

‘22년 멸종위기종 증식 기술개발 연구
2022 Study on the development of endangered species captive
propagation technique

멸종위기종복원센터
Research Center for Endangered Species

윤주덕, 유정우 등 19명
Ju-Duk Yoon, Yoo jeong woo, et al.

2022. 12.
December 2022

국립생태원
National Institute of Ecology

참여연구진

· 연구책임자

윤 주 덕	복원연구실 어류양서파충류팀	책임연구원
-------	----------------	-------

· 내부 연구원

김 근 식	복원연구실 어류양서파충류팀	선임연구원
-------	----------------	-------

강 동 원	복원연구실 어류양서파충류팀	전임연구원
-------	----------------	-------

유 정 우	복원연구실 어류양서파충류팀	전임연구원
-------	----------------	-------

유 나 경	복원연구실 어류양서파충류팀	전임연구원
-------	----------------	-------

황 정 은	복원연구실 식물팀	선임연구원
-------	-----------	-------

박 형 빈	복원연구실 식물팀	전임연구원
-------	-----------	-------

안 지 애	복원연구실 식물팀	전임연구원
-------	-----------	-------

백 주 형	복원연구실 식물팀	계장
-------	-----------	----

김 영 중	복원연구실 곤충·무척추동물팀	책임연구원
-------	-----------------	-------

윤 창 만	복원연구실 곤충·무척추동물팀	선임연구원
-------	-----------------	-------

김 황	복원연구실 곤충·무척추동물팀	전임연구원
-----	-----------------	-------

김 만 년	복원연구실 곤충·무척추동물팀	전임연구원
-------	-----------------	-------

김 진 영	복원연구실 곤충·무척추동물팀	전임연구원
-------	-----------------	-------

박 종 대	복원연구실 곤충·무척추동물팀	전임연구원
-------	-----------------	-------

최 예 진	복원연구실 곤충·무척추동물팀	전문위원
-------	-----------------	------

유 인 성	복원연구실 곤충·무척추동물팀	전문위원
-------	-----------------	------

· 외부 연구원

고 영 민	제주양서류생태연구소	소장
-------	------------	----

고 경 범	제주양서류생태연구소	
-------	------------	--

본 연구진은 연구윤리를 준수하였음을 서약합니다.

요 약 문

(어류) 멸종위기 담수어류의 완전 양식 기술 개발을 위해 여울마자의 인공성숙 유도 및 난질 개선방안연구, 큰줄납자루 인공증식 연구, 모래주사와 한강납줄개의 원종 확보 및 최적 사육조건 파악 연구 그리고 여울마자의 환경 적응력 파악을 통한 자연성 증진방안 개발 연구를 진행하였다. 여울마자 인공성숙 유도 및 난질 개선방안연구 결과 곤쟁이를 주 3회 급여한 그룹이 주 1회 급여한 그룹보다 약 1.57배 높은 비율의 양질의 알을 생산하였다. 수온 및 광주기 조절을 통한 큰줄납자루의 인공성숙 유도 및 인공증식 결과 332개의 난을 확보했으며, 수온 23℃에서 99.7%의 수정률 99%의 부화율을 보였다. 모래주사와 한강납줄개 원종확보 및 최적 사육조건 파악 결과 한강납줄개는 수온 23~25℃에서 모래주사는 수온 21~25℃에서 먹이 활동이 가장 활발하였고, 한강납줄개는 냉동 장구벌레를, 모래주사는 식물성 사료 및 냉동 장구벌레를 선호하였다. 여울마자의 자연성 증진을 위해 유영능력 향상 훈련, 포식자 인지 훈련 그리고 자연 먹이 섭이 훈련을 진행한 결과, 훈련 전보다 개선된 환경 적응력을 확인하였다.

(양서파충류) 수원청개구리의 증식 복원을 위해 원종 확보를 수행하였고, 유전자 분석 결과, 총 50개체의 수원청개구리 원종을 도입하였다. 수원청개구리를 사육하기 위해 사육장을 제작하였고, 번식을 위해서는 인공강우 형태의 번식장을 제작하였으나 번식하진 않았다. 추후, 번식을 위해 번식장을 재조성할 예정이다. 비바리뱀은 직접조사와 트랩을 이용한 포획을 시도하였지만, 출현하지 않았다.

(식물) 증식 기술 개발 연구로는 나도풍란 유묘의 최적 생육 조건을 실험을 통해 구명하고 기후변화에 따른 나도풍란의 생리적 특성 및 생장 변화를 모니터링하였으며, 무성생식방법을 이용하여 가는동자꽃 대량증식 개체를 확보하였다.

(곤충무척추동물) 소똥구리의 유효개체군을 확보하고 유전적 다양성 증대를 위해 몽골의 개체군을 추가적으로 도입하고, 몽골 현지의 서식환경에 대해서 조사하였다. 소똥구리의 최적 증식환경을 구축하여 산란율을 증대시킬 수 있는 조건에 대한 연구를 진행하였다. 주요 서식지 위협요인인 구충제(이버멕틴)의 환경 위해성을 알아보기 위해 소똥구리 근연종인 렌지소똥풍뎅이를 대상으로 생태먹이사슬 기반 이버멕틴 노출실험을 수행하여 잠재적 위해성을 조사하였다. 40주간 칼슘을 섭취한 참달팽이 실험군의 누적 평균 성장률(%)은 칼슘을 섭취하지 않은 대조군과 비교하여 최대 1.4배, 평균 1.3배 최소 1.2배 더 높았다. 특히, 생물에서 유래한 칼슘제를 섭취한 참달팽이의

누적 성장률이 인위적으로 제조한 중질탄산칼슘에 비해 6.9%p 높게 나타나 성장률 개선에 더욱 효과적인 것을 확인하였다. 10주간 칼슘 선호도를 실험한 결과 한 개체가 여러 칼슘제를 중복으로 섭취한 경우를 모두 포함한 총 섭취 횟수는 195회였으며, 굴껍데기(59회), 계란껍데기(46회), 산호(33회), 중질탄산칼슘(32회), 갑오징어뼈(25회) 순으로 확인되었다. 이에 따라, 성장률과 선호도 모두 우수하게 평가된 굴껍데기를 참달팽이에 급이할 가장 적합한 칼슘 보충제로 선정하였다.

+ 주요어: 여울마자, 큰줄납자루, 모래주사, 한강납줄개, 나도풍란, 가는동자꽃, 소똥구리, 참달팽이, 비바리뱀, 수원청개구리, 인공증식, 최적 사육조건, 자연성 증진

목 차

요약문	i
목 차	iii
표목차	v
그림목차	vi
ABSTRACT	vii
I. 서론	1
II. 멸종위기종 증식기술 개발	2
1. 여울마자 난질 개선 및 증식 기술 연구(어류)	2
2. 모래주사, 큰줄납자루 인공증식 연구(어류)	5
3. 나도풍란의 조직배양 기술을 이용한 대량증식 기술개발(식물)	8
4. 나도풍란의 환경인자 조절에 따른 생육 조건 확인(식물)	15
5. 가는동자꽃의 무성 생식 방법을 통한 증식 기술개발(식물)	24
6. 실내·야외 최적 증식환경 구축에 따른 생활사적 특성 연구(곤충)	27
7. 가축을 통한 약제 노출이 소똥구리 근연종이 미치는 영향 연구(곤충)	35
8. 참달팽이 성장률 개선 연구	42

Ⅲ. 멸종위기종 원종 확보 및 사육조건 연구	52
1. 한강납줄개 도입(어류)	52
2. 수원청개구리 및 비바리뱀 도입 및 사육조건 연구(양서파충류)	54
3. 소뿔구리 몽골 개체군 도입(곤충)	65
Ⅳ. 멸종위기종 멸종위기종 환경 적응력 파악 연구	71
1. 여울마자 자연성 증진 훈련Ⅱ(어류)	71
Ⅴ. 참고문헌	80

표 목 차

표. II-1-(1). 먹이 공급 비율별 수온 및 광주기 변화를 통한 여울마자 성숙 유도.....	3
표. II-1-(2). 먹이원 공급 비율에 따른 인공성숙 유도 결과	3
표. II-1-(3). 먹이원 비율에 따른 난질 평가	4
표. II-2-(1). 산란숙주 유무에 따른 성숙유도	6
표. II-2-(2). 산란숙주 유무에 따른 성숙유도 결과	6
표. II-4-(1). 온도, 이산화탄소 농도, 차광 처리에 따른 실험구 조성 ..	16
표. II-4-(2). 기후변화 조건 및 광조건에 따른 엽록소 함량	22
표. II-4-(3). 기후변화 조건 및 광조건에 따른 생장 변화	23
표. II-6-(1). 조기 동면개체군 월동관리	28
표. II-6-(2). 일반 동면개체군 월동관리	29
표. II-6-(3). 일반 동면개체군 월동생존율	33
표. II-6-(4). 암컷 1개체당 대조구, 실내증식실 이외 기상환경에서의 번식효율 비교.....	34
표. II-7-(1). 소똥구리 먹이원 내 약제 노출수준에 따른 생물검정 연구 방법	36
표. II-7-(2). 고농도 약제 분변 직접 노출에 따른 위해성 평가 연구 방법 ...	37
표. II-7-(3). 가축을 통한 분변과 렌지소똥퐁텡이 체내 이버멕틴 잔류 농도 ...	38
표. II-7-(4). 고농도 약제 분변에 따른 렌지소똥퐁텡이 체내 이버멕틴 잔류 농도...	38
표. II-8-(1). 참달팽이 칼슘 공급 비교 실험 조건	43
표. II-8-(2). 성장단계별 사육 용기 크기	43
표. II-8-(3). 칼슘 종류, 급여 기간에 따른 귀무/대립 가설	45
표. II-8-(4). 40주간 참달팽이 각경 성장 크기 및 표준오차	46
표. II-8-(5). 5가지 칼슘제의 일반 및 무기성분 분석 결과	48
표. II-8-(6). Kolomogorov-Snimov of fit test, Lilliefors test for normal, Shapiro-wilk's	

West를 이용한 참달팽이 각경 측정값 정규성 검토	49
표. II-8-(7). 칼슘제의 종류, 급이 기간, 두 변수의 교호작용에 대한 반복측정분 산분석(repeated measures ANOVA) 결과(실험군, 대조군 포함)	50
표. II-8-(8). 각 칼슘제와 대조군(미급이) 간의 반복측정분산분석 (repeated measures ANOVA) 결과	50
표. II-8-(9). 참달팽이의 칼슘제 종류에 따른 실험 차수별 선호도	51
표. III-2-(1). 수원청개구리 사육실 온·습도(평균)	59
표. III-2-(2). 수원청개구리 원종 크기 측정(평균±표준편차)	61
표. III-2-(3). STRUCTURE 분석을 통한 청개구리류 동정 결과	61
표. III-3-(1). 소뿔구리 채집지	67
표. III-3-(2). 소뿔구리 서식환경 조사지	68
표. III-3-(3). 소뿔구리 서식지 환경정보	70

그 립 목 차

그림. II-1-(1). 생먹이(좌), 미세조류와퍼(우)	2
그림. II-2-(1). 큰줄납자루 유무에 따른 성숙 유도	6
그림. II-2-(2). 수컷의 혼인색(좌), 주둥이에 발달한 추성(우)	7
그림. II-2-(3). 산란관이 발달한 암컷	7
그림. II-3-(1). 나도풍란의 종자 발아 및 원괴체 형성	10
그림. II-3-(2). 배지 농도가 나도풍란 유묘의 생장에 미치는 영향	11
그림. II-3-(3). 활성탄이 나도풍란 유묘의 생장에 미치는 영향	12
그림. II-3-(4). 유기물 첨가가 나도풍란 유묘의 생장에 미치는 영향	13
그림. II-3-(5). 배지 조성이 나도풍란 유묘의 후기 생장에 미치는 영향	14
그림. II-4-(1). 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT)의 기온(T) 및 상대습도(RH) 변화	17
그림. II-4-(2). 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT)의 내 나도풍란의 이산 화탄소 흡수율 일 변화 및 야간 이산화탄소 흡수량	18
그림. II-4-(3). 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT)의 내 나도풍란의 기공전도도, 증산속도, 순간증산효율 및 내재적 수분 이용효율	18
그림. II-4-(4). 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT)의 내 나도풍란의 엽록소 형광 반응 변화	19
그림. II-4-(5). 차광률에 따른 대조수(Control)와 기후변화 처리구 (CCT) 내 나도풍란의 엽록소 형광 반응	20
그림. II-4-(6). 차광율에 따른 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT) 내 나도풍란의 광합성 기구 활력지수	21
그림. II-5-(1). 가는동자꽃 근경분리(좌) 및 분주(우)	25
그림. II-6-(1). 사육 케이지 내부(좌)와 메탈할라이드 전등이 설치된 모습(우)	28

그림. II-6(2). 항온항습실 시간별 온도설정	30
그림. II-6(3). 250w 적외선등 적용 모습(좌)과 산란경단 관리(우)	30
그림. II-6(4). 야외 소똥구리 사육케이지(좌)와 산란경단 관리(우) ...	30
그림. II-6(5). 인공번데기방 안에서 발육중인 소똥구리 번데기(좌)와 이상없이 우화한 소똥구리 신성충(우)	32
그림. II-7(1). 위협요인 규명을 위한 시험중 확보	35
그림. II-7(2). 소똥구리 먹이원 내 약제 노출수준에 따른 생물검정 연구	36
그림. II-7(3). 고농도 약제 분변 직접 노출에 따른 위해성 평가 연구	37
그림. II-7(4). 가축을 통한 약제 노출에 따른 렌지소똥풍뎡이 생존율	39
그림. II-7(5). 고농도 약제 분변 노출에 따른 렌지소똥풍뎡이 생존율	39
그림. II-7(6). 약제 농도에 따른 산란활동(굴파기)	40
그림. II-7(7). 약제 농도에 산란 경단수(누적)	40
그림. II-8(1). 양배추와 칼슘을 섭취 중인 참달팽이(좌), 각경 크기에 따라 사용된 사육 용기(우)	44
그림. II-8(2). 해부 형미경(좌)과 버니어 캘리퍼스(우)를 이용한 참달 팽이 각경 측정	44
그림. II-8(3). 칼슘 선호도 실험(1:중질탄산칼슘, 2: 계란껍데기, 3: 산 호, 4: 굴껍데기, 5: 갑오징어뼈)	45
그림. II-8(4). 칼슘 종류에 따른 참달팽이의 누적 주간 성장률(%) ...	47
그림. III-1(1). 한강납줄개 서식지 전경(좌), 원종(중), 주요 출현지(우)	52
그림. III-1(2). 산란 숙주 합사 1일 후(좌), 산란 숙주 합사 7일 후(우) ...	53
그림. III-2(1). 포획한 수원청개구리	55
그림. III-2(2). 수원청개구리 포획 지역	56
그림. III-2(3). 개구리로부터 구강상피세포 추출	57
그림. III-2(4). 수원청개구리 사육장(좌: 외부, 우: 내부)	58

그림. III-2-(5). 수원청개구리 번식장	58
그림. III-2-(6). 비바리뱀 원종 확보를 위한 현장조사	59
그림. III-2-(7). 비바리뱀 포획에 사용된 트랩(좌: 그물트랩, 우: 철제트랩) ...	60
그림. III-2-(8). 사육장 내 포집 개체	63
그림. III-2-(9). 트랩에 포획된 쇠살모사	64
그림. III-3-(1). 국립생태원-몽골국립대학교 간 MOU 체결	66
그림. III-3-(2). 소뿔구리 도입을 위한 법적행정적 절차	67
그림. III-3-(3). 소뿔구리 채집지(좌), 소뿔구리 채집하는 모습(우)	67
그림. III-3-(4). 소뿔구리 도입과정	69
그림. IV-1-(1). 포식자 회피 훈련용 수조(좌: 모형도, 우: 트랙수조) ...	72
그림. IV-1-(2). 포식자 인식 실험용 수조(좌: 모형도, 우: 트랙수조) ...	73
그림. IV-1-(3). 자연먹이 섭이 훈련 일정	74
그림. IV-1-(4). 지느러미 변형 교정훈련 수조(좌: 훈련수조, 우: 모형도) ..	74
그림. IV-1-(5). 수영 능력 검증 실험 수조	75
그림. IV-1-(6). 포식자 인식 훈련 전후 위험 및 안전구역에 위치한 여울마자의 비율(%)	76
그림. IV-1-(7). 훈련 전, 후 여울마자 먹이 섭이 후 잔존량	77
그림. IV-1-(8). 교정 훈련 전(좌), 후(우) 지느러미 변형 비율	78
그림. IV-1-(9). 수영능력 검증 실험 수조 평균 통과시간(좌), 수영능력 검증 실험 수조 평균 충돌횟수(우)	79

Abstract

(어류) In this study, we conducted four different experiment to develop species specific optimal captive breeding system. First, we evaluated optimal opossum shrimp feeding ratio to *Microphysogobio rapidus* to enhance quality of mature egg. Group A(feed 3 time per week) show 1.57 times higher quality of mature egg production rate than group B(feed 1 time per week). Second, we captive breed *Acheilognathus majusculus* by controlling the water temperature and light period. Total 332 eggs were raid, the fertility and hatching rate at 23℃ of water show 99.7% and 99%. Third, we introduced wild strain of *Rhodeus pseudosericeus* and *Microphysogobio koreensis* from their natural habitat to figure out optimal breeding condition. *R. pseudosericeus* show active foraging behavior at 23~25℃ of water condition and prefer blood warm. *M. koreensis* show active foraging behavior at 21~25℃ and prefer vegetable pellet and blood warm. Finally, we designed species specific(*Microphysogobio rapidus*) nature behavior enhance program relate with swimming performance, anti-predator behavior and foraging behavior. As a result, *Microphysogobio rapidus* show improved nature behavior after enhance program.

(양서파충류) We secured wild individuals for captive propagation and a total of 50 individuals of *Dryophytes suweonensis* was identified in genetic analysis. Also, we made cages and rain chambers for breeding of *D. suweonensis*. But it didn't breed. Later, we made another coditions for breeding of *D. suweonensis*. *Sybinophis chinensis* attempted direct investigation and trap capture, but did not appear.

(식물) As for reproduction research, optimal growth conditions of *Sedirea japonica* were investigated, and the physiological and growth responses of *S. japonica* to the climate change conditions were monitored. Mass propagation of *Lychnis kiusiana* was completed using asexual reproduction.

(곤충무척추동물) In this study, we introduced dung beetle, *Gymnopleurus mopsus* populations from Mongolia to South Korea to enhance proliferative efficiency of breeding group and genetic diversity. In addition, we also

conducted captive-rearing trials to establish an optimal breeding systems for *G. mopsus* under laboratory and semi-field conditions. In a series of habitat risk assessment of *G. mopsus*, we investigated the potential impact of the ivermectin residues that remained in livestock feces on the *Onthophagus lenzii*. The cumulative growth rate (%) of the *Koreanohadra Koreana* which took calcium (experimental group) for 40 weeks was up to 1.4 times, 1.3 times on average, and at least 1.2 times higher than those which did not take calcium (control group). In particular, the cumulative growth rate (%) of K. Koreana that ingested calcium sources derived from organisms such as oyster shells was 6.9%p higher than that of artificially produced ground calcium carbonate, confirming that it was more effective in improving the growth rate. As a result of the calcium intake preference experiment for 10 weeks the cumulative intake was 195 times, followed by oyster shells (59 times), egg shells (46 times), coral (33 times), ground calcium carbonate (32 times), and cuttlefish bones (25 times). Accordingly, oyster shells, which were evaluated as excellent in both growth rate and preference, were selected as the most suitable calcium supplement for K. Koreana.

+ Keyword: *Microphysogobio rapidus*, *Acheilognathus majusculus*, *Rhodeus pseudosericeus*, *Microphysogobio koreensis*, captive breeding, optimal breeding condition, natural behavior enhancement, *Dryophytes suweonensis*, terrarium, *Gymnopleurus mopsus*, *Koreanohadra Koreana*, cumulative growth rate, calcium

I. 서론

환경부 “야생생물 보호 및 관리에 관한 법률” 제 132조2항에 따라 ‘현재 개체군으로 지속적인 생존이 어렵다 판단되는 종에 대한 증식·복원하는 등 필요한 조치’에 따라 멸종위기종에 복원을 위한 연구 수행이 필요하다. “야생생물 보호 및 관리에 관한 법률”에 따라 멸종위기종을 현재 관리중이나 지정종수가 지속적으로 증가하고 있다.

※ 멸종위기종 지정수: 92종(’89) → 198종(’98) → 246종(’12) → 267종(’17)

체계적으로 멸종위기종 복원을 위한 계획을 수립해야한다. 환경부에서 2018년 ‘멸종위기 야생생물보전 종합계획’과 2019년 ‘과제별 세부 이행계획’을 수립하여 멸종위기종 복원에 대한 제도적인 체계를 마련하였다. 이에 따라 국립생태원 멸종위기종복원센터에서는 2019년 ‘멸종위기종 복원 중장기 실행전략’을 수립하여 분류군별 멸종위기종 증식·복원을 수행하고 있다.

센터 내에서 멸종위기종 복원 수행을 위해 멸종 위협 정도에 따라 복원대상종 64종을 선정하였고, 그 중 시급성, 복원 가능성, 원종확보 및 국민 체감도를 고려하여 25종을 대상으로 우선복원대상종으로 선정하였고, 종별 증식·복원 연구 단계를 고려하여 기초생태, 증식기술, 유전연구, 모니터링 등 단계를 고려하여 맞춤형 증식·복원 연구를 추진하고 있다.

생물종 멸종으로 인한 생태계 불균형 문제 해결 및 생물다양성, 생태계 건강성 회복을 위해 멸종위기종별 맞춤형 증식 기술 개발이 필요하다. 따라서 본 연구는 1)절멸위기에 처한 멸종위기 야생생물의 유전적 다양성을 고려한 맞춤형 증식 기술을 개발하며, 2)한반도 멸종위기 야생생물의 체계적인 증식·복원을 위한 정책적, 과학적 기반을 제시하며, 3)멸종위기종 복원을 통한 국내 생물다양성 및 생태계 건강성을 회복을 위함이다.

II. 멸종위기종 증식기술 개발

1. 여울마자 난질 개선 및 증식 기술 연구

가. 서론

어류의 증식 기술 개발에 있어서 양질의 성숙란을 확보하는 기술 개발은 가장 우선도가 높은 과제 중 하나이다. 어류의 난질에 영향을 미치는 요인은 수온, 광주기, 먹이원, 영양상태, 호르몬 주기, 유전자 발현 비율 등 굉장히 다양하나(Brooks, S., Tyler, C. R. & Sumpter, J. P. 1997) 멸종위기 담수어류의 경우 이에 대한 연구가 미흡한 상황이다. 따라서, 여울마자의 완전 양식 기술 확보를 위해 먹이의 공급 비율별 여울마자의 인공 성숙 및 난질을 평가하기 위한 최적 먹이원을 확인하고자 하였다. 산란에 적합한 환경 조성을 위해 어류 산란에서 중요한 환경 요인인 광주기와 수온을 조절하였으며(Takashima and Yamada, 1984), 산란준비기 및 산란 시기인 2월-5월까지의 여울마자 핵심서식지인 남강(경남 산청군) 지역의 광주기와 수온 자료를 활용하여, 먹이 종류별(그림 1) 수온과 광주기 조절 일정을 표 1과 같이 설계하였다.

나. 연구 내용 및 방법

이전(21년) 실험을 통해 급격한 수온 변화와 생먹이(곤쟁이) 급여를 통한 여울마자의 난질 개선을 확인하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 여울마자 난질개선을 위한 최적 먹이 급여 비율을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 실험은 멸종위기종복원센터 트랙수조(1.5×4.0×0.8 m, 5ton)에서 진행하였다. 실험군은 주 1회 생먹이를 급여한 A그룹, 주 3회 생먹이를 급여한 B그룹으로 나누어 진행하였다. 먹이 급여는 매일 어체중의 3-5%가량 급여하였고 수온 및 광주기는 냉각기와 티타늄온도조절기 그리고 LED조명을 이용하여 조절하였다(그림 2). 10주 이후에는 먹이 공급을 중지한 뒤 MS-222(75ppm)로 마취 후 적정 농도(0.5μl/g)의 성숙호르몬(Ovaprim)을 주사하였고, 12시간 뒤 복부압박법으로 성숙 유무 확인 후 건식법으로 수정하여 난질평가를 위한 수정률 및 부화율을 조사하였다.



그림 II-1-(1). 생먹이(좌), 미세조류와퍼(중), 실험수조(우)

표. II-1-(1). 먹이 공급 비율별 수온 및 광주기 변화를 통한 여울마자 성숙 유도

주	수온(도)	광주기	먹이원	
			A(주 6회 와퍼, 1회 생먹이)	B(주 4회 와퍼, 3회 생먹이)
1	28	14:00	생먹이+영양강화와퍼	생먹이+영양강화와퍼
2	28	14:00	생먹이+영양강화와퍼	생먹이+영양강화와퍼
3	26	13:00	생먹이+영양강화와퍼	생먹이+영양강화와퍼
4	20	11:00	생먹이+영양강화와퍼	생먹이+영양강화와퍼
5	15	09:00	생먹이+영양강화와퍼	생먹이+영양강화와퍼
6	8	08:00	-	-
7	12	10:30	생먹이+영양강화와퍼	생먹이+영양강화와퍼
8	18	10:30	생먹이+영양강화와퍼	생먹이+영양강화와퍼
9	20	10:00	생먹이+영양강화와퍼	생먹이+영양강화와퍼
10	20	11:00	먹이 공급 중지	먹이 공급 중지

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 먹이원 공급 비율에 따른 인공성숙 유도 결과

먹이원 공급 비율에 따른 실험군 별 마취(MS-222) 후 복부압박법을 통해 성숙란과 미성숙란 혹은 정자가 방출된 여울마자의 비율을 비교한 결과(표 4). 주 1회 생먹이를 급여한 실험군 21개체 중 13개체에서 성숙이 확인(61.9%)되었으며, 주 3회 생먹이를 급여한 실험군 21개체 중 11개체에서 성숙이 확인(52.4%)되었다.

표. II-1-(2). 먹이원 공급 비율에 따른 인공성숙 유도 결과

먹이원 공급 비율	성숙개체수/총개체수	비율(%)	비고
생먹이 주 1회 급여(A)	13/21	61.9	수컷 ×
생먹이 주 3회 급여(B)	11/21	52.4	수컷 1

(2) 난질 평가

복부 압박법을 통해 채란 후 해부현미경을 이용하여 난질을 평가하였으며 난질 평가의 기준은 채란한 알의 난막과 세포막 경계가 뚜렷함을 기준으로 평가하였다(표 5). 주 1회 생먹이를 급여한 A그룹에서는 인공성숙이 완료된 개체 13마리에게서 약 40,560개가량의 알을 채란 하였으며, 그중 6마리에게서 선명한 빗갈을 띠는 18,720개가량의 좋은 난질의 성숙란을 확보하였다. 주 3회 생먹이를 급여한 B그룹에서는 인공성숙이 완료된 개체 11마리에서 약 34,320여개의 알을 채란 하였으며, 그중 8마리에게서 24,960개가량의 좋은 난질의 성숙란을 확보하였다.

표. II-1-(3). 먹이원 비율에 따른 난질 평가

먹이 비율	총 채란량	총 성숙란
생먹이 주 1회 급여(A)	13개체, 40,560	6개체, 18,720
생먹이 주 3회 급여(B)	11개체, 34,320	8개체, 24,960

(3) 결론 및 고찰

동물성 생먹이(곤쟁이) 공급 비율이 높은 B그룹에서 좋은 난질의 성숙란 비율(72.7%)이 A그룹의 좋은 난질의 성숙란 비율(46.1%)보다 높았으나, 수컷의 성숙 비율은 두 그룹 모두 크게 떨어짐을 보였다. 이러한 문제점은 이전 인공성숙 유도 실험 후 충분한 휴식 기간을 가지지 못하여 나타난 것으로 판단되어, 인공성숙 유도 그룹과 채란 후 휴식 그룹을 별도로 나누어 관리하는 방안이 필요하다고 판단된다.

2. 모래주사, 큰줄납자루 인공증식 연구

가. 서론

(1) 모래주사 원종 추가 확보 및 최적 사육조건 파악

모래주사의 완전 양식 기술 개발을 위한 최적 사육조건 파악을 위하여 낙동강(남강) 및 섬강에 서식하는 원종 포획 및 수온, 수질, 하상구조, 유속 등 서식지 환경을 파악하여 이를 기반으로 모래주사의 최적 사육조건 파악을 위한 연구를 진행하였다.

(2) 큰줄납자루 인공증식 연구

큰줄납자루의 성숙 유도에는 수온, 광주기 및 민물조개의 유무가 중요하다고 알려져 있으며 최적 조건 파악을 위해 인공증식 개체(영강 F1)를 대상으로 수온, 일주기에 따른 성숙률 및 산란 숙주인 민물조개의 유무에 따른 인공성숙 및 자연 산란 유도 실험을 진행하였다.

나. 연구 내용 및 방법

(1) 모래주사 원종 추가 확보 및 최적 사육조건 파악

모래주사 인공증식 연구를 하기에 앞서 야생에서의 모래주사 산란 생태 파악을 위하여 산란 시기 및 출현 시기로 알려진 4~6월 투망을 이용한 원종 확보를 시도하였다. 확보한 모래주사의 최적 사육조건을 파악하기 위해 180L 사각수조에 순치 후 사육 환경 적응 및 먹이 적응을 진행하였다.

(2) 큰줄납자루 인공증식 연구

(가) 큰줄납자루 성숙 유도 조건 파악

실험은 멸종위기종 복원센터 내 사각수조(1.0×0.45×0.4m, 180L)에서 진행하였으며 각 수조(A, B)당 암컷 6개체, 수컷 2개체를 합사한 뒤 A그룹에는 큰줄납자루 서식지에서 포획한 민물조개(말조개)를 합사하였다. 수온 및 광주기의 조절은 자동온도조절기와 티타늄 수중 히터봉, 타이머식 콘센트와 LED조명을 이용하여 아래와 같이 조절하였다(표 10). 먹이 급여는 배합사료, 냉동장구벌레 등을 일 2회 반복 시까지 급여하였다. 암컷과 수컷의 산란관 발달 및 혼인색 발현 확인 후 적정 농도(75ppm)의 MS-222용액을 이용하여 개체를 마취 한 뒤 복부압박

법을 통해 채란, 건식법으로 수정한 뒤 부화병을 이용하여 부화하였다.



그림 11-2-(1). 큰줄납자루 서식지 유래 민물조개(좌), 큰줄납자루 인공증식 개체(우)

표. 11-2-(1). 산란숙주 유무에 따른 성숙유도

주	산란숙주			
	A(산란 숙주 有)		B(산란 숙주 無)	
	수온(도)	광주기(L:D)	수온(도)	광주기(L:D)
1	26	14:10	26	14:10
2	24	14:10	24	14:10
3	22	13:11	22	13:11
4	20	11:13	20	11:13
5	18	09:15	18	09:15
6	20	11:13	20	11:13
7	22	13:11	22	13:11
8	24	14:10	24	14:10
9	26	14:10	26	14:10
10	26	14:10	26	14:10

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 모래주사 원종 추가 확보 및 최적 사육조건 파악

남강유역 일대(임천)에서 확보한 모래주사 20개체를 대상으로 정밀동정을 실시한 결과 모래주사 7개체, 돌마자 13개체로 판별되었다. 사육환경 적응 결과 수온 모래주사는 21~25℃에서 가장 활발한 먹이반응을 보였다. 저서성 어류인 모래주사의 특성을 반영하여 수조 내부에 바닥재 투입하였을 때 수표면을 배회하는 등 이상행동의 감소를 확인하였고, 은신에 적합한 구조물을 배치한 뒤 먹이 섭취량이 증가하였다. 모래주사는 수조 도입 2주 후 와퍼와 냉동 장구벌레에 가장 활발한 먹이 반응을 보였다.

(2) 큰줄납자루 인공증식 연구

사육 환경(수온, 광주기) 조절 및 산란 숙주 합사를 통한 인공성숙 유도 결과 최저 수온 도달 후 20℃에 도달하였을 때 산란 숙주와 합사한 그룹의 수컷의 혼인색 및 추성 발현과 암컷의 산란관 발달 등의 성숙을 확인하였다. 자연 산란 유도 결과 말조개에서 치어 1개체를 확보 후 정상 발달까지 확인했으나 산란 개체 수 확인 및 관리의 어려움 등으로 인해 산란 숙주를 이용한 부화는 대량증식에는 적합하지 않음을 확인하였다. 채란 전 발달한 암컷의 산란관(평균 39.7mm)은 채란 후 2~3일 이내에 급격히 줄어들음을 확인하였다. 최저 수온 도달 후 복부 압박법을 통한 인공 채란 결과 1개월 동안 총 332개의 알을 확보(표 16)하였다. 건식법을 이용한 인공 수정 결과 총 331개의 수정란을 확보 후 부화병에 넣어 부화하였다(수정률 99.7%). 부화병을 이용한 부화 결과 23℃ 수온에서 48시간 후 327개체 부화(부화율 99%)를 확인하였다. 총 75개체가 건강한 치어(약 120일생)까지 발달(생존률 약 23%)하였다.



그림 II-2-(2). 수컷의 혼인색(좌), 주둥이에 발달한 추성(우)



그림 II-2-(3). 산란관이 발달한 암컷

3) 결론 및 고찰

수온, 광주기 조절 및 산란 숙주 합사를 통한 큰줄납자루 인공성숙 유도 실험 결과 산란 숙주 합사 후 산란까지 최소 6주에서 최대 10주가량 소요됨을 확인하였다. 화병 이용 시 23℃ 수온에서 48시간 후 99%의 부화율을 보였으나, 난황 흡수가 끝난 뒤 먹이 붙임 과정(생후 16~26일)에서 부화병 바닥 먹이 찌꺼기 제거 또는 먹이 급여량 조절을 통한 부화병 내부 수질 관리가 정상적인 발달에 중요한 요인이라고 판단된다.

표. II-2-(2). 산란숙주 유무에 따른 성숙유도 결과

주	수온(도)	광주기	산란 숙주		비고
			A(산란 숙주 有)	B(산란 숙주 無)	
1	26	14:00			
2	24	14:00			
3	22	13:00			
4	20	11:00			
5	18	09:00			
6	20	11:00	수컷 혼인색, 암컷 산란관 발달		147개 채란
7	22	13:00			
8	24	14:00			58개 채란
9	26	14:00			
10	26	14:00			127개 채란

3. 나도풍란의 조직배양 기술을 활용한 대량증식 기술개발

가. 서론

생태계의 건강한 기능을 위해서는 각 종의 생존이 중요하기 때문에 생물 다양성 보전은 전 세계적으로 주요한 문제이다. 현화식물은 5개의 아과로 나뉘며 특히 난초과(Orchidaceae)는 속씨식물 중 다양성의 약 8%를 차지하는 (현재 약 28,000종) 가장 크고 널리 퍼진 과 중 하나이다(Chase et al., 2015; Willis, 2017). 그러나 IUCN은 2017년 IUCN 세계 적색 목록에 948종의 난초를 등재하였으며 이 중 56.5%가 멸종위기에 처해 있는 것으로 보고하였다(IUCN, 2017). 생태계 내에서 난초의 생존을 위해서는 최적의 조건이 필요한 것으로 알려져 있다(Cozzolino and Widmer, 2005).

이러한 난초의 중요성에도 불구하고 모든 난초 종의 약 4분의 1이 서식지 파괴, 불법 밀반입, 남획, 기후변화 등으로 인해 멸종위기에 처해 있다. 난초의 현지내 또는 현지외 보전을 위해서는 다면적이며 통합적인 접근이 필요하다. 특히 조직배양은 빠른 시간 내에 대량증식을 가능하게 하며 멸종위기 난초과 식물의 복원·보전에 널리 이용되는 방식이다(Dutra et al., 2009; Godo et al., 2010; Pathak et al., 2011; Kim et al., 2019).

난초 종자의 기내 발아를 위한 최적 배양 조건을 구명하기 위해서는 꼬투리의 성숙 정도, 배지 조성, 광주조건, 온도 조건 등을 고려해야 한다(Arditti and Ernst, 1984). 특히 배지 조성은 유묘의 생장에 직접적인 영향을 미치며 탄수화물, 아미노산, 비타민, 미네랄, 생장호르몬, 유기산 등은 기내 발아와 원괴체 생장에 필수적이다(Kauth et al., 2008). 이 외에도 활성탄, 생장 조절물질, 유기물 등의 첨가 유무 역시 유묘의 생장에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Pathak et al., 2011; Kim and al., 2019). 따라서 본 연구에서는 배지의 종류, 활성탄, 유기물 등의 유무에 따른 나도풍란 유묘의 생장 변화를 관찰하고 최적 생장 조건을 구명하고자 하였다.

나. 연구 내용 및 방법

2019년 제주 비자림에서 채취한 나도풍란 종자를 70% 에탄올과 20% 치아염소산나트륨 용액에서 15분간 표면 살균하였다. 이후 멸균수로 세척하고 메스를 사용하여 꼬투리를 잘라서 씨앗을 배지에 파종하였다.

MS(Duchefa, Haarlem, 네덜란드) 및 Hyponex(Kisan Bio, 서울, 한국) 배지의 다양한 농도가 유묘 생장에 미치는 영향을 평가하기 위해 원괴체를 4가지 배지에서 생장시켰다: ①MS; ②1/2MS; ③Hyponex(N:P:K = 7:6:19, 3g · L⁻¹); ④1/2Hyponex

유묘 생장에 대한 활성탄(AC 0.6g · L⁻¹; Duchefa, Haarlem, Netherlands)의 효과를 평가하기 위해 원괴체를 다음 4가지 배지에서 생장시켰다: ①AC+MS; ②AC+1/2MS; ③AC+Hyponex; ④AC+1/2Hyponex

유묘 생장에 대한 유기물(Banana homogenate 30g · L⁻¹; Kisan Bio, 서울, 한국; Apple homogenate 10g · L⁻¹; Kisan Bio, 서울, 한국)의 효과를 평가하기 위해 원

괴체를 가지 배지에서 성장시켰다: ①MS+유기물; ②1/2MS+유기물; ③Hyponex+유기물; ④1/2Hyponex+유기물

모든 배지에 30g의 설탕을 보충하고 0.8% 한천으로 고형화하였다. 배지의 pH를 5.7로 조정하고, 배지를 120 ℃에서 15분 동안 고압멸균법으로 소독하였다. 배양병은 Incu Tissue(72×72×100 mm; SPL, 경기도, 한국)에 100 mL의 배지를 채우고 모든 배양물을 25±3 ℃, 16/8 h의 광주기에서 배양하였다. 배양 7개월 후, 상이한 배지에서 유묘의 성장 특성을 비교하였다.

각 처리구는 5개의 개체가 들어 있는 3개의 배양병으로 구성하였다. 파종 7개월 후 대표 유묘를 선정하여 사진 촬영하였다. 유묘의 생중량, 엽면적, 뿌리의 길이, 뿌리의 수를 측정하였다.

2개월 간격으로 계대배양을 실시하였으며 파종 9월 후 다음 16개 배지 조성에 대해 유묘 성장을 비교하였다: ①MS; ②1/2 MS; ③Hyponex; ④1/2Hyponex; ⑤AC+MS; ⑥AC+1/2MS; ⑦AC+Hyponex; ⑧AC+1/2Hyponex; ⑨MS+유기물; ⑩1/2MS+유기물; ⑪Hyponex+유기물; ⑫1/2Hyponex+유기물; ⑬MS+AC+유기물; ⑭1/2MS+AC+유기물; ⑮Hyponex+AC+유기물; ⑯1/2Hyponex+AC+유기물

다. 연구 결과 및 고찰

(1) MS 및 Hyponex 배지의 다양한 농도가 유묘의 성장에 미치는 영향
동일한 꼬투리의 종자를 Hyponex 배지 파종한 후 1개월(그림 II-3-(1)a)에 원괴체가 발생하였고 2개월(그림 II-3-(1)b,c)에 새싹 정단이 형성되었다. 정단부가 형성된 발아체를 배지 종류, 농도 및 조성이 다른 배양병으로 옮겼다.

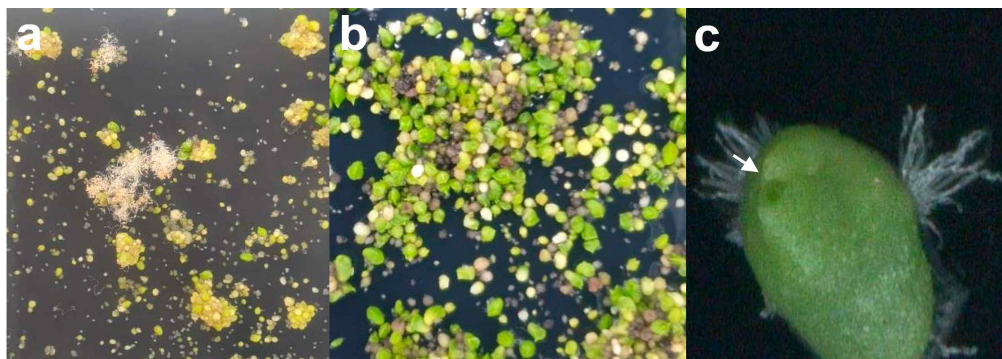


그림 II-3-(1). 나도풍란의 종자 발아 및 원괴체 형성

과중 7개월 후 식물의 생중량, 뿌리 길이 및 엽면적을 비교하여 유묘의 생장을 조사하였다. 그 결과, 배지 조성에 따라 유묘의 생장이 영향을 받은 것으로 나타났다(그림 II-3-(2)b). MS의 농도를 반으로 감소시킨 배지(1/2MS)에서 자란 유묘는 MS 배지(0.007 g)에서 자란 유묘의 무게보다 더 높은 생중량(0.118 g)을 나타냈다. Hyponex 농도를 반으로 감소시킨 배지(1/2Hyponex)에서 자란 유묘의 생중량은 0.239 g으로 Hyponex 배지에서 자란 유묘(0.129 g)보다 1.8배 더 높았다. 배지 농도가 엽면적에 미치는 영향과 관련하여 1/2Hyponex 배지에서 자란 유묘는 엽면적(1.238 cm²)이 큰 반면 뿌리 길이에는 유의한 영향이 없었다.

a

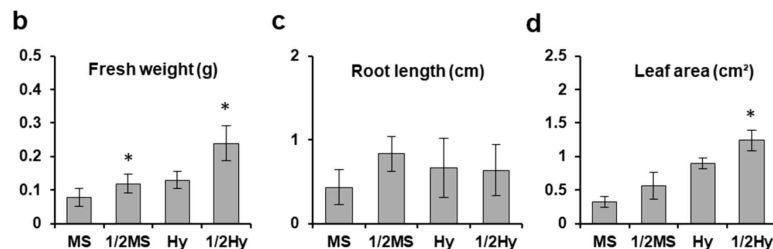
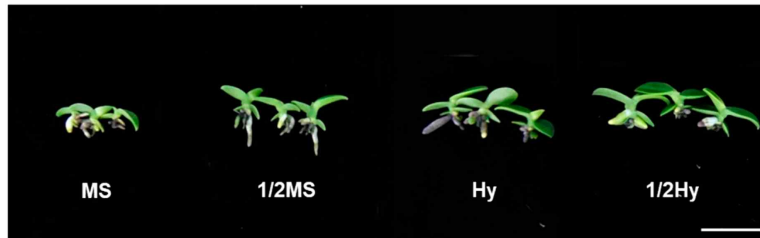


그림 II-3-(2). 배지 농도가 나도풍란 유묘의 생장에 미치는 영향

(2) 활성탄의 첨가가 유묘의 생장에 미치는 영향

MS 및 1/2MS 배지에서 활성탄의 첨가는 유묘의 생장을 저해시키는 것으로 나타났다. MS 배지의 대부분의 유묘는 기저 부분의 괴사(갈변)를 보였고, 1/2MS 배지의 유묘는 뿌리가 거의 없고 갈변 또는 녹색이었다(그림 II-3-(3)a).

Hyponex와 1/2Hyponex 배지에서 유묘의 생중량은 활성탄이 첨가되지 않은 배지(각각 0.129 g 및 0.239 g)보다 활성탄이 첨가된 배지에서 더 높았다(각각 0.236 g 및 0.366 g; (그림 II-3-(3)b).

유묘의 뿌리 길이는 Hyponex와 1/2Hyponex 배지에서 활성탄의 유무에 의한 유의미한 차이가 없었다(그림 II-3-(3)c).

Hyponex와 1/2Hyponex 배지에 활성탄을 첨가했을 때 활성탄이 없는 경우에 비해 유묘의 엽면적이 약 2배 증가하였다(그림 II-3-(3)d).

또한 활성탄이 첨가된 MS 및 1/2MS 배지에서 자란 유묘는 활성탄이 없는 MS 및 1/2MS 배지에서 자란 유묘보다 생중량, 뿌리 길이 및 엽면적이 더 작았다(그림 II-3-(3)b-d).

활성탄은 흡착 특성을 보유하고 있어서 난초과 식물의 성장 과정에서 발생하는 페놀 등의 유해 화합물을 흡착하여 묘목의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 그러나 MS 및 1/2MS 배지에서 오히려 활성탄의 첨가로 갈변 증상이 나타난 것이 확인되었는데, 이는 활성탄이 유해 화합물뿐만 아니라 비타민 등 영양소를 흡착한 결과로 추정된다.

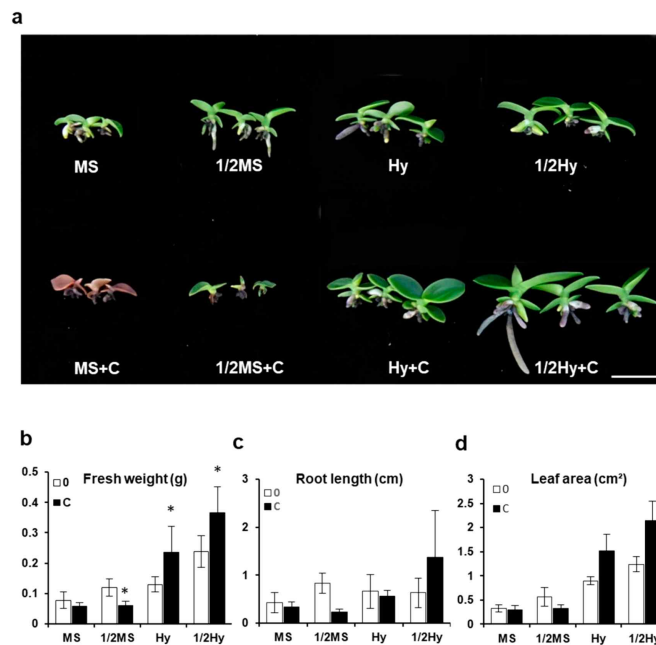


그림 II-3-(3). 활성탄이 나도풍란 유묘의 성장에 미치는 영향

(3) 유기물 첨가가 유묘의 생장에 미치는 영향

유기물(사과와 바나나 분말)의 첨가는 생중량, 뿌리 길이, 엽면적을 유의하게 증가시켰다(그림 II-3-(4)b-d). 특히 뿌리 성장 증가는 유기물 첨가에 의해 가장 큰 영향을 받음. 뿌리 길이의 경우 유기물 첨가 배지에서 자란 유묘가 첨가하지 않은 배지에서 자란 유묘에 비해 2~4배 이상 증가하였다. 생중량과 엽면적 역시 유기물 첨가 배지에서 자란 유묘가 첨가하지 않은 배지에서 자란 유묘에 비해 증가하는 경향을 보였다.

a

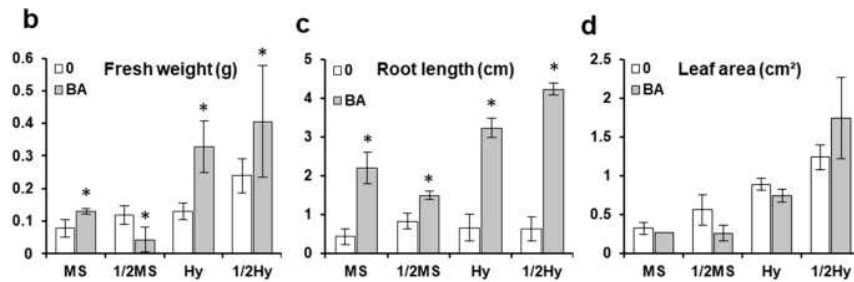
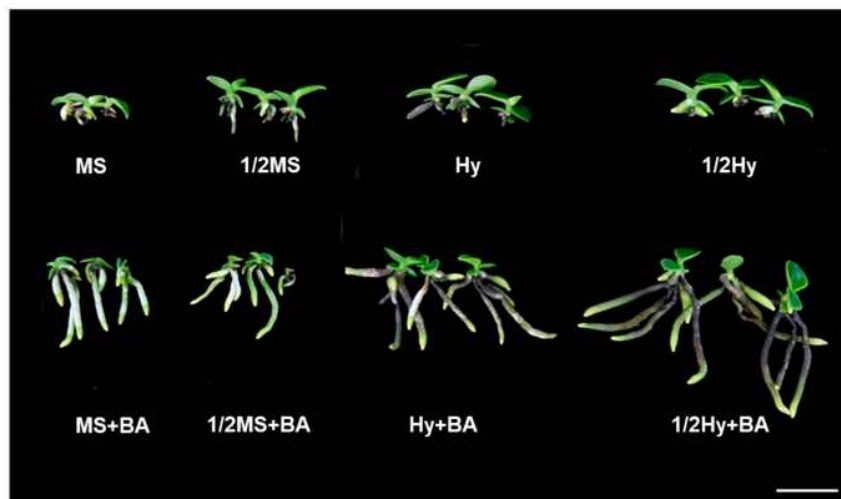


그림 II-3-(4). 유기물 첨가가 나도풍란 유묘의 생장에 미치는 영향

(4) 배지 조성이 후기 유묘 생장에 미치는 영향

배지 조성이 후기 유묘 생장에 미치는 영향을 파악하기 위해 파종 9개월 후 유묘의 생장을 관찰하였다. MS, 1/2MS, Hyponex 배지에서 유기물 첨가에 의해 생중량과 뿌리 길이가 유의하게 증가하였다. 활성탄의 첨가는 후기 유묘 생장에 유의한 영향을 미치지 않았다. 특히 MS와 1/2MS 배지의 경우 활성탄과 유기물을 모두 첨가한 경우 그렇지 않은 경우에 비해서 6배 이상 생중량과 뿌리 길이가 증가하였다(그림 II-3-(5)b, c).

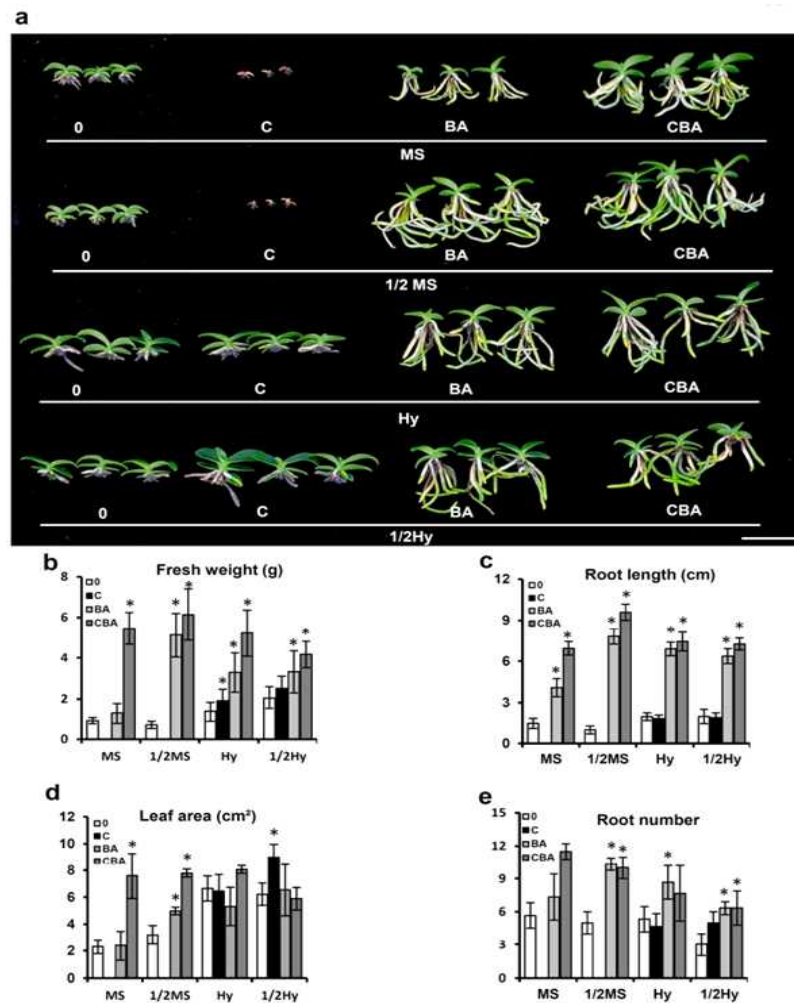


그림 II-3-(5). 배지 조성이 나도풍란 유묘의 후기 생장에 미치는 영향

4. 나도풍란의 환경인자 조절에 따른 생육 조건 확립

가. 서론

나도풍란(*Sedirea japonica*)는 착생란으로서 나무줄기나 바위에 붙어서 자란다. 꽃은 6~8월에 잎겨드랑이에서 발달하는 총상꽃차례에 4~10개가 비스듬히 밀으로 처져서 달린다(Kim et al., 2014). 녹색을 띠는 공기뿌리는 줄기 아래쪽에서 길게 뻗어 나오며 줄기는 짧아서 거의 관찰되지 않는다.

전세계적으로 중국, 일본, 우리나라에 분포하며 우리나라 남해안 도서지역이 북방 한계에 해당한다. 국내에서는 멸종위기 1급 야생생물로 지정되어 있으며 과거 제주도와 남해안 도서지역에 분포한 기록이 있으나 현재는 발견되지 않는다(Suetsugu et al., 2013; Shim et al., 2020). 복원 개체 이외에는 지난 20여 년간 발견된 자연 개체가 없어 멸종 상태인 것으로 생각되며, 무분별한 채취로 인하여 알려진 자생지가 모두 소실된 것으로 추정된다(Shim et al., 2020).

나도풍란은 연중 온난한 환경에서 생육하는 것으로 알려져 있다. 그러나 전 세계적 기후변화에 따라 우리나라 역시 평균 기온이 상승하고 있으며 특히 여름철 이상기온이 관측되고 있다. 국립생태원 「복원대상지 방사·이식 후 개체 적응 및 생태환경변화 모니터링」 연구에서 수행한 시험 이식 결과에 따르면 이식 후 나도풍란의 초기 생장은 미세환경 또는 미기후의 영향을 받으며 특히 이상기후에 따른 건조 현상 등이 개체 생존에 부정적인 영향을 주는 것으로 나타났다. 따라서 기후변화로 인해 남방계 식물의 북상 또는 분포 면적 확대, 이상기후로 인한 서식지 환경변화 등이 나도풍란의 생존에 간접적으로 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되어 이에 관한 연구 및 연구 협력이 필요하다(IPCC, 2014; Lee et al., 2017). 따라서 본 연구에서는 대기 온도 상승 및 대기 중 이산화탄소 농도 증가에 따른 나도풍란 유묘의 생리적 반응 변화를 관찰하고 최적 생육 조건을 확립하고자 하였다.

나. 연구 내용 및 방법

- (1) 실험재료: 조직배양을 통해 증식한 나도풍란 100개체
- (2) 실험구 조성

①수태로 채운 지름 10 cm 포트 중앙에 나도풍란을 1본씩 배치하였다. ②저면관수를 통해 수태가 건조되지 않도록 주의하며 생육시켰다. ③자연광형 SPDS (Soil Plant Daylit System) 챔버를 이용하여 기후변화 조건에 따른 대기 이산화탄소 농도 및 온도 조건을 조성하였다. ④광조건에 따른 생리·생장 변화를 조사하기 위해 차광막을 이용해 대조구와 처리구 내에 무차광, 60%, 90% 차광 처리구를 조성하였다(표 II-4-(1)). ⑤챔버 내에 설치된 기상관측센서를 활용하여 기온 및 상대습도 변화를 모니터링하고 차광처리에 따른 내부 환경 변화는 휴대용 광도측정기, 온습도측정기를 사용하여 조사하였다.

표 II-4-(1). 온도, 이산화탄소 농도, 차광 처리에 따른 실험구 조성

실험구	온도	이산화탄소 농도	차광 처리
대조구(Control)	최근 3년의 기상조건을 고려하여 평균 대기온도로 설정	400 ppm	무차광
			60% 차광
			90% 차광
기후변화 처리구 (CCT)	대조구+3 ℃	650 ppm	무차광
			60% 차광
			90% 차광

(3) 기후변화 조건에 따른 이산화탄소 흡수율 및 기공 반응 변화 모니터링

①대조구와 처리구의 무차광 조건에서 생육한 개체를 대상으로 CO₂ 교환율 및 기공 전도도를 측정하였다. ②측정된 결과를 통해 야간(19시 ~ 6시; 12시간)의 CO₂ 흡수량 및 내재적 수분이용효율, 순간증산효율을 산출하였다. ③측정 시 PPFD (Phyosynthetic Photon Flux Density)는 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 고정하고 챔버 유입 공기유량은 600 $\mu\text{mol s}^{-1}$, CO₂ 농도는 각 처리구의 평균 농도를 기준으로 400 및 650 ppm에서 실시하였으며 엽온은 대조구 25 ℃, 기후변화 처리구는 28 ℃로 설정하였다.

(4) 기후변화 조건 및 광주건에 따른 엽록소 형광 반응

①기후변화 및 차광처리 21일 후부터 1주일 간격으로 OKJIP 분석을 통해 조사하였다. ②엽록소 형광 반응 측정기를 사용하여 20분간 암적응 시킨 앞에 3,500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광량을 1초간 조사하고 50 μs (O 단계), 300 μs (K 단계), 2 ms

(J 단계), 30 ms (I 단계), 500 ms (P 단계)의 엽록소 형광 밀도를 측정하였다. ③ OKJIP 분석 결과를 통해 생물리학적 변수(VJ , VI , V_k , ΦPO , ΦEO , ψO , ABS/RC , DIO/RC , $TR0/RC$, $ET0/RC$, $RE0/RC$, $RE0/TR0$, $PIABS$ 및 $DFABS$)를 산출하였다.

(5) 기후변화 조건 및 광주건에 따른 엽록소 형광 반응

①생리적 특성 변화 측정이 종료된 후 각 실험구에서 3장의 잎을 채취한 후 엽편 0.1 g을 10 ml의 DMSO 용액으로 6시간 동안 엽록소를 추출하였다. ②추출한 용액은 분광광도계를 이용하여 663 nm, 645 nm, 470 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고 엽록소 a, b, a+b, 카로티노이드 함량을 산출하였다. ③SPAD를 사용해 엽색도를 측정하였다.

(6) 기후변화 조건 및 광주건에 따른 생장 변화

①생리적 특성 변화 측정이 종료된 후 엽수, 엽두께, 엽면적, 엽건중, 뿌리건중량 등을 측정하였다. ②엽두께는 버니어캘리퍼스를 사용하여 잎의 가장 가운데 부분에서 측정하였다. ③부위별 건중은 건조기로 80 ℃에서 48시간동안 건조하여 측정하였다. ④측정 결과를 이용하여 T/R율, 엽면적비, 비엽면적, 엽중비 등을 계산하였다.

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 생육환경 비교

①기후변화 조건에 따른 챔버 내 일평균 기온은 대조구에서 8월(25.3 ℃)부터 11월(18 ℃)까지 점차 감소하였고 기후변화 처리구는 대조구보다 평균 2.9 ℃ 높게 나타났다(그림 II-4-(1)). ②챔버 내부 온도는 60% 차광 처리구와 90% 차광 처리구에서 대조구에 비해 각각 평균 1.8 ℃, 3.3 ℃ 감소하였다. ③상대습도는 대조구와 처리구 모두 70%로 설정하였으나 일정하게 유지되지 않았고 대조구와 기후변화 처리구에서 각각 평균 58.3%, 49.1%로 나타났다.

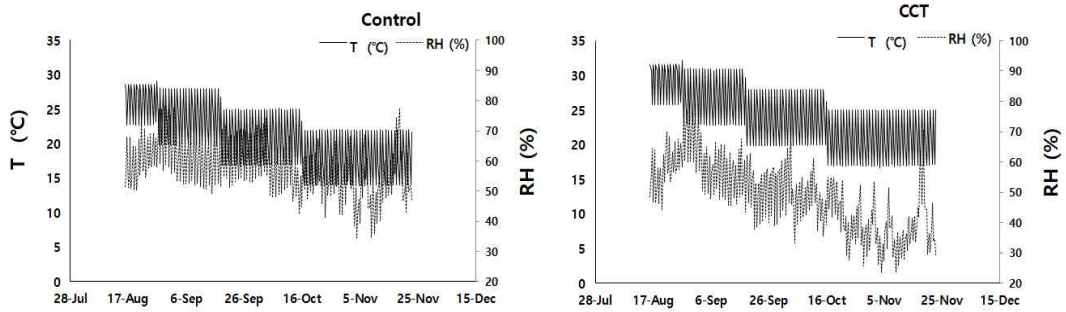


그림 II-4-(1). 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT)의 기온(T) 및 상대습도(RH) 변화

(2) 기후변화 조건에 따른 이산화탄소 흡수율 및 기공 반응 변화 모니터링

①나도풍란은 주로 밤에 CO₂를 흡수하는 전형적인 CAM (Crassulacean Acid Metabolism) 식물의 특징을 보였다. ②대조구의 개체는 CO₂ 흡수율의 일 변화가 뚜렷하지만 기후변화 처리구에서는 22시부터 23시까지 흡수율이 다소 감소하였다가 회복되는 경향을 보였다. ③야간 CO₂ 흡수량은 대조구(45.0 mmol CO₂ m⁻²)가 기후변화 처리구(38.6 mmol CO₂ m⁻²)에 비해 약 17% 높게 나타났다(그림 II-4(2)). ④이는 상대적으로 높은 기온에서 나도풍란이 생육하는 경우 수분 손실을 막기 위해 기공을 차단하면서 일일 순 CO₂ 흡수량의 감소가 나타난 것으로 판단된다. ⑤기공전도도와 증산속도는 대조구에서 오후 6시 이후 급격하게 증가하여 큰 값을 유지하다가 오전 3시 이후 큰 폭으로 감소하는 경향을 보였다. 반면 기후변화 처리구에서는 상대적으로 상승 폭이 크지 않고 오전 3시 이전까지 대조구에 비해 전반적으로 낮은 값을 유지하였다(그림 II-4(3)). ⑥이는 기후변화 처리구의 개체가 대조구의 개체에 비해 기공개폐가 신속히 일어나지 않음을 의미한다.

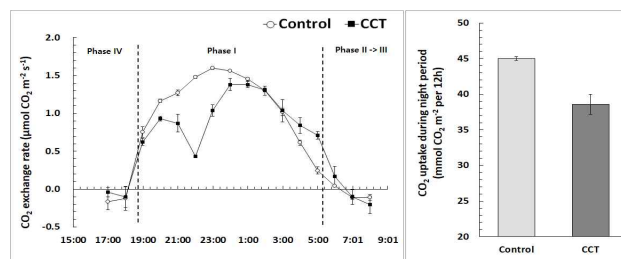


그림 II-4-(2). 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT) 내 나도풍란의 CO₂ 흡수율 일 변화 및 야간 CO₂ 흡수량

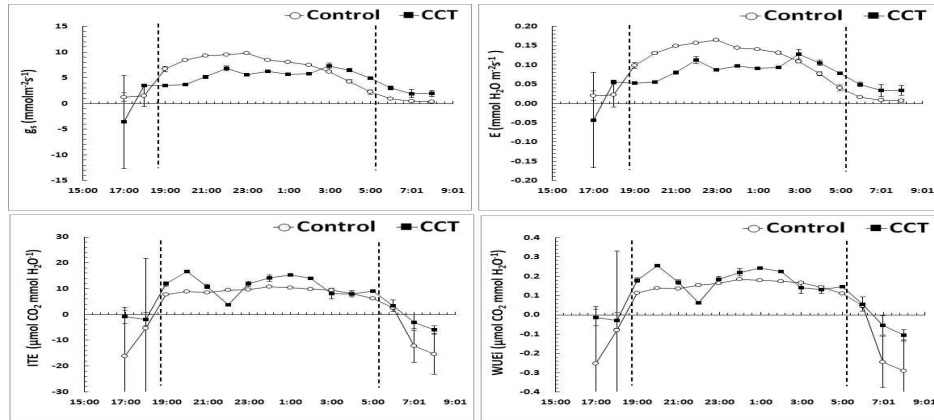


그림 II-4-(3). 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT) 내 나도풍란의 기공전도도(g_s), 증산속도(E), 순간증산효율(ITE) 및 내재적 수분 이용효율(WUEi)

(3) 기후변화 조건 및 광조건에 따른 엽록소 형광 반응

①기후변화 조건과 차광율에 따른 엽록소 형광 반응을 관찰한 결과 ABS/RC, TR0/RC, ET0/RC 및 DI0/RC는 전반적으로 대조구+90% 차광 처리구(Control 90%)에서 가장 낮은 경향을 보였다. 이와 대조적으로 기후변화+무차광 처리구(CCT 0%)에서는 처리 후 42일경부터 ABS/RC, DI0/RC가 다른 처리구에 비해 유의하게 증가하였으며($P<0.05$), 처리 후 55일경에는 ET0/RC와 TR0/RC 역시 가장 높은 경향을 보였다(그림 II-4-(4)). ②기후변화+무차광 처리구(CCT 0%)의 ABS/RC 및 DI0/RC 증가는 강한 광과 상대적으로 높은 온도 조건에서 광합성 기구의 손상을 방지하기 위한 기작으로 이해할 수 있으며, 반응중심을 비활성화시키고 여기 에너지를 열로 소산시키는 것으로 판단된다. ③기후변화+무차광 처리구(CCT 0%)에서 나도풍란은 일차적으로 강한 광에 대한 보호기작에도 장기간 이러한 조건이 지속되면서, 과도하게 유입되는 빛 에너지를 차단하기 어려워졌으며, 전반적인 광반응 과정이 영향을 받고 있음을 알 수 있다. ④대조구+90% 차광 처리구(Control 90%)에서는 빛이 과도하게 없는 조건에서 대사활동에 필요한 적절한 온도 조건이 수반되지 못하여 전반적인 광합성 활성이 저하된 상태이며 다시 빛 에너지의 충분한 공급 등이 이루어지면 회복될 수 있을 것으로 판단된다.

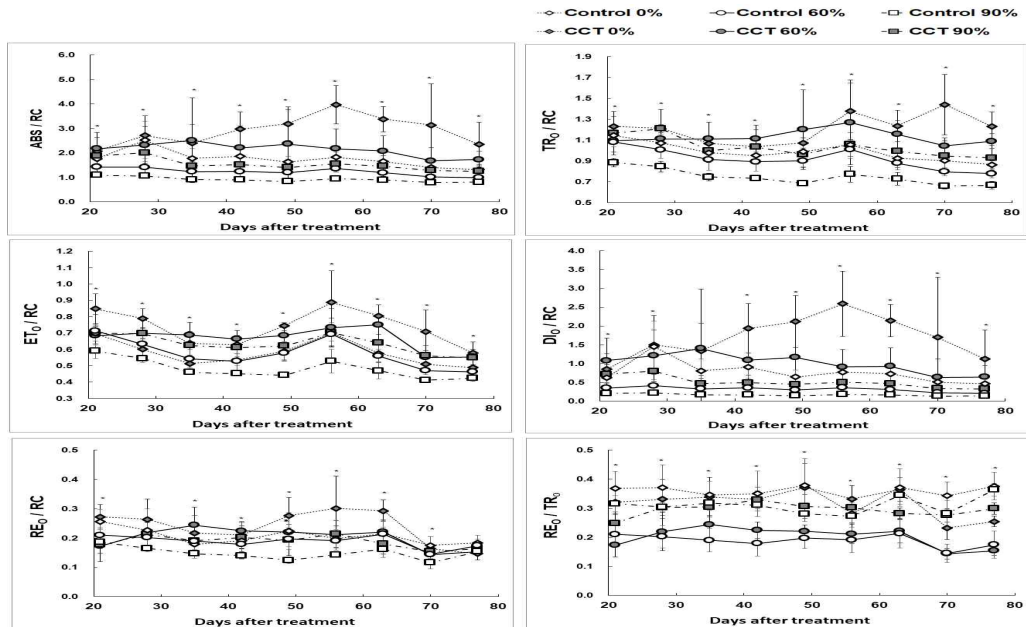


그림 11-4(4). 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT) 내 나도풍란의 엽록소 형광 반응 변화

⑤대조구의 경우 차광율이 높아짐에 따라 Φ PO와 Φ EO가 다소 증가하는 것으로 나타났다. 이를 통해 차광처리에 의해 전자 전달 효율이 증가한 것을 알 수 있다(그림 11-4(5)). ⑥기후변화 처리구의 경우 처리 후 56일쯤에 일부 지표가 비교적 큰 차이를 보였는데 대조구+무차광 처리구(Control 0%)에 비해 기후변화+무차광 처리구(CCT 0%)에서 Φ PO는 38%, Φ EO는 40% 감소하였고, 이와 대조적으로 V_k 는 38% 증가하였다. 기후변화 60% 차광처리는 다른 지표에서는 큰 차이가 없었으나 V_k 가 약 50% 증가하였는데 V_k 의 증가는 산소발생복합체의 비활성화로 인해 광계 II에서 초기 전자수용체 퀸 QA- 이후 전자 전달이 저해됨을 의미한다. 이후 77일이 지나면서 대조구는 차광율에 따라 56일째와 유사한 경향을 보였으며, 기후변화+무차광 처리구(CCT 0%)의 Φ PO, Φ EO의 감소 및 V_k 증가가 56일에 비해 더 큰 차이를 보였다. 이를 통해 대조구에 비해 기후변화 조건에서 Φ PO와 Φ EO의 감소 및 V_k 증가로 전반적인 전자 전달 효율이 저해되는 것을 알 수 있었으나 차광처리를 통해 이러한 경향이 다소 개선되는 것으로 나타났다.

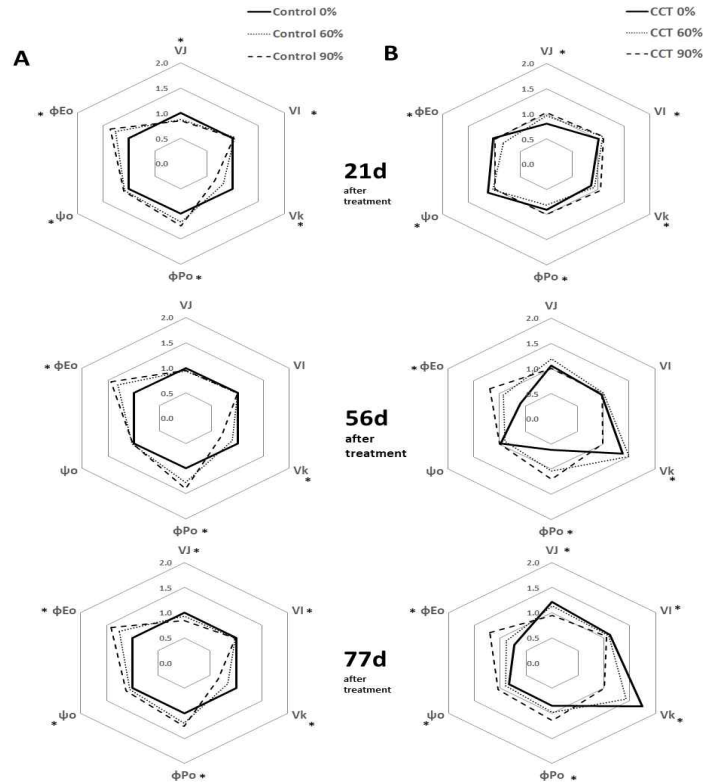


그림 II-4-(5). 차광율에 따른 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT) 내 나도풍란의 엽록소 형광 반응

⑦대조구와 기후변화 처리구 모두 차광율이 높아질수록 광합성 기구의 활력 지수(PIABS, DFABS)가 크게 증가하였다(그림 II-4-(6)). ⑧차광처리에 의해 빛이 지나치게 부족한 조건에서 생육하는 경우에는 광계 II의 활성을 증가시켜 빛 에너지를 더 효율적으로 처리하기 위한 적응반응이 나타났다. 이는 기후변화 처리구에 비해 대조구에서 더 높은 경향을 보여 상대적으로 대조구의 개체가 민감하게 반응함을 알 수 있다.

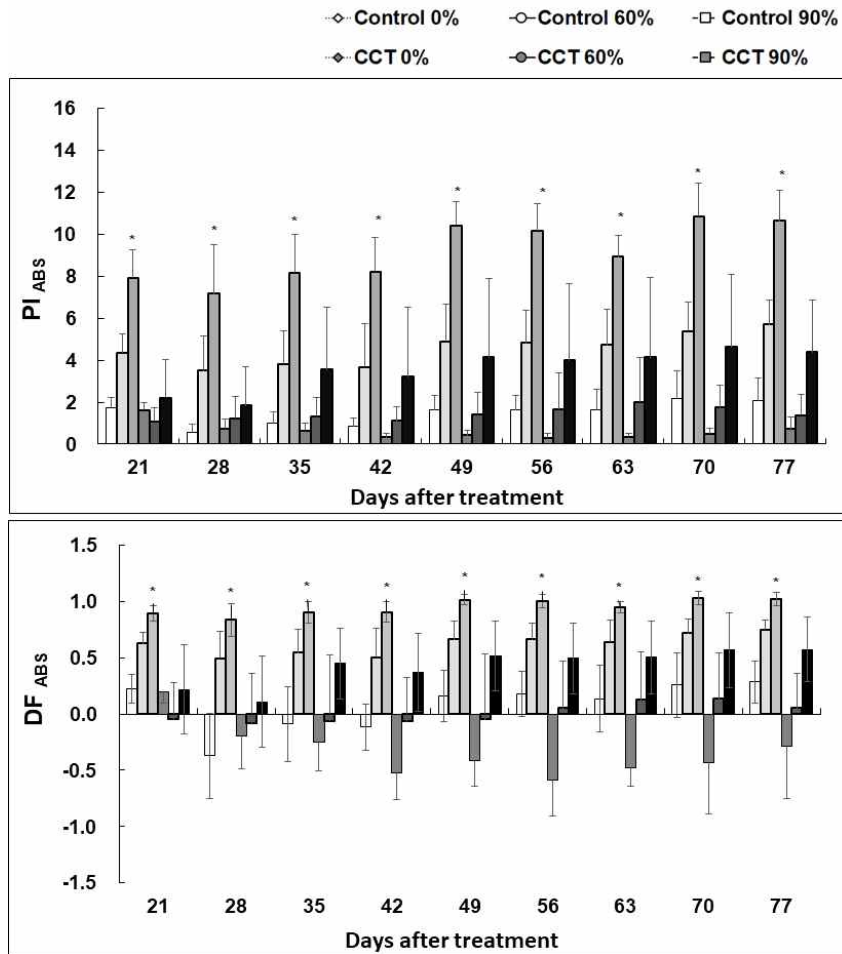


그림 II-4-(6). 차광율에 따른 대조구(Control)와 기후변화 처리구(CCT) 내 나도풍란의 광합성 기구 활력지수(PI_{ABS} , DF_{ABS})

(4) 기후변화 조건 및 광조건에 따른 엽록소 및 카로티노이드 함량 변화

① 엽록소 함량은 차광율이 높아질수록 증가하는 경향을 보였다(표 II-4-(2)). ② 무차광 및 90% 차광 처리 시 기후변화 처리구의 엽록소 a/b가 더 낮은 경향을 보였는데, 이는 엽록소 a의 감소에 의한 차이로 나타난 결과로서 탄소고정계의 활성 저하에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. ③ 나도풍란은 차광율이 높아짐에 따라 카로티노이드 함량 역시 증가하는 경향을 보였는데, 이는 카로티노이드가 관보호적용보다는 보조색소로서의 기능이 중요하게 작용한 결과로 여겨진다.

표 II-4-(2). 기후변화 조건 및 광조건에 따른 엽록소 함량

실험구	엽록소 함량(mg g ⁻¹)			카로티노이드 (mg g ⁻¹)	엽록소 a/b	엽록소/ 카로티노이드
	a	b	a + b			
대조구+ 무차광	2.95±0.36	0.60±0.13	3.55±0.49	1.17±0.12	4.99±0.58	3.02±0.15
대조구+ 60% 차광	4.12±0.81	1.26±0.17	5.37±0.66	1.40±0.20	3.38±1.06	3.86±0.07
대조구+ 90% 차광	6.10±0.52	1.35±0.22	7.44±0.64	1.66±0.11	4.60±0.82	4.48±0.32
기후변화 처리구+ 무차광	2.86±0.40	0.60±0.04	3.46±0.40	1.09±0.19	4.81±0.76	3.19±0.22
기후변화 처리구+ 60% 차광	4.26±0.46	1.00±0.18	5.26±0.59	1.25±0.14	4.29±0.50	4.20±0.26
기후변화 처리구+ 90% 차광	5.62±0.07	1.41±0.03	7.03±0.10	1.56±0.04	3.99±0.09	4.53±0.05
기후변화 처리	ns	ns	ns	*	ns	*
차광 처리	**	**	**	**	*	**
기후변화 × 차광	ns	ns	ns	ns	ns	ns

(5) 기후변화 조건 및 광조건에 따른 생장 변화

①엽수와 엽두께는 처리에 따른 차이를 보이지 않았다(표 II-4-(3)). ②엽건중, 엽면적, 엽면적비, 비엽면적은 차광에 따라 유의한 차이를 보였고 차광율이 증가함에 따라 엽건중, 엽면적 등의 증가가 이루어진 것은 빛의 이용효율을 높이기 위한 것으로 판단된다. ③뿌리건중, 총건중, T/R율, 엽면적비, 비엽면적, 엽중비는 기후변화 처리에 의해 유의한 변화를 보였다. ④전반적으로 대조구에 비해 기후변화 처리구의 건중량이 더 낮았으며, 특히 뿌리 건중량에서 큰 차이를 보여 T/R율, 총건중량 등에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. ⑤나도풍란이 대기 중 CO₂ 증가에도 전반적인 생장이 감소한 것은 CO₂ 흡수량 차이와 관계가 높은 것으로 판단되며, 기존에 보고된 연구 결과가 주로 대기 중 CO₂ 농도만 증가시킨 데에 비해 본 연구에서는 대기온도 역시 3 ℃ 이상 증가하여 호흡으로 인한 물질 소비가 증가하였을 것으로 판단된다. 즉 상대적으로 높은 온도 조건에 의해 수분 손실을 줄이기 위한 기공닫힘이 CO₂ 흡수를 줄이고 호흡으로 인한 소비는 증가시켜 전반적인 생장의 감소로 이어진 것으로 보인다.

표 II-4-(3). 기후변화 조건 및 광조건에 따른 생장 변화

실험구	엽수	건중량 (g)			엽두께 (mm)	엽면적 (cm ²)	T/R률 (g g ⁻¹)	엽면적비 (cm ² g ⁻¹)	비엽면적 (g g ⁻¹)	엽중비 (g g ⁻¹)
		잎	뿌리	총						
대조구+ 무차광	4.6±1.3	0.22 ±0.09	0.32 ±0.1	0.54 ±0.19	1.50 ±0.11	39.6 ±15.8	0.66 ±0.14	187.5 ±29.6	73.0 ±6.6	0.39 ±0.05
대조구+ 60% 차광	5.0±1.0	0.31 ±0.05	0.40 ±0.09	0.72 ±0.13	1.65 ±0.08	59.8 ±6.8	0.80 ±0.12	191.1 ±13	85.0 ±12.1	0.44 ±0.04
대조구+ 90% 차광	5.6±1.1	0.33 ±0.06	0.39 ±0.03	0.72 ±0.08	1.63 ±0.12	68.9 ±8.1	0.87 ±0.12	207.6 ±15.5	95.9 ±7.5	0.46 ±0.03
기후변화 처 리구+ 무차광	4.6±0.6	0.22 ±0.09	0.24 ±0.10	0.46 ±0.19	1.64 ±0.11	45.3 ±12.9	0.96 ±0.14	211.1 ±24.7	103.2 ±16.6	0.49 ±0.03
기후변화 처리구+ 60% 차광	4.4±0.9	0.23 ±0.05	0.23 ±0.04	0.46 ±0.09	1.61 ±0.11	53.5 ±6.7	0.98 ±0.06	239.5 ±28.7	118.0 ±11.5	0.50 ±0.02
기후변화 처리구+ 90% 차광	4.4±0.9	0.27 ±0.08	0.27 ±0.06	0.53 ±0.14	1.58 ±0.05	64.0 ±15.9	0.99 ±0.08	242 ±13.9	120.2 ±4.3	0.50 ±0.02
기후변화 처리 차광 처리	ns	ns	**	*	ns	ns	**	**	**	**
기후변화 × 차광	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

*p≤0.05, **p≤0.001, ns: non-significant

5. 가는동자꽃 무성번식을 이용한 증식 기술 연구

가. 서론

가는동자꽃은 석죽목(Caryophyllales) 석죽과(Caryophyllaceae)에 속하는 여러해살이풀이다. 전 세계적으로 30여종의 동자꽃속(Lychnis)이 분포하고 있으며, 국내에는 가는동자꽃을 포함한 총 6종의 동자꽃속이 자생하고 있다(Lee, 1974; Magnus et al., 2008; Shin 2017). 현재 가는동자꽃의 경우 서식지 훼손, 주변 식생에 의한 피압 등에 의해서 개체수가 급감하여 2017년 환경부에서 지정 멸종위기 야생생물 II급으로 등록되었다. 2019년 멸종위기 야생생물 전국 분포조사에 따르면 현재 국내에는 부산시 금정산 습지 내 약 200여 개체만 분포하는 것으로 확인되었다. 최근 가는동자꽃이 생육하는 습지를 보호 및 보전하기 위해 연구를 통한 대책을 마련하고 있지만(Yamasaki et al., 2013; 신명주, 2017),

아직까지 가는동자꽃의 증식에 관한 연구는 부족한 실정이다.

종자를 활용한 유성증식의 경우 충분한 양의 종자가 확보된다면 대량증식 개체를 얻을 수 있지만 멸종위기식물의 경우 종자의 확보가 어렵기 때문에 유성증식을 통한 증식은 쉽지 않은 실정이다. 여러해살이 식물의 경우 삼목 또는 분주와 같은 무성증식 방법을 이용하여 대량개체 확보가 가능하다. 따라서, 본 연구는 종자 발아한 2년생 가는동자꽃 개체를 이용하여 무성증식 방법(삼목, 분주)을 통한 최적 대량증식법을 개발하고자 수행하였다.

나. 연구 내용 및 방법

(1) 가는동자꽃의 무성 생식 방법을 통한 증식 기술개발

(가) 분주를 통한 개체 증식

①부산시 금정산 내 습지에서 채종된 종자로 번식된 2년생 가는동자꽃 개체를 이용하여 무성 생식 방법을 이용한 대량증식 기술개발 연구를 수행하였다. 2년생 가는동자꽃 10개체를 사용하여 개체의 뿌리줄기(근경)와 원뿌리에서 발달한 신초를 미세뿌리가 손상되지 않게 절단하였으며, 줄기별 1개의 성장점을 포함할 수 있게 제조하였다(그림 II-5-(1)). ②초기 증산량 억제와 건조 방지를 위해 각각의 개체들은 잎의 1/2을 절단하여 플라스틱 포트에 한 개체씩 이식 후 최대 습도를 유지할 위한 플라스틱 덮개 및 비닐을 덮어주었다. 초기 높은 상대 습도 유지를 위한 관수를 매일 실시하였으며, 1주일 간격으로 생존율 및 발근율을 측정하였다. 발근 및 생존이 확인한 개체들은 온실로 옮겨 순화를 진행하였다.



그림 II-5-(1). 가는동자꽃 근경분리(좌) 및 분주(우)

(나) 삽목을 통한 개체 증식

①부산시 금정산 내 습지에서 채종된 종자를 이용하여 발아시킨 2년생 가는동자꽃 개체를 이용하여 삽목을 이용한 최적 대량증식 기술개발 연구를 수행하였다. 삽수 제조 방법에 따른 발근 및 생존율을 확인하기 위해 생장점(액아)을 포함하여 1마디, 2마디의 길이로 삽수를 제조하여 길이에 따른 발근율 및 생존율을 측정하였다. 삽목 용토별 생존율을 측정하기 위해 3가지의 배양토(상토, 펄라이트, 피트모스)를 이용하여 용토를 채운 삽목 트레이에 10개체씩 삽목을 진행하였다(그림 II-5-(2)). ②초기 증산량 억제를 통한 건조 방지를 위해 삽수의 잎을 절반가량 절단하였으며, 삽목판은 토양 건조를 방지하기 위하여 비닐을 이용하여 습도를 유지하고 저면관수 및 두상관수를 매일 실시하였다. 주 1회 발근율 및 생존율을 측정하고 후 발근 및 생존이 완료된 개체는 온실로 옮겨 순화 및 생육 진행하였다.

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 가는동자꽃의 무성 생식 방법을 통한 증식 기술개발

(가) 분주를 통한 개체 증식

분주를 완료한 개체들은 발근이 완료되고 생존이 확인될 때까지 최대 습도를 유지할 수 있도록 수분 관리하였으며, 매주 1회 생존율 및 발근율을 측정한 후 고사 개체들은 측정에서 제외하였다. 2년생 가는동자꽃 10개체(10개 포트)에서 근경 분리를 통하여 총 60개체의 분주 개체들이 분리되었으며, 실험기간 동안 분주 개체 60개체 중 총 50개체가 발근 완료되어 80%의 발근율을 나타내었다. 초기 발근이 완료된 개체들은 모두 정상 활착 및 뿌리돌림이 진행되어 100%의 생존율을 나타내었으며, 분주를 통한 증식을 통해 10개체를 60개체로 증식 성공하였다.

(나) 삽목을 통한 개체 증식

삽수의 발근율 및 생존율을 매주 1회씩 측정하였으며, 측정 도중 고사한 개체들은 측정에서 제외하였다. 삽수 길이에 따른 증식 실험 결과 1마디로 제조한 10개의 삽수에서는 0%의 발근율이 나타났으며, 2마디의 길이로 제조한 삽수는 총 10개 중 8개가 발근되어 80%의 발근율을 나타내었으며, 발근이 완료된 개체들은 모두 100% 생존하여 정상적으로 활착 완료하였다.

용토별 삽목 실험을 진행한 결과 3가지의 배양토 중에서 펄라이트 및 상토에

삼목한 개체들은 삽수 10개에서 모두 발근이 완료되어 100%의 발근율을, 피트 모스의 경우에는 2개만 발근이 완료되어 20%의 발근율을 나타내었다(그림 II-5-(3)). 발근이 완료된 삽수는 모두 활착 완료하여 100%의 생존율을 나타내었다. 가는동자꽃 10개체를 삼목하여 총 32개체를 증식 완료하였다.

라. 결론

삼목을 통한 증식에 있어 삽수의 길이는 액아(결눈)를 포함할 수 있는 2마디 길이의 삽수로 제조하는 것이 발근율과 생존율을 높이는데 유리한 것으로 판단된다. 삼목에 사용되는 용토는 배수가 뛰어난 펄라이트 또는 배수 및 보수력이 잘 발달한 원예용 상토를 이용하는 것이 발근과 뿌리의 생장에 도움이 될 것으로 보이며, 대량증식에 적합할 것으로 판단된다. 산성을 띠거나 배수력이 좋지 않은 용토에서는 발근 및 뿌리의 생장이 방해되는 것으로 판단된다.

분주 시 미세뿌리가 손상되거나 신초가 손상된 개체들은 발근 능력이 떨어지거나 발근 진행 중간 고사하였다. 분주 후 초기 발근이 유도된 개체들은 모두 활착하여 생존하였기 때문에 초기 발근 유도가 분주를 통한 증식에 있어 중요할 것으로 판단된다. 따라서 분주를 통한 개체 증식 시 미세뿌리 및 신초의 손상을 최소화하여 분주하여 발근율을 높이는 것이 분주를 통한 대량증식 기술에서 매우 중요할 것으로 보인다. 다년생 개체인 가는동자꽃의 경우 매년 뿌리줄기로 새로운 신초가 발생하므로 이를 이용한 분주는 대량 개체 확보에 있어 매우 유용할 것으로 판단된다.

가는동자꽃의 경우 방사 이식 후 개체적응 및 모니터링 연구 결과 국내 자생지가 한 곳만 존재하며 개체군 내 개화 개체가 부족하여 종자 확보가 어려운 상황이다. 또한 자생지 내 생육 특성상 굵어 자라며 주변 기주식물에 기대 자라기 때문에 개체군 번식 및 확장에 있어 무성번식을 통한 증식이 진행될 가능성이 존재한다. 따라서 기존 소량의 종자 발아 개체를 이용하여 무성 증식 기술개발을 우선으로 진행하여 증식연구 및 방사 이식을 위한 대량 개체 확보를 진행하였다. 추후 지속적인 모니터링을 통한 자생지 및 온실 개체에서의 종자 확보와 자생지 내 개체군의 확장에 있어 무성번식 가능성에 관한 연구가 필요하다.

가는동자꽃의 경우 연차별 계획에 따라 1차년도 연구를 통해 원종확보를 완료하였으며 2차년도 연구를 통하여 가는동자꽃의 무성증식 개발을 100% 이행하여 총 82개체를 확보하였다. 2차년도 연구를 통해서 증식된 개체들을 이용하여 3차년도 연구 시 종자 확보 및 유성 생식을 활용한 증식법 개발 연구를 수행하여 가는동자꽃의 유·무성 증식 기술개발을 완료할 예정이다.

6. 실내·야외 최적 증식환경 구축에 따른 생활사적 특성 연구

가. 서론

소똥구리는 환경, 경제, 문화적 측면에서 다양한 가치를 지닌 대표적인 곤충이다. 하지만, 국내에서는 1970년 이후로 발견기록이 없어 지역절멸로 추정되고 있으며 환경부에서는 멸종위기 야생생물 II급으로 지정하여 보호하고 있다. 현재는 「멸종위기 야생생물 보전 종합계획('18~'27)」에 따라 우선복원 대상종으로 지정하여 소똥구리 복원연구를 수행하고 있다. 본 연구는 멸종위기 II급 소똥구리의 복원을 위한 기초 생태자료를 축적하고 최적 증식환경을 구축하기 위해 수행하였다. '19년에 1차 도입한 소똥구리 개체군은 실내 공간에서 누대사육이 이어짐에 따라 비행행동을 보이지 않고 산란수가 줄어드는 등의 개체군 활력 저하가 확인되었다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 소똥구리의 활력을 증가시킬 수 있는 최적 증식환경에 대한 연구를 진행하였다.

나. 연구 내용 및 방법

(1) 실내 최적 증식환경 구축

(가) 초기 동면 개체군

2021년 4월에 순차적으로 저온($25^{\circ}\text{C} \rightarrow 20^{\circ}\text{C} \rightarrow 18^{\circ}\text{C}$)에 노출시켜 일반 동면개체군보다 일찍 동면에 진입한 초기 동면개체군은 약 8개월간의 동면기간을 거친 후, 2021년 12월 13일부터 순차적으로 고온($18^{\circ}\text{C} \rightarrow 20^{\circ}\text{C} \rightarrow 22^{\circ}\text{C} \rightarrow 25^{\circ}\text{C}$)에 노출하여 동면에서 깨어나 활동을 시작하게 했다. 주 3회 먹이를 공급했고, 토양매트가 건조해지면 분무기로 수분을 제공했다. 2주가 지난 후에 생존한 개체와 동면중 폐사한 개체를 확인하여 월동생존율을 분석했다.

표. II-6-(1). 조기 동면개체군 월동관리

구분	날짜	일수	온도	일장(빛:어둠)
저온처리	'21. 03. 26. ~ 04. 02.	7	25℃	14:10
	'21. 04. 02. ~ 04. 09.	7	20℃	12:12
	'21. 04. 09. ~ 04. 16.	7	18℃	10:14
동면	'21. 04. 16. ~ 12. 13.	242	6℃	0:24
고온처리	'21. 12. 13. ~ 12. 20.	7	18℃	10:14
	'21. 12. 20. ~ 12. 27.	7	20℃	12:12
	'21. 12. 27. ~ '22. 01. 03.	7	22℃	14:10
	'22. 01. 03. ~ 계속		25℃	14:10

소통구리의 산란을 증대시킬 수 있는 요인을 찾기 위한 연구를 진행하였다. 플라스틱 사육케이지(550mm×380mm×303mm(H))에 수분을 공급한 토양매트(모래:질석=1:1)를 20cm 높이로 채우고 동면 중 생존한 성충 12개체를 투입하여 사육실험을 진행했다. 5파장 형광등과 메탈할라이드 전구(400W, 10시~16시)를 광원으로 사용했고, 창문으로 들어오는 햇볕을 짝여 주었다. 2주마다 성충을 같은 크기의 다른 사육케이지로 이동시키고 이전의 사육케이지의 산란경단은 따로 채취하지 않고, 암컷 성충이 산란을 마치고 나온 그 상태로 유지하게 했다. 토양 매트가 건조되는 것을 막기 위해 신성충이 우화할 때까지 주 3회 분무기로 수분을 공급했다.

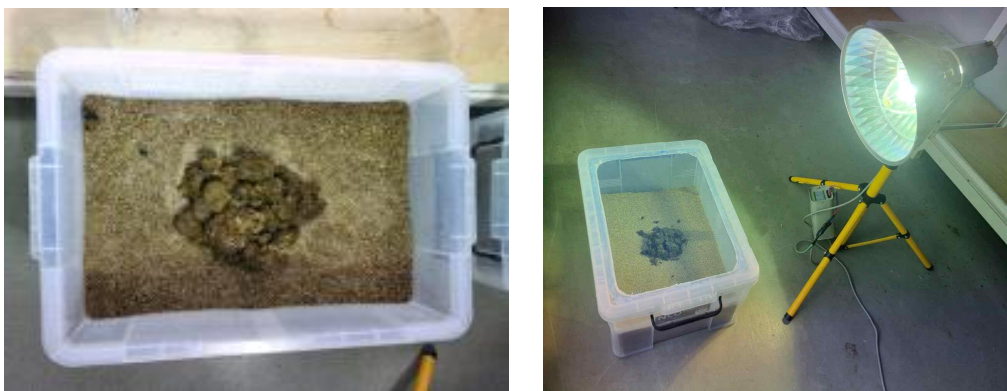


그림. II-6-(1). 사육 케이지 내부(좌)와 메탈할라이드 전등이 설치된 모습(우)

(나) 일반 동면개체군

2021년 10월부터 순차적으로 저온(25℃→18℃→13℃→8℃→3℃)에 노출시켜 동면에 들어간 개체군을 항온항습기 안에서 약 6개월간의 동면기간을 보내고, 2022년 4월부터 순차적으로 고온(5℃→7℃→10℃→15℃→20℃→25℃)에 노출하여 동면에서 깨어나 활동을 시작하게 했다. 주 3회 먹이를 공급했고, 토양매트가 건조해지면 분무기로 수분을 제공했다. 2주가 지난 후에 생존한 개체와 동면중 폐사한 개체를 확인하여 월동생존율을 분석했다. 성충이 우화하여 성충이 된 년도(19년, 20년, 21년), 먹이에 첨가제를 추가하여 섭식한 먹이의 영양분 차이, 도입한 월(채집시기, 지역)에 따라 구분하여 월동생존율을 분석했다.

표. II-6-(2). 일반 동면개체군 월동관리

구분	날짜	일수	온도	일장(빛:어둠)
저온처리	'21. 10. 01. ~ 10. 15.	14	25℃ → 18℃	12:12
	'21. 10. 15. ~ 10. 22.	7	13℃	10:14
	'21. 10. 22. ~ 10. 29.	7	8℃	10:14
	'21. 10. 29. ~ 11. 02.	7	3℃	0:24
동면	'21. 11. 02. ~ '22. 04. 18.	168	2℃	0:24
고온처리	'22. 04. 18. ~ 04. 25.	7	5℃	0:24
	'22. 04. 25. ~ 05. 02.	7	7℃	10:14
	'22. 05. 02. ~ 05. 09.	7	10℃	12:12
	'22. 05. 09. ~ 05. 16.	7	15℃	12:12
	'22. 05. 16. ~ 05. 23.	7	20℃	14:10
	'22. 05. 23. ~ '22. 06. 06.	14	25℃	14:10

매 시간마다 온도와 습도를 설정하여 자동으로 조절이 가능한 항온항습실을 설치하여 낮에는 온도가 서서히 올라가고 밤에는 온도가 서서히 낮아지게 하여 밤낮효과를 실내에 적용할 수 있게 하였다. 동면해제를 위한 순차적 고온 환경 노출이 완료된 6월 6일부터는 항온항습실 내에서 아래와 같이 환경조건을 설정하였다.

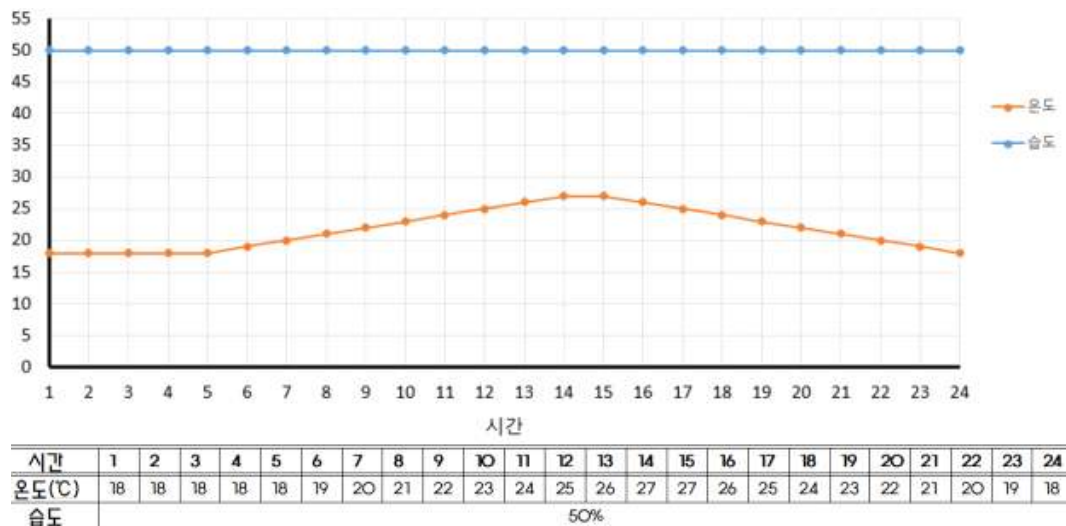


그림. II-6-(2). 항온항습실 시간별 온도설정

소똥구리의 산란을 증대시킬 수 있는 요인을 알아보기 위한 연구로서 아크릴 원형케이지(250mm×250mm(H))에 모래와 질석을 1:1로 섞은 매트를 20cm 채워넣고 케이지당 2쌍씩 넣어 사육실험을 수행했다. 빛조건은 5과장 형광등과 적외선 전구(250W)를 광원으로 적용했다. 산란경단은 2주에 한번 수거하여 개수를 기록했다.



그림. II-6-(3). 250w 적외선등 적용 모습(좌)과 산란경단 관리(우)

일반 동면개체군 중 일부를 검역소에 설치된 반-야외 모니터링시설로 옮겨와서 태양의 직사광선과 야외 기상 등에 직접 노출된 상태에서 실험을 진행했다. 아크릴 원형케이지(250mm×250mm(H))에 토양매트(모래:질석=1:1)를 20cm 깊이로 채우고 모니터링시설 안에 같은 깊이로 묻음으로써 토양매트의 온도를 바깥 토양의 온도와 같아지도록 했다. 원형케이지에 소똥구리 암수 2쌍을 넣고 주 3회 먹이를 공급하며 토양매트가 건조해지면 분무기로 수분을 제공했다. 산란경단은 2주에 한번 수거하여 개수를 기록했다.



그림. 11-6-(4). 야외 소똥구리 사육케이지(좌)와 산란경단 관리(우)

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 실내 최적 증식환경 구축

(가) 조기 동면 개체군

‘21년 4월에 52개체가 동면에 진입했지만, 40개체가 월동중 폐사하고 12개체만 생존하였다. 8개월의 동면 기간은 월동생존율이 23%로 나타났다. 8개월은 평소 약 6개월의 동면 기간보다 2개월이 더 길었는데, 고온처리를 하지 않았음에도 불구하고 냉장실(6℃)에서 지표면으로 나와 폐사한 개체들이 보였다. 너무 긴 동면 기간은 오히려 해가 될 수도 있음을 확인할 수 있었다.

생존한 12개체는 광원으로서 메탈할라이드 전등(400W)과 창문으로 잠깐씩 들어오는 햇빛을 쬌어주었다. 메탈할라이드 전등은 약 1.2m정도 거리를 두었으며 햇빛은 동절기였기 때문에 빛이 약하여 사육케이지에 영향을 줄만한 열이 전달되지는 않았다. 12개체중 6개체는 사육관리중 폐사하였고 2개체의 신성충

이 발생했다. 1개의 산란경단은 채취하는 과정에서 경단 겉부분이 손상되었는데, 플로털폼을 이용하여 인공번데기방을 만들어 주었고 무사히 성충까지 우화했다. 조기 동면 개체군의 산란수가 저조한 것으로 봤을 때, 메탈할라이드 전등과 동절기 햇빛은 높은 강도의 빛을 제공했지만, 소똥구리의 활력을 높이는 핵심 인자로서 작용하지 못한 것으로 판단된다.



그림. 11-6-(5). 인공번데기방 안에서 발육중인 소똥구리 번데기(좌)와 이상없이 우화한 소똥구리 성충(우)

(나) 일반 동면 개체군

월동생존율은 출생년도에 따른 생존기간이 가장 중요한 요인으로 나타났다. 가장 최근 해('21)에 발생하여 생존했던 기간이 짧은 성충일수록 월동생존율이 높았다. '19년에 발생한 성충은 햇수로 4년째인 2022년에 월동생존율이 10%였으며, '20년에 발생한 성충은 3년째에 월동생존율이 61%, 그리고 '21년에 발생한 성충은 2년째에 월동생존율이 84%로 나타났다. 첨가제의 유무와 도입한 월에 따라서는 유의한 차이가 없었다.

표. II-6-(3). 일반 동면 개체군 월동생존율

구분			동면 전 개체수		동면 후 개체수		생존율	
출생년도	19년		10		1		10%	
	20년		75		46		61%	
	21년		43		36		84%	
첨가제 섭식	무처리	‘19	76	3	49	0	64%	0%
		‘20		61		38		62%
		‘21		12		11		92%
	첨가제	‘19	52	7	34	1	65%	14%
		‘20		14		8		57%
		‘21		31		25		81%
도입한 월	7월	‘19	53	7	34	0	64%	0%
		‘20		31		22		71%
		‘21		15		12		80%
	8월	‘19	54	1	32	0	59%	0%
		‘20		44		24		55%
		‘21		9		8		89%
	MIX	‘19	21	2	17	1	81%	50%
		‘20		4		3		75%
		‘21		15		13		86%

‘19년도에 도입한 소똥구리 개체군은 실내에서 누대사육이 이어짐에 따라 비행행동을 보이지 않고 산란수가 줄어들며 경단의 크기를 작게 만드는 등의 전체적인 활력 저하가 확인되었다. 그래서 소똥구리의 활력을 증가시킬 조건을 찾기 위해 실내에서 항온항습실을 구축하여 시간별로 온도를 변화시켜 밤낮 효과를 적용하였으며, 적외선 전구(250w)를 설치하여 야외의 태양 직사광선과 유사한 효과를 받을 수 있게 했다.

표. II-6-(4). 암컷 1개체당 대조구, 실내증식실, 야외 기상환경에서의 번식효율 비교

		암컷 개체수	산란 경단수	암컷 1개체당 평균 산란수	비율
실내	항온조건 + 5파장 형광등	25	20	0.80	1
	밤낮 온도변화 + 적외선등	15	18	1.20	1.5
야외	야외 기상환경(영양군)	24	49	2.04	2.55

암컷 1개체당 평균 산란수는 야외 기상환경 > 실내환경(밤낮 온도변화 + 적외선등) > 실내환경(항온조건 + 5파장 형광등) 순으로 높았으며, 야외 기상환경에서는 기존의 실내 조건보다 2.55배 더 높게 나타났다. 실내에 밤낮 온도변화 조건과 적외선 전등을 적용했을 때, 기존의 산란수보다는 1.5배 높았지만 야외 기상환경에 비해서는 낮게 나타났다. 항온항습실에서는 적외선등을 10시부터 15시까지 5시간 동안만 적용하였는데, 실제로 야외에서 산란이 가장 활발한 6월 중순의 일조시간인 15.6시간에 비해 부족했을 가능성이 있다. 향후 실내증식실에서 적외선 전등의 일조시간 차이에 따른 암컷의 산란수 변화에 대한 추가실험을 수행할 필요성이 있다.

7. 소똥구리 먹이원 위협요인(약제) 규명을 위한 연구

가. 서론

소똥구리는 과거 우리나라 전역에 분포하였으나 1970년대 이후 발견기록이 없어 현재 지역절멸로 추정하고 있다. 소똥구리가 사라진 이유에 대해서는 아직까지 정확히 밝혀지지 않았으나 주요 원인중 하나로 1970년대부터 사용량이 급격하게 증가한 사람과 가축 대상 구충제가 지목되고 있다. 구충제는 특히 사람과 가축의 배설물을 통해 생태계로 노출되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 분변을 먹이로 하는 분식성 곤충에 중독증상을 일으켜 개체군 및 군집에 부정적 영향을 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 가축 구충제로 흔히 사용되는 이버멕틴(ivermectin)을 이용해 먹이원 경로(약제→가축→분변→곤충) 및 직접 노출에 따른 구충제의 분식성 곤충류에 미치는 영향을 알아보았다. 일련의 실험과정을 통해 도출되는 결과는 약제의 소똥구리에 대한 위해성을 판단하는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

나. 연구 내용 및 방법

약제에 대한 위해성 평가는 렌지소똥풍뎅이(*Onthophagus lenzii*)를 대상으로 수행하였다. 렌지소똥풍뎅이는 소똥구리와 유사한 생태를 가진 근연종으로, 소똥구리를 대상으로 한 약제 노출실험을 대신해 멸종위기종 훼손, 증식 개체수 관리 등의 문제를 해결하였다. 실험에 쓰인 렌지소똥풍뎅이는 '22년 6월 초 제주지역 자연 방목지에서 300개체를 채집하였고(그림. II-7-(1)). 멸종위기종복원센터 곤충증식실로 가져와 순화 처리를 진행하였다.

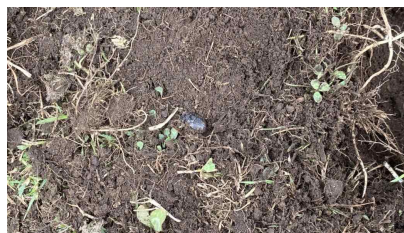


그림 II-7-(1). 위협요인 규명을 위한 시험종 확보

본 연구는 구충제를 가축에 투여함으로써 약제 → 가축 → 분변 → 곤충으로 이어지는 일련의 생태 먹이사슬 흐름에 따라 분변을 통해 노출되는 약제의 농도와 이를 먹이로 섭식한 렌지소똥풍뎅이에 대한 영향을 알아보고자 하였다. 센터에서 사육중인 가축(말)에 이버멕틴을 경구투여 후 분변을 시간 경과에 따라 수집하였다. 수집한 분변 일부는 약제 농도분석을 수행하였고 균일하게 교반 후 -70℃에서 실험 시작까지 보관하였다. 이후 수집날짜에 따라 구분한 분변을 렌지소똥풍뎅이에 노출시켜 사육하였고, 이때 생존에 차이가 있는지 조사하였다(표 II-7-(1)).

표 II-7-(1). 소똥구리 먹이원 내 약제 노출수준에 따른 생물검정 연구 방법

약제 투여	대상 가축	말 1개체(1일 분변생산량 약 30kg)	
	대상 약제	이버멕틴 구충제(Ivermectin Paste 1.87%, duvet)	
	투여 방법	무게 450kg 기준 4.825g(이버멕틴 성분 0.09g) 경구투여	
대상곤충	소똥구리 근연종(렌지소똥풍뎅이)		
분변수거	분변 수거일	Day(약제 투여일) - 1, +1, +2, +5, +8, +16, +28, +42	
	수거시간	24시간(09시 ~ 익일 09시) 동안 생산된 분변을 모두 수거	
	분석용 샘플	수거된 분변의 약제를 균일화하여 분석용 샘플(500g) 채취	
생물검정	구분	약제 투여일 ± n일 분변	실험 개체수(180개체)
	대조군	-1일	10쌍
	실험군	+1일	10쌍
		+2일	10쌍
		+5일	10쌍
		+8일	10쌍
		+16일	10쌍
		+28일	10쌍
	분석항목	성충	생존, 산란, 아치사 반응
		유충	생존, 발육, 아치사 반응
약제 분석	분석기관	순천대학교 친환경농업센터	
	분석방법	액체 크로마토그래피(LC-MS)	



그림 II-7-(2). 소똥구리 먹이원 내 약제 노출수준에 따른 생물검정 연구

앞선 가축 분변을 통한 잔류 약제 노출 실험 결과를 기반으로 고농도 약제 분변을 제작한 후 직접 노출 시킴으로써 약제가 렌지소똥퐁뎅이에 미치는 영향을 알아보았다. 고농도 약제 분변은 OECD 시험가이드라인(OECD, 2009)에 따라 제작하였다. 분변 1kg 기준으로 각 농도에 필요한 이버멕틴을 유기 휘발성 용매(아세톤)에 녹인 후 분변과 섞어 30분간 균일화 하였다. 이후 상온에서 4시간 동안 용매를 충분히 기화시킨 후 -70℃에서 실험 시작까지 보관하였다. 각 농도별 분변에 따라 그룹을 나누어 렌지소똥퐁뎅이에게 먹이로 공급하였고, 이때 생존률과 활동성, 산란 등을 조사하였다(표 II-7-(2)).

표 II-7-(2). 고농도 약제 분변 직접 노출에 따른 위해성 평가 연구 방법

고농도 약제분변	대상 약제	이버멕틴 구충제(Ivermectin Paste 1.87%, duvet)	
	제작 방법	분변 1kg 기준 각 농도에 필요한 이버멕틴의 양을 측정하여 용매(아세톤)에 녹여 분변과 섞어서 균일화	
대상 곤충	소똥구리 근연종(렌지소똥퐁뎅이)		
생물검정	구분	농도(ppm)	실험 개체수(100개체)
	대조군	0	20쌍
		0 (acetone)	20쌍
	실험군	2	20쌍
		5	20쌍
		50	10쌍
		100	10쌍
	분석 항목	성충	생존, 산란, 활동 반응
		유충	생존, 발육 반응
약제분석	분석기관	순천대학교 친환경농업센터	
	분석방법	액체 크로마토그래피(LC-MS)	



그림 II-7-(3). 고농도 약제 분변 직접 노출에 따른 위해성 평가 연구

다. 연구 결과

생태 먹이사슬 흐름(약제 → 가축 → 분변 → 곤충)에 따라 분변으로 노출되는 약제의 농도는 이버멕틴 투약 후 1일차에 $2.29 \pm 0.05 \text{ mg kg}^{-1}$ 로 가장 높은 농도를 보였고 이를 섭식한 렌지소똥풍뎅이 체내 잔류량은 $0.34 \pm 0.00 \text{ mg kg}^{-1}$ 으로 나타났다(표 II-7-(3)). 분변을 통해 노출되는 약제는 점차 농도가 낮아졌고, 5일차 분변(0.007 mg kg^{-1}) 이후 이를 섭식한 렌지소똥풍뎅이 체내에 이버멕틴은 검출되지 않았다.

표 II-7-(3). 가축을 통한 분변과 렌지소똥풍뎅이 체내 이버멕틴 잔류 농도

구분	말 분변	mg kg ⁻¹ (mean± se)
		렌지소똥풍뎅이
D-1	N.D.	N.D.
D+1	2.2922 ± 0.0501	0.3402 ± 0.0044
D+2	0.1048 ± 0.0033	0.0250 ± 0.0019
D+5	0.0070 ± 0.0003	N.D.
D+8	0.0024 ± 0.0002	N.D.
D+16	N.D.	N.D.
D+28	N.D.	N.D.

정량한계(LOQ)=0.002 mg/kg

고농도 약제 분변 제작을 통한 노출 실험에서도 가축에 이버멕틴 투약 후 1일차 농도(2.29 ± 0.05)와 유사한 2ppm 분변을 노출시 렌지소똥풍뎅이 체내 잔류량은 $0.32 \pm 0.00 \text{ mg kg}^{-1}$ 로 가축 분변을 통한 노출 실험과 유사한 결과를 확인하였다. 또한 두 실험을 통해 분변 내 약제의 농도가 높을수록 렌지소똥풍뎅이 체내 축적이 높아지는 것을 확인할 수 있었다(표 II-7-(4)).

표 II-7-(4). 고농도 약제 분변에 따른 렌지소똥풍뎅이 체내 이버멕틴 잔류 농도

농도	체내 잔류량	mg kg ⁻¹ (mean± se)
		비고
0	N.D.	Negative control
0(acetone)	N.D.	Positive control
2ppm	0.3265 ± 0.0056	-
5ppm	1.4659 ± 0.0178	-
50ppm	2.8274 ± 0.0466	-
100ppm	6.3579 ± 0.0839	-

정량한계(LOQ)=0.002 mg/kg

분변 내 약제 농도에 따라 이를 섭식한 렌지소똥풍뎡이의 생존은 유의한 차이를 보였다. 가축에 이버멕틴을 투약 후 잔류농도가 가장 높은 1일차 분변 (2.29 ± 0.05)을 섭식한 렌지소똥풍뎡이의 생존율은 실험 60일차를 기점으로 50% 이하로 감소하였고 이후 뚜렷한 감소세가 관찰되었다(그림 II-7-(4)). 이는 고농도 약제분변 제작을 통한 노출 실험시 2ppm 분변을 섭식한 렌지소똥풍뎡이에서도 유사한 결과를 확인할 수 있었다(그림 II-7-(5)).

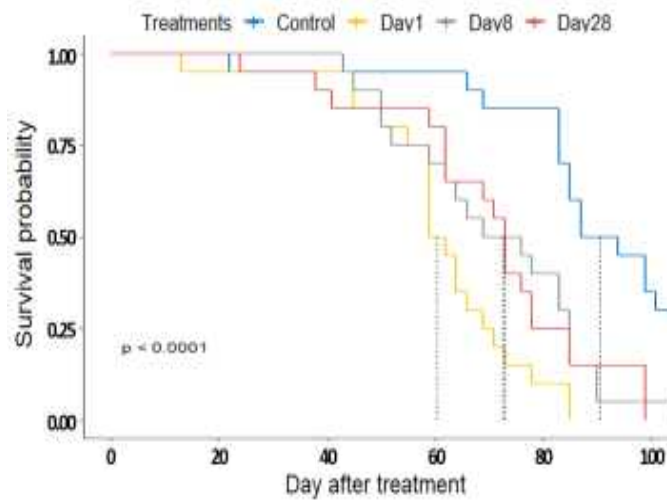


그림 II-7-(4). 가축을 통한 약제 노출에 따른 렌지소똥풍뎡이(*O.lenzii*) 생존율

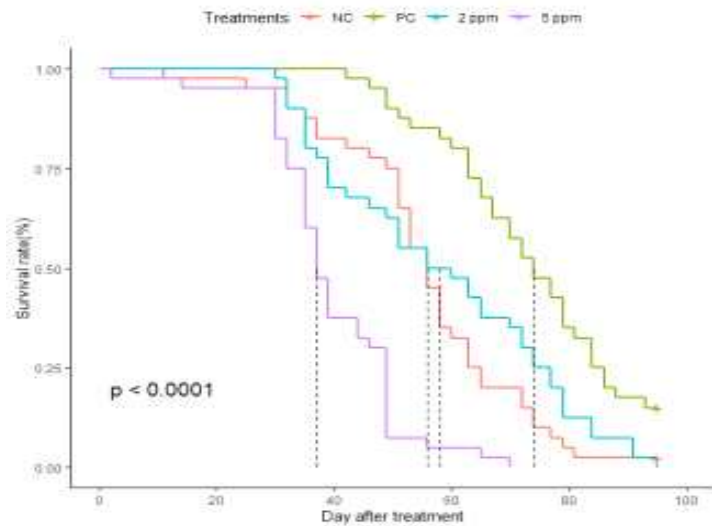


그림 II-7-(5). 고농도 약제 분변 노출에 따른 렌지소똥풍뎡이(*O.lenzii*) 생존율

렌지소똥풍뎡이의 행동을 관찰한 결과, 약제에 노출됨에 따라 활동성의 저하를 확인할 수 있었다. 렌지소똥풍뎡이는 분변 속에서 먹이섭취를 하며 분변 아래 터널을 만들어 길쭉한 모양의 경단을 만든 후 산란을 한다. 약제 노출시 2ppm(2.25 ± 0.17 회)과 5ppm(1.73 ± 0.10 회)이 약제 처리를 하지 않은 대조군(4.75 ± 0.22 회)에 비해 산란을 위한 굴파기 횟수가 감소함을 확인하였다(그림 II-7-(6)). 이는 또한 산란 경단의 갯수와 제작 시기가 약제 노출농도에 따라 지연됨을 확인할 수 있었다(그림 II-7-(7)).

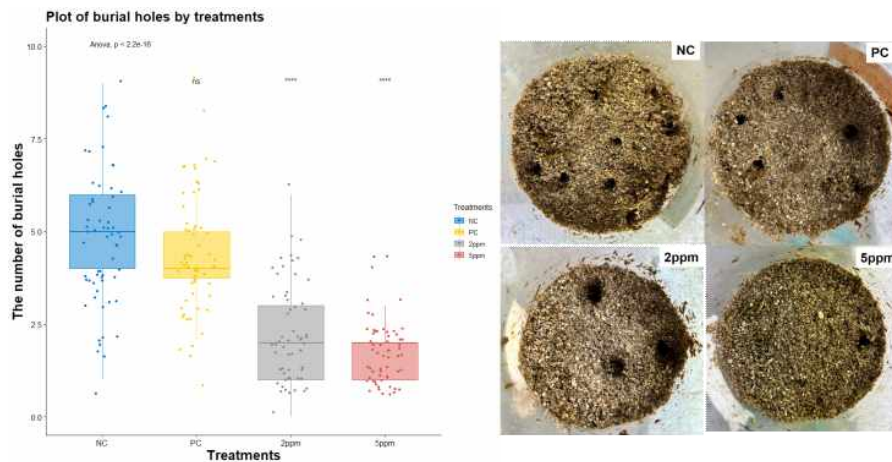


그림 II-7-(6). 약제 농도에 따른 산란활동(굴파기)

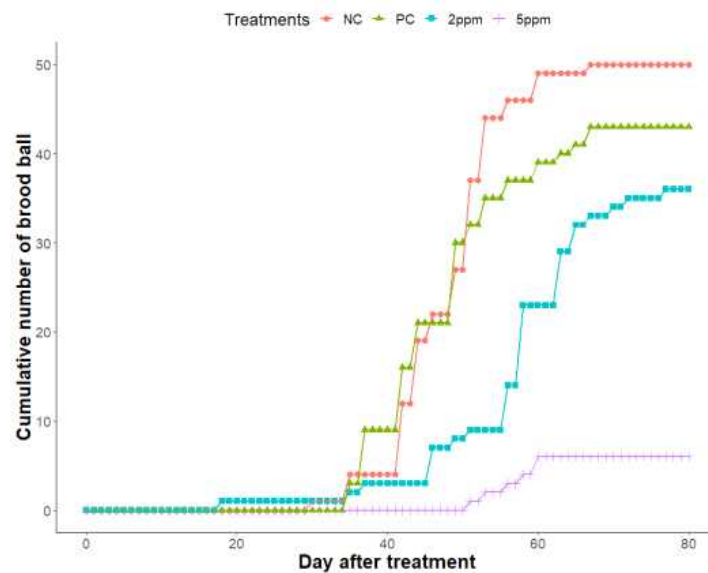


그림 II-7-(7). 약제 농도에 산란 경단수(누적)

다. 결론 및 고찰

본 연구를 통해 가축에 투여하는 구충제는 가축 배설물을 먹이로 하는 곤충에게 노출될 수 있으며, 이러한 약제의 사용으로 구충제가 잔류하는 분변을 분식성 곤충이 섭식하게 되면 그들의 개체군에 부정적인 영향을 받을 수 있음을 확인할 수 있었다. 연구에서 사용된 가축용 구충제 이버멕틴은 가축 체내 기생충을 방제하는데 사용되는 동물용 의약품이지만 그 사용으로 인해 소똥구리를 포함한 분식성 곤충류의 개체수 감소 등 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 특히 이버멕틴은 뿔소똥구리(*Copris ochus*)와 애기뿔소똥구리(*Copris acutidens*)와 같은 종에서 성체 사망률에 직접적인 영향을 미치고 (Iwasa, M. 2007), 분식성 곤충의 후각과 운동능력을 감소시켜 기본적인 생물학적 활동을 저해한다고 알려졌다(Verdú, J. R. et al. 2015). 본 연구에서도 렌지소똥풍뎅이를 구충제에 노출시킨 결과 노출농도에 따라 생존율에 유의한 차이를 보였고 굴파기 행동과 경단제작 등 생식활동의 저하를 관찰할 수 있었다. 이는 분변을 통한 약제 노출은 장기적으로 이들 개체군의 감소를 초래할 것으로 판단된다. 이를 통해 구충제 사용에 따른 소똥구리 먹이원 위협요인 해소 및 안정적인 서식지 조성을 위해서는 가축용 약제 사용에 대한 철저한 가이드라인 마련이 필요할 것으로 사료되며 향후 소똥구리를 야외 서식지에 방사시 방목 가축에게 약제 사용에 따른 영향을 최소화하는 방안이 필요할 것으로 판단된다.

8. 참달팽이 성장률 개선 연구

가. 서론

참달팽이(*Koreanohadra koreana*)는 환경부 멸종위기 야생생물Ⅱ급으로 지정되어 법적으로 보호받고 있으며, 2022년 국가생물적색목록 개정판에서는 위급(CR, Critically Endangered)으로 상향 조정되었다(* 12년 위기(EN, Endangered)). 참달팽이는 한국 고유종으로 최근까지 전라남도 신안군 홍도가 유일한 서식지로 알려져 있었다. 국립생태원 멸종위기종복원센터는 2019~2020년 전라남도 신안군 일대 65개 지점(25개 지역)에서 참달팽이의 서식 현황을 조사하여 하태도 신규 서식지를 발굴하였다. Choi and Park (2020)은 흑산군도에 해당하는 대장도 습지 인근에서 장도참달팽이(*Koreanohadra koreana jangdoensis*)를 발견하여 참달팽이의 아종으로 기록하였다. 그럼에도 불구하고 서식지가 신안군 일부 섬에 한정되어 있어 향후 기후변화에 의한 여름철 기온 상승 등 환경 변화로부터 개체군 감소가 예상된다. 야생 개체군을 보전하기 위해서는 인공증식 기술개발이 필요하며, 적시에 개체군을 보강하기 위해서는 서식지외보전기관에서 인공증식 개체군이 안정적으로 유지되어야 한다.

육상 달팽이는 이동성이 약해 지리적으로 격리된 환경에서 적응방산(適應放散) 진화하는 사례가 많이 알려져 있다. 특히 버뮤다 제도(Outerbridge and Sarkis, 2018), 보닌제도(Chiba, 1999; Chiba and Cowie, 2016)와 같은 대양섬(oceanic islands)의 토착 달팽이는 이미 많은 종이 절멸하였거나 절멸 위기에 놓여 복원연구가 진행되고 있다. 대표적으로 버뮤다 제도 고유 달팽이 중 *Poecilozonites* 속의 인공증식 등 복원 프로젝트 사례가 있다(Outerbridge and Sarkis, 2018; Copeland and Hesselberg, 2021). 참달팽이의 서식지인 신안군 또한 약 1004개의 섬으로 이루어져 있으며, 대부분의 섬들은 육로로 연결되지 않아 지리적으로 격리되어 있다. 국립생태원 멸종위기종복원센터는 2018년 10월 전라남도 신안군 홍도에서 참달팽이 5개체를 센터 내 자체 증식시설로 도입하여 인공증식 기술개발 연구를 시작하였다. 2021년에는 참달팽이 인공증식에 최초로 성공하였으며, 산란·성장률 개선 연구 등을 통해 인공증식 기술을 발전시켰다. 향후 인공증식된 참달팽이는 야생 개체군의 보전을 위한 이입·보강을 포함해, 유전·생태·생리학적 특성 등을 구명하는데 활용될 계획이다.

나. 연구 내용 및 방법

(1) 칼슘 공급 방법 차이에 따른 성장률 비교

성장기의 참달팽이 유생을 이용하여 칼슘 급여 방법에 따른 성장률을 비교 분석하였다. 실험에 사용한 참달팽이는 '18년에 홍도에서 도입한 성체로부터 인공증식한 24개체였다. 사육실의 온도는 24℃로 유지하였다. 사육실의 습도는 60%를 유지하였으며, 개별 사육통의 습도는 90% 이상으로 조절하였다. 실험에 이용한 24개체 모두 달팽이 사료와 식물성 먹이(양배추 등)를 주식으로 주 3회 정량 급여하였다. 실험군에는 먹이 급여 시 서로 다른 종류의 칼슘을 제공하였으며, 대조군은 칼슘을 급여하지 않았다. 실험군에 제공한 칼슘은 각각 중질탄산칼슘, 계란껍데기, 굴껍데기, 산호, 갑오징어뼈의 가루였다(표. II-8-(1)).

표. II-8-(1). 참달팽이 칼슘 공급 비교 실험 조건

번호	①	②	③	④	⑤	⑥
실험 그룹	대조군	실험군1	실험군2	실험군3	실험군4	실험군5
	칼슘 미공급	중질 탄산칼슘	계란 껍데기	굴 껍데기	산호	갑오징어 뼈
개체수	4	4	4	4	4	4

※ 공통 먹이: 달팽이 사료 + 채소류

각 실험 개체는 모두 개별 사육하였으며, 패각의 각경 길이(mm)를 기준으로 사육 용기를 점차 큰 것으로 교체해 주었다. 각경 7mm 이하는 40×12mm 크기의 용기에 사육하였으며, 각경 11mm 이하는 60×15mm, 각경 11mm 이상은 100×40mm 크기의 사육 용기로 교체하였다(표. II-8-(2), 그림. II-8-(1)). 각경의 길이는 현미경카메라(Nikon Y-TV55)와 Tcapture (Tucsen Photonics Co., Ltd., Fujian, China) 소프트웨어를 이용하여 정밀하게 측정하였으며, 13mm 이상부터는 버니어 캘리퍼스를 이용하여 매주 1회 총 40주간(초기 측정값 포함) 각경을 측정하였다(그림. II-8-(2)).

표. II-8-(2). 성장단계별 사육 용기 크기

구분		각경크기 (mm)		
		< 7	7 ≤ ~ 11 <	11 ≤
사육용기 크기 (mm)	40 × 12	○		
	60 × 15		○	
	100 × 40			○



그림. 11-8-(1). 양배추와 칼슘을 섭취 중인 참달팽이 (좌), 각경 크기에 따라 사용된 사육 용기(우)

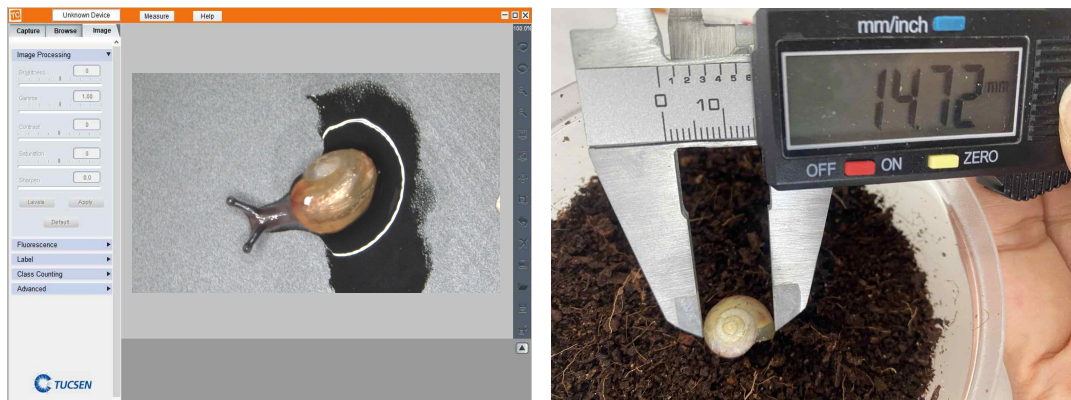


그림. 11-8-(2). 해부 현미경(좌)과 버니어 캘리퍼스(우)를 이용한 참달팽이 각경 측정

(2) 참달팽이 칼슘 종류별 성장률에 미치는 영향 검증

칼슘 종류, 급이 기간, 칼슘 종류와 급이 기간의 교호작용이 각 실험 개체별 성장 크기의 변화에 영향을 미치는지 통계적으로 검증하기 위해 반복측정분산분석(Repeated Measures ANOVA)을 수행하였다. 칼슘 종류에 따른 각 주차별 개체간 성장 크기의 정규성 여부는 Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors test for normal, Shapiro-wilk's Wtest를 적용하여 확인하였다. Statistica (Statsoft, Version 8.0)를 통계분석에 사용하였다. 분석 결과의 신뢰 수준은 95%로 설정하여 유의 수준(p -value)은 0.05 이내로 하였으며, 귀무가설 또는 대립가설의 채택 여부를 확인하였다(표. 11-8-(3)).

표. II-8-(3). 칼슘 종류, 급여 기간에 따른 귀무/대립 가설

구분	귀무가설	대립가설
칼슘 종류	칼슘 종류에 따른 성장 차이 없음	칼슘 종류에 따른 성장 차이 있음
칼슘 급여 기간	칼슘 급여 기간에 따른 성장 차이 없음	칼슘 급여 기간에 따른 성장 차이 있음
칼슘 종류와 급여 기간의 교호작용	칼슘 종류와 급여 기간이 성장에 복합적으로 작용하지 않음	칼슘 종류와 급여 기간이 성장에 복합적으로 작용함

(3) 참달팽이 칼슘 섭취 선호도 실험

멸종위기종복원센터 자체 사육시설에서 인공증식한 참달팽이 준성체(26개체, 각경 약 18mm)를 이용하여 갑오징어뼈, 굴껍데기, 계란껍데기, 산호, 중질탄산칼슘 가루 등 칼슘 5종에 대한 선호도를 확인하였다(그림. II-8-(3)). 칼슘 선호도 실험은 10주간(5~7월) 총 10회(매주 1회) 진행하였으며, 실험 1회당 7시간 동안 매 1분 간격으로 사진을 촬영하여 참달팽이가 각 칼슘제를 방문한 횟수를 측정하였다. 이중 칼슘제 위에서 1분 이상 머무르는 것이 확인된 사진만 칼슘을 섭취한 것으로 판단하였다. 1분 이상 칼슘제 위에서 또한, 칼슘에 대한 섭취 반응도를 유지하기 위해 실험 중에만 칼슘을 제공하였으며, 매 회차 실험이 종료되면 칼슘을 담은 접시를 제거하였다. 각 칼슘제는 식품의약품안전처(고시 제 2022-31호)의 식품공전 및 식품유형별기준규격에 따라 일반(조단백, 조지방 등 6종) 및 무기 성분(Ca, Na 등 5종)을 분석하여 특성을 비교하였다.

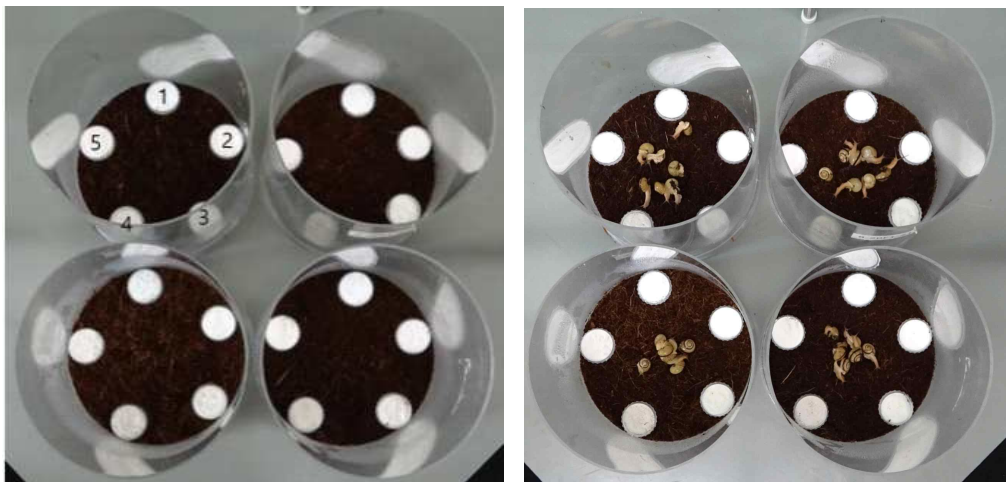


그림. II-9-(3). 칼슘 선호도 실험 (1: 중질탄산칼슘, 2: 계란껍데기, 3: 산호, 4: 굴껍데기, 5: 갑오징어뼈)

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 칼슘 공급 방법 차이에 따른 성장률 비교

40주간 칼슘을 급여한 실험군은 평균 7.2mm(9.5→16.7mm)가 성장한 반면, 미급여 대조군은 5.2mm(9.8→15.0mm) 증가하여 약 2mm의 차이를 보였다. 칼슘제 별로는 갑오징어뼈 7.6mm(9.5→17.1mm)에 서 가장 크게 성장하였으며, 굴껍데기 7.4mm(9.4→16.8mm), 산호 7.3mm(9.6→17.0mm), 계란껍데기 7.2 mm(9.2→16.3mm), 중질탄산칼슘 6.5mm(9.8→16.3mm), 미급여 5.2mm(9.8→15.0mm), 순이었다(표. II-8-(4)).

표. II-8-(4). 40주간 참달팽이 각경 성장 크기 및 표준오차

주 차	주차별 각경 크기(mm)						표준오차					
	중질 탄산칼슘	계란 껍데기	굴 껍데기	산호	갑오징 어뼈	미급여	중질 탄산칼슘	계란 껍데기	굴 껍데기	산호	갑오징어 뼈	미급여
1	9.8	9.2	9.4	9.6	9.5	9.8	0.9	0.8	0.6	0.7	0.6	0.8
2	10.3	9.7	10.0	10.1	10.0	10.1	0.9	0.8	0.6	0.8	0.6	0.8
3	10.6	10.1	10.4	10.5	10.3	10.3	1.0	0.8	0.5	0.9	0.7	0.8
4	11.0	10.6	10.7	10.9	10.8	10.4	1.1	0.9	0.6	1.0	0.8	0.8
5	11.5	11.2	11.2	11.4	11.4	10.6	1.1	1.1	0.6	1.1	1.0	0.9
6	11.6	11.4	11.4	11.7	11.6	10.7	1.1	1.0	0.8	1.1	1.0	0.8
7	11.7	11.5	11.5	11.8	11.9	10.8	1.1	0.9	0.8	1.0	0.9	0.8
8	11.9	11.7	11.6	12.0	12.1	10.8	1.3	0.9	0.6	1.0	1.0	0.7
9	12.0	11.9	11.7	12.2	12.3	10.9	1.3	0.8	0.6	0.9	1.0	0.8
10	12.0	12.0	11.7	12.2	12.5	11.0	1.3	0.8	0.6	0.9	0.9	0.9
11	12.2	12.1	11.8	12.4	12.7	11.0	1.3	0.9	0.6	0.8	0.9	0.9
12	12.3	12.3	11.9	12.6	12.8	11.2	1.3	1.0	0.7	0.8	0.9	0.9
13	12.4	12.3	12.1	12.8	12.9	11.2	1.3	1.0	0.8	0.8	0.9	0.9
14	12.6	12.4	12.2	12.9	13.0	11.3	1.2	0.9	0.7	0.7	0.9	0.9
15	12.6	12.4	12.3	13.1	13.1	11.4	1.2	0.9	0.7	0.7	0.9	0.8
16	12.6	12.4	12.4	13.1	13.2	11.4	1.2	0.8	0.7	0.7	0.9	0.8
17	12.7	12.7	12.7	13.2	13.4	11.5	1.2	0.8	0.8	0.7	0.9	0.7
18	13.0	13.2	13.1	13.6	13.7	11.9	1.2	0.9	0.8	0.6	0.9	0.8
19	13.4	13.6	13.5	13.9	14.1	12.1	1.2	0.9	0.9	0.5	0.8	0.7
20	13.7	14.0	13.8	14.3	14.4	12.4	1.2	0.9	0.8	0.5	0.9	0.7
21	13.9	14.2	14.0	14.6	14.7	12.5	1.2	1.0	0.8	0.5	1.0	0.7
22	14.1	14.5	14.2	14.7	14.9	12.6	1.1	1.0	0.7	0.5	0.9	0.7
23	14.2	14.7	14.3	14.8	15.1	12.8	1.1	1.1	0.6	0.5	0.9	0.7
24	14.3	14.7	14.3	14.8	15.1	12.8	1.1	1.1	0.6	0.5	1.0	0.7
25	14.3	14.7	14.3	14.9	15.2	12.8	1.0	1.1	0.7	0.5	0.9	0.7
26	14.3	14.7	14.3	14.9	15.2	12.8	1.0	1.1	0.7	0.4	1.0	0.7
27	14.4	14.8	14.4	15.0	15.3	13.0	1.1	1.1	0.6	0.5	0.9	0.7
28	14.7	15.1	14.8	15.3	15.6	13.3	1.2	1.1	0.4	0.6	0.7	0.6
29	15.0	15.4	15.3	15.7	16.0	13.7	1.2	1.0	0.5	0.7	0.7	0.5
30	15.3	15.7	15.8	16.1	16.3	14.0	1.3	1.0	0.6	0.7	0.8	0.5
31	15.7	15.9	16.2	16.4	16.7	14.4	1.3	0.9	0.6	0.8	0.6	0.3
32	15.9	16.1	16.5	16.7	17.0	14.7	1.3	0.8	0.7	0.8	0.4	0.3
33	16.1	16.2	16.5	16.9	17.0	14.8	1.4	0.8	0.8	0.8	0.3	0.2
34	16.2	16.3	16.8	17.0	17.1	15.0	1.4	0.9	0.7	0.8	0.3	0.3
35	16.3	16.3	16.8	17.0	17.1	15.0	1.4	0.9	0.7	0.8	0.3	0.3
36	16.3	16.3	16.8	17.0	17.1	15.0	1.4	0.9	0.7	0.8	0.3	0.3
37	16.3	16.3	16.8	17.0	17.1	15.0	1.4	0.9	0.7	0.8	0.3	0.3
38	16.3	16.3	16.8	17.0	17.1	15.0	1.4	0.9	0.7	0.8	0.3	0.3
39	16.3	16.3	16.8	17.0	17.1	15.0	1.4	0.9	0.7	0.8	0.3	0.2
40	16.3	16.3	16.8	17.0	17.1	15.0	1.4	0.9	0.7	0.8	0.3	0.2

육상 달팽이의 패각은 주로 석회질 성분으로 구성되어 있어(권과 이, 2021) 생존을 위해 칼슘을 필수적으로 섭취해야 하기 때문에 석회질이 풍부한 서식처에서 더 많은 개체들이 발견된다(Outerbridge and Sarkis, 2018). 특히, 성장 및 산란기에 많은 칼슘을 필요로 하며 칼슘이 부족한 경우 다른 달팽이나 자신의 패각을 갉아 먹기도 하여 사육 시 충분한 칼슘 급이가 필요하다. 40주간 칼슘을 급이한 참달팽이 실험군의 누적 성장률은 평균 57.3%로, 칼슘을 급이하지 않은 대조군의 42.8%보다 14.5%p 높았다. 특히, 생물에서 유래한 칼슘제(갑오징어뼈 등)를 급이한 실험군의 누적 성장률은 58.7%로 인위적으로 제조한 중질탄산칼슘 51.8%에 비해 6.9%p 높게 나타났다. 칼슘제 별로는 갑오징어뼈 59.8%를 섭취한 참달팽이 실험군이 가장 크게 성장하였으며, 굴껍데기 59.3%, 계란껍데기 58.4%, 산호 57.4%, 중질탄산칼슘 51.8%, 미금이 42.8% 순이었다(그림. II-8-(4)).

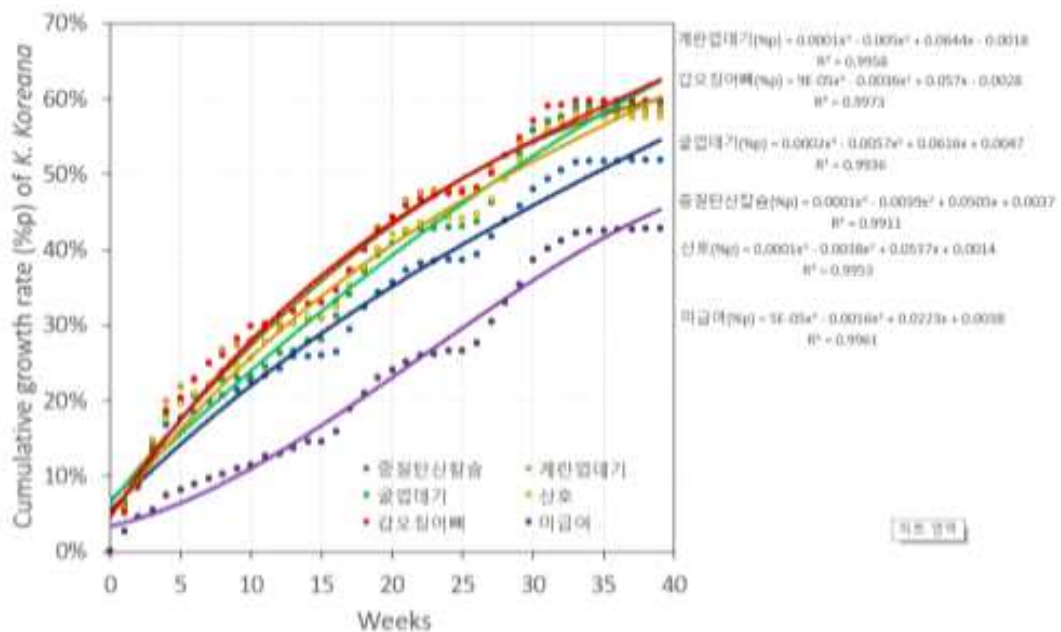


그림. II-8-(4). 칼슘 종류에 따른 참달팽이의 누적 주간 성장률(%)

생물 유래 칼슘제의 조단백질, 조섬유, 무기질(나트륨, 칼륨, 인 등)은 인위적으로 제조한 중질탄산칼슘에 비해 상대적으로 높은 수준으로 검출되었다(표. II-9-(5)). 특히, 가장 높은 성장률을 보인 갑오징어뼈는 다른 칼슘제에 비해 조단백, 조지방, 조섬유의 함유량이 가장 높았다. 이는 채소류 식단에서 부족한 필수 영양소를 칼슘제를 통해서 보충할 수 있음을 의미하며, 이는 성장에 도움을 줄 수 있음을 시사한다. 갑오징어뼈의 Na, K 성분 또한 다른 칼슘제에 비해 상대적으로 가장 높았으나, 성장률과의 연관성은 확인되지 않았다. 다만, 본연구에서는 칼슘제 성분의 비율이 참달팽이의 성장률에 미치는 영향에 대해서 심도 있게 다루지 않았으므로 향후 이와 관련된 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다.

표. II-8-(5). 5가지 칼슘제의 일반 및 무기성분 분석 결과

성분		중질탄산 칼슘	계란 껍데기	굴 껍데기	산호	갑오징어 뼈
일반	Moisture (%)	1.97	0.49	0.91	0.30	2.33
	Crude protein(g/100g)	0.01	3.33	0.61	0.09	7.49
	Crudefat(g/100g)	0.32	0.22	0.10	0.06	0.51
	Crude fiber(%)	0.74	11.51	31.58	23.65	32.89
	Carbohydrate(g/100g)	41.06	40.14	43.43	43.90	40.02
	Crude ash(%)	56.64	55.82	54.95	55.65	49.65
무기	Ca(mg/100g)	53,603.2	49,362.3	49,722.1	43,930.2	46,076.6
	Na(mg/100g)	20.85	250.76	725.47	520.50	1135.76
	K(mg/100g)	7.11	51.37	36.92	14.19	125.38
	Fe(mg/100g)	9.7	0.00	44.96	4.60	2.52
	P(mg/100g)	0.00	76.85	42.42	14.25	34.10

(2) 참달팽이 칼슘 종류별 성장률에 미치는 영향 검증

1개의 대조군(칼슘 미급여)과 5개의 실험군(칼슘 급여) 각각 4개체 씩 총 24개체를 대상으로 40주간 각경을 측정하여 확보한 표본수는 총 960개였다. 각 주차별 참달팽이의 각경 크기 측정값을 독립변수로 할 때 모든 변수에서 정규분포($p>0.20$) 하는 것을 확인하였다(표. II-8-(6)).

표. II-8-(6). Kolomogorov-Smirnov of fit test, Lilliefors test for normal, Shapiro-wilk's

Wtest를 이용한 참달팽이 각경 측정값 정규성 검토

Var.	Kolomogorov-Smirnov goodness of fit test		Lilliefors test	Shapiro-wilk's W test	
	k-s d	p-value	Lilliefors p-value	Shapiro-wilk W	p-value
1	0.12012	> 0.20	> 0.20	0.96864	0.63353
2	0.12487	> 0.20	> 0.20	0.96822	0.62323
3	0.86380	> 0.20	> 0.20	0.98271	0.94010
4	0.69840	> 0.20	> 0.20	0.98312	0.94561
5	0.10221	> 0.20	> 0.20	0.96535	0.55481
6	0.11761	> 0.20	> 0.20	0.96366	0.51617
7	0.10021	> 0.20	> 0.20	0.96097	0.45814
8	0.10120	> 0.20	> 0.20	0.96688	0.59082
9	0.11561	> 0.20	> 0.20	0.97479	0.78427
10	0.12778	> 0.20	> 0.20	0.97773	0.85063
11	0.13901	> 0.20	> 0.20	0.97746	0.84494
12	0.8438	> 0.20	> 0.20	0.97983	0.89273
13	0.10721	> 0.20	> 0.20	0.97451	0.77743
14	0.09947	> 0.20	> 0.20	0.97608	0.81415
15	0.12233	> 0.20	> 0.20	0.96755	0.60691
16	0.11817	> 0.20	> 0.20	0.96974	0.66060
17	0.10399	> 0.20	> 0.20	0.96065	0.45159
18	0.10201	> 0.20	> 0.20	0.96747	0.60505
19	0.10370	> 0.20	> 0.20	0.96920	0.64726
20	0.11418	> 0.20	> 0.20	0.96909	0.64457
21	0.10311	> 0.20	> 0.20	0.96263	0.49350
22	0.09907	> 0.20	> 0.20	0.96530	0.55369
23	0.11218	> 0.20	> 0.20	0.96121	0.46321
24	0.10702	> 0.20	> 0.20	0.96480	0.54198
25	0.09243	> 0.20	> 0.20	0.96549	0.55796
26	0.09530	> 0.20	> 0.20	0.96996	0.66595
27	0.11523	> 0.20	> 0.20	0.96571	0.56325
28	0.10646	> 0.20	> 0.20	0.97351	0.75339
29	0.09656	> 0.20	> 0.20	0.97349	0.75287
30	0.12902	> 0.20	> 0.20	0.96861	0.63282
31	0.10002	> 0.20	> 0.20	0.96011	0.44056
32	0.13684	> 0.20	> 0.20	0.95231	0.30375
33	0.12312	> 0.20	> 0.20	0.96279	0.49700
34	0.11795	> 0.20	> 0.20	0.96802	0.61839
35	0.12730	> 0.20	> 0.20	0.96692	0.59192
36	0.13379	> 0.20	> 0.20	0.96682	0.58948
37	0.13356	> 0.20	> 0.20	0.96361	0.51503
38	0.13106	> 0.20	> 0.20	0.96408	0.52562
39	0.13082	> 0.20	> 0.20	0.96252	0.49116
40	0.13052	> 0.20	> 0.20	0.96305	0.50260

반복측정분산분석(repeated measures ANOVA) 결과 칼슘 섭취 기간이 참달팽이 성장에 가장 주요한 요인으로 나타났으며($F: 1045.331, p < 0.001$), 칼슘 섭취 기간과 종류의 교호작용 또한 통계적으로 유의미한 상관성($F 3.288, p < 0.001$)을 보였다(표 II-9-(7)). 반면, 칼슘 종류의 통계적인 유의성은 다른 두 변수에 비해 상대적으로 낮았다($F 2.328, p = 0.085$). 이는 성장률 효과가 가장 적었던 중질탄산칼슘($F 3.038, p = 0.132$)의 영향에 기인한 것으로 판단되며, 그 외 생물 유래 칼슘은 대체로 통계적인 유의성($p < 0.001$)이 검증되었다(표 II-8-(8)). 이에 따라 참달팽이의 성장률 개선을 위해서는 인위적으로 제조한 중질탄산칼슘보다 생물에서 얻어진 칼슘제를 급여하는 것이 적합한 것으로 판단된다.

표. II-8-(7). 칼슘제의 종류, 급여 기간, 두 변수의 교호작용에 대한 반복측정분산분석(repeated measures ANOVA) 결과(실험군, 대조군 포함)

효과	Sum of square	F value	Mean of square	F ratio	p-value
절편	178825.9	1	178825.9	6904.050	< 0.001
칼슘 종류	301.5	5	60.3	2.328	0.085
급여 기간	4042.9	39	103.7	1045.331	< 0.001
교호작용	63.6	195	0.3	3.288	< 0.001

표. II-8-(8). 각 칼슘제와 대조군(미급여) 간의 반복측정분산분석(repeated measures ANOVA) 결과

	효과	Sum of square	F value	Mean of square	F ratio	p-value
갯오징어뼈	Intercept	57214.38	1	57214.38	3505.766	< 0.001
	Calcium type	244.38	1	244.38	14.974	0.008
	Feeding period	1230.64	39	31.55	240.184	< 0.001
	Interaction effect	39.82	39	1.02	7.772	< 0.001
굴껍데기	Intercept	54918.48	1	54918.48	3422.608	< 0.001
	Calcium type	116.30	1	116.30	7.248	0.036
	Feeding period	1215.71	39	31.17	480.851	< 0.001
	Interaction effect	26.64	39	0.68	10.535	< 0.001
산호	Intercept	56565.17	1	56565.17	3240.387	< 0.001
	Calcium type	203.68	1	203.68	11.668	0.014
	Feeding period	1179.38	39	30.24	397.037	< 0.001
	Interaction effect	28.52	39	0.73	9.600	< 0.001
계란껍데기	Intercept	54907.60	1	54907.60	2342.270	< 0.001
	Calcium type	115.80	4	115.80	4.940	0.068
	Feeding period	1136.84	39	29.15	360.308	< 0.001
	Interaction effect	29.25	39	0.75	9.271	< 0.001
중질탄산칼슘	Intercept	54695.86	1	54695.86	1563.405	< 0.001
	Calcium type	106.27	1	106.27	3.038	0.132
	Feeding period	1026.24	39	26.31	269.726	< 0.001
	Interaction effect	9.47	39	0.24	2.490	0.000014

(3) 참달팽이 칼슘 섭취 선호도 실험

10회에 걸쳐 참달팽이의 칼슘 섭취 선호도를 실험한 결과, 1회 이상 칼슘제를 섭취한 것으로 확인된 표본의 개수는 총 100개였다. 이 중 1회 실험(7시간)에서 한 개체가 여러 칼슘제를 중복으로 섭취한 경우를 모두 포함한 총 섭취 횟수는 195회였다. 최종적으로 굴껍데기에서 59회로 가장 높은 섭취 빈도를 보였으며, 계란껍데기 46회, 산호 33회, 중질탄산칼슘 32회, 갑오징어뼈 25회 순이었다(표. II-8-(9)). 굴껍데기를 섭취한 참달팽이의 성장률은 59.3%로 성장률이 가장 컸던 갑오징어뼈 59.8%에 비해 약 0.5%p 차이가 났으나 선호도에서는 약 2배 높은 수준이었다. 성장률과 선호도 모두 우수하게 평가된 굴껍데기를 우선 급이하는 것이 참달팽이 성장률 개선에 효과적일 것으로 사료되며, 개체별로 칼슘 섭취 반응이 낮은 경우 칼슘제의 선호도를 고려하여 다른 생물 유래 칼슘제로 변경하는 것이 적절할 것으로 판단된다.

표. II-8-(9). 참달팽이의 칼슘제 종류에 따른 실험 차수별 선호도

실험 차수	중질탄산칼슘	계란껍데기	굴껍데기	산호	갑오징어뼈
1	0	5	5	3	3
2	3	5	4	3	0
3	2	5	5	1	4
4	3	2	5	3	0
5	4	5	7	4	2
6	3	6	1	4	2
7	5	3	6	4	6
8	5	5	9	5	2
9	5	6	8	4	2
10	2	4	9	2	4
합계	32	46	59	33	25
평균±표준오차	3±0.5	5±0.4	6±0.7	3±0.3	3±0.6

* 칼슘제에 1분 이상 머문 개체만 방문 횟수로 기록하였음

III. 멸종위기종 원종 확보 및 사육 조건 연구

1. 한강납줄개 원종 도입

가. 서론

한강납줄개의 완전 양식 기술 확보를 위한 최적 사육조건 파악을 위하여 한강납줄개의 주요 서식지인 남한강 수계(이리천, 흑천), 북한강 수계(상천천) 일대에 서식하는 한강납줄개 포획 및 수온, 수질, 하상구조, 유속 등 서식지 환경을 측정하였으며, 이를 기반으로 최적 사육조건을 설정하였다. 또한 서식지에서 포획한 한강납줄개의 주요 산란숙주인 담수성 조개류를 합사하여 성숙 조건을 파악하고자 하였다.

나. 연구 내용 및 방법

(1) 한강납줄개 원종 확보

4~7월경 한강유역 서식지(흑천)에서 투망, 족대 그리고 삼각망을 이용하여 원종 확보를 시도하였으며, 한강납줄개 서식지 수온 및 일조량 파악을 위한 HOBO 데이터 로거를 설치하였다.



그림 III-1-(1). 한강납줄개 서식지 전경(좌), 한강납줄개 원종(중), 한강납줄개 주요 출현지(우)

(2) 한강납줄개 원종 사육시설 순치 및 성숙 유도

한강유역일대(이리천, 성천천, 흑천)에서 포획한 원종은 수조에 도입하기 전 100ppm OTC로 2일간 약욕을 진행한 후 사각수조(1.0×0.45×0.4m, 180L)에 도입하였다. 수조 도입 직후 적응기간 동안 개체에 가해지는 스트레스를 최소화하기 위해 첫 1일간 암막천을 이용하여 암실조건을 유지해 주었다.

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 한강납줄개 원종 확보

한강납줄개 서식지인 한강 유역 일대(흑천, 성천천, 이리천)에서 한강납줄개 증식기술개발 연구를 위한 원종 확보 후 약육 수조를 거쳐 사육 수조 도입 완료하였으며 23℃~25℃에서 가장 먹이 반응 및 활동성이 높음을 확인하였다.

(2) 한강납줄개 원종 사육시설 순치 및 성숙 유도

산란 숙주 합사를 통한 인공 성숙 유도 실험 진행 중이며 산란 숙주(말조개) 도입 7일 후 수컷 개체가 숙주 주변을 지키는 영역권행동을 보이기 시작하였다.



그림 III-1-(2). 산란 숙주 합사 1일 후(좌), 산란 숙주 합사 7일 후(우)

2. 수원청개구리, 비바리뱀 원종 도입

가. 서론

우리나라에 서식하는 청개구리류에는 청개구리(*Dryophytes japonica*), 수원청개구리(*Dryophytes suweonensis*), 노랑배청개구리(*Dryophytes flaviventris*)가 있다. 청개구리는 우리나라를 포함한 동북아시아에 널리 서식하고 있으며 IUCN 적색 목록에 least concern(LC) 등급으로 지정되어있다(Kuzmin et al., 2017). 반면 청개구리와 자매종인 수원청개구리는 우리나라 고유종으로 서식지 파편화, 근연종과의 경쟁, 교잡종 발생 등과 같은 원인들로 인해 멸종위기에 처해있다(Borzee, 2018). 따라서 환경부에서는 수원청개구리를 멸종위기 야생생물 I 급으로 지정했으며 IUCN 적색목록집에 Endangered(EN) 등급으로 지정되어 있다(MOE, 2012).

멸종위기 원인 중 하나인 잡종화는 외교배 억압(outbreeding depression) 또는 유전적 동화(genetic assimilation)를 통해 멸종위기 야생생물에 위협을 미칠 수 있다. 이는 종간 유전자 흐름이 직간접적인 방법을 통해 생물다양성을 감소시키거나 극단적인 경우에는 종을 멸종시킬 수 있기 때문에 연구자들 사이에서 잡종화에 대한 부정적인 견해가 다수이다(Rieseberg and Carney, 1998; Levin, 2002). 수원청개구리와 청개구리는 서식지를 공유하는 동서종으로 교잡종이 발생하고 있으며, 이 두 종의 잡종화가 수원청개구리의 멸종 원인으로서 영향을 미치고 있다는 결과가 있다(Borzee et al., 2020; Roh et al., 2014).

양서류의 생물다양성을 보전하기 위해서는 인공번식 후 방류하는 방법을 포함한 간섭주의의 보전 정책이 권장된다(Gascon et al., 2007). 멸종위기에 처한 양서류에서 유전적으로 대표하는 집단을 포획한 후에 개체를 방류함으로써 개체군을 유지하고 종이 멸종하는데 도움을 주는 인공번식 후 방류 프로그램이 전 세계적으로 수립되어있다. 다수 프로그램들이 높은 성공률을 보이며 재도입에 성공했다는 결과가 보고되었다(Silla and Byrne, 2019). 따라서 수원청개구리를 복원하기 위해 인공번식 후 재도입 프로그램을 적용시킬 예정이며, 잡종화가 수원청개구리의 멸종 원인 중 하나이기 때문에 수원청개구리의 원종을 확보하여 인공번식을 수행할 예정이다.

나. 연구 내용 및 방법

(1) 수원청개구리 원종 도입

(가) 포획 방법

수원청개구리 원종 도입을 위하여 4월부터 6월까지 청개구리류의 활동시간대인 일몰 후에 수원청개구리가 분포하고 있다고 알려져 있는 전라북도(익산시, 완주군), 충청남도(아산시), 충청북도(충주시), 경기도(평택시) 지역에서 수원청개구리로 추정되는 개체들을 포획하였다(그림. III-2-(1)).

포획 방법은 수원청개구리가 주로 서식하는 곳이며 청개구리와 공동 서식지로 사용하고 있는 논 습지의 논둑을 걸어다니면서 울음소리를 내는 개체를 포획하였고 청개구리와 수원청개구리를 Borzee et al., (2013)에 따라 형태적으로 구분한 뒤 수원청개구리로 추정되는 개체들을 도입하였다.



그림. III-2-(1). 포획한 수원청개구리

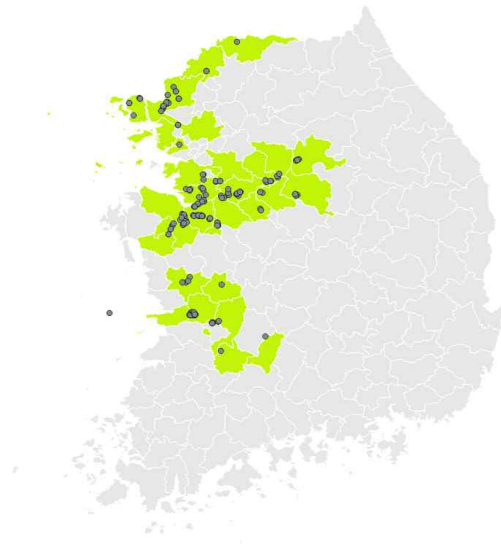


그림. III-2-(2). 수원청개구리 포획 지역

(나) 유전자 분석

수원청개구리와 청개구리의 교잡종이 존재하기 때문에 확실한 원종을 도입하기 위해서 원종 확인을 위해 유전자 분석을 수행하였다 (Borzee et al., 2020). 유전자 추출은 비침습적 방법으로 멸균면봉을 개구리 입에 30초에서 1분간 물린 뒤, 구강상피세포를 채취하였다(그림. III-2-(2)).

수원청개구리의 원종을 확인하기 위해 nuclear DNA(nuDNA) 영역인 POMC, SIAH, RAG1, C-MYC를 분석하였고 mitochondrial 12S rDNA 영역을 대상으로 분석하였다. nuDNA를 이용하여 STRUCTURE 분석 결과, 청개구리와 2종 중 해당하는 Q 값이 0.995 이상일 경우 해당 종으로 구분하였으며 그 외에는 잡종으로 추정하였다.



그림. III-2-(3). 개구리로부터 구강상피세포 추출

(2) 수원청개구리 최적 사육조건 연구

(가) 수원청개구리 사육장 제작

포획한 개체들은 실내에 위치한 30 × 30 × 30 cm 크기의 앞쪽으로 열리는 문이 있는 유리로 된 테라리움(PT2600, Exo-terra, Hagen, Montreal, Canada)에 개체들을 사육하였다. 테라리움 내부는 웅덩이를 조성하였고 웅덩이의 수질 정화를 위해 측면 여과기를 설치하였다. 그 외 부분에는 마사토를 깔 후 그 위에 코코피트를 덮어놓아 약 10 cm의 높이로 육지를 조성하였다(그림. III-2-()). 한 사육장 당 같은 지역에서 포획한 4~5개체 만을 사육하였다. 먹이는 칼슘과 함께 귀뚜라미를 일주일에 두 번씩 급여하였으며, 사육장 내 온도 및 습도는 17~26℃, 55~82%로 설정하였다(표. III-2-(1)).

또한, 자연 번식을 위해 인공강우 형태의 번식장을 제작하였다. 한 번식장은 16:00부터 20:30까지 위에서 물을 떨어뜨리게 하였고 다른 한 번식장은 12:00~2:00, 20:00~22:00 까지 떨어뜨리게 하였다(<https://www.joshsfrogs.com/catalog/blog/2013/10/how-to-make-a-rain-chamber/> 참고). 번식을 위해 스킨답서스 식물을 식재하였고 광주기는 평소 일출 및 일몰시간에 맞추었다(그림. III-2-(4, 5)).

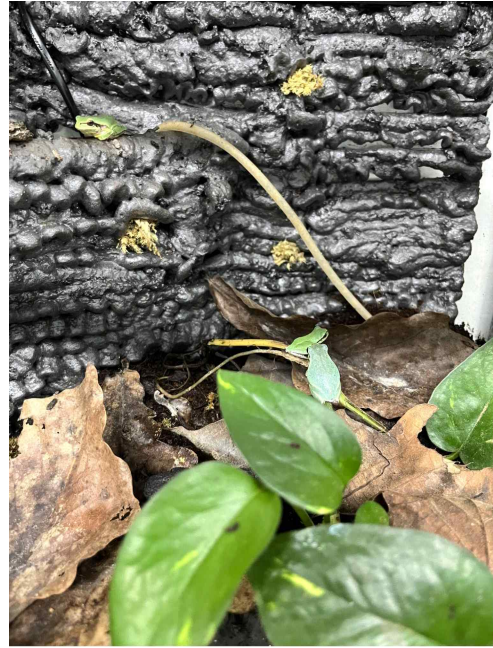
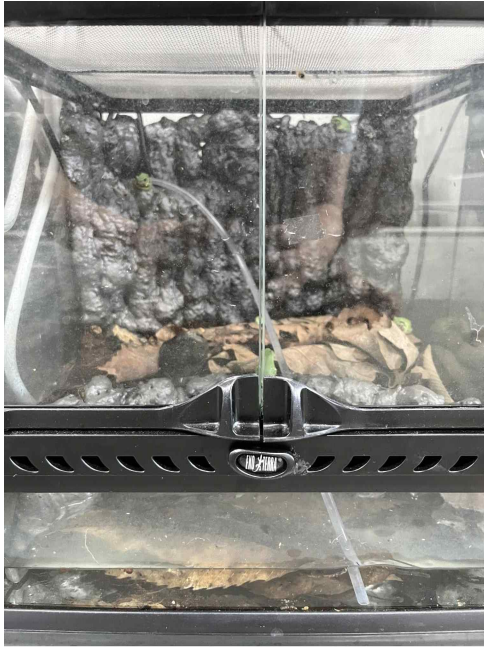


그림. III-2-(4). 수원청개구리 사육장(좌: 외부, 우: 내부)

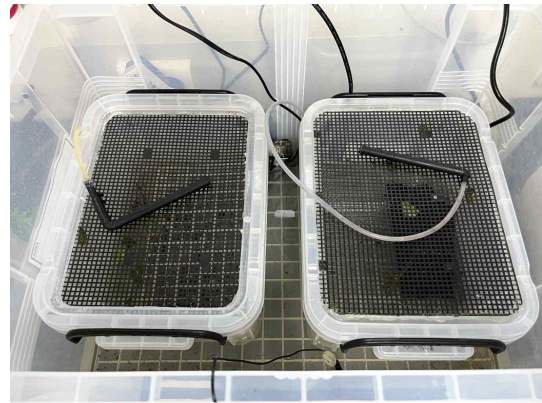
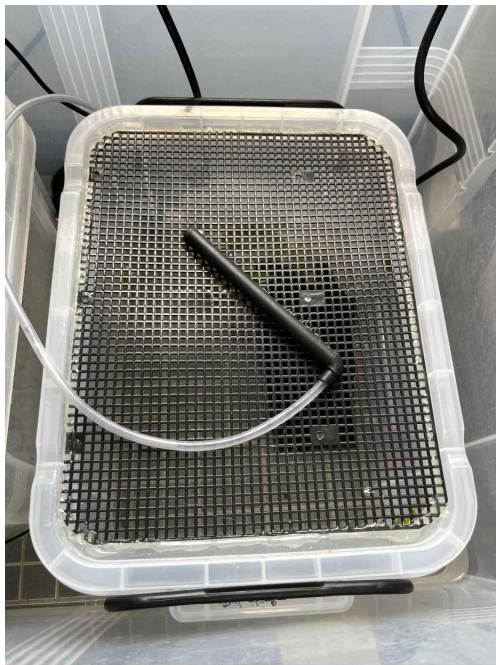


그림. III-2-(5). 수원청개구리 번식장

표. III-2-(1). 수원청개구리 사육실 온·습도(평균)

월	온도 (°C)	습도 (%)
4월	24.0	68.4
5월	21.6	64.1
6월	25.7	64.8
7월	24.9	81.7
8월	24.3	81.4
9월	24.4	63.1
10월	22.3	55.4
11월	17.6	54.8

(3) 비바리뱀 원종 확보

제주도 내 국한하여 서식하는 비바리뱀을 확보하기 위해 외부조사원을 운용하여 현장조사를 수행하였다. 비바리뱀은 4~5월경 짝짓기를 하고, 6~8월경 알을 낳아 번식하는 것으로 알려져 이를 참고하여 자연상태의 비바리뱀 원종 확보를 하고자 4~10월까지 현지조사를 통해 원종확보 및 도입을 하였다. 자연상태의 비바리뱀 도입을 통해 외부형태특징, 연령, 짝짓기 및 산란, 부화기간 등 조사하여 증식 매뉴얼 작성에 활용하기 위한 토대를 마련하고자 하였다. 비바리뱀의 주요 서식지 환경과 미소서식지 유형 및 특성을 파악하기 위해 제주도 내 비바리뱀 자연서식지의 기온, 강수량, 습도, 일조량 등 주요 환경요인에 대한 자료를 수집하였다. 문헌자료 및 기존에 기록된 비바리뱀의 출현지점의 GPS 자료를 이용하여 GIS 분석을 통한 주요 서식지 환경 특성, 입지조건 등 분석을 수행하였다.



그림. III-2-(6). 비바리뱀 원종 확보를 위한 현장조사

도입방법은 외부조사원과 2인1조로 구성하여 직접포획 및 트랩을 이용한 포획을 시도하였다. 포획에 사용된 트랩은 그물통발과 철제트랩을 이용하여 포획시도를 하였다. 포획의 효율성을 높이기 위해 뱀유인제를 별도로 트랩내에 설치하여 포획률을 높이하고자 하였다.



그림. III-2-(7). 비바리뱀 포획에 사용된 트랩(좌: 그물트랩, 우: 철제트랩)

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 수원청개구리 원종 도입

(가) 포획 결과

4월 수원청개구리 원종 확보를 위한 조사 결과, 수원청개구리로 추정되는 개체를 전북 익산시에서는 10개체 포획하였으며, 완주군에서는 2개체를 포획하였다. 충북 충주에서는 3개체 및 아산에서는 1개체를 포획하였다. 유전자 분석 결과, 수원청개구리 원종은 암컷 5개체, 수컷 8개체로 총 13개체로 확인되었으며, 암컷의 SVL(Snout-vent lengths, 주둥이부터 항문까지의 길이)은 $25.8 \pm 2.1\text{mm}$ 였으며, 수컷은 $26.01 \pm 2.26\text{mm}$ 로 나타났고, 몸무게는 암컷에서 $1.48 \pm 0.42\text{g}$ 으로 나타났고 수컷은 $1.53 \pm 0.45\text{g}$ 으로 확인되었다.

5월에는 경기도 평택시 및 수원시, 충북 충주시, 충남 아산시에서 조사를 수행하였으며, 수원청개구리로 추정되는 개체를 평택시에서 7개체, 충주에서 14개체, 아산에서 5개체, 완주군에서 11개체를 포획하였다. 그 중 수원청개구리

원종은 암컷 11개체, 수컷 24개체로 총 35개체로 확인되었다. 수원청개구리 원종 암컷의 SVL은 $26.97 \pm 1.52\text{mm}$, 수컷은 $27.15 \pm 2.34\text{mm}$ 로 나타났고, 암컷의 무게는 $1.82 \pm 0.43\text{g}$, 수컷의 무게는 $1.59 \pm 0.38\text{g}$ 으로 나타났다.

6월에는 전북 익산시 경기도 수원시, 파주시 및 연천군에서 조사를 수행하였고, 수원청개구리로 추정되는 개체를 익산시에서 2개체 확보하였다. 파주시에서는 확인이 안 되었고 연천군에서는 울음소리로는 확인되었으나 포획하지 못하였다. 5월에서 6월까지 경기도 수원시에서 조사를 수행하였으나 수원청개구리로 추정되는 개체는 확인하지 못하였다. 수원청개구리 원종은 모두 수컷으로 2개체로 확인되었으며, 길이는 $27.99 \pm 0.02\text{mm}$, 몸무게는 $1.75 \pm 0.18\text{g}$ 으로 나타났다. 모든 값은 평균값과 표준편차로 나타내었다.

표. III-2-(2). 수원청개구리 원종 크기 측정 (평균±표준편차)

월 (암, 수 개체수)	SVL (Snout-vent lengths) (mm)		BW (Body weights) (g)	
	암	수	암	수
4월 (암 = 5, 수 = 8)	25.8 ± 2.1	26.01 ± 2.26	1.48 ± 0.42	1.53 ± 0.45
5월 (암 = 11, 수 = 24)	26.97 ± 1.52	27.15 ± 2.34	1.82 ± 0.43	1.59 ± 0.38
6월 (수 = 2)	-	27.99 ± 0.02	-	27.99 ± 0.02

(나) 유전자 분석

포획한 청개구리류의 유전자를 분석한 결과, 청개구리 원종 4개체, 교잡종 16개체, 수원청개구리 원종 50개체를 확보하였다.

표. III-2-(3). STRUCTURE 분석을 통한 청개구리류 동정 결과

ID	STRUCTURE results using nucleotide DNA		Results of mitochondrial DNA	Results of species identification
	<i>D. suweonensis</i>	<i>D. japonicus</i>		
ASMW0413	0.994	0.006	DS	HY
ASMW0517_01	0.997	0.003	DS	DS
ASMW0517_02	0.997	0.003	DS	DS
ASMW0517_03	0.996	0.004	DS	DS
ASMW0517_04	0.997	0.003	DS	DS
ASMW0517_05	0.773	0.227	DS	HY
ASMW0517_06	0.998	0.002	DS	DS

ID	STRUCTURE results using nucleotide DNA		Results of mitochondrial DNA	Results of species identification
	<i>D. suweonensis</i>	<i>D. japonicus</i>		
CJJN0518_01	0.997	0.003	DS	DS
CJJN0518_02	0.998	0.002	DS	DS
CJJN0518_03	0.997	0.003	DS	DS
CJJN0518_04	0.997	0.003	DS	DS
CJJN0518_05	0.996	0.004	DS	DS
CJJN0518_06	0.997	0.003	DS	DS
CJJN0518_07	0.997	0.003	DS	DS
CJJN0518_08	0.996	0.004	DS	DS
CJJN0518_09	0.997	0.003	DS	DS
CJJN0518_10	0.997	0.003	DS	DS
CJJN0518_11	0.997	0.003	DS	DS
CJJN0518_12	0.997	0.003	DS	DS
CJJN0518_14	0.995	0.005	DS	DS
CJJR0414_01	0.997	0.003	DS	DS
CJJR0414_02	0.997	0.003	DS	DS
CJJR0414_03	0.997	0.003	DS	DS
ISSG0414_01	0.995	0.005	DS	DS
ISSG0414_02	0.996	0.004	DS	DS
ISSG0414_03	0.814	0.186	DS	HY
ISSG0414_04	0.811	0.189	DS	HY
ISSG0414_05	0.997	0.003	DS	DS
ISSG0414_07	0.998	0.002	DS	DS
ISSG0414_08	0.998	0.002	DS	DS
ISSG0414_09	0.995	0.005	DS	DS
ISSG0414_10	0.997	0.003	DS	DS
ISSG0516_01	0.996	0.004	DS	DS
ISSG0516_02	0.996	0.004	DS	DS
ISSG0516_03	0.978	0.022	DS	HY
ISSG0516_04	0.99	0.01	DS	HY
ISSG0516_05	0.994	0.006	DS	HY
ISSG0516_06	0.996	0.004	DS	DS
ISSG0516_07	0.982	0.018	DS	HY
ISSG0516_08	0.995	0.005	DS	DS
ISSG0516_09	0.991	0.009	DS	HY
ISSG0516_10	0.996	0.004	DS	DS
ISSG0516_11	0.995	0.005	DS	DS
PTCN0518_01	0.995	0.005	DS	DS
PTCN0518_02	0.997	0.003	DS	DS
PTCN0518_03	0.997	0.003	DS	DS
PTCN0518_04	0.995	0.005	DS	DS
PTCN0518_06	0.996	0.004	DS	DS
PTCN0518_07	0.995	0.005	DS	DS
PTCN0518_08	0.994	0.006	DS	HY

ID	STRUCTURE results using nucleotide DNA		Results of mitochondrial DNA	Results of species identification
	<i>D. suweonensis</i>	<i>D. japonicus</i>		
SWPL01	0.949	0.051	DJ	HY
SWPL02	0.201	0.799	DJ	HY
SWPL03	0.004	0.996	DJ	DJ
SWPL04	0.413	0.587	DJ	HY
SWPL05	0.742	0.258	DJ	HY
SWPL06	0.005	0.995	DJ	DJ
SWPL07	0.47	0.53	DJ	HY
WJBD0412_01	0.997	0.003	DS	DS
WJBD0412_02	0.997	0.003	DS	DS
WJGC0516_01	0.003	0.997	DJ	DJ
WJGC0516_02	0.004	0.996	DJ	DJ
WJGC0516_03	0.995	0.005	DS	DS
WJGC0516_04	0.997	0.003	DS	DS
WJGC0516_05	0.998	0.002	DS	DS
WJHY0518_01	0.997	0.003	DS	DS
WJHY0518_02	0.997	0.003	DS	DS
WJHY0518_03	0.993	0.007	DS	HY
WJHY0518_04	0.997	0.003	DS	DS
WJHY0518_05	0.995	0.005	DS	DS
WJHY0518_06	0.997	0.003	DS	DS

* DS = 수원청개구리, DJ = 청개구리, HY = 교잡

(2) 수원청개구리 최적 사육조건 연구

번식장이 아닌 사육장 내에서 사육하는 일부 개체 중 번식을 하기 전에 나타나는 행동인 포접 행동과 울음주머니를 부풀린 개체가 일부 있었으나 번식을 하진 않았다. 사육장에서의 개체들은 잘 적응하였으며, 본 연구 목적은 증식·복원이므로 추후 번식장 내의 환경 조건을 새로 조성하여 번식 실험을 재수행할 예정이다.

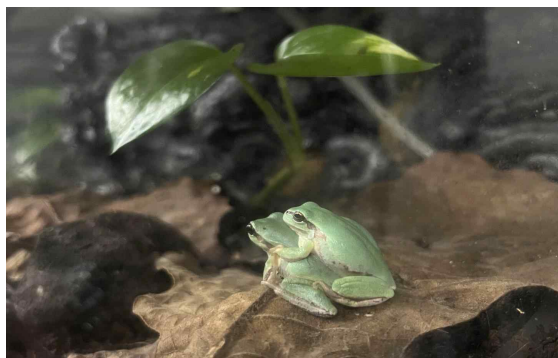


그림. III-2-(8). 사육장 내 포접 개체

(3) 비바리뱀 원종 확보

비바리뱀 활동시기를 고려하여 총 4차에 걸쳐 직접포획 조사를 수행하고 4~10월까지 5지역 20곳에 트랩을 설치하였다. 포획트랩이 설치된 지점은 기존에 비바리뱀 출현이 확인된 장소에 설치를 하였다. 포획 결과 뱀유인제를 활용한 그물트랩에서 쇠살모사 1개체가 포획되었지만, 비바리뱀은 출현하지 않았다.

비바리뱀은 제주도에 한정적으로 서식하는 우리나라 멸종위기 파충류종으로 개체가 작고, 행동이 빨라 직접 포획은 비바리뱀이 은신할 수 있는 돌틈이나 고사목틈 등을 직접 확인하는 방법만 있어 포획하는데 매우 어려움이 있다. 또한, 연구를 수행하고자하는 곳(경북 영양군)에서 비바리뱀 서식지(제주도)까지 이동하기에 시간, 비용, 인력의 소모가 크기에 효율적으로 연구를 수행할 수 있는 방안이 먼저 필요하다고 판단된다. 향후 비바리뱀 포획을 위해 제주도 현지에서 연구를 수행할 수 있는 방안을 제시하여 반영이 될 수 있다면 효율적인 비바리뱀 복원 연구를 수행할 수 있다고 판단된다.



그림. III-2-(9). 트랩에 포획된 쇠살모사

3. 소똥구리 몽골개체군 도입

가. 서론

소똥구리는 환경, 경제, 문화적 측면에서 다양한 가치를 지닌 대표적인 곤충이다. 하지만, 국내에서는 1970년 이후로 발견기록이 없어 지역절멸로 추정되고 있으며 환경부에서는 멸종위기 야생생물 II급으로 지정하여 보호하고 있다. 현재는 「멸종위기 야생생물 보전 종합계획(’18~’27)」에 따라 우선복원 대상종으로 지정하여 소똥구리 복원연구를 수행하고 있다.

소똥구리의 지속적이고 건강한 복원을 위해서는 유효개체군을 확보하고 유전적 다양성 증대를 위한 지속적인 모개체군 도입이 필요하다. 이전까지는 소똥구리를 ‘수입금지품’으로서 도입해왔기 때문에 복원 연구사업을 수행하는데 있어 수입금지품 관리에 관한 법적 규정은 장애물로서 작용해 왔으나, 연구진의 노력에 의해 소똥구리가 ‘수입금지품’에서 제외될 수 있었다. 본 연구에서는 최초로 ‘일반수입품’으로서 소똥구리를 도입함으로써 몽골과 국내에서 요구되는 법적·행정적 절차를 확립하고, 몽골 현지의 소똥구리 서식환경에 대해 조사하고자 한다.

나. 연구 내용 및 방법

(1) 원종 도입을 위한 법적·행정 절차

(가) 원종 도입 및 공동연구를 위한 MoU 체결

국립생태원과 몽골국립대학교 간 업무협약을 통해 멸종위기종 도입 및 복원 등의 생물다양성 보존을 위한 연구 협력체계를 구축하였다. 이를 통해 업무협약서를 몽골 검역당국에 제출함으로써 가축 관련 질병의 비발생 검증 문서를 발급받았다.

MEMORANDUM OF UNDERSTANDING
BETWEEN NATIONAL INSTITUTE OF ECOLOGY
AND NATIONAL UNIVERSITY OF MONGOLIA

- Parties.** This Memorandum of Understanding (hereinafter referred to as "MoU") is made and entered into by and between National Institute of Ecology (hereinafter referred to as "NIE"), whose address is (13657) 1210, Gungang-ro, Masco-myeon, Secheon-gun, Chungcheongnam-do, Republic of Korea and National University of Mongolia (hereinafter referred to as "NUM"), whose address is (14201) Bk Sarguulin Gudanj-1, Ulaanbaatar, Mongolia.
NIE and NUM shall be collectively referred to as the "Parties" and individually as the "Party".
- Purpose.** The purpose of this MoU is to promote the biodiversity conservation and research transboundary environmental issue in Northeast Asia and strengthen the amity between the Republic of Korea and Mongolia.
- Forms of Co-operation.** Within such fields as are mutually acceptable for the Parties, the following forms of co-operation, amongst others, may be pursued hereunder:
 - Exchange of researchers and scientific experts
 - Joint research activities on transboundary environmental and biodiversity issues including yellow dust and restoration of endangered species
 - Establishment of joint research stations
 - Joint advocacy and education activities
 - Knowledge exchange and capacity building in ecological management and conservation
- Specific Co-operation Projects.** Specific co-operation projects, for instance within such fields as described in section 3 above, must be negotiated separately between the Parties and are in each specific case to be established in separate written forms, stating the respective rights and obligations of the Parties. In case of any ambiguity or conflict between the terms and conditions of this MoU and those of a separate agreement as mentioned above, the terms and conditions of each separate agreement shall prevail.
- Financial Arrangements & Provisions.** Both Parties understand that all financial arrangements between the Parties have to be further negotiated and mutually agreed, and will depend on the availability of funds. Both Parties may seek financing of joint activities from internal and external sources available to them.

The costs of any activities or programs to be carried out or done under the framework of the MoU shall be agreed in consultation with the Parties in a separate legally binding agreement prior to commencement of the respective program.

- Intellectual Property Rights.** Each party will respect each other's intellectual property. The treatment of all innovative products (technology, processes, etc.) and publications resulting from the implementation of this MoU will be addressed in separate legally binding agreements on fair and reasonable terms proportional to the contribution of collaborating Parties.
- General Coordinators.** Each Party shall designate an administrative office to oversee and facilitate the implementation of any agreements arising out of this MoU. These offices are:

For National Institute of Ecology: Ecological Adaptation Research Dept. E-mail: geotop@nie.n.kr Tel: +82 941 959 9679	For National University of Mongolia: Administration and Human Resource Dept. E-mail: shojin@num.edu.mn Tel: +976 77207730 - 1113
--	---
- Liability.** Except for loss or damages caused through gross negligence or intent, the Parties shall have no liability to each other hereunder.
- Legal Relationship.** This MoU shall be construed as a statement of purpose to promote a genuine and mutually beneficial collaboration between the Parties. Nothing in this MoU shall create any legal relationship between the Parties.
- Term of MoU.** This MoU will be effective from the date of the last signature hereto and will remain in force for a time period of five (5) years, with a possibility for renewal at the end of the five-year period, subject to the Parties' written agreement. Either Party may terminate this MoU by giving six (6) months' notice in writing to the other Party.
- Signatures.** In witness whereof, the Parties to this MoU through their duly authorized representatives have executed this MoU on the dates set out below, and certify that they have read, understood, and agreed to the terms and conditions of this MoU as set forth herein.

This MoU has been drawn up in two (2) original copies in the English language, each Party receiving one duly signed copy hereof.

Signed on behalf of
National Institute of Ecology
Date: July 26, 2022

De-Soon Cho
President
National Institute of Ecology

Signed on behalf of
National University of Mongolia
Date: July 26, 2022

B. Dakhnyam
Acting President
National University of Mongolia

그림. III-3-(1). 국립생태원-몽골국립대학교 간 MoU 체결

(나) 몽골의 법적·행정 절차

소통구리 도입을 위해 몽골에서 요구되는 법적·행정 절차는 아래와 같다.

- 채집지역의 지방청(Local district office)으로부터 채집허가 승인
- 환경관광부(Ministry of Environment and Tourism)의 포획 및 반출허가 승인
- 몽골상업회의소(Mongolian National Chamber of Commerce and Industry)의 증명서 취득
- 관세청(Customs General Administration of Mongolia)의 통관 및 식물검역 증명서 취득
- 채집 지역의 가축관련 질병※ 비발생 검증자료 증빙

※ 병원체(9종): 수포성구내염, 아프리카마역, 비저, 탄저, 말전염성빈혈, 말바이러스성동맥염, 말전염성자궁염, 가성피저, 선역

(다) 법적·행정 절차

소통구리 도입을 위해 국내에서 요구되는 법적·행정 절차는 아래와 같다.

- 지방환경청의 멸종위기 야생생물 수입 및 보관허가 승인
- 수입한 해당 공항검역소에서 식물검역대상물품 수입신고 및 검역신청
- 농림축산검역본부 고시 제2018-17호 '금지품에서 제외되는 해충의 규정에 맞는 허가서류 증빙

- 검역 통과 후 수입통관 신청



그림. III-3-(2). 소똥구리 도입을 위한 법적·행정적 절차

(2) 소똥구리 원종 확보 및 도입

2022년 08월 11일 ~ 2022년 08월 12일까지 몽골의 Durnogobi Aimag과 Omnogobi Aimag 주변 4곳에서 가축의 분변에서 활동 중인 소똥구리를 육안으로 확인하여 직접 채집하였다. 채집한 개체는 플라스틱케이지에 보관하여 몽골대학교의 실험실로 이동했으며, 검역과정을 준비하기 위해 현미경으로 확인하며 응애 등의 잡충을 제거했다.

표. III-3-(1). 소똥구리 채집지

번호	지역	GPS 좌표
1	22km Westsouth of Mandalgovi, Durnogobi Aimag	45°40'15.3"N 106°00'08.2"E
2	10km North of Khuld, Durnogobi Aimag	45°18'09.81"N 105°37'02.66"E
3	9km South of Tsogt-ovoo, Omnogobi Aimag	44°21'18.26"N 105°15'26.49"E
4	23km Northeast of Dalanzadgad, Omnogobi Aimag	43°21'12.72"N 104°39'42.2"E

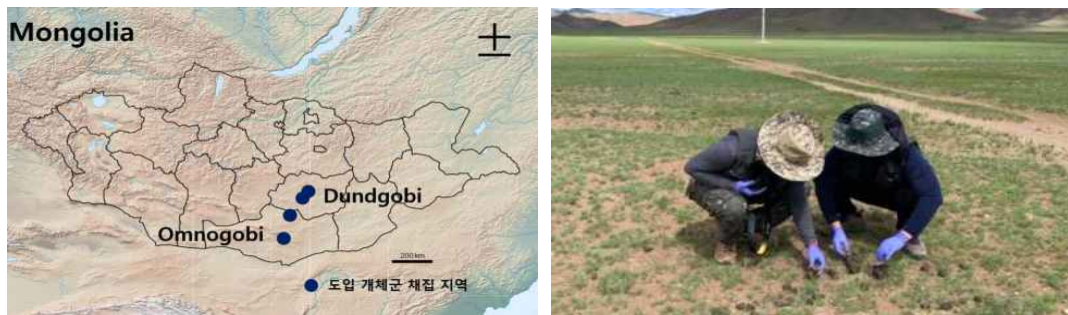


그림. III-3-(3). 소똥구리 채집지(좌), 소똥구리 채집하는 모습(우)

(3) 몽골 내 소똥구리 서식환경 조사

2022년 06월 16일 ~ 07월 01일, 08월 11일 ~ 08월 12일, 두 차례에 걸쳐 몽골 내 Durnogobi Aimag, Omnogobi Aimag, Khövsgöl Aimag, Bulgan Aimag 주변의 소똥구리 서식지 6곳에서 온도, 습도, 고도, 날씨, 가축 종류 및 소똥구리 개체수를 조사하였다.

표. III-3-(2). 소똥구리 서식환경 조사지

번호	지역	GPS 좌표
1	22km Westsouth of Mandalgovi, Durnogobi Aimag	45°40'15.3"N 106°00'08.2"E
2	10km North of Khuld, Durnogobi Aimag	45°18'09.81"N 105°37'02.66"E
3	9km South of Tsogt-ovoo, Omnogobi Aimag	44°21'18.26"N 105°15'26.49"E
4	23km Northeast of Dalanzadgad, Omnogobi Aimag	43°21'12.72"N 104°39'42.2"E
5	5km East of Ikh-Uul, Khövsgöl Aimag	49°27'32.6"N 101°32'20.8"E
6	Orkhon, Bulgan Aimag	48°37'10.83"N 103°32'30.12"E

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 소똥구리 원종 도입

몽골에서 채집된 소똥구리 230개체는 인천공항에서 검역과 수입통관을 마치고 2022년 8월 18일 경북 영양군에 위치한 멸종위기종복원센터로 차량을 통해 도착했다. 아이스박스 안에서 긴 시간 동안 먹이없이 저온 상태로 보관되었기 때문에, 힘이 없는 개체들이 있었으나 항온항습실에서 개체군 안정화 과정(18℃~27℃, 5파장 형광등=14:10(L:D), 250W 적외선등=10시~15시(30분 단위))을 통해 다시 활력을 찾게 되었다. 차후의 도입 과정에서는 검역과정 중에 겪게 되는 저온 노출시간을 최소화함으로써 소똥구리의 건강에 대한 악영향을 최소화할 방안이 필요하다.



도입 개체군 채집



개체 선별 및 세척(몽골국립대학교)



도입준비(몽골)



검역 및 수입통관(인천공항)



도입 후 상태 확인(멸종위기종복원센터)



먹이 섭식중인 소똥구리(멸종위기종복원센터)

그림. III-3-(4). 소똥구리 도입과정

몽골의 소똥구리 서식환경 조사결과에 따르면 소똥구리는 몽골의 온대초원 (steppe)과 사막지역에 주로 서식하며, 고도 1,500m 이하의 건조하고 식생피복도가 낮은 환경을 선호하는 것으로 판단된다. 서식환경 조사결과는 소똥구리 실내증식 환경을 구축하는 과정에서 참고자료가 될 수 있다. 추가적으로 차후 년도부터는 식생의 종류와 피복도, 깊이에 따른 토질종류 등의 좀더 구체화된 서식정보에 대한 연구를 통해 방사지를 선정하는데 필요한 기초자료로 활용하고자 한다.

표. III-3-(3). 소똥구리 서식지 환경정보

지역	경관	토질	식생	고도 (m)	온도 (°C)	습도 (%)	가 축
22km Westsouth of Mandalgovi, Dundgobi Aimag	반사막초지	-	초본	1445	27	20	말
10km North of Khuld, Dundgobi Aimag	반사막- 사막 완충지대	거친모 래, 자갈	초본	1306	31	20	말
9km South of Tsogt-ovoo, Omnogobi Aimag	사막	가는모래	3~4m간격 덤불식생	1180	28	24	말
3km Northeast of Dalanzadgad, Omnogobi Aimag	사막	거친자갈	덤불식생이 높은 밀도	1402	27	20	말
5km East of Ikh-Uul, Khövsgöl Aimag	초지	거친모래 , 자갈	허브	1145	23	27	말, 소
Orkhon, Bulgan Aimag	초지	거친모래 , 자갈	허브	1053	24	40	말, 소

IV. 멸종위기종 환경 적응력 연구

1. 여울마자 자연성 증진 훈련Ⅱ

가. 서론

어류의 증식 및 방류는 멸종위기에 처한 어류의 개체군 회복에 가장 많이 사용되는 방법 중 하나이다. 그러나 다양한 외부 위험요인으로부터 차단된 상태로 인위적으로 공급되는 먹이를 섭취하며 자란 어류들은 야생개체와 비교하여 먹이활동 능력, 수상 및 육상 포식자에 대한 기피능력 등 생존에 필수적인 행동의 발달이 늦어 야생에 방류 되었을 시 생존율이 저조한 것으로 알려져 있다. 이러한 선행연구들을 바탕으로 어류를 야생에 방류하기 전에 아래와 같이 다양한 자연성 증진 훈련을 실시하는 것은 인공적으로 증식된 개체들이 야생에 더욱 빨리 적응하고, 방류 후 생존율을 더욱 높이는 전략이 될 것이라 사료된다.

나. 연구 내용 및 방법

(1) 포식자 인지 훈련

야생에서 다양한 먹이를 경험하며 자라는 야생개체와 달리 인공적으로 사육되며 사료 혹은 이미 죽어있는 먹이만 먹으며 자란 인공사육 개체는 야생으로 방류되었을 시 새로운 먹이환경에 적응하는 기간이 길어 방류 초기의 사망률 뿐만 아니라 성장률에도 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(Olla et al. 1998). 이러한 먹이 적응력의 저하를 야생의 동종개체 혹은 유사종의 개체와의 합사를 통한 사회 학습(Social Learning)을 이용하여 개선하고자 하였다. 훈련과정은 21년에 실시한 포식자 인지 훈련과 같은 방법을 사용하였으며 포식성 어류로는 꺾지를 선택하였다. 훈련과정은 21년에 실시한 포식자 인지 훈련과 같은 방법을 사용하였으며 포식성 어류로는 꺾지를 선택하였다.

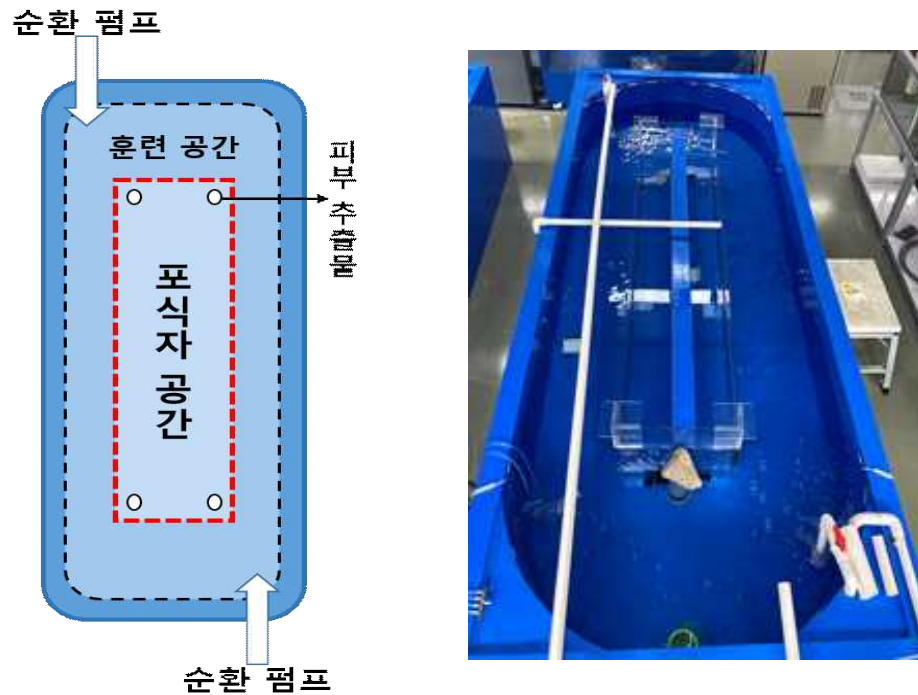


그림. IV-1-(1). 포식자 회피 훈련용 수조(좌: 모형도, 우: 트랙수조)

(1.1) 포식자 인지 훈련과정

- (가) 포식자 회피 훈련은 12개월령의 인공증식 여울마자 130여 개체를 대상으로 진행하였으며, 훈련 수조(4.50 × 1.50 m) 중앙에 직경 5cm 크기의 구멍이 5cm 간격으로 뚫린 아크릴 판을 이용하여 격리벽(2.30 × 0.49 m)을 설치한 뒤, 각 구멍은 그물망을 이용해 포식자와 여울마자의 출입을 막았다(그림 IV-1-(1)).
- (나) 포식자 및 알람신호 노출을 위해 매일 오전 10:00시 격벽 내부에 포식자(꺀지 등)와 먹이용 어류 사체를 다져서 만든 알람신호 1g을 구멍을 뚫은 2L 채수병병에 담아 격벽 4귀통이에 넣어주었다.
- (다) 오후 16:00시 (6시간 후) 격벽 내부의 포식자 및 알람신호를 제거하였다.
- (라) 훈련 48시간 후 비훈련개체와 훈련개체 10마리씩을 무작위로 선별하여 실험수조로 옮겨 검증실험을 진행하였다.

(마) 수온은 온도조절기를 이용하여 21도로 유지하였고 에어 펌프를 이용하여 산소를 공급해 주었다.



그림. IV-1-(2). 포식자 인식 실험용 수조(좌: 모형도, 우: 트랙수조)

(1.2) 포식자 인지 훈련 검증과정

(가) 격벽이 설치된 실험수조(1.00 × 0.45 m, 그림. IV-1-(2).)에 개체들을 방류 한 이후 30분간 안정시켜주고 촬영을 시작하였다.

(나) 촬영을 시작하고 15분 뒤 포식자를 넣을 공간에 알람신호 혹은 포식자(미유기)를 넣어주어 실험 수조에 있는 개체들에게 자극을 주었다.

(다) 노출 15분 전과 15분 후를 비디오카메라(iphone SE2)로 수조의 수직상에서 30분간 촬영하였다.

(라) 포식자 및 알람신호가 위치한 격벽으로부터 가까운 구역(20cm)을 위험구역으로 설정하고, 그 이외의 지역을 안전 구역으로 설정한 뒤 15초 간격으로 해당 구역에 위치한 개체수를 기록하여 자극원 (알람신호 혹은 포식자)에 노출되기 15분 전과 후 15분동안 위험 혹은 안전구역에 위치한 개체의 비율을 확인하였다.

(2) 자연먹이 섭이 훈련

인공증식 여울마자의 자연먹이 적응을 위한 섭이 훈련을 진행하였다. 여울마자와 서식지 및 먹이원이 비슷한 야생 돌마자 개체와 합사를 통한 사회 학습 (Social Learning)을 이용하여 훈련의 효율을 상승시켰다. 일정 및 훈련 방법은 21년과 같은 방법으로 진행하였다.

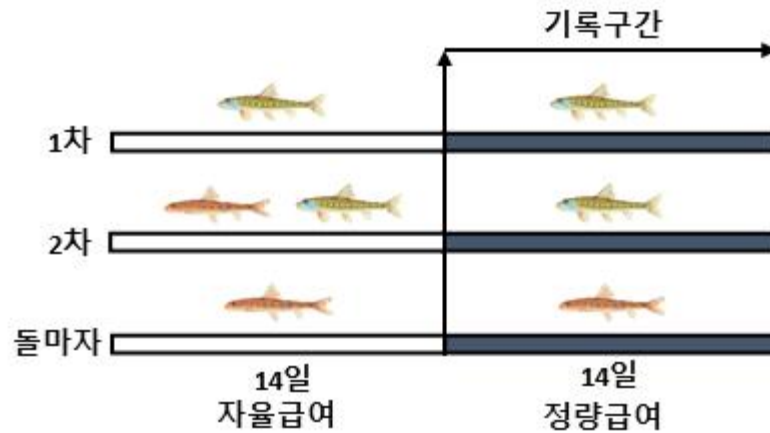


그림. IV-1-(3). 자연먹이 섭이 훈련 일정

(2.1) 자연먹이 섭이 훈련 과정

자연먹이 섭식 훈련은 트랙수조(4.50 × 1.50 m)에서 1차 훈련과 2차 훈련으로 나누어서 실시를 하였으며, 훈련은 자유롭게 자연 먹이원(부착조류)을 섭식하는 적응구간 14일과, 동일한 면적(5 × 5 cm 4개)의 먹이를 수조 각 귀통이에 공급한 뒤 매일 오전 10시에 잔존 먹이량을 14일간 기록하는 기록구간으로 나누어 진행을 하였다(그림. IV-1-(4)). 1차 적응 훈련은 인공증식 여울마자 10개체를 대상으로 진행을 하였고, 2차 훈련은 1차 훈련을 받지 않은 여울마자 10개체와 야생에서 포획한 돌마자 10개체를 자율 급여 기간 동안 합사를 하고, 기록구간에서는 돌마자를 수조에서 제외한 여울마자 10개체의 잔존 먹이량을 14일간 기록하였다. 그리고 인공증식 여울마자와 야생 돌마자 간의 먹이 섭식량 비교를 위하여 돌마자 10개체 또한 위와 같은 방법으로 먹이섭식량을 기록하였다.

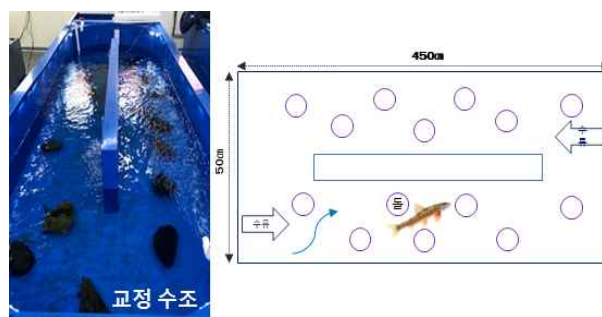


그림. IV-1-(4). 지느러미 변형 교정 훈련 수조(좌: 훈련수조, 우: 모형도)

(3) 지느러미 변형 교정 및 유영능력 향상 훈련

인공증식 여울마자의 지느러미 변형 교정 및 유영능력 향상 훈련을 진행하였다. 환경 풍부화를 이용한 훈련은 21년과 같은 방법 및 일정으로 진행하였다.

(3.1) 지느러미 변형 교정 및 유영훈련 향상 훈련 과정

훈련은 트랙수조(4.50×1.50 m)에서 11개월령의 인공증식 여울마자 30개체를 대상으로 진행하였으며, 수조 양 끝 지점에서 모터를 이용하여 지속적으로 수류를 일으켜 주었고, 물이 흐르는 방향을 따라 돌(평균 $20 \times 30 \times 20$ cm)을 교차하여 배치를 하였다. 먹이는 하루 3회 반복 시 까지 공급하였으며, 에어펌프 및 온도조절기를 이용하여 산소공급과 수온을 유지하였다. 훈련을 시작하기 전 적정 농도(75ppm)의 MS-222를 이용하여 전 개체를 마취한 뒤 해부현미경을 이용하여 지느러미 변형율을 기록하였고, 훈련 60일 뒤 변형율을 기록하여 교정된 개체 수를 확인하였다.

(3.2) 지느러미 변형 교정 및 유영훈련 향상 검증 과정

훈련 시작 전과 후 대상 여울마자들의 유영능력을 수중 미로를 설치한 실험수조에서 목표지점 도달까지 걸린 시간, 장애물에 부딪힌 횟수를 기록하여 유영 능력을 평가하였다.

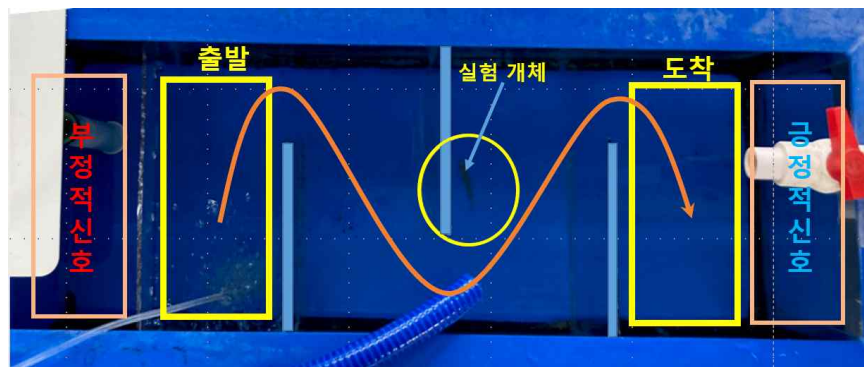


그림. IV-1-(5). 유영 능력 검증 실험 수조

다. 연구 결과 및 고찰

(1) 포식자 인지 훈련

훈련 전 알람신호 노출 시 여울마자의 위험구역 접근율은 약 15.54% 증가하였으나, 훈련 후 알람신호 노출 시 여울마자의 위험구역 접근율은 약 27.21%로 감소하였다. 훈련 전 포식자 노출 시 여울마자의 위험구역 접근율은 약 8.07% 감소하였으나, 훈련 후 포식자 노출 시 여울마자의 위험구역 접근율은 약 46.52%로 감소하였다.



그림. IV-1-(6). 포식자 인식 훈련 전후 위험 및 안전구역에 위치한 여울마자의 비율(%)

(1.1) 포식자 인지 훈련 결론 및 고찰

동족의 손상된 피부조직에서 흘러나오는 알람신호와 포식자를 이용한 포식자 인지 훈련 결과 인공증식 여울마자의 알람신호 및 포식자 인지 능력은 훈련을 통한 증진이 가능함을 확인하였다. 훈련을 받지 않은 여울마자는 알람신호에 처음 노출되었을 때 아무런 자극이 없을 때 위험구역에 잔류한 비율(47.7%)보다 15.5% 높은 위험구역 잔류 비율(63.24%) 비율을 보였다. 포식자에 노출되었을 때는 훈련을 받지 않은 개체는 44.23%의 위험지역 잔류 비율을, 훈련을 받은 개체는 5.78%의 잔류 비율을 보였다. 추후 포식성 어류의 크기 및 종별 인지 훈련 및 포식성 어류 모형을 이용한 시각적인 자극과 포식성 어류에서 얻은 화학적인 자극을 포함한 인지훈련을 실시하여 훈련에 가장 적합한 포식성 어류의 크기 및 종을 파악하면 더욱 효과적인 훈련 진행이 가능하리라 판단된다.

(2) 자연 먹이 섭이 훈련

야생 돌마자와 합사 훈련을 받지 않은 여울마자의 2주간 먹이 섭이량은 약 19%로 확인되었으며, 합사하여 자연먹이 섭이 훈련을 받은 여울마자의 2주간 먹이 섭이량은 약 56%로 확인되었다. 야생 돌마자의 2주간 먹이 섭이량은 약 80%로 확인되어 훈련을 받은 여울마자가 약 3배 더 높은 먹이 섭이량을 보였다.

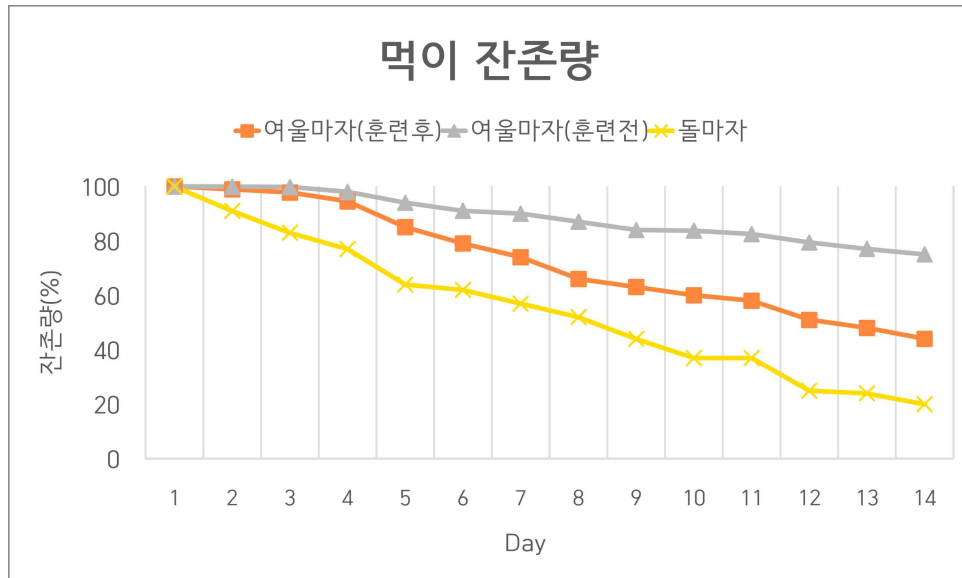


그림. IV-1-(7). 훈련 전, 후 여울마자 먹이 섭이 후 잔존량

(2.1) 자연 먹이 섭이 훈련 결론 및 고찰

근연종과의 합사를 통한 자연먹이 섭이 및 적응 훈련을 진행한 결과 근연종과 합사한 경험이 있는 여울마자 그룹이 그렇지 않은 그룹보다 약 3배 높은 적응력을 보여주었다. 하지만, 야생의 어류는 한가지 먹이원만 섭이하는 것이 아닌 더욱 다양한 먹이원에 노출, 섭이하며 영양분을 얻으므로 야생에서 접할 수 있는 다양한 먹이원에 대한 적응 훈련을 진행하면 방류 후 더욱 빠른 적응이 가능하리라 판단된다.

(3) 지느러미 변형 교정 및 수영능력 향상 훈련

10개월 경의 인공증식된 여울마자 32개체를 대상으로 지느러미 변형 훈련을 진행한 결과 훈련을 받기 전 32개체 중 27개체(84%)의 지느러미형태가 일그러지는 변형을 확인하였으며, 사육환경 구조적 다양화를 통한 변형 교정 결과 60일 후 변형개체의 수가 27개체에서 4개체(12%)로 감소함을 확인하였다.

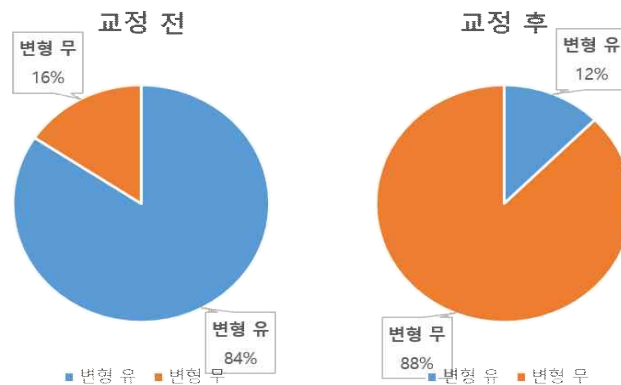


그림. IV-1-(8). 교정 훈련 전(좌), 후(우) 지느러미 변형 비율

유영능력 훈련을 받은 10개체와 받지 않은 10개체를 대상으로 수중 미로 통과 시간 및 장애물 충돌 횟수 비교를 통한 유영능력 검증 실험을 진행한 결과, 훈련을 받지 않아 지느러미에 변형이 있는 개체와 변형이 교정된 개체의 수중미로의 출발지점에서 목표지점까지 도달에 필요한 평균 소요시간과 장애물 충돌 횟수를 비교해 본 결과, 소요시간은 약 2분, 충돌 횟수는 약 6회 감소됨을 확인하였다.

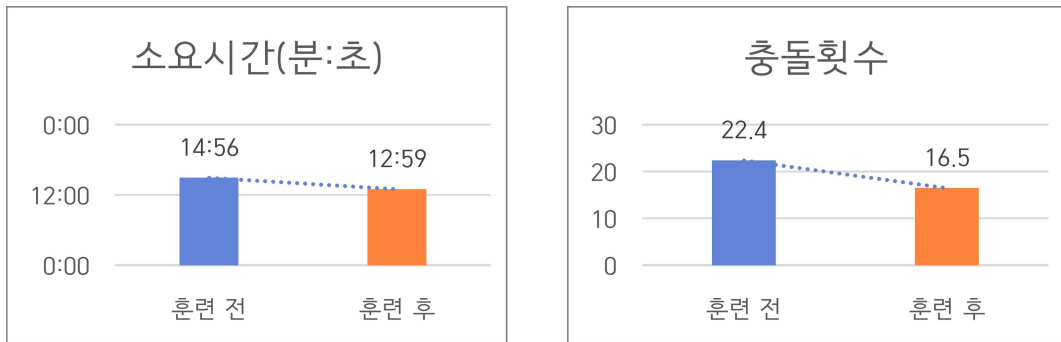


그림. IV-1-(9). 유영능력 검증 실험 수조 평균 통과시간(좌), 유영능력 검증 실험 수조 평균 총돌횟수(우)

(3.1) 지느러미 변형 교정 및 유영능력 향상 훈련 결론 및 고찰

사육 수조의 구조적 다양화를 통해 사육으로 인해 발생한 가슴지느러미의 변형 교정 및 수중미로 통과 시간 단축을 통해 정확한 방향 전환과 같은 유영능력 개선을 확인 하였으며, 추후 어류가 단시간에 가장 빠른 속도를 낼 때의 유영 속도인 돌진 속도 및 평시 유영하는 동안 보이는 속도인 유영 속도 등을 측정하여 더욱 객관적인 유영능력 평가도 함께 진행할 예정이다.

V. 참고문헌

- 국립생물자원관. 2012. 한국의 멸종위기 야생동식물 적색자료집-연체동물. 107.
- 권오길, 이준상. 2021. 달팽이는 왜. 지성사. 184.
- 농업과학기술원. 2003. 분식성 곤충에 대한 가축용 구충제 Ivermectin의 안전사용 시기. 농사로. 농사백과
- 신명주 (2017). 한국산 동자꽃속(*Lychnis* L.)의 계통분류 및 가는동자꽃의 유전적 다양성 연구. 영남대학교. 73p.
- 환경부. 2018. 멸종위기 야생생물 보전 종합계획 2018~2027.
- 한정호, 최지성, 홍석우, 조기택, 이정섭. 2016. 모래무지 인공종묘의 대량 생산 방법. 대한민국특허청. KR101606713B1
- Charpentier, R. (1968). Élevage aseptique d'un Coléoptère coprophage: *Aphodius constans* Duft. (Col., Scarabaeidae). Ann. Epiphyt, 19:533-38.
- Takashima, F. and Y. Yamada. 1984. Control of maturation in masu salmon by manipulation of photoperiod. Aquaculture, 43, 243-257.
- Broomage, N., M. Porter and C. Randall. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture, 197, 63-98.
- Michael Hutchison, Danielle Stewart, Keith Chilcott, Adam Butcher, Angela Henderson, Mark McLennan and Philip Smith. 2012. Strategies to improve post release survival of hatchery-reared threatened fish species. Murray-Darling Basin Authority, 1-62.
- Grant E. Brown, Maud C. O. Ferrari, Douglas P. Chivers. 2013. Adaptive Forgetting: Why Predator Recognition Training Might Not Enhance Poststocking Survival. Fisheriees, 38, 16-25.
- Borzée, A., Park, S., Kim, A., Kim, H. T., & Jang, Y. (2013). Morphometrics of two sympatric species of tree frogs in Korea: a morphological key for the critically endangered *Hyla suweonensis* in relation to *H. japonica*. Animal Cells and Systems, 17(5), 348-356.
- Borzée, A., Fong, J. J., Nguyen, H. Q., & Jang, Y. (2020). Large-scale hybridisation as an extinction threat to the Suweon treefrog (Hylidae:

- Dryophytes suweonensis). *Animals*, 10(5), 764.
- Verdú, J.R. (2018). Ivermectin residues disrupt dung beetle diversity, soil properties and ecosystem functioning: An interdisciplinary field study. *Science of the Total Environment*, 618, 219-228.
- Arditti, J., Ernst, R. (1984). Physiology of Germinating Orchid Seeds. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives* 3, 177-222.
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Van den Berg, C., Schuiteman, A. (2015). An Updated Classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of Linnean Society* 177(2), 151-174.
- Cozzolino, S., Widmer, A. (2005). Orchid Diversity: An Evolutionary Consequence of Deception? *Trends in Ecology and Evolution* 20(9), 487-494.
- Dutra, D.; Kane, M.E.; Richardson, L. (2009). Asymbiotic Seed Germination and In Vitro Seedling Development of *Cyrtopodium Punctatum* A Propagation Protocol for an Endangered Florida Native Orchid. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 96, 235-243.
- Godo, T., Komori, M., Nakaoki, E., Yukawa, T., Miyoshi, K. (2010). Germination of Mature Seeds of *Calanthe Tricarinata* Lindl., an Endangered Terrestrial Orchid, by Asymbiotic Culture In Vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 46, 323-328.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Group I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; IPCC: Geneva, Switzerland pp. 1-151.
- IUCN (2017). The IUCN Red List of Threatened Species; IUCN: Gland, Switzerland, 2017; Available online: <http://www.iucnredlist.org> (accessed on 24 October 2017).
- Kauth, P. J., Dutra, D., Johnson, T. R., Stewart, S. L., Kane, M. E., Vendrame, W. (2008). Techniques and Applications of In Vitro Orchid Seed Germination. in *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Tropical Issues* pp. 375-391.
- Kim, D. H., Kang, K. W., Enkhtaivan, G., Jan, U., Sivanesan, I. (2019). Impact of Activated Charcoal, Culture Medium Strength and Thidiazuron on Non-Symbiotic In Vitro Seed Germination of *Pecteilis Radiata* (Thunb.) Raf. *South African Journal of Botany* 124, 144-150.

- Kim, Y. K., Jo, S. J., Kim, K. J. (2014). Phylogenetic position of *Nefinetia* and *Sedirea* (Orchidaceae) and their species identification using the chloroplast matK and the nuclear ITS sequences. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 44(1), 39-50.
- Lee, S. I., Lee, E. P., Kim, E. J., Park, J. H., Cho, K. T., Lee, S. Y., You, Y. H. (2017). Growth response and variation of ecological niche breadth of *Hibiscus hamabo*, the endangered plant, according to light, moisture and nutrient under elevated CO₂ concentration and temperature. *Korean Journal of Environment and Ecology* 31(3), 279-286.
- Lee T. B. (2003). Coloured flora of Korea. Col. I,II. Seoul; Hyangmun Publ. Co, Ltd. 1928pp.
- Magnus P, Abel G, Sileshi N, Jan S, Christian B (2008) Colonization and diversification in the African 'sky islands' by Eurasian *Lychnis* L. (Caryophyllaceae). *Journal of Biogeography* 35(6), 1016-1029.
- Pathak, P., Piri, H., Vij, S. P., Mahant, K. C., Chauhan, S. (2011). In Vitro Propagation and Mass Scale Multiplication of a Critically Endangered Epiphytic orchid, *Gastrochilus Calceolaris* (Buch.-Ham Ex J.E.Sm.) D.Don. Using Immature Seeds. *Indian Journal of Experimental Biology* 49(9), 711-716.
- Suetsugu, K., Tanaka, K. (2013). Pollination of *Sedirea japonica* (Orchidaceae) by *Bombus diversus diversus* (Hymenoptera: Apidae). *European Journal of Entomology* 110(3), 545-548.
- Willis, K.J. State of the World's Plants Report; Royal Botanic Gardens: London, UK, 2017; ISBN 1-84246-647-X.
- Yamasaki T., Ozeki K., Fujii N., Takehara M., Yokogawa M., Shingo K., Isagi Y. (2013). Genetic diversity and structure of *Silene kiusiana* (Caryophyllaceae) in the Aso region, Kyushu, Japan, revealed by novel nuclear microsatellite markers. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 63(3), 107-120.
- OECD. (2009). Guidance document on the determination of the toxicity of a test chemical to the dung beetle *Aphodius constans*.
- Verdú, J. R. et al. (2015). Low doses of ivermectin cause sensory and locomotor disorders in dung beetles. *Sci. Rep.* 5, 13912

- Iwasa, M., Maruo, T., Ueda, M. & Yamashita, N. (2007). Adverse effects of ivermectin on the dung beetles, *Caccobius jessoensis* Harold and rare species, *Copris ochus* Motschulsky and *Copris acutidens* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae), in Japan. Bull. Entomol. Res. 97, 619-625
- Choi, Y.-G. and G.-M. Park. 2020. Descriptions of new species and a new record (six species of gastropods and one species of bivalve) of Korea. Korean Journal of Nature Conservation, 19, 1-14.
- Chiba, S. 1999. Accelerated evolution of land snails *Mandarina* in the oceanic Bonin islands: evidence from mitochondrial DNA sequences. Evolution, 53(2), 460-471.
- Chiba, S and R. H. Cowie, 2016. Evolution and extinction of land snails on oceanic islands. The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 47, 123-141.
- Copeland, A. and T. Hesselberg. 2021. Habitat preferences of the critically endangered greater Bermuda land snail *Poecilozonites bermudensis* in the wild. Oryx, 1-4.
- Outerbridge, M. E. and S. C. Sarkis. 2018. Recovery plan for the endemic land snails of Bermuda, *Poecilozonites bermudensis* and *Poecilozonites circumfirmatus*. Department of Environment and Natural Resources, Government of Bermuda, 26 pp.
- Brooks, S., Tyler, C. R. & Sumpter, J. P. (1997). Egg quality in fish: What makes a good egg?. Rev. Fish Biol. Fisher. 7, 387-416

‘22년 멸종위기종 증식기술 개발 연구

2022 Conservation Research on the Population Trends and Factor Analyses in Endangered Species

발행일 2023년 1월 31일

발행인 조도순

발행처 국립생태원

충청남도 서천군 마서면 금강로 1210

참여 연구자 윤주덕, 김근식, 강동원, 유정우, 유나경, 황정은, 안지애, 박형빈, 백주형,
김영중, 윤창만, 김황, 김만년, 김진영, 박종대, 최예진, 유인성, 고영민, 고경범

문의 054-680-7363

홈페이지 www.nie.re.kr

제작 (주)전우용사춘

ISBN 979-11-6698-246-0(93400)



© 국립생태원

이 책은 저작권법에 의해 보호를 받는 저작물이므로 무단 전재와 무단 복제를 할 수 없습니다.

