호하는 항목을 집중적으로 홍보에 반영할 필요가 있음. 또한 육종 참전복 배수체 종자는 이전 연구 결과에 나타난 것처럼 성장에서 뛰어난 강점을 가지고 있으며, 국내에서 생산된 전복의 특성상 맛과 질감의 선호도가 매우 높게 나타남. 중국의 전복 시장에서 소비자들이 가식부가 큰 전복을 선호하여 판매시장에서도 이러한 수요를 충족하기 위해 생산자들이 전력을 다하고 있음.
- 현 상황에서 본 프로젝트의 육종 참전복 배수체 종자의 선호도가 높게 나타날 것으로 예상됨. 현지 상황에 맞춘 사육 매뉴얼 제작 및 기술적인 지원을 제공한다면 현지 수요가 대량으로 늘어날 것으로 예상됨. 또한 프로젝트 종료 이후에도 지속적인 개량을 거듭하여 약점을 보완하고 강점을 늘려 적극적 홍보를 통해 중국을 포함한 해외 시장에 진입하는 전략으로 수출을 추진할 필요가 있음.

(나) 중국수출을 위한 현지 유통망 확보 및 활용

- 국제사회의 무역적인 측면에서 COVID-19로 인한 국경봉쇄 및 지역간 이동 등이 크게 제한됨으로서 주요 대상국들인 중국과 일본으로의 수출이 원활하지 않았음. 주변국들은 수출입 등 국가 간 무역 활동에 있어 각 국가들은 자국의 권리 보호 강화를 확대하고 있으며, 때문에 생물 제품의 수출 등 산업화 추진 시 기술보호를 위한 최소한의 조치 마련의 필요성은 점점 더 중요시되고 있음. 아직 전 세계적으로 COVID-19의 확산세가 온전히 제어되지 못하고 있어 국제시장의 경우 차년도 수출 대상 주변국과의 국제정세 변화 및 COVID-19 영향권에 있는 수산물 국제 시장의 동향에 대한 면밀한 검토와 조사가 더욱 중요할 것으로 판단됨.

(2) 국내 판매망 확보

(가) 배수체 종자의 우수성 홍보

- 본 프로젝트에서 개발한 배수체 육종 참전복의 우수성을 홍보하고 배수체 육종 참전복의 법적보호를 통해 기술 도용을 방지하기 위하여 브랜드명 개발 및 Brand Identity를 개발하여 상표를 등록함[그림 1-3-12].

(나) 국내 배수체 종자판매

- 최근 COVID-19로 인해 무역 등과 같은 타국과의 교류가 원활하지 않으나, 국내의 경우 점차 안정화될 것으로 예상되는 바, 국내 전복양식 현장의 수요가 점차 회복될 수 있으리라 기대됨.
- 2020년 육종 참전복 배수체 종자의 국내 판매는 총 4건으로 총 판매금액 127,170천원의 실적을 달성하였으며, 2021년에는 국내 판매 총 9건으로 판매금액은 총 419,618천원의 실적을 달성하였음. 국내의 경우, 육종된 우량 전복의 국내 기술 보급의 수요가 점차 증대하고 있으며, 배수체 육종 참전복 역시 예외는 아님. 현재 배수체 대량유도 및 처리 기술이 정립되어 2단계 시범생산과 민간현장 시험이 이루어지고 있고, 배수체 육종 참전복의 수요는 지속적으로 증가할 것으로 예상됨.
- 이에 2022년에는 중국수출을 위한 판매전략을 재수립하여 현지 유통망을 확보 및 활용할 뿐만 아니라 국내에도 생산 판매를 진행하고자 함.

BI INFORMATION

Symbol Mark



Golden Seed Abalone (골든시드아발론)의 로고는 전복의 모양을 형상화 하였다. 골든시드프로젝트(GSP)를 통해 개발한 전복 신품종으로서 3배체 기술 도입으로 염색체가 2n이 아닌 3n으로 구성되어 있다. 번식 기능이 없어 성장에 에너지를 집중하게 되어 크게 성장이 가능하다.

심볼은 전복의 유려한 타원이 주는 생동성과 푸른 바다에서 활동성있게 성장하는 모습 등 다양하게 해석이 가능하며, 이를 통해 싱싱하고 건강한 전복의 이미지를 표현 할 수 있다.

푸른색 계열의 색상으로 푸른 바다를 상징하여 전복의 싱싱함과 건강함을 표현하고자 하였고, 금색은 예로부터 귀하게 대접 받아온 주요 수산물인 전복의 고급스러운 느낌을 살리고자 한다.

Grid



Logo Type

(한글)



(영문)



Appointed Main Color



C93 M55 Y34 K11



C31 M48 Y95 K0



C97 M82 Y56 K27

[그림 1-3-12]

배수체 참전복 Brand Identity

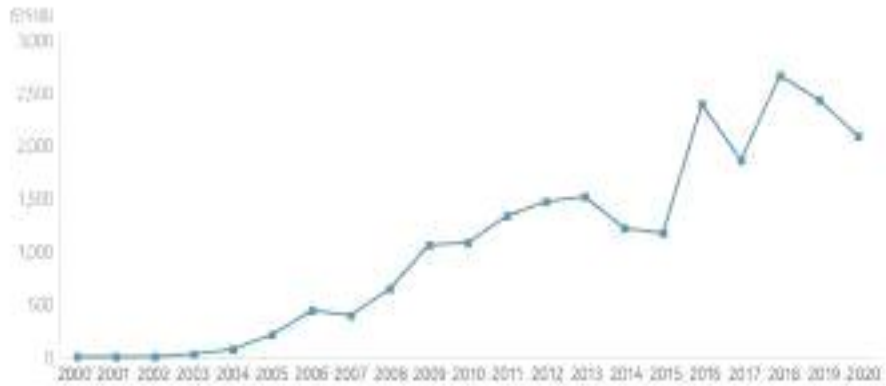
마. 전복 종자시장개척 및 수출

(1) 전복 수출량

- 우리나라 전복 수출은 전복 생산량과 궤를 같이 했다. 2000년대 들어서면서 해상가두리를 이용한 전복 양식 기술이 보급되면서 전복 생산량이 증가했고, 이에 비례하여 수출량 또한 증가하기 시작했다. [그림 1-3-13]에서 살펴볼 수 있듯이 2000년의 전복 수출량은 1톤에 미치지 못했지만, 2003년에 양식 전복 생산량이 1천 톤을 넘어섰고 수출량 또한 21톤을 기록하였으며, 이때부터 전복 수출은 본격화되었음. 이후에도 전복 수출량은 생산량 증가와 더불어 지속적으로 증가했는데, 2009년 수출량은 1천톤을 달성했고 2016년에 2천톤을 넘었음. 하지만 2017년에 수출량은 감소하여 약 1,800톤 수준이었으나, 2018년 약 2,600톤으로 다시 증가했음. 2019년 들어 수출량이 전년에 비해 소폭 감소했고, 2020년 들어 COVID-19의 영향으로 감소세가 이어졌음.
- 최근 COVID-19로 인한 악조건 속에서도 수출량은 2,000톤 이상을 유지했고, 2021년 들어서도 회복세를 보이다가 COVID-19 재확산의 여파로 어려움을 겪고 있지만 급격한 감소로 이어지는 않음. 이는 일본 위주였던 수출시장을 다변화했고, 활전복 위주의 수출에서 벗어나 냉동 및 가공 전복 등으로 수출 전복의 제품을 다양화할 수 있었기 때문임.

(2) 전복 제품별 수출 동향

- [표 1-3-6]과 같이 전복의 HS-Code는 2000년부터 2011년까지, 활전복과 가공품의 2가지로 구분되어 있음. 이는 우리나라 사람들이 주로 활어를 선호하는 경향으로 인해 전복이 활전복 상태로 주로 유통되었고, 또한 전복의 수출입량이 많지 않았던 시기에 HS-Code가 세분화 될 필요성이 적었기 때문으로 보임.
- 전복 수출량이 급증하면서, 수출되는 전복의 형태 또한 다양해지면서 기존의 HS-Code로 전복의 수출입량을 정확하게 파악하기 어려워짐. 따라서 급증하는 전복 수출입을 정확하게 파악하기 위해 HS-Code를 세분화할 필요성이 대두됨. 2012년부터 활전복 이외에, 냉동한 것, 건조한 것, 염장이나 염수장 한 것, 훈제한 것, 밀폐용기에 넣은 것, 밀폐용기 이외의 기타 등의 7가지로 전복의 HS-Code가 세분화되었음. 2017년에 전복의 HS-Code가 변경되었으나, 제품 형태 7가지는 그대로 유지되면서 개별적인 번호만 바뀌었음.
- 우리나라에서 수출되는 전복의 제품 형태는 [표 1-3-7]에서 확인할 수 있듯이, 대부분 활전복임. 물론 2011년까지 냉동 전복은 HS-Code의 미분류로 인해 누락되었을 수 있는데, 이를 감안하더라도 이 시기까지 활전복의 수출 비중은 90%를 훨씬 넘는 수준으로 추정할 수 있음. 그런데 2010년대 이후부터 활전복의 비중은 점차 감소하는 경향을 보여, 2017년에 이르러 80% 정도로 감소함. 이후 다소 증감이 있지만, 83-88% 수준을 나타내면서 과거와 같이 90%는 넘어서고 있지 못하고 있음.



[그림 1-3-13]
우리나라 연도별 전복 수출량

[표 1-3-6] 전복 관련 HS-Code의 변화(2000년 이후)

연도	HS-Code	구분
2000년 ~ 2011년	0307911200	산 것·신선 또는 냉장
	1605901091	조제 또는 저장처리하여 밀폐용기에 넣은 것
2012년 ~ 2016년	0307810000	살아있는 것, 신선한 것, 냉장한 것
	0307891000	냉동한 것
	0307892000	건조한 것
	0307893000	염장이나 염수장한 것
	0307894000	훈제한 것
	1605571000	밀폐용기에 넣은 것
	1605579000	기타
2017년 ~ 현재	0307810000	살아있거나, 신선하거나 냉장한 전복
	0307830000	냉동한 전복
	0307871000	건조한 것
	0307872000	염장이나 염수장한 것
	0307873000	훈제한 것
	1605571000	밀폐용기에 넣은 것
	1605579000	기타

자료 : 한국관세무역개발원, HS품목별 수출입통관편람, 각 연도

[표 1-3-7] 연도별 제품 형태별 전복 수출 동향

(단위 : 톤, %)

연도	총 수출량	활전복		가공 전복		냉동 전복		기타 수출량
		수출량	비중	수출량	비중	수출량	비중	
2000년	1	1	100.0	0	0.0	-	-	-
2005년	220	210	95.3	10	4.7	-	-	-
2006년	428	407	95.0	21	5.0	-	-	-
2007년	377	377	100.0	0	0.0	-	-	-
2008년	630	630	100.0	0	0.0	-	-	-
2009년	1,032	1,018	98.7	14	1.3	-	-	-
2010년	1,064	1,001	94.1	63	5.9	-	-	-
2011년	1,303	1,229	94.3	74	5.7	-	-	-
2012년	1,423	1,332	93.6	13	0.9	78	5.5	0
2013년	1,476	1,329	90.0	74	5.0	68	4.6	5
2014년	1,184	1,115	94.2	26	2.2	41	3.5	1
2015년	1,144	1,078	94.3	25	2.2	36	3.1	5
2016년	2,328	2,188	94.0	43	1.9	96	4.1	2
2017년	1,808	1,600	88.5	124	6.8	84	4.6	0
2018년	2,599	2,165	83.3	364	14.0	68	2.6	3
2019년	2,378	2,002	84.2	336	14.1	37	1.5	3
2020년	2,032	1,785	87.9	191	9.4	55	2.7	0

주: 1. 가공전복은 밀폐용기에 넣은 것과 이외의 기타를 포함한 것임

2. 기타는 건조한 것, 염장이나 염수장한 것, 훈제한 것을 포함한 것임

3. HS-Code별로 수출을 적용하여 활전복 기준으로 환산함

자료 : 한국관세무역개발원, HS품목별 수출입통관편람, 각 연도

- 활전복의 수출 비중이 줄어든 것은 가공전복의 수출량이 증가했기 때문임. 2010년 이전까지 가공전복 수출이 기록된 해도 있었지만 미미한 수준이었음. 물론 이 시기에도 활전복 위주의 수출에서 벗어나려는 업계의 노력은 있었지만 실제로 가공전복 수출을 본 궤도 위에 올려놓지는 못함.
- 2010년에 가공 전복 수출량이 25톤을 기록했고, 이후부터 점차 증가하는 추세를 보여 2017년에 100톤 이상이 수출되었음. 그리고 2018년과 2019년 모두 300톤 이상의 가공 전복 수출을 기록하면서, 수출량에서 차지하는 비중이 약 14%까지 증가했음.
- 이처럼 가공 전복의 수출량이 크게 늘어날 수 있었던 것은 업계의 부단한 노력이 있었기 때문이지만, 가공 전복을 생산할 수 있을 만큼의 전복 생산량이 풍부했고, 가공 원재료인 전복 가격이 낮게 형성되면서 가격 경쟁력을 확보할 수 있었기 때문임.

(3) 주요 국가별 수출 동향

- 우리나라 전복은 대부분 일본으로 수출하고 있음. [표 1-3-8]에서 보여지듯이 2015년까지 95% 이상의 전복이 일본으로 수출되었음. 그러나 2016년 들어 중국으로 전복이 대량 수출되면서 일본으로 수출되는 전복의 비중이 약 67%까지 감소하였음. 2017년에 중국으로 수출이 급감하면서 일본 수출 비중이 다시 91% 수준으로 확대되었음. 그러나 최근 싱가포르, 미국, 베트남 등으로 전복 수출량이 늘어나면서, 일본에 대한 수출 비중은 과거와 달리 2019년과 2020년 들어 80% 수준으로 줄어들었음. 이처럼 우리나라 전복 수출 대상국들이 다양화되면서 일본에 대한 집중도가 완화된 데 따라, 더욱 안정적으로 수출을 지속시킬 수 있는 여건이 조성되고 있는 것으로 보임.

[표 1-3-8] 주요국별 전복 수출 동향

(단위 : 톤)

연도	총 수출량	일본	베트남	싱가포르	미국	대만	홍콩	중국
2012년	1,423	1,419	-	0	1	0	1	0
2013년	1,476	1,385	-	10	0	1	75	1
2014년	1,184	1,164	0	2	3	-	6	-
2015년	1,144	1,115	-	1	15	0	7	0
2016년	2,328	1,550	5	3	5	10	146	590
2017년	1,808	1,646	1	47	19	2	66	13
2018년	2,599	1,733	19	202	62	13	90	388
2019년	2,378	1,913	84	186	53	34	66	4
2020년	2,032	1,619	140	88	86	40	26	1

주: 1. '-'는 수출실적이 없는 경우이고, '0'은 수출실적이 0.49톤 이하임

2. HS-Code별로 수율을 적용하여 활전복 기준으로 환산함

자료 : 한국관세무역개발원, HS품목별 수출입통관편람, 각 연도

- **대한민국:** 2021년 현재 우리나라 전복은 일본, 중국, 홍콩, 싱가포르, 태국, 베트남, 말레이시아 등의 아시아 국가들을 비롯하여 미국, 캐나다, 괌 등으로 다양한 국가들에 수출되고 있음. 그런데 전복은 전 세계에 걸쳐 다양한 종류가 서식하고 있고, 많은 국가들이 자연산을 채취하거나 양식으로 생산하고 있지만, 전복을 식재료로 즐겨 먹는 국가는 한국, 중국(대만, 홍콩 등 포함), 일본 등의 3개국에 국한되며, 이 국가들의 해외교민들이 전복을 섭취할 뿐임. 전복은 여러 국가로 수출되고 있지만, 소비층은 매우 제한적일 수밖에 없는 특징을 가지고 있음. 최근 베트남에 수출되는 전복은 우리나라 교포 혹은 현지에서 거주하는 화교 등과 같은 전통적인 소비층이 아니라, 베트남 국민들이 즐겨 먹으면서 수출량이 급증하는 양상으로 파악됨.

- **일본:** 일본의 전복 생산은 양식산이 거의 없고, 대부분 자연산에 의존하는데, 연간 생산량은 약 2천 톤임. 따라서 일본은 자국 내 전복 소비량의 상당량을 수입에 의존하고 있는데, 수입량 중에서 한국산 전복의 비중이 가장 큼. 한국산 전복은 다른 나라에 비해 가격 경쟁력이 높고 품질 또한 좋다고 평가받고 있음. 특히 한국은 지리적으로 가까워 선박을 이용하여 활전복 상태로 바로 수입하기 쉬우므로 한국산 전복을 매우 선호함. 이에 2010년대 중반까지 전복 수출량의 대부분인 약 97-98%가 일본으로 수출되었음. 최근 들어 그 비중이 80%까지 떨어지기는 했지만, 수출량은 지속적으로 증가하는 모습을 보이고 있음. 그리고 일본으로 수출되는 전복의 95% 이상이 활전복이며 이외에도 냉동, 가공품 등으로 수출되고 있음. 활전복 이외의 제품 형태로는 냉동 전복의 비중이 다음으로 높음. 그러나 최근 들어 전복을 껍질 및 내장을 제거하고, 자숙한 이후에 냉동 처리한 가공품의 수출량이 늘어나고 있음[표 1-3-9].

- **베트남:** 베트남은 2020년 들어서 우리나라가 일본에 이어 두 번째로 전복 수출을 많이 한 나라가 베트남임. 2015년까지 베트남으로 수출된 전복은 거의 없음. 2016년부터 활전복을 중심으로 소량 수출하기 시작하여 2019년 84톤의 전복이 베트남에 수출되었고 2020년 들어서 140톤을 수출하여 한국산 전복의 수출량이 급증하는 경향을 보임[표 1-3-10]. 그런데 우리나라 전복 수출국가로서 베트남은 남다른 의미를 가지고 있음. 베트남 또한 중국 및 일본을 제외한 다른 나라들과 같이 전복을 즐겨 먹지 않는 국가임. 그러나 최근 베트남의 대중문화에 큰 영향을 미친 한류는 식문화에까지 확장되었고, 급기야 한국산 전복을 호텔 혹은 고급음식점에서 식재료로 활용하기 시작했음. 즉 중국 및 일본을 제외하고, 전복을 수입하는 해당 국가의 자국민들이 대중적으로 소비하기 시작한 것은 거의 처음이라고 볼 수 있음. 따라서 이 같은 베트남에 대한 전복 수출을 통해 앞으로 다른 국가들, 특히 태국, 인도, 말레이시아 등의 아시아 국가들에 대한 수출 확대의 가능성을 엿볼 수 있음. 한편 베트남으로 수출되는 전복은 거의 활전복이고, 운송방법은 주로 항공을 통해 수출되고 있으며 선박을 이용하기도 함. 값비싼 항공료를 지불하는 대신 선박을 통해 운송비용을 낮출 수 있는 방안 등이 필요함. 물론 활전복 상태를 유지할 수 있는 전용 컨테이너가 제작되어 수출에 이용되고 있지만, 최근 급증하는 전복 수요를 감당할 만큼 전용 컨테이너가 넉넉하지 못한 실정임.

[표 1-3-9] 일본으로 수출된 전복의 연도별 변화

(단위 : 톤)

연도	합계	활전복	냉동 전복	가공 전복	기타
2012년	1,419	1,329	76	13	1
2013년	1,385	1,323	61	1	-
2014년	1,164	1,108	39	17	-
2015년	1,115	1,067	31	17	0
2016년	1,550	1,457	71	22	-
2017년	1,646	1,535	69	42	-
2018년	1,733	1,672	25	36	0
2019년	1,913	1,823	13	77	-
2020년	1,619	1,560	8	51	-

- 주: 1. '-'는 수출실적이 없는 경우이고, '0'은 수출실적이 0.49톤 이하임
 2. HS-Code별로 수율을 적용하여 활전복 기준으로 환산함
 3. 기타는 건조한 것, 염장이나 염수장한 것, 훈제한 것을 포함한 것임
 자료 : 한국관세무역개발원, HS품목별 수출입통관편람, 각 연도

[표 1-3-10] 베트남으로 수출된 전복의 연도별 변화

(단위 : 톤)

연도	합계	활전복	기타
2016년	5	5	0
2017년	1	2	1
2018년	19	18	1
2019년	84	83	1
2020년	140	135	5

- 주: 1. '0'은 수출실적이 0.49톤 이하임
 2. HS-Code별로 수율을 적용하여 활전복 기준으로 환산함
 3. 기타는 냉동한 것, 건조한 것, 염장이나 염수장한 것, 훈제한 것, 가공한 것을 포함한 것임
 자료 : 한국관세무역개발원, HS품목별 수출입통관편람, 각 연도

- **미국:** 미국으로 수출되는 전복은 대부분 교포들을 대상으로 마트 혹은 음식점 등에서 유통됨. [표 1-3-11]를 보면 2017년까지 미국으로 수출된 전복은 20톤 미만이었지만, 2018년 이후부터 50톤 이상을 수출하고 있으며, 2020년에 80톤을 기록하면서 지속적으로 늘어나고 있는 추세임. 미국으로 수출되는 전복의 가장 큰 특징은 다른 나라들과 달리 활전복의 비중이 낮음. 2020년 기준으로 미국에 수출된 전복 중에서 활전복이 50% 이고, 냉동 전복이 33%, 나머지 27%가 가공 전복 등임. 이는 장거리 수송인 경우 전복 운송을 거의 항공에 의존하게 되는데, 활전복은 폐사 방지를 위해 물이 필요하거나 전용 용기 등이 필요하여 무게와 부피가 늘어날 수밖에 없음. 그러나 냉동 전복 혹은 자숙한 전복을 냉동 처리한 것은 활전복에 비해 저장성이 높고, 무게와 부피를 줄일 수 있어 kg당 운송료를 월등하게 낮출 수 있음

- **중국:** 중국은 전복 생산량과 소비량이 세계에서 가장 많은 국가임. 전복 양식방법은 육상수조식 혹은 해상에서 채롱식을 이용하고 있는데, 푸젠성 지역에서 채롱식 방법으로 집중적으로 생산되고 있음. 그리고 중국은 자국 내에서 양식으로 생산하기 힘든 큰 크기 전복을 제외하고 대부분 자국산 전복을 소비하고 있음. 한국산 전복의 중국 수출량은 2015년까지 미미한 수준이었음. 그런데 2016년 들어 중국으로 한국산 전복이 590톤이나 수출되었음[표 1-3-12]. 이는 중국 내 전복 치패 공급의 문제가 발생하여, 이 해에 전복 공급이 축소되면서 중국산 전복의 가격이 급등했기 때문으로 판단됨. 이에 상대적으로 가격 경쟁력을 갖춘 한국산 전복을 중국으로 대량 수출할 수 있었음. 그러나 중국의 치패 공급 문제가 해결되자, 중국 전복 수출량은 2017년에 13톤으로 급감했음. 2018년에 들어 한국산 전복의 공급초과로 인해 가격이 급락하게 되자, 다시 중국으로 수출량이 크게 늘어 남. 하지만 2019년 한국산 전복의 가격이 상승함과 동시에 중국으로 전복 수출은 다시 급감함. 이처럼 중국으로의 전복 수출은 중국의 전복 수급의 문제가 발생하거나 한국산 전복 가격의 급락 등과 같은 변수가 나타나지 않는 이상, 지속적인 수출을 장담하기 어려움이 있음. 왜냐하면 중국산 전복의 가격은 한국산에 비해 거의 절반 수준으로 가격적인 측면에서 중국산에 비해 우위를 점하기 힘든 상황 때문임.

- **홍콩:** 홍콩으로 수출되는 전복의 가장 큰 특징은 다른 나라들과 달리 활전복의 비중이 낮다는 것임. 특히 통조림(밀폐용기)의 형태와 자숙하고 냉동처리한 가공 전복의 수출 비중이 높으며, 수출량이 많지 않지만 건조한 전복 또한 수출되고 있음. 그런데 [표 1-3-13]에 나타나듯이 2016년에 활전복이 115톤이나 수출되면서 전복 수출량이 전년에 비해 크게 증가함. 하지만 이후 급격한 감소세를 보이고 있음. 이는 홍콩의 정치적 상황으로 인해 관광객이 줄어드는 등, 전반적으로 소비 침체를 겪고 있기 때문으로 보임. 따라서 홍콩으로의 전복 수출 확대는 당분간 어려울 것으로 전망됨.

[표 1-3-11] 미국으로 수출된 전복의 연도별 변화

(단위 : 톤)

연도	합계	활전복	냉동 전복	기타
2012년	1	1	-	0
2013년	0	0	-	-
2014년	3	3	0	0
2015년	15	9	0	6
2016년	5	0	2	3
2017년	19	9	0	9
2018년	62	32	7	23
2019년	53	40	7	6
2020년	86	43	28	15

주: 1. '-'는 수출실적이 없는 경우이고, '0'은 수출실적이 0.49톤 이하임
 2. HS-Code별로 수율을 적용하여 활전복 기준으로 환산함
 3. 기타는 건조한 것, 염장이나 염수장한 것, 훈제한 것, 가공한 것을 포함한 것임
 자료 : 한국관세무역개발원, HS품목별 수출입통관편람, 각 연도

[표 1-3-12] 중국으로 수출된 전복의 연도별 변화

(단위 : 톤)

연도	합계	활전복	냉동 전복	기타
2012년	0	0	-	0
2013년	1	1	0	-
2014년	-	-	-	-
2015년	0	0	-	0
2016년	590	589	0	1
2017년	13	12	0	1
2018년	388	386	-	2
2019년	4	-	4	0
2020년	1	-	-	1

주: 1. '-'는 수출실적이 없는 경우이고, '0'은 수출실적이 0.49톤 이하임
 2. HS-Code별로 수율을 적용하여 활전복 기준으로 환산함
 3. 기타는 건조한 것, 염장이나 염수장한 것, 훈제한 것, 가공한 것을 포함한 것임
 자료 : 한국관세무역개발원, HS품목별 수출입통관편람, 각 연도

[표 1-3-13] 홍콩으로 수출된 전복의 연도별 변화

(단위 : 톤)

연도	합계	활전복	냉동 전복	가공 전복	기타
2012년	1	0	0	1	0
2013년	75	0	0	70	5
2014년	6	0	2	4	0
2015년	7	0	4	3	-
2016년	146	115	21	10	-
2017년	66	33	12	21	-
2018년	90	33	4	53	1
2019년	66	17	0	49	2
2020년	26	2	1	23	0

주: 1. '-'는 수출실적이 없는 경우이고, '0'은 수출실적이 0.49톤 이하임

2. HS-Code별로 수율을 적용하여 활전복 기준으로 환산함

3. 기타는 건조한 것, 염장이나 염수장한 것, 훈제한 것을 포함한 것임

자료 : 한국관세무역개발원, HS품목별 수출입통관편람, 각 연도

(4) 전복 수출 활성화 방안

- 앞서 살펴본 것과 같이 우리나라 전복의 수출량은 2019년과 2020년에 걸쳐 감소하는 추세를 보였음. 그러나 2020년은 COVID-19의 영향으로 수출이 원활하게 이루어지지 못했지만, 2021년 들어 회복세를 보이고 있는 것을 고려하면, 전복 수출량은 다시 증가세로 돌아설 것으로 전망됨. 그리고 수출업자들을 통한 면담조사 결과, 대부분 수출 확대 가능성에 대해 밝은 전망을 가지고 있었음. 이는 한류를 비롯한 대한민국이라는 국가 브랜드의 역할이 더욱 커졌고, 한국산 전복의 품질 등이 좋다는 점 때문임.
- 이 같은 호의적인 수출 여건에도 불구하고 앞서 살펴본 수출 동향에 비추어 볼 때, 몇 가지 극복해야 할 과제가 있음. 첫째 우리나라 전복 수출의 제품형태가 대부분 활전복인데 반해, 활전복 수출의 문제점이 크게 개선되지 못하고 있음. 즉 활전복은 저장성이 취약하여, 선박을 통한 대량 수출은 지리적인 제약이 큼. 이에 활전복 수출은 수조 물차를 이용하는 일본에 집중되고 있음. 물론 최근 전용 컨테이너를 제작하여 이용하고 있지만, 컨테이너의 수가 부족하여 여전히 거리가 먼 국가에 대한 수출은 대부분 값비싼 항공 운송에 의존하고 있음. 따라서 전용 컨테이너 수를 획기적으로 늘리고 해당 국가에 물류센터를 조성함으로써 운송비용을 줄이는 방안 등을 적극적으로 고려해야 할 필요가 있음. 예를 들어 최근 급부상한 수출 국가인 베트남에 현지 물류센터를 조성하여 더욱 낮은 가격으로 한국산 전복을 판매할 수 있다면, 현지인들의 대중적인 한국산 활전복 소비를 더욱 확대해 갈 수 있을 것으로 판단됨.
- 둘째, 수출대상국 다변화를 위한 지속적인 노력이 요구됨. 수출의 대부분을 일본에 의존했던 과거와 달리 최근 들어 여러 나라에 전복이 수출되고 있지만, 베트남을 제외하면 여전히 소량이 수출되고 있을 뿐이고 수출대상국 또한 김 등에 비교하면 적은 수준임. 그런데 과거에 전복을 소비하지 않았으나 한류에 힘입어 우리나라 식문화의 하나로 전복이 소비될 수 있다는 것을 베트남을 통해 확인할 수 있었음. 따라서 베트남을 중심으로 동남아시아 국가들에 대한 적극적인 수출확대를 고려해야 할 필요가 있음.
- 셋째, 활전복은 우리나라 전복 수출에서 차지하는 중요성이 크지만, 활전복 위주의 수출 구조에서 벗어나야 함. 물론 활전복 수출은 그 자체로 중요하지만, 가공 전복에 대한 투자 확대를 통해 수출 제품 형태를 다양화시켜 부가가치를 높여야 함. 더구나 가공 전복은 활전복에 비해 저장성이 뛰어나며, 국내 수급을 안정시킬 수 있는 효과까지 가지고 있음.
- 넷째, 국내 활전복(종자)가 중국 등의 국제 전복시장에 진입하기 위해서는 가격 경쟁력을 살리는 것도 중요하지만 질적 경쟁력을 재고하는 것이 유리하며, 중국

내 한국 수산물에 청결하고 믿고 먹을 수 있는 식품이라는 인식이 강함. 이를 활용하여 활전복(종자)뿐만 아니라 전복의 위생·크기·맛 등을 향상시켜 프리미엄 식품으로 부각할 필요가 있음

- 우리나라 전복의 수출입 동향을 살펴보고, 수출 확대를 위한 몇 가지 방안을 제시해보았음. 물론 앞서 제시한 방안들은 전복 수출 확대를 위한 단초에 지나지 않음. 그러나 이 같은 고민을 비롯하여 다양한 수요 확대 방안들이 실행되어 국내 전복 가격의 안정화와 어가 경영의 어려움이 해소될 수 있기를 기대함.

(5) 지속적 수출 활성화를 위한 후속 전략 수립

- 본 과제는 2021년을 마지막으로 종료되지만, 전복산업현장 및 참여기업에서는 지속적인 배수체 전복의 생산을 수행하고자 함.
- 본 연구수행으로 개발한 배수체 전복 생산 기술을 참여기업인 민간으로 이전하여 참여기업 주도하에 자체적으로 배수체 전복을 생산하여 현장에 공급 가능하게 함[그림 1-3-14].
- 배수체 전복 생산기술의 완성도를 높이기 위하여 프로젝트 책임기관인 국립수산과학원 및 국립부경대학교에서는 지속적인 기술지원을 계획하고 있음.
- 또한 3배체 전복의 안정적인 생산을 위한 4배체 전복개발연구도 추진계획 중임.



[그림 1-3-14]

배수체 전복의 지속적 수출활성화를 위한 전략

1-4. 제1세부프로젝트 연구결과 종합 고찰 및 결론

가. 배수체 육종 참전복 대량생산 및 실용화 기반 구축

(1) 배수체 유도기술

- 참전복을 대상으로 한 배수체 유도 기술은 국내외 사례에서 모두 배수체 유도 효율의 문제점 또는 배수체 처리군의 낮은 부화율 및 초기 유생 생존율로 배수체 종자의 대량생산에 손쉽게 사용할 수 없는 기술적인 한계가 있었다. 그러나 GSP 프로젝트의 연구개발을 통해서 종래의 기술적 문제점이 극복되었으며, 최적화된 배수체 처리조건의 개발을 통해 배수체 유도 효율 95-99% 수준을 유지하면서 일반 전복과 비슷한 부화율과 생존율을 나타낼 수 있는 기술 수준까지 도달하게 되었다. 이에 2단계 연구 종료 시점에서 국내 참전복 배수체 유도 기술 수준은 세계 선두권에 도달하였다고 판단된다. 실험실 수준의 표준 조건에서 최적화된 처리조건은 현장 산업화를 위한 대량 처리 조건에서도 안정적으로 그 효율이 나타났고, 수 차례의 반복 시험을 통해서 배수체 유도 효율에 관한 재현성이 검증되었다.
- 본 프로젝트에서 개발한 배수체 유도를 위한 표준 처리조건에 대하여 다양한 현장 환경에서 어느 정도 적용될 수 있는지에 관한 현장 실증화 연구를 진행하였다. 그 결과 배수체 유도 대량처리로 다수의 참여기업에서 요구하는 배수체 물량을 처리 할 수 있었으며, 그 유도율에 있어서도 95% 이상의 높은 효율을 나타내었다. 이는 본 배수체 유도기술을 이용하여 배수체 전복의 산업화에 진입할 수 있을 것으로 판단 된다.
- 향후 배수체 전복의 산업화를 위하여 육종 배수체 전복 종자의 대량처리 기술을 생산 현장 참여기업으로 기술이전을 실시할 계획이다. 또한 본 프로젝트는 2021년을 마지막으로 종료되지만 배수화 처리 개발기술의 실용화와 아울러 현재의 화학적 처리 없이 배수체를 유도할 수 있는 새로운 방법(4배체 활용 가능성 또는 chemical-free 방식의 배수체 유도 등)의 이용 가능성에 대하여 지속적인 개선과 기술의 배타적 권리 확보를 위한 노력이 계속되어야 할 것이다.

(2) 실용화 기반구축

(가) 민간협력 체제 구축

- 한국의 전복양식은 과학적이며 체계적인 관리가 없이 장기간의 계대생산으로 인하여 종자의 열성화가 우려되며, 최근 성장 속도 둔화 및 생존율 저하 현상 등이 발생하고 있다. 또한, 최근 급격하게 변화하는 기후변화의 일부로 하절기 고수온에 의한 대량폐사 및 전복 산란기에 전복 양식시설 밀집 지역에서는 해사가

두리 내에 성숙한 모패의 방란·방정으로 인하여 산소결핍과 수질오염 등의 문제로 대량폐사가 빈번히 발생하고 있다. 이에 본 프로젝트에서는 (사)한국전복산업연합회, 완도지회, 해남지회, 전복종자협회 등을 방문하여 현재의 전복 양식산업의 이러한 문제점의 해결방안으로 3배체 전복의 빠른 성장과 생식소 발달억제 등의 일반적인 특징을 설명하고 현장적용 기반구축을 위한 협의회를 개최한 바 있다. 민간협력 체제 구축을 위하여 (사)한국전복산업연합회 및 각 지역 전복협회에 배수체 전복 시험생산을 희망하는 업체의 추천을 요청하고, 각 추천업체를 방문하여 생산규모, 방식, 시기 등을 재검토하여 배수체 육종 참전복 시험생산을 추진하였다. 그 결과 참여업체에서는 배수체 육종 참전복의 성장형질의 우수성 및 고수온내성 등의 특성을 확인하고 향후 지속적인 생산을 요구하였다.

- 현장 결과를 토대로 배수체 육종 참전복의 산업화를 추진하기 위해서는 배수체 전복의 형질특성에 대한 현장시험 및 평가과정을 좀 더 세밀하게 분석할 필요성이 대두되었다. 이러한 평가의 공정성을 위해서는 (사)한국전복산업연합회 및 각 지역 전복협회와의 지속적인 협조가 필요하다. 이에 본 프로젝트에서는 (사)한국전복산업연합회 및 각 지역 전복협회와의 협의회를 구성하여 배수체전복의 산업화를 위하여 지속적인 협조체제를 구축하였다.

(나) 전복 양식 환경 및 시장변화

- 현재 농산종자에 비해 수산종자는 아직 제대로 산업화되지 않았고 무엇보다 상업적으로 상품화가 된 수산종자가 없기에 이에 따른 국내외 산업적 유통망 역시 형성되어 있지 않은 실정이다. 최근 전복 최대 생산 및 소비국인 중국은 경제성장에 따라 전복 수요의 폭발적 증가가 나타났고 중국을 비롯한 전 세계전복 양식 산업의 동반 성장을 가져왔다. 이에 따라 전복종자의 수요 역시 비약적으로 늘어날 것으로 예상된다. 그러나 기후변화로 인한 양식 환경의 급격한 변화, 이를 따라가지 못하는 양식기술, 설비 등 최대의 전복종자 수요국인 중국은 종자양식장과 전복양식장의 양적 확대에도 불구하고 생산성은 오히려 떨어지고, 종자 생산 역시 감소하여 우수한 전복종자의 수요가 높아지고 있다. 중국 역시 전문적인 수산종자기업은 없고 대형전복양식 유통기업에서 자체적으로 전복종자를 생산해 내부에서 소비하는 수준이며 전문적으로 유통되는 단계는 아닌 것으로 조사되고 있으며 현재 중국 내 대학 및 연구기관에서도 우리나라와 마찬가지로 우수한 전복 종자를 개발하고 있으므로 우리가 먼저 개발된 육종 참전복 배수체 종자를 수출상품화하고 전문적으로 유통시킬 체계를 만들어 시장을 선점해야 할 필요성이 있다.

- 육종 참전복 배수체 종자를 개발하여 수출을 추진할 경우 수입국 요구 및 시장 선호도에 따라 육종형질, 종자의 크기, 물량 등 다양한 제품 규격에 관한 요구가 예상되며, 안정적인 국내 수출용 종자 생산 체계를 유지하기 위해서는 불임종자의 특성을 고려해 다양한 측면에서 실용화 기반이 구축되어 있어야 한다. 하지만 우리나라는 전복 성패 수출 경험은 풍부함에도 불구하고 종자를 수출한 사례는 전무하기 때문에 상기 언급한 수출용 전복종자의 국내 기반을 구축하기 위한 연구 결과들이 확보되어야 하며 수출을 위해서 전복 치패를 대용량으로 안전하게 해외로 수출할 수 있는 효율적인 수송방법 개발 또한 함께 개발되어야 한다. 아울러 육종 참전복 배수체 종자를 세계일류 상품으로 수출할 수 있는 체계적인 수출 마케팅 및 산업화 전략 수립 또한 필요하며, 이는 궁극적으로 수출 지향적 전문 신품종 종자회사들의 발굴되어 국제시장을 선도할 수 있는 능력을 갖출 수 있도록 국내 기반의 구축이 중요할 것이다.

나. 배수체 육종 참전복 종자 수출

- 국제사회의 무역 활동 추세를 보면 2020년부터 COVID-19로 인한 국경봉쇄 및 지역 간 이동 등 교류가 제한적이고 세계적으로 COVID-19의 확산세가 제어되지 못하고 있으나 우리나라의 경우 점차 안정화될 것으로 예상되므로 우리나라의 전복양식 현장 수요가 조금씩 나아질 수 있을 것으로 기대된다.
- 우리나라의 경우 육종된 우량 전복의 국내 기술 보급의 수요가 점차 증대하고 있으며, 배수체 육종 참전복 역시 예외는 아니다. 현재 배수체 대량유도 및 처리기술이 정립되어 민간 참여기업에서 생산하고 있으며 배수체 육종 참전복의 특징이 가시적으로 나타나고 있다. 따라서 배수체 육종 참전복의 수요는 점차 증가할 것으로 예상된다.
- 국내에도 배수체 육종 참전복의 생산 및 판매를 진행하였으며, 추후 전복의 최대 생산 및 소비국인 중국으로 수출을 위한 판매전략을 재수립하여 현지 유통망을 확보하고 동시에 활용할 것이다.

2. 제2세부프로젝트 연구수행 결과

2-1. 배수체 유도 및 처리기술 개량

가. 현장 적용성 개선

○ 필요성

- : GSP 1단계 연구개발 사업을 통해 확립된 참전복 배수체(3n) 유도 조건이 민간 치패장 등 현장조건에서의 대량처리 시 효과적으로 작동할 수 있도록 세부 기술 조건을 최적화하고 그 결과를 검증하여 배수체 유도 기술의 현장 적용성을 개선할 필요가 있음.

(1) 현장조건에서 배수체 처리를 위한 수온-최초처리 시점의 최적화

○ 목적

- : GSP 연구개발 사업 1단계에 개발된 프로토콜은 특정 수정란 배양온도를 기준으로 완성된 방법이다. 현장의 치패장의 경우 다양한 범위 온도에서 수정란 배양과 부화 조건을 이용하므로 현장에서 대량 배수체 처리를 위해서 안정적으로 사용할 수 있는 기준 온도의 마련이 필요하다. 초기 수정란 배양온도는 3배체 유도 시 극체 방출 시점을 결정하는 중요한 요인이며, 따라서 정립된 기준 온도에 따라 3배체 처리를 위한 최초처리 시점과 처리 기간을 최적화하였다..

○ 현장성을 위한 주요 고려사항

- : 현재까지 1단계에 개발된 3배체 유도 프로토콜은 항온(20°C)의 처리 전 초기 수정란 배양온도를 기준으로 완성된 방식이다. 그러나 여러 치패장의 경우 15~18°C 범위의 수정란 배양과 부화 조건을 이용하는 차이점이 있다. 초기 수정란 배양온도는 3배체 유도 시 극체 방출 시점을 결정하는 중요한 요인이며, 따라서 초기 배양온도에 따라 3배체 처리를 위한 최초처리 시점이 결정된다.
- : 그러나 1단계 연구를 통해서, 초기 배양온도를 낮게 할 때 3배체 처리 지속기간의 연장이 필요할 뿐만 아니라(처리 기간을 연장 시 처리된 수정란의 부화율 및 기형률이 증가할 잠재적 위해성이 있음), 초기 극체 방출 시점의 균일도가 다소 낮아지는 단점이 관찰된 바 있다.
- : 따라서 치패장 현장에서 기존의 배수체 유도 효율을 안정적으로 유지하기 위해 초기 배양온도와 처리 온도를 인위적으로 종래의 항온 조건으로 맞추어 수행해야 하는지, 아니면 보다 편의성을 증대시키기 위해 현장 수온에 맞추어 실시하여도 배수체 유도율에 큰 영향이 없는지를 확인하고자 하였다.
- : 아울러 1단계 개발 프로토콜에 의거, 처리된 수정란을 처리 수온과 동일한 온도에서 발생, 부화 및 유생 사육을 시행해야 하는지, 또는 처리 이후 현장 수온에 맞추어 배 발생 및 유생 사육을 수행하여도 배수체 처리그룹의 수율(유생 생존율, 기형률 등)에 유의적인 차이를 유발하는지를 검증하고자 하였다.

○ 1차 예비 조사 실험의 내용 및 결과

- : 1차 예비 시험 군의 설정 및 배수체 처리를 위해서 최초 배양온도 및 배수체 처리 시 온도를 14°C, 16°C, 18°C로 설정하였고, 최초처리 시작 시점을 수정 후 11 MPI (mins post insemination)부터 16 MPI까지로 1 MPI 간격으로 계획하였다. 화학적 처리 원(Caffeine; CF), 처리 농도 및 처리 지속기간은 모든 시험구에서 제1극체 억제 최소 요구 기간(1단계 최적화 조건)으로 고정하였다.
- : 배수체 처리 후 처치 - 처리된 수정란은 16°C 수조에서 부화를 유도하였고, 부화 유생을 표본을 뽑아 유세포분석을 수행하였다.
- : 1차 예비 시험 결과 시험구별 배수체 유도율 배수체 불완전 유도가 많은 온도 시험 조건에서 관찰되었다. 설정한 대부분의 온도 시험구에서 종래의 배수체 유도 효율보다 낮거나 배수체가 유도되지 않는 결과가 관찰되었고, 초기 배양과 처리 시 온도의 변화가 배수체 유도(즉, 제1극체 방출 억제)에 민감한 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 따라서 본 시험 결과를 재확인함과 동시에 기존의 배수체 유도 프로토콜과(1단계에 정립된 프로토콜)의 정량적 차이를 평가하기 위해서 2차 시험을 아래와 같이 실시하였다.
- : 2차 시험평가의 연구내용: 최초처리 온도 및 처리 시작 시점
- : 1차 예비 결과에 의거 최초처리 온도 구간에 따라 유의적인 배수체 유도율 변화가 확인됨에 따라, 1차 실험 결과를 재검증하고, 현장에서 사용 시 가능한 조건을 탐색하기 위해 2차 재평가 시험을 수행하였다.
- : (실험군 설정 및 배수체 처리) 1차 예비 실험의 가장 낮은 저온 배양은 상대적으로 강한 처리 또는 장시간의 극체 방출 억제 처리가 요구되며, 현실적으로 현장에서의 대량처리에는 적합하지 않다고 판단되었다. 따라서, 2차 평가의 경우, 초기 배양온도, 처리 시점, 처리 시 온도, 처리 지속기간을 대상으로 다음과 같은 조정된 실험구간을 설정하였다. 16°C에서 최초처리 시점을 10 MPI, 12 MPI, 14 MPI, 16 MPI로 설정하여 16분 및 20분 실시하였다. 18°C 그룹과 20°C 그룹에서는 10, 12, 14, 16 MPI에서 16분 처리를 수행하였다. 아울러, 처리 온도 구간별 부화율 등에 차이가 관찰되는지를 검증하기 위해서 각 온도구별 무처리 대조군을 각각 설정하도록 하였다. 각 시험구별 50,000~70,000개의 수정란을 대상으로 하여 제1극체 억제 방출 실험을 수행하였다.
- : (처리 수정란의 처치 및 분석) 처리가 완료된 수정란은 현장조건을 반영하기 위해서 16°C 수조에서 부화를 유도하였고, 부화율 측정을 위해 소량의 수정란(500개 내외)을 별도의 16°C 용기에 수용하여 부화 유생의 수와 부화 유생의 기형을 등을 평가하도록 하였다[그림 2-1-1]. 아울러 기존 확립 프로토콜에 의해 유도된 양성 대조군 그룹들의 경우 16°C와 20°C 부화조에 각각 수용하여 부화율의 차이가 관찰되는지를 확인하였다. 또한, 부화 후 상층부에서 활발히 수영하는 유생들

을 대상으로 정상 발달 유생의 빈도 등을 조사하기 위해 상층부 유생을 수거하여 현미경 검경을 실시하도록 하였다. 부화 유생 단계에서 배수성을 측정하기 위해서 부화 유생을 수거, 드라이아이스를 통해 급속 냉동시켰으며, PI 염색을 기반으로 한 유세포분석을 수행하였고, 유세포분석은 1단계 유생 시료를 대상으로 확립된 프로토콜을 이용하였다.



[그림 2-1-1]

대량 처리 세부 기술 조건을 위한 사전 조사 2차 시험 검증

○ 2차 시험평가의 연구결과: 시험구별 부화율

: 본 사전 평가 시험에서 사용한 무처리 대조군들의 평균 부화율은 67.1%, 66.1% 및 65.6%로 각각 나타나 통계적 유의차가 없었다($P > 0.05$). 제1극체 방출 억제를 위해 처리된 다양한 시험구의 부화율은 최초 배양온도 및 처리 온도에 따라 유의적인 큰 차이가 관찰되지 않았고, 대부분 시험구에서 무처리 대조군 평균 부화율의 약 80%~90% 수준에서 관찰되었다. 온도별 최초처리 시점(또는 처리 지속기간 그룹 간) 일부 소수의 그룹에서 무처리 대조군과의 통계적 유의성이 측정되었지만, 이러한 유의차가 특정 시험처리 요인에 의한 영향으로 선명하게 나타나는 것은 아니었으며 다만, 각 온도 구간에서 최초처리 시점이 지연되는 그룹들에서(14 MPI 또는 16 MPI) 상대적으로 앞선 최초처리 시점의 그룹들보다 다소 낮은 부화율을 보였다($P < 0.05$) [그림 2-1-2].

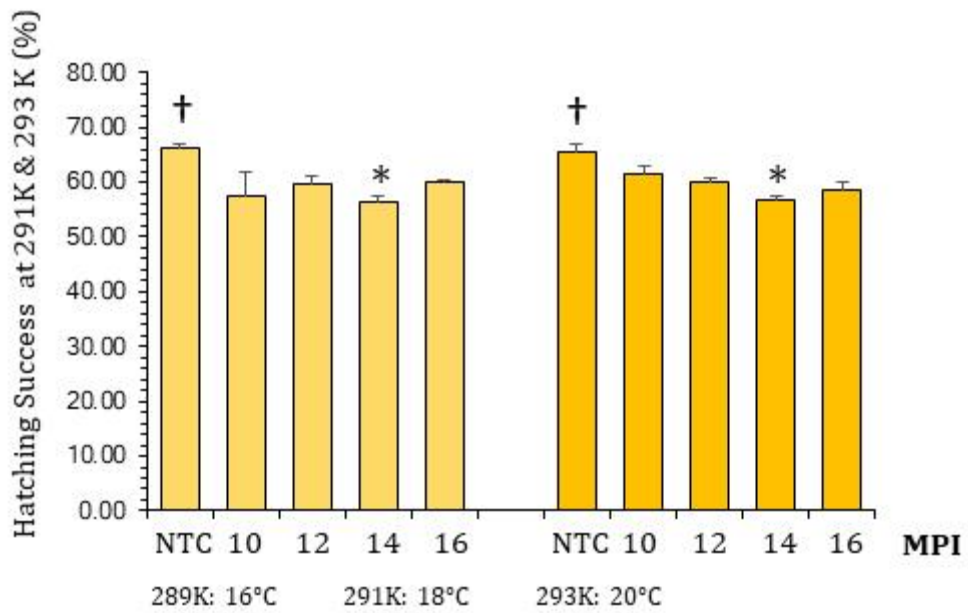
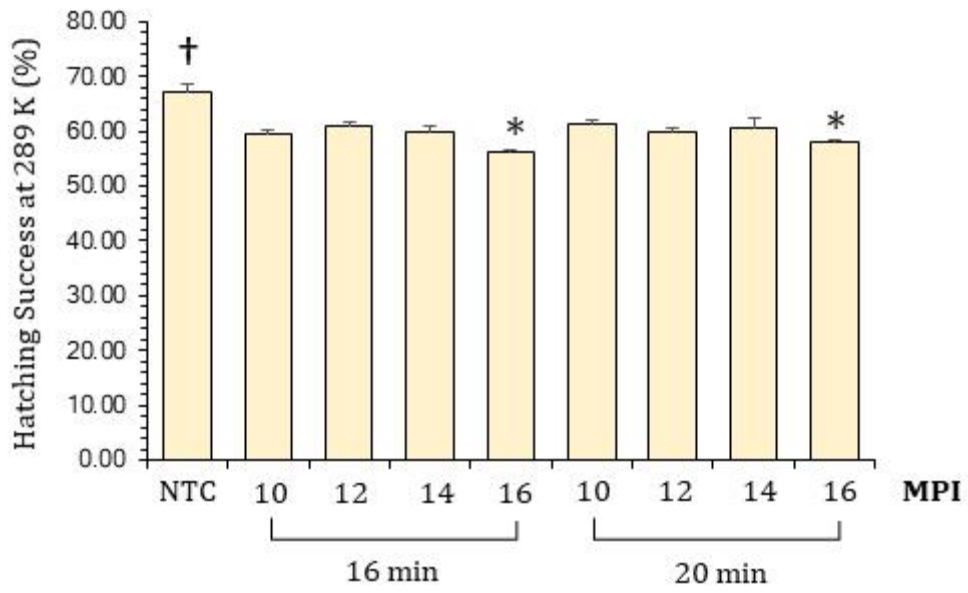
: 부화 유생의 기형률은 무처리 대조군과 비교 시(95% 이상 정상 부화 유생), 배수체 처리 기간이 상대적으로 장시간 처리된 그룹들에서 다소 높게 나타나는 경향을 보였으나, 이는 배수체 처리의 처리 지속기간 증가에 의한 처리 용액 노출 기간에 의한 것이며, 정상 형태의 유생 빈도는 최초처리 온도 구간에 의해 크게 영향을 받지 않는 것으로 판단되었다.

○ 2차 시험평가의 연구결과: 배수체 유도 효율

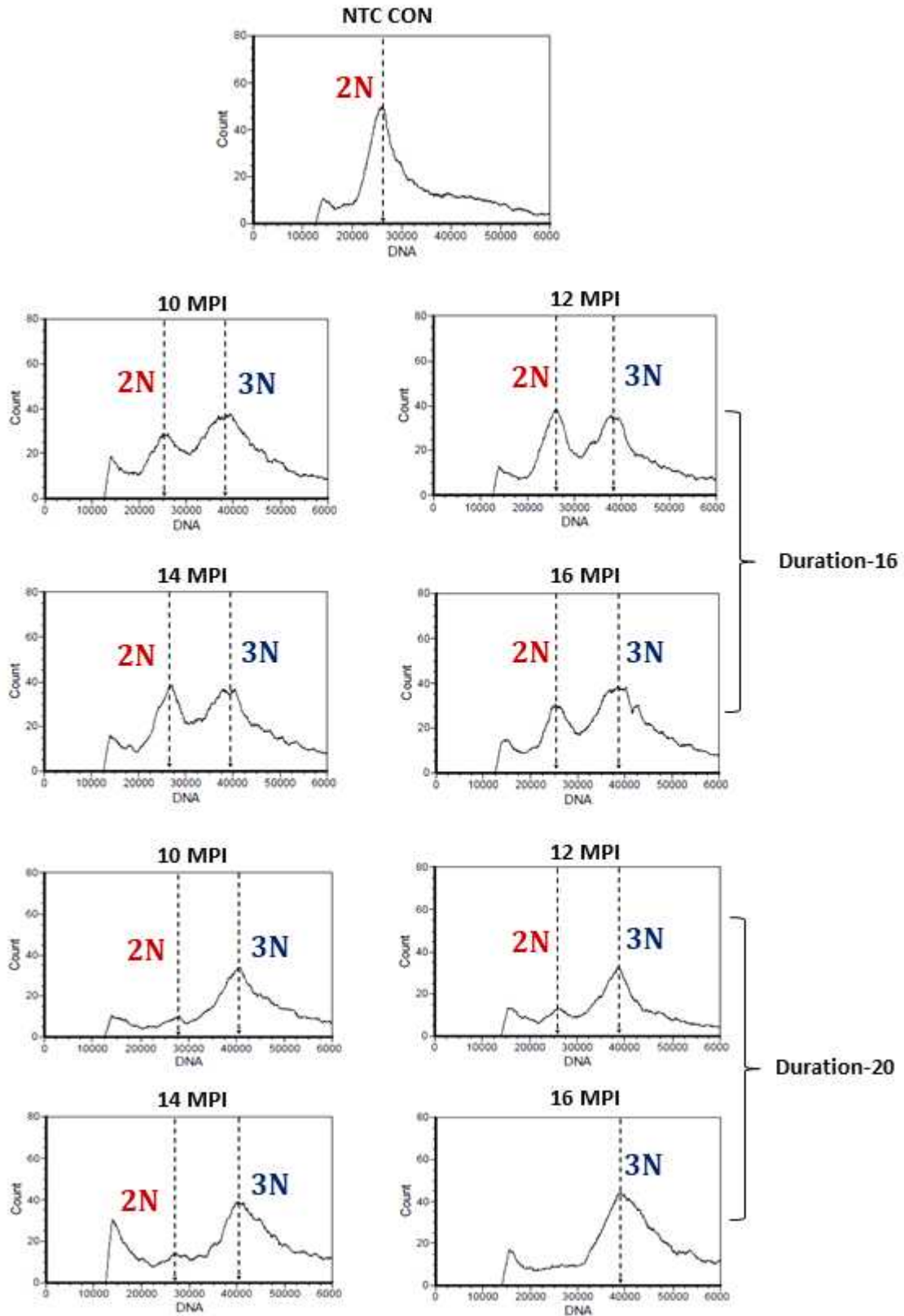
: 부화 유생의 유세포분석 peak 패턴을 분석한 결과, 최초 배양온도, 처리 온도 및 최초처리 시작 시점에 따라 다양한 배수체 유도 효율이 관찰되었다. 최초 배양온도 및 처리 온도를 16°C에서 수행할 경우, 무처리 대조군에서는 전형적인 2배체 peak이 정확히 예상대로 관찰되었다. 16°C에서 16분간 배수체 처리를 수행한 경우, 최초처리 시점을 지연시켜 처리를 수행하더라도 (즉, 10, 12, 14, 16 MPI), 2배체와 3배체 유생이 혼재하여 출현하였으며 2배체에 대한 3배체의 상대 비율 역시 40%~60%로 낮게 관찰되어 고효율의 배수체 유도가 불가능한 것으로 나타났다[그림 2-1-3].

: 16°C에서의 배수체 처리 지속기간을 20분으로 증가시킬 경우, 다소 높은 비율의 3배체 유생이 관찰되었으며, 10~14 MPI 그룹들에서는 약 80% 정도의 3배체 유도가 나타났고 16 MPI에서 20분간 처리된 그룹에서는 3배체 유생이 대부분 우점하는 peak 패턴을 나타내었다.

: 18°C 그룹들에서는(모두 배수체 처리 지속기간은 16분), 10 MPI 그룹의 경우 2배체 peak이 함께 출현하여 3배체 유도율이 약 60%에 머무는 것으로 관찰되었다. 그 외 처리시작 시점을 지연시킨 그룹들의 경우 12 MPI에서는 80% 이상, 14 MPI 그룹에서는 약 90%, 그리고 16 MPI 그룹에서는 거의 100%에 근접하지만 아주 낮은 빈도의 2배체 유생들이 매우 작은 minor peak을 형성하였다[그림 2-1-4].



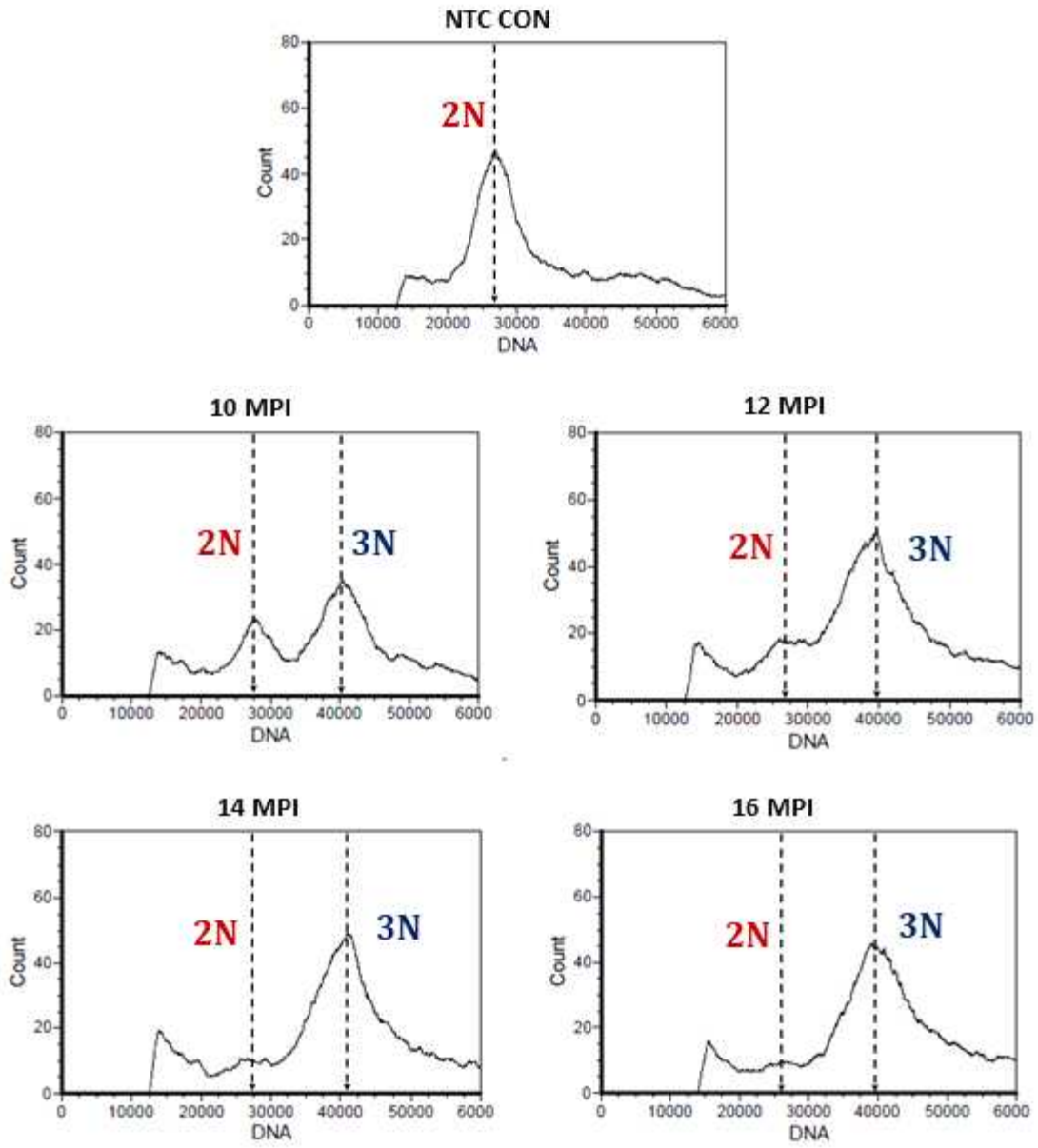
[그림 2-1-2]
 최초 처리 시점 및 초기 배양 온도 조건에 따른 실험구들의 부화율



[그림 2-1-3]

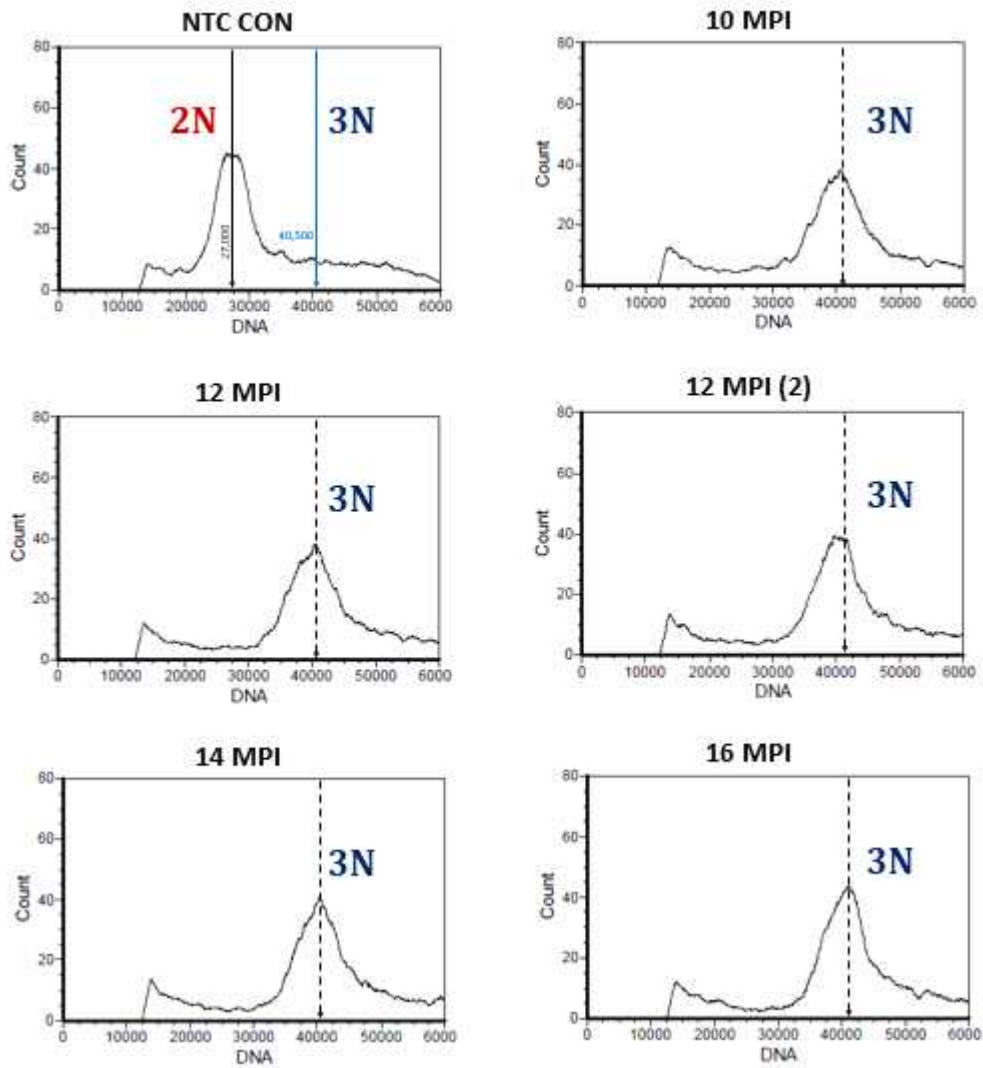
초기 온도 배양 조건 및 처리 시점이 배수체 유생 생성에 미치는 영향-1(14°C)

- : 20°C 그룹들에서는(모두 배수체 처리 지속기간은 16분), 무처리 대조군을 제외한 모든 배수체 처리그룹들에서 최초처리 시점과 무관하게 \approx 100% 3배체 유생 빈도를 나타내는 단일 3n peak이 안정적으로 관찰되었고, 이배체 peak 예상 위치에서 어떠한 minor peak들도 관찰되지 않았다[그림 2-1-5].
- : 따라서 본 시험평가에서, 기존 1단계에서 정립된 배수체 유도 효율과 동일한 효과를 나타내기 위해서는 20°C의 초기 배양/처리 온도를 이용하거나, 18°C에서 “16 MPI” 이상의 처리를 수행하거나, 또는 16°C에서 “16 MPI-20 d-min 처리” 이상의 처리 조건이 필요한 것으로 나타났다.
- : 그러므로 연구실 실험조건과 비교 시 상대적으로 많은 변수 요인이 존재하는 현장 치패장에서 대량처리를 안정적으로 실현하기 위해서는 소폭의 온도 또는 처리 시점의 변화에 따라서 배수체 유도 효율이 유동적으로 변할 수 있는 온도 구간을 이용하는 것보다는, 비록 항온 유지를 위한 별도의 장치가 요구되더라도, 극체 방출 감수분열의 속도 균일하게 증가시키는 온도 구간을 이용하는 것이 바람직하다고 판단되었다.
- : 이에, 제1세부 프로젝트와의 협의를 통해 현장 대량처리는 현장에서 사용하는 해수 온도를 그대로 이용하기보다는 일정하고 안정적인 결과를 보다 담보할 수 있는 20°C의 항온 해수를 이용하기로 하였고, 이를 토대로 그 외 세부처리 방법들을 현장에 맞추어 아래와 같이 검토하였다.



[그림 2-1-4]

초기 온도 배양 조건 및 처리 시점이 배수체 유생 생성에 미치는 영향-1 (18°C)



[그림 2-1-5]

초기 온도 배양 조건 및 처리 시점이 배수체 유생 생성에 미치는 영향-3 (20°C)

(2) 대량처리를 위한 세부 기술 조건의 개선

○ 목적

- : 상기 정립된 처리 시점과 온도와의 상관관계 결과를 토대로 현장에서 대량처리를 위한 간편화 조건을 포함하여 실제 민간 전복 종묘장 조건에 더욱 편리하고 효과적으로 적용하기 위해서 세부 조건을 현장환경 중심으로 평가하고, 대량처리를 위한 세부처리 방법들을 최적화함.

○ 처리 수정란 규모처리 수정란 규모

- : 주관연구기관과 현장 민간업체와의 협의 내용에 따라 배수체 채묘 및 시범 생산을 위해 할당된 수조 크기를 고려하여 배수체 처리는 약 1,000만개 수정란을 시범적으로 2회에 걸쳐 처리할 수 있는 조건을 마련하였다.
- : 해당 규모의 처리가 원활히 이루어질 수 있도록 사전 실험을 통해서 처리 용액 1-L 당 배수체 유도 효율과 생존율이 감소하지 않는 적정 수의 수정란을 평가하였으며, 이를 통해서 난 수거 장비의 크기, 처리 용기의 크기, 처리 용액의 양 등을 결정하였다.

○ 해당 지역 해수 평가

- : 현장 해수 수질이 배수체 유도 효율에 미치는 영향이 없음을 확인하기 위해서 기존 사용 실험 해수와 현장 해수를 대상으로 동일 수정란에 배수체 처리를 하여, 배수체 유도율에 유의미한 차이가 없음을 사전에 평가하였다.

○ 대용량 처리 용액의 제조 및 간편화

- : 현장 해수와 실험 해수 간 배수체 유도에 관한 영향 차이가 없음을 확인 후 현장에서 고용량의 배수체 처리 용액을 신속히 손쉽게 제조할 수 있도록 배수체 유도 효율에 영향을 미치지 않으며 안정적인 실온 보관(고농축 시약 제조서부터 현장 도착 후 예상 처리 시작 시점까지의 총 소요 시간 및 온도 등을 고려)등이 가능한 최대 시약 농축 한계를 사전에 평가하였다.
- : 아울러 고농축 용액의 신속한 희석을 위한 전용 용기 및 해수 혼합 용기를 최적화하여 현장에서 간편하고 신속한 용액 마련이 되도록 하였다.

○ 전처리 유지 수조, 처리 수조 및 세척 수조 등 세부 조건

- : 전원 공급으로 항온이 간편하게 유지될 수 있는 온도 조절 시스템을 테스트하여 수정란이 열원에 직접 노출되지 않고 전처리(최초처리 직전까지) 및 처리 지속기간까지 요구되는 온도 범위($\pm 0.2^{\circ}\text{C}$)로 유지되도록 최적화를 수행하였다.
- : 아울러 다량의 수정란이 균일하게 처리 용액에 노출될 수 있도록 물리적 충격 없이 처리 동안 혼합될 수 있도록 공기공급장치를 최적화하여 마련하였다.
- : 다량의 수정란을 처치하는 과정 중에 전처리 수조에서 처리 수조로의 수정란 이동, 그리고 처리 후 처리조에서 세척조로의 수정란 이동에 용액 제거 등을 위한 시간이 소요될 수 있음을 고려하여 1차 및 2차 처리조로 순차적인 이동을 수행

함으로써 용액의 희석에 의한 영향을 최소화하고자 조정하였고(전처리에서 처리 조로 이동 시), 이후 처리된 수정란을 순차적으로 해수를 교환할 수 있는 간편한 세척 방식을 마련하였다.

○ 부화 유도, 샘플링 및 추가적인 scale-up 처리 조건 구축

: 처리된 수정란의 부화 용기 수용, 샘플링, 유생 사육은 해당 치패장 현장에서 수행하는 방식을 동일하게 실시하여 대조군과의 차이 여부, 해당 현장에서 일반적인 유생 생산 시와의 차이점이 관찰 여부를 평가하였다.

: Pilot 규모로 최적화된 조건들을 조합하여 표준 처리 방법을 도출하였으며, 해당 결과를 제1세부 프로젝트에 전달, 1세부에서 추가적인 대량처리 scale-up (수천만~1억 수정란 대상) 및 자동화 장치의 구성을 수행하였다(제1세부프로젝트 연구결과 참조).

(3) 민간 치폐장에서의 대량처리 효과의 검증

○ 목적

- : 상기 최적화 대량처리 조건을 기반으로 민간현장에서 배수체 대량처리를 수행하고, 이를 통해 정립된 대량처리 조건이 원활히 작동하는지 검증하고 배수체 종자의 시험생산으로 연결함.

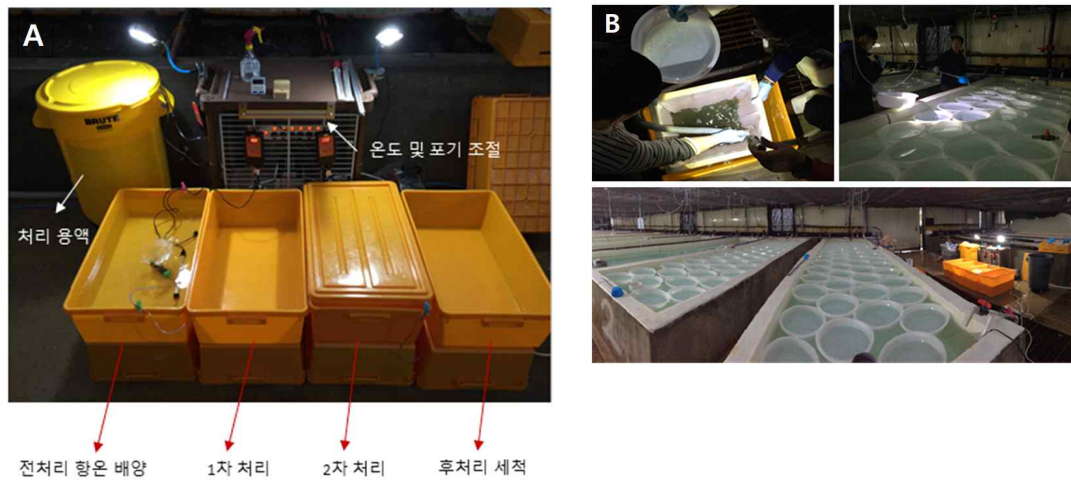
○ 대량처리 세부 내용 및 방법

- : (산란 유도 및 수정란 생산) 제1세부 프로젝트 기관에서 산업화 가계로 선발 육종된 전복 모패를 현장 치폐장으로 이송하여 해당 치폐장의 방식대로 간출 및 자외선 조사 해수 처리를 통해 방란 방정을 유도하였다[그림 2-1-6]. 별도로 마련된 모패 산란·방정 유도용 수조 장치를 이용하여, 자외선 해수를 2-3회 환수하면서 방란 방정이 이루어지는지를 관찰하였고, 방란 방정이 이루어진 모패들로부터 배우자를 수거하여 배우자의 미수정 상태, 정자의 활성도, 알의 균일 모양 등을 현미경으로 확인하였다. 회수한 미수정란은 17~18°C 여과 해수로 세란하고, 알 수를 측정하여 500만개씩 두 개의 분조(aliquots)를 배수체 처리를 위해 별도의 용기에 마련하였다. 정자는 적절한 활성도가 확인된 시료를 선발하여 수정에 이용하였다. 습식법을 이용하여 수정을 수행하였고, 수정 시 사용한 해수의 온도는 18°C였으며, 이후 수정란의 세란 역시 18°C 해수를 이용하여 2분간 실시하였다.
- : (배수체 처리) 2분간 세란 한 수정란을 다시 준비된 여과 해수로 1분간 세란하였고, 곧바로 준비된 전처리 수조(최초 배양 항온 수조)로 옮겨 최초처리 시점까지 동일 온도에서 유지하였다[그림 2-1-7A]. 1차 배수체 처리조와 2차 배수체 처리조에 순차적으로 이송시켜 처리 지속시간을 상기 시험조건에 맞추어 1단계 정립한 처리 조건을 이용하여 배수체 대량처리를 수행하였다. 배수체 처리가 완료되면, 곧이어 동일 온도의 여과 해수를 담고 있는 세척조로 옮겼고, 이후 16~17°C 여과 해수를 분당 2L의 속도로 세척조에 첨가하여 잔여 용액이 완전히 제거될 수 있도록 세란 하였다.
- : (부화 유도, 유생 사육 및 치폐 생산) 세란이 완료된 배수체 처리 수정란은 16°C 직사각 수조에 준비된 부화 용기들(지름 40cm 원형 플라스틱 용기)에 분포하여 발생을 유도하였다[그림 2-1-7B]. 배수체의 부화율과 생존율 등을 평가하기 위해서 배수체 처리 과정을 생략한 무처리 대조군을 동일 모패에서 얻은 수정란(이배체 대조군)을 이용하여 역시 앞서와 동일한 방법으로 16°C 수조에 장착된 부화 용기에 수용하였다. 이후 부화가 개시되는 시점부터 부화가 대부분 종료되는 수정 후 약 18~20시간째에 부화 용기에 있는 상층 유영 유생들을 동일 16°C 수조에 풀어 수용하였고, 이후 유생 사육, 채묘 및 관리는 민간현장에서 그간 수행해온 방식대로 동일하게 실시하여 현장의 조건이 배수체 유도와 종자 생산에 적용 가능한지를 평가하였다.



[그림 2-1-6]

배수체 현장 대량 처리를 위한 모패 선발 및 간출 자극



[그림 2-1-7]

배수체 현장처리에서 배수체 유도 및 부화 유도

A. 배수체 대량처리를 위한 처리 시스템의 구성 및 준비

B. 배수체 대량처리 후 조치 및 부화 조 수용

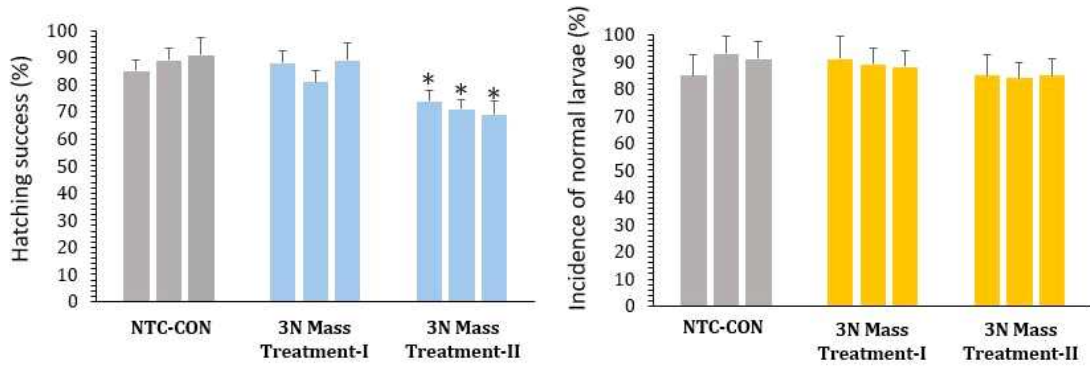
: (유생 배수체의 유도 효율 조사) 부화 시점에서 상층 유생을 일부 수거하여 연구실로 이송하였고, 이송 후 연구실에서 소규모 유생 수조에 수용 후 유생의 배수성 분석(유세포분석), 유생의 정상 형태 유무, 기형률 등을 평가하였다. 유생의 배수성 분석은 이송 직후 및 부화 24시간 이후에 2차례 실시하였고, 현미경 검경을 통해 정상 유생의 빈도 및 기형률을 측정은 부화 24시간째 유생을 기준으로 평가하였다.

○ 민간 치폐장에서의 현장 대량처리 결과

: (부화율 및 생존율) 현장에서 처리된 배수체의 부화율은 대조군의 약 85~90%에 해당하여 기존의 최적화된 프로토콜에서 얻어진 수치와 유사하였으며, 2차 대량처리 시 다소 낮은 부화율이 관찰되었으나 egg batch에 의한 차이로 판단되고 유의미한 차이는 아니었다. 부화 유생을 24시간 경과 시점에서 정상 모양의 유생 빈도를 측정한 결과, 역시 대조군과 큰 통계적 차이 없이 조사한 batch 별로 80~90%에 달하는 정상 빈도를 나타내었고, 생존율 및 유영 능력 등에서 큰 차이가 관찰되지 않았다[그림 2-1-8].

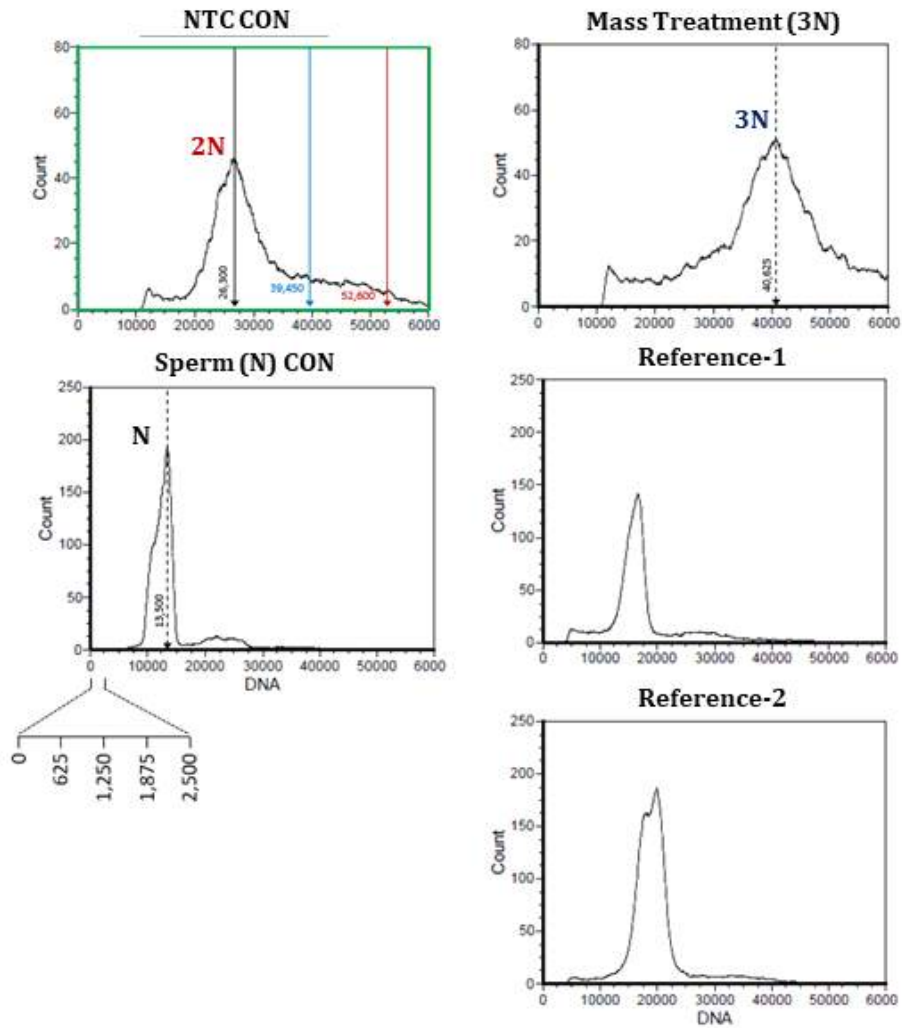
: (유생 배수체 확인) 현장에서 대량 처리된 배수체 그룹은 전형적인 3배체 단일 peak을 나타내어 고효율로 배수체가 유도되었음을 잘 알 수 있었고, 본 현장 시험에서 적용된 조건들이 종래의 실험 시설에서 얻어진 배수체 유도 효율과 유사한 정도로 배수체 전복 유생의 생산이 가능함을 나타내었다. 반면 무처리 대조군은 전형적인 2배체 단일 peak을 나타내어 앞서 3배체 그룹과 선명한 차이를 유세포분석에서 보여주었다[그림 2-1-9].

: (치폐의 배수성 확인) 유생 단계에서 확인된 배수체 유도율이 채묘 후 치폐 생산 시점까지 안정적으로 유지되는지를 재검증함. 유생 사육 이후 수거된 유생은 준비된 수조에 채묘 하였고 현장 치폐장에서 사용하는 방법을 그대로 적용하여 대조군과 치폐 사육을 수행하였다(사육조건 및 모니터링은 제1세부 프로젝트 연구결과 참조). 현장조건에서 이배체 대조군과 동일 방식으로 사육한 치폐(수정 후 약 5개월)를 무작위로 수집하여 에탄올에 고정, 연구실로 옮긴 후 개체 측정과 배수성 분석을 수행하였다[그림 2-1-10]. 배수성 분석을 위해서 치폐로부터 소량의 근육 부위를 얻은 후 균질화 과정을 통해 세포들을 모아 유세포분석을 수행하였다. 유세포분석은 앞서와 같이 PI 염색을 기반으로 세포 당 DNA 함량을 측정하여 배수성 평가를 하였다. 유세포분석 결과, 분석한 12마리의 무처리 대조군은 모두 2배체로 판정되어 예상과 일치하였다. 반면 배수체 처리그룹은 분석한 34마리 중 33마리에서 3배체 단일 peak이 관찰되어 유도율이 97.1%로 관찰되었다. 따라서 배수체 유생이 채묘, 치폐 성장 과정 중 특이적인 탈락 없이 일반 대조군 치폐와 유사한 생존율 및 성적을 나타냄을 알 수 있었고, 형태적 또는 크기 차이는 아직 치폐 단계에서 관찰되지 않았다.



[그림 2-1-8]

대량 현장 배수체 처리 그룹의 부화율(좌) 및 정상유생 빈도(우)



[그림 2-1-9]

대량 현장 배수체 처리 그룹의 유세포분석(flow cytometry) 분석



2N

연번	각장(mm)	각폭(mm)	각고(mm)	무게(g)
1	13.81	9.71	3.60	0.21
2	13.94	10.17	3.60	0.23
3	14.11	9.89	3.73	0.24
4	14.88	11.04	3.24	0.25
5	14.00	14.17	3.50	0.23
6	13.76	9.83	3.20	0.22
7	12.49	8.56	3.13	0.15
8	12.83	8.96	3.18	0.19
9	12.26	8.86	2.79	0.15
10	11.78	8.80	3.05	0.14
11	12.60	9.22	3.36	0.18
12	11.71	8.34	2.99	0.13
13	12.42	8.73	3.01	0.15
14	11.98	8.57	2.81	0.14
15	11.38	8.24	2.81	0.12
AVE	12.93	9.54	3.20	0.18
STD	1.07	1.50	0.30	0.04

3N

연번	각장(mm)	각폭(mm)	각고(mm)	무게(g)
1	13.97	9.92	3.32	0.24
2	16.28	11.32	3.88	0.32
3	15.17	10.13	3.28	0.26
4	13.83	9.49	3.41	0.20
5	13.69	9.69	3.50	0.22
6	13.93	9.61	3.62	0.22
7	13.70	9.32	3.96	0.24
8	13.68	9.67	3.63	0.22
9	13.25	8.90	3.33	0.19
10	15.96	10.84	4.29	0.34
11	17.02	11.63	4.11	0.39
12	16.19	11.45	4.41	0.36
13	13.37	9.84	3.43	0.19
14	13.13	9.70	3.49	0.21
15	13.21	9.10	3.43	0.20
AVE	14.43	10.04	3.67	0.25
STD	1.32	0.86	0.37	0.07

[그림 2-1-10]

대량 처리 후 현장에서 사육한 치패 시료(수정 후 5개월)

○ 민간 치패장 분양용 배수체 대량처리 그룹의 평가

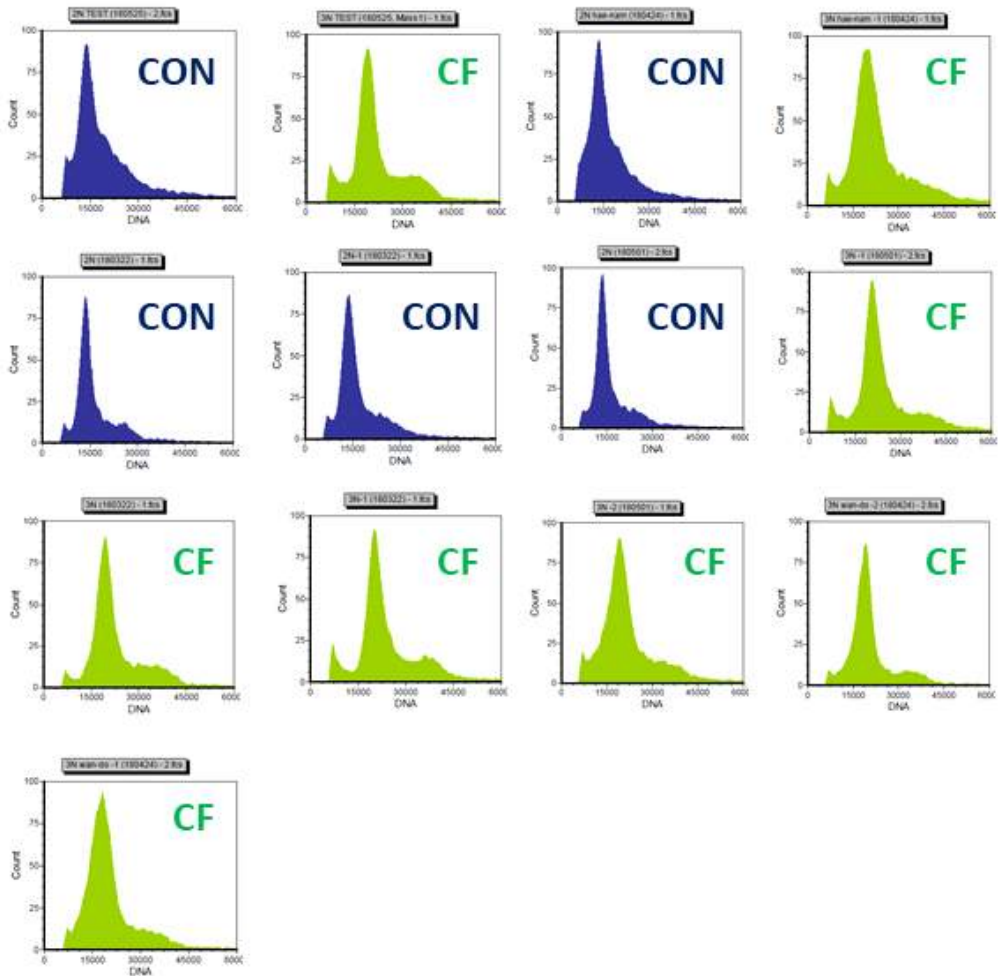
- : 상기 언급한 바와 같이 제2세부프로젝트 기관에서 정립한 최적 대량처리 조건을 토대로 제1세부 프로젝트 기관은 민간 치패장 분양이 가능한 수준으로 대량처리 규모를 확대하여(자동화 장비 포함 등) 1억 마리 배수체 유생을 생산, 취급할 수 있는 공정을 정립하였다. 제1세부프로젝트 기관으로 전달된 대량처리 조건이 재현성 있게 안정적으로 작동하는지 조사하기 위해 제1세부프로젝트 기관에서 생산한 유생을 대상으로 검증 조사를 수행하였다.
- : 2018년 3월부터 6월까지 총 8회에 걸쳐 생산된 실험군 유생(총 1억 마리 생산)을 대상으로 배수체 유도 효율의 재현성을 평가하였다. 배수체 분석은 유세포분석법을 이용하여 상기 회차별 대량처리 군으로부터 부화한 부화 유생을 표본 채집하여, 단일 3배체 peak이 형성되는지를 확인하였으며 이때 회차별 유생 시료를 2 반복 분석하였다.
- : 유도를 재현성을 조사한 결과, 분석한 모든 처리그룹에서 유세포분석 시 단일 3배체 peak이 형성 관찰되었으며 대조군 (2N) 대비 정확히 1.5배의 세포 당 DNA 함량에 해당하는 평균 channel 값을 나타냄으로써, 본 연구에서 개량된 3배체 대량처리 조건이 효과적이고 안정적으로 작동하는 것을 알 수 있었다[그림 2-1-11].
- : 상기 8개 처리 군 중 3개의 대량처리 그룹의 부화율 및 유생의 정상성을 이배체 무처리 대조군과 비교한 결과, 부화율은 대조군과 통계적으로 유의적인 차이가 없거나, 다소 낮은 부화율(대조군 대비 약 85%)을 보여 본 연구에서 3배체 그룹들에서 관찰되는 통상의 수치(부화율, 유생 생존율 및 정상성)와 다르지 않아 사용한 프로토콜의 안정성을 잘 나타내었다.

나. 4배체 유도 기술 가능성 평가

○ 목적 및 범위

- : 3배체 전복의 대량생산을 보다 간편화하기 위한 목적으로 4배체로부터 2배체 배우자(2n)를 확보, 정상 이배체의 반수체 배우자(n) 간 수정을 통해서 3배체 접합자(3n)를 화학적 처리 없이 일반 수정과정을 통해서 3배체를 대량생산하기 위한 전략을 수립하고자 하였다. 그러나 전복의 4배체 기술을 아직 정립되어 있지 못한 상태로서, 당시 종자 개발 등에 사용할 수 있는 생존력 있는 4배체 전복의 생산 조건은 전무한 상태였다. 실제 4배체 전복이 물리·화학적 처리를 통해 생존력이 확보 가능성은 단정할 수 없는 상태였다. 이에 국내 전복 4배체 기초 자료가 전무한 실정에서 4배체 기술이 전복에서 개발 가능성이 있는지에 대한 사전 조사와 예비 타당성 평가가 필요하였다. 본 4배체 개발 연구항목의 경우, 많은 기초 연구와 시험이 요구되기 때문에, 본 GSP 사업에서는 2단계 2차연도까지 우선적인 시험연구를 수행하되, 전복의 생식 연령을 고려할 때 4배체 기술이 확

보되더라도 본 GSP 사업의 종자 생산에 이용하는 것은 현실적으로 불가능하므로 2차연도까지 연구개발과 시험을 수행하여 그 결과를 토대로 앞으로의 기술 완성도를 예측할 수 있는 수준까지 추진하고자 하였다. 따라서 본 2단계 1차 및 2차연도에서는 다양한 후보 처리 조건들을 설정한 후, 4배체 배수화에 사용될 수 있는 세포분열 억제 기법들이 전복 수정란에서의 작동 여부에 대한 우선 확립하고, 해당 결과들을 토대로 4배체 유전형 유도 및 생존력 시험평가 자료 확보를 목표로하였다. 이후 3차연도~5차연도에는 당초 세부프로젝트의 목표인 3배체의 특징 평가에 주력하되, 4배체와 관련해서는 재현성 평가 및 생존율 개선 시사점을 갖는 세부 조건의 평가를 실험실 수준에서 제1세부프로젝트 기관과의 협의를 통해서 그 추진 여부를 결정하여 수행하도록 하였다.



[그림 2-1-11]

육종전복보급센터 대량처리 그룹의 배수체 판정결과

(1) 세포분열 억제를 위한 예비 기반 조사 및 탐색

○ 사배체 실험 관련 배우자, 수정란, 유생 취급·분석 공통사항

- : 기초 실험을 위해서 시험 환경에 대한 변수 발생을 최소한으로 통제하기 위해서 아래와 같이 생물 취급 및 분석조건을 일정하게 유지하였다.
- : (모패 이용) 4배체 유도 및 관련 기술개발에 사용한 모패는 (구)육종연구센터(제1세부프로젝트 기관)에서 본 GSP 사업을 위해 1단계에 확보 모패로 유지하고 있는 4~5년산 모패와 선발육종을 통해 산업화 가계(또는 후보 가계)로 선발하여 유지하고 있던 3~4년산 암수 모패로서, 제1세부프로젝트 기관에서 정립된 방법에 따라 관리하였다.
- : (방란, 방정, 인공수정 및 수정란 관리) 산란 유도를 위해서 생식소의 육안검사를 통해서 선발한 모패 암수는 실온 간출과 자외선 조사 해수 처리를 통해서 암실 조건에서 방란, 방정을 유도하였고(실험 일자별로 16~18°C 범위의 해수 이용), 방란 및 방정이 확인된 최초 시점에서부터 방란, 방정의 진행을 관찰하여 일반적으로 1시~1.5 시간 내 난과 정자를 수거하였다. 수거된 정액의 경우, 동일 일자의 반복 실험 등이 필요할 경우 10~12°C에 암냉 보관하면서 정자의 활성을 현미경으로 관찰 후 수정에 이용하였다. 수정 및 수정란 세척의 경우, 정자 운동성을 현미경으로 검경 후 확인한 정액 시료를 이용하여 수정에 이용하였고, 수정란 일부(약 500개)를 샘플링하여 제2세포기로 발생하는 수정란의 비율을 기준으로 수정률을 계산하였다. 미수정란의 세척은 극체 방출의 시간이 비의도적으로 앞당겨지는 것을 방지하기 위해 18°C로 실시하였고, 수정 및 수정 후 세란 과정은 시험구별로 설정된 최초 배양온도(전처리 온도)와 같은 온도로 수행하였다.
- : (발생, 부화 유도 및 유생의 정상성 분석) 배수체 처리 또는 극체 방출 억제 처리 등, 4배체 관련 처리가 이루어진 그룹의 부화율을 평가하기 위해서, 시험구별 약 300~500개의 수정란을 플라스틱 용기에 수용하여 수정 24시간째 부화 용기에 있는 전체 시료를 동시에 고정 처리하였다. 고정 처리 시료로부터 3 반복의 무작위 샘플링(~100개)을 통해서 미부화 발생 배(embryo) 및 부화 유생(hatched larvae)의 비율을 측정하여, 시험구 당 평균 부화율을 계산하였다. 부화 유생의 기형을 평가를 위해서, 해당 부화 그룹으로부터 부화 유생 중 비정상적 외형을 갖는 유생의 빈도를 계산하였으며, 역시 무작위 샘플링을 통한 3 반복 측정을 수행하였다. 아울러 부화 유생이 유생 사육기간 동안 생존과 발달 가능성을 사전에 평가한다는 측면에서 부화 후 24시간째부터 전형적인 veliger 단계를 보이는 시점에서 대조군과 처리그룹의 형태적 정상성을 비교 분석하였다. 분석은 유생의 shell, velum, foot 등이 정상 형태로 발달하였는지를 기준으로 평가하였다.
- : (유생의 배수성 분석) 처리그룹으로부터 부화 종료 예상 시점보다 약 2시간 이전에 중·상층부에서 유평하는 유생을 사이펀으로 회수하였으며, 회수 직후 얼음을

이용하여 유생의 활동성을 멈추고 해수를 제거한 후 직접 유세포분석에 이용하거나 드라이아이스를 이용하여 냉동 처리된 유생을 -80°C 초저온 냉동고에 분석 직전까지 보관하였다. 유세포분석에 사용 직전, 유생은 4°C 멸균 PBS (pH 6.8)에 2회 신속히 세척 후 균질화 과정을 거쳤으며, 앞서와 같이, 불순물 제거 및 세포 분리 후 PI 염색을 기반으로 하는 세포 당 DNA 함량 분석을 통해 배수성을 판정하였다. 배수성 판정을 위해 표준 시험구로서 genome size를 알고 있는 어류 세포, 반수체 전복 세포(이배체로부터 얻은 정액 시료), 이배체 전복(근육 조직), 삼배체 전복(근육 조직)을 이용하여 haploid-diploid-triploid 표준값을 분석마다 보정, 확인 후 실험 시료의 배수성을 평가하였다.

○ 수정 후 제1난할 억제 방식 평가

- : 어류 등에서 정립된 통상의 제1난할 억제 방식에 의해 배수체 유도를 수행할 경우, 전복 수정란의 생존율에 미치는 영향을 1차 예비 조사하기 위해서, 물리적 처리, 화학적 처리 및 중복처리에 대한 수정란의 생존 가능성을 조사하고자 하였다.
- : 인공 방란 방정된 배우자들을 수정시키고, 수정 후 제1난할이 육안으로 관찰 가능한 시점의 10분 및 20분 이전에 세포분열 억제 처리를 위해서 극체 방출 억제에 이용하고 있는 화학적 처리 원(CF), 물리적 처리 원(온도자극; Thermal shock; TS), 그리고 이들 두 처리 조건을 동시에 처리하는 중복처리(CF+CS)를 처리하였다. 아울러 본 실험에서 사용한 처리 원들이 기본적인 분열 억제 효과가 있는지를 확인하기 위한 참조 군으로 극체 방출 억제 시점에서 CF, CS 및 CF+CS를 처리하여 제1극체 또는 제2극체 억제 그룹을 설정하여 검증하였고, 아울러 생존율에 미치는 효과를 확인하기 위해서 무처리 대조군(CON)을 설정하였다. 시험구별로 약 70,000~100,000개의 수정란을 이용하여 3 반복 조사를 통해 평균 생존율(부화율) 등을 평가하였다. 처리 후 역시 20°C 항온 배양 조건에서 배 발생 진행 여부와 부화율을 조사하였고, 기형률을 측정하였다.
- : 무처리의 대조군의 수정률은 95%, 그리고 부화율은 평균 85%로 관찰되어 인공 수정에 의한 배우자의 질이 우수하고, 적절한 방식으로 수정란의 관리가 되었음을 나타내었다. 참조 그룹의 부화율 역시 80~88%로 나타나 무처리 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았으며, 참조 군의 예상 배수성(3n)이 모두 유세포분석에 관찰되어, 사용한 시약들이 적절하게 감수분열을 억제한 것으로 나타났다. 그러나, 본 조사에서 설정한 모든 난할 억제 처리그룹들의 경우 모두 10% 미만의 부화율을 나타내어, 극심한 생존율 저하를 보였으며, 특히 부화한 유생들도 상층부에서 활발한 유영을 하지 못하고, 부화 후 대부분 폐사하거나 저층으로 가라앉는 양상을 보였다. 너무 극심히 낮은 부화율로 인해 분석에 필요한 충분한 수의 유생을 모든 실험군에서 확보하지는 못하였으나, 분석한 시험구에서 정확한 배수체 peak들을 관찰할 수 없었다. 따라서, 본 예비 조사 결과, 전복의 수정란

은 감수분열 시기까지 물리·화학적 처리를 통해 세포분열이 효과적으로 억제될 수 있으나, 이후 수정란의 난할(체세포분열)이 진행되는 시점에서는 통상의 물리·화학적 처리에 매우 민감하게 반응하여, 감수분열 억제 시 생존율에 큰 영향을 미치지 않은 처리 조건들을 이용하더라도 난할 과정에서는 극심한 생존율 감소가 유발되었다. 이상의 결과를 토대로 난할 억제를 통한 4배체 유도는 기술적으로 큰 실효성이 없다고 판단하였다.

○ 극체(polar body)의 순차적 억제 처리를 위한 예비 평가

- : 배수체 유도를 위해 두 개의 극체를 하나의 접합자에 모두 포함할 수 있는 처리 방법을 이용하고자, 이에 관한 예비 평가하고자 하였다. 두 개의 극체(제1극체 및 제2극체)를 원하는 시점에서 각각 단독 또는 두 개의 극체를 순차적으로 모두 억제할 수 있는 조건을 확보할 경우 정자의 추가적 조작을 통해서 다양한 배수체 조합을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 향후 3배체로부터 4배체를 유도할 수 있는 기술 적용 기회의 폭을 확대할 수 있다. 따라서 본 연구항목에서는 4배체 관련 기반기술의 확보 측면에서 두 개의 극체 방출을 순차적 모두 억제할 수 있는 기본 조건들을 확보하고, 이들 기술 조건이 전복 수정란의 부화율, 부화 유생의 생존율(기형율) 및 배수체 유도 가능성을 조사하고자 하였다. 이에, 이와 관련한 1차 예비 조사로서 극체 방출 억제 효과가 확인된 처리 조건들의 조합에 관하여 가능성을 평가하고자 하였다.
- : (실험조건 및 처리그룹 설계) 제1극체를 억제할 수 있는 화학처리 기본 조건으로서 11-MPI 최초처리 시작, 처리 원 CF 농도 8 mM, 처리 지속기간 16 min (duration mins; d-min)을 설정하였으며, 온도 자극에 의한 물리적 처리 기본 조건으로서 역시 11 MPI, CS-1°C/16 d-min을 설정하였다. 제2극체를 억제할 수 있는 기본 조건은 제1극체 억제 강도를 동일하게 27 MPI에 적용하는 것으로 설정하였다. 제1극체와 제2극체를 순차적으로 억제할 수 있는지 가능성을 1차 예비조사하기 위해서 CF-CS 처리와 CS-CF 처리가 극체 억제를 중복시킬 수 있는지를 평가하였다. 아울러 CF용 무처리 대조군과 CS용 무처리 대조군을 설정하여 2배체 대조군을 마련하였다. 처리 후 부화 유생을 대상으로 유세포분석을 통해서 무처리 대조군(2배체) 대비 배수체(단일 극체 억제형 및 두 개 극체 억제형) 그룹의 세포 당 DNA 함량을 평가하였다.
- : (단일 극체 억제형 참조 그룹들의 배수성 판정결과) 설정한 두 개의 무처리 대조군에서는 전형적인 2배체의 flow cytometer peak이 관찰되어 예상과 일치하였으며, 역시 제1극체가 억제된 CF 처리군, CS 처리군, 그리고 제2극체가 억제된 CF 처리군, 그리고 CS 처리군 모두 3배체 peak이 관찰되었다. 따라서 본 시험에 사용된 극체 방출 억제 시점과 처리 강도가 제1극체와 제2극체를 각각 효과적으로 방출 억제할 수 있는 조건이었음을 잘 나타내었다.

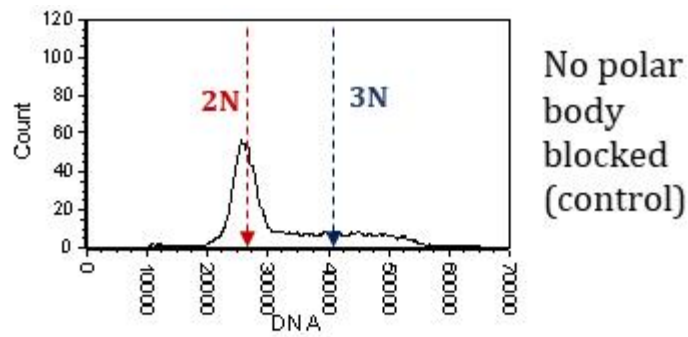
: (제1 및 제2극체 중복 억제형 처리군) 두 개의 기본 조건을 병행한 처리군(11 MPI 및 27 MPI에서 제1극체와 제2극체를 억제한 병행 처리군)의 경우, 상대적으로 단일 극체를 억제한 시험구들에 비해서 signal noise가 높게 나타났으며, main peak의 위치를 고려 시, CF-CS 조합의 경우 3배체에 해당하는 peak을 나타내었고 CS-CF의 경우 4배체에 근접한 peak을 보였다[그림 2-1-12, 2-1-13]. 따라서, 본 1차 예비 시험 결과를 토대로 두 중복 처리군의 큰 결과 차이가 처리 원들의 조합 순서에 의한 차이인지 또는 사용한 특정 처리 조합의 우연한 효과에 의한 결과 차이인지를 확인하기 위해 다양한 참조군과 대조군을 포함하는 2차 평가를 아래와 같이 실시하였다.

○ 중복 억제형 처리 조건 개발을 위한 저온처리 조건의 최적화

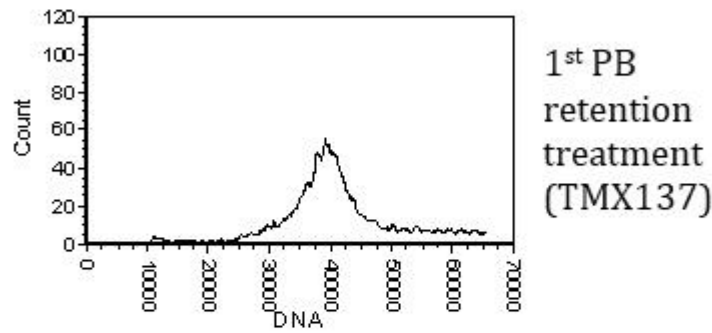
: (필요성) 4배체 유도의 경우 CF 최적 처리뿐만 아니라 저온 처리 역시 필수적으로 복합처리에 포함되어야 하는 것으로 나타났다. 따라서 복합처리의 디자인을 위해서 CF와 CS의 적용 순서 등의 조사가 필요하므로 기존 CF 최적 조건과 달리, CS 처리 조건의 경우 제1극체 및 제2극체의 선택적 억제 가능 조건이 새로이 확립되어야 할 필요성이 있다. 저온처리 조건은 종래 국내외 문헌 등에서 일부 소개된 바 있으나 모든 기존 연구들에서 저온처리를 이용한 극체 방출 억제 효율이 높지 않아 90%를 넘지 못한 상태로 보고되어 있으므로 유도 효율을 극대화해야 하는 4배체 실험을 위해서 직접 이용할만한 기술 사례는 찾을 수 없었다. 따라서 저온처리 조건을 극체의 순차적 억제를 위한 기술요소로 포함 시키기 위해 저온처리를 이용한 제1극체 및 제2극체의 억제 조건의 유도 효율을 개선 및 최적화 조사를 우선 수행하였다.

: (실험 설계 및 평가) 본 연구에서 저온 자극 처리를 위한 공통사항은 다음과 같다. 수정란 세란은 18°C에서 2분간 실시하였고, 세란 후 수정란은 20°C 항온 수조로 옮겨 저온처리 직전까지 배양하였다. 각 실험 처리구 당 수정란은 대량처리 시험을 제외하면 모두 100,000~120,000개씩을 실험에 이용하였다. 처리 후 수정란은 20°C 배양 조(15L 직사각 플라스틱 용기)에 수용하여 부화를 유도하였다. 수정률 측정을 위해 수정 2시간째 무작위로 선발한 약 200개의 배(embryo)를 대상으로 난할이 개시된 배의 빈도를 백분율로 평가하였다. 부화율은 각 처리 실험구별 약 300개의 수정란을 별도의 50 ml 소형 플라스틱 용기에 옮긴 후 부화가 완료된 시점(수정 20시간 후)에서 용기 내 시료를 모두 고정 처리 후 이로부터 무작위로 수집한 50~60개 시료를 대상으로 부화율을 백분율로 계산하였다. 수정률과 부화율은 모두 3 반복 측정하였다. 1차 저온처리 실험의 경우, 최적 처리 온도를 결정하기 위해 -1°C, 1°C 및 3°C 온도 조건별로 12분 및 24분간 저온처리를 수행하였고, 이때 최초처리 시점은 상기 극체 방출 시점의 조사 결과를 토대로 수정 11분으로 하였다. 아울러 저온처리 과정을 제외한 모든 조건을 같게 취급한 대조군을 마련하여 저온처리가 부화율, 정

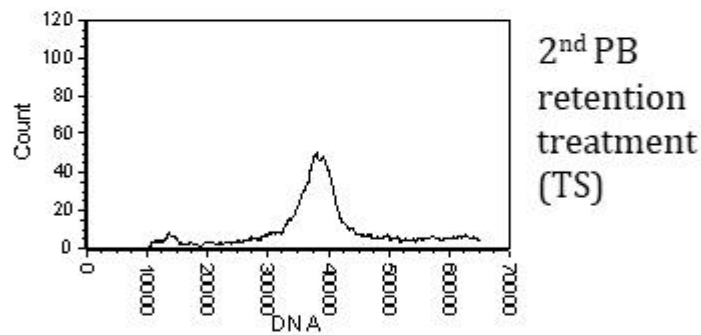
상 유생의 빈도 및 배수체 빈도에 미치는 영향을 조사하였다. 총 2 반복 실험처리를 수행하였다. 2차 저온처리 실험의 경우, 상기 1차 실험을 토대로 선정된 1°C 처리 온도를 이용하여 수정 11분 후부터 10분, 12분, 14분, 16분, 18분, 20분, 22분 및 24분간 저온처리를 하였고(처리 지속기간 당 3 반복 처리), 처리 지속기간에 따른 부화율, 정상 유생 빈도, 유생생존율(부화 24시간 후) 및 배수체 출현 효과를 무처리 대조군과 비교하였다. 3차 저온처리 실험의 경우, 제2극체 방출 억제를 위해서 수정 25분, 27분, 29분, 31분, 33분 및 35분 후 1°C에서 14분간 처리를 수행하여 제2극체 방출 억제 효율을 조사하였다.



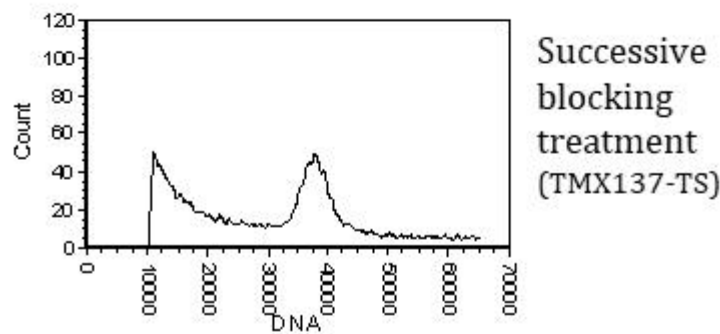
No polar
body
blocked
(control)



1st PB
retention
treatment
(TMX137)



2nd PB
retention
treatment
(TS)

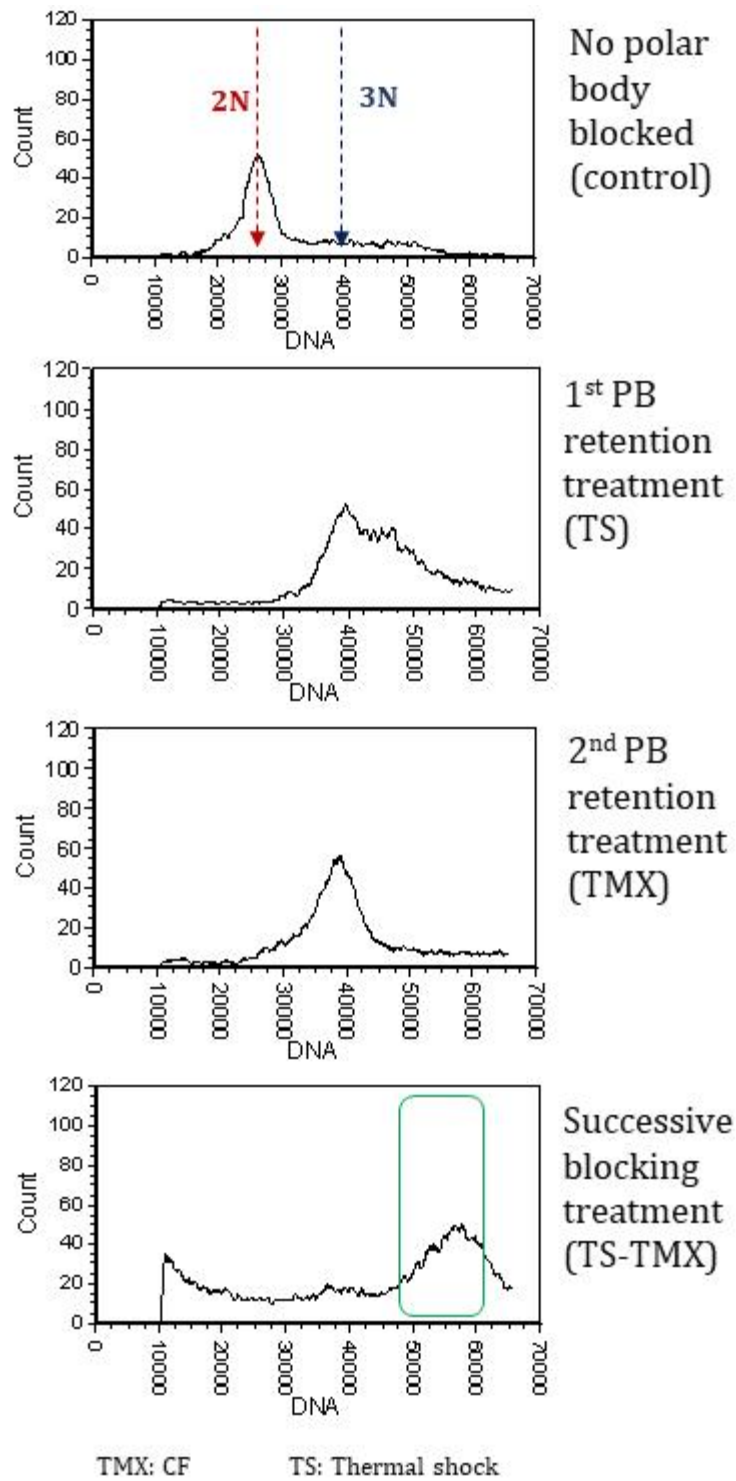


Successive
blocking
treatment
(TMX137-TS)

TMX137: CF TS: Thermal shock

[그림 2-1-12]

극체의 순차적 억제를 위한 예비 조건 탐색-1



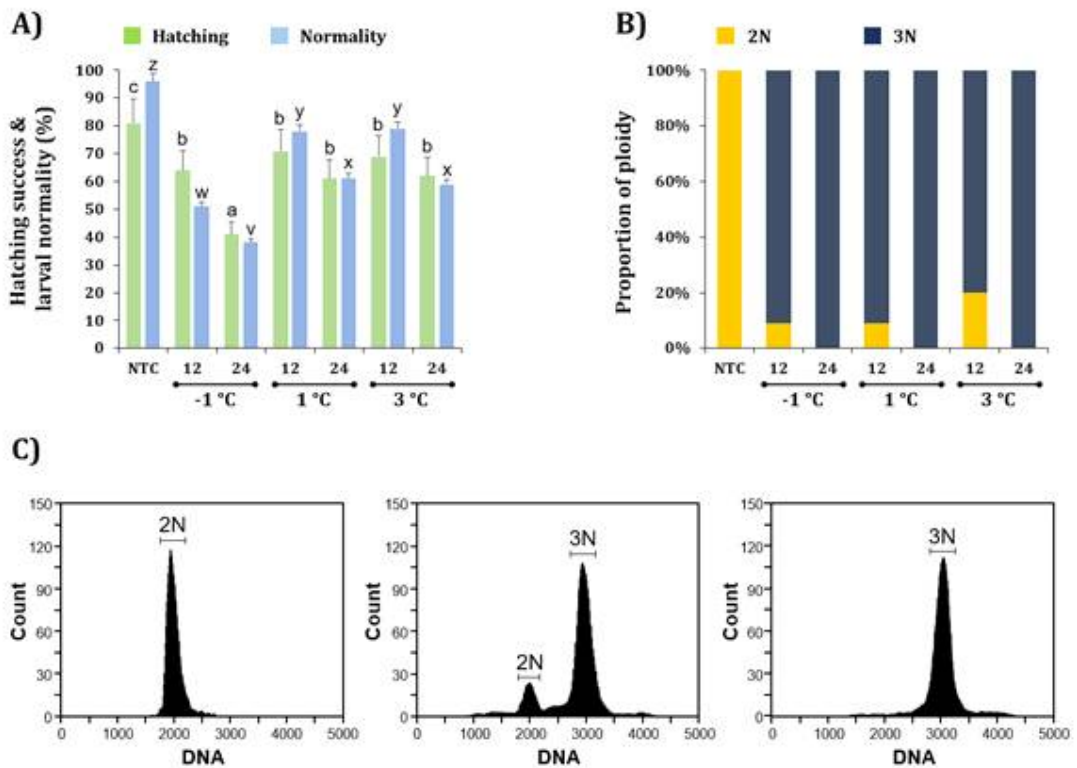
[그림 2-1-13]

극체의 순차적 억제를 위한 예비 조건 탐색-2

: (제1극체 방출 억제용 저온처리 조건: 1차 실험 결과) 1차 실험에서 무처리 대조군의 평균 수정율 및 부화율은 각각 91% 및 81%로 나타나 양질의 배우자가 실험에 사용되었음을 알 수 있었다. 저온 자극 처리 군은 모두 대조군과 비교하면 유의적으로 낮은 부화율을 나타내었는데($P < 0.05$), 특히 가장 낮은 처리 온도인 -1°C 그룹은 나머지 두 처리군(1°C 및 3°C)에 비해서도 유의적으로 낮은 부화율을 나타내었다($P < 0.05$). 그러나 1°C 처리그룹과 3°C 처리그룹 간에는 부화율에 있어서 통계적인 유의차가 관찰되지 않았다($P > 0.05$). 부화 유생의 정상성의 경우 무처리 대조군과 저온 처리군 간 더욱 뚜렷한 차이를 나타내었는데, 대조군의 경우 부화한 대부분의 유생이 정상적인 발달 형태를 보이었으나 저온 처리군에서는 유각이 형성되지 않거나 기형적으로 발달한 부화 유생이 높은 빈도로 관찰되었다($P < 0.05$). 특히 -1°C 온도에서 24분간 처리한 그룹의 경우 전체 유생들 중 오직 38%만이 정상 유생에 해당하였으며, 처리 지속시간을 12분으로 단축하였을 시에도 약 50%의 부화 유생은 비정상적 형태를 나타내었다. 반면 1°C 그룹(61~78%)과 3°C 그룹(59~79%)의 경우 정상 유생의 빈도에 있어 서로 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 유세포분석을 통해 histogram peak들을 분석한 결과, 대조군의 유생(이배체 해당)은 $1,997 \pm 25$ (기하평균)의 channel 값을 갖는 세포 당 형광 강도를 나타냈지만, 저온 처리그룹 중 단일 histogram peak을 나타내는 24분 처리그룹들은 기하평균 3016 ± 61 의 값을 나타냄으로써 대조군 대비 1.510배 증가한 형광 세기 값(삼배체 해당)을 보였다. 반면, 12분간 저온처리를 수행한 그룹들은 모두 단일 삼배체 peak을 형성하지 못하고 이배체에 해당하는 histogram peak이 함께 검출되었는데, 각 histogram peak에 해당하는 세포 수의 상대 비율을 측정한 결과 -1°C 및 1°C 그룹들에서는 약 10%, 그리고 3°C 처리군에서는 20%에 해당하는 2배체 세포들이 검출되었다[그림 2-1-14].

: (제1극체 방출 억제용 저온처리 조건: 2차 실험 결과) 2차 실험에서도 역시 수정률은 평균 95% 이상으로 관찰되었고, 무처리 대조군의 평균 부화율은 88%로 양호하게 나타났다. 저온처리 그룹들의 경우 처리 지속시간이 10분에서 24분으로 증가할수록 부화율의 점진적인 감소를 나타내어 10분 및 12분 처리군의 경우 대조군 대비 85% 이상의 부화율을 나타냈지만 최장 처리그룹인 24분 처리그룹에서는 53.2% (대조군 대비 60%)의 낮은 부화율을 나타내었다($P < 0.05$). 부화 유생의 정상성의 경우 역시 모든 저온 처리군에서 대조군보다 낮은 정상 유생 빈도를 나타내었는데($P < 0.05$), 저온 처리그룹들 간 비교 시 10분~16분 처리그룹들이 유사한 정상 유생 빈도를(77~83%) 보였고 나머지 18분~24분 처리그룹들이 역시 유사한 정상 유생 빈도(51~61%)를 나타내어 통계적으로 두 집단이 구분되었다. 부화 유생의 24시간째 생존율 역시 부화 유생의 정상성 양상과 유사한 경향을 나타내어 대조군을 제외한 처리군들 간 비교 시 10분-14분 처리군들이 유

사한 생존율을, 그리고 18분-24분 처리군들이 역시 유사한 생존율을 나타내었으며, 16분 처리군은 두 집단의 중간 값에 해당하는 생존율을 나타내었다. 유세포 분석을 수행한 결과 앞서 1차 실험에서와 마찬가지로 무처리 대조군은 이배체에 해당하는 단일 peak을 형성하였고 처리 지속기간이 14분 이상의 모든 처리 조건들에서는 삼배체에 해당하는 단일 peak들이 예외 없이 관찰되었다. 반면 10분 및 12분 처리그룹들에서는 10% 미만의 이배체 해당 세포들이 작은 histogram peak을 형성하였다[그림 2-1-15].

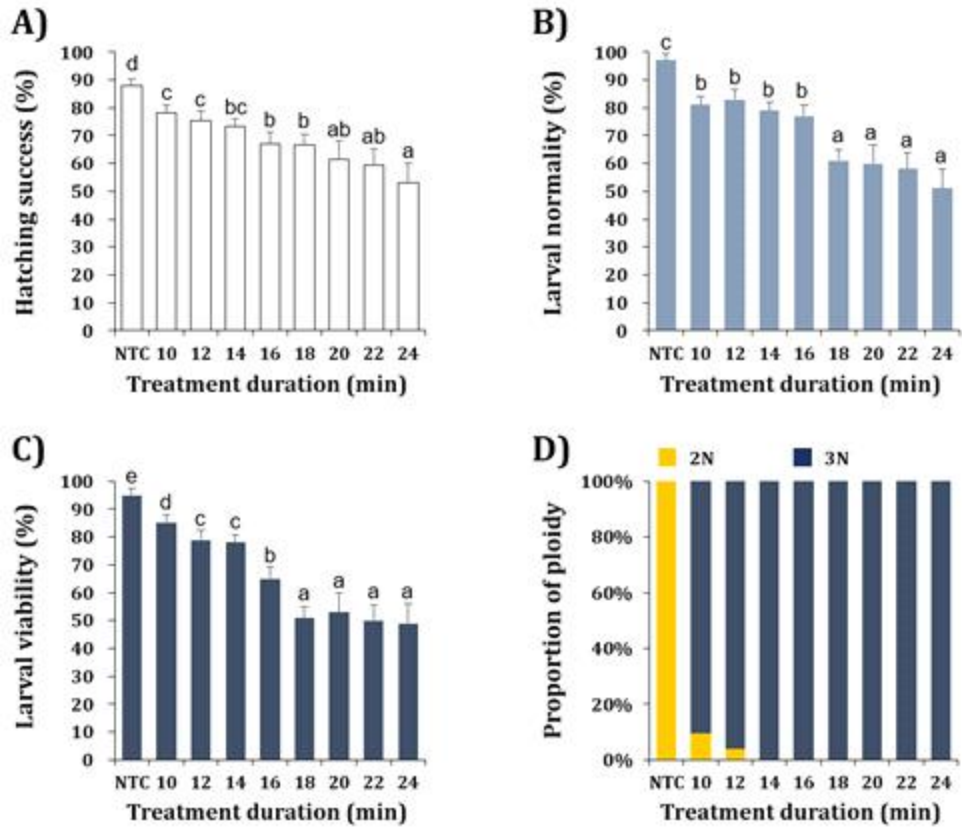


[그림 2-1-14]

저온처리를 통한 제1극체 방출억제 결과

A) 부화율 및 유생정상성, B) 유세포분석 결과, C) 유세포분석 결과 대표 histograms

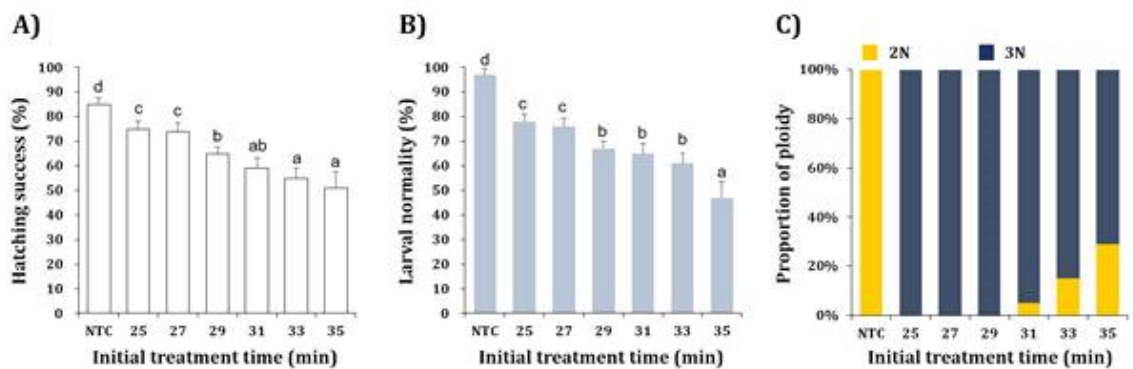
: (제2극체 방출 억제용 저온처리 조건) 제1극체 억제 처리 시와 유사하게 모든 저온 처리그룹에서 대조군(평균 85%) 대비 유의적으로 낮은 부화율을 나타냈으며 (51~75%) 최초처리 시점이 늦을수록 부화율에 부정적인 영향을 끼치는 것으로 관찰되었다($P < 0.05$). 부화 유생의 정상성의 경우 역시 대조군(97%)보다 유의적으로 낮은 빈도가 관찰되었으나 처리 군 간 비교할 경우 25분(78%) 및 27분(76%)의 최초 처리 시점 그룹들이 다른 처리군들과 비교 시 상대적으로 높은 정상 유생 빈도를 나타낸 반면, 가장 늦은 처리 시점인 35분째 처리그룹이 가장 낮은 정상 유생 빈도(47%)를 나타내었다($P < 0.05$). 유세포분석 결과 최초처리 시점이 27분~29분 사이에 저온처리가 이루어진 그룹들은 모두 단일 삼배체 peak을 형성하였으나 31분 이상의 최초처리 시점에 저온처리가 이루어진 그룹들에서는 삼배체 peak과 아울러 이배체 peak이 함께 검출되었고, 이배체 세포들의 상대 빈도를 측정한 결과 최초처리 시점이 31분 이후 증가할수록 이배체 세포의 빈도가 증가하는 경향을 나타내었다(5~29%) [그림 2-1-16]. 이상의 결과를 종합하면, 제1극체 및 제2극체 방출 억제를 위한 최초처리 시점, 처리 온도 (-1°C , 1°C 및 3°C) 및 저온처리 지속 기간(10분~24분)에 따른 부화율, 유생의 정상성, 생존율 및 삼배체 유도효율을 평가하였다. 연구결과, 제1극체를 대상으로 선택적인 방출 억제가 필요한 경우 수정 11분 후 14분간의 저온(1°C) 처리를, 그리고 제2극체를 주 대상으로 하되 억제 대상 극체를 엄격하게 특정할 필요성이 없는 경우에는 수정 25분~27분 후 14분간 저온(1°C) 처리를 하는 것이 북방전복의 배수체 유도에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 본 저온처리 조건을 이용하여 처리 시 배수체 유도율이 안정적으로 재현 가능함을 확인하였으나 배수체의 수율은 사용한 수정란의 질에 차등으로 나타났다.



[그림 2-1-15]

제1극체 방출억제를 위한 저온처리 시간 별 분석결과

A) 부화율, B) 유생 정상성, C) 유생 생존율, D) 유세포분석 결과



[그림 2-1-16]

제2극체 방출억제를 위한 저온처리의 최초 처리시점 별 분석결과

A) 부화율, B) 유생 정상성, C) 유세포분석 결과

(2) 4배체 유도 가능 처리 조합 개발

(2.1) 극체 순차적 억제 조건의 세분화 평가

○ 목적

: 1차 시험 결과를 토대로 제1극체 억제를 위한 처리원과 제2극체 억제를 위한 처리원들이 조합 순서에 따라 차등의 결과 도출 가능성이 관찰되었으므로, 해당 결과의 재현성을 검증하고, 이로부터 단계별 감수분열 억제를 위한 처리 조건을 세분화하여 그 영향을 평가하고자 하였다.

○ 수행내용 및 방법

: (무처리 대조군 및 기본 처리 조건) 무처리 대조군으로서 1차 실험과 마찬가지로 화학적 처리원의 제1극체 및 제2극체 시점에 대한 대조군들, 그리고 역시 물리적 처리원의 제1극체 및 제2극체 시점에 대한 대조군들을 설정하였다. 화학 처리원의 경우 제1극체 및 제2극체 억제를 위해 CF의 4, 6, 8 mM의 세 개 처리 강도를 설정하였고, 물리적 처리를 통한 제1극체 및 제2극체 방출 억제를 위해 CS-1°C 및 CS-3°C의 처리 강도를 설정하였으며, 처리 지속기간은 모두 16분으로 고정하였다.

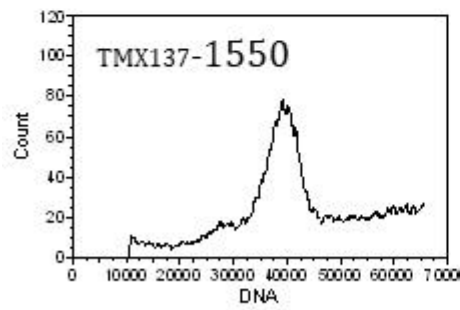
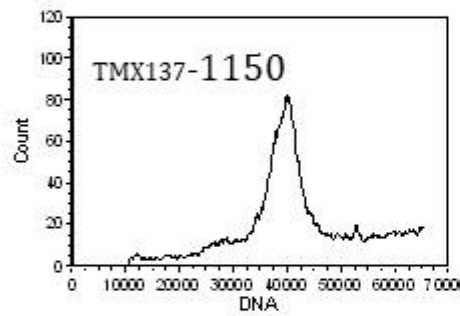
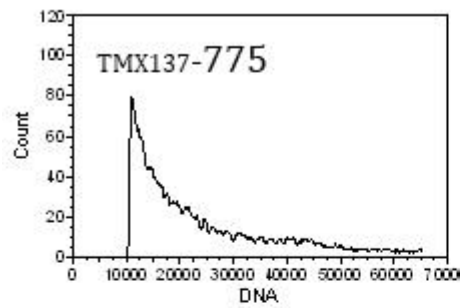
: (참조군 및 병행 처리군 설계) 각각 단일 극체 방출 억제가 효과적으로 유도되었는지를 확인하기 위한 참조군을 제1극체 및 제2극체별로, 각각 화학적 처리와 물리적 처리 시험구를 두어 단계별 처리의 성공 여부를 검증하였다. 순차적 억제를 위한 병행 처리구로서 화학적 처리를 연속해서 처리하는 시험구, 물리적 처리를 연속해서 처리하는 시험구, 화학적 처리 후 물리적 처리를 처리하는 시험구, 물리적 처리 후 화학적 처리를 처리하는 시험구 4개 유형을 두어 그 처리 효과를 조사하였다.

○ 배수체 유도결과

: (무처리 대조군) 무처리 대조군으로 설정한 모든 그룹에서 이배체 peak이 관찰되어 예상과 일치하였고, 유세포분석 시 noise 유발 정도는 그룹 간 차이가 있었으나 유의미한 경향은 관찰되지 않았고 peak의 channel 값에는 영향을 끼치지 않았다.

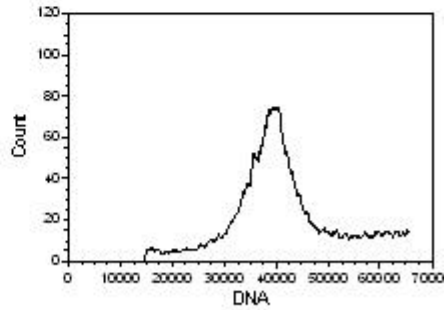
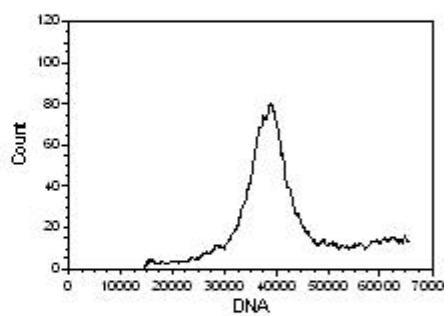
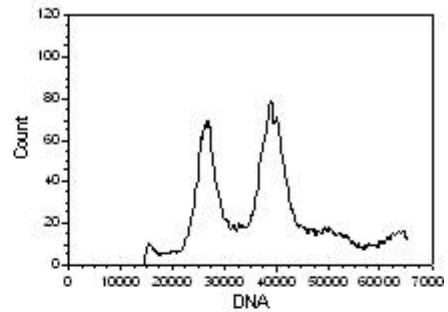
: (화학적 처리 참조군) 3개의 처리 강도로 구분하여 제1극체를 방출 억제 처리하였을 경우, CF 4 mM에서는 정확한 배수체 유도 여부가 불투명하였으나, CF 6 mM 및 CF 8 mM에서는 3N-type의 peak channel 값이 관찰되어 제1극체가 완벽하게 억제되는 조건임을 확인할 수 있었다[그림 2-1-17]. 동일 처리 강도를 제2극체 방출 억제에 적용하였을 경우, CF 4 mM에서는 2N과 3N-type의 peak channel 값이 관찰되었고 그 비율은 1:1 정도로 나타났다. 반면 CF 6 mM 및 CF 8 mM 처리 조건에서는 모두 단일 peak이 3n-type으로 관찰되어, 역시 제2극체의 방출이 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

Blocking treatment
for 1st PB



TMX137-775: CF 4 mM
 TMX137-1150: CF 6 mM
 TMX137-1550: CF 8 mM

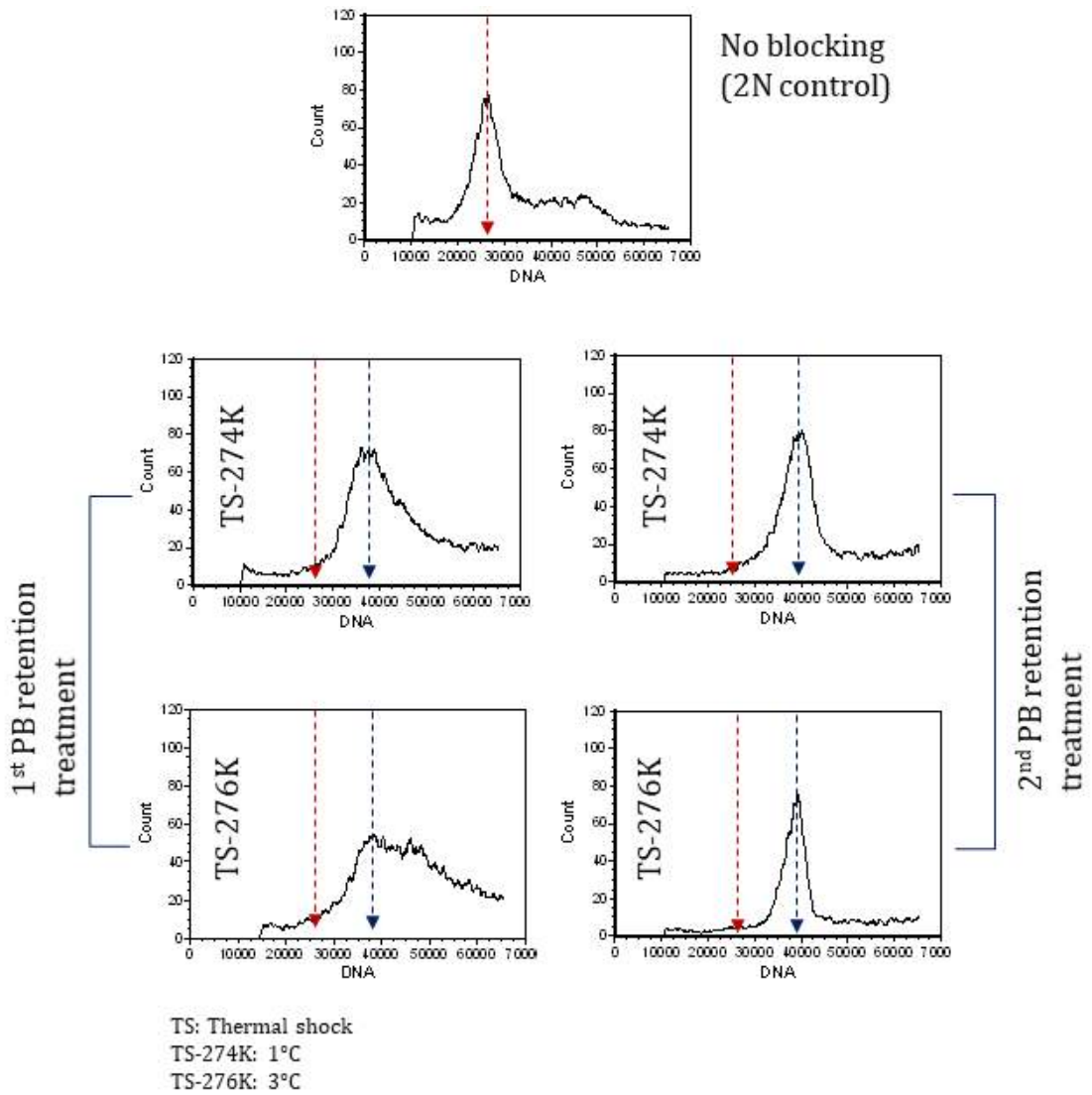
Blocking treatment
for 2nd PB



[그림 2-1-17]

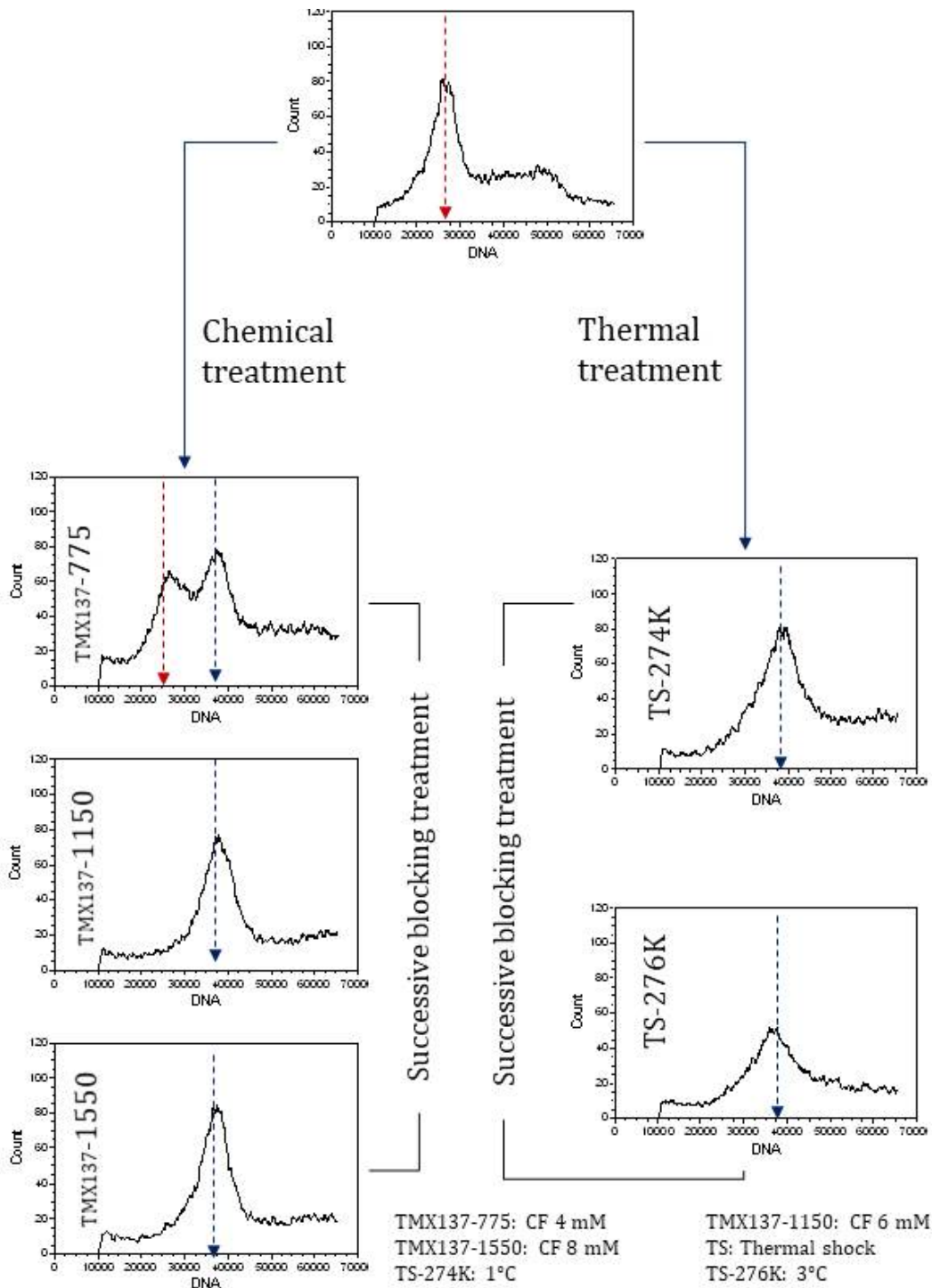
극체의 순차적 억제 실험을 위한 화학적 처리 참조군의 유세포분석

- : (물리적 처리 참조군) 물리적 처리를 통해 CS-1°C 및 CS-3°C 조건으로 제1극체를 억제한 경우 CS-1°C 처리군에서는 단일의 3n-type peak이 선명히 잘 관찰되었다. 반면 CS-3°C 처리군에서는 1°C와 유사하게 기본적으로 3n-type의 main peak이 관찰되지만, 그 peak의 폭이 넓고 channel 값이 큰 쪽에서 중첩된 signal이 관찰되었다. CS-3°C 처리군을 반복 분석하였을 때도 항상 일양하지는 않지만 이러한 경향이 종종 관찰되어 본 최초처리 시점 및 전처리 조건을 이용할 때 제1극체 억제의 경우 CS-3°C 처리가 CS-1°C 처리보다는 정확도 및 완성도 측면에서 다소 불리한 것으로 판단되었다. 하지만 동일 처리 강도로 제2극체 억제에 적용한 참조군에서는 두 조건 모두 3n-type의 전형적인 단일 peak을 각기 나타내어, 제1극체 억제와는 달리 두 물리적 처리 강도 모두 제2극체의 효과적인 억제에 동일하게 이용될 수 있음을 확인하였다[그림 2-1-18].
- : (화학적 연속처리군) CF 4 mM, CF 6 mM 및 CF 8 mM 화학적 처리를 제1극체와 제2극체에 연속적으로 처리하는 방식을 적용한 결과, CF 4 mM 연속 처리군에서는 2n-type의 peak과 3n-type의 peak이 관찰되었으며, 그 비율은 약 4:6 정도로 나타났다. 반면, CF 6 mM 및 CF 8 mM 각 연속처리 방식의 경우 모두 단독처리와 유사하게 모두 3n-type의 단일 peak을 나타내어 두 처리 강도 별 큰 차이는 관찰되지 않았다[그림 2-1-19].
- : (물리적 연속처리군) 제1극체 및 제2극체 방출 억제를 모두 물리적 처리 1°C 및 3°C 강도로 연속하여 처리하는 방식을 적용한 결과, 1°C 연속처리 그룹에서 3n-type의 단일 peak이 관찰되었고, 역시 3°C 연속처리 그룹에서도 3n-type의 단일 peak 패턴이 관찰되었다[그림 2-1-19].
- : (화학적 처리 후 물리적 처리군) 제1극체를 화학적 처리로 억제하고, 이어서 제2극체를 물리적 처리로 억제하기 위한 방식의 병행 처리를 수행한 결과로 화학적 처리를 CF 4 mM, CF 6 mM 및 CF 8 mM로 처리한 그룹별로 물리적 처리를 1°C 및 3°C로 처리한 총 6개의 병행 처리군을 조사하였다[그림 2-1-20]. CF 4 mM+1°C 병행 그룹에서는 낮은 빈도의 3배체 유생 생성을 나타내는 작은 peak이 관찰되었으며, channel gate의 앞쪽에서 noise 유사 signal들이 다량 관찰되었다. CF 4 mM+3°C 처리군의 경우 3n-type의 단일 peak이 검출되었다. CF 5 mM+1°C 병행 그룹 및 CF 6 mM+3°C 병행 그룹에서는 두 그룹 간 유의적인 차이는 관찰되지 않았고, 두 그룹 모두 공통적으로 3n-type의 단일 peak을 형성하는 것으로 나타났다. CF 8 mM+1°C 병행 그룹 및 CF 8 mM+3°C 병행 그룹 역시 앞서 병행 그룹들과 동일한 결과를 나타내어 두 그룹 간 유의적인 차이는 관찰되지 않았고, 공통적으로 3n-type의 단일 peak을 형성하였다.



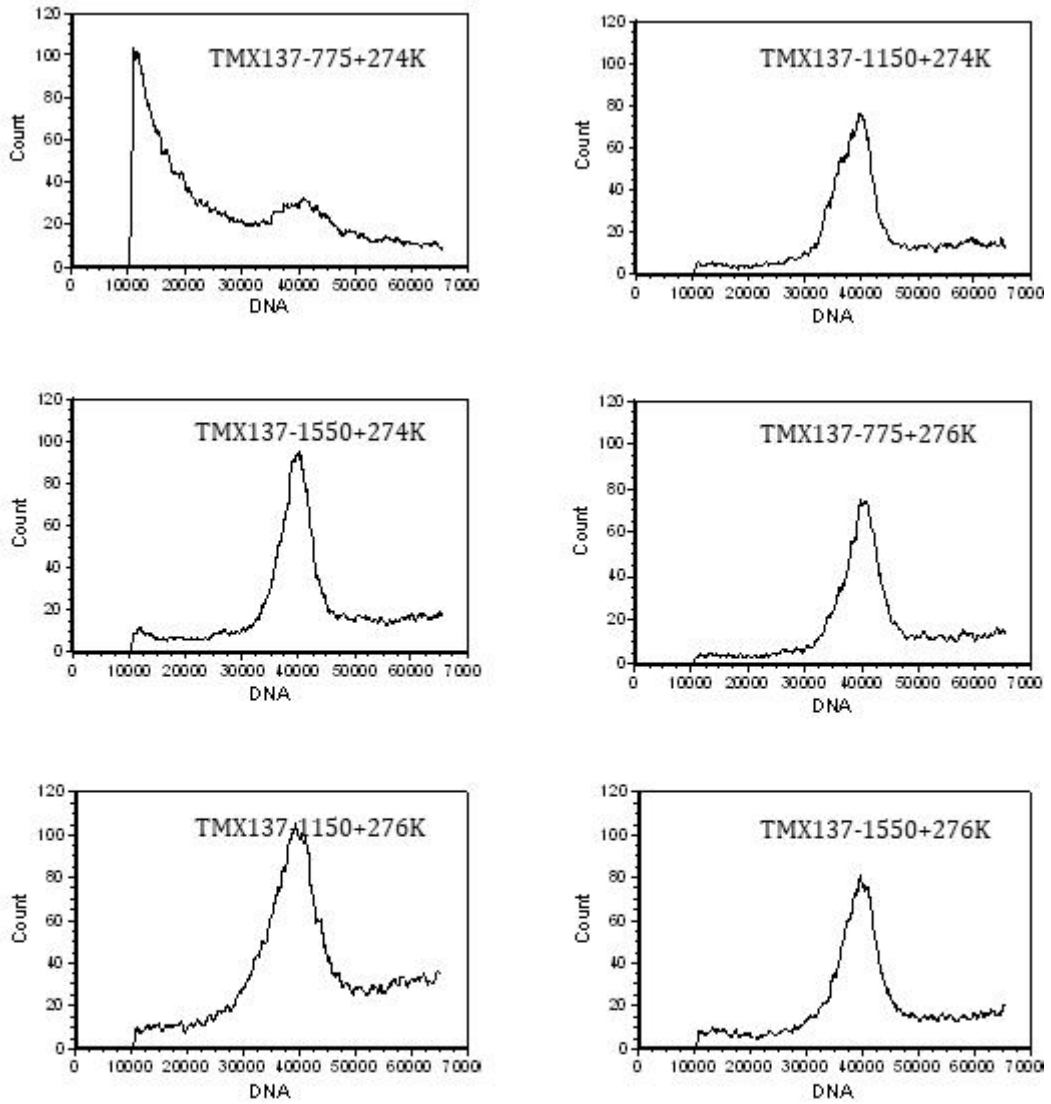
[그림 2-1-18]

극체의 순차적 억제 실험을 위한 물리적 처리 참조군의 유세포분석



[그림 2-1-19]

극체의 순차적 억제를 위한 화학적 및 물리적 연속처리 그룹의 유세포분석



TMX137-775: CF 4 mM
 TMX137-1550: CF 8 mM
 TS-274K: 1°C

TMX137-1150: CF 6 mM
 TS: Thermal shock
 TS-276K: 3°C

[그림 2-1-20]

극체의 순차적 억제를 위한 화학적 선행 처리 후 물리적 후속 처리 그룹들의 유세포분석

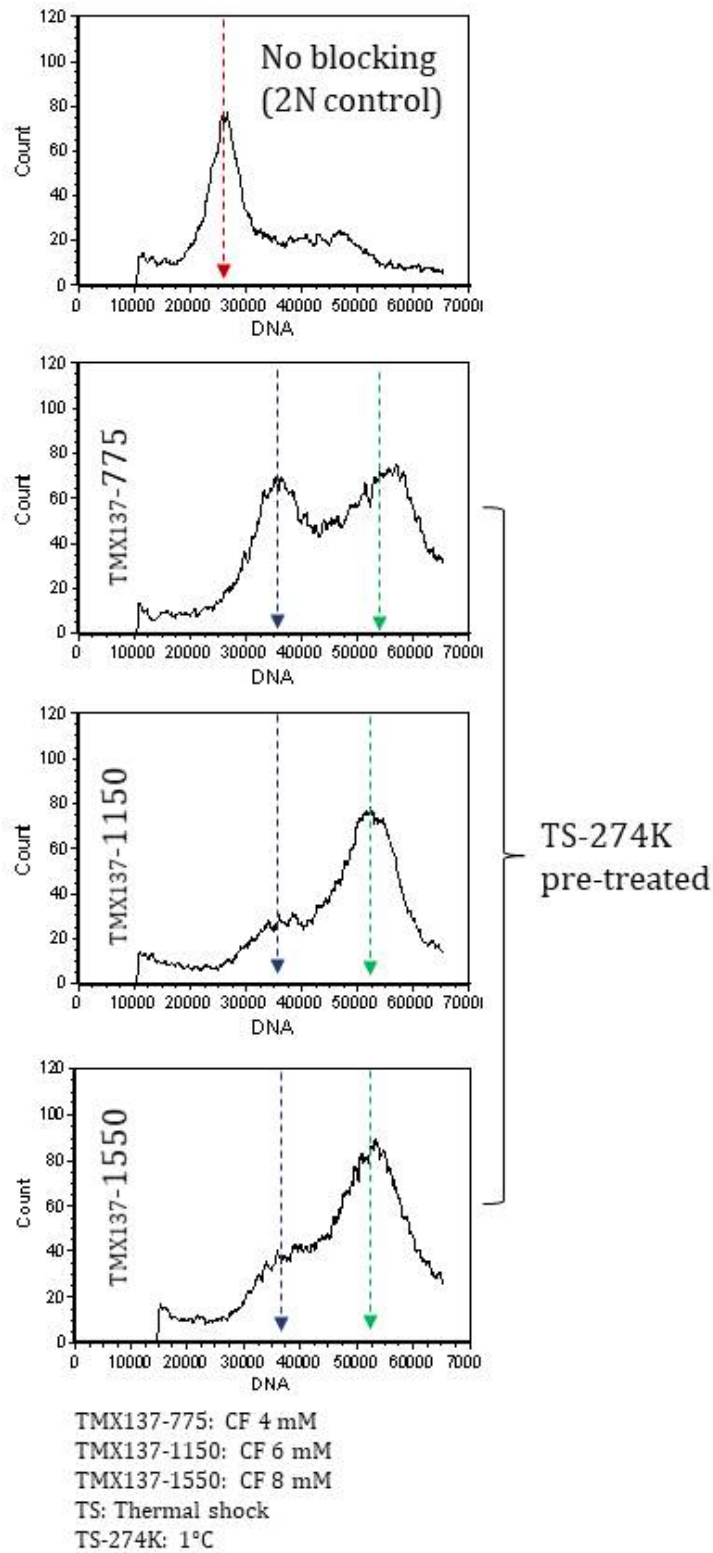
: (물리적 처리 후 화학적 처리군) 제1극체를 물리적 처리를 통해서 방출 억제하고 이어 제2극체를 화학적 처리로 방출 억제하는 방식을 전복 수정란에 적용한 결과, 앞서의 병행 처리군과 크게 다른 유세포분석 양상을 나타내었다. CS-1°C+CF 4 mM 처리 결과 2n-type의 peak는 관찰되지 않았으며, 3n-type의 peak와 \approx 4n-type의 peak가 관찰되었고 그 비율은 약 1:1 정도로 나타났다. 한편 1°C+CF 6 mM 처리군의 경우 역시 2n peak는 관찰되지 않았고 작은 크기의 3n-type 및 main peak으로서 \approx 4n-type의 peak이 관찰되었다. 그 비율은 약 2:8 정도로 나타났다. 또한 1°C+CF 6 mM 처리군의 경우 앞서 1°C+CF 6 mM 처리와 유사한 패턴을 보임으로써 \approx 4n-peak의 peak이 90% 이상으로 관찰되었다[그림 2-1-21]. CS-3°C+CF 4 mM 처리군의 경우 1°C+CF 4 mM 처리군과 유사하여 1:1 비율의 3n-peak과 \approx 4n-peak이 관찰되었다. 나머지 처리군 역시 1°C 기반 처리군과 유사한 패턴을 보여 3n-type의 peak과 \approx 4n-type의 peak를 나타내었다. 하지만 1°C 기반 처리와 비교 시 3n-type peak의 비중이 더 높게 나타나는 차이를 보였다[그림 2-1-22].

○ 수정란의 부화율

: (화학적 연속처리 및 물리적 연속처리 그룹) 화학적 처리를 제1극체와 제2극체 방출 억제를 위해 연속하여 처리하거나 물리적 처리를 제1극체와 제2극체 방출 억제에 연속하여 처리한 그룹의 부화율을 조사한 결과, 무처리 대조군은 78.1%의 부화율을 나타내었고, 화학적 연속 처리군의 경우 사용한 처리 강도가 CF 4 mM, CF 6 mM 및 CF 8 mM으로 증가할수록 부화율의 감소가 관찰되었다. 제1극체와 제2극체를 연속하여 처리하기 위해 증가된 처리 기간에 노출됨에 따라, 기존의 단일 극체 억제용 처리보다 유의적으로 낮은 부화율이 관찰되어 대조군과 비교 시 통계적인 유의차가 관찰되었다. 특히 가장 높은 강도로 연속한 처리군에서는 51.1%의 부화율을 나타냄으로써 낮은 농도 그룹들을 연속한 경우(65.4% 및 60.9%)와 비교 시 역시 통계적 유의차를 나타내었다($P < 0.05$). 물리적 처리를 제1극체와 제2극체에 연속 처리한 그룹들의 경우 1°C를 연속 처리한 경우 63.0%의 부화율을, 그리고 3°C를 연속 처리한 그룹의 경우 평균 67.9%를 나타내었다. 처리 강도가 다른 두 그룹에서 강한 처리가 연속 처리된 그룹에서 다소 낮은 부화율을 나타내었으나 통계적인 유의차는 관찰되지 않았다($P > 0.05$)[그림 2-1-23].

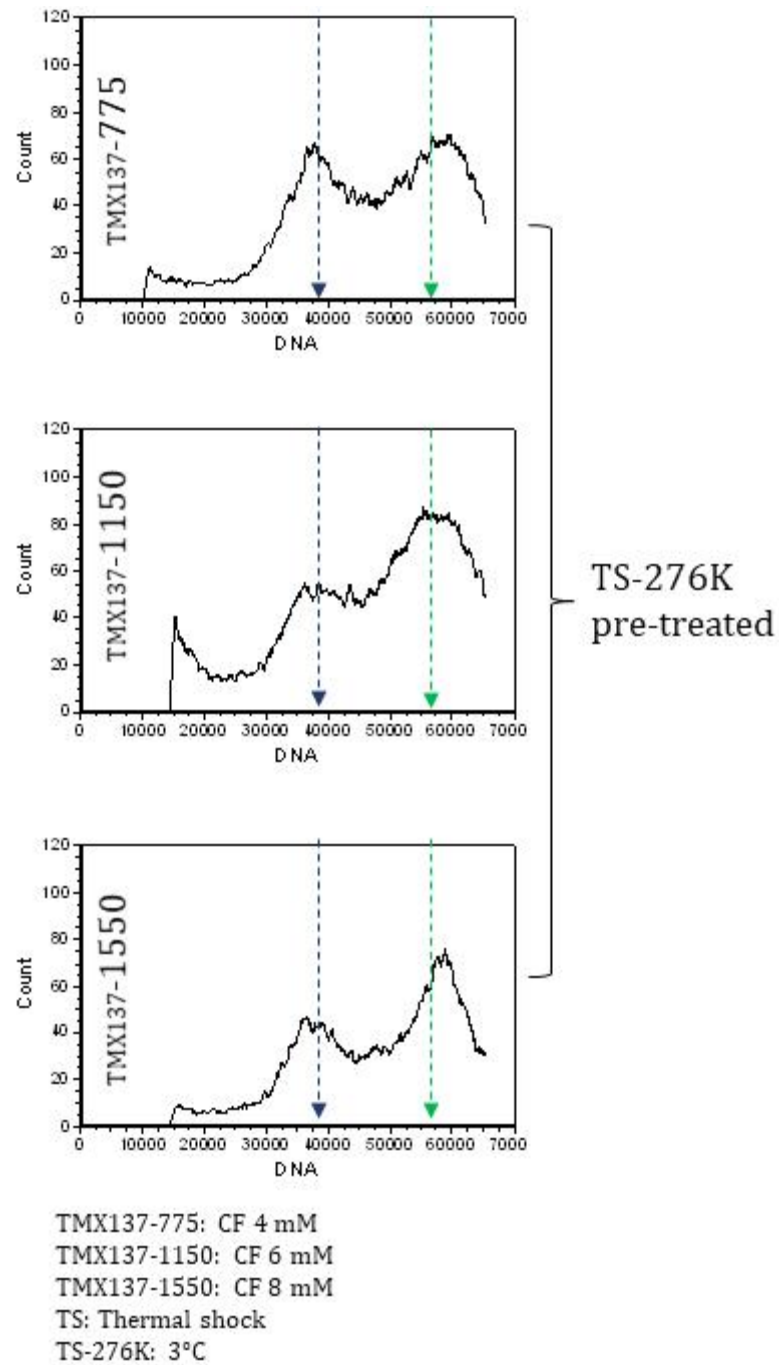
: (화학적 처리 후 물리적 처리군) 제1극체를 화학적 처리를 통해 억제하고, 이후 물리적 처리를 통해 제2극체를 억제하는 방식에 관한 처리군 및 이들과 관련된 대조군과 참조군의 부화율을 나타낸 것이다[그림 2-1-24]. 무처리 대조군의 경우 71.3%의 평균 부화율을 나타내었으며, 화학적 단일 처리 참조군(제1극체만 화학적 처리를 통해 억제한 배수체 참조군)에 속하는 그룹들의 경우, CF 4 mM, CF 6 mM 및 CF 8 mM 처리군들간 부화율에 관한 통계적인 유의차는 관찰되

지 않아, 이들 그룹들은 71% 내외의 부화율을 나타내었으며 대조군과도 유의적인 차이를 나타내지 않았다. CF 4 mM 화학적 처리 후 물리적 처리(1°C 및 3°C)를 병행한 그룹, 동일한 방식으로 CF 6 mM 또는 CF 8 mM의 화학적 처리 후 물리적 처리를 병행한 그룹들의 경우 역시 급격한 부화율의 감소나 특정 처리 조합에서의 특이적인 부화율의 변동은 관찰되지 않았다. CF 4 mM 및 CF 6 mM의 선행 처리 그룹들에서는 물리적 후속 처리에 의해 추가적인 부화율의 감소는 관찰되지 않았고 해당 화학적 단일 처리 참조군들과 통계적 차이가 관찰되지 않았다. 또한 이들 시험군에서는 물리적 처리 강도 그룹간 차이 역시 나타나지 않았다. 반면, 화학적 선행 처리 강도가 가장 높은 CF 8 mM의 경우, 단일 처리 참조군에 비해서 부화율의 추가 감소가 관찰되었는데, 단일 처리 참조군의 경우 71.5%의 평균 부화율을 나타내었으나, 병행 처리군의 경우 65% 내외의 부화율을 나타내어 선행 처리의 강도가 높을 경우에는 병행처리에 의한 부화율의 추가적 감소가 야기되는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 그러나 본 그룹에 있어서도 물리적 처리 강도는 서로 부화율에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 한편, 물리적 단일 처리 참조군(화학적 처리 없이, 제2극체 만을 물리적 처리에 의해서 억제한 배수체 참조군)의 경우 1°C 참조군과 3°C 참조군의 경우 각각 69.8% 및 71.1% 평균 부화율을 나타내었고, 두 참조군 그룹 간 통계적 차이는 관찰되지 않았다($P > 0.05$).



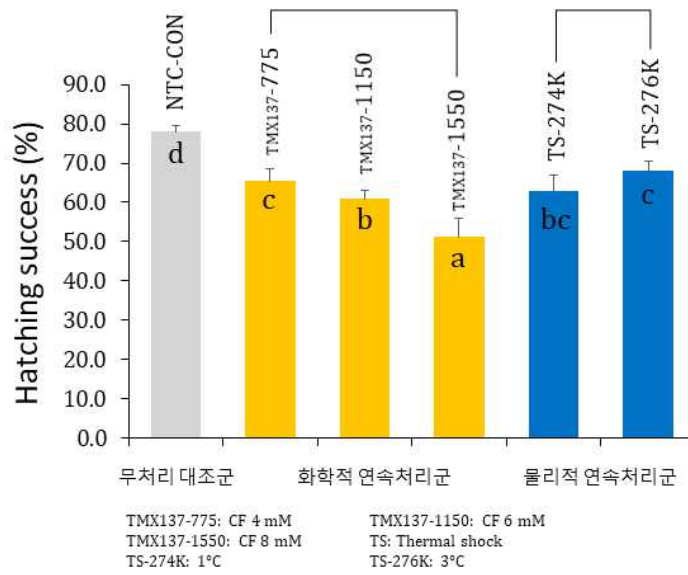
[그림 2-1-21]

극체의 순차적 억제를 위한 물리적 처리 선행 후
 화학적 후속 처리 그룹들의 유세포분석-1



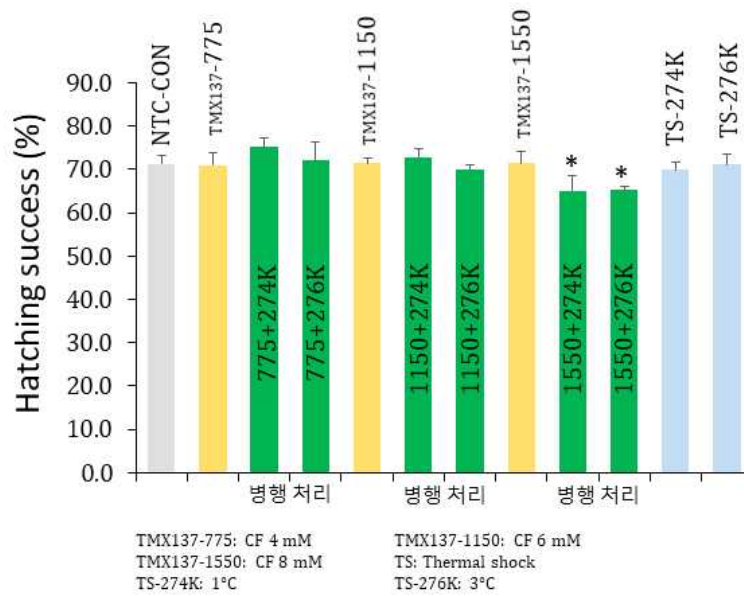
[그림 2-1-22]

극체의 순차적 억제를 위한 물리적 처리 선행 후
 화학적 후속 처리 그룹들의 유세포분석-2



[그림 2-1-23]

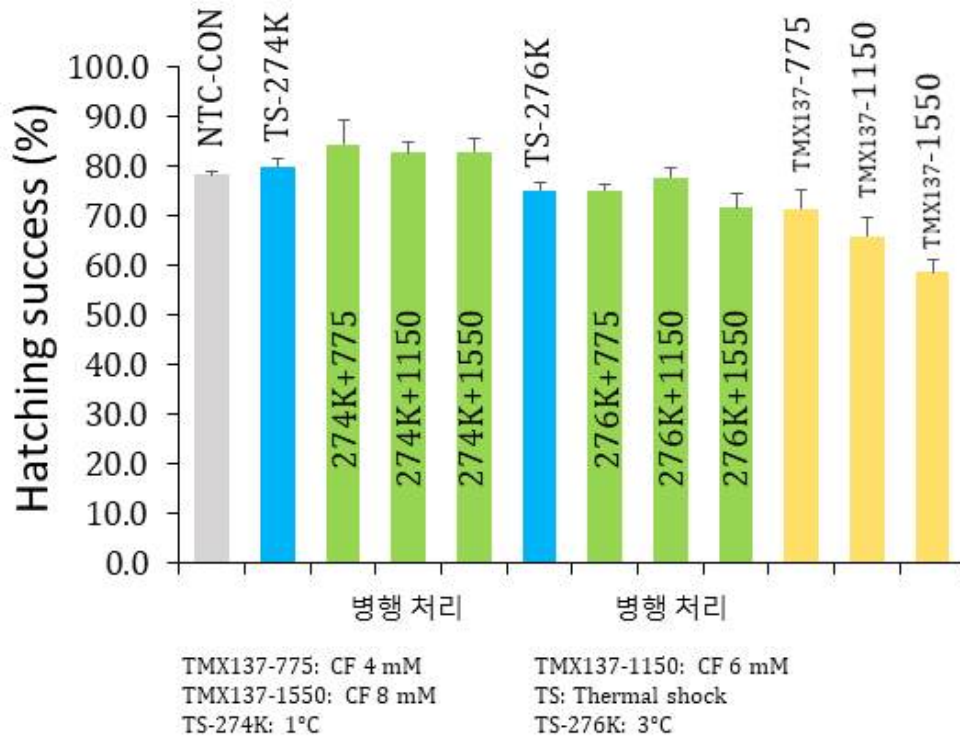
화학적 연속 처리 및 물리적 연속 처리를 이용한 극체 억제 그룹의 부화율



[그림 2-1-24]

화학적 선행 처리 후 물리적 후속 처리 그룹들의 부화율

: (물리적 처리 후 화학적 처리군) 제1극체를 물리적 처리를 통해 억제하고, 이후 화학적 처리를 통해 제2극체를 순차적으로 억제하는 방식에 관한 처리군, 대조군 및 참조군의 부화율을 나타낸 것이다[그림 2-1-25]. 무처리 대조군의 경우 78.2%의 평균 부화율을 나타내었으며, 물리적 단일 처리 참조군(즉 제1극체만 물리적 처리를 통해 억제한 배수체 참조군)에 속하는 그룹들의 경우, CS-1°C와 CS-3°C 처리군의 경우 79.9% 및 75.1%의 평균 부화율을 각각 나타내어 두 그룹 간 그리고 대조군과 비교 시 통계적 유의차는 관찰되지 않았다($P > 0.05$). CS-1°C의 물리적 처리 후 화학적 처리를 이어서 병행 처리한 그룹의 경우 참조군에 비해서 추가적인 부화율의 감소는 관찰되지 않았으며 4, 6, CF 8 mM을 병행 처리한 그룹들의 평균 부화율은 82~84%의 범위에서 관찰되어 참조군과의 차이가 크게 없음은 물론, 화학적 처리 강도에 따른 부화율의 변동 역시 크게 없는 것으로 나타났다($P > 0.05$). CS-3°C의 물리적 처리를 선행하고 뒤이어 화학적 처리를 병행한 그룹에서도 CS-1°C에서와 유사한 경향을 나타내었는데, 참조군의 부화율과 비교 시 유사한 평균 부화율이 관찰되었고 (72~78%), 화학적 처리 강도에 따른 부화율의 차등 변화 등은 나타나지 않았다($P > 0.05$). 한편, 화학적 단일 처리 참조군(물리적 처리 없이, 제2극체만을 화학적 처리에 의해서 억제한 배수체 참조군)의 경우 농도 의존적인 부화율의 감소가 관찰되었는데, CF 4 mM로 제2극체를 억제한 그룹의 평균 부화율은 71.4%, CF 6 mM 및 CF 8 mM로 억제한 그룹의 부화율은 각각 65.9% 및 58.7%로 나타났다($P < 0.05$). 따라서 본 시험의 화학적 처리원을 이용 단일 극체 방출 억제 방식에 있어서 제2극체의 경우 제1극체에 비해서 보다 농도에 의존적인 부화율 감소가 관찰되어 앞서 동일 화학적 처리 강도에서 제1극체가 부화율의 큰 감소 없이 이루어지는 반면, 제2극체의 경우 강도가 올라갈수록 부화율이 보다 민감하게 감소하는 경향이 나타났다.



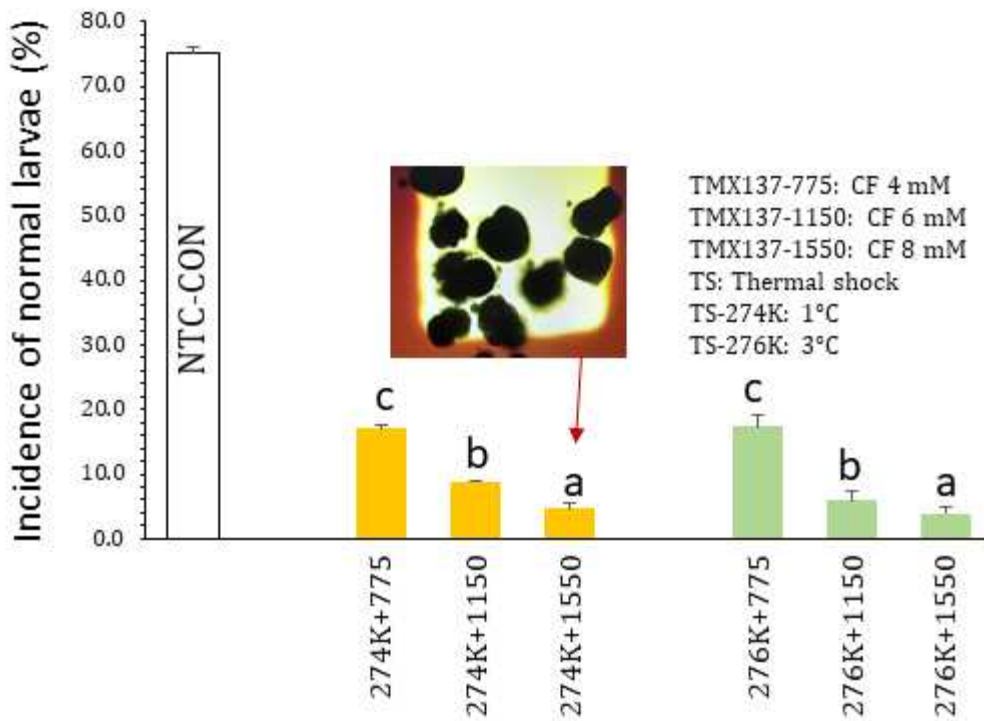
[그림 2-1-25]

물리적 선행 처리 후 화학적 후속 처리 그룹들의 부화율

○ 부화 유생의 기형률

- : (대조군 및 참조군) 본 시험에 사용한 무처리 대조군들 및 단일 극체 억제제를 위한 참조군들의 경우 예상되는 2n 및 3n 유생들을 생산하도록 설계되어 있는 그룹들로서, 이들 그룹들 내 정상 모양의 유생들을 빈도는 1단계 시험들 및 2단계 3배체 최적화 조사 실험들에서 관찰된 수치 범위에 대부분 속하는 것으로 나타나 특이적 변동 사항은 없었다. 무처리 대조군들의 경우 정상 유생의 빈도(즉 $100 - \text{유생의 기형률} \%$)는 사용한 모패들의 난질에 따라 75~95%로 나타나, batch 별 차이는 관찰되었으나 그 외 특정 경향은 관찰할 수 없었다. 또한 제1극체만을 억제하거나 제2극체만을 억제하는 참조군들의 경우 역시, 화학적 처리원을 이용한 제1극체의 경우 batch별 난질별 차이는 있었으나 대부분의 경우에서 무처리 대조군들의 약 70-90% 내외에서 정상 유생의 빈도가 관찰되었고, 사용한 난질이 우수할수록, 정상 유생의 빈도가 높아지는 일변적인 경향과 일치하였다. 단 제2극체를 억제할 경우, 화학적 처리원에 노출된 시험구들이 그 처리강도가 강한 그룹들에서 제1극체 억제시 보다 낮은 정상 유생의 빈도를 나타내었다. 이 경우 역시 급격한 감소를 보이는 것은 아니며 제1극체 억제 시보다 약 10% 정도의 감소가 있었지만 일반화 할 수 있는 경향은 아니며 batch별 사용모패별 큰 차이가 있었다. 한편 물리적 처리를 통해 제1극체 또는 제2극체를 단일 억제하는 참조군 역시 사용하는 모패별로 차이가 있었지만, 대부분 60~80% 내외로 무처리 대조군과 비교 시 약 15%의 수준의 기형률의 증가가 관찰되었다. 하지만 동일 처리에 의해 egg batch간 차이가 15%를 선회하는 사례가 종종 관찰됨에 따라, 특징적인 정상성 패턴을 구체화하기는 어렵고, 물리적 자극에 의해 3배체 처리 시 일반적으로 관찰되는 변동 폭 안에서의 편차라고 판단되었다.
- : (제1극체+제2극체 억제 그룹) 유세포 분석에 의해 $\approx 4n$ peak를 포함하는 그룹들의 경우 제1극체와 제2극체가 성공적으로 하나의 수정란 내 포함되도록 제1감수분열과 제2감수분열이 모두 억제되었을 가능성이 높은 그룹들이다. 이들 그룹들은 본 시험에서 설정한 다양한 처리그룹들 중 물리적 처리를 통해 제1극체를 억제하고 화학적 처리를 통해 제2극체를 억제한 그룹들이다. 이들 그룹들은 유생의 부화율 조사에서 대조군 및 참조군과 큰 차이가 없이 대등하거나 또는 부화율이 낮더라도 급격한 감소를 보이지 않았음에도 불구하고, 부화 유생의 정상성은 매우 낮은 것으로 나타났다[그림 2-1-26]. CS-1°C를 이용하여 제1극체를 억제한 1°C+CF 4 mM, 1°C+CF 6 mM, 및 1°C+CF 8 mM 병행 처리 그룹들은 각각 17.1%, 8.8%, 4.7%의 정상 유생 빈도를 나타내어 무처리 대조군(동일 모패 이용 무처리 대조군의 정상 빈도 = 75.1%)에 비해서 극히 낮은 정상 개체 빈도를 나타내어, 부화까지 배 발생 능력은 충분히 보유하고 있으나, 부화 유생의 초기 발달 및 변태과정 중 대부분의 유생들이 정상 형태를 갖추지 못하는 것으로

관찰되었다. CS-3°C를 이용하여 제1극체를 억제한 3°C+CF 4 mM, 3°C+CF 6 mM 및 3°C+CF 8 mM 병행 처리 그룹들은 각각 17.4%, 5.9%, 3.9%의 정상유생 빈도를 나타내었다. 이들 그룹들의 정상 유생 빈도 값은 무처리 대조군(동일 모패 이용 무처리 대조군의 정상 빈도 = 79.1%)과 비교 시 역시 극히 낮은 유생 정상성을 나타내었고, 앞서의 1°C 결과에서와 마찬가지로, 물리적 처리 시 제2극체 억제를 위한 화학적 처리 농도에 매우 민감하여 그 처리 강도가 올라갈수록 부화 유생의 정상성은 반비례하는 것으로 나타났다.



[그림 2-1-26]

제1극체/제2극체 방출이 연속 억제 그룹들의 정상 부화 유생 빈도(%)

(2.2) 순차적 극체 억제 처리 조건의 재현성 평가-1

○ 목적

- : 상기 시험 결과를 토대로 순차적 극체의 방출을 억제하기 위한 기본 조건으로서 제1극체 억제를 위한 처리원의 종류(즉, 물리적 처리)와 제2극체 억제를 위한 처리(화학적 처리) 방식이 확인되었고, 이에 해당 결과가 재현성 있게 반복될 수 있는지를 재검증 확인하고자 하였다.
- : 아울러, 순차적 병행 처리 그룹들에서 부화의 경우 처리 농도에 따라 심각한 장애를 겪지 않지만, 부화 유생의 정상성이 급격히 낮아지며 그 낮아지는 경향이 제2극체 억제를 위해 상용한 화학적 처리원의 처리 강도에 따라 매우 의존적인 경향을 보인바 있음. 따라서 부화 유생의 정상성에 미치는 영향을 다시 한번 재검증하기 위해서 2차 시험평가 당시의 그룹들 중 배수성 평가를 근거하여 선발한 그룹들을 다시 유도하여 그 영향을 재평가하고자 하였다.

○ 수행내용 및 방법

- : (처리군 설계) 앞서 제1극체를 억제하기 위한 물리적 처리로서 CS-1°C와 CS-3°C를 비교 시, 배수체 유도 잠재력 측면에서 CS-1°C가 보다 우수하고, 또한 부화율 및 부화유생의 정상성에서 CS-3°C와 유사하였으므로 본 3차 평가에서는 제1극체 억제는 CS-1°C를 기준으로 한 병행 처리 그룹들을 선정하였다. 제2극체를 억제를 위해 화학적 처리원으로 사용한 바 있는 CF 4 mM, CF 6 mM, CF 8 mM 처리의 효과를 재검증하기 위해 그대로 3차 평가에 이용하였고, 농도 의존적인 부화 유생의 정상성 감소를 재확인하기 위해 CF 10 mM 처리를 추가하였다. 따라서 본 평가는 물리적 처리 CS-1°C 조건을 통한 제1극체 방출 억제와 이어서 CF 화학적 처리를 통한 제2극체의 순차적 방출 억제를 유도하고자 실험군을 설계하였다.
- : (대조군 설정) 아울러 정상 유생의 빈도와 부화율에 미치는 영향을 평가하기 위한 대조군으로서 무처리 대조군을 설정하였고, 본 대조군을 통하여 3차 평가에 사용한 egg batch의 난질에 관한 기본 평가를 하였다. 앞서 평가 시 참조군들에 따른 부화율 및 정상성의 특별한 경향이 관찰되지 않았으므로 본 평가에서는 단일 극체 억제를 위한 참조군들은 설정하지 않았다.
- : (실험 처리) 모든 시험 조건은 앞서의 평가에 사용하였던 조건들을 재현하여 실시하였고, 수정란 약 100,000개씩을 반복구로 하는 3반복 그룹을 설정하여 각 처리군을 생산하였다.

○ 배수체 유도 결과

- : 대조군에서 수거한 유생의 배수성은 유세포분석에서 이배체 단일 peak를 잘 나타내었고 분석 샘플별로 평균 gate channel 값 역시 일양하게 나타났다.
- : CS-1°C+CF 4 mM의 경우 이전 시험과는 달리 $\approx 4n$ peak를 형성하지 못하였

고, main peak로서 $\approx 3n$ -peak 만을 나타내었다. 그 외 제2극체 화학적 처리 강도가 높은 그룹들에서는 $\approx 3n$ -peak의 channel 값과 $\approx 4n$ -peak의 channel 값을 가진 peak 두 개의 peaks를 동시에 보여 주었다.

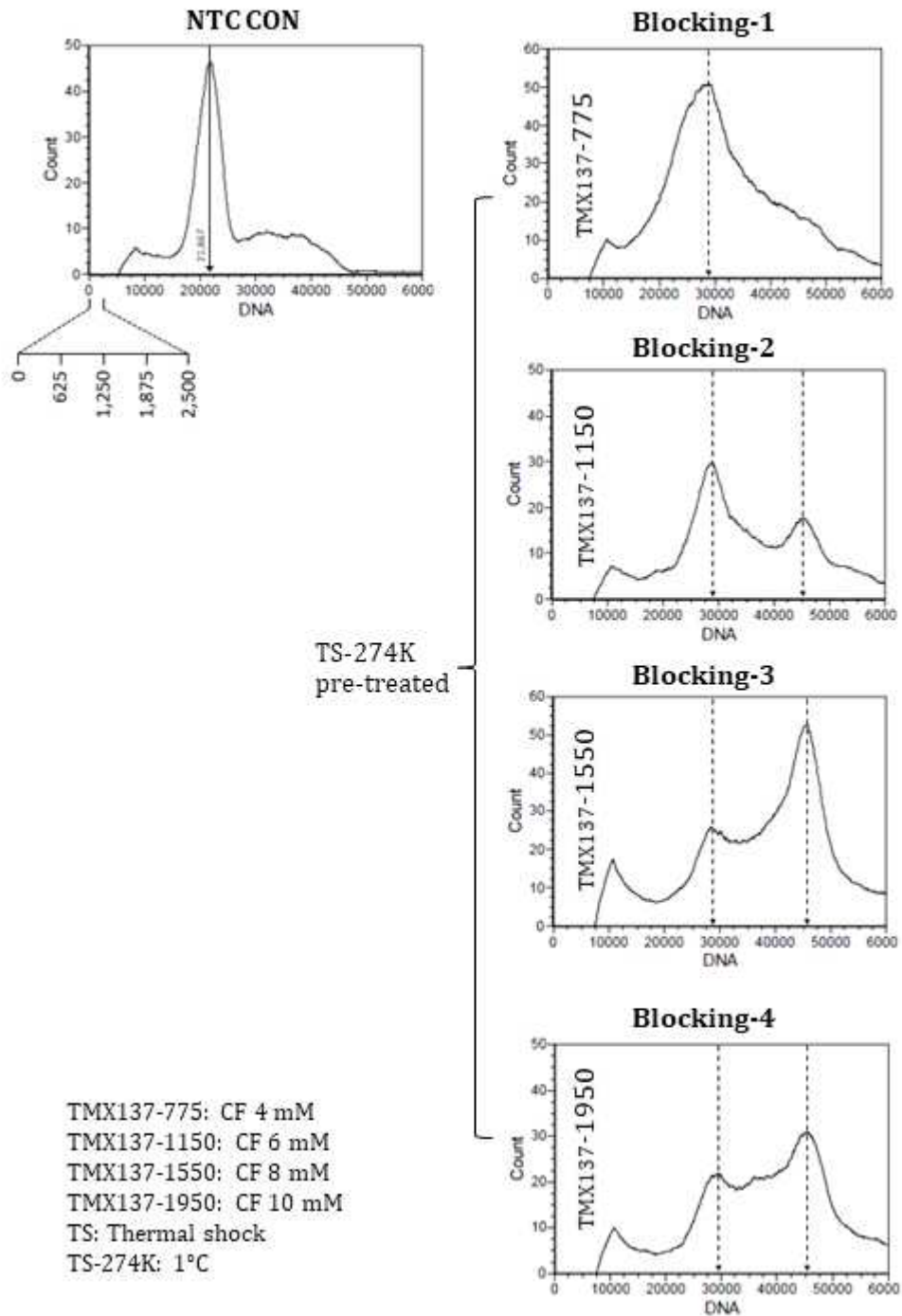
- : 분석한 그룹들의 경우 화학적 처리 강도가 올라갈수록 $\approx 3n$ -peak의 비중이 줄고 대신 $\approx 4n$ -peak의 비중이 증가하는 경향을 보였는데 이러한 경향은 CF 8 mM까지 선명하게 관찰되었고, 그 이후 최대 농도 CF 10 mM에서는 추가적인 $\approx 4n$ -peak의 비율 증가는 관찰되지 않았다[그림 2-1-27].

○ 부화율 결과

- : 본 평가 시험에서는 사용한 egg batch의 그리 우수하지 못하여, 무처리 대조군 역시 평균 부화율이 50% 미만으로 나타났다(43.8%).
- : 앞서 시험평가에서와 달리, 본 평가에서는 사용한 난질로 인해 무처리 대조군 자체의 부화율이 50% 미만으로 나타났는데, 동일 난을 이용한 병행 처리군의 부화율은 처리 강도에 민감하게 반응하여 처리 강도가 높을수록 부화율이 낮아지는 경향을 나타내었다. CS-1°C 처리 후 화학적 처리로서 CF 증가 농도를 실시한 그룹들의 평균 부화율은 27.8%, 19.5%, 15.1%, 16.2%로 각각 나타나 CF 8 mM까지 지속적인 감소가 이루어졌고, CF 10 mM에서는 추가적인 감소는 일어나지 않았다[그림 2-1-28].

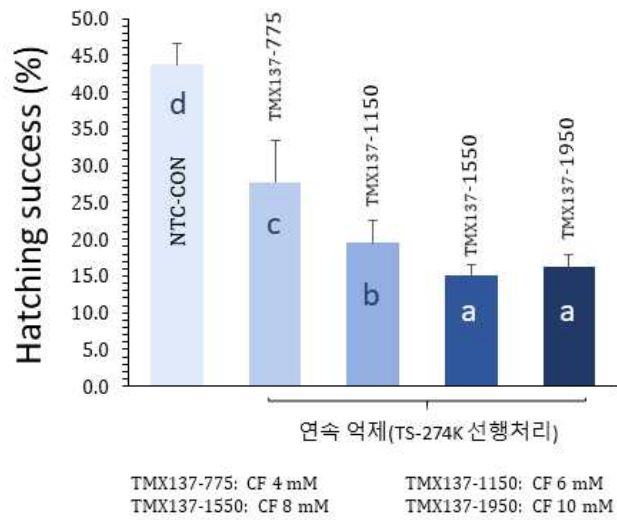
○ 유생의 정상 형태 빈도 결과

- : 무처리 대조군의 경우 부화율은 일반적인 부화율보다 크게 낮았으나 부화에 성공한 유생들의 정상 개체 빈도는 83.4%로 일반적인 값을 나타내었다.
- : $\approx 3n/4n$ peak를 보이는 처리군들의 경우 극히 낮은 정상성을 보여 앞서의 평가 시험 결과를 재현하였다. CS-1°C 처리 후 CF 처리를 실시한 그룹들에서 부화한 유생들의 정상개체 빈도는 54.2%, 7.4%, 1.5%, 3.0%로 나타나 CF 8 mM까지 처리 강도 의존적인 감소가 일어났고, 이후 CF 10 mM에서는 다시 약간의 증가를 보였으나 유의미한 증가는 아니라고 판단되었다[그림 2-1-29].
- : 따라서, 직전 평가와 비교하여 금회 평가 결과를 종합할 경우 다음과 같은 추론이 가능하였다. 첫째, 물리적 자극의 선행 처리와 화학적 자극의 후발 처리를 통해서 두 개의 극체를 순차적으로 방출 억제하는 것은 일관성 있는 결과라고 인정할 수 있다. 둘째, 그러나 그 효율은 난질에 의해 크게 영향을 받을 수 있는데, 난질이 좋지 못할 경우 처리 강도에 따른 부화율의 감소가 민감하게 표현된다. 또한 난질이 좋지 못할 경우, 저농도의 화학적 처리원에 의한 병행 처리가 불완전하게 나타난다. 셋째, 순차적 억제 처리를 받은 수정란으로부터 부화한 유생은 매우 심각한 초기 발달 장애가 야기될 수 있고, 그 부정적 영향은 제2극체 억제 방출을 위해 사용하는 화학적 처리 강도에 큰 영향을 받는다. 넷째, 사용하는 난의 난질에 따라서 절대적인 확보 마리 수는 큰 차이를 보이지만, 화학적 처리원 농도 의존적인 감소는 일관된 경향으로 판단된다.

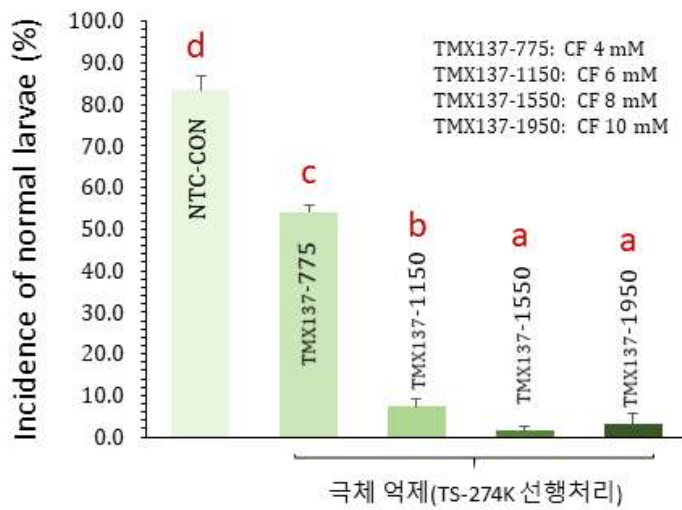


[그림 2-1-27]

제1극체/제2극체 연속 억제 효과의 검증(유세포분석)



[그림 2-1-28]
 제1극체/제2극체 연속 억제 효과의 검증 시험 구의 부화율(%)



[그림 2-1-29]
 제1극체/제2극체 연속 억제 효과의 검증 시험 구의
 정상 부화 유생 빈도(%)

(2.3) 순차적 극체 억제 처리 조건의 재현성 평가-2

○ 목적

: 직전 재현성 평가 시험의 결과, 좋지 않은 난질을 이용 시 화학적 처리의 저농도 처리군의 배수체 유도 효율이 급격히 낮아짐이 관찰됨에 따라, 당초 2차 평가에서 CF 4 mM 이용 그룹에서의 관찰된 $\approx 3n/4n$ peak가 유도되지 못하였다. 따라서 해당 결과의 이유가 난질의 영향을 받는 지를 재검증하기 위해서 수정율과 무처리 대조군의 부화율이 보다 높은 그룹에서 유도 가능 유무를 (CS-1°C+CF 4 mM) 확인하고자 하였다.

○ 수행내용 및 방법

: (실험군 설계) 대조군은 무처리 그룹으로서 사용한 모패로부터 얻은 egg batch의 난질 평가와 처리군의 상대 부화율 및 정상성 평가를 위한 대조군으로 설정하였다. 처리군은 앞서의 이유에 의거, 이전 시험 평가에 이용하였던 병행 처리군의 난질 영향을 재검증하기 위해서 1°C 처리(제1극체) 후 4, 6, CF 8 mM 화학적 처리군을 설정하였다. 3차 평가에 의해, CF 10 mM의 경우 CF 8 mM과 비교 시 유의미한 차이를 보여주지 못하였으므로 평가에서 제외하였다.

: (배수체 처리) 배수체 처리는 약 100,000개 내외의 수정란을 대상으로 실시하였고, 다른 처리 요인들은 앞서와 동일하게 실시하였다.

○ 부화율 성적 및 부화율의 처리 농도 의존성

: 본 시험에서 사용한 난질의 경우, 무처리 대조군의 평균 부화율이 75.3%로 나타났으며, 통상의 부화율 수준을 회복하였다.

: 순차적 방출 억제 처리군의 경우, CS-1°C 물리적 처리 후 화학적 병행처리를 통해 설정한 1°C+CF 4 mM, 1°C+CF 6 mM, 1°C+CF 8 mM 그룹들의 평균 부화율은 68.2%, 71.4%, 69.5%로 나타났다. 대조군 부화율과 비교 시 다소 낮은 평균 값들을 형성함으로써, 대조군과 차이 없는 높은 부화율을 나타내지는 못하였지만, 직전 시험과 비교 시 상대적으로 높은 부화율 성적을 보이는 값들이다.

: 특히, 직전 시험에서는 화학적 처리원들의 처리 농도가 증가할수록 농도 의존적인 감소 경향이 뚜렷이 보였지만, 본 시험에서는 병행 처리군들 사이에서 농도 의존성이 표현되지 않았다. 따라서 본 시험을 통해 사용하는 모패들의 egg batch별 난질이 병행 처리군의 부화율의 절대 값뿐만 아니라 농도 의존성 유무에 큰 영향을 끼침을 알 수 있었다[그림 2-1-30].

○ 저농도 병행 처리 그룹의 배수체 유도

: 앞서의 실험 시 화학적 처리 농도가 제일 낮은(부화 유생의 정상성 및 부화율이 처리군 중 가장 높음) 그룹에서는 $\approx 4n$ peak가 표현되지 못하였지만, 본 시험에서는 1°C+CF 4 mM 병행 처리구에서 $\approx 3n/4n$ peak 형태가 관찰 가능함에 따라, 일정 수준 이상의 난질이 확보될 경우에 저강도 처리가 효과적으로 작동할

수 있음을 시사하였다[그림 2-1-31].

- : 한편 그 외 그룹에서는 CF 6 mM 및 CF 8 mM 조건에서 $\approx 3n/4n$ peak가 관찰되어 3차 평가 결과를 잘 재현하였다. 그러나 본 시험에서는 CF 8 mM이 CF 6 mM 보다 $\approx 4n/3n$ peak ratio가 더 높은 것으로 관찰되어, 추후 생존율 및 수율(yield)을 개선하기 위한 후속 연구에서 농도 결정을 위한 추가 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

○ 정상 유생 빈도

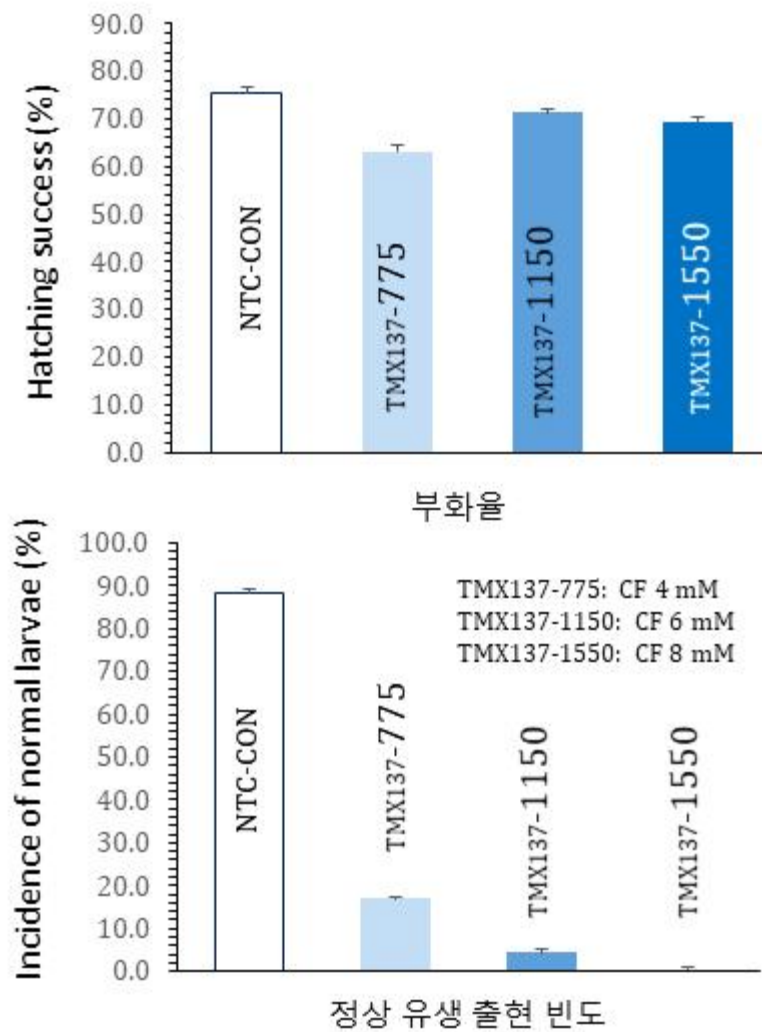
- : 높은 부화율에도 불구하고 병행 처리군들에서 부화한 유생의 정상성은 대조군에 비해 유의적으로 크게 낮은 정상 개체의 빈도 및 화학처리원의 농도 의존적 감소 경향을 나타내었다.
- : 대조군(무처리군)의 정상 유생 빈도는 88.5%로 나타났지만 1°C 물리적 처리 후 화학적 병행처리를 통해 설정한 1°C+CF 4 mM, 1°C+CF 6 mM, 1°C+CF 8 mM 그룹들의 정상 유생 빈도는 각각 17.1, 4.3 및 0.5%로 나타나, 난질에 따라 크게 영향을 받지 않았다.

(3) 4배체 유도 효율 및 세부처리 조건 개선

(3.1) 복합처리 시 화학적 처리원의 농도 효과

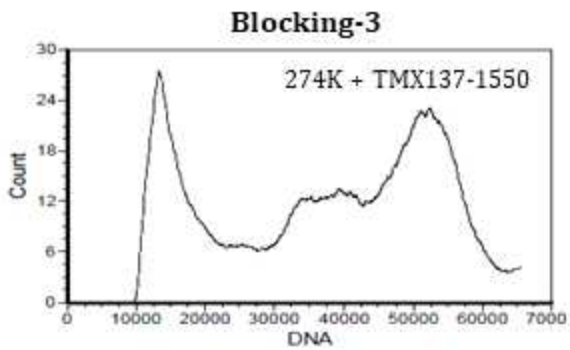
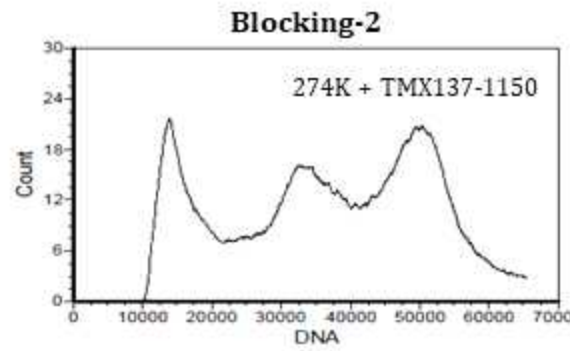
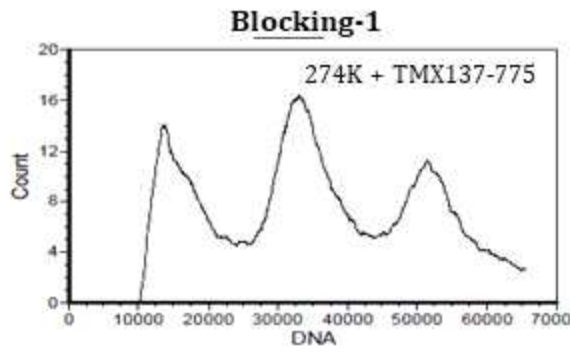
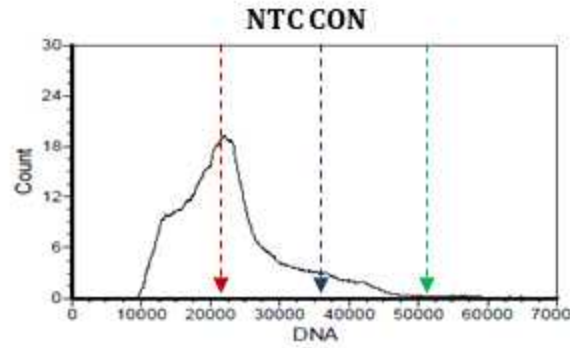
○ 목적

- : 순차적 억제처리에 의해 배수화 그룹이 재현성 있게 유도되고, 난질 개선을 통해서 부화율 및 저농도 처리군에서의 배수화 유생의 생산이 가능함을 확인하지만, 부화 유생의 정상성은 모든 실험 차수에서 극히 낮게 나오는 경향이 반복되는 문제점이 관찰되었다.
- : 이에 본 시험에서는 첫째, 부화 유생 정상성의 개선 여지가 있다고 판단되는 저농도 처리 구간을 보다 세분화하여 정상성은 개선하고 배수화 유도 효율은 적정 수준을 유지할 수 있는 처리가 가능한지를 확인하고자 하였고(배수화 그룹의 정상 유생의 수율을 개선할 수 있는 방안이 가능한지 조사), 둘째, 전복 유생의 초기 배양 관리를 통상의 관리 방법에서 개선된 조건을 처리하였을 때 유생의 생존율(정상 유생)을 개선할 여지가 있는지의 여부를 확인하고자 하였다.



[그림 2-1-30]

제1극체/제2극체 연속 억제 효과의 재 검증 시험 구의 부화율 및 정상 유생 빈도(%)



TMX137-775: CF 4 mM
 TMX137-1550: CF 8 mM
 TS-274K: 1°C

TMX137-1150: CF 6 mM
 TS: Thermal shock

[그림 2-1-31]

제1극체/제2극체 연속 억제 효과의 재 검증 시험 구 유세포분석

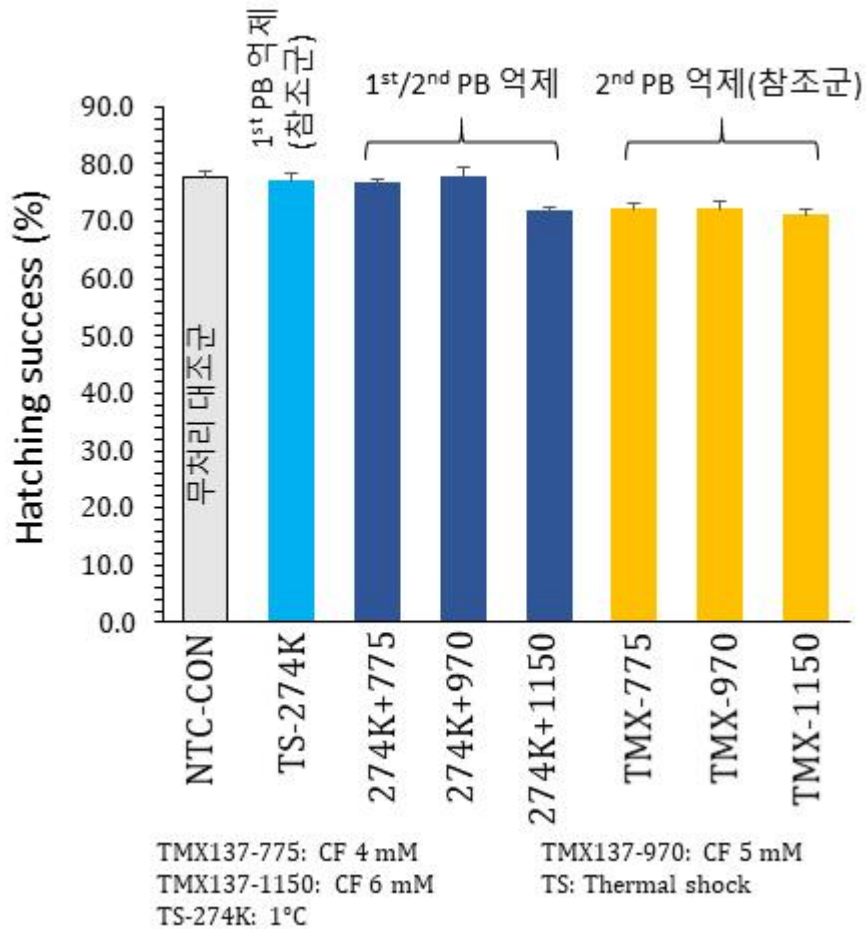
○ 수행내용 및 방법

- : (병행 처리군의 설계) 정상 유생의 빈도가 특히 낮은 성적을 앞서 실험에서 지속적으로 나타내었던 CF 8 mM 처리군은 제외하였다. 대신 CF 처리 강도 수준을 구분하여 CF 4 mM, CF 5 mM, CF 6 mM의 처리를 비교함으로써 조금 더 정상 유생의 빈도를 증가시킬 수 있는지를 확인하고자 하였다.
- : (대조군 및 참조군의 설계) 이때 대조군으로서 무처리 그룹을 설정하여, 사용한 egg batch의 품질 평가와 상대 부화율 및 기형률의 대조군으로 사용하였다. 병행 처리군의 부화 유생의 낮은 정상성을 보다 자세히 평가하기 위해서 상기 무처리 대조군뿐만 아니라 각 화학처리 강도를 반영한 참조군을(즉, 병행 처리에서 1 CS처리를 제외한 제2극체 단독 억제 그룹) 3 그룹 설정하였다. 아울러 물리적 처리 1 CS의 정상 개체 빈도에 미치는 영향을 같이 비교하기 위해서 물리적 단독 처리(제1극체 단독 억제; 화학적 처리는 제외함)를 반영한 참조군을 설정하였다.
- : (유생 관리 및 샘플링) 직전까지의 유생 샘플링은 부화가 거의 완료되는 예상 시점의 2시간 이전 시점에서 중상층의 유영 유생을 부화 수조에서 직접 수거하는 방법을 이용하였다. 그러나 본 평가에서는 부화 개시가 관찰되는 시점에서 2시간 이내 최상층의 활발한 유영을 보이는 유생들만을 (2,000미 이하) 신속히 선별하여 이중여과(double filtered)된 새로운 여과해수 수조를 별도로 준비하여(15 L) 저밀도 환경에서 초기 배양을 실시하였고 12시간 당 1회전 환수가 될 수 있도록 여과해수를 이용하여 수질을 지속적으로 관리 하였다. 시험구별로 2개 반복구를 마련하여 부화조의 부화 종료 근접 시점(4차 시험까지에서 유생 샘플링을 실시한 시점), 그리고 부화 종료 12시간 경과 시점에서 2차 샘플링을 재실시 하였다. 따라서 기존 부화 유생 샘플링 시점에서 부화조, 저밀도 초기 배양수조 간 차이가 관찰되는지 여부를 확인하였고, 초기 배양 수조에서 부화 후 veliger 단계에서 정상 외형의 유생이 생존 가능한지 여부를 평가하고자 하였다.

○ 부화율 결과

- : 무처리 대조군에서 관찰된 평균 부화율은 77.7%로 양호하였다. 아울러 단일 극체 처리를 위한 참조군(화학적 처리 참조군 및 물리적 처리 참조군) 모두에서 70% 이상의 부화율을 보였다. 제1극체 억제를 위한 물리적 처리 참조군의 경우 무처리 대조군과 전혀 차이가 없는 77.1%의 평균 부화율을 나타내었고, 제2극체 억제를 위한 화학적 처리 참조군에서는 다소 낮은 평균 부화율이 관찰되어 (71.1%~72.2%) 무처리 대조군과 통계적 차이를 보였다($P < 0.05$). 하지만 참조군들간에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$) [그림 2-1-32].
- : 5차 시험의 양호한 난질을 이용할 경우 병행 처리군에서도 큰 부화율의 감소는 관찰되지 않아 2차 및 4차 시험의 결과와 유사하였다. CS-1°C 이후 CF 4 mM, CF 5 mM, CF 6 mM 병행 처리에서 모두 71.9%~77.8% 범위의 부화율을 나

타내었고, 병행 처리군 중 가장 높은 화학적 처리 농도를 포함하는 1°C+CF 6 mM 처리구(71.9%)에서는 무처리 대조군 및 나머지 병행처리군과 통계적 차이를 나타내었으나($P < 0.05$), 낮은 농도 그룹들은 무처리 대조군과 유사한 부화율을 나타내었다.



[그림 2-1-32]

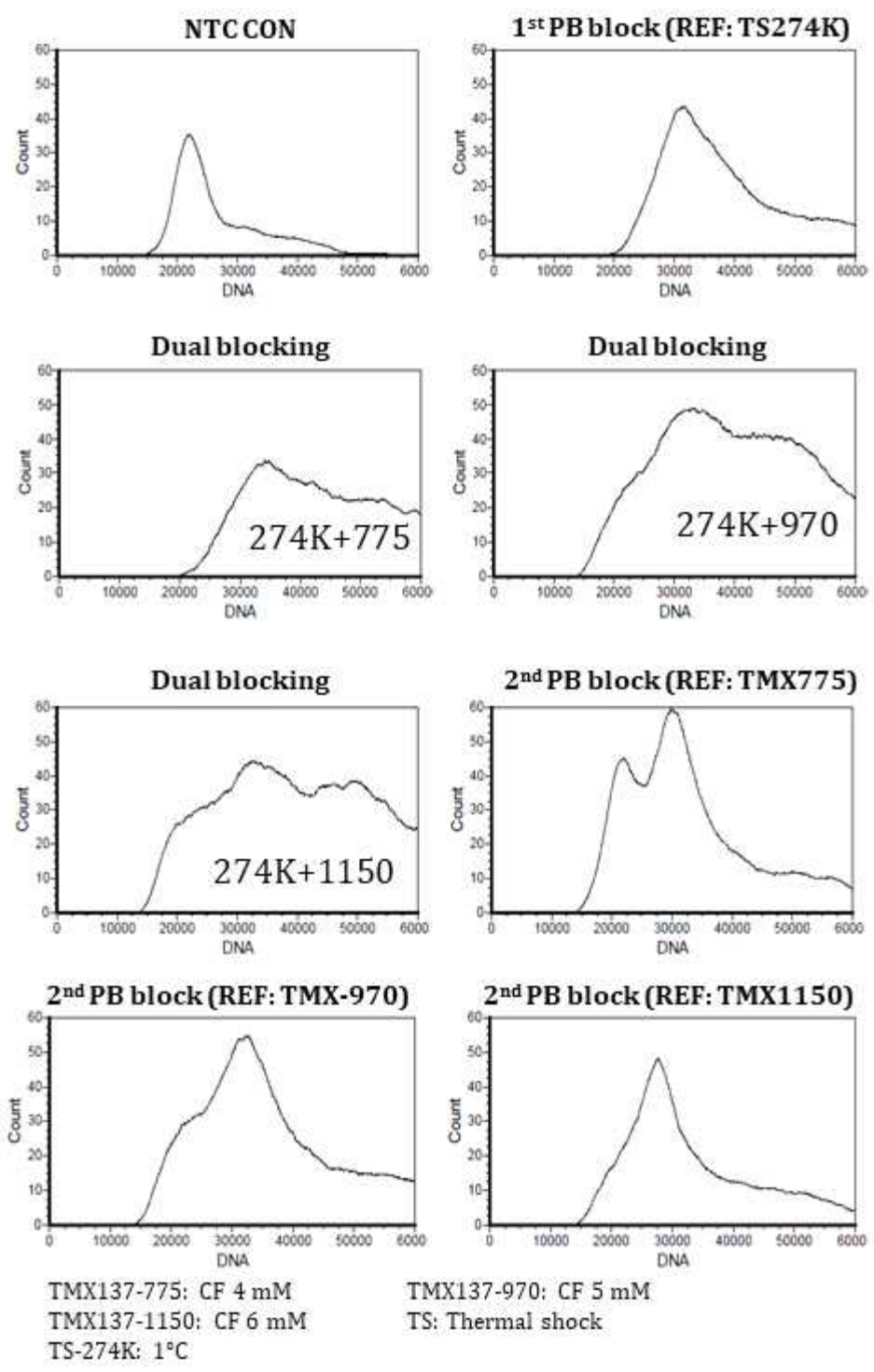
제1극체/제2극체 연속 억제 처리의 세분화 개선 실험구 부화율

○ 배수성 분석결과

- : 무처리 대조군은 반복구 모두에서 전형적인 2n-peak를 나타내었고, 참조군들 역시 예상과 다르지 않은 배수체 빈도를 나타내었다. 제1극체를 억제한 CS 참조군 및 제2극체를 억제한 CF 참조군들 모두 3n-peaks를 포함하였다. 이중 가장 낮은 CF 농도의 참조군인 CF 4 mM 그룹에서는 2n+3n peaks가 두 개 형성되어 이전의 결과와 유사하였고, 따라서 사용한 극체 별 억제 조건은 모두 효과적으로 작동하는 것으로 판단되었다.
- : 병행처리 군에서는 앞서와 유사한 결과를 나타내어 가장 낮은 화학적 처리에서는 상대적으로 작은 비율의 $\approx 4n$ peak가 관찰되었고 농도가 증가할수록 $\approx 4n$ peak의 비중이 증가하는 경향을 보여 이전 시험평가의 결과를 잘 재현하였다. 특히 5차 시험에서 새로이 평가한 중간 그룹인 CS-1°C+CF 5 mM 병행 처리군은 CF 6 mM 이용 병행 처리군과 조금 더 유사한 유세포분석 양상을 나타내었다[그림 2-1-33].

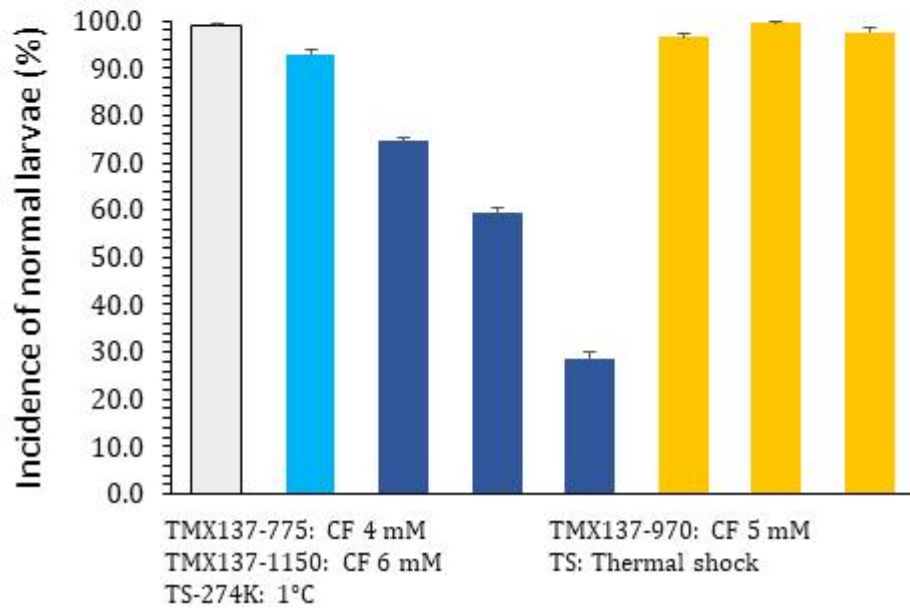
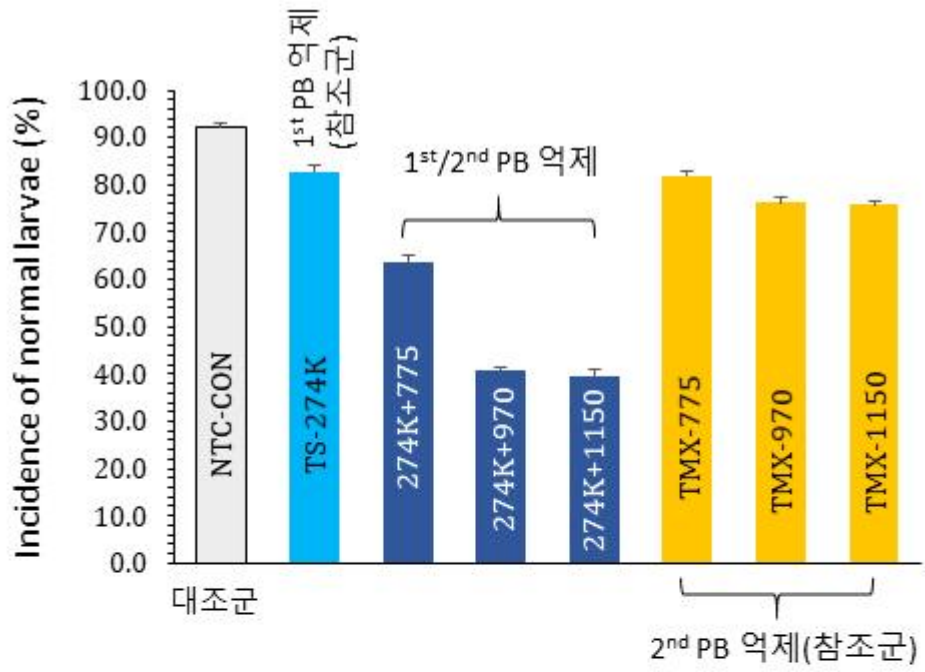
○ 정상 유생 빈도

- : 직전 시험과 동일한 시점에서 부화조에서 직접 수거한 유생들은 이전과 유사한 정상 빈도를 나타내었다(병행 처리군의 경우 처리 농도별로 10%~20%의 정상유생 빈도). 이때 무처리 대조군의 경우 90%의 정상 유생개체 빈도를 보였고, 단일 극체 억제형 배수체 참조군의 경우 76%~82%의 정상빈도를 나타내어, 이전 시험들의 결과와 크게 다르지 않았다.
- : 하지만 부화 직후 최상층 유생만을 선발하여 저밀도 여과해수 초기 배양을 실시할 경우 부화 유생의 정상성이 보다 개선될 수 있는 가능성을 보였다. 초기 배양 수조로부터 앞서 부화조 샘플링과 동일 시점에서 유생을 샘플링하여 비교한 결과, 병행 처리군 중 가장 낮은 농도에 노출된 그룹(CF 4 mM)의 경우 63.4%, 중간 농도의 경우(CF 5 mM) 40.9%, 그리고 5차 시험에서 가장 높은 농도인 CF 6 mM 처리 그룹의 경우 39.5%의 정상개체 빈도를 나타내었다. 본 결과를 통해, 비록 농도 의존적 감소 경향을 지속되지만, 우수한 부화율을 보이는 병행 처리군으로부터 보다 엄격한 부화 유생의 관리 개선을 통해 유생의 정상성을 개선할 수 있는 여지가 있음을 확인 가능하였다[그림 2-1-34].
- : 하지만 병행 처리군이 아닌 대조군 및 참조군의 경우 부화조에서 직접 샘플링한 유생과 저밀도 초기 배양조에서 샘플링한 유생간 정상 유생의 빈도에는 큰 차이가 관찰되지 않았다. 평균 정상유생 빈도는 무처리 대조군의 경우 92.2%, CS 참조군의 경우 82.7%, CF 참조군들의 경우 농도에 따라(4, 5, CF 6 mM) 81.9%, 76.3% 75.8%로 나타났다.



[그림 2-1-33]

제1극체/제2극체 연속 억제 처리의 세분화 개선 실험구의 부화율



[그림 2-1-34]

제1극체/제2극체 억제 그룹의 유생 관리 및 정상 유생 빈도

(위: 부화 종료 시점, 아래: 부화 종료 12시간 후)

- : 저밀도 유생관리 조건에서 부화 익일(부화 종료 후 12시간) 추가적인 유생을 수거하여 veliger 단계의 유생에서 정상성을 유지하는 개체들의 빈도를 확인한 결과, 대조군 및 참조군의 경우 소수의 비정상 개체들이 탈락함에 따라 중상층 유영 유생들은 대부분이 정상 개체들로서, 유영 유생 중 정상개체의 빈도는 오히려 증가하였다. 무처리 대조군은 98.8%, CS 참조군의 경우 63.0%, CF 참조군들의 경우 농도와 무관하게 96.6%~99.6%로 나타나 무처리 대조군과 큰 차이가 없었다. 병행처리군의 경우 직전(12시간 이전)의 정상 개체 빈도와 비교 시 CF 4 mM 및 CF 5 mM의 경우 참조군과 마찬가지로 정상개체의 빈도가 다소 증가하여 각각 74.6% 및 59.5%를 나타내었다.
- : 하지만 CF 6 mM을 이용한 병행 처리군의 경우 비정상 개체들이 유의적으로 증가하여 정상 개체 빈도가 28.6%로 나타났다. 이들 유생들에서 유세포 분석 결과 이전과 유사한 $\approx 3n/4n$ peak이 관찰됨에 따라 veliger 단계에서 생존하는 정상 외형의 유생에서 배수성이 관찰 가능하였다.
- : 따라서 이상의 시험 결과를 통해, 병행 처리군의 수율을 개선하기 위해서 4~CF 6 mM 범위를 기본적인 추가 개선 대상 구간으로 정할 수 있고, 처리 자체뿐만 아니라 처리 후 부화한 유생을 대상으로 한 보다 특화된 관리 방법의 개선과 최적화 조건 개발이 요구되는 것을 알 수 있다.

(3.2) 복합처리 시 최초처리 시점 조정 효과

○ 목적

- : 처리자극원이 전복 수정란의 발생 및 부화유생의 생존에 미치는 영향을 최소화하고 아울러 극체 방출 시점에 보다 표적화된 처리를 집중하기 위한 조건을 탐색하기 위해서 제 1극체 방출억제에서 저온자극의 최초 처리 시점을 최대한 앞당기고(9 MPF), 저온 처리 시간을 최소화(12분)하고자 하였다. 이후 다양한 최초 처리 시점에서 CF의 최소 요구 조건(16분, 6 mM)을 이용하여 제2극체 방출을 억제하여 해당 조건에서 배수체 생성 효과를 확인하였다.
- : 4배체 유도 실험군들과 별도로 비교 대조군을 설정하여, CF 단독 처리 시 제2극체 방출 억제를 위한 정확한 최초 처리 시점을 확인하고자 하였다.

○ 수행내용 및 방법

- : (무처리 대조군 및 비교 대조군) 무처리 대조군으로 일반적인 2배체 발생을 유도하였고, 저온처리 비교 대조군으로 저온처리를 통한 제 1극체만을 억제한 비교 대조군을 설정하였다. 제2극체 CF 단독처리 대조군으로는 CF의 최소 요구 조건인 CF 6 mM - 16분간 처리조건에서 CF의 최초 처리 시점을 서로 상이하게 설정하였다.
- : (복합 처리군의 설계) 제 1극체 방출억제를 위한 저온자극은 1°C에서 수정 후 9분부터 21분까지, 12분간 지속되도록 고정하였다. 저온처리 이후 CF 6 mM을 16분

간 처리하여 제 2극체 방출을 억제하고자 하였고, 이때 CF의 최초 처리 시점을 수정 후 21분부터 30 분까지 1분 간격으로 상이하게 설정하였다. 서로 다른 시점에서 CF처리를 위해 저온처리와 CF처리 사이에 20°C에서 중간배양을 실시하였다.

: (실험 처리 수조 배치 및 처리 전략 수립) 상기 실험 설계에 관한 실험군의 표식 및 실험 처리에 관한 전체 요약은[그림 2-1-35]에 나타내었다. 대조군 포함 총 24개의 실험군으로 구성되어 있으며 시험구별 요구되는 처리 시작 및 종료 시점을 실험으로 구현하기 위해서 설계한 처리 조의 배치 등에 관한 정보는[그림 2-1-36]에 나타내었다.

○ 부화율, 정상개체 빈도율 결과

: 무처리 대조군과 저온처리 비교 대조군은 모두 90% 이상의 부화율을 보이며 유의적인 차이는 관찰되지 않아 매우 양질의 우수한 수정란이 사용되었음을 알 수 있었다. 정상개체 빈도율 또한 90%이상의 정상성을 보이며 해당 그룹간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

: 처리군과 CF 단독처리 대조군의 경우 CF의 최초처리 시점이 늦어질수록 부화율이 다소 떨어지는 경향을 보이며, 정상개체 빈도율 또한 CF의 최초처리 시점이 늦어질수록 낮아지는 경향을 나타내었다[그림 2-1-37].

○ 배수체 유도 결과

: 무처리 대조군은 2배체 peak가, 저온처리 비교 대조군은 3배체 peak가 관찰되어 예상과 일치함을 보였다.

: 처리군에서 4배체의 비율은 23 MPI에서 CF를 처리한 그룹부터 증가하기 시작하여, 25 MPI에서 CF 처리를 시작한 그룹에서 최대치를 보이며, 26-28 MPI에서 처리를 시작한 그룹은 3배체과 4배체의 비율이 거의 동일하지만, 이후 29 MPI에서 CF 처리를 시작한 그룹에서는 3배체의 비율이 더 증가하였다[그림 2-1-38].

: CF 단독처리대조군의 경우, 21 MPI-27 MPI에서 처리를 시작한 그룹까지는 3배체 peak가 관찰되나 28 MPI에서 처리를 시작한 그룹에서는 약간의 2N이 검출되기 시작하여 30MPI에서 CF처리를 한 그룹에서는 상당비율의 2배체 세포들이 함께 검출되었다[그림 2-1-39].

복합 처리군의 CS 처리 사항

- 0 MPF: 수정 20 °C
- 9 MPF: 1°C 12분 처리 시작
- ▶ 100% 3n peak 형성 가능
- ▶ CS 처리는 대량 용량 용기를 이용하여 동시 처리, 이후 분주
- 21 MPF: CS 처리 후 20°C로 복귀
- ▶ 복귀 후 5만개씩 신속히 분주; 1분 내

CF 처리 개시 시점

- 21 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 22 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 23 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 24 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 25 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 26 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 27 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 28 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 29 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 30 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)

Group labeling

- A-21-37
- A-22-38
- A-23-39
- A-24-40
- A-25-41
- A-26-42
- A-27-43
- A-28-44
- A-29-45
- A-30-46

CF 처리 종료 시점

- 37 MPF: A-21-37 CF 처리 종료 및 세란
- 38 MPF: A-22-38 CF 처리 종료 및 세란
- 39 MPF: A-23-39 CF 처리 종료 및 세란
- 40 MPF: A-24-40 CF 처리 종료 및 세란
- 41 MPF: A-25-41 CF 처리 종료 및 세란
- 42 MPF: A-26-42 CF 처리 종료 및 세란
- 43 MPF: A-27-43 CF 처리 종료 및 세란
- 44 MPF: A-28-44 CF 처리 종료 및 세란
- 45 MPF: A-29-45 CF 처리 종료 및 세란
- 46 MPF: A-30-46 CF 처리 종료 및 세란

비교 대조군 설정

- 1) 무처리 대조군
- 2) 저온처리 단독 대조군 (1°C 12분 from 9 MPF)
 - ▶ CS 처리 후 분주를 통해 A-CS CON 마련

- 3) 제2극체 CF 단독 처리군
 - ▶

Group labeling

- A-NT CON
- A-CS CON

CF 처리 종료 시점

- 21 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 22 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 23 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 24 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 25 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 26 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 27 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 28 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 29 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)
- 30 MPF: CF 처리 시작 (6 mM, 16 min)

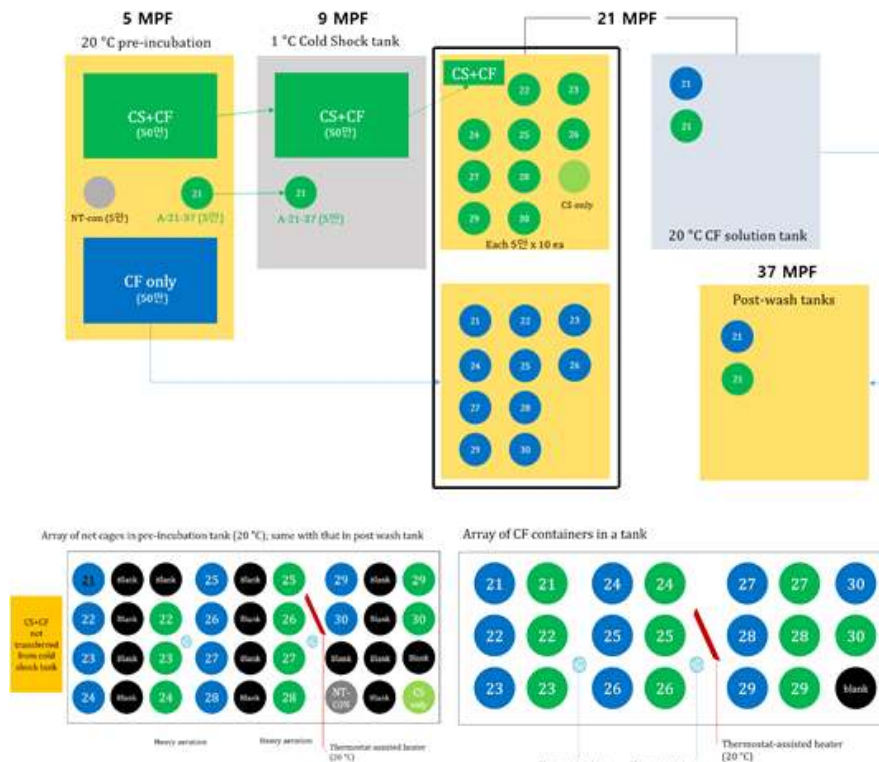
- A-CF-CON21-37
- A-CF-CON22-38
- A-CF-CON23-39
- A-CF-CON24-40
- A-CF-CON25-41
- A-CF-CON26-42
- A-CF-CON27-43
- A-CF-CON28-44
- A-CF-CON29-45
- A-CF-CON30-46

CF 처리 종료 시점

- 37 MPF: A-CF-CON21-37 CF 처리 종료 및 세란
- 38 MPF: A-CF-CON22-38 CF 처리 종료 및 세란
- 39 MPF: A-CF-CON23-39 CF 처리 종료 및 세란
- 40 MPF: A-CF-CON24-40 CF 처리 종료 및 세란
- 41 MPF: A-CF-CON25-41 CF 처리 종료 및 세란
- 42 MPF: A-CF-CON26-42 CF 처리 종료 및 세란
- 43 MPF: A-CF-CON27-43 CF 처리 종료 및 세란
- 44 MPF: A-CF-CON28-44 CF 처리 종료 및 세란
- 45 MPF: A-CF-CON29-45 CF 처리 종료 및 세란
- 46 MPF: A-CF-CON30-46 CF 처리 종료 및 세란

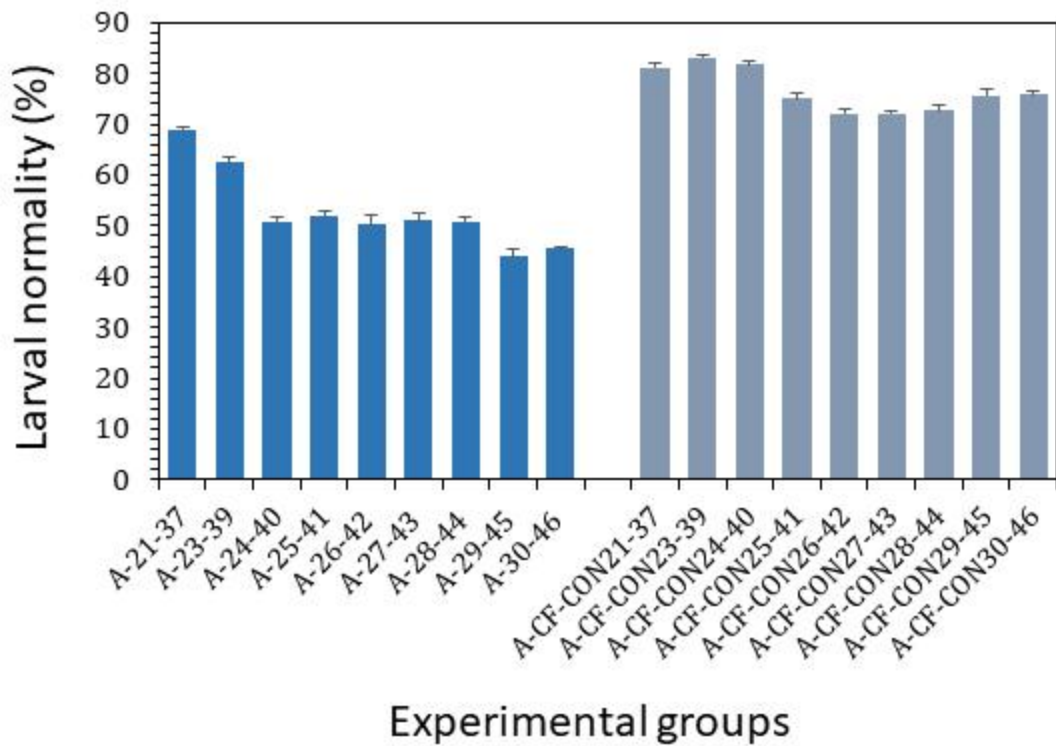
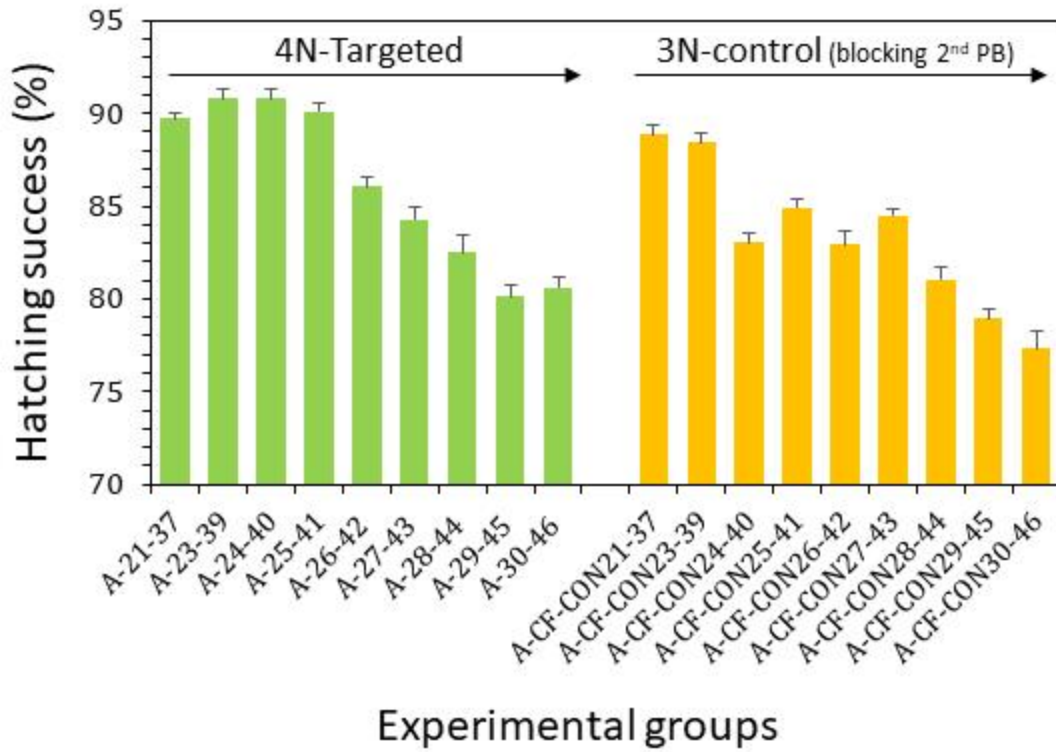
[그림 2-1-35]

극체방출의 순차적 억제를 위한 최초처리시점의 조정 실험군정보



[그림 2-1-36]

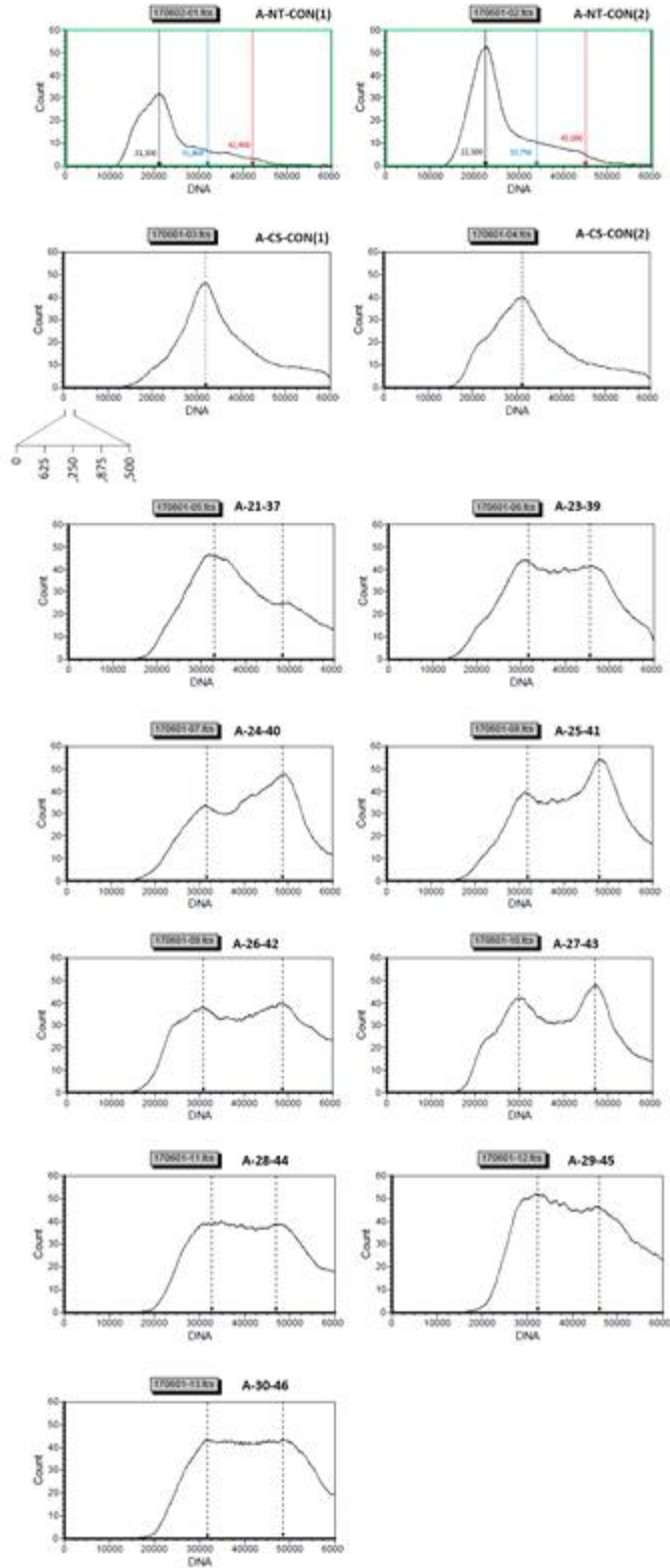
**극체방출의 순차적 억제를 위한 최초처리시점의 조정:
처리수조 및 실험군 배치 정보**



[그림 2-1-37]

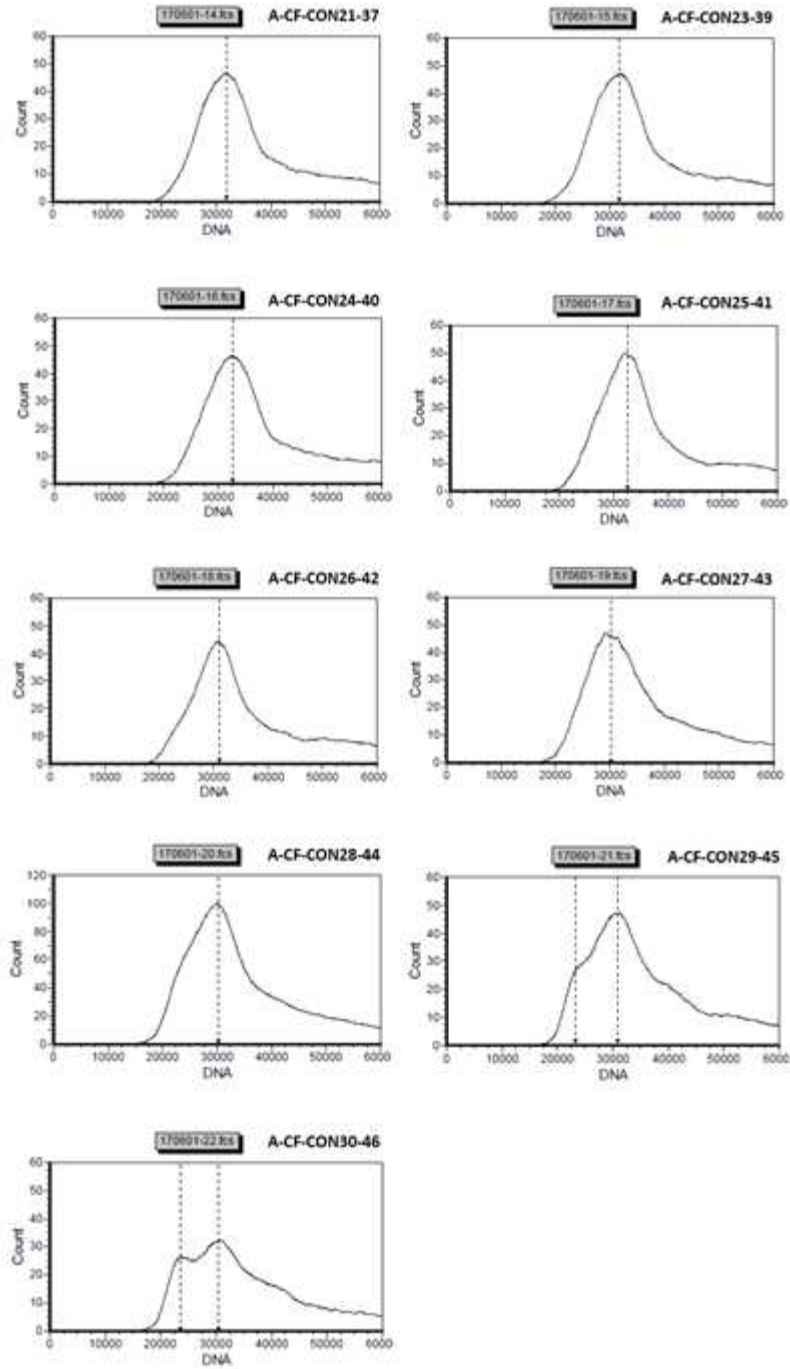
극체방출의 순차적 억제를 위한 최초처리시점의 조정 실험:

부화율 및 유생정상성 분석



[그림 2-1-38]

극체방출의 순차적 억제를 위한 최초처리시점의 조정 실험:
 유세포분석을 이용한 복합처리군(CS+CF)의 배수체 분석



[그림 2-1-39]

극체방출의 순차적 억제를 위한 최초처리시점의 조정 실험:
 유세포분석을 이용한 비교대조군(CF단독 처리)의 배수체 분석

(3.3) 복합처리 시 물리적 처리와 화학적 처리간 차등 비중 효과

○ 목적

- : 극체 연속 방출 처리 시 두 극체를 모두 억제하기 위해 요구되는 최소 처리 지속 기간 내에서 CS 처리와 CF간 처리간 처리 시간의 비율을 서로 달리하여 최적처리 조합을 탐색하고자 하였다. 차등 비중으로 설계된 실험 조합별로, 배수체 유도 효율(4배체 포함 peak의 비율), 수정란의 부화율 및 부화 유생의 정상성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

○ 실험 설계

- : 저온 처리(CS 0.5-1°C) 후 CF 처리(5.5 mM) 연속 처리 수행하였다. 수정 후 최초 처리 시점은 11 MPF로 고정하였으며 모든 처리가 끝나는 시점 또한 43 MPF로 고정하여 총 처리 기간이 32분이 되도록 하였다.
- : 제 1극체 방출 억제를 위한 저온 처리는 12, 14, 16, 18, 20분간 이루어지고 이에 상응하도록 20, 18, 16, 14, 12분간 CF처리를 통해 제 2극체 방출 억제를 유도하도록 하였다.

○ 부화율 및 정상개체 빈도 결과

- : 부화율은 모든 그룹에서 대조군 (69%)대비 80% 이상 양호하게 나타났으며 실험 조합간 수치의 차이는 있었으나 유의미한 통계적 차이에 관한 경향은 관찰되지 않았다.
- : 복합 처리군으로부터 부화 유생의 정상성을 조사한 결과, CS12+CF20 그룹이 가장 낮은 정상성 (평균 6%내외)를 보이고, CS를 가장 길게 그리고 CF를 가장 짧게 처리한 그룹(CS20+CF12)에서 가장 높은 정상성 (평균 19%)를 보여 실험군간 차이가 있었다[그림 2-1-40].

○ 배수체 유도 결과

- : 유세포분석 결과, 대부분 실험구에서 다양한 수준의 배수체가 포함되는 양상을 나타내었으며 특히 3배체 해당 세포들과 4배체를 포함하는 4배체 이상이 배수성을 보이는 세포들이 함께 검출되었다. 4배체 포함 세포들의 비중은 CS12+CF20 그룹에서 가장 높은 비율로 관찰되었고, 반면 CS20+CF12 그룹의 경우 3배체 해당 세포들의 상대 비중이 다른 그룹들에 비해서 증가하는 결과를 나타내었다[그림 2-1-41].
- : 본 시험의 결과를 종합하며, 부화율과 유도된 배수체의 상대 비율과는 유의미한 상관관계가 없으나 부화 유생의 정상성과 배수체 분석 자료와는 밀접한 상관관계가 관찰되었다. 즉, 배수성 분석에서 4배체 이상의 세포들을 높게 포함하는 실험 조합의 경우 정상성이 상대적으로 낮게 관찰되었고, 반대로 정상성이 상대적으로 높게 측정된 실험구들은 4배체 유도 효율이 낮게 나타났다.
- : 따라서 본 결과는 저온 처리를 늘리고 CF 처리를 최소화하는 방식은 높은 고효율의 극체 연속 억제에 효과적이지 않으며 최소 처리 시간으로 설정된 32분 내에서 CF 처리가 최소 50% 이상 포함되어야만 일정 수준 이상의 양 극체의 순

차적 억제 효과가 효과적으로 얻어질 수 있음을 시사하고 있다. 하지만 부화 유생의 정상성 측면에서는 극체의 순차적 처리 효과가 높아질수록 유생의 정상성이 감소하여 4배체 이상의 유생이 3배체 유생에 비해 낮은 정상성을 나타내므로 수율을 감안한 처리 조건의 결정이 필요하다.

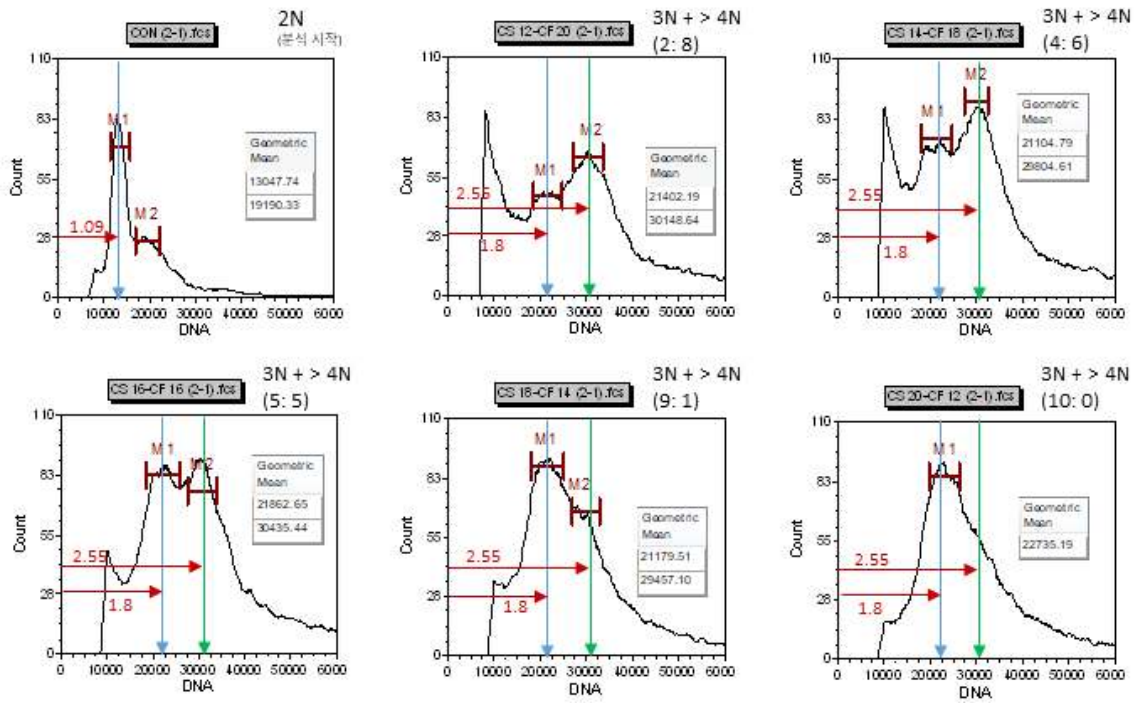
Exp. Group		No. Eggs	No. Hatched larvae	% Hatching	Average	SEM
CON	Rep. 1	120	82	68.33	68.99	0.53
	Rep. 2	112	78	69.64		
CS12-CF20	Rep. 1	126	86	68.25	69.25	0.81
	Rep. 2	121	85	70.25		
CS14-CF18	Rep. 1	133	79	59.40	59.77	0.30
	Rep. 2	148	89	60.14		
CS16-CF16	Rep. 1	115	65	56.52	55.89	0.51
	Rep. 2	114	63	55.26		
CS18-CF14	Rep. 1	110	62	56.36	56.89	0.43
	Rep. 2	108	62	57.41		
CS20-CF12	Rep. 1	112	69	61.61	62.62	0.83
	Rep. 2	110	70	63.64		

↓

Exp. Group		No. Larvae	No. Normal larvae	% Normality	Average	SEM
CON	Rep. 1	104	99	95.19	94.44	0.61
	Rep. 2	111	104	93.69		
CS12-CF20	Rep. 1	125	7	5.60	6.56	0.78
	Rep. 2	133	10	7.52		
CS14-CF18	Rep. 1	120	13	10.83	10.23	0.49
	Rep. 2	135	13	9.63		
CS16-CF16	Rep. 1	129	13	10.08	10.37	0.24
	Rep. 2	150	16	10.67		
CS18-CF14	Rep. 1	167	32	19.16	18.84	0.26
	Rep. 2	135	25	18.52		
CS20-CF12	Rep. 1	131	24	18.32	19.29	0.79
	Rep. 2	153	31	20.26		

[그림 2-1-40]

CS처리와 CF처리간 처리지속기간의 비율에 따른 극체방출의 순차적 억제 효과: 부화율 및 유생 정상성



[그림 2-1-41]

CS처리와 CF처리간 처리지속기간의 비율에 따른
극체방출의 순차적 억제 효과: 배수체 출현 양상

(3.4) 자성발생성 처리 조건 조사

○ 목적

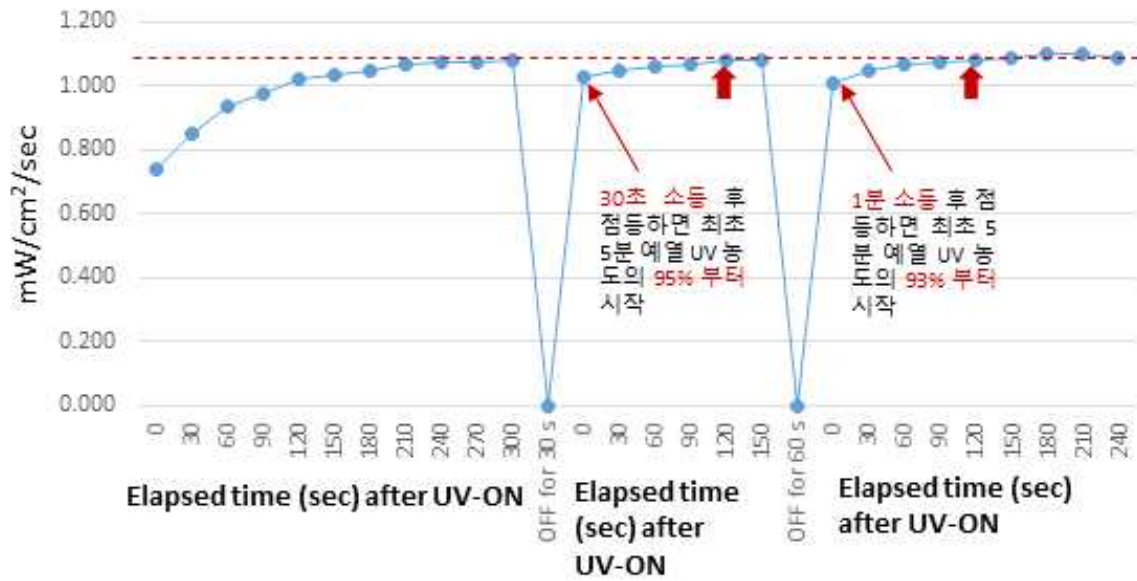
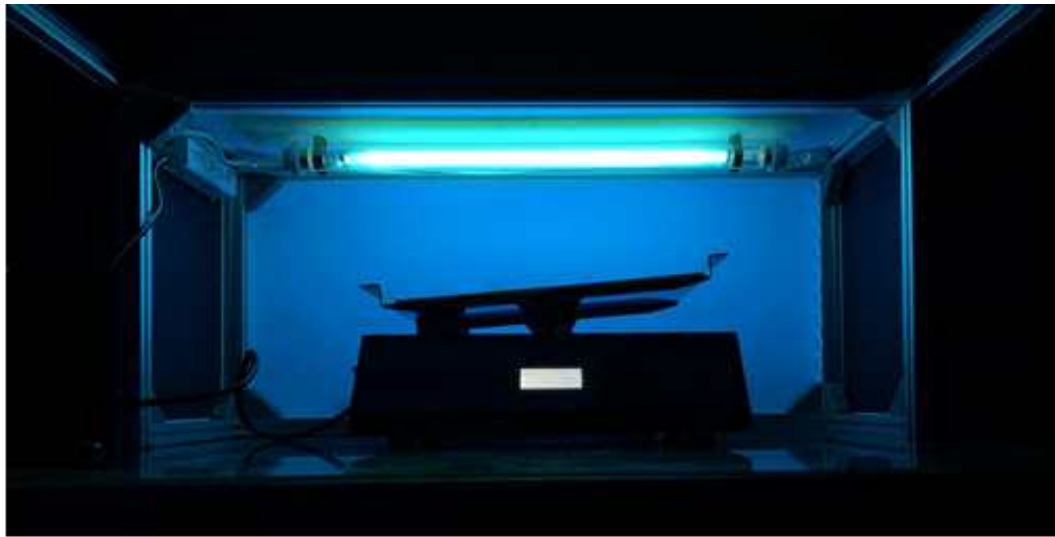
- : 양 극체를 순차적으로 억제하는 처리를 기반으로 할 경우, 4배체를 포함하는 배수체 집단이 형성되지만, 4배체 외에 다양한 배수체형의 세포들이 동시에 검출된다. 따라서 4배체 형성의 집중도를 개선하기 위해 불활성화 정자를 이용, 자성발생성 방식의 4배체(gynogenetic 4N) 유도를 추진하고자 하였고, 이를 위해서 전복의 자성발생성 발생을 유도할 수 있는 실험조건을 우선 구축하고자 하였다.
- : 자성발생성 유도 실험의 경우 일부 실험적인 국외 문헌들이 보고되어 있으나 본 연구의 예비 실험 결과, 재현성을 담보하기 어려울 뿐만아니라 세부 기술 조건에 대한 자세한 기록이 부족하여 해당 자료의 직접적인 이용은 불가능하였다. 따라서 본 연구의 실험조건에서 자성발생성 발생 유도 조건을 실험적으로 재검토 및 재정립하고자 하였다.
- : 이를 위해 자외선 조사 처리에 관한 다양한 세부처리 조건들에 관한 사전 조사 실험들을 추진하였고, 평가자료를 토대로 자외선 조사 장치를 설계하였으며, 자외선 처리에 의한 자성발생성 반수체 발생 및 제1극체 억제를 통한 자성발생성 이배체 복원 조건을 구하고자 하였다.

○ 자외선 조사 세부 기술 조건의 예비 평가

- : 자외선 불활성화 처리를 위해서, 자외선 강도, 자외선 광원과 정자와의 거리, 정자 균일 혼합 방법, 복수의 순차적인 자외선 처리가 필요하므로 자외선 예열 및 자외선 점등/소등 간격에 따른 자외선량(농도) 변동, 정자 수, 정액의 희석 정도, 동시에 처리할 수 있는 실험군 수 등에 관한 예비 평가를 수행하였고, 이를 토대로 두 종류의 자외선 장치를 설계하여 실험에 이용하였다[그림 2-1-42].

○ 자외선 조사 및 자성발생성 발생 유도

- : 예비 평가 결과를 토대로 설정한 자외선 조건은 15W, 254 nm (UVC; Sankyo, JAPAN)의 자외선 등과, 지름 9 cm의 유리 petridish를 사용하여 정자의 자외선 조사에 사용하였으며 2D-Rocker (RK-1D, WiseMix, Korea)을 사용하여 5 rpm속도로 정자를 혼합하였다. 자외선 등은 10분의 예열시간을 가진 후 실험에 사용, 정자와 자외선 조사 등과의 거리는 10 cm로 설정하여 1,200 erg/mm²/sec로 조사하였다.
- : 정액은 방정 진행 중인 수컷으로부터 transfer pipette를 이용하여 직접 채취, 12~15°C에 보관하면서 각 petridish당 2.2 ml의 정자를 취하여 자외선 조사에 이용함.
- : 정자 불활성화는 상기 처리 조건으로 15, 20, 25, 30, 35초간 실시하였으며 그룹별 1회씩, 총 2개 petridish에 자외선을 조사하였으며 각 petridish 당 1 ml 해수를 이용하여 petridish washing 후 washing 한 해수를 포함하여 혼합하였다.
- : 사용한 정자의 농도는 2.8×10^7 sperm/ml로, 약 10만-15만의 미수정란이 들어 있는 300 ml의 해수에 혼합 정액 약 5 ml을 이용하여 수정하였다(수온 20°C).



[그림 2-1-42]

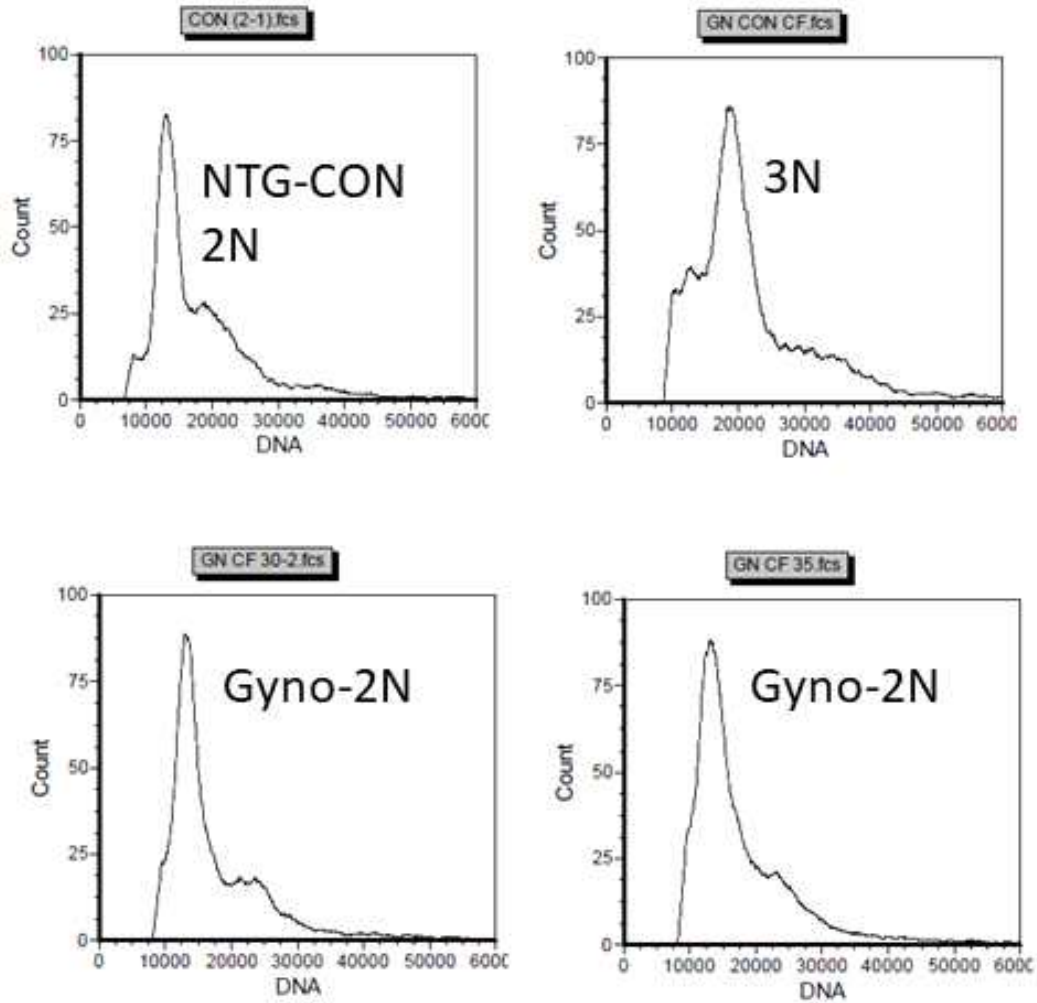
자성발생성 발생의 유도를 위한 자외선 조사 조건의 최적화

○ 2배체로의 복원 유도, 부화율 및 정상개체 빈도

- : 자성발생성 반수체 수정 그룹들로부터 수정란의 절반을 취하여 6 mM CF에 수정 후 12분부터 28분까지(16분간) 노출시켜 제1극체 방출을 억제할 유도를 하였다.
- : 15, 20, 25초간 자외선 조사를 한 정자를 사용한 그룹에서는 부화개체가 관찰되지 않았으나 자외선 조사를 30초, 35초 간 수행한 그룹에서는 각 6%, 14%의 부화율이 확인되었다.
- : 정자에 15, 20, 25초간 자외선 조사를 하여 자성발생성 반수체로부터 CF처리를 통한 2배체 복원을 시도한 그룹에서도 부화개체는 관찰되지 않았으나 30, 35초에 해당하는 그룹에서는 각 8%, 14%의 부화율을 보였다.
- : 반수체 유도 그룹 중 유생단계에서 정상개체는 확인되지 않았지만, 30, 35초에서 2배체 복원을 시도한 그룹에서는 각 7%, 6%의 정상개체가 확인되었다.

○ 유세포분석 결과

- : 무처리 대조군의 경우 전형적인 2배체로 판정되었으며 불활성화 정자가 아닌 일반 정자와 수정 후 제1극체를 억제한 대조군(CF처리 대조군)에서 3배체 단일 peak가 관찰되어 본 자성발생성 실험에서 제1극체 방출 억제 조건이 잘 작동하였음을 나타내었다.
- : 또한 자성발생성 발생 유도 후 제1극체 억제를 통해서 부화한 부화유생들을 분석한 결과 조사한 두 그룹(30 및 35초 처리군) 모두에서 해당 부화유생들은 모두 2배체로 판정되어 자성발생성 이배체 유도가 성공적으로 이루어졌음을 시사하였다[그림 2-1-43].
- : 이상의 결과에서 본 시험을 통해서 자성발생성 발생의 유도와 반수체의 이배체 복원이 이루어지는 조건이 확보되었음을 알 수 있었다. 자성발생성 반수체 그룹에서 더 낮은 자외선 강도에서 부화 개체가 관찰되지 않은 이유는 불완전한 정자 유전물질의 불활성화로 인해 야기된 비정상적 aneuploidy 세포들이 부화까지 이르지 못하였기 때문으로 예상되면 본 관찰치는 자성발생성 이배체 실험 시 관찰되는 Hertwig Effect로 설명될 수 있다. 아울러 이배체 복원 처리가 되지 않은 그룹에서 부화 자어가 관찰되었지만, 이들은 모두 정상 개체들이 아니지만, 제1극체 억제 처리가 된 시험구들에서 정상개체가 출현하는 것은 반수체의 이배체 복원이 이루어졌음을 시사한다. 하지만 그 수율 측면에서 본 조사의 모든 자성발생성 실험군들이 매우 낮게 나타났는데, 이는 무처리 대조군 30% 내외로 나타나 사용한 난질 자체에 기인한 문제로 판단되었다.



[그림 2-1-43]

자성발생성 이배체, 정상 이배체, 삼배체의 유세포 분석

(3.5) 자성발생성 4배체 처리 효과 조사

○ 목적

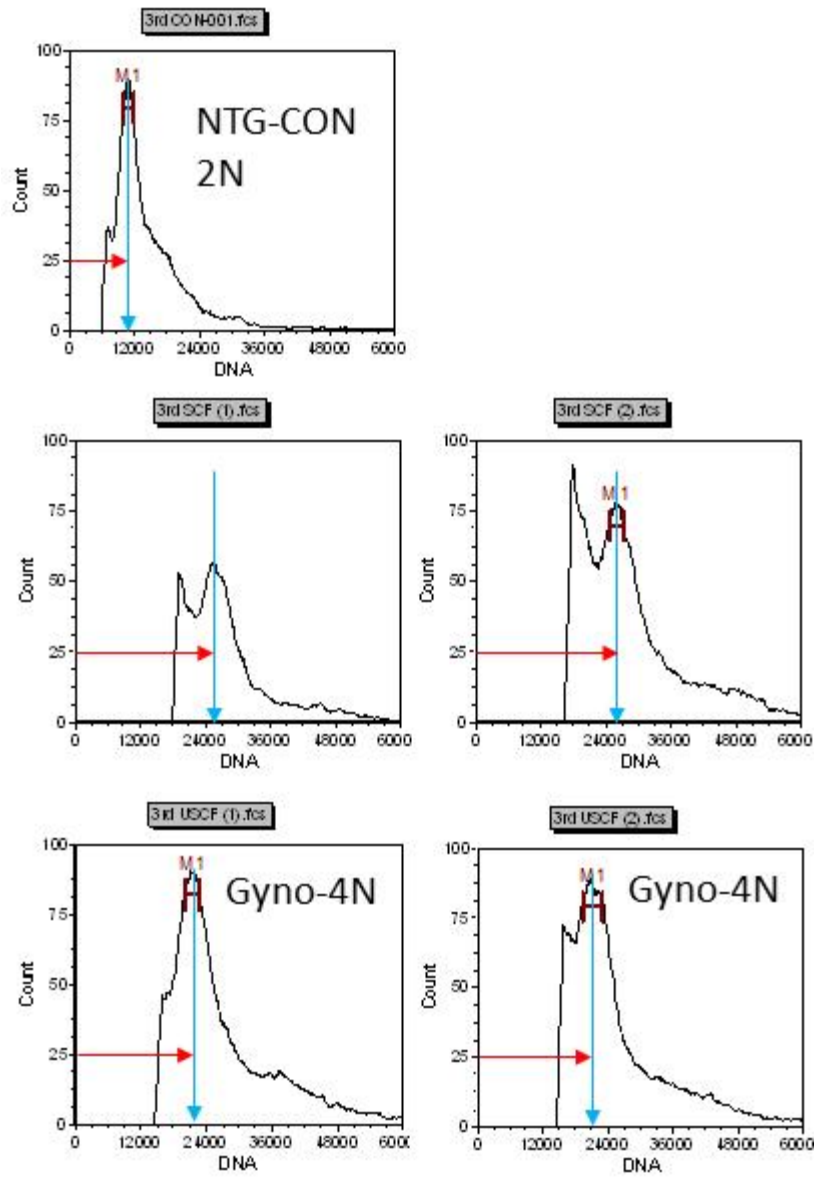
- : 상기 자성발생성 발생 조건을 이용하여 4배체의 유도의 정확성과 집중도가 개선되는지를 자성발생성 4배체 처리군을 통해서 확인하기 위해 자성발생성 4배체 유도(불활화 정자를 이용한 수정 및 복합처리)와 일반 정자를 이용한 복합처리 두 그룹에서 생산된 유생들의 배수성 특성을 비교하고자 하였다.

○ 실험군 설계

- : 자성발생 4배체 유도를 위해서 3.2×10^8 sperm/ml 농도를 가진 정액을 14°C 항온 수조를 만들어 수정 전까지 계속 보관하였으며, 미수정란은 15 L 용기에 4 L 정도 수용하여 용기 아래에 ice pack을 비접촉 방식으로 제공하였다.
- : 수정 용기(2.7 L) 2개에 각각 분조한 알(약 531,000개)에 정상 정자 (CSF group)와 UV 정자 (UCSF group)를 각각 참가하여 하여 수정을 유도하였다.
- : 극체의 연속 억제를 위해 수정 11분 후 0.5°C 에서 12분간 CS처리 후 CF 6 mM 을 21분간 처리하였다.
- : 처리 후 동일 조건에서 부화를 유도하였으며, 부화 유생을 대상으로 배수성 분석과 정상성 분석을 수행하였다.

○ 배수성 및 정상성 분석결과

- : 유세포분석 결과 불활성 정자를 사용한 UCSF 그룹에서는 대부분의 세포들이 (90% 이상) 전복 4N genome size에 해당하는 일양한 단일 peak를 형성하는 반면, CSF 그룹에서는 4N을 포함하지만 상대적으로 >4N 이상의 배수성을 갖는 세포들이 혼입되어 관찰되었다[그림 2-1-44].
- : 부화율의 경우 무처리 대조군의 경우 평균 74%에 해당하는 부화율을 보였으나 불활성화 정자를 이용한 복합처리 그룹(UCSF)의 경우, 무처리 대조군 대비 약 40%에 해당하는 부화율을, 그리고 CSF 처리군의 경우 대조군 대비 약 80%의 부화율을 보였다[표 2-1-1]. 부화 유생의 정상빈도의 경우 대조군에 비해서 UCSF 군 및 CSF 군 모두 극히 낮은 정상성을 보였으며 특히 UCSF 그룹에서 더 낮게 관찰되는 경향을 보였다.
- : 이상의 결과에서 자성발생성 방식의 4배체 유도는 전복의 4배체 유도 시 4배체 출현 빈도의 집중도를 유의적으로 개선시킬 수 있는 잠재력이 인정되었다. 하지만 정자의 자외선 처리로 인한 정자 운동성 등 정자의 수정 능력에 부정적인 영향이 필연적으로 수반되며, 4배체 유도의 집중도가 높아지더라도 부화 유생의 정상성 개선에는 큰 효과가 없는 것으로 나타나 추가적인 기술 개선이 필요한 것으로 나타났다.
- : 본 실험 이후 몇 차례의 추가적인 개선 사항(정자 수집 시점, 고농도 정자를 이용한 자외선 조사 처리 등)과 관련한 실험들이 일부 더 추진 중에 있으나 아직 복합 처리군의 유생 생존율을 대폭 개선시킬 수 있는 조건은 추가적인 연구가 필요한 상태이다.



[그림 2-1-44]
 자성발생성 사배체 유도

[표 2-1-1] 자성발생성 복합처리 실험구의 부화율

Experimental groups		No. eggs examined	No. hatched larvae	Hatching rate (%)	Mean	SEM
CON	Rep. 1	152	111	73.03	74.33	1.07
	Rep. 2	156	118	75.64		
CSF (1)	Rep. 1	136	89	65.44	65.17	0.22
	Rep. 2	151	98	64.90		
CSF (2)	Rep. 1	141	92	65.25	64.67	0.48
	Rep. 2	142	91	64.08		
UCSF (1)	Rep. 1	136	44	32.35	32.43	0.06
	Rep. 2	160	52	32.50		
UCSF (2)	Rep. 1	160	53	33.13	32.23	0.73
	Rep. 2	150	47	31.33		

(4) 4배체 유생의 생존을 평가

○ 조사 대상 실험군 및 유생 사육

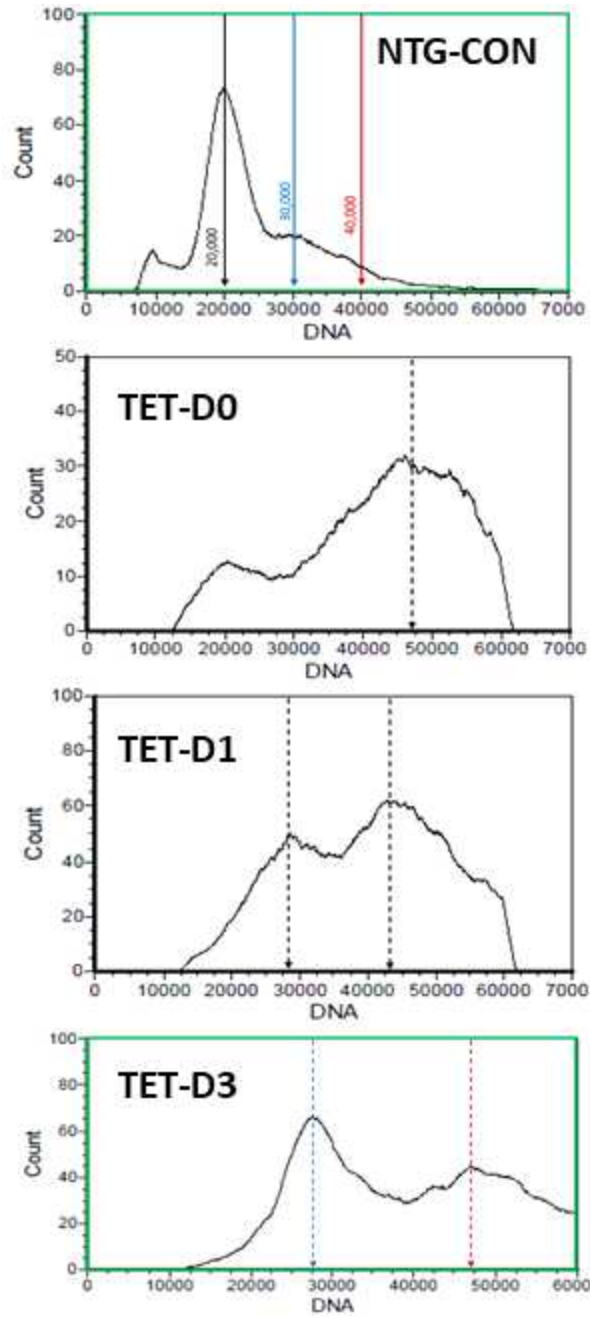
- : 일반 정자를 이용, 양 극체를 억제하는 복합 처리군을 대상으로 채묘 시기까지의 배수성 그룹의 비율 변동과 유생의 생존율을 조사하였다. 복합처리군은 11 MPF 에서 CS0.5-1로 14분간 처리 후 이어 CF5.5조건으로 19분간 처리를 통해 부화 유생을 100만 마리 이상 생산하여 실험에 이용하였다.
- : 유생 사육 수질을 유지하기 위해 3중의 하우징 필터(1 um)를 연결과 자외선 살균 장치를 이용하여 17~18도의 여과 살균 해수를 우수 하면서 조사하였다. 약 100만 마리의 유생을 2 톤 수량의 직사각 수조에 수용하여 수용 직후부터 부착근접시기까지 부유 유생을 사육하였다.
- : 대량 처리한 복합 처리군의 유세포분석 결과, 이배체 해당 peak는 관찰되지 않았으며 3배체 peak 역시 거의 관찰되지 않았고 대부분 \geq 4N 해당 peak을 나타냄으로써 복합처리를 통해 극체의 순차적 억제가 효율적으로 이루어진 배수체 그룹이 생산되었음을 알 수 있었으며, 극체 억제 효율 자체는 일정 수준 이상의 기술이 정립되었음을 시사하였다.

○ 복합 처리군의 부화율 및 부화 직후 정상성 빈도 결과

- : 유생 사육 동안 D0, D1, D3 시점에서 유생의 생존 정도를 평가하였고(사육 조 내 유생의 밀도 평가 기준), 해당 시점에서 약 200~300개체의 유생을 샘플링하여 유세포 분석을 수행, 배수체 유생들의 생존 여부와 이들의 외형적 정상성 빈도를 조사하였다.
- : 처리군의 부화율은 무처리 대조군 대비 50% 정도로 관찰되었으나 정상 유생 빈도는 부화 직후에도 극히 낮아 5% 미만으로 관찰되었다.

○ 시간 경과에 따른 생존율 및 배수성 변동

- : 부화 직후에도 정상성 빈도가 매우 낮았기 때문에 가파른 유생 탈락이 예상되었는데, 부화 1일째 D1의 경우 최초 수용 시 유생의 밀도 대비 약 20% 정도만 부유 유생 상태로 생존하였고 많은 개체들이 폐사하였다. 이후 추가적인 소실이 지속되어 부화 3일째(D3)에서는 D1 대비 10%(최초 수용 마리수의 약 2%)만이 생존하는 것으로 나타났다.
- : 각 샘플링 시점에서 정상 외형의 유생 빈도 역시 감소하는 경향을 나타내어 최초 5%의 정상 유생 비율이 D1에 도달 시에는 1% 미만으로 관찰되었고, 부화 3일째에는 0.5% 정도만이 정상의 외형을 갖는 것으로 나타나, 최초 5%의 정상 빈도와 비교 시 약 1/10의 개체들만이 정상성을 유지하는 것으로 평가되었다.
- : 각 샘플링 시점에서 배수성에 관한 유세포분석을 실시한 결과, 최초 대부분 \geq 4N의 peak를 나타내던 그룹에서 D1에서는 3N에 해당하는 peak가 약 40% 관찰되었으나 2배체에 해당하는 peak들은 관찰되지 않았다. 이후 D3에서는 3N 해당 peak의 비율이 더욱 증가하여 오히려 \geq 4N의 peak보다 높은 비율을 나타내었지만(약 60~70%) D3에서도 여전히 최초 \geq 4N의 peak 위치의 peak들이 관찰 가능하였다[그림 2-1-45].



[그림 2-1-45]

복합처리군 부화유생의 시간 경과에 따른 배수성 변동

- : 이상의 결과에서 복합처리(연속 극체 억제)는 다량의 배수체 부화 유생 생산이 가능하나 채묘 근접시기까지 생존율은 2%, 그리고 이중 정상성 빈도는 0.5%의 극히 낮은 생존 특성을 보였다. 더욱이 생존한 정상 유생 중 60~70% 이상이 최초 배수성 특징을 유지하지 못하고 배수성이 감소하는 것을 고려할 때 4배체 유생의 수율은 더 낮아질 것으로 예상되었다. 배수성의 변동에 관해서는 전복의 경우 그간 안정적인 3배체 유지와는 크게 다른 결과로서 3배체보다 더 높은 배수성이 유도되었을 때 일어나는 현상이다. 이에 관한 아직 명확한 해석이나 설명은 추가적인 연구가 필요하지만, 종래 패류의 배수체 유도 시 다양한 배수체들이 함께 출현한다는 일부 보고들과 일맥상통하고 있다.
 - : 본 실험을 토대로 유사한 방식의 대량처리 후 부화 유생의 사육을 시도하였으나 사용한 수정란의 질적 차이에 따라 매우 민감한 반응을 보여, 특히 부화 직후 정상 유생의 빈도가 큰 폭으로 변동하였으나(1% - 최대 50%), 그럼에도 불구하고 부화 유생의 유생 사육 기간별 생존율은 모두 5% 미만으로 관찰되었는데, 이는 유생 생존율이 매우 낮은 그룹에서 수질 악화 등으로 인한 영향이 복합적으로 작용하기 때문에 시험구별 생존율과 최초 부화 유생의 정상성 간에 상관관계를 특정하여 연결하기는 어려운 상태이다. 따라서 통상의 유생 사육법을 그대로 적용해서는 복합처리를 통해 생산한 유생의 일정 수준 이상의 생존율을 기대하기가 어려우며, 처리기술 자체의 개량뿐만 아니라 난질과 처리군의 유생 관리 조건 역시 많은 연구와 개량 노력이 필요한 상태이다.
- 난질 및 유생 사육 개선에 따른 4배체 처리그룹의 생존율 개선 가능성 평가
- : 상기 2단계 2차연도까지의 처리 조건 개발에 관한 연구를 토대로 3차연도~5차연도까지는 다양한 난질을 나타내는 암컷 모패들을 대상으로 유도 및 생존율에 관한 재현 또는 차이 유발을 조사하였다(1~2회/년; 10개체의 양질의 난을 보이는 암컷 이용). 복합처리를 기반한 대량처리 조건은 상기 처리 조건을 이용하였고, 분석 및 평가 역시 2차연도까지의 조건을 준용하여 실시하였다.
 - : 처리 결과, 부화 유생의 배수성 및 유세포분석 peak 출현 양상은 암컷 모패 및 처리 그룹에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나, 유생 사육 과정 중 유생의 생존율은 처리 그룹(즉, 사용 모패 및 난질)에 따라 유의적인 차이를 보였다. 3차연도~5차연도까지 생산한 다양한 처리그룹 중 대량처리 후 부화 유생의 사육 과정에서 수질 통제가 가장 많이 개선된 조건으로 사육한 5차연도의 4배체 실험(2021년 7월 6일; 해남 육종전복보급센터)에서 유생의 정상성과 유생의 생존 지속성이 가장 우수하였다. 5차연도의 대량처리는 5천만 개의 수정란을 대상으로 수행하였고, 수질에 대한 부정적인 요인을 최소화하기 위해 최상층 부화 유생만을 선별적으로 유생 사육에 투입하였다. 유생 사육은 다중 여과 장치를 통과한 여과 해수를 이용하였고 자동온도조절 장치를 통해 항온 조건(20°C)을 유지하면

서 일간 회전율을 유지하였다. 비록 대량처리 그룹 수용 수조(약 1 m x 10 m x 0.7 m = W x D x H; 2개 수조 이용)로부터 일자별 정량적인 생존을 추적은 불가능하였으나 사육 일자별 생존 유생의 수가 지속 감소하였음에도 불구하고, 채묘 근접 시점인 수정 후 3.0~3.5일에도 형태의 정상성을 보이는 개체들이 다수 확인 가능하였다. 반복구 수조-1의 경우 상층부로부터 수거한 생존 유생 중 정상성을 보이는 개체들의 빈도는 약 85%, 중하층으로부터 수거한 정상 형태의 유생 빈도는 약 63%로 관찰되었다. 반복구 수조-2 역시 수조-1과 크게 다르지 않아서 상층부 및 중하층의 정상 유생의 빈도는 각각 88% 및 67%로 나타났다 [그림 2-1-46]. 부화 유생 단계에서의 유세포분석 결과로부터 배수체 유생의 감소와 관련한 그간의 경향을 고려할 때 본 실험에서 확인된 정상 유생 중 배수체 빈도는 약 1~5% 범위로 추정할 수 있다. 즉시 이용 가능 수조 수의 제한으로 해당 그룹의 채묘 및 부착 유생의 사육은 수행하지 못하였으므로, 배수체(4배체)의 부착 후 지속적인 생산 및 성장에 대한 관찰이 필요하다.



[그림 2-1-46]
4배체 대량처리 그룹의 유생 형태 정상성 평가

2-2. 배수체의 세포유전학적 특징 평가

가. 세포 당 DNA 함량 및 nucleolar organizer region (NOR) 측정

(1) 배수체(3n) 세포 당 DNA content 및 배수성 판정

○ 목적 및 연구범위

- : 유세포 분석법(flow cytometry)은 배수체 판정에 가장 정확하고 신속한 방법론이다. 하지만 사용하는 분석 기기와 샘플 조건에 따라 분석값에 편차가 시료별로 발생한다. 따라서 다양한 시료 조건에서 배수체 분석 시 시료 간 발생하는 편차 구간을 파악하고, 이로부터 배수체 판정 시 인정 가능한 편차 범위를 제시하고자 하였다.
- : 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용한 DNA 함량 세포의 핵 내 핵산 물질을 특이적으로 형광 염색한 후 세포 당 형광의 세기를 측정하는 방법을 기초로 한다. 따라서 삼배체는 이론적으로 배수화(polyploidization)가 되어 이배체 genome 크기의 1.5배에 해당하는 DNA 함량(즉, 반수체 유전물질의 추가)을 보유하게 되고 삼배체 세포 하나당 형광의 강도는 이배체의 1.5배 증가하게 된다.
- : 때문에, 유세포분석 기법을 통해 배수체의 genome size를 측정하는 가장 정확하고 재현성 있는 방법으로 알려져 있으며, 사용 기기의 민감도에 따라 aneuploidy의 검출도 가능하다.
- : 그러나 본 분석법은 DNA 함량과 형광 강도가 정비례(linear scale)하고 그 정비례 증가 값이 유세포 분석기의 detector에서 정확히 반영된다는 전제 조건이 충족되어야 한다. 하지만 세포의 모양, debris 미립자의 통과, 염색의 정도에 따라서 항시 1.5배의 절대적 수치가 측정되지는 않기 때문에 배수체의 DNA 검증을 위해 본 방법을 적용하기 위해서는 사용 분석기에서 세포 당 검출되는 형광의 편차 범위에 대한 인정 범위가 확인되어야 한다.
- : 본 실험에서는 배수체 판정 목적을 위해서 설계된 Ploidy Analyzer 유세포 분석기를 기준으로 이배체와 삼배체의 DNA 함량에 관한 검증 및 편차 범위(배수성 판정 신뢰도)를 파악하고, 이로부터 전복 배수체 판정을 위한 프로토콜 개발에 활용하고자 하였다.

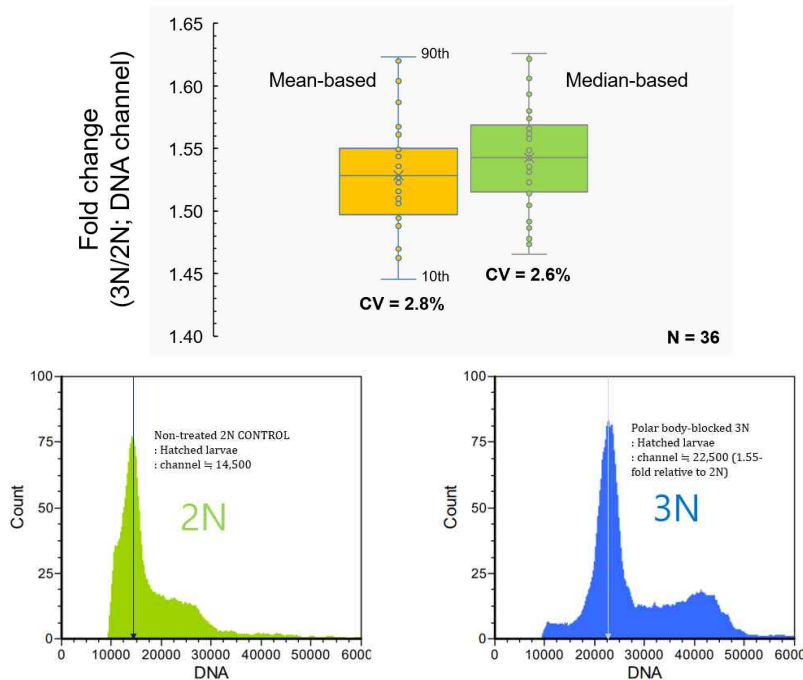
○ 수행 내용 및 방법

- : 1단계 연구를 통해서 전복을 대상으로 유세포분석에 가장 적합한 조직은 외투막의 연체 근육 부위로 확인한 바 있으므로 분석 시료는 모두 외투막 조직만을 이용하여 준비하였다. 아울러 최소 요구 외투막 조직의 크기, 균질화, 완충용액(용량) 그리고 염색 반응(반응 시약, 용량, 반응시간) 역시 1단계 연구를 통해 최적화되어 있으므로 본 연구항목은 모두 이를 준용하여 수행하였다.
- : 이배체 전복 11마리, 삼배체 전복 36마리를 대상으로 외투막 조직을 균질화하여 세포 현탁액을 만들었으며 PI 염색 방법을 이용하여 유세포분석을 수행하였다. DNA 함량검증에 사용한 시약은 Sysmex 社の PI Absolute T kit이며, 분석기기는 Sysmex 社の CyFlow Ploidy Analyzer, Cube-6를 사용하였다. 개체별

시료로부터 형성되는 단일 peak의 histogram을 대상으로 상기 개발사 유세포 분석기에서 제공하는 프로그램을 이용하여 DNA channel의 mean 값과 median 값, 그리고 절대 표준편차 및 CV(%) 값을 구하였다.

○ 이배체 및 삼배체 DNA channel 값 분석 및 배수성 판정

- : 정상 이배체에서 얻어진 raw mean value로 측정할 경우 산술평균은 13230.19 ± 649.41 (기하평균 = 13215.6)의 DNA channel 값을, 그리고 raw median value로 측정할 경우 산술평균은 13154.38 ± 615.83 (기하평균 = 13141.2)로 나타났다. 반면 삼배체의 경우 raw mean data를 기준 시 21294.43 ± 596.73 (기하평균 = 21286.3), 그리고 raw median 값을 기준 시 21333.00 ± 564.75 (기하평균 = 21325.7)로 나타났다.
- : 이배체 평균값에 대한 fold increase를 분석한 결과 mean 기준이 median 기준보다 조금 더 이론값(1.5)에 가깝게 나타났으나 큰 차이는 없었다. 두 기준 모두에서 outlier 없이 10-90 percentile box plot을 얻을 수 있었다[그림 2-2-1].
- : 시료 간 편차를 coefficient variation (% CV)로 평가하였을 때 이배체는 물론 삼배체에서도 모두 5% 미만으로 관찰되어 매우 일양하고 재현성 있는 값이 얻어짐을 알 수 있었다. 따라서 DNA 함량검증을 위한 유세포분석은 1.5-fold로부터 5% 이내의 CV range에 속한다면(이배체 대비 약 1.44-1.62-fold range) euploidy로 3N 판정을 수행해도 무방할 것으로 나타났다.



[그림 2-2-1]

유세포분석을 통한 2배체 대비 3배체의 DNA channel fold의
증가 범위 및 편차 검증

(2) AgNO₃-NOR 특징

○ 목적

: NOR 분석은 고정 세포를 대상으로 인 형성 부위를 간단한 질산은(AgNO₃) 염색을 통해 active NOR의 수를 계수하여 배수성을 판정할 수 있는 간편한 방법으로서 어류 등 척추동물에서 세포 크기 측정과 아울러 간편한 배수성 분석으로 소개된 바 있다. 그러나 무척추동물(연체동물 등)에서는 인위적으로 유도한 배수체의 NOR 표현 특성에 대해서는 많은 자료가 축적되어 있지 않다.

○ 내용 및 방법

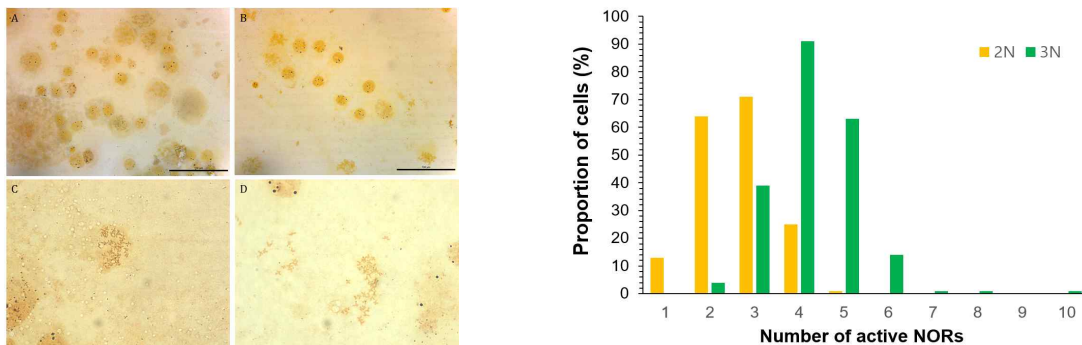
: 이배체 및 삼배체 처리 수정란을 20°C 수온에서 배양한 후 담륜자 단계의 유생을 시료로 사용하였다. 담륜자 단계의 유생이 포함된 해수 현탁액은 여과 해수로 만든 0.1% 콜히친 용액과 1:1로 혼합하였으며, 20°C에서 4시간 동안 배양하였다.

: 콜히친 처리 이후, 여과 해수를 이용하여 콜히친을 세척 하였으며 이후 0.075 M KCl에 상온으로 1시간 반응하였다. Carnoy solution으로 유생을 1시간 동안 고정하였으며, 이때 고정액은 20분 간격으로 교체하였다. 고정된 시료는 4°C 보관하였다.

: 확보된 시료는 슬라이드 글라스에 일정량 올린 후 공기 중에서 말렸으며, colloidal 현상액과 AgNO₃ (silver nitrate)를 1 : 2 비율로 섞어 해당 시료에 올린 후 커버 글라스를 덮었다. 55°C의 hot plate에 해당 슬라이드 글라스를 올리고 약 3분간 반응하였다. 이후 커버 글라스를 제거, 증류수로 시료를 세척 후 현미경으로 검사하여 결과를 확인하였다.

○ 배수체 전복의 Active NOR 수 분포

: Active NOR 수를 분석한 결과 이배체의 세포에서는 1개에서 5개 범위로 NOR 수가 관찰되었고, 삼배체 세포에서는 2개에서 10개로 역시 광범위한 NOR 수가 확인되었다[그림 2-2-2].



[그림 2-2-2]

(좌) 이배체 및 3배체 전복 세포의 Ag-NORs (A, C = 2N; B, D = 3N). Bar = 100 um.

Cells were treated with hypotonic solution (0.075M KCl).

(우) 이배체 및 삼배체 전복 세포의 Ag-NOR 수의 출현 빈도

- : 서로 다른 수의 NOR 을 가지는 세포들의 비율을 분석하기 위해서 이배체 세포 174개 그리고 삼배체 세포 214개를 측정하였다. 이배체에서는 인 형성 부위를 3 개를 가지는 세포는 71개로 전체의 40.8 %로 가장 높은 비율로 확인되었으며, 5개로 가장 많은 개수의 인 형성 부위를 가지는 세포는 1개 확인되었다.
- : 삼배체 세포에서 NOR 부위를 4개 가지고 있는 세포는 91개로 전체의 42.5 %를 차지하였으며 인 형성 부위가 7, 8, 10개를 가지는 세포는 상대적으로 매우 낮은 비율로 나타났다. 따라서 NOR 개수의 경우 이배체 세포와 삼배체 세포 간 차등의 수를 나타내고 있지만, ploidy 그룹 내에서 일정한 active NOR 수를 나타내지 않고 다양한 수를 나타내었다. 때문에, NOR 분석법을 이용할 경우, 해당 개체에서 NOR 수에 관한 정규분포가 얻어질 만큼 충분한 세포 수의 측정을 통해서만 이배체와 삼배체 개체를 정확히 판정할 수 있다. 이에 NOR 분석법이 경제적이고 간편한 방법론을 제공하지만, 배수체의 구분을 정량적으로 하기 위해서는 많은 수의 세포를 대상으로 조사를 해야만 하는 단점이 있고, 따라서 현장 등에서 다량의 개체를 대상으로 신속 정확 분석법으로 이용될 가능성은 작다고 판단되었다.

나. 배수체 전복의 염색체 표본 분석 및 핵형

○ 목적

- : 배수체 종자의 배수성 특징을 세포유전학적 기법들을 이용하여 검증할 수 있는 기술 조건들을 정립하고자 하였다. 염색체 표본을 고효율로 얻을 수 있는 분석 조건을 성체 및 유생을 대상으로 구축하여 배수체 핵형의 특징을 검증하였으며 배수체 전복의 염색체 구성의 정상성을 확인하였다.

(1) 성체 전복 대상 염색체 표본 확보 조건 개발

○ 목적 및 필요성

- : 삼배체 유도는 반수체 염색체 조(chromosome-set)를 부가시킴으로써 3개의 상동염색체를 갖는 개체를 만드는 방법이며, 전통적으로 수산 동물을 대상으로 사용하고 있는 육종법 중 하나이다. 유도된 삼배체의 배수성을 검증하기 위해 본 연구와 같이 유세포분석법을 이용, 세포 당 DNA 함량의 1.5배 증가를 확인하는 것이 일반적으로 인정되는 방법이지만, 식용을 목적으로 인위적으로 유도한 삼배체 상품의 경우, 최종 상품을 대상으로 염색체 구성에 관한 정상성(즉, aneuploidy 등 없이 정확히 3개의 상동염색체를 구성)을 확인하는 것은 필요한 절차이다.
- : 그러나 그 중요성에도 불구하고 전복으로부터 핵형(karyotype)을 분석하는 대부분의 기존 방법들은 왕성한 세포 분열을 보이는 부유 유생을 대상으로 국한되어 있으며, 세포 주기가 상대적으로 늦은 치패 이후의 발달 단계(성체 등)에서는 핵형 분석을 위한 염색체 표본 확보 조건이 거의 전무한 상태이다.

: 때문에, 유도된 삼배체 최종 상품의 세포유전학적 검증 시 핵심 사안인 염색체 핵형 정보 확보가 거의 불가능한 상태였다. 따라서 본 연구에서는 치패기 이후의 전복(성체 등)을 대상으로 조직 배양 방법을 이용, 양질의 핵형 분석을 가능케 하는 염색체 표본 제작 방법을 개발하고, 이를 기반으로 이배체와 삼배체의 핵형 구성을 비교, 유도된 배수체의 염색체 구성의 정상성을 검증하고자 하였다.

○ 연구내용 및 방법

: (대상조직 선정 및 조직 배양) 전복 개체를 희생시키지 않고 조직을 확보 배양에 이용하기 위해서 맨틀(mantle) 일부를 채취하여 조직 배양을 시행하였고, 조직 배양은 다양한 배지 조성을 대상으로 최적의 맨틀 조직 분열이 유도되는 조성을 조사하여 이용하였다. 기본 L15 배지(Leibovitz's L-15 medium) 조성에 fetal bovine serum, hemolymph, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, leukemia inhibitory factor, abalone embryo extract, and medaka embryo extract 등의 첨가 조성물을 구성하여 최적 배지를 결정하였다.

: (조건 정립) 조직 배양으로부터 최적의 염색체 표본 제작 조건을 구축하기 위해 조직 배양 기간(2일 - 22일), 맨틀 채취의 부위(central zone, submarginal zone, marginal zone)을 변수로 다양한 시험평가를 시행하여, 염색체 중기분열상을 나타내는 세포의 비율, 세포 당 염색체 수(modal chromosome number)를 조사하고 전복 크기에 따른 재현성 검증을 수행하였다.

○ 조직 배양 기간 및 대상조직의 선정 결과

: 조직 배양 기간이 6일째까지는 염색체 분열상이 거의 관찰되지 않았으나 10일째부터 증가하기 시작하여 14일째 유의적인 증가가 관찰되어 이후 18일째 및 22일째까지 유사한 빈도로 염색체 분열상의 확보 가능한 것으로 나타나 중기분열상 유도를 위한 전복의 맨틀 조직 배양은 14일이 요구됨을 알 수 있었다.

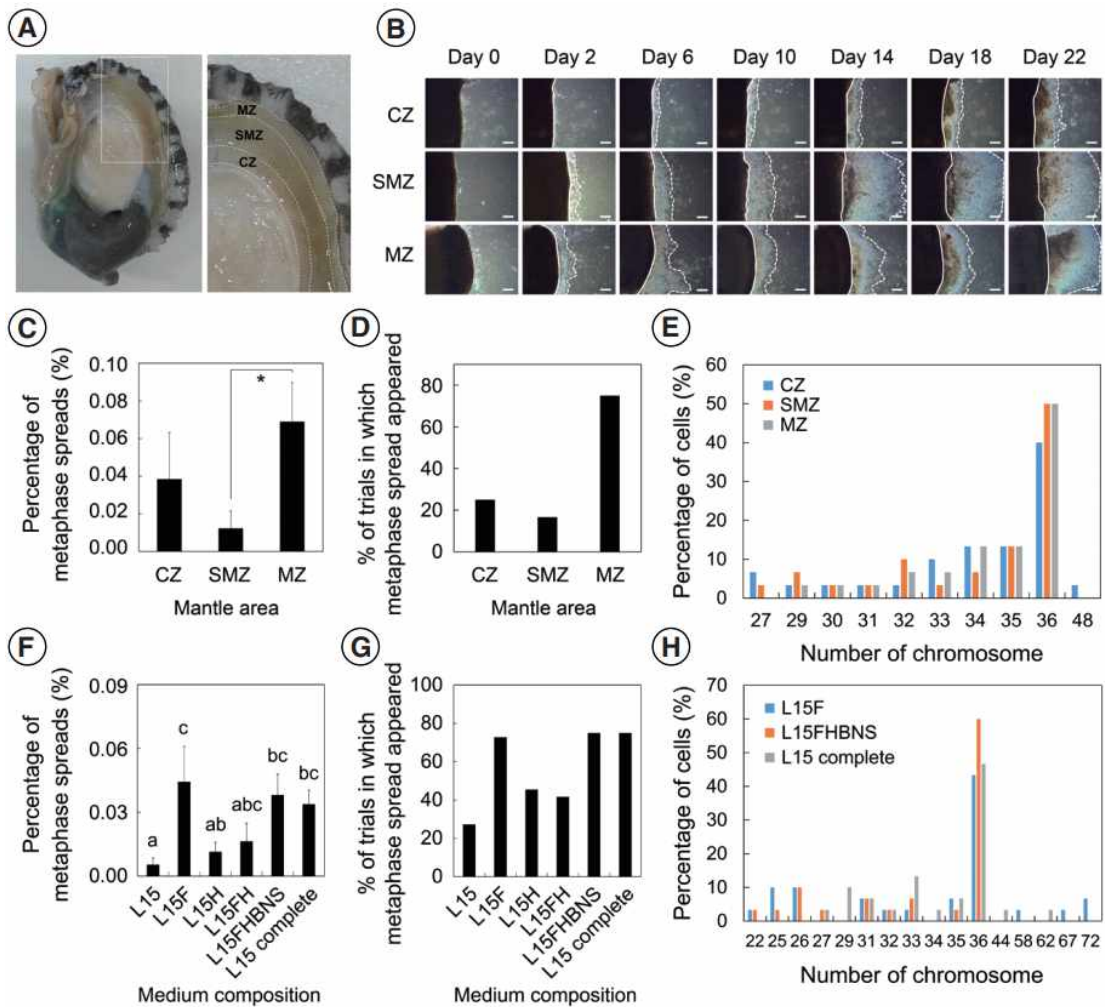
: 조직 배양을 위한 맨틀 조직 채취 위치에 따라서 염색체 중기분열상 확보 효율에 큰 차이가 관찰되었는데 marginal zone에서 채취한 조직이 submarginal zone 및 central zone에서 채취한 조직에 비해 훨씬 활성이 높고, 세포 분열이 왕성하며 염색체 중기분열상 확보가 유리한 것으로 나타났다.

○ 배지 조성의 확인

: 기본 배지를 포함한 모든 배지 조성에서 염색체 표본의 확보는 가능하였으나 기본 배지인 L15보다는 성장 인자 등이 첨가된 배지에서 상대적으로 높은 효율로 염색체 중기분열상 유도가 유리하였다.

○ 개체 크기에 따른 실험 방법 검증 결과

: 종자 치패 크기인 3 g 개체부터 중량이 80 g 이상인 개체까지 개체 크기에 따른 염색체 중기분열상 확보효율을 조사한 결과, 본 개발 조건은 개체 크기와 관계없이 유사한 효율을 보임으로써 다양한 발달 단계에 있는 전복 개체들을 대상으로 염색체 표본 확보가 가능한 것으로 나타났다. 이에 해당하는 결과를 [그림 2-2-3]에 나타내었다.



[그림 2-2-3]

조직 배양을 이용한 성체 전복의 핵형 분석 조건 정립

A) 분석에 이용한 맨틀 조직 영역, B) 맨틀 조직 영역에 따른 배양 효율, C-D) 조직 영역에 따른 중기분열상 빈도, E) 조직 영역에 따른 염색체 중기분열상의 modal number, F-G) 배지에 따른 염색체 중기분열상 빈도, H) 배양 배지에 따른 염색체 중기분열상의 modal number.

(2) 유생 및 성체 배수체의 염색체 표본 및 핵형 분석

○ 목적 및 필요성

- : 포유류나 어류를 비롯한 척추동물의 경우, 일반적으로 직접법 또는 유사 분열 촉진 물질을 사용하는 혈구 세포 배양법을 통해 핵형 분석이 이루어지며, 조직 배양법 또한 활용되고 있지만, 전복류를 비롯한 복족류 생물의 경우, 흔히 사용되는 유사 분열 촉진 물질들의 효과가 아직 명확히 밝혀져 있지 않고, 조직 배양 기술의 발달 또한 부진하므로, 이들의 핵형 분석을 위해 세포 분열이 활발히 일어나는 발생 중의 배아나 유생이 주로 이용되고 있다.
- : 현재 전복류의 핵형 분석에 있어 주로 이용되고 있는 유생은 담륜자 단계의 유생이지만 담륜자 이후 단계의 유생을 핵형 분석에 이용할 수 있을 때 시료 확보의 용이성이 증대될 수 있다.
- : 앞서 전복 성체 외투막 조직을 체외 배양하여 얻어진 배양 세포를 이용하여 전복 성체 유래 핵형 분석 기술을 보편적으로 활용되기 위해서는 기술의 재현성 및 유래된 염색체의 분석을 위한 기반기술이 확보될 필요가 있다.
- : 따라서 담륜자 이후 부유 유생기 단계 유생을 대상으로 핵형 분석을 위한 중기염색체의 확보 가능성을 평가하고 그 효율을 담륜자 유생의 것과 비교하였다. 이때 2배체 및 3배체 유생 모두를 대상으로 평가함으로써 이러한 결과들이 배수체 개체에서 유사하게 적용될 수 있는지를 평가하였다. 또한, 성체 외투막 유래 배양 세포의 핵형분석을 위한 추가적인 2배체 및 3배체의 중기염색체를 확보하고, arm ratio 분석을 통해 확보된 중기염색체의 특성을 분석하였다.

○ 연구 방법

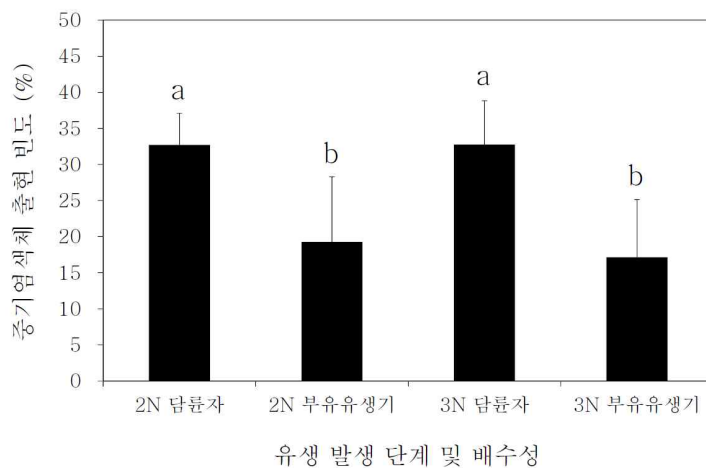
- : (시료 준비) 정상 수정 및 삼배체 처리를 통해 생산된 수정란을 20°C 수온에서 배양한 후 담륜자(trochophore, 수정 후 16~18시간) 및 부유유생기(veliger, 수정 후 20~30시간) 단계 유생을 중기염색체 확보 평가를 위한 시료로 이용하였다.
- : (콜히친, colchicine 처리) 0.22 μm 필터에 해수를 여과한 여과해수에 콜히친을 녹여 0.1% 콜히친 용액을 준비하여 유생 현탁액과 콜히친 용액을 1:1 혼합하여 0.05% 콜히친 용액에서 20°C, 4시간 반응하였다.
- : (저장액 처리) 콜히친 처리가 끝난 유생들을 15 mL 튜브에 옮긴 후, 얼음마취를 실시하고 5 mL 여과해수로 콜히친 성분을 2회 세척하였다. 여과해수 제거 후, 0.075 M KCl 용액 3 mL에 유생을 부유하여 상온 1시간 반응하였다.
- : (고정액 처리) 저장액 제거 후, 냉장 보관된 고정액[Carnoy solution (Acetic acid : Methanol = 1 : 3)] 2 mL로 유생을 부유하여 상온에서 1시간 반응하였고, 이때 20분 간격으로 동일량의 고정액 용액을 교체하였다. 고정액이 처리된 샘플은 핵형분석 이전까지 4°C에서 보관하였다.
- : (핵형 분석) 유생이 고정되어있는 2 mL 고정액에 1 mL acetic acid를 첨가하여

methanol과 acetic acid의 비율을 1:1로 조정하였다. 약 40회의 피펫팅을 약하게 진행하고 3 mL methanol을 첨가하여 다시 고정액과 동일한 비율로 methanol과 acetic acid의 양을 조절한 후, 70% ethanol에서 4°C에 보관된 슬라이드 글라스에 유생 세포가 부유되어 있는 고정액 20 μ L drop을 3번에 걸쳐 떨어뜨렸다. Gurr's buffer (pH 6.8)로 희석된 10% Giemsa 염색액에 상온에서 7분간 염색을 수행하고 1차 증류수로 염색액을 세척 후 상온에서 건조하였다.

- : (중기염색체 발현 비율 확인) Giemsa 염색이 완료된 각 슬라이드 글라스 내에 무작위로 30 부위를 선정하여 200배 배율로 촬영하였다. 중기염색체 상태에 있는 세포수와 그렇지 않은 세포 수를 계수하고 중기염색체 상태의 세포 비율을 측정하였다.
- : (정상성 분석) 실험군 별 계수가 가능한 중기염색체 세포 30개를 선정하여 각 세포의 염색체 수를 계수하고 정상 수의 염색체를 가진 세포의 비율을 측정하였다.

○ 전복의 유생 단계 및 배수성에 따른 중기염색체 확보효율 비교

- : 정상 수정된 이배체 전복 수정란과 삼배체 처리 수정란을 배양하여 담륜자 및 부유유생기 유생들을 수집하였고, 각각의 유생들을 처리하여 중기염색체 확보를 시도하였다.
- : 이배체 유생을 이용하여 실험을 진행하였을 경우, 중기염색체 확보 비율은 담륜자 유생에서는 $32.7 \pm 4.4\%$, 부유 유생기 유생에서는 $19.3 \pm 9.0\%$ 로 확인되었다. 또한 삼배체 처리 유생을 이용하여 실험을 진행하였을 경우, 중기염색체 확보 비율은 담륜자 유생에서는 $32.7 \pm 6.1\%$, 부유 유생기 유생에서는 $17.1 \pm 8.0\%$ 로 확인되었다[그림2-2-4].
- : 통계 분석 결과, 배수성에 관련 없이 담륜자 단계 유생이 부유 유생기 단계 유생보다 중기염색체 출현 빈도가 유의적으로 높은 것으로 확인되었고, 이는 중기염색체 확보에 있어 담륜자를 이용하는 것이 부유 유생기 단계 유생을 이용하는 것보다 효율적임을 나타내었다.



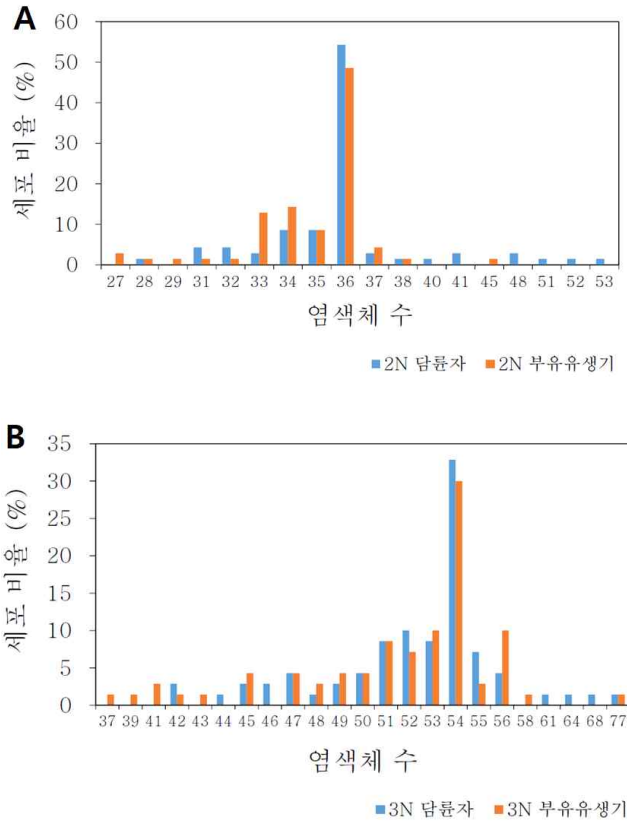
[그림 2-2-4]

참전복 유생의 발생 단계 및 배수성에 따른 중기염색체 출현 빈도

- 전복의 유생 단계 및 배수성에 따른 중기염색체 정상성 비율 비교
 - : 이배체 및 삼배체 처리 담륜자 및 부유 유생기 유생으로부터 확보된 중기염색체 중 각 그룹별 30개씩의 중기염색체를 무작위로 선별하여 염색체 수를 계수하였고, 정상성 비율을 평가하였다.
 - : 그 결과, 이배체에서 36개의 정상 염색체 수를 가진 세포의 비율이 담륜자의 경우 54.3%, 부유유생기의 경우 48.6%로 확인되었다. 삼배체 처리군들에서는 54개의 염색체 수를 가진 세포의 비율이 담륜자 및 부유유생기 각각 32.9%, 30.0%로 확인되었다[그림 2-2-5].
 - : 중기염색체 확보효율과는 달리, 중기염색체 정상성 세포 비율은 유생의 발생 단계에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다. 하지만, 배수성에 따라 이배체는 48.6~54.3%, 삼배체는 30.0~32.9%로 정상성 비율에서 차이를 나타내었다[그림 2-2-6]. 그룹별 정상 개수를 가지는 중기염색체의 대표 사진은 [그림 2-2-7] 및 [그림 2-2-8]에 제시하였다.
- 발생 단계에 따른 유생의 콜히친 감수성 평가
 - : 발생 단계에 따른 염색체 표본 확보효율의 차이에 대한 원인으로 중기염색체 준비과정에서 처리되는 콜히친에 대한 감수성이 유생 발생 단계에 따라 다를 수 있기 때문이라는 점을 고려하여 이배체 및 삼배체 처리 개체의 유생 단계에 따른 콜히친 감수성을 평가하였다.
 - : 그룹별 콜히친 처리된 유생들의 섬모 운동 여부를 콜히친 처리되지 않은 대조군과 비교 평가한 결과, 이배체 담륜자의 경우 대조군 90.8±8.3%, 콜히친 처리군 78.9±10.2%에서 섬모 운동이 관찰되었고, 이배체 부유 유생기의 경우, 대조군 87.1±2.0%, 콜히친 처리군 86.0±5.3%에서 섬모 운동이 확인되었다. 삼배체의 경우, 담륜자에서는 대조군 100%, 콜히친 처리군 90.1±5.3%, 부유 유생기에서는 대조군 91.1±1.1%, 콜히친 처리군 90.0±4.9%에서 유생들의 섬모 운동이 관찰되었다[그림 2-2-9].
 - : 콜히친 처리에 의한 섬모 운동을 나타내는 유생 개체들의 비율이 이배체 및 삼배체 모두에서 유생 발생 단계에 따라 큰 차이를 나타내지 않았으며, 이는 중기염색체 출현 빈도가 콜히친 감수성과는 무관하다는 것을 의미한다.

(2.2) 성체 유래 세포로부터 중기염색체 확보 및 arm ratio 분석

- 연구 방법
 - : (전복 외투막 유래 세포 회수) 전복 성체의 겉 표면을 70% ethanol로 닦아 1차 멸균처리하고 외투막 부위 중 marginal zone을 회수하였다. 회수한 조직은 20 mL의 오염제거용액(0.2 μm 여과해수에 400 U/mL penicillin, 400 μg/mL streptomycin, 250 μg/mL gentamicin, 2 μg/mL amphotericin B, 10 μg/mL phenol red)에 담구어 18°C 배양기에 보관하였다.

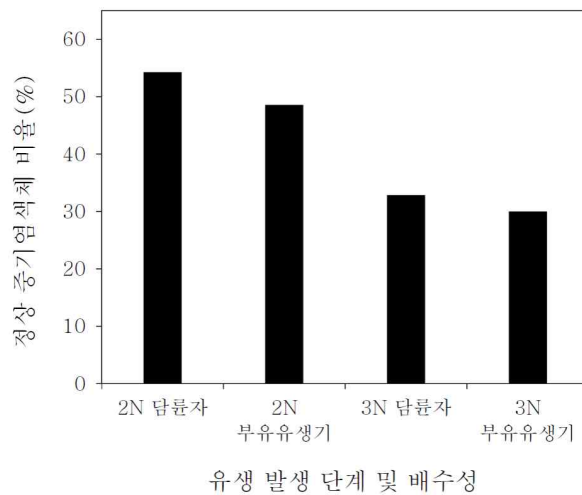


[그림 2-2-5]

참전복 유생의 발생 단계에 따른 중기염색체 정상성 비율

A. 2배체 유생의 중기염색체 정상성 비율

B. 3배체 유생의 중기염색체 정상성 비율



[그림 2-2-6]

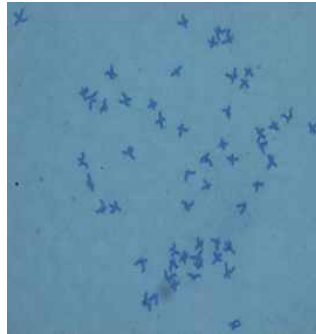
2배체 및 3배체 간 유생 유래 정상 중기염색체 비율 비교

2N
담륵자



2N = 36

3N
담륵자

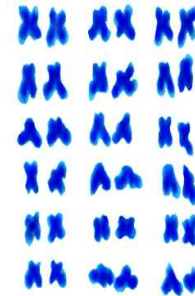


3N = 54

[그림 2-2-7]

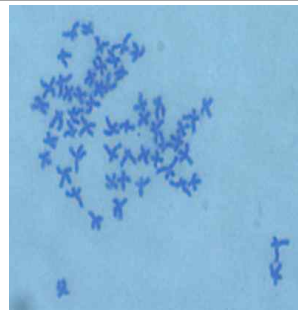
2배체 및 3배체 담륵자 유래 정상 개수를 가지는 중기염색체의 대표 사진

2N
부유유생기



2N = 36

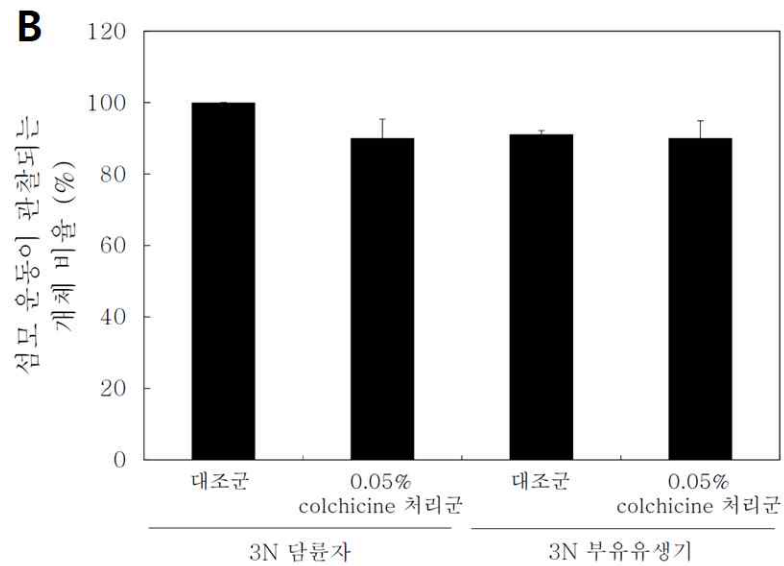
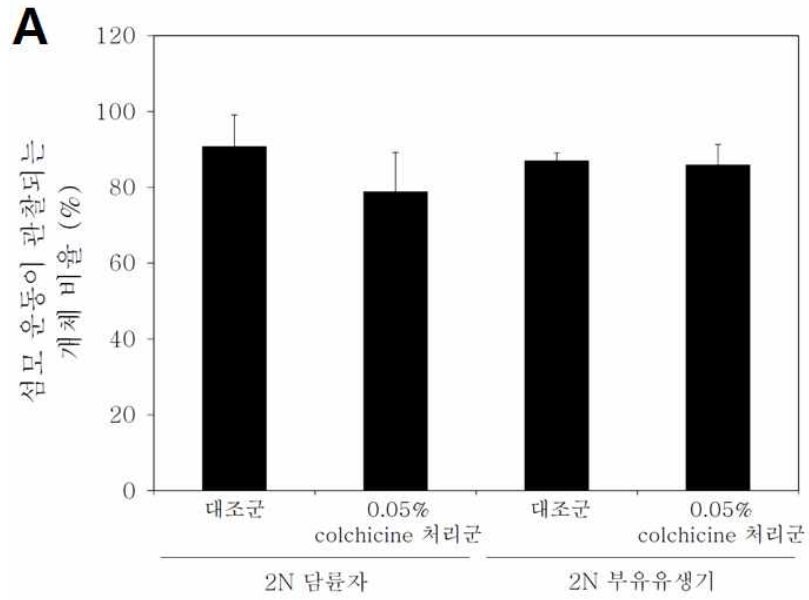
3N
부유유생기



3N = 54

[그림 2-2-8]

2배체 및 3배체 부유유생기 유래 정상 개수를 가지는 중기염색체의 대표 사진



[그림 2-2-9]

전복 유생의 발생 단계에 따른 콜히친 감수성 비교

- A. 전복 2배체 유생의 콜히친 감수성 비교
- B. 전복 3배체 유생의 콜히친 감수성 비교

- : (조직 배양) 배양된 조직을 20 mL 세척액(0.2 μ m 여과해수에 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin)으로 2회 세척 후, 조직을 4 mm² (2mm x 2mm)크기로 자르고 3 mL의 배양배지(Leibovitz's L-15 기초배양배지에 소태아혈청 15% (v/v), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin)가 담긴 16 mL 시험관에 옮겨 배양하였다. 14-22일간 18°C 배양기에서 배양하고 6일마다 배지를 교체하였다.
- : (전복 외투막 유래 세포 고정) 배양이 종료되면 배지 150 μ L을 제거하고 10 mg/mL 농도의 콜히친 150 μ L 첨가하여 18°C 배양기에서 4시간 반응한다. 배양배지와 전복 조직 조각을 15 mL 튜브에 옮기고 1,500 rpm 조건에서 4분간 원심분리한다. 상층액 제거 후 저장액(0.075 M KCl) 6 mL 첨가하여 25°C 조건에서 45분간 반응하고, 이때 15분 간격으로 피펫팅 수행하였다. 냉장된 고정액 (methanol 75% (v/v), acetic acid 25% (v/v)) 6 mL을 첨가하고, 튜브를 부드럽게 위아래로 뒤집어 섞은 후 최소 10분간 얼음에서 반응 후, 1,500 rpm 조건에서 4분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 6 mL의 고정액 첨가 후 얼음에서 30분간 반응하였다. 반응 종료 다시 1,500 rpm 조건에서 4분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 6 mL의 고정액 첨가 후 얼음에서 30분간 반응하는 과정을 2회 반복하였다.
- : (고정된 전복 외투막 유래 세포 회수) 1,500 rpm 조건에서 4분간 원심분리 후 고정액 제거하고 50% acetic acid 1 mL 처리 후 25°C 배양기에 2분간 반응하였다. wide bore 팁으로 피펫팅을 실시하여, 전복 조직으로부터 세포 분리시켰다. 분리된 세포가 담긴 고정액을 새 15 mL 튜브에 옮기고 normal 팁으로 피펫팅하여 단일 세포로 분리하였다.
- : (핵형슬라이드 제작 및 염색) 1,500 rpm 조건에서 4분간 원심분리 후 고정액을 제거하고, 20-30 μ L 고정액으로 부유시켰다. 에탄올에 냉장 보관된 깨끗한 슬라이드 글라스(10분간 acetic acid 처리)를 꺼내고 휴지로 에탄올을 닦아서 제거하고, 최소 15 cm 이상 높이에서 세포 부유액 10-15 μ L를 준비된 슬라이드 글라스에 떨어뜨렸다. 60°C 건조기에 슬라이드 글라스를 건조하고 25°C에서 염색액으로 7분간 염색, 증류수로 염색약을 씻어내고 공기 중에서 완전 건조 후 현미경으로 중기염색체 검경하였다.
- : (전복 핵형 arm ratio 측정) 전복 핵형(2n=36)의 상동염색체는 Karyotype analysis 2.0 version 프로그램에서 제공하는 방식을 이용해 결정하였다. 염색체의 동원체를 기준으로 arm의 길이를 측정하였을 때, 긴 쪽을 long arm으로 짧은 쪽을 short arm으로 하여 arm ratio는 long arm의 길이를 short arm의 길이로 나누어 값을 구하였고, [표 2-2-1]에 제시된 기준에 따라 염색체형을 결정하였다.

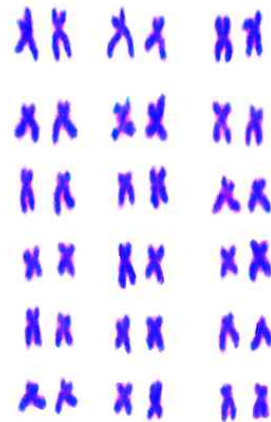
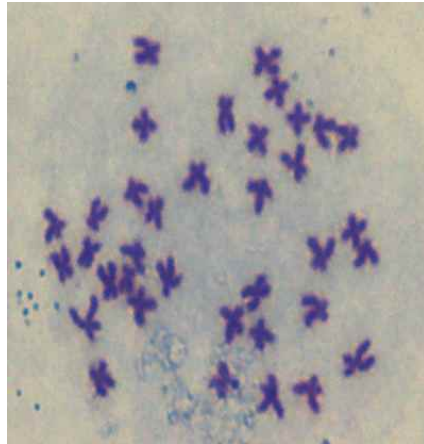
○ 성체 유래 세포로부터 중기염색체 확보 결과

: 성체 외투막 조직 배양을 통해 유래된 배양 세포를 이용하여 핵형 분석을 수행하였고, 이배체 및 삼배체 각각에서 36개 및 54개의 정상 염색체 수를 가지는 euploidy 중기염색체를 확보할 수 있었다. [그림 2-2-10, 11].

[표 2-2-1] Arm ratio에 따른 동원체 위치 및 염색체 유형

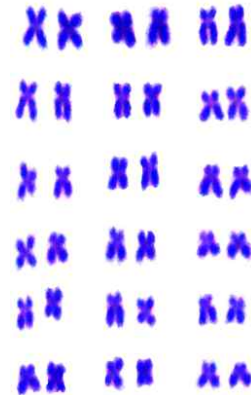
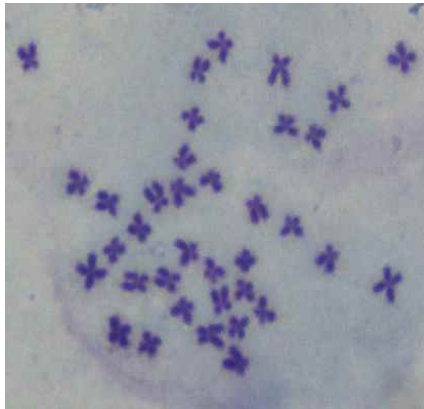
Arm ratio	Centromeric Position	Chromosome Terminology
1.0	Median point	M (metacentric)
1.0 - 1.7	Median point	M (metacentric)
1.7 - 3.0	Submedian region	Sm (submetacentric)
3.0 - 7.0	Subterminal range	St (subacrocentric)
7.0 - ∞	Terminal region	t (acrocentric)
∞	Terminal point	T (telocentric)

2N 성체
외투막 세포 1



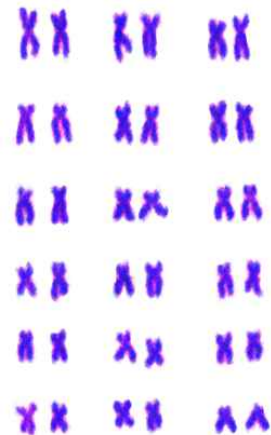
2N = 36

2N 성체
외투막 세포 2



2N = 36

2N 성체
외투막 세포 3

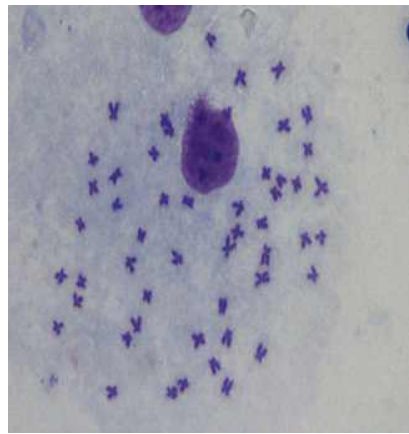


2N = 36

[그림 2-2-10]

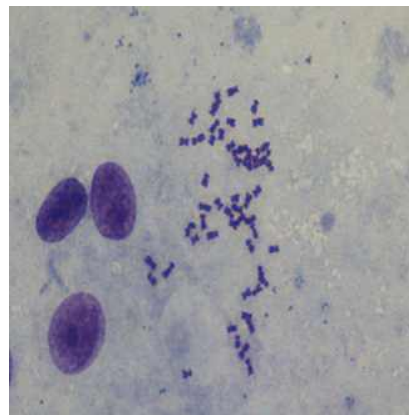
2배체 전복 성체 외투막 세포 유래 증기염색체의 대표 사진들

3N 성체
외투막 세포 1



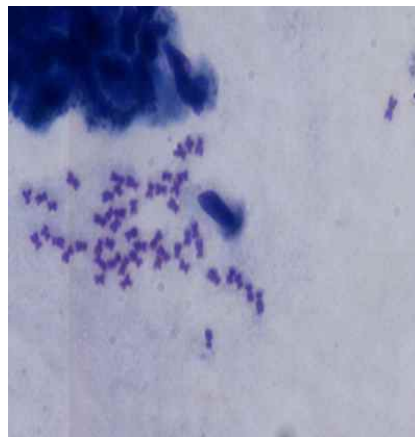
3N = 54

3N 성체
외투막 세포 2



3N = 54

3N 성체
외투막 세포 3



3N = 54

[그림 2-2-11]

3배체 전복 성체 외투막 세포 유래 중기염색체의 대표 사진들

○ Arm ratio 분석 결과

- : 이배체 전복 성체의 외투막 조직 배양으로부터 유래된 배양 세포의 핵형 분석을 통해 중기염색체를 확보하였고, 염색체들의 arm ratio를 측정하였다. [표 2-2-2]에 제시된 바와 같은 arm ratio 값들을 확보할 수 있었고, [표 2-2-1]에 제시된 기준에 따라 각 중기염색체(세포)에 존재하는 염색체들의 염색체 유형 별 개수를 측정하였다[표 2-2-2].
- : 결과적으로, 총 5개의 염색체형 조합이 확인되었고, 그중 10개 metacentric 염색체와 8개의 submetacentric 염색체로 구성된 중기염색체(세포)의 수가 14개 (70%)로 가장 높은 비율을 나타내었다. 본 염색체 핵형 분석 조건을 토대로 삼배체 상품의 염색체 구성에 관한 정상성을 검증할 수 있었고, 특히 개체를 희생시키지 않고 살려둔 채로 분석 검증이 가능하며, 유세포분석 자료와 정확히 일치하는 배수성을 확인할 수 있었다.

[표 2-2-2] 전복(*Haliotis discus hanna*) 성체 외투막 유래 배양 세포의 arm ratio 분석

염색체 번호	분석된 중기염색체(세포) 번호																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	21
1	1.36	1.31	1.80	1.07	1.36	2.48	1.04	1.57	1.83	1.65	1.18	1.18	1.33	1.19	1.81	1.89	1.36	1.48	1.29	1.44
2	2.10	1.83	1.27	1.30	2.47	1.16	2.07	1.31	1.35	1.18	1.64	1.83	1.71	2.08	1.07	1.07	1.86	1.17	1.06	1.89
3	1.32	1.59	1.69	1.94	1.39	1.42	2.38	1.95	1.18	1.96	1.38	2.14	1.72	1.12	1.51	2.79	1.24	2.15	1.62	1.41
4	1.12	1.16	1.87	1.83	1.65	1.68	1.31	1.57	1.15	1.36	2.60	2.62	2.36	1.65	1.37	2.11	1.99	2.22	2.16	2.64
5	1.97	2.06	1.47	1.72	2.69	2.26	1.44	2.29	1.86	1.18	1.22	1.30	2.55	2.22	1.93	1.56	2.29	1.59	1.95	1.29
6	2.26	1.95	2.29	1.48	1.35	1.57	1.10	1.44	2.11	2.19	1.86	1.25	2.05	2.72	1.65	1.32	1.63	2.08	2.22	2.55
7	1.78	1.34	1.24	1.32	2.31	1.99	2.02	1.78	2.48	1.82	2.48	1.74	1.24	1.98	2.13	1.59	1.42	1.33	1.55	1.21
8	2.92	1.70	1.77	2.03	1.80	1.28	2.25	1.37	1.74	1.30	1.31	1.86	1.75	1.47	1.30	1.86	2.58	2.69	2.00	2.15
9	1.42	2.48	1.07	1.93	2.08	2.15	1.82	2.22	1.42	2.09	2.01	2.44	1.63	1.76	2.64	1.14	1.60	1.09	2.74	1.84
10	2.07	1.45	1.27	1.40	2.48	1.84	2.00	1.91	2.09	1.45	2.27	1.91	2.04	1.51	1.99	1.76	1.90	1.61	1.14	1.65
11	1.02	2.22	2.16	1.13	1.41	1.99	1.60	1.08	1.31	2.91	1.24	1.34	1.78	1.83	2.10	2.08	1.46	1.75	2.03	1.05
12	1.66	1.10	1.03	1.31	1.53	1.87	1.16	1.78	1.20	1.28	1.95	1.77	1.40	2.35	1.37	1.45	1.63	1.14	2.45	1.11
13	1.80	1.83	2.54	1.19	1.65	1.40	1.37	1.46	1.42	1.56	1.78	1.13	1.24	1.17	1.65	1.14	1.07	2.18	1.46	2.80
14	1.16	1.51	2.04	1.54	1.64	1.08	2.49	1.30	2.14	2.48	1.09	1.50	1.49	1.45	1.02	1.81	2.03	1.29	1.67	1.20
15	2.18	1.25	1.49	1.30	1.18	2.60	1.27	1.04	1.76	1.30	1.39	1.11	2.47	1.51	2.28	1.53	1.22	1.44	2.42	1.90
16	1.35	1.95	1.34	2.07	2.42	1.26	1.75	2.45	1.20	2.16	1.69	1.71	1.28	1.25	1.29	1.42	2.26	2.18	1.57	1.36
17	1.17	1.10	1.06	1.09	1.39	1.59	1.17	1.18	1.42	1.56	1.48	1.27	1.60	1.98	1.87	1.11	1.83	2.09	1.15	2.18
18	1.17	1.85	2.20	1.45	2.14	1.39	1.50	1.85	1.10	1.18	1.24	1.97	1.19	1.40	1.05	2.05	1.26	1.13	1.74	1.29

2-3. 배수체 전복의 발생·성장 단계별 전사체 발현 DB의 체계화

○ 필요성

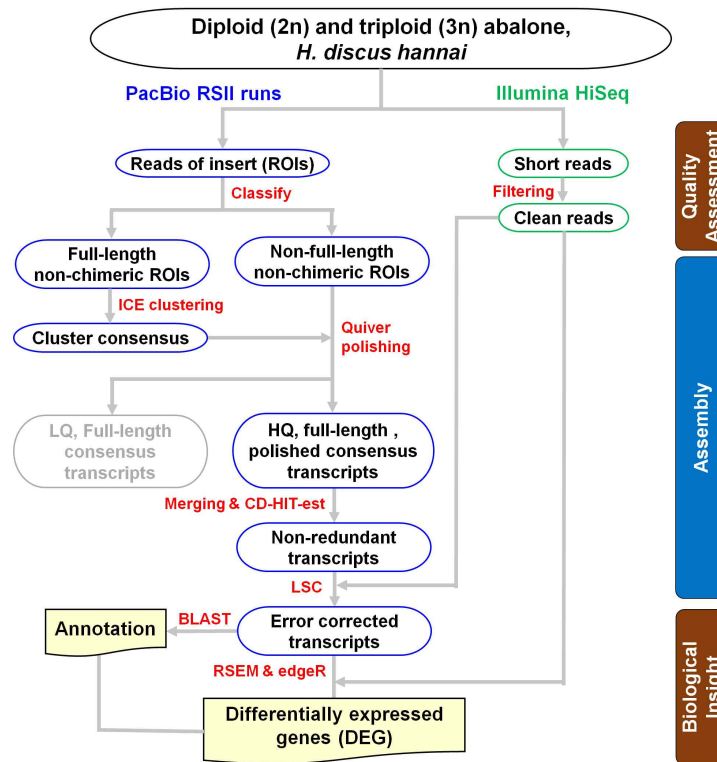
- : 유도된 3배체는 genome size 및 세포 크기 증가로 인해(nuclear-cytoplasmic index) 의도된 목적 형질(생식기능 감소)이외에 비의도적인 생리 형질의 변화(세포 수, 세포 분열 주기, 성장, 호흡 등)가 수반될 가능성이 높고, 이러한 생리 형질의 변화는 양식 환경에서 환경변화(수온, 수질, 용존산소, 병원체 감염 등)에 이배체와 3배체가 서로 다른 생리반응을 나타낼 가능성이 높다.
- : 뿐만 아니라 이러한 차등 반응은 전복의 발달, 성장 단계에 따라 서로 다르게 표현될 가능성이 높으므로 3배체의 생리특성을 규정하기 위해서는 다양한 생물 단계에서의 분석 자료를 기반으로 실시해야 한다.
- : 1단계 연구를 통해서 전복 3배체 및 2배체 시료를 대상으로 전사체 염기서열 자료의 확보가 추진되어, 3배체와 2배체 간 차등 발현 유전자들이 1차 탐색이 수행된 바 있음. 그러나 1단계 연구기간 내 3배체 유도 조건의 최적화 및 배수체 대량 처리가 가능한 기술이 1단계 중후반부에 완성됨에 따라, 생식 연령을 포함한 전 생활사(> 3년)에 해당하는 발현유전자 소재의 확보가 매우 제한적일 수 밖에 없었다.
- : 때문에 다양한 발달(성장) 단계에서 3배체와 2배체간 차등성(형질 및 유전자 차등발현)에 관한 분석은 2단계 3배체 배수체 전복의 종자 특성(유전학적 및 생리적 특성) 조사를 통해서 완성도 높은 평가가 필요한 상태이다.
- : 2단계에 진입하여 연차별로 배수체 대량 처리 및 종자 생산이 성공적으로 이루어짐에 따라 1단계 후반부에 이어서 배수체 year-class 집단이 연속적으로 확보됨에 따라 다양한 발달 단계의 배수체 시료와 동일 환경에서 사육된 이배체 시료의 확보가 용이해졌음은 물론, 서로 다른 양식 환경을 반영하는 조건에서 사육된 다양한 배수체 집단 역시 확보됨에 따라 환경 특성 별 배수체의 생리 특성 조사 역시 가능할 것으로 기대된다.
- : 이에 앞으로 계획되어 있는 2배체와 3배체 간 차등 및 동등형질의 본격적인 탐색 및 조사를 신속하게 추진하기 위해서는 종래 전사체 정보의 부족분을 보완하고, 다양한 생물단계에서의 특성 조사가 가능할 수 있도록 생물 단계별 배수체 전사체의 platform DB를 구축하는 것이 중요시 된다.

○ 목적

- : 유도된 3배체 전복 종자의 완성도 높은 전사체 DB 구축 및 이배체 및 배수체 차등발현 유전자 발굴 등의 유전학적 특성 분석을 통하여 3배체 종자에 특화된 양식 관리 매뉴얼 수립 및 국내·외 배수체 종자 산업화 상품의 상세 설명을 위한 과학적 자료를 제공하고자 한다.

○ 연구수행 범위

- : 3배체 참전복의 체계적인 생물학적 특성(배수체의 발생, 발달, 경제형질, 기타 차등 생리특성, 생식형질 등)분석을 위하여 그간 확보한 염기서열들 자료를 재분류하고, 부족한 전사체 발현자료는 NGS기반 전사체 분석을 추가적으로 수행함으로써 DB를 보완 확립한다.
- : 2배체 및 3배체 참전복으로부터 3세대 NGS 원자료를 확보하고, 기 확보 되어있는 2세대 조직별 NGS 데이터를 이용한 서열오류보정 등을 포함하는 하이브리드 방법으로 완성도 높은 하나의 전장 참조 전사체 (full-length reference transcriptome) 염기서열 DB를 구축한다[그림 2-3-1].
- : 구축된 전장 참조 전사체 DB를 바탕으로 3배체 전복의 생물학적 특성 분석을 위해 참전복의 생활사에 따라 발생단계별(상실배, 담륜자, 피면자), 성장단계별(8개월 치패, 16개월 생식소 미성숙 중패, 24개월 생식소 성숙 성패 암컷 및 수컷) 등으로 5그룹으로 나누어 시료 확보 및 발현 정보자료 DB를 재구성 및 보완한다.
- : 참조 전사체 염기서열 및 차등 발현 전사체의 실험적 검증을 통해 NGS분석 데이터의 신뢰성을 검증한다.



[그림 2-3-1]

배수체 참전복의 전사체 분석을 위한 완성도 높은 전장참조전사체(full-length reference transcriptome) DB 확립방법

가. 2배체 및 3배체 전복의 참조 전장 전사체(full-length reference transcriptome) 데이터베이스(DB) 구축

(1) Pac-Bio Iso-seq 분석

○ Iso-seq sequencing 라이브러리 제작

- : 16개월 된 2배체 및 3배체 참전복으로부터 총 8개의 조직(eye, gill, gut, heart, hemocyte, hepatopancreas, muscle, tentacle)에서 homogenization 및 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 이후 RNeasy plus mini kit (Qiagen)와 RNase free DNase (Qiagen) 처리를 통하여 total RNA 순수분리를 실시하였다. RNA의 양적 및 질적 평가는 흡광도 측정결과와 28S rRNA: 18S rRNA ratio를 평가하여 검증, Agilent 2100 Bioanalyzer를 이용하여 RNA integrity number (RIN) 7.0 이상을 NGS분석(PacBio Iso-seq 및 Illumina RNA-seq)에 사용하였다.
- : PacBio Iso-seq은 short reads 분석에서 필요한 assembly 과정 없이 5' 말단에서 3' 말단을 포함하는 전장 전사체 (full-length transcripts) 서열분석법으로 *de novo* assembly 과정 없이 다양한 전사체분석의 활용이 가능하다.
- : 2배체 및 3배체 참전복의 SMRT(single-molecule, real-time) 라이브러리는 8개의 조직에서 추출된 total RNA를 합하여 Isoform sequencing protocol에 따라 “clonetech SMRTer PCR cDNA synthesis kit”와 “BluePippin size selection system protocol”에 따라 제작하였다.

○ Iso-seq sequencing and ROIs (reads of insert) clustering

- : 제작된 라이브러리들은 PacBio RSII platform을 사용하여 1-2kb(2 cell), 2-3kb(3 cell), 3-6kb(3 cell)의 사이즈별로 서열 분석하였다[표 2-3-1].
- : Iso-Seq ROIs (reads of insert)은 5' 및 3' 프라이머 및 poly-A tail의 검출유무에 따라 분류하였으며 결과 분석의 예시로 3배체 ROIs 분류 히스토그램을 [그림 2-3-2]에 나타내었으며, [표 2-3-1]에 결과를 요약하였다.
- : 분류된 FLNC 및 nFLNC의 clustering은 ICE와 Quiver algorithm을 사용하여 정확도 99% 이상의 isoform을 HQ (high-quality) consensus isoform으로 나머지를 LQ (low-quality) consensus isoform으로 분류하였다[표 2-3-1]. 최종적으로 2배체 참전복으로부터 62,440개의 HQ isoform과 3배체 참전복으로부터 67,694개의 HQ isoform 서열을 얻었다.
- : 2배체 및 3배체 참전복으로부터 얻은 각각의 HQ isoform 서열들은 병합하여 총 130,134개의 isoform 서열의 기초 reference transcriptome을 얻었다. 이 기초 DB는 CD-HIT-EST 프로그램으로 필요 없는 서열을 제거하여 108,203개의 병합된 non-redundant isoform들의 서열을 얻었다.

(2) Illumina RNA-seq 분석

○ Illumina RNA-seq 라이브러리 제작 및 서열분석

- ： 라이브러리 제작을 위해 eye를 제외한 각각의 2배체, 3배체 참전복 6개의 조직으로부터 추출된 total RNA 500ng은 Illumina사의 “TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit”를 사용하여 총 12개의 cDNA 라이브러리들을 각각 제작하였으며, Illumina HiSeq 2500 플랫폼으로 paired-end(2 x 100 bp) 서열 분석을 하였다[표 2-3-2].

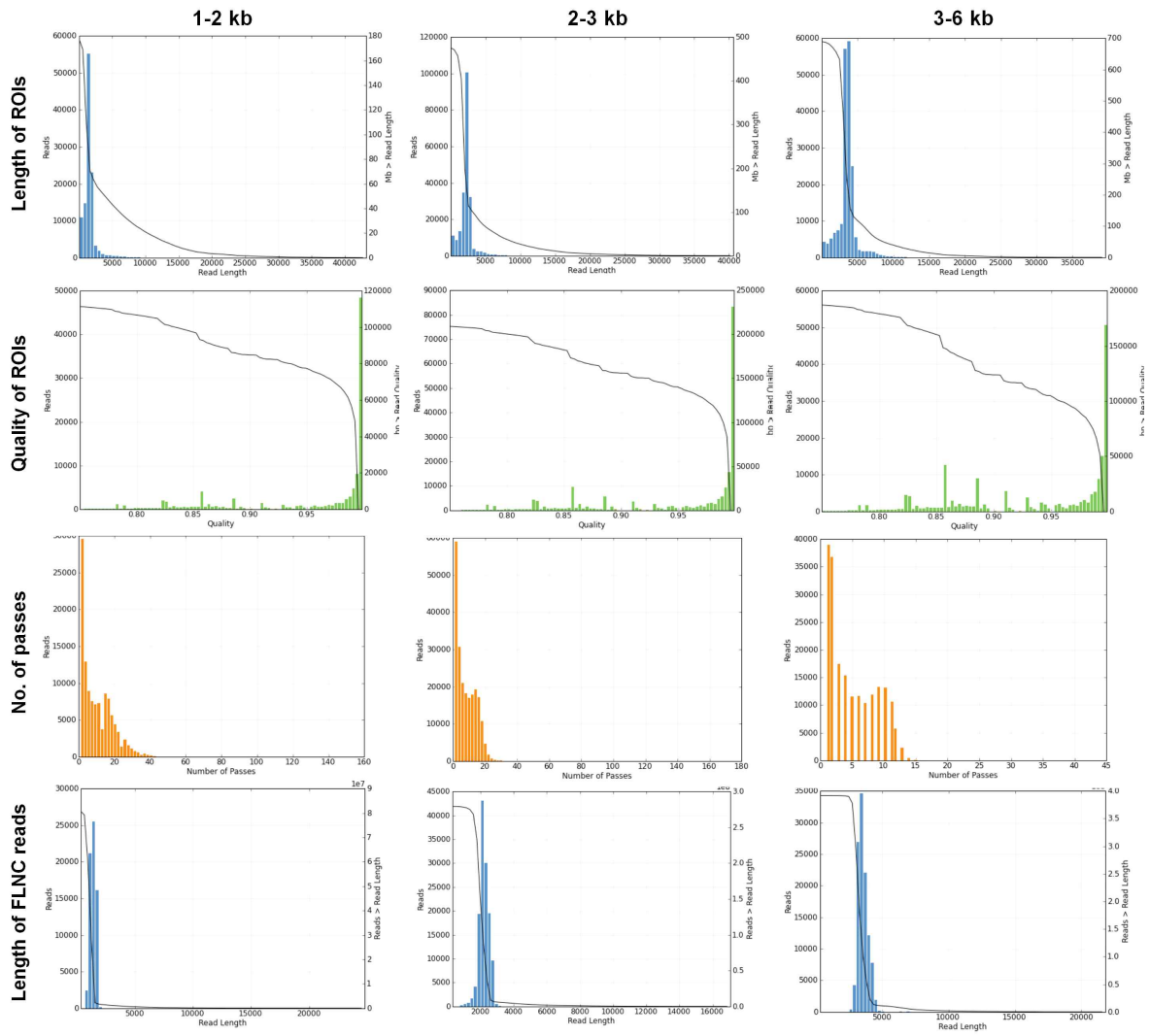
(3) PacBio Iso-seq의 non-redundant isoform 서열들의 교정 (Error-correction)

- 2배체 및 3배체 참전복 차등발현전사체 분석을 위한 보다 정확도 높은 하나의 reference transcriptome 서열을 얻기 위해, Illumina HiSeq을 통해 얻은 short read 염기서열로 LCS tool을 사용하여 PacBio Iso-Seq의 non-redundant long-read isoform들의 서열을 교정하였다.
- 서열교정결과 최종적으로 108,182개의 2배체 및 3배체 차등발현 전사체 분석을 위한 전장참조전사체(full-length reference transcriptome)의 서열을 얻을 수 있다.

[표 2-3-1] 참전복 reference transcriptome 구축을 위한 PacBio Iso-seq 결과 요약

	2배체			3배체		
	1-2kb	2-3kb	3-6kb	1-2kb	2-3kb	3-6kb
Sequencing						
No. ROIs ^a	150,426	209,542	153,653	118,021	222,151	201,667
Total ROIs bases	234,507,456	507,079,656	520,969,192	207,509,911	528,279,396	2,211,439,330
Mean ROIs length	1,555	2,421	3389	1723	2373	3657
Mean ROIs quality	0.95	0.94	0.93	0.95	0.94	0.93
Mean No. of passes	11.8	7.2	4.8	10.8	7.9	5.1
Classification						
No. ROIs ^a	150,426	209,542	153,653	118,021	222,151	201,667
No. 5' reads	102,870	141,249	108,304	83,566	159,490	142,331
No. 3' reads	109,024	151,968	112,293	86,487	166,194	146,149
No. poly-A reads	102,110	148,184	109,055	80,415	161,857	142,715
No. filtered short read	10,672	9,181	2,899	8,367	8,596	3,230
No. nFL ^b	56,916	83,993	65,187	42,057	80,421	84,836
No. FL	82,838	116,368	85,567	67,597	133,134	113,601
No. FLNC ^c	81,924	115,722	85,121	66,313	132,157	113,017
Mean length of FLNC	1,275	2,291	3,387	1,360	2,213	3,596
Clustering						
	2배체			3배체		
No. FLNC	282,767			311,487		
No. consensus isoform	116,897			124,620		
Mean length of consensus isoform	2,525			2,525		
No. polished HQ ^d	62,626			67,901		
No. polished LQ ^e	54,271			56,719		
No. PCR chimera in HQ	186			207		

^areads of insert; ^bnon-full-length read; ^cfull-length non-chimeric read; ^dhigh-quality isoform; ^elow-quality isoform



[그림 2-3-2]

3배체 Iso-seq ROIs들의 분류결과 히스토그램 예시

(4) 2배체 및 3배체 참조전사체 reference transcriptome의 완성도 분석

- 얻어진 2배체, 3배체 참조전사체 reference transcriptome은 Eukaryote (eukaryote_odb9) 및 Metazoa(metazoa_odb9)를 포함하는 두 개의 gene data set DB에 대해 Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs v3.0.2 software (BUSCO, <http://busco.ezlab.org/>)를 사용하여 완성도를 조사하였다. 또한 Illumina RNA-Seq으로부터 얻은 read들을 reference transcriptome에 mapping하였다.
- 얻어진 전사체 참조전사체는 진핵생물 82.5%, 후생생물 78.4%로 비교적 높은 BUSCOs 비율을 나타내었으며[표 2-3-2], 각각의 2배체, 3배체의 6개 조직으로부터 얻은 read sequence들의 매핑을 역시 75.9%에서 82.6% 수준의 높은 매핑율을 나타내었다[표 2-3-3].
- 이러한 결과는 2배체, 3배체 참조전사체 reference transcriptome이 높은 완성도를 확립하였으며, 이후 수행하는 기능적 annotation 및 차등발현전사체 분석의 유의미한 결과를 도출할 수 있음을 나타낸다.
- 확보된 2배체, 3배체 reference transcriptome은 local DB로 구축하여 다양한 분석이 가능토록 하였다.

(5) Reference transcriptome의 NCBI DB annotation

- 2배체 및 3배체 참조전사체의 reference transcriptome을 NCBI non-redundant (NR) DB에 Blastx하여 서열들을 e-value 컷-오프 $1.0E \times 10^{-6}$ 값으로 annotation하였다. 총 60,069개의 isoform 서열이 하나 이상의 Blastx hit를 가지며 평균 29~100%의 유사성을 나타내었다[그림 2-3-3A].
- Annotation된 서열의 생물종 분포분석결과 해양복족류인 자이언트샷갯조개 (*Lottia gigantea*)의 유전자과 가장 많은 수의 서열이, 그 다음으로 참굴 (*Crassostrea gigas*), 군소(*Aplysia californica*), 디스크전복 (*Haliotis discus*)의 순으로 분포되어 있었다[그림 2-3-3B].

(6) Reference transcriptome의 유전자 온톨로지(gene ontology, GO) 분석

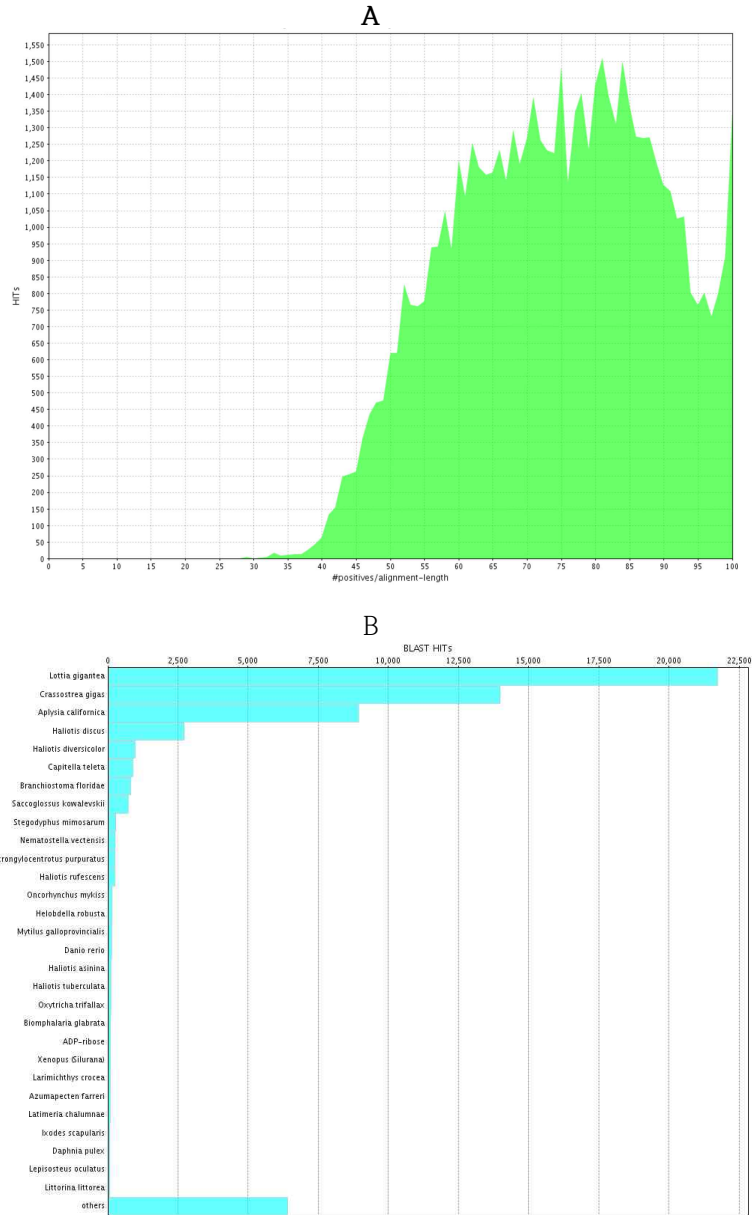
- 유전자의 온톨로지는 분석은 관심 있는 유전자의 기능분석 및 질병 연관성의 해석에 기여를 하고 있으며, 생물학적 대사 과정에서의 역할에 따라 구분한 생명대사(biological process, BP), 생화학적 수준에서의 생산물에 따른 분자 수준에서의 기능(molecular function, MF), 세포 내 존재 위치에 따른 구분한 세포의 구성요소(cellular component, CC)의 세 개의 주된 카테고리 분류할 수 있다.
- 따라서 2배체, 3배체 참조전사체 reference transcriptome의 서열은 Blast2GO program을 사용하여 유전자 온톨로지 분석을 레벨3 단계에서 분석하였다.

[표 2-3-2] 2배체, 3배체 참전복 reference transcriptome의 BUSCO 완성도 분석

Completeness assessment (BUSCO v3.0.2)		
BUSCOs	Eukaryote_odb9	Metazoa
No. of complete (%)	250 (82.5)	767 (78.4)
No. of complete and single-copy (%)	87 (28.7)	279 (28.5)
No. of complete and duplicated (%)	163 (53.8)	488 (49.9)
No. of fragmented (%)	16 (5.3)	38 (3.9)
No. of missing (%)	37 (12.2)	173 (17.7)
No. of genes assessed	303 (100)	978 (100)

[표 2-3-3] 전복 reference transcriptome 구축을 위한 Illumina RNA-seq 결과 및 매핑을 분석

Sequencing						
Total No. of raw read						
Tissue	Gill	Gut	Heart	Hemocyte	Hepatopancreas	Muscle
2배체	27,427,327	29,448,828	34,811,789	29,462,075	26,114,543	30,699,007
3배체	26,126,500	29,872,048	29,037,209	35,209,574	28,236,537	32,912,477
Read mapping (%)						
2배체	75.9	82.6	80.0	80.6	78.3	81.2
3배체	76.5	81.7	81.3	81.8	76.4	79.1



[그림 2-3-3]

2배체, 3배체 참전복 reference transcriptome의 annotation.

A. Best Blastx hit 서열에 대한 유사성 분포 히스토그램,

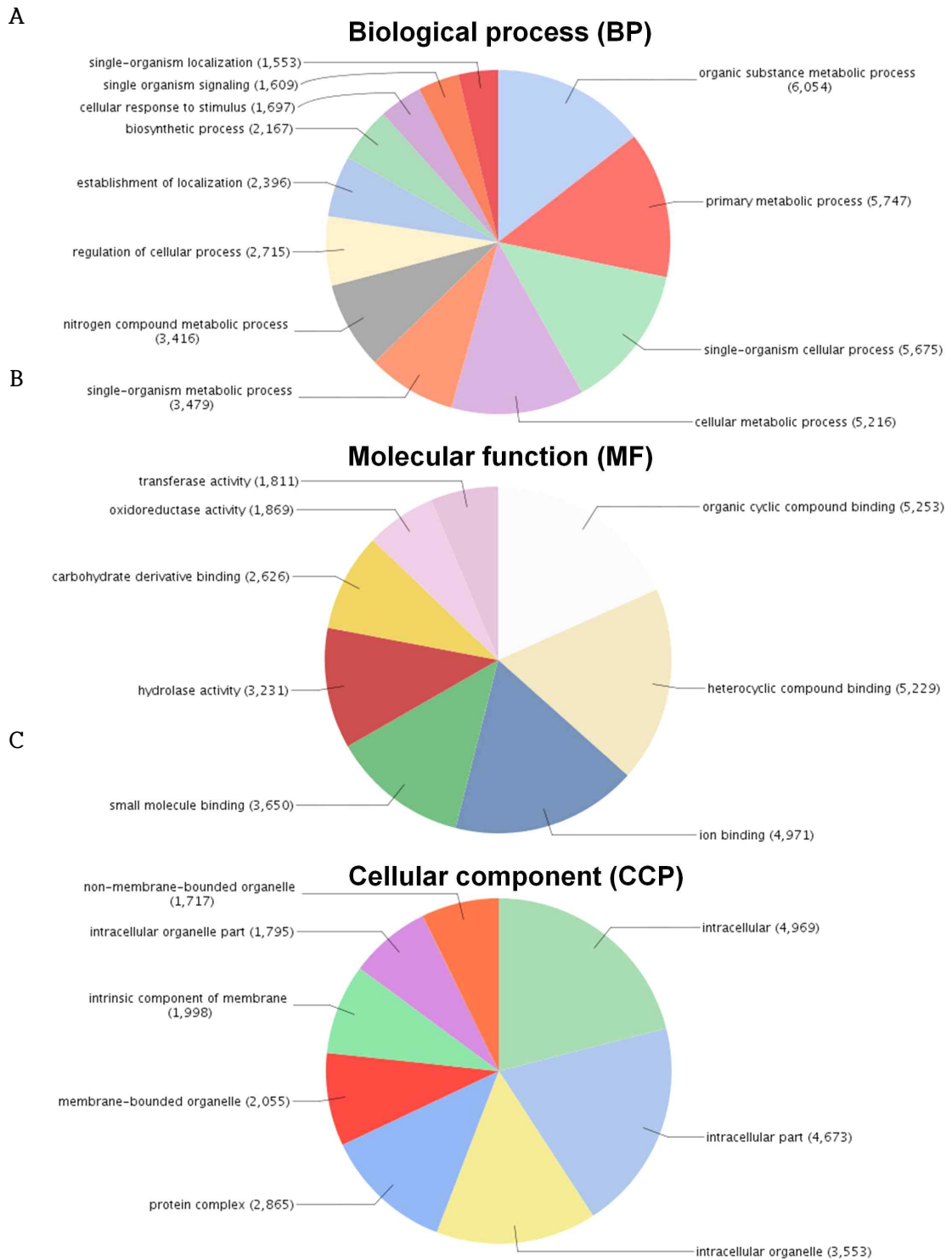
B. Blastx hit 종분포 히스토그램

- BP 카테고리: reference transcriptome은 organic substance metabolic process항(6,054 전사체)에 가장 많은 수의 전사체들이 연관되어 있으며, 이어서 primary metabolic process항(5,747 전사체), single-organism cellular process항(5,675 전사체), cellular metabolic process항(5,216 전사체) 등의 순서로 분류되었다[그림 2-3-4A].
- MF 카테고리: organic cyclic compound binding항(5,253 전사체)에 가장 많은 수의 전사체들 연관되어 있었으며, heterocyclic compound binding항(5,229 전사체), ion binding항(4,971 전사체), small molecule binding항(3,650 전사체) 순서 등으로 분류되었다[그림 2-3-4B].
- CC 카테고리: intracellular항(4,969 전사체)을 포함한, intracellular part항(4,673 전사체), intracellular organelle항(3,553 전사체), protein complex항(2,865 전사체) 순서로 분류되었다[그림 2-3-4C].
- 얻어진 완성도 높은 2배체 및 3배체 참조전체(reference transcriptome)의 전사체 서열들과 기능적 annotation 결과는 현재 local database로 Blast algorithm을 사용한 검색이 가능하도록 구축하였으며, 추후 관계부처와 논의하여 공개 DB로 이전 또는 공개여부를 결정하도록 할 것이다.

나. 배수체 전사체 발달·성장 단계별 DB 구축

(1) 2배체 및 3배체 참조전체의 발달·성장 단계별 전사체분석 DB 재분류

- 1단계 연구를 통해서 전복 3배체 및 2배체 시료를 대상으로 전사체 염기서열 자료의 확보가 추진되어, 3배체와 2배체 간 차등 발현 유전자들이 1차 탐색이 수행된 바 있음. 그러나 1단계 연구기간 내 3배체 유도 조건의 최적화 및 배수체 대량 처리가 가능한 기술이 1단계 중후반부에 완성됨에 따라, 생식 연령을 포함한 전 생활사(> 3년)에 해당하는 발현유전자 소재의 확보가 매우 제한적일 수 밖에 없었다.
- 2단계에 진입하여 년차별로 배수체 대량 처리 및 종자 생산이 성공적으로 이루어짐에 따라 1단계 후반부에 이어서 배수체 year-class 집단이 연속적으로 확보됨에 따라 다양한 발달 단계의 배수체 시료와 동일 환경에서 사육된 이배체 시료의 확보가 가능하게 되었다.
- 따라서 3배체 참조전체의 체계적인 생물학적 특성(배수체의 발생, 발달, 경제형질, 기타 차등 생리특성, 생식형질 등)분석을 위하여 그간 확보한 염기서열들 자료를 재분류하였음. 부족한 전사체 발현자료는 NGS기반 전사체 분석을 추가적으로 수행함으로써 DB를 보완 확립하였다.
- 3배체 전복의 생물학적 특성 분석을 위해 참조전체의 생활사에 따라 수정 후 초기 발생기, 어린전복, 성장기, 18 개월 성체(미성숙) 및 24개월 성체(암수 성숙)등으로 5그룹으로 나누어 시료 확보 및 발현 정보자료 DB를 재구성 및 보완하였으며, 재분류 정비된 전사체 시료 및 NGS 분석의 종류는 [표 2-3-4]에 나타내었다.



[그림 2-3-4]

2배체, 3배체 참전복 reference transcriptome의 유전자 온톨로지 분류파이차트

A. Biological Process, B. Molecular function, C. Cellular component

[표 2-3-4]

2배체, 3배체 참전복 발달 및 성장 단계별 전사체 NGS 분석 시료, 종류, sequencing 방법

구분	생활사	Raw read 길이(bp)	시료구분	NGS 플랫폼
초기발생기	상실배(Morula)	2 × 100	전체	Illumina HiSeq 2500
	낭배기 (Gastrula)	2 × 100		
	담륜자(veliger)	2 × 100		
어린전복	치파(Seedling, ~ 4개월)	2 × 100	조직구분 (muscle, 그 외)	Illumina HiSeq 2500
성장기	~8개월	2 × 100	조직구분 (gill, gut, hemocyte, hepatopancrease, tentacle, muscle)	Illumina HiSeq 2500
미성숙 전복	~16개월	2 × 100	조직구분, 암수구분없음 (gill, gut, hemocyte, hepatopancrease, tentacle, muscle)	Illumina HiSeq 2500
		3,000 ~ 15,000	모든 조직 풀링	PacBio Iso-Seq
성숙 전복	~24개월	2 × 100	조직 및 암수구분 (gill, gut, hemocyte, hepatopancrease, tentacle, muscle)	Illumina HiSeq 2500
		3,000 ~ 15,000	모든 조직 풀링	PacBio Sequel

(2) 2배체 및 3배체 NGS분석 유전자 발현 정량화

- 재구성된 1단계 및 2단계 2배체, 3배체 참전복의 전처리 된 Illumina RNA-seq short read 염기서열(2 x 100bp)은 만들어진 전장참조전사체(full-length reference transcriptome)에 Kallisto 프로그램을 사용하여 정렬하여 매핑된 read수를 확인하여 정량화된 전사체의 발달, 성장 단계에 따른 발현량을 [표 2-3-5]에 나타냈다.
- 다양한 발생, 성장단계의 조직들로부터 생산된 short read들은 reference transcriptome에 대해, 24개월 3배체 참전복 수컷 생식소(gonad)에서 최저 65.4%를, 24개월 2배체 참전복 수컷 혈구세포(hemocYTE)에서 최고 83.2%의 매핑율을 나타냈다.
- Read 수가 1이상인 전사체는 24개월 2배체 참전복 암컷 혈구세포(hemocYTE)에서 60,383개로 최소를 나타냈으며, 16개월 3배체 참전복 근육조직에서 82,145개로 최대값을 나타냈다.
- 정량발현량(FPKM) 값이 1이상인 isoform의 수는 2배체 참전복 상실배(morula) 시기에 30,210개로 가장 적었으며, 16개월 3배체 참전복 심장(heart)조직에서 가장 많았다.

(3) 2배체 및 3배체 참전복 초기발생단계 전사체 발현 상관관계 평가

- 2배체 및 3배체 참전복 초기발달단계별 시료의 일관성 및 각각의 발생단계별 시료의 상관관계를 hierarchical clustering하여 우선적으로 평가하였다.
- 상실배(morula), 담륜자(trochophore), 피면자(veliger) 단계의 유전자 발현값을 시각화한 heat map은 각각의 발생단계별로 2배체 및 3배체 참전복이 하나의 그룹으로 일관되게 clustering되어 시료의 일관성을 나타내고 있으며, 담륜자와 피면자의 유전자발현이 더 깊은 상관관계가 있음을 확인하였다[그림 2-3-5]. 이러한 결과는 담륜자에서 피면자로 형태적 변화과정보다 상실배에서 담륜자로 형태적 변화과정에 더욱 많은 유전자발현이 요구됨을 나타낸다.
- 2배체 및 3배체 참전복의 발생단계별 동시발현(co-expression) 분석은 cluster 1(104개 전사체), cluster 2(252개 전사체), cluster 3(59개 전사체)를 포함하는 각기 다른 3개의 발현패턴을 지닌 그룹으로 나누어졌다[그림 2-3-6]. 이러한 결과는 2배체 및 3배체 참전복의 초기발생과정에서 유전자발현 역동성이 유사함을 나타낸다.
- 따라서, 2배체 및 3배체 참전복사이의 동일발생단계에서의 차등발현유전자는 3배체 전복의 특성을 이해하는데 중요하리라 생각하며, 향후 이러한 3개의 각기 다른 패턴에 속해 유전자를 연구한다면 참전복의 초기발생에 관한 분자유전학적 기초자료로 활용될 수 있으리라 생각한다.

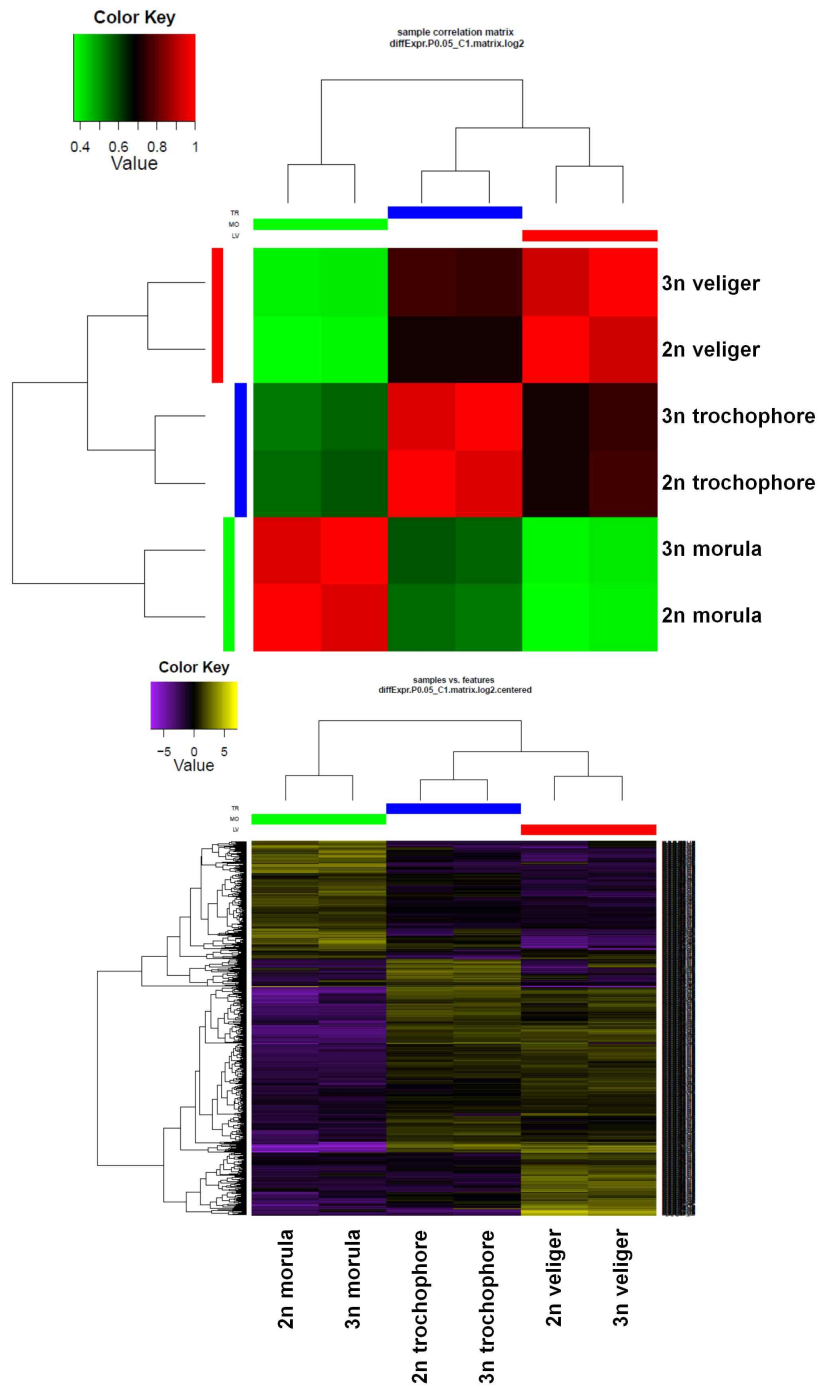
[표 2-3-5]

2배체 및 3배체 전복의 Illumina RNA-seq short read 현황, reference transcriptome에 대한 매핑율, 정량발현 전사체 수

Stage	Ploidy	Tissue	Total reads	Mapping rate (%)	Isoform read count > 0	Isoform FPKM >1
Morula	2n	Whole	26,274,161	76.0	60,441	30,210
	3n		26,754,667	76.0	63,048	31,842
Trochophore	2n	Whole	30,911,377	71.1	68,882	37,444
	3n		30,764,517	71.4	69,235	37,700
Veliger	2n	Whole	29,092,740	71.7	75,950	44,471
	3n		37,617,874	71.2	76,150	43,270
8 month	2n	Gill	30,202,893	71.4	74,208	48,299
		Gut	27,209,469	76.1	76,034	51,288
		Heart	25,406,903	73.8	76,349	50,684
		Hemocyte	26,119,356	76.5	72,914	44,078
		Hepatopancreas	24,150,674	73.2	71,532	47,166
		Muscle	22,327,072	78.4	76,032	51,206
		Tentacle	30,472,749	80.0	78,346	48,787
	3n	Gill	25,492,268	71.3	73,804	48,726
		Gut	28,960,427	76.1	75,382	50,938
		Heart	23,455,325	73.1	77,452	52,000
		Hemocyte	21,124,410	76.8	70,402	40,836
		Hepatopancreas	22,445,326	73.1	70,081	45,286
		Muscle	21,672,951	79.6	75,546	50,772
		Tentacle	30,849,773	77.6	79,687	50,838
16 month	2n	Gill	27,427,327	75.9	74,861	48,142
		Gut	29,448,828	82.5	78,692	51,348
		Heart	34,811,789	79.7	81,282	53,488
		Hemocyte	29,462,075	80.6	67,120	37,876
		Hepatopancreas	26,114,543	78.3	72,221	44,934
		Muscle	30,699,007	81.2	80,964	51,505
	3n	Gill	26,126,500	76.5	76,302	48,973
		Gut	29,872,048	81.7	79,606	54,192
		Heart	29,037,209	81.3	81,700	55,297
		Hemocyte	35,209,574	81.8	70,137	39,331
		Hepatopancreas	28,236,537	76.4	75,300	47,897
		Muscle	32,912,477	79.1	82,145	52,940

[표 2-3-5] 계속

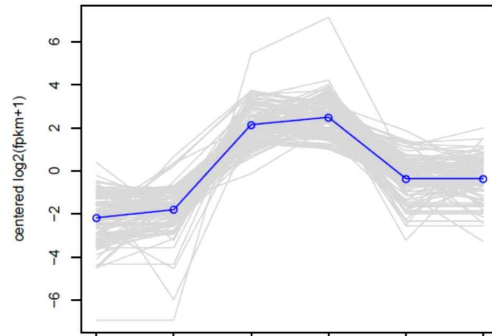
Stage	Ploidy	Tissue	Total reads	Mapping rate (%)	Isoform read count > 0	Isoform FPKM >1
24 month	2n Female	Gill	26,289,097	78.9	77,113	48,537
		Gonad	24,704,731	81.5	64,045	36,086
		Heat	30,064,808	80.2	75,221	48,296
		Hemocyte	28,420,036	78.1	60,383	34,821
		Hepatopanceras	32,978,307	80.8	69,351	42,023
		Muscle	38,181,111	77.5	75,310	46,261
	2n Male	Gill	31,156,201	73.8	75,874	48,998
		Gonad	26,432,884	66.2	65,356	34,274
		Heat	33,514,587	78.8	76,792	48,764
		Hemocyte	25,884,273	83.2	65,899	37,536
		Hepatopanceras	27,057,265	78.1	70,692	44,834
		Muscle	31,072,098	80.1	78,942	51,226
	3n Female	Gill	28,787,604	73.9	71,608	44,784
		Gonad	37,617,095	75.1	73,419	42,533
		Heat	32,442,012	79.2	72,986	45,601
		Hemocyte	28,993,807	78.0	63,581	35,740
		Hepatopanceras	34,226,532	79.0	70,864	42,634
		Muscle	33,887,184	79.9	77,855	48,098
	3n Male	Gill	35,394,273	74.7	77,379	48,562
		Gonad	34,555,508	65.4	65,473	33,345
		Heat	30,840,350	79.3	78,595	51,019
Hemocyte		36,889,991	82.7	67,183	36,723	
Hepatopanceras		38,625,243	77.8	74,679	45,340	
Muscle		31,524,104	79.0	80,084	51,355	



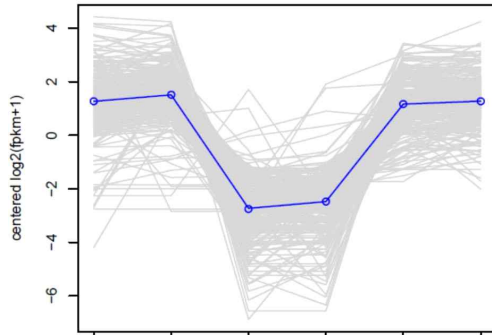
[그림 2-3-5]

2배체 및 3배체 참전복의 발생단계별 전사체 발현 프로파일의 계통분석과 그룹화

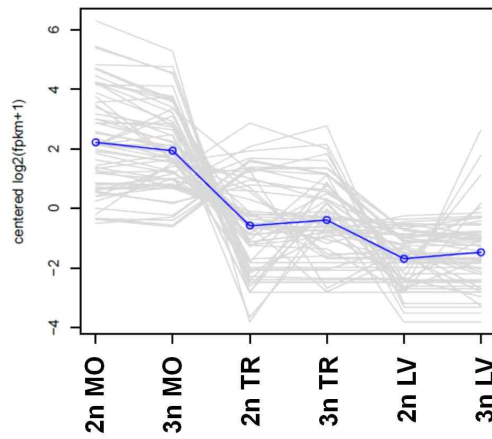
subcluster_1_log2_medianCentered_fpk.matrix, 104 tra



subcluster_2_log2_medianCentered_fpk.matrix, 252 tra



subcluster_3_log2_medianCentered_fpk.matrix, 59 tra



[그림 2-3-6]

2배체, 3배체 참전복의 발생단계별 동시발현분석 및 그룹화.

MO, 상실배; TR, 담륜자; LV, 피면자

(4) 부화 후 8개월 2배체, 3배체 치패의 전사체 발현 상관관계 평가

- 부화 후 8개월 2배체 및 3배체 참전복 조직별 발현량을 hierarchical clustering하여 2배체 및 3배체 참전복이 각각 하나의 그룹으로 clustering됨을 확인하였다[그림 2-3-7].
- 이러한 결과는 3배체 참전복 시료의 NGS DB는 2배체 참전복 NGS DB와 발달 단계별로 차이나는 발현유전자를 비교분석이 가능케 하고, 3배체 참전복의 발달 기간에 영향을 끼치는 발현유전자를 발굴하여 3배체 참전복의 치패 생존율을 개선할 수 있는 전략 수립에 이용할수 있으리라 판단된다.

(5) 부화 후 16개월 2배체, 3배체 치패의 전사체 발현 상관관계 평가

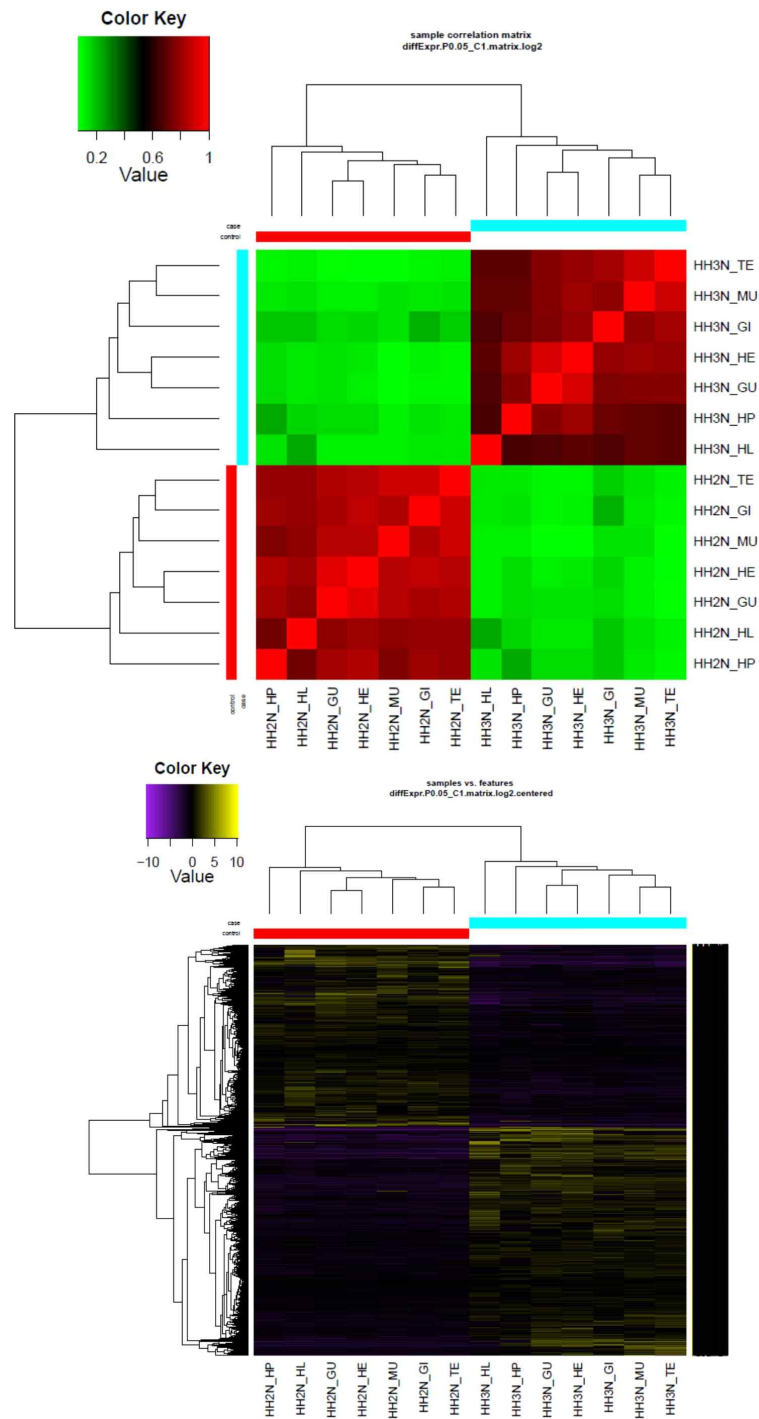
- 2배체 및 3배체 참전복 조직별 발현량을 hierarchical clustering하여 2배체 및 3배체 참전복이 각각 하나의 그룹으로 clustering됨을 확인하였다.
- 하지만 8개월 성숙 2배체 및 3배체 참전복의 조직별 cluster는 일관되었던 것과 대조적으로, 3배체 16개월 참전복의 조직별 발현 clustering은 hemocyte와 hepatopancreas가 하나의 군을 gut, gill, heart, muscle이 하나의 군으로 clustering되어 2배체의 그것과는 다름을 보였다[그림 2-3-8].

(6) 부화 후 24개월 2배체, 3배체 치패의 전사체 발현 상관관계 평가

- 전사체 발현 clustering의 결과 24개월 암컷 및 수컷의 2배체의 조직별 전사체 발현패턴의 clustering은 16개월 성장 2배체 참전복의 조직별 발현패턴 clustering과 유사하였지만, 24개월 성장 암컷 및 수컷의 3배체의 조직별 발현패턴 clustering은 16개월 성장 3배체와 비교하였을 때 전혀 다른 발현패턴 clustering이 나타났는데, 이는 3배체 참전복이 성장과 함께 상당히 다른 조직적 생리, 표현형질의 변화가 수반됨을 나타낸다[그림 2-3-9].

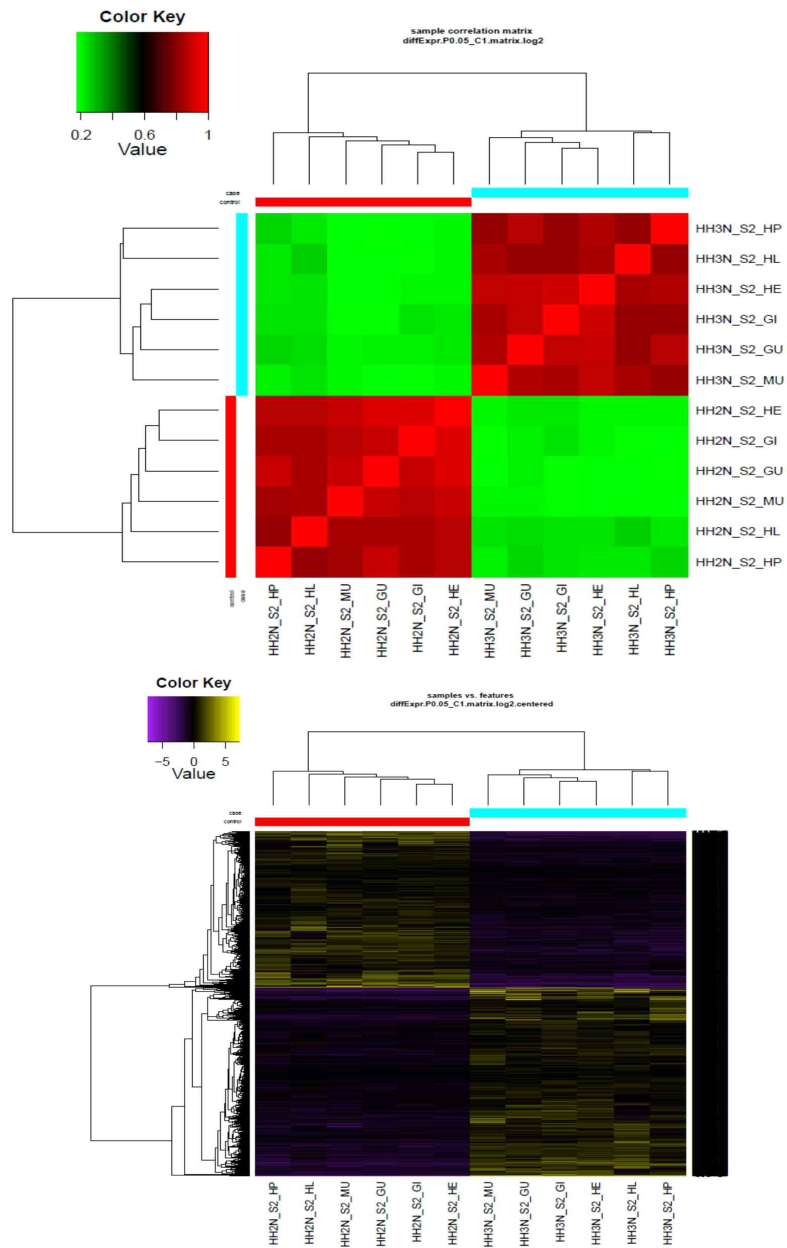
다. 발달·성장 단계별 배수체 특이 차등발현 유전자 탐색

- 전사체의 차등발현을 측정하기 위해 RSEM(RNA-Seq by Expectation-Maximization) 프로그램으로 2배체와 3배체 참전복 각각의 RNA-seq 라이브러리들의 size를 이용하여 각 발현 수치를 보정하는 TMM (Trimmed mean of M-value) 값을 계산하였다.
- 각각의 발생, 발달, 성장 단계별 조직별 2배체 및 3배체의 전사체들의 TMM값은 edgeR을 이용하여 그 발현량의 차이를 비교하였으며, $|\log_2FC| > 1$ 와 $FDR < 0.05$ 의 값을 기준안에서 차등발현유전자로 선정하였다.



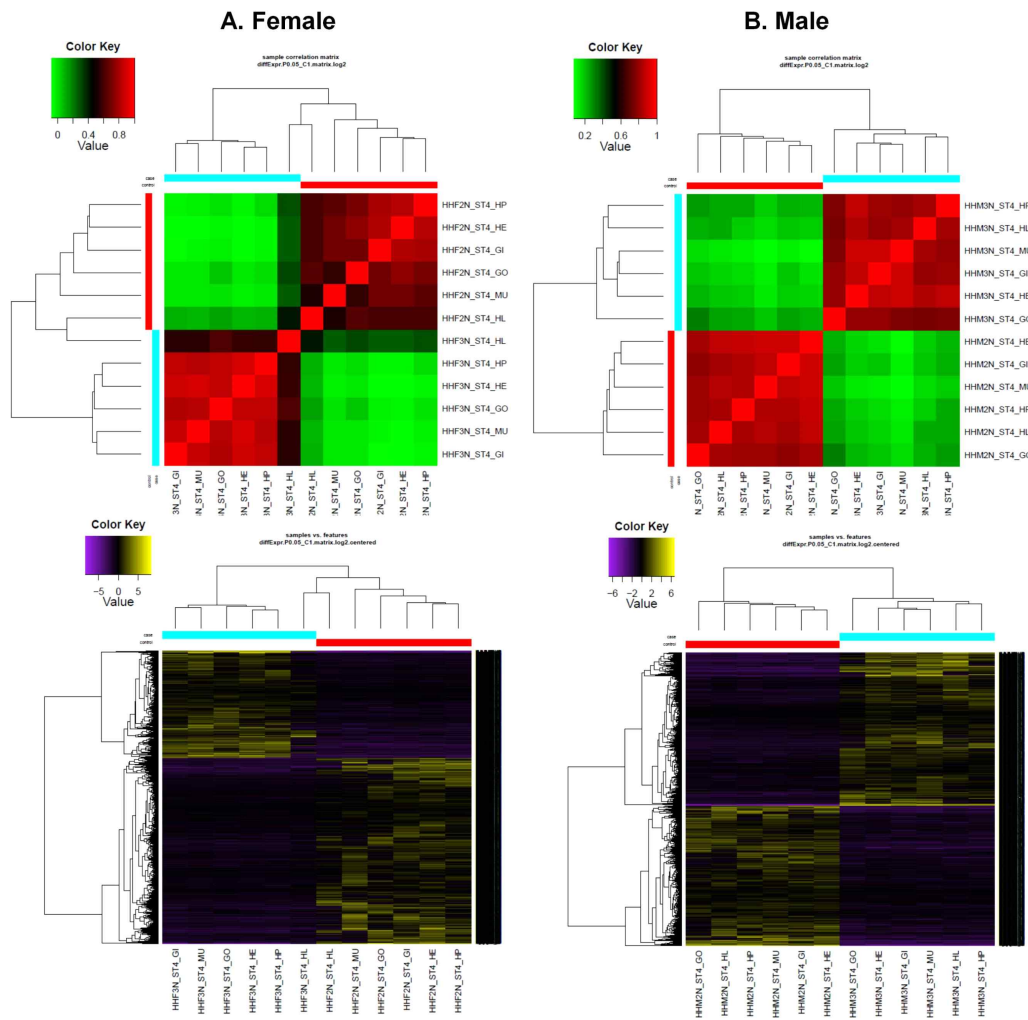
[그림 2-3-7]

부화 후 8개월 성장 2배체 및 3배체 참전복의 조직별
전사체발현 프로파일의 계통분석과 그룹화



[그림 2-3-8]

부화 후 16개월 성장 2배체 및 3배체 참전복의 조직별
전사체발현 프로파일의 계통분석과 그룹화



[그림 2-3-9]

부화 후 24개월 성장 2배체 및 3배체 참전복 암컷과 수컷의 조직별
전사체발현 프로파일의 계통분석과 그룹화

(1) 2배체, 3배체 참전복의 초기발생단계의 차등발현유전자 발굴

○ 상실배(morula) 단계

- : 총 21개의 차등발현전사체가 동정되었다[그림 2-3-10A].
- : 그 중 9개의 전사체가 3배체 특이적인 상향발현(up-regulation)을 나타내었으며, 12개의 전사체가 하향발현(down-regulation)되었다. 상향발현전사체 중 5개의 전사체는 각각 pol-like protein, transcription elongation regulator 1-like isoform x2, cytochrome oxidase subunit 1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like-B-like isoform x1, NADH dehydrogenase subunit 5와 유사성을 나타냈다. 하향발현 전사체는 acylglycerol mitochondrial-like, elongation factor 1 α 등을 포함하는 6개의 전사체가 NCBI NR DB의 유전자와 유사성을 나타내었으며, 나머지 6개는 유사성이 확인되지 않았다[표 2-3-6].

○ 담륜자(trochophore) 단계

- : 총 13개의 차등발현전사체가 동정되었다[그림 2-3-10B].
- : 상실배 시기에서 3배체에서 하향 발현되었던 acylglycerol mitochondrial-like를 포함한 9개 전사체가 3배체에서 상향 발현되었다. 한편 하향 발현된 4개의 중에서도 acylglycerol mitochondrial-like와 유사성을 가진 전사체를 포함하고 있어, 앞으로의 연구 (차년도)에서는 유전자의 발현량 및 발현기작에 대한 연구도 의미 있으리라 생각한다[표 2-3-6].

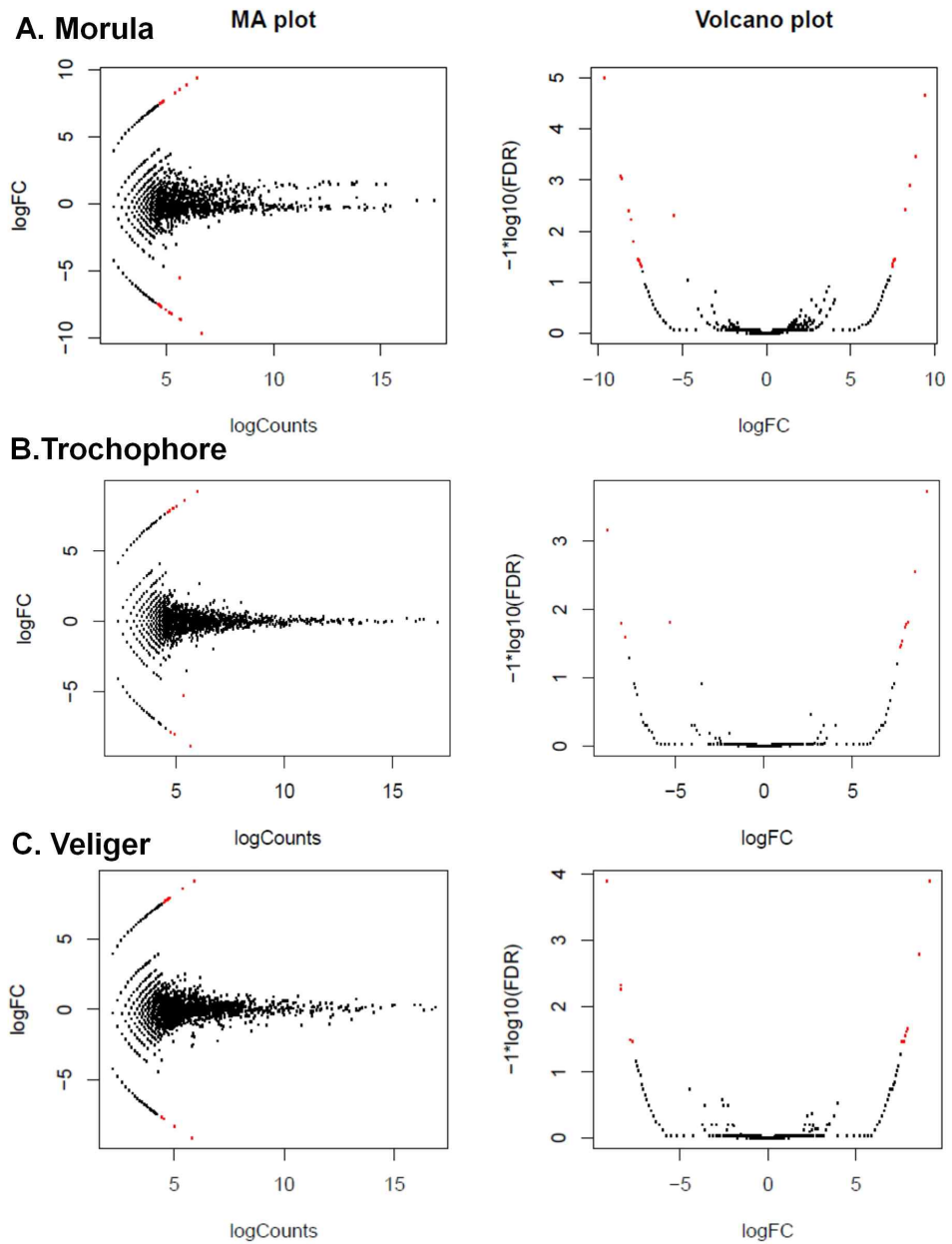
○ 피면자(veliger) 단계

- : 총 19개의 차등발현전사체가 동정되었다[그림 2-3-10C].
- : 14개의 전사체가 상향발현되었으며 이들 중 enoyl-hydratase domain-containing protein mitochondrial, DnaJ homolog subfamily c member 22-like 코딩전사체는 2-2-2의 co-expression 분석 cluster 2그룹에 속하였다. 5개의 전사체가 3배체 피면자 참전복에서 하향발현을 나타냈으며, 이들 모두는 유사성 검색결과가 나타나지 않았다. 한편 HH_2N_PB_222139.1_1.00 전사체가 co-expression 분석 cluster 2그룹에 속하였다[표 2-3-6].

- 초기발생단계의 2배체 및 3배체 참전복 사이의 차등발현유전자는 그 수가 극히 제한적이었으며, 또한 동정된 차등발현유전자의 45%이상이 유사성이 없는 새로운 전사체였다. 이러한 결과는 초기 배발생 과정에서의 2배체, 3배체 참전복의 비의도적 생리적 형질변화 및 다면발현 극히 적음을 암시한다.

(2) 부화 후 8개월 2배체, 3배체 치패의 조직별 차등발현유전자 발굴

- 부화 후 8개월 각 2배체 및 3배체 참전복의 7개의 조직들인 gill(GI), gut(GU), heart(HE), hemocyte(HL), hepatopancreas(HP), muscle(MU), tentacle(TE) 대한 Illumina RNA-seq short read들을 사용하여 차등발현유전자를 동정하였다.



[그림 2-3-10]

2배체 및 3배체 참전복의 발생시기별 차등발현유전자의 MA 및 volcano plot

[표 2-3-6]

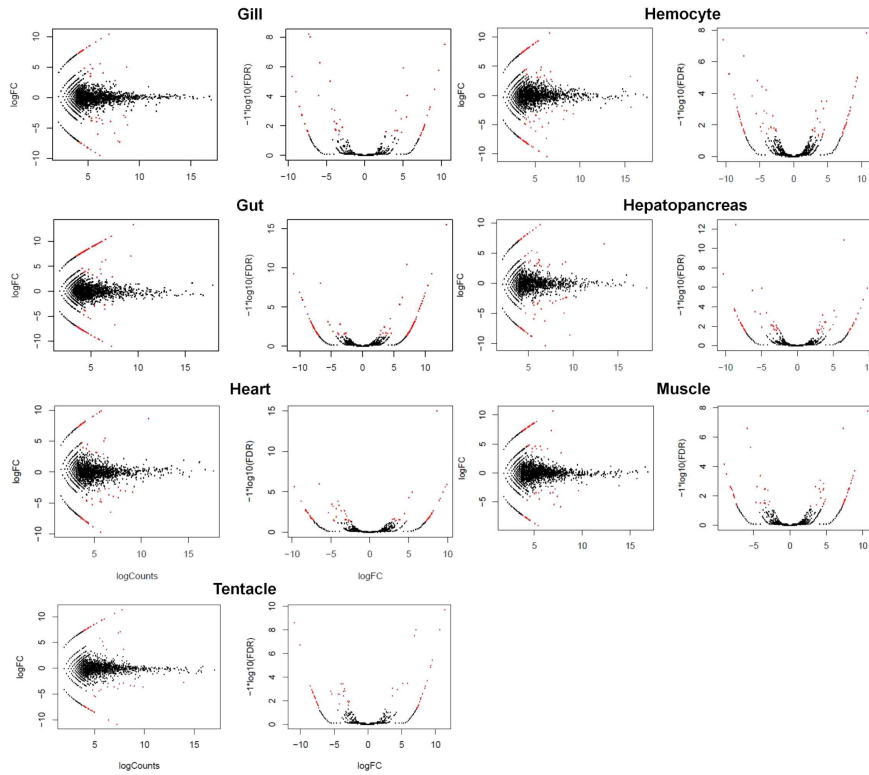
초기발생 시기 3배체 참전복의 상향 및 하향발현 차등발현유전자 목록, NCBI NR BLASTx hit 유전자들

	Blastx hit	TMM (2n)	TMM (3n)	log FC	FDR
상 실 배	상향발현유전자				
	NADH dehydrogenase subunit 5	0	118.478	8.86	3.48E-04
	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like-B-like isoform x1	0	95.919	7.64	3.55E-02
	cytochrome oxidase subunit i	0	64.26	7.59	3.73E-02
	pol-like protein	0.699	33.921	7.47	4.87E-02
	transcription elongation regulator 1-like isoform x2	0	37.151	7.47	4.87E-02
	하향발현유전자				
	acylglycerol mitochondrial-like	125.783	0	-9.68	9.87E-06
	elongation factor 1 alpha	47.996	0	-8.66	8.42E-04
	NADH dehydrogenase subunit 5	77.262	0	-8.23	4.02E-03
담 륜 자	loss of heterozygosity 12 chromosomal region 1 protein homolog	68.677	1.402	-5.50	4.84E-03
	zinc finger protein on ecdysone puffs-like isoform x2	45.724	0	-8.09	5.88E-03
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_135136	44.615	0	-7.90	1.59E-02
	uncharacterized protein loc101851033	31.659	0	-7.66	3.55E-02
	상향발현유전자				
	acylglycerol mitochondrial-like	0	70.241	9.20	1.85E-04
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_167590	0	32.703	8.54	2.78E-03
	transposable element tcb1 partial	0	95.112	8.02	1.67E-02
	zinc finger protein on ecdysone puffs-like isoform x1	0	36.047	7.97	1.82E-02
	heat shock protein 90	0.521	40.279	7.82	2.88E-02
hypothetical protein CGI_10015393	0	35.145	7.77	3.33E-02	
predicted protein	0	32.183	7.72	3.60E-02	
과 면 자	하향발현유전자				
	acylglycerol mitochondrial-like	55.938	0.333	-8.85	6.81E-04
	transposable element tcb2 transposase	24.425	0	-8.04	1.57E-02
	tumor necrosis factor alpha	26.757	0.007	-7.85	2.54E-02
과 면 자	상향발현유전자				
	transposable element tcb2 transposase	0.027	148.608	9.17	1.26E-04
	RNA-directed DNA polymerase from transposon x, partial	0	36.946	8.62	1.65E-03
	ubiquinol-cytochrome c rieske iron-sulfur polypeptide 1	0	22.092	7.95	2.19E-02
	transposase	0.264	21.924	7.91	2.19E-02
	DnaJ homolog subfamily c member 22-like	0	34.501	7.82	2.78E-02
	enoyl-hydratase domain-containing protein mitochondrial	0	33.549	7.73	3.41E-02
	elongation factor 1 alpha	0	17.574	7.62	3.41E-02
NADH dehydrogenase subunit 5	0.014	37.548	7.62	3.41E-02	

- $|\log_2FC| > 1$ 와 $FDR < 0.05$ 의 값을 기준안에서 8개월 성장 2배체 및 3배체 참전복의 조직별 차등 발현 전사체를 동정하였다[그림 2-3-11].
- 총 345개의 전사체가 3배체 8개월 참전복 7개의 조직에서 상향 조절되었으며, 84개의 전사체가 중복값을 가지는 전사체였다. 가장 많은 수의 차등 발현 전사체는 gut조직(90개)에서 동정되었으며, gill(33개)에서 가장 적은 차등발현전사체가 동정되었다[표 2-3-7].
- 총 318개의 전사체가 하향 조절되었으며, 그중 78개의 전사체는 조직별 중복 전사체였다.
- 3배체 참전복의 조직별 상위 10개의 상향 및 하향발현 전사체중 NCBI BLASTx 결과 annotation된 전사체들을[표 2-3-8]에 나타내었다.
- 상위 10개의 상향 발현된 전사체 중 EGF-like and EMI domain-containing protein 1-like는 gill, hemocyte, muscle 및 tentacle의 4개 조직에서 상향발현 되었고, collagen pro alpha-chain, hypothetical protein LOTGIDRAFT _131825, sialic acid binding lectin, PREDICTED: endoglucanase-like가 두 개의 조직에서 상향발현 되었다.
- 하향 발현된 상위 10개의 전사체중 selenocysteine-specific elongation factor-like는 gill, muscle, tentacle에서, biotin-protein ligase, acylglycerol mitochondrial-like, hypothetical protein LOTGIDRAFT_184530의 전사체가 2개 조직에서 하향발현 되었다.
- 8개월 성숙 3배체 참전복의 조직별 차등 발현 전사체는 그 수가 초기발생단계에 동정된 전사체의 수보다 증가하였으며, 이는 3배체 참전복이 2배체 참전복과 다른 생리특성을 나타내기 시작을 암시한다.

(3) 부화 후 16개월 성장 2배체, 3배체 전복의 조직별 차등발현유전자 발굴

- 1단계 연구에서 확보된 16개월 성숙 2배체 및 3배체 참전복의 gill(GI), gut(GU), heart(HE), hemocyte(HL), hepatopancreas(HP), muscle(MU) 6개의 조직들에 대한 Illumina RNA-seq short read들을 사용하여 차등발현유전자를 동정하였다[그림 2-3-12].
- $|\log_2FC| > 1$ 와 $FDR < 0.05$ 의 값을 기준안에서 16개월 성장 2배체 및 3배체 참전복의 조직별 차등발현전사체를 동정하였다[표 2-3-9]. 16개월 성장 3배체 참전복의 차등발현 전사체의 수는 8개월 성장 3배체에서 동정한 차등발현전사체 수보다 100배가량이 많았으며, 이러한 결과는 3배체 특이적인 생리, 표현형질 또는 비의도적 생리, 표현형질이 16개월 성숙 후 나타날 가능성이 높음을 나타낸다.
- 총 40,396개의 전사체가 3배체 16개월 참전복 6개의 조직에서 상향조절되었으며, 17,428개의 전사체가 조직 중복을 가짐으로 22,968개의 전사체의 서열이 unique한 상향발현전사체이었다. 가장 많은 수의 차등발현전사체는 hemocyte(7,736개)에서 동정되었으며, gill(5,980개)에서 가장 적은 차등발현전사체가 동정되었다. 총 42,696개의 전사체가 하향조절되었으며, 그중 17,991개의 전사체는 조직별 중복 전사체였다.



[그림 2-3-11]

부화 후 8개월 성장 2배체 및 3배체 참전복의 조직별 차등발현전사체의 MA 및 volcano plot

[표 2-3-7]

부화 후 8개월 성숙 2배체, 3배체 참전복의 조직별 차등발현전사체수 ($|\log_2FC| > 1$, $FDR < 0.05$)

Tissue	Up-regulated DEGs	Down-regulated DEGs	Total
Gill	33	29	62
Gut	90	61	151
Heart	48	54	102
Hemocyte	54	52	106
Hepatopancreas	42	50	92
Muscle	44	30	74
Tentacle	34	42	76
Total (unique)	345 (261)	318 (240)	663 (501)

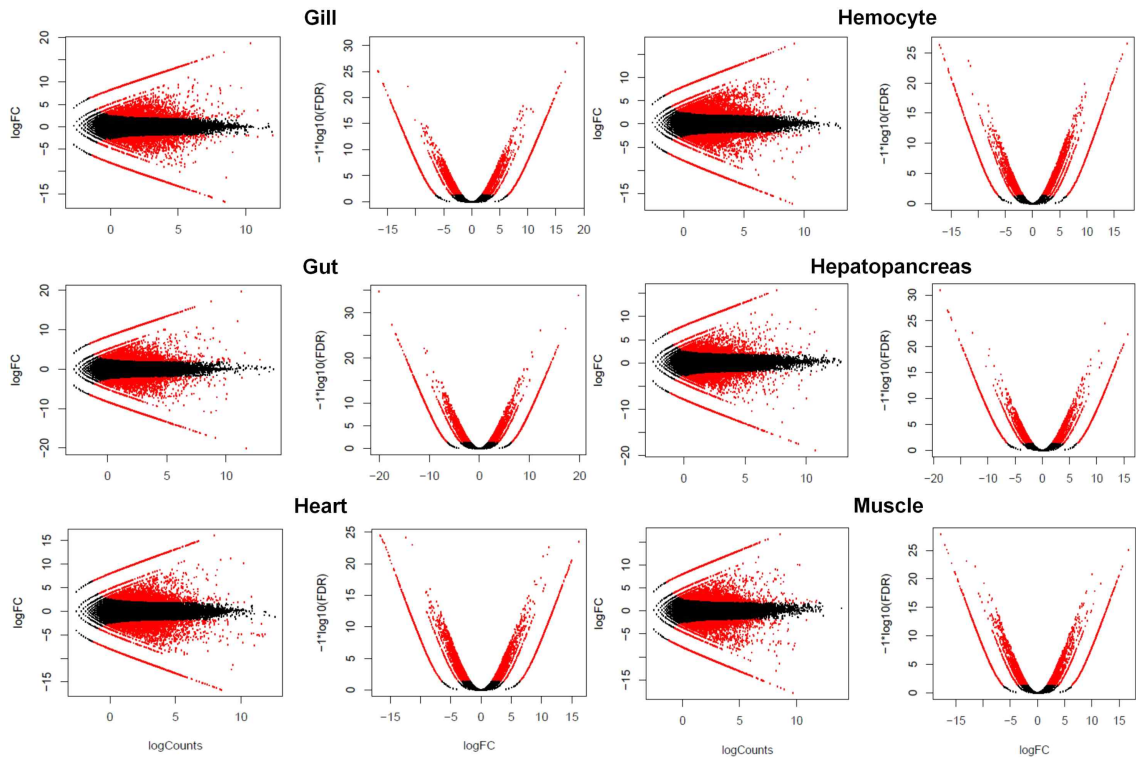
[표 2-3-8]

부화 후 8개월 3배체 참전복의 상향 및 하향발현 차등발현유전자 목록, NCBI NR BLASTx hit 유전자들

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	HR	Blast hit	Log2FC	FDR
Gill	hypothetical protein LOTGIDRAFT_131825	10.43	3.07E-08	transposase	-8.54	4.96E-04
	sialic acid binding lectin	5.03	1.23E-06	selenocysteine-specific elongation factor-like	-8.21	1.91E-03
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_126569, partial	9.68	1.79E-06	transposable element tcb2 transposase	-7.83	7.17E-03
	uncharacterized protein loc100888289	5.54	8.99E-05	hypothetical protein LOTGIDRAFT_200884	-7.51	2.05E-02
	egf-like and emi domain-containing protein 1-like	8.54	5.43E-04	hypothetical protein LOTGIDRAFT_229513	-7.45	2.42E-02
	hypothetical protein RirG_013040	4.03	9.45E-04			
	unnamed protein product	5.44	2.52E-03			
Gut	PREDICTED: endoglucanase-like	13.34	2.93E-16	uncharacterized protein loc102810040	-10.05	1.27E-07
	collagen pro alpha-chain	10.37	1.80E-08	acylglycerol mitochondrial-like	-9.72	5.98E-07
	collagen pro alpha-chain	9.82	4.08E-07	cytochrome oxidase subunit i	-8.76	7.88E-05
	acylglycerol mitochondrial-like	9.35	3.90E-06	hypothetical protein LOTGIDRAFT_122568, partial [Lottia gigantea]	-8.47	2.96E-04
				collagen pro alpha-chain	-8.3	6.32E-04
Heart	hypothetical protein LOTGIDRAFT_131825	9.68	2.43E-06	transposable element tcb2 transposase	-8.82	1.41E-04
	PREDICTED: endoglucanase-like	8.61	9.32E-16	hypothetical protein LOTGIDRAFT_184530	-8.21	2.08E-03
				nadh dehydrogenase subunit 5	-8.17	2.19E-03
				hypothetical protein LOTGIDRAFT_213342	-8.17	2.19E-03
Hemo cyte	hypothetical protein LOTGIDRAFT_167107	9.38	9.85E-06	biotin--protein ligase	-9.54	5.90E-06
	egf-like and emi domain-containing protein 1-like	9.33	1.15E-05	hypothetical protein LOTGIDRAFT_184530	-9.51	5.90E-06
	receptor-type tyrosine-protein phosphatase t	8.35	7.95E-04	uncharacterized protein loc101849520	-5.4	1.59E-05
				pol-like protein	-4.68	3.89E-05
				PREDICTED: uncharacterized protein K02A2.6-like	-6.1	1.45E-04

[표 2-3-8] 계속

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	FDR	Blast hit	Log2FC	FDR
Hepatop anreas	rna-directed dna polymerase from mobile element partial	9.73	1.18E-06	hypothetical protein LOTGIDRAFT_162340	-8.78	1.61E-04
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_111575, partial	9.2	1.85E-05	transposable element tcb2 transposase	-8.7	2.55E-04
	rna-directed dna polymerase from transposon x- partial	8.48	4.60E-04	acylglycerol mitochondrial-like	-8.32	8.74E-04
	nuclease harbil	7.90	4.24E-03	hypothetical protein LOTGIDRAFT_158430	-8.32	8.74E-04
				transposable element tcb2 transposase	-8.11	2.32E-04
				cleavage and polyadenylation specificity	-7.92	4.23E-03
Muscle	hypothetical protein CAPTEDRAFT_164396	8.64	4.25E-04	selenocysteine-specific elongation factor-like	-9.08	7.23E-05
	uncharacterized protein loc102810040	8.55	6.23E-04	probable complex i intermediate-associated protein mitochondrial	-8.77	3.32E-04
	collagen pro alpha-chain	8.46	8.70E-04	loss of heterozygosity 12 chromosomal region 1 protein homolog	-8.04	3.26E-03
	egf-like and emi domain-containing protein 1-like	8.36	1.37E-03	CR1-3 [Lycodichthys dearborni]	-7.95	4.02E-03
	collagen pro alpha-chain	8.10	3.26E-03	hypothetical protein LOTGIDRAFT_178363	-7.74	9.09E-03
	acetyl- acetyltransferase mitochondrial	8.06	3.26E-03			
Tentacle	sialic acid binding lectin	9.55	3.69E-06	unnamed protein product	-8.54	5.45E-04
	egf-like and emi domain-containing protein 1-like	8.49	5.68E-04	biotin--protein ligase	-8.33	1.10E-03
	kyphoscoliosis peptidase-like	8.39	8.83E-04	selenocysteine-specific elongation factor-like	-8.18	1.85E-03
				collagen pro alpha-chain	-7.96	3.75E-03
				cytochrome c oxidase subunit i	-7.96	3.75E-03



[그림 2-3-12]

부화 후 16개월 성장 2배체 및 3배체 참전복의 조직별 차등발현전사체의 MA 및 volcano plot

[표 2-3-9]

부화 후 16개월 성숙 2배체, 3배체 참전복의 조직별 차등발현전사체수($|\log_2FC| > 1, FDR < 0.05$)

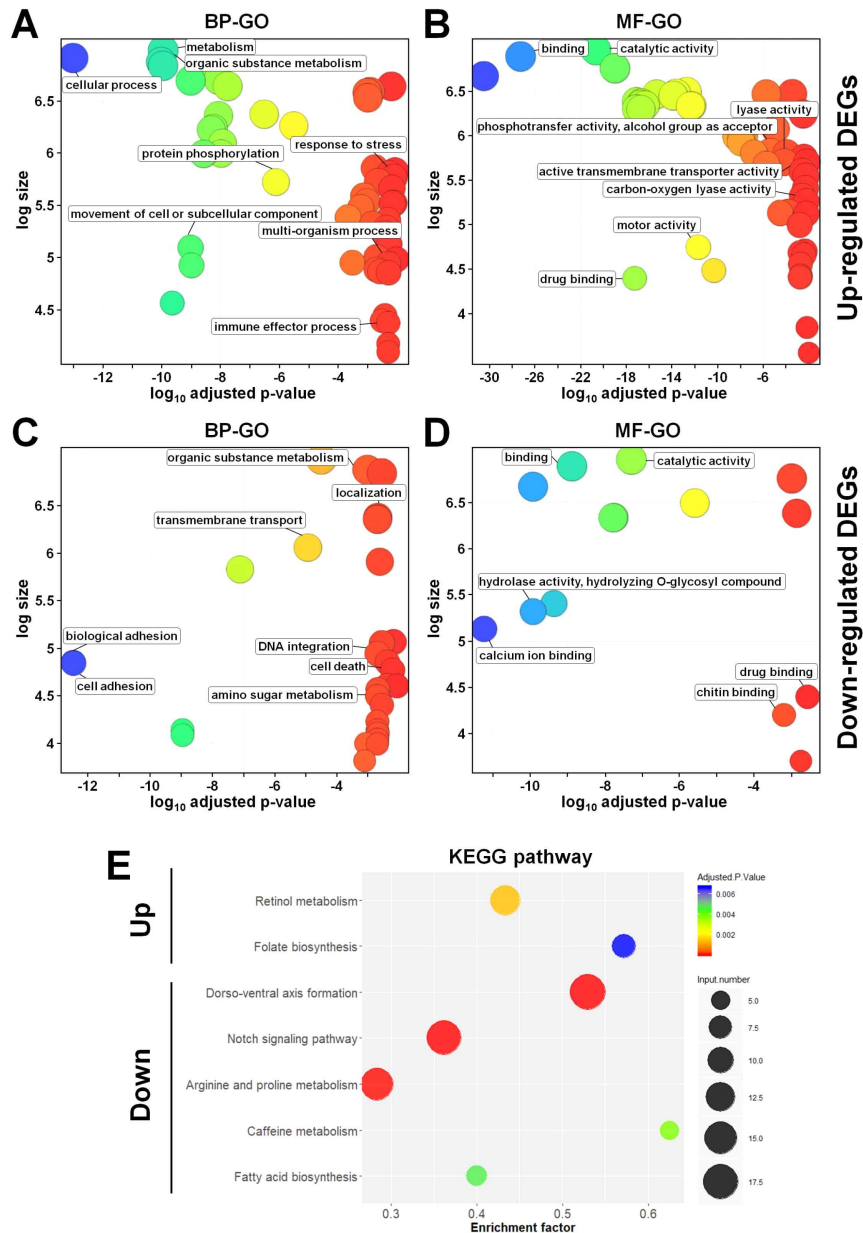
Tissue	Up-regulated DEGs	Down-regulated DEGs	Total
Gill	5,989	5,780	11,769
Gut	6,208	6,587	12,795
Heart	7,286	7,019	14,305
Hemocyte	7,736	8,814	16,550
Hepatopancreas	5,693	6,769	12,462
Muscle	7,484	7,727	15,211
Total (unique)	40,396 (22,968)	42,696 (24,705)	83,092 (47,673)
Total (unique)	345 (261)	318 (240)	663 (501)

- 전복의 hepatopancreas는 gonad 조직과 complex를 이루는 조직으로 에너지대사 및 생식소 발달을 위한 기능을 제공한다. 따라서 16개월 성숙 3배체 hepatopancreas로부터 동정된 전사체들에 대한 GO 및 KEGG enrichment를 기능적 분류를 실시하였다[그림 2-3-13]. 그 결과 대부분의 전사체들이 에너지대사에 관련된 기능적 카테고리에 enrichment되었으며, 이는 16개월 성장 3배체 참전복이 아마도 생식소 성장에 요구되는 에너지를 체성장에 재분배하기 때문이라 생각한다.
- [표 2-3-10]은 16개월 성장 3배체 참전복의 조직별 상위 10개의 상향 및 하향발현전사체를 나타내었으며, 대부분이 에너지대사에 관련된 전사체였으며 이는 GO 및 KEGG pathway enrichment분석과 잘 일치하였다.
- 따라서 16개월 성장 3배체 참전복의 차등발현전사체들은 아마도 생식소의 성장을 억제함으로써 전복의 성장촉진에 관여하리라 생각된다.

(4) 부하 후 24개월 성장 2배체, 3배체 참전복 성패의 조직별 차등발현전사체 발굴

- 24개월 성장 참전복은 생식소의 암컷과 수컷이 명확하기 때문에 성별에 따른 조직별 차등발현전사체를 동정하였다[그림 2-3-14].
- 24개월 3배체 암컷 참전복의 6개 조직으로부터 상향발현전사체(53,145개) 및 하향발현전사체(62,636개)가 동정 되었다[표 2-3-11]. 상향발현전사체는 생식소에서 가장 많았으며(12,881개), 하향발현전사체는 muscle에서 가장(14,525개) 많았다. 24개월 3배체 수컷 참전복에서는 총 38,713개의 상향발현전사체가, 35,666개의 하향발현전사체가 동정 되었으며, muscle에서 9,067개 상향발현전사체 및 8,038개 하향발현전사체로 그 수가 가장 많았다.
- 24개월 성장 3배체 참전복의 조직별 중복 없는 상향발현전사체수는 암컷이 34,600개, 수컷이 24,881개였으며, 하향발현전사체수는 암컷이 35,960개, 수컷이 23,039개로 암컷에서 많은 수의 차등발현전사체가 동정 되었다. 또한, 16개월 성장 참전복 3배체의 보다 24개월 성장 3배체 참전복 암컷에서 차등발현전사체의 수가 증가하였다. 이러한 결과는 암컷 3배체가 수컷 3배체에 비해 배수체효과에 의해 성장과 함께 더욱 다양한 생리, 형태적 변화가 유도됨을 나타낸다.
- 암컷 및 수컷의 조직별 차등발현전사체 상위 10개의 목록을 각각 [표 2-3-12] 및 [표 2-3-13]에 나타내었다. 대부분의 전사체가 에너지대사와 연관된 전사체들로 16개월 성장 참전복과 마찬가지로 생식소 성장에 요구되는 에너지를 체성장에 재분배와 밀접한 연관관계가 있음을 나타낸다.

○ 24개월 성장 3배체 참전복에서 21,318개의 상향발현전사체와 23,194개의 하향발현전사체들이 암컷 편향발현을, 11,599개의 상향발현전사체와 10,273개의 하향발현전사체들이 수컷 편향발현을 나타냈으며, 13,283개 및 12,767개의 전사체는 암컷과 수컷의 공통차등발현 전사체였다[그림 2-3-15]. 이들 차등발현전사체는 24개월 성장 3배체의 암컷과 수컷의 특성을 반영할 뿐만 아니라 2배체 참전복과 다른 생리, 형태적 특성을 설명할 수 있는 전사체들이라 생각된다.



[그림 2-3-13]

16개월 성장 3배체 참전복의 hepatopancreas조직으로부터 동정된 차등발현전사체의 GO와 KEGG pathway enrichment 분석

[표 2-3-10]

부화 후 16개월 성장 3배체 참전복의 상위 10개 상향 및 하향발현 차등발현유전자 목록, NCBI NR BLASTx hit 유전자들

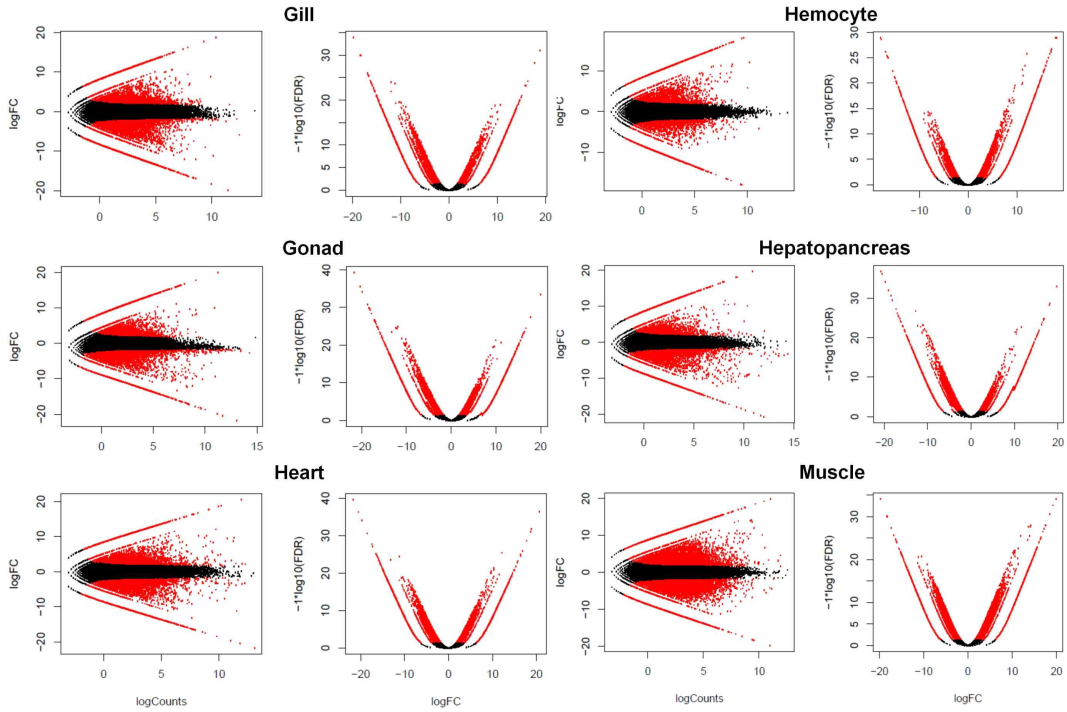
Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log ₂ FC	FDR	Blast hit	Log ₂ FC	FDR
Gill	cytochrome oxidase subunit i	18.66	3.84E-31	nadh dehydrogenase subunit 1	-16.78	8.58E-26
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_200884	16.69	1.12E-25	cytochrome b	-16.64	1.20E-25
	hypothetical protein DAPPUDRAFT_72393, partial	15.90	1.60E-23	nadh dehydrogenase subunit 5	-15.83	2.13E-23
	cytochrome b	15.61	6.56E-23	cytochrome c oxidase subunit i	-15.79	2.41E-23
	allene oxide synthase-lipoxygenase	15.46	1.29E-22	hypothetical protein BRAFLDRAFT_75497	-15.70	3.92E-23
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_234865	15.42	1.54E-22	nadh dehydrogenase subunit 4	-15.58	7.19E-23
	nadh dehydrogenase subunit 4	15.13	1.01E-21	cytochrome b	-15.55	7.73E-23
	low quality protein: uncharacterized protein loc105340758	15.06	1.51E-21	nadh dehydrogenase subunit 2	-15.29	3.48E-22
	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 87f-like isoform x5	14.71	1.56E-20	nadh dehydrogenase subunit 3	-14.92	3.67E-21
	transitional endoplasmic reticulum atpase	14.69	1.67E-20	hypothetical protein LOTGIDRAFT_177987	-14.61	2.58E-20
Gut	cytochrome oxidase subunit i	19.71	1.29E-34	ctrl_halru ame: full=chymotrypsin-like serine proteinase flags: precursor	-20.09	1.85E-35
	nadh dehydrogenase subunit 5	17.16	3.22E-27	nadh dehydrogenase subunit 1	-17.49	4.29E-28
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_177987	15.59	4.53E-23	collagen pro alpha-chain	-16.71	4.68E-26
	collagen alpha-4 chain	15.58	4.53E-23	cytochrome b	-16.65	6.11E-26
	cytochrome c oxidase subunit i	15.39	1.53E-22	von willebrand factor type egf and pentraxin domain-containing protein 1	-16.27	7.60E-25
	deleted in malignant brain tumors 1 partial	15.19	4.86E-22	collagen pro alpha-chain	-16.18	1.21E-24
				nadh dehydrogenase subunit 4	-15.93	6.10E-24
				nadh dehydrogenase subunit 3	-15.85	1.02E-23
				nadh dehydrogenase subunit 4	-15.66	3.10E-23
				nadh dehydrogenase subunit 4	-15.32	2.29E-22

[표 2-3-10] 계속

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	FDR	Blast hit	Log2FC	FDR
Heart	nadh dehydrogenase subunit 5	16.10	3.16E-24	nadh dehydrogenase subunit 5	-16.69	3.31E-25
	low quality protein: uncharacterized protein loc105340758	14.92	3.30E-21	collagen pro alpha-chain	-16.53	4.86E-25
	nadh dehydrogenase subunit 1	14.85	5.44E-21	cytochrome b	-16.26	1.57E-24
	nadh dehydrogenase subunit 4	14.81	6.68E-21	nadh dehydrogenase subunit 4	-16.13	3.16E-24
	transitional endoplasmic reticulum atpase	14.62	1.98E-20	nadh dehydrogenase subunit 4	-16.00	5.63E-24
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_177987	14.52	3.83E-20	nadh dehydrogenase subunit 3	-15.75	2.28E-23
				cytochrome c oxidase subunit i	-15.73	2.28E-23
				nadh dehydrogenase subunit 5	-15.58	6.01E-23
				cytochrome c oxidase subunit i	-15.42	1.71E-22
				nadh dehydrogenase subunit 2	-15.22	5.56E-22
Hemocyte	cytochrome oxidase subunit i	17.38	2.84E-27	alpha-2-macroglobulin-like protein	-17.21	4.57E-27
	nadh dehydrogenase subunit 5	16.56	1.67E-25	hypothetical protein LOTGIDRAFT_174075	-16.98	1.47E-26
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_200884	16.30	8.41E-25	cytochrome b	-16.61	1.48E-25
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_174075	16.07	2.50E-24	nadh dehydrogenase subunit 2	-16.26	9.37E-25
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_235056	15.61	4.75E-23	nadh dehydrogenase subunit 3	-16.16	1.67E-24
	nadh dehydrogenase subunit 4	15.09	1.12E-21	hypothetical protein LOTGIDRAFT_174075	-15.62	4.59E-23
	myosin-2 essential light chain	15.06	1.23E-21	uncharacterized protein loc105329543	-15.51	7.72E-23
				nadh dehydrogenase subunit 4	-15.38	1.69E-22

[표 2-3-10] 계속

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	FDR	Blast hit	Log2FC	FDR
Hepatopancreas	hypothetical protein LOTGIDRAFT_158430	15.67	3.78E-23	hypothetical protein OXYTRI_13058	-18.83	1.21E-31
	cytochrome b	14.95	3.45E-21	hypothetical protein EgrG_000335800	-17.44	8.69E-28
	protein nov-like	14.95	3.45E-21	hypothetical protein OXYTRI_14248	-17.29	1.71E-27
	collagen alpha-4 chain	14.95	3.45E-21	hypothetical protein DAPPUDRAFT_72393, partial	-17.21	2.16E-27
	nadh dehydrogenase subunit 4	14.95	3.45E-21	hypothetical protein glysoja_046946	-16.84	2.31E-26
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_200884	14.86	5.27E-21	cytochrome b	-16.66	6.56E-26
	prohormone convertase 1	14.69	1.63E-20	cytochrome b	-15.95	6.89E-24
	cd109 antigen-like	14.50	4.60E-20	nadh dehydrogenase subunit 1	-15.35	2.99E-22
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_192810	14.45	5.55E-20	nadh dehydrogenase subunit 5	-15.26	5.22E-22
	nadh dehydrogenase subunit 1	14.28	1.71E-19	uncharacterized protein loc105338110	-14.89	4.85E-21
Muscle	hemocyanin isoform 1	15.60	6.27E-23	collagen pro alpha-chain	-17.04	1.08E-26
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_141651	14.93	2.99E-21	nadh dehydrogenase subunit 1	-17.03	1.08E-26
	nadh dehydrogenase subunit 4	14.86	4.92E-21	cytochrome b	-16.72	6.99E-26
	hemocyanin isoform 1	14.65	1.74E-20	collagen pro alpha-chain	-16.45	2.95E-25
	collagen pro alpha-chain	14.51	3.72E-20	nadh dehydrogenase subunit 5	-15.81	1.82E-23
	cytochrome b	14.37	8.78E-20	cytochrome b	-15.26	5.47E-22
				hypothetical protein LOTGIDRAFT_200673	-15.21	6.96E-22
				hypothetical protein LOTGIDRAFT_218011	-15.20	7.09E-22
				myosin heavy striated muscle-like	-15.18	7.51E-22



[그림 2-3-14]

부화 후 24개월 성장 2배체 및 3배체 참전복의 조직별 차등발현전사체의 MA 및 volcano plot

[표 2-3-11]

부화 후 24개월 성숙 2배체, 3배체 참전복의 조직별 차등발현전사체수 ($|\log_2FC| > 1$, $FDR < 0.05$)

Sex	Tissue	Up-regulated DEGs	Down-regulated DEGs	Total
Female	Gill	6,677	13,379	20,056
	Gonad	12,881	9,488	22,369
	Heart	8,125	10,897	19,022
	Hemocyte	6,080	4,792	10,872
	Hepatopancreas	7,303	9,555	16,858
	Muscle	12,079	14,525	26,604
	Total (unique)	53,145 (34,600)	62,636 (35,960)	115,781 (70,560)
Male	Gill	5,776	4,866	10,662
	Gonad	4,742	6,662	11,404
	Heart	8,228	5,619	13,847
	Hemocyte	4,867	4,983	9,850
	Hepatopancreas	6,033	5,498	11,531
	Muscle	9,067	8,038	17,105
	Total (unique)	38,713 (24,881)	35,666 (23,039)	74,399 (47,920)

[표 2-3-12]

24개월 성장 3배체 암컷 조직별 상위 10개의 상향 및 하향발현 전사체 목록, NCBI NR BLASTx hit 유전자들

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	FDR	Blast hit	Log2FC	FDR
Gill	cytochrome oxidase subunit i	18.77	9.43E-32	cytochrome oxidase subunit i	-19.83	1.16E-34
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_200884	17.72	5.32E-29	cytochrome c oxidase subunit i	-18.37	1.01E-30
	hypothetical protein DAPPUDRAFT_72393, partial	16.26	5.88E-25	cytochrome oxidase subunit i	-18.33	1.01E-30
	hypothetical protein OXYTRI_14248	15.85	6.01E-24	hypothetical protein LOTGIDRAFT_228264	-16.95	9.38E-27
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_234865	15.83	6.61E-24	no hit found	-16.78	2.50E-26
	hypoxia inducible factor-1alpha	15.04	1.01E-21	tryptophan -dioxygenase-like isoform x1	-16.72	3.38E-26
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_208046	14.93	1.90E-21	nadh dehydrogenase subunit 1	-16.06	1.88E-24
	cytochrome b	14.90	2.23E-21			
	glutathione-s-transferase isoform 1	14.90	2.23E-21			
	GJ16721	14.68	8.76E-21			
Gonad	cytochrome oxidase subunit i	19.93	3.79E-34	cytochrome oxidase subunit i	-21.73	5.11E-40
	vitelline envelope zona pellucida domain protein 16	16.31	3.46E-24	cytochrome c oxidase subunit i	-20.40	2.56E-36
	elongation factor 2	16.28	4.10E-24	cytochrome c oxidase subunit i	-19.87	6.77E-35
	polyadenylate-binding protein partial	16.18	7.37E-24	no hit found	-18.70	1.42E-31
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_231082	16.16	8.55E-24	ctrl_halru_ame: full=chymotrypsin-like serine proteinase flags: precursor	-18.36	1.20E-30
	hypothetical protein DAPPUDRAFT_72393, partial	16.01	2.31E-23	nadh dehydrogenase subunit 1	-18.33	1.29E-30
	chaperonin containing tcp1	15.86	6.14E-23	vitelline envelope zona pellucida domain protein 26	-18.25	2.03E-30
				ctrl_halru_ame: full=chymotrypsin-like serine proteinase flags: precursor	-18.10	4.80E-30
				hypothetical protein LOTGIDRAFT_122568, partial	-17.78	4.01E-29
				ctrl_halru_ame: full=chymotrypsin-like serine proteinase flags: precursor	-17.20	1.89E-27

[표 2-3-12] 계속

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	FDR	Blast hit	Log2FC	FDR
Heart	cytochrome oxidase subunit i	20.57	3.52E-37	cytochrome oxidase subunit i	-21.72	2.38E-40
	collagen pro alpha-chain	18.87	1.89E-32	cytochrome c oxidase subunit i	-20.46	4.83E-37
	collagen pro alpha-chain	18.62	8.78E-32	cytochrome oxidase subunit i	-19.68	8.60E-35
	collagen pro alpha-chain	17.78	2.21E-29	nadh dehydrogenase subunit 1	-18.44	2.58E-31
	collagen pro alpha-chain	17.76	2.23E-29	carboxypeptidase b-like	-17.44	1.85E-28
	collagen pro alpha-chain	16.79	1.36E-26	calponin-2-like isoform x1	-16.55	6.14E-26
	cytochrome b	16.44	1.13E-25	hypothetical protein LOTGIDRAFT_200673	-16.48	8.95E-26
	calponin-2-like isoform x1	16.42	1.22E-25			
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_200673	16.36	1.62E-25			
Hemocyte	cytochrome oxidase subunit i	18.11	1.24E-29	cytochrome c oxidase subunit i	-17.97	1.24E-29
	cytochrome oxidase subunit i	17.97	1.24E-29	hypothetical protein LOTGIDRAFT_174075	-16.93	6.36E-27
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_174075	17.16	2.07E-27	serine protease inhibitor protein	-16.62	3.97E-26
	procollagen type vi alpha 4	17.05	3.72E-27	uncharacterized protein loc101845595	-16.44	1.06E-25
	alpha-2-macroglobulin-like protein	16.78	1.57E-26	Severin	-15.48	4.42E-23
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_131685	16.45	1.06E-25	hypothetical protein LOTGIDRAFT_233318	-15.09	5.54E-22
	cytochrome oxidase subunit i	16.43	1.06E-25			
	actin	16.23	3.99E-25			

[표 2-3-12] 계속

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	FDR	Blast hit	Log2FC	FDR
Hepa topan creas	cytochrome oxidase subunit i	19.66	1.27E-33	hypothetical protein EgrG_000335800	-20.79	1.85E-37
	cellulase	18.12	2.69E-29	hypothetical protein MTR_5g051000	-20.47	8.02E-37
	uncharacterized protein loc105338110	17.97	6.59E-29	cytochrome oxidase subunit i	-19.75	8.37E-35
	cytochrome b	16.69	2.55E-25	cytochrome oxidase subunit i	-18.95	1.25E-32
	nadh dehydrogenase subunit 1	16.64	3.31E-25	cytochrome c oxidase subunit i	-18.48	2.68E-31
	cytochrome b	16.44	1.23E-24	hypothetical protein LOTGIDRAFT_230050	-18.09	3.51E-30
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_163475	16.24	4.52E-24	collagen pro alpha-chain	-17.29	6.23E-28
	hypothetical protein OXYTRI_14248	15.65	1.63E-22	nadh dehydrogenase subunit 1	-12.71	1.88E-27
	hypothetical protein EgrG_000335800	15.63	1.81E-22			
Muscle	cytochrome oxidase subunit i	19.85	7.74E-35	cytochrome oxidase subunit i	-19.79	7.74E-35
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_109284	19.26	2.17E-33	hypothetical protein LOTGIDRAFT_228264	-18.36	6.52E-31
	collagen pro alpha-chain	18.51	2.92E-31	cytochrome c oxidase subunit i	-18.30	7.90E-31
	collagen pro alpha-chain	17.58	8.97E-29	hypothetical protein DAPPUDRAFT_72393, partial	-18.22	1.21E-30
	collagen pro alpha-chain	17.50	1.22E-28	60s ribosomal protein l4-like	-16.34	1.76E-25
	collagen pro alpha-chain	16.97	3.24E-27	hypothetical protein LOTGIDRAFT_200673	-16.32	1.88E-25
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_234865	16.52	5.78E-26	cytochrome oxidase subunit i	-16.15	5.70E-25
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_231723	16.42	1.08E-25			
	collagen alpha-4 chain	16.34	1.76E-25			

[표 2-3-13]

24개월 성장 3배체 수컷 조직별 상위 10개의 상향 및 하향발현 전사체 목록, NCBI NR BLASTx hit 유전자들

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	FDR	Blast hit	Log2FC	FDR
Gill	cytochrome oxidase subunit i	18.48	1.31E-30	PREDICTED: putative aminopeptidase W07G4.4	-16.92	2.16E-26
	hypothetical protein MTR_5g051000	18.00	1.91E-29	hypothetical protein BRAFLDRAFT_75497	-16.47	3.88E-25
	tryptophan -dioxygenase-like isoform x1	14.92	5.36E-21	cytochrome c oxidase subunit i	-16.25	1.40E-24
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_190816	14.72	1.80E-20	hypothetical protein LOTGIDRAFT_209217	-16.01	4.41E-24
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_192974, partial	14.58	4.15E-20	nadh dehydrogenase subunit 1	-15.98	4.98E-24
	uncharacterized protein loc101854317	14.31	2.52E-19	serine threonine-protein phosphatase alpha-2 isoform	-15.16	1.17E-21
				GJ16721	-15.12	1.47E-21
				hypothetical protein LOTGIDRAFT_192974, partial	-14.85	8.07E-21
				nadh dehydrogenase subunit 5	-14.67	2.35E-20
Gonad	cytochrome oxidase subunit i	18.17	6.05E-30	cytochrome c oxidase subunit i	-17.13	3.19E-27
	hypothetical protein EgrG_000335800	16.98	7.29E-27	serine threonine-protein phosphatase alpha-2 isoform	-16.53	1.48E-25
	uncharacterized protein loc105348423	16.17	1.50E-24	ornithine decarboxylase 1	-15.00	3.42E-21
	nadh dehydrogenase subunit 1	14.43	1.41E-19	nadh dehydrogenase subunit 5	-14.87	7.41E-21
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_190816	14.32	2.79E-19	high mobility group protein dsp1-like isoform x1	-13.82	6.57E-18
	nadh dehydrogenase subunit 1	13.90	4.48E-18			
	multifunctional protein ade2-like	13.85	6.12E-18			
	nadh dehydrogenase subunit 5	13.82	6.57E-18			

[표 2-3-13] 계속

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	FDR	Blast hit	Log2FC	FDR
Heart	cytochrome oxidase subunit i	19.98	4.21E-35	cytochrome c oxidase subunit i	-18.92	2.26E-32
	nadh dehydrogenase subunit 1	19.25	3.42E-33	serine threonine-protein phosphatase alpha-2 isoform	-16.05	2.90E-24
	hypothetical protein OXYTRI_14248 [Oxytricha trifallax]	17.49	2.27E-28	nadh dehydrogenase subunit 5	-16.05	2.90E-24
	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1-like	15.95	5.27E-24	nadh dehydrogenase subunit 1	-15.83	1.09E-23
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_161404	15.60	4.51E-23	paramyosin [Haliotis discus discus]	-15.19	4.82E-22
	collagen pro alpha-chain	15.50	8.19E-23	heat shock protein 90	-14.53	3.60E-20
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_160662	15.44	1.12E-22	hypothetical protein LOTGIDRAFT_142841, partial	-14.29	1.68E-19
				collagen pro alpha-chain	-14.29	1.68E-19
Hemo cyte	PREDICTED: peflin-like	15.59	7.69E-23	cytochrome c oxidase subunit i	-17.69	3.18E-28
	hypothetical protein OXYTRI_14248 [Oxytricha trifallax]	15.56	8.47E-23	nadh dehydrogenase subunit 1	-17.15	6.71E-27
	deleted in malignant brain tumors 1 isoform x1	15.19	6.64E-22	serine threonine-protein phosphatase alpha-2 isoform	-16.67	1.27E-25
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_174075	14.90	3.95E-21	hypothetical protein LOTGIDRAFT_131685	-16.42	4.26E-25
	PREDICTED: peflin-like	14.79	7.66E-21	hypothetical protein LOTGIDRAFT_233318	-15.87	1.60E-23
				limulus clotting factor c-like	-15.47	1.38E-22

[표 2-3-13] 계속

Tissue	상향발현조절			하향발현조절		
	Blast hit	Log2FC	FDR	Blast hit	Log2FC	FDR
Hepa topan creas	cytochrome oxidase subunit i	17.88	5.78E-28	cytochrome c oxidase subunit i	-17.81	1.76E-28
	hypothetical protein OXYTRI_13058	17.05	8.98E-26	nadh dehydrogenase subunit 1	-17.21	3.68E-27
	cd109 antigen-like isoform x3	16.41	6.16E-24	hypothetical protein LOTGIDRAFT_191852	-15.46	2.49E-22
	no hit found	16.10	4.53E-23	collagen alpha-4 chain	-15.10	1.98E-21
	cd109 antigen-like isoform x4	15.74	3.51E-22	serine threonine-protein phosphatase alpha-2 isoform	-14.91	5.74E-21
	cd109 antigen-like isoform x2	15.58	9.77E-22	cd109 antigen-like	-14.91	5.74E-21
	hypothetical protein LOTGIDRAFT_158430	14.70	2.06E-19	hypothetical protein LOTGIDRAFT_131754, partial	-14.55	6.54E-20
				transmembrane protein 144-like isoform x5	-14.43	1.36E-19
				PREDICTED: endoglucanase-like	-14.15	7.30E-19
Muscle	hypothetical protein DAPPUDRAFT_72393, partial	17.89	4.22E-29	hypothetical protein LOTGIDRAFT_228264 [Lottia gigantea]	-19.82	1.27E-34
	hypothetical protein DAPPUDRAFT_72393, partial	17.30	1.01E-27	nadh dehydrogenase subunit 1	-17.11	3.04E-27
	PREDICTED: cubilin-like	16.59	7.75E-26	uncharacterized protein loc105325156	-16.28	5.76E-25
	troponin skeletal muscle-like isoform x2	15.79	1.29E-23	serine threonine-protein phosphatase alpha-2 isoform	-16.01	3.36E-24
	troponin skeletal muscle-like isoform x2	15.74	1.71E-23	von willebrand factor type egf and pentraxin domain-containing protein 1-like isoform x2	-15.84	1.04E-23
	heat shock protein 90	15.00	1.83E-21	nadh dehydrogenase subunit 4	-15.47	1.01E-22
	troponin skeletal muscle-like isoform x2	14.89	3.86E-21	hypothetical protein LOTGIDRAFT_109284	-15.45	1.07E-22
				glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	-15.12	9.20E-22
				troponin skeletal muscle-like isoform x2	-15.09	1.07E-21

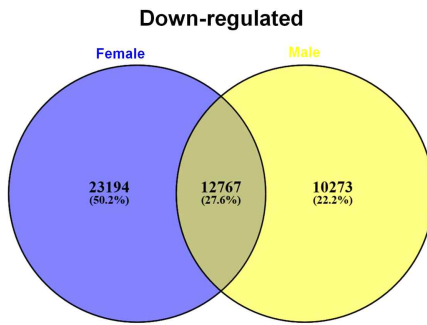
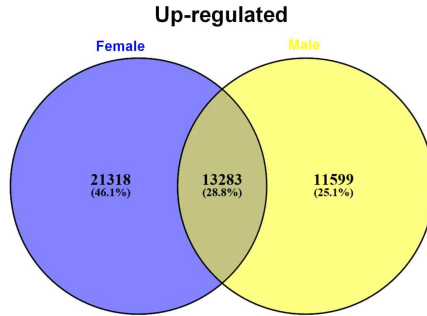
라. 3배체 참전복의 발생, 성장 단계별 특이 차등 발현 전사체의 동정 및 발현패턴검증

(1) 발생 및 성장 단계별 상향 발현 전사체

- 발생단계(상실배, 담륜자, 피면자의 합)의 28개, 치패(8개월) 262개, 중패(16개월) 22,968개, 성패(24개월) 46,200개의 조직별 중복값이 없는 상향 발현 전사체를 Venn diagram으로 비교하였다[그림 2-3-16].
- 발생단계에서 8개, 치패 130개, 중패 8,052개, 성패 31,216개의 특이 상향 발현 전사체가 나타났다.
- 또한, 모든 발생, 및 성장단계에서 공통으로 두 개의 상향 발현 전사체 (HH_3N_PB_12571.1 및 HH_3N_PB_65166.1)가 동정되었다. HH_3N_PB_12571.1는 cytochrome oxidase subunit 1였으며, HH_3N_PB_65166.1는 blast 검색결과 유사성을 나타내지 않았다.

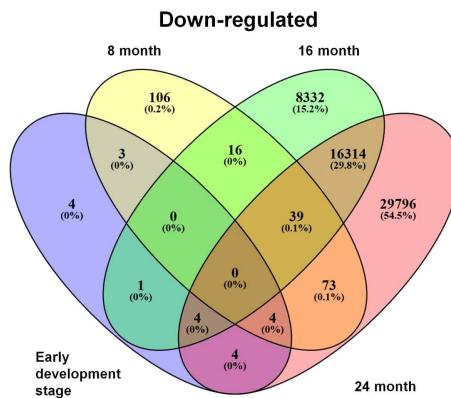
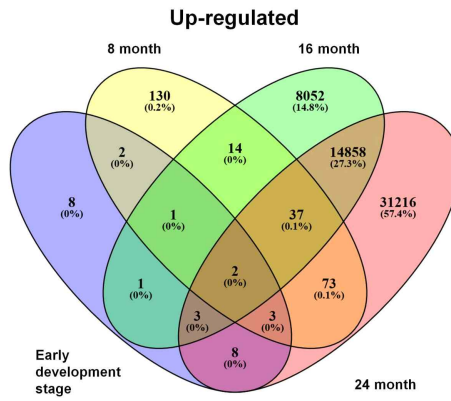
(2) 발생 및 성장 단계별 하향 발현 전사체

- 발생단계 총 21개, 치패(8개월) 241개, 중패(16개월) 24,706개, 성패(24개월) 46,234개의 조직별 중복값이 없는 하향 발현 전사체를 비교하였다[그림 2-3-16].
- 발생단계 4개, 치패 106개, 중패 8,332개, 성패 29,796개의 특이 하향발현 전사체가 나타났다. 하지만 발생, 및 성장단계에서 공통 하향발현 전사체는 나타나지 않았다.
- 이러한 결과를 바탕으로 동정된 발생, 성장단계별 특이적 또는 공통적 상향 발현 전사체는 3배체 참전복의 배수체 효과의 발생 및 성장단계에 따른 특성을 이해하는데 기초자료가 될것이라 생각한다.



[그림 2-3-15]

24개월 성장 3배체 참전복 암컷, 수컷의 특이적 또는 공통 차등발현전사체수

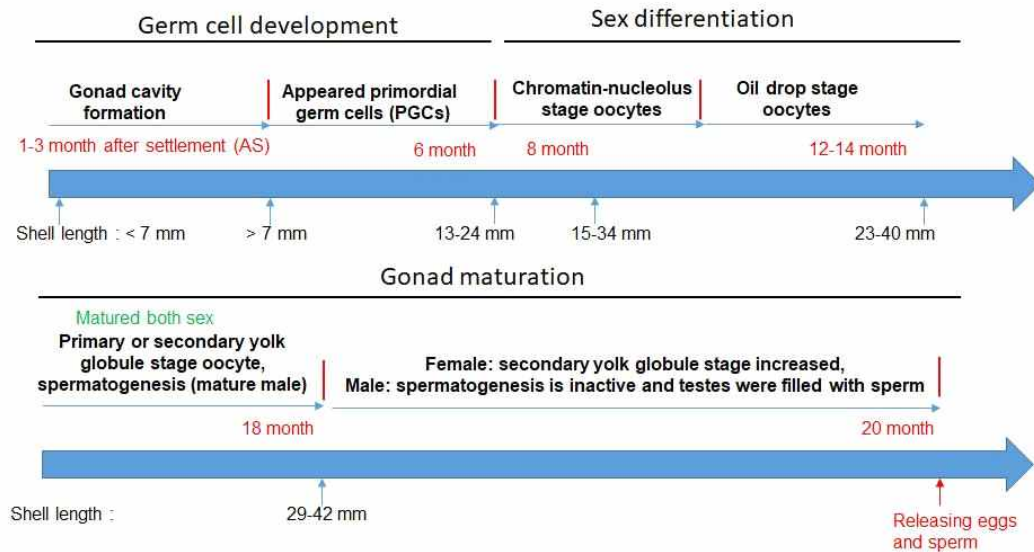


[그림 2-3-16]

3배체 참전복 발생과 성장에 연관된 공통 또는 특이적 차등발현전사체

(3) 발현패턴 검증을 위한 유전자 선발

- 전복의 생식소 발달과정은 크게 germ cell development, sex differentiation, 및 gonad maturation의 3단계로 구분할 수 있다[그림 2-3-17]. 그중 미성숙 참전복의 hepatopancreas 조직은 안쪽 부분의 소화샘(digestive gland)와 바깥쪽의 미성숙 생식소(gonad)로 이루어진 complex구조로 에너지대사 및 생식에 중요한 역할을 담당하는 기관이다. 따라서, NGS분석 시료 중 16개월 중패의 hepatopancreas는 에너지대사 및 생식소 성숙의 중요한 시기 및 조직이라 생각된다.
- 따라서, 16개월 3배체 중패 hepatopancreas에서 동정된 차등발현전사체 18개를 임의로 선택하여, NGS분석 데이터의 신뢰성 검증 및 유전자의 발현패턴을 검증하고자 하였다.



[그림 2-3-17]

전복 생활사에 따른 생식소 발달과정

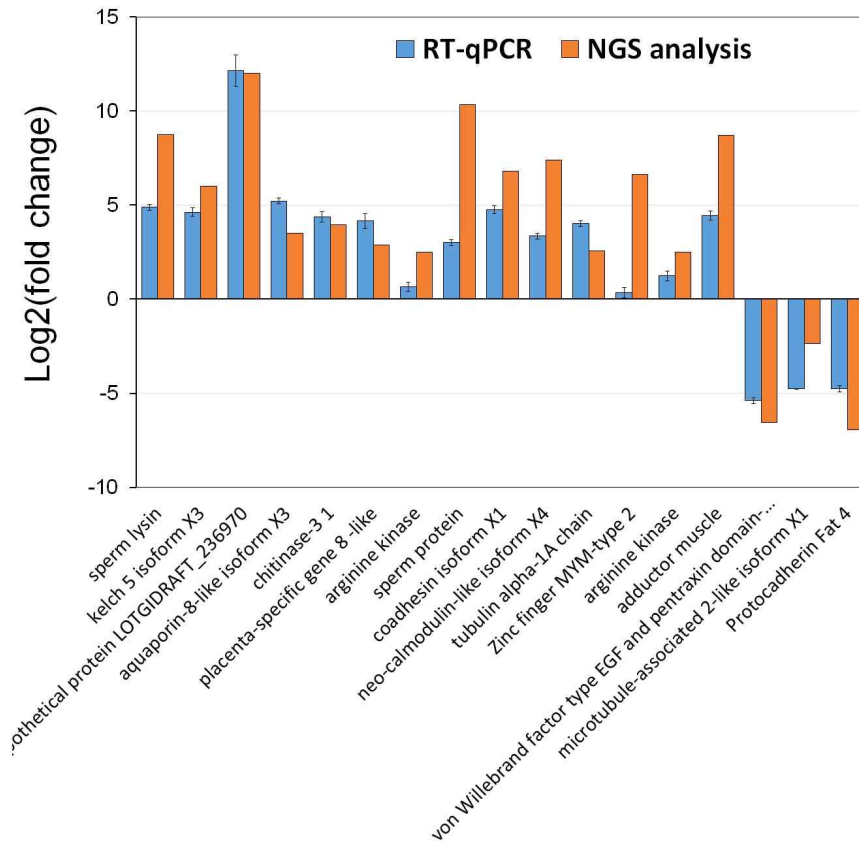
(4) 발현패턴 검증을 선발유전자의 RT-qPCR 검증

- : 선발된 전사체들의 프라이머를 reference transcriptome의 염기서열을 바탕으로 제작하였다[표 2-3-14].
- : 선발된 모든 전사체들은 NGS분석의 결과와 유사하게 상향 및 하향발현조절 되었으며, 차등발현량(log2FC)도 NGS의 차등발현량과 유사한 결과를 나타내었다 [그림 2-3-18].
- : 이러한 결과는 긴 생활사 동안 전복 양식 과정 중 나타날 수 있는 다양한 생리, 형태적 특성변화의 원인 및 종류 대하여 NGS분석이 그 정도를 분석하는 기초자료로 활용될 수 있으며, 아울러 3배체 종자에 특화된 양식 관리 매뉴얼을 수립하거나 3배체의 장점을 최대화 시킬 수 있는 전략을 수립하는 중요한 자료가 될 수 있음을 제시한다.

[표 2-3-14]

발현패턴 검증을 위한 16개월 3배체 참전복으로부터 동정된 차등발현유전자 및 프라이머 서열

Description	Forward primer	Reverse primer
Sperm lysin	TCCGATAGCTTCTCTGGACA	GCAATGAAGGTAGGGATGGT
Kelch 5 isoform X3	GATCACGTGAAGTTGAACGC	TTGGCAATGGTAGGGACGTA
Hypothetical protein LOTGIDRAFT_236970	CTGTGTACCGTAAAGGTCTC	ATGTTCCGTTAGCGCACAGA
Aquaporin-8-like isoform X3	TGTAGAGCAGTTCTCCTCGA	GGTTCATTGATCCACCCGTA
Chitinase-3 1	TCACTCCCGACCTTAATGTG	TCCCATACGTAGCTAGCTTC
Placenta-specific gene 8 -like	CAGAAGAGGAAGTGGTCATC	CTTGAGCTCACGAGCAAGTT
Arginine kinase	TTCGAGAAGTTCACTGGCGA	GGAAGGTCCTGTCTGTTGTTG
Sperm protein	GATGGCGACTTAGTGATGCT	TTCGTCGAAACCGAGGCTCA
Cadherin isoform X1	ACGTGAGCAATGTCGTCGAA	ATCTTGGTTCACCACGCATG
Tubulin alpha-1A chain-like	CTGATGACGTCATGCGATGA	TGGATGCCATGTTCAAGGCA
Neo-calmodulin-like isoform X4	TGTCAGCAGCTAGGAAC TTC	AAGGATAGTCTGGGACTGAG
Zinc finger MYM-type 2	CATCACTGGTACTCTCTCG	GAGTGT CAGGACTCTCTTCA
Arginine kinase	CCTTCGAGAAGTTCACTGGC	GAGATGGTCCTCCTCGTTTA
Essential light adductor muscle-like	GCTGTTCCACCACAATCAAG	ATACTCCGTCCTGGATTGGTG
Von Willebrand factor type EGF and pentraxin domain-containing 1-like	ATACACCTGCAACCAGGGAT	TTACAGGGTAGACGTGTGTC
Microtubule-associated 2-like isoform X1	TAAGTCGGATGGTTCTGCAC	CAGTTTGGGTT CAGTGGAGT
Protocadherin Fat 4	TCGTGGTAGAAGCAACGGAT	CAAGACGCCTTCTTCGTCTA



[그림 2-3-18]

선발된 16개월 3배체 참전복 중패의 차등발현전사체 발현패턴 검증

2-4. 배수체의 환경 스트레스에 대한 발현반응 특징평가

○ 필요성

- : 육종된 우량 전복 및 배수체 전복의 대량유도 및 처리기술이 확립되어 2단계 시범생산과 민간현장 시험이 이루어졌으며, 현장 양식장의 육종 전복 및 배수체 전복의 대량유도 및 처리기술의 보급 및 수요가 지속적 증가하였다.
- : 긴 생활사 동안 전복 양식 과정 중 나타날 수 있는 다양한 환경변화에 대한 이배체 및 배수체 전복 사이의 동등 및 차등 반응을 나타내는 원인과 그 정도를 분석하는 것은 배수체 전복의 특화된 양식관리지침 수립에 유용할 뿐만 아니라, 배수체 전복의 장점을 극대화시켜 생산성을 높이고 최고 품질의 건강한 배수체 전복생산을 위한 전략을 수립하는데 매우 중요하다.
- : 그러나 가능한 모든 경우의 수와 가능성에 대해서 in vivo 시험처리를 하고 발현 유전체 분석을 수행하는 것은 방대한 경비와 시간을 요구하기 때문에 현실적으로 불가능하다. 따라서 배수체 전복 종자의 산업화 측면에서 시급성과 중요도를 고려하여 유의미한 차등 발현 유발 요인을 적절히 선별하는 것이 특히 중요하다.
- : 배수체효과 가설에 따라 생식능력 억제로 인한 에너지 분배, 추가 염색체 세트로부터의 부가적인 유전적 영향, 이형접합성(heterozygosity) 증가, 및 세포크기에 거대증(gigantism) 등이 예측되므로 이배체와 달리 환경에 대한 차등 분자유전학적 특성을 나타내리라 예상된다.
- : 온도는 생물학적 반응속도에 영향을 주어 다양한 생리 반응의 변화를 일으키며, 이러한 생리 반응의 변화에 필요한 대부분의 에너지는 호기성 대사과정에 의해 생성된다. 그러므로, 환경 스트레스 중 온도와 산소는 생물학적 시스템을 지배하는 가장 중요한 환경변수이다.
- : 따라서, 현재까지 수집된 유전 정보를 바탕으로 유의미한 환경변동요인에 대한 실험적인 모델을 구축하고, 구축된 모델을 바탕으로 이배체와 배수체 전복간 환경에 대한 차등 반응 여부에 관한 분자유전학적 특성분석이 필요하다.

○ 목적

- : 환경변동요인인 온도와 산소에 변동에 따른 이배체와 배수체 전복의 스트레스 반응 실험모델을 구축하여 환경변동요인에 대한 이배체 및 배수체 전복의 동등 및 차등 발현유전자들을 발굴하여 배수체 전복의 환경변동요인에 대한 생리적 반응 메커니즘 이해를 위한 과학적 자료를 제시한다.

○ 연구수행방법

- : 전복양식현장에서 발생 가능한 환경변동 요인인 고수온 및 저산소 상황을 실험실 내 시험처리모델을 구축하였다.
- : 구축된 실험모델을 바탕으로 이배체 및 배수체 전복의 고수온 및 저산소를 처리

후 발현하는 전사체 DB를 구축하였으며, 이를 바탕으로 고수온 및 저산소에 대한 차등 발현 전사체를 이배체 및 배수체 전복 각각으로부터 동정하였다.

- : 이배체 및 배수체 전복으로부터 동정된 고수온 및 저산소 반응 차등 발현 전사체의 차이를 비교 분석하여, 배수체 전복이 고수온 및 저산소 환경에 어떻게 반응하는가에 대한 분자유전학적 해석과 함께 생리반응을 설명하고자 하였다.
- : 아울러, 고수온 처리에 대한 7개의 열충격 단백질 유전자들(heat shock protein genes, HSPs)의 발현 특징을 이배체 및 배수체 전복에서 비교분석 하였으며, 저산소, 고수온 및 중금속 처리와 미생물 감염 실험에 대한 저산소-유도인자-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 유전자의 발현 특징도 이배체 및 배수체 전복에서 비교분석 하였다.

가. 환경(고수온 및 저산소) 스트레스에 대한 배수체 차등발현유전자(differentially expressed genes) NGS 분석

(1) 환경 스트레스에 대한 배수체 발현반응 특징 평가모델 구축

- 국립수산과학원 수산종자육종연구소 (제1세부)에서 수정 된 후 3개월 성숙 이배체 및 배수체 전복을 부경대학교(제2세부) 실험실로 옮겨 실내 배양수조(3톤용량)에 수온(18~20°C)와 용존산소(7~8 ppm)를 유지하며 배양하였다.
- 환경스트레스 반응 시험을 위한 이배체 및 배수체는 평균각장, 50.5 \pm 5.6 mm의 전복을 시험대상으로 사용하였다.
- 고수온 처리시험 모델
 - : 고수온 처리는 20 \pm 0.2°C에서 30 \pm 0.2°C까지 시간당 2°C의 온도 증가율로 증가시켰으며, 30°C 도달 후 24시간 유지하였다. 실험기간 동안 용존산소량은 8.0 \pm 0.5 ppm으로 유지하였다.
- 저산소 처리시험 모델
 - : 저산소 처리는 용존산소량 8.0 \pm 0.5 ppm에서 2.0 \pm 0.5 ppm까지 시간당 2 ppm의 용존산소 감소율로 감소시켰으며, 2 ppm 도달 후 24시간 유지하였다. 실험기간 동안 수온은 20°C로 유지하였다.
- 고수온 저산소 시험모델에 대한 대조군의 수온 및 용존산소량은 각각 20 \pm 0.2°C, 8.0 \pm 0.5 ppm으로 유지하였다.

(2) 전사체 서열분석 및 참조전사체 구축[표 2-4-1].

- 1단계에서 최적화된 간췌장(hepatopancreas) total RNA의 추출방법 따라 mRNA를 추출하여 Illumina사의 “TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit”를 사용하여 총 6개 그룹 (이배체: 대조군, 고온 처리군, 저산소 처리군; 배수체: 대조군, 고온 처리군, 저산소 처리군)의 cDNA 라이브러리들을 구축하였다.

- 구축된 cDNA 라이브러리는 Illumina NextSeq 500 플랫폼으로 paired-end (2 x 75 bp) 서열분석을 하여 이배체 대조군에서 가장 적은 59,258,806개의 raw read와 배수체 저산소 처리군에서 가장 많은 68,383,604개의 raw read들이 Q30 88.5~91.3% 범위로 얻어졌다.
- 얻어진 raw read들은 Cutadapt (v1.9) algorithm을 사용하여 clean read들로 필터링하여 총 316,085,993개의 clean read들을 얻었다.
- Clean read들을 Trinity tool (v2.5.1) software *k-mer* 25의 값으로 de novo assembly 하여 총 271,039개의 contig가 얻어졌다.
- Contig들을 CD-HIT-EST 플랫폼(threshold=97% identity)을 이용하여 중복 contig들을 제거하였으며, 최종적으로 209,947개의 비중복 전사체 (non-redundant transcript)들이 총길이 163,506,864bp, 평균길이 778.7bp, N50 1,301bp, GC 비율 43.27% 및 길이범위 201~36,434bp에서 얻어졌다.
- Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs v3.0.2 software (BUSCO, <http://busco.ezlab.org/>)를 사용하여 Eukaryote(eukaryote_odb9) 및 Metazoa (metazoa_odb9)를 포함하는 두 개의 gene data set DB에 대해 완성도를 조사한 결과, 98.7%의 complete BUSCO가 metazoa 및 eukaryote DB에서 검출되었다. 이러한 결과는 참조전사체의 높은 질적 완성도를 나타낸다.
- 구축된 cDNA 라이브러리 및 전사체 DB는 미국 국립생물공학정보센터 (NCBI) DB에 Bioproject accession ID. PRJNA597237에 등록하였다.

(3) 참조전사체 기능분석

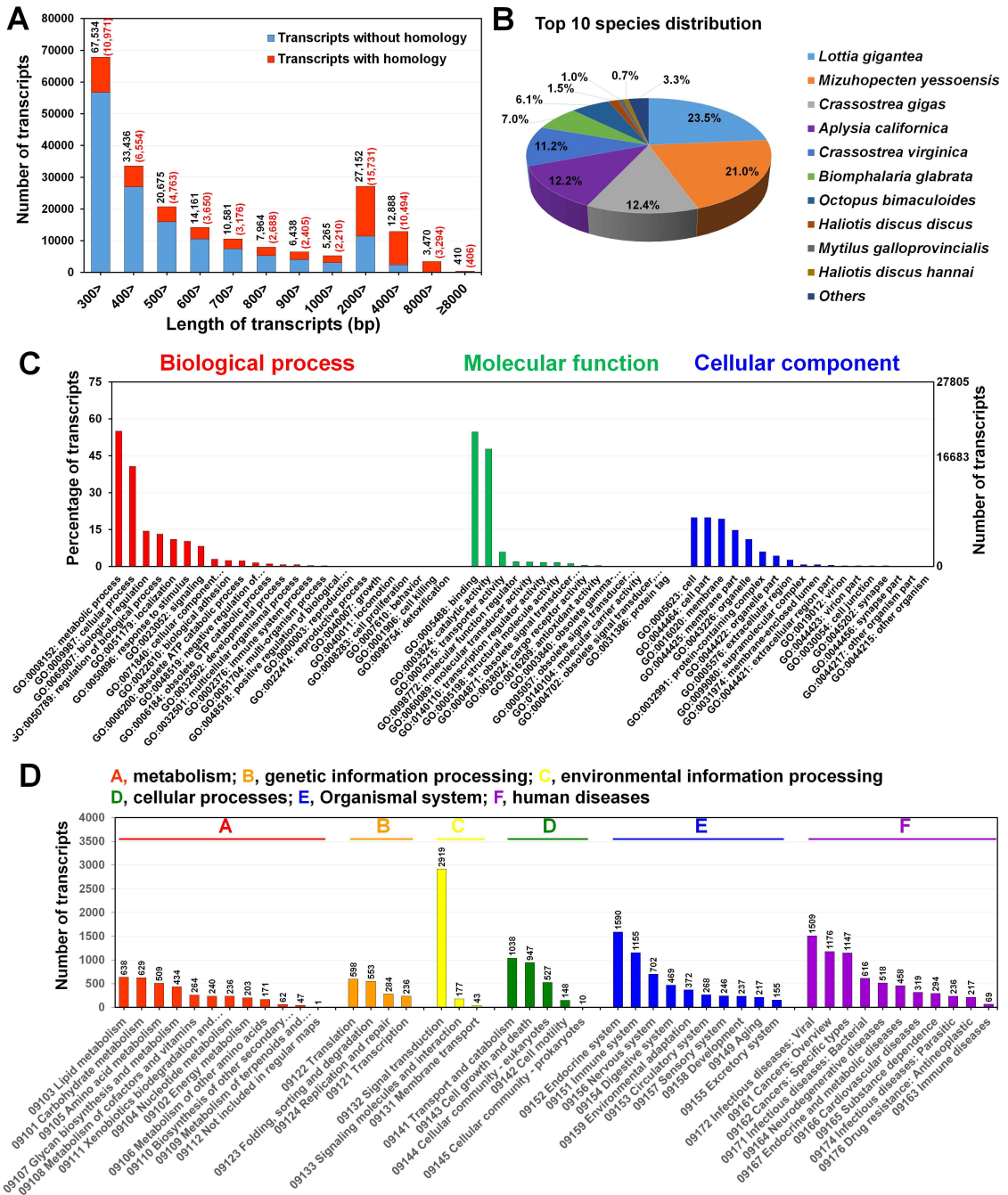
- 참조전사체의 기능분석은 NCBI non-redundant protein DB에 BLASTx algorithm을 이용하여 수행하였다. 그 결과 총 63,581 전사체가 annotation되었으며[그림 2-4-1A], 23.5% 전사체 서열이 *Lottia gigantea*와 유사성을 나타냈으며 21.0% 전사체 서열이 *Mizuhopecten yessoensis*와 12.4%는 *Crassostrea gigas*와 12.2%의 전사체 서열이 *Aplysia californica*와 유사성을 나타내었다[그림 2-4-1B]. 한편 총 2,588개의 전사체 서열은 26 Haliotis 종에서 유래한 전사체들과 유사성을 나타내었다.
- 유전자 온톨로지는 (gene ontology, GO)는 전체적인 유전자 기능과 관련된 개념을 정의하고 이러한 기능이 어떤 유기체에서 어떻게 서로 연관되어 있는가에 대한 정보를 제공한다. KEGG pathway 분석은 이배체-배수체 간체장의 전사체들의 연관된 잠재적인 대사경로에 대한 정보를 제공한다.
- 이배체 및 배수체 간체장 참조전사체의 GO 분석결과 총 37,008 전사체들이 74,717 GO term으로 분류되었으며, 이들은 세 개의 주 카테고리인 biological process (BP) 카테고리에 28,608 term들, molecular function 카테고리에

31,810 term들 및 cellular component (CC) 카테고리에 14,299 term들이 분포되었다[그림 2-4-1C].

- 둘 이상의 분자 기능의 정렬된 조립을 설명하는 BP 카테고리는 25 하위 카테고리를 나타냈으며, 이들 중 “metabolic process”에 20,402 전사체 (55.0%)로 가장 많은 수의 전사체가 분류되었고, 그 다음에 “cellular process”(15,092 전사체, 40.7%), “biological regulation” (5,343 전사체, 14.4%)를 차지하였다.
- 유전자 산물이 수행하는 생화학적 활동을 설명하는 MF 카테고리는 15개의 하위 카테고리로 분류되었으며, 20,290 전사체(54.7%)가 “binding” 카테고리에, 17,709 전사체 (46.4%) 전사체가 “catalytic activity”에 그리고, 2,178 전사체 (5.9%)가 “transporter activity”에 분류되었다.
- 세포구조와 관련된 유전자 및 그들 산물의 기능을 설명하는 CC 카테고리는 18개 하위 카테고리로 분류되었으며, “cell”(7,378 전사체, 19.9%) 및 “cell part”(7,378 전사체, 19.9%)에 가장 많은 전사체들이 분류되었으며, 다음으로 “membrane”(7,144 전사체, 19.3%) 및 “membrane part”(5,458 전사체, 14.7%)로 나타났다.
- 이배체 및 배수체 간체장 참조전사체의 KEGG pathway 분석결과 5,784 KEGG orthology를 가지는 10,934 전사체 (NCBI NR annotation된 전사체 중 16.4%)들이 439 biological pathways를 포함하는 6개의 주된 KEGG 카테고리로 분류되었다[그림 2-4-1D].
- KEGG pathway의 주된 카테고리중 하나인 metabolism 카테고리에서 “Global and overview maps”에 가장 많은 1,500 전사체가 포함되었고, 다음은 environmental information processing 카테고리에서 “signal transduction” (1,397 전사체)였다.

(4) 전사체들의 발현분석

- 전사체들의 발현정도는 TopHat software를 이용하여 각 시험군 라이브러리의 clean read들을 참조전사체에 매핑하여 fragment per kilobase million mapped read (FPKM) 값을 구함으로써 분석하였다.
- 각 시험군 라이브러리의 read들의 매핑율은 [표 2-4-1]에 나타내었으며, 그 범위는 배수체 대조군 라이브러리가 70.3%부터 이배체 저산소 처리군 라이브러리가 75.6%로 전체적으로 높은 매핑율을 나타내었다. 이러한 결과는 고수온 및 저산소 처리 실험모델이 재현 가능하며, 발현반응 전사체들의 높은 질적 완성도를 가짐을 나타낸다.
- 또한 FPKM 값의 라이브러리별 분포는 배수체의 대조군, 고수온 처리군, 저산소 처리군 사이의 차이는 나타나지 않았으나, 이배체보다는 높은값을 보였다[표 2-4-2]. 이러한 결과는 배수체 전복이 고수온 및 저산소 처리에 대한 빠른 생리적 반응이 일어남을 암시한다.



[그림 2-4-1]

환경 스트레스에 대한 이배체 및 배수체 전복 참조 전사체의 기능분석.

(A) NCBI NR annotation 결과요약, (B) 전사체들의 유사성 중 분포,

(C) GO 기능분석, (D) KEGG 경로분석

[표 2-4-1] 이배체 및 배수체 전복 간췌장 전사체 서열분석 및 MxS 설명

MxS descriptors						
Item	Description	Item	Description	Submitted_to_INSDC		
Investigation_type	Mollusca	Material	Sea water (ENVO:00002149)	Bioproject	PRJNA597237	
Collection_date	Jun-17, 2017	Env_package	Water	Biosample	SAMN13671000	
Country	South Korea (Busan)	Sample_type	Hepatopancreas	SRA	SRP238538	
Biome	Aquatic biome (ENVO:00002030)	Maturity	Immature	TSA		
Feature	Laboratory rearing	Ploidy	Diploid and triploid			
Sequencing stats (NexSeq 500; paired-end, 2 × 75 bp) and expression profiling (TopHat v2.1.1)						
Sample	Diploid			Triploid		
	Control	High temperature	Hypoxia	Control	High temperature	Hypoxia
No. of PE raw reads	59,258,806	66,719,950	63,209,452	61,648,212	66,424,270	68,383,604
Q30 bases (% ≥)	91.3	88.5	91.2	89.4	91.1	90.9
Mean quality Score of reads	33.8	33.2	33.8	33.4	33.8	33.7
Number of bases (Mb)	4,503	5,071	4,805	4,685	5,047	5,197
No. of PE clean reads	58,103,632	64,599,182	61,282,580	58,077,262	65,104,924	66,963,942
Number of bases (bp)	4,260,221,692	4,616,883,874	4,537,747,386	4,264,164,902	4,771,513,248	4,905,921,412
No. of mapped reads	45,830,959	49,373,179	48,263,550	46,467,993	51,511,541	52,674,609
Mapping rate (%)	78.9	76.4	78.8	80.0	79.1	78.7
De novo assembly stats (Trinity v2.5.1) and removing non-redundant transcripts (CD-HIT-EST v4.7)						
No. of assembled contigs	No. of bases (bp)	GC contents (%)	Length of smallest/largest contig	Average length (bp)	Median length (bp)	N50 (bp)
271,039	238,026,377	43.27	201/36,434	878.20	456	1,553
No. of non-redundant transcript	No. of bases (bp)	GC contents (%)	Length of smallest/largest transcript	Average length (bp)	Median length (bp)	N50 (bp)
210,630	163,757,282	43.19	201/36,434	777.46	415	1,298
Completeness assessment (BUSCO v3.0.2)						
BUSCOs	Metazoa odb9			Eukayota odb9		
	Number	%total		Number	%total	
Complete	965	98.7		299	98.7	
Complete and single-copy	698	71.4		209	69.0	
Complete and duplicated	267	27.3		90	29.7	
Fragmented	12	1.2		4	1.3	
Missing	1	0.1		0	0	
Total BUSCO groups searched	978			303		

[표 2-4-2]

이배체 및 배수체 대조군, 고수온 및 저산소 처리군 라이브러리 전사체들의 발현양 분포

Sample	FPKM ^a >0	FPKM≥1	0<FPKM≤1	1<FPKM≤10	10<FPKM≤100	FPKM>100
대조군	185,076	67,766	117,300	58,230	7,836	1,701
	87.9 ^b	36.6 ^c	63.4 ^c	31.5 ^c	4.2 ^c	0.9 ^c
이배체 고온처리군	181,330	59,424	121,906	51,542	6,410	1,472
	86.1	32.8	67.2	28.4	3.5	0.8
저산소처리군	184,261	57,287	126,974	49,330	6,358	1,599
	87.5	31.1	68.9	26.8	3.5	0.9
대조군	187,210	76,300	110,910	66,100	8,723	1,477
	88.9	40.8	59.2	35.3	4.7	0.8
배수체 고온처리군	185,207	62,110	123,097	53,130	7,379	1,628
	87.9	33.5	66.5	28.7	4.0	0.9
저산소처리군	192,914	63,283	129,631	54,000	7,669	1,614
	91.6	32.8	67.2	28.0	4.0	0.8
평균	186,000	64,362	121,636	55,389	7,396	1,582
	88.3	34.6	65.4	29.8	4.0	0.9

^aFPKM: fragments per kilobase million mapped reads.

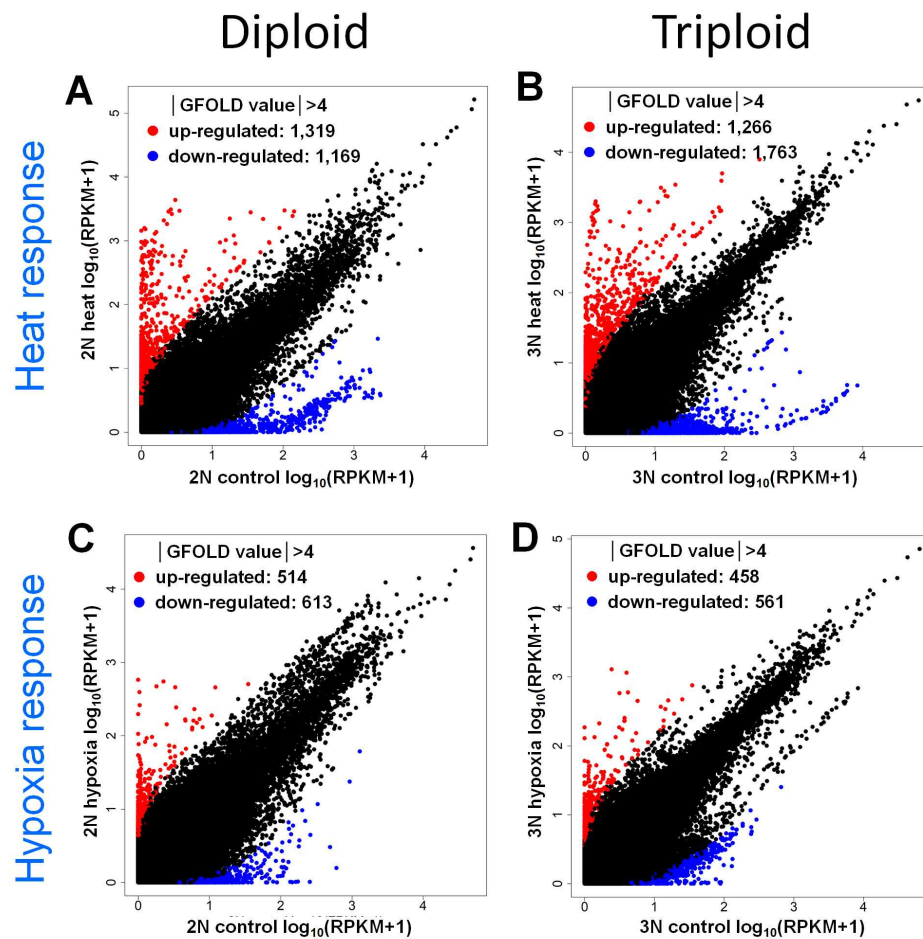
^bThe percentage of transcripts accounting for all non-redundant transcripts in the hepatopancreas transcriptome.

^cThe remaining percentage of transcripts accounting for expressed transcripts in each sample.

(5) 환경 스트레스에 대한 이배체와 배수체 전복의 차등 발현반응 비교 분석

- 환경 스트레스에 대한 이배체 및 배수체 전복의 차등 발현 전사체 동정
 - : 환경 스트레스에 대한 이배체 및 배수체 전복의 차등 발현 전사체들을 비교 분석을 위해, 먼저 이배체 및 배수체 각각에 대한 고수온 및 저산소 반응 차등 발현 전사체를 동정하였다[그림 2-4-2].
 - : 차등발현 전사체의 동정은 GFOLD (generalized fold change) algorithm으로 $|GFOLD\ value| > 4$ 를 컷-오프 값으로 수행하였다.
- 고수온 처리에 대한 이배체 및 배수체 전복의 차등발현 전사체 동정
 - : 이배체 전복으로부터 고수온 처리 후 총 2,488개의 차등발현 전사체가 동정 되었으며, 이 중 1,319개의 전사체가 상향발현되었으며 1,169개의 전사체가 하향 발현되었다[그림 2-4-2A]. 배수체 전복은 고수온 처리에 대해 총 3,029개 차등 발현 전사체를 나타냈으며, 이중 1,266개의 전사체가 상향발현되었으며, 1,763개의 전사체가 하향발현되었다[그림 2-4-2B].
- 저산소 처리에 대한 이배체 및 배수체 전복의 차등발현 전사체 동정
 - : 이배체 전복은 저산소 처리 후 총 1,127개의 차등발현 전사체가 동정, 이 중 514 전사체가 상향발현되었으며 613 전사체가 하향발현되었다[그림 2-4-2C]. 배수체 전복으로부터 저산소 처리에 대해 총 1,019개의 차 발현 전사체가 동정 되었으며, 458개의 전사체가 상향발현되었으며, 561개의 전사체가 하향발현되었다[그림 2-4-2D].
- 동정된 환경 스트레스에 대한 차등발현 전사체의 중첩비교
 - : 이배체 및 배수체로부터 동정된 고수온 및 저산소 처리에 대한 차등발현 전사체 들의 중첩비교를 실시하였다.
 - : 고수온 반응 차등발현 전사체의 중첩비교를 통해 이배체 특이적인 상향발현 및 하향발현되는 전사체는 각각 670개 및 1,110개로 나타났으며, 배수체 특이적으로 상향발현 및 하향발현되는 전사체는 각각 904개 및 1,417개로 나타났다. 한편으로 고수온 처리에 대해 331개의 전사체는 이배체 및 배수체 전복에서 모두 상향발현을 나타냈으며, 28개 전사체는 모두에서 하향발현을 나타냈다. 한편으로 이배체 전복에서는 상향발현 하였지만 배수체 전복에서는 하향발현(318개 전사체)을 하거나 이배체 전복에서는 하향발현 하였지만 배수체 전복에서는 상향발현 (31개 전사체)을 나타내는 상반된 전사조절을 나타내는 중복 전사체들이 나타났다[그림 2-4-3A].
 - : 저산소 반응 차등발현 전사체의 중첩비교를 통해 이배체 특이적인 상향발현 및 하향발현되는 전사체는 각각 429개 및 581개로, 배수체 특이적으로 상향발현 및 하향발현되는 전사체는 각각 373개 및 529개로 나타났다. 이배체 및 배수체 전 복에서 저산소 처리에 대한 서로 반대(상향과 하향)되는 발현은 각각 14개 전사

체였으며, 이배체 및 배수체에서 71개(이배체와 배수체에서 모두 상향발현) 및 18개(이배체와 배수체에서 모두 하향발현)의 전사체는 모두 동일한 전사조절을 나타내었다[그림 2-4-3B].

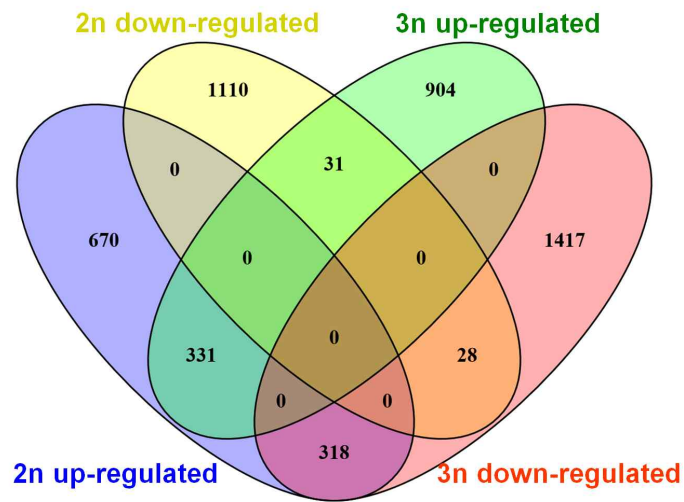


[그림 2-4-2]

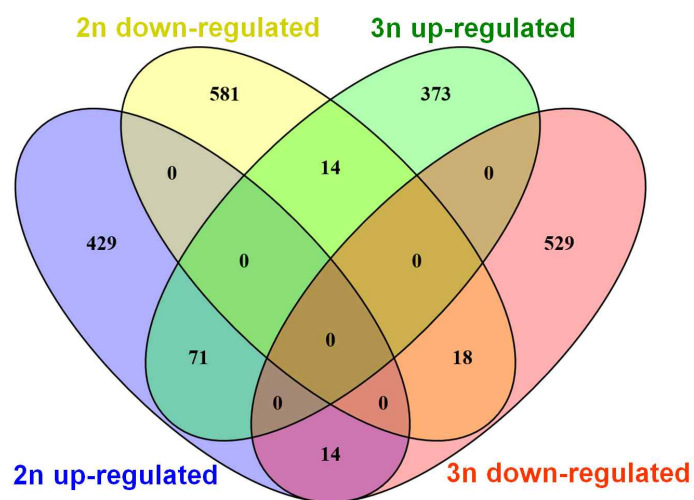
환경 스트레스에 대한 이배체 및 배수체 차등발현 전사체 동정.

- (A) 이배체 고수온 처리, (B) 배수체 고수온 처리,
- (C) 이배체 저산소 처리, (D) 배수체 저산소 처리

A High temperature response DETs



B Hypoxia response DETs



[그림 2-4-3]

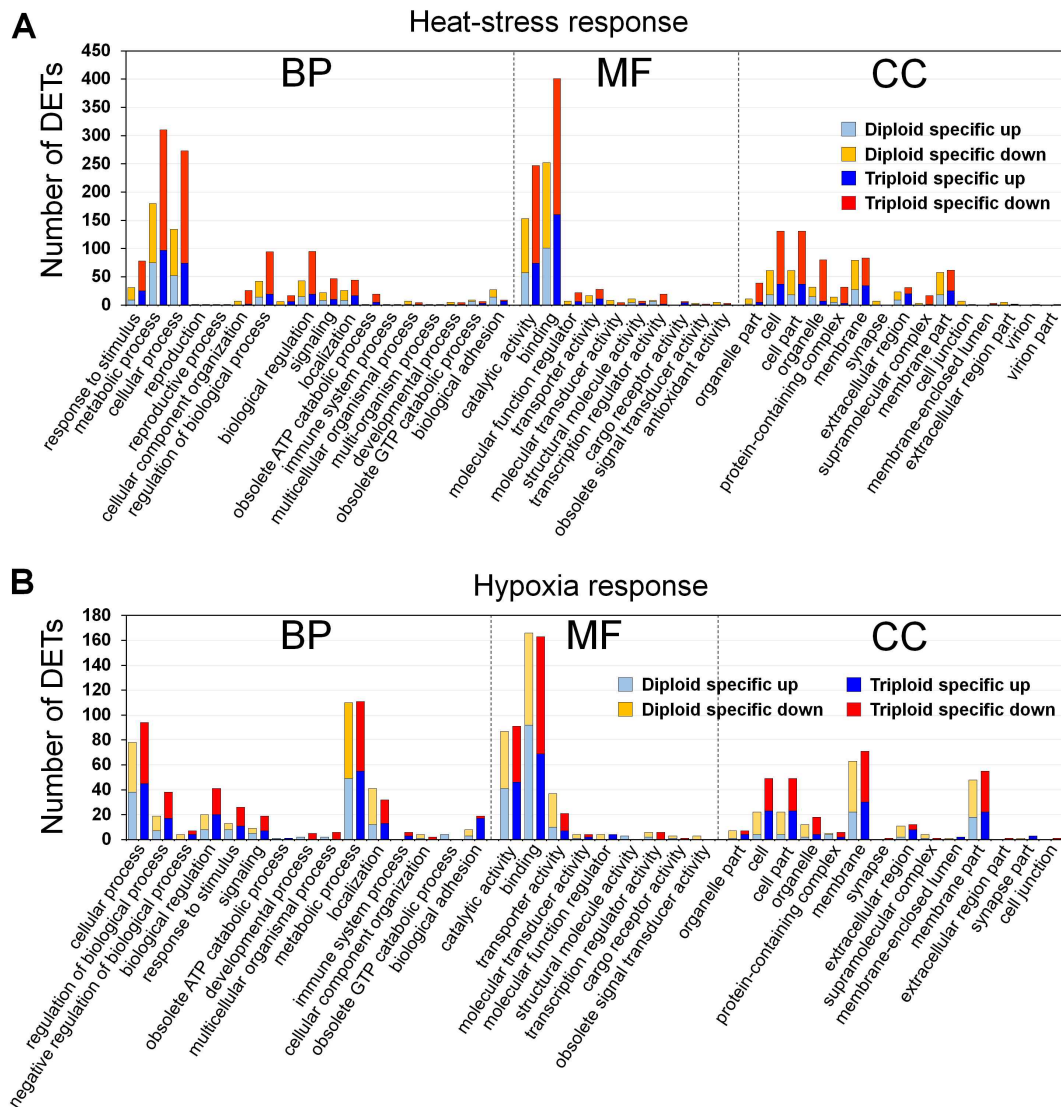
환경 스트레스에 대한 이배체 및 배수체의 차등발현 전사체의 중첩비교.

(A) 고수온 반응 차등발현 전사체, (B) 저산소 반응 차등발현 전사체

- 고수온 및 저산소 반응에 대한 배수체 특이적 전사체의 기능 및 발현분석
 - : 배수체 특이적 고수온 및 저산소 반응 차등발현 전사체들의 전체적인 유전자 기능과 연관 관계를 파악하기 위해 GO enrichment 분석을 수행하였다.
 - : 배수체 특이적 고수온 반응 차등 발현 전사체들의 GO 분포는 이배체 특이적인 차등발현 전사체들의 GO 분포와 유의적인 차이는 보이지 않았다. 하지만 각각의 GO에 분류된 배수체 특이적 상향 및 하향 차등발현 전사체들의 수는 전반적으로 이배체특이적 전사체 수보다 높았다. 특히, BP 카테고리의 “response to stimulus” GO term으로 분류된 차등발현 전사체수는 배수체에서 상향 및 하향 발현된 전사체 모두 2배 이상 더 높았으며, MF 카테고리에서는 배수체 전복의 상향발현 전사체수가 이배체보다 더 높았다. 이러한 결과는 배수체 전복이 고수온 스트레스에 대한 반응으로 이배체보다 강한 저항성을 가질 수 있음을 시사한다. 또한 CC 카테고리의 “cell” 및 “cell part”의 차등발현 전사체는 상향 및 하향발현 전사체 모두가 배수체에서 높았다. 이러한 결과는 고수온 반응 차등 발현 전사체들이 배수체효과와 연관됨을 시사한다[그림 2-4-4A].
 - : 배수체 의존적 저산소 반응 차등발현 전사체들의 GO term의 분포는 고수온 반응 차등 발현 전사체들과 유사하게 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 각 GO term에 분류된 전사체들의 수는 고수온 반응 차등발현 전사체들이 배수체에서 전반적으로 높게 나타났던 패턴과 달리 이배체와 배수체 사이에서 유의적인 차이가 보이지 않았다[그림 2-4-4B].
- 고수온 및 저산소 반응에 대한 배수체와 이배체의 중복 전사체들의 공통 전사조절
 - : 고수온 반응 이배체 및 배수체 전복 차등발현 전사체 중 공통 상향발현 중복 전사체 331개의 전사체 중 68.9% (228개의 전사체)들이 배수체 전복에서 더욱 높은 FPKM값을 나타내었다. 또한 공통 하향발현 중복 전사체 28개의 전사체 중 92.9% (26개의 전사체)들이 배수 전복에서 더욱 낮은 FPKM값을 나타내었다[그림 2-4-5A]. 이러한 결과는 배수체 전복이 고수온 변화에 더욱 효과적인 대응을 할 수 있음을 나타낸다.
 - : 저산소 반응 차등발현 공통 전사체들도 고수온 반응과 유사하게 상향발현되는 14개의 전사체 중 76.0% (54개의 전사체)들이 배수체 전복에서 더욱 높은 FPKM값을 나타내었으며, 하향발현되는 14개(100%) 전사체 모두가 배수체 전복에서 더욱 낮은 FPKM값을 나타내었다[그림 2-4-5B]. 이러한 결과는 배수체 전복이 저산소 변화에 더욱 효과적인 대응을 할 수 있음을 암시한다.
- 고수온 및 저산소 반응에 대한 배수체와 이배체의 중복 전사체들의 상반된 전사조절
 - : 고수온 스트레스에 반응하여 배수체 전복에서 상향발현되나 이배체 전복에서 하향 발현되는 전사체들은 세포신호전달 및 자극에 대한 생리반응현상 조절에 관련된 전사체들이 주를 이루고 있었으며, 배수체에서는 하향발현되나 이배체에서는 상향

발현되는 전사체들을 성숙과 연관된 전사체들이 주를 이루고있다[표 2-4-3]. 이러한 결과는 배수체가 성숙에 연관된 분자적 유동성을 자극에 대한 생리반응현상으로 전환 시킴으로써 고수온 자극에 대한 저항성이 증가 될 수 있음을 나타낸다.

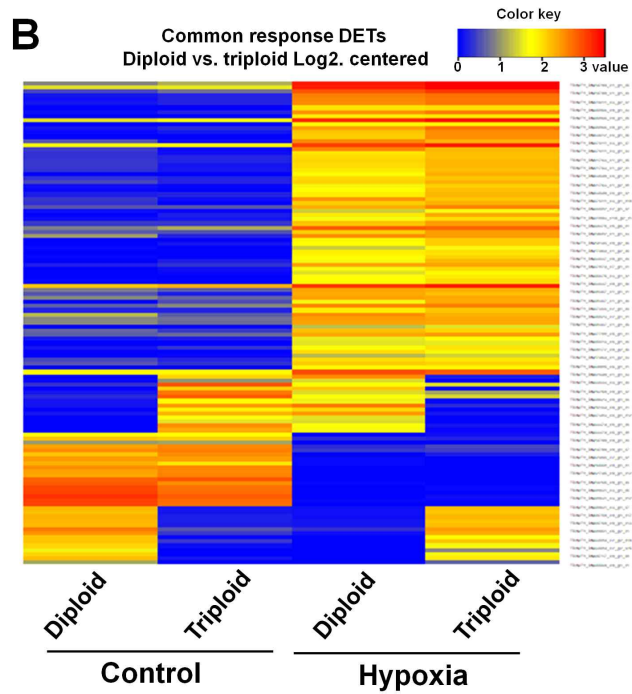
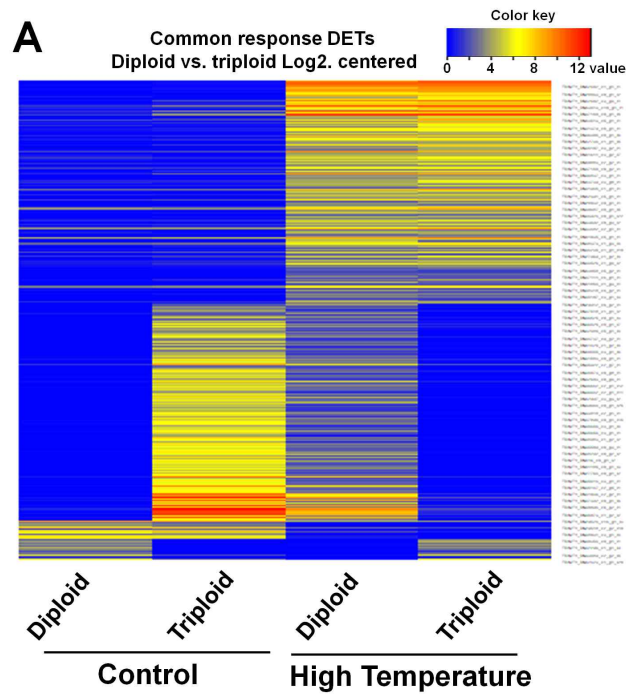
: 저산소 스트레스의 경우 interferon-induced 44-like protein 유전자는 배수체에서 상향발현되고 이배체에서는 하향발현되거나, 배수체에서는 하향발현되고 이배체에서는 상향발현되는 두 가지 모든 경우가 관찰되었다[표 2-4-4]. 이러한 결과는 interferon-induced 44-like protein을 코딩하는 유전자는 이배체 및 배수체에서 isoform 의존적인 조절을 시사하며 향후 더욱 자세한 분자적 연구가 필요하리라 판단된다.



[그림 2-4-4]

환경 스트레스에 대한 이배체 및 배수체의 특이적인 차등발현 전사체들의 GO enrichment 비교

(A) 고수온 반응 차등발현 전사체, (B) 저산소 반응 차등발현 전사체



[그림 2-4-5]

환경 스트레스에 대한 이배체 및 배수체의 중복 공통 차등발현 전사체들의 발현 패턴

(A) 고수온 반응 차등발현 전사체, (B) 저산소 반응 차등발현 전사체

나. 고수온 자극에 대한 HSP 유전자들의 발현 반응분석

(1) 전복 열충격단백질 유전자들(heat shock protein genes, HSPs)의 선정

- HSP 유전자 패밀리는 열 충격에 의한 세포 내 단백질의 보호를 주 기능으로 하는 molecular chaperone들로서 다양한 분자량의 크기를 갖는 여러 종류의 HSP member들이 알려져 있다.
- 전사체 DB분석을 통해 samall HSP 26, HSP70과 isoform, HSP90이 고수온 자극에 대해 이배체 및 배수체 전복에서 동일한 전사조절 반응을 하며, 이들 유전자의 발현정도가 배수체 전복에서 유의미하게 높음을 알 수 있었다.
- 하지만, 전체 HSP member들에 대한 이배체와 배수체 사이의 차등 발현의 절대량, 차등 발현 유발 주요 조직 등에 포함한 자세한 발현특징의 연구가 필요하였다.
- 따라서 현재까지 이배체 전복에서 보고된 총 7개의 HSP유전자들 (heat shock protein 90 (HSP90) 1개 isoform, HSP70 member에서 3개 isoforms [HSP70 및 heat shock inducible protein 70 (HSIP70) 및 HSP70-12A], heat shock binding protein-1 (HSPBP1)를 사용하여 기초발현 및 고수온 자극에 대한 유도 발현 특징을 조사하였다. 발현수준 조사에 사용된 PCR 프라이머들은 [표 2-4-5]에 나타내었다.

(2) 실험생물 및 고수온 처리 모델

- 이배체(각장 6.2 ± 1.2 cm)와 배수체(각장 6.5 ± 1.0 cm)는 동일 모패로부터 생산된 동일연령의 전복을 사용하였다.
- HSP유전자의 이배체 및 배수체 전복의 기초발현 조사는 $19 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 혼합사육(communal culture)중인 이배체와 배수체를 무작위로 선발하여(그룹 당 6개체) 아가미 및 간첩장에서 조사하였다. 배수성 확인은 유세포분석을 통하여 확인하였다.
- 고수온 처리는 $19 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 까지 시간당 0.5°C 의 온도 증가율로 증가시켰으며, 30°C 도달 후 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 24시간 유지하였다. 대조군은 수온 $19 \pm 1^\circ\text{C}$ 으로 유지하였으며, 처리군과 대조군의 용존산소량은 6 ± 0.5 ppm으로 유지하였다.

[표 2-4-3]

이배체 및 배수체 전복에서 고수온 스트레스에 대해 서로 상반된 전사조절 반응을 하는 차등 발현 전사체의 NCBI NR BLASTx 검색결과

NCBI NR BLASTx Gene description	배수체		이배체	
	GFOLD value		GFOLD value	
interferon-induced 44-like protein	7.39	Up	-6.33	Down
Aggrecan core protein	6.18	Up	-4.27	Down
mucin-3A-like	5.81	Up	-5.33	Down
Transcription elongation factor spt5	5.78	Up	-6.34	Down
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	5.63	Up	-5.90	Down
pregnancy zone protein	5.32	Up	-6.04	Down
sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1-like	4.70	Up	-4.72	Down
Zinc finger protein 850	4.47	Up	-4.85	Down
serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B-like	4.17	Up	-4.41	Down
cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase-like isoform X5	-11.33	Down	8.10	Up
sperm protein 6kDa	-10.40	Down	8.74	Up
fertilization protein	-10.36	Down	10.09	Up
kelch-like protein 3	-10.35	Down	8.04	Up
H fertilization protein, partial	-10.23	Down	9.87	Up
sperm lysin	-10.11	Down	9.53	Up
PREDICTED: transmembrane channel-like protein 3	-10.01	Down	7.16	Up
PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56	-10.00	Down	7.26	Up
serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B-like	-9.93	Down	5.59	Up
PREDICTED: transmembrane channel-like protein 3	-9.50	Down	6.55	Up
PREDICTED: testis-specific serine/threonine-protein kinase 3-like	-9.20	Down	6.74	Up
Hemicentin-1	-9.11	Down	4.99	Up
SCO-spondin-like	-9.07	Down	7.90	Up
arginine kinase	-8.97	Down	8.68	Up
PREDICTED: tripartite motif-containing protein 45	-8.97	Down	8.30	Up
PREDICTED: protein FAM78B-like isoform X1	-8.94	Down	8.05	Up
axonemal protein 66.0	-8.84	Down	5.47	Up
sperm protein	-8.82	Down	5.79	Up

[표 2-4-3] 계속

NCBI NR BLASTx Gene description	배수체		이배체	
	GFOLD value		GFOLD value	
placenta-specific gene 8 protein-like	-8.81	Down	7.22	Up
PREDICTED: sperm motility kinase X	-8.77	Down	4.31	Up
aquaporin-8-like	-8.68	Down	7.11	Up
caveolin-1-like	-8.61	Down	6.82	Up
stabilizer of axonemal microtubules 1-like	-8.40	Down	7.07	Up
WD repeat-containing protein on Y chromosome-like	-8.34	Down	6.12	Up
Tetratricopeptide repeat protein 25	-8.10	Down	4.43	Up
PREDICTED: band 7 protein AGAP004871-like	-7.95	Down	4.27	Up
phosphatidylethanolamine-binding protein 4-like isoform X1	-7.90	Down	4.98	Up
F-box only protein 39-like	-7.64	Down	5.14	Up
neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3-like	-7.45	Down	6.09	Up
testis-specific serine/threonine-protein kinase 4-like	-7.38	Down	5.43	Up
Sex-determining region Y protein	-6.94	Down	4.33	Up
Tubulin alpha chain	-6.91	Down	5.37	Up
RecName: Full=Arginine kinase; Short=AK	-6.91	Down	6.65	Up
angiopoietin-1 receptor-like isoform X2	-6.87	Down	4.16	Up
tubulin A, partial	-6.69	Down	4.91	Up
Photoreceptor outer segment membrane glycoprotein 2	-6.67	Down	4.66	Up
coadhesin-like isoform X2	-6.54	Down	4.36	Up
PREDICTED: transmembrane protein 53-B-like	-6.33	Down	4.17	Up
serine/threonine-protein kinase Nek5-like	-6.20	Down	4.54	Up
PREDICTED: ankyrin repeat and SOCS box protein 8-like [Aplysia californica]	-5.81	Down	4.53	Up
abnormal spindle-like microcephaly-associated protein homolog isoform X6	-5.31	Down	4.55	Up
PREDICTED: phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ-like	-4.86	Down	4.75	Up
PREDICTED: retinal-binding protein-like isoform X1	-4.70	Down	4.88	Up
receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta-like isoform X14	-4.47	Down	4.77	Up
PREDICTED: probable palmitoyltransferase ZDHHC24	-4.39	Down	4.89	Up
Dynein heavy chain	-4.12	Down	5.46	Up

[표 2-4-4]

이배체 및 배수체 전복에서 저산소 스트레스에 대해 서로 상반된 전사조절 반응을 하는 차등 발현 전사체의 NCBI NR BLASTx 검색결과

전사체 ID	배수체				이배체				Description
	FPKM value		GFOLD value	FPKM value		GFOLD value			
	대조군	저산소 처리군		대조군	저산소 처리군				
TRINITY_DN24675_c0_g1_i1	8.08	0.11	-4.05	Down	0.00	27.00	6.95	Up	No hit
TRINITY_DN25149_c0_g1_i1	20.15	0.17	-5.02	Down	0.08	42.34	7.21	Up	hypothetical protein OCBIM_22017536mg
TRINITY_DN25631_c0_g1_i1	5.64	0.00	-5.08	Down	0.00	8.38	6.01	Up	No hit
TRINITY_DN26250_c0_g1_i2	9.38	0.00	-4.79	Down	0.00	10.92	5.37	Up	No hit
TRINITY_DN30623_c0_g1_i1	45.08	1.20	-4.80	Down	0.10	2.44	4.27	Up	hypothetical protein LOTGIDRAFT_232101
TRINITY_DN30623_c0_g1_i4	83.59	2.18	-4.84	Down	0.19	3.88	4.03	Up	No hit
TRINITY_DN30623_c0_g1_i5	86.85	2.41	-4.75	Down	0.20	4.02	4.02	Up	No hit
TRINITY_DN33379_c5_g1_i2	27.97	0.08	-6.51	Down	0.02	3.86	5.02	Up	interferon-induced 44-like protein
TRINITY_DN33379_c5_g1_i5	2.59	0.00	-5.60	Down	0.01	2.32	5.80	Up	interferon-induced 44-like protein
TRINITY_DN33379_c5_g1_i8	16.72	0.04	-6.66	Down	0.01	3.49	5.77	Up	interferon-induced 44-like protein
TRINITY_DN33433_c3_g1_i4	0.99	0.00	-4.12	Down	0.02	2.43	5.01	Up	No hit
TRINITY_DN37383_c4_g1_i12	13.37	0.10	-5.39	Down	0.10	21.25	6.56	Up	No hit
TRINITY_DN39158_c3_g1_i11	4.45	0.04	-4.93	Down	0.08	3.05	4.20	Up	No hit
TRINITY_DN40257_c0_g1_i17	3.71	0.00	-5.40	Down	0.00	2.75	5.32	Up	No hit

[표 2-4-4] 계속

전사체 ID	배수체				이배체				Description
	FPKM value		GFOLD value	FPKM value		GFOLD value			
	대조군	저산소 처리군		대조군	저산소 처리군				
TRINITY_DN40750_c0_g1_i16	0.09	11.00	6.59	Up	12.95	0.06	-6.74	Down	interferon-induced 44-like protein
TRINITY_DN40750_c0_g1_i17	0.08	10.32	6.57	Up	12.09	0.05	-6.72	Down	interferon-induced 44-like protein
TRINITY_DN40750_c0_g1_i14	0.12	13.43	6.47	Up	15.27	0.06	-6.87	Down	interferon-induced 44-like protein
TRINITY_DN40750_c0_g1_i13	0.12	10.84	6.27	Up	12.79	0.08	-6.45	Down	interferon-induced 44-like protein
TRINITY_DN40750_c0_g1_i1	0.13	11.40	6.26	Up	13.49	0.08	-6.47	Down	interferon-induced 44-like protein
TRINITY_DN38051_c5_g2_i1	0.42	21.17	5.38	Up	42.68	0.22	-6.61	Down	hypothetical protein LOTGIDRAFT_154544
TRINITY_DN37995_c1_g3_i5	0.26	14.77	5.09	Up	22.83	0.06	-6.26	Down	No hit
TRINITY_DN33589_c2_g2_i10	0.04	4.52	4.87	Up	10.82	0.00	-6.07	Down	hypothetical protein KP79_PYT26345
TRINITY_DN41714_c0_g2_i1	0.24	10.43	4.68	Up	10.35	0.02	-5.99	Down	No hit
TRINITY_DN33589_c2_g2_i25	0.06	3.35	4.62	Up	8.33	0.00	-6.79	Down	hypothetical protein KP79_PYT26345
TRINITY_DN30354_c0_g1_i1	0.00	0.86	4.45	Up	3.11	0.01	-5.32	Down	No hit
TRINITY_DN40717_c0_g1_i8	0.00	3.54	4.31	Up	7.96	0.00	-4.96	Down	No hit
TRINITY_DN38051_c5_g2_i2	0.08	5.87	4.19	Up	11.38	0.00	-5.09	Down	hypothetical protein LOTGIDRAFT_154544
TRINITY_DN35560_c0_g1_i1	0.01	0.51	4.14	Up	1.32	0.01	-4.99	Down	RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey

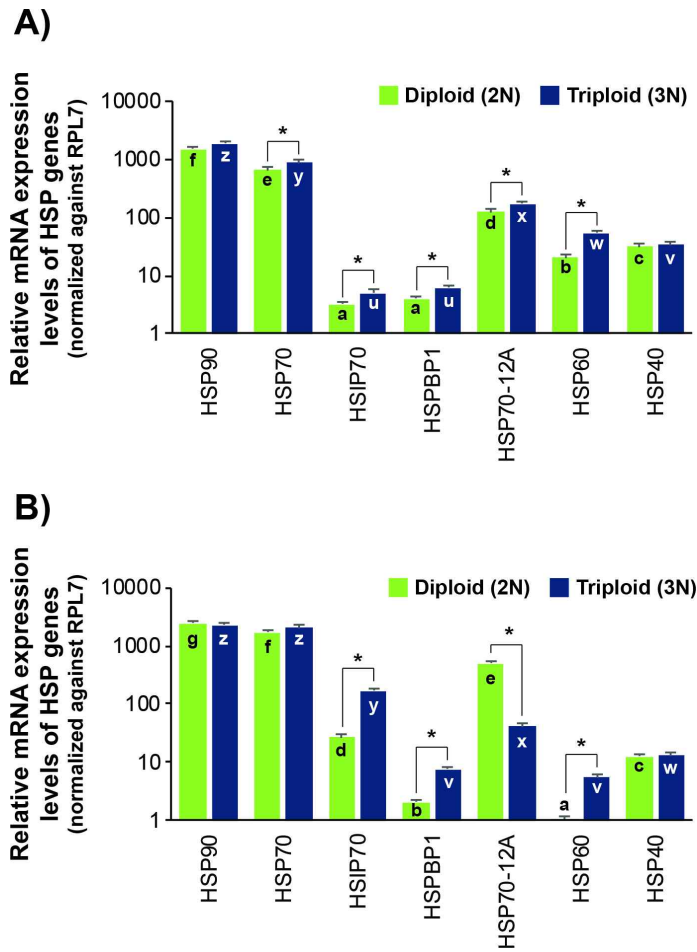
[표 2-4-5]

이배체와 배수체 전복 HSP유전자들의 발현수준 조사를 위해 사용된 프라이머 정보

Gene symbol	Primer sequence (5'-to-3')
HSP90	FW: TTGACGAGTACTGTGTCCAG
	RV: ACCAGACGATTGGAAACCAC
HSP70	FW: GGATCGACCCGTATTCCTAA
	RV: TCCTGCTGTCTCAATGCCAA
HSIP70	FW: AGAAAGCTCTGCGAGATGCT
	RV: CAGAACATCCTTGATGGCGT
HSPBP1	FW: TTGGCATGATTGACCAGCTG
	RV: ACCTTCACAGACTCACCTGA
HSP70-12A	FW: GAGTCAGCCACATTGCAGTA
	RV: AGCTTACTGGATGGATGACG
HSP60	FW: AACCCCTTCTCATCATCGCT
	RV: GATGTCCTCCAGCTTGTACA
HSP40	FW: TTTCGGAGGTCCAAGTATGC
	RV: CAAGTGACACCTGTAGGTCT

(3) 이배체와 배수체 전복 사이의 HSP 유전자들의 기초발현 수준 조사

- 아가미에서의 HSP 유전자들의 사이의 기초 발현패턴은 이배체 및 배수체가 서로 유사하였다. HSP90이 가장 높은 발현량을 그리고 이어서 HSP70이 두 번째로 높은 발현량을 나타내었다. 나머지 유전자들이 경우 HSP70-12A, HSP40 및 HSP60 순으로 발현수준이 관찰되었고, HSPBP1 및 HSIP70 유전자들이 가장 낮은 발현량을 나타내었다 ($P < 0.05$)[그림 2-4-6].
- 그러나 각 HSP 유전자별 이배체 및 배수체 그룹간 발현량을 비교 시 분석한 7개 HSP 유전자들 모두에서 배수체 전복에서 높은 발현 수준을 나타내는 경향을 보였으며, 이중 HSP90 및 HSP40을 제외한 5개 HSP 유전자들에서 통계적인 차이가 관찰되었다 ($P < 0.05$). 통계적 유의차가 인정되는 5개의 HSP 유전자들은 이배체의 평균 값과 비교 시 배수체에서의 1.3배~2.6배 높게 나타났고, 이 중 HSP60에서 이배체와 배수체간 가장 큰 차이를 보였다[그림 2-4-6A].
- 간췌장의 HSP 유전자들의 기초발현 수준 평가결과, 이배체의 경우 역시 HSP90 및 HSP70이 상대적으로 다른 HSP 유전자들에 비해 월등히 높은 발현량을 나타낸다는 점, 그리고 이들 두 유전자에 이어서 HSP70-12A가 높은 발현수준을 보인다는 점에서 아가미에서의 발현 결과와 유사하였다. 반면, 다른 HSP 유전자들의 경우, 아가미와 달리 간췌장에서는 HSIP70 유전자가 HSP40, HSP60 및 HSPBP1보다 유의적으로 높은 발현을 나타내는 차이가 관찰되었다($P < 0.05$)[그림 2-4-6B]. 이러한 연구결과는 배수체 유도가 고수온에 대한 생리적 반응 및 유전자발현 반응 체계에 큰 영향을 미치지 않는다는 종래의 연구보고와 일맥상통한다.
- 배수체 간췌장 내 HSP 유전자들의 기초발현 경향 역시 HSP90/HSP70이 매우 높은 발현을, 그리고 HSPBP1, HSP40, HSP60에서 상대적으로 낮은 발현을 보인다는 점에서 이배체에서의 결과와 유사하였으나, 이배체와 달리 배수체의 경우 HSIP70의 유전자발현이 HSP70-12A보다 더 높게 나타나 차이가 있었다. 한편, 각 HSP 유전자별 이배체와 배수체간 기초발현 수준을 비교한 결과, 분석한 7개의 유전자 중 아가미에서와 마찬가지로 HSP90 및 HSP40에서는 유의적인 차이가 없었고($P > 0.05$), 그 외 추가적으로 HSP70 유전자 역시 간췌장에서는 통계적인 유의차가 인정되지 않았다($P > 0.05$). 나머지 4개 유전자 중 HSIP70, HSPBP1 및 HSP60에서는 배수체가 이배체에 비해 3.6배 - 6.3배 높은 기초발현 수준을 나타낸 반면, HSP70-12A의 경우 이배체가 배수체에 비해 10 이상의 높은 기초발현 수준을 나타내었다($P < 0.05$)[그림 2-4-6B]. 이러한 연구결과는 배수체가 이배체에 비해 고수온 자극에 대하여 보다 높은 고수온 내성 형질을 보유할 잠재적인 가능성 평가에 대한 자세한 연구들이 필요할 것으로 판단된다.



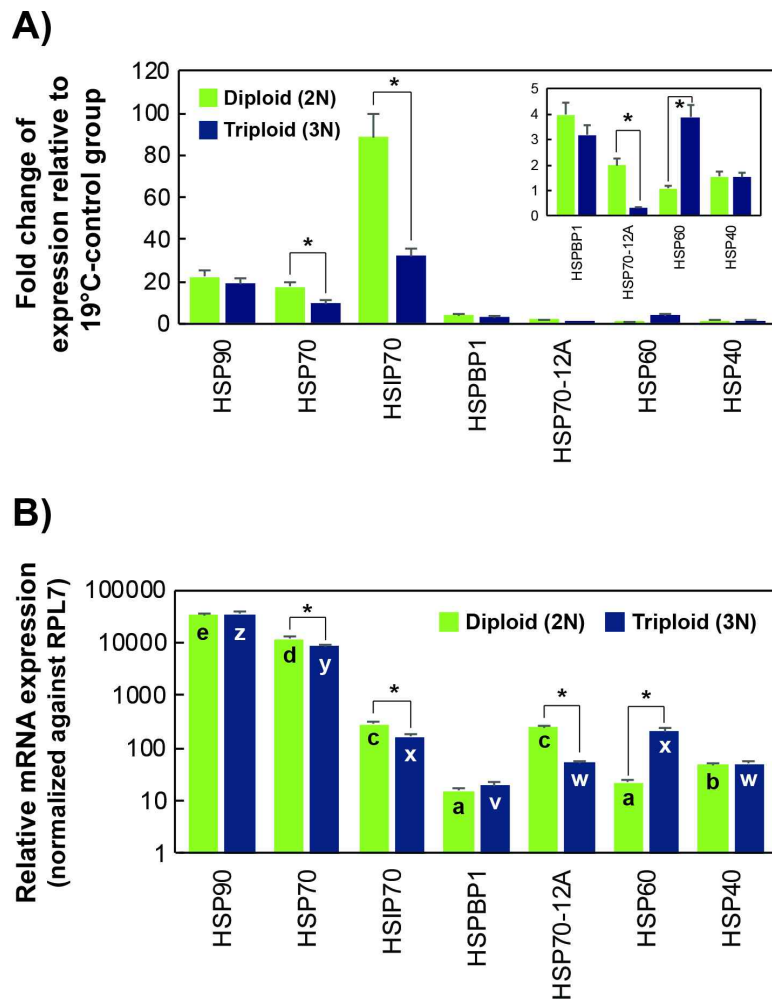
[그림 2-4-6]

HSP유전자들의 이배체 및 배수체 전복에서의 기초발현. (A)아가미, (B)간췌장

(4) 아가미에서 2배체와 3배체 전복 사이의 고수온 자극에 대한 HSP 유전자들의 차등 발현수준

- 2배체 및 3배체 모두에서 고수온 자극 처리에 의해 HSP 유전자들의 다양한 유도 발현 양상이 관찰되었으며, 각 HSP 유전자 별로 유도발현의 민감도 및 fold change 값에 큰 차이를 나타내었다.
- 나머지 유전자들이 경우 HSP70-12A, HSP40 및 HSP60 순으로 발현 수준이 관찰되었고, HSPBP1 및 HSIP70 유전자들이 가장 낮은 발현량을 나타내었다 ($P < 0.05$)[그림 2-4-7A].
- 2배체의 경우 RPL7 normalization을 토대로 19°C 유지군의 경우 앞서 시행한 기초 발현수준 평가와 비교 시 HSP 유전자발현수준의 순서 및 상대발현수준에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 반면 30 °C로 수온 상승 그룹의 경우 19°C 항온 유지군에 비해서 HSP 유전자별로 다양한 폭의 유도발현 수준이 관찰되었는데 30°C/19°C fold change 값을 기준 시, HSIP70 (> 80-fold)에서 가장 많은 변화가 유발되었고, 이어서 HSP90 (22.5-fold) 및 HSP70 (17.8-fold)에서 많은 발현 수준의 변화가 관찰되었다($P < 0.05$). 나머지 HSP40, HSP70-12A 및 HSPBP1 유전자의 경우 1.5-fold에서 4.0-fold의 비교적 소폭의 유전자발현 증가를 나타내었으며($P < 0.05$), 다른 HSP 유전자들과는 달리 HSP60의 경우 이배체 아가미에서 고수온 자극에 의한 유의적인 발현의 증감은 관찰되지 않았다($P > 0.05$)[그림 2-4-7A].
- 3배체의 경우 고수온 자극에 의해 HSIP70, HSP90 및 HSP70이 다른 HSP 유전자들에 비해 상대적으로 많은 폭의 fold change 변화가 관찰된다는 측면에서 2배체에서의 발현패턴과 유사하였다($P < 0.05$). 그러나 3배체의 경우 2배체에서 고수온에 발현의 증가를 나타낸 바 있는 HSP70-12A가 3배체에서는 오히려 발현이 감소되는 결과를 보인다는 점($P < 0.05$), 그리고 2배체에서는 고수온 자극에 발현의 변화가 없는 HSP60 유전자가 3배체에서는 동일 고수온 자극에 대해서 4배에 가까운 발현 증가를 나타낸다는 점에서 2배체와 뚜렷한 차이를 보였다($P < 0.05$)[그림 2-4-7A].
- 각 HSP 유전자별 fold change 값에 관한 2배체와 3배체간 차이를 비교할 경우 HSP90, HSPBP1 그리고 HSP40에서는 유의적인 차이가 없었으나 HSP70 (2N vs 3N = 18-fold vs. 10-fold) 및 HSIP70 (89-fold vs. 32-fold)에서 2배체가 3배체에 비해 유의적으로 높은 유도 발현 민감도를 나타내었다($P < 0.05$).
- 이에 기초 발현 수준을 반영한 고수온 자극 시 최종 발현 양(end-point expression level)을 HSP 유전자별로 2배체와 3배체를 비교할 경우, 역시 HSP90, HSPBP1 그리고 HSP40에서는 고수온 자극 이후 2배체와 3배체가 유사한 발현 수준에 도달하는 것으로 나타났으며($P > 0.05$), HSP70 (2N/3N ratio = 1.4-fold), HSIP70 (1.8-fold) 및 HSP70-12A (4.6-fold)에서는 고수온 자극에 의해 2배체가 3배체에 비해 더 높은 발현량을 최종 나타내었다($P < 0.05$). 반면 HSP60의 경우 3배체가 기초발현 수준이 2배체에 비해 더 높았음에도(2.6-fold)

불구하고 고수온 자극시 3배체 특이적인 유도발현을 나타냄으로써 고수온 처리 이후 2배체와 3배체간 발현 수준의 차이는 더 심화되었다(3N/2N ratio = 9.5-fold) ($P < 0.05$)[그림 2-4-7B].



[그림 2-4-7]

아가미에서 2배체와 3배체들간 고수온 자극에 대한 HSP 유전자들의 차등 발현.

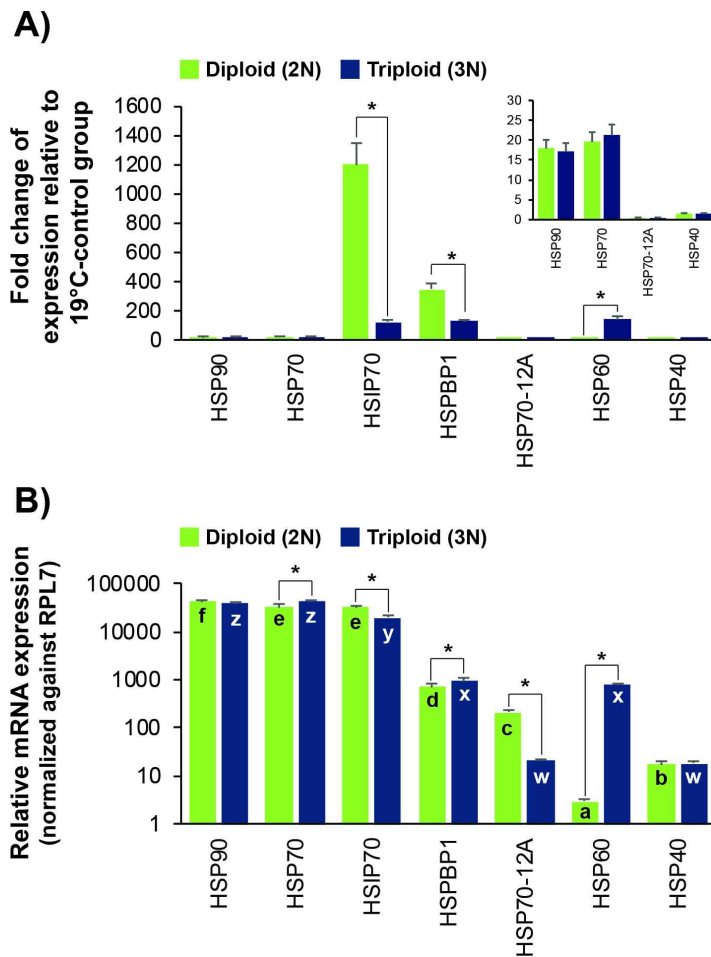
(A) HSP 유전자들의 발현 대조군 대비 상대적인 발현,

(B) HSP 유전자들의 발현량 normalization

(5) 간체장에서 2배체와 3배체들간의 고수온 자극에 대한 HSP 유전자들의 차등 발현 수준

- 아가미에서와 마찬가지로 고수온 자극에 의해 간체장에서도 HSP 유전자별 다양한 fold change 값이 관찰되었고 HSP유전자 종류에 따라 2배체와 3배체간 유도발현의 민감도 및 고수온 자극 처리 후 최종 도달 유전자 발현량에 차이가 관찰되었다.
- 2배체 간체장의 경우 고수온 자극에 의해 가장 큰 폭의 fold change를 나타낸 유전자는 HSIP70 (30°C/19°C ratio = 1,200-fold)로서 급격한 발현 증가가 유도되었고, HSIP70에 이어 HSPBP1 역시 고수온 처리에 의해 300배 이상의 발현 증가가 관찰되었다($P < 0.05$). 이들 두 HSP 유전자 외에 HSP90 및 HSP70에서 약 18-fold에서 20-fold의 발현 증가가 관찰되었으며 HSP40 및 HSP60의 경우 각각 1.4-fold 및 2.8-fold의 유전자발현 증가를 나타내었다($P < 0.05$). 반면 HSP70-12A에서는 고수온 자극에 의해 오히려 발현이 감소하는 결과를 나타내어 아가미에서의 결과와 차이를 보였다($P < 0.05$)[그림 2-4-8A].
- 3배체의 경우 역시 HSIP70 및 HSPBP1에서 높은 유도발현을 나타내었으나 그 fold change 값의 증가 폭이 2배체에 비해서 상대적으로 낮았고(HSIP70 119-fold 및 HSPBP1 127-fold), 2배체와 마찬가지로 HSP70-12A의 경우 3배체에서도 고수온 자극에 의해 발현이 감소하는 공통적인 결과를 나타내었다. 그 외 HSP90, HSP70 및 HSP40의 경우 2배체에서 관찰된 fold change 값들과 유사한 발현 변동을 보여 유의적인 차이가 없었다. 하지만 HSP60의 경우 2배체에서는 2.8배의 fold change 증가 보였으나 3배체의 경우 140배 이상의 유전자 발현 증가를 나타냄으로써 뚜렷한 차이가 관찰되었다($P < 0.05$)[그림 2-4-8A].
- 아가미에서와 마찬가지로 간체장에서도 고수온 자극 시 최종 도달하는 HSP 유전자 발현 수준을 2배체와 3배체간 비교할 경우, HSP90 및 HSP40의 경우 고수온 자극 시 end-point 발현량에 배수체 수준에 따른 유의적인 차이는 없었다($P > 0.05$). HSP70 및 HSPBP1의 경우 end-point 발현량에 있어서 3배체가 2배체에 비해 1.3배의 높은 발현수준을 나타내었으며, 반대로 HSIP70의 경우 2배체가 3배체에 비해 1.6배의 높은 발현량을 표현하였다($P < 0.05$). 반면 HSP70-12A의 경우 고수온 자극에 의해 2배체 및 3배체에서 모두 유사한 발현 감소 폭(fold change)을 보였지만, 원 기초발현수준이 2배체가 3배체에 비해 매우 높았기 때문에 최종 고수온 자극 이후 발현량에서 2배체가 3배체보다 10배 이상의 높은 발현수준을 나타내었다($P < 0.05$). 마지막으로 HSP60의 경우, 3배체가 2배체에 비해 5배 이상의 기초발현 수준을 보였으며 고수온 자극에 의해 3배체에서 훨씬 큰 폭의 fold change가 유도됨에 따라 최종 발현량 수준에서 2배체와의 차이가 더욱 심화되는 결과를 나타내었다(3N/2N ratio = 270-fold) ($P < 0.05$)[그림 2-4-8B].
- 이에 기초 발현 수준을 반영한 고수온 자극 시 최종 발현량(end-point expression level)을 HSP 유전자별로 2배체와 3배체를 비교할 경우, 역시

HSP90, HSPBP1 그리고 HSP40에서는 고수온 자극 이후 2배체와 3배체가 유사한 발현수준에 도달하는 것으로 나타났으며($P>0.05$), HSP70 (2N/3N ratio = 1.4-fold), HSIP70 (1.8-fold) 및 HSP70-12A (4.6-fold)에서는 고수온 자극에 의해 2배체가 3배체에 비해 더 높은 발현량을 최종 나타내었다($P<0.05$). 반면 HSP60의 경우 3배체가 기초발현 수준이 2배체에 비해 더 높았음에도(2.6-fold) 불구하고 고수온 자극시 3배체 특이적인 유도발현을 나타냄으로써 고수온 처리 이후 2배체와 3배체간 발현수준의 차이는 더 심화되었다(3N/2N ratio = 9.5-fold) ($P<0.05$)[그림 2-4-8B].



[그림 2-4-8]

간체장에서 2배체와 3배체들간 고수온 자극에 대한 HSP 유전자들의 차등 발현.

(A) HSP 유전자들의 발현 대조군 대비 상대적인 발현,

(B) HSP 유전자들의 발현량 normalization

다. 다양한 환경스트레스에 대한 저산소 유도인자-1 α (HIF-1 α) 유전자의 발현 특징

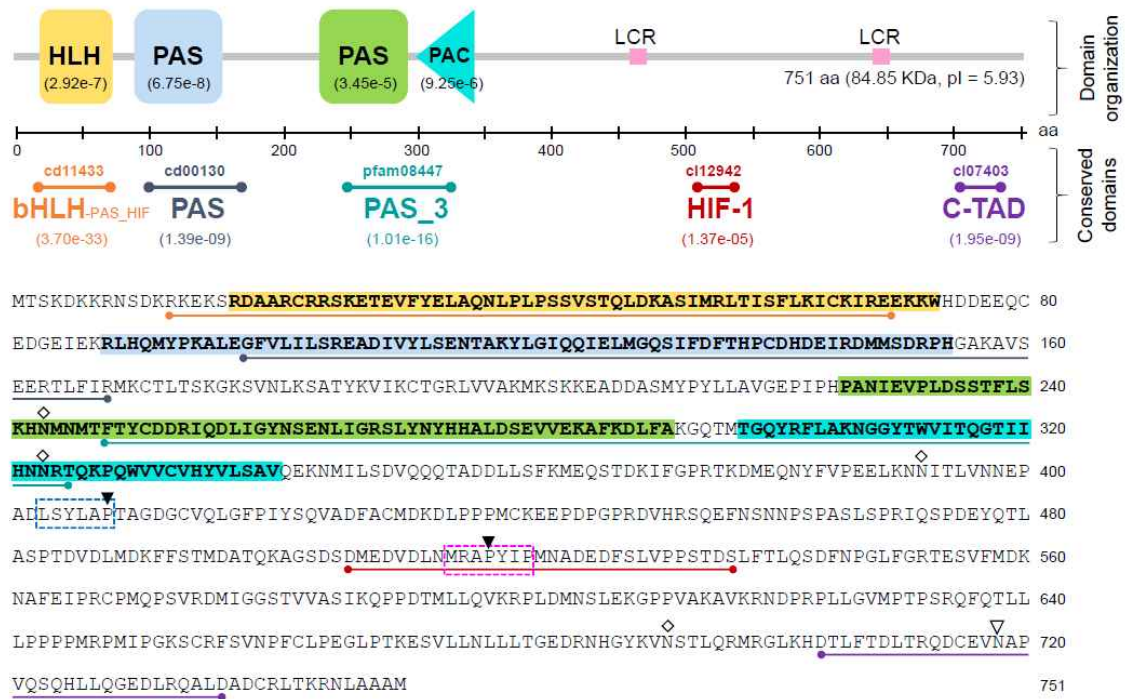
(1) 전복 HIF-1 α 의 분자적 특성

- HIF-1 α 는 저산소 환경에 대해 반응하는 주요한 전사조절인자로, 최근 고수온, 중금속, 미생물 감염 등 다양한 환경변화에 대한 전사조절 역할이 2배체 전복은 물론 다양한 생물종에서 밝혀지고 있다.
- 하지만, HIF-1 α 유전자의 2배체와 3배체 전복사이의 사이의 저산소를 포함한 다양한 환경변화에 대한 발현특징에 대한 연구는 환경변화에 대한 3배체 전복의 특화된 양식관리지침 수립에 유용할 뿐만 아니라 3배체의 장점을 극대화시켜 생산성을 높이고 최고 품질의 건강한 3배체 육종 전복생산을 위한 전략을 수립하는데 중요할 것이다.
- 따라서 전복 HIF-1 α 유전자의 다양한 조직에 대한 저산소, 고수온, 중금속 처리 및 면역감염실험에 대한 유도발현 특징을 조사하였다. 전복 HIF-1 α cDNA cloning 및 발현수준 조사에 사용된 PCR 프라이머들은 [표 2-4-6]에 나타내었다.
- 동정된 HIF-1 α 유전자의 코딩 염기서열은 2256bp의 길이를 가지며, 751개의 아미노산을 암호화하고 있었으며, metazoan ortholog들이 가지는 전형적인 basic helix-loop-helix 도메인(bHLH), 두개의 Per-Arnt-Sim (PAS) 도메인들, N- and C-terminal oxygen-dependent degradation 도메인들 (N-ODDD and C-ODDD), 그리고 C-terminal transactivation 도메인 (C-TAD)을 가지고 있었다[그림 2-4-9, 10].

[표 2-4-6]

전복 HIF-1 α 의 cDNA cloning 및 유전자들의 발현수준 조사를 위해 사용된 프라이머 정보

Primer name	Sequence (5'-to-3')	Amplicon	Purpose
HIF1α			
Hdh-HIF1a-FW	AGAACAGTCGTACCTGGAAG	4471 bp	cDNA cloning
Hdh-HIF1a-RV	AGTGAAGCTCTCTGTGCGA		
Hdh-HIF1a-GW1	CCAGGTACGACTGTTCTAGTTCAACG	-	Genome walking to upstream region
Hdh-HIF1a-GW2	CTGTGTGAAAGCACTTCTCTCAAGIG		
Hdh-HIF1a-q1F	CGTGCAATCTCAACATCTGC	183 bp	RT-qPCR assay
Hdh-HIF1a-q1R	AACCAGAAGCTGCACAATCG		
HSP90			
Hdh-HSP90-q1F	TTGACGAGTACTGTGTCCAG	205 bp	RT-qPCR assay
Hdh-HSP90-q1R	ACCAGACGATTGGAAACCAC		
MT			
Hdh-MT-q1F	GGTACCGACTGCAAGTGTA	189 bp	RT-qPCR assay
Hdh-MT-q1R	TCATCGGAAGTCATGTGAGC		
RPL5			
Hdh-RPL5-q1F	AGATGAGGATGGCAAACCAG	168 bp	RT-qPCR assay (normalization control)
Hdh-RPL5-q1R	TCGCTGCTCTCAGAGTCAA		



[그림 2-4-10]

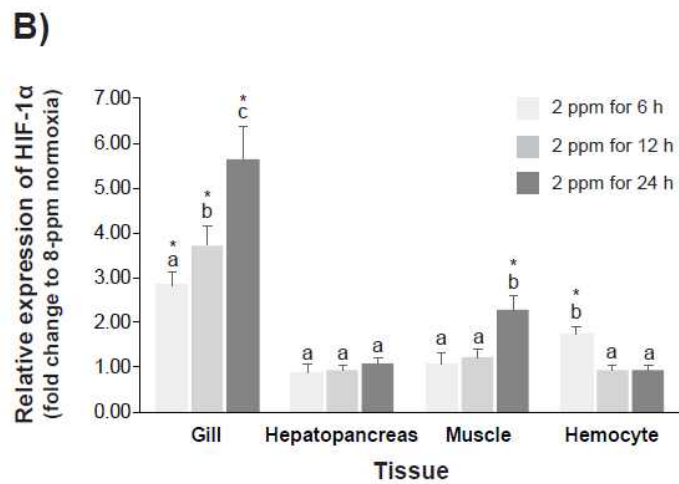
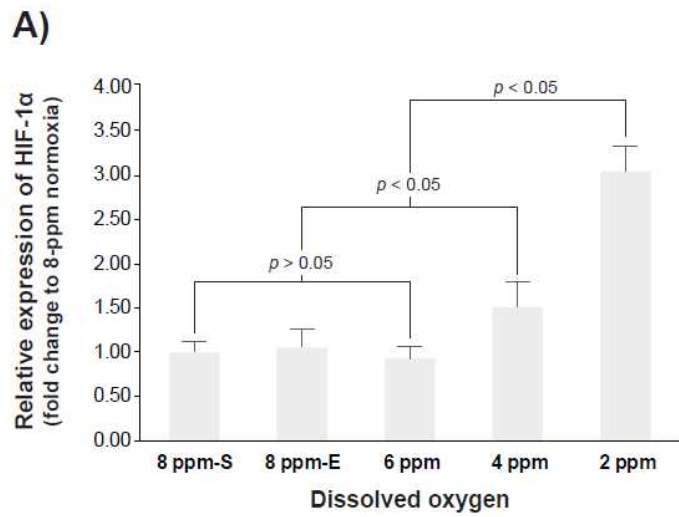
참전복 HIF-1 α 단백질의 도메인 구성

(2) 저산소 처리 후 HIF-1 α 유전자의 발현특징

- 2배체와 3배체는 동일 모패로부터 생산된 동일연령의 전복을 사용하였다.
- 저산소 처리는 전사체분석에서 사용한 방법과 동일한 방법으로 용존산소량 $8.0 \pm 0.5\text{ppm}$ 에서 $2.0 \pm 0.5\text{ppm}$ 까지 시간당 2ppm의 용존산소 감소율로 감소시켰다.
- 2배체 전복 아가미에서의 저산소 처리에 HIF-1 α 의 발현은 용존산소의 농도에 6ppm까지는 변화가 없었으나 4ppm 및 2ppm의 용존산소 감소시 상향발현량이 증가하는 용존산소 의존적 발현패턴이 관찰되었다[그림 2-4-11A].
- 2배체 전복의 저산소 지속시간에 따른 HIF-1 α 의 발현은 아가미에서 6, 12, 24시간 저산소 상태가 지속됨에 따라 2.8, 3.7, 및 5.7배 상향발현되는 양의 상관관계를 보였다($p < 0.05$). 간췌장은 HIF-1 α 의 발현조절이 저산소상태에서 관찰되지 않았으며, 이는 간췌장 전사체분석에서 저산소 처리후 차등 발현 전사체가 동정되지 않은 이유를 설명한다. 근육에서는 저산소 상태가 24시간 지속되었을 때 유의미한 (2.3배) HIF-1 α 의 상향발현이 관찰되었다($p < 0.05$). 한편 혈구세포에서는 저산소 상태가 6시간 지속되었을 때 초기 상향발현이 (1.7-fold; $p < 0.05$)이 나타났으나 12 및 24시간 지속 시 그 발현이 사라졌다 ($p > 0.05$)[그림 2-4-11B].

(3) 수온 상승에 따른 HIF-1 α 유전자의 발현 특징

- 수온의 상승은 전사체분석에서 구축된 동일한 시험법을 사용하였다.
- 2배체 전복 아가미에서의 HIF-1 α 유전자 발현은 수온이 30°C에 도달했을 때 2.5배 상향발현되었으며, 30°C를 2시간 동안 지속시켰을 때 3.7배 상향조절되었다. 이후 12시간 30°C의 지속은 대조군과 차이가 없었으며 그 이상의 지속은 (24시간)은 대조군보다 낮은 발현특징을 나타내었다[그림 2-4-12A]. 2배체 전복 간췌장에서의 HIF-1 α 유전자의 상향발현(3.1배)은 30°C를 2시간 동안 지속시켰을 때 처음 관찰되었으며, 30°C 6시간 지속이 그 발현이 급격히 증가(11.5배 상향발현)하였다. 이후 빠른 발현감소와 함께 30°C 12시간 지속시 대조군과 동일한 발현을 나타냈다 [그림 2-4-12B]. 2배체 전복 근육에서의 HIF-1 α 유전자는 30°C를 2시간 및 6시간 지속시 4.2배 및 4.6배 상향발현되었으며, 12시간에 1.9배로 상향발현으로 발현량이 감소하다가 24시간에 대조군과 동일한 발현 특징을 나타냈다[그림 2-4-12C]. 2배체 전복의 혈구에서의 HIF-1 α 유전자 발현은 30°C를 2시간 및 6시간 지속시 5.1배 및 2.5배 상향발현이 관찰되었다[그림 2-4-12D]. 2배체 전복의 수온증가에 따른 HSP90의 발현패턴은 대부분의 조직에서 HIF-1 α 유전자 발현패턴과 유사하게 나타났다[그림 2-4-12E-H]. 이러한 결과는 전복의 HIF-1 α 유전자 발현은 고수온 환경에 의해 조절되며 조직에 따라 다양한 발현패턴을 나타남을 제시하였다.

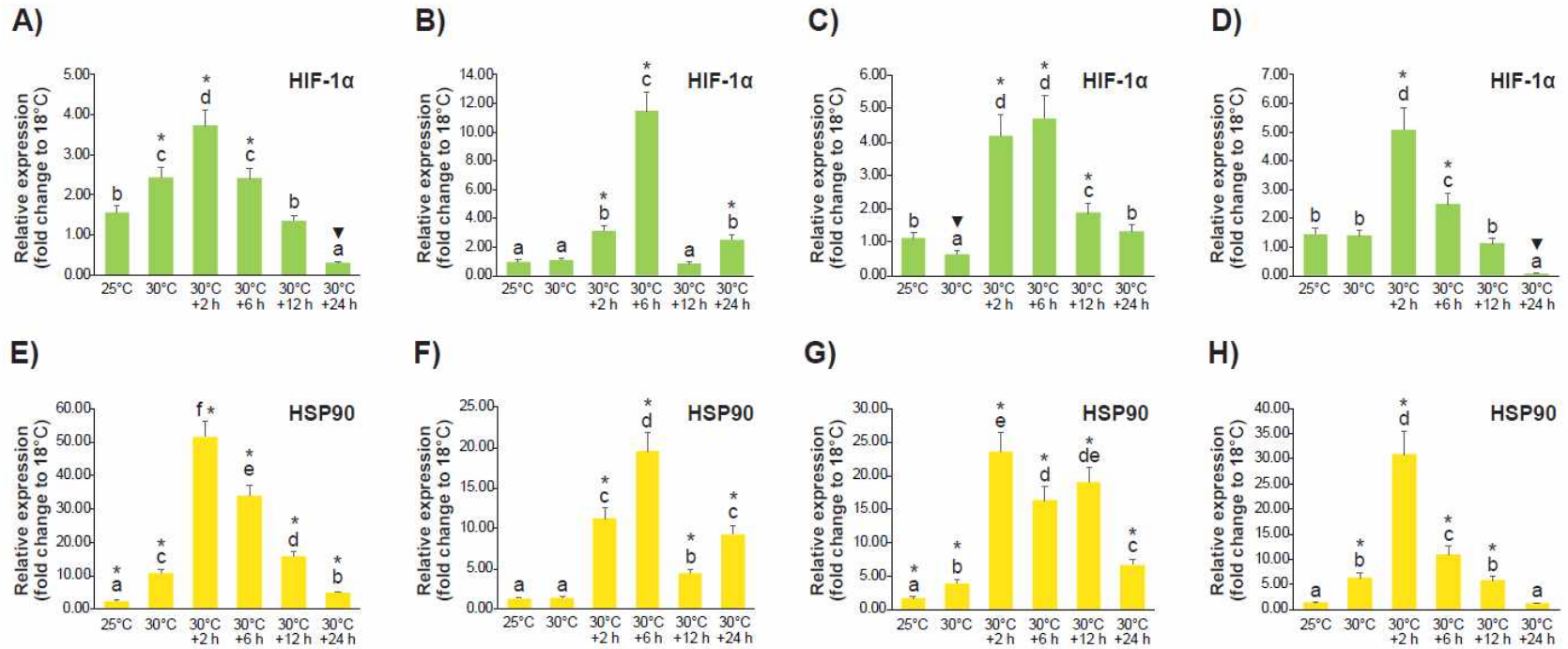


[그림 2-4-11]

저산소 처리 후 전복 HIF-1 α 유전자의 발현 특징.

(A) 아가미에서의 용존산소 의존성 발현특성,

(B) 저산소 지속시간에 따른 조직별 발현특성



[그림 2-4-12]

수온 상승에 따른 전복 HIF-1α 및 HSP90 유전자 발현 특징의 조직별 비교.

(A와 E) 아가미, (B와 F) 간췌장, (C와 G) 근육, (D와 H) 혈구세포

(4) 중금속 노출에 따른 HIF-1 α 유전자의 발현 특징

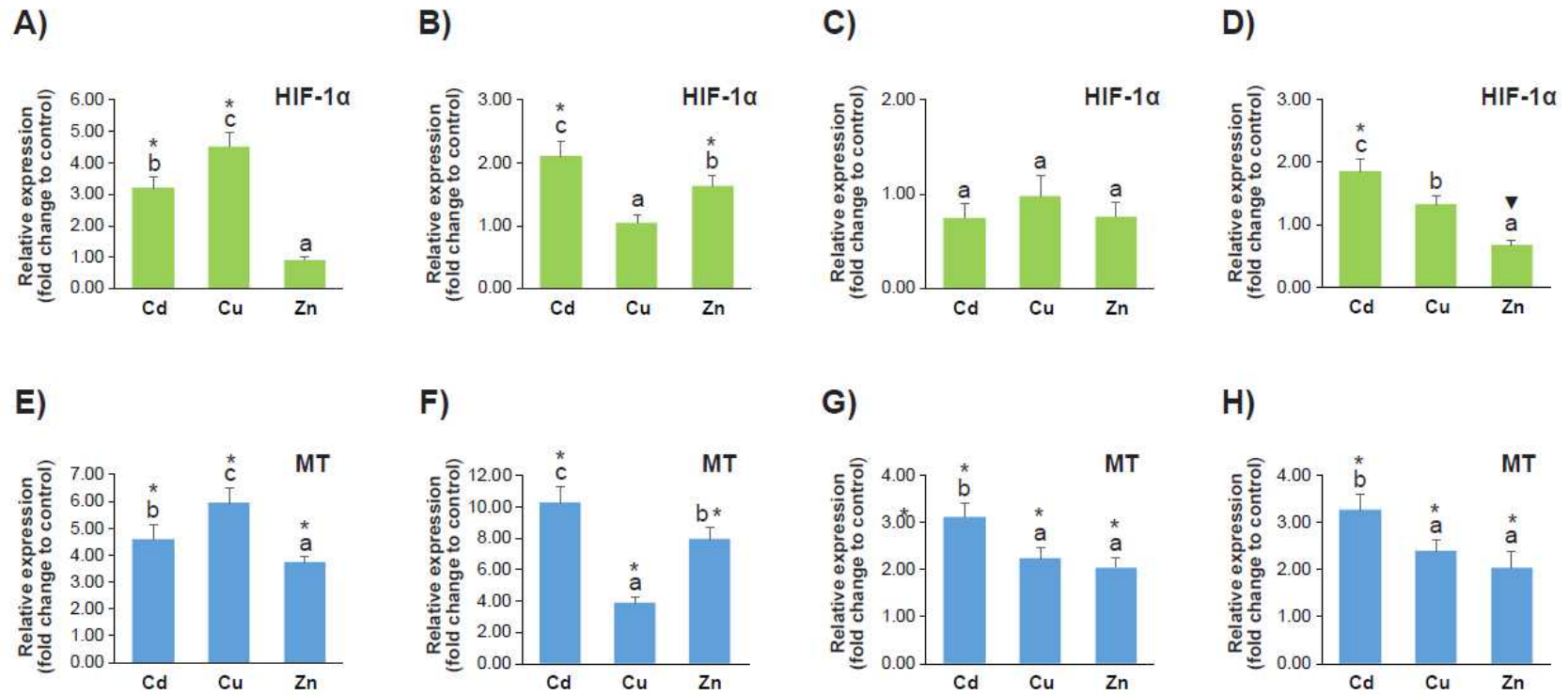
- 전복의 중금속 노출 시험은 100ppb 카드뮴(Cd), 50ppb 구리(Cu), 100ppb 아연(Zn)의 농도로 수행하였다. 중금속 노출 시험동안 수조의 수온과 용존산소량은 $19\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 및 7.0 ± 0.5 ppm으로 유지하였다.
- 중금속 노출에 따른 2배체 전복 아가미에서의 HIF-1 α 유전자 발현은 구리에 의해 4.5배 카드뮴에 의해 3.1배 증가되었으나 아연은 대조군과 동일한 발현을 나타냈었다[그림 2-4-13A]. 2배체 전복 간췌장에서는 카드뮴 및 아연 노출에 의해 HIF-1 α 유전자의 상향발현이 관찰되었으나 구리 노출은 발현에 영향을 미치지 않았다[그림 2-4-13B]. 2배체 전복 근육에서의 HIF-1 α 유전자의 발현은 사용한 3가지 중금속에 대해 반응하지 않았다[그림 2-4-13C]. 2배체 전복의 혈구에서는 카드뮴에 의해서만 HIF-1 α 유전자 상향발현이 관찰되었고 아연에 대해 오히려 하향발현 되었다[그림 2-4-13D]. 2배체 전복의 MT 유전자는 모든 조직에서 3가지 중금속에 상향발현 되었다[그림 2-4-13E-H]. 이러한 결과는 각각의 중금속이 전복의 HIF-1 α 유전자 발현에 미치는 영향은 조직에 따라 차이를 나타낸다.

(5) 면역반응 유도에 따른 HIF-1 α 유전자의 발현 특징

- 전복의 면역반응 유도는 100 $\mu\text{g/g}$ LPS (lipopolysaccharide) 및 그람음성균이 *Vibrio harveyi* (1×10^6 CFU)를 패각근에 주사하여 수행하였다. 수조의 수온과 용존산소량은 $19\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 및 7.0 ± 0.5 ppm으로 유지하였다.
- 면역반응 유도 후 2배체 전복 HIF-1 α 유전자는 아가미, 근육, 및 혈구세포에서는 상향발현 조절되었으나 간췌장에서는 하향발현 조절되었다[그림 2-4-14].

(6) 면역유도 HIF-1 α 유전자 발현에 미치는 저산소 환경변동의 영향

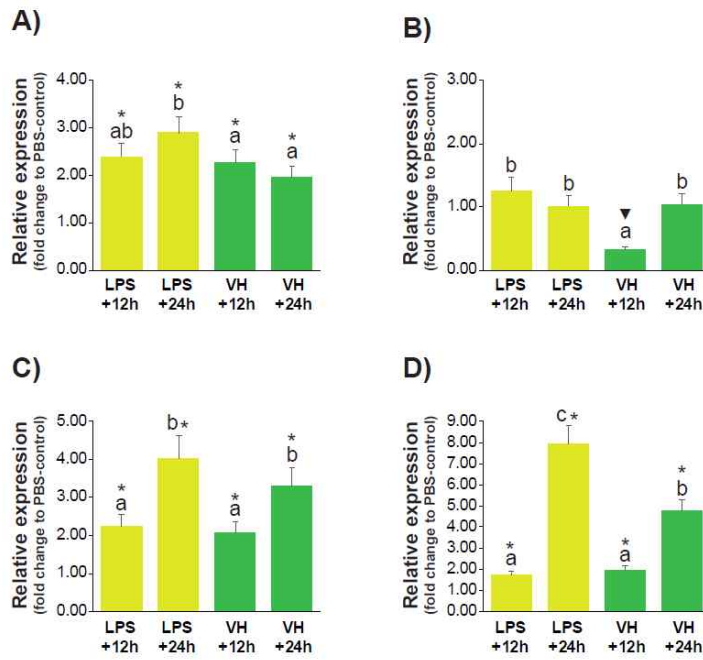
- 저산소 환경변동이 전복에 주는 추가적인 영향과 전복의 차이를 비교분석하고자 하였다. 저산소 환경(용존산소 2 ppm)처리 후 24시간 후에 전복에 각각 면역반응 유도시험을 수행하여 혈구세포를 이용하여 HIF-1 α 유전자 발현을 조사하였다.
- LPS에 의한 저산소 상태의 HIF-1 α 유전자 발현은 6.9배 증가하였으며 정상산소상태의 HIF-1 α 유전자 발현은 7.6배로 유의미한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 하지만 *V. harveyi*에 의한 HIF-1 α 유전자 발현은 저산소 상태에서 감소하였다[그림 2-4-15].



[그림 2-4-13]

중금속 노출에 따른 전복 HIF-1 α 및 MT 유전자 발현 특징의 조직별 비교.

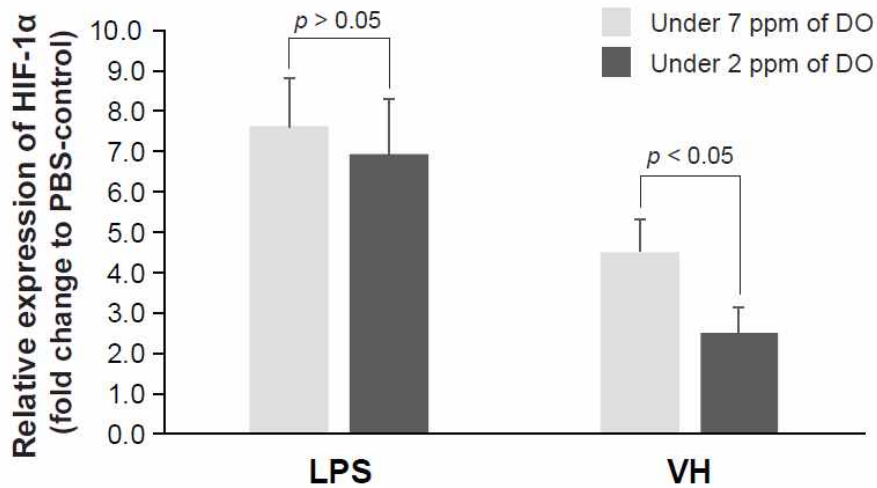
(A와 E) 아가미, (B와 F) 간체장, (C와 G) 근육, (D와 H) 혈구세포



[그림 2-4-14]

면역반응 유도 후 전복 HIF-1 α 유전자의 발현 특징.

(A) 아가미, (B) 간췌장, (C) 근육, (D) 혈구세포



[그림 2-4-15]

2배체 전복에서 혈구세포에서 LPS 및 *V. harvey*의 면역 유도 HIF-1 α 유전자발현에 저산소 상태가 미치는 영향

2-5. 배수체의 체조성 및 형태학적 특징 조사

가. 배수체의 체조성 특징

○ 목적

: 배수체에 특징적인 차등 형질 발현이 성체 체성분 변화 유발 가능성 조사, 그리고 식품으로서 배수체 전복의 상품성을 구체화하기 위하여 배수체와 이배체의 체조성을 비교 분석함.

○ 연구범위 및 내용

: 동일 사육 환경에서 6개월 이상 사육한 동일 나이(5년 산)의 이배체와 삼배체의 연체부위(간첩장-생식소 제거)를 대상으로 체조성 분석을 수행함. 이배체 및 삼배체 각 9개체를 대상으로 3개체씩 혼합한 3개의 반복구를 마련하여 분석을 수행하였다.

: 분석항목은 일반성분검사(proximate content analysis), 유리아미노산(free amino acids), 구성아미노산(bound amino acids), 지방산(free fatty acids)의 총 4개의 항목으로 분석하였다.

(1) 일반성분검사

○ 일반성분검사에서는 이배체와 삼배체 전복에서의 수분(moisture), 회분(ash), 조단백질(crude protein) 및 조지방(crude fat) 함량을 분석하였다[그림 2-5-1].

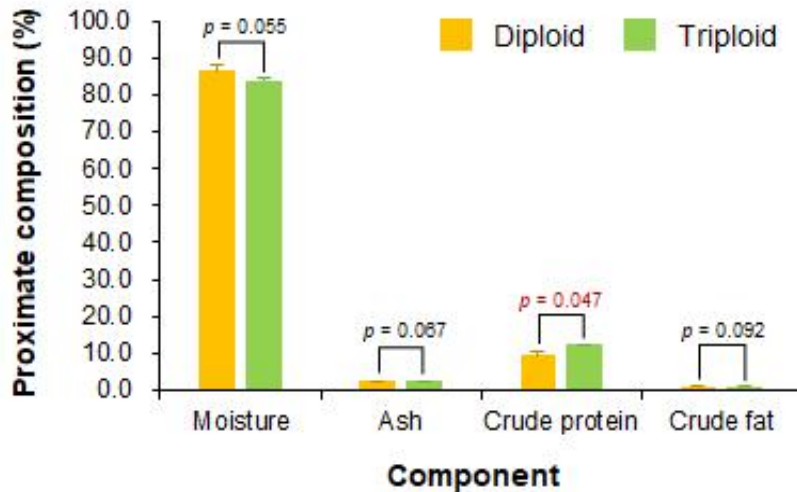
: 수분의 경우 이배체와 삼배체는 각각 평균 86.6% 및 84.0%로 나타났으며, 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$). 회분의 경우 이배체는 평균 2.5%, 삼배체는 2.4%를 보이며 통계적 유의차가 없었다($p > 0.05$).

: 조지방은 이배체 및 삼배체 모두 0.9 - 1.0 사이의 값을 나타내어 서로 유의적 차이가 없었다($p < 0.05$). 하지만 조단백의 경우, 이배체는 9.6%의 함량을 보인 반면 삼배체는 12.3%로 삼배체가 이배체와 비교 시 약 1.3배 높은 조단백을 함유하는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

: 따라서 5년산 이배체 및 삼배체 전복의 일반성분검사에서는 수분, 회분 및 조지방 함량에 있어 이배체와 큰 차이가 없었으나, 배수체는 이배체와 비교 시 유의적으로 높은 조단백 함량을 나타내는 차이가 있었다.

(2) 아미노산(amino acids)

○ (구성아미노산; bound amino acids) 아미노산 분석은 구성아미노산과 유리아미노산으로 구분하여 성분분석을 수행하였다. 구성아미노산 분석은 총 19종[aspartic acid (Asp), threonine (Thr), serine (Ser), glutamic acid (Glu); glycine (Gly); alanine (Ala); cysteine (Cys); valine (Val); methionine (Met), isoleucine (Ile); leucine (Leu); tyrosine (Tyr); phenylalanine (Phe), Lysine (Lys), ammonia (NH₃), histidine (His); arginine (Arg), hydroxyproline (Hypro), proline (Pro)]의 구성 아미노산에 관하여 이배체와 삼배체에서의 함량 분석을 수행하였다[그림 2-5-2].



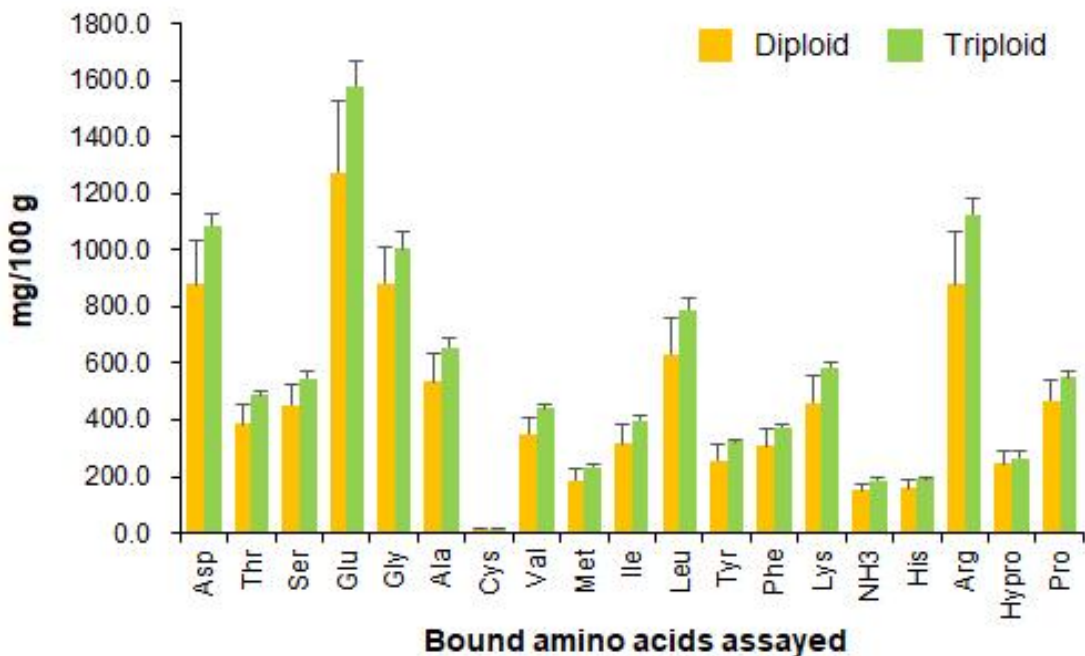
[그림 2-5-1]

5년산 이배체 및 삼배체 전복에서의 일반성분(수분, 회분, 조단백, 조지방) 함량 비교

- : 이배체에서는 분석한 구성아미노산 중 Glu 함량(1274.7 mg/100 g)이 가장 높았고, 이어서 Gly, Asp 및 Arg 순으로 함량이 높았다. 반면 분석한 구성아미노산 중 Cys (15.1 mg/100 g)이 가장 낮게 나타났다.
- : 삼배체의 구성아미노산의 함량 순서 역시 이배체와 크게 다르지 않았다. Glu (1579.1 mg)이 가장 높았고 Cys (15.2 mg)이 가장 낮은 값을 나타내었다.
- : 구성 아미노산 검사로 검출된 모든 아미노산 종류들에서 이배체와 비교 시 삼배체가 높은 함량 수치를 나타내는 경향을 보였으나(최대 1.26배; Thr), 통계적인 유의차는 인정되지 않았다($p > 0.05$; $p = 0.058$ [Val] ~ 0.455 [Cys]).
- (유리아미노산; free amino acids) 총 35종의 유리아미노산 종류를 대상으로 이배체(2n)와 배수체(3n)간 조성 및 함량 차이 여부를 평가하였다.
 - : 분석에 이용한 100 g의 시료를 기준 시 taurine 포함 15종의 아미노산은 이배체 및 삼배체 시료에서 모두 검출되었으며, citrulline, α -amino-n-butyric acid, cystathionine, leucine, tyrosine 5종의 아미노산은 이배체에서는 검출되지 않았으나 삼배체에서만 검출되었다. 이 중 cystathionine의 경우 분석한 3반복구(3개체/반복구) 모두에서 검출되었고, 나머지 citrulline, α -amino-n-butyric acid, leucine, tyrosine은 3반복구 중 1개 또는 2개 반복구에서 검출되었다[표 2-5-1].
 - : 반면, β -Amino isobutyric acid는 이배체에서만 검출되었고(3개 반복구 중 2개 반복구 시료에서 검출), 삼배체에서는 반복구 모두에서 검출되지 않았다.
 - : 그 외 14개 유리아미노산(sarcosine, α -amino adipic acid, methionine, phenylalanine, γ -amino-n-butyric acid, ethanol amine, hydroxylysine,

1-methylhistidine, histidine, 3-methylhistidine, anserine, carnosine, hydroxy proline, proline)은 100 g 시료 기준 시 이배체 및 삼배체 시료 모두에서 검출되지 않았다.

- : 이배체 및 삼배체 모두에서 검출된 15종의 유리아미노산의 함량을 아미노산 종류별로 비교할 경우, 이배체에서 가장 높은 농도로 검출된 유리아미노산은 Tau (920.0 mg/100 g 시료)이었고, 이어 Arg (106.8 mg) 및 Glu (40.6 mg) 순으로 함량이 높게 검출되었다. 반면, Gly, Ala, Asp 유리 아미노산의 경우 10~20 mg/100 g 수준으로 측정되었고, 그 외 Val 외 8종의 측정 항목에서는 모두 10 mg 미만의 농도를 나타내었다.
- : 삼배체의 경우 이배체와 마찬가지로 Tau (1150.8 mg), Arg (203.5 mg) 및 Glu (49.5 mg)이 가장 높은 함량을 보이는 유리 아미노산으로 나타났고, 역시 이배체와 동일하게 β -Ala (0.5 mg), Cys (2.7 mg), Ile (5.0 mg)의 3종 유리 아미노산이 가장 낮은 함량을 보였다. 그 외 9개 측정 항목에서는 이배체와 삼배체 간 함량 순서에 다소 차이가 있었다.
- : 상기의 자료를 종합하여 비교하면, 전반적으로 유리아미노산 함량은 이배체에 비해 삼배체가 높게 나타났고(산술 평균값을 단순 비교 시 최대 3배가량) 이 중 4개 종류의 아미노산(Asp, Ser, Orn, Arg)에서 삼배체가 더 높게 검출되는 통계적인 유의차가 관찰되었다($p < 0.05$). 아울러 삼배체 그룹에서만 검출된 5종의 아미노산 중 cystathionine 에서도 통계적 유의차가 인정되었다($p < 0.05$).



[그림 2-5-2]

5년산 이배체 및 삼배체 전복에서의 구성 아미노산 함량 비교

[표 2-5-1] 이배체(2N)와 배수체(3N) 간 유리 아미노산 함량 비교

Component	Abbreviation	Concentration (mg/100 g)		
		Diploid	Triploid	<i>p</i> value
Taurine	Tau	920.9 ± 211.3	1150.8 ± 45.8	0.098
Aspartic acid	Asp	11.7 ± 1.9	15.4 ± 1.9	0.039
Threonine	Thr	3.3 ± 1.7	10.1 ± 4.4	0.051
Serine	Ser	5.9 ± 2.3	10.6 ± 2.4	0.033
Glutamic acid	Glu	40.6 ± 8.7	49.5 ± 2.5	0.107
Glycine	Gly	16.6 ± 3.2	24.9 ± 11.7	0.172
Alanine	Ala	12.3 ± 5.6	13.4 ± 0.7	0.389
Valine	Val	6.7 ± 1.2	7.1 ± 6.2	0.458
Cystine	Cys	1.9 ± 0.5	2.7 ± 2.4	0.304
Isoleucine	Ile	3.1 ± 1.1	5.0 ± 1.2	0.057
β-Alanine	β-Ala	0.3 ± 0.6	0.5 ± 0.5	0.358
Ammonia	NH ₃	7.1 ± 1.8	8.3 ± 1.2	0.202
Ornithine	Orn	3.4 ± 4.8	10.9 ± 3.2	0.049
Lysine	Lys	3.8 ± 1.7	6.2 ± 1.7	0.074
Arginine	Arg	106.8 ± 38.6	203.5 ± 10.5	0.021
Citrulline	Cit	0.0 ± 0.0	1.1 ± 1.3	0.146
α-amino-n-butyric acid	α-ABA	0.0 ± 0.0	3.6 ± 6.2	0.211
Cystathionine	Cysthi	0.0 ± 0.0	5.5 ± 1.5	0.012
Leucine	Leu	0.0 ± 0.0	1.1 ± 1.8	0.211
Tyrosine	Tyr	0.0 ± 0.0	5.5 ± 5.2	0.102
β-Amino isobutyric acid	β-AiBA	2.4 ± 2.2	0.0 ± 0.0	0.097

(3) 지방산(free fatty acids)

- 이배체(2N)와 배수체(3N)간 지방산 조성과 함량을 비교하였으며, 결과는 [표 2-5-2]에 나타내었다.
- ： 이배체 및 삼배체 시료에서 총 37개의 지방산 종류를 분석한 결과, 100 g 시료 기준 myristic acid (14:0), pentadecanoic acid (15:0), palmitic acid (16:0), palmitoleic acid (16:1), heptadecanoic acid (17:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1 n-9 cis), linoleic acid (18:2 n-6 cis), cis-11-eicosenoic acid (20:1), α -linolenic acid (18:3 n-3), cis-8, 11, 14-eicosadienoic (20:2), tricosanoic acid (23:0), cis-5,8,11,14,17- eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) 총 13종의 지방산이 검출된 반면, butyric acid (4:0), caproic acid (6:0), caprylic acid (8:0), capric acid (10:0), undecanoic acid (11:0), lauric acid (12:0), tridecanoic acid (13:0), myrisoleic acid (14:1), cis-10-pentadecenoic acid (15:1), cis-10-heptadecenoic acid (17:1), elaidic acid (18:1 n-9 trans), linolelaidic acid (18:2 n-6 trans), arachidic acid (20:0), γ -linolenic acid (18:3 n-6), heneicosanoic acid (21:0), behenic acid (22:0), cis-8,11,14-eicosatrienoic acid (20:3 n-6), erucic acid (22:1 n-9), cis-11,14,17-eicosatrienoic acid (20:3 n-6), arachidonic acid (20:4 n-6), cis-13,16-docosadienoic acid (22:2), lignoceric acid (24:0), nervonic acid (24:1), cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (22:6 n-3) 24종의 지방산은 100 g 시료 기준 이배체와 삼배체 시료 모두에서 검출되지 않았다.
- ： 이배체와 삼배체 모두에서 검출된 13종의 지방산의 함량을 비교했을 시, 이배체에서 가장 높은 농도로 검출된 지방산은 palmitic acid (45.67 mg/100g 시료)이며, oleic acid (32.20 mg), tricosanoic acid (25.10 mg), stearic acid (16.83 mg), cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (15.30 mg) 및 myristic acid (10.97 mg) 순으로 높은 함량을 보였다. 그에 반해 cis-11-eicosenoic acid, α -linolenic acid, linoleic acid, heptadecanoic acid, pentadecanoic acid, cis-11,14-eicosadienoic acid, palmitoleic acid 의 경우 5.5 mg/100g 미만 수준으로 측정되었다.
- ： 삼배체에서도 이배체와 유사하게 palmitic acid (62.50 mg), oleic acid (44.57 mg), tricosanoic acid (33.10 mg), stearic acid (19.60 mg) 순으로 지방산 함량이 가장 높게 나타났으나, 이 외 9종의 지방산에 대해서는 이배체의 지방산 함량 순서와는 다소 차이를 보였다.
- 이배체와 삼배체 전복의 지방산 조성을 포화지방산과 불포화지방산으로 구분하여 비교한 자료를 [표 2-5-3]에 나타내었다. Heptadecanoic acid를 제외한 모든 포화지방산들에서 통계적인 유의차가 관찰된 반면에(p < 0.05), 불포화지방산들에서는 palmitoleic acid, oleic acid를 제외하고 이배체와 삼배체간의 통계적 유의차가 관찰되지 않았다(p > 0.05).

○ 전반적으로 지방산의 경우에도 이배체에 비해 삼배체에서의 지방산 함량이 높게 나타났으며(단순 산술 평균값 비교 시), myristic acid, pentadecanoic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid 총 6 종류의 지방산에서 통계적 유의적 차이가 관찰되었다($p < 0.05$). 추가로, 이배체와 삼배체 간 포화지방산 및 불포화지방산 간 함량 비교에서는 포화지방이 불포화지방보다 유의차가 크게 나타나는 경향을 보였다.

[표 2-5-2] 이배체(2N)와 배수체(3N) 간 지방산 함량 비교

Component	Free fatty acid	Concentration (mg/100 g)		
		Diploid	Triploid	<i>p</i> value
Myristic acid	14 : 0	10.97 ± 1.15	19.33 ± 3.21	0.017
Pentadecanoic acid	15 : 0	2.37 ± 0.31	3.03 ± 0.25	0.023
Palmitic acid	16 : 0	45.67 ± 4.53	62.50 ± 5.68	0.009
Palmitoleic acid	16 : 1	0.90 ± 1.56	3.53 ± 1.10	0.041
Heptadecanoic acid	17 : 0	2.90 ± 0.36	3.43 ± 0.42	0.085
Stearic acid	18 : 0	16.83 ± 1.58	19.60 ± 0.53	0.041
Oleic acid	18 : 1 n-9 cis	32.20 ± 2.77	44.57 ± 5.15	0.017
Linoleic acid	18 : 2 n-6 cis	4.17 ± 0.60	5.43 ± 0.98	0.072
cis-11-Eicosenoic acid	20 : 1	5.33 ± 0.70	7.37 ± 1.47	0.062
α-Linolenic acid	18 : 3 n-3	4.43 ± 1.07	6.17 ± 1.96	0.134
cis-11,14-Eicosadienoic acid	20 : 2	1.83 ± 1.72	2.50 ± 2.41	0.359
Tricosanoic acid	23 : 0	25.10 ± 1.66	33.10 ± 3.01	0.013
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	20 : 5 n-3	15.30 ± 1.84	17.93 ± 2.40	0.105

[표 2-5-3] 이배체(2N)와 배수체(3N)에서의 포화지방산 및 불포화지방산별 함량 비교

Component	Free fatty acid	Concentration (mg/100 g)			
		Diploid	Triploid	p value	
Saturated fatty acids	Myristic acid	14 : 0	10.97 ± 1.15	19.33 ± 3.21	0.017
	Pentadecanoic acid	15 : 0	2.37 ± 0.31	3.03 ± 0.25	0.023
	Palmitic acid	16 : 0	45.67 ± 4.53	62.50 ± 5.68	0.009
	Heptadecanoic acid	17 : 0	2.90 ± 0.36	3.43 ± 0.42	0.085
	Stearic acid	18 : 0	16.83 ± 1.58	19.60 ± 0.53	0.041
	Tricosanoic acid	23 : 0	25.10 ± 1.66	33.10 ± 3.01	0.013
Unsaturated fatty acids	Palmitoleic acid	16 : 1	0.90 ± 1.56	3.53 ± 1.10	0.041
	Oleic acid	18 : 1 n-9 cis	32.20 ± 2.77	44.57 ± 5.15	0.017
	Linoleic acid	18 : 2 n-6 cis	4.17 ± 0.60	5.43 ± 0.98	0.072
	α-Linolenic acid	18 : 3 n-3	4.43 ± 1.07	6.17 ± 1.96	0.134
	cis-11-Eicosenoic acid	20 : 1	5.33 ± 0.70	7.37 ± 1.47	0.062
	cis-11,14-Eicosadienoic acid	20 : 2	1.83 ± 1.72	2.50 ± 2.41	0.359
	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	20 : 5 n-3	15.30 ± 1.84	17.93 ± 2.40	0.105

나. 배수체의 형태학적 특징

○ 목적

- : 이배체 대비 배수체의 차등형질 조사의 일환으로 성장단계별 배수체와 이배체의 외형적 차이(패각의 형태)에 대하여 평가하고, 배수체의 비만도, 중량 특성, 체형에 대한 특징을 조사함.

(1) 패각의 계측 형질

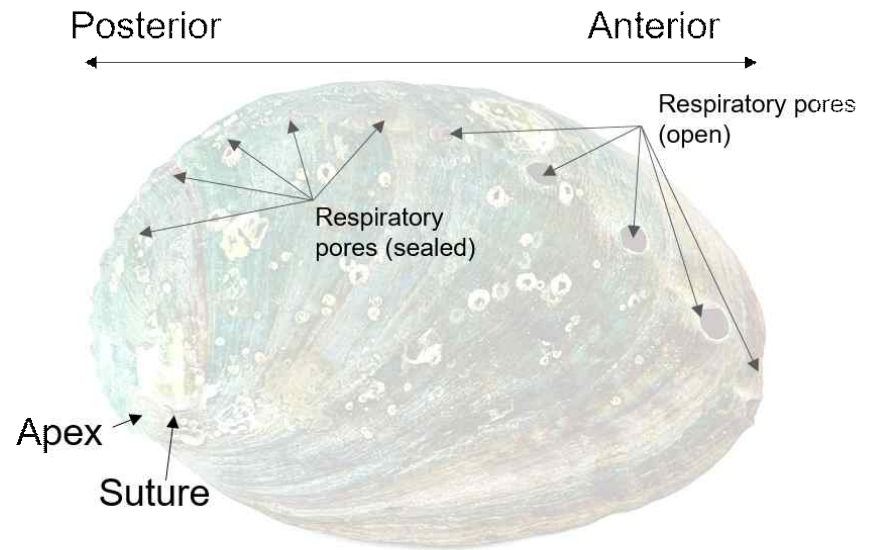
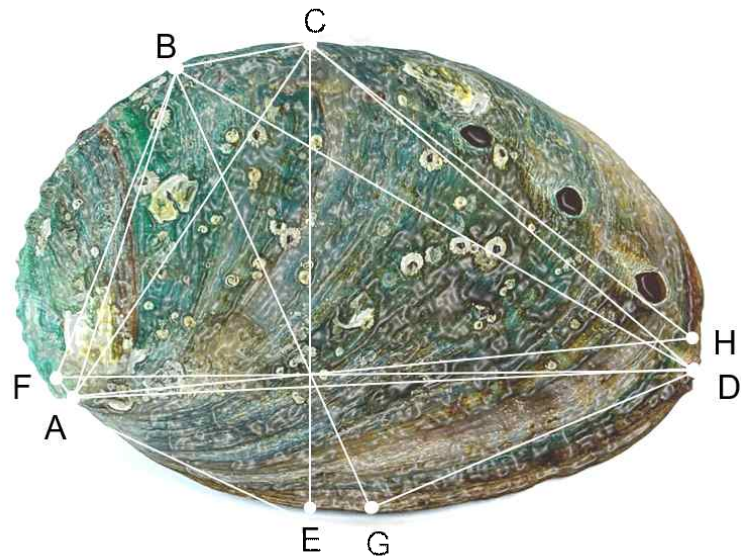
(1.1) 계측 및 평가 기준

- 성장 단계별로 삼배체와 이배체 간 계측 형질(morphometric traits)의 차이가 유발되는지를 조사하고자 하였다. 이를 위해 전복류의 형태분석에 관한 종래의 선행연구 자료들을 토대로 8개의 계측 기준점을 설정 후 4개의 성장 단계(size group-I ~ IV)에서 이배체와 삼배체의 외형 형질을 비교하였다.
- 패각 내 계측 기준점(point)의 설정은 아래와 같다.
 - : Point F 및 Point D: 각정(apex)과 가장 최근에 개방된 출수공(last open respiratory pore; 가장 anterior part쪽의 출수공)을 직선으로 그었을 경우 해당 직선과 만나는 패각의 양 끝 지점
 - : Point C 및 Point A: Suture와 가장 최근에 닫힌 출수공(last closed respiratory pore)을 직선으로 지나가는 선과 만나는 패각의 양 끝점
 - : Point E: Point C에서 수직으로 직선을 그었을 때 패각의 끝에 도달하는 지점
 - : Point H: Point F와 point D를 연결하는 직선과 point C와 point E를 연결하는 직선이 교차하는 점을 지나도록 Point A에서 anterior쪽으로 직선을 그었을 때 그 직선이 패각 끝에 도달하는 지점
 - : Point B: Point D에서 가장 최근에 닫힌 출수공(last closed respiratory pore)을 지나가는 직선을 그었을 때 posterior쪽 패각의 끝에 직선이 도달하는 지점
 - : Point G: C-E point를 지나가는 직선과 F-D point를 지나가는 직선이 교차하는 점을 지나도록 point B에서 직선을 그었을 때 패각 끝에 도달하는 지점
- 앞서와 같이 설정한 8개의 point 지점(points A~H)간 직선거리를 측정함으로써 총 16개의 계측 자료를 성장단계별로 확보하였다(직선거리, FD, AC, CE, AH, AF, AD, AE, CH, CD, DB, BF, BA, BG, GE, DG, CB). 설정한 8개의 point 지점 및 지점 간 16개의 직선거리 측정값은 [그림 2-5-3]에 나타내었다.
- 각 성장 단계의 개체별로 확보한 16개 측정값들 중 각장과 관련한 가장 큰 값에 해당하는 FD를 기준으로 나머지 15개 측정값들의 FD에 대한 상대 비율(%)을 계산하였다(15개 characters = AC/FD, CE/FD, AH/FD, AF/FD, AD/FD, AE/FD, CH/FD, CD/FD, DB/FD, BF/FD, BA/FD, BG/FD, GE/FD, DG/FD, CB/FD).

- 아울러 각고와 관련한 가장 큰 값에 해당하는 CE를 기준으로 나머지 15개 측정값들의 CE에 대한 상대 비율(%)을 계산하였다(15 characters = FD/CE, AC/CE, CE/CE, AH/CE, AF/CE, AD/CE, AE/CE, CH/CE, CD/CE, DB/CE, BF/CE, BA/CE, BG/CE, GE/CE, DG/CE, CB/CE).
- 따라서 개체별 30개의 characters 값들을 확보하여 통계처리에 이용하였다.

(1.2) 성장단계별 이배체-배수체의 패각 계측 형질

- 크기별 배수체-이배체 그룹 및 통계처리
 - : 동일 사육조건에서 채묘 및 사육하고 있던 이배체와 배수체 개체들을 대상으로 4개의 성장 구간 단계를 나누어 분석에 이용하였다. Size group-I은 패각의 크기(shell length 기준)가 2.17 ± 0.10 mm (2N) 및 2.21 ± 0.10 mm (3N), Size group-II는 3.06 ± 0.10 mm (2N) 및 3.25 ± 0.09 mm (3N), Size group-III는 4.78 ± 0.27 mm (2N) 및 4.35 ± 0.26 mm (3N), 그리고 Size group-IV는 11.45 ± 0.35 mm (2N) 및 10.52 ± 0.66 mm (3N)로서, 각 size group내 이배체와 삼배체간 유사한 개체들을 분석에 이용하였다.
 - : 각 size group에서 각 character별 이배체와 삼배체간 평균값의 유의적인 차이가 있는지 여부는 student's t-test를 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.
- 성장 단계 및 배수체 그룹간 16개 지표들의 측정값
 - : Size group-I~IV에 해당하는 이배체와 삼배체 개체들을 대상으로 패각의 무게 및 16개 지표들의 평균 측정값, 최대-최소값, 변동계수(coefficient of variation; %CV)를 [표 2-5-4]에 나타내었다. 표에서 보듯이 지표별로 변동계수(%CV)의 차이를 보여 지표에 따라서 개체간 편차가 큰 지표들과(예, GE 및 DG 등), 개체간 일양한 측정값을 보이는 지표들(FD, CE, AH, AD 등)이 관찰되었다.
 - : 그러나 각 성장 단계 그룹 내에서 지표별 CV 값에 대한 이배체와 삼배체간 선명한 차이 또는 배수성 특이적인 상관관계는 관찰되지 않았다. 물론 본 측정값 자체를 이용하여 이배체와 삼배체간 통계처리를 수행할 경우, 일부 지표에서 통계적인 유의차가 관찰되었으나 이는 각 개체의 크기에 따라 직접적으로 영향을 받는 절대 값이므로 본 연구의 통계처리 분석 대상에 포함시키지 않았으며, 대신 본 지표 측정값들 간의 상대 크기(기준 지표에 대한 비율)의 평가를 통해 계측형질 평가를 수행하였다.



[그림 2-5-3]

2배체와 3배체 간 계측형질 특성 차이 평가를 위한 측정 지표

[표 2-5-4] 3배체 및 2배체 전복의 계측형질 평가를 위한 패각 측정값 요약

Size Group	Ploidy		Shell weight (g)	Character code (cm)															
				FD	AC	CE	AH	AF	AD	AE	CH	CD	DB	BF	BA	BG	GE	DG	CB
Group 1	2N	Max	0.42	2.43	1.80	1.75	2.30	0.40	2.25	1.30	1.63	1.93	2.10	1.40	1.45	2.08	0.45	1.25	0.85
		Min	0.21	1.95	0.40	1.40	1.83	0.13	1.73	0.75	1.15	1.28	1.20	1.05	1.18	1.30	0.15	0.58	0.33
		Ave	0.30	2.10	1.45	1.49	2.02	0.25	1.95	1.08	1.39	1.54	1.83	1.17	1.27	1.68	0.22	0.87	0.57
		SD	0.04	0.09	0.19	0.06	0.11	0.06	0.10	0.18	0.12	0.16	0.12	0.08	0.07	0.17	0.06	0.14	0.13
		%CV	13.07	4.05	13.43	4.10	5.25	23.97	5.34	16.60	8.86	10.42	6.80	7.00	5.83	10.20	28.10	15.87	23.28
	3N	Max	0.50	2.38	1.80	1.68	2.33	0.45	2.30	1.43	1.50	1.58	2.05	1.48	1.40	1.98	0.43	1.20	0.65
		Min	0.27	1.95	1.30	1.33	1.83	0.18	1.83	0.53	1.08	1.20	1.73	1.00	1.10	1.45	0.18	0.70	0.38
		Ave	0.36	2.11	1.55	1.48	2.03	0.23	1.99	0.96	1.31	1.43	1.83	1.17	1.25	1.61	0.27	0.95	0.55
		SD	0.05	0.11	0.14	0.08	0.13	0.05	0.11	0.18	0.10	0.09	0.07	0.10	0.08	0.11	0.07	0.15	0.07
		%CV	14.33	5.07	8.85	5.37	6.58	20.27	5.77	18.70	7.26	6.12	3.65	8.81	6.67	6.99	27.13	15.86	12.21
Group 2	2N	Max	0.96	3.08	2.50	2.13	2.95	0.33	2.95	1.95	2.10	2.18	2.90	1.78	1.85	2.55	0.50	1.33	1.23
		Min	0.52	2.80	1.95	1.85	2.55	0.18	2.58	1.20	1.50	1.60	2.43	1.40	1.48	2.05	0.25	0.78	0.68
		Ave	0.81	2.91	2.18	2.00	2.80	0.23	2.77	1.60	1.82	1.91	2.61	1.59	1.68	2.30	0.36	1.06	0.85
		SD	0.08	0.09	0.13	0.09	0.08	0.03	0.09	0.20	0.15	0.15	0.11	0.09	0.08	0.11	0.07	0.16	0.14
		%CV	10.23	3.16	6.13	4.38	2.72	12.96	3.08	12.21	8.08	7.63	4.23	5.64	4.51	4.94	18.97	15.29	16.46
	3N	Max	1.18	3.25	2.53	2.28	3.13	0.28	3.13	2.03	2.25	2.40	2.85	1.80	1.90	2.60	0.50	1.55	1.00
		Min	0.49	2.88	2.05	1.95	2.80	0.15	2.73	1.30	1.78	1.83	2.48	1.48	1.55	2.18	0.18	0.73	0.65
		Ave	0.95	3.07	2.28	2.11	2.99	0.21	2.95	1.69	1.95	2.03	2.66	1.68	1.78	2.41	0.34	1.14	0.81
		SD	0.15	0.11	0.12	0.10	0.09	0.03	0.10	0.21	0.10	0.13	0.10	0.09	0.08	0.09	0.08	0.17	0.10
		%CV	15.32	3.74	5.33	4.73	3.05	15.69	3.33	12.15	5.28	6.31	3.84	5.22	4.64	3.63	23.58	14.96	12.53
Group 3	2N	Max	9.85	5.05	3.90	3.50	4.95	0.45	5.00	3.65	3.35	3.50	4.30	3.15	3.35	4.35	0.45	2.20	1.90
		Min	2.68	3.75	2.95	2.70	3.60	0.20	3.50	1.90	2.35	2.45	3.45	2.15	2.30	3.10	0.20	0.90	0.90
		Ave	4.09	4.51	3.47	3.06	4.40	0.33	4.35	2.71	2.79	2.92	3.87	2.63	2.78	3.59	0.33	1.49	1.34
		SD	1.05	0.28	0.27	0.21	0.34	0.08	0.35	0.41	0.22	0.25	0.20	0.19	0.19	0.21	0.07	0.31	0.20
		%CV	25.61	6.23	7.69	6.87	7.77	22.50	8.15	15.18	8.01	8.54	5.15	7.28	6.75	5.92	21.79	20.59	15.01
	3N	Max	4.68	4.90	3.90	3.30	4.80	0.40	4.75	3.15	3.10	3.25	4.35	2.70	3.00	4.05	0.85	1.90	1.85
		Min	2.52	3.80	2.80	2.75	3.60	0.20	3.55	1.80	2.45	2.60	3.60	2.05	2.20	2.95	0.30	1.30	0.85
		Ave	3.30	4.26	3.19	3.03	4.13	0.29	4.07	2.26	2.76	2.94	3.84	2.33	2.53	3.40	0.54	1.58	1.26
		SD	0.48	0.26	0.26	0.14	0.27	0.04	0.27	0.33	0.16	0.21	0.18	0.14	0.18	0.25	0.08	0.15	0.28
		%CV	14.60	6.21	8.05	4.67	6.59	15.24	6.63	14.82	5.69	7.13	4.77	6.19	7.10	7.35	15.38	9.47	22.63
Group 4	2N	Max	0.00	12.45	9.70	7.95	12.10	1.10	12.15	8.65	6.70	7.05	9.20	7.35	7.45	8.90	1.50	5.70	2.70
		Min	0.00	9.85	7.10	6.25	9.35	0.40	9.50	5.55	4.60	5.05	7.05	6.00	5.95	7.35	0.70	2.65	1.15
		Ave	0.00	11.11	8.47	7.26	10.69	0.71	10.73	6.98	5.89	6.20	8.12	6.69	6.91	8.18	1.16	3.79	2.09
		SD	0.00	0.47	0.47	0.50	0.50	0.18	0.45	0.81	0.71	0.75	0.62	0.32	0.29	0.37	0.18	0.75	0.31
		%CV	0.00	4.23	5.60	6.90	4.65	25.01	4.20	11.56	12.14	12.17	7.59	4.74	4.16	4.47	15.12	19.78	15.09
	3N	Max	41.38	11.60	8.70	7.80	11.60	0.55	11.55	7.30	8.60	8.85	9.55	7.10	7.30	7.95	2.05	7.15	2.70
		Min	18.49	8.80	6.15	5.85	8.65	0.15	8.60	3.55	4.85	5.15	7.20	4.35	4.55	5.80	0.35	3.55	0.65
		Ave	30.75	10.17	7.05	6.73	10.05	0.33	10.03	5.06	6.79	7.00	8.33	5.90	6.08	7.06	0.81	5.07	1.74
		SD	5.10	0.77	0.44	0.38	0.76	0.08	0.77	0.77	0.69	0.68	0.52	0.39	0.42	0.40	0.23	0.84	0.40
		%CV	16.60	7.54	6.30	5.67	7.61	23.93	7.72	15.12	10.18	9.66	6.21	6.59	6.86	5.61	28.23	16.65	23.13

Max: Maximum Min: Minimum Ave: Average SD: Standard deviation CV: Coefficient of variation (%)

○ 크기 그룹-I에서의 분석

- : Size group-I에서 30개 character들의 이배체와 삼배체간 비교 분석을 수행한 결과는 [그림 2-5-4]에 나타내었다. 그림에서 보듯이 Size group-I의 경우 FD에 대한 상대 크기(%) 및 CE에 대한 상대 크기 모두에서 이배체와 삼배체간 통계적인 차이는 관찰되지 않았다($p > 0.05$).
- : FD에 대한 상대비율의 경우 15개 character들에서 이배체와 삼배체간 유의차 검증을 위한 t-test p 값이 0.14~0.85로 나타났고, CE에 대한 15개의 character들에 역시 0.10~0.87로 나타남으로서, Size group-I에서는 두 ploidy 그룹들 간에 계측형질에 대한 형태적 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

○ 크기 그룹-II에서의 분석

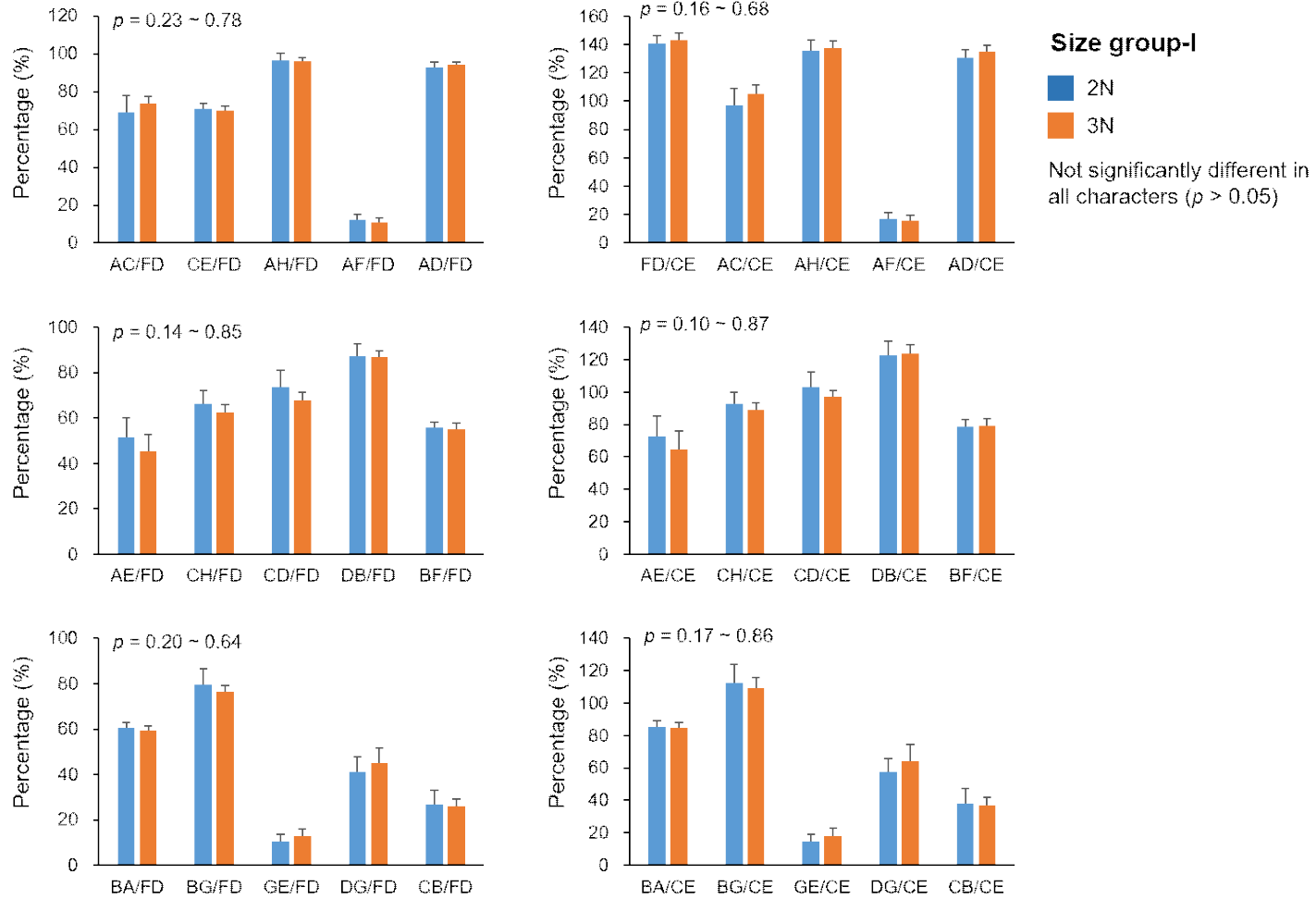
- : Size group-II 역시 앞서 Size group-I과 유사한 경향을 나타내어 대부분의 character들에서 이배체와 삼배체간 통계적 유의차는 관찰되지 않았다.
- : FD를 기준으로 하는 모든 character들은 유의차가 인정되지 않았고(p value = 0.08~0.99), 반면 CE를 기준으로 한 character들의 경우 DB/CE에서 이배체에 비해 삼배체가 유의적으로 작은 값을 나타내어 통계적 유의성 차이가 인정되었다 ($p < 0.05$). 그러나 나머지 모든 14개 character들에서는 이배체와 삼배체간 유의적인 차이는 관찰되지 않았다($p > 0.05$)[그림 2-5-5].

○ 크기 그룹-III에서의 분석

- : Size group-III의 경우 앞서 두 그룹들과는 달리 FD 및 CE를 기준으로 한 분석 모두에서 이배체와 삼배체간 통계적인 유의차를 보이는 character들이 관찰되었다. FD 기준 분석의 경우, AE/FD 및 BF/FD 비율 값에서 삼배체는 이배체보다 유의적으로 낮은 수치를 보였으며, 반면 DB/FD 및 GE/FD에서는 반대로 삼배체가 이배체보다 유의적으로 높은 수치를 나타내었다.
- : 한편, CE를 기준으로 한 분석의 경우 AC/CE, AE/CE, BF/CE, BA/CE 비율에서 삼배체가 이배체보다 낮은 값을, 그리고 GE/CE에서 삼배체가 이배체보다 높은 비율 값을 보였다[그림 2-5-6].

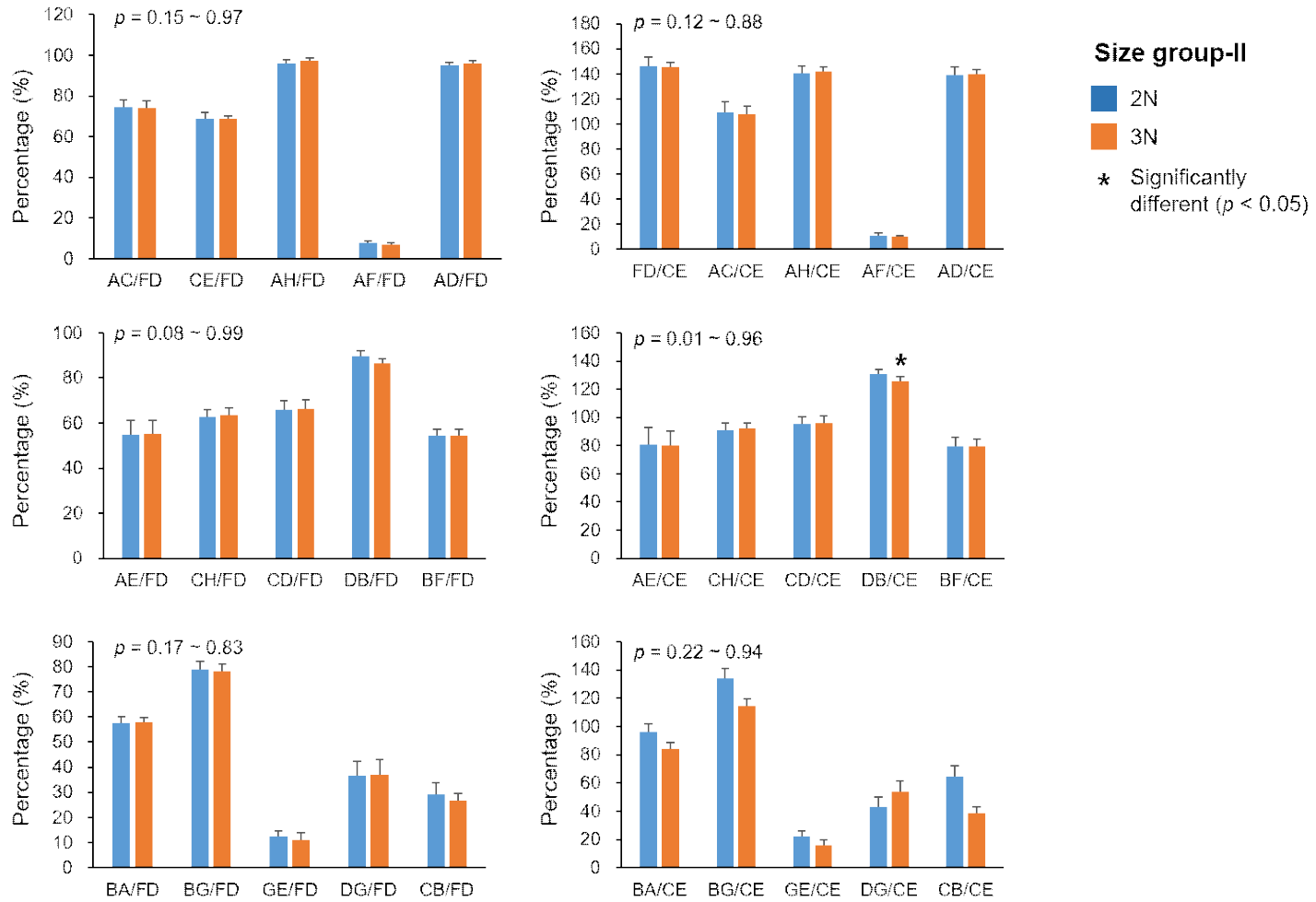
○ 크기 그룹-IV에서의 분석

- : 완전한 성체 크기에 도달한 개체들이 속하는 Size group-IV의 경우 이배체와 삼배체 간 유의적인 차이를 나타내는 character들이 확연히 증가하는 경향을 나타내었다[그림 2-5-7].



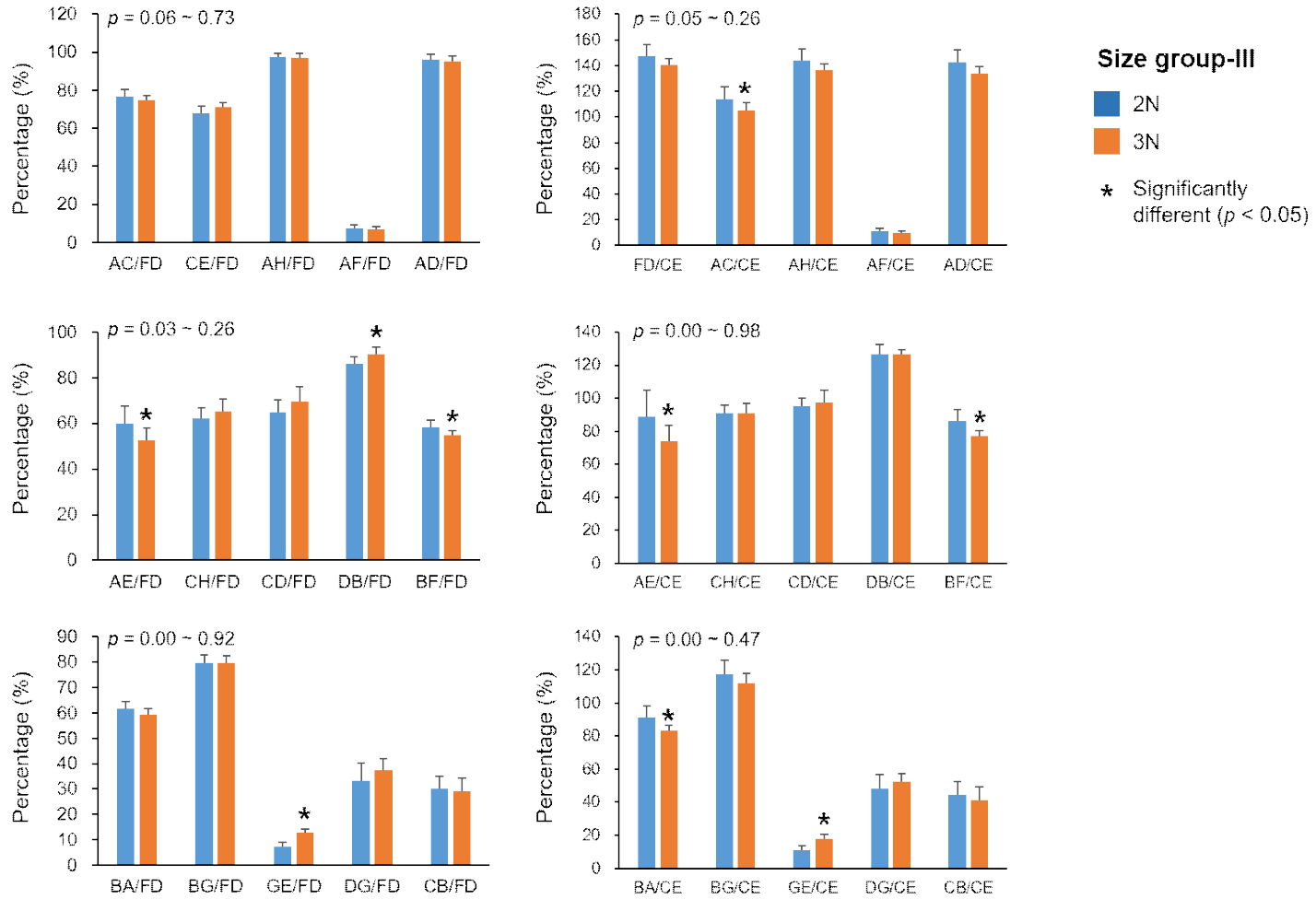
[그림 2-5-4]

Size group-I 에서의 2배체와 3배체 간 계측형질의 분석



[그림 2-5-5]

Size group-II 에서의 2배체와 3배체 간 계측형질의 분석



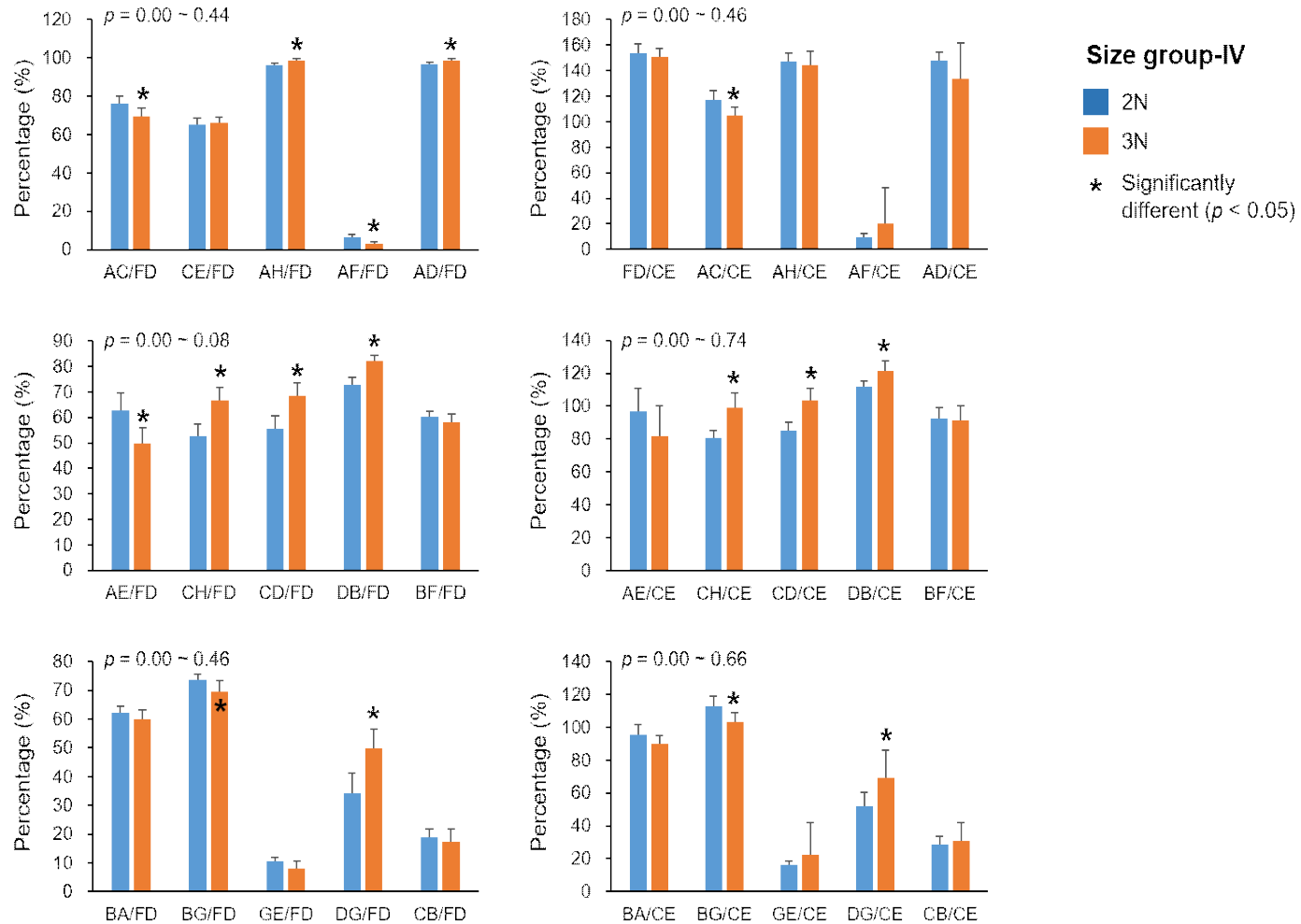
[그림 2-5-6]

Size group-III 에서의 2배체와 3배체 간 계측형질의 분석

- : FD를 기준으로 한 분석의 경우 FD에 대한 AC, AH, AF, AD, AE, CG, CD, DB, BG, DG의 상대 비율에 해당하는 총 10개의 character들에서 이배체와 삼배체간 통계적인 유의차가 관찰되었다. 반면 CE를 기준으로 한 분석에서는 CE에 대한 AC, CH, CD, DB, BG, DG의 상대 비율에 해당하는 총 6개의 character들에서 통계적인 차이가 관찰되었다.
- : Ploidy group간 차이를 보이는 16개의 character들 중에서 AC/FD, AF/FD, AE/FD, BG/FD, AC/CE, BG/CE 6개 character들은 이배체가 삼배체보다 높은 값을 나타내었고, 반면 나머지 10개 character들(AH/FD, AD/FD, CH/FD, CD/FD, DB/FD, DG/FD, CH/CE, CD/CE, DB/CE, DG/CE)에서는 삼배체가 이배체보다 유의적으로 높은 수치를 보였다.

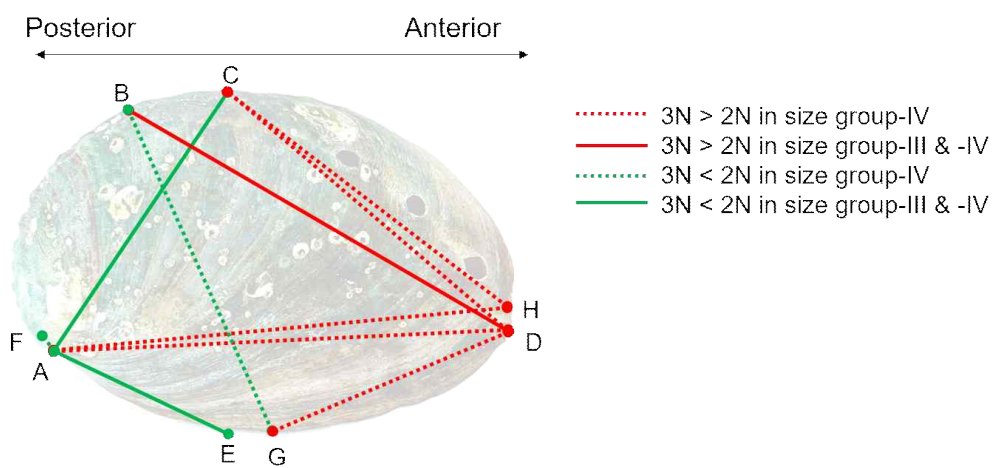
(1.3) 종합 고찰

- 이상의 결과를 종합하면 이배체와 삼배체 간 패각의 계측 형질 차이는 초기 발달에서는 거의 관찰되지 않지만, 성숙 나이를 지나 개체 크기가 증가하면서 그 차이가 선명해지기 시작하며, 이는 현장 보급한 이배체와 삼배체 전복에서도 유사하게 관찰된 바 있다. 이배체보다 삼배체에서 유의적으로 증가하는 character들은 모두 Point H 또는 Point D와 연결된 character들임을 알 수 있다. 서로 근접한 이들 두 개의 points들은 전복의 가장 전방(anterior) 부분에 위치하므로 패각의 anterior part의 길이 성장과 상관관계가 있을 가능성을 암시하고 있다. 반면 성체 단계에서 이배체와 비교 시 삼배체가 유의적으로 낮은 수치를 보이는 character들은 모두 posterior 쪽 성장과 관련이 되어 있음을 알 수 있다. 즉 각 정 또는 suture 근접 point들과 연결된 character들이거나 상대적으로 posterior 방향에 있는 point들 (B 및 E)과 연결된 character들로 나타났다[그림 2-5-8].
- Ploidy 간 차이를 보이는 character 중 AC 연관 및 AE 연관 character들 ($2N > 3N$)은 Size group-IV 뿐만 아니라 Size group-III에서 이미 차이를 보이기 시작한 형질이었고, 또한 BD-연관 character ($2N < 3N$) 역시 Size group-III에서 이미 삼배체가 이배체보다 유의적으로 큰 값을 나타내고 있음을 알 수 있다.
- 따라서 본 연구를 통해, 완전한 성숙연령 도달 이후 단계에 접어든 삼배체는 shell의 anterior part 성장에 있어 이배체와 유의적인 차이를 나타내며, 이는 이후 연구결과에서 삼배체가 해당 성체 시기에 이배체보다 높은 비만도와 성장 개선편 특성을 보인다는 결과와 유의미한 상관관계를 갖는 것으로 생각된다.
- 패류의 패각 형태는 사육조건 또는 사육 환경에 따라 영향을 받을 수 있으므로 추후 서로 다른 사육조건에서 성장한 집단들을 대상으로 재현성 검증이 필요할 수 있을 것이다. 이를 통해 사육조건에 큰 영향을 받지 않는 특징들이 발굴된다면 배수체의 생산 형질에 관한 유용한 표현형 지표가 확보될 수 있으리라 기대된다.



[그림 2-5-7]

Size group-IV 에서의 2배체와 3배체 간 계측형질의 분석



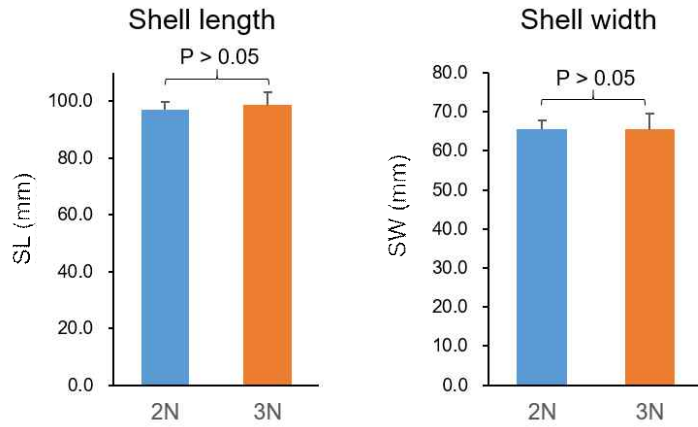
[그림 2-5-8]

2배체와 3배체 간 유의적 통계차이를 나타내는 계측형질의 요약

(2) 체고, 비만도, 가식부 중량

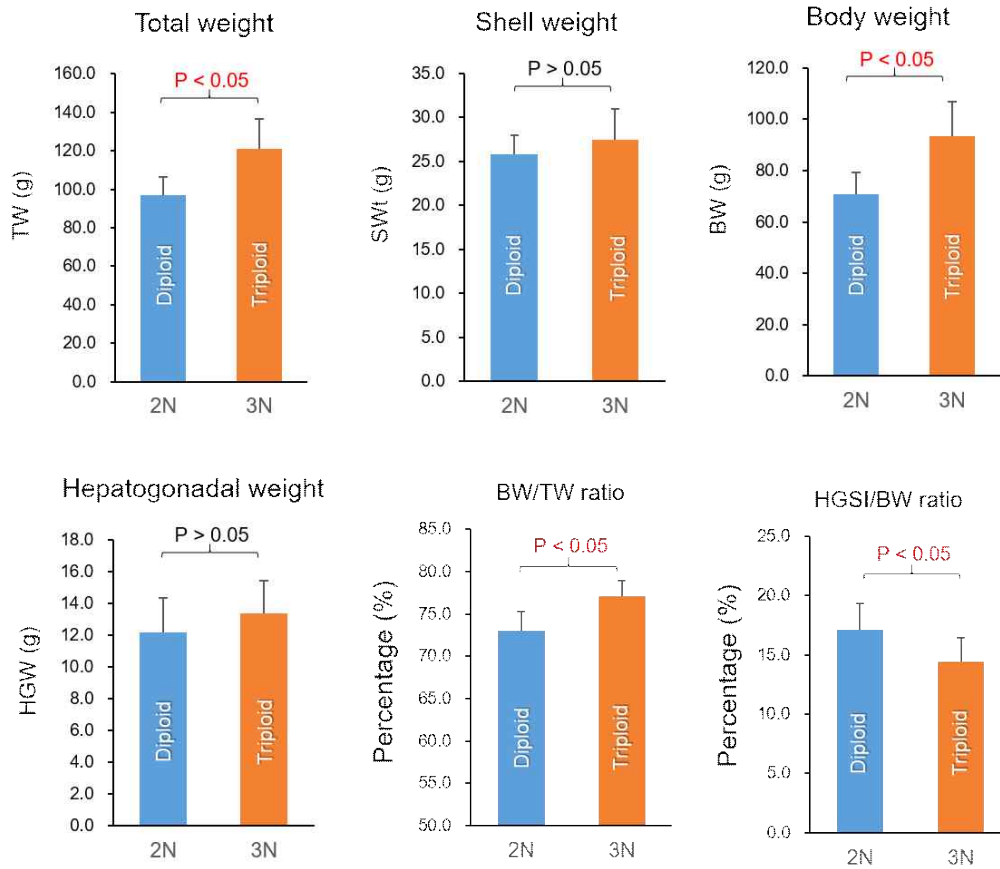
(2.1) 동일 패각 크기를 갖는 이배체 및 삼배체의 중량 특징

- 3년 이상의 연령에 해당하는 성체 배수체는 상기와 같이 성장 형질과 관련한 형태학적 차이를 나타낼 가능성이 관찰되었고, 해당 연령 구간에서 삼배체가 이배체보다 유의적인 무게 증가가 1차 확인된 바 있다. 이에 본 연구 항목에서는 gross morphology에서 육안적 차이(고비만도)를 나타내는 삼배체 전복의 특성을 보다 구체화하기 위해서 동일 크기의 패각을 갖는 이배체와 삼배체를 대상으로 추가적인 분석을 하였다.
- 동일 모패들로부터 동일 시점에 생산하여 만3년 이상 동일 사육 환경에서 성장한 이배체 및 삼배체 개체들을 대상으로 하였으며, 두 ploidy 그룹에서 패각의 크기를 기준으로 통계적 유의차가 없는 개체들을 24미 이상 선발하여 분석에 이용하였다. 해당 시기에 이미 삼배체가 이배체에 평균 무게가 더 높게 관찰되었으므로 이배체를 기준으로 삼배체 그룹으로부터 각장(shell length) 및 각폭(shell width) 모두에서 이배체와 통계적인 차이가 없는 개체들을 선발하였다[그림 2-5-9].
- 앞서 그림에서 보듯이 이배체와 삼배체는 패각의 크기에서는 동일하였으나 총 중량(total weight: TW)의 경우 삼배체가 이배체와 비교 시 유의적으로 높은 중량을 나타내었다. 패각의 무게는 패각의 크기와 마찬가지로 두 그룹 간 유사하여, 이배체와 삼배체간 패각 자체의 두께 등의 특성에 유의적인 차이는 없는 것으로 판단되었다. 따라서 패각을 제외한 무게(body weight)에서도 역시 이배체보다 삼배체가 유의적으로 높은 중량을 나타내었다. 하지만 생식소를 포함한 간체장의 경우 두 그룹 간 유의적인 차이가 관찰되지 않았는데, 이는 생식소 성숙 정도가 유의적으로 낮더라도 이미 체중이 더 높은 삼배체가 더 큰 간체장을 갖기 때문에 간체장을 포함한 동일 패각 크기의 이배체 및 삼배체간 측정에서는 유의적인 차이가 표현되지 않았다.
- 삼배체는 이배체와 동일 크기의 패각을 가질 때 패각의 무게에서도 큰 차이를 나타내지 않기 때문에, 육안적인 패각의 크기를 기준으로 할 경우 전체 총중량(TW) 중 연체부 중량(BW)이 차지하는 비율은 이배체와 큰 차이를 나타내지 않는다. 즉, 동일 패각 크기를 갖는 상품들 간 비교할 경우 삼배체가 이배체에 비해 가식부가 더 높으며, 아울러 동을 크기 기준 시, 삼배체의 HGSI (hepatogonadal tissue가 전체 체중에서 차지하는 비율)가 이배체보다 낮음을 알 수 있다[그림 2-5-10].



[그림 2-5-9]

비만도 관련 형태 특징 비교에 이용한 2배체 및 3배체 전복 개체들의 각장 및 각폭

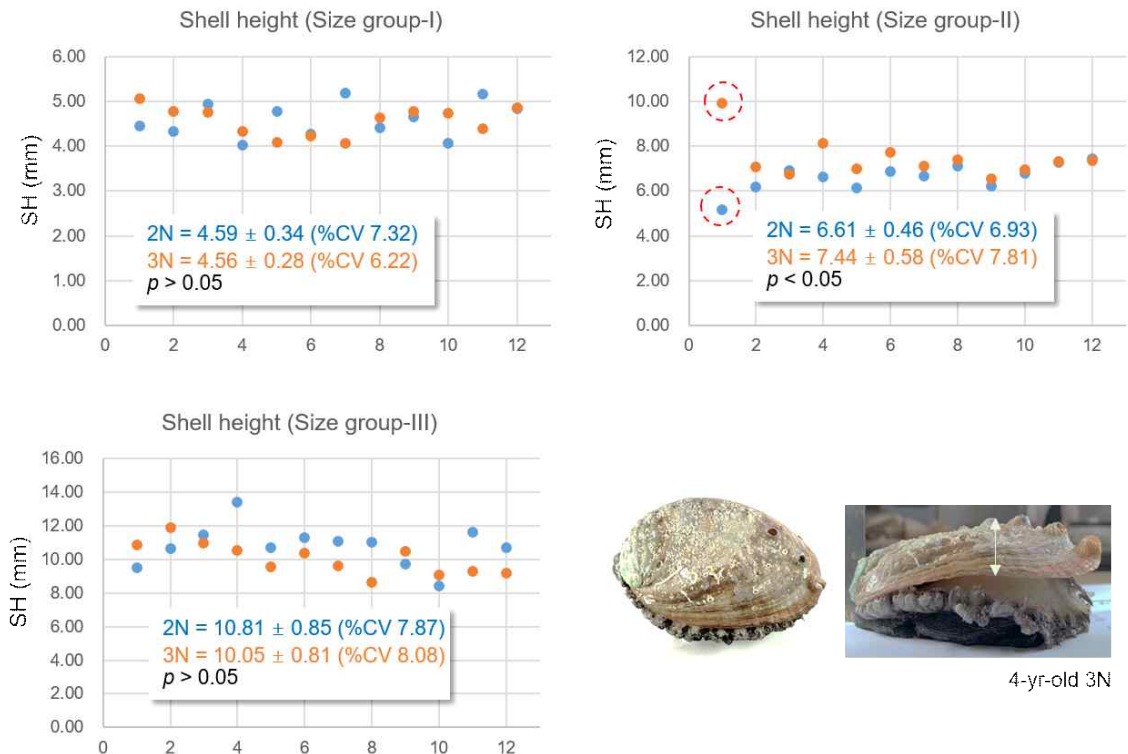


[그림 2-5-10]

동일 패각 크기의 2배체와 3배체 전복 개체들 간 중량 특성 및 간췌장-생식소 속도지수 비교

(2.2) 각고(shell height) 형질

- 삼배체 비만도 형질과 각고(shell height; SH)간 상관관계 여부를 조사하기 위해 서로 다른 size group들(상기 계측 형질 분석에 이용한 동일 그룹들)에 속하는 이배체와 삼배체들의 각도를 측정하였다[그림 2-5-11]. 그 결과 size group-I 및 -III의 경우 이배체와 삼배체 간 매우 유사한 평균 및 CV 값을 나타내어 ploidy 그룹에 따른 각고 자체의 차이는 해당 시기에 없는 것으로 나타났다.
- Size group-II에서 통계적 유의차가 관찰되었으나, 해당 그룹 내(특히 이배체) 측정값의 outlier가 존재한다는 점, 그리고 성장이 진행되어 size group-III에서 그 차이가 소멸된다는 점을 고려할 때 해당 시기에 각고와 비만도 형질이 연계된다고 판단하기는 어렵다.
- Size group-IV의 경우 삼배체들은 그림에서 보듯이 각고의 측정값은 이배체와 선명한 차이를 나타내지 않지만, 이보다는 body mass 두께 자체가 증가하는 경향을 나타내는 특징을 보여, 삼배체 개체의 전체적인 체고와 비만도가 삼배체가 높아지지만, 그 주요한 이유가 각고 자체가 높아지는 것에 기인하는 것은 아닌 것으로 판단된다.



[그림 2-5-11]

2배체와 3배체 전복의 각고 비교

2-6. 배수체의 생식학적 특징 및 생식력 조사

○ 필요성

- : 2배체 및 3배체 전복의 발달 및 성장 단계별 차등발현 유전자들의 profiling과 배수체 특이 전사체의 동정은 이배체와 비교 시 배수체 전복이 차등적으로 나타낼 수 있는 잠재적 대사 형질과 세포 기능을 추적하고 배수체 상품을 규격화하는데 유용한 자료로 활용될 것이며, 이는 배수화 탐재를 통해 육종학적 측면에서 배수체에 획득될 수 있는 형질 개선 효과를 탐색하기 위한 근간이 될 것이다.
- : 반면 배수체 유도의 원 목적은 생식학적 격리를 통해 국내에서 탐제한 육종기술(참전복 선발육종; 국립수산물연구원) 배타적 권리의 지속적인 확보와 미승인 상태의 대량 복제를 방지하기 위함이다. 따라서 GSP 수출 상품은 종자 단계에서 이루어지지만 궁극적으로 수입국에서 상품으로 판매되는 최종 형태는 종자로부터 양식한 성체(2년산 이상)이고, 수입국 기업들이 생식 가능 연령의 성체를 확보했을 때 생식학적 격리 효과의 정도에 관한 자세한 검증이 GSP 프로젝트에서 이루어져야 한다.
- : GSP 1단계 연구를 통해서 배수체 기술이 완성된 후 시범 생산된 3배체 집단을 대상으로 전복 3배체는 기본적으로 생식소 발달이 크게 지연되고 생식 기능이 크게 제한되거나 억제될 수 있음을 확인한 바 있다. 그러나 전복은 생식연령 도달 기간이 상당히 길기 때문에(2년 이상) 이에 대한 분자적 연구 데이터의 생산은 장기간의 추적 조사가 필요할 수 밖에 없다.
- : GSP 2단계 연구가 진행되는 동안 year-class 배수체들의 생식소 발달을 추적하면서 4차년-5차년도에는 다양한 생식 연령을 갖는 시험 대상 배수체 및 동일 연령의 이배체 전복들을 확보하였다.
- : 따라서 확보된 배수체의 불임·부분성숙 기전 및 작동원리에 관한 분자적 수준의 분석을 수행함으로써 배수체 전복의 생식 가능성, 불임 수준, 그리고 생식학적 격리효과의 정도를 판단하여 과학적이고 체계적인 자료를 제공할 필요성이 있다.

○ 목적

- : 생식 가능 연령에 도달한 배수체 전복의 불임·부분성숙 기전 및 작동원리에 관한 분자적 경로내 관련 유전자들의 발현의 상관관계를 분석하고, 아울러 배수체 전복의 생식(방정, 방란) 가능성 여부에 관한 판단을 하고자 한다.

○ 연구수행 범위

- : 배수체-이배체의 암수 생식소의 외형적 발달 특징 및 조직학적 특징을 조사하여 생식 주기에 따른 외관적 차이 및 조직학적 차이의 판단 자료를 확보한다.
- : 배수체-이배체 비교 평가용 발현 마터를 발굴하여 암수 배수체의 생식소 성숙에 따른 기초발현 특징(조직발현 집중도 등), 생물정보학분석, 및 서열분석을 통한

배수체-이배체간 차등 발현 평가를 수행한다.

- : 암수 배수체 및 참조 대조군 이배체 시료를 선발하여 확보된 참조전장전사체 및 국립수산물과학원에 기 확보되어 있는 전장유전체를 이용하여 생식소 성숙에 관한 관련 유전자들의 발현의 상관관계를 분석한다.
- : 배수체 전복의 인공 산란 방정·방란 가능성 조사, 배수체 생성 배우자 특징 조사, 배수체 자손 생성 가능성 조사(배우자의 수정능력 및 수정란의 발생 능력)를 통하여 배수체 전복의 생식 가능성을 평가한다.

가. 생식소의 외형적 발달 및 조직학적 특징

(1) 분석 대상 시료

- 인위적으로 유도된 3배체 전복의 경우 2배체에 비해서 상대적으로 매우 낮은 성숙 능력을 가지며, 대부분 배수체 개체들에서 기능적인 불임 가능성과 함께 생식소 성숙이 제한되는 현상은 이미 이전 GSP 연구를 통해서 1차 확인된 바 있다. 그럼에도 불구하고 매우 적은 마리 수이지만(특히 수컷의 경우) 연령이 2년을 넘어서면서 외관상 생식소의 부분성숙을 보이는 개체들이 출현하며(비록 현재로서는 3배체가 방정 등 기능적인 생식능력 확보 수준까지 발달하지는 않은 상태), 이러한 경향은 3배체의 연령이 높아질수록 더 빈번하게 나타나는 양상을 보인다. 물론 이러한 예외적인 개체들의 출현이 3배체를 이용한 생식학적 격리 효과 또는 목적을 전면적으로 제한하지는 않겠으나 3배체 전복의 생식능력에 대한 포괄적이고 과학적인 최종 판정을 위해서(발현 마커 기반 조사 및 메커니즘 확인 등), 그리고 3배체 예외적 생식 가능성에 따른 추가 배수체 조작의 가능성 타진을 위해서는 반드시 확인이 필요한 사항이다.
- 이에 본 당해연구에서는 전복 3배체의 생식능력에 대한 과학적이고 포괄적인 판정을 위해서 예외적인 부분성숙 표현형을 나타내는 고연령 그룹의 배수체 개체들에 대한 평가연구를 수행하고자 하였다.
- 이전 GSP 연구에서 2년산 연령의 배수체들을 대상으로 한 조사가 수행되었던 점을 고려하여(* 당시 일부 부분성숙을 수컷들이 나타내지만 최종 배우자 형성까지 도달하지 못하고 방정 기능은 갖추지 못함. 조직학적 분석을 통해서도 spermiogenesis 진행이 이루어지지 않음을 확인 한 바 있음) 당해연구에서는 첫째, 다른 모패 그룹으로부터 생산된 2년산 3배체 암수 생식소 조직의 표현형을 재검증하여 유전적 background의 차이, 사육조건 및 사육환경의 차이가 있음에도 불구하고 3배체가 일관되게 2년 연령에서 직전 연구결과를 재현할 수 있는지를 확인하고자 하였다.
- 둘째, 아울러 이와 함께 2년 연령보다 고연령인 4년산 3배체들을 대상으로 생식소 발달의 진전이 있는지를 확인하고자 하였으며, 이를 토대로 이러한 예외적 배

수체들이 일반적인 sterile-like 표현형을 보이는 배수체들과 차등의 생식 기능(산란 방정 가능성 등)을 가질 잠재력이 있는지, 만약 있다면 해당 메커니즘에 대한 조사를 통해 전복 3배체의 생식특징에 관한 보다 고해상도의 평가를 수행하고자 하였다. 해당 개체들은 당해년도 연구의 경우 '1.5. 항의 배수체-이배체간 성숙관련 발현 유전자의 평가'를 위한 시료로 사용된다.

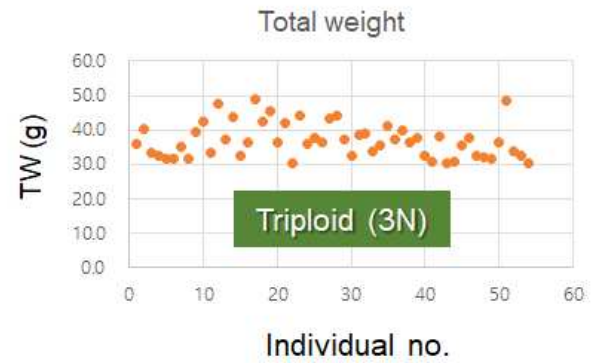
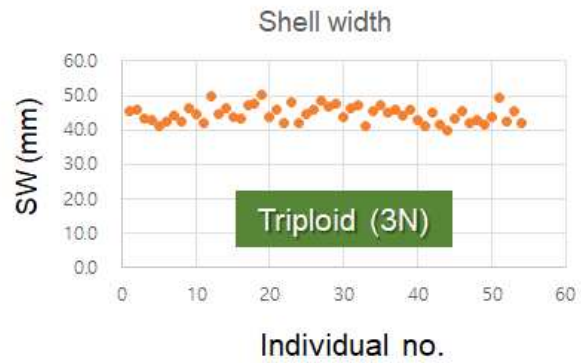
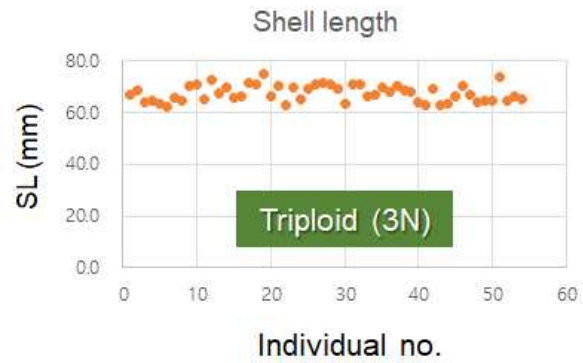
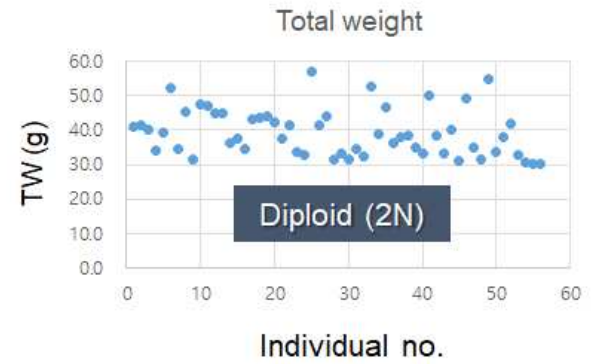
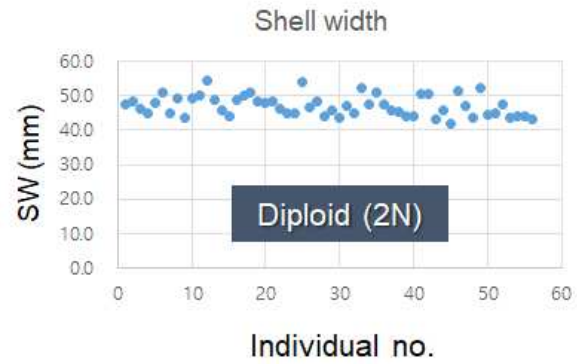
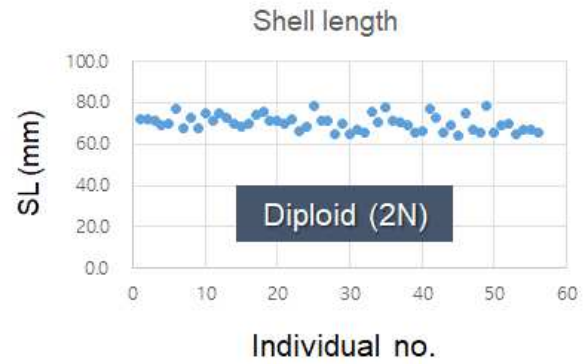
- 2년 연령에 해당하는 부분성숙 개체 시료는 배수체 및 이배체 그룹(동일 모패로부터 생산 후 동일 사육환경에서 사육중인 그룹들; 제1세부프로젝트 기관에서 사육 중인 집단)을 대상으로 육안 검사를 통해 암수 판정 및 생식소 부분 성숙을 나타내는 개체들로서 2년 연령에 맞추어 확보한 시료들이다. Flow cytometry 분석을 통해 배수성 유지를 재검증 하였고, 생식소 성숙을 보이는 3배체 개체들의 표본 샘플을 대상으로 해부 후 생식소의 추가적인 분석을 실시하였다. 암수 판정이 가능하여 성숙이 최소한 부분적으로라도 유발되었다고 판단되는 3배체들과 이들의 half-sibling 2배체 대조군 개체들을 대상으로 조사를 실시하였다.
- 4년 연령의 배수체 집단 역시 GSP 연구를 통해 생산된 3배체 및 2배체 대조군이 며, 해당 집단은 2년차에 성숙 표현형이 1차 조사된 집단이다. 2년산과 동일한 방법으로 1차 육안검사 후 성숙을 나타내는 개체들 중 표본 집단을 선발한 시료들로서, 이를 대상으로 생식소의 추가적인 발달 정도를 조사하였다.

(2) 2년산 배수체의 생식소 발달 특성 재검증

- 이전 조사된 배수체 집단과는 독립적으로 생산된 다른 배수체 집단이지만 2년 연령에서 나타내는 생식소의 발달에 관한 표현형은 크게 다르지 않았다. 조사한 3배체들의 대부분(90% 이상)은 2년 연령에서 전형적인 생식소 발달 지연 또는 장애를 나타냄으로써 외관상 평가 시 sterile-like 형태의 표현형을 나타냄으로써, 이전 결과와 매우 유사하였다. 이들 sterile-like 생식소를 나타내는 개체들은 생식소의 선명한 발달을 보이지 않으며 적지 않은 개체들에서 암수의 외관상 판정이 거의 불가능한 수준의 생식소를 표현하고 있었다. 생식소의 성숙이 이루어지지 않더라도 암수 판정이 가능한 개체들은 대부분 수컷에 해당됨으로써, 2년 연령에서 생식소 외관 표현형을 기준으로 불임기능 탑재 효과가 수컷보다는 암컷에 더욱 유효하다는 결과 역시 선명하게 재현되었다.
- 반면 부분적인 생식소 발달을 나타내는 약 10% 내외의 2년 연령의 3배체 및 상대적으로 훨씬 완숙한 생식소 발달을 보이는 2배체 각 50여 개체들을 대상으로 개체 측정을 수행한 결과, 각장, 각폭 및 총 중량 측면에서 통계적인 유의차는 관찰되지 않았다[그림 2-6-1]. 지난 연구결과를 통해 3배체가 체형의 변화와 성장의 가속화가 개시되는 시점이 최소 2년 이후 단계에서 선명해지므로 (또한 전체 sterile-like 개체들을 포함한 측정값이 아니라 일부 개체들을 선별적으로 선발하

여 측정된 값이므로) 본 측정에서 ploidy 그룹 간 차이가 없는 것은 이전 연구결과와 다르지 않다.

- 암수 판정이 가능하고 부분 성숙을 나타내는 이들 3배체 개체들의 생식소 발달에 관한 대표 표현형을[그림 2-6-2]에 나타내었다. 그림에서 보듯이 2년산 2배체 암컷은 간체장을 둘러싼 녹색의 난소 조직이 잘 발달한 완숙의 생식소 발달을 보이는 반면 3배체 암컷들은 암수 판정이 가능하더라도 매우 협소한 국소 부위에서만 난소의 미약한 발달을 나타내거나 그렇지 않을 경우 많은 암컷 추정 개체들은 간체장 외에 특징적인 생식소 발달을 확인할 수 없는 수준을 나타내었다. 이들 개체들을 대상으로는 유전자 발현 검사를 위한 난소 조직의 선별적인 샘플링 역시 거의 불가능하였다.
- 한편 2배체 수컷은 유백색의 잘 발달한 전형적인 성숙 정소를 2년 연령에서 표현하고 있었다. 수컷의 경우 2년산 3배체에서 정소의 부분발달을 보이는 빈도가 동일 연령에서 암컷에 비해 높을 뿐만 아니라 그 발달 정도도 암컷과 비교 시 상대적으로 더 진전된 부분 성숙을 표현함으로써 이전의 다른 배수체 집단을 대상으로 한 조사 결과와 일치하였다. 하지만 외관상 제한된 부분 성숙의 표현형을 나타내더라도 2배체의 정소에 비해서 그 크기가 작거나 간체장을 둘러싼 정소의 발달이 특정 영역에서만 이루어지는 개체들이 많고, 또한 생식소 발달이 제한됨에 따라 출수공 방향으로의 충분한 생식소 신장이 이루어지지 못한 경우가 빈번하였다. 또한 정소의 외관상 색을 2배체 성숙 정소와 비교 시 색이 탁하고 완전한 유백색으로 전환된 완숙한 정소는 2년산 연령에서 관찰되지 않았다.



[그림 2-6-1]

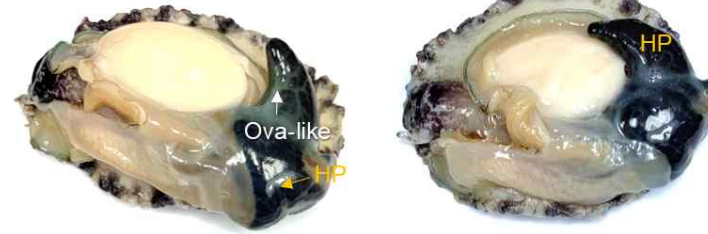
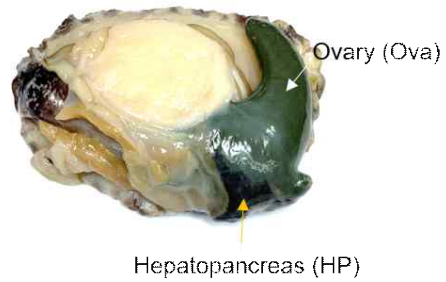
생식소 발달의 재검증을 위한 2년산 3배체 선별 개체들 및 대조군 2배체 개체들의 크기 및 무게 측정

Diploid (2N)
(representative ones)

Triploid (3N)
(representative ones)

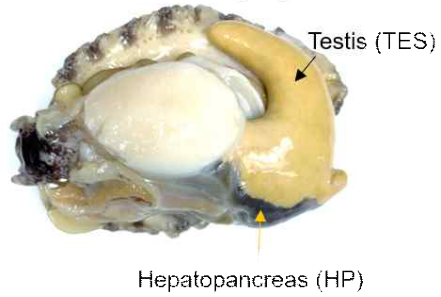
2N Female (2Y)

3N Female (2Y)



2N Male (2Y)

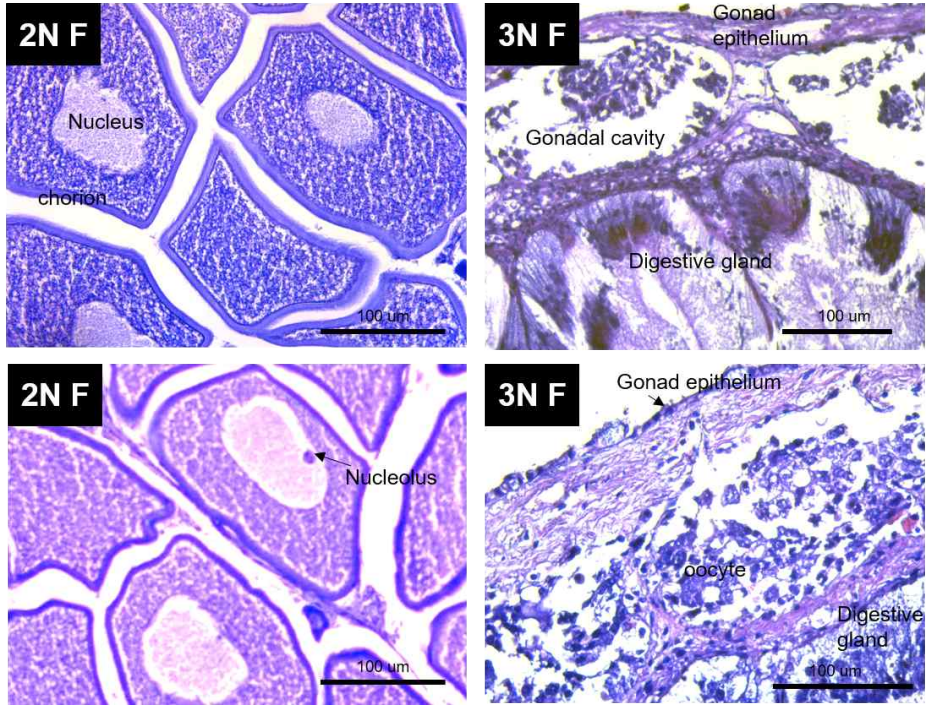
3N Male (2Y)



[그림 2-6-2]

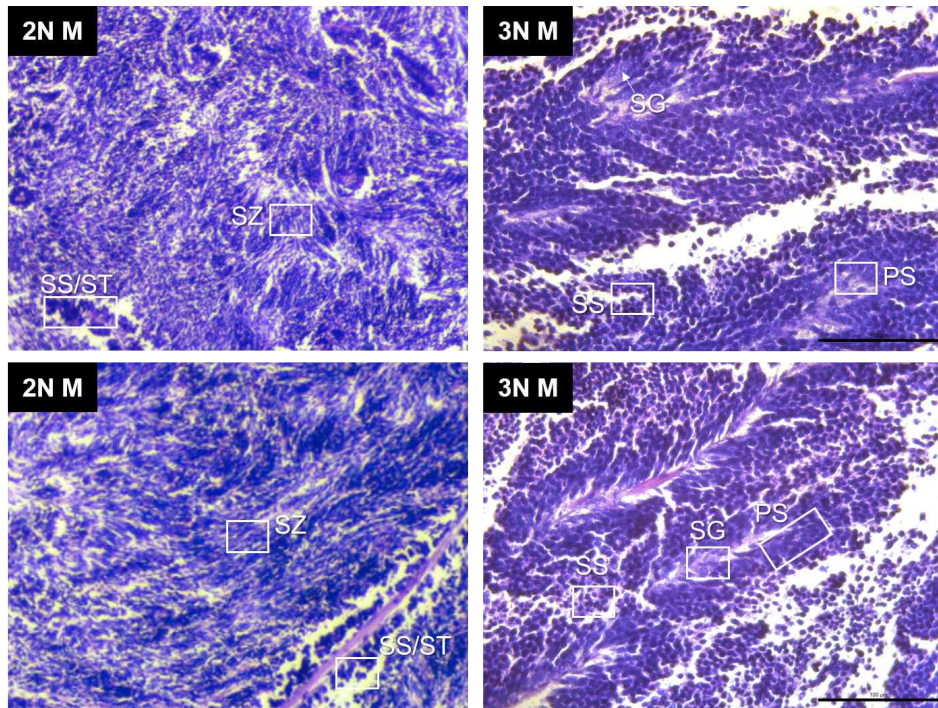
2년산 3배체 암수의 생식소 발달 재검증(동일 연령의 2배체 대조군과의 비교)

- 외형적 조사에 이어 2년산 2배체 및 3배체 생식소를 대상으로 조직학적 재검증 분석을 실시하였다. 암컷의 경우 2배체는 이미 완전히 성숙한 난의 크기를 난소 내 보유하고 있어 인공산란 유도가 가능할 수준에 도달한 배우자 성숙 정도를 조직학적으로 확인할 수 있었다. 그러나 3배체 암컷의 경우 이와는 확연히 다른 난소 조직 특징을 나타내었는데, 대부분의 암컷 3배체 개체들은 gonadal epithelium과 간체장 사이의 gonadal cavity가 많이 비어 있으며 2배체 난소에 관찰되는 성숙 난모세포들은 전혀 관찰되지 않았다. 일부 난모세포가 매우 초기 단계의 발달에 머물고 있는 수준으로서 조직학적으로 큰 차이를 나타내었고, 이는 사육환경 및 유전적인 background가 달라지더라도 2년 연령에서의 3배체 난소 발달 정도는 일양하게 관찰되었다[그림 2-6-3].
- 반면 수컷의 경우 외관상 정소 발달과 마찬가지로 조직학적 분석에서도 일정 수준의 성숙 진전이 이루어진 것으로 나타났다. 2년 연령 시점에서 이배체는 정원 세포의 최종 성숙, 즉 spermiogenesis를 포함한 spermatogenesis의 전 과정이 활발히 일어나 성숙한 정소 내에 다량의 spermatid 및 spermatozoa가 전체 정소 부위에 걸쳐 관찰가능 하였고, 감수 분열이 종료되지 않은 secondary spermatocyte들은 오직 매우 제한된 정소 영역에서만 소수 관찰되었다. 반면 3배체 정소의 조직학 시료에서는 primary spermatocyte들이 어렵지 않게 동정가능 하였고, 심지어 spermatogonia 역시 정소 내에서 관찰가능 하였다. 또한 2배체와는 달리 조직학적 분석에서 3배체 수컷의 정소내에는 변태를 거친 sperm이 관찰되지 않음은 물론 second meiosis를 거친 spermatid 역시 쉽게 동정하기가 매우 어려웠다. 즉, 이전의 연구 결과와 상통하여 2년산 수컷 3배체 일부 개체들은 외관상 정소의 발달과 성숙을 표현하지만 정소 내 배우자들은 spermiogenesis 단계로 거의 진입하지 못하는 것으로 판단되었다[그림 2-6-4].



[그림 2-6-3]

3배체 암컷 난소 발달의 조직학적 재검증



[그림 2-6-4]

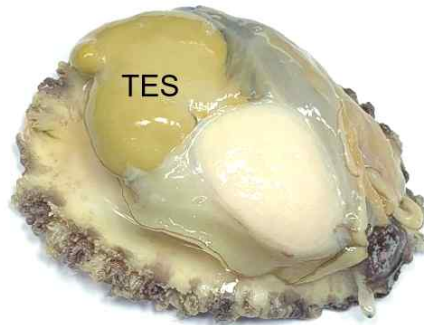
3배체 수컷 정소 발달의 조직학적 재검증

(3) 4년산 배수체의 생식소 발달 특성

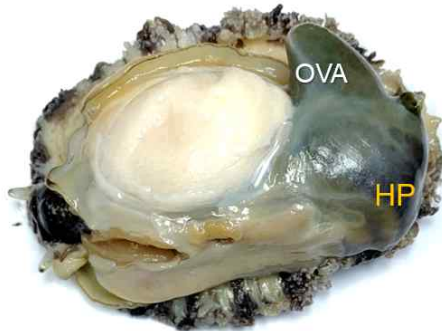
- 완전한 full-maturity 연령을 넘어선 4년산 개체들(일반적으로 모패로서 사용되는 개체들의 연령에 해당) 중 상대적으로 높은 수준의 생식소 발달을 보이는 개체들의 대표적인 생식소 외관 표현형을 [그림 2-6-5]에 나타내었다.
- 2배체의 경우 이미 4년산 개체들은 통상 모패로 사용가능하고, 이미 2년 연령에서 완숙의 난소 및 정소 발달을 보이기 때문에 4년 연령에서 3배체와 2배체 간 생식소 발달을 비교하는 것은 더 이상 큰 의미가 없다. 대신 본 분석의 주된 목표는 2년 연령 대비 고연령 배수체 개체들이 추가적인 생식소 발달 빈도와 정도를 나타내는가를 조사하는 것이다. 4년 연령 그룹의 경우 역시 동일 연령의 2배체에 비해서는 빈도 및 정도 모두에서 확연히 성숙 정도가 낮게 나타난다.
- 하지만 2년산과 비교할 경우 그 진전 속도는 늦지만 생식소의 추가적인 성숙 진행은 이루어지는 것으로 판단된다. 물론 일부(약 20% 내외) 개체들의 경우 2년 연령에서와 마찬가지로 성숙이 아직도 거의 이루어지지 않아 생식소의 선택적인 적출이 불가능하며 심지어 정확한 암수 판정 역시 어려운 개체들이 존재하였다. 이들 개체들은 대부분 암컷으로 추정된다. 수컷의 경우는 개체간 차이가 있지만 4년 연령 그룹에서는 대부분의 3배체 수컷들에서도 외관상 수컷으로의 판정이 어렵지 않고, 육안으로도 2년산에 비해서 보다 왕성하게 성숙한 정소를 관찰할 수 있다. 정소의 발달 정도가 2배체처럼 완전한 유백색으로 발달하지는 않더라도 성숙 표현형의 정도에 편차가 있는 것으로 관찰되었다. 비록 정소의 용적, 간췌장을 둘러싼 부위의 분포 등에서 2년산에 비해 더 발달은 하였지만 4년산 수컷 3배체 개체들 대부분은 2년 연령에서와 마찬가지로 탁한 정소의 색(최종 정자로의 배우자 발달 및 분화가 이루어지지 않음)을 나타내며 이들은 현재 진행 중인 조직학적 분석에도 2년산과 선명한 차이를 나타내지 않고 있다. 그러나 일부 소수의 개체들은 상대적으로 더 밝은 정소의 색을 표현함으로써 육안 관찰 시 마치 성숙도가 다소 낮은 2배체 수컷의 정소와 유사한 표현형을 보이고 있다. 하지만 이들 개체들처럼 육안 관찰시 성숙 표현형을 나타내는 예외적인 4년산 개체들의 수가 매우 제한적이어서(전체 약 300 개체 배수체 중 5-6미에 해당) 방정가능성 평가를 병행 시험해야 하는바, 조직학적 분석을 위해 당장 개체들을 희생시키는 것은 어렵고, 현재 제1세 부프로젝트 기관과 조직학적 분석용 마리 수와 방정유도 실험을 위한 마리 수 조정 및 일정 협의를 진행하고 있다.



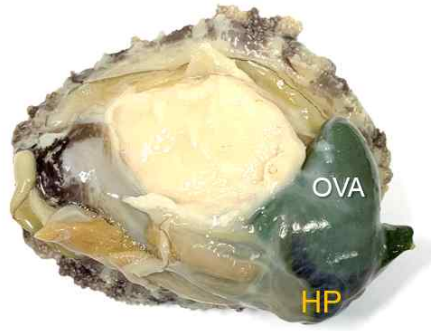
3N Male (4Y)



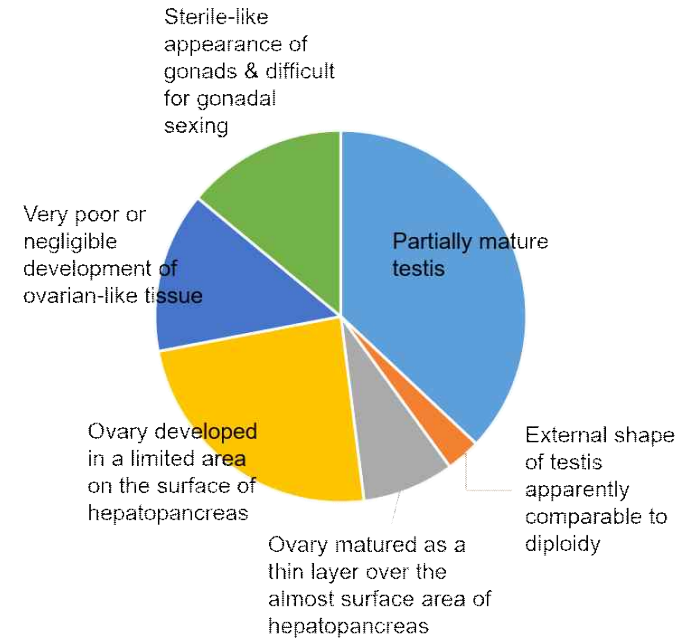
3N Male (4Y)



3N Female (4Y)



3N Female (4Y)



Visual examination of gonadal maturity at 4Y

[그림 2-6-5]

4년 이상된(4Y) 3배체 암수의 생식소 조직의 발달 조사

- 한편 암컷의 경우, 2년산에서는 대부분의 암컷들은 간체장 오염 없이 난소 적출이 거의 불가능할 정도로 미발달 또는 미성숙 정도를 나타내었으나, 4년산의 경우 암컷 판정가능 개체들의 비율이 증가할 뿐만 아니라 난소의 성숙도 자체 역시 추가적인 진행이 이루어지는 것으로 관찰되었다. 비록 추가적인 난소 및 난모세포의 성숙도가 진행되었더라도 육안 관찰 시 2배체와 대등할 수준의 난소 성숙 개체들은 찾아보기 힘들고 대부분 제한된 성숙을 보이는 암컷 3배체 개체들의 경우 간체장의 일부분을 매우 얇게 덮는 정도의 난소 발달 수준을 나타낸다. 하지만 이들의 경우, 개체 차이는 있으나, 현재 진행 중인 조직학적 분석에서 일정 수준의 성숙 난들을 나타내고 있어 수컷의 경우와는 차이가 있었다. 즉, 현재까지 진행된 결과만을 토대로 할 경우 일부 고연령의 수컷 3배체들은 외관상 2배체에 필적할 만한 크기와 용적의 정소를 보유하고더라도 조직학적으로 최종 변태과정을 거친 정자를 확인하기 어려우나, 반면 고연령의 암컷 3배체들의 경우 발달한 난소 조직의 크기나 양(난모세포의 수 등)은 매우 제한적이지만 조직학적으로는 2배체의 암컷과 유사한 정도의 발달을 나타낼 수 있는 것으로 생각된다. 따라서 이들 암컷들이 전반적인 난소의 성숙 없이 국소 부위에서 성숙한 난모 세포들을 통상의 방법에 의해서 방란시킬 수 있는지 여부에 따라 고연령 3배체 암컷의 생식기능에 대한 포괄적인 평가가 이루어질 수 있을 것이다. 현재 10월 말까지 기 확보한 고연령 암수 개체들의 조직학적 분석이 완료될 예정이며, 성숙도가 더욱 높은 고연령 암컷 개체들의 경우 역시 차년도 방란 유도 실험과 조직학적 분석용 개체 희생 마리 수 및 시기를 프로젝트 주관기관과 조정하고 있다.

나. 성숙관련 유전자 정량발현 분석조건 최적화

(1) 생식소-간체장 RNA 분리 및 정량분석조건 최적화

- 전복 Hepatogonadal complex sample의 문제점

: 전복은 다른 패류와 마찬가지로 성숙과정 중 내층(inner layer)의 간체장 (hepatopancreas)을 생식소가 둘러싸는(outer gonad layer) hepatogonadal complex를 형성하며, hepatogonadal sample은 전복의 성숙 기능뿐만 아니라, 영양, 대사, 면역 등 광범위한 물질대사에 관여하는 주요 기관이다. 이에, hepatogonadal sample은 암수 배우자의 성숙 및 다양한 관련 대사를 위해서 많은 종류의 물질이 다량 축적되는 장소이며, 때문에 hepatogonadal complex에 축적되어 있는 다량의 물질들은 종종 qPCR 분석을 위한 유전자 발현 분석에 심각한 저해인자(inhibitor)로 작용하며, 특히 성숙시즌 등 생식소의 성숙발달이 왕성하게 진행되는 시기의 hepatogonadal complex의 경우 더욱 저해인자들을 광범위하게 축적하는 경향을 나타낸다.

: 따라서 전복의 hepatogonadal complex를 대상으로 유전자발현(정량발현 등)

연구를 수행하기 위해선 해당 시료로부터 inhibitory substances의 오염이 최소화된 total RNA핵산 시료를 확보하는 것이 필수적이나, 통상의 추출방법의 경우 시료에 따라 저해인자의 충분한 제거가 쉽지 않으며(또한 저해인자의 hepatogonadal 시료 내 함유량을 사전에 예측하기 어렵고) 때문에 downstream process로 수행되는 RT-qPCR을 저해 또는 간섭함으로써 실제 유전자 발현 수준을 정확하게 반영하지 못하는 심각한 bias가 유발될 가능성이 매우 높다. 즉, 유전자 발현정도에 따른 quantification cycle (CQ) 값이 아니라 template내 혼입된 저해인자의 오염정도에 따라 CQ 값이 반영되기 때문이다.

- : 이와 관련하여, 일부 선행연구들을 통해 패류 hepatogonadal complex 시료로부터 저해인자 오염을 줄일 수 있는 RNA 추출 kit 또는 방법론들이 소개된 바 있다. 그러나 본 연구진의 이들 개선방법들을 전복의 hepatogonadal complex에 적용해본 결과, 이들 방법 역시 전복 개체의 상태(성숙도, 영양, 대사 상태 등)에 따라 민감하게 영향을 받는 것으로 나타나 일양하고 포괄적인 적용은 불가능하여 개체에 따른 hepatogonadal 시료의 종류별로 total RNA 순도, 수율 및 DNA 오염 등 측면에서 큰 편차가 있는 것으로 나타났다.
- : 본 GSP 세부프로젝트는 전복의 hepatogonadal sample로부터 2배체와 3배체의 성숙기능을 평가하기 위해 다양한 유전자들의 많은 정량발현분석을 필수적으로 수행해야하고(특히, 당해년도의 경우, 성숙관련 유전자, 대사관련 유전자, 환경내성 관련 유전들 등 2배체와 3배체 간 본격적인 분자생리를 규명하기 위한 유전자정량발현 실험이 필요) 따라서 유전자발현 분석의 정확도를 충실히 담보하기 위해서 본 연구항목에서는 “배수체-이배체 비교 평가용 생식소 유전자 발현 조사”를 위한 연구의 일환으로 전복의 hepatogonadal complex 시료로부터 기존의 방법론들의 약점과 부족분을 보완할 수 있는 유효한 protocol을 마련, 분석 실험에 이용하고자 하였다.

○ 기존 방법론들의 비교 및 RT-qPCR validity 분석

- : 개선된 프로토콜을 마련하기 위해 step 별 최적화 및 비교 평가 과정을 통해서 각 세부 단계를 최적화하였으며, 다양한 종래의 방법론들과의 평가를 통해 개선 정도의 효과를 검증하였다.
- : 본 연구에서 최종 도출된 프로토콜은 Trizol 방법과 silica column 방법을 조합한 hybrid protocol을 기본으로 하고 있으며, 그 기본 전략은 Trizol 방법에 의거 시료의 파쇄 및 클로로포름 처리를 수행하여 얻은 상층액을 직접 spin column의 DNA removal step에 적용하여 반응 후 이후 spin column의 washing 및 elution을 수행하는 hybrid 전략이다(이하 본 개선된 프로토콜을 HBP이라 칭함). 이때 시료의 양, 반응화합물의 용량, 반응 조합의 순서, 반응 시간 등에 관한 세부 내용들을 최적화하여 최종 도출 프로토콜을 정립하였다.

- : 개선된 프로토콜의 성능을 비교평가하기 위해 기존의 동물 조직을 대상으로 한 통상적인 방법들, 그리고 선행연구에 의해 패류 hepatogonadal 시료를 대상으로 일부 개선효과가 있다고 보고된 바 있는 다음의 방법들을 본 프로토콜과 비교하였다.
- : (비교 프로토콜-I; Comparative Test Protocol-I; CTP1) 일반적인 Trizol (TriPure) Reagent를 이용하는 방법으로서 Trizol 상에서 균질 마쇄 후 클로로포름 추출, 알콜 침전, 알콜 세척, pellet 건조, 완충용액에 resuspension을 수행하는 방법
- (CTP2) Animal tissue로부터 total RNA를 추출하는 통상의 spin column을 이용한 RNA 추출 방법으로서 조직 균질 후 spin column을 이용하여 DNA 제거, 불순물 제거, washing, 및 elution을 수행하는 방법(별도의 DNase 처리 과정을 포함 또는 미포함 하는 3개 제조사의 kit들을 제조사의 권고방법대로 시행)
- (CTP3) 연체동물(mollusc) 전용 spin column 방법을 이용하는 방법으로서 별도의 DNase 처리 과정을 포함하는 제조사의 권고 방법대로 수행.
- (CTP4) 상기 Trizol 방법을 토대로 추가적인 원심분리 수행과 부가적인 유기용매 처리 방법을 거친 후 1차 resuspension된 RNA 용액을 대상으로 2차 LiCl 침전(re-precipitation: 2-5M LiCl 혼합, 배양, 원심분리)을 거친 후 다시 알콜 세척, 건조, resuspension을 수행하는 방법
- (CTP5) 비교 프로토콜-I(Trizol 추출 방법)에서 얻은 RNA pellet을 녹인 후 spin column (비교 프로토콜-IV)을 이용하여 재차 clean-up 과정을 거치는 방법
- HBP 프로토콜의 성능 검사를 위해서 일차적으로 각 프로토콜들로부터 추출된 RNA의 순도를 평가하기 위해 260/280 nm 흡광도 측정(> 1.9 여부, Nanodrop spectrophotometer 이용), 260/230 nm 흡광도 측정(> 1.9)를 실시하였고 기본적으로 각 프로토콜 당 동일 개체 시료(또는 동일 혼합 시료)를 이용하여 6-8회의 반복 시험 평가를 수행하였고 추출 RNA의 integrity를 전기영동하여 확인하였다. 아울러 total RNA 추출 시 빈번히 유발되는 DNA의 오염 제거 완성도를 평가하기 위해 추출된 RNA 시료를 대상으로 RT(-) 및 RT(+) 주형을 대상으로 PCR을 수행 genomic DNA 증폭 단편이 유발되는지를 확인하였다. 이때 확인을 위해서 전복의 metallothionein 유전자의 intron-1 303 bp을 증폭하는 프라이머 쌍(FW 5'-TATGCTACTCGGGATCGA-3' 및 RV: 5'-CCTGAAGCGTTCGAAGATCT-3')을 이용하여 통상의 PCR 열순환 조건으로 33 cycle을 실시하였다.
- : RT-qPCR validity를 위해서 oligo-d(T) priming 방법을 이용하여 각 프로토콜로부터 준비된 total RNA (2ug)를 cDNA로 역전사 시킨 후(Omniscript RT-Kit, Qiagen사; 제조사 권고방법에 따름) 프로토콜의 유효성을 qPCR로 비교 평가 하였고, 이때 각 RNA 추출 프로토콜 조건 당 최소 3개 이상의 biological replications 및 triplicate technical replication을 구성하였다. RT-qPCR의 validation용 test 유전자는 본 연구진의 선행연구를 통해 증폭 조건이 확립되어

있는 housekeeping 유전자들 중 전복의 hepatogonadal organ에 상대적으로 발현수준이 높다고 조사한 바 있는 ribosomal protein L7 (RPL7; KP698945) 및 RPL8 (KP698947), 그리고 이들 두 유전자보다 상대적으로 발현 수준이 낮다고 조사된 바 있는 RPL3 (KP698943), RPL4 (KP698944) 및 beta-tubulin (β -TU; EF103431) 유전자를 test gene으로 이용하였다. 각 유전자의 증폭 프라이머들과 amplicon 크기는 [표 2-6-1]에 나타내었다.

: qPCR 반응은 Light Cycler 480 Real-time PCR system (Roche)를 이용하였고 열순환 조건은 초기 변성 반응(95°C 2 min) 후 95°C 10초, 58°C 10초 및 72°C 15초로 45 cycle을 설정하였으며 각 biological replication 별로 3회의 technical replications을 통해 median CQ 값을 취하여 정량 평가에 이용하였다. PCR efficiency (E)는 hepatogonadal cDNA의 5 serial log dilution points로 작성한 표준곡선을 이용하여 $E = 10(-1/k) - 1$ (herein, k = slope) 공식을 통해서 계산하였다. Slope, Intercepts, correlation coefficient (Pearson R) 및 coefficient of determination (R²) 값은 qbaseplus software (Biogazelle, Ghent, Belgium)를 이용하여 계산하였다. Standard error of efficiency [SE(E)]는 $SE(\text{slope}) \times (1 + E)\ln 10 / \text{slope}^2$ (herein, E = PCR efficiency)의 식을 이용하여 값을 구하였다. Geometric mean, median, standard deviation [\pm Cq] and coefficient of variation (CV) of Cq 값은 BestKeeper software package를 이용하여 구하였고, Cq 값을 linear scale의 발현 양[expression quantities; relative quantity (RQ)]로 전환시키기 위해서 다음의 공식을 이용하였다. $RQ = E - Cq$ (herein, E = PCR efficiency). 발현측정과 관련한 값들의 프로토콜 간 평가를 위해서 student's t-test 및 ANOVA (followed by Duncan's multiple range test)를 이용하여 p < 0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

○ RNA yield 및 순도 평가

: CTP1~CTP4의 기존 방법과 본 연구의 HBP 방법을 이용하여 성체 성숙 선복의 hepatogonadal RNA를 추출 후 RNA의 수율과 순도, 그리고 DNA 오염 여부를 비교 평가하였다[그림 2-6-6]. 그 결과, RNA의 양적인 측면에서는 CTP1(즉, Trizol 방법)이 가장 유리하였고 반면 spin column을 이용하는 두 가지 방법(CTP2, CTP3)가 가장 낮은 수율을 보였다. CTP1 이후 LiCl 재침전 방법으로 다시 순수 분리하는 CTP4와 HBP가 유사한 정도의 수율을 나타내었다. 그러나, CTP1은 260/280 nm 흡광도 및 260/230 nm 흡광도 측정에서 다른 프로토콜들에 비해 매우 저조한 성적을 나타내었으며 260/230 nm의 경우 특히 낮은 값을 보였다. 260/280 nm의 경우 CTP1외 HBP를 포함한 나머지 4가지 방법 모두 유사하였지만 260/230 nm의 경우 오직 LiCl 재침전방법인 CTP4와 본 방법 HBP

만이 고순도의 RNA 확보가 가능한 것으로 나타났다. 반면 CTP1+CTP2를 순차적으로 연계하는 CTP5의 경우 260/280 nm 및 260/230 nm에서 hepatogonadal 시료의 상태 및 종류에 따라서 매우 큰 편차를 보였다. CTP5로 추출한 RNA를 다시 LiCl로 재침전 후 분리할 경우 260/280 nm에서는 유의적인 개선이 관찰되었으나, 260/230 nm에서는 선명한 개선효과가 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합할 경우 본 HBP 방법은 양적인 측면에서는 spin column 방식보다 훨씬 유리함과 동시에 순도 측면에서는 LiCl 재침전 회수 방법에 상응하는 고순도의 RNA 확보가 가능함을 알 수 있다.

: 이와 함께 확보한 RNA 시료에 genomic DNA의 오염이 검출되는지를 평가한 결과 CTP1에서는 다수의 시료들에서 genomic DNA PCR band가 관찰되었으며 DNase 처리 또는 DNA removal step을 포함하는 CTP2, CTP3, CTP5, HBP 방법에서는 DNA의 오염이 매우 극미하거나 없는 수준으로 확인되었다. CTP4의 경우 CTP1에서 LiCl 재침전을 통해 DNA 오염을 상당 부분 제거할 수 있는 것으로 나타났지만, 온전한 제거는 불가능함으로써 CTP4 역시 일부 시료들에서 약한 gDNA PCR(+) 결과를 나타내었다.

○ RT-qPCR Cq profile, PCR efficiency 및 RQ 평가

: 상기 평가를 통해 hepatogonadal sample로부터 RNA 추출 시 gDNA 오염이 너무 많이 일어나는 CTP1 및 샘플간 편차가 매우 커 일양한 결과를 얻기 어려운 CTP5는 더 이상 검증의 대상에서 제외하였고, 서로 유사한 정도의 효과를 보이는 두 spin column 방법들 중 CTP2를 음성 대조군으로 선발하였고, 아울러 장시간의 분리 소요시간과 재 회수 과정에서 RNA의 손실이 있으나 흡광도 측면에서 HBP와 유사하였던 CTP4를 선발하여 HBP 방법과 RT-qPCR validation을 수행하였다. 이때 HBP1과 HBP2는 모든 방법은 동일하나 washing 과정을 1회 더 추가한 세부 조건을 달리하여 함께 비교하였다.

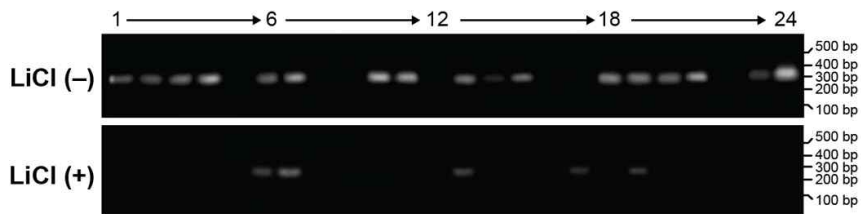
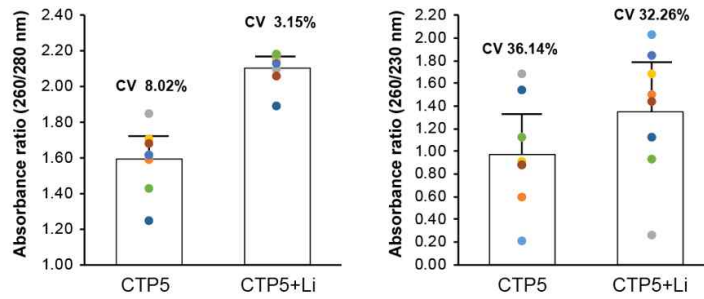
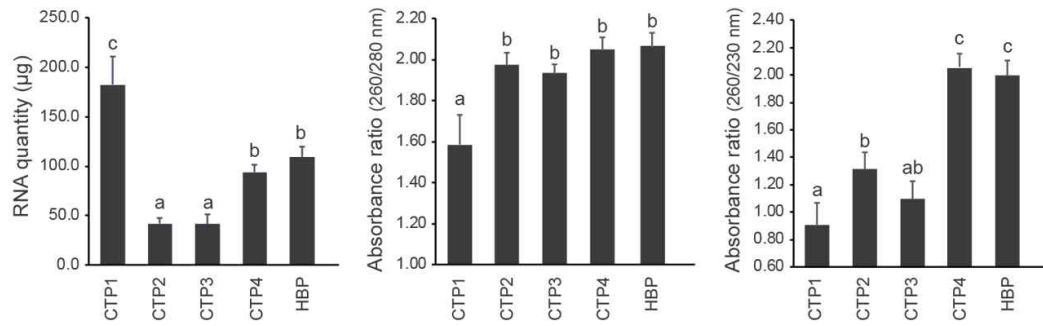
: Cq profile의 결과 HBP1 및 HBP2 방법은 서로 차이가 없었고, 이들 두 프로토콜은 기존 CTP2와 비교 시 5 cycle 이상의 Cq 값 개선 효과를 보였으며 CTP4에 비해서도 1 Cq 분량의 개선이 이루어졌음을 보였다. 이러한 개선 효과는 서로 다른 유전자 RPL3 및 RPL7 모두에서 유사하게 나타났다[그림 2-6-7].

: CTP2, CTP4, HBP1, HBP2 프로토콜들을 이용하여 PCR efficiency를 측정한 결과를 [표 2-6-2]에 나타내었다. CTP2의 경우 % PCR efficiency가 두 test 유전자 모두에서 100%를 훨씬 넘어서는 값을 보임으로써 고농도 cDNA template에서 PCR inhibition이 일어났음을 시사하고 있으며 역시 R2 값도 다른 방법들에 비해 유의적으로 낮게 나타나 hepatogonadal RNA로부터 유전자 발현 정량 분석시 간섭 또는 bias가 유발할 수 있음을 잘 나타내었다. 그 외 CTP4 및 HYB 프로토콜들은 모두 적절한 PCR efficiency 및 R2 값을 보여 큰 차이가 관찰되지 않았다.

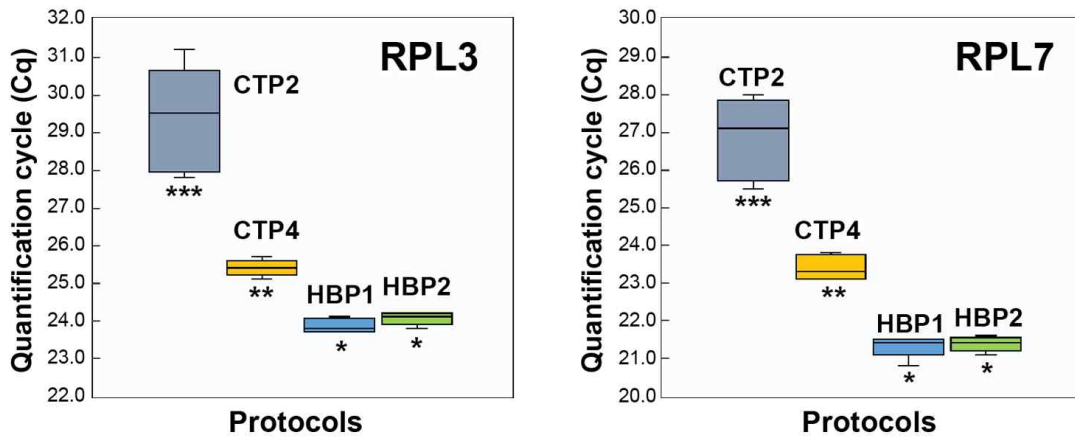
[표 2-6-1]

전복 hepatogonadal RNA sample의 RT-qPCR validation을 위한 프라이머

Gene	Amplicon (bp)	Sequence (5'-to-3')
RPL7	156	CAAGCTGAACACTCCAAACG TCCACAGCACTGATGTTTCC
RPL8	161	TGGAAACTACGCCACAGTCA GTCCTGCCTTCAACATTGGT
RPL3	168	TCATTGCACACACCCAGACT CAATGACCTCATCCTGTTCG
RPL4	176	GCTGCTTCAAGACCGCTTAT TGGCCAGCTTTCTCTGAAAC
β -TU	161	ACATTCACTAGGTGGGGGTA GTACTGACAATGTGGCGTTG



[그림 2-2-6]
 전복 hepatogonadal RNA 추출 프로토콜 개선
 (프로토콜 별 수율, 순도 및 DNA 오염 평가)



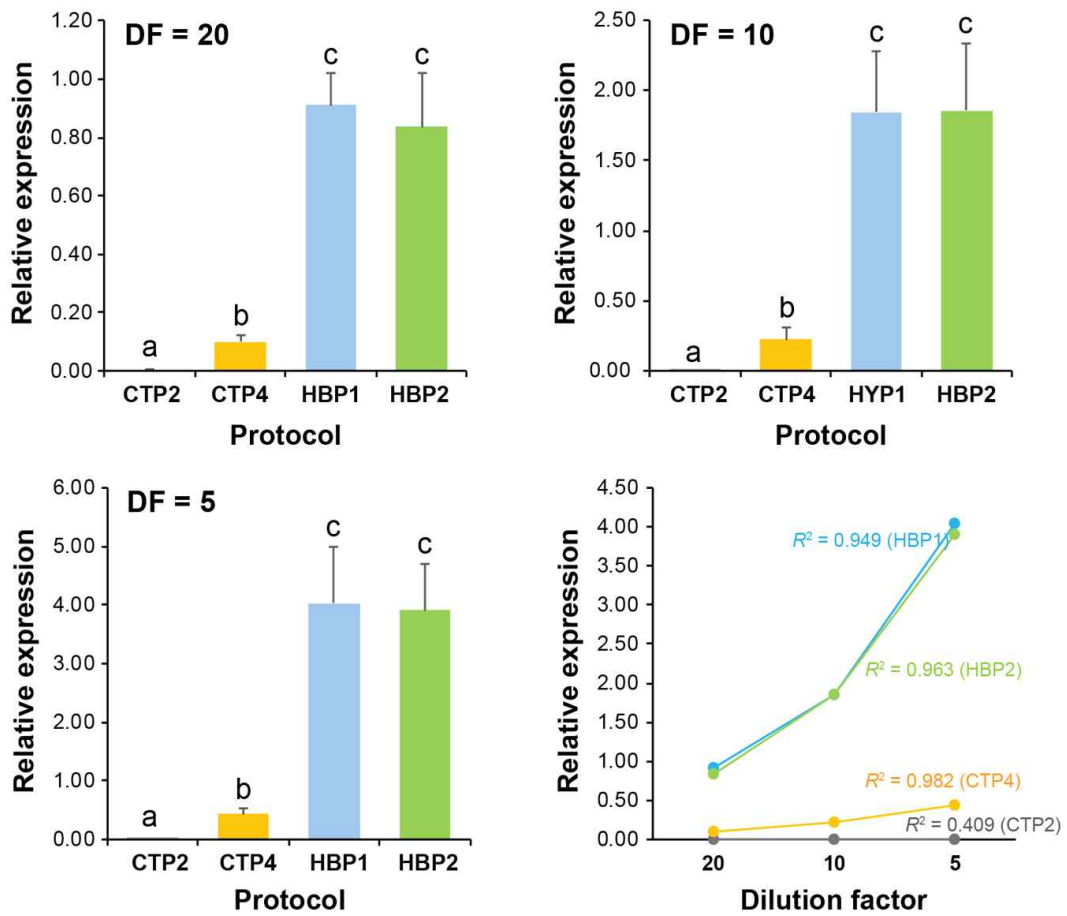
[그림 2-6-7]

전복 hepatogonadal RNA 추출 프로토콜 개선
(RT-qPCR validation: Cq profile 평가)

[표 2-6-2] 전복 hepatogonadal RNA sample 추출법에 따른 qPCR efficiency 평가

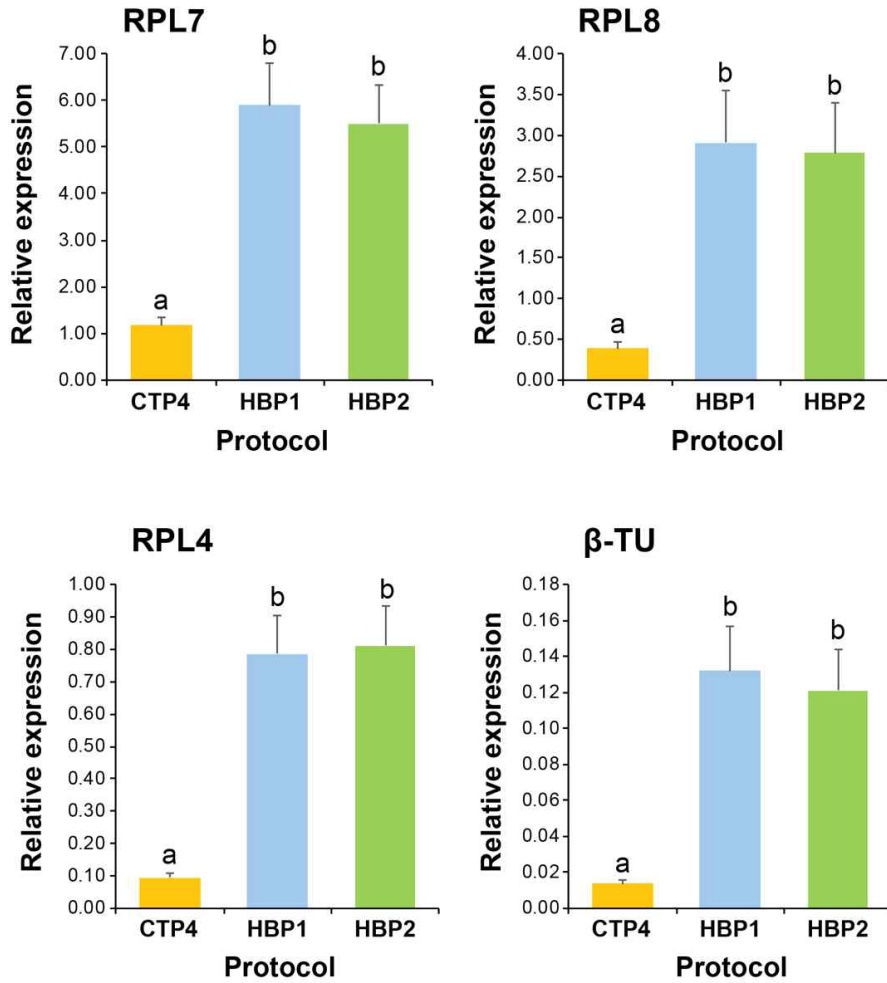
Gene	Protocol	Slope	Intercept	PCR efficiency (\pm SE)	Correlation coefficient	R^2
RPL3	CTP2	-2.95	27.36	1.183 \pm 0.283	-0.9535	0.9092
	CTP4	-3.18	21.80	1.063 \pm 0.022	-0.9997	0.9993
	HYP1	-3.38	19.58	0.976 \pm 0.024	-0.9995	0.9991
	HYP2	-3.35	19.72	0.988 \pm 0.037	-0.9989	0.9978
RPL7	CTP2	-2.97	26.14	1.171 \pm 0.352	-0.9298	0.8646
	CTP4	-3.20	19.66	1.054 \pm 0.093	-0.9938	0.9875
	HYP1	-3.37	17.36	0.980 \pm 0.078	-0.9951	0.9901
	HYP2	-3.33	17.54	0.997 \pm 0.033	-0.9991	0.9983

- : Cq 값을 RQ로 전환하여 비교한 결과(PPL3 test gene), HBP1/HBP2 프로토콜의 유전자발현 조사 개선 효과를 더욱 선명하게 보여 줌으로써 CTP2 및 CTP4 모두에 대해서 유의적인 qPCR 환경이 개선되었음을 나타내었다. 특히, 본 평가에서 cDNA template의 dilution factor (DF)를 달리했을 때, HBP 프로토콜은 주형 농도 의존적인 RQ값의 확보가 CTP4에 비해서 월등히 효과적임을 보여주었다. 반면 CTP2의 경우 주형의 농도를 증가시킬 경우 PCR inhibition에 의해 고농도 cDNA에서 RQ값의 비례적인 증가가 불가능함으로써 R2 값이 다른 프로토콜들에 비해 유의적으로 낮게 관찰되었다[그림 2-6-8].
 - : 상기 결과가 다른 test 유전자들에서도 일양하게 나타날 수 있는지를 확인하였다. 이때 직전 실험에서 너무 낮은 효율과 값을 보였던 CTP2는 제외하고, CTP4와 HBP 프로토콜들을 비교하였다. Hepatogonadal organ에서 서로 다른 기초 발현 수준을 갖는 RPL7, RPL8, RPL4, B-TU 모두에서 HBP 프로토콜의 우수한 성적이 잘 표현되었다[그림 2-6-9].
- 다양한 hepatogonadal sample들을 이용한 재현성 및 활용성 평가
- : 앞서의 결과에 따라 HBP 프로토콜은 전복의 hepatogonadal RNA 추출 시 고순도의 RNA를 추출함과 동시에 일정 수준이상의 수율을 담보할 수 있으며, 기존의 일부 개선 방법들 및 종래의 통상적인 방법들에 비해 월등히 우수한 RT-qPCR template을 제공할 수 있는 것으로 나타났다.
 - : 이에 본 연구의 HBP 프로토콜이 성장 단계, 성숙 정도, 종자, in vivo 자극 처리, 배수체 등의 다양한 hepatogonadal 시료에서도 안정적으로 사용 가능한지를 확인하였다. 총 100개 이상의 hepatogonadal 샘플을 대상으로 HBP 프로토콜을 이용한 RNA 추출을 통해서 흡광도 평가를 수행한 결과, 모든 시료 종류 type에서 매우 일양한 260/280 nm 및 260/230 nm 값 범위를 보여 최소 1.8 이상의 값을 안정적으로 제공하였다. 뿐만 아니라, 이들 total RNA 시료를 이용한 RT-qPCR linearity를 무작위 선발 시료로 평가한 결과 모두 0.99 이상의 R2 값을 나타냄으로써 PCR inhibition 없이 유전자 발현 정량화가 이루어질 수 있음을 확인하였다[그림 2-6-10].



[그림 2-6-8]

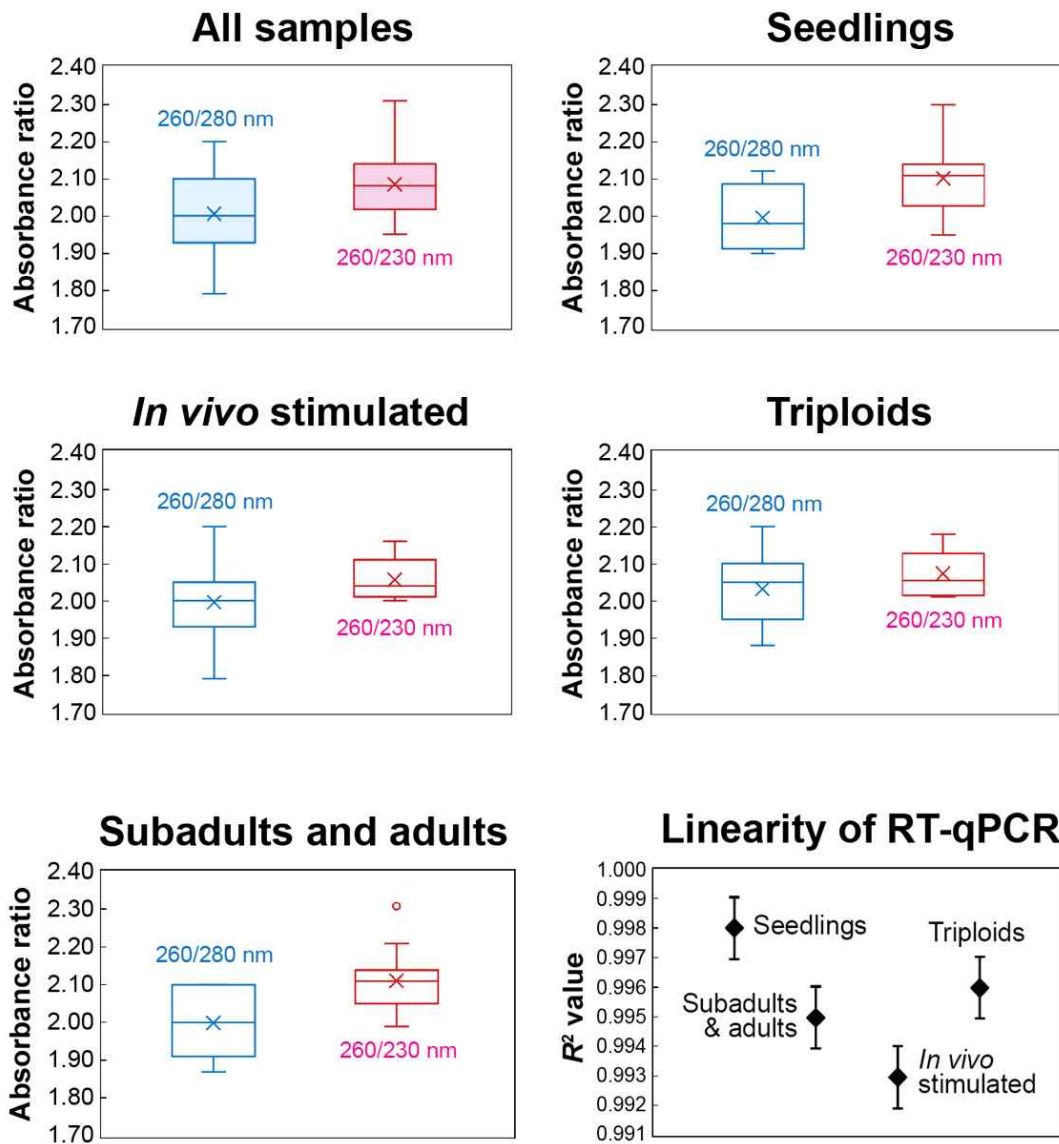
전복 hepatogonadal RNA 추출 프로토콜 개선
(RT-qPCR validation: dilution factor 및 RQ 검증)



[그림 2-6-9]

전복 hepatogonadal RNA 추출 프로토콜 개선

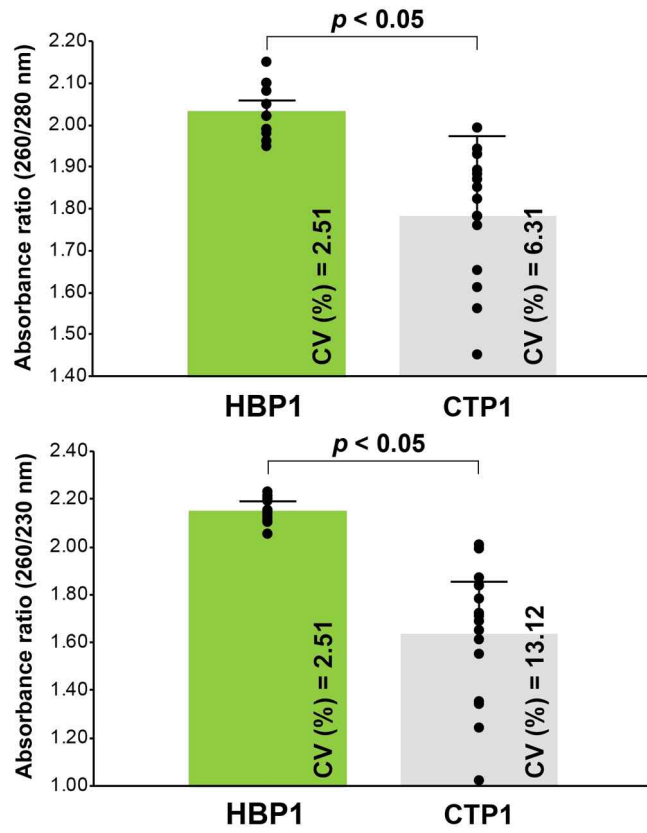
(RT-qPCR validation: 서로다른 유전자를 이용한 RQ 재검증)



[그림 2-6-10]

다양한 hepatogonadal 시료에 대한 재현성 검증

: 이상의 결과를 토대로, HBP 프로토콜은 전복의 hepatogonadal RNA를 위한 매우 안정적이고 효과적인 방법임을 알 수 있다. 하지만 hepatogonadal organ과 다른 조직(기관)을 동시에 동일 유전자발현 측정을 할 경우, 조직별로 서로 다른 방법에 의해 추출된 RNA 주형을 RT-qPCR에 사용하는 것은 바람직하지 못하다. 따라서 본 연구의 마지막 HBP 검증 단계로서 HBP 방법론이 hepatogonadal 샘플 외에 다양한 조직들에 대해서도 모두 적절하게 작동이 가능한지를 최종 검증하고자 하였다. Hepatogonadal 시료 외에 전복의 다양한 체세포 조직(아가미, 눈, 혈구, 심장, 소화관, 근육, 촉수 등) 및 전복의 발생단계 시료(미수정란, 수정란, 부화 전 발생 단계, trocophore, veliger 단계 유생)을 대상으로 HBP 프로토콜에 의한 RNA를 추출하였고, 이때 각 시료 종류별로 대조군 방법으로 CTP1을 함께 사용하여 RNA를 추출 후 흡광도를 서로 비교하였다[그림 2-6-11]. 그림에서 보듯이, HBP 프로토콜은 260/280 nm 및 260/230 nm 에서 일양하고 안정적인 값을 나타내었으나(%CV < 3.0%), CTP1의 경우 대부분 시료들에서 고 순도의 RNA의 추출이 가능하였지만 일부 조직의 종류에 따라서 흡광도 측정값이 크게 낮아지는 시료들이 관찰되었다. 따라서 본 연구결과, 종래 고순도의 전복 hepatogonadal RNA를 확보하기 위해서는 recovery yield의 손실을 감수하더라도 장시간의 순수정제 과정이 요구되었으나, 본 HBP 방법을 이용할 경우, 상대적으로 손쉽고, 빠른 시간 내 매우 안정적인 방식의 고순도 hepatogonadal RNA 시료의 확보가 가능하였고, 이에 이하 이배체 및 배수체 전복의 생식소 유전자 발현 평가 등을 위시하여 여러 유전자 발현 정량분석에 본 HBP 방법들을 이용하였다.



[그림 2-6-11]

다양한 조직 및 발생 시료 종류를 이용한 개선 프로토콜의 활용성 검증

(2) 수컷 성숙 관련 발현유전자 마커 발굴

(2.1) 전복 정소 최종성숙 지표 유전자로서 testis-specific serine/threonine kinase (TSSK) multigene family member들의 발굴 및 구조 분석

○ 목적 및 범위

: 전복 수컷 생식소 발현유전자 탐색 결과를 바탕으로 전복 정소(testis) 최종성숙 지표 유전자로서 testis-specific serine/threonine kinase (TSSK) 유전자 그룹을 수컷 생식소 발현의 유전자 마커로 선정하였다.

: TSSK 유전자들의 기능이 가장 많은 연구정보가 축적되어있는 일부 모델 포유류(및 인간 포함)들의 연구결과를 토대로 할 때 TSSK 유전자는 multigene family로 genome에 존재하며 TSSK1 뿐만 아니라 다른 member들 역시 정소의 발달 단계 특이적인 발현과 함께 고유의 isoform 또는 member 특이적 기능을 담당한다고 알려져 있다. 그러나 무척추동물 그룹의 경우 genome sequencing 또는 transcriptome 대량 서열 발굴 프로젝트를 통해 일부 TSSK member들이 computational annotation 방식으로 예측된 바 있으나 실제 발현 기능을 하는지에 대한 정보는 매우 극미하고, 특히 현재 예측하는 무척추동물의 TSSK member들의 명명법(nomenclature)이 포유류의 명명법에 잘 맞지 않을 뿐만 아니라 annotation 자체가 불분명하고 아울러 포유류에서는 관찰되지 않는 unusual TSSK isoform 들이 다수 관찰된다.

: 때문에, 현재 인간을 위시한 포유류에서 정립된 TSSK multigene family의 구분과 알려진 기능을 무척추동물에 직접 적용하는 것이 매우 힘든 실정이다. 따라서 배수체 전복을 대상으로 한 GSP 연구와 관련하여 삼배체 수컷의 불임 기능을 해석 또는 표지할 수 있는 마커로서 TSSK gene member들을 활용이 유용할 것으로 예상하지만, 현재 전복에서는 본 연구진이 GSP 연구를 통해 발굴한 TSSK1 isoform 외에는 연구정보가 거의 없는 상태이다.

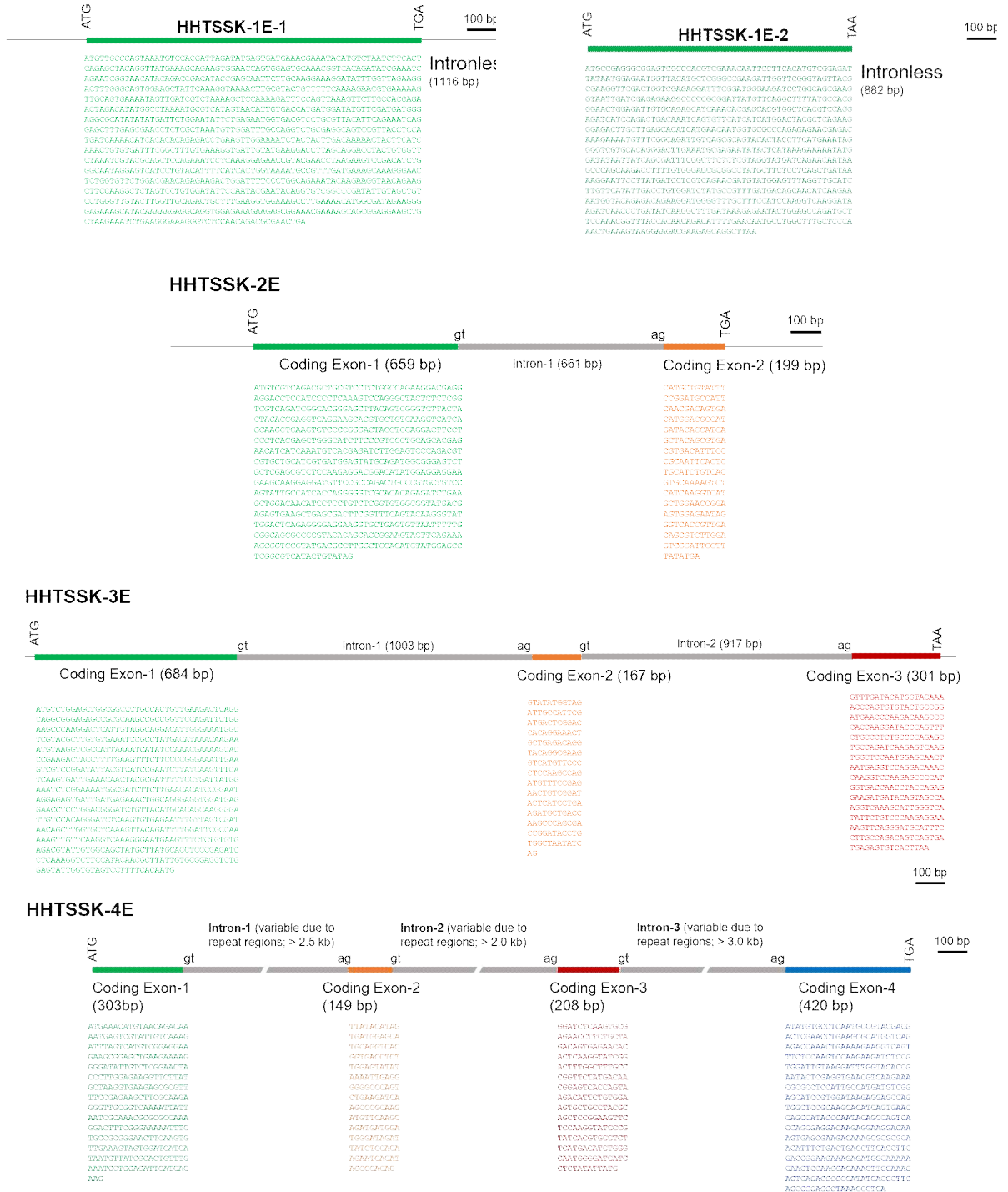
: 이에 전복으로부터 TSSK gene family 전체를 발굴, 분리하고 이들을 대상으로 유전자 및 예측 아미노산의 구조, 분자계통학적 평가를 통한 nomenclature 재 정비, 수컷 전복에서의 기초발현 특징(조직발현 분포 및 생식소 내 TSSK member 들 간 조직발현 수준 비교 평가)을 수행함으로써 삼배체 전복 정소의 부분성숙 및 불임 특성을 해석하기 위한 마커로 개발하고자 하였다.

○ 연구내용 및 방법

: Local DB 형태로 연구실에서 보유하고 있는 NGS transcriptome 및 public release 가 되어 있는 Haliothis 속 genome draft들을 대상으로 생물정보학 분석법을 통해 기존 TSSK1 및 동물 TSSK member들과 상동성(homology)을 보이는 서열 단편들을 확보 한후 해당 partial 서열들로부터 잠재적인 full-length open reading frame (ORF)를 포함하는 서열들을 클로닝 분리하였다.

- : 클로닝을 위해서 전복 testis total RNA로부터 RT-PCR 분리와 전복 genomic DNA로부터 PCR 분리를 후보 TSSK isoform 별로 실시하였으며 1차 클로닝 자료를 토대로 genome내에서 분리하는 가능하지만 정소에서의 발현이 검출되지 않는 염기서열들(pseudogene화 예상)을 본 연구에서 제외하였다.
 - : Contig assembly 및 primer walking을 통해서 양방향 서열 확인을 기초하여 각 TSSK member 별로 representative sequence를 gDNA 및 cDNA version으로 확보하였고, 해당 서열들을 대상으로 genomic gene의 exon-intron organization, coding 서열의 mRNA서열과의 match 여부, functional transcript 생성의 검증을 수행하였으며, 각 cDNA 서열로부터 유추한 아미노산 서열을 토대로 conserved domain search, 3D modeling 분석을 수행하여 기존 알려져있는 TSSK member들과의 기본적인 orthology 보유 여부를 조사하였다.
 - : 각 TSSK member 별 아미노산 서열을 이용하여 이미 분자계통학적 유연관계가 정립되어 있는 대표 포유류 종의 TSSK member들 및 현재 산발적으로 등록되어 있는 mollusc 종에서 예측된 TSSK 서열들을 포함하여 분자계통학 평가를 재수행함으로써 전복에서 발굴한 TSSK isoform들과 포유류/연체동물 종의 TSSK member들간의 structural orthology 및 nomenclature 방식을 재검토하였다.
- 전복 TSSK member 유전자들의 genomic 구조
- : TSSK gene 발굴을 통해서 functional transcript를 형성하는 전복의 TSSK 유전자들은 TSSK1-like member를 포함하여 총 5종류로 나타났으며, genomic DNA 상에서 TSSK 유사 구조를 가지지만 testis에서 발현하지 않은 2개의 isoform은 본 과제의 분석에서 제외하였다.
 - : 유전자 구조(exon-intron organization)을 기준으로 할 때 5개의 TSSK member들 중 2개의 유전자는 intron을 가지지 않는 단일 exon 유전자로 밝혀졌으며(intronless gene), 1개의 TSSK유전자는 2개의 exon을, 나머지 2개의 TSSK genes은 각각 3개 및 4개의 exon으로 구성된 유전자였다. 이중 4개의 exon을 가지는 TSSK 유전자가 전년도 TSSK1-like 서열에 해당하는 것으로 나타났다[그림 2-6-12].
 - : 아직 mollusc TSSK multigene의 molecular phylogeny가 전무하다는 점을 고려하여 현재 발굴한 전복의 TSSK유전자들은 coding exon의 수에 기초하여 *Haliotis discus hannai* TSSK-1E-1 (HHTSSK-1E-1; intronless), HHTSSK-1E-2 (intronless), HHTSSK-2E (2-exon), HHTSSK-3E (3-exon), HHTSSK-4E (4-exon)으로 1차 명명하여 후속 실험을 수행하였다. 각 유전자의 구조에 대한 특징은 다음과 같다.
 - : HHTSSK-1E-1은 intronless 유전자로서 개시코돈(ATG)로부터 종결코돈(TGA)까지 총 1116 bp의 단일 exon 구조를 가지며, functional transcript를 정소에 발현하고, 정소에 발현된 transcript의 서열은 genomic DNA coding sequence와

- 잘 일치하였다. 마찬가지로 또 다른 intronless gene으로서 HHTSSK-1E-2는 1E-1과 비교 시 보다 짧은 서열을 가짐으로써 ORF의 길이가 882 bp였으며 종결코돈은 1E-1과 달리 TAA를 나타내었다.
- : HHTSSK-2E는 coding exon-1에 659 bp를, 그리고 exon-2에 199 bp (종결코돈 포함)를 나타내었으며 이들 두 exon 사이에 661 bp의 intron-1을 포함하고 있었다. 전형적인 exon-intron splicing rule (gt-ag)을 잘 따르고 있었고 종결코돈은 TGA를 갖고 있었다. Transcription에 의해 정소에 발현하는 mRNA 서열 내 858-bp coding sequence (종결코돈 포함)와 genomic DNA 상의 coding exon 서열이 대부분 일치하였으나 일부 synonymous substitution도 관찰되었다. 또한 ORF 서열을 기준 시 여타 member들에 비해서 상대적으로 높은 G+C% (54.89%)를 나타내었다.
 - : HHTSSK-3E는 exon-1, -2 및 -3의 길이가 각각 684 bp, 167 bp, 301 bp로 나타났고, 비교적 긴 길이의 두 개 intron (1003-bp intron-1 및 917-bp intron 2)들을 보유하고 있었다. 역시 일부 염기서열에서 다형성이 관찰되었으나 대표서열을 기준 시 gDNA-cDNA coding 서열이 일치하였다. 종결코돈은 TAA를 갖고 있어 1E-2 member와 동일하였다.
 - : HHTSSK-4E는 본 연구진이 기존 동정한바 있는 TSSK member (TSSK1-like)의 연구결과와 동일하게 303-bp exon-1, 149-bp exon-2, 208-bp exon-3 및 420-bp exon-3 (종결코돈 포함)의 구성을 갖고 있었으며 매우 긴 intron들을 보유하고 있었고 각 intron 별로 mini- 및 micro-satellite가 복수로 관찰되었다. 종결코돈은 TGA로 나타났고, 각 intron-exon boundary rule 역시 gt-ag rule을 잘 보전하고 있었다.



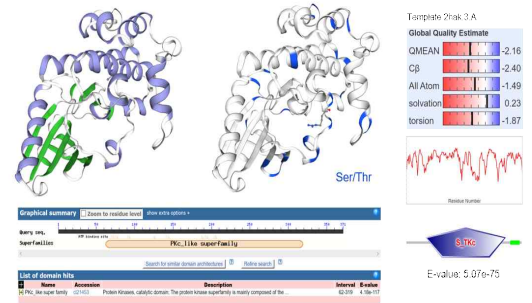
[그림 2-6-12]

전복에서 발현하는 TSSK 유전자 member들(HHTSSK-1E ~ 4E)의 exon count 및 genomic 구조. Intronless (single exon; 1E)의 경우 2개 isoform이 관찰되며 2-exon, 3-exon 및 4-exon 구조 유전자는 각 1개 member로 구성.

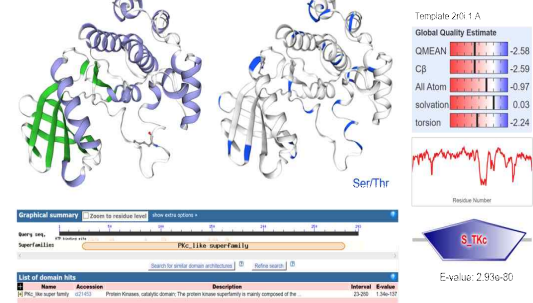
○ 전복 TSSK 아미노산 서열 및 domain 예측 구조

- : 전복 TSSK member들의 유추 아미노산 서열을 이용하여 conserved domain 예측 분석과 이를 근거한 3D modeling 분석을 수행하였으며[그림 2-6-13], 각 member의 주요 특징은 아래와 같다.
- : HHTSSK-1E-1은 총 371개의 아미노산을 코딩하고 있었으며 conserved domain search 및 SMART domain prediction 프로그램을 통해서 PKc-like superfamily domain (S_TKc domain)을 갖고 있는 것으로 예측되었다. 분자량 및 pI 계산 값은 각각 43.0 KDa 및 9.10이었다. Conserved domain은 전체 protein의 central region에 257 amino acid residues로 예측되었고, 3D modeling을 통해서 최소 7개의 서로 다른 크기의 helix와 9개의 spreadsheet 구조가 동정 되었다.
- : HHTSSK-1E-1은 총 293개의 아미노산으로 구성되는 단백질로서 역시 257-aa residue로 구성되는 S_TKc domain을 보유하고 있는 것으로 예측되었다 (e-value = 2.93e-80). 상대적으로 작은 크기의 단백질로서(예측 분자량 = 33.3 KDa), conserved domain은 N-terminal 영역의 23 aa와 C-terminal 영역의 13 aa를 제외한 모든 부위에 해당되었다. 3D 모델링을 통해서 최소 8개 이상의 크고 작은 helix구조와 7개의 beta-sheet 구조가 예상되었다.
- : HHTSSK-2E는 전복에서 발굴된 TSSK member들 중 가장 작은 크기에 해당되며(32.1 KDa), 285개의 아미노산 residue들 중 N-terminal의 23-aa 및 C-terminal의 Ile residue를 제외할 경우 나머지 261-aa residue가 모두 conserved S_TKc domain 영역으로 예측되었다. 다른 positive charge를 띠는 member들과 달리 HHTSSK-2E는 5.56의 pI 값을 보여 차이를 나타내었다. 3D 모델링을 통해서 helix의 경우 다른 member들과 유사한 크기와 수를 보였고 beta-sheet의 경우 6개가 예측되었다.
- : HHTSSK-3E의 경우 383개의 아미노산으로 구성되어 있었으며 central region에 conserved S_TKc domain을 보유하고 있고 (258 aa residues), conserved domain 이후에 전복 TSSK member들 중 가장 긴 94-aa c-terminal region을 나타내었다. 본 member는 43.3 KDa의 분자량과 8.77의 pI 값을 나타내어 전복의 TSSK member들 중 가장 큰 크기의 단백질에 해당되었다. 3D 모델링에서 7개의 helix구조와 최소6개의 beta-sheet 구조가 예측되었다.

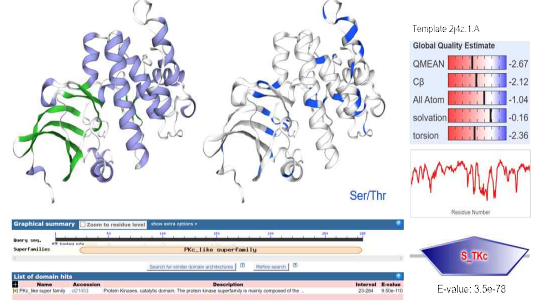
HHTSSK-1E-1 (371 aa) 257-conserved domain residues
 MLFSECFRLDMSDETRYSMLRSELQMKAEVEPECKRSQDRKSESEVYETPTYLAILLAEFGYIVRRTLGGSDSYV
 KYKLVCFSEKREKVKAVIVRDLKAKPKDFQKFLPRELDIPKMRHSIVTMMQMPDDGRRIYMI LEYSENGDVL
 RYKQSGALSEPLAKCWCQGVCRANVRLHDQNTIHRDLKLENLKDKMYFKLCPFGFYKDCMKDLSTYVQSSK
 SYAAPFLIKGPEYFKKSDIWAIVGVILYFITKMPFDESKNSGVLDPQRRLDPFQKQKVKVTEASKALVLIWIF
 QYEVGRREDIVAVLGCTNLQATALVYSELNMAIEGRKAVKRRQVEKEERKFAAEFAAKKSEGRGCTPTIAN



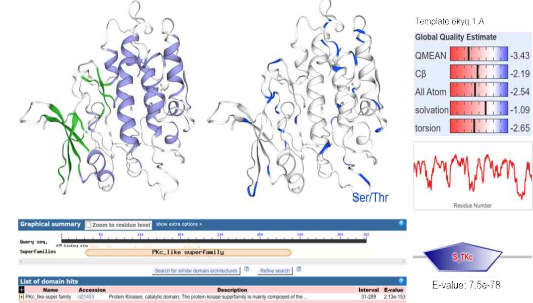
HHTSSK-1E-2 (293 aa) 257-conserved domain residues
 NFRAESPTSKQFLHMSLEIMERGVMGPKIGSGSYAKVRIVERISDGKILAAKVIDREKAPADYVQAFMPRELEI
 VQSLKIEHVAVVQETIQTDKSVPIIMVYAKQKDLLEHDMNNGAPRENETKMFQIVSAVNYLHEIGVWHDLIK
 ENILIKKNDLIIISDPGFSRYDQNNKPSKTCGSAAYASQLIKGIPYDPQRNDVWSLIGLILFLTCSMPPDD
 SNIKKVQRQDGVCFPSKVKDKINPDKALIKRILEPDASKRFTTIDILNNAWLCSQTESKEDEEQA



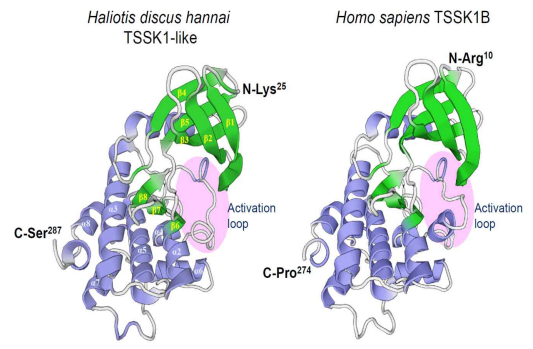
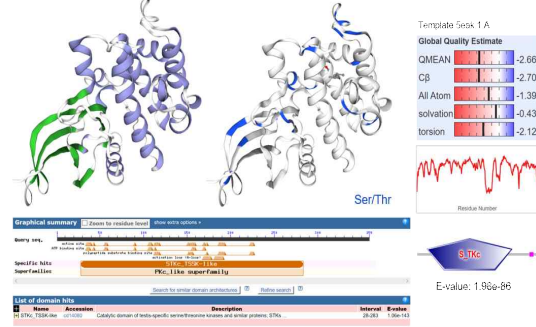
HHTSSK-2E (285 aa) 261-conserved domain residues
 HSSDAASSQRDEEDLPLKYQYSLGQIGTGAYSRVLLHRGQRARAVKVISKVKCPDYLEDLDFELHGLGIFP
 SLQHEINTKCHELLESQTSQIVMYADGSSLEELQEDGHEEERARMEFQTARAVQICHGQVAHNDLKLDN
 ILLSRCSGMPRVKLSDFGFSRVLDSEGRKVLVSNVFCSSAPYTAPEVLQKSGPYDALAADVMSLGLVLYSMLYFR
 MPFSDSDMAQHLQRLQVFFPAHSASVTCCKSLKVMLEPEVEMRVTVDSVLESDFP



HHTSSK-3E (383 aa) 258-conserved domain residues
 MSAGGAPATVEDSGHREPRARRFQILRQQLIVGRTLNGSYACVKSAYDINKKQVAKIISKRKAPEDYLLK
 FLPRELEVVRLLRHPNLIKFQVIEITTRFFLIMEISENGDLEHIRNRVDEKLAGWRNRLLDGIYMSHSG
 IVHVDLKCENLLVNSLVKQVDFGFAKGLFKVKGNEVSLCETVCGSYAVAPPEILKGLPYNACAEVWSIGVVL
 FVMYGRLLPDDSDHRKLLRQVQAKVMFSPKVDVSNCRILLKMLTKPSDRIPVAMIRPMDTWKTCQVLEDEPK
 TSPFDQFLPSAPELPPQSSGNGATREVDQHPKSKSMVNTLPERDDTVAKVVALGHLISQSEKFRDAPFQ
 TVSEDSVT



HHTSSK-4E (359 aa) 255-conserved domain residues
 MKNVDDMERIYKIVMSSEEAELKHFGYCLSTPLGEGSYAKVKSAPSEKLRHNYNPKIINRKAAPDFREKFLP
 RELQVLYVHHVHVALEFELRHHKLYVMEHAGKDLLEYIKLRQAQSEIQRKAKMFKMMGGIDYLRKHHLIAH
 RDLKCEMLLDENELKLVDFGFAEYVNGPSTKTCOSAAAYAPVLEQGIYFVPLHDIWAMGIIILYIMICSM
 FYDSENLRMVRDQCEKRVFSKSKISVDCQDLVHLLILEVWVKFASIMMSEHPWIRGSSSAGTSVNVQYFPI
 QPVTSEDKKIKVSEDKAATFIDTLRLRPEERDGRKSKKDKVGRSEPTDMLQPEAKA



[그림 2-6-13]

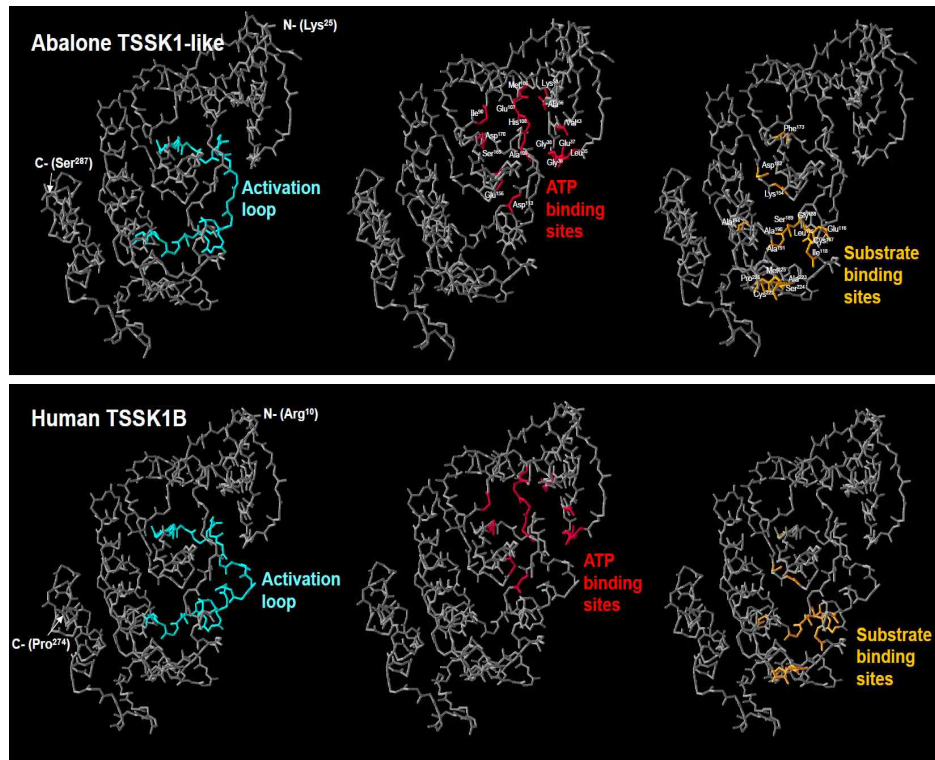
전북 TSSK multigene family member의 도메인 구조 예측 및 3D 모형화(오른쪽 아래 끝의 3D 모델은 HHTSSK-4E와 인간 TSSK1B와 상동성 비교)

: HHTSSK-4E의 경우 전년도 연구를 통해서 polymorphism이 많이 관찰되는 member로 알려진 대로 전년도 발굴 서열과 작은 차이를 나타내었으나 전년도 연구에서 개체 및 집단간 다형성이 높다는 점을 고려할 때, 당해년 발굴 isoform이 전년도와 다른 member가 아닌 동일 member (즉, 포유류의 TSSK1B에 상응하는 전복의 TSSK member)로 취급하는 것이 합당할 것으로 판단된다. 255-aa의 residue로 구성된 conserved domain 및 인간 TSSK1B와 높은 상동성을 가진 3D구조 등이 일관되게 관찰되었다[그림 2-6-14]. 이상의 클로닝 및 생물정보분석 결과를 [표 2-6-3]에 요약하여 나타내었다.

○ 전복 TSSK multigene family 분자계통분석

: 본 연구에서 발굴한 총 5개 TSSK member들과 기존 연체동물들에서 예측된 TSSK 서열들, 그리고 이미 분자계통과 nomenclature가 정립된 대표 포유류 종의 TSSK gene family (인간 = TSSK1, TSSK2, TSSK3, TSSK4 및 TSSK6 으로 정립되어 있고 이중 TSSK1, TSSK2 및 TSSK6가 intronless gene에 해당. 대부분 포유류 종에서 동일하게 적용)를 이용하여 분자계통 분석을 수행하였다. 계통분석은 전체 protein 영역(whole protein region)을 이용한 분석과 alignment가 상대적으로 더 유효한 conserved domain 영역만을 이용한 분석을 수행하였다. 다양한 branching algorithm들 및 reconstruction option들을 대상으로 예비 분석을 진행 후 reference 서열로 이용한 인간의 TSSK gene 서열들이 기존 정립 방식에 가장 근접한 유연관계를 보이는 option을 선택하여 분석을 수행하였다. 분석 프로그램은 MEGA-X 프로그램을 이용하였고 Neighbor-joining을 기반으로 JTT, Uniform, 50% partial deletion 옵션을 사용하였다. Bootstrap replication은 1000회 수행하여 branching node의 confidence level을 정하였다.

: Whole protein 영역을 이용한 tree reconstruction 결과, mollusc에서 TSSK1 및 TSSK2로 annotation된 서열 중 전복의 HHTSSK-4E를 포함하여 총 7개의 서열들이 하나의 clade를 형성하였고, 해당 clade는 기존 포유류의 TSSK1/TSSK2 clade와 분자계통학적으로 유연관계를 갖는 것으로 나타났다. 그러나 그 외 TSSK1 등으로 annotation되어 등록되어있는 다양한 mollusc TSSK 서열들은 본 clade에 포함되지 않으며 포유류의 TSSK1/2와도 선명한 유연관계를 갖지 않는 것으로 나타났다[그림 2-6-15].

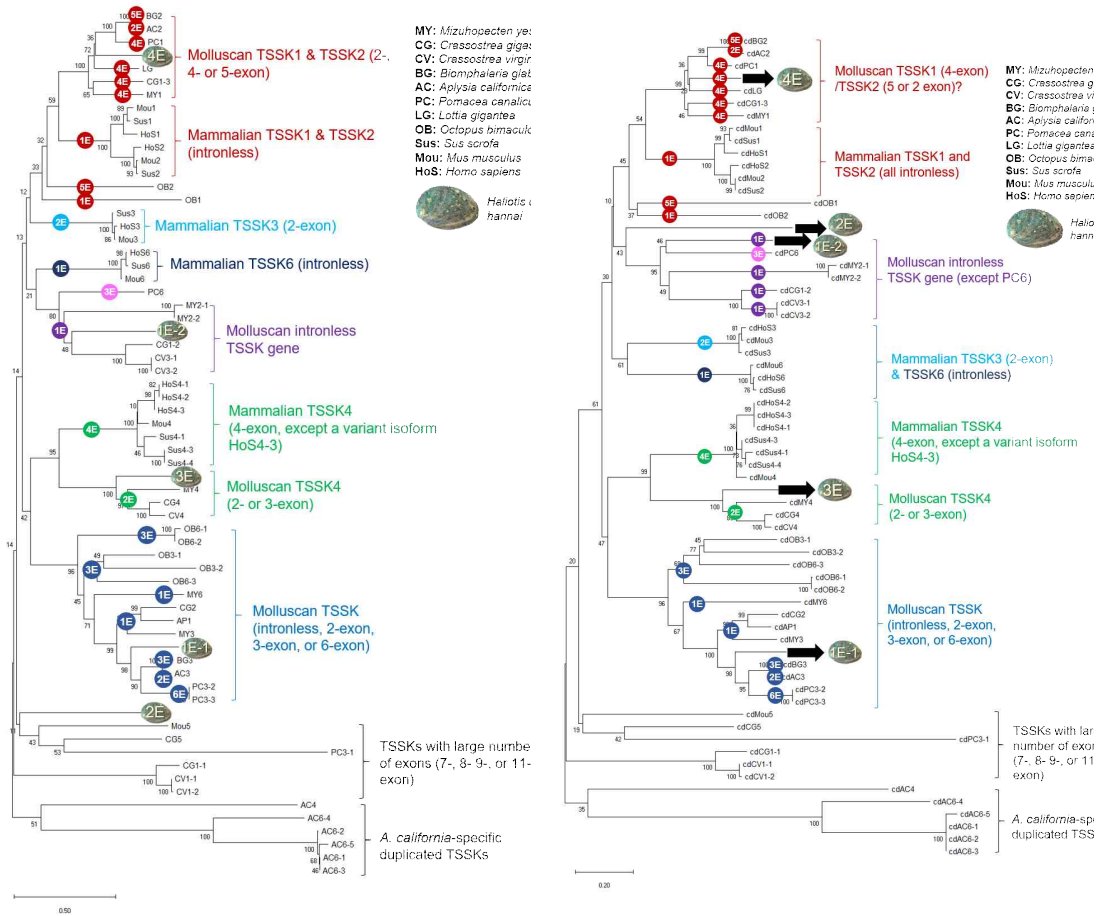


[그림 2-6-14]

Human TSSK과 전복 TSSK1-like의 3D structural modeling: main motifs

[표 2-6-3] 전복 TSSK multigene family의 염기 및 아미노산 서열 정보 요약

TSSK member	ORF (bp)*	Stop codon	G+C (%)	No. AA coded	Mw (Da)	pI	Hydrophobicity	STKc domain (aa)
HHTSSK-1E-1	1116	TGA	43.46	371	42986.92	9.10	-0.520	257
HHTSSK-1E-2	882	TAA	46.60	293	33347.48	8.11	-0.404	257
HHTSSK-2E	858	TGA	54.89	285	32086.57	5.56	-0.242	261
HHTSSK-3E	1152	TAA	48.27	383	43273.95	8.77	-0.344	258
HHTSSK-4E	1089	TGA	48.15	359	40999.50	9.29	-0.528	255



[그림 2-6-15]

전복 TSSK multigene family의 분자계통 분석(좌: whole protein region; 우: conserved domain region)

- : 전복의 HHTSSK-1E-2(intronless)는 여타 mollusc TSSK 서열들 중 intronless gene으로부터 유래한 TSSK들과 유연관계를 가지며 비록 매우 약한 bootstrap value에 의한 형성이지만 인간을 위시한 포유류 TSSK6와 연관되는 관계를 보였다. 한편, HHTSSK-2E는 인간의 어떠한 TSSK member와도 genetic affiliation을 나타내지 않았으며 mouse의 TSSK5 (인간 및 다른 포유류 종에서는 발견되지 않는 member)와 약한 유연관계를 보일 뿐 거의 독립적인 position을 나타내었다. HHTSSK-3E의 경우 molluscan 종들로부터 TSSK4라고 명명된 서열들과 강한 유연관계를 나타내어 작은 clade를 형성하였고, 해당 clade는 역시 포유류의 정립된 TSSK4 clade와 밀접한 관계를 나타내는 monophyletic clade (bootstrap value = 95%)를 보임으로써 전복에서 발굴된 HHTSSK-3E 유전자는 TSSK4 member에 해당된다고 판단되었다. Intronless gene인 HHTSSK-1E-1은 포유류의 TSSK들과는 선명한 유연관계를 나타내지 않는 별도의 molluscan clade내 속하였는데 해당 clade 내에는 전복의 1E-1 유전자처럼 intronless genes들도 포함되어 있었으나 그 외 여러 종류의 multi-exon gene들도 함께 속해있었다.
- : Conserved domain 영역을 이용한 분자계통분석 결과 역시 큰 틀에서 유사한 tree topology를 나타내었다. HHTSSK-4E 및 -3E가 각각 인간(포유류)의 TSSK1/2 및 TSSK4와 밀접한 유연관계를 가진다는 점, HHTSSK-1E-1이 별도의 monophyletic molluscan clade에 속한다는 점, HHTSSK-1E-2가 대부분 intronless molluscan TSSK 유전자 기원의 서열들과 유연관계를 가진다는 결과는 앞서의 whole protein 서열을 이용한 분자계통결과와 유사하였다. 그러나, HHTSSK-2E의 경우 whole protein 서열을 이용한 결과와는 달리 molluscan intronless gene들과 연관된 (bootstrap은 다소 약한 43%) 결과를 나타내었다.
- : 이상의 분자계통분석 결과를 종합할 경우, 첫째 포유류에서 정립된 TSSK multigene family의 진화 가설은 molluscan 그룹에는 맞지 않으며, 특히 retroposition-mediated gene duplication 가설만으로는 molluscan TSSK family의 진화를 선명하게 설명할 수 없고 molluscan 그룹은 TSSK 유전자들에 있어 다른 evolutionary history를 갖는 것으로 보인다. 둘째, 인간 및 포유류에서는 TSSK 유전자들의 exon number들이 member별로 잘 보존되어 있어 각 member들의 공통조상 기원을 추정하고 있으나, 해당 가설은 molluscan lineage에서는 그렇지 않은 패턴이 분명해 보인다. 아미노산 서열을 기준으로 매우 강한 genetic affiliation과 함께 monophyletic clade를 형성하는 molluscan TSSK 서열들간에도 exon 수에 대한 유전자 구조는 다양하게 나타나기 때문이다. 또한 셋째, molluscan TSSK 유전자들 중 일부 member들은 포유류의 TSSK 서열들과 밀접한 유연관계를 보이지 않으며(즉, member

-dependent clustering이 아닌 molluscan taxonomic position-dependent clustering) 별도의 evolutionary repertoire를 갖는 것으로 예상된다. 그럼에도 불구하고 넷째, molluscan TSSK gene 들 중 일부 member들(예, 전복의 경우 TSSK-3E 및 TSSK-4E)은 인간(포유류)의 TSSK1(또는 TSSK2)과 TSSK4와 밀접한 유연관계를 보이며, 최소한 이들 두 member들 (인간 기준 TSSK1 및 TSSK4)은 공통조상 유전자로부터 유래하였을 가능성을 나타낸다. 이에 본 연구에서 제시한 molluscan TSSK member들의 phylogenetic relationship을 바탕으로 molluscan 그룹의 경우 인간/포유류에서 정한바 있는 명명법과는 다른 명명 체계가 합당할 것이다.

(2.2) TSSK member들의 발현 특징

○ 전복 TSSK multigene family member들의 정소 특이적 발현분포

- : 전복에서 발굴한 TSSK 유전자들의 기초발현 특징을 조사하기 위한 일환으로 각 member들의 조직 발현 분포 패턴을 분석하였다. 전복 수컷으로부터 아가미(gill), 소화관(gut), 심장(heart), 혈구세포(hemocyte), 간췌장(hepatopancreas), 근육(muscle), 촉수(tentacle) 및 정소(testis)로부터 추출한 total RNA를 역전사시킨 cDNA 주형을 대상으로 end-point RT-PCR을 수행하였다.
- : 예비 실험을 통해서 단일 PCR band를 specific하게 증폭시킬 수 있는 프라이머 조건과 열순환 조건을 평가, 선정하였고, 이로부터 각 TSSK member들의 발현 산물 단편을 RT-PCR로 증폭, 조직 발현 특징을 조사하였다. 최종 선정한 열순환 조건은 94°C 20초, 58°C 20초 및 72°C 20초로 구성된 각 cycle을 30회 반복수행하는 반응이며, 각 유전자별 PCR primer쌍은 specificity (melt curve analysis)와 efficiency (standard curve를 이용한 PCR-E value 측정)를 평가하여 최적화하였고, 해당 프라이머 서열은 [표 2-6-4]에 나타내었다.
- : RT-PCR 결과, 분석한 5종의 TSSK member들 모두 정소에서 가장 강한 발현을 보였으며, member들에 따라서 정소에 국한된 발현 또는 일부 정소가 아닌 조직에서의 약한 발현을 보였다. HHTSSK-1E-1(intronless) 및 HHTSSK-1E-2(intronless)의 경우 정소 외에 혈구(hemocyte)에서 아주 약한 발현이 검출되었고, 1E-1 유전자는 근육에서도 매우 약한 RT-PCR 검출이 가능하였다. HHTSSK-1E-2 역시 간췌장 등 일부 조직에서 매우 약한 발현 신호가 검출되었으나 상대적으로 정소 발현 수준에 비해 크게 낮아 정소 집중 발현 패턴으로 인정할 수 있었다. HHTSSK-2E는 정소에서의 발현이 end-point상에 상대적으로 다른 member들에 비해서 약했으나 정소 국한적인 발현을 보여 정소 외 다른 조직에서는 전혀 검출되지 않았다. HHTSSK-3E 역시 -2E 유전자 발현 패턴과 유사하여 정소에 집중된 발현을 나타내었다. 반면 HHTSSK-4E는 혈구,

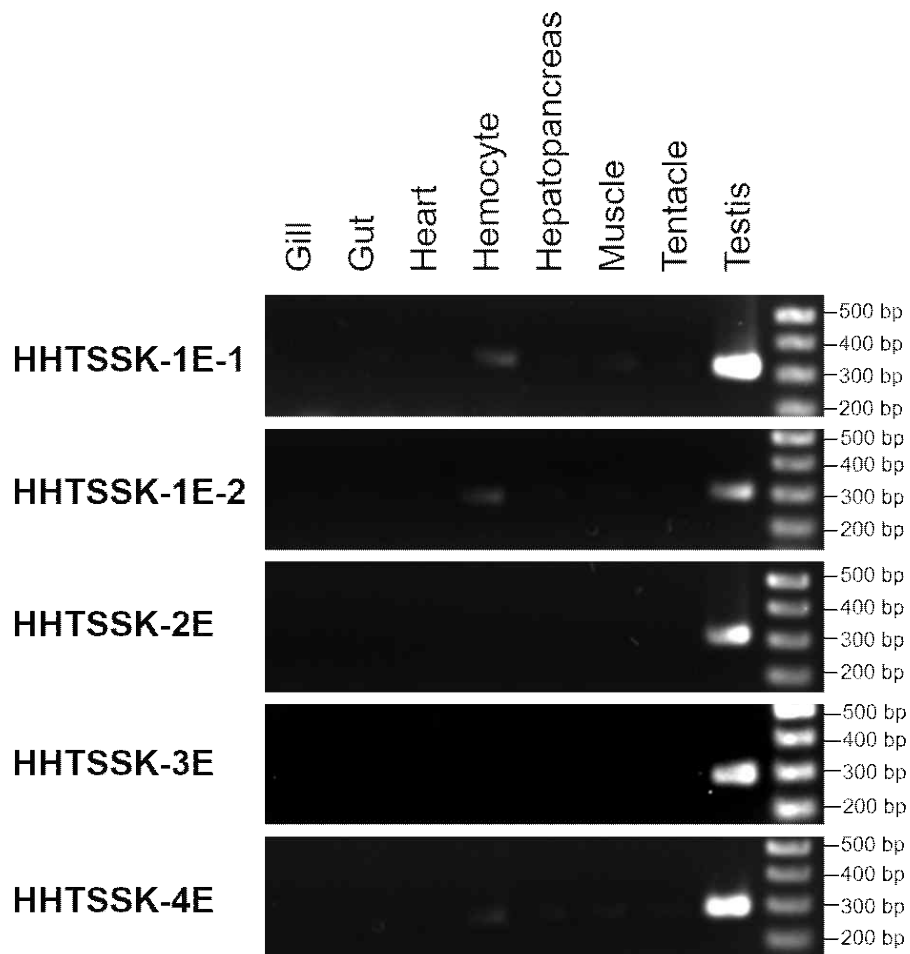
간체장, 근육 및 척수에서 매우 약한 발현 신호가 검출되었으나 정소의 발현수준과 비교 시 상대적으로 극미하여 testis-predominant 발현패턴으로 인정할 수 있었다. 다. 이상의 결과로부터 정소에 집중화된 조직발현 패턴을 미루어볼 때 전복에서 본 연구를 통해 발굴된 TSSK member들은 모두 정소의 성숙, 발달에 밀접하게 관여하며, 본 전복 종의 수컷 생식소 발달 발현 마커 유전자로 유용하게 이용될 것으로 판단된다[그림 2-6-16].

○ 전복 TSSK multigene family member의 정소 내 발현수준

: 전복 TSSK 다섯 member 들 모두 정소 집중형 발현패턴을 보임에 따라, 이들 TSSK member들 간 정소 내에서 차등의 양적 발현을 보이는지에 대한 기초발현 평가를 수행하였다. 상대발현 정량을 위해서 정소 조직의 total RNA-cDNA template 을 대상으로 RT-qPCR을 실시하였다. RT-qPCR을 위해 프라이머는 앞서 end-point PCR에서 최적화시킨 각 프라이머 쌍을 이용하였고, 상대 정량을 위한 normalization reference를 위해서 이전 GSP 연구를 통해 검증한 바 있는 3개의 internal control 유전자 및 증폭 프라이머들을 이용하였다. Internal control 유전자는 정소에서 항상 구성적 발현을 한다고 예상되는 전복 ribosomal protein L3 (RPL3), RPL5 및 RPL7을 사용하였다. 열순환 반응은 end-point PCR 조건을 40회 순환 반복하면서 각 cycle의 elongation step이 마칠 때 마다 SYBR green을 이용한 형광 검출을 통해 실시간 정량을 수행하였다. 이때 열순환 및 형광검출 장치는 Roche Light Cycler 480을 이용하였다.

[표 2-6-4] 전복 TSSK gene들의 RT-PCR 및 RT-qPCR 분석에 이용한 프라이머 정보

Gene	Primer name	Sequence (5'-to-3')
HHTSSK-1E-1	HHTSSK-E1(1)-q1F	GACGAACAGAGAAGACTGGA
	HHTSSK-E1(1)-q1R	TTGCACAGAGGAGTCAGTTC
HHTSSK-1E-2	HHTSSK-E1(2)-q1F	CAGCAAGACCTTTTGTGGGA
	HHTSSK-E1(2)-q1R	GAGCAAAGCCAGGCATTGTT
HHTSSK-2E	HHTSSK-E2-q1F	GAGGAAGGTGCTGAGTGTTA
	HHTSSK-E2-q1R	AATCCGACTCCAAGACGCTA
HHTSSK-3E	HHTSSK-E3-q1F	ACCGGATACCTGTGGCTAAT
	HHTSSK-E3-q1R	ACTGACTGTCTGGCAAGGAA
HHTSSK-4E	HHTSSK-E4-q1F	AGGTGAACGTCAAGAAACGC
	HHTSSK-E4-q1R	ATTCACTCAACCGCACTCAC



[그림 2-6-16]

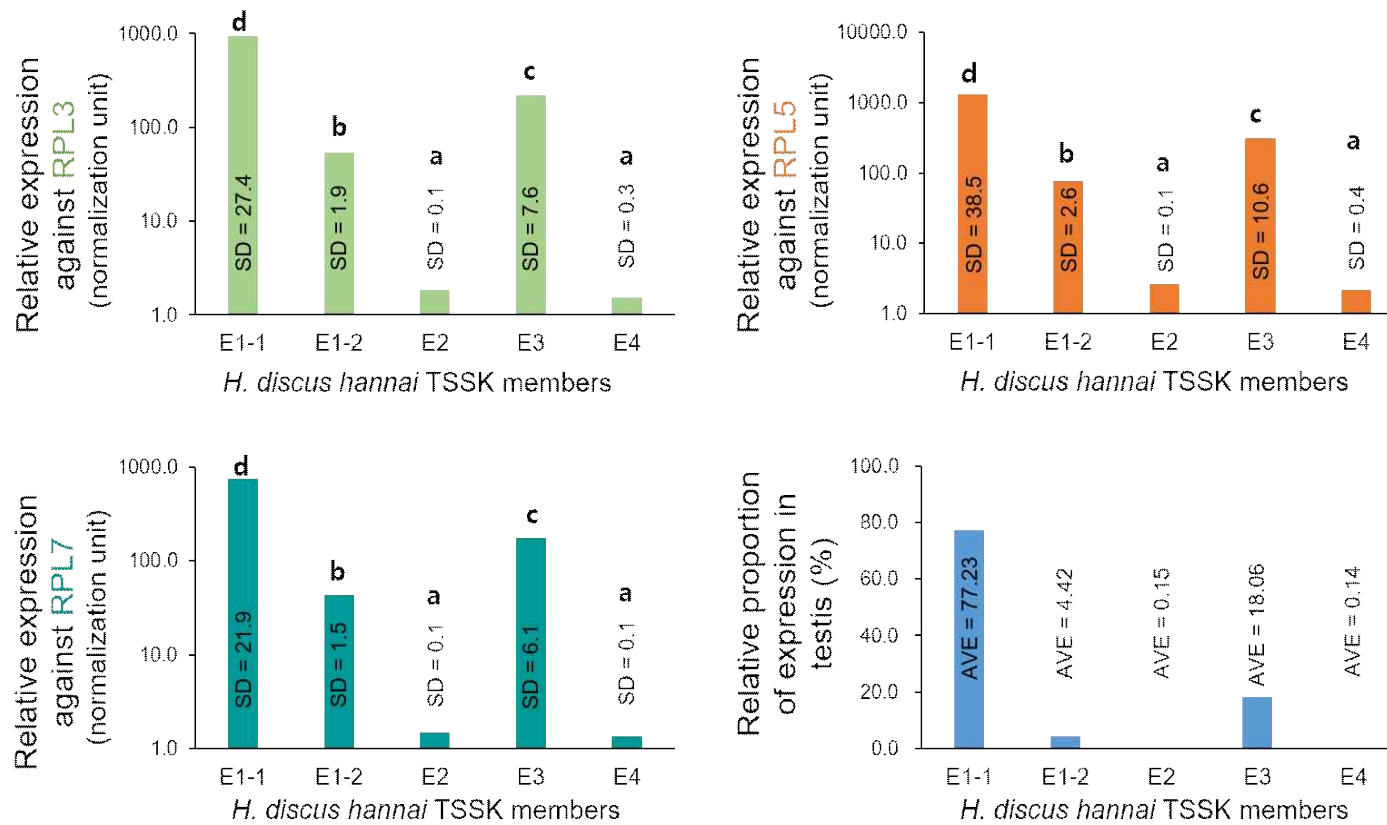
전복 TSSK multigene family member 들의 조직발현 분포 분석(RT-PCR)

: 전복 TSSK member들의 발현수준 (PCR efficiency와 reference gene에 대한 RQ값)을 비교한 결과 TSSK member들 간 큰 차이를 나타내었는데, 그 양상은 reference control 유전자의 종류와 상관없이 일양하게 나타났다. 총 5 member 들 중 1E-1이 상대적으로 월등히 높은 RQ 값을 보였고, 이어서 3E member가 뒤를 이어 높은 발현수준을 나타내었다. 그 다음 높은 발현수준은 1E-2에서 관찰되었으며, 반면 2E와 4E member는 상대적으로 낮은 발현수준을 나타내었다. 이러한 발현수준의 순서와 상대적 비율은 RPL3, RPL5, RPL7 internal control 이용 반응 모두에서 일정하였으며, 각 TSSK member들의 발현 RQ 값을 상대비율(백분율)로 표현할 경우 1E-1 유전자가 77%로 가장 우점하였으며 E4의 경우 1% 이하로 나타났다[그림 2-6-17]. 본 연구 결과, 일정 수준의 성숙을 보이는 정소에서 TSSK 유전자발현의 상대비교를 정량할 수 있는 조건이 갖추어짐에 따라, 정소의 발달 정도에 따라 차등 발현을 나타내는 member들을 선정평가 할 수 있는 지표 체계가 구축되었다.

○ 수컷 생식소 발달 단계에 따른 발현패턴 검증

: 상기 5종의 TSSK member 중 분자계통을 통해 포유류(인간)에서 정세포 최종성숙 단계(spermiogenesis)의 핵심 역할을 담당한다고 밝혀진 포유류 TSSK1 member와 가장 functional/structural orthology가 밀접한 전복의 TSSK member는 TSSK-4E이다(즉, human TSSK1의 ortholog). 따라서 본 항목에서는 전복 HHTSSK-4E를 중심으로 전복의 정소 발달(생식주기 및 수컷의 age)에 따른 발현패턴을 추가로 분석함으로써 TSSK 유전자가 전복의 수컷 생식소 발달을 지표화할 수 있는 유용 마커임을 입증하고자 하였다.

: (수컷 age에 따른 차등 발현 평가) 전복은 일반적 사육 조건에서 1년산에서 생식소의 발달과 성숙이 일어나지만 대부분 인공방정에 사용할 만큼의 충분한 성숙도는 보이지 않는 반면 2년째부터 보다 왕성한 정소 성숙과 생식가능 연령에 도달한다. 따라서 본 연구에서는 정소 발달 정도가 차이가 있는 1년산과 이후 연령(2년산 및 3년산)의 개체들을 대상으로 TSSK1-like 유전자 발현을 RT-qPCR 정량 분석을 실시하였다. 외관상 차이뿐만 아니라 조직학적 분석에서도 차이가 있는지를 확인하기 위해 1년산과 2년산 정소 조직을 비교한 결과 1년산 및 2년산 모두 정자 형성이 이루어졌음을 알 수 있었지만 1년산의 경우 secondary spermatocyte가 많은 반면 2년산의 경우 secondary spermatocyte의 비율이 줄고 spermatid와 spermatozoa의 비중이 더 증가하였음을 알 수 있었다. 정소조직을 대상으로 연령별 TSSK1-like 유전자의 발현을 분석한 결과 1년산에 비해 2년산 및 3년산에서 유의적으로 높은 발현 수준이 관찰되었으며, 2년산과 3년산 사이에는 통계적 차이가 없었다. 따라서 본 결과를 토대로 전복의 TSSK1-like 유전자는 생식소의 성숙 정도가 더 진행된 정소에서 더 높은 발현을 보이는 유전자인 것으로 나타났다[그림 2-6-18].

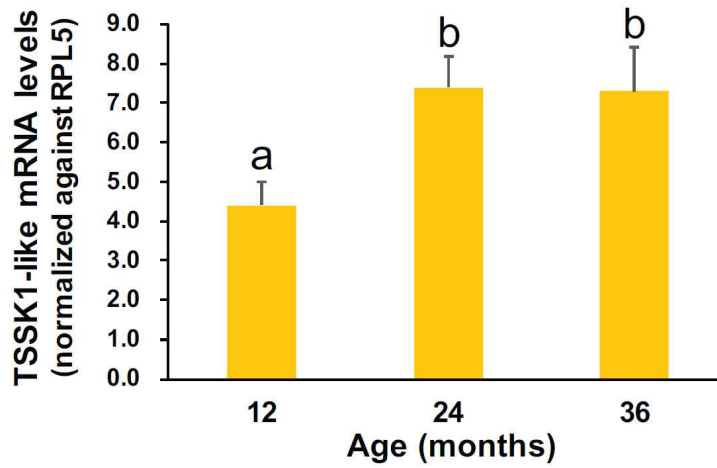


[그림 2-6-17]

전복 TSSK multigene family member 간 정소 내 상대발현 수준 비교(RT-qPCR).

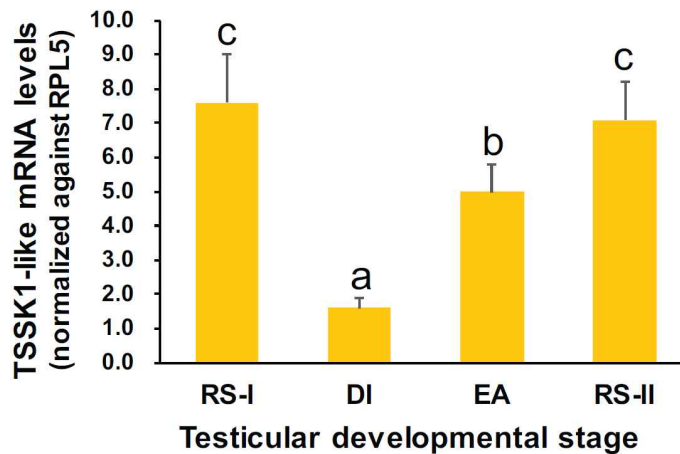
SD, standard deviation; AVE, average. 막대그래프 위에 서로 다른 알파벳으로 통계적 유의차(ANOVA $p < 0.05$) 표시.

- : (생식주기에 따른 차등 발현 평가) 2년산 전복 수컷들을 대상으로 정소의 성숙 주기에 따라 TSSK1의 발현이 조절되는지를 확인함으로써 앞서 성숙도와 발현과의 상관관계를 재검증하고자 하였다. 2년산 전복 수컷 그룹을 대상으로 정자방출 단계(release and spent stage; RS), 퇴화감소 단계(degenerate inactive stage; DI), 그리고 성숙 활성화 진입단계(early active stage; EA)에서 생식소 샘플을 얻어 유전자 발현을 분석하여 TSSK1-like의 변동 양상을 조사하였다. 분석결과, 최종 성숙이 가장 많이 일어난 단계에서(RS) 가장 높은 발현을 보였다가 퇴화단계에서 빠르게 감소하였고, 다시 성숙이 개시되는 EA가 되면서 TSSK1-like 유전자발현도 증가하기 시작한 후 RS에 최고 발현수준을 회복하는 패턴을 나타내었다[그림 2-6-19] 따라서 본 결과로부터 TSSK1-like는 앞서 연령 그룹의 실험에서와 유사하게 정소의 발달 성숙이 더욱 진행될수록 그 발현 수준이 높아지는 상관관계를 보임을 알 수 있었다. 두 연구 결과를 종합할 경우, 전복 TSSK1-like 유전자는 기본적으로 정소의 성숙단계와 밀접한 관계를 가지며, 정소의 성숙정도가 높아질수록 유전자 발현이 증가하는 것을 고려할 때 포유류에서처럼 spermiogenesis 후반부에 가장 높은 발현을 하는 것을 알 수 있으므로 전복 TSSK1-like와 포유류 TSSK1과 기능적인 orthologue 관계를 인정할 수 있다고 판단되었다. 따라서 본 TSSK1-like는 전복 수컷의 최종 성숙 단계 진행을 평가할 수 있는 분자마커로 사용가능하며 이를 토대로 배수체 수컷의 표현형 그룹들을 평가하기 위한 도구로 활용할 수 있다고 판단되었다.
- : (방출된 정자에서의 발현 검출) TSSK1-like의 기능이 최종성숙단계와 밀접함을 보다 더 입증하기 위해서 인공 방정을 유도한 후 얻은 정자를 회수하여 유전자 발현이 검출되는지를 확인하였다. RT-PCR 분석을 통해 조사한 결과 방출된 정자에서도 TSSK1-like의 transcript들이 검출됨을 알 수 있었다. 하지만 그 발현 수준은 정소에서의 발현 수준과 비교시 매우 낮게 나타났다. RT-PCR 결과를 재검증하기 위해서 RT-qPCR 분석을 실시한 결과 정자에서의 발현은 정소에서의 발현과 비교시 수십배 낮게 나타났다. 따라서 전복의 경우 방출된 정자에서도 mRNA 발현산물이 검출된다는 점을 고려할 때 TSSK1-like의 기능이 생식소 발달 초기가 아니라 최종 단계에서(post-meiotic) 더 중요시됨을 알 수 있으며, 아울러 그림에도 불구하고 정자에서 발현 수준이 급격히 낮아지는 점을 고려할 때 최종성숙 이후에는 유전자 발현수준이 아니라 단백질 수준에서 그 주된 기능을 수행하리라 예상된다[그림 2-6-20].



[그림 2-6-18]

1년산 전복 수컷과 2년산-3년산 전복 수컷의 TSSK1-like 발현수준(RT-qPCR). Histogram에 다른 알파벳으로 표시된 내용은 ANOVA (followed Duncan's multiple range test) 분석에 의해 유의적인 차이를 나타냄(P <0.05)



[그림 2-6-19]

전복 TSSK multigene family member 간 정소 내 상대발현 수준 비교(RT-qPCR). SD, standard deviation; AVE, average. 막대그래프 위에 서로 다른 알파벳으로 통계적 유의차(ANOVA p < 0.05) 표시.

(3) 암컷 성숙관련 발현 유전자 마커 발굴

○ 암컷 성숙관련 발현 마커 유전자 선발

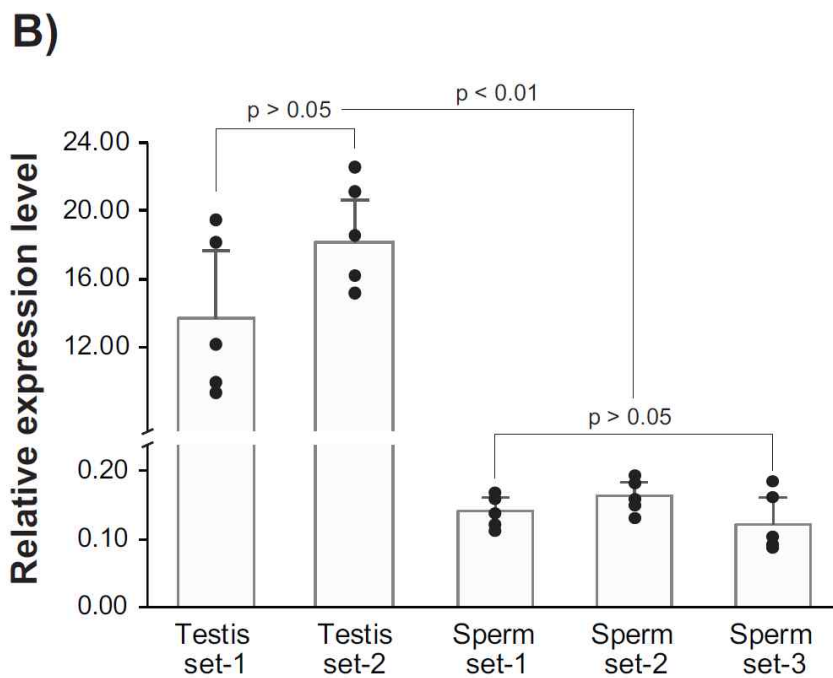
: 부화후 24개월 성장 2배체 및 3배체 전복 성체의 조직별 차등발현전사체 (differentially expressed genes, DEGs) 분석 결과 암컷 생식소에서 총 22,369 개의 차등발현전사체를 발굴하였으며, 12,881개의 전사체가 3배체 전복에서 상향 발현되었고 9,488개의 전사체가 하향발현되었다. 이 결과를 바탕으로 2배체 및 3배체 전복 암컷 생식소 발달 및 성숙 관련 유전자들을 선발하기 위한 기초 데이터로 활용하였다[그림 2-6-21].

: 전년도 2배체 및 3배체 전복 암컷 생식소 차등발현전사체 데이터와 기존에 보고된 연체동물을 비롯한 다른 동물종의 암컷 생식소 발달 및 성숙 연관 유전자들의 연구결과를 바탕으로 전복 암컷 생식소 발달 및 성숙에 핵심 역할을 하리라 기대되는 총 10개의 후보유전자들을 우선적으로 선발하였다[표 2-6-5].

○ 선발유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 특징

: 무척추동물의 FOXL2 유전자의 기능에 대해서는 현재까지 많은 연구가 진행되지 않았으나, FOXL2 유전자는 초기 암컷 생식소 분화 및 발달을 유도하는 가장 보존된 유전자로 인식되고 있다. FOXL2 단백질은 전사인자로 세포분화 및 증식과 연관된 보존된 DNA 결합 motif인 Forkhead (FH) box domain을 가진다. 전복 FOXL2유전자는 3개의 exon들과 두 개의 intron으로 구성된 tripartite 구조로 나타났다. 888bp의 ORF는 296개의 아미노산을 암호화하는 단백질로 96개의 아미노산잔기로 이루어진 보존된 FH 도메인을 가지고 있었다[그림 2-6-22].

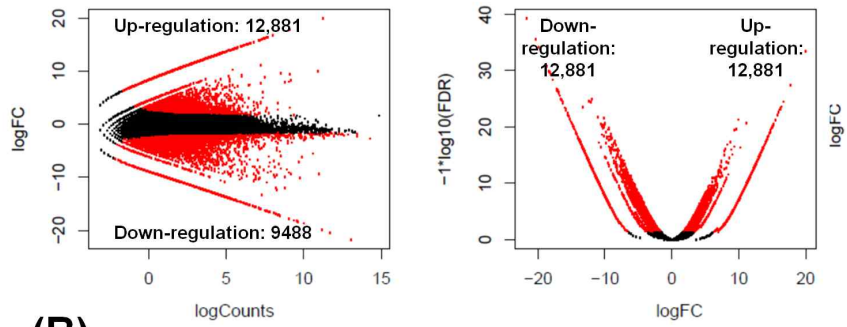
: DMRT1 유전자는 보존된 zinc finger-like DNA-binding 도메인인 DM 도메인 가진 전사인자 (transcript factor)을 암호화하며 척추동물의 DMRT1은 초기 성 결정 및 분화에 관련된 기능을 보고하고 있다. 전복 DMRT1 유전자는 5개의 exon들과 4개의 intron들로 구성되어 있었으며, 969bp ORF는 323 아미노산 단백질을 암호화하고 있었다. 전복 DMRT1단백질은 N말단 42개의 아미노산의 보존된 DM 도메인을 포함하고 있었다[그림 2-6-23].



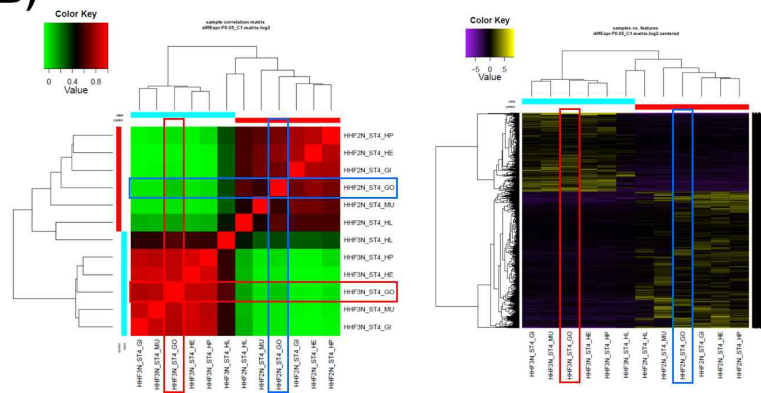
[그림 2-6-20]

전복 TSSK multigene family member 간 정소 내 상대발현 수준 비교(RT-qPCR).
SD, standard deviation; AVE, average. 막대그래프 위에 서로 다른 알파벳으로 통계적
유의차(ANOVA $p < 0.05$) 표시.

(A) Female gonad DEGs (2N vs. 3N)



(B)



[그림 2-6-21]

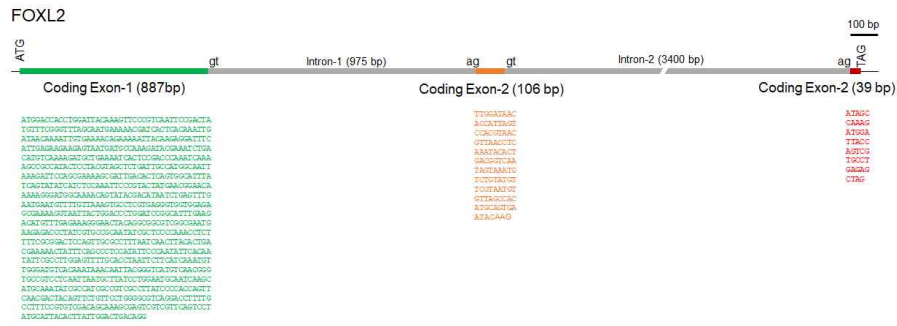
전년도 24개월 성숙 2배체 및 3배체 전복의 조직별 차등발현전사체 발굴 분석.

(A) 2배체 및 3배체 암컷 생식소의 차등발현전사체 발굴을 위한 volcano 및 MA plot, (B) 전사체 발현프로파일

[표 2-6-5] 암컷 생식소 성숙 및 발현 후보 유전자들 및 전년도 차등발현분석 결과

Candidate gene	Protein function	Role in reproduction	DEG
Forkhead Transcription factor (FOXL2)	Transcription factor	Female sex determination	3N Up
Doublesex and mab-3-related transcription factor (DMRT)	Transcription factor	Sex determination and differentiation	3N Up
Vitelline envelope zona pellucida domain protein 14 (VEZP14)	Egg coat protein	Sexual maturation and reproduction	3N down
Sperm-lysin (SL)	Acrosomal protein	Sexual maturation and reproduction	3N Up
Vitellogenin (VTG)	Vitellogenesis	Sexual maturation and yolk formation	3N down
β -catenin (CTNNB1)	Transcription factor	Female sex determination	ND*
Meiosis arrest female protein 1 (MARF1)	Oocyte development	Meiotic arrest	3N Up
Placenta-specific gene 8 (PLAC8)	unknown	Implantation and embryo development	3N Up
Dynein light chain 1 cytoplasmic (DYNLL1)	Enzyme	Intracellular transport and motility	3N Up
SCO-spondin (SSPO)	thrombospondin	Neuronal development	3N Up

*ND, not determined.



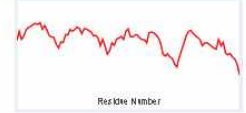
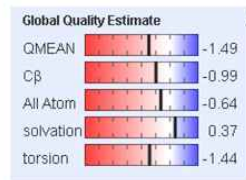
FOXL2(296 aa)

(96 conserved domains)

MDHLDYKVPVNSDYVSLAMKNDHSQJDNKIVKTEKLPEDFIEKKSNDAKDTSKMSKDAENHSDPNQKPPYSYVALUAMAIKDSSEKRLTSLGIYQ
 YIISKFPYERNKKGWQNSIRHNLSLNECFVKVPREGGGERKGNWYTLDPAFEDMFEKGNRYRRRRMKRPPYRAAISLPKPLFADSSCAFNQLTLTKN
 YFSPSPQYSQSPWFSFAPNSSSNVGMSCQINNYGSCQRVPSSINAYPGMQSSMQJSPSPYPHQFNDSYVPGASGPFAPCRQQSESSFSPMHY
 TYWTRD



Template name-6AKP.1.C



E-value :1.98e-59

Search sets: Specify sets Super Families

FFH super Family 512

1. List of domain hits

Name	Accession	Description	Interval	E-value
1	CG00229 super family	CG00229	69-214	2.53e-26
2	Transcription factor of the Forkhead/3 family (Transcription)			

domain

Biological Process

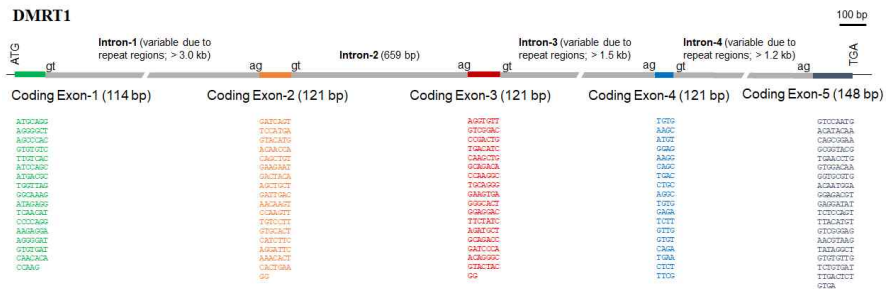
- regulation of transcription, DNA-templated (GO:0006355) ⚡

Molecular Function

- sequence-specific DNA binding (GO:0043565) ⚡
- DNA-binding transcription factor activity (GO:0003700) ⚡

[그림 2-6-22]

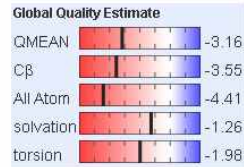
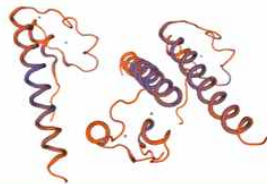
FOXL2유전자의 염기 및 아미노산 서열 특징



DMRT1-like – (323 aa)

(42 conserved domain)

MAEEFTSTKAKKDTQLRSCARCRNHAVISPLKGHKRFLFANCGCSSCLSAQRQKVSREQIALRRRQVQDEEAGRSI
 PYPPEVLTGRGHSSLAGANLQSLRQFPNIVSGLNAVLTEGSLRQTIMRLQKEETRGDGTDWAATS GPTTSTSTTT
 MTSTAEALGLRQGS HRSFKAEPFFPSEFYPSGYYPQSSAYTPLYGTLPPYTRSTPSVAAAYKSYHAAESPYQAPPFLTPP
 PPTTSPYSYQLMGSMGLTDGPTSPADVPSREFRKS LAKYCGGGEQGEANPPPETTPVSVFSPSTTPTGMSSDEEAALLI
 DCCND



Protein Classification

DM domain-containing protein (domain architecture ID: 10465229)
 DM domain-containing protein

Graphical summary Zoom to residue level [Show extra options](#)

Query seq.

Specific hits **DM**

Superfamilies **DM superfamily**

List of domain hits

Name	Accession	Description	Interval	E-value
DM	pfam03751	DM DNA-binding domain; The DM domain is named after <i>dax</i> and <i>mat-3</i> . <i>dax</i> contains a single ...	20-63	2.62e-19

GO terms

Biological Process	Molecular Function
<ul style="list-style-type: none"> regulation of transcription, DNA-templated (GO:0006355) ? 	<ul style="list-style-type: none"> sequence-specific DNA binding (GO:0043665) ? DNA-binding transcription factor activity (GO:0003700) ?

E-value-6e-30

[그림 2-6-23]
 DMRT1 유전자의 염기 및 아미노산 서열 특징

- : VEZP14 유전자는 ZP도메인을 가진 egg coat 단백질을 암호화하는 유전자로 현재까지 전복에서 총 30개의 (VEZP2-30 및 VERL) ZP도메인을 egg coat 단백질이 알려져 있다. 전복 VEZP14는 두 개의 exon들 (exon-1: 3446bp 및 exon-2: 199bp)로 구성된 유전자로 1968bp의 ORF는 656개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 265개 아미노산으로 구성된 ZP도메인을 나타내었다[그림 2-6-24].
- : 전복 SL유전자는 16 kDa의 acrosomal 단백질로 egg VE에 대한 비효소적, 종 특이적 용해활성을 가지고 있으며 숫컷 생식소에서 주된 발현이 이루어짐이 보고되고 있다. 하지만 전년도 NGS분석에서 암컷 생식소의 차등발현분석에서 2배체 보다 3배체에서 상향발현되는 현상이 관찰되었다. 따라서 SL유전자가 3배체 암컷 생식소의 성숙 및 발달지연효과 또는 억제효과가 예상된다. 전복 SL mRNA 염기서열 (NCBI accession No. M98875.1)은 총 645bp의 길이로 48bp의 5'-UTR, 종결코돈 TGA를 포함하는 467bp의 ORF, 및 poly(A) tail을 포함하는 143bp의 3'-UTR로 구성되어 있었다. ORF는 154개의 아미노산으로 구성된 단백질 (NCBI accession No. AAA91565)을 코딩하며, N말단의 signal peptide (18아미노산 잔기)와 mature peptide로 구성되어 있었다.
- : VTG단백질은 주된 egg yolk 단백질이며 oocyte 성숙 및 발달 관여하는 주요한 인자이다. VTG유전자는 주로 간에서 발현되지만, 일부 동물종에서는 생식소에서도 역시 VTG의 발현이 관찰됨이 보고되었다. 전년도 2배체 및 3배체 암컷 생식소의 차등발현 NGS분석 결과 3배체 전복 암컷의 생식소에서 하향발현 조절이 관찰되었으며 이러한 결과는 전복 생식소에서도 일부 VTG의 발현이 일어나며 3배체 전복에서 VTG의 발현억제는 생식소 성숙 및 발달 지연을 초래할 수 있음을 나타낸다. 따라서 VTG유전자를 암컷 생식소 성숙 마커로 선발하였다. 전복 VTG mRNA 염기서열 (NCBI accession No. AB360714.1)은 총 7753bp의 길이로 34bp의 3'-UTR, 종결코돈 TGA를 포함하는 7,176bp의 ORF 및 poly(A) tail을 포함하는 543bp의 5'-UTR로 구성되어 있었다. ORF는 2,391개의 아미노산으로 구성된 단백질 (NCBI accession No. BAF98238.1)을 코딩하며, N말단 27-677잔기는 lipoprotein amino terminal region을 C말단 2102-2266잔기는 von willebrand factor (vWF) type D 도메인을 포함하였다.

- : 동물의 생식소는 스테로이드 호르몬의 변화에 역동적으로 반응하며 이들 스테로이드 호르몬들은 Wnt/ β -catenin signaling pathway에 의해 조절된다. β -catenin은 canonical WNT signaling mediator로 척추동물의 ovarian development에 관여하리라 추측하고 있으나, 무척추동물의 β -catenin의 생식소 성숙 및 발달에 대한 연구는 미진하다. 따라서 β -catenin유전자에 대한 전복 생식소 성숙 및 발달에 대한 발현특징은 2배체 및 3배체 전복의 생식소 성숙 및 발달을 이해하기 위한 기본 자료가 될 수 있을 뿐만 아니라 무척추동물의 생식소 성숙 및 발달과 연관된 β -catenin기능을 제시할 수 있는 좋은 정보라 판단된다. 전복 β -catenin유전자는 4개의 exon들로 이루어진 tetrapartite 구조를 나타냈으며, ORF는 2,490bp의 길이로 830개의 아미노산으로 이루어진 12개의 armadillo repeat domain들을 포함하는 단백질을 암호화하였다[그림 2-6-25].
- : MARF1 단백질은 포유류의 난발생에서 prophase I을 지나 감수분열은 유도하는데 필수적인 성숙 촉진인자를 활성화 하는 기능을 가진다고 보고되고 있다. 하지만 연체동물을 포함한 무척추동물의 MARF1 유전자의 생식소 성숙 및 발달에 관한 보고는 아직까지 전무하다. 전년도 NGS분석 결과에 의하면 MARF1 전사체는 3배체 전복에서 상향발현 조절됨이 나타났다. 따라서 전복 MARF1유전자의 2배체 및 3배체 발현특징 비교는 3배체 암컷 생식소 발달 및 성숙과정에 대한 중요한 정보를 제공하리라 판단된다. 전복 MARF1유전자의 exon-intron구조에 대해서는 현재 연구가 본 연구실에서 연구가 진행되고 있다. MARF1 mRNA의 ORF는 TGA종결코돈을 포함하는 4848bp 길이로 약 161 kDa의 단백질을 암호화하고 있었다[그림 2-6-26].
- : PLAC8 단백질의 기능에 대한 연구는 많이 보고되어 있지 않으나 사람의 배 발달 및 수정란의 착상에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. 전복 PLAC8 유전자의 mRNA는 363bp의 ORF는 121 아미노산 단백질을 암호화하고 있었다.
- : SSPO유전자는 4개의 exon들로 이루어져 있었으며, 4584 bp의 ORF는 1528개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 암호화하고 있었다. SSPO단백질은 8개의 thrombospondin type 1 repeat들과 두 개의 laminin G 도메인으로 구성되어 있었다[그림 2-6-27].

MARF1 Protein(1615 aa)

542 conserved domains

MGEDSPAIGVFWDIENCPVKWKSALSVVQRI RDRFFHGHEAEFMCVCDILKERKDIIEELNSAQVDIIHISASSKNAADDKIKQSLRRFADTHPPHTKVILISG
DVNFSMDLSDLRHRKNFHVLIHRAHSHPSLIACANEHFCFEELVEDVPCRSPTKTFEGLSEVEVRGFPSHMHTDKLRARLKKLSENCGRVTSITQDYALLKFS
HEVALRAQKRMDGEDVFGQKIIAQIPATSN TG DSTV GSPHTG YTKRSKLSMPGFGSPKHYNRHSSPSGDRRTFRNNSPYRGCVSAPVASGYTSSPEANNRPS
DVDADKQPDNYSTNGKRPSREMLMQQQRYQESQHLN GGCG GGG DAGDEMDGTGELDNHRYAQRVGHWSGD EKGKIQSYKR RHFSGSHSDEQTE NY
HYYSALSHNSFTY GSGSPIHNPQRVR HGS GPF GCRPKSVPYELDHPCGSSW PPPQDN EFFHRGSPNFRS YSPRRYNC MNSNQNNCN YQQNNYHNNFH N
NINSSNSFQPI MPGASPPGSP L TDGSSPQGMGPVELVVTN LDYNI SAK EWRKILFTTFH PHVKV LNV HVKTQLDN TCIGMIKVPTIEEARFAISQFHRKKIGYKR
IQVSLKTD DAHTASANI RAEAI AL LQE AKGNVLP LFKFIELFDKRY HRSISVS ELYKMRDTLDIREQGGAGRMVY LAPVLAKPPTP LEASDTEGEEVLEEPVCASH
CPEGSVFYAEAMNSMLPNVRIQLKTLAAQVHSM LQSHNGHMP LMSFPAC YAAEF SALVSVK EGVPLEHLJSCVPGIQVQVSR LGVKKVQW MENQPPQAI
EFGRSATASPLLSHLGQISREVTD LKHSAN CRMPVSKFIPAYH HFFGRQCRVADYGYTKLMELFEAIPYALQV LGTGDRKILTLSHR AQIRRFADLLK V LK
GQPAKQLAVEEPEAFEAVFGKAWDVTEYGVCI EDL LMEIPSTLLMTVEEGKSFISVPKRDQTS EEMERTKQF ALEVVDLLKHNPRC RMPFNKFI PAYHHF
GRQCRVADYGYFTKLTDLFEAVPQVV EEEEGDERLLR L TQPEMRKVLSEQITNLLKI QPGHG MVKDELLPAFT RQFSFNLHLQDFQVVS LDALLARLHII SIETY
NNVEYVLMKTTLEPLALRV LQLLMDQSSG CLPLVELCSWYK TTFSEEC DVQTIKEELVD FVHVSG DDDGSAVIRLTALQTLARDIRHMLMRHGRIPLHQFDK
IFFEVHGVEMKPALHGFDCHTHTLLQAI PHVSVR GKG NRK YVQLSPA KVPATLPASL K ASPARIFFGD HKALN AGK GESND SGVNDALDEELDRSHVDVLS
QPVPSAIPSELAPDLHAKDLIQLHSPQDQDILFLTD EER GQKTP LCLTPTSEL LQFAAQCLVIRPPEGAGSSRS TPAGDSQQGLARN SALT LAVTATEFGDH
DPSSNELLELLKGGWVKASPEQL EEVSRTF RVTAS GRESPADP ALRSHGHTPSIEPAEKLPNGEESKPSVSLATSIPMEVPASEGSGSINTTLKDASSFSSE
QNVAVDVSFDEMFKMSMPL ETSSTK SSTGSTDTDPVSSPRKSR SRMAARFV NPMHNSA



GO terms

Biological Process

- regulation of gene expression (GO:0010468)

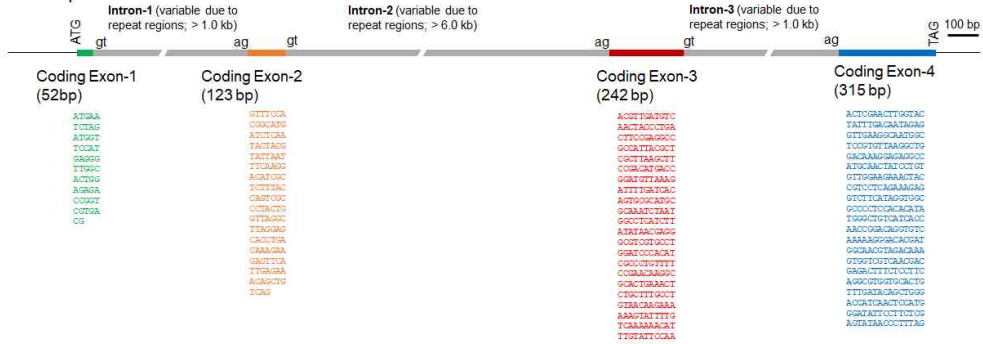
Molecular Function

- nucleic acid binding (GO:0003676)

[그림 2-6-26]

MARF1 단백질의 아미노산 서열 및 도메인 구조

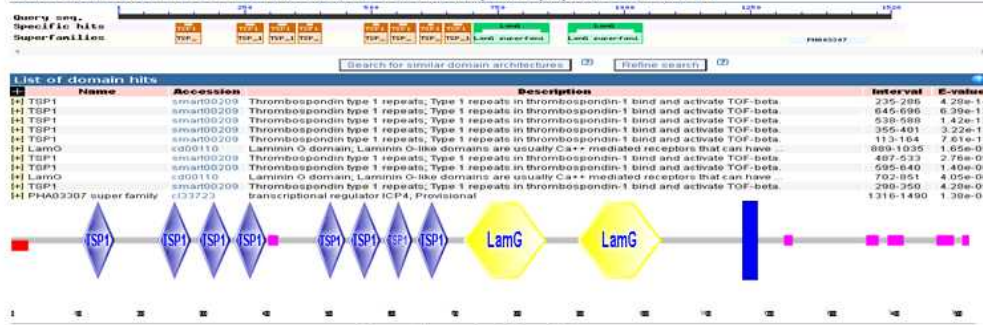
SCO-spondin like



SCO-spondin-like (1528 aa)-

(316 conserved domains)

MCYLLQLKAVHVLGVAIHLGLSQVCDAITQADKDALTHHMLDTLAVYHPSNKTSFIKLCRRHICSSKAFAPKPGYFQWREGTTKAEQDVF
 WQTYKCVLKTDLTCLPIDGQWSLWAEWSGCSAGCQGVGNRTRGRQCNNPLPSNHGLKCFGPFEKADCNGPCNNSAMATGLQEAGEHL
 KEVHKAIPLRIECMYGHCTYETLKKYLPISMRDKYWSNLICAKYKRACPDVGGWSAWGVWSECTVPCGNGYLYRHRTKNSPTPIINGGQAT
 PGPVYEKSCVGNKCNHIGKDEKAVFSEWSAFSPCSVSCGTYSQVTRRRSCLLKKLVRGETVDNLIISRPCQGACPKKGGWSEWETVC
 CSAVCGEGRKRLMCAADPPYSGGGGCLGPEVDTSDCNRQRARQNKSTPGAKPQPPAKSQKFGKNYRTSANFYPAGLSGPERITSRPPE
 FPDPRNQDLKVKPAWGDPPYQPYDRSRESLYQQWADWSSCSRSCGGYRKRDRGCEYTDASAKTCGGGHTKRVREWRGDGKKKEQEM
 KALCCGEIRIQFCNIAQCPEQGGWSNWMQWSTCDVTGCGPNRRRFRRCNPLPANGGPGCLGDYREVRTCRNAPQEPDDHWSRWST
 WSRCDCNLHACPVTKGWGAWGWAPCSKTCGIGHNFRDRTCTDPAPFNNGEICHGPGTESAYCYNRPCQGNEAAVKFNKNSYLTSYSPH
 AKPIRLLYLRKPLSPSGTLVYRHRGCMEGTFDCQHNLVLSLKNYRPFGLTIDGRDIDLAKTSVKASEWNDLLVYVSRVKSYYRVDNDEGHTT
 FIPDSPFLEEMNLDGSMRVGTGETGRDGFHGMISILRINFKDIALYQSPYWLGLGAPDKEEFIKQLSDVDVYNYPDFRGRHYARLFSRHDRLM
 KILITVRMRKSNGLIYNEGVVPGSHIALFSEQALKLFCACNKKKVFQCKTFVFQTRTWYLLTIEVEGNGSVLRLDKGEAMQLSCVGRNYRP
 QKEVFIGGAPPHIWAIVTNRGTVKKGHDGNVDKVVVNDETFSTRRGAFLDAGTINSMGYSFSTHVSNVVEHSTSKVTLRCDFTSFTTGDHD
 AKAQWLEDRLNNSHGVIHQRLPGLQNESSVTLMPESHKQGLYACVYNQDGRLLITHAFPITRSNESLVLNVTPWETHIIVLIVVIFIAAA
 LLVKDAIKMSTGPTDDKAQILEDIHNSLNKPLMEPTNMSVQIEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDE
 QQDVDATEQMHQLGSQVAARLIEENKDKVLELISSMVSLNPNRDSVSRSPMESSRQVTRDSFRRVPSVPQQGSSLYDVNYSARRNSSSK
 VQKRSSPSPTRRSPIGAMVDDDDQDMSPERRWSVSHRSSGSLSPSRASISPRRLSQSISPPKASAEVYNARPLDSPRHRGSPPLEYSDPM
 EFSDDPGLPLESGPPMEPELPHLSRPPGILGPTPPGFGGVRLPVMQSQRGSPPSPPEPPPH



E-value-1.99e-13

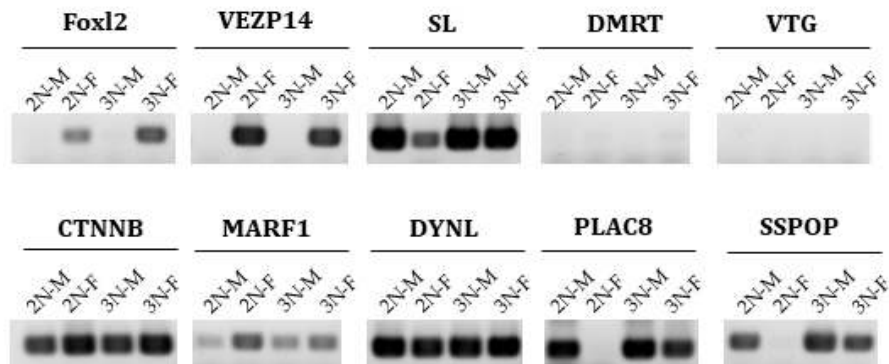
[그림 2-6-27]

SSPO유전자의 염기 및 아미노산 서열 특징

- End-point RT-PCR을 이용한 primer 증폭조건의 검정
 - : 선발된 암컷 생식소 발달 및 성숙 관련 유전자들의 RT-PCR을 위한 프라이머 정보는 [표 2-6-6]에 나타내었다.
 - : Primer 증폭조건의 검정은 4년 성숙 2배체 및 3배체 암컷 및 수컷을 사용하여 총 5개 조직(아가미, 장, 간췌장, 맨틀, 생식소)으로부터 추출한 total RNA를 cDNA로 합성하여 수행하였다. 합성된 cDNA는 2배체 및 3배체 암컷 및 수컷으로 나누어서 합하여 동일량의 cDNA를 사용하여 end-point RT-PCR을 수행하였다.
 - : 그 결과 FOXL2 및 VEZP14는 2배체 및 3배체 전복 암컷에서만 오로지 해당 크기의 DNA amplicon이 검출되었다. SL, CTNNB, MARF1, DYNL은 amplicon의 intensity의 차이가 있었으나 2배체 및 3배체 암컷과 수컷 모두에서 검출되었다. DMRT1과 VTG는 amplicon의 intensity가 2배체 및 3배체 암컷 및 수컷 모두에게 아주 약하거나 거의 검출되지 않았다. 한편 PLAC8과 SSPOP는 2배체 전복의 수컷 및 3배체 전복의 암컷과 수컷에서 검출되었다[그림 2-6-28].
 - : 암컷 생식소 발달 및 성숙의 발현특징을 조사하기위한 프라이머들의 조직별 검증은 FOXL2, SL, SSPOP유전자가 오로지 암컷 생식소에서만 발현이 나타났다[그림 2-6-29]. 이러한 결과는 2배체 및 3배체 전복 암컷 생식소 발달 및 성숙에 관련한 유전자 발현특징을 조사하기 위해 DMRT1 및 VTG를 제외한 나머지 선발된 유전자를 프라이머 디자인이 적절히 수행되었음을 제시한다. 또한 FOXL2, SL, SSOP유전자는 암컷 생식소 발달 및 성숙에 관련된 적절한 마커 유전자가 될 수 있으리라 판단된다. 현재 DMRT1 및 SSPOP의 프라이머 서열을 적절한 전사체 검출을 위해 조정 중에 있다.
- 암컷 2배체 및 3배체간 유전자 발현평가
 - : 암컷 생식소의 2배체 및 3배체간의 유전자 발현평가 역시 생식가능 연령이 도달한 2년산 및 4년산 전복을 사용하여 측정하였다. 발현평가에 사용한 유전자들은 FOXL2, VEZP14, SL, CTNNB, MARF1, DYNL, PLAC8 및 SSOP였다.
 - : VEZP14, CTNNB, MARF1유전자는 암컷 생식소에서 2배체에 비해 각각 1배 가량 하향발현을 나타내었다.
 - : 한편 SL 및 PLAC8유전자는 2배체에 비해 3배체 전복에서 각각 0.8배 3배 상향 조절을 나타내었다. 이러한 결과는 앞에서도 예측했듯이 SL 및 PLAC8유전자가 3배체의 생식소또는 난발달을 억제함으로 전체적으로 3배체 전복의 표현형질의 생식소 발달 지연 또는 억제가 나타나리라 예상한다.
 - : SSPOP유전자는 end-point PCR 결과와 달리 3배체 전복 생식소에서 월등한 발현을 나타냈었다. 따라서 3배체 생식소 발달 및 성숙에 관련되 SSPOP의 작용기작 규명은 흥미로울 것이다.

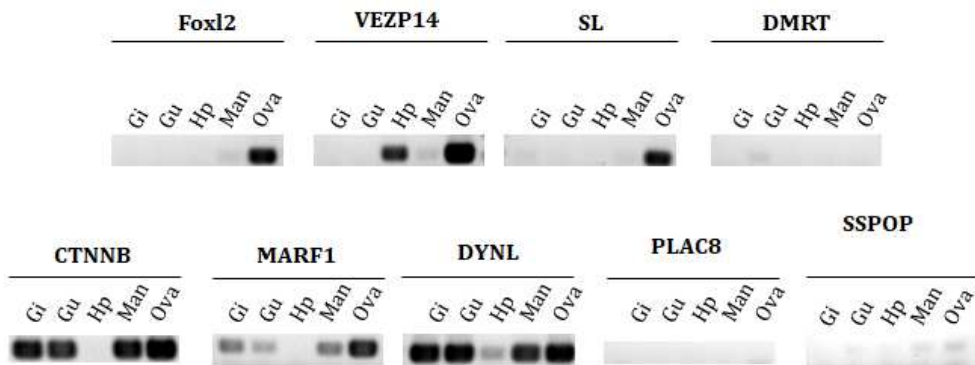
[표 2-6-6] 암컷 생식소 발달 및 성숙 관련 유전자들의 RT-PCR을 위한 프라이머 정보

Gene symbol	Gene Descriptions & Aliases	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
Foxl2	Forkhead box protein L2	Hdh-Foxl2-1F	CACCAGTTCAACGACTACAG	178
		Hdh-Foxl2-1R	AGACATTGGTGTGCCTGCAT	
VEZP14	Vitelline envelope zona pellucida domain protein14	Hdh-VEZP14-1F	TAAGAGATCAGCGGAGAGCT	204
		Hdh-VEZP14-1R	TGCCTCGAAATGGTCACTCT	
SL	Sperm-lysin	Hdh-SL-1F	AGGTGCCGAAATTGGAAGAC	176
		Hdh-SL-1R	GTGCATGCAGCTGTCTTCTT	
DMRT	Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1	Hdh-DMRT-1F	GGATGCATGGAACCAATCTC	190
		Hdh-DMRT-1R	TTGGAGTCTCTCGGTGAAGA	
VTG	Vitellogenin	Hdh-VTG-1F	TATTGGCTTCCACTGTGTGC	169
		Hdh-VTG-1R	GGTCTCGGATGGTTAACATC	
CTNNB	Beta-Catenin	Hdh-CTNNB-1F	ATGCAAGGCCTAGAAATCGG	181
		Hdh-CTNNB-1R	GAGTTCAAAAGGTCGGTATCG	
MARF1	Meiosis Regulator And MRNA Stability Factor 1 Meiosis arrest female protein 1 homolog Limkain B1	Hdh-MARF1-1F	CGATGTGTCCTTTGACGAGA	202
		Hdh-MARF1-1R	ACACTAGCCATGCTGTCCTA	
DYNL	Dynein light chain cytoplasmic	Hdh-DynL-1F	CGCTGCATACATCAAGAAGG	184
		Hdh-DynL-1R	GAACGTCCATAAGCTGTGCA	
PLAC8	Placenta-specific gene 8-like protein	Hdh-PLAC8-1F	TCCTATGTGTGTACCCAACG	170
		Hdh-PLAC8-1R	AGTTAATCTGCCATTCGCCG	
SSPOP	SCO-spondin-like protein	Hdh-SSPOP-1F	GTCCATATCTCCTCCCAAAG	197
		Hdh-SSPOP-1R	GAGGTCGACTCAATGGATGA	



[그림 2-6-28]

End-point RT-PCR을 이용한 2배체 및 3배체 전복에서의 primer 증폭조건의 검정



[그림 2-6-29]

End-point RT-PCR을 이용한 primer 조직별 증폭조건의 검정.

Gi, 아가미; Gu, 내장; Hp, 간췌장; Man, 멘틀; Ova, ovary

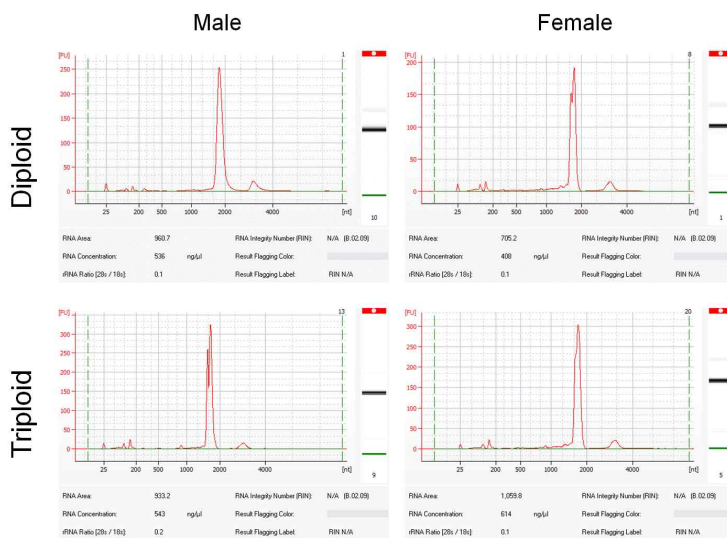
다. 배수체의 생식소 유전자발현 특징

(1) 암수 배수체 및 참조 대조군 이배체 시료 선발

- 암수 배수체 및 참조 대조군(이배체)에서 성숙관련 유전자의 발현특징을 확인하기 위해, 성숙관련 유전자 발현이 가장 크게 차이가 날 것이라고 예상되는 산란기 시즌(이배체 기준)에 동일 조건에서 사육된 이배체 및 삼배체 전복(4년산)을 샘플링하였다.
- 생식소의 외형적인 성숙도를 기준으로 개체를 선발하였으며, 이배체는 전형적인 성숙 생식소 외형을 보였지만 삼배체는 대부분의 개체가 상대적으로 성숙도가 낮았다.
- 이중 이배체의 경우 암수 모두 최대 성숙이 이루어졌다고 판단되는 개체를 선발하였으며, 삼배체의 경우 부분성숙 기작 규명을 해석하기 위해 이배체의 성숙도에 최대한으로 근접한 성숙도를 보이는 개체가 포함되도록 하였다.

(2) NGS 분석 및 발현패턴 clustering 분석

- 선발된 암수 배수체 및 참조 대조군 이배체들로부터 total RNA 추출
 - : 선발된 개체로부터 해부학적 방법을 이용하여 간체장 오염 없이 생식소 조직을 획득한 후 RNA 추출 이전까지 -80°C에서 보관하였다.
 - : 해당 생식소 조직은 앞서 최적화된 HBP 프로토콜 방법에 의해 Trizol과 silica column을 조합한 방식으로 추출하였다.
 - : 각각의 선발된 암수 배수체 및 참조 대조군의 생식소로부터 추출된 RNA의 양적 질적 평가는 ND-2000 spectrophotometer 및 Bioanalyzer 2100 system으로 수행하여 고품질의 RNA를 NGS 분석 라이브러리 제작에 사용하였다[그림 2-6-30].



[그림 2-6-30]

배수체 및 참조 대조군 생식소로부터 추출한 total RNA의 Bioanalyzer 2100 system으로 분석한 Electropherogram과 겔 이미지 예시

○ 배수체 생식소 cDNA 라이브러리 제작 및 sequencing

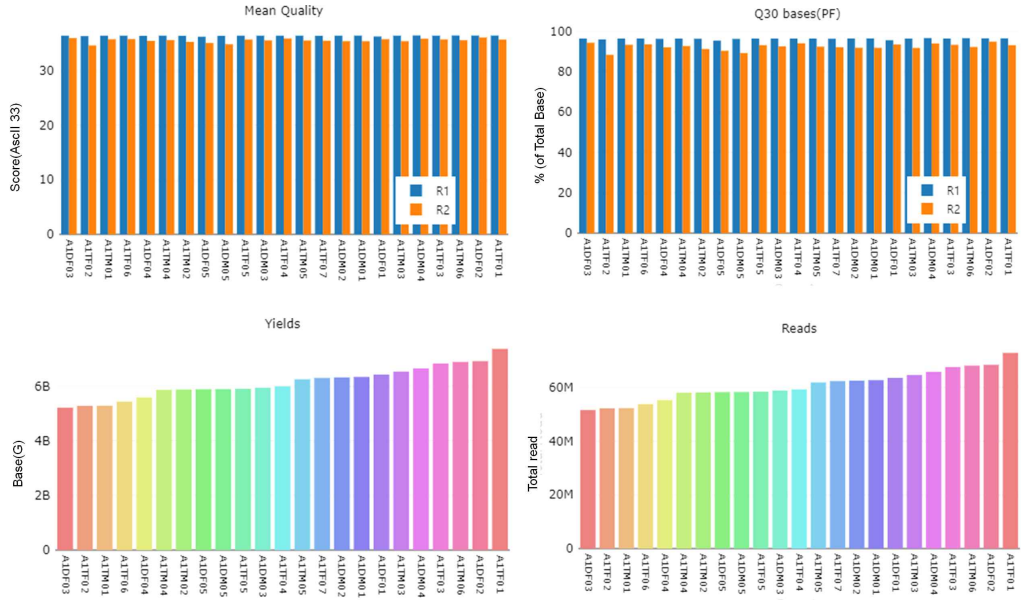
- : 배수체 생식소 NGS분석을 위한 cDNA 라이브러리는 “TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold kit”를 사용하여 total RNA속에 포함되어 있는 cytoplasmic rRNA와 mitochondrial rRNA를 제거한 후 cDNA 라이브러리를 illumina 라이브러리 프로토콜에 따라 제작하였다. cDNA library 제작을 위한 first cDNA strand는 random primer를 사용하여 합성하였다.
- : 제작된 시료들에 대한 전사체분석은 Illumina Novaseq6000 플랫폼을 사용하여 2×100 bp paired-end sequencing을 수행하였다.
- : Sequencing 후 얻어진 raw reads들의 결과는 [표 2-6-7] 및 [그림 2-6-31]에 나타내었다. 얻어진 raw read들은 Phred quality score (Q)값이 모두 30이상 (99.9% 정확도)의 나타내었다.

○ 배수체 및 참조 대조군의 발현 clustering

- : 배수체 및 참조 대조군의 발현 clustering을 위해 얻어진 raw read들을 본 연구를 통해 기 확보한 전복의 참조전장전사체 및 국립수산과학원의 전장유전체에 매핑을 수행하였다. 수행결과 모든 선발 시료의 라이브러리의 매핑율은 60.86% ~73.23% 범위를 나타내었다.
- : 매핑을 통한 선발된 배수체 각각의 개체와 참조 대조군 이배체 각각의 개체에 대한 발현량을 주성분분석(Principle component analysis)를 실시하여 개체별로 생식소 발달에 따른 clustering을 수행하였다[그림 2-6-32].
- : PCA분석을 통한 배수체 및 참조 대조군 이배체의 전사체 발현 clustering은 암컷 배수체와 암컷 참조 대조군 이배체가 서로 다른 그룹을 나타내어 배수체와 이배체간의 생식소 성숙에 연관된 전사체 발현의 차이가 있음을 나타낸다.
- : 하지만 암컷 참조 대조군 이배체들이 서로가 밀접한 cluster를 이루고 있는 반면, 암컷 배수체의 그룹은 더욱 광범위한 cluster를 이루므로써 암컷 배수체의 생식소 관련 전사체들의 발현이 참조 대조군 이배체의 전사체 발현에 비해 일양하지 않음을 나타내고 있다. 이러한 결과는 암컷 배수체의 생식소 성숙의 정도가 개체마다 많은 변이가 있음을 암시한다.
- : 또한 배수체 A1TF07과 A1TF06은 참조 대조군 이배체와의 주성분(PC1)의 variation이 많이 차이가 나지 않는 것으로 미루어 보아 아마도 배수체 A1TF07과 A1TF06의 생식소 성숙정도가 이배체의 생식소 성숙 정도에 가장 근접한 배수체 일 것이다.

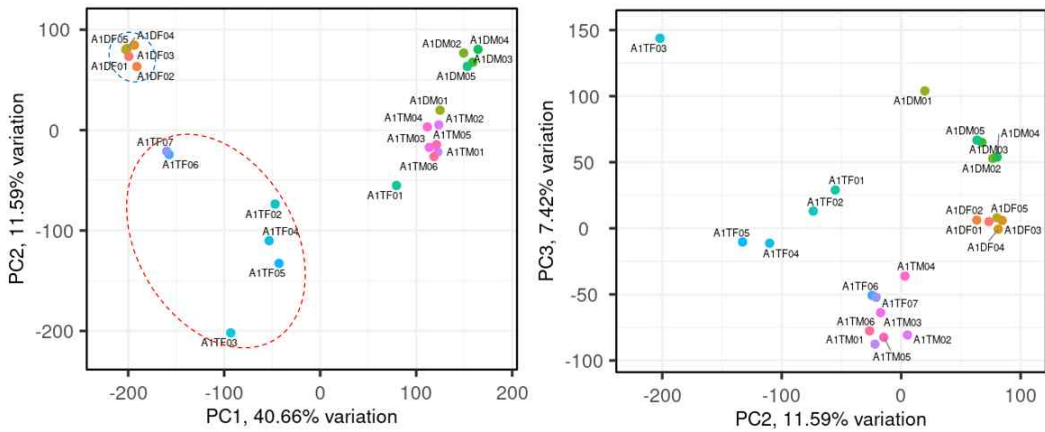
[표 2-6-7] 배수체 및 참조 대조군 생식소 전사체 sequencing 결과

	Sample_ID	Read Order	Yield(Bases)	Reads	% of >= Q30 Bases(PF)	Mean Quality Score(PF)
이배체 암컷	A1DF01	R1	3,209,131,681	31,773,581	95.55	36.27
		R2	3,209,131,681	31,773,581	93.41	35.77
	A1DF02	R1	3,455,684,397	34,214,697	96.46	36.44
		R2	3,455,684,397	34,214,697	94.81	36.09
	A1DF03	R1	2,605,039,470	25,792,470	96.35	36.42
		R2	2,605,039,470	25,792,470	94.27	35.97
	A1DF04	R1	2,792,487,390	27,648,390	96.22	36.39
		R2	2,792,487,390	27,648,390	92.04	35.47
	A1DF05	R1	2,941,609,042	29,124,842	95.32	36.23
		R2	2,941,609,042	29,124,842	90.29	35.07
이배체 수컷	A1DM01	R1	3,166,343,132	31,349,932	96.42	36.43
		R2	3,166,343,132	31,349,932	91.77	35.4
	A1DM02	R1	3,157,907,309	31,266,409	96.39	36.42
		R2	3,157,907,309	31,266,409	91.8	35.41
	A1DM03	R1	2,969,988,931	29,405,831	96.35	36.42
		R2	2,969,988,931	29,405,831	92.48	35.55
	A1DM04	R1	3,322,785,466	32,898,866	96.6	36.46
		R2	3,322,785,466	32,898,866	93.9	35.87
	A1DM05	R1	2,943,742,162	29,145,962	96.19	36.39
		R2	2,943,742,162	29,145,962	89.18	34.84
배수체 암컷	A1TF01	R1	3,678,974,490	36,425,490	96.45	36.44
		R2	3,678,974,490	36,425,490	93.09	35.71
	A1TF02	R1	2,636,796,092	26,106,892	95.93	36.34
		R2	2,636,796,092	26,106,892	88.31	34.63
	A1TF03	R1	3,411,979,879	33,781,979	96.37	36.42
		R2	3,411,979,879	33,781,979	93.25	35.73
	A1TF04	R1	2,993,657,170	29,640,170	96.36	36.42
		R2	2,993,657,170	29,640,170	94.01	35.9
	A1TF05	R1	2,949,438,562	29,202,362	96.35	36.42
		R2	2,949,438,562	29,202,362	93.09	35.71
	A1TF06	R1	2,716,094,121	26,892,021	96.39	36.42
		R2	2,716,094,121	26,892,021	93.5	35.79
	A1TF07	R1	3,147,897,502	31,167,302	96.26	36.4
		R2	3,147,897,502	31,167,302	92.06	35.49
배수체 수컷	A1TM01	R1	2,640,731,557	26,145,857	96.35	36.42
		R2	2,640,731,557	26,145,857	93.28	35.76
	A1TM02	R1	2,936,988,090	29,079,090	96.26	36.4
		R2	2,936,988,090	29,079,090	91.19	35.27
	A1TM03	R1	3,262,929,735	32,306,235	96.34	36.42
		R2	3,262,929,735	32,306,235	91.72	35.4
	A1TM04	R1	2,930,402,789	29,013,889	96.34	36.42
		R2	2,930,402,789	29,013,889	92.66	35.6
	A1TM05	R1	3,123,649,422	30,927,222	96.36	36.42
		R2	3,123,649,422	30,927,222	92.34	35.53
	A1TM06	R1	3,440,232,104	34,061,704	96.55	36.45
		R2	3,440,232,104	34,061,704	92.2	35.59



[그림 2-6-31]

배수체 및 참조 대조군 생식소 Illumina Novaseq6000 sequencing 결과 요약



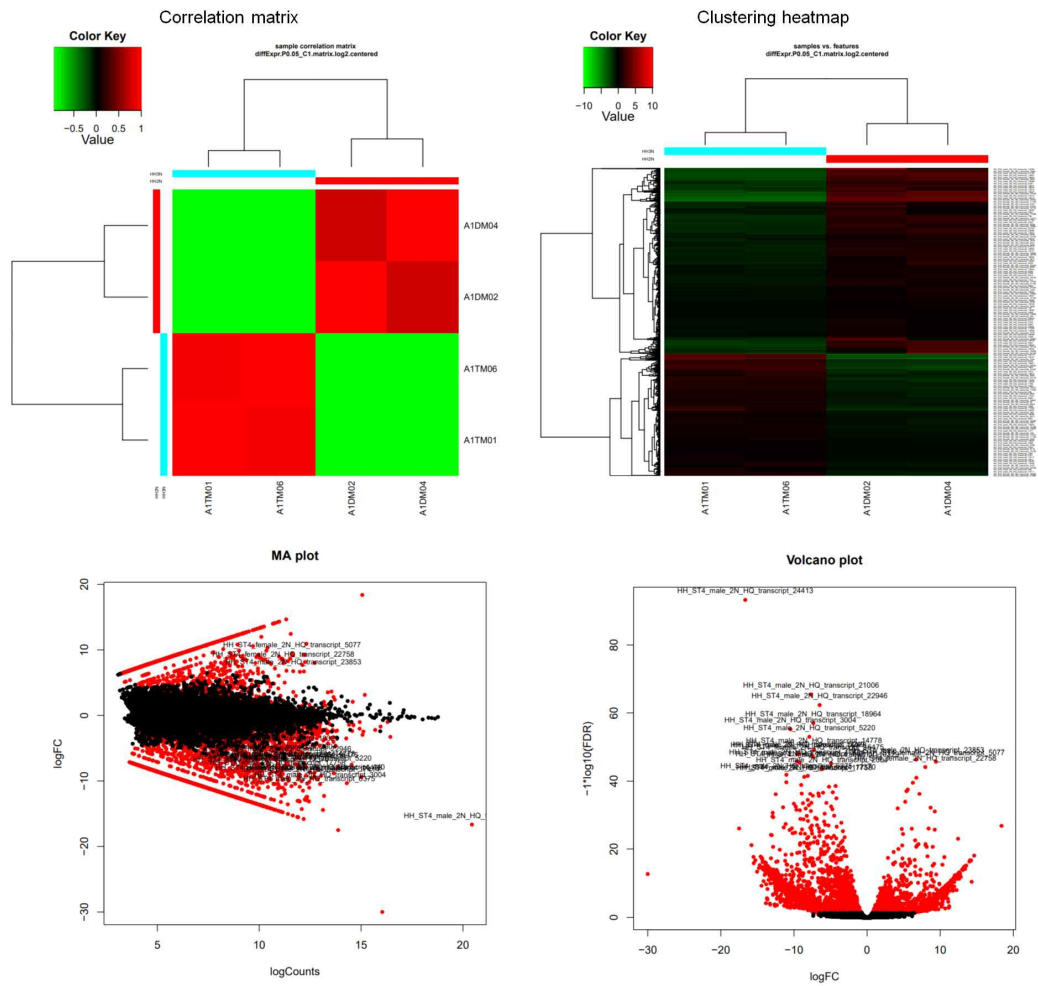
[그림 2-6-32]

생식소 전사체 발현에 따른 배수체 및 참조 대조군의 개체별 clustering

- : 수컷의 경우 배수체와 이배체의 주성분 variation이 거의 차이가 없거나 약간 차이가 나타났다. 이러한 결과는 2단계 연구결과 중 육안검사를 기준 시 생식소 성숙 정도가 배수체 암컷보다 수컷에서 더욱 관찰되는 결과와 일관된다.
- : PCA분석을 통해 주성분 variation 가장 큰 차이를 나타내는 암컷 배수체 A1TF02, 04, 05와 참조 대조군 이배체 A1DF01, 03, 04, 05 개체의 생식소 차등발현 유전자를 동정하고 분석하고자 하였다. 또한 수컷의 경우는 배수체 A1TM01, 06과 참조 대조군 A1DM02, 04를 선발하여 수컷생식소의 불임·부분성숙 기전을 해석할 수 있는 차등발현 유전자를 동정하여 분석하고자 하였다.

(3) 차등발현 유전자 동정 및 분석

- 선발된 암수 배수체 및 참조 대조군 라이브러리의 전사체 발현량은 Kallisto 프로그램을 사용하여 계산하였으며, TMM(Trimmed mean normalization of M-values)의 값으로 normalized 발현값을 측정하였다.
- 차등발현유전자 분석은 edgeR을 사용하여 Log2(Fold change)값을 구하였으며, 기준값은 FDR(False discovery rate) 0.05이하 설정하여 차등발현 유전자를 동정하였다.
- 수컷 참조 대조군 이배체와 배수체 생식소 성숙 연과 차등발현 전사체
 - : 발현량의 hierarchical clustering 결과 이배체와 배수체 전복이 각각 하나의 그룹으로 clustering 됨을 확인하였다[그림 2-6-33].
 - : $|\log_2FC| > 1$ 와 $FDR < 0.05$ 의 값을 기준안에서 총 1,437개의 전사체가 3배체 전복 생식소에서 상향 발현 조절되었으며 2,179개의 전사체가 하향발현 조절되었다 [그림 2-6-33].
 - : 수컷 배수체의 생식소 성숙 연관 상위 상향 또는 하향 차등발현전사체를 [표 2-6-8]과 [표2-6-9]에 나타내었다.
 - : 수컷 배수체의 생식소 성숙 연관 상위 상향 차등발현전사체는 actin, HSP90, NADH dehydrogenase subunit 5, Exprolin-1등이 있었다. 이러한 유전자들은 아마도 생식소 성숙에 필요한 에너지를 근육 성장이나 발달에 재분배에 관여하리라 생각된다.



[그림 2-6-33]

수컷 배수체 및 이배체 생식소 성숙 연관 차등발현 전사체의 동정

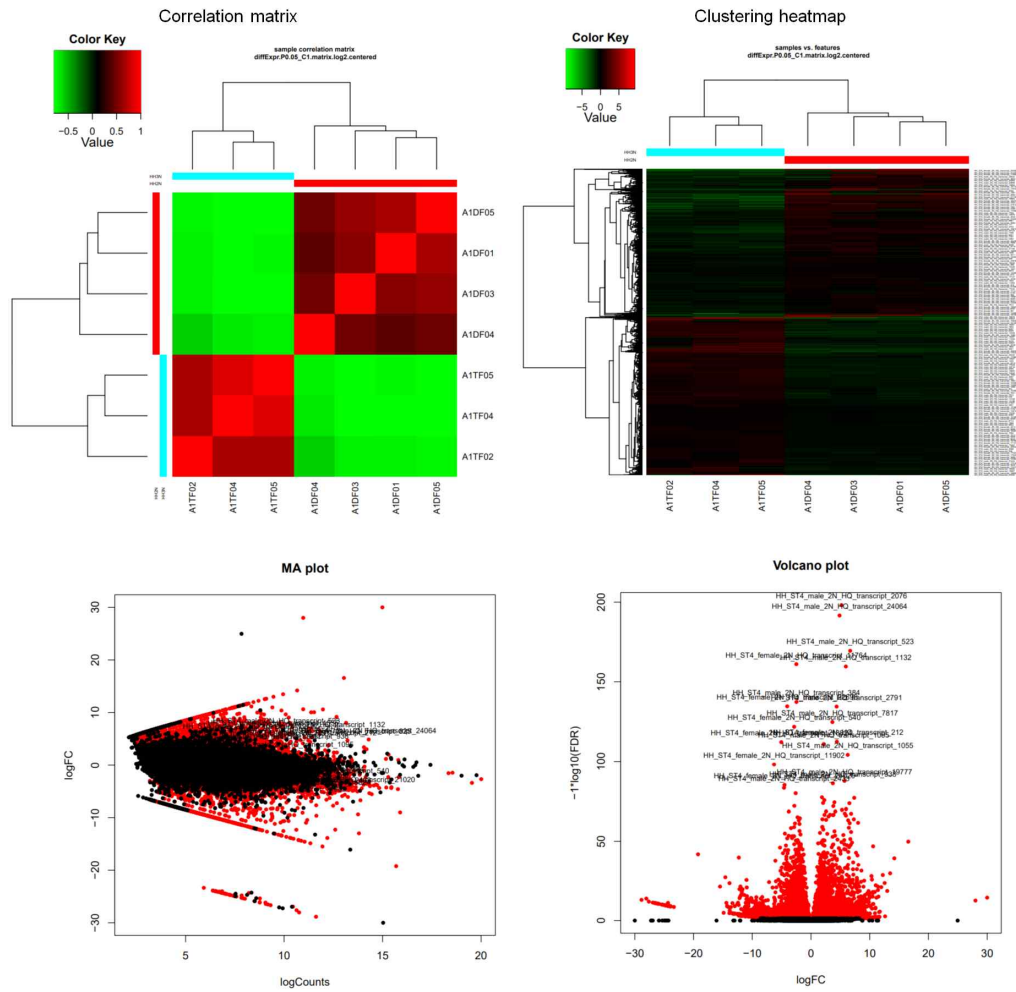
[표 2-6-8] 수컷 배수체 전복 생식소 성숙관련 상향발현 차등전사체

Gene	생식소 발현양 (TMM)		LogFC	FDR
	이배체	배수체		
actin [<i>Haliotis discus hannai</i>]	0	3000.487	13.83	2.86E-18
PREDICTED: tribbles homolog 2-like [<i>Crassostrea gigas</i>]	0	2350.903	13.48	3.53E-15
heat shock protein 90 [<i>Haliotis discus hannai</i>]	0	2211.312	13.39	2.7E-18
hypothetical protein LOTGIDRAFT_189988 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	1926.148	13.19	1.03E-16
hypothetical protein LOTGIDRAFT_228225 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	1856.609	13.14	1.35E-17
hypothetical protein LOTGIDRAFT_196362 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	1657.938	12.97	1.03E-14
hypothetical protein LOTGIDRAFT_108036 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	1201.671	12.51	6.34E-16
PREDICTED: calumenin-B-like [<i>Xiphophorus maculatus</i>]	0	1160.164	12.46	1.42E-15
NADH dehydrogenase subunit 5 [<i>Haliotis discus hannai</i>]	0	1116.552	12.40	1E-15
hypothetical protein LOTGIDRAFT_237453 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	1024.785	12.28	4.04E-15
PREDICTED: KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2-like isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	0	978.8462	12.21	3.72E-15
hypothetical protein LOTGIDRAFT_192316 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	776.3964	11.88	3.55E-14
PREDICTED: alpha-endosulfine-like [<i>Aplysia californica</i>]	0	772.3404	11.87	1.54E-13
Exportin-1 [<i>Crassostrea gigas</i>]	0	698.2927	11.73	6.94E-14
hypothetical protein LOTGIDRAFT_121003, partial [<i>Lottia gigantea</i>]	0	668.2987	11.66	0.0003
hypothetical protein CAPTEDRAFT_181658 [<i>Capitella teleta</i>]	0	657.4199	11.64	5.73E-13
cytochrome c oxidase subunit I [<i>Haliotis rubra</i>]	0	649.9972	11.62	0.014694
PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleo-protein 1-like [<i>Aplysia californica</i>]	0	629.8917	11.58	4.75E-13
hypothetical protein LOTGIDRAFT_207043 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	624.3713	11.57	1.36E-13
PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleo-protein 87F-like isoform X3 [<i>Aplysia californica</i>]	0	622.8014	11.56	2.26E-13

[표 2-6-9] 수컷 배수체 전복 생식소 성숙관련 하향발현 차등전사체

Gene	생식소 발현양 (TMM)		LogFC	FDR
	이배체	배수체		
toll-like receptor 4	2298340	18.02503	-16.99	2.4E-246
testis-specific serine/threonine-protein kinase 2	12699.44	0	-16.29	4.27E-25
PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 6-like [<i>Aplysia californica</i>]	5293.895	0	-15.02	4.24E-23
kyphoscoliosis peptidase,hillarlin-like	3594.501	0	-14.47	1.03E-18
putative adp,ATP carrier protein [<i>Schistosoma mansoni</i>]	3571.016	0	-14.46	0.00918
cytochrome c oxidase subunit I [<i>Haliotis tuberculata</i>]	3535.285	0	-14.44	8.55E-21
putative polyadenylate-binding protein 1, partial [<i>Haliotis diversicolor</i>]	3385.337	0	-14.38	6.46E-21
NADH dehydrogenase subunit 5 (mitochondrion) [<i>Haliotis discus hanna</i>]	3118.65	0	-14.26	9.09E-18
alpha-amylase	7804.663	0.376527	-14.15	6.2E-20
PREDICTED: uncharacterized protein LOC105334161 isoform X4 [<i>Crassostrea gigas</i>]	2691.376	0	-14.05	1.27E-18
PREDICTED: aconitate hydratase, mitochondrial-like [<i>Megachile rotundata</i>]	2573.993	0	-13.98	6.48E-20
testicular haploid expressed protein, partial [<i>Scrobicularia plana</i>]	2492.547	0	-13.94	1.53E-18
PREDICTED: uncharacterized protein C2orf50-like isoform X5 [<i>Crassostrea gigas</i>]	2121.892	0	-13.71	9.34E-18
PREDICTED: lamin-B receptor-like isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	1974.969	0	-13.60	7.87E-19
PREDICTED: translation elongation factor 2 [<i>Diaphorina citri</i>]	1942.356	0	-13.58	8.09E-19
PREDICTED: testicular haploid expressed gene protein-like [<i>Aplysia californica</i>]	1902.379	0	-13.55	1.04E-16
predicted protein, 14.protein STPG4-like isoform X2 [<i>Crassostrea virginica</i>]	1883.789	0	-13.53	7.13E-18
14-3-3 zeta [<i>Haliotis diversicolor</i>]	1875.724	0	-13.53	3.65E-18
PREDICTED: plastin-3-like [<i>Crassostrea gigas</i>]	1818.272	0	-13.48	1.51E-18
hypothetical protein CAPTEDRAFT_221963 [<i>Capitella teleta</i>]	1794.347	0	-13.46	2.27E-18
PREDICTED: KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2-like [<i>Crassostrea gigas</i>]	1786.359	0	-13.46	0.008545
PREDICTED: uncharacterized protein LOC105348654 isoform X3 [<i>Crassostrea gigas</i>]	1685.003	0	-13.37	2.78E-08
PREDICTED: YTH domain family protein 3-like [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>]	1646.59	0	-13.34	3.79E-18

- : 하향발현되는 차등발현유전자는 수컷 생식소 발현 마커로 선정된 TSSK2 및 testicular haploid expressed protein 등 알려진 생식소 성숙에 연관 유전자들이 나타났으며, 놀랍게도 가장 많은 하향발현을 나타낸 유전자는 Toll-like receptor 4로 annotation된 유전자가 동정되었다. 따라서 본 과제를 통해서 배수체 전복의 수컷 생식소 성숙 연관 유전자의 좀더 세밀한 분자생물학적 연구가 수반된다면 흥미로운 결과를 도출할 수 있으리라 판단된다.
 - : 하지만 동정된 수컷 생식소 성숙 연관 차등발현전사체들 중 많은 수가 annotation되지 않았을 뿐만 아니라, BLAT hit을 가지는 전사체들도 대부분이 hypothetical 혹은 predicted 단백질 유전자로 이러한 단백질을 연구한다면 앞으로 수컷 배수체 전복의 생식소 성숙 기작의 완전히 밝히는데 더욱 흥미로울 것이다.
- 암컷 참조 대조군 이배체와 배수체 생식소 성숙 연관 차등발현 전사체
- : 수컷 생식소 성숙 연관 전사체 발현량의 hierarchical clustering 결과와 마찬가지로 암컷 이배체와 배수체 전복이 각각 하나의 그룹으로 clustering 됨을 확인하였다[그림 2-6-34].
 - : $|\log_2FC| > 1$ 와 $FDR < 0.05$ 의 값을 기준안에서 총 4,229개의 전사체가 3배체 전복 생식소에서 상향 발현 조절되었으며 3,665개의 전사체가 하향발현 조절되었다[그림 2-6-33].
 - : 암컷 배수체 생식소 관련 차등발현전사체가 수컷과 비교하였을 때 유의미하게 많은 차등발현 전사체수를 나타낸 암컷 배수체의 불임·부분성숙에 관여하는 전사체의 분자경로가 훨씬 복잡하고 정교하게 조절될 수 있음을 나타낸다.
 - : 암컷 배수체의 생식소 성숙 연관 상위 상향 또는 하향 차등발현전사체를 [표 2-6-10]과 [표 2-6-11]에 나타내었다.
 - : 암컷 배수체의 생식소 성숙 연관 하향 차등발현전사체들중 Vitellin envelope zona pellucida domain protein 26, heat shock protein 70, β -caenin 등이 있었다. 특히 VEZP26은 zona pellucida domain을 공유하는 단백질로 전복의 egg의 수정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 본 연구의 암컷 생식소 유전자 마커의 하나로도 동정된바 있으며, 배수체 암컷 생식소 성숙 연관 차등발현 전사체들에서 많은 VEZP들이 하향발현되고 있다. 따라서 egg coat 단백질을 코딩하는 Zona pellucid domain을 공유하는 단백질이 암컷 생식소 성숙에 중요한 역할을 하리라 판단된다.



[그림 2-6-34]

암컷 배수체 및 이배체 생식소 성숙 연관 차등발현 전사체의 동정

[표 2-6-10] 암컷 배수체 전복 생식소 성숙관련 상향발현 차등전사체

Gene	생식소 발현양 (TMM)		LogFC	FDR
	이배체	배수체		
hypothetical protein EgrG_000335800 [<i>Echinococcus granulosus</i>]	0	184703.1	19.69	1.06E-26
hypothetical protein DAPPUDRAFT_72393, partial [<i>Daphnia pulex</i>]	0	4154.793	14.22	2.64E-19
PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1-like [<i>Aplysia californica</i>]	0	2900.096	13.70	2E-37
Csa-calmodulin 6, partial [<i>Cupiennius salei</i>]	0	2570.392	13.53	8.14E-37
PREDICTED: uncharacterized protein LOC101850683 [<i>Aplysia californica</i>]	0	2305.439	13.37	1.85E-26
PREDICTED: APOBEC1 complementation factor-like isoform X5 [<i>Crassostrea gigas</i>]	0	921.933	12.05	7.87E-29
alpha 1 type IV collagen [<i>Haliotis tuberculata</i>]	0	817.4886	11.87	0.003236
synaptonemal complex protein 3	0	658.8236	11.56	4.56E-24
PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L-like [<i>Crassostrea gigas</i>]	0	598.5285	11.42	5.45E-21
hypothetical protein LOTGIDRAFT_196362 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	588.29	11.40	0.004865
PREDICTED: uncharacterized protein LOC105347353 [<i>Crassostrea gigas</i>]	0	559.0484	11.33	1.42E-25
nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like	1.207105	2876.14	11.25	1.57E-50
galectin [<i>Haliotis rufescens</i>]	0	528.3151	11.24	0.005542
hypothetical protein LOTGIDRAFT_108853 [<i>Lottia gigantea</i>] >gi 556094111 gb ESO82764.1 hypothetical protein LOTGIDRAFT_108853 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	498.3609	11.16	7.98E-16
hypothetical protein LOTGIDRAFT_229075 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	487.5442	11.13	8.53E-22
Chain A, Crystal Structures Of Protein Kinase B Selective Inhibitors In Complex With Protein Kinase A And Mutants	0	444.2723	10.99	6.81E-25
NADH dehydrogenase subunit 5 [<i>Haliotis discus hannai</i>]	0	390.9779	10.81	0.007916
unknown [<i>Medicago truncatula</i>]	0	373.9039	10.74	7.52E-21
hypothetical protein LOTGIDRAFT_191852 [<i>Lottia gigantea</i>]	0	352.0138	10.66	0.00893

[표 2-6-11] 암컷 배수체 전복 생식소 성숙관련 하향발현 차등전사체

Gene	생식소 발현양 (TMM)		LogFC	FDR
	이배체	배수체		
hypothetical protein LOTGIDRAFT_201878 [<i>Lottia gigantea</i>]	6338.443	0	-29.17	3.68E-14
hypothetical protein LOTGIDRAFT_205205 [<i>Lottia gigantea</i>]	2880.68	0	-28.07	3.5E-13
PREDICTED: uncharacterized protein LOC101860495 [<i>Aplysia californica</i>]	2152.68	0	-27.67	7.82E-13
hypothetical protein LOTGIDRAFT_111948 [<i>Lottia gigantea</i>]	1482.725	0	-27.17	2.1E-12
vitelline envelope zona pellucida domain protein 26 [<i>Haliotis rufescens</i>]	1278.762	0	-26.97	3.1E-12
PREDICTED: phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial-like [<i>Aplysia californica</i>]	1198.594	0	-26.88	3.69E-12
zona pellucida domain protein D [<i>Haliotis rufescens</i>]	1130.8	0	-26.80	4.29E-12
hypothetical protein LOTGIDRAFT_184615 [<i>Lottia gigantea</i>]	945.4968	0	-26.55	6.83E-12
hypothetical protein LOTGIDRAFT_233029 [<i>Lottia gigantea</i>]	900.0455	0	-26.25	1.21E-11
heat shock protein 70 [<i>Tegillarca granosa</i>]	1424.423	0	-26.20	1.32E-11
PREDICTED: phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial-like [<i>Aplysia californica</i>]	729.7165	0	-26.20	1.33E-11
NADH dehydrogenase subunit 4 (mitochondrion) [<i>Lunella aff. cinerea</i> STW-2013]	814.2373	0	-26.03	1.82E-11
hypothetical protein LOTGIDRAFT_115464 [<i>Lottia gigantea</i>]	534.6107	0	-25.77	2.93E-11
hypothetical protein LOTGIDRAFT_110000 [<i>Lottia gigantea</i>]	526.8754	0	-25.75	3.05E-11
hypothetical protein LOTGIDRAFT_138283 [<i>Lottia gigantea</i>]	517.8217	0	-25.73	3.19E-11
PREDICTED: delta(14)-sterol reductase-like [<i>Crassostrea gigas</i>]	488.0655	0	-25.64	3.78E-11
hypothetical protein LOTGIDRAFT_188306 [<i>Lottia gigantea</i>]	450.9929	0	-25.53	4.57E-11
hypothetical protein LOTGIDRAFT_177209 [<i>Lottia gigantea</i>]	410.9986	0	-25.41	5.75E-11
PREDICTED: RNA-binding protein 39-like isoform X2 [<i>Crassostrea gigas</i>]	376.1359	0	-25.30	7.05E-11
PREDICTED: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4-like [<i>Aplysia californica</i>]	344.2431	0	-25.16	8.94E-11
beta-catenin [<i>Azumapecten farreri</i>]	337.1123	0	-25.15	9.25E-11
hypothetical protein LOTGIDRAFT_211278 [<i>Lottia gigantea</i>]	287.367	0	-24.92	1.39E-10

(4) TSSK member들의 수컷 배수체 생식소 내 발현 특징

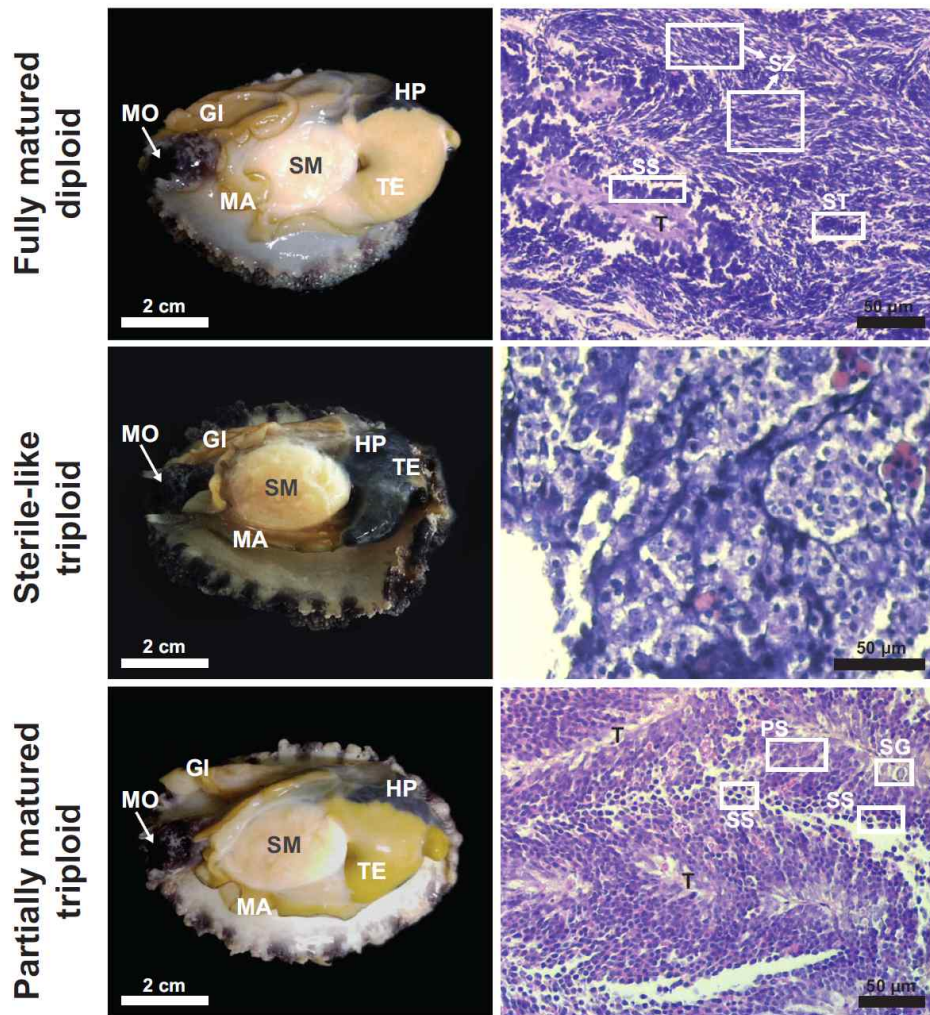
○ 목적 및 범위

: 앞서 배수체와 이배체 간 유전자 NGS 기반 발현 결과를 볼 때, 암컷의 경우 이배체와 배수체 난소 내 차등발현유전자(differentially expressed genes)의 수가 매우 많고, 발현패턴의 특징적 구분이 배수성에 따라서 선명하며, 차등 발현량 역시 배수체와 이배체 간 큰 차이를 나타낸다. 반면 수컷(정소 발현)의 경우, 배수체와 이배체 간 차이는 있지만, 암컷과 비교하면 그 정도(차등발현유전자 수와 발현량의 차이 등)가 유의적으로 약하거나 축소된 경향을 보임을 알 수 있다. 이러한 특징은 생식소의 외관적 표현형 발달과도 밀접하여 수컷의 경우 부분성숙 정소를 표현하는 일부 배수체들의 경우 이배체와 비교할 만큼의 외관적 정소 발달이 가능하였다. 그럼에도 불구하고, 현재까지 배수체 수컷(부분성숙 배수체 수컷)에서도 이배체와 유사한 방정 및 최종 배우자 생성은 관찰할 수 없기에, 수컷의 최종 생식에 관한 추가 분석을 유전자발현 수준에서 수행하고자 하였고, 그 대상 유전자 마커로서 전복 정소(정자) 최종 성숙에 핵심 기능을 담당한다고 본 연구에서 규명한 바 있는 TSSK 유전자 마커들을 이용하고자 하였다. 이를 위해 보유하고 있는 배수체 수컷 2년산 및 4년산을 대상으로 TSSK 발현 마커 member들의 발현을 같은 연령의 이배체 수컷들과 정량비교(qPCR)하여 배수체 수컷의 최종성숙 장애(지연)에 대한 해석을 수행하고자 하였다.

○ 2년산 배수체 수컷 생식소에서의 TSSK1-like (human TSSK1-ortholog)의 발현

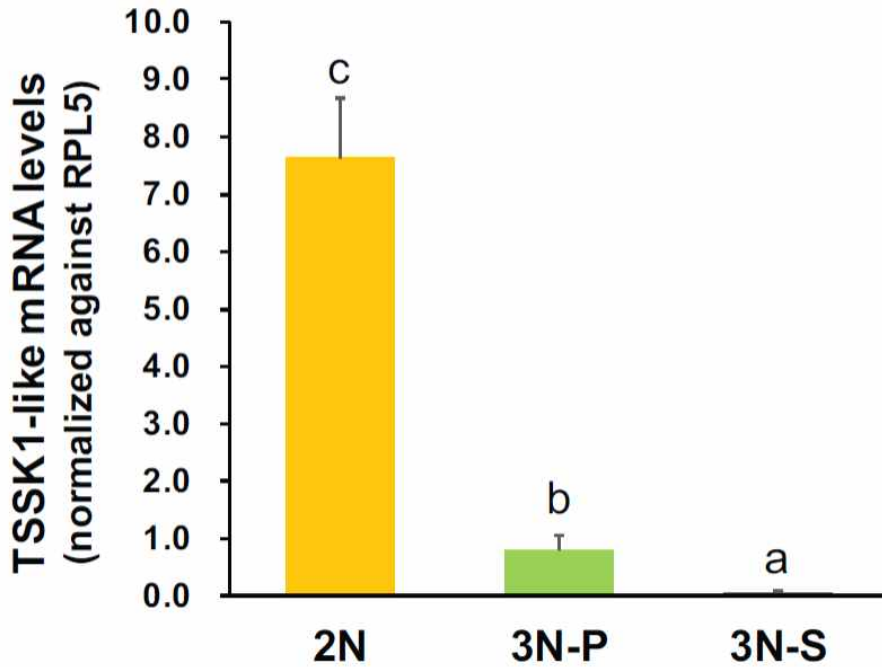
: 상기 세종류의 특징적인 정소 발달 단계를 보이는 표현형 그룹을 대상으로[즉 불임성 배수체 - 감수분열이 거의 진행되지 않은 정소; 부분성숙 배수체 - 감수분열이 개시되었으나 spermatid로의 진행이 되지 않은 정소; 성숙 이배체 - 감수분열과 spermiogenesis가 완료되어 성숙 정자를 포함하는 정소] TSSK1-like 유전자발현을 RT-qPCR로 분석하였다[그림 2-6-35].

: 불임성 배수체 수컷은 TSSK1-like mRNA의 수준이 매우 낮거나 발현 검출이 쉽지 않은 개체들이 대부분으로 나타났다. 반면 부분성숙 배수체들은 불임성 배수체들보다 유의적으로 높은 발현을 보였다. 하지만 그 역시 이배체 성숙 정소의 발현 수준과 비교 시 7-8배의 낮은 발현 수준을 보여 큰 차이를 나타내었다[그림 2-6-36].



[그림 2-6-35]

전복 배수체 수컷(2년산)의 서로 다른 외형적 정소 형질
(sterile-like and partially mature triploid)



[그림 2-6-36]

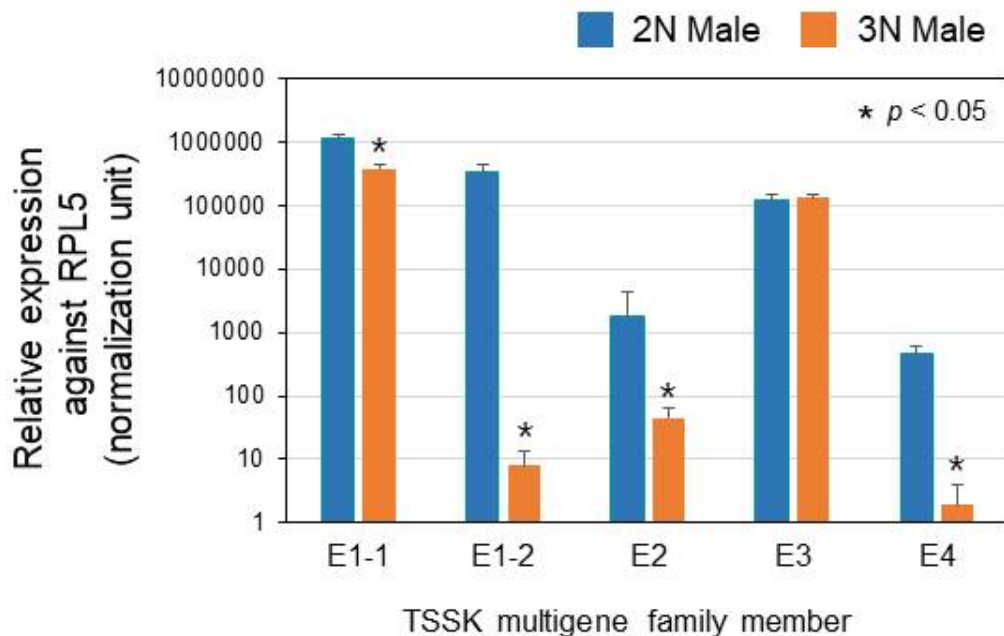
전복 2배체 수컷과 3배체 수컷간 TSSK1 유전자 발현.

Histogram에 다른 알파벳으로 표시된 내용은 ANOVA (followed Duncan's multiple range test) 분석에 의해 유의적인 차이를 나타냄(P <0.05)

: 따라서 본 결과를 토대로 TSSK1-like 마커는 배수체 정소 발달을 측정할 수 있는 도구로 유용하며, TSSK1-like가 포유류와 마찬가지로 최종성숙을 조절하는 기능이 있다고 인정되므로 배수체에서 최종성숙인 spermiogenesis가 일어나지 않는 이유는 TSSK1-like이 발현이 매우 낮거나 없기 때문으로 생각된다. 이상의 결과에서 배수체 수컷은 생식 가능 연령에 도달하여(2년산) 일부 개체들이 외관상 부분성숙의 표현형을 나타낼 수 있지만, 생식소의 최종성숙 단계인 감수분열 이후 spermiogenesis 단계로의 진입은 이루어지지 않는 것으로 나타났고, 그 주된 원인은 정자 분화의 최종 단계를 조절하는 TSSK1의 발현이 배수체에서 크게 낮기 때문이다. 본 결과는 배수체의 성숙 억제와 자연에 관한 새로이 규명된 연구결과로서 향후 전복뿐만 아니라 수산 동물의 배수체 육종과 생식 형질평가에 새로운 연구 방향을 제시할 수 있다고 기대된다.

○ 4년산 배수체 수컷 생식소에서의 TSSK member들의 발현

- : 본 연구결과를 토대로 4년산 성숙 연령이 보다 오래된 배수체 수컷들을 대상으로 2년산 수컷에서의 연구결과가 재현되는지 그리고 TSSK1-like (HHTSSK-4E) 외에 다른 TSSK member들의 발현 역시 배수체와 이배체간 차등성을 나타내는지 (나타낸다면 가장 큰 차이를 보이는 member는 무엇인지)를 조사하고자 하였다.
- : 전복 삼배체와 이배체 수컷들(4년 산) 간 차등의 정소 성숙 단계를 표현할 수 있는 발현 마커를 구축하기 위해 TSSK multigene family 5 member들을 이용하여 유전자 발현 정량분석을 수행하였다[그림 2-6-37]. 이배체 수컷의 경우 5 TSSK member들 중 HHTSSK-1E-1이 가장 높은 발현을 나타내었고, 뒤이어 HHTSSK-1E-2 및 HHTSSK-3E 순으로 높은 평균 RQ값을 보였다. 반면 HHTSSK-2E와 HHTSSK-4E는 상대적으로 크게 낮은 발현수준을 보였으며, 특히 HHTSSK-4E의 경우 RQ 값을 기준으로 HHTSSK-1E-1의 발현량보다 2,000 배 이상 낮은 평균 RQ 값을 나타내었다. 특정 TSSK member 내에서 수컷 개체 간 RQ 값의 편차가 TSSK member별로 크게 다르게 나타나, HHTSSK-1E-1의 경우 CV 19.3%였으나 HHTSSK-2E의 경우 무려 CV가 143%를 보임으로써, HHTSSK-2E의 발현이 수컷 정소의 성숙도 등 차이에 의해 매우 민감하게 좌우 될 수 있음을 시사하고 있다. 한편 나머지 3개 TSSK member들의 경우 개체 간 CV는 20.6~27.9%로 서로 크게 다르지 않았다.



[그림 2-6-37]

TSSK multigene family 유전자들의 2배체 및 3배체 수컷 정소(4년산)에서의 차등 발현

- : 반면 동일 연령의 삼배체 수컷들은 이배체와 비교 시 판이한 TSSK 유전자발현 양상을 보여주었다. 비록 HHTSSK-1E-1의 경우 이배체 수컷과 마찬가지로 삼배체 정소에서 다른 TSSK member들보다 월등히 높은 RQ 값을 보였지만, 삼배체 정소 내 측정된 HHTSSK-1E-1의 RQ 값은 이배체와 비교 시 3-fold 이상 낮은 수치에 해당되었다. 특히, 1E-2의 경우 이배체와 삼배체간 가장 큰 폭의 RQ 값의 차이를 나타내었는데, 삼배체 1E-2의 유전자발현 수준은 이배체보다 무려 4000배 이상 낮게 관찰되었다. 이배체에서의 발현과 비교 시 유의적으로 낮은 발현은 HHTSSK-2E ($2N/3N = 41.4$ -fold) 및 HHTSSK-4E ($2N/3N = 242.4$ -fold)에서도 공통적으로 관찰되었다. 하지만 다른 TSSK member들과 달리 3E의 경우 이배체와 삼배체간 RQ 값에 있어 큰 차이 없이 유사하였다($P < 0.05$). TSSK member 내 수컷 개체 간 RQ 값의 편차를 조사한 결과, 삼배체 수컷에서 가장 큰 개체 간 편차를 보이는 TSSK member는 HHTSSK-4E로서 ($CV = 101.0\%$), 이배체와 비교 시 %CV값이 3배 이상 높게 나타났다. 반면 삼배체 수컷에서도 이배체에서와 마찬가지로 HHTSSK-3E ($CV = 10.3\%$) 유전자와 HHTSSK-1E-1 유전자($CV = 18.0\%$)가 비교적 개체 간 일정한 RQ 값을 보였고, 반면 HHTSSK-2E와 HHTSSK-1E-2는 상대적으로 높은 수준의 개체 간 편차를 나타내었다.
- : 이상의 결과에서 서로 다른 정소 성숙도를 보이는 이배체와 배수체 간 TSSK gene member들의 발현수준이 큰 폭으로 차이가 난다는 점을 고려할 때 이들 TSSK multigene들은 정소의 성숙에 모두 밀접하게 관여하며 전복 수컷 배우자의 형성에 중요한 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다. 그뿐만 아니라 TSSK member 별로 2N과 3N 수컷 간 차등 발현의 폭이 서로 크게 다르게 나타난다는 점으로 미루어 볼 때 각 TSSK member들은 spermatogenesis stage /phase에 따라 서로 차등의 역할을 갖고 있음을 암시한다. 본 유전자발현 분석에 사용한 수컷 개체들이 부화 후 4년째 최대 성숙 시기(산란시즌)에 근접한 시점에서 샘플링된 개체들임을 고려할 때 이배체와 삼배체간 가장 큰 발현수준 차이를 보이는 TSSK member들은 post-meiotic의 최종 성숙단계(즉, spermiogenesis)에 핵심적인 기능을 하는 TSSK form이라고 판단되며, HHTSSK-1E-1 및 HHTSSK-4E가 이에 해당된다. 반대로 이배체와 삼배체간 거의 발현차이를 보이지 않는 TSSK member (즉, HHTSSK-3E)는 정자의 최종성숙 단계보다는 삼배체 수컷도 공통적으로 나타내는 정소의 기능에 관여할 가능성이 크다. 따라서 삼배체와 이배체를 정소 발달을 최종 단계에서 효과적으로 구분하는 발현 마커의 기능성 측면에서 고려할 때 HHTSSK-1E-2와 HHTSSK-4E가 가장 효과적인 배수체 수컷 정소 발현 마커로 사용 가능하다고 판단된다.

라. 인공 방란·방정 자극 처리에 대한 반응

○ 목적 및 범위

- : 배수체의 생식학적 기능 평가의 최종 단계로서 배수체(삼배체) 암수를 대상으로 방란·방정 유도를 위한 간출 자극을 통해 배수체의 방란 또는 방정 유도 가능 여부, 정상적인 접합자(zygote) 생성 여부, 그리고 접합자의 발생을 통한 자손 개체 생성 가능성에 대해서 평가함.

○ 연구내용 및 방법

- : GSP 프로젝트 1단계에 2년산 수컷 배수체로부터 방정을 유도하기 위한 예비 시험이 이루어진 바 있다. 당시 2년산 이배체 개체들의 경우 통상의 간출 및 자외선처리 해수 처리 자극에 반응하여 왕성한 방정을 보였으나 함께 처리한 동일 연령의 배수체 수컷들은 방정이 일어나지 않았었다. 이를 토대로 GSP 2단계에는 2년 이상의 연령에 해당하는 배수체 수컷 개체들, 그리고 배수체 암컷을 대상으로 한(1단계 연구 당시 외관상 성숙 생식소를 나타내는 배수체 암컷의 확보가 불가능하였으므로) 인공산란 및 방정 유도 실험을 수행하고자 하였다.
- : GSP 2단계 프로젝트 기간에 배수체의 인공 방란·방정 유도는 5년에 걸쳐서 2년산 (암, 수) 배수체를 이용하여 1회, 3년산 (암, 수)을 이용한 1회, 4년산 (암, 수) 1회, 수컷 1회) 2회, 그리고 5년산 (암, 수) 1회를 시도하여 총 5회 수행하였다.
- : 각 회차의 산란(방정) 유도 실험에서 조사 대상 배수체 집단에서 배수체의 전수 조사를 시행, 육안검사를 통해 해당 그룹에서 생식소의 외형적 발달이 가장 많이 진행되었다고 판단되는 배수체 개체들을 선발하였다[그림 2-6-38]. 제1세부 프로젝트 기관에서 정립한 바 있는 간출 및 자외선처리 해수를 이용한 전복 산란(방정) 유도 조건을 이용하여 배수체의 산란(방정)을 유도하였고, 이때 간출과 자외선 자극 조건이 적절히 수행되었는지를 확인하기 위해 이배체 성숙 암수 모패를 대조군으로 이용하였다.
- : 이때, 자외선처리 해수의 환수는 암실 조건에서 약 1~2시간 간격으로 수행하였고, 이배체 대조군 암컷 및 수컷의 산란(방정)이 확인된 이후에도(일반적으로 3회 환수 이내에 방란·방정이 유도), 방란 또는 방정하지 않은 배수체 개체들이 있을 경우 자외선 해수 처리를 최대 5~6회까지 실시하였다[그림 2-6-39].
- : 배수체로부터 배우자의 방란(방정)이 확인될 경우, 배우자의 수정능력 및 발생 능력을 확인하기 위해서 일반 이배체 모패로부터 얻은 정상 배우자(알 또는 정자; 반수체)와 인공수정(artificial insemination)을 수행하였고, 인공수정을 통해 부화 유생이 확보될 경우 유생의 정상성 조사 및 ploidy status (배수성) 조사를 수행하였다. 정상성 및 배수성 평가의 참조군 시료를 확보하기 위해서 이배체로부터 얻은 반수체 배우자간 수정을 통한 일반 이배체 유생, 그리고 필요시 이배체 수정란을 대상으로 삼배체를 유도하여 분석에 함께 이용하였다. 배수성 분석은 유세포분석을 이용하였다.



[그림 2-6-38]

배수체 인공산란(방정)유도를 위한 암컷 및 수컷 배수체 모패 선발과 간출 자극



[그림 2-6-39]

배수체 모패의 방란(방정)을 위한 간출 자극 후 자외선 조사 해수 처리

○ 결과

- : (1회차 유도 실험) 해당 사육장(거제)에서 이배체 전복의 산란기에 해당하는 시기에 배수체 성패들을 대상으로 방란(방정) 실험을 수행하였다. 3년산 배수체 성패 약 800개체로부터 전수 조사를 통해 해당 그룹에서 가장 외형적 생식소 발달이 높은 암컷 4개체 및 수컷 7개체를 선발하여 인공 방란(방정) 유도를 수행한 결과, 배수체 수컷은 지속적인 인공자극 처리에도 불구하고 7개체 모두 방정을 하지 않아 배우자 확보가 불가능하였다. 반면 암컷 배수체 4개체로부터 방란이 유도되었는데, 암컷 배수체 개체별로 방란 된 알의 수와 알 형태의 정상성에 큰 차이가 관찰되었다(이배체로부터 얻은 일반적인 전복 미수정란과 비교 시 색이 탁하고 어두우며 배수체 암컷 개체에 따라 미수정란에 젤리층이 존재). 이배체로 확보한 일반 배수체 정자와 인공수정을 수행한 결과 수정률에 있어서도 배수체 암컷별로 큰 차이가 관찰되었다(수정률 0.1% 미만~90%; 2세포기 진행 시점에서 측정). 해당 인공수정교배 그룹으로부터 확보한 부화 유생을 유세포분석을 통해 세포 당 DNA 함량을 조사한 결과 정상적인 euploidy에 해당하는 peak은 관찰되지 않았고 이배체 DNA 함량 값보다는 크고 삼배체 해당 DNA 함량 값보다는 작은 aneuploidy 추정 peak을 나타내었다.
- : (2회차 유도 실험) 1회차 산란(방정)유도 실험과 동일한 사육장(거제)에서 관리 중인 2년산 배수체 개체들을 대상으로 인공산란(방정) 유도를 수행하였다. 2년산 배수체 그룹(약 2,000개체)에서 성숙 난소를 표현하는 암컷 5개체, 그리고 외관상 성숙 정소를 갖고 있는 배수체 수컷 26개체를 선발하여 앞서 1차 실험과 동일한 방식(간출 및 자외선 조사 해수 처리)으로 인공산란(방정)을 유도하였다. 그 결과, 배수체 암컷 5개체 중 3개체로부터 방란을 확인하였는데, 그중 암컷 1개체로부터는 통상의 인공수정이 가능할 정도의 난을 얻었으며, 나머지 암컷 2개체로부터는 극소량의 비정상 형태의 난이 방란되어 수정이 불가하였다. 하지만 많은 수의 난이 방란된 암컷 개체(1개체)는 유세포 분석결과 이배체로 판정되어, 결과적으로 삼배체 암컷으로부터 정상적인 수정이 가능한 난은 얻지 못하였다. 수컷의 경우 총 26개체 중 3개체로부터 정충을 얻었지만, 해당 3개체 모두 이배체로 판정되어 결과적으로 삼배체 수컷으로부터는 성공적인 방정을 확인할 수 없었다.
- : (3회차 유도 실험) 3회차 실험은 육종전복보급센터(해남)에서 관리 중인 4년산 배수체 성패(약 1,500개체)를 대상으로 인공산란(방정)실험을 수행하였다. 해당 배수체 그룹으로부터 암컷 15개체, 그리고 수컷 24개체를 생식소 외형을 기준으로 선발하였으며 상기와 유사한 방법으로 간출 자극을 시행하였다. 그 결과, 조사 대상 암컷 15개체 중 5개체가 소량의 난을 방란하였으며, 각 암컷으로부터 얻은 난과 일반 이배체 수컷으로부터 준비한 정자와의 인공수정을 실시하였다. 인공수정 24

시간 후 부화 유생의 생성 여부를 조사한 결과, 2개 수정 그룹에서는 부화가 일어나지 않았고 나머지 3개 그룹의 경우 매우 작은 수의 부화 유생이 관찰되었으나 대조군의 부화 유생(이배체 암컷 × 이배체 수컷)과는 달리 표층(상층)에 부유하는 유생이 없고 대부분 중하층에서만 관찰되었다. 이들 중하층에 있는 유생을 현미경으로 관찰한 결과 이들 유생은 정상적인 발생 과정을 거치지 못한 비정상적 형태의 기형들(미부화 개체들 포함)이 다수를 차지하였다. 또한, 중하층에는 발생을 멈춘(또는 미수정) 알들 역시 현미경 검경을 통해 다수 관찰 가능하였다. 따라서 본 회차의 실험을 통해서 정상적인 수정과 발생 능력을 갖춘 암컷 배우자는 확인되지 않았다. 한편, 방정을 유도한 24개체의 배수체 수컷은 모두 방정하지 않았다.

- : (4회차 유도 실험) 육종전복보급센터에서 관리 중인 4년산 배수체 수컷을 대상으로 방정을 유도하였다. 총 30개체의 배수체 수컷을 대상으로 상기와 유사한 방법으로 방정을 유도하였으나 유도에 사용한 30개체 모두에서 성공적인 방정을 확인할 수 없었다.
- : (5회차 유도 실험) 육종전복보급센터에서 관리 중인 5년산 배수체 암컷 4개체와 수컷 5개체에 대해 인공 산란(방정) 유도를 수행하였다. 이 중 배수체 암컷 1개체로부터 방란이 이루어졌지만 난수가 매우 적어 수정에 사용할 수 없었고, 현미경 검경결과 비정상적인 형태로 관찰되었다. 배수체 수컷의 경우 5개체 중 2개체에서 방정을 확인하였지만, 유세포 분석결과 해당 2개체는 모두 이배체로 확인되었다.

○ 고찰

- : GSP 2단계 기간인 5년에 걸쳐 수행된 총 5회의 배수체 전복의 인공 산란(방정) 유도결과를 종합하면 아래와 같다.
- : 배수체 전복의 인공 산란(방정)에 사용된 개체는 모두 120개체였으며 이중 수컷이 92개체, 암컷은 28개체였다. 수컷 92개체 중 방정이 확인된 개체는 5개체였지만, 해당 5개체 모두 이배체로 확인되어 삼배체 수컷 전복에서 성공적인 방정은 이루어지지 않았다. 본 연구결과를 통해서 전복 삼배체의 경우 비록 육안 관찰 시 이배체와 비교 가능할 만큼의 외형적으로 성숙한 정소를 표현할 수 있으나, 삼배체 수컷은 정소 내 정충의 최종성숙 및 방정 기능을 온전히 갖추지 못한 것으로 판단된다. 따라서 본 연구의 대상 중인 참전복의 경우 삼배체 유도를 통해 생물학적 격리 효과(배우자 수준의 불임성 탑재)를 기대할 수 있다.
- : 한편, 암컷 28개체 중 방란이 유도된 개체는 총 13개체이고 이 중 1개체가 이배체로 확인되었으므로 12개체가 방란 유도가 이루어진 배수체 암컷에 해당된다. 이들 암컷 12개체로부터 얻은 난을 이용하여 일반 정자와 인공수정을 시도하였으나 비정상적으로 방란 된 알의 수가 너무 작거나, 정상적인 형태를 갖추지 못한 경우, 그리고 수정 후 정상적인 발생 및 유생 생산이 이루어지지 못한 경우가 대부분이었다[그림 2-6-40]. 비록 1회차 실험에서 암컷 4개체로부터 부유 가능 유생이 소량 생산되었으나 이들 역시 정상적인 정배수성(euploidy)을 갖추지

못한 이수성(aneuploidy)에 해당되므로 배수체 암컷의 제한된 방란 잠재력을 인정하더라도 생존력 있는 후대 자손의 원활한 생산 가능성은 극히 낮다고 판단된다. 특히 배수체 그룹으로부터 외관상 성숙 개체의 선발 빈도가 수컷에 비해 암컷이 훨씬 낮은 점을 고려할 때 암컷 역시 본 프로젝트의 목적(생식학적 격리를 통한 비승인 방식의 대량 생물 복제 방지)에 부합한다고 판단된다.



[그림 2-6-40]

이배체 대조군 암수 간 교배(좌) 및 삼배체 암컷과 이배체 수컷 간 교배(우)를 통한 유생의 부화

2-7. 민간 현장 보급 배수체 시료의 평가

○ 목적

- : 제1세부 프로젝트 기관에서 현장 시험을 위해 민간 치패장에 보급한 배수체(삼배체) 전복 및 이배체 대조군을 대상으로 그간 조사한 배수체의 형질 특성에 관한 연구결과가 현장에서의 재현성 정도를 평가하기 위해 민간 현장 보급 시료의 현장 평가에 관한 모니터링을 지원함.

○ 연구 범위

- : 본 연구 항목의 추진은 배수체의 형질에 대한 pilot 평가 자료가 확보 직후 4차년(2020년)에 민간 현장 보급 1개소의 배수체 시료를 대상으로 시작되었다. 제1세부 프로젝트 기관에서의 다른 현장 시료 평가 자료를 토대로 하고 있으며, 현재도 진행 중이고, 2단계 GSP 사업 종료 이후에도 제1세부 프로젝트 기관과의 협의를 통해 배수체의 특성이 본격적으로 발현되는 최종 상품 크기 단계까지 지속 추진될 예정이다.
- : 그간 제1세부 프로젝트 기관에서는 여러 차례 시범 분양을 통해 배수체 형질 특성을 현장에서 확인한 바 있으나, 단일 현장에서 유생 단계부터 최종 성체 크기의 성숙 단계까지 정기적인 모니터링을 추가로 수행하기 위해서 제2세부 프로젝트와 본 연구 항목을 공동으로 설계한 바 있다. 계획에 따라 배수체 유생을 민간에 분양 후 민간 채묘장에서 채묘, 치패 생산 및 가두리 입식 등 민간 현장 환경에 투입 후 배수체의 배수성이 안정적으로 유지되는지 검증(즉, 유생 단계에서 분양 직전 확인한 배수체 빈도가 현장 시료에서도 안정적으로 재현되는지 여부), 민간 현장에서 배수체의 우량 형질이 발현되는 시기 및 그 발현 정도 비교 평가(보급 센터 등 시험기관 및 시범 분양 민간 현장에서 관찰한 바 있는 배수체의 성장, 비만도, 체형, 패각 형태 형질의 개량이 지속해서 재현되는 정도), 최종 성체 상품 크기에 도달하였을 때(약 3~4년) 배수체의 생식학적 격리 완성도가 민간 현장에서 재현되는지 재검증을 목표로 수행 중이다.

가. 현장 보급 배수체의 배수성 유지 조사

○ 목적

- : 삼배체 유생을 민간 현장에 분양 후 부착 치패 및 종자 단계에서 배수성이 안정적으로 되는지 조사, 검증함.

○ 연구내용 및 방법

- : 배수체 유생을 분양 후 민간 채묘장에서 부착과 치패 사육 단계(육상 시설)에서 현장 치패장(해남 소재)을 방문, 배수체 및 이배체 대조군의 무작위 시료(약 30개체씩)를 채집하여 유생 단계에서 확인된 바 있는 배수체 빈도가 치패 단계(채묘 약 6개월 후)에서 안정적으로 유지되는지 확인하고자 하였다. 배수성 확인을 위해서 삼

배체 개체별 소량의 근육 조직을 절단 후 앞서 정립된 유세포분석 방법을 이용하여 이배체 대비 세포 당 DNA 함량을 기준으로 삼배체 판정과 빈도를 평가하였다.

- : 치패 단계 이후 선별 과정을 통해 가두리 입식 후 1년간의 추가적인 사육 후 역시 동일 업체를 방문(1년 산 대상), 배수체 및 이배체 대조군에 해당하는 가두리로부터 무작위 30개체씩을 다시 채집하여 성장 과정 중 배수성이 안정적으로 유지되는지를 재검증하였다. 각 개체의 맨틀 근육을 이용하여 역시 유세포분석을 통한 배수성 판정을 수행하였고, 배수체 그룹의 삼배체 출현 빈도를 계산하였다.

○ 배수성 판정 및 삼배체 출현 빈도

- : 현장 보급 직전 배수체 대량처리를 통해 생산한 유생 그룹은 유세포분석의 반복 수행을 통해 정확한 삼배체 해당 단일 peak을 보인 그룹이며, 이배체 해당 peak은 관찰되지 않았으며 99% 근접의 삼배체 출현 빈도를 보인 바 있다.
- : 2020년 10월 채묘 6개월 후 수집한 삼배체 처리 그룹의 치패 12개체씩 2회 분석한 결과 분석한 모든 개체에서 삼배체 단일 peak을 형성하였고 모두 배수성 판정 기준에 따라 삼배체 판정이 명확히 이루어졌다.
- : 2021년 11월 채묘 17개월 후 가두리 입식 그룹으로부터 수집한 개체를 대상으로 유세포분석 시 정확한 euploidy peak을 나타낸 24개체 중 23개체에서 삼배체 판정이 가능하였다(빈도 = 95.8%).
- : 이상의 결과에서 유생 단계에 탑재된 삼배체 배수성은 현장 채묘, 치패 사육 및 가두리 입식 환경에서 안정적으로 유지되었음을 알 수 있었으며, 그간의 제2세부 프로젝트 기관의 자체 시험 결과(2017년 민간 현장 배수체 처리 그룹의 치패의 배수성 확인 시험) 및 제1세부 프로젝트 기관의 이전 시범 현장 분양시험의 결과를 잘 재현하였다.

나. 현장 보급 배수체의 주요 형질 추적평가 지원

○ 목적

- : 현장에 보급 분양된 배수체가 민간 현장 조건에서 이배체 대비 차등 형질이 발현 하는지 모니터링 평가를 통해서 제1세부 프로젝트 기관이 주도하는 현장에서의 사양 관리를 최적화 및 업데이트할 수 있는 자료 확보를 지속하고자 하였다.

○ 연구 범위

- : 그간의 형질평가 연구결과를 통해 전복의 삼배체는 기본적으로 불임성을 통한 양적 형질의 개선 효과는 이배체가 생식소 발달이 최고조로 왕성해지는 3년산 성체 시기 이후부터 본격화되는 잠재력을 가지므로, 초기 종자 및 치패 단계에서는 아직 삼배체 특이적인 차등 형질을 기대하기는 어렵다.
- : 지속적인 모니터링 추적은 아니나 이미 성체 성숙 단계 이후 배수체의 형질 변화 및 양적 형질의 개선(성장, 비만도 등)은 이미 pilot 규모 및 일부 시범 보급 단

계에서 확인한 바 있다. 따라서 본 연구 항목에서는 이전의 연구결과들을 토대로 현장 환경에서 배수체 차등 형질의 최초 발현 시기 및 발현 정도를 파악하고, 아울러 그간의 유전자발현 연구에서 확인한 배수체 성체 특이적 차등 발현 선발 마커(대사, 면역, 성숙)들의 차등 발현이 개시되는 시점을 함께 추적 조사하고자 함으로써 제1세부 프로젝트 기관에서 수행하는 현장 보급 시료의 형질평가를 지원하고자 하였다.

- : 이를 위해, 유생 보급 후 치패(채묘 약 6개월 후) 및 1년산 개체들을 대상으로 개체 측정(성장, 크기, 또는 패각 계측 형질)과 아울러 선발 발현 마커들의 mRNA 발현을 조사하였으며, 본 조사는 추후 해당 배수체들의 나이가 3~4년까지 도달하는 시기까지 지속될 예정이다.

○ 연구내용 및 방법

- : 현장 보급 이배체 및 삼배체는 2020년 4월 동일 모패 그룹으로부터 생산 후 유생 상태에서 보급 분양하였으며(해남 소재지 S 업체), 2020년 10월 부착 치패 단계의 시료를 확보하였다[그림 2-7-1]. 개체별 총 중량, 패각의 무게(연체부 중량), 패각의 길이(각장) 및 패각의 넓이(각폭)를 측정 이배체와 삼배체를 비교하였다. 중량은 0.01 g 단위까지 전자저울을 이용하여 측정하였으며, 길이는 버니어 캘리퍼스를 이용하여 0.01 mm 단위까지 측정하였다.
- : 동일 배수체 및 이배체 그룹을 대상으로 2021년 11월 가두리 입식 후 사육 중인 개체들을 다시 무작위 시료를 수집하여 상기와 유사한 방식으로 개체 측정을 수행하였다. 배수성 분석이 확인된 개체들을 대상으로 무게 및 길이 측정을 수행하였고, 해당 개체들의 경우 10미씩 표본을 대상으로 패각의 계측 형질을 함께 조사하였다. 패각의 계측 형질은 앞서 '체조성 및 형태분석' 연구결과를 토대로 이배체와 삼배체 간 성장단계에서 차이를 나타낼 수 있는 항목들을 위주로 총 12개의 항목을 측정하였고 해당 측정치를 이용, 패각의 morphometric 비율에 관한 총 15개의 비율 값을 구한 후 삼배체와 이배체 간 차이가 있는지 조사하였다.
- : 배수체의 차등 형질 발현 시기에 차등 형질의 해석을 대비하기 위해 앞서 전사체 NGS 데이터베이스로부터 배수체와 이배체 간 차등 발현을 나타내는 유전자 마커들을 선발하였다. 차등 발현 후보 유전자들을 대상으로 문헌 조사를 통해 다른 동물 종에서 연구결과들이 보고된 바 있는 유전자들을 위주로, 대사, 면역 및 성숙 관련 유전자들을 선발하였고, 수컷의 경우 앞서 발현 마커로 선정한 TSSK member들을 함께 분석대상으로 선발하였다. 선발한 유전자들을 대상으로 발현 산물의 기본적인 기능, 유전자 및 전사체의 기본 구조에 대한 정보를 수집하고, end-point PCR 과정을 통해 각 유전자의 발현을 효과적으로 정량할 수 있는 최적 primer 조건을 검증하였다.



[그림 2-7-1]

현장 보급 이배체 및 삼배체 전복 시료(해남, S 업체)의 치패 사육 현황 및 배수체 시료 샘플링

: 전사 발현 정량을 위해서 개체별로 근육(muscle) 부위와 간췌장+생식소 혼합 부위(hepatogonadal appendage sample)로 구분하여 2개 생체 샘플을 확보하고, 핵산 추출 및 cDNA 합성을 통해 주형을 확보하였다. 이때 cDNA 주형 합성은 oligo-d(T) priming 방식과 nonamer-random priming 방식을 병행하였다. qPCR 증폭은 앞서와 같이 SYBR Green을 이용한 상대정량 검출 방식을 이용하였고, 이때 그간 연구결과를 토대로 internal reference 유전자로서 ribosomal protein L5 (RPL5)를 이용하였다. 당년산(6개월) 배수체 및 이배체 시료의 경우 생식소 발달이 거의 이루어지지 않는 점을 고려하여 대사 및 면역 관련 유전자를 위주로 기초 조사를 수행하였고, 1년산 개체들이 경우 역시 생식소성숙이 거의 일어나지 않았으나 간췌장 표면에 일부 개체들(이배체)의 생식소 형성이 관찰되었으므로 해당 개체들을 위주로 성숙 관련 유전자의 발현 조사를 포함시켰다.

○ 당년산 치패의 개체 측정

: 6개월령 배수체 및 이배체 개체(치패) 그룹의 경우 해당 치패장의 현장 조건에서 개체간 편차가 크게 관찰되어 일정 개체 수의 무작위 선발 시료만으로는 성장 형질에 대한 평가가 실효성이 크지 않았다. 다만, 무작위 수집 시료 중 분석에 이용하기 위해 outlier에 개체들을 제외하고 중앙값에 근접 개체들을 비교할 경우 치패 단계(패각의 길이가 약 15~20 mm 해당)에서 그간의 연구결과로부터 예상한 대로 배수성에 따른 길이 및 무게 성장 모두 선명한 차이는 관찰되지 않았다. 분석 개체들이 속한 배수체 샘플 그룹의 각장(18.27 ± 1.15 mm), 각폭(12.25 ± 0.79 mm), 총중량(0.56 ± 0.11 g), 연체부 중량(0.33 ± 0.08 g) 모두 분석에 이용한 이배체 개체들의 측정값[각장(18.20 ± 1.00 mm), 각폭(12.45 ± 0.77 mm), 총중량(0.55 ± 0.08 g), 연체부 중량(0.35 ± 0.05 g)]과 유사하였다[그림 2-7-2]. 다만 배수체 치패 시료들에서 패각의 무게가 이배체에 비해 크게 나타나 통계적 유의차가 인정됨으로써(2N 0.20 ± 0.03 g vs. 3N 0.23 ± 0.04 g; $p=0.04$) 앞서 성체 단계에서의 결과와 차이가 있었다. 하지만 통계 확률값 자체를 고려할 때 해당 결과가 현장 샘플의 특징을 대변한다고 대표성을 부여하기는 어렵고 현재로서 큰 의미를 부여할 만한 근거는 확보되지 않은 상태이다.

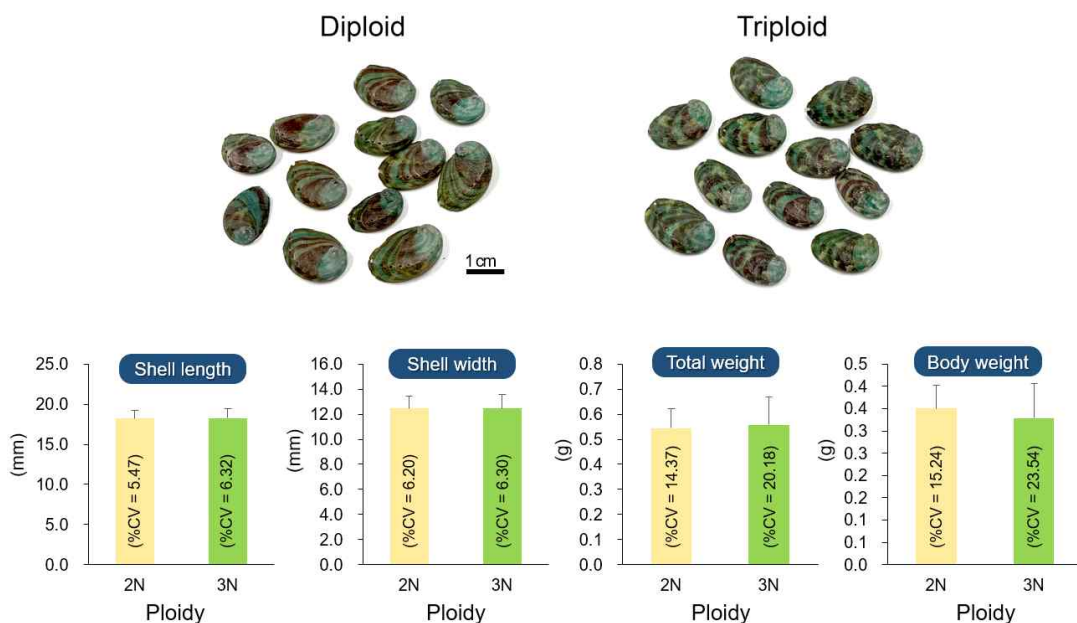
○ 1년산 개체의 개체 측정

: 1년산(2020년 생산) 배수체 현장 시료 역시 아직 이배체 그룹과 비교 시 배수체 특이적인 양적 형질의 변화는 아직 나타나지 않은 것으로 판단되었다. 동일 양식장의 배수체 입식 가두리와 이배체 입식 가두리를 대상으로 비교하였으나 현장 환경에서 배수성에 따른 특이적인 형질의 표현은 관찰할 수 없었고, 치패에서와 마찬가지로 개체 간 편차가 시험환경의 사육에서보다 크게 관찰되었다.

: 배수체 개량 형질의 경우 이배체 기준 성숙기를 2~3회 이상 거친 후에 발현한다는 그간의 본 프로젝트 연구결과를 고려할 때, 해당 현장 배수체 시료(1년산)

에서 배수체 특이적인 형질이 아직 미발현한 결과는 이전 결과와 크게 다르지 않다. 분석을 위해 선발한 배수체 개체들 대부분 생식소 발달이 거의 이루어지지 않은 상태로 육안 판정상 정확한 암수 구분이 불가능하였으며, 이배체 역시 아주 소량의 생식소 발달이 몇몇 개체에서 관찰되었으나 비 산란기에 해당하는 시료 채집 시점에서 성숙도는 매우 낮은 상태였다[그림 2-7-3].

: 분석에 이용한 개체들의 경우 이배체 및 배수체 간 총중량 (29.16 ± 3.27 g vs. 26.58 ± 3.10 g), 연체부 중량(20.57 ± 2.71 g vs. 19.19 ± 2.46 g), 각장(6.28 ± 0.21 cm vs. 6.14 ± 0.46 cm)에서 통계적 유의차가 관찰되지 않았다($p > 0.05$). 반면 각쪽의 경우 이배체(4.28 ± 0.16 cm)가 배수체(3.90 ± 0.17 cm)에 비해 크게 나타나($p < 0.05$) 패각의 형태 변화 개시의 가능성을 시사하였으나 추가적인 성장 이후 재확인 필요할 것이다. 아울러, 앞서 결과에서 당년산 치패에서 배수체의 패각 무게가 이배체에 비해 크게 관찰되었으나, 1년산 개체의 경우 오히려 배수체에서 패각 무게가 더 작은 결과가 나타남으로써(배수체 7.40 ± 1.06 g 이배체 8.59 ± 1.08 g; $p < 0.05$) 추후 검증이 요구된다. 단, 가두리 입식된 현장 시료의 경우 비록 분석 전 패각의 부착물질을 최대한 제거했다 하더라도 완벽한 제거를 항시 담보할 수 없고, 또한 패각에 이물질(또는 작은 패류)이 부착되어있는 동안 패각 성장에 영향을 미쳤을 가능성이 있음을 온전히 간과하기는 어렵다.



[그림 2-7-2]

실험에 이용한 현장 보급 이배체 및 삼배체 전복(치패)의 계측 형질평가

Diploid



Triploid



[그림 2-7-3]

실험에 이용한 현장 보급 이배체 및 삼배체 전복(1년산)의 생식소 발달 조사

○ 1년산 배수체 패각 형태의 morphometric 비율

: 1년산 배수체 및 이배체의 패각 계측 형질의 비율을 비교한 결과, 15개 비율 항목 중 14개 항목에서는 이배체와 배수체 간 유의차가 표현되지 않았다($p > 0.05$). 단, 항목 중 AF/FD 비율의 평균에서 이배체는 9.8 ± 1.7 인 반면 배수체는 7.6 ± 1.3 으로 나타나 t-test 결과 통계적 유의차가 인정되었다($p < 0.05$) [그림 2-7-4]. 1년산 현장 가두리 입식 개체들에서 유의차가 관찰된 해당 항목(AF/FD)은 앞서 '성장단계별 배수체-이배체의 패각 형태분석 결과(2.5. 체조성 및 패각의 형태분석)'에서 배수체가 성장하면서 이배체와 비교 시 유의적으로 작은 값을 나타내는 형질이라는 점에서, 기존 본 연구진이 수행한 선행 결과와 일맥상 통한다. 따라서 1년산 현장 보급 배수체의 형태분석을 종합하면, 아직 배수체의 차등 형질이 표현되는 시기(나이)에 도달하지 않았음을 시사하고 있으며, 이에 현장 환경에 적응하여 성장하는 배수체 그룹이 차등 형질을 표현하는 시기까지 추가적인 모니터링과 후속 조사가 뒤따라야 할 것이다.



[그림 2-7-4]

실험에 이용한 현장 보급 1년산 전복의 계측 형질 비율 평가

○ 유전자 선발 및 기초발현 분석

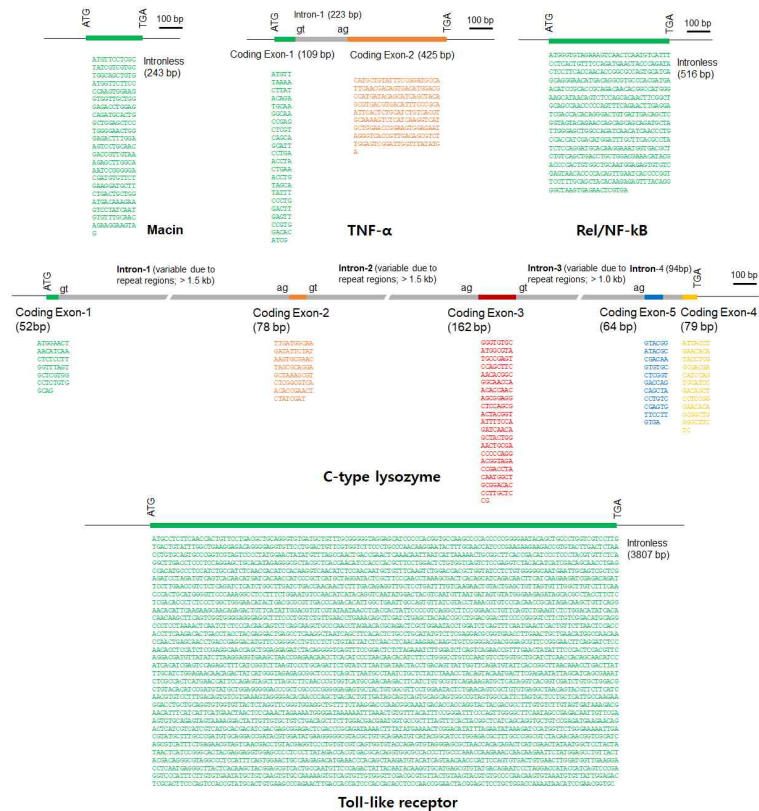
- : 현장 보급된 배수체의 형질 발현을 평가하기 위한 연구의 일환으로 배수체와 이배체간 차등발현유전자(NGS DB 분석)를 위주로 선발한 대사 및 면역 연관 유전자의 발현 조사를 배수체 성장 단계별로 진행 중에 있다. NGS 데이터베이스의 분석을 통해서 총 5개의 대사(metabolism)관련 유전자를 우선적으로 선발하였다. 선발된 유전자 중 Cytochrome P450 (CYP7A1)의 경우 선행 문헌 조사를 통해서 선발하였고 그 외 4개 대사 연관 유전자는 NGS 분석 시 삼배체 전복에서 상향발현되는 유전자들에 해당한다[chitinase-3 (CHI3L), aquaporin 8 (AQP8), endoglucanase 4 (Cel61a) 및 arginine kinase (ARGK)]. 선발 대사 연관 마커 유전자 전사체 및 암호화 아미노산의 수는 [표 2-7-1]에 나타내었고, 이들 유전자의 mRNA 발현을 분석하기 위한 RT-PCR/RT-qPCR 프라이머 정보는 [표 2-7-2]과 같다.
- : 면역 연관 마커 유전자의 경우, 선행 NGS 데이터베이스 구축을 위해 사용한 전복 개체들이 비자극 개체들이었기 때문에 NGS 차등발현 분석을 통한 면역관련 유전자 선발은 제한적이므로, 현장 시료의 면역기능 평가를 위한 유전자 그룹은 기존 선행연구 조사를 통해서 무척추동물의 선천성 면역 및 생체 방어에 중요한 역할을 하는 유전자들로 1차 구성하였다. 이에 후보유전자로서 본 연구의 NGS 분석에서 배수체에서 상향 또는 하향 차등 발현은 평가되지 않았으나 면역기능이 이미 다른 무척추동물에서 보고된 바 있는 C-type lysozyme (LYZc), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), Toll-like receptor (TLR), 그리고 Rel/NF-kB을 선발하였다. 아울러 연구진의 NGS 분석을 통해 배수체에서 상향 발현이 예측되는 면역 관련 유전자 1종(macin, mytimacins peptide family)을 추가로 선발, 총 5종의 면역 관련 발현 마커를 선정하였다. 5종의 선정 면역 관련 유전자의 구조는 [그림 2-7-5]에 나타내었고, 그림에서 보듯이 macin, Rel/NF-kB, TRL 유전자는 intronless 유전자로 각각 243 bp, 516 bp 및 3807 bp의 ORF를 포함하고 있고, TNF- α 는 두 개의 2개의 exon들로 구성되어 있으며(109-bp exon-1 및 425-bp exon-2), LYZ는 4개 exon의 tetrapartite 구조를 갖추고 있었다. 이들 면역 관련 유전자의 발현을 분석하기 위해 최적화 시킨 RT-PCR 프라이머 정보는 [표 2-7-3]에 나타내었다.

[표 2-7-1] 선발된 대사 관련 유전자의 염기서열 서열 특징 요약

Gene name	ORF(bp)	Protein (aa)	NGS (2N vs. 3N)
Chitinase-3	1956	652	3N up
Aquaporin 8	786	262	3N up
Endoglucanase 4	1545	515	3N up
Arginine kinase	1068	355	3N up
Cytochrome P450	1095	365	Not determined

[표 2-7-2] 현장적응 이배체 및 삼배체에서의 대사 관련 유전자 발현반응 특징조사를 위한 프라이머 정보

Gene symbol	Gene Descriptions & Aliases	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
CHI3L	Chitinase-3-like protein	Hdh-CHI3L-1F	AACGAAGAAGCTAGTGGCGA	183
		Hdh-CHI3L-1R	GTCACTAATGCTACCACTCC	
AQP8	Aquaporin 8	Hdh-AQP8-1F	CTACGGGTGGATCAATGAAC	188
		Hdh-AQP8-1R	CTTGTGGAATAGCAGGCGTT	
Cel61a	Endoglucanase-4	Hdh-Cel61a-1F	CATGTGGCTGTACAAGGCTA	216
		Hdh-Cel61a-1R	TTAGGGGAGTATGTGACGCT	
ArgK	Arginine kinase	Hdh-ArgK-1F	ACCTCAACATCCAGCCAAGA	184
		Hdh-ArgK-1R	AGGAACTACTTCTTGGCAGC	
CYP7A1	Cytochrome P450	Hdh-CYP7A1-1F	TCGGATCTCTATGTCCAGGA	226
		Hdh-CYP7A1-1R	TAGCACGTTCTCTTGGACAC	



[그림 2-7-5]

현장 보급 배수체 전복의 분석에 이용한 유전자 구조 분석 예(면역관련 유전자)

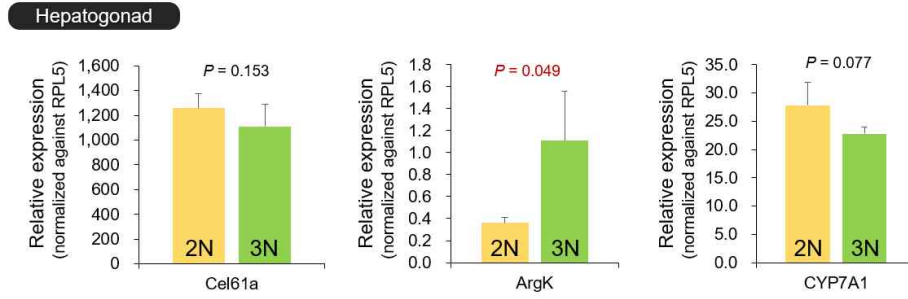
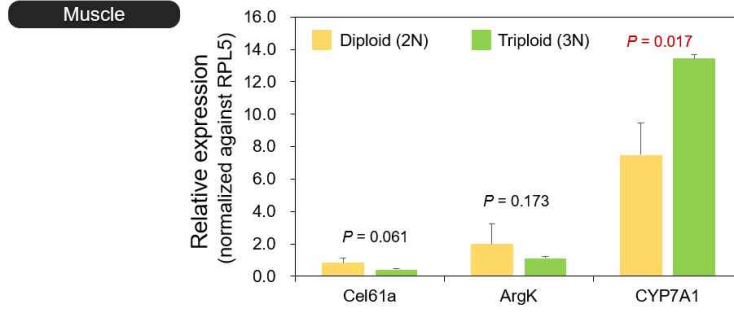
[표 2-7-3] 현장적응 2배체 및 3배체에서의 면역관련 유전자 발현반응 특징조사를 위한 프라이머 정보

Gene symbol	Gene Descriptions & Aliases	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
Macin	Mytimacin	Hdh-Macin-1F	GCAATTGCTATGACACCTGG	172
		Hdh-Macin-1R	CAAACGCATTGATAGGCCTG	
LYZc	C-type lysozyme	Hdh-LYZc-1F	CCTTGCTCCGACTATCTGAA	154
		Hdh-LYZc-1R	TTCAGTAGGTACATCCGCTC	
		Hdh-TNFa-1F	AGGGAATCGTCGTGGAGAT	
TNFα	tumor necrosis factor alpha	A	GAGTTGCAGAAGTCCATGG	175
		Hdh-TNFa-1R	A	
TLR	pattern recognition receptor (Toll-Like Receptor)	Hdh-TLR-1F	CAGTGGTGTACCAGAGTGTA	191
		Hdh-TLR-1R	GTCGTAGTAACAGGCTCCAT	
NFκB	Rel/NF-κB	Hdh-NFκB-1F	TATCTCCAGGATGCACAAGG	177
		Hdh-NFκB-1R	TCACGAGTTCTCACTTAGCC	

- : 한편 성숙 관련 유전자의 경우, 앞서 연구 항목인 「2-6. 나. 성숙 관련 유전자 정량발현 분석조건의 최적화」에서 ‘암컷/수컷 성숙 관련 발현유전자 마커 발굴’의 연구결과를 토대로 선정하였다. 아직 1년산 현장 보급 개체들(특히 배수체의 경우)의 생식소 발달 미비한 상태이지만 추후 추적 분석을 위한 마련을 위해서 암컷과 수컷 특이적인 유전자 마커들을 위주로 선발하였다. 암컷의 경우 FoxL 외 난소 특이·집중발현 유전자들을 그리고 수컷의 경우 TSSK member 중 정소에서 가장 높은 발현을 보이는 TSSK member와 배수체 vs. 이배체 간 가장 많은 차등 발현량을 보이는 TSSK member를 선정하였고, 해당 유전자들의 정량 발현 분석용 프라이머들은 「2-6. 나. 성숙 관련 유전자 정량발현 분석조건의 최적화」에 명시한 프라이머들을 그대로 이용하였다.
- : 대사 관련 유전자들의 상대 정량발현분석 결과, hepatogonad 부위를 제외한 전체 연체부 근육 시료에서 CEL61A 및 ARGK 유전자의 발현은 이배체와 삼배체 현장 시료 전복에서 유의미한 발현 차이가 관찰되지 않았다($p>0.05$). 하지만 CYP7A1 유전자의 경우 3배체가 1.8배 높은 발현수준을 보였다($p<0.05$). 반면 hepatogonadal 조직에서 배수체는 이배체와 비교 시 CEL61A 및 CYP7A1의 발현에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나 ARGK 유전자의 경우 이배체 대비 3배 이상의 고발현 수준을 나타냄으로써 삼배체 전복이 대사 관련 일부 유전자들의 조직 의존적 상향발현을 유도할 가능성을 시사하고 있다[그림 2-7-6].
- : 면역 관련 유전자의 경우 연체부 근육 조직에서 TNF α 및 NF κ B 유전자의 발현은 이배체 및 삼배체 현장 전복 시료에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 반면 LYZc 유전자의 경우 배수체가 1.2배 높은 발현을 보여 통계적 유의차가 인정되었다($p<0.05$). 한편 macin 유전자의 경우 근육에서 다른 분석 유전자들과 비교 시 이배체와 삼배체 모두 낮은 발현수준을 보였으나, 이배체에서 특히 낮은 발현(정량분석 가능 범위 내로 전사 산물이 검출되지 않는 수준)을 보여 배수체의 발현수준은 이배체 대비 약 30배에 달하였다. Hepatogonad 시료에서 macin 유전자는 삼배체에 높은 발현을 보이지만 이배체에서는 근육에서처럼 극히 낮은 수준을 나타냄으로써 배수성 간에 큰 차이를 보였다($p<0.01$). 반대로 hepatogonad 내 LYZc 및 TNF α 의 발현량은 배수체보다 이배체가 크게 나타나 통계적 유의차가 있었다($p<0.05$). 반면 NF κ B 유전자는 근육에서와 마찬가지로 hepatogonad에서도 역시 배수성에 따른 차등 발현 양상을 나타내지 않았다[그림 2-7-7].
- : 성숙 관련 유전자의 경우 개체별 유전자 발현 조사가 수행되었으나 배수체뿐만 아니라 이배체에서도 성숙도가 낮고 표현형적 암수 구분(phenotypic sexing)이 어려운 개체들이 다수 존재함으로써 전사체 검출 여부 및 검출량에서 개체 편차가 매우 크게 관찰되었다. 따라서 현재 연령의 개체들을 대상으로는 배수성을 기준으로 성숙 관련 유전자발현 패턴을 그룹화하는 것이 큰 실효성이 없다고 판단.

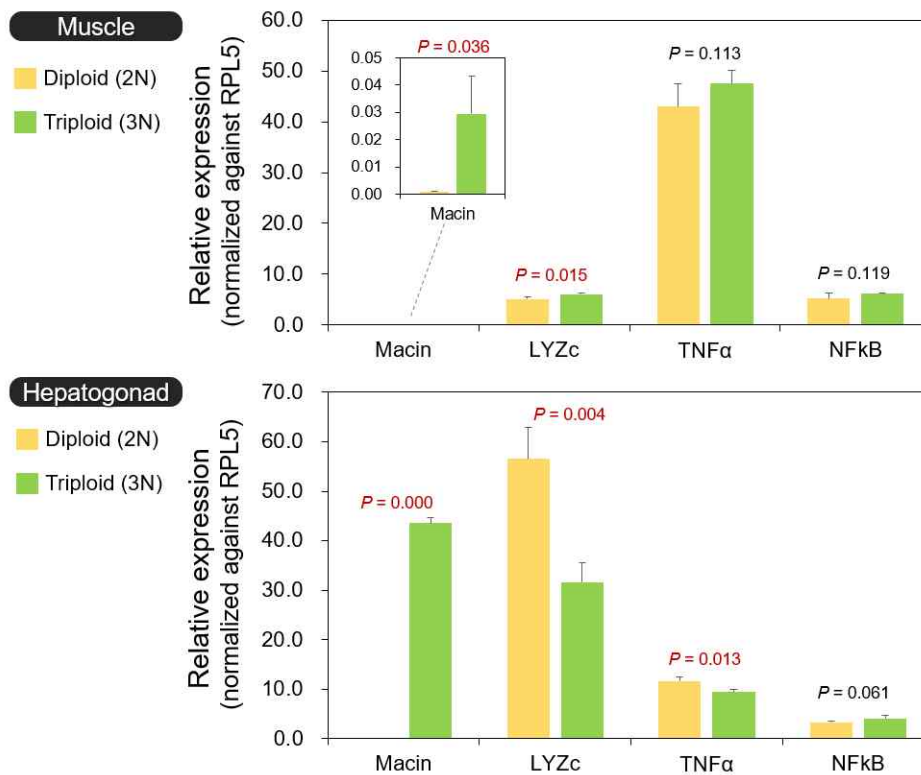
이배체 기준 2년째 산란기 도달 시점부터 암수 생식소 발달(표현형 구분)을 구분하여 성숙 관련 유전자의 배수체 내 발현분석을 다시 착수하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

- : 이상의 결과에서, 현장 환경에서 사육생산 중인 배수체 전복의 경우 현재까지의 나이(연령)까지는 비록 배수체 특이적인 외부 형질의 차등 표현이 아직 가시화되지 않았으나 유전자발현 수준에서는 이미 이배체와 구분되는 대사 및 면역 관련 전사발현 profile이 배수체 조직(기관)에서 구축되고 있음을 시사한다. 특히 비교적 최근 패류 종으로부터 발굴된 cysteine-rich 항균 단백질 유전자 macin은 미생물감염 또는 공격 실험(immune stimulation or bacterial challenge)이 없더라도 배수체 전복의 근육 및 간췌장/생식소에서 이배체보다 월등히 높은 기초발현 수준을 나타내므로, 이에 관하여 보다 자세한 후속 연구(macin의 신규 기능; 예, 다른 AMP처럼 대사 관련 호르몬 역할?)가 뒤따라야 할 것이다. 현장 보급 시료의 형질 변화에 관한 지속적인 모니터링 추진을 통해 현장 환경에서 배수체 특이 형질의 표현 시점과 그 정도에 관한 자료를 정기적으로 수집, 배수체의 현장관리 사양 개발 등에 관한 후속 조치가 이루어질 것이다.



[그림 2-7-6]

현장 보급 배수체 전복의 대사 관련 유전자들의 발현 분석(간체장 및 근육)



[그림 2-7-7]

현장 보급 배수체 전복의 면역 관련 유전자들의 발현 분석(간체장 및 근육)

2-8. 배수체 유도·분석 표준 매뉴얼(프로토콜) 제작

○ 목적

: 전복(*Haliotis discus hannai*)은 연체동물강(mollusk)에 속하는 고부가가치 패류 종으로서 국내 해면 양식 산업뿐만 아니라 종자 수출을 위한 전략 품목으로서도 중요시된다. 양식 생산성은 우량의 원재료(즉, 우량종자) 확보 여부에 따라 크게 좌우되며 때문에 전복을 대상으로 우량의 품종을 생산하기 위한 다양한 유전육종 기법들이 개발되고 있다. 이중 3배체 유도를 통한 배수체 육종 기술은 불임의 형질을 탑재함으로써 비의도적인 생식을 방지하거나 아울러 생식에 요구되는 에너지를 체세포 성장 및 대사로 전환함으로써 부가적인 우량의 경제형질을 개체에 획득케 하는 기술이다. 본 기술은 특히 종자 수출 시 수입국의 생태계 유전자 오염을 최소화하거나 또는 비승인 된 생물학적 재생산을 방지할 수 있는 기술로서도 중요시된다. 전복을 대상으로 한 3배체 유도 방법에 관한 실험자료들이 일부 학계에 보고된 바 있으나, 각 연구 보고마다 그 처리 방법과 효과(유도율 및 수율 등)가 크게 다르고 또한 실제 종자생산 현장에서 바로 적용하여 사용하기 위해서는 처리 방법의 완성도와 처리 효과의 재현성이 온전히 확보되어 있지 못한 실정이다. 따라서 본 프로토콜은 그간의 GSP 전복 품목의 연구개발 자료를 토대로 3배체 전복을 고효율·고수율로 유도할 수 있는 매뉴얼을 제공함과 동시에 배수체의 판정 및 대표적인 형질의 특징을 소개함으로써 배수체 전복을 생산 시험연구하고자 하는 연구단체, 보급기관 및 민간 기업에 도움을 주기 위하여 제작하였다.

○ 범위 및 내용

- : (서론) 프로토콜의 목적, 유도 원리 및 주요 고려사항
- : (유도 프로토콜) 준비물, 처리 프로토콜, 세부 참고사항, 문제해결 가이드
- : (판정 프로토콜) 배수체 판정 원리, 유세포분석/염색체분석을 이용한 판정
- : (주요 형질발달) 배수체의 생존, 성장, 형태, 성숙에 관한 주요 형질 특성
- : (참고문헌)
- : (부록) 시약 및 재료, 실험자 안전 등
- : (4배체) 4배체 유생 유도 프로토콜
- : 상기와 같은 기본 구성으로 다음의 프로토콜(매뉴얼)을 제작하였음
(총 43면; 2019년 1차 draft 작성 이후 두 차례에 걸친 업데이트 수행)
- : 본 프로토콜(매뉴얼)은 제1세부프로젝트(국립수산과학원 수산종자육종연구소)와 제2세부프로젝트(부경대학교 수산과학대학)의 공동 마련 성과물임

배수체 전복 유도 프로토콜



2021년 12월

국립부경대학교 수산과학대학
국립수산과학원 육종전북보급센터

본 프로토콜은 GSP 수산물처리장에서 수행한 배수체 생산 기술 개발연구 및 특성 조사(연구과적 번호: 2130004-05-3-586209)의 결과로, 부경대학교 국립수산과학원 육종전북보급센터에서 공동 제작한 것입니다.

목 차

I. 서 론	1
I-1. 프로토콜의 목적	1
I-2. 유도 할리 및 주요 고려사항	1
II. 3배체 전복 유도	5
II-1. 시약, 재료 및 기구	5
II-2. 3배체 처리 프로토콜	7
II-3. 세부 참고 사항	9
II-4. 문제 해결 가이드	11
III. 3배체 전복 판정	12
III-1. 현미	12
III-2. 유세포분석을 이용한 3배체 판정	12
III-3. 열액자분석을 이용한 3배체 판정	15
VI. 3배체 전복의 주요 형성 발달	19
VI-1. 생존율 및 성장	19
VI-2. 체중, 개수 형성 및 체조성	20
VI-3. 생식소의 외형적 발달 특성	21
VI-4. 생식소의 조직학적 특성	23
V. 참고문헌	24
부록-1 (배수체 유도 프로토콜 사용 시약, 재료 및 기구)	25
부록-2 (상업사 안전 확보 및 취급 주의 사항)	28
부록-3 (배수체 판정 프로토콜 사용 시약, 재료 및 기구)	30
부록-4 (4배체 육생 유도 프로토콜)	33

I. 서 론

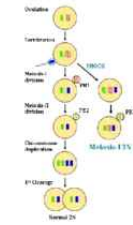
I-1. 프로토콜 목적

전복(*abalone Haliotis discus hannai*)은 연체동물강(mollusk)에 속하는 고부가치 해류종으로서 국내 해면 양식 산업뿐만 아니라 총아 수출을 위한 전략 품종으로도 중요시된다. 양식 생산성은 우량의 인공배(즉, 우양종자) 확보 여부에 따라 크게 좌우되며 때문에 전복을 대상으로 우량의 공중을 생산하기 위한 다양한 유전육종 기법들이 개발되고 있다. 이중 3배체 유도를 통한 배수체 육종 기술은 불임의 알질을 탑재함으로써 비의도적인 생식을 방지하거나 아몰이 발생에 요구되는 에너지를 체세포 성장 및 대사로 전환함으로써 부가적인 우량의 경제성을 개체에 획득해 주는 기술이다. 본 기술은 특히 총아 수출 시 수입국의 생체 유전자 오염을 최소화하거나 또는 미충만한 생물학적 재발산을 방지할 수 있는 기술로서도 중요시된다. 전복을 대상으로 한 3배체 유도 방법에 관한 실험자료들이 일부 학계에 보고된 바 있으나, 각 연구 보고서마다 그 처리 방법과 효과(유도율 및 수율 등)가 크게 다르고 또한 실제 총아생산 현장에서 바로 적용하여 사용하기 위해서는 처리 방법의 완성도와 처리 효과의 재현성이 온전히 확보되어 있지 못한 실정이다. 따라서 본 프로토콜은 고산의 GSP 전복 육종의 연구개발 자료를 토대로 3배체 전복을 고효율·고수율로 유도할 수 있는 대안법을 제공함과 동시에 배수체의 판정 및 대표적인 형질의 특성을 소개함으로써 배수체 전복을 생산 시험연구 하고자 하는 연구단체, 보급기관 및 민간 기업에 도움을 주기 위하여 제작되었다.

I-2. 유도 할리 및 주요 고려사항

1) 유도 할리

배란된 전복의 알은 정자의 수정 후 제1극체(1st polar body; PB1)와 제2극체(2nd polar body; PB2)를 순차적으로 방출함으로써 제1감수분열(meiosis)과 제2감수분열을 각각 완성하게 된다. 따라서 전복 수정란을 대상으로 제1감수분열 또는 제2감수분열을 억제(즉, 제1극체 또는 제2극체 방출을 억제)하는 처리를 통해서 정상적인 2배체(diploid) 열액체조(chromosome-set)의 구성보다 반수체(haploid) 염색체조만을 부가적으로 더 보유하게 되는 3배체(triploid) 유전형을 유도하게 된다.



2) 처리 시 주요 고려 사항

전복 수정란을 대상으로 극체 방출 억제를 통해서 3배체를 유도하기 위해서는 다음과 같은 기술적 및 요건 조건들이 적절히 통제되어야 한다.

□ 억제 대상 극체 선정

전복 수정란을 대상으로 3배체 유도는 제1극체 또는 제2극체 중 하나를 선택하여 방출 억제를 위한 처리를 수행한다. 두 단계 모두 배수체 유도가 가능하지만 처리 시점까지 배양시간을 단축할 수 있고 처리된 수정란의 생존율, 처리 효과의 영향률 등이 측면에서 보다 제1극체 방출 억제가 보다 유리하므로 본 프로토콜은 제1극체 방출 억제를 대상으로 하고 있다.

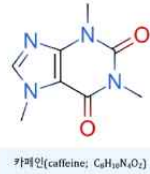


전복 수정란의 제1극체(좌) 및 제2극체(우) 방출

□ 처리된

극체 방출을 억제하기 위해서는 물리적 자극(온도, 수압 등) 또는 화학적 자극(세포분열 억제제)을 실시하는데, 선택된 방법에 따라 장단점이 다르다. 물리적 자극 처리의 경우 화살표를 사용하지 않기 때문에 실험자의 안전성 측면과 실험 취급 측면에서 좀 더 유리한 반면, 현장에서 대량 처리를 위해서 단기간 처리 용액의 온도 또는 수압을 일정하고 정밀하게 유지해야 하기 때문에 처리의 간헐성 측면에서(특히 대량 처리의 경우) 불완전이 있다. 화학적 자극의 경우 요구되는 최종 농도에 맞추어 농축시약을 사전에 준비함으로써 간단한 피서를 통해 처리 용액을 마련할 수 있으므로 현장에서 대량 처리의 간편성은 인정되지만 용해시약들의 경우 실험자의 안전성 확보를 위한 별도의 취급 주의가 필요한 단점이 있다. 본 프로토콜에서는 카페인(cafeine; C₈H₁₀N₄O₂)을 화학적 처리제로 사용한다. 카페인은 중추신경계 자극 화합물로 알려져 있으나 거의 등 이미 오랜 기간 동안 인구가 식용 섭취의 경향이 있는 화합물이다. 인간에게는 안전한 식용 화합물이지만 전복과 같은 무척추동물의 일부 종에서는 일정 농도 이상에서 세포분열을 억제하는 것으로 알려져 있다. 카페인은 상온에서 매우 안정하며, 용액의 냉각이 거의 없는 용질로서 상온에서 용해되는 것이 용이한 편이다. 전복 수정란을 대상으로 극체 방출 억제 효과를 얻기 위해서는 일반적으로 5~20 mM 범위의 카페인 농도를 이용할 수 있는데 전복의 수정란과 배(embryo)는 카페인 농도에 민감

하여 처리 농도가 높을수록 극제 방출 효과는 높아지지만 반대로 고농도의 카페인 조건에서는 생분율이 감소하고 기생 용량이 크게 높아질 수 있으므로 주의하여야 한다.



□ 수질권의 사친 배양조건

전복 수질권으로부터 극제 방출을 억제하기 위해서는 수질 유 직렬한 최초 처리 시점에 정확한 처리가 시작되어야 한다. 극제가 이미 방출된 이후에 처리가 시작될 경우 배수회류가 발생할 수 있으나, 극제 방출을 우려하여 너무 이른 시간에 처리를 시작할 경우 처리 기간이 불필요하게 길어지므로 수질권의 생분율에 부정적인 영향을 미치게 된다. 전복 수질권의 초기 발생은 비록 동일 시점에 수질 처리를 수행하더라도 수질권들 사이에 다소의 차이를 나타낼 수 있으므로 수질권의 사친 배양 기간에서는 수질권 발생을 최대한 동기화시키는 노력이 중요하다. 다른 변온동물들과 마찬가지로 전복 수질권의 발생은 온도에 따라 그 발생 속도가 크게 차우되므로 카페인의 최초 처리 시점을 결정함에 있어 수질권 배양 온도 조건을 필수적으로 함께 고려해야 한다. 본 크로모코의 사친배양 조건은 다양한 온도범위에서 제1극제 방출을 수치 조사한 결과로부터 결정된 조건이며 많은 반복 시험을 통해 배수회 유도효율과 처리 수질권의 생분율이 확인된 조건이다.

□ 카페인 처리

최초 처리시점에 카페인 처리를 개시 후 적절한 기간 동안 일정한 농도에 수질권이 카페인에 고르게 노출되도록 해야 한다. 주로 카페인 용액에 수질권을 침시켜 처리를 수행하게 되는데 배수회 유도와 수질권의 생분율을 고려하여 최적 처리 지속 기간을 결정해야 한다. 카페인 처리에서 사친 배양과 마찬가지로 온도를 고려해야 하는데 일반적으로 사친 배양 온도와 동일한 온도 조건을 이용한다. 처리 지속 기간의 경우, 극제 방출이 일어나는 구간을 포함해야 하고 이때 과도하게 긴 처리 지속 기간은 수질권의 생분율을 저하하고 기생 방출을 유발하게 되므로 주의해야 한다.

□ 처리 후 조치

카페인 처리가 종료되면 카페인 용액으로부터 수질권을 신속하게 수거할 수 있는 기술적인 방법이 사친에 계획되어 있어야 하며 불필요한 잔여의 카페인이 수질권에 남을 경우 발생 및 부하에 부정적인 영향을 미치게 되므로 여과 배수를 이용한 수질권의 세척 과정이 필요하다. 수질권 세척 중 물리적인 충격으로 인한 수질권의 손상이 일어나지 않도록 주의해야 한다. 세척이 끝난 알은 부화조로 옮겨 부화를 유도한다.

□ 요약

배수회 처리 단계별 대표적인 수질 내용과 각 단계에서의 주요 고려사항은 아래와 같다.

전복 배수회(EN) 유도를 위한 처리 단계 및 고려사항		
단계	수질 내용	고려 사항
수질권 획득	습식법에 의한 인공수질	• 수질권이 균부 • 인공수질 수 세척 • 수질 온도
사친 배양	최초 처리 시점까지 병은 배양	• 배양온도 및 기간 • 병은 살지 않음
극제 방출 억제 처리	카페인에 침지 노출	• 카페인 농도 • 처리 지속 기간 • 처리 온도 • 알맞은 노출 조건 유지
사후 처리	카페인 제거 및 배 방출 확인	• 수거 및 세척 횟수 • 수질을 및 발생 평가

II. 3번째 전복 유도

II-1. 시약, 재료 및 기구

시약·재료·기구*	용도	취급 주의 사항 등†
여과테수	• 카페인 제조 • 수질권 처리 및 세척	• 카페인 농축액 제조를 위한 테수는 0.45 μm 이하 여과수 이용 • 그 외 수질권 취급에 필요한 테수는 1 μm 이하 여과여과수 이용 권장
카페인 용액	• 극제 방출 억제	• Analytical grade 이상의 순도를 갖는 시약 이용 • 농축 용액은 냉동보관(제조 후 1주 이내 사용) • 최종 사용 농도로 희석한 용액은 제조 당일 사용
고성액	• 정지, 알, 배 시료 샘플링	• 용액 하얗게 될 시 미스크 및 보호 장갑 착용. • 폐기 시 별도 용기에 구분하여 폐기
초자 및 알희용소모품류	• 사친제조 및 시료 채취	• 일반 화학실험 기구에 적합
수중펌프	• 배수 이동 및 공급	• 사용 배수가 용량에 따라 45W~120 W 범위 사용(순전 주의)
자동온도조절기	• 사친배양, 처리, 세척 시 알은 유지	• 온도 보정 사전 점검 • 소수 전체 차지까지 표시 가능 • 연동 용량은 사용하는 알의 용량을 고려하여 결정

하터	• 알은 유지	• 알양 또는 치아를 수중 하터(200W ~ 1 kW) • 충격에 의한 치손 및 누전 주의 • 인턴 연로 상태에서 공기 노출 주의
온도계	• 배양 및 처리 온도 확인	• 사전 온도 보정(특히 디지털 방식일 경우) • 유리용 온도계를 사용할 경우 온도 표시 구간 확인
타이머	• 처리 시점 및 기간 확인	• 방수기능 권장
기포기 및 에어 연결	• 배양조 및 처리조 내 배수 순환 및 산소 공급	• 기포발생기(액엔브로워) 설치 시 진동이 배양조 및 처리조에 전달되지 않도록 주의 • 카페인 처리조에 사용하는 에어호스 및 에어호스 돌은 소독 처리 후 설치
수질권 거름 망	• 수질권 수거 및 이동	• 65 ~ 75 μm 범위 크기의 망을 사용 • 알 수거 및 이동이 용이하도록 둘 및 손잡이 설계 권장 • 망이 오염되거나 파손시 반드시 사용 후 세척 • 망 회손 또는 찢어짐이 발생하지 않도록 보관 시 주의 • 폐기 사용 전 잘 상태 점검
수조	• 사친배양, 카페인 처리, 세척	• 물리적인 충격에 쉽게 파손되지 않고 세척, 소독이 용이한 재질로 설계(폴리프로필렌 또는 이크릴 등) • 수질권 확인이 용이하도록 내부는 밝은 색이 될 수 있도록 설계 권장 • 카페인 처리조는 사용 전 소독 권장

*시약 제조 방법, 재료 및 기구의 예시는 「부록-1」 참조
†시약, 재료 및 기구의 자세한 취급 주의 사항은 「부록-2」 참조

II-2. 3째채 처리 프로토콜

A. 모래 선반, 간출지극 및 방란 방정 유도

- A.1.** 육안 검사를 통해서 방란 및 방정 유도에 사용될 실속 모래를 선별한다.
- A.2.** 모래의 배기에 부착한 부속물을 제거하고 마른 수건 또는 여과지를 이용하여 모래에 묻어 있는 수분을 제거한다.
- A.3.** 통풍이 잘되는 장소에서 모래를 뒤집어 공기 중에 1시간 간출하고, 이때 주기적으로(약 15분 간격) 모래의 물기를 제거하며 모래끼리 서로 부착되지 않도록 한다.
- A.4.** 간출이 끝난 모래는 준비한 지워신 처리액으로 2회 충분히 세척한 후 산소 포기와 알실 처리가 된 수조(100 L 기준)에 알수 각각 10 ~ 15미리씩 수용한다.
- A.5.** 수용 후 2시간째부터 매 1시간 간격으로 수조를 확인하여 산란이 이루어졌는지를 확인 후 자외선 조사 해수로 환수를 실시한다. 이때 갇힌 빛에 모래들이 노출되지 않도록 암 조건을 유지한다.
- A.6.** 최초 방란과 방정이 확인된 후 1시간 이내에 난과 정자를 수거한다. 정자는 수거 후 현미경으로 정자활성을 확인하고 바로 사용하지 않을 경우 14°C 저온 보관한다. 알은 수거 후 100 μm 여과망을 이용해 난을 회수하여 용기에 담고 난이 바닥에 가라앉으면 부유한 물순환을 조심스럽게 부여하여 세척과정을 2회 실시한다. 수경 전까지 17°C가 넘지 않는 온도에서 보관한다.

B. 인공수정, 사전배양 및 극체 방출 억제 처리

- B.1.** 인공 수정은 습수법을 이용한다. 암 1개당 약 50개의 정자의 밀도가 되도록 수거한 정자의 농도를 맞추어 암과 조심스럽게 혼합하여 수정을 유도한다. 수정은 18-19°C 여과 해수를 이용하여 생사 투입 시점을 수정시간으로 하여 시간 경과를 타이머로 측정한다.
- B.2.** 수정 2분 후 수정란 거름망을 이용하여 수정란을 18-19°C 여과 해수로 2회 이상 신속히 세척한다. 수정 후 5분 이내로 세란을 실시한다.
- B.3.** 수정 5분 채 미리 준비된 20°C 사전 양은 배양조로 수정란을 옮긴 후 수정 12분까지 배양한다.

- B.4.** 수정 후 11분 30분에 도달하면 사전 배양조로부터 수정란을 카메인 처리조로 이동시킬 준비를 시작하고 수정 12분 채 6 mM 카메인 용액이 담긴 처리조로 수정란을 침지시킨다. 카메인 처리는 처리용액은 1 L 당 60만개의 수정란 비율이 넘지 않도록 하고 온도는 20°C 환경이 유지되도록 한다. 별도의 산소 포기는 필요치 않지만 많은 양의 알이 갇힘이 지속해서 일어 없도록 주기적으로 카메인 용액의 순환이 일어나 수 있도록 조심스럽게 용액과 수정란을 천천히 섞어준다.
- B.5.** 수정 후 28분에 도달하면 카메인 처리가 종료될 수 있도록 수정란을 신속하게 수거하여 세척조로 옮긴다.

C. 처리 후 세안 및 부화 유도

- C.1.** 1차 세척조로 옮긴 수정란은 1차 세척조의 오래 방치하지 않고 곧 바로 2차 세척조로 옮겨서 세안을 실시한다. 세안은 흐르는 여과해수를 이용하여 천천히 골고루 수정란을 세척하는데 이때 사이린 또는 자아의 수용 필름을 이용할 수 있다. 세안 과정 중 물리적 충격에 의해 수정란의 막은 등이 닳아지지 않도록 주의해야 한다. 세척을 여과해수는 18-20°C로 알온 해수를 이용한다.
- C.2.** 세척이 종료되면 부화조를 설치한다. 천복의 배 방울 및 부화소요 시간은 온도에 따라서 달라지므로 부화 예상 시간을 온도에 맞추어 계획해야 한다. 부화 온도는 일반적으로 18°C 이하에서 알온 조건이 되도록 조절하여 실시한다. 처리한 수정란이 갇힘이 많지 않은 상태에서 방울과 부화가 이루어지기 위해서는 부화조 내 해수의 용량뿐만 아니라 부화조의 바닥 면적도 역시 중요하다. 일반적으로 시용 40 cm 한일 용기에 7 L의 해수를 포함할 경우 약 300,000개의 수정란을 바닥면에 고르게 퍼지도록 하면 적절하다.
- C.3.** 부화율을 측정하기 위해서 약 300개의 수정란을 위하여 바닥면이 넓은 용기(플라스틱 소형 샘플링 등)에 30-40 ml의 여과해수와 함께 수용한 후 부화를 유도한다. 부화 후 용기 내 고장액을 넣어 고정할 후 부화 용량과 미부화 배를 현미경 하에서 구분하여 부화율을 측정한다. 1회 측정 당 50개 이상의 무작위 시료를 위하여 정경하고 3회 이상의 반복 측정치로부터 평균 값을 구한다.

II-3. 세부 참고 사항

㉠ 모래 선반, 간출 및 배우자 확보

- 실속한 알수 모래는 중량이 부풀어 오른 전란 녹색의 산소와 유박액의 실속을 특징적으로 갖는다. 개체 마다 약간의 차이를 나타낼 수 있다.



- 공기 중 간출 시 공기 온도는 30 ~ 35°C로 물에서 간출 효과를 증가시킬 수 있으나 이때 공기 중 병 손상이 심 일어나도록 주의해야 한다.
- 일반적으로 수컷의 방정이 암컷의 방란보다 일찍 이루어지는 경향이 있으므로 배우자를 동시에 확보하기 위해서는 암컷의 간출과 수컷의 간출 사이에 시간 차이를 두어 실시할 수 있다. 단 필요한 시간 차이는 각 환경의 조건에 따라 다르므로 주의해야 한다.
- 자외선 해수는 일반적인 시판 수중 자외선램프(500 W 내외)를 이용할 수 있다. 단 자외선에 의해 수온이 증가하게 되므로 온도 증가분을 예상하여야 한다.
- 산란된 알은 물리적인 충격에 민감하므로 수거 및 세안 과정 시 충격이 발생하지 않도록 주의해야 한다.

㉡ 인공 수정, 극체 방출 억제 처리

- 카메인은 상온에서 용해도가 높지 않은 휘발성이다. 따라서 농축액(stock solution)을 제조할 경우 50 mM 이상의 농도를 제조할 경우 경량이 쉽게 생길 수 있으므로 주의해야 한다.
- 1,000만개 이상의 수정란을 1회에 1회량 처리할 경우 수정란을 사전 배양조에서 처리조로 이동 중 해수가 수정란과 함께 처리조로 혼합될 가능성이 높다. 이 경우 수정란을 옮긴 직후 카메인 용액을 새 카메인 용액으로 1회 환수해 주거나 또는 처리조를 1차 및 2차 처리조로 구분하여 수정란을 이동 시켜줌으로써 혼합 해수에 의한 희석을 방지할 수 있다.
- 내강 처리한 수정란의 세척은 여과 해수를 유수시켜 충분한 세안이 이루어지도록 해야 하는데, 이때 아래에 그림과 같이 수정란 거름망을 over-flow 세척조에 설치하여 세척을 실시하면 편리하다.



㉢ 부화조 설치 및 부화를 평가

- 부화 온도를 실온으로 조절이 가능할 경우 실험대 등을 설치하여 부화조들을 설치할 수 있다. 그러나 일반적으로 보다 안정적인 양산 조건을 유지하기 위해서는 수온 조절이 가능한 수조 내에 부화조를 설치하는 방법이 바람직하다. 두 경우 모두 부화조 내 난포 포기는 하지 않는다.



- 수정 2시간째 초기 난발, 수정 30시간 후 부화 용량과 미부화 난의 전형적인 모양은 아래와 같다.



II-4. 문제 해결 가이드

문제점	점검 필요사항 및 조치
배수체가 유도되지 않음	<ul style="list-style-type: none"> □ 카데인 시약 제조 오류 - 정확한 농도의 차이 용액이 제조되었는지 확인 □ 카데인 시약 오염 - 카데인 분해 미생물들에 의해 시약이 오염가능성 확인 □ 비의도적인 수정이 이루어졌음 - 저위전 배수 직후 처리 과정 및 배양차 수거 과정 중 난과 질자의 비의도적인 접촉으로 인해 수정이 일어나서 이미 극체 발출이 사전에 일어났음. 발생 단계를 확인 또는 미수정 그룹의 병행이 진행되고 있는지 확인
부하율이 매우 낮거나 기생률이 높음	<ul style="list-style-type: none"> □ 카데인 처리 농도가 과도함 - 기제인 농축액 및 희석액 제조 과정 점검 □ 난장이 좋지 못함 - 배수체 처리는 일반 2배체 경산 시보나 높은 난율을 요구함. 2배체 대조군의 수정률과 부하율이 80% 이상인지 확인 □ 수정란의 물리적 손상 - 세안, 처리 등 취급 과정 중 수정란에 물리적 손상이 아기간했음 □ 부하 배수의 오염 및 수정 점검
유생의 생존율이 매우 낮음	<ul style="list-style-type: none"> □ 일반적으로 분 프로토콜에서 생산한 배수체의 유생 생존율은 대조군의 약 80%에 해당됨. 이보다 유의적으로 낮을 경우는 기생의 빈도가 증가하였는지 확인 필요 □ 유생 사육 밀도가 너무 높음
3배체 유도 효율이 90% 미만으로 낮음	<ul style="list-style-type: none"> □ 수정 및 사친 배양 온도가 정확히 없음 - 18°C 이하의 온도 또는 22°C 이상의 온도에서는 고율을 유도가 어려움 □ 카데인 대량 처리 시 처리과정 중 수정란과 함께 배수의 혼입으로 카데인이 희석 - 1차 처리조 및 2차 처리조의 순차적 처리 또는 수정란 투입 후 카데인 용액 1회 환수

III. 3배체 전복 판정

III-1. 원리

유도된 3배체는 일반 2배체에 비해서 한수체(haploid) 염색체 조를 무가적으로 더 가지게 되므로 2배체에 비해서 세포 당 DNA 함량이 1.5배 증가하게 되고, 염색체 수 역시 2배체(2n = 36)에 비해서 1.5배 증가된 염색체 3n = 54 수를 갖는다. 따라서 배수체 판정의 원리는 세포 당 DNA의 양을 측정하거나 염색체 수를 직접 세수하는 방법이 가장 정확한 방법이다.

세포 핵 내 DNA 함량이 농약함에 따라 핵의 용적이 커지게 되는데 이에 nuclear-cytoplasmic index에 의해서 세포의 크기가 증가하게 된다. 따라서 세포의 핵 또는 세포 크기를 현미경하에서 측정하는 방법으로도 배수체 구분이 가능하다고 알려져 있다. 하지만 세포 핵 또는 세포 크기를 측정하는 방법은 슬라이드 표본을 만들 때 smear 되는 세포의 모양에 따라 발생하는 오차, 그리고 세포 유형에 따라 나타나는 모양과 크기의 편차가 크기 때문에 그 간헐성에도 불구하고 측정의 신뢰도가 높은 방법은 아니다. 따라서 본 프로토콜은 첫째 유세포분석(flow cytometry)을 이용한 배수체 판정 그리고 둘째 염색체 분석을 이용한 판정에 관한 표준 방법을 제시하고자 하였다.

III-2. 유세포분석을 이용한 3배체 판정

- 본 프로토콜에서 나타난 방법은 sysmex사의 CyFlow Ploidy Analyser를 사용한 Flow cytometry 분석법을 기준으로 설명된 방법이며 분석에 사용되는 시약들 역시 sysmex사의 CyStain PI Absolute T Kit (Order No.; 05-5023)를 사용하는 것을 기준으로 한다.
- 전복 무하 유생의 경우, 단일 개체로부터 얻을 수 있는 시료 양의 제한 때문에 배수체 판정 시 혼합 유생 시료를 대량으로 분석하는 방법을 나타낸다.
- 시제 단계 이후의 분석 시료의 경우 학자가 용이하고 생분류 후에도 생존력에 영향을 크게 미치지 않는 편을 또는 근육 조직을 이용하는 것을 기준으로 한다.
- 유생시기와 시제 단계 이후의 flow cytometry 분석 시 분석 방법을 시약 사용은 동일하다.
- 사용하는 시약의 물질안전보건자료 및 제조법 등은 부록-3에 나타내었다.

A. 시료 생분류

- A1.** 무하 유생은 시어린 등을 이용하여 최소 한 후 여과 배수로 1회 그리고 생리식염수로 1회 세척 후 거름망 또는 거운 마위를 이용하여 유생을 수거한다. 수거한 유생 시료로부터 불기름 최대한 제거한다. 수거한 유생은 바로 유세포분석에 이용할 수 있고 바로 사용하지 않고 보관이 필요한 경우는 드라이아이스를 이용하여 급속 냉동 후 냉동보관 한다. 유생은 100~200개체 혼합시료로부터 1회분의 분석용 시료를 제조하면 3회 정도의 반복 분석이 가능하다.
- A2.** 시제 단계 이후의 시료는 개체별 배수성 판정이 가능하므로 소량의 개체별 편을 또는 근육 조직을 채취하면 되는데, 약 10 mg의 시료만 3회씩 반복 분석이 충분히 가능하다. 재취한 조직은 95% 에탄올에 고정하여 냉동보관하면 반영구적으로 유세포분석이 가능하다.

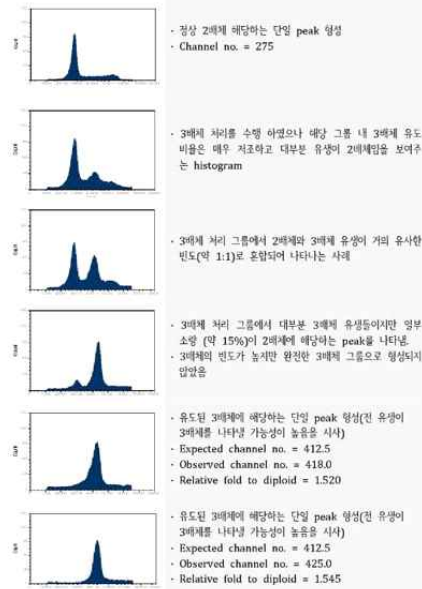
B. 세포 균질화 및 열제

- B1.** 조직 시료를 Extraction Buffer 500 µl에 넣고 균질화를 실시한다. 균질화는 1.5 mL용 소형 plastic pestle이 장착된 진동 균질기를 사용하면 편리하다.
- B2.** 균질화된 시료로부터 세포 분리가 이루어지도록 실온에서 10분간 반응시킨다.
- B3.** 균질화되지 않은 debris 등을 제거하기 위해서 30 µm Cellcris filter (Falcon)를 이용하여 잔여 세포를 선택적으로 걸러낸다.
- B4.** 걸러진 시료를 3.5 mL 시험관에 넣고 염색 시약(PI staining solution) 2 mL와 잘 혼합한다. 혼합 후 40분간 암실에서 실온 반응을 수행한다.

C. 유세포분석 및 배수체 판정

- C1.** 염색이 완료된 시료는 CyFlow Ploidy Analyser의 메뉴에 의거하여 DNA channel 값을 측정한다.
- C2.** 배수체 판정을 위해서 건복의 반수체 세포(정상 시료) 또는 정상 2배체 시료의 channel 값(X-axis)을 확인하고 3배체 처리된 시료의 channel 값과의 상대 비교를 통해 배수성을 판정한다. 배수성 판정은 동일 시료 내 channel 값의 일정한 정도(5% 이하의 편차)를 확인 후 상대 channel 값의 1.5-fold 증가 여부를 통해 판정한다.

D. 유세포분석의 배수성 판정 예시



III-3. 염색체분석을 이용한 3배체 판정

- 염색체 표준 분석은 방추사 형성 억제 화합물인 colchicine을 이용하여 중기 분열상에서 세포 분열을 정지시키는 원리를 이용한다.
- 유형을 대상으로 하는 염색체 표준 확보와 생체 조직으로부터 염색체 표준을 얻는 방법으로 구분된다.
- 유형 시기는 항성란 분열을 하는 시기이므로 유형에 직접 colchicine을 처리하여 염색체 표준을 얻지만, 상체의 경우 조직배양 과정을 거쳐야만 표준 확보가 가능하다.
- 따라서 유형시기와 염색체 표준 분석은 처리 그램으로부터 효과적인 배수체 유도가 이루어졌는지를 확인하기 위한 목적으로 주로 사용되고 현재 염색체 분석은 최종 생산된 재료의 맥락 정상성을 검증하기 위한 목적으로 사용된다.

부화 유형의 염색체 표준 분석

A. 시료 준비

A.1. 수정란을 20°C 수온에서 배양한 후 달포리(trochophore, 수정 후 16~18시간) 및 부유 유생기(veliger, 수정 후 20~30시간) 단계 유생을 시료로 이용한다.

B. 콜히친(colchicine) 처리

B.1. 0.22 μm 밀도에 액수를 여과한 여과액수에 콜히친을 녹여 0.1% 콜히친 용액을 준비
B.2. 유생 연삭액과 콜히친용액을 1:1 혼합하여 0.05% 콜히친 용액에서 20°C, 4시간 반응

C. 저장액 처리

C.1. 콜히친 처리가 끝난 유생들을 15 mL 튜브에 옮긴 후, 얼음마쉬를 실시하고 5 mL 여과액수로 콜히친 성분은 2배 희석
C.2. 여과액수 제거 후, 0.075 M KCl 용액 3 mL에 유생을 부유하여 상온 1시간 반응

D. 고정액 처리

D.1. 저장액 제거 후, 냉장 보관된 고정액(Carnoy solution (Acetic acid : Methanol = 1 : 3)) 2 mL로 유생을 부유하여 상온에서 1시간 반응, 이틀, 20은 간격으로 동일량의 고정액 용액을 교체
D.2. 다음 심혈 과정까지 4°C에서 보관

E. 핵형 분석

- E.1.** 유생이 고정되어 있는 2 mL 고정액에 1 mL acetic acid를 첨가하여 methanol과 acetic acid의 비율을 1:1로 조정
E.2. 약 40회의 피펫팅을 약하게 진탕하고 3 mL methanol을 첨가하여 다시 고정액과 동일한 비율로 methanol과 acetic acid의 양을 조정
E.3. 70% ethanol에서 4°C에 보관된 슬라이드 글라스에 유생 세포가 부유되어 있는 고정액의 20 μL drop을 3번에 걸쳐 떨어뜨림
E.4. Gurr's buffer (pH 6.8)로 희석된 10% Giemsa 염색액에 상온에서 7분간 염색을 실시하고 1차 증류수로 염색액을 세척한 후 상온에서 건조

F. 중기염색체 발현 비율 확인

- F.1.** Giemsa 염색이 완료된 각 슬라이드 글라스 내에 중기염색체 분열상이 있는 30 위치를 선정하여 200배 배율로 촬영
F.2. 중기염색체 상태에 있는 세포 수와 그렇지 않은 세포 수를 계수하고 중기염색체 상태의 세포 비율을 측정

G. 정상성 분석

- G.1.** 삼배군 별 계수가 가능한 중기염색체 세포 30개를 선정하여 각 세포의 염색체 수를 계수하고 정상 수의 염색체를 가진 세포의 비율을 측정

치폐 이후의 염색체 표준 분석

A. 전복 외부막 유래 세포 회수

- A.1.** 전복 상체의 껍 표면을 70% ethanol로 닦아 1차 멸균처리하고 외부막 부위 중 marginal zone을 회수
A.2. 회수한 조직은 20 mL의 미생물 오염제 용액(0.2 μm 여과액수에 400 U/mL penicillin, 400 μg/mL streptomycin, 250 μg/mL gentamicin, 2 μg/mL amphotericin B, 10 μg/mL phenol red)에 담겨 18°C 배양기에 넣고 배양기에 의해 보관

B. 조직 배양

- B.1.** 다음 날, 보관된 조직을 20 mL 세척액(0.2 μm 여과액수에 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin)으로 2배 희석
B.2. 조직을 4 mm² (2 mm x 2 mm)크기로 자르고 3 mL의 배양액(Leibovitz's L-15 기호배양액에 소 태아혈청 15% (v/v), 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin)가 담긴 16 mL 시험관에 옮겨 배양
B.3. 14~22일간 18°C 배양기에서 배양하고 6일마다 배지교체

C. 전복 외부막 유래 세포 고정

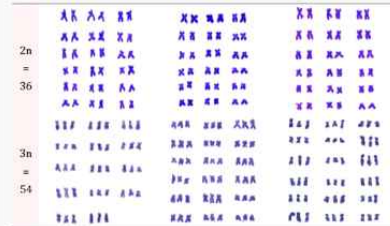
- C.1.** 배양 마시멜 날, 배지 150 μL 제거 후 10 mg/mL 농도의 콜히친 150 μL 첨가하여 18°C 배양기에서 4시간 반응
C.2. 배양 배지와 전복 조직 조각을 15 mL 튜브에 옮기고 1,500 rpm 조건에서 4분간 원심분리
C.3. 상층액 제거 후 저장액(0.075 M KCl) 6 mL 첨가하여 25°C 조건에서 45분간 반응, 15분 간격으로 피펫팅 실시
C.4. 냉장된 고정액(methanol 75% (v/v), acetic acid 25% (v/v)) 6 mL를 첨가하고, 튜브를 부드럽게 휘어줘로 뒤집어 섞은 후 최소 10분간 얼음에서 반응
C.5. 1,500 rpm 조건에서 4분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 6 mL의 고정액 첨가 후 얼음에서 30분간 반응
C.6. C.5번 과정을 2회 반복

D. 고정된 전복 외부막 유래 세포 회수

- D.1.** 1,500 rpm 조건에서 4분간 원심분리 후 고정액 제거
D.2. 50% acetic acid 1 mL 처리 후 25°C 배양기에 2분간 반응
D.3. 끝이 넓은 밀도로 피펫팅을 실시해 전복 조직으로부터 세포 분리
D.4. 분리된 세포가 담긴 고정액을 새 15 mL 튜브에 옮기고 끝을 자르지 않은 임으로 피펫팅하여 단일 세포로 분리

E. 핵형슬라이드 제작, 염색 및 핵형 판정

- E.1.** 1,500 rpm 조건에서 4분간 원심분리 후 고정액을 제거하고, 20-30 μL 고정액으로 부유
E.2. 액난올에 냉장 보관된 핵산 슬라이드 글라스(10분간 acetic acid 처리)를 꺼내고 유체로 액난올을 닦아서 제거
E.3. 최소 15 cm 이상 높아져서 세포 부유액 10-15 μL를 준비한 슬라이드 글라스에 떨어뜨림
E.4. 60°C 건조기에 슬라이드 글라스를 건조하고 25°C에서 Giemsa 염색액으로 7분간 염색
E.5. 증류수로 염색한 성분을 씻어내고 공기 중에서 완전히 건조 후 임미경으로 중기염색체 촬영
E.6. 전복 핵형(2n=36 및 3n=54)의 상동염색체는 Karyotype analysis 2.0 version 프로그램에서 제공하는 방식을 이용해 결정



Arm ratio	Centromeric Position	Chromosome Terminology
1.0	Median point	M (metacentric)
1.0 - 1.7	Median point	M (metacentric)
1.7 - 3.0	Submedian region	Sm (submetacentric)
3.0 - 7.0	Subterminal range	St (subacocentric)
7.0 - ∞	Terminal region	t (acrocentric)
∞	Terminal point	T (telocentric)

VI. 3세대 전복의 주요 형성 발달

본 장에서는 유도된 3세대 전복을 사육하였을 때 2세대와 비교하여 서육적으로 관찰되는 주요 형성들을 소개함으로써, 연구 및 양식현장에서 3세대 전복 종주의 인식부터 상태 크기까지의 사육 관리를 마련하는 데 도움 되는 정보를 제공하기 위함이다. 이에 3세대 전복의 주요 형성로서 생존율, 성장 형성, 패각의 계속 형성, 상동 크기 상형의 체조성, 그리고 생식소 발달 특성에 대해서 동일 환경에서 사육된 2세대와의 차이점을 위주로 소개하고자 하였다. 본 장에서 기술된 내용은 국립수산물관리원 육종전복보급센터(해남)의 사육연구동에서 생산된 사육된 동일 연령의 2세대 및 3세대 전복을 비교한 자료이며, 따라서 사육환경 및 관리 조건 등이 본 연구개발의 환경과 다를 경우 VI 장에서 소개한 내용 및 세부 사항에서 차이가 있을 수 있다.

VI-1. 생존율 및 성장

1) 생존율

3대체를 유도할 때 주로 카패인 찰지 또는 저온 서육법이 이용되기 때문에 수질관리와 발생 및 초기 부화 유생의 발달에 부정적인 영향을 끼칠 수 있다. 본 프로젝트에서 제시한 개체(모어) 간 차이가 관찰될 수 있다. 때문에, 부화 유생 단계에서는 아무 하악적 또는 물리적 차이를 가지지 않은 2세대 그룹보다 유생의 생존 및 탈린 관리에 더 많은 주의와 노력이 필요하다. 특히 유생 서육 중 알약 및 폐사 유생으로부터 사육 속초 내 수질 환경이 빠르게 악화될 경우 3세대 유생량 자체 때문이 아닌 수질 악화로 인한 연속 폐사발파 원인이 신속히 확인될 수 있다. 부유 유생 시기 이후 부화기에 체조 과정 중에도 역시 세심한 주의가 필요하다. 일반적으로 부화 이후 3세대 체조의 생존율은 2세대와 크게 다르지 않다. 출자 및 미성숙 단계(subadult)도 체조와 마찬가지로 생존율에 있어 3세대와 2세대 간 유의적인 생존율 차이는 관찰되지 않았다. 성숙기 도망 이후(약 2년 이후) 구간의 경우 환경 스트레스 등이 없는 인공적인 사육환경에서는 3세대의 생존율은 2세대와 크게 다르지 않다. 다만 여 출정 고추은 및 이와 연관된 자산소 환경에 노출될 경우 3세대는 2세대와 비교 시 더 높은 수준의 환경 내성을 나타낼 가능성이 크고 3세대의 생존율이 종종 우수하게 나타난다. 아울러 산란기 및 성숙기 도망 이후 2세대 성체 집단의 비비도적인 연속 산란-성장기가 일어날 때 수질 환경 악화가 빈번히 유발되고 이로 인한 일련 침입 및 폐사 가능성이 야기될 수 있다. 따라서 생산량에 제한된 3세대는 경우 무병발파 및 연속적인 집단 산란-성장 가능성이 없으므로 이로 인한 폐사 위험도가 2세대보다 훨씬 작을 수 있다.

2) 성장

3세대 생산은 돌입 가능 달계를 주축적으로 수행되지만, 생식소 성숙 억제 특성으로 인해 성장 등 다른 양적 형성 발달에 더 많은 투자가 가능한 잠재력을 갖게 될 수 있다. 따라서 3세대가 2세대와 차등 성장 형성의 발달은 2세대가 성 성숙 나이에 도달한 이후부터 진행될 것이다. 생산 환경 및 사육조건에 따라서 차이가 있지만, 일반적으로 2년 이후부터 3세대 그룹에서 2세대 대비 성장 개선 효과가 관찰되며, 중형 기준 형성 정도는 약 30%로 나타난다. 본 성장 형성 비교는 일반전복과 육종 배수체 전복의 비교에 관한 것으로, 제1해부 프로젝트 기간에서 사육연구동 및 사립 농장 민간 양식장에서 관찰한 결과이다.

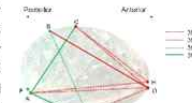
총 중량의 항상 효과 외에 배수체 전복에서 관찰되는 또 하나의 특징은 체양의 변화를 들 수 있다. 배수체 전복의 성장 개산이 뚜렷해지는 3-4년간 연령에 도달할 때 많은 배수체 개체들은 2세대와 비교 시 높은 체고를 나타내는 특징이 있다. 해당 3세대 개체들의 높은 체고는 패각의 지고 형성과는 크게 연관이 없으며, 연체 가시부 두께가 증가하는 변화에 기인한 것으로, 3세대의 경우 총 중량 중 연체 가시부 중량의 비율이 2세대보다 큰 관찰이 있다.



VI-2. 패각 계속 형성 및 체조성

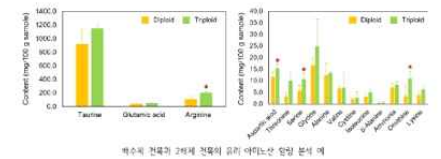
1) 패각 계속 형성

2세대와 3세대 간 패각의 계속 형성 차이는 초기 발달에서는 거의 관찰되지 않지만, 성숙 나이를 가까워질수록 도달하면 그 차이가 선명해지기 시작한다. 오른쪽의 그림은 2세대와 3세대의 패각 계속 형성 분석에서 성장단계별로 통계적으로 유의미한 차이를 보이는 패각의 특징을 도식화한 것이다. 그림에서 보듯이 3세대는 2세대보다 패각 앞부분(anterior part)의 성장과 연관된 지표들에서 유의적으로 큰 값을 나타내며 반면 패각의 뒷부분(posterior part) 성장과 연관된 지표들에서 2세대와 비교 시 작은 값을 갖는 특징이 있다. 이러한 3세대의 패각 형태에 관한 특징은 전복의 성장 발달 단계가 진행될수록 뚜렷해지며 이 시기의 배수체 전복이 2세대보다 큰 비전도와 성장 개선 효과를 보인다는 결과에도 유의미한 상관관계가 있다.



2) 체조성

일반 성분 분석(proximate analysis)을 통해서 3세대는 수분(moisture), 회분(ash) 및 조지방(crude fat)에서 2세대와 유의적인 차이가 없었으나 조단백(crude protein)에서 2세대와 비교하여 약 1.3배 높은 함량을 나타내었다. 유리 아미노산 분석에서 2세대 및 3세대 모두에서 가장 높은 함량을 보인 아미노산들은 타우린(taurine), 아르기닌(arginine) 및 글루탐산(glutamic acid) 이었고, 3세대는 이들 아미노산 함량에서 2세대보다 1.2-2배 높은 함량을 보였지만 개체간 편차도 인해 통계적 유의차가 항상 식별되지는 않았다. 지방산의 경우 3세대와 비교 시 3세대가 더 높은 함량을 보였으며, 특히 펜타데칸산(pentadecanoic acid), 팔미트산(palmitic acid), 팔미트레산(palmitoleic acid), 스테아르산(stearic acid), 올레산(oleic acid)에서 2세대와 3세대간 통계적 유의차가 관찰되었다. 본 조사 결과는 동일 사육장소(육종전복보급센터, 해남)에서 최소 6개월 이상 성장한 2세대와 3세대 성체 전복을 대상으로 조사한 결과로서 배수체의 차동형성 방법 조정을 통해서 최종 식용 상품의 품질(및 영양)을 개선할 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 그러나 체조성의 경우 사육환경 및 먹이 등에서 변이될 수 있으므로, 추후 다양한 사육환경과 시온에서 추가적인 조사가 보완되어야 할 필요성이 있다.



배수체 전복과 2세대 전복의 유리 아미노산 및 지방 분해

VI-3. 생식소의 외형적 발달 특징

유도된 3세대는 높은 생식소 발달(2방의 생식소)을 유지하기 때문에 일반적인 2세대(2방의 생식소)에 비해 더 많은 생식소 발달을 기대할 수 있다. 그러나 3세대는 생식소 발달이 지연될 수 있다. 때문에 갈수분말이 매우 지연되거나 강해를 받게 되고 생식 배수체(gamete)의 형성을 위한 생식소의 발달이 필수 모두에서 2세대와 비교 불일치하게 된다. 이러한 생식소 발달 억제 또는 지연의 원인은 전복에서도 공통적으로 관찰되는데, 일반적으로 전복의 기능적인 온천한 성숙이 2년 이후에 도달하는 것을 고려하여, 본 연구에서는 2년산으로 기준으로 3세대 전복과 2세대 전복의 생식소 발달을 소개하고자 한다.

1) 알약

2세대의 경우 2년간 연령에 도달할 경우 진한 녹색의 성숙 난소 포함하는 잘 발달된 난소를 나타내며, 전복은 다른 패류종과 마찬가지로 간헐적으로 들어오는 생체 생식소가 발달하는데, 충분히 성숙한 알약의 경우 난소 조직이 간헐적으로 대부분을 덮게 되고, 육안적으로 두툼이 부풀어 오른 녹색의 난소를 쉽게 확인할 수 있다. 반면, 전복에서 3세대 동일 연령(2년)에 도달하여도 난소의 충분한 성숙이 거의 일어나지 못한다. 이 시기에 3세대 전복의 대부분 알약은 2세대에서처럼 간헐적으로 덮는 녹색의 난소를 형성하지 못하기 때문에 간헐적으로 색이 그대로 표현되는 것이 일반적이며, 이 경우 육안으로 이용한 알수 판정이 종종 어렵다. 일부 예외적으로 간헐적으로 난소 부위에 난소 조직이 발달하는 개체들이 관찰될 수 있다.



2) 수컷

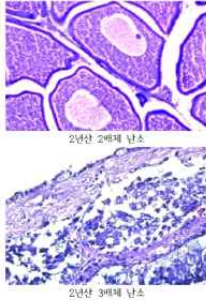
2세대 수컷의 경우 2년산에 도달하면 유색의 잘 발달된 정소를 표현할 수 있으며, 간헐적으로 대부분을 덮는 정소는 산란기에 충분히 부풀어 올라 있다. 반면 3세대 수컷의 경우 동일 연령 시기에서 알약과 마찬가지로 2세대와 비교 불일치한 잘 발달된 정소를 나타내며, 하지만 수컷 3세대들은 알약 3세대들에 비해 조금 더 진한 정소 발달을 보이는 개체들의 빈도가 높다. 많은 3세대 수컷 개체들은 2년산 간헐적으로 발달하는 정소를 보이지만, 일부 개체들은 2세대 수컷처럼 산란 시에는 간헐적으로 전부를 덮는 체로 발달한 정소를 관찰할 수 있어 마치 조금 더 성숙한 2세대 수컷의 형태가 유사하다. 하지만 충분히 성숙한 2세대 수컷의 정소와 비교해 보면 3세대 수컷에서 발달한 정소는 그 크기가 상대적으로 작을 뿐이고, 정소의 색깔이 밝은 유색에 이르지 못한 채 황색을 띠는 것이 일반적이다.



VI-4. 생식소의 조직학적 특징

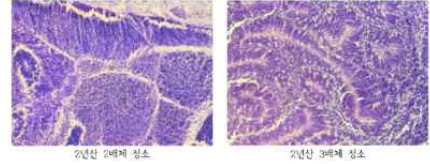
1) 알컷

동상의 조직학적 분석법을 이용하여 생식소 조직의 결편을 만들어 현미경으로 관찰할 경우, 2년 산 알컷은 상측, 산란시즌에 잘 발달한 상측 난 모세포를 보유하고 있으며 난황을 충분히 축적하여 크기가 큰 난모세포로 가득 찬 난소 조직을 관찰할 수 있다. 반면 이 시기의 3배체 알컷은 생식소 의방에서 유출할 수 있듯이 조직학적인 분석에서도 난황을 충분히 축적한 발달한 난모세포를 관찰하기가 매우 어렵고, 일부 소수의 난모세포가 관찰되더라도 그 크기가 매우 작거나 발달 정도가 2배체에 비해서 크게 퇴행하여 있음을 알 수 있다. 많은 미성숙 3배체 알컷의 경우 간 배강과 생식소 의방 사이의 생식강(gonadal cavity)이 비어지 있는 상태로 관찰되는 것이 일반적이다.



2) 수컷

조직학적 분석을 통해 2년 산 생식 시즌의 2배체 전복 수컷의 정소 내에는 이미 많은 정모세포들이 감수분열을 마치고 형태학적 분화를 거쳐 정세포(spermatid) 및 꼬리를 갖는 정자(sperm)로 발달해 있는 것을 쉽게 관찰할 수 있다. 반면 동일 연령의 3배체 전복 수컷들은 2배체에 비해서 다소 늦은 발달을 나타낸다. 일반적으로 외관상 정소의 발달이 극히 미소적이거나 발달 상태가 낮은 수컷 3배체들의 정소에는 미분화 상태의 정원세포들이 쉽게 관찰되는 반면, 외관상 견해감을 충분히 담은 정소의 경우 일부 정원세포, 제1정모세포, 그리고 다수의 제2정모세포들이 관찰 가능하다. 하지만 2년 산 3배체 수컷의 정소 경우 형태학적 변화를 거친 정세포 또는 정자를 조직학적으로 관찰하기는 어렵다. 2년 산 3배체 수컷 전복의 경우 정자형성과정에서 최종 정숙단계로의 진입은 일어나지 않는 것이 일반적이다.



VI. 참고 문헌

Arai K, Naito F, Fujino K. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1986;52(3):817-22.

Lee YJ, Nam BH, Lee JY, Chang YJ. Maturity and spawning of the triploid Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *The Korean Journal of Malacology* 2013;29(2):105-11.

Kim CH, Kim EJ, Seo C, Park CJ, Nam YK. Transcriptome expression profiles between diploid and triploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) juveniles in response to acute heat-stress and hypoxia treatments. *Marine Genomics* 2021;57:1008020.

Kim CH, Park CJ, Kim EJ, Nam YK. Transcriptional modulation patterns of abalone *Haliotis discus hannai* hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in interdependent cross-talks between hypoxia, infection, and environmental stresses. *Aquaculture Reports* 2021;19:100566.

Kim EJ, Kim SJ, Park CJ, Nam YK. Characterization of testis-specific serine/threonine kinase 1-like (TSSK1-like) gene and expression patterns in diploid and triploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai* Gastropoda: Mollusca) males. *PLoS ONE* 2019;14(12):e0216022.

Okumura SI, Arai K, Harigaya Y, Eguchi H, Sakai M, Sembolona H, Yamamoto K. Highly efficient induction of triploid Pacific abalone *Haliotis discus hannai* by caffeine treatment. *Fisheries Science* 2007;73(2):237-43.

Park CJ, Kwon MS, Kim EJ, Nam YK. Improvement of cold-shock treatment conditions for triploidy induction in Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *The Korean Journal of Malacology* 2018;34(4):191-200.

Ryu JH, Lee SY, Nam YK, Gong SP. Non-lethal method for the preparation of metaphase spreads using cultured mantle tissue from live adult abalone. *Biotechnology* 2018;65(1):33-36.

부록-1: 배수체 유도 프로토콜을 사용 시약, 재료 및 기구

[주의] 본 매뉴얼에서 명시하고 있는 시약 및 기구와 제품들은 아래를 들어 위한 예시일 뿐, 매뉴얼에서 수명하고자 하는 활동을 위해 최우선 또는 필수적인 사항들이 아닐 수 있습니다.

시약: 카페인(Caffeine), 포르말린(Formalin)
 재료 및 기구: 0.45 μ m membrane filter, Vacuum pump, 여과정 필터, Stirring plate, Magnetic bar, 울라스트릭 소모품 펌, 초자 및 일회용 소모품 튜, 수증 펌프, 자동온도조절기, 히터, 온도계, 타이머, 키보드, 수증량 저울, 수조

□ 여과해수

A. 카페인 농축액 제조를 위한 해수

- 필터 해수는 0.45 μ m 여과 막 membrane filter (corning #430516)를 이용해 여과 후 사용한다.
- 여과 시 사용된 기구는 Ulvac사의 MDA-006 Vacuum pump를 사용하였다.
- Vacuum pump 사용 시 Hg vacuum을 너무 높게 하여 filter가 파손되지 않도록 주의한다.



B. 수증량 처리 및 세척을 위한 해수

- 1 μ m 이하의 여과정 필터를 이용하여 여과한다.
- 해수가 들어가는 in 부분과 여과되어 나오는 out 부분을 확인하여 설정한다.
- 하루정도의 내부 길이 보다 하도한 필터 사용은 압력 내재지도 파손될 수 있으니 길이에 맞는 필터를 사용한다.
- 수증과 튜를 너무 길게 조이면 허용압력 내에서 파손될 수 있으니 튜를 세지 않을 정도로 조인다.
- 화학성분이 있는 액체는 사용을 피한다.



□ 카페인(caffeine)

A. 30 mM 카페인 농축 용액

카페인(caffeine; C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂)	5.82 g
0.45 μ m 여과 해수	1 L
Total	1 L

- Stirring Plate와 Magnetic bar를 이용해 속도를 조절해 가며 용해한다.
- 실험 시 사용된 Stirring Plate는 CORNING사의 모탈렉 PC-620D 제품이다.
- 용해 시 카페인용액에 다른 물질이 들어가지 않게 주의한다.

B. 배양 사용농도 카페인 용액

30 mM 카페인 농축 용액	1 L
0.45 μ m 여과 해수	4 L
Total	5 L

- 최종 처리 농도에 따라 용액이 100%가 아닌 20% 정도로 희석하여 사용한다.
- 카페인 용액(배양 용액)에 용해된 농도를 높게 제조한다. 배양 용액 1 L 당 50,000개를 넘지 않는 것이 좋다.
- 정기간 보관은 피한다.

□ 포르말린(Formalin)

40% formalin (CH ₂ O)	3 mL
1 μ m 이하 여과 해수	27 mL
Total	30 mL

- 무해성 측정 등을 위해서 얼마나 무해 용액이 단기간 고장을 위한 목적으로 제조한다.
- 배양체 처리 후 무해를 측정 수증량은 약 300개 정도를 별도로 담아 무해를 유도할 수 있는 조건을 이용한다.
- 유독 위험물이므로 취급에 주의한다.

□ 수증펌프

- 수증인 배양, 배양 등 해수가 필요할 경우 작은 용의 해수를 일정한 속도로 흐르게 하거나 미세 시점 때 확인한다.
- 사용목적에 따라 자동 수(7W-120W)가 적절인 제품을 이용한다. 난해 물리적 충격이 가해지지 않도록 용량 선택에 신경해야 한다.
- 누전을 주의해야 한다.



□ 자동온도조절기

- 배수체 처리, 사전 배양, 수증 등에 일정한 온도를 유지할 때 사용한다.
- 온도 조절 범위와 인자가 다르므로 연결할 수 있는 하위의 온도를 미리 확인해야 한다.
- 정확한 상태를 위해서는 표준 온도계로 자동온도조절기에 표시되는 온도를 보정할 필요가 있다.



□ 초자 및 일회용 소모품 튜

- 시약제조 및 시료 채취를 위한 목적
- 일반 화학실험 기구에 따른

3-2. 염색체분석을 이용한 배수체 판정

A. 부화 유생의 염색체 표본 분석

시약 : 콜히친(Colchicine), 염화칼륨(KCl), 고정액(Carnoy solution), 초산(Acetic acid), Methanol, 시약용 에탄올, Gurr's buffer (pH 6.8), Giemsa 염색액
 재료 및 기구 : 0.22 μm 필터 된 여과해수, 15 mL 튜브, 얼음, 피펫, 200 μL, 1000 μL, 슬라이드 글라스, 멸균 증류수, 1차 증류수, 고정용 광학 현미경

시약 조제법

□ 콜히친(Colchicine)

Colchicine	100 mg
여과해수	100 mL
Total	100 mL

• 보관법 - 상온 또는 4°C 보관하여야 한다.

□ 70% 에탄올

시약용 에탄올	7 mL
멸균 증류수	3 mL
Total	10 mL

• 보관법 - 상온 보관하여야 한다.

□ 0.075 M 염화칼륨(KCl)

염화칼륨(KCl)	560 mg
멸균 증류수	100 mL
Total	100 mL

• 보관법 - 상온 보관하여야 한다.

□ 10% Giemsa 염색액

Giemsa 염색액	1 mL
Gurr's buffer (pH 6.8)	9 mL
Total	10 mL

• 보관법 - 영하에서 상온 보관하여야 한다.

□ 고정액(Carnoy solution)

초산(Acetic acid)	2 mL
Methanol	6 mL
Total	8 mL

• 사용 시 주의를할 - 제조 후 24시간 이내에 사용의 이치므로 밀폐한 용기를 보관하여야 한다. 보관: 4°C 보관하여야 한다.

B. 치해 이후의 염색체 표본 분석

시약 : 에탄올, Penicillin, Streptomycin, Gentamicin, Amphotericin B, Phenol red, 콜히친(Colchicine), 염화칼륨(KCl), 초산(Acetic acid), Methanol

재료 및 기구 : 여과 해수, 배양기, Leibovitz's L-15 기초배양매지, 소 태아양상, 15 mL 튜브, 원심분리기, 멸균 증류수, 피펫, 200 μL, 1000 μL, 글러브, 얼음, 슬라이드 글라스, 유지, 60°C 건조기, 고정용 광학 현미경, Karyotype analysis 2.0 version 프로그램

시약 조제법

□ 70% 에탄올

• 부화 유생의 염색체 표본 분석의 시약 조제법 참고

□ 오염제거용액

여과해수	20 mL
Penicillin	8000 IU
Streptomycin	8 mg
Gentamicin	5 mg
Amphotericin B	0.04 mg
Phenol red	0.2 mg
Total	20 mL

• 보관법 - 4°C 보관하여야 한다.

□ 세척액

여과해수	20 mL
Penicillin	2000 IU
Streptomycin	2 mg
Total	20 mL

• 보관법 - 4°C 보관하여야 한다.

□ 배양매지

Leibovitz's L-15 기초배양매지	8.5 mL
소 태아혈청	1.5 mL
Penicillin	1000 IU
Streptomycin	1 mg
Total	10 mL

• 보관법 - 4°C 보관하여야 한다.

□ 10 mg/mL 콜히친(Colchicine)

Colchicine	100 mg
멸균 증류수	10 mL
Total	10 mL

• 보관법 - 상온 또는 4°C 보관하여야 한다.

□ 0.075 M 염화칼륨(KCl), 고정액(Carnoy solution)

• 부화 유생의 염색체 표본 분석의 시약 조제법 참고

□ 50% 초산(Acetic acid)

초산(Acetic acid)	5 mL
멸균 증류수	5 mL
Total	10 mL

• 보관법 - 상온 보관하여야 한다.

□ 10% Giemsa 염색액

• 부화 유생의 염색체 표본 분석의 시약 조제법 참고

부록-4: 4배체 유생 유도 프로토콜

4배체 유도 프로토콜(참전복 4배체 유생)





□ 목적 및 프로토콜의 범위

- 3배체 진북의 대량생산을 보다 간편화하기 위한 4배체 생산. 생산된 4배체로부터 배우자를 확보하여(2배체 배우자) 2배체 진북의 반수체 배우자와 교배하여 3배체를 생산하기 위한 것이다.
- 본 프로토콜은 4배체 진북 유생을 유도하기 위해 치내생식 암시과 복합 처리(물리적 처리 + 화학적 처리)에 의한 극체의 연속 역제를 기반으로 제작된 프로토콜이다.
- 4배체 유도 처리조건으로 제 1년간 억제발성과 극체 연속발생 억제 방식에 대해 다양한 조합을 평가 후 신발한 조건이 수록되어 있으며 4배체 및 다양한 배수체들이 일부 혼합되어 나타나는 것을 최소화하기 위해 자생발생방생시의 4배체를 유도하는 처리 조건을 이용하는 조건이다.
- 본 프로토콜을 이용할 경우 수정란에 복합치료를 통해 4배체 유생이 효과적으로 얻어지고 처리된 유생 중 고면도로 4배체를 집중시킬 수 있다.
- 그럼에도 불구하고 아직 생존력 있는 4배체의 수율(yield)은 3배체에 비해서 지금껏 낮아 이에 관한 추가적인 개선이 필요한 상태이다. 따라서 본 프로토콜은 4배체 유생을 실질적으로 얻고자 하는 연구자를 위한 것이며, 대량 처리를 통해서 4배체 집단을 생산하려는 기업을 대상으로 하지 않는다.

□ 처리 시 주의사항

[배수체 감전복 유도를 위한 표준 프로토콜]의 3배체 부분을 참조

□ 시약, 재료 및 기구

시약-재료-기구	용도	취급 주의 사항 등
저온해수	• 물리적 자극을 통한 극체 발출 억을 유도	• 1 μm 필터로 여과된 해수를 사용하여 세척 • ± 0.5 °C 내외의 범위에서 온도가 유지 될 수 있도록 함
저온치미르	• 물리적자극 처리	• 온도유지가 용이한 재질의 용기를 사용 • 물리적 충격에 쉽게 파손되지 않으며 세척 및 소독이 용이한 재질을 선택
드러미어이스	• 배수체 분석을 위한 유생의 급속냉동	• 저온화상주의 • 물리적 충격 및 저온노출에 쉽게 파손되지 않는 재질을 사용하여 보관
자외선조사기	• 장자의 유전물질 파괴	 • 자외선 노출주의 • 안전장비 착용   

이와 4배체 유도에 사용되는 시약, 재료 및 기구는 [배수체(3N) 참전복 유도를 위한 표준 프로토콜]을 참조

□ 4번째 처리 프로토콜

1. [참고 01]과 같은 방법의 산란자극을 통해 모래로부터 정자와 미수정란을 얻는다.

참고 01	성숙된 모래로부터 산란자극을 통한 정자와 미수정란 확보
1.	산란자극에 사용되는 알갱이 생식소는 진한녹색, 수컷이 생식소는 유백색과 같은 색을 나타내는 것을 사용한다. 또한 모래는 적산수온을 맞출 수 있는 시설에서 사육한다.
2.	선발된 모래는 다른 수건 등을 사용하여 모래에 묻은 수분을 제거한다.
3.	알갱이 및 수컷 모래는 1시간 동안 30~35°C의 공기중에서 건조하여 산란자극을 거른다.
4.	간출된 모래는 산소포기가 및 알살처리가 된 수조에 저외선 조사해수와 함께 수용한다. 이때 사용되는 저외선등은 시킨되는 수중 저외선램프(500 W 내외)를 사용 할 수 있다.
5.	저외선 조사 해수에 수용 후 2시간배양 1시간 간격으로 2~3회 환수하여 산란 및 방정여부를 확인한다.
6.	확보된 정자와 난은 사용전까지 12~15°C에 보관한다.

2. 확보한 정자는 [참고 02]에 따른 저외선 조사기를 이용하여 [참고 03]과 같이 저외선에 노출시킨다.
 3. 저외선 조사된 정자와 난을 수정시켜 수정란을 확보한다[참고 04]
 4. 확보된 수정란은 20°C 염온수조로 옮겨 자극된 처리 전까지 배양한다.

참고 02	정자의 저외선 조사기의 조건
1.	UV-c 타입의 15W, 254 nm 저외선 조사등을 사용한다.
2.	실용 수형전 저외선등(UV light)을 10분간 예열한다.
3.	정자와 저외선 조사용기의 거리는 10 cm로 설정한다.
4.	저외선 조사에 사용될 정자는 15 cm 유리메트리디쉬에 용어 저외선 조사를 한다. 이때 사용되는 유리메트리디쉬는 에탄올로 소독하여 준비한다.
5.	해당 정자에 고르게 저외선 조사가 될 수 있도록 헤이커를 사용하여 3 rpm 속도로 정자를 혼합한다.

참고 03 정자의 저외선 조사

1. 정자의 저외선 조사에 사용되는 조사기는 아래 기준을 따른다
2. 사용되는 정자의 농도는 2×10^7 sperms/mL 이상으로 설정한다.
3. 15 cm 유리메트리디쉬에 정자를 4 mL 넣는다.
4. 페트리디쉬 선반에 고르게 정자를 고르게 받는다.
5. 헤이커의 속도를 3 rpm으로 설정하고 해당 정자에 30초 동안 저외선 조사를 거한다.

참고 04 저외선 조사된 정자와 난을 이용한 수정란 확보

1. 미수정란이 1000 eggs/mL의 농도로 들어있는 혼탁액 300 mL에 저외선 조사된 정자 15 mL를 섞어 수정을 유도한다.
2. 수정은 2분 30초간 수행한다.
3. 유도된 수정란은 75 μm 망에 담아 2분간 여과해수로 세척, 잉여의 정자를 제거한다.
4. 수정에 사용되는 해수는 1 μm 필터로 여과된 해수를 사용한다. 사용되는 해수는 20°C로 설정한다.
5. 수정된 수정란은 20°C 염온수조에서 자극된 처리전까지 배양한다.

5. 수정된 수정란에 [참고 05]과 같이 물리적 자극 수행
 6. 물리적 자극 노출종료 즉시 [참고 06]과 같이 준비된 화학적 자극액에 노출

참고 05 수정란의 난할억제를 위한 물리적 자극원 제작 및 처리

1. 저온저리를 위한 1°C 저온 해수 제작
 - 1) 저온 해수를 제작하기 해수를 1 μm 필터로 여과한다.
 - 2) 여과된 해수는 -20°C에 얼려 저온 저외선의 온도를 낮추는데 사용한다.
 - 3) 여과된 해수로 제조된 저온해수는 온도 유지가 용이하며, 수정란이 담긴 75 μm망이 충분히 담길 수 있는 크기의 처리조에 보관한다.
2. 수정 11분 후 물리적 자극 처리를 위해, 20°C 염온수조에서 배양중이던 수정란을 수정란이 담긴 75 μm망과 함께 저온 처리조로 신속히 옮겨 12분간 처리한다.
3. 수정란이 출몰 이루어 보이지 않도록 지속적으로 조심스럽게 수정란을 섞어준다.
4. 저온저리시, ±0.5°C 범위 이내로 유지 될 수 있도록 유의한다.

참고 06 수정란의 난할억제를 위한 화학적 자극원 제작 및 처리

1. 자극원 처리를 위한 카페인 제조
 - 1) 0.45 μm 필터를 사용하여 카페인 솔루션 제조에 사용될 해수를 여과한다.
 - 2) 70% 알코올로 소독된 10L 비커에 여과해수 4L와 카페인 29.13 g을 넣는다.
 - 3) 교반기와 마그네틱 바를 사용하여 카페인을 녹인다.
 - 4) 5L 맥스삼인더로 해당 솔루션을 옮기고 여과해수를 사용하여 5L 까지 mass-up하여 30 mM의 카페인 농축액을 제조한다.
 - 5) 제조된 카페인 농축액은 4°C에 보관한다.
 - 6) 자극원 처리 전, 카페인 농축액을 해수로 1/5로 희석하여 6 mM로 제작 후 자극원 처리에 사용한다.
 - 7) 자극원 처리를 위한 카페인 솔루션의 온도는 20°C로 설정한다.
 - 8) 해당 솔루션은 요염을 최소화 할 수 있으며, 수정란이 담긴 75 μm망이 충분히 담길 수 있는 크기의 처리조에 보관한다.
2. 저온 처리 직후, 수정란이 담긴 75 μm망에 묻은 해수를 최소화 하여 카페인 6 mM 처리조로 옮겨 16분간 노출시킨다.

7. 잉여의 자극 처리된 재료를 위한 세안[참고 07]
 8. 처리된 수정란의 부화유도[참고 08]

참고 07 자극원 처리가 종료된 수정란의 세안

1. 화학적 처리가 종료된 수정란은 20°C 해수로 세안하여 잉여의 카페인용액을 제거가 필요하다.
2. 처리 완료된 수정란은 1차 세척조로 이동 후 해당 1차 세척조에서 오래 방치하지 않고 2차 세척조로 옮겨 세안을 수행한다. 이때 흐르는 해수를 사용하여 충분히 세안한다.
3. 세안에 사용되는 해수는 1 μm 필터로 여과된 해수를 사용하며, 수온은 20°C로 유지하여 사용한다.
4. 세안 과정 중 물리적 충격에 의해 수정란이 손상될 우려를 주지 않도록 주의한다.

참고 08 처리된 수정란의 부화유도

1. 처리가 종료되어 잉여의 자극원이 제거된 수정란은 1 μm 필터로 여과된 해수에서 부화유도한다.
 2. 부화유도에 사용되는 부화조는 부화조액의 해수용량과 부화조의 비단면적을 고려하여, 처리된 수정란들이 겹치지 않도록 충분한 크기의 부화조를 사용한다.
 3. 부화 유도시 수온은 20°C으로 유지된다.
9. [참고 09]의 방법으로 처리된 수정란의 수정을 확인
 10. [참고 09]의 방법으로 부화유성의 부화를 및 정상개체 인도를 확인
 11. 부화유성의 배양성 확인

참고 09 처리된 수정란의 수정률과 부화유성의 부화율, 부화유성의 정상개체 유도(%) 확인

1. 처리된 수정란의 수정율은 제 2세포기로 도달한 수정란을 기준으로 확인한다.
2. 부화율 측정을 위해, 수정란 약 300개를 30~40 mL 해수에 담긴 소형 부화용기에 옮긴 후 수정 24시간째 부화용기의 시료 전체를 formalin으로 고정하여 부화 및 미부화한 개체로부터 부화율을 확인한다. 이때 사용되는 소형 부화용기는 바닥면이 충분히 넓은 것을 사용하며, 고정액으로 사용되는 formalin은 4%가 되도록 처리한다.
3. 부화유성의 정상개체 인도를 veliger 단계의 부화유성으로부터 설모와 shell의 모양 등을 기준으로 정상성을 확인한다.

- 참고주의 사항
 [해수(GN) 참전복 유도를 위한 표준 프로토콜]을 참조

□ 4N 배수성 확인 프로토콜

- 유도된 4배체 유생은 2배체와 비교하여 세포 당 DNA 함량이 2배 높은 특성을 가진다. 따라서 차이군의 배수성 확인은 유세포 분석을 통해 세포의 DNA함량을 확인 할 수 있다.
- 아래 분석방법은 sysmex cit의 CyFlow Ploidy Analyser, Cube6을 사용하여 분석을 수행하였다. 유생분석을 위한 시약은 Sysmex cit의 PI Absolute T kit를 사용하였으며 그 방법은 manual 방법을 따라 수행되었다.

방법

1. 부화유생의 배수성은 부화초에서 부화한 유생을 수집 후, 유세포 분석을 통해 확인한다.
2. 유세포 분석을 위한 부화유생은 분손률이 현저히 낮도록 사이린 및 카이벳 등으로 유생을 수집한다.
3. 수집된 유생은 염색을 이용하여 유생의 운동성을 낮춘 후 1.5 ml 튜브에 불순물과 배수를 제거한 부화유생을 담는다. 이후 해당 유생을 직접 유세포 분석에 사용하거나, 드라이아이스를 이용하여 급속냉동된 시료를 분석 전까지 -80℃에 보관한다. 부화유생의 수집방법은 [참고 10]을 확인한다.

참고 10 배수체 분석을 위한 부화유생의 수집

1. 부화초 상층에 부화된 유생을 수집하기 위해 transfer pipette를 사용하여 잡거나, 8 mm 호스를 사용 사이린하여 수집한다.
2. 해당 도구를 사용하여 유생 수집시, 물리적 충격을 최소화하여 수집한다. 특히, 사이린 방법으로 유생을 수집할 때 낙자에 의한 물리적 충격을 최소화 하기 위하여 유생이 수집되는 망울 여과 배수에 담긴 상태로 사이린한다.
3. 부화유생은 거름망을 통해 회수하고, 여과액을 이용하여 1회 세척한다.
4. 세척된 시료는 고니알 필터의 튜브로 옮기고, 해당 시료로부터 배수를 최대한 제거하기 위해 얼음 마위를 통해 유생의 운동성을 낮춘다.
5. 해당 시료로부터 상층부의 배수를 제거, 배수가 제거된 시료만은 1.5 ml 튜브에 담아 분석 또는 보관한다.

참고 11 부화유생의 배수성 확인

1. 시료가 담긴 1.5 ml tube에 extraction buffer 500 µL을 넣고 전동균질기를 이용한 균질화를 실시한다.
2. 균질화된 시료를 실온에서 10분간 반응한다.
3. Debris등을 제거하기 위해 30 µm Celltrics filter (Falcon)를 이용하여 3.5 ml tube에 거른다.
4. 걸러진 시료는 2 mL의 염색시약(PI staining solution)과 혼합한다.
5. 혼합된 시료는 40분간 암실에서 실온반응 후 분석에 사용한다.

4. 불순물이 제거된 부화유생은 [참고 11]에 표기된 마와 같이 kit의 manual방법으로 세포의 균질화 및 염색을 실시한다.
5. [참고 12]와 같이 염색된 시료로부터 배수체 판정

참고 12 부화유생의 배수성 확인

1. CyFlow Ploidy Analyser의 manual방법에 따라 결과가 완료된 시료의 배수성을 측정한다.
2. 배수체 판정을 위해 분석용 대조군 시료로서 전복의 정지(만수체), 2배체 전복 및 3배체 전복을 사용한다.
3. 대조군 시료의 channel 값을 확인하고, 이와 배수체 차이군의 channel값을 비교하여 channel값의 fold값을 계산, 시료의 배수성을 확인한다.
4. 샘플분석 시 마다 증류수로 기기를 세척하여 샘플간 혼합을 최소화 한 후 분석을 수행한다.

주 의

본 프로토콜은 해양수산부-농림축산식품부의 지원을 받아 CSP 수산융차사업단에서 수행중인 '배수체 생산기술 개발연구 및 특질조사'사업의 연구보고서로 제출된 것으로 공개 및 배포를 위해서는 작성 기관인 부경대학교의 사전 승인이 필요합니다.

2-9. 제2세부프로젝트 연구결과 고찰 및 결론

가. 배수체 대량생산 기술

- 배수체(3n) 유도용 세포분열(극체 방출) 억제 최적화 기술(1단계 개발성과)이 민간 전복 치패생산 현장 환경에 효과적으로 작동할 수 있도록 최적 대량 처리 조건이 2단계 연구개발을 통해 정립됨(제2세부프로젝트). 정립된 조건은 제1세부프로젝트(산업화 추진 세부프로젝트)로 이전되어 회당 수역의 유생 개체를 대량 생산할 수 있는 최적화 공정으로 더욱 발전되었으며, 현재까지 제1세부프로젝트에서 이를 기반으로 민간현장보급용 배수체 유생 대량생산이 수행되고 있다.
- 보급한 배수체 유생은 이미 수차례 민간 치패장 및 해상가두리 양식장에서 우수한 양적 형질을 표현할 수 있는 잠재력을 확인하였고, 따라서 3배체 생산의 경우 대량생산 및 산업화 추진을 위한 완성도 높은 기술력이 정립되었다고 판단된다.
- 4배체의 경우, 전복의 생활사(생식 연령) 기간 및 당초 2단계 협약 내용에 의거 실험 규모로 제한한 연구개발이 이루어졌으며, 방대하고 다양한 단위 실험 수행을 통해서 유생 단계에서 높은 비율로 4배체 전복이 유도될 수 있는 유도 조건이 정립되었다. 4배체 생존력이 유생 단계에서 확인되었고, 생존율을 개선할 수 있는 관리 조건이 마련되었으나, 실제 채묘 과정을 통해서 기능적인 4배체 전복의 확보와 이로부터 3배체 생산의 실효성에 관해서는 후속연구 추진을 계획하고 있다.

나. 배수체의 세포, 유전 및 생리학적 특징

- 유도된 전복 배수체(3n)는 수년에 걸친 조사를 통해서 안정적인 배수성(ploidy status)을 유지할 수 있는 것으로 나타나, 생식학적격리 방안으로서의 배수체 이용에 대한 당위성을 잘 뒷받침 한 바 있다. 배수성의 안정성, 정배수성(euploidy), 정상성에 대한 다양한 세포유전학적 검증자료를 확보함으로써 유전학적 측면에서 최종 소비 형태인 식품 안전성에 관한 근거를 제시하였다.
- 아울러 배수화(polyploidization)를 통한 염색체 수 및 heterozygosity (대립유전자 수) 증가로 인해 배수체 전복에서 유발될 수 있는 다양한 잠재적 차등 형질에 대한 탐색이 이루어졌고, 이를 위해 분자유전학, 세포유전학, 생리학 등 다각적이고 다양한 방법론들이 이용되었다. 특히, 불임 형질의 탑재로 인해 부가적으로 획득된 양적 생산 형질의 변화(성장 개선, 체형 개량, 고수온 내성, 체조성 변화)는 양식생산성 측면에서 육종 배수체 품종의 유용성을 잘 설명해주고 있다. 뿐만 아니라 현재까지 2단계 연구개발을 통해 확보된 방대한 기초·차등 발현 자료에 관한 데이터베이스는 본 GSP 프로젝트 이후에도 전복의 분자유종 및 품종 개량을 위해서도 매우 유용하게 활용될 수 있으리라 기대된다.

다. 배수체의 생식 능력

- 배수체(3n)는 3쌍의 상동염색체를 갖기 때문에 제1감수분열 중기에서 균등 분할 과정을 원활히 진행시키기 어렵고, 따라서 생식소 발달을 위한 감수분열 진행이 제한되거나 억제되며, 이렇게 획득된 불임 형질(기능)은 본 GSP 프로젝트의 목적인 '전복 육종품종의 불법(미승인) 생물 교배와 생산 방지'를 위한 핵심 요건이다.
- GSP 2단계 5년 동안 확보한 배수체 암수를 대상으로 생식소 유전자발현, 조직(세포) 조사, 인공방란(방정) 유도 등 다양한 방법론적 접근과 장기간의 추적 조사를 수행함으로써 배수체 전복이 표현할 수 있는 생식 능력의 범위와 불임 형질 탐재 효과의 정도를 규명하였다. 연구조사를 통해 배수체 암컷은 생식소 성숙 발달 빈도가 매우 낮지만, 예외적으로 부분 성숙한 암컷은 비정상적이고 소량의 제한된 방란 기능을 나타낼 수 있는 '접합자' 수준에서의 불임 수준을 나타내었다. 반면 배수체 수컷의 경우, 외관상 부분성숙 정소를 표현하는 개체들의 빈도가 상대적으로 암컷보다 높지만 이들 배수체 수컷들은 최종적으로 배우자(정자)의 방란 기능을 갖추지 못한 '배우자' 수준에서의 불임 수준을 나타내었다. 불임기작(부분성숙)에 대한 규명 및 해석을 위해서 완성도 높은 유전자발현 평가를 진행하였으며 암수 성숙 및 불임에 관한 고감도 발현 마커들을 확보하였다. 본 연구결과를 통해 배수체 품종의 생식학적 격리 측면의 스펙과 성능에 관한 자세한 규격화가 가능하였고, 나아가 본 GSP 품종 뿐만아니라 추후 여타 무척추동물(패류 등)의 배수체 분자육종을 위한 유용 참조 리소스로 활용 가능할 것으로 기대된다.

라. 향후 활용 및 연계 방향

- GSP 프로젝트를 통해서 우리나라 대표 패류 종인 참전복을 대상으로 불임성과 고생산성 형질이 탐재된 육종 배수체 품종의 대량생산 기술이 확보되었다. 본 육종 배수체 품종개발 및 생산 기술은 그간 국내에 별도로 추진되어온 선발육종기술과 염색체 공학기술을 연계·접목 시킴으로써 기술효과의 시너지 창출은 물론, 다기능성 패류 분자육종에 관한 새로운 연구 방향을 제시하였고, 장기 연구를 통해 그간 산발적인 단기 과제들에서 불가능하였던 생물 발달 단계에 따른 차등형질의 발현 패턴 자료를 체계적으로 제시할 수 있었다.
- 따라서 본 연구 결과물은 추후 참전복은 물론 국내 주요 전복 종의 분자육종을 위한 중요한 바탕 자료로 활용될 수 있으리라 기대된다. 아울러 GSP 2단계 후반부에 확보한 연구자료의 재검증 및 기술 확대를 위해서 후속 연구 발굴이 추진될 것이며, 민간 기술 이전이 함께 병행될 것이다.

제 3 절 연구개발 성과

1. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	품종개발		특허		논문		분 자 마 커	유전자원		국내매 출액	종자 수출액	기술 이전	마케팅 전략 추립 보고서	인력 양성
	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비SCI		수 집	등 록					
최종목표	2		4	4	3	4		2			1,000	1		20
1차년도	목표		1	1	1	1		1						4
	실적		1	-	-	2		3						4
2차년도	목표		1		-	1		1		5	-			4
	실적		1		1	1		3		5.3	1			5
3차년도	목표		1	1	1	1		-		245	1			4
	실적		-	2	1	1		1		15.3	1			5
4차년도	목표	1	1		-	1		-	-	250				4
	실적	4		1		1	2		1	127,170	-			6
5차년도	목표	1		2	1					-	500			4
	실적	2		1	1					419,618	-			3
합 계	목표	2		4	4	3	4		2	-	1,000	1		20
	실적	6		3	3	4	6		8	546,788	20.6	2		23

2. 품종개발

세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다

구 분	품종 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
품종출원	골든시드아발론 (Golden Seed Abalone)	대한민국	국립 수산 과학원	2020. 11.26.	40-2020 -0214515				
					40-2020 -0214516				
					40-2020 -0214517				
					40-2020 -0214518				
품종출원	골든시드아발론 (Golden Seed Abalone)	대한민국	국립 수산 과학원	2021. 6.3.	40-2021 -0113559				
					40-2021 -0113560				

3. 특허

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격] 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다									
구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	전복의 핵형분석 방법	대한민국	부경대학교 산학협력단	2017. 10.30.	10-2017-0142119	부경대학교 산학협력단	2019. 06.25.	10-1995-130	
발명특허	참전복 3배체 생산 장치 및 생산 방법	대한민국	국립수산과학원	2018. 12.14.	10-2018-0162379	국립수산과학원	2019. 07.16.	10-2002-294	
발명특허	유전자 마커를 이용한 참전복 삼배체 판별방법	대한민국	국립수산과학원	2020. 12.10.	10-2020-0172136	국립수산과학원	2021. 10.12.	10-2311-743	

4. 논문

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Diversification and domain evolution of molluskan metallothioneins	Fisheries and Aquatic Sciences	남윤권, 김은정	20(8)	대한민국	Fisheries and Aquatic Sciences	비SCI (SCOPUS)
2	Molecular cloning of metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) and transcriptional responses to metal and heat stresses in Pacific abalone, <i>Haliotis discus hannai</i>	Fisheries and Aquatic Sciences	이상윤, 남윤권	20(7)	대한민국	Fisheries and Aquatic Sciences	비SCI (SCOPUS)
3	Non-lethal method for the preparation of metaphase spreads using cultured mantle tissue from live adult abalone	Biotechniques	류준형, 이상윤, 남윤권, 공승표	65(1)	영국	Future Science Group, United Kingdom	SCI
4	복방전복(<i>Haliotis discus hannai</i>) 삼배체 유도를 위한 저온자극 처리 조건의 개선	The Korean Journal of Malacology	박철지, 권민수, 김은정, 남윤권	34(4)	대한민국	한국패류학회	비SCI
5	Characterization of testis-specific serine/threonine kinase 1-like (TSSK1-like) gene and expression patterns in diploid and triploid Pacific abalone (<i>Haliotis discus hannai</i> ; Gropoda; Mollusca) males	PLOS ONE	김은정, 김소정, 박철지, 남윤권	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226022	미국	PLOS	SCI
6	Assessment of suitable reference genes for RT-qPCR normalization with developmental samples in Pacific abalone <i>Haliotis discus hannai</i>	Journal of Animal Reproduction and Biotechnology	이상윤, 박철지, 남윤권	34(4)	대한민국	동물생명공학회	비SCI

7	Transcriptome expression profiles between diploid and triploid Pacific abalone (<i>Haliotis discus hannai</i>) juveniles in response to acute heat stress and hypoxia treatment	Marine Genomics	김찬희, 김은정, 서채화, 박철지, 남윤권	On-line published https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100820	네덜란드	Elsevier	SCI
8	Expression pattern of major heat shock protein genes in diploid and triplid abalone <i>Haliotis discus hannai</i>	Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences	박철지, 김은정, 남윤권	53(4)	대한민국	Fisheries and Aquatic Sciences	비SCI
9	Evaluation of using veliger stage larvae for the preparation of metabphase spreads from the Pacific abalone <i>Haliotis discus hannai</i>	Journal of Animal Reproduction and Biotechnology	최재훈, 김은정, 박철지, 남윤권, 공승표	35(3)	대한민국	동물생명공학회	비SCI
10	Transcriptoanl modulation patterns of abalone <i>Haliotis discus hannai</i> , hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in interdependent crosstalk between hypoxia, infection, and environmental stresses	Aquaculture Reports	김찬희, 박철지, 김은정, 남윤권	19:100566 doi:10/1016/j.aqrep.2020.100566	네덜란드	Elsevier	SCI

5. 유전자원

세부적으로 전부(건별로)기록						
번호	특성	수집	등록			기 타
			등록인	등록일	등록번호	
1	FOXL2 <i>Haliotis discus hannai</i> forkhead box protein L2	등록 (GenBank)	이상윤, 이동환, 남윤권	2017. 09.29.	MG011709	
2	TSSK1 <i>Haliotis discus hannai</i> testis-specific serine/threonine-protein kinase 1	등록 (GenBank)	이동환, 이차용, 남윤권	2017. 09.29.	MG011710	
3	SOX9 <i>Haliotis discus hannai</i> sex-determining region Y-box 9	등록 (GenBank)	이동환, 이차용, 남윤권	2017. 09.29.	MG011711	
4	Transcriptome of the abalone <i>Haliotis discus hannai</i> , stimulated by LPS and heavy metal: Abalone Control	등록 (GenBank)	김찬희, 최호정, 남윤권	2018. 10.04.	SRX4801087	
5	Transcriptome of the abalone <i>Haliotis discus hannai</i> , stimulated by LPS and heavy metal: Abalone LPS	등록 (GenBank)	김찬희, 최호정, 남윤권	2018. 10.04.	SRX4801088	
6	Transcriptome of the abalone <i>Haliotis discus hannai</i> , stimulated by LPS and heavy metal: Abalone Cu	등록 (GenBank)	김찬희, 최호정, 남윤권	2018. 10.04.	SRX4801089	
7	<i>Haliotis discus hannai</i> TSSK1 genomic gene sequence	등록 (GenBank)	남윤권	2019. 08.02.	MN245299	
8	HIF1a <i>Haliotis discus hannai</i> hypoxia inducible factror 1 alpha novel variant	등록 (GenBank)	김찬희, 최호정, 박철지, 남윤권	2020. 08.05.	MT833932	

6. 국내매출액

국내 종자 판매 실적			
번호	일자	판매처	매출액(원)
1	2020.04.06	완도 금일 척치리 어촌계 전홍철	28,000,000
2	2020.04.10.	완도 금일 척치리 어촌계 전현정	39,000,000
3	2020.06.25.	입암포영어조합법인(내) 김방옥	29,680,000
4	2020.07.03.	입암포영어조합법인(내) 이삼열	30,490,000
5	2021.04.01.	해미원 박남규	36,220,000
6	2021.05.17.	해남군수협 김성주	25,880,000
7	2021.05.18.	입암포영어조합법인(내) 김방옥	25,470,000
8	2021.09.10.	더조은수산 김병용	64,260,000
9	2021.09.15.	경영수산 최경영	131,900,000
10	2021.09.15	명품전복 오지수	44,670,000
11	2021.09.15.	훈희영어조합법인 김광희	14,210,000
12	2021.09.27.	훈희영어조합법인 김광희	47,618,000
13	2021.10.13.	경영수산 최경영	29,390,000

7. 종자수출액/수입대체효과

종자수출액(USD)				
번호	수출품목	수출액		
		수출일	수출국	수출금액
1	배수체 참전복	2018.10.15.	일본	\$ 24,877
2	배수체 참전복	2018.10.29.	일본	\$ 27,820
3	배수체 참전복	2019.11-12	대만	\$153,218

8. 기술이전

기술이전					
번호	기술이전 유형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	노하우	배수체 전복 대량생산 기술	청해전복양식	2018.04.01.	무상
2	노하우	배수체 전복 대량생산 기술	연일수산	2019.08.01.	무상

9. 인력양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인건비 지원 수혜자	2017		2	2		3	1			4		
2	인건비 지원 수혜자	2018		2	3		2	3			3	2	
3	인건비 지원 수혜자	2019	1	1	1	2	2	3			3	1	1
4	인건비 지원 수혜자	2020	1	1	2	2	3	3			5	1	
5	인건비 지원 수혜자	2021				3	1	1			2	1	
합 계			2	6	8	7	11	12			17	5	1

10. 매뉴얼 제작

매뉴얼 제작건수		
번호	제목	비고
1	(2017년) 배수체 육종 참전북	(프로젝트 공동 제작)
2	(2018년) 배수체 육종 참전북 표준 매뉴얼	(프로젝트 공동 제작)
3	(2019년) 배수체 참전북 유도를 위한 표준 프로토콜	(프로젝트 공동 제작)
4	(2020년) 배수체 참전북 유도를 위한 표준 프로토콜 (2019년 초판의 2020년 update)	(프로젝트 공동 제작)
5	배수체 전북 유도 프로토콜 최종본	(프로젝트 공동 제작)

11. 기술적 및 경제적 성과

가. 기술적 성과

개발기술명	관련기술 최고 보유국	기술수준		비고
		우리나라	본 프로젝트	
전복 불임 배수체 개발 기술	호주/일본	50%	95%	본 프로젝트 착수 시점에서 최선두국 대비 약 50%의 기술수준이었으나, 2단계 연구 개발을 종료하는 시점에는 국내 기술 수준 역시 최선두권으로 대폭 신장되어 현재 관련 기술 최고 보유국과 비슷한 수준 또는 더 높은 수준에 도달하였다고 판단됨.

나. 경제적 성과

(1) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품 (골든시드아발론)	개발후 현재까지	10 억원
			향후 3년간 매출	10 억원
		관련제품 (비교대상 없음)	개발후 현재까지	
			향후 3년간 매출	
	시장 점유율	개발제품 (골든시드아발론)	개발후 현재까지	국내 : 1 % 국외 : 0.1%
			향후 3년간 매출	국내 : 3 % 국외 : 1 %
		관련제품 (비교대상 없음)	개발후 현재까지	
			향후 3년간 매출	
세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		없음	
	3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		없음	

(2) 사업화 계획

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	5년			
	소요예산(백만원)	10억 (2억 / 년)			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		10억	30억	50억	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	1	3	5
국외		0.1	1.5	3	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	현재의 화학적 처리 없이 배수체를 유도할 수 있는 새로운 방법(4배체 활용)의 개발로 신제품 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	전복 품목에 대한 무역수지 개선효과는 적합하지 않음.			
	수 출				

제 3 장 목표 달성도 및 관련분야 기여도

제 1 절 연구개발목표 및 목표 달성도

1. 프로젝트의 연구개발목표

육종·개량된 전복 품종의 비승인 형태의 재생산을 방지하기 위해 배수체 기술이 탑재된 육종 종자의 생산 및 사양관리 최적화와 표준화를 확립하고, 배수체 종자의 대량 생산을 통해 국내외 산업화를 활성화한다. 또한 배수체 참전복 종자의 대량 생산을 위해 생산 기술을 개량함으로써 보다 효과적인 실용화를 추진한다. 배수체 참전복의 특성을 연구, 조사하여 산업화 제품으로서의 성능을 평가한다(2021년까지 수출액 1,000만 달러 달성)

2. 평가 착안점 및 목표 달성도

목표	평가의 착안점	달성 내용	달성도(%)
배수체 전복 종자의 대량생산 기반구축	배수체 전복 종자의 대량생산이 가능한 기반이 구축되었는가?	- 95-99%의 고효율 배수체 유도 기술 검증 - 배수체 전복 종자의 대량 생산이 가능한 장치 개발(특허 등록)	100
민간협력체제 구축	배수체 전복 종자의 대량생산을 위한 민간업체와의 협력체계가 구축되었는가?	- 각 지역별 전복협회와의 지속적인 협력체제 구축 - 참여기업에서의 배수체 전복 종자 생산 및 양성 - 참여기업에서의 수출 및 국내 판매	100
수출 및 산업화 기반구축	국내외 수출 및 산업화를 위한 기반이 마련되었는가?	- 수출 판매망 확보(중국, 일본) - 국내 판매망 확보	100
배수체 전복 특성조사	배수체 전복의 형질 특성을 평가할 수 있는 기술이 개발되었는가?	- 세포유전학적 및 생식생태학적 특징 분석, 정립 - 차등 유전자 발현 대량발굴 및 평가 기술 정립 - 배수체 전복 형질 평가 기술 확보	100
배수체 생산 및 사양관리 매뉴얼 제작	배수체 종자 생산 및 사육관리에 관한 매뉴얼이 제작되었는가?	- 배수체 유도 프로토콜 완성 - 배수체 전복 생산 매뉴얼 완성 - 배수체 종자 사양관리 매뉴얼 완성	100

3. 연차별 연구목표 및 달성도

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행 내용
1차 년도 (2017)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	배수체 육종 참전복 대량생산 기반구축	100	<ul style="list-style-type: none"> 배수체 육종 참전복 생산을 위한 산업화용 어미성숙관리 배수체 육종 참전복 종자의 대량 시험 생산 배수체 종자생산을 위한 표준매뉴얼 제작(1)
		수출 및 산업화 기반구축	100	<ul style="list-style-type: none"> 국내외 판매전략 수립 및 판매망 확보
		민간협력체제 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> 배수체 참전복의 현장적응력 평가
	【제2세부】 배수체 생산기술 개량연구 및 특성조사	배수체 생산기술 개량: 3배체 유도 기술의 현장 적용 조건 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> 수온 요인을 고려한 최초 처리 온도 및 처리 시점 최적화 현장 맞춤형 간편화 대량 처리 세부 조건의 평가 및 개선 배수체 전복 유도 대량처리(현장 시험) 및 효율 검정
배수체 생산기술 개량: 4배체 유도 가능성 및 기반 조건 조사		100	<ul style="list-style-type: none"> 관련 시험을 위한 공통 기반 사항 마련 및 정립 세포 분열 억제 기반 조건 조사 및 기술 평가 기반 기술 조건의 개선 및 4배체 유도 가능성 조사 	
2차 년도 (2018)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	배수체 육종 참전복 대량생산	100	<ul style="list-style-type: none"> 일반집단 및 육종가계 모패 선발 관리 성숙 산란 환경 조절 배수체 전복 대량생산 배수체 전복 표준매뉴얼 제작
		수출 및 산업화 기반구축	100	<ul style="list-style-type: none"> 국내외 판매전략 수립 및 판매망 확보 지속
		민간협력체제 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> 배수체 참전복의 현장적응력 평가 지속 참여민간업체 선정 및 협의체 구성
	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	3배체 유도 기술의 현장 적용 조건 정립	100	<ul style="list-style-type: none"> 배수체(3배체) 유도를 위한 대량 처리 조건의 적용, 재현성 평가 및 최적화 배수체 유도 효율의 재검증 배수체 유도 수율의 재검증
4배체 유도 및 초기 특징조사		100	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 처리 조건들의 탐색 및 4배체 유도 가능 조건의 확보 4배체 유도 조건의 개선 4배체 처리군의 초기 생존 특성 (부화, 유생 생존, 유생 정상성) 평가 	

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행 내용
3차 년도 (2019)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	대량생산체제 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 생산용 육종 어미 생산 및 관리
		민간협력 체제 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 참여기업 주도의 배수체 전복 대량생산 ▪ 배수체 종자의 품질관리 및 안전성 검증 ▪ 배수체 전복의 관리 기술 지원
		수출 및 산업화 기반구축	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 국내외 판매망 확보 및 수출 - 중국 판매망 확보를 위한 현지 양식환경 조사와 전복 가격 동향 분석 - 마케팅 전략 수립(SWOT 분석) - 국내 판매망 확보
	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	배수체 종자의 특성 조사 (1): 배수체 참전복의 유전학적 특징조사	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 참전복의 세포유전학적 검증 - 배수체(3배체)의 염색체조 (chromosomeset) 구성 조사 및 검증 - 배수체(3배체)의 세포, 핵 크기, 인형성 부위(nucleolar organizer region) 평가 및 검증 - 배수체(3배체) DNA 함량 검증 ▪ 배수체(3배체) 참전복의 분자유전학적 특성 검증 - 발현 전사체 DB 구축 및 체계화 - 배수체 전복의 생물발달(성장) 단계별(발생, 치패, 미성숙, 성숙연령) 발현 전사체 특징평가 (비자극 조건에서 이배체와의 동등 및 차등발현 유전자 평가) - 분자발현 마커를 이용한 배수체 수컷의 생식 기구 분석 및 검증
		배수체 종자의 특성 조사 (2): 배수체 참전복 기술의 표준 프로토콜 제작	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 참전복 유도 표준 프로토콜 제작 - 유도 원리 및 고려 사항 - 시약, 재료 기구, - 3배체 대량 처리 프로토콜 - 3배체 판정 프로토콜 - 문제해결 가이드 - 안전 취급 사항 - 4배체 유도 프로토콜

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행 내용
4차 년도 (2020)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	대량생산 기반구축	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체생산용 모패 성숙관리 - 자동수온 조절장치를 이용하여 조기성숙유도 - 4차년도 생산목표량 생산 ▪ 지속적인 대량생산용 육종참전복 사육관리 - 지속적인 생산을 위한 모패 생산 및 확보
		민간협력 체제유지	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 전복 대량생산 - 참여기업 추가 확보를 통한 생산량 확대 - 참여기업 주도의 배수체 전복 대량생산 ▪ 배수체 전복 현장 모니터링 - 배수체 전복 성장 형질 측정 - 배수체 전복 관리기술 지원 ▪ 지속적인 배수체 종자의 품질관리 및 안전성 검증
		배수체 종자 중국 수출 및 국내 산업화	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 중국 판매망 확보 - 중국 수출을 위한 판매 전략 수립 - 종자 수출을 위한 현지 유통망 확보 및 활용 ▪ 국내 판매망 확보 - 배수체 종자 우수성 홍보 - 국내 배수체 종자 판매
4차 년도 (2020)	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	배수체-이배체 비교 평가용 생식소 발현 마커 발굴	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 발현 마커 유전자 서열 및 기초 발현 특징 조사 - 수컷 생식소 발현 마커 확보 - 암컷 생식소 발현 마커 확보 - 기초발현 특징(조직 발현 집중도 등) - 생물정보학분석 및 서열 분석 ▪ 조직학적 특징 조사 - 2년산 배수체 암수 생식소 특징 - 4년산 배수체 암수 생식소 특징 ▪ 유전자 발현 정량분석 조건 개선 - 개선 프로토콜 정립 - Yield, 순도, 오염도 평가 - 유전자발현 평가 개선 유효성 - 재현성, 활용성, 확장성 평가 ▪ 배수체-이배체간 차등 발현 평가 - 수컷 생식소 차등 발현(2N-3N) - 암컷 생식소 차등 발현(2N-3N)

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행 내용
4차 년도 (2020)	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	배수체 외부 형질 및 체조성 특징	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 형태(계측, 계수) 형질에 대한 배수체-이배체간 비교 평가 - 형질평가 기준 마련 - 성장단계별 지표값 비교 - 배수체 특징적 계측형태 요인 파악 ▪ 배수체-이배체간 체조성 평가 - 시료 확보 및 특성 평가(비만도, 중량, 체형 특성) - 체조성에 영향요인, 변동요인, 분석 세부전략 수립
		환경 조건에 대한 배수체 발현 반응 특성 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 고수온 처리에 대한 배수체-이배체의 발현 반응 조사 - 분석 기반 및 세부조건 수립 - NGS기반 차등 발현 전사체 평가 - 핵심 마커 기반 차등 발현 패턴 평가 ▪ 저산소 처리에 대한 배수체-이배체의 발현 반응 조사 - 분석 기반 및 세부조건 수립 - NGS기반 차등 발현 전사체 평가 - 핵심 마커 기반 차등 발현 패턴 평가 ▪ 현장 적응 배수체 시험군들 간 발현반응 특성 조사 - 민간분양 배수체 종자 및 대조군 시료 확보 - 차등발현 분석 대상 유전자 확보 (면역 및 대사) 및 분석조건 확립 - 이배체 및 3배체 간 차등 발현 분석
		배수체 매뉴얼 업데이트	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 매뉴얼 업데이트 - 목차 재구성(유도, 판정, 생식소 평가 부분: 5개 chapter, 3개 부록 및 1개 부속 매뉴얼; 총 40면) - 신규 내용 추가(배수체의 생식소 외형 발달 및 조직학적 분석, 암수별) - 기타 매뉴얼 포맷 및 세부 내용 수정

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행 내용
5차 년도 (2021)	【제1세부】 육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매	시장개척 및 수출	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 시장개척 및 수출 - 상품가치 향상을 위한 안전성 검정 체계구축 - 배수체 전복 생산 및 사양관리 매뉴얼 개발 - 배수체 식별용 마커 개발 및 활용 - 지속적 수출 활성화를 위한 후속 전략 수립
	【제2세부】 배수체 생산기술 개량 연구 및 특성 조사	배수체 전복의 생식 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체(3N) 전복의 불임·부분성숙 기전 및 작동원리 분석 - 성숙 및 생식 관련 molecular pathway내 관련 유전자들 발현의 상관관계 분석 ▪ 배수체 전복의 생식 가능성 평가 - 인공 산란 방정 가능성 조사 - 배수체 생성 배우자의 특징 조사 - 배수체의 자손 생성 가능성 조사 (배우자의 수정능력 및 수정란의 발생 능력)
		민간 현장 보급 배수체 전복의 형질 특성 조사(지속)	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 민간 현장 사육·생산된 배수체 전복의 형질 특성 평가 - 종자 및 최소 상품크기 도달 전복을 대상 ※4차년의 경우 치패에 대해서 평가하였으므로 종자 및 상품크기 도달 전복에 대한 분석을 5차년에 실시 - 외부형질 특성(계측형질 및 관련 특징) - 유전학적·생리학적 특성(핵심 마커 유전자들의 발현 profile - 대사, 면역, 성숙관련 발현 특징을 이배체 동일 현장 시료와 비교 평가)
		배수체 최종 매뉴얼 업데이트	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배수체 전복 생산 및 평가를 위한 표준 지침서 형태로 업데이트 ※제1세부프로젝트와 공동 제작 추진 - 배수체 전복 유도 - 배수체 전복 판정 및 분석 - 배수체 전복의 대표적 형질 특성 - 배수체 전복의 사육 및 생산 관리

4. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책

- 2단계 7 Block에서 설정한 본 프로젝트의 논문, 유전자원 등록, 육종특성 개발, 특허, 기술이전 등의 성과목표는 대부분 달성하였으나, 수출액 1,000만 달러는 달성하지 못하였다. 이는 2019년 말부터 전 세계적으로 무섭게 번지고 있는 COVID-19의 영향으로 국가 간 국경봉쇄 및 지역 간 이동 등이 크게 제한되어 있기 때문에 수산물 뿐만 아니라 모든 수출관련 업무 등의 마비현상 등이 발생하였기 때문이다.
- 국제사회의 무역 거래 측면에서 COVID-19로 인한 국경봉쇄 및 지역 간 이동 등이 크게 제한적이며, 현재까지 전 세계적으로 COVID-19의 확산세가 온전히 제어되지 못하고 있는 실정이다. 국내의 경우 점차 안정화될 것으로 예상되었으나 최근 변이 바이러스의 발생으로 다시 수출 등의 문제가 발생하고 있다.
- 이에 수출물량 일부의 국내 판매를 추진하여 총 13건, 판매금액은 총 546,788천원의 실적을 달성하였다. 국내의 경우, 육종된 우량 전복의 국내 기술 보급의 수요가 점차 증대하고 있으며, 배수체 육종 전복 역시 예외는 아니다. 현재 배수체 대량유도 및 처리기술이 정립되어 참여기업을 통한 배수체 전복 종자의 대량생산이 이루어지고 있으며 배수체 종자의 평가 결과 및 형질 특징 등이 점차 가시화되고 있어 배수체 육종전복의 수요는 지속적으로 증가할 것으로 예상된다. 따라서 중국 수출을 위한 판매전략을 재수립하여 수출을 추진할 계획이다.
- 향후 배수체 전복의 산업화를 위하여 육종 배수체 전복 종자의 대량처리 기술을 생산 현장 참여기업으로 기술이전을 실시할 계획이다. 또한 본 프로젝트는 2021년을 마지막으로 종료되지만 배수화 처리 개발 기술의 실용화와 아울러 현재의 화학적 처리 없이 배수체를 유도할 수 있는 새로운 방법(4배체 활용 가능성 또는 chemical-free 방식의 배수체 유도 등)의 이용 가능성에 대하여 지속적인 개선과 기술의 배타적 권리 확보를 위한 노력을 계속할 것이다.

제 2 절 기술발전 기여도

1. 과학기술적 측면 기여도

구분	기여
배수체 생산 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 종래의 유도 효율을 대폭 개선할 수 있는 전복 배수체 유도 조건이 개발됨에 따라 이를 이용하여 GSP 관련 여타 전복 품종의 배수체 유도가 필요할 시, 기술 접목 및 지원 가능 - 배수체 전복 생산을 위한 최적화 조건 정립 전략을 이용, 여타 패류의 배수체 유도 처리 조건 개발에 활용 - 생태계 위해성(생물다양성 훼손) 저감형 품종의 산업화를 위한 생식학적 격리 품종의 대량생산 프로토콜로 활용
유용 유전자 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - 본 프로젝트의 배수체 평가를 위해 발굴된 고용량 발현유전자 DB는 참전복 및 여타 관련 종의 분자유종 기초 소재로 활용
패류의 차등형질 발현정보	<ul style="list-style-type: none"> - 본 프로젝트에서 배수화로 인해 야기되는 비의도적 형질변화 정보는 배수체 패류의 육종 및 여타 육종 기술과의 중복적용 시 해당 배수체 품종의 형질평가를 위한 기초자료로 활용
전복류의 세포 및 조직 배양기술	<ul style="list-style-type: none"> - 전복류를 대상으로 한 신규 세포배양 기술 정립 자료는 전복의 기초 연구 및 세포주 개발연구에 활용. - 조직 배양 기술을 기반한 염색체 표본 확보 기술을 이용 다양한 세포 유전학적 기초연구에 활용

2. 사회경제적 측면 기여도

구분	기여
국내외 산업화	<ul style="list-style-type: none"> - 배수체 전복 산업화 추진 연구개발로 연계하여 수출에 활용 - 국내 전복 열성화 양식 품종의 대체 및 전복 양식 생산성 개선을 통한 어가 소득 증대에 활용 - 최근 급변하는 해양환경에 적응하지 못하고 여름철 대량폐사의 문제 해결에 따른 어업인 소득증대에 활용
전복종자 전문기업 발굴 및 육성	<ul style="list-style-type: none"> - GSP 종자를 이용한 기술 집약형 전복 종자 전문기업 발굴 - 수산 양식분야의 사회적 평가 인식 제고에 활용
육종품종에 대한 배타적 기술권리 보호	<ul style="list-style-type: none"> - 비승인된 육종품종의 재생산 및 기술유출 방지를 통한 국내 육종 기술 보호
배수체 생산 전문 인력 양성	<ul style="list-style-type: none"> - 체계적 전문기술을 습득한 전문인력 양성에 활용

제 4 장 연구결과의 활용 계획

1. 2단계 연구개발 결과를 기반한 추가 연구과제 발굴

구분	활용계획
단기 실용화 과제 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 고효율 배수체 전복 생산기술이 참전복에서 개발되었으므로 육종으로 개발되어진 속성장, 고수온내성 품종에 적용할 수 있는 단기 실용화 연구 필요
기초 연구과제 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 배수체 처리기술 개발의 실용화를 위하여 현재의 방법인 화학적 처리 없이 배수체를 유도할 수 있는 새로운 방법(4배체 생산 및 활용)의 개량 연구 필요

2. 기술확산 및 산업화 추진 계획

구분	활용계획
기술확산	<ul style="list-style-type: none"> - 본 프로젝트의 참여기업을 비롯하여 전복 종자생산업체에 배수체 전복 생산 및 사양관리 매뉴얼 제작 및 보급 - 산학연 협의체 구성을 통한 기술 세미나 및 설명회를 개최하여 배수체 기술의 소개
배수체 전복 산업화 추진	<ul style="list-style-type: none"> - 배수체 전복 생산기술을 참여기업인 민간으로 이전하여 참여기업 주도하에 자체적으로 배수체 전복을 생산하여 현장에 배수체 종자 공급 - 배수체 전복 생산기술의 완성도를 높이기 위한 지속적인 기술지원 필요 <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> <pre> graph TD A[국립수산과학원 + 국립부경대학교] --> B[배수체 전복 생산 기술개발] B --> C[배수체 전복 생산기술 이전] C --> D[참여기업 주도 배수체 전복 판매] D --> E1((참여기업1)) D --> E2((참여기업2)) D --> E3((참여기업3)) D --> E4[...] D --> En((참여기업n)) E1 --> F[전복 유통 전문업체를 통한 수출] E2 --> F E3 --> F E4 --> F En --> F </pre> </div>

참고문헌

- Arai K, Naito F, Fujino K. 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52: 417-422.
- Arai, K. 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture.* 197: 205-228.
- Arai, K. and Okumura, S.I. 2013. Aquaculture-oriented genetic researches in abalone: current status and future perspective. *Afr. J. Biotechnol.* 12: 4044-4052.
- Beaumont, A.R. and Fairbrother, J.E. 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *J. Shellfish Res.* 10: 1-18.
- Benfey, T.J. and Sutterlin, A.M. 1984. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture.* 36: 359-367.
- Blair JE, Hedges SB. 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Mol Biol Evol.* 22: 2275-2284.
- Chang, Y.J. 1993. Identification of blood cells and their physiological functions in the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Aquaculture.* 6: 1-12.
- Chevassus, B. 1983. Hybridization in fish. *Aquaculture.* 33: 245-262.
- Cook PA. 2019. Worldwide abalone production statistics. *J. Shellfish Res.* 38: 401-404.
- Dheilly NM, Jouaux A, Boudry P, Favrel P, Lelong C. 2014. Transcriptomic profiling of gametogenesis in triploid pacific oysters *Crassostrea gigas*: Towards an understanding of partial sterility associated with triploidy. *PLoS One.* 9: e112094.
- Elliott, N.G. 2000. Genetic improvement programmes in abalone: what is the future?. *Aquac. Res.* 31: 51-59.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M. and Piferrer, F. 2001. Induction of triploidy and Gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica.* 111: 175-195.
- Gao D, Qiu L, Gao Q, Hou Z, Wang L, Song L. 2015. Repertoire and evolution of TNF superfamily in *Crassostrea gigas*: Implications for expansion and diversification of this superfamily in Mollusca. *Dev. Comp. Immunol.* 51: 251-260.
- Hara, M. and Sekino, M. 2005. Genetic difference between Ezo-awabi *Haliotis discus hannai* and Kuro-awabi *Haliotis discus discus* population: microsatellite-based population analysis in Japanese abalone. *Fish. Sci.* 71: 754-766.
- Jee YJ, Nam BH, Lee JY, Chang YJ. 2013. Maturity and spawning of the triploid Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Kor. J. Malacol.* 29:105-11.
- 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.
- Jha KN, Coleman AR, Wong L, Salicioni AM, Howcroft E, Johnson GR. 2013. Heat shock protein 90 functions to stabilize and activate the testis-specific serine/threonine kinases, a family of kinases essential for male fertility. *J Biol Chem.* 288: 16308-16320.
- Kim CH, Kim EJ, Seo C, Park CJ, Nam YK. 2021. Transcriptome expression profiles between diploid and triploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) juveniles in response to acute heat-stress and hypoxia treatments. *Mar. Genomics.* 57: 100820.
- Kim CH, Park CJ, Kim EJ, Nam YK. 2021. Transcriptional modulation patterns of abalone *Haliotis discus hannai* hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in interdependent crosstalk between hypoxia, infection, and environmental stresses. *Aquacult. Rep.* 19: 100566.
- Kim EJ, Kim SJ, Park CJ, Nam YK. 2019. Characterization of testis-specific serine/threonine kinase 1-like (TSSK1-like) gene and expression patterns in diploid and triploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*; Gastropoda; Mollusca) males. *PLoS ONE* 14: e026022.
- Kim H, Kim BH, Son MH, Jeon MA, Lee YG, Lee JS. 2016. Gonadal development and reproductive cycle of cultured abalone, *Haliotis discus hannai* (gastropoda: haliotidae) in Korea: implications for seed production. *J. Shellfish Res.* 35: 653-659.
- Komen, H. and Thorgaard, G.H. 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture.* 269: 150-173.
- Lee SY, Nam YK. 2016. Transcriptional responses of metallothionein gene to different stress factors in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Fish Shellfish Immunol.* 58: 530-541.
- Lee SY, Nam YK. 2017. Molecular cloning of metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) and transcriptional responses to metal and heat stresses in Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Fish. Aquatic Sci.* 20: 9.

- Li L, Zhao J, Wang L, Qiu L, Song L. 2013. Genomic organization, polymorphisms and molecular evolution of the goose-type lysozyme gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Gene*. 513: 40-52.
- Li Y, Sosnik J, Brassard L, Reese M, Spiridonov NA, Bates TC, et al. 2011. Expression and localization of five members of the testis-specific serine kinase (TSSK) family in mouse and human sperm and testis. *Mol. Hum. Reprod.* 17: 42-56.
- Li, Y., Li, X. and Qin J.G. 2007. Triploidy induction in Australian greenlip abalone *Haliotis laevis* (Donovan) with cytochalasin B. *Aquac. Res.* 38: 487-492.
- Liu, W., Heasman, M. and Simpson, R. 2004. Optimization of triploidy induction in the blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach, 1814), using 6-dimethylaminopurine. *Aquac. Res.* 35: 1076-1085.
- Maldonado, R., Ibarra, A.M., Ramirez, J.L., Vasquez, J.E., Badillo, L.M. 2001. Induction of triploidy in Pacific red abalone (*Haliotis rufescens*). *J. Shellfish Res.* 20: 1071-1075.
- Nam, Y.K., Choi, G.C., Park, D.J. and Kim, D.S. 2001. Survival and growth of induced tetraploid mud loach. *Aquaculture International*. 9: 61-71.
- Okumura SI, Arai K, Harigaya Y, Eguchi H, Sakai M, Senbokuya H, et al. 2007. Highly efficient induction of triploid Pacific abalone *Haliotis discus hannai* by caffeine treatment. *Fish. Sci.* 73: 237-243.
- Peruzzi, S., Kettunen A, Primicerio R. and Kauric, G. 2007. Thermal shock induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac. Res.* 38: 926-932.
- Piferrer F, Beaumont A, Falguiere J-C, Flajshans M, Haffray P, Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*. 293: 125-156.
- Rasmussen, R.S. and Morrissey, M.T. 2007. Biotechnology in aquaculture: transgenics and polyploidy. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 6: 2-16.
- Ryu JH, Lee SY, Nam YK, Gong SP. 2018. Non-lethal method for the preparation of metaphase spreads using cultured mantle tissue from live adult abalone. *Biotechniques* 65: 33-36.
- Sekino, M., Shigenobu, Y., Nakamura, Y., Sugaya, T. and Hara, M. 2012. Application of massively parallel pyrosequencing to the discovery of non-dinucleotide microsatellite: tetra- and pentanucleotide repeat markers for the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Cons. Genet. Resour.* 4: 939-941.
- Shang P, Hoogerbrugge J, Baarends WM, Grootegoed JA. 2013. Evolution of testis-specific kinases TSSK1B and TSSK2 in primates. *Andrology*. 1: 160-168.
- Slabbert, R., Prins N. and Brink D. 2010. A microsatellite panel for triploid verification in the abalone *Haliotis midae*. *Afr. J. Mar. Sci.* 32(2): 259-264.
- 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.
- Suenaga, E. and Nakamura, H. 2005. Evolution of tree methods for effective extraction of DNA from human hair. *J. chromatogr. B.* 820: 137-141.
- Suquet M, Malo F, Quere C, Ledu C, Grand JL, Benabdelmouna A. 2016. Gamete quality in triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. 451: 11-15.
- Tabarini, C. L., 1984. Induced Triploidy in the bay Scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*. 42: 151-160.
- Thorgaard G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Gall, G.A.E., Propp, J. and Utter, F.M. 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture*. 35: 125-135.
- Wadsworth, P., Wilson, A.E. and Walton, W.C. 2019. A meta-analysis of growth rate in diploid and triploid oysters. *Aquaculture*. 490: 9-16.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10: 506-513.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Wolters, W.R., Chrisman C.L. and Libey, G.S. 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.* 20: 253-258.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Wang, Y. and Wang, R. 1998. Triploidy induction in Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino by 6-dimethylaminopurine and the performance of triploid juveniles. *J. Shellfish Res.* 17: 783-788.

연구개발보고서 초록

프로젝트명	(국문) 육종 참전복 배수체 종자 개발과 국내외 산업화				
	(영문) Development of genetically improved polyploid seed(<i>Haliotis discus hannai</i>) and domestic and foreign industrialization				
프로젝트 연구기관	국립수산과학원 수산종자육종연구소	프로젝트연구 책임자	(소속)국립수산과학원 수산종자육종연구소		
참여기업	입암포영어조합법인 연일수산, 해성전복양식		(성명)박 철 지		
총연구 개발비 (천원)	계	1,895,292	총연구기간	2017.1. ~ 2021.12.(5년 0월)	
	정부출연 연구개발비	1,605,000	총참여 연구원 수	총 인원	87명
	기업부담금	290,292		내부인원	64명
	연구기관부담금	-		외부인원	23명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 배수체 기술이 탑재된 육종 종자의 생산 및 사양관리 최적화와 표준화 - 배수체 종자의 대량 생산과 공급으로 국내외 산업화 - 배수체 참전복 생산 기술을 개량함으로써 보다 효과적인 실용화를 추진함 - 배수체 참전복의 특성을 연구, 조사함으로써 산업화 제품의 성능을 평가함 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 품종개발 6건, 특허 6건, 논문 10건, 유용유전자원 등록 8건, 기술이전 2건, 인력양성 23건 달성 - 연구기간동안 배수체 육종 참전복 유생 총 10억마리를 생산하여 참여기업으로 분양 - 배수체 전복을 효과적으로 생산하기 위한 종자생산 및 사양관리 표준매뉴얼 제작 - 중국, 일본, 홍콩 등을 포함한 동아시아 지역 판매전략 수립 및 현지 시장조사 완료 - 일본, 대만 국외 수출 및 국내 판매를 통해 20.6만 달러, 5.5억 원의 판매실적 달성 - 배수체 유도 대량처리 조건의 현장 적용성을 개량하여 그 효과와 처리 안정성을 검증 - 현장 맞춤형 3배체 대량처리 조건 정립 및 4배체 유도 가능 조건 확보 및 개선 - 배수체의 대량처리, 유도, 판정 및 주요 형질특성에 관한 표준 프로토콜 정립 및 매뉴얼 제작 - 배수체와 이배체 간 차등 형질 발현 조사, 배수체의 생식생태학적 특징 구체화 - 배수체 종자의 유전적 구성에 대한 안정성과 배수화에 따른 유전자발현 차등성 자료 제시 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수출된 육종 참전복의 비승인된 재생산 및 기술복제 방지를 통한 국내 육종 기술 보호 - 참전복 이외 여타 수산종자프로젝트의 신제품 개발 시 불임화 기술지원 - 배수체 육종 참전복 대량생산을 위한 어미관리, 생산 시스템 관리 및 실용화 관리 체제 구축 - 우량 배수체 참전복의 생산 기반 및 기술의 산업체 이전 및 수출전략 공동 추진 - 기술 개선 및 최적화를 통한 배수체의 현장 적용성 및 편리성 증대 - 배수체의 특성 분석을 통한 실용화 제품의 규격 및 성능 평가 지원 - 고효율 간편 배수체 유도 기술의 실용화 공동 추진 - 배수체 특성이 탑재된 우량 참전복의 수출 추진 					

<별첨 2>

자체평가보고서

사업단명	GSP수산종자사업단	과제번호	213008-05-5-CG600		
프로젝트명	육종 참전복 배수체 종자 개발과 국내외 산업화				
프로젝트연구기관	국립수산과학원 수산종자육종연구소				
연구담당자	프로젝트 연구책임자	박 철 지			
	세부프로젝트 연구책임자	기관(부서)	국립수산과학원 수산종자육종연구소	성 명	박 철 지
		기관(부서)	부경대학교	성 명	남 윤 권
연구기간	총 기 간	2017.1.1.~2021.12.31.	당해 연도 기간	2021.1.1.~ 2021.12.31.	
연구비(천원)	총 규 모	1,895,292	당해 연도 규모	160,292	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행 계획대로 진행 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음 어느 정도 얻음 얻지 못함

구분	품종개발		특허		논문		분 자 마 커	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전	마케팅 전략 추진 보고서	인력 양성
	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비SCI		수 집	등 록					
최종목표	2		4	4	3	4		2			1,000	1		20
연구기간 내 달성실적	6		3	3	4	6		8	546,788		20.6	2		23
달성율(%)	300		75	75	133	150		400	-		2.1	200		115

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)(해성전복양식)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족 보통 미흡

(근거 :

)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구 성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

나. 연구 성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는? (※중간·단계평가에 한함)

- 충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는? (※중간·단계평가에 한함)

- 확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)(연일수산)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

만족 보통 미흡

(근거 : _____)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구 성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

충분 보통 불충분

나. 연구 성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는? (※중간·단계평가에 한함)

충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는? (※중간·단계평가에 한함)

확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)(입암포영어조합법인)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

만족 보통 미흡

(근거 : _____)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구 성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

충분 보통 불충분

나. 연구 성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는? (※중간·단계평가에 한함)

충분 고려 중 중단


다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는? (※중간·단계평가에 한함)

확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
프로젝트 책임자	국립수산과학원 수산종자육종연구소	해양수산연구원	박 철 지 

3. 연구비 집행실적 (2017~2021)

구분	세부프로젝트명		금액	년도	계획금액	사용액	잔액	비고
육종 참전복 배수체 종자 개발과 국내외 산업화	육종 참전복 배수체 종자의 사양관리 및 대량생산 기술개발과 국내외 판매			2017	200,000	176,715	(23,285)	이월 금액 사용 완료
				2018	380,000	377,845	(2,155)	
				2019	220,000	190,611	(29,389)	
				2020	200,000	179,861	(20,139)	
				2021	160,292	160,292	0	
				소계	1,160,292	1,160,292	0	
	배수체 생산기술 개량연구 및 특성조사			2017	150,000	149,312	(688)	이월 금액 사용 완료
				2018	150,000	149,263	(737)	
				2019	150,000	147,000	(3,000)	
				2020	150,000	150,000	0	
				2021	135,000	135,000	0	
소계	735,000	735,000	0					
총계				1,895,292	1,895,292	0		

4. 연구목표 대비 성과

구분	품종개발		특허		논문		분 자 마 커	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전	마케팅 전략 수립 보고서	인 력 양 성
	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비SCI		수 집	등 록					
최종목표	2		4	4	3	4		2			1,000	1		20
최종실적	6		3	3	4	7		8	546,788		20.6	2		23
달성율(%)	300		75	75	133	175		400	-		2.1	200		115
1 차 년 도	목표		1	1	1	1		1						4
	실적		1			2		3						4
	달성률		100	0	0	200		300						100
2 차 년 도	목표		1			1		1			5			4
	실적		1		1	1		3			5.3	1		5
	달성률		100		-	100		300			106	-		125
3 차 년 도	목표		1	1	1	1					245	1		4
	실적			2	1	2		1			15.3	1		5
	달성률		0	200	100	200		-			6.2	100		125
4 차 년 도	목표	1		1		1					250			4
	실적	4		1		1	2		1	127,170				6
	달성률	400		100		-	200		200	-				110
5 차 년 도	목표	1			2	1					500			4
	실적	2			1	1				419,618				3
	달성률	200			50	100				-	0			75

5. 핵심기술

구분	핵심기술 명
①	불임 배수체 전복 유도용 고용량·고효율 대량처리 기술
②	전복 조기성숙 유도 기술
③	DNA를 이용한 배수체 품종 판별 기술
④	배수체(수컷) 전복의 생식능력분석을 위한 분자발현 마커 기술

6. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v			v	v	v			
②의 기술					v			v		
③의 기술		v			v	v	v			
④의 기술	v									v

7. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술 명	핵심기술별 연구결과 활용계획 및 기대효과
①의 기술	- 육종품종의 배타적 기술권리 보호 및 생태계 위해성(생물다양성 훼손) 저감형 품종의 산업화를 위한 생식학적격리 품종의 대량생산 프로토콜로 활용 - 참전복 이외 패류의 배수체 품종 대량유도를 위한 핵심 참고지침으로 활용
②의 기술	- 기후변화에 대비하여 전복 종자를 연중 생산 가능하게 하여 소득 창출에 기여
③의 기술	- 배수체 전복 생산 시 신속하고 간편하게 배수체 판독이 가능하게 함(특허 출원)
④의 기술	- 전복 및 무척추동물 양성생식기능의 평가와 분자유종조작을 위한 타깃 발현유전자 소재로 활용(패류 양성생식의 진화적 메커니즘 규명 및 인위적 정밀조절 기술에 관한 후속 연구과제 발굴)

8. 연구종료 후 성과창출 계획

구분	품종개발		특허		논문		분자마커	유전자원		국내 매출액 (천만원)	종자 수출액 (만달러)	기술 이전	마케팅 전략 수립 보고서	인력 양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
최종목표	2		4	4	3	4		2			1,000	1		20
연구기간 내 달성실적	6		3	3	4	7		8	55		20.6	2		23
연구종료 후 성과창출 계획	1		1	1						50	50	1		

9. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술 명	불임 배수체 전복 유도용 고용량·고효율 대량처리 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	30,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	3~5년	실용화예상시기	2025년
기술이전 시 선행조건	전복 종자생산 시설, 유전공학 전문지식을 겸비한 전문인력		

핵심기술 명	DNA를 이용한 배수체 판별 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	3~5년	실용화예상시기	2025년
기술이전 시 선행조건	배수체 전복 종자생산 시설 보유(대량화 처리 장치 및 배수체 유도기술)		

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부·해양수산부에서 시행한 Golden Seed 프로젝트 사업 연구 개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부·해양수산부(농림식품 기술기획평가원)에서 시행한 Golden Seed 프로젝트 사업의 연구 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.