

(19)대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. <i>A01K 67/00</i> (2006.01) <i>A01K 67/033</i> (2006.01)	(45) 공고일자 2006년04월17일 (11) 등록번호 10-0571997 (24) 등록일자 2006년04월11일
--	--

(21) 출원번호	10-2005-0017701	(65) 공개번호
(22) 출원일자	2005년03월03일	(43) 공개일자

(73) 특허권자 이화여자대학교 산학협력단
 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자 송준임
 서울특별시 종로구 청운동 106

황성진
 서울특별시 강남구 논현동 223

(74) 대리인 특허법인다래

(56) 선행기술조사문헌 JP06225663 A JP2003009713 A KR1020050003508 A * 심사관에 의하여 인용된 문헌	JP2001238563 A KR1020050003507 A
---	-------------------------------------

심사관 : 김정태

(54) 한국산 연산호류의 유생 채취방법 및 유생 배양방법

요약

본 발명은 한국산 연산호류(soft coral)의 대량 증식을 위한 유생 채취방법 및 배양방법을 제공한다.

본 발명의 연산호류 유생 채취방법은,

1) 연산호류의 성숙 개체를 선정하는 단계; 2) 선정된 연산호류를 채취하는 단계; 3) 채취된 연산호류를 배양하여 유생을 발생시키는 단계; 및 4) 유생을 채취하는 단계를 포함하여 이루어진다.

본 발명의 연산호류 유생 배양방법은 배양수에 넣고 수류, 산소, 칼슘 및 먹이를 공급하면서 배양함을 특징으로 한다.

본 발명의 연산호류 유생 채취방법을 통해 연산호류의 유성번식에 의해 발생한 유생을 수득하고, 수득한 유생을 본 발명의 연산호류 유생 배양방법으로 배양하여 연산호류 유생을 폴립 및 군체로 발달시키기 위한 조건을 최적화시킴으로써, 한국산 산호자원을 대량 증식시킬 수 있어, 종 보전 및 생태계 복원은 물론, 신물질 연구나 유전학적 연구 등을 위한 종 확보 수단으로 직접 사용될 수 있으며, 관광용 해양 수조 사업의 내수와 수출로 경제성이 증대되는 효과를 가져다 준다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 큰수지맨드라미의 월별 성숙한 정낭의 빈도를 나타낸 것이고,

도 2는 큰수지맨드라미의 월별 성숙한 난모세포의 빈도를 나타낸 것이고,

도 3a는 큰수지맨드라미의 발달 형태를 나타낸 사진이고, 도 3b는 큰수지맨드라미의 초기 발생에서 P단계, OP단계, WP 단계에 있는 개체의 빈도 변화를 나타낸 것이며,

도 4a는 밤수지맨드라미의 발달 형태를 나타낸 사진이고, 도 4b는 밤수지맨드라미의 초기 발생에서 P단계, OP단계, WP 단계에 있는 개체의 빈도 변화를 나타낸 것이며,

도 5는 연산호류 유생 배양에서, 배양수에 따른 유생의 생존율을 나타낸 것이고,

도 6은 연산호류 유생 배양에서, 발생에 영향을 주는 조건에 따른 유생의 생존율을 나타낸 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 한국산 연산호류의 대량 증식을 위한 유생 채취방법 및 유생 배양방법에 관한 것이다.

산호충류는 "바다의 꽃"이라 불리우며, 오랫동안 보석이나 장신구용으로 상품화 되어 왔지만, 최근에는 산호 추출물의 향암, 항균 작용이 보고되면서 그 가치가 재평가되고 있다. 산호는 전 세계적으로 CITES(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)에서 6,000여종 전체를 규제종으로 지정하고 있다. 한국에서는 1998년에 환경부 지정 '한국의 멸종위기 및 보호야생 동·식물' 중 산호충류 15종을 보호종으로 지정한 바 있고, 2004년에는 문화재청 지정으로 '연산호 군락'과 '해송류'를 각각 천연기념물로 지정하기에 이르렀다. 지구 역사상 산호초 형성은 지구상에 생물이 살 수 있는 환경을 만들어 주었고, 현재도 산호 서식지는 어장이 형성되며, 다양한 생물들이 어울려 살 수 있는 생태학적으로 매우 중요한 해양 생태계를 이루고 있다.

온대 해역인 우리나라에서는 제주도 해역의 서귀포 문섬, 숲섬 및 범섬 일대가 쿠로시오 난류의 영향으로 다양한 해양생물이 분포하는 독특한 해양생태계를 이루고 있다. 이 지역은 잘 발달된 조하대 암반 기질에 다양한 부착생물이 서식하며, 특히 연산호류, 해양류 등이 군집을 이루고 있어 우리나라에서 종다양성(species diversity)이 가장 높은 지역으로 간주되고 있다. 이 지역의 화려한 연산호 군락(soft coral community)은 열대나 아열대에서는 볼 수 없는 특유한 생태계로 UNEP의 ICRI(International Coral Reef Initiative)에 2000년에 이미 보고되었을 뿐만 아니라, 세계 해양보존지역 위원회에서 도 해양보호지역(Marine Protected Area, MPA)으로 선포하여 보호하려는 계획을 세우고 있다.

그러나, 최근에는 귀중한 연산호 군락지가 무분별한 채취와 어업, 잠수함 관광, 방파제 공사 등과 같은 산업활동에 의하여 급속도로 파괴 되어가고 있다. 또한, 산호충류는 오랫동안 각종 보석용이나 장식용으로 사용되면서 귀중한 산호자원이 고갈되어 왔고, 해양관광용이나 수족관용으로 이용되면서 위기에 처하게 되었다.

미국의 플로리다, 하와이, 괌에서는 대규모 산호 양식장을 건설하여 종 보존을 위한 사업 및 관광용과 상업용 자원으로 생산 개발하고 있으나, 주로 돌산호류의 대량 증식이 이루어지고 있으며, 연산호류에 대한 증식은 일부 시도되고 있다.

그러나, 국내에서는 산호류를 대량 증식시키려는 시도가 이루어진 적이 전혀 없으며, 극소수 수조가게에서 외국산 산호종을 일부 수입하여 해수 수조를 장식하는 정도이다. 그리고, 일부 관상용 종 개발을 위한 한국해양연구원의 연구사업인 "한국산 해산관상생물 개발을 위한 기초연구"가 식량자원이 아닌, 다른 목적을 위한 종의 생태 연구와 증·양식 개발 연구로 초기단계에 이르고 있을 뿐이다.

한편, 한국특허공개 제10-2005-3508호(2005.01.12 공개)는 한국산 산호충류의 무성생식에 의한 대량 증식 방법에 관한 것으로, 연산호류의 무성생식에 의한 증식을 개시하고 있다. 이 방법에 따라 무성생식으로 증식시킬 경우, 모체로부터 용이하게 증식 개체들을 얻을 수 있으나, 이들은 모두 클론들로, 서식처내의 유전자 풀(Gene pool)을 감소시켜 유전적 다양성의 저하를 초래할 수 있다. 또한 무성생식 방법은 모체 1 개체로부터 얻을 수 있는 증식 개체의 수에 한계가 있는 단점이 있다.

따라서 연산호류를 유성생식에 의해 대량 증식시킬 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있고, 이를 위해서 증식 대상종의 생식주기, 생식방법 등의 생식양상의 연구로 성숙한 연산호류의 대량 증식 방법이 결정될 수 있다.

이에 본 발명자들은 한국산 연산호류를 대량으로 증식시킬 수 있는 최적의 증식, 배양하는 방법을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 한국산 연산호류의 대량증식을 위한 유생 채취방법 및 배양방법을 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 한국산 연산호류(soft coral)의 대량증식을 위한 유생 채취방법을 제공한다.

본 발명의 연산호류 유생 채취방법은,

1) 연산호류의 성숙 개체를 선정하는 단계; 2) 선정된 연산호류를 채취하는 단계; 3) 채취된 연산호류를 배양하여 유생을 발생시키는 단계; 및 4) 유생을 채취하는 단계를 포함하여 이루어진다.

상기 연산호류는 연산호류에 속하는 것은 모두 가능하고, 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*), 밤수지맨드라미(*Dendronephthya castanea*), 자색수지맨드라미(*Dendronephthya putteri*) 중 선택된 하나인 것이 바람직하다.

본 발명의 연산호류 유생 채취방법은 자웅이체(gonochoric) 혹은 자웅동체(hermaphroditic)의 형태를 갖는 연산호류의 유성번식에 의해 발생된 유생을 채취하는 것이다.

본 발명의 연산호류 유생 채취방법 제 1단계는, 연산호류의 암 수 성숙 개체를 선정하는 단계이다.

큰수지맨드라미의 경우, 자웅이체이며, 이들의 유성생식시기가 여름부터 초가을로, 6~10월에 성숙개체를 선정하는 것이 바람직하다.

난모세포는 6~10월, 정낭세포는 6~9월에 성숙한 양상을 갖는다. 이 기간 중 주요 유성생식시기는 7~9월이며, 이 때 성숙한 난모세포가 가장 빈도가 높고, 유성생식을 통해 암컷 군체에서 유생이 발생되는 시기는 7~10월이므로, 성숙개체 선정시기는 7~10월이 가장 바람직하다

큰수지맨드라미의 성숙한 난모세포 크기는 300~500 μm 이고, 오렌지색임을 특징으로 한다. 난모세포는 원형으로 소낭에 싸여 있으며, 생식선의 내부는 난황으로 짙어 있고, 핵이 한쪽으로 치우쳐 존재하는 특징을 보인다.

큰수지맨드라미의 성숙한 정낭은 크기가 250~375 μm 이고, 상아색임을 특징으로 한다. 정낭은 난모세포와 비교하면 불규칙한 원형으로, 미성숙시에는 정원세포가 정낭을 꽂 채우고 있으나, 성숙함에 따라 정모세포가 정낭의 중간부위에 배열되어 중앙부가 비어보이는 상태로 변하는 특징을 나타낸다.

밤수지맨드라미의 경우도 또한, 상기 큰수지맨드라미와 유사한 유성생식양상을 나타내며, 주요생식시기는 7~9월이다.

본 발명의 연산호류 대량증식방법의 제 2단계는, 선정된 연산호류를 채취하는 단계로, 1단계에서 선정된 성숙한 연산호류 군체의 일부 가지를 8~10 cm 크기로 절단하는 것이 바람직하다.

채취시에 절단에 사용된 도구로 날카로운 가위 또는 칼을 사용한다.

절단된 연산호류의 가지는 자연해수와 100% 산소를 이용하여 비닐에 포장하여 이동하고, 이동된 가지는 포장상태로 약 30분간 23~26 ℃에서 온도 적응을 시킨다.

본 발명의 연산호류 대량증식방법의 제3단계는, 제2단계에서 채취된 성숙한 연산호류를 배양하여 유생을 발생시키는 단계로,

먼저, 상기 제2단계에서 채취된 연산호류를 자연해수를 담은 유수식 배양수조 내에서 약 24시간 동안 1차 순응시킨 후 배양하며, 자연해수 및 인공해수 모두에서 배양가능하다.

자연해수에서 연산호류를 배양할 경우, 순응 후 바로 자연해수에서의 배양 단계를 수행하고, 인공해수에서 연산호류를 배양할 경우에는 자연해수 및 인공해수의 혼합 배양수에서의 2차 순응 단계를 거치도록 한다.

본 발명의 제3단계에서 자연해수에서 배양시, a) 채취된 연산호류를 자연해수를 담은 폐쇄식 배양수조에서 24시간동안 순응시키는 단계; 및 b) 순응된 연산호류를 자연해수를 사용한 폐쇄식 배양수조에서 12시간 간격으로 자연해수를 교환해주면서 배양하여 유생을 발생시키는 단계를 포함하여 수행한다.

본 발명의 제3단계에서 인공해수에서 배양시, a) 채취된 연산호류를 자연해수를 담은 폐쇄식 배양수조에서 24시간동안 1차 순응시키는 단계; b) 1차 순응된 연산호류를 자연해수와 인공해수가 혼합된 배양수, 바람직하게는 1:1 비로 혼합된 배양수를 담은 폐쇄식 배양수조에서 24시간동안 2차 순응시키는 단계; 및 c) 2차 순응된 연산호류를 100% 인공해수를 사용한 폐쇄식 배양수조에서 12시간 간격으로 인공해수를 교환해주면서 배양하여 유생을 발생시키는 단계를 포함하여 수행한다.

배양수조의 시스템은 5~10 ℓ 용량의 폐쇄식 배양수조가 바람직하고, 연산호류를 배양하는 데는 적절한 수류가 필수적이기 때문에, 수류와 산소 공급을 위하여 대용량의 산소공급기를 설치된 것이 바람직하다.

또한, 배양 수조에 물을 걸러주는 장치와 단백질을 제거기인 스킴머(skimmer)는 사용하지 말아야 한다.

유생 발생은 해수의 온도와 암모니아 등의 요인에 의해 영향을 받기 때문에 가능한 한 하기의 서식처의 조건과 동일하게 배양수 조건을 맞추어 주어야 한다(Bassim et Sammarco, 2003).

[생식시기의 서식처 수질 조건]

- 암모니아(NH_3 , NH_4) : 0.023~0.038 mg/ℓ
- 아질산염(NO_2) : 0.001~0.009 mg/ℓ
- 질산염(NO_3) : 항상 0값 유지
- 온도 : 23~26 ℃ 정도 유지
- 수소이온 농도(pH) : 8.1~8.3 정도 유지
- 염도(Salinity) : 32~33 ‰
- 칼슘(Calcium) : 350~400 ppm

또한, 본 발명에서 유생을 발생시키기 위한 배양수조의 시스템으로 일반적인 배양수조 시스템과는 다른 수조를 사용하여야 하는데, 우선, 배양수조는 5~10 L 용량의 폐쇄식 배양수조가 바람직하고, 연산호류를 배양하는 데는 적절한 수류가 필수적이기 때문에, 수류와 산소 공급을 위하여 대용량의 산소공급기를 설치된 것이 바람직하다.

또한, 배양 수조에 물을 걸러주는 장치와 단백질 제거기인 스킴머(skimmer)는 사용하지 말아야 한다.

본 발명의 연산호류는 배우자(gamete)를 체외로 내보내는 '방출 방법(broadcasting mode)' 및 플라눌라(planulae) 유생을 체외로 내보내는 '체내 양육 방법(internal brooding mode)'과 '체외표면 양육방법(external surface brooding mode)' 등 3가지 유성생식 방법을 갖는다(Benayahu, Hydrobiologia, 216/217, 125~130, 1991).

큰수지맨드라미의 경우, 유성생식을 통해 7 ~ 10월에 암컷 군체에서 유생이 발생되게 되고, 유생을 점액질에 싸서 방출하는 '체내 양육자(internal brooder)'의 형태로 유생을 방출한다.

밤수지맨드라미의 경우도 또한, 상기 큰수지맨드라미와 유사한 유성생식양상을 나타내며 '체내 양육자' 형태로 유생을 방출한다.

본 발명의 연산호류 유생 채취방법의 제 4단계에서는, 상기 3단계에서 발생되어 방출된 유생을 채취하는 단계로, 격자크기가 100~300 μm 인 플랑크톤 망을 이용하여 배양수를 걸러 증식용 유생을 얻는 것이 바람직하다.

본 발명의 4단계에서 채취된 모체로부터 방출된 유생은 주황색으로 크기가 500~1200 μm 이며 쌀알 모양이고, 방출된 유생은 이배엽성 조직을 뚜렷하게 보여주고 있으며, 몸 표면에 많은 섬모를 가지고 있어 활발한 운동성을 보인다.

이와 같은 방법으로 채취된 연산호류의 유생은 하기의 유생 배양방법을 통해 배양되어 폴립으로 성장·발달될 수 있다.

본 발명은 한국산 연산호류 대량증식을 위한 유생 배양방법을 제공한다.

본 발명은 연산호류(soft coral) 유생을 배양수에 넣고 수류, 산소, 칼슘 및 먹이를 공급하면서 배양하는 연산호류 유생 배양방법을 제공한다.

본 발명의 연산호류 유생 배양방법에서, 상기 유생은 연산호류의 유성생식으로 발생한 것을 사용하고, 상기 연산호류는 연산호류에 속하는 것은 모두 가능하고, 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*), 밤수지맨드라미(*Dendronephthya castanea*), 자색수지맨드라미(*Dendronephthya putteri*)가 바람직하다. 또한, 서귀포 근해에서 채취된 것이 바람직하고, 문섬, 범섬 등지에서 채취한다.

유생 배양을 위해 한국산 연산호류가 서식하는 서식해황에 맞추어 배양 조건을 주고, 그 과정 중에 다양한 조건실험을 통해 종에 따라 생장에 최적의 조건을 찾아 맞추는 것이 바람직하다.

본 발명의 유생 배양방법에서, 상기 배양수는 인공해수 또는 자연해수를 모두 사용할 수 있다.

배양수는 유생의 성장률 및 생존율에 영향을 미치는데, 높은 유생의 생존율을 위해서는 자연해수가 바람직하며, 0.45 μm 필터로 여과한 자연해수를 사용하는 것이 가장 바람직하다. 또한, 배양수는 12시간마다 교환해 주는 것이 바람직하다.

유생의 배양온도는 생식시기의 해수온도를 고려하여 22~24 $^{\circ}\text{C}$ 가 바람직하다.

또한, 유생의 배양은 폐쇄식·유수식 배양수조에서 모두 가능하나, 유생은 기질에 부착하여 변태를 하기 전까지 수중에서 떠다니는 부유성 유생단계(planktonic larva)를 갖기 때문에, 배수구 입구에 플랑크톤 망을 쳐서 유생이 빠져나가지 못하도록 하는 것이 바람직하다.

배양수에는 필수적으로 적절한 수류 및 산소를 공급하면서 배양함을 특징으로 하며, 이를 위해 대용량의 산소공급기가 설치되는 것이 바람직하다.

또한 본 발명의 유생 배양방법에서, 유생의 발달 단계에 따라 먹이 및 칼슘의 투여가 적절히 조절되는 것이 유생의 정상적 발달을 위해 바람직하다.

본 발명의 배양방법에서, 유생의 먹이(feeding)는 1~2 μm 의 식물성 플랑크톤을 섭식함을 특징으로 하고, 배양시 WP (white primordial polyp) 단계 이후에 먹이를 투여하는 것이 바람직하다.

본 발명의 배양방법에서, 배양수가 함유하는 칼슘농도를 500 mg/liter로 함유시키고 이를 유지하는 것이 바람직하다. 칼슘은 연산호류가 플라눌라 유생에서 폴립의 형태로 성장하는데 필수적이며, 배양 전기간에 걸쳐 500 mg/liter 농도를 유지하도록 배양수에 투여하는 것이 가장 바람직하다.

연산호류의 유생 배양시, 유생이 기질에 부착하여 변태를 하기 전까지는 제3단계의 일정한 활동 양상을 보인다.

첫 단계에는 유생이 배양수 내에서 상·하, 좌·우로 자유롭게 움직인다.

둘째 단계에는 수면 바로 아래에서 유영을 한다.

셋째 단계에는 부착을 위한 적절한 기질을 찾기 위하여 바닥으로 내려온다.

플라눌라(planulae, P) 유생이 기질에 부착한 후에는 곧바로 변태를 시작하여 주황색의 폴립 과정(orange primordial polyp, OP)을 거쳐 최초의 흰색 폴립(white primordial polyp, WP)으로 성장해 간다.

OP 단계의 폴립은 우상체가 없는 촉수의 발달을 위한 촉수 홈(tentacle groove) 및 발달 중인 격막, 격막사, 위수강 등을 갖는다.

WP 단계의 폴립은 촉수, 우상체(pinnule), 격막, 격막사, 위수강, 골편 등이 형성되면서 완전한 최초 폴립으로 발달한다.

한 개체로서의 완전한 폴립으로 성장이 끝난 후에는, 무성생식법인 출아법에 의해 두 번째 폴립을 만들고, 계속적으로 무성생식을 하여 군체로 성장하는 발달 단계를 거치게 된다.

본 발명의 연산호류 유생 채취방법을 통해 연산호류의 유성번식에 의해 발생한 유생을 수득하고, 또한 본 발명의 최적화된 유생 배양방법을 통해 연산호류 유생을 폴립 및 군체로 발달시킴으로써, 한국산 산호자원을 대량 증식시킬 수 있어, 종 보전 및 생태계 복원은 물론, 신물질 연구나 유전학적 연구 등을 위한 종 확보 수단으로 직접 사용될 수 있으며, 관광용 해양 수조 사업의 내수와 수출로 경제성이 증대되는 효과를 가져다 준다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예] 한국산 연산호류의 유생 채취 및 유생 배양

1) 본 발명의 연산호류의 생식 주기 및 시기 조사

본 발명의 연산호류의 유성번식에 의한 대량증식을 위한 연산호류의 성숙 개체를 선정하고, 채취하기 위해서, 연산호류의 생식주기 및 생식시기에 대한 연구를 수행하였다.

서귀포 근해의 문섬, 범섬 등지에서 스쿠바를 이용하여 증식대상인 큰수지맨드라미 군체로부터 생식선을 매월 약 100여개 정도 적출하여 생식선의 크기, 형태 및 색상을 관찰하였다. 본 실험은 2003년 2월부터 2004년 1월까지 실시하였다.

성숙한 생식선은 크기, 내부형태 변화 및 색상 변화를 통하여 판별하였으며 크기의 단위는 μm 로 표시하였다.

결과는 도 1과 도 2에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, 큰수지맨드라미는 성숙한 정낭이 각각 6~9월에 빈도가 높으며 도 2와 같이, 성숙한 난모세포는 6~10월에 빈도가 높은 것으로 나타나, 유성생식 시기가 여름부터 초가을인 것으로 조사되었다.

또한, 암컷의 경우에는 6월에 가장 낮은 빈도로 성숙한 생식선을 갖는 반면, 수컷은 6월에 성숙한 생식선의 빈도가 가장 높은 것으로 나타나 수컷이 암컷보다 성적으로 먼저 성숙에 이르는 경향을 보였다. 성숙한 난모세포가 7월과 9월에 가장 많이 관찰되는 것으로 보아 이 시기가 주된 생식 시기임을 알 수 있다.

또한, 성숙한 난모세포는 크기가 300~500 μm 이며 오렌지색을 띠고 있으며, 성숙한 정낭은 크기가 250~375 μm 로 상아색을 띠고 있었다. 난모세포는 원형으로 소낭에 싸여있으며, 생식선의 내부는 난황으로 꽉 차 있고 핵이 한쪽으로 치우쳐 존재한다. 정낭은 난모세포와 비교하면 불규칙한 원형을 띠고 있다. 미성숙 시에는 정원세포가 정낭을 꽉 채우고 있으나 성숙함에 따라서 정모세포가 정낭의 중간 부위에 배열되어 중앙부가 비어 보이게 된다.

유성생식 양상을 파악하기 위하여 이상의 생식선 발달 상황 조사에 의해 추정된 생식시기를 중심으로 조직학적 연구와 현장 조사를 병행하였다.

그 결과, 큰수지맨드라미는 7월에서 10월 사이에 유생을 점액질에 싸서 방출하는 체내 양육자임을 밝혀냈다.

또한, 보호종인 밤수지맨드라미는 동일한 방법으로 생식시기가 7~9월임을 확인하였다.

2) 본 발명의 연산호류 대량증식을 위한 유생 채취

상기에서 조사된 큰수지맨드라미 및 밤수지맨드라미의 유성생식시기에, 서귀포 근해의 문섬, 범섬 등지에서 유생을 갖고 있는 암컷 군체의 일부 가지를 날카로운 가위를 이용하여 9 cm 크기로 절단하여 채취하였다.

절단한 가지를 자연해수와 100% 산소를 이용하여 비닐에 포장하여 운반하였고, 운반된 가지는 포장된 상태로 약 30분간 온도 적응을 시킨 다음, 유수식으로 된 자연해수 배양수조 내에서 약 24시간동안 1차 순응시켰다.

순응이 끝난 가지는 자연해수와 인공해수 모두 배양이 가능하며, 인공해수에서 유생을 채취하고자 할 경우에는 2차 순응 단계를 거치도록 하였다.

채취된 연산호류를 인공해수에서 배양할 경우에는 1차 순응이 끝난 가지를 자연해수와 인공해수가 1:1로 섞인 배양수에 산소공급이 되는 7 리터 용량의 폐쇄식 배양수조로 옮기고, 24시간 경과 후에는 100% 인공해수를 사용한 폐쇄식 수조에서 배양하였다. 폐쇄식 배양수조로 옮긴 후부터는 하루에 두 번씩 12시간 간격으로 배양수를 갈아주었고, 격자 크기가 100 μm 인 플랑크톤 망을 이용하여 배양수를 걸러 증식용 유생을 채취하였다.

연산호류 가지로부터 방출된 유생은 주황색으로 크기가 500~1200 μm 이며 쌀알 모양이었다(도 3a, 도 4a 참조). 방출된 유생은 이배엽성 조직을 뚜렷하게 보여주고 있으며, 몸 표면에 많은 섬모를 가지고 있어 활발한 운동성을 보였다.

유생 발생은 해수의 온도와 암모니아 등의 요인에 의해 영향을 받기 때문에 가능한 서식처의 조건과 동일하게 맞추어 주어야 한다(Bassim et Sammarco, 2003).

3) 본 발명의 연산호류 유생 배양시 조건 최적화 실험

본 발명에서는 유성생식을 통한 연산호류의 대량 증식 성공률을 높이기 위해 연산호류의 유생 배양시 최적 조건을 알아보았다.

상기 실시예 1에서 준비한 큰수지맨드라미와 밤수지맨드라미 유생을 대상으로 하였고, 실험 조건은 인공해수/자연해수, 먹이/갈슘이 초기 발생과정에서 유생과 폴립의 생존율 및 성장률에 영향을 미치는지에 대해 실험을 수행하였다.

이 때, 유생 초기 발생 단계를 3단계로 나누어 각 조건에 따른 발달 상황을 비교하기 용이하도록 하였다.

첫 번째는 플라눌라(planulae) 유생 단계로 결과표에서 P로 표시하였고, 이 단계의 발달 상황은 운동성이 있는 유생이 기질에 부착하고 폴립단계로 변태하기 전까지를 포함한다.

두 번째는 초기 폴립단계로 결과표에서 OP(orange primordial polyp)로 표시하였다. 이 단계는 유생이 폴립으로 변태를 하는 과정 중에 우상체가 있는 촉수를 형성하기 전까지이며, 이 때의 폴립은 연한 노란색을 띄고, 촉수가 만들어지기 위해서 촉수 홈(tentacle groove)이 형성되어 있다.

세 번째는 후기 폴립단계로 결과표에서 WP(white primordial polyp)로 표시하였다.

도 3a 및 도 3b 는 큰수지맨드라미의 발달 형태 및 초기 발생 단계에서의 P단계, OP단계, WP 단계에 있는 개체의 빈도 변화를 나타낸 것이며,

도 4a 및 도 4b 는 밤수지맨드라미의 발달 형태 및 초기 발생 단계에서의 P단계, OP단계, WP 단계에 있는 개체의 빈도 변화를 나타낸 것이다.

3-1) 초기 발생 과정에서의 인공해수/자연해수 영향 비교 조사

초기 발생과정에 있어 발생 성공률을 높이기 위해 인공해수와 자연해수 중 발생률에 영향을 미치는 정도를 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

유생을 인공해수 배양수와 0.45 μm 필터로 여과시킨 자연해수를 각각 멸균된 6-웰에 넣어 24 $^{\circ}\text{C}$ 생장용 배양기(growth chamber)내에서 배양하였다.

배양수 별로 보면, 인공해수에서는 P 단계에서 OP와 WP 단계로의 발달이 2일 내에 이루어졌고, 자연해수에서도 배양 2일 만에 WP 단계의 폴립으로 발달하여 배양수에 따른 초기 발생 성장률의 차이가 없는 것으로 나타났다.

그러나 배양수 조건에 따른 생존율은 발달 단계에 따라 차이가 있는 것으로 조사되었다.

도 5의 연산호류 유생의 배양수에 따른 생존율을 보면, 발생 초기에 자연해수에서 더 높으나, 중기에는 인공해수에서 더 높고, 후기에는 자연해수에서 생존율이 높은 것으로 조사되어, 전반적으로 자연해수에서의 생존율이 높은 것으로 나타났다.

3-2) 초기 발생 과정에서의 먹이/칼슘 영향 비교 조사

상기 3-1)의 결과에 따라 발생 후기에는 발생에 필요한 여러 요인들이 보다 중요한 것으로 추정되어, 연산호류 유생의 생존과 성장에 영향을 많이 미치는 먹이와 칼슘에 대해 조사하였다.

먹이는 크기 1~2 μm 의 식물성 플랑크톤을 사용하였고, 칼슘은 자연해수의 농도보다 100 mg/l정도 높은 500 mg/l를 유지하도록 하였다.

실험은 0.45 μm 필터로 여과시킨 자연해수에 먹이 또는 칼슘 조건을 각각 하나의 조건만 처리한 실험군, 먹이 및 칼슘 두 조건 모두 처리한 실험군을 대상으로 수행되었다.

도 6의 결과를 보면, 먹이 및 칼슘이 발생과정에 있어 성장률을 증가시키는 것으로 조사되었다. 생존율을 보면, 먹이 조건에서는 배양 11일 후에는 25%였고, 칼슘 조건 및 먹이/칼슘 조건에서는 각각 75%, 38.8%로 조사되어, 칼슘 조건이 생존율에 가장 큰 영향을 주는 것으로 나타났다.

또한, 배양 14일 째에 먹이/칼슘 조건에서 WP의 빈도가 다른 조건에서 보다 2배 이상 높게 나타나 WP 단계 이후부터는 먹이의 투여가 중요한 것으로 조사되었다.

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 유생 채취방법에 따라 연산호류의 유생생식기간에 성숙한 생식선을 갖는 개체를 채취하고, 또한 본 발명의 유생 배양방법에 따라 연산호류 유생을 조건 배양함으로써 폴립으로의 성장과 발달이 가능하여 대량 증식이 가능함을 확인하였다.

발명의 효과

본 발명의 연산호류 유생 채취방법을 통해 연산호류의 유성번식에 의해 발생한 유생을 수득하고, 수득한 유생을 본 발명의 연산호류 유생 배양방법으로 배양하여 연산호류 유생을 폴립 및 군체로 발달시키기 위한 조건을 최적화시킴으로써, 한국 산 산호자원을 대량 증식시킬 수 있어, 종 보전 및 생태계 복원은 물론, 신물질 연구나 유전학적 연구 등을 위한 종 확보 수단으로 직접 사용될 수 있으며, 관광용 해양 수조 사업의 내수와 수출로 경제성이 증대되는 효과를 가져다 준다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

연산호류(soft coral) 유생을 배양수에 넣고 수류, 산소, 칼슘 및 먹이를 공급하면서 배양하는 연산호류 유생 배양방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 연산호류는 큰수지맨드라미(*Dendronephthya gigantea*), 밤수지맨드라미(*Dendronephthya castanea*), 자색수지맨드라미(*Dendronephthya putteri*) 중에서 선택된 하나임을 특징으로 하는 유생 배양방법.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 배양수는 인공해수 또는 자연해수를 사용함을 특징으로 하는 유생 배양방법.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 배양수는 0.45 μm 필터로 여과한 자연해수를 사용함을 특징으로 하는 유생 배양방법.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 배양수는 12시간 마다 교환함을 특징으로 하는 유생 배양방법.

청구항 6.

제 1항에 있어서, 상기 유생의 먹이는 1~2 μm 의 식물성 플랑크톤을 섭식함을 특징으로 하는 유생 배양방법.

청구항 7.

제 1항에 있어서, 상기 유생의 먹이는 배양시 WP (white primordial polyp) 단계 이후에 투여하는 것을 특징으로 하는 유생 배양방법.

청구항 8.

제 1항에 있어서, 상기 칼슘은 배양수에 농도 500 mg/liter로 함유시키고 이를 유지하는 것을 특징으로 하는 유생 배양방법.

청구항 9.

제 1항에 있어서, 상기 칼슘은 배양 전기간에 걸쳐 배양수에 투여하는 것을 특징으로 하는 유생 배양방법.

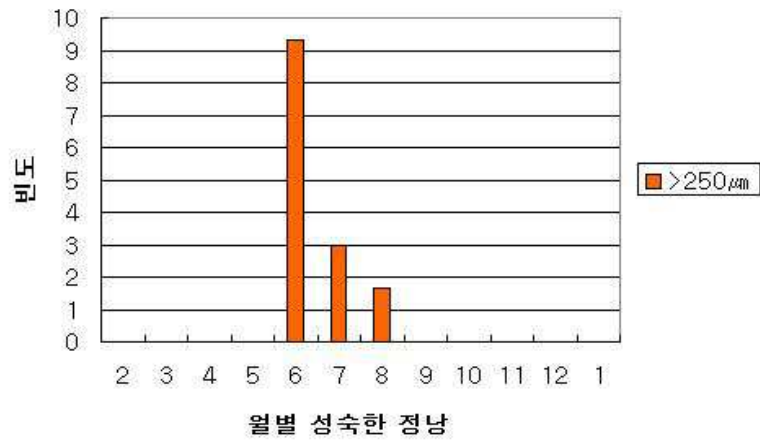
청구항 10.

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 유생은 다음 단계에 따라 채취한 것을 특징으로 하는 연산호류 유생 배양방법;

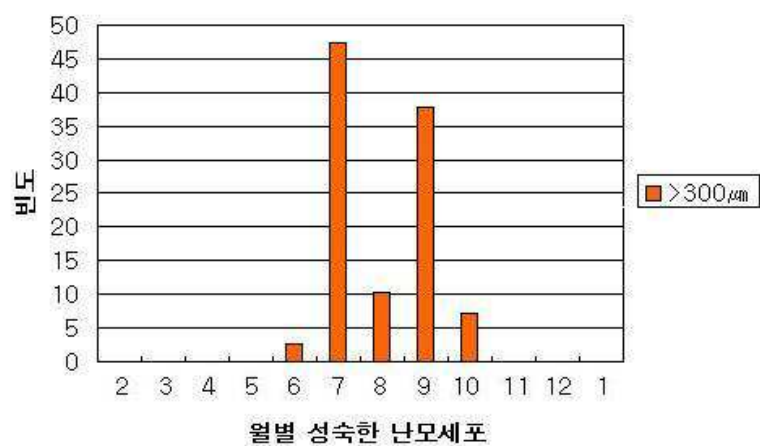
1) 연산호류의 성숙 개체를 선정하는 단계; 2) 선정된 연산호류를 채취하는 단계; 3) 채취된 연산호류를 배양하여 유생을 발생시키는 단계; 및 4) 유생을 채취하는 단계.

도면

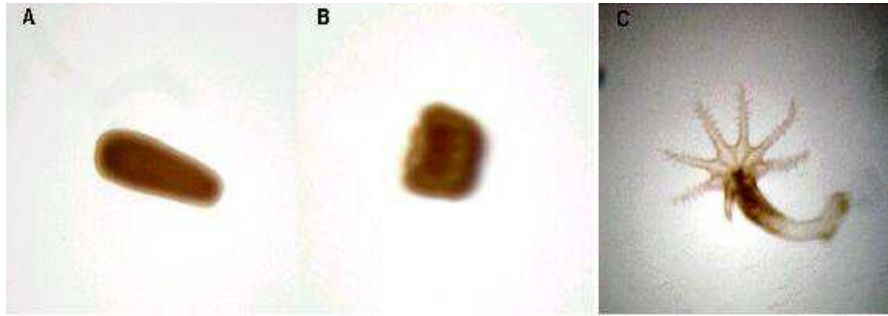
도면1



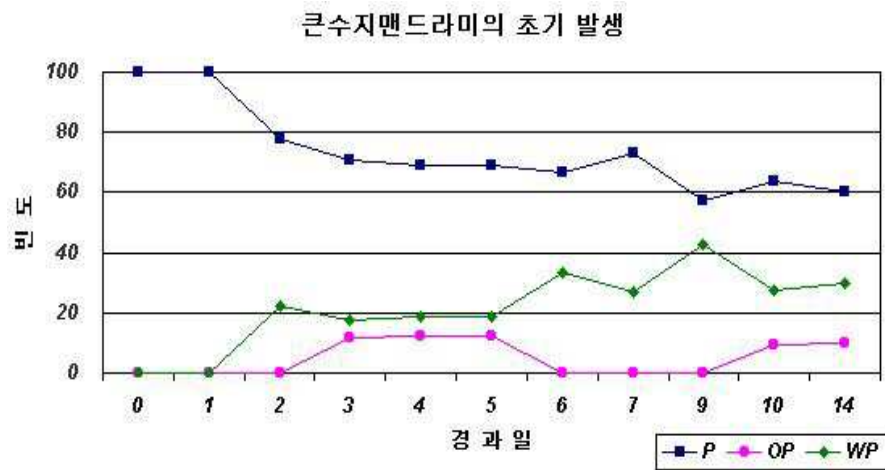
도면2



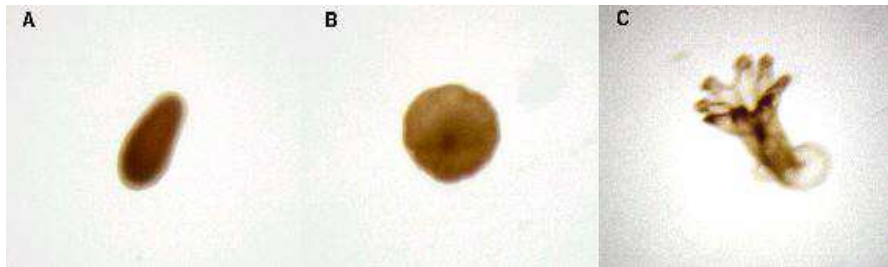
도면3a



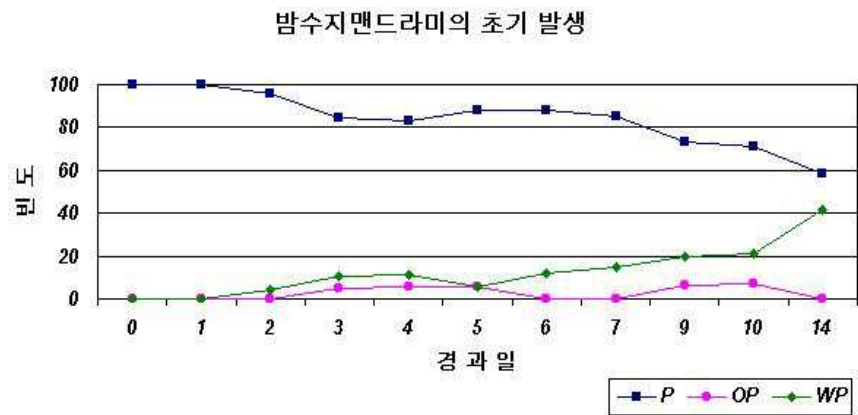
도면3b



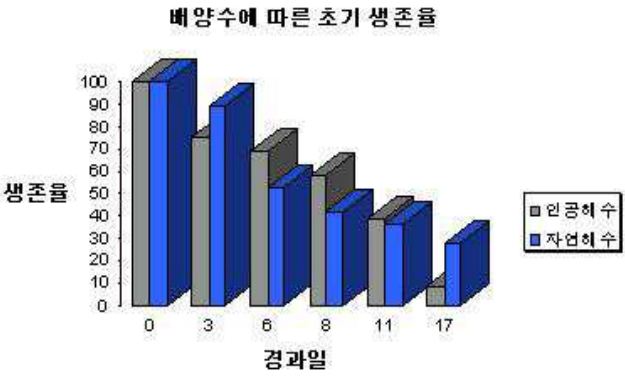
도면4a



도면4b



도면5



도면6

