

방어류 양식 산업화 기술 개발

Development of commercial aquaculture for yellowtails

주관연구기관	국립수산과학원 제주수산연구소
발행년월	2017-03
주관부처	해양수산부
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201700007500
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 17:15:36

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

2016년 도
국립수산과학원 사업보고서
Report of National Institute of Fisheries Science

방어류 양식 산업화 기술개발

Development of commercial aquaculture for yellowtails

제주수산연구소
Jeju Fisheries Research Institute

국립수산과학원

National Institute of Fisheries Science

제 출 문

국립수산과학원장 귀하

본 보고서를 ‘방어류 양식 산업화 기술개발’(연구개발 기간 : 2014. 1.~2016. 12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017년 2월

총괄연구책임자 : 양상근

참 여 연 구 원 : 정민환, 김봉석, 임상구,
문태석, 김재우, 지승철,
정민민, 이승중, 도정완,
백진이, 이영돈, 임봉수

보고서 요약

과제 번호	R2016008		연구기간	2014. 1~2016. 12(3년 간)	
연구사업명	수산시험연구사업				
연구과제명	방어류 양식 산업화 기술개발				
연구책임자	양상근	총 연구기간 참여 연구원 수	총 : 13명 내부 : 11명 외부 : 2명	총 연구 개발비	456,000천원
과제책임부서명	제주수산연구소		참여기업명		
위탁연구	연구기관명 : 한국해양대학교		연구책임자 : 최철영		
요약				보고서 면수	56쪽
<p>○ 우리나라 연안에 서식하는 방어류에는 방어(<i>Seriola quinqueradiata</i>),부시리(<i>S. lalandi</i>)및 잭방어(<i>S. dumerili</i>)등 3종이 있으며, 이중 부시리는 우리나라 전 연안에 분포하나 서해에 많고, 잭방어는 서해와 남해안에 많은 편이나 동해안에도 분포한다. 특히 부시리는 우리나라뿐만 아니라 일본, 중국 등 전 세계의 온대 수역에 분포하는 것으로 알려져 있다. 일본에서는 방어, 부시리 및 잭방어 3종이 양식되고 있으며 방어류 양식생산량의 대부분이 방어이며 다음으로 잭방어 이지만, 잭방어와 부시리는 방어 보다 시장가격이 높게 형성되어 있다.</p> <p>○ 우리나라의 방어류 양식은 방어를 대상으로 1963년경에 축제식 양성 형태로 시도되었으나, 그 경제성이 좋지 않아 중단되었다. 그 뒤 1968년에 우리나라 남해안에서 방어 치어 채포와 사육시험이 있었으며, 일본수출을 위하여 자연에서 채포한 치어의 양성이 활발하게 진행되었다. 그리고 1976년에 국내에서 채포한 양성용 종묘의 수출이 금지되면서 국내에서도 방어양식이 본격으로 시작되었다.</p> <p>○ 그러나 지금까지 우리나라의 방어류 양식은 자연에서 치어를 채포하여 양식하는 방법으로 종묘생산 및 중간양성 기술개발 관한 연구가 체계적으로 되어 있지 않다. 2014년 초부터 시행된 수산자원관리법 시행령 제6조 2항(수산자원의 포획·채취금지 체장 또는 체중, 대통령령 제25276호)에 의거 체장이 30 cm 이하의 방어는 포획이 금지되기 때문에 앞으로 방어류의 양식실용화를 위해서는 인공종묘생산 시스템 확보가 중요하다.</p> <p>○ 따라서 방어류 양식 산업화를 위한 소득 창출형 양식품종 개발을 위하여 방어, 부시리를 대상으로 종자생산 연구, 부시리 중간 육성어 성장 특성 및 모니터링 연구를 수행하였다. 또한 수정란 생산의 문제를 해결하기 위하여 방어 산란 유도에 미치는 광반응 효과 연구를 수행하였다.</p> <p>○ 본 연구를 통하여 국내 처음으로 방어 및 부시리 수정란 생산, 부시리 종자생산을 성공하였고, Green LED 광원 노출에 따른 방어의 성숙 유도 효과와 항산화 및 면역력 증진 효과를 파악하였다.</p>					

요 약 문

연구의 목적 및 내용	방어류 양식 산업화를 위하여 방어, 부시리를 대상으로 종자생산, 부시리 중간 육성어의 성장 특성 및 모니터링 및 방어 산란 유도에 미치는 광반응 효과 연구를 수행하였다.				
연구개발 성과	<p>○ 방어 산란 유도 조건은 광주기 조절(L: 11→9.5→13시간), 수온조절(21.5℃→16.5℃→19℃) 및 호르몬(HCG) 주사가 요구되었고, Green+가온 실험구에서 HCG 주사후 56시간에 자연산란을 시작하여 4일 동안 산란이 지속하여 수정란 1,470천 개(부상률 71.8%)를 생산하였다.</p> <p>○ 부시리 산란을 위한 광주기 조절은 산란기 이전인 2014년 2월부터 12 Light (L) : 12 Dark (D)에서 15 L : 9 D로 조절하여 사육하였다. 산란은 수온이 17.0℃되는 5월 3일부터 시작하여 20.5℃되는 6월 12일까지 26회 하였다. 산란기간 동안의 산란량은 $4,449 \times 10^3$개였고, 부상률 및 수정률은 각각 76.1%, 100%였다.</p> <p>○ 부시리 종묘는 부화후 60일째까지의 성장 및 생존율은 각각 113.79 ± 14.74 mm, 9.1%이었고, 순성장률(AGR)과 일간성장률(SGR)은 각각 18.53 mm/day, 5.48%/day이었다. 부화 20일까지 초기 단계에서는 성장이 거의 되지 않았지만, 20일 이후부터 서서히 증가하기 시작하여 30일 이후부터는 빠른 성장을 보였다.</p> <p>○ 지하해수를 이용한 부시리 중간어 사육결과, 증체율(WG), 일간성장률(SGR) 및 사료섭취율(DFI)은 지하해수 실험구에 비하여 혼합수와 자연수 실험구가 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). EP사료와 생사료 공급한 중간어 사육결과, 사료효율은 EP사료가 생사료에 비해 3.3배 높았다($P < 0.05$).</p> <p>○ 산란이 확인되기 직전인 4월에는 대조구(자연광+자연수) 및 형광등+가온 실험구에 비하여 Green LED+가온 실험구에서 성 성숙 호르몬(GnRH, GTH, FSH, LH, E₂ 및 VTG) 의 농도가 유의적으로 높게 관찰되었다($P < 0.05$).</p>				
연구개발 성과의 활용계획	<p>○ 방어의 수정란 생산 기술은 안정적인 방어 수정란 확보 및 참다랑어 등 대형어종 수정란 생산에 활용</p> <p>○ 부시리 수정란 생산 및 인공종자 생산기술은 민간 종묘생산 업체 수정란 분양 및 인공종자생산 기술 매뉴얼 제공</p> <p>○ LED 파장에 따른 방어의 성숙 및 면역력 증가 효과 연구는 넙치 대량폐사 저감을 위해 LED 불빛 장치로 면역력 증가, 스트레스 감소에 따른 성장과 질병 제어 적용</p>				
핵심어 (5개 이내)	방어류	산란유도	수정란	종묘생산	광반응

SUMMARY

Purpose	To develop and industrialize yellowtails aquaculture, we investigated seed production (<i>Seriola quinqueradiata</i> and <i>S. lalandi</i>), characteristics of growth performance in nursery stage (<i>S. lalandi</i>) and effects of light spectrum on ovulation induction in <i>S. quinqueradiata</i>				
Outcome	<p>○ To induce sex maturation, the photoperiod slightly decreased as follows:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 11 Ligh (L):13Dark (D) in early November 2015 (non-breeding season) - 9.5L:13.5D in early December 2015. <p>It increased to 13L:10D in early May 2016 (breeding season).</p> <p>Natural water temperature increased from 16°C in early January 2016 to 19°C in early May 2016. HCG (doses 500 IU/kg BW) was injected into the dorsal musculature for natural spawning. In treatment group, spawning began in 56 hours and was completed in 4 days after HCG treatment. In this trial for environmental factor control, the amount of spawning (1,470,000 eggs) and floating (fertilization) rate (71.8%) were recorded.</p> <p>○ The photoperiod (light/dark; L/D) was set to a 12 L/12 D from October 2013 to January 2014, and 15 L/9 D from February 2014 to June 2014. The first spawning of yellowtail kingfish occurred in May 3, 2014, at a water temperature of 17.0°C. Spawning continued until June 12, 2014, with the water temperature set at 20.5°C. A total of 26 times of spawning occurred during this period. The total number of eggs spawned during the spawning period was $4,449 \times 10^3$. The buoyant rate of spawning eggs and fertilization rate of buoyant eggs during the spawned period were 76.1% and 100%, respectively.</p> <p>○ The total length of larval fish increased to 113.79 ± 14.74 mm on 60 days post-hatch (DPH) and the survival rate was 9.1%. The absolute growth rate and specific growth rate under laboratory conditions were 18.53 mm/day and 5.48%/day, respectively. In the incipient period, it hardly grew, but began to grow slowly after 20 DPH. Then it showed fast growth from 30 DPH.</p> <p>○ Significantly higher weight gain (WG), specific growth rate (SGR) and daily feed intake (DFI) were observed in fish reared in seawater mixed with underground seawater (24.0 ± 0.6 psu). Feed efficiency was significantly improved in extruded pellet (EP) compared with that in raw feed (RF) ($P < 0.05$).</p> <p>○ We profiled sex maturation hormones (GnRH, GTH, FSH, LH and VTG) activity in plasma conducted by green LED (treatment group) and full spectrum (control group). In April, sex maturation hormone activity under green treatment group was significantly higher than that of the control group ($p < 0.05$).</p>				
Future Use and Application	<p>○ The fertilized egg production technology of <i>S. quinqueradiata</i> is available for the stable supply of fertilized eggs of the species as well as for the fertilized egg production of large-type fish like tuna.</p> <p>○ The fertilized egg and seed production technology of <i>S. lalandi</i> provides technical manuals about fertilized egg production and seed production to private seedling companies.</p> <p>○ The outcome of this study for the effects of light spectrum on sex maturation and immune system enhancement can also be applied for strengthening immunity, controlling growth and disease outbreak by using the LED light spectra.</p>				
Key words	Yellowtails	Spawning induction	Fertilized egg	Seed production	Photoreaction

목 차

제1장. 연구개발과제의 개요	6
제2장. 국내외 기술개발 현황	8
제3장. 연구개발수행 내용 및 결과	9
제1절. 방어 종자생산 연구	9
1. 생식소 조사	9
2. 수정란 생산	13
3. 종묘생산	16
제2절. 부시리 종자생산 연구	17
1. 수정란 생산	17
2. 종묘생산	22
3. 밀도와 수온에 따른 초기 성장	27
4. 종묘 기형	28
제3절. 부시리 중간 육성어 성장 및 경제성 분석	30
1. 중간어 성장 특성	30
2. 중간어 모니터링 및 손익분기점 분석	32
제4절. 방어 어미 산란유도에 미치는 광방응 효과	35
1. LED 파장별 방어의 성숙과 향산화 및 면역 관련 유전자의 발현 변화 분석 ...	35
2. LED 파장별 방어의 성숙과 면역 관련 호르몬 분석	44
제4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	50
제5장. 연구개발결과의 활용계획	53
제6장. 참고문헌	54

CONTENTS

Chapter 1. Summary of research project.....	6
Chapter 2. Current state of technical development.....	8
Chapter 3. Contents and results of research	9
Par. 1. Research of seed production for yellowtail.....	9
1. Investigation of germ plasm.....	9
2. Fertilized egg production	13
3. Seed production	16
Par. 2. Research of seed production for yellowtail kingfish.....	17
1. Fertilized egg production.....	17
2. Seed production.....	22
3. Growth according to the density and water temperature of larvae.....	27
4. Abnormal seed.....	28
Par. 3. Growth and economic analysis of medium fish for yellowtail kingfish ...	30
1. Growth characteristics of medium fish.....	30
2. Monitoring and analysis of the break-even point.....	32
Par. 4. Photoreaction effect on spawning induction of yellowtail	35
1. Analysis of maturation, antioxidant and immune-related gene expression of changes yellowtail exposed to green LEDs	35
2. Hormone analysis of maturation and immune-related of yellowtail exposed to green LEDs.....	44
Chapter 4. Research achievement and contribution.....	50
Chapter 5. Application plan of research results.....	53
Chapter 6. References	54

제1장. 연구개발과제의 개요

제1절. 연구개발의 목적

우리나라 연안에 서식하는 방어류에는 방어(*Seriola quinqueradiata*), 부시리(*S. lalandi*) 및 잭방어(*S. dumerili*) 등 3종이 있으며, 이중 부시리는 우리나라 전 연안에 분포하나 서해에 많고, 잭방어는 서해와 남해안에 많은 편이나 동해안에도 분포한다(Yoo, 1989). 특히 부시리는 우리나라 뿐만 아니라 일본, 중국 등 전 세계의 온대 수역에 분포하는 것으로 알려져 있다. 일본에서는 방어, 부시리 및 잭방어 3종이 양식되고 있으며 방어류 양식생산량의 대부분이 방어이며 다음으로 잭방어 이지만, 잭방어와 부시리는 방어 보다 시장가격이 높게 형성되어 있다(Nakada, 2000).

우리나라의 방어류 양식은 방어를 대상으로 1963년경에 축제식 양성 형태로 시도되었으나, 그 경제성이 좋지 않아 중단되었다. 그 뒤 1968년에 우리나라 남해안에서 방어 치어 채포와 사육시험이 있었으며, 일본수출을 위하여 자연에서 채포한 치어의 양성이 활발하게 진행되었다. 그리고 1976년에 국내에서 채포한 양성용 종묘의 수출이 금지되면서 국내에서도 방어양식이 본격적으로 시작되었다.

우리나라의 방어류 양식은 자연에서 치어를 채포하여 양식하는 방법으로 종묘생산 및 중간양성 기술개발 관한 연구가 체계적으로 되어 있지 않다. 2014년 초부터 시행된 수산자원관리법 시행령 제6조 2항(수산자원의 포획·채취금지 체장 또는 체중, 대통령령 제25276호)에 의거 체장이 30 cm 이하의 방어는 포획이 금지되기 때문에 앞으로 방어류의 양식 실용화를 위해서는 인공종묘생산 시스템 확보가 중요하다.

현재까지도 어류의 성숙을 촉진시키거나 산란을 유도하기 위해서 호르몬을 처리하여 어류의 생리 현상을 조절하는 경우가 많으나, 소비자들은 호르몬이 인체에 미칠 부정적인 영향에 대한 걱정 때문에 호르몬 처리 방법은 물론 호르몬을 처리한 어류를 꺼려하는 경향을 보이고 있다. 따라서 호르몬 처리 등과 같은 부정적인 사회적 인식을 벗어난 새로운 개념의 어류 번식조절 기법의 개발이 요구된다.

어류의 성숙, 배란 및 산란은 생식 내분비계의 지배에 의해 조절되지만, 이러한 조절을 유도하는 환경 요인 중에서 빛(光)은 가장 중요한 요인 중의 하나이다.

LED (light emitting diode) 광원은 특정한 파장의 빛만을 발광하는 장점을 갖고 있음은 물론, 기존의 조명(백열등과 형광등)에 비하여 소비 전력이 매우 낮고(약 1/10~20 수준) 수명이 길며(약 50,000 시간), 수은 가스를 사용하지 않는 등 저탄소 친환경적인 차세대 조명으로 각광받고 있다.

전 세계적으로도 LED 조명과 관련하여 여러 가지 정부 정책과 시행 과제들이 발표되면서 차세대 광원으로서의 LED에 대한 관심이 고조되고 있는 상황에서 수산양식 분야도 예외가 될 수 없다.

특정 LED 광 파장과 어류의 광반응 메커니즘의 규명을 통하여, 고부가 어종인 방어의 산란 유도 기술을 확보하게 된다면, 그동안 인공종묘생산이 어려웠던 고부가 대형 어종인 방어의 양식 산업화가 촉진될 수 있음은 물론 나아가 특정 광 파장에 의한 면역력 증강, 성숙 촉진 등의 기술개발을 도모함으로써 양적 및 질적으로 우수한 방어의 안정적인 생산기술을 제공할 수 있다.

따라서 방어류 양식 산업화를 위한 소득 창출형 양식품종 개발을 위하여 방어, 부시리를 대상으로 종자생산 연구, 부시리 중간 육성어의 성장특성 및 모니터링 연구를 수행하였다. 또한 수정란 생산의 문제를 해결하기 위하여 방어 산란 유도에 미치는 광반응 효과 연구를 수행하였다.

본 연구를 통하여 국내 처음으로 방어 및 부시리 수정란 생산, 부시리 종자생산을 성공하였고, Green LED 광원 노출에 따른 방어의 성숙, 면역 관련 호르몬 농도 변화를 파악하였다.

제2장 국내외 기술개발 현황

방어는 80년대 치어 채포를 통한 양식이 현재 우리나라 가두리 양식의 시초가 되었으나, 인공종묘생산 기술은 확보하지 못한 실정이다. 국내 회유성 대형어종이 종묘생산은 참다랑어를 대상으로 연구가 진행되고 있다.

방어 자연산 종묘 채포 금지 등으로 인공 종자생산 기술을 개발해야 할 실정에 있으며, 앞으로 인공종묘 산업체 공급으로 육상수조 및 가두리를 이용한 회유성 어종의 양식시대 선도가 필요하다.

일본의 경우 방어는 해산어 양식생산량 중 15만여 톤 수준으로 1위를 차지하는 주요 양식대상종이며, 방어 인공종묘생산 연구는 1960년도부터 시작하여 현재는 일부 인공산 종묘가 생산되어 산업체에 보급되고 있다. 또한 방어류 양식은 호주와 뉴질랜드에서는 Yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi*, 미국 캘리포니아에서는 California yellowtail *Seriola lalandi*을 대상으로 2000년 초에 양식 실용화를 수행하고 있다(Moran et al., 2007; Kolkovski and Sakakura, 2007; Stuart and Drawbridge, 2012).

LED 광원을 해양생물에 적용한 연구는 세계적으로도 일본 류큐대학의 Takemura 교수팀에 의해서 진행되었으나, 현재는 관련 연구의 수행이 진행되고 있지 않는 실정이며, 연구 내용면으로 볼 때도 LED 광원(파장)에 대한 어류의 초기 광 반응에 관한 내용이 주를 이루고 있다.

한국해양대학교 최철영 교수 연구팀이 최근 수행하고 있는 “LED 광 파장을 해양생물의 성숙 및 내분비 조절에 적용시킨 연구”는 세계적으로도 거의 적용 사례가 없을 정도로 미개척 분야나 다름없는 새로운 연구 분야이며, LED 특정 광 파장을 활용하여 어류의 성숙 조절, 스트레스 절감 및 면역력을 증강시킬 수 있다는 연구는 세계적으로도 주목받고 있다. 최근 해수관상어인 파랑돔, *Chrysiptera parasema*을 대상으로 3가지 파장(Red, peak at 630 nm; Green, 530 nm; Blue, 450 nm)과 3가지 세기(0.3, 0.6, 및 0.9 W/m²)의 LED 조명을 이용하여 파랑돔을 사육한 결과, 광 파장에 따른 파랑돔의 성숙 차이를 보고한 바 있다(Shin et al., 2013).

양질의 방어 수정란 확보를 위한 방안으로 기존의 호르몬 처리 방법이 아닌 특정 광 파장에 의한 방어 어미의 면역력 증강 효과와 더불어 성숙 및 산란 유도 효과에 대한 분석이 필요한 실정이다.

제 3장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 방어 종자생산 연구

1. 생식소 조사

가. 재료 및 방법

1) 실험어

2014년도는 방어(4.8~6.5 kg)를 실험에 사용하였으며, 실험어를 두 그룹(가온처리구, 자연수온구)으로 구분하여 조사하였다.

2015년도는 암컷 방어(8.76±1.43 kg)를 실험에 사용하였으며, 실험어를 세 그룹[대조구: 일반등 + 자연수, 실험구 I (Green 파장+자연수), 실험구 II (Green 파장+가온)]으로 구분하여 조사하였다.

2016년도는 성숙한 암컷(15.7±1.34 kg)를 사용하였으며, 실험을 진행하기 위하여 실험어를 세 그룹 [자연광+자연수, 실험구 I (Green 파장+가온수), 실험구 II (형광등+가온수)] 으로 구분하여 조사하였다.

2) 조사 방법

월별 성 성숙도를 조사하기 위하여 실험어의 전장(TL, Total length; 0.1 cm)과 체중(BW, Body weight; 0.01 g) 및 생식소중량을 측정하여 생식소 중량지수(GSI = 생식소 중량×100/체중)를 구하였고, 월별 생식소의 발달단계를 조직학적으로 조사하기 위하여 생식소를 Bouin's solution에 24시간 고정 후 파라핀 조직절편법을 이용하여 5~7 μ m로 절편하였다. 조직표본은 Myer hematoxylin과 0.5% eosin으로 핵과 세포질 비교염색 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

나. 조직학적 분석을 통한 생식소 발달

1) 2014년도

2014년 1월 실험 시작시 생식세포는 암컷개체의 경우 대부분 주변인기 난모세포 단계로 난모세포의 크기는 50~70 μ m의 난모세포들이 관찰되었다(Fig. 1B).

자연수온구 암컷의 2월 생식세포 발달은 초기 성장단계의 난황을 축적 전단계로 대부분 주변인기 난모세포들이 관찰되었고 난황포와 유구기단계의 난모세포(200~300 μ m)들도 함께 관찰되었다(Fig. 1C). 3월의 생식세포의 변화는 2월에 비해 발달되고 비대해진 난황을 축적하기 시작한 난모세포들(250~300 μ m)이 부분 관찰되기 시작했으며(Fig. 1E), 4월의 생식세포는 난황포와 유구기 단계의 난모세포들이 관찰되었으며 일부 퇴행난들이 관찰되었다(Fig. 1G).

자연수온구 수컷의 생식선내 생식세포의 변화양상은 시작시 대부분 정원세포와 정모세포단계의 세포들이 관찰되었고(Fig. 2A), 2월은 초기 성장기로 대부분 정모세포와 정세포가 일부 관찰되었다(Fig. 2C). 3월의 생식세포의 변화양상은 정모세포가 관찰되었으며 대부분 정세포의 비율이 많아지고 정자들도 일부 관찰되었다(Fig. 2E).

가온처리구 암컷개체의 생식세포 변화 양상은 2월에 대부분 성장단계로 난황이 축적된 난모세포들($200\sim350\ \mu\text{m}$)과 주변인기 단계의 난모세포, 유구기단계의 난모세포들이 관찰되어졌다(Fig. 1D). 3월의 경우 2월에 비해 난황을 축적하고 있는 난모세포들도 일부 관찰되었고 난모세포의 크기가 $400\sim500\ \mu\text{m}$ 로 비대해졌음(Fig. 1F). 4월의 생식세포는 난황포와 유구기 단계의 난모세포들이 관찰되었으며 일부 퇴행난들이 관찰되었다(Fig. 1H).

가온처리구 수컷의 생식세포의 변화 양상은 2월의 경우 정세포가 대부분 관찰되었고 일부 정자도 관찰되었으나 배정은 확인 되지 않았다(Fig. 2D). 3월과 4월의 경우 대부분 정자가 관찰되었고 배정도 확인 되었으나, 4월의 경우 3월에 비해 정소내 정자가 빠져나가 결합조직이 대부분 관찰되었다(Fig. 2F, 2G).

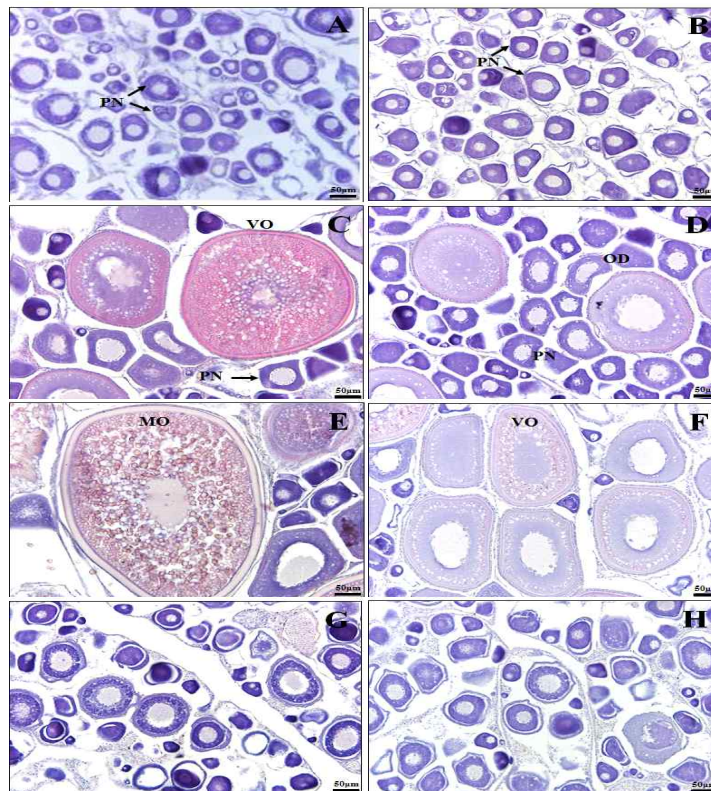


Fig. 1. A photomicrograph of cross-sections of a female yellowtail (*S. quinquerediata*) under high-water temperature (A, C, E, G) and natural-water temperature (B, D, F, H). A, B: Jan., C, D: Feb., E, F: Mar., G, H: Apr., MO: mature oocytes, OD: oil droplet stage oocytes, PN: peri-nucleolus stage oocytes, VO: vitellogenic oocytes. Bar=50 μm .

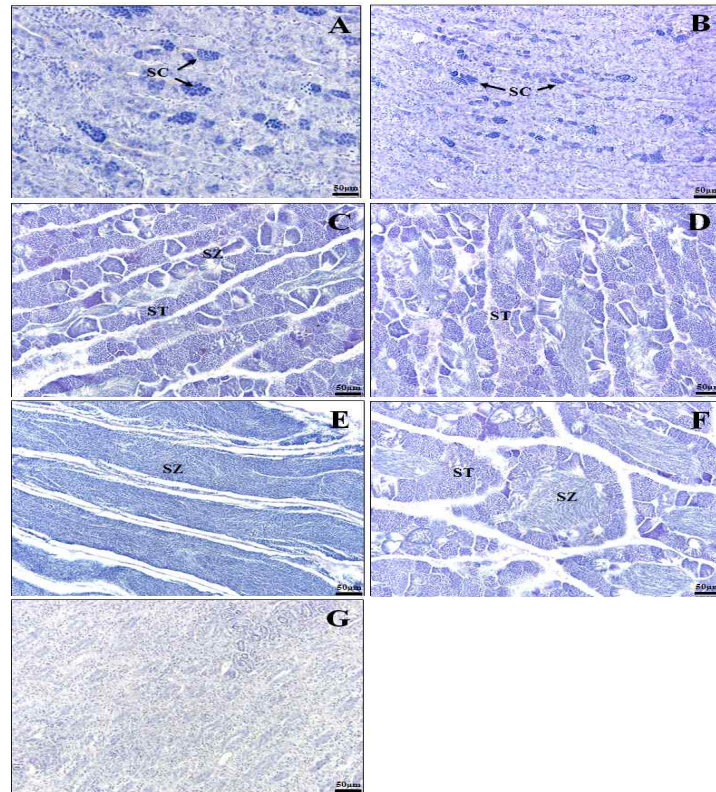


Fig. 2. A photomicrograph of cross-sections of a male yellowtail (*S. quinquerediata*) under high-water temperature (A, C, E, G) and natural-water temperature (B, D, F). A, B: Jan., C, D: Feb., E, F: Mar., G: Apr., SC: spermatocyte, ST: spermatid, SZ: spermatozoon. Bar=50 μ m.

2) 2015년도

Green LED 파장 및 대조구인 형광등 조명이 방어의 생식소 발달에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 방어 암컷의 생식소를 월별로 관찰하였다.

그 결과, 전 실험기간 동안 모든 실험구에서 동일하게 3월에 샘플링한 개체에서 가장 발달된 난모세포를 가지고 있는 것을 확인하였으나, 5월에 샘플링한 개체에서는 난모세포가 모두 퇴화되어 있었다.

광원별 실험구의 관찰 결과, 대조구(형광등)에 비하여 Green과 Green+가온 실험구에서 성숙된 난모세포를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

본 연구와 유사한 연구로 Shin et al. (2013)의 연구에 의하면 yellowtail damselfish, *Chrysiptera cyanea*을 형광등 및 다양한 LED 파장에 노출시켜 4개월간 사육하면서 생식소의 발달 정도를 조직학적으로 관찰한 결과, 형광등 및 다른 LED 실험구에서는 초기 성장단계의 난모세포만이 관찰되었으나, Green LED 실험구에서는 난황이 포함되어 있는 성숙한 난모세포가 관찰되었다고 보고한 바 있다.

본 연구도 이전의 연구 결과와 유사하게 Green 파장의 빛이 방어의 생식소를 성숙시키는데 효과적으로 작용하고 있는 것으로 사료된다.

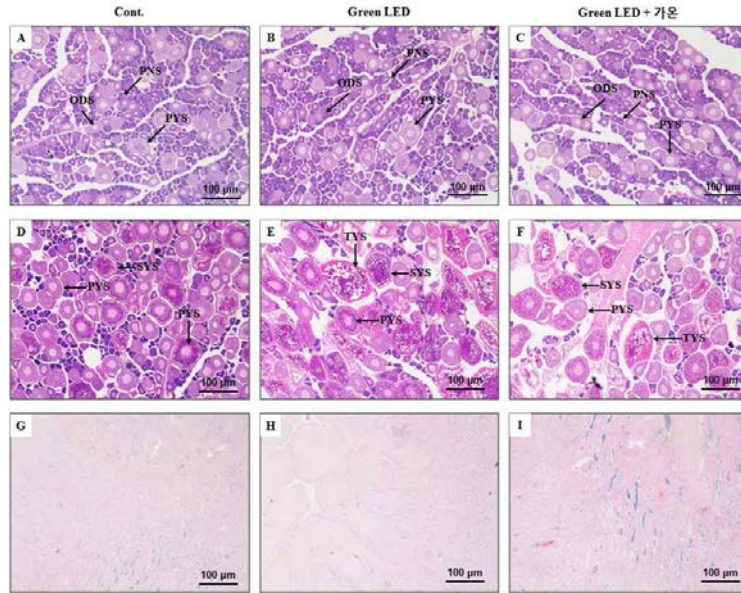


Fig. 3. A photomicrograph of cross-sections of yellowtail (*S. quinquerediata*) under white fluorescent bulb (Cont., A, D, G), green LED (B, E, H), and green LED + high-water temperature (G + High T., C, F, I). Cross-section of fish ovaries at Jan (A, B, C), Mar (D, E, F), and May (G, H, I) under different light conditions. PNS: peri-nucleolus stage; ODS: oil droplet stage; PYS: primary yolk stage; SYS: secondary yolk stage; TYS: tertiary yolk stage. Scale bar= 100 μ m.

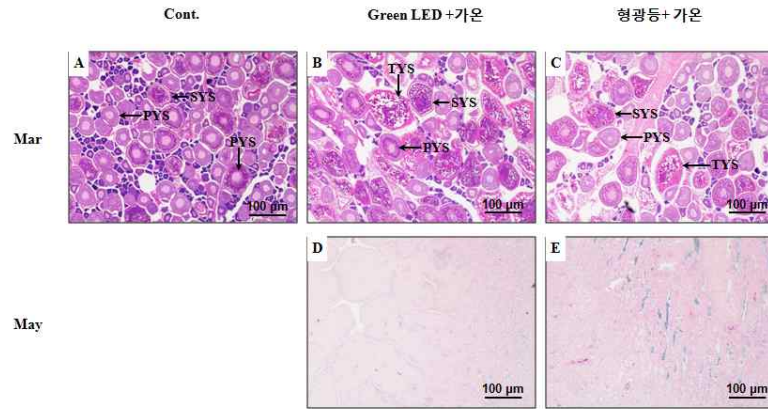
3) 2016년도

광원(자연광, Green 및 형광등)에 따른 방어의 생식소 발달에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 방어의 산란 전후(2016년 3월 및 5월)로 방어 암컷의 생식소를 조직학적 관찰하였다(Fig. 4). 전 실험기간 동안 모든 실험구에서 동일하게 3월 말의 개체들은 발달된 난모세포를 가지고 있었으나, 산란(5월 초) 이후인 5월 말의 개체들은 난모세포가 모두 퇴화되어 있었다.

광원별 실험구의 관찰 결과, 대조구(자연광)에 비하여 Green LED+가온과 형광등+가온 실험구에서 성숙된 난모세포를 확인할 수 있었다.

본 연구와 유사한 연구로 Shin et al. (2013)의 연구에 의하면 yellowtail damselfish, *Chrysiptera cyanea*을 형광등 및 다양한 LED 파장에 노출시켜 4개월간 사육하면서 생식소의 발달 정도를 조직학적으로 관찰한 결과, 형광등 및 다른 LED 실험구에서는 초기 성장단계의 난모세포만이 관찰되었으나, Green LED 실험구에서는 난황이 포함되어 있는 성숙한 난모세포가 관찰되었다고 보고한 바 있다.

본 연구도 이전의 연구 결과와 유사하게 Green 파장의 빛이 방어의 생식소를 성숙시키는데 효과적으로 작용하고 있는 것으로 사료된다.



PNS: peri-nucleolus stage; ODS: oil droplet stage; PYS: primary yolk stage; SYS: secondary yolk stage; TYS: tertiary yolk stage.

Fig. 4. A photomicrograph of cross-sections of yellowtail (*S. quinquerediata*) under nature light (Cont., A), green LED + high-water temperature (G + High T., B, D) and white fluorescent bulb (SNP) + high-water temperature (SNP + High T., C, E). Cross-section of fish ovaries at Mar (A, B, C), May (D, E) under different light conditions. PYS: primary yolk stage; SYS: secondary yolk stage; TYS: tertiary yolk stage. Scale bar=100 μ m.

2. 수정란 생산

가. 어미사육 및 환경조절

1) 2014년도

방어 어미는 자연산으로 50 m³ 실내수조에 가온처리구와 자연수온구로 구분하여 각각 55마리 (4.8~6.5 kg)를 수용하여 사육하였으며, 2014년 1월부터 4월까지 사육수온은 각각 18.4±1.6°C, 14.9±0.7°C에서 사육하였다. 먹이는 생사료인 전갱이(*Trachurus japonicus*)와 살오징어(*Todarodes pacificus*)를 공급하였다. 조도, 광주기 및 유수량은 각각 130 Lux, 15 L : 9 D 및 6회전/1일되게 조절하였다.

2) 2015년도

방어 어미는 5월에 산란유도를 위하여 117마리(6.6~13.6 kg)를 3그룹(Green 파장+가온, Green 파장+자연수, 형광등+자연수)으로 구분하여 사육하였다. 형광등 및 green 파장의 LED는 각각 27W 및 0.5W/m²의 세기로 일정하게 조절하였고, 유수량은 6회/1일, 먹이는 전갱이(*Trachurus japonicus*)를 공급하였다. 광주기 조절은 1월부터 11 Light (L) : 13 Dark (D)으로 시작하여 5월에 15 L : 9 D로 1개월 간격으로 명기를 1시간씩 증가시켰다. 가온구의 수온조절은 2월 중순부터 5월 하순까지 자연수온 보다 1°C 높게 조절하였다.

3) 2016년도

방어 어미는 자연산을 구입하여 육상수조에서 순치 사육한 46마리(8.7~15.6 kg)를 Green LED+가온, 형광등+가온 및 자연광(대조구)의 3개 실험구를 설정하여 사육관리 하였다. 형광등

및 green 파장의 LED는 각각 27 W 및 0.5 W/m^2 의 세기로 일정하게 조절하였다(Fig. 5).

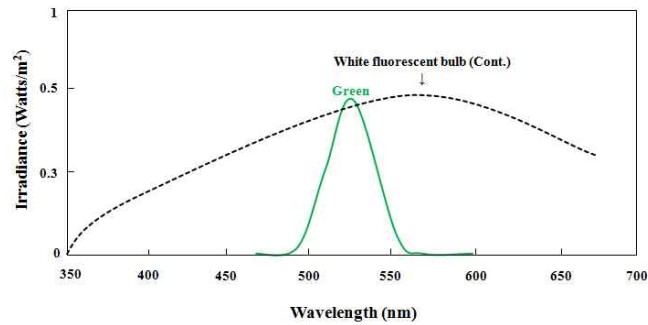


Fig. 5. Spectral profiles of green light emitting diodes (LEDs) and white fluorescent bulb (Cont.) used in this study.

광주기 조절은 2015년 11월 초순부터 11 Light (L) : 13 Dark (D)에서 12월 초순 9.5 L : 14.5 D로 줄인 이후 점차 증가하여 5월 초순에 13 L : 11 D로 조절하였다(Fig. 6).

수온조절은 가온구(LED 그린, 형광등)의 수온은 16°C 로 내려가는 12월 초순부터 15일 간격으로 0.5°C 씩 증가하여 5월 초순에 19.0°C 로 조절하였다(Fig. 7).

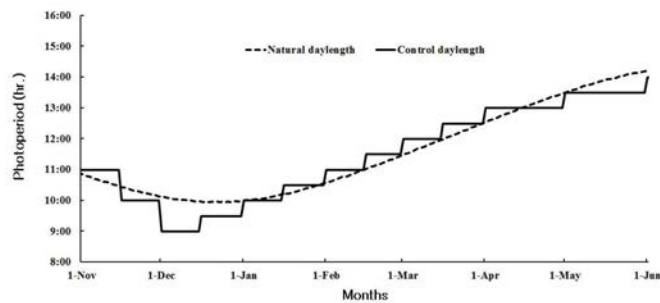


Fig. 6. The photoperiod for induction of sexual maturation of yellowtail (*S. quinquerediata*).

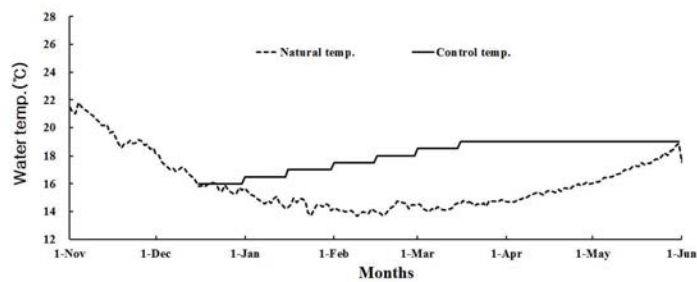


Fig. 7. The water temperature control for induction of sexual maturation of yellowtail(*S. quinquerediata*).

나. 난경 조사

Green LED+가온과 형광등+가온 실험구의 산란유도를 위한 호르몬(HCG) 주사시기를 파악하기 위하여 산란기 이전인 2016년 4월 7일(1차)과 4월 20일(2차)에 캐놀레이션에 의한 난 채취와 입체해

부현미경(Nikon, SMZ745T)을 사용하여 난경 600 μm 이상의 비율을 조사하였다.

1차 조사한 결과는 Green LED+가온 실험구는 각각 1.3%(난경크기, 0.22~0.73 mm), 0.6%(0.17~0.66 mm) 및 0%(0.17~0.56 mm)이었고, 형광등+가온 실험구는 각각 15.1%(0.18~0.82 mm) 및 10.0%(0.17~0.80 mm)이었다.

2차 조사한 결과는 Green LED+가온 실험구는 각각 13.8%(0.07~0.88 mm), 6.9%(0.11~0.69 mm), 0%(0.07~0.55 mm) 및 0%(0.08~0.51 mm)이었고, 형광등+가온 실험구는 각각 24.4%(0.16~0.87 mm) 및 6.25%(0.19~0.67 mm)이었다.

2주 동안에 난경이 크기가 증가한 것으로 나타났고, 실험구별 난경 600 μm 이상의 비율은 형광등+가온 실험구가 Green LED+가온 실험구에 비해 높은 것을 알 수 있었다.

다. 호르몬 주사

호르몬(HCG)은 Green LED+가온, 형광등+가온 실험구의 모든 개체를 대상으로 2016년 4월 28일(18:00)에 어체중 1 kg당 500 IU를 주사하였다.

라. 산란유도 효과

2014~2015년도 방어 수컷은 정액이 나올 정도로 성숙하였지만, 암컷은 난모세포가 성숙난으로 발달되지 않은 결과로 자연산란으로 수정란을 확보하지 못하였다.

2016년도에는 Green LED+가온, 형광등+가온 실험구의 전 개체를 대상으로 4월 28일(18:00)에 어체중 1kg당 500 IU를 주사한 결과, Green LED+가온 실험구에서 HCG 주사후 56시간이 5월 1일 2시부터 자연산란을 시작하여 5월 4일까지 4일 동안 산란이 지속되고, 산란기간 동안 총 산란량 및 부상률은 각각 1,470천 개, 71.8%이었다(Fig. 8). 수정란의 크기는 1.03~1.26 mm (평균 1.13 ± 0.05 mm)였고, 유구는 1~5개였다.

육상수조에서 외유성 대형어종인 방어의 산란 유도 조건은 광주기 조절(L: 11→9.5→13시간), 수온조절($21.5^{\circ}\text{C} \rightarrow 16.5^{\circ}\text{C} \rightarrow 19^{\circ}\text{C}$) 및 호르몬(HCG) 주사가 병행되어야 가능할 것으로 판단된다.

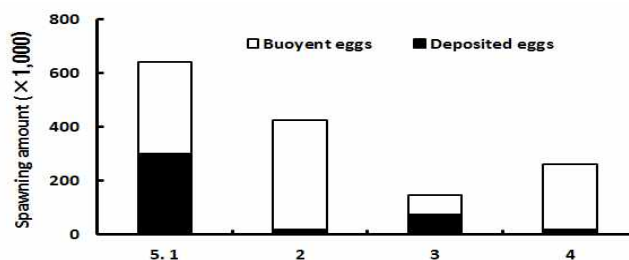


Fig. 8. Spawn frequency and egg production of captive-reared yellowtail (*S. quinqueradidata*) exposed to green light-emitting diodes (LEDs) and high-water temperature from May, 2016.

3. 종묘생산

가. 수정란 수용

방어 종묘생산을 위하여 자연산란한 수정란을 4회, 총 910천 개를 수용하였다(Table 1).

Table 1. Acceptation of the fertilized egg for seed production of yellowtail (*S. quinqueredidiat*)

	Date	Rearing tank	Amount (×1,000)
1	2016. 5. 1	8 m ³ (2)	280
2	2016. 5. 2	60 m ³ (1)	420
3	2016. 5. 4	16 m ³ (1)	100
4	2016. 5. 17	8 m ³ (1)	110
Total	4	-	910

나. 먹이 공급 및 사육관리

자어 사육기간 동안의 먹이공급은 부화후 2일째부터 액상농축 Chlorella (대상, Korea)로 배양하여 바이오 DHA marineglos (Marineglos co., Japan)로 8시간 동안 영양강화한 rotifer (*Brachionus plicatilis*), 8일째부터 CELCO (INVE, Belgium)로 8시간 동안 영양강화한 *Artemia nauplius*를 공급하였다.

사육수온은 18.6~21.1℃ 되게 유지하였으며, 환수량은 부화 일수에 따라 1일 0.1회전씩 증가하였다.

다. 초기 성장

2차에 수정란 420천 개를 수용한 60 m³ 수조에서 부화 18일째까지 사육한 것을 제외 하면 부화 5~10일째에 전량 폐사가 발생하였고, 부화 단계에서의 감모와 로티퍼 공급 단계인 부화후 5~15일 사이 사육초기 단계에서 회유성 어종의 특성인 침강사로 인한 초기감모로 판단된다. 일본에서도 참돔, 넙치 등에 비해 방어는 부화까지 발생이 정지되는 것이 많고, 사육 초기 감모가 많은 어종으로 알려져 있어 이에 대한 추가 연구가 필요한 실정이다.

부화자어의 크기는 3.09±0.32 mm, 2일째 3.94±0.12 mm, 3일째 4.00±0.07 mm, 5일째 4.11±0.05 mm, 10일째 4.19±0.10 mm, 15일째 4.22±0.33 mm로 성장하였고, 순성장율(AGR)과 일간성장율(SGR)은 각각 0.08 mm/day, 2.08%/day이었다.

제2절. 부시리 종자생산 연구

1. 수정란 생산

가. 어미사육 및 환경조절

1) 2014년도

어미는 제주 연안에서 어획한 자연산으로 2008년 3월에 20마리(4.5 ± 0.7 kg)와 2012년 10월에 39마리(2.6 ± 0.7 kg)로 총 59마리를 실내 콘크리트 수조($8.0 \text{ m} \times 8.0 \text{ m} \times 2.0 \text{ m}$, 유효수량 100 m^3)에서 사육하였다. 사육수는 자연해수를 1일 6회전 공급하였고, 사육기간의 수온은 $12.0 \sim 29.0^\circ\text{C}$ 였다. 산란시기의 유수량은 산란한 알의 보호를 위하여 1일 3.5회전으로 조절하여 양질의 수정란을 채집할 수 있도록 하였다.

실내 육상수조에서 어미 사육기간 동안의 성장(Table 2)은 2008년 3월에 구입한 개체들은 77개월 동안 $3.1 \sim 5.9$ kg (평균, 4.5 ± 0.7 kg)에서 $9.4 \sim 14.9$ kg (11.4 ± 1.3 kg)로 증가하였고, 2012년 10월에 구입한 개체들은 22개월 동안에 $1.3 \sim 4.0$ kg (2.6 ± 0.9 kg)에서 $6.1 \sim 10.5$ kg (8.0 ± 1.1 kg)까지 성장하였다.

Table 2. Growth of captive-reared yellowtail kingfish (*S. lalandi*) broodstock used for the induction of sexual maturation and natural spawning in an indoor culture tank

Rearing period	Indi. number	Size			
		Total length (cm)		Weight (kg)	
		First	Final	First	Final
2008. 3~2014. 7 (77 months)	20	65.9~80.8 (74.3 ± 4.4)	96.0~114.0 (104.8 ± 5.3)	3.1~5.9 (4.5 ± 0.7)	9.4~14.9 (11.4 ± 1.3)
2012. 10~2014. 7 (22 months)	39	52.0~79.0 (65.5 ± 8.3)	85.0~103.0 (93.8 ± 4.2)	1.3~4.0 (2.6 ± 0.9)	6.1~10.5 (8.0 ± 1.1)

방어류인 California yellowtail을 대상으로 140 m^3 원형수조(Stuart and Drawbridge, 2012)와 Yellowtail kingfish을 대상으로 70 m^3 원형수조에서 14마리(평균 체중, 17 kg) 수용하여 산란을 유도하였다(Moran et. al., 2007). 본 연구에서 사육수조의 크기는 100 m^3 으로 부시리 어미 사육에 문제가 없었고, 광주기 조절로 산란이 유도되어 수정란을 얻을 수 있었다. 방어류 어미 관리의 수조크기는 사육 어미의 밀도와 산란행동 특성 등이 관련성이 있는 것으로 사료된다. 사육수조에서 부시리 어미를 육상수조에서 사육하면서 수정란을 생산한 것은 이번이 처음으로 부시리의 건강한 수정란을 안정적으로 생산을 위해서는 적절한 암수비율과 사육밀도 그리고 산란행동 특성을 고려한 사육수조 시스템에 관한 추후 검토가 요구된다.

먹이는 조단백 46.0% 이상, 조지방 9.0% 이상, 조회분 16.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 칼슘 1.0% 이상, 인 2.7% 이하인 상업용 사료인 EP 사료(16~18 mm)를 공급 하였고, 4월부터 산란종료까지 살오징어를 추가로 공급 하였다. 어미의 성숙유도 사양관리에 영양 공급원으로서 먹이의 공급관리는 매우 중요한 요소 중의 하나이다. Yellowtail kingfish 어미 먹이사양관리에서 생사료에 고도불포화지방산(HUFAs, 주로 eicosapentaenoic acid (EPA), decosahexaenoic acid (DHA),

arachidonic acid (AA), 비타민(고농도의 α tocopherol과 vitamin C) 및 면역 자극제를 보충해 주고 있다(Kolkovski, 2004). 그리고 astaxanthin의 공급원으로 10% krill meal을 함유하는 soft-dry pellets을 먹이로 공급하여 난질을 향상시킨 경우(Verakunpiriya, 1996)도 있다. 본 연구에서는 조단백 46.0% 이상, 조지방 9.0% 이상, 조회분 16.0 % 이하, 조섬유 5.0% 이하, 칼슘 1.0% 이상, 인 2.7% 이하인 EP 사료(16~18 mm)를 공급하다가 산란개시 1개월 전인 4월부터 살오징어를 추가로 공급하여 수정란을 생산하였지만, 앞으로 건강한 수정란을 안정적으로 확보하기 위해서는 어미의 건강을 향상시키는 사료영양 보충에 관한 연구가 요구된다.

성숙유도를 위한 어미의 사양관리 조건은 명기의 조도는 130 Lux로 유지하였으며, 광주기는 준하계 산란어류의 성숙유도조건(Song, 2004)을 참고로 2013년 10월부터 2014년 1월까지 12 Light (L) : 12 Dark (D)에서 2014년 2월부터 산란 종료시까지 15 L : 9 D로 조절하여 사육하였다.

2) 2015년도

어미는 51마리(3.0~13.7 kg)였으며, 명기의 조도는 사육수조 중앙에 130 Lux되게 하였으며, 광주기는 1월부터 11 L : 13 D로 시작하여 5월에 15 L : 9 D로 1개월 간격으로 명기를 1시간씩 증가되게 조절하였다.

나. 자연산란

1) 조사 방법

매일 오전 8~9시 사이에 난을 수거한 후 메스실린더를 이용하여 부상란과 침하란을 분리하여 각각의 부피를 측정하여 산란량을 계산하였고, 부상률은 산란량에 대한 부상란의 비로 환산하였다. 난수는 용적법으로 얻어진 mL당 500개를 역산하여 계산하였다. 수정률은 만능투영기(PJ300, Mitutoyo)를 이용하여 부상란 중에서 발생이 진행된 알의 수를 계수하여 그 비율로 계산하여 나타내었다.

2) 산란 행동

부시리의 산란행동은 장일처리(15 L : 9 D)조건에서 3개월 경과 후 2014년 5월 초부터 19시부터 24시 사이에 시작하였으며, 수조 가장자리를 질서 있게 유영하는 무리들 속에 비교적 몸집이 큰 한 마리의 암컷 개체를 선두로 수컷 2마리가 서로 뒤엉켜 몸을 비틀고 따라 붙으면서 암컷의 생식공 좌우에 밀착하여 복부를 압박하며 빠른 속도로 유영하는 행동이 관찰되었다. 그리고 1시간 전후의 구애행동 끝에 암컷의 산란은 시작되고 질서 정연한 개체들의 유영은 다소 무질서하게 빨라지는 행동을 보였다. 잠시 후 맑고 잔잔한 수조에는 산란된 난들과 수컷의 정액으로 희뿌옇게 흐려지면서 작은 물거품들이 수면에 떠다니는 것이 관찰되었다.

뉴질랜드 Yellowtail kingfish의 경우 산란행동은 구애행동 후 30분에서 90분 사이에 산란이 일어나는데, 산란 10~15분전에 다른 수컷이 산란에 참여하는 것을 볼 수 있었으며(Moran et al, 2007), 본 연구에서도 몸집이 큰 한 마리의 암컷 개체를 선두로 수컷 2마리가 서로 뒤엉켜

몸을 비틀고 따라 붙으면서 암컷의 생식공 좌우로 밀착하여 복부를 압박하며 빠른 속도로 유영하는 행동으로 암컷의 산란을 촉발시키는 것을 볼 수 있었다. 산란 전 구애행동의 정보는 언제 산란이 이루어질지 예측되어 채란 준비가 가능하여 채란 지체에 따른 수정란의 박테리아 감염이나 채란망에 의한 기계적 손상을 줄일 수 있다(Moran et al, 2007).

3) 산란 수온 및 산란량

가) 2014년도

최초 산란은 사육수온이 17.0°C가 되는 5월 3일에 시작하여 수온이 20.5°C가 되는 6월 중순에 종료되었다. 이 산란기간 동안 총 26회 산란하였으며, 총 산란량은 $4,449 \times 10^3$ 개로 1회 평균 산란량은 171×10^3 개였다. 부시리의 성숙란은 분리 부성란으로 산란한 알의 부상률은 평균 76.1%였으며, 산란기간 동안의 부상란에 대한 수정률은 100%였다(Fig. 9). 산란 초기의 3회까지 산란한 알은 대부분 백탁과 침강으로 부상률은 0%였다. 그리고 5월 23일부터 산란종료시까지 2~3일 간격으로 산란하는 패턴을 보였고, 이 시기의 부상률은 33.3~96.4%였다.

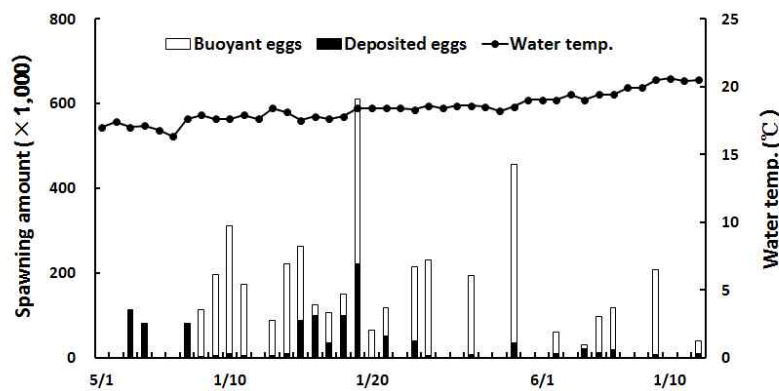


Fig. 9. Spawn frequency and egg production of captive-reared yellowtail kingfish (*S. lalandi*) broodstock in an indoor culture tank from May to June, 2014.

제주연안에서 춘하계산란종인 부시리를 대상으로 하여 광주기를 이용한 성숙유도 사양관리를 찾아보기 어려우나, 제주지역에 서식하는 하계산란종인 능성어를 대상으로 부시리와 유사한 사양관리 조건인 장일처리와 수온조절로 성숙유도와 수정란을 생산하고 있다(Song, 2004). 일본의 부시리 수정란 생산은 일본 남부 고토에서 수온이 15.5~18.5°C인 4~5월 사이에 호르몬 처리에 의한 인공수정을 수행하였다(Fugita and Yogata, 1984). California yellowtail은 캘리포니아 San Diego와 Catalina Island에서 4~7월 사이에 수온이 16.5~22.0°C 일 때, 북 뉴질랜드 East Coast에서 서식하는 Yellowtail kingfish는 11~2월 사이 수온 17.0°C 이상에서 산란한다(Stuart and Drawbridge, 2012; Moran et al., 2007).

California yellowtail는 16.5~22.0°C의 수온 범위에서 37~43회 산란을 하였고(Stuart and Drawbridge, 2012), 본 연구에서 부시리는 17.0~20.5°C 수온 범위에서 26회 산란하였다. 일본

남부지역과 미국 캘리포니아 그리고 뉴질랜드 등에서도 수온이 15°C 이상조건에서 산란개시가 일어나는 것은 유사하나 산란 종료시기와 산란 횟수에서 지역별 차이를 보이는 것은 적응생리적 특성으로 볼 수 있다.

Fugita and Yogata (1984)는 부시리의 인공수정시 수정률은 81.6%로 보고하였고, Yellowtail kingfish는 수조내 자연산란에서 부상란의 99% 이상이 수정란 이었다(Moran et al., 2007).

난경 및 유구의 변화는 1주일 간격으로 부상란 30개를 만능투영기를 이용하여 0.001 mm까지 측정하였다.

수정란의 난경은 1.290~1.495 mm (평균, 1.388 ± 0.041 mm) 범위였으며, 1개의 유구를 가진 분리 부성란이다. 산란기간 동안 측정된 난경 및 유구경의 변화는 Fig. 10에 나타내었다. 난경의 변화는 산란 초기 5월 8일에 1.366~1.495 mm (1.416 ± 0.030 mm), 산란 말기인 6월 9일에는 1.290~1.430 mm (1.351 ± 0.037 mm)였다. 유구경의 변화는 산란이 시작되는 산란 초기인 5월 8일에 0.294~0.393 mm (0.348 ± 0.025 mm)에서 산란 후반기로 갈수록 작아지는 경향이였다.

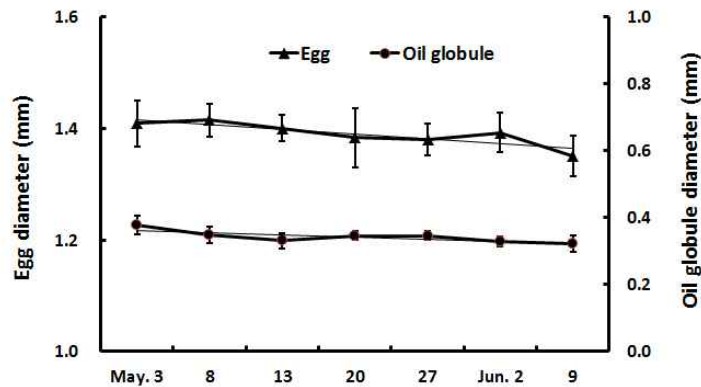


Fig.10. Spawn frequency and egg production of captive-reared yellowtail kingfish (*S. lalandi*) broodstock in an indoor culture tank from May to June, 2014.

Fugita and Yogata (1984)은 호르몬 처리에 의해 인공수정시킨 부시리의 난경과 유구경은 각각 1.36 ± 0.07 mm, 0.34 ± 0.02 mm라고 보고하고 있다. 본 연구에서 자연산란한 부시리의 난경과 유구경은 인공수정을 한 것 보다는 약간 크다. California yellowtail의 난경과 유구경은 2009년에 각각 1.36 ± 0.03 mm, 0.29 ± 0.02 mm, 2010년에 각각 1.40 ± 0.05 mm, 0.31 ± 0.05 mm (Stuart and Drawbridge, 2012), Yellowtail kingfish의 난경과 유구경은 각각 1.40 ± 0.04 mm, 0.31 ± 0.01 mm이다 (Moran et al., 2007). 부시리의 난경은 California yellowtail과 Yellowtail kingfish는 비슷한 크기였다. 본 연구에서 난경과 유구경이 산란기간의 경과에 따른 크기 변화는 산란개시 시점에 비해 종료시점에 각각 4%, 13%가 감소하였고, 난경에 따라 유구경도 산란기간의 경과에 따라 적어지는 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 Yellowtail kingfish의 난경이 산란기간 동안에 용적으로 약 15%까지 감소하는 것을 볼 수 있었고, 유구경은 난경과 밀접한 관련이 있으며 난경에 비해 더 많이 감소하여 유구 크기가 처음에 비해 용적으로 20%이상 떨어지는 것을 볼 수

있다(Moran et al., 2007). 산란기간 동안에 난경이 감소하는 패턴으로 암컷 각 개체의 난 생성 차이나 산란기간(Fugita and Yogata, 1984), 또는 산란기간이 지속되는 동안에 일반적으로 난질이 떨어진다고 보고가 있다(Brooks et al., 1997). 그리고 난경이 클수록 난질도 더 좋을 것이라는 추정도 있으나(Kamler, 1992), 산란기간 동안에 눈에 띄는 경향은 없었으며, 실제로 난경이 난질에 영향을 미치는가에 대한 결론을 내기는 어렵다고 보고하고 있다(Moran et al, 2007).

나) 2015년도

산란기간 동안의 수온 및 산란량 변화는 Fig. 11과 같다. 최초 산란은 광주기가 15 L : 9 D이고, 사육수온이 16.8℃로 올라가는 5월 12일부터 시작하여 사육수온이 22.3℃인 7월 12일까지 2개월 동안 지속되었고, 이 기간 동안의 산란 횟수는 19회였다. 산란기간 동안에 총 산란량과 부상률은 각각 6,977천개, 84.3%였고, 부상란의 수정률은 100%로 나타났다.

부시리의 산란기간 동안 측정한 부시리 수정란의 난경은 1.21~1.52 mm (평균 1.36 ± 0.06 mm)이었으며, 산란초기에는 1.43 ± 0.03 mm, 산란중기에는 1.34 ± 0.05 mm, 산란말기에는 1.31 ± 0.03 mm로 산란초기에 비해 산란 말기로 갈수록 작아지는 경향을 보였다.

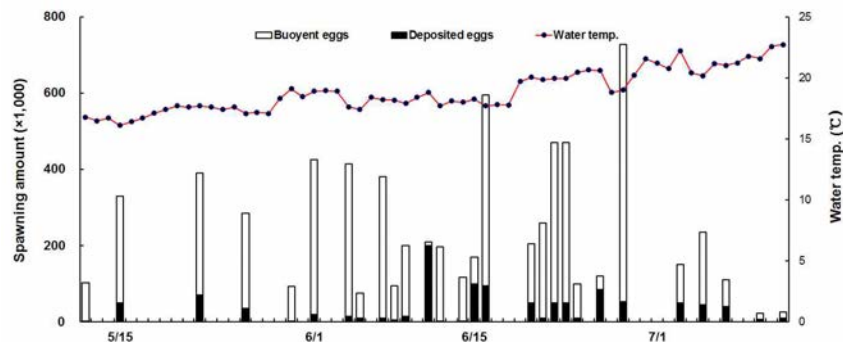


Fig. 11. Spawn frequency and egg production of captive-reared yellowtail kingfish(*S. lalandi*) broodstock in an indoor culture tank from May to July, 2015.

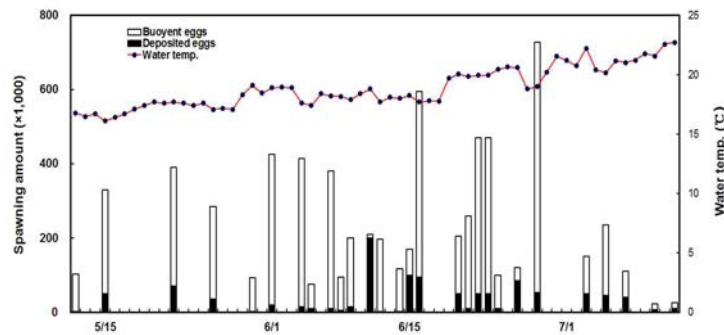


Fig. 11. Spawn frequency and egg production of captive-reared yellowtail kingfish(*S. lalandi*) broodstock in an indoor culture tank from May to July, 2015.

유구경의 변화는 산란초기에 0.36 ± 0.02 mm, 산란중기에는 0.35 ± 0.02 mm, 산란말기에 0.33 ± 0.02 mm로 난경 변화와 같이 산란말기로 갈수록 작아지는 경향이였다.

2. 종묘생산

가. 2014년도

1) 난수용

종묘생산을 위한 난수용은 자연산란한 수정란을 2014년 5월 30일에 320천개를 육상수조(5.5 m × 5.0 m × 1.3 m, 27.5 m³) 3조에 수용하였다.

2) 사육환경

조도는 85~320 Lux였고, 광주기는 부화후 20일 이전에는 24 Light (L)/0 Dark (D), 이후는 15L/9D로 조절하였다. 수온, 염분, 용존산소 및 pH는 각각 $19.6 \sim 24.4^{\circ}\text{C}$ ($21.6 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$), 30.7~33.3‰ ($32.1 \pm 0.7\text{‰}$), 5.86~8.96 mg/ℓ (6.90 ± 0.60 mg/ℓ) 및 7.38~8.20 (7.97 ± 0.17)이었다. 사육수는 고압 여과한 자연해수를 0~4.5회전되게 점차 증가하였고, 부화 8일째부터는 유막제거 장치를 설치하여 표면에 유막을 제거하였다. 또한 수질 안정을 위한 Green water로 DHA·EPA가 함유된 Super fresh chlorella (Chlorella co., Japan)를 첨가와 더불어 사육수조의 수질관리를 위하여 PRO-W (INVE, Belgium)와 PSB Plus (Bioheli, Korea)를 첨가하였다.

3) 먹이 계열 및 공급 시기

자치어 사육기간 동안의 먹이공급은 부화후 2일째부터 액상농축 Chlorella (대상, Korea)로 배양하여 바이오 DHA marineglos (Marineglos co., Japan)로 8시간동안 영양강화시킨 rotifer (*Brachionus plicatilis*), 8일째부터 CELCO (INVE, Belgium)로 8시간동안 영양강화한 Artemia nauplius를 공급하였다. 12일째부터 미립자 초기 배합사료를 공급하기 시작하여 순차적으로 사료의 크기를 증가시켰다. 그리고 25일째부터는 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)의 부화자어를 공급하였다.

먹이 섭이 확인은 먹이 공급후 1시간부터 1일 간격으로 10마리씩 무작위로 채집하여 입체해부 현미경(Nikon, SMZ745T)으로 소화관을 관찰하였다.

인공 종묘생산을 위한 부시리 자치어의 먹이 계열에 따른 섭취률은 Table 3에 나타내었다. 사육 수온 $21.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 에서 초기 먹이인 rotifer는 부화 후 3일째에 30.0%, 부화후 4일째에 100% 섭이를 확인 할 수 있었으며, *Artemia nauplius*는 부화후 9일째에 100% 섭이를 확인하였다. 초기 배합사료($100 \sim 200 \mu\text{m}$)는 소화기관의 발달과 연관하여 부화 12일째부터 공급하면서 100% 섭이를 확인하였다. 돌돔의 부화자어는 부화후 25일째부터 공급하면서 100% 먹이 섭이를 확인할 수 있었다.

첫 먹이 공급시기는 평균 수온 22°C 에서 부화 직후부터 난황이 거의 흡수된 부화후 72시간에서 자어의 상악장 크기는 $0.259 \pm 0.039 \text{ mm}$ 이었다. 이것은 代田(1970)의 방법에 따라 먹이 섭취시 구경을 최소 0.5d로 가정할 경우와 부시리 자어의 첫 먹인 rotifer 섭취시 소화관에서 발견은 부화 3일째에 30.0%, 4일째에 100% 섭이를 확인한 결과와 일치하는 결과였다. 한편 부시리 자어의 첫 먹인 rotifer는 피갑장 크기가 $100 \sim 210 \mu\text{m}$ 로써 부화후 72시간부터 rotifer 섭이가 가능한 입의 크기로 판단된다. 또한 *Artemia nauplius*의 크기는 $540 \sim 750 \mu\text{m}$ 로써 부화 8일째에 20%, 부화 9일째에 100% 섭이를 확인 하였고, 초기 배합사료는 부화 12일째부터 공급하면서 100% 섭이를 하였다. 그러나 초기 배합사료의 크기가 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 로 rotifer와 같은 크기로 예비시험에서 부화 7~10일 사이에 초기배합사료를 첫 공급을 한 경우, rotifer 보다는 먹이 선택성이 강하였지만, 공급후 2일 이전에 전량 감도가 발생하였다.

Table 3. Feeding rate of larvae and fingerlings on food proceeding of yellowtail kingfish (*S. lalandi*)

	Food proceeding					
	Rotifer		<i>Artemia nauplius</i>		Commercial diet	Rock bream's hatching fry
	DPH* (3 days)	DPH (4 days)	DPH (8 days)	DPH (9 days)	DPH (12 days)	DPH (25 days)
Feeding rate (%)	30.0	100.0	20.0	100.0	100.0	100.0

*DPH: Days post-hatch.

효율적인 소화 작용은 먹이를 잡아먹고 소화시켜 흡수하게 함으로써 자어의 생존과 성장에 매우 중요하게 작용한다(Kjorsvik et al., 2004). 자어가 형태학적으로 먹이를 받아들일 수 있게 되었다 하더라도, 소화계는 완전한 기능을 하기까지 일련의 변화 단계를 거치게 된다(Govoni et al., 2004; Canino and Bailey, 1995). 소화작용을 위한 구조학적 발달에 대한 것은 소화 작용을 이해하고 자어의 먹이를 공급을 시작하는 적절한 시기를 결정하는 데에 필수적이다(Watanabe and Kiron, 1994; Baglolle et al., 1997; Cahu and Zambonino Infante, 2001).

Yellowtail kingfish의 최초의 먹이는 영양강화한 rotifer (large size)를 주기 시작하여 부화후 12일째부터 양양 강화한 *Artemia nauplius*, 부화 20일째부터 배합사료를 공급하였고(Kolkovski and Sakakura, 2007), California Yellowtail *Seriola lalandi*의 자어가 빠른 경우는 부화후 6일째

부터 *Artemia* nauplius를 섭취할 수 있었다고 보고하고 있다(Stuart and Drawbridge, 2012). 부시리 자어에 *Artemia* nauplius를 공급시키는 사육 밀도 등 사육조건에 따라 앞당길 수 있는 것으로 판단되지만, 초기 배합사료의 공급시기는 자어의 소화관 발달과 연관하여 추후 연구가 필요하다.

4) 성장 및 생존율

자치어의 성장은 부화 1일째부터 10일 간격으로 10마리씩 무작위로 채집하여 저온 마취 및 MS-222(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 마취 후 크기에 따라 입체해부현미경(Nikon, SMZ745T)과 Digital caliper로 0.01 mm까지 조사하였다.

성장률 조사는 순성장율(AGR, Absoulte growth rate)은 mm/day로, 일간성장율(SGR, Specific growth rate)은 %/day로 조사하였다(Hopkins, 1992). AGR과 SGR은 각각 $(TL_f - TL_i)/\Delta t$, $100(\ln TL_f - \ln TL_i)/\Delta t$ 으로 계산하였고, 여기서 TL_f 와 TL_i 는 최종과 최초의 전장(mm)이며, 각각의 Δt 는 사육기간의 일수(days)이다.

생존율은 부화 1일째부터 10일 간격으로 생존량을 파악하였고, 60일째에는 생산된 개체수를 전수조사를 하였다.

부시리 인공종자 생산시 자치어의 성장과 생존율의 변화는 Fig. 12에 나타내었다. 평균 전장은 부화후 1일째에 4.49 ± 0.17 mm에서 60일째에 113.79 ± 14.74 mm로 증가였다. 순성장율(AGR)과 일간성장율(SGR)은 각각 1.85 mm/day, 5.48%/day이었고, 20일까지 초기 단계에서는 성장이 거의 되지 않았지만, 20일 이후부터 서서히 증가하기 시작하여 30일 이후부터는 급격한 성장을 보였다.

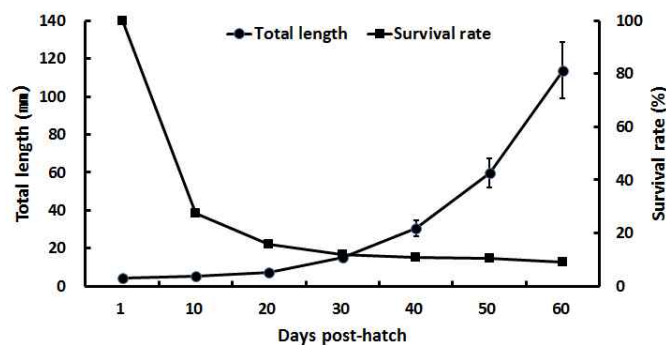


Fig. 12. Total length and survival rate of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) larvae during 60 days post-hatch.

자치어의 생존율은 부화 직후부터 난황이 완전히 흡수하고 초기 먹이를 섭취 못한 개체들이 60~70%가 폐사하여, 10일 경과시까지 자어의 생존율은 27.5%로서 초기에 대량으로 폐사하였다. 그리고 부화후 20일째 생존율은 15.7%로 낮아진 다음, 그 이후부터는 초기감모와 같은 대량 감모는 없었다. 실험종료시인 60일째까지의 평균 생존율은 9.1%였다.

순성장율(AGR)과 일간성장율(SGR)에 대해서는 Yellowtail kingfish *Seriola lalandi*의 자치어는 부화후 36일까지 각각 0.51 mm/day, 4.60 %/day로 보고하고 있다(Chen et. al., 2006). 본 연구에서는 부화후 60일까지 각각 18.53 mm/day, 5.48 %/day로 부시리의 자치어는 초기 단계에서는 성장이 거의 되지 않았지만, 30일 이후부터는 성장이 빠른 것으로 나타났다. 또한 사육수온에 대해서는 Yellowtail kingfish *Seriola lalandi*의 자어는 부화후 10일까지는 21°C, 이후에 자어의 생존율이 안정되고 부터는 섭이와 성장 촉진을 위하여 23~25°C로 올려야 한다고 보고하고 있다(Zhenhua, 2014). 본 연구에서도 부화후 10일까지의 사육수온은 21.7±0.2°C로써 사육수온이 자어의 성장과 생존에 영향이 없는 것으로 판단된다. 그리고 방어류의 자치어는 참돔 *Pagrus major*, 감성돔 *Acanthopagrus schlegelii*과 같은 어종에 비해 빠른 성장을 나타낸다(Kolkovski and Sakakura, 2007). 본 연구에서도 부화후 1일째에 4.49±0.17 mm에서 60일째에 113.79±14.74 mm로 자치어 단계에서 빠른 성장을 보였다.

내생 섭이(Endogenous feeding)에서 외생 섭이(Eexogenous feeding)로의 주요 영양 전환기에 어류 대량 폐사가 일어난다(Otterlei et al. 1999). 방어 *Seriola quinqueradiata*의 종묘생산 시기에 2번의 대량 폐사가 일어나며, 하나는 '위험기간'으로 불리는 부화후 첫 먹이 섭취기까지 이며, 또 다른 것은 치어기에 일어나는 공식에 의한 것이다(Sakakura and Tsukamoto, 1999, Yamazaki et al., 2002). 개구 기간에 방어와 잭방어 *Seriola dumerili*의 자어 경우에는 사육 수조의 바닥으로 가라앉는 경향이 있는데 이로 인해 대량 폐사가 일어난다. 이 폐사는 강한 통기를 실시하여 줌으로써 줄일 수 있었다(Shiozawa et al. 2003, Yamazaki et al., 2002). 공식 현상은 방어(Mizuta, 1981, Sakakura and Tsukamoto, 1999), 잭방어(Shiozawa et al., 2003)와 부시리(Ebisu and Tachihara, 1993)의 종묘생산 시기에 나타나며, 방어와 잭방어는 부시리보다 더 공격적인 것으로 여겨지고 있다(Kolkovski and Sakakura, 2007). California Yellowtail *Seriola lalandi*의 치어기까지 생존율은 5%였고, 부화후 17~20일 사이에 원인을 알 수 없는 높은 폐사율과 기형인 개체가 40%로 보고하고 있다(Stuart and Drawbridge, 2012). 본 연구에서는 부화후 60일째까지의 9.1%로 부화 직후부터 난황이 완전히 흡수하고부터 10일 사이에 60~70%가 폐사하였고, 20일 이후부터는 초기감모와 같은 대량 감모와 공식 현상은 거의 없었다.

돌돔의 부화자어 공급으로 태평양 참치(*Thunnus orientalis*)의 자치어의 성장과 생존율이 높이는 것으로 보고되고 있다(Seoka et al., 2007). 본 연구에서도 부화후 25일째부터 부화자어를 공급함으로써 공식에 의한 폐사가 없었던 것으로 판단되며, 대형어종의 종묘생산에 있어 부화자어가 공식 방지 효과와 더불어 공급시기 등의 검토가 요구된다.

2) 2015년도

부시리의 수정란 수용은 5월 15일부터 7월 11일까지 11회, 2,250천 개의 수정란을 사각 콘크리트 13~26 m³ 수조에 수용하였다.

부화 2일째부터 rotifer, 부화 8일째부터 *Artemia* nauplius, 부화 12일째부터 초기 배합사료(100~200 μm), 부화 25일째부터 돌돔 부화자어를 공급하였다.

종자생산은 6월 12일에 195천 개의 수정란을 수용한 26 m³ 수조에서 부화후 80일째까지 사육하여 18.1~54.1 g (평균 체중, 27.4±12.6 g)의 종자 6,000마리를 생산하였다. 나머지 10회의 수정란 수용은 부화후 6일에서 15일 사이에 대량감모가 발생하였다. 부시리의 자·치어의 성장 특성은 Fig. 13에 나타내었다. 자어의 평균 전장은 부화 1일째에 4.7±0.2 mm에서 부화 80일째에 145.4±30.3 mm로 성장하였다. 부화일수에 따른 전장의 증가는 부화 35일에 12.4±3.0 mm로 초기 단계에서는 성장률이 낮았지만, 부화 40일 이후부터 서서히 증가하기 시작하여 부화 70일 이후부터는 급격히 증가하기 시작하였다.

체중의 증가는 부화 40일째부터 증가하기 시작하여 부화 70일 이후에는 전장의 증가와 같이 급격히 증가하였다. 부화 80일까지 순성장률(AGR)과 일간성장률(SGR)은 각각 1.76 mm/day, 4.29%/day이었다.

자·치어 사육 기간 동안 전장(TL)에 대한 체장(BL) 및 체중(BW)의 상대 성장 관계는 각각 $BL = 0.8827TL - 0.4183$ ($R^2 = 0.998$), $BW = 0.000005TL^{2.8054}$ ($R^2 = 0.9935$)의 회귀 관계식으로 표시되었다(Fig. 14~15).

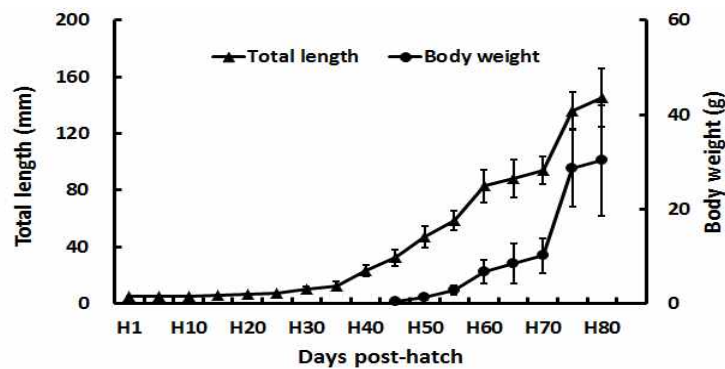


Fig. 13. Total length and body weight during 80 days post-hatch of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) larvae.

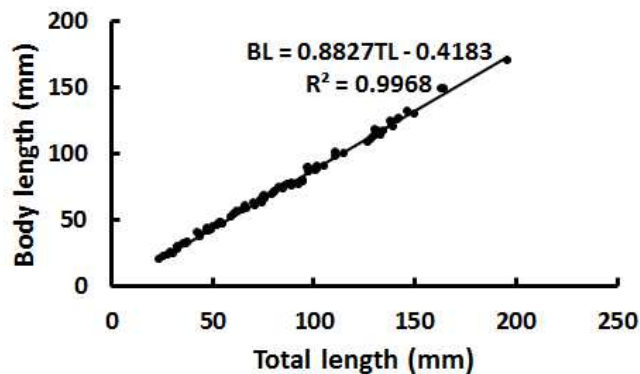


Fig. 14. Relation between body length against total length during 80 days post-hatch of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) larvae.

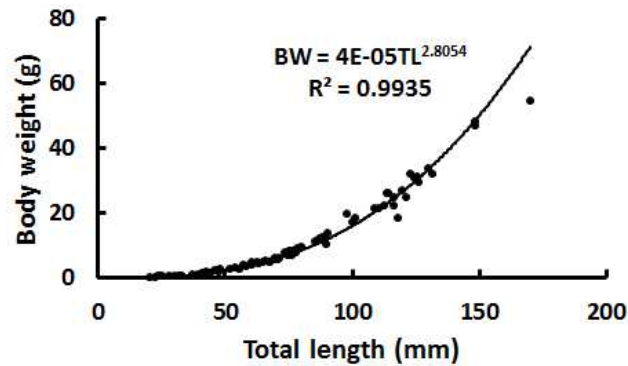


Fig. 15. Relation between body weight against total length during 80 days post-hatch of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) larvae.

3. 밀도와 수온에 따른 초기 성장

부시리 종자생산 시 난수용 밀도와 사육수온에 따른 초기 성장은 각각 5.8~14.7개/L, 19.5~21.1℃ 범위에서 조사하였다. 성장은 부화 1일째부터 5일 간격으로 10마리씩 무작위로 채집하여 저온 마취후 입체해부현미경(Nikon, SMZ745T)과 Digital caliper로 0.01 mm까지 조사하였다.

부시리의 난수용 밀도와 사육수온에 따른 초기성장은 Fig. 16~17에 나타내었다. 난수용 밀도에 따른 초기성장은 밀도가 낮은 5.8개/L와 7.5개/L에서 보다는 높은 12.3개/L와 14.7개/L에서 성장이 높게 나타났다.

사육수온에 따른 초기성장은 평균수온이 높은 21.1℃에서 보다는 낮은 20.5℃와 19.5℃에서 성장이 높게 나타났다.

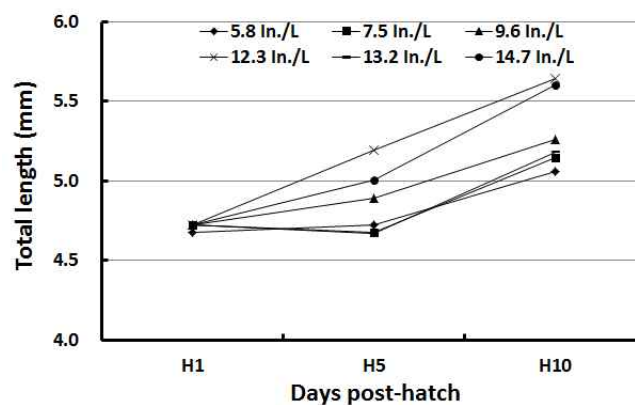


Fig. 16. A comparison of the growth according to the density of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) larvae.

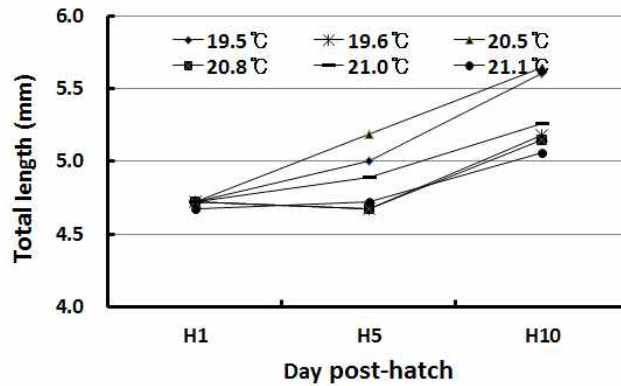


Fig. 17. A comparison of the growth according to water temperature of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) larvae.

4. 종묘 기형

부시리의 기형률 조사는 2015년도 종묘를 대상으로 부화 84일째와 129일째에 2회 조사하였고, 실험어는 각각 702마리(27.3 ± 14.0 g), 673마리(292.6 ± 68.3 g)를 사용하였다. 기형 판별은 육안으로 판정하였고, X-ray 촬영은 2차 조사시 육안으로 판정된 기형어를 대상으로 하였다.

부시리 종묘의 육안 기형은 아가미, 주둥이, 아가미+주둥이, 척추골 기형으로 구분하고, 척추 기형은 척추의 전반부, 후반부 및 복합(전·후반부) 기형으로 구분하였다.

1차와 2차 조사시 외부기형률은 각각 3.7%, 2.2%이었고, 기형 형태별 출현 빈도는 1차 조사에서는 주둥이(42.3%), 아가미(30.8%), 주둥이+아가미(26.9%) 순이었고, 2차 조사에서는 척추(80.0%), 주둥이(13.3%), 아가미(6.7%) 순으로 나타났다(Fig. 18).

기형개체는 정상개체의 비해 상대적으로 적은 것으로 나타났고($P < 0.05$), X-ray 촬영에 의한 척추 기형의 위치별 출현 빈도는 복합(41.7%), 전반부(16.7%), 후반부(16.7%) 순으로 나타났다(Fig. 19).

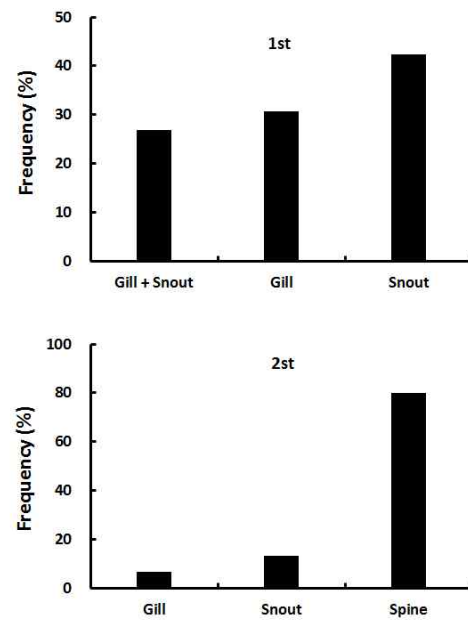


Fig. 18. Frequency of occurrence according to abnormal fish (gill + snout, gii, snout, spine) of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) seed.

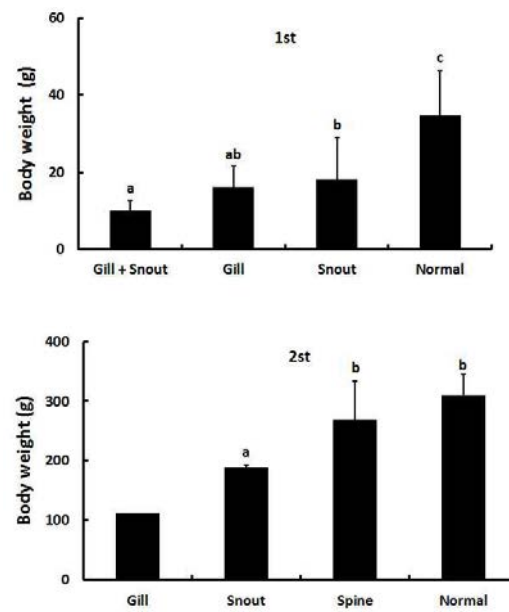


Fig. 19. A comparison of the growth according to abnormal (gill + snout, gii, spine) and normal fish of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) seed.

제3절. 부시리 중간 육성어 성장 및 경제성 분석

1. 중간어 성장 특성

가. 지하해수 공급에 따른 중간어 성장

지하해수를 이용한 부시리 종묘의 성장 특성 조사를 위한 실험어는 2014년도에 생산한 치어(체중 89.84 ± 0.66 g)를 이용하여, 콘크리트 8 m³ 수조에 동일한 밀도로 150마리를 수용하였다. 실험구는 지하해수, 혼합수(지하해수+자연수), 자연해수 실험구를 설정하여 2반복으로 실시하였다. 유수량은 72 L/min, 광조건은 조도 100 Lux에서 12시간 명기, 12시간 암기(L:D=12:12) 조건에서 10주간 사육하였다. 사육환경은 수온, 염분, 용존산소 및 pH를 조사하였고, 사육어의 사료공급은 상업용 EP 사료(유레카, 넘치 3호)를 1일 4회 만복이 되게 공급하였다.

성장률 조사를 위해 실험어는 MS-222 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 마취 후 개체별 체중을 측정하였다. 실험 종료 후 각 실험구별 증체율(weight gain, WG), 일간성장률(specific growth rate, SGR), 사료효율(feed efficiency, FE), 사료섭취율(daily feed intake, DFI), 생존율(survival) 및 비만도(condition factor, CF) 값을 계산하였다.

실험기간 동안의 지하해수, 혼합수 및 자연해수 실험구의 수온은 각각 $18.5 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, $21.0 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ 및 $23.6 \pm 1.7^{\circ}\text{C}$, 염분은 각각 $16.0 \pm 0.7\text{‰}$, $24.0 \pm 0.6\text{‰}$ 및 $31.6 \pm 0.6\text{‰}$, 용존산소는 각각 8.6 ± 0.8 , 7.8 ± 0.7 및 7.1 ± 0.5 , pH는 각각 8.2 ± 0.4 , 8.3 ± 0.4 및 8.4 ± 0.3 이었다.

사육수에 따른 종묘의 성장 특성을 조사한 결과(Table 4)에서, 증체율(WG)은 지하해수 실험구가 $287.95 \pm 8.88\%$ 로 가장 낮았으며, 혼합수와 자연수 실험구는 각각 $439.78 \pm 7.26\%$, $470.40 \pm 59.41\%$ 로 높은 성장을 보였다($P < 0.05$). 또한 일간성장률(SGR)과 사료섭취율(DFI)에서도 증체율(WG)과 같은 경향이었다. 반면에 생존율, 사료효율(FE) 및 비만도(CF)는 모든 실험구간에서 유의적인 차이는 없었다($P > 0.05$).

자바리(*Epinephelus bruneus*) 치어 단계인 0년어의 증체율(WG)은 사육수온 26, 23, 19 및 16°C 에서 각각 105.8, 56.4, 9.4 및 -3.2%으로 수온이 낮을수록 낮아지는 경향이 뚜렷하였다 보고하고 있다(Yang et al., 2014). 본 연구에서 19, 21 및 24°C 수온에서 증체율(WG)이 각각 288.0, 439.8 및 470.4%로 부시리는 성장이 좋은 어종으로 판단된다. 또한 지하해수와 자연해수를 혼합 공급한 실험구(염분, 24‰)가 자연해수를 공급한 실험구(32‰)에 비해 증체율(WG), 일간성장률(SGR)에서 차이가 없었다. 앞으로 제주도 육상수조에서 부시리를 양식할 경우, 지하해수와 자연해수를 혼합 공급하는 것이 여름철 고수온, 겨울철 저수온에 대한 영향을 최소화 할 수 있는 하나의 양식방법으로 판단된다.

Table 4. Growth performances of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) seed in underground seawater (US), mixed seawater (US+NS) and natural seawater (NS) for 10 weeks

	Underground seawater (US) (16.0±0.7 psu, 18.5±0.3℃)	Mixed seawater (US+NS) (24.0±0.6 psu, 18.5±0.3℃)	Natural seawater (NS) (31.6±0.6 psu, 21.0±0.9℃)
Initial body weight (g/fish)	89.84±0.66 ^{ns}	89.02±2.43	90.98±1.98
Final body weight (g/fish)	348.55±10.56 ^a	480.42±6.67 ^b	519.36±42.76 ^b
Survival (%)	94.74±1.24 ^{ns}	95.18±0.62	92.98±2.48
Weight gain (%) ¹	287.95±8.88 ^a	439.78±7.26 ^b	470.40±59.41 ^b
Specific growth rate (%) ²	1.91±0.03 ^a	2.37±0.02 ^b	2.45±0.15 ^b
Feed efficiency (%) ³	67.20±2.11 ^{ns}	73.85±1.36	70.02±5.21
Daily feed intake (%) ⁴	2.33±0.03 ^a	2.54±0.05 ^b	2.65±0.01 ^b
Condition factor ⁵	1.10±0.00 ^{ns}	1.10±0.00	1.00±0.00

Values (mean ± SE) in each row a different superscript are significantly different (P<0.05).
ns = values are not significant (P>0.05).

Values are means ± SE (n=2).

¹(Final fish wt. - initial fish wt.) × 100/initial fish wt.

²[Ln (final fish wt.) - Ln (initial fish wt.)] × 100/days of feeding.

³Wet weight gain × 100/feed intake.

⁴Feed intake × 100/[(initial fish wt. + final fish wt. + dead fish wt.) × days reared/2].

⁵[Fish weight (g)/fish length (cm)³] × 100.

나. 먹이 종류에 따른 중간어 성장

생사료와 EP사료의 공급에 따른 부시리 중간 육성어의 성장 특성 조사를 위한 실험어는 2015 년도에 생산한 치어(체중 212.7±2.5 g)를 이용하여, 콘크리트 8 m³ 수조에 동일한 밀도로 100마 리로 하여 2반복으로 6주간 사육하였다. 사육환경은 수온, 염분, 용존산소 및 pH를 조사하였고, 사육어의 사료공급은 1일 2회 반복이 되게 공급하였다. 성장률 조사를 위해 실험어는 MS-222 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 마취 후 개체별 체중을 측정하였다. 실험 종 료 후 각 실험구별 증체률(weight gain, WG), 일간성장률(specific growth rate, SGR), 사료효 율(feed efficiency, FE), 사료섭취률(daily feed intake, DFI), 생존율(survival) 및 비만도 (condition factor, CF) 값을 계산하였다.

실험기간 6주 동안의 사육환경, 수온, 염분, 용존산소(DO) 및 pH는 생사료 실험구는 각각 20.9±0.7℃, 33.3±0.6 psu, 10.0±2.0 mg/L 및 8.5±1.6였고, EP사료 실험구는 각각 21.3±0.5℃, 33.0±0.6 psu, 10.2±2.3 mg/L 및 7.7±1.4였다.

부시리 중간어의 생사료와 EP사료 공급에 따른 사육결과는 Table 5에 나타내었다. 증체율 (WG), 일간 성장률(SGR) 및 사료 섭취율(DFI)은 생사료 실험구가 각각 97.5±0.6%, 2.4±0.0%, 13.2±0.4%로 EP사료 실험구 각각 79.4±0.3%, 2.1±0.0%, 4.4±1.2%에 비해 높은 반면, 사료 효율 (FE)은 EP사료 실험구가 56.10±1.47%로 생사료 실험구에 비해 3.3배 높았다(P<0.05). 생존율 및

비만도(CF)는 실험구간에서의 유의한 차이는 없었다($P>0.05$).

Table 5. Growth performances of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) seed in raw and EP feed for 6 weeks.

	Raw feed	EP feed
Survival (%)	98.1±2.7 ^{ns}	97.7±2.1
Initial body weight (g/fish)	213.9±2.5 ^{ns}	211.4±2.5
Final body weight (g/fish)	422.4±6.2 ^b	379.2±5.1 ^a
Weight gain (%) ¹	97.5±0.6 ^b	79.4±0.3 ^a
Specific growth rate (%) ²	2.4±0.0 ^b	2.1±0.0 ^a
Feed efficiency (%) ³	16.95±0.51 ^a	56.10±1.47 ^b
Daily feed intake (%) ⁴	13.2±0.4 ^b	4.4±1.2 ^a
Condition factor ⁵	1.2±0.0 ^{ns}	1.3±0.1

Values (mean ± SE) in each row a different superscript are significantly different ($P<0.05$). ns = values are not significant ($P>0.05$).

Values are means ± SE (n=2).

¹(Final fish wt. - initial fish wt.) × 100/initial fish wt.

²[Ln (final fish wt.) - Ln (initial fish wt.)] × 100/days of feeding.

³Wet weight gain × 100/feed intake.

⁴Feed intake × 100/[(initial fish wt. + final fish wt. + dead fish wt.) × days reared/2].

⁵[Fish weight (g)/fish length (cm)³] × 100.

2. 중간 육성어 모니터링 및 손익분기점 분석

가. 중간 육성어 모니터링

2014년에 생산한 부시리 종자 12,000마리(체중 24.7±12.6 g)는 추자도 가두리, 위미 가두리 및 표선 육상수조에 개소당 4,000마리, 2015년에 생산한 부시리 종자 5,500마리(체중, 30.3±11.7 g)는 종달가두리에 분양하였고, 2월 간격으로 성장도를 조사하였다(Fig. 20).

2014년 분양한 3개소의 사육한 결과, 위미가두리 사육어는 피부 기생충인 *Benedenia seriolae*로 인해 먹이섭취 부진으로 성장이 둔화, 표선육상수조는 사육수온이 17.5~17.8℃으로 지난해 11월부터 성장 저하와 감모, 추자도 가두리는 돌풍으로 가두리가 유실되었다.

반면, 연구소(위미)에서는 EP사료 공급으로 24.7±12.6 g의 종자가 26개월 동안에 2,813.9± 516.3 g으로 성장하였다.

2015년 분양어는 육상수조(13 m × 8 m × 1.3 m, 유효수량 100 m³)에서 자연해수와 지하해수를 혼합한 사육수온 21.5℃에서 12월까지 384.9±70.6 g까지 성장과 폐사 개체는 거의 나타나지 않았으나, 2016년 1월에 육상수조에서 가두리로 이동에 의한 스트레스로 먹이 섭취 저하, 10월 태풍(차바)의 영향으로 사육어가 대부분 폐사되었다.

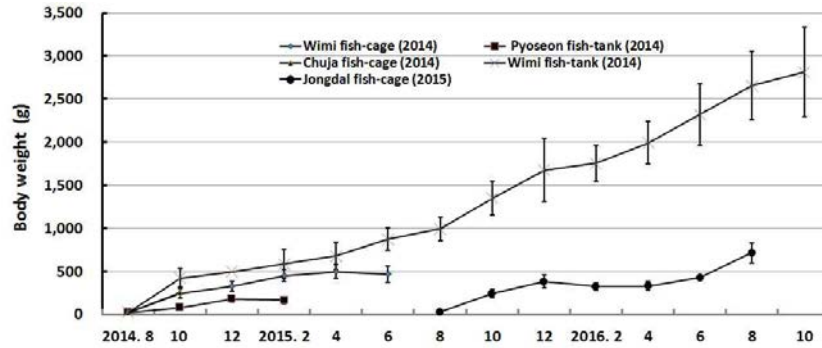


Fig. 20. Growth changes of yellowtail kingfish (*S. lalandi*) seed during from 2014 to 2016.

나. 손익분기점 분석

부시리 양식경영이 성립 가능한 생산량 및 양식규모를 예측하기 위해, 손익분기점 분석을 실시하였는데 선행되었던 실험의 결과에 따라, 1.676 kg의 부시리를 입식해 3 kg까지 성장시킨 후 시장에 판매할 경우 필요한 비용과 이익을 산출하였다.

이때, 어장의 크기는 1 ha, 선박은 5 m³ 규모의 어장관리선 1대를 기준으로 분석하였으며, 어장과 선박은 영어기반에 해당하는 초기투자비용이므로 고정비로 구분하였다.

양식량을 늘려감에 따라 증가되는 변동비에는 사료비를 비롯한 양식비용이 포함되었으며, 부시리 양식초기에 시설하는 가두리 설비의 경우에는 양식 비용 중 시설관리비 항목에 감가상각비가 포함되는 것으로 간주하고 별도로 삽입하지 않았다.

실험결과에 기초하여 부시리 양식을 실시할 경우, 1 ha의 해상가두리 양식장에서 2.17 m³ 수준을 생산할 때가 이익이 0이 되는 손익분기점인 것으로 나타났으며, 따라서 부시리 양식경영시 2.71 m³ 이하의 생산량 수준에서는 경영이 성립하지 못하는 것으로 분석되었다(Fig. 21).

또한 부시리 양식에서 양식어가 평균 어가소득 43,976천 원을 달성하기 위해서는 8.65m³ 이상을 생산해야하는 것으로 분석되었는데 즉, 1 ha의 어장에서 8.65 m³ 이상의 부시리를 생산해야 정상적인 경영이 가능할 것으로 판단되었다.

본 예측의 경우 시험양식의 결과만을 활용했기 때문에, 무게 1.676 kg의 부시리 치어 비용과 폐사율, 사료의 종류별 사용량 등 정확한 비용항목을 적용하지 못한 한계점이 있다.

향후 이와 같은 한계점을 개선한 분석이 추가적으로 필요할 것이며, 부시리 양식의 안정적인 경영을 위해서는 사료계수, 양식기간 등과 같이 실제 양식경영에서 중요시되는 항목의 효율성 증대를 위한 연구 및 기술개발이 필요하다.

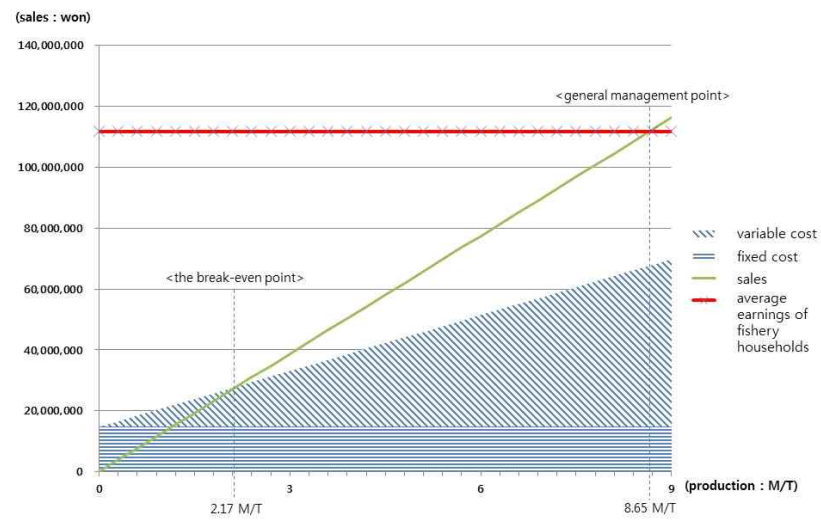


Fig. 21. The prediction results of the break-even point and general management point for yellowtail kingfish (*S. lalandi*) aquaculture.

제 4절 방어 어미 산란유도에 미치는 광반응 효과

1. LED 파장별 방어의 성숙과 항산화 및 면역 관련 유전자의 발현 변화 분석

특정 파장의 조사에 따른 방어의 성숙 유도 효과와 항산화 및 면역력 증진 효과를 확인해 보기 위하여, 세 개의 실험구[대조구: 일반등+자연수, 실험구 I (Green 파장+자연수), 실험구 II (Green 파장+가온)]로 구분한 후, quantitative real-time PCR (QPCR)을 통하여 성숙과 항산화 그리고 면역 관련 유전자의 월별 발현량 변화를 비교하였다.

가. 재료 및 방법

1) 실험어

본 연구에서는 성숙한 암컷 방어(8.76±1.43 kg)를 실험에 사용하였으며, 성 성숙은 방어를 해부한 후, 생식소의 외형과 정액 및 난모세포의 존재 여부 등을 확인하여 결정하였다. 본 실험을 위하여 실험어를 세 그룹[대조구: 형광등 + 자연수, 실험구 I (Green 파장+자연수), 실험구 II (Green 파장+가온)]으로 구분하여 사육하였으며, 형광등 및 green 파장의 LED는 각각 27 W 및 0.5 W/m²의 세기로 일정하게 조절하였다(Fig 5).

2) 샘플링

샘플링은 월별로 각각의 실험구에서 세 마리씩 채집하여 혈액 및 조직(시상하부, 뇌하수체, 간, 생식소)을 채취하였다. 조직을 채취한 후, total RNA 추출 시까지 -80 °C의 초저온 냉동고에 보관하였다. Heparin sodium을 처리한 주사기를 사용하여 미부혈관으로부터 혈액을 채취한 후, 원심분리(4 °C, 10000 × g, 10분)하여 얻은 혈장을 호르몬 분석 전까지 -80 °C의 초저온 냉동고에 보관하였다. 샘플링 시 체장과 무게를 측정하였으며, 생식소는 Bouin액에 고정하여 조직 관찰에 사용하였다.

3) RNA 추출 및 cDNA 합성

Trizol reagent (Gibco/BRL, USA)를 이용하여 방어의 다양한 조직에서 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 농도 및 순도는 260과 280 nm 파장의 UV spectroscopy에 의해 결정되었다. 2.5 µg의 total RNA를 template로 하여 oligo-d(T)₁₅ anchor primer와 M-MLV reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 RT-PCR 분석 시까지 -20 °C 냉동고에 보관하였다.

4) Quantitative PCR (QPCR)

각각의 실험구별 방어의 성 성숙 유전자(GnRH, GTH, FSH, LH, ER 및 VTG) 및 항산화 유전자(SOD, CAT 및 GPX) mRNA 발현 변화를 QPCR을 이용하여 조사하였다. QPCR의 수행을 위한 primer는 방어의 염기서열을 기초로 Beacon Designer software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 디자인하였다(Table 6). QPCR은 Bio-Rad CFX96™ Real-time PCR Detection

System (Bio-Rad, USA)와 iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA)를 이용하여 95 ℃에서 5분간 초기 열변성 1회, 95 ℃에서 20초간 열변성, 55℃에서 20초간 primer 결합을 총 40회 실시하였다. 내부표준 유전자로는 β -actin을 사용하여 PCR이 진행됨에 따라 calculated threshold cycle (Ct) 값을 결정하여 β -actin에 대한 발현량을 정량화하였다.

Table 6. Primers for QPCR in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)

Genes	Primer	Sequence
GnRH (KT229623)	Forward	5'-AAG AGG GAA CTG GAT AGT CT-3'
	Reverse	5'-TCC TTT CAT TCT ATA AAT TCT GGC-3'
GTH α (KF719239)	Forward	5'-CAT GGG CTG TGA GGA ATG-3'
	Reverse	5'-CGT GAT GTT CTT TGG GTT GT-3'
FSH β (KF719237)	Forward	5'-ACC GTC GTC AAC ATC TCT-3'
	Reverse	5'-CCA GTC GTA GTC GCT GAT-3'
LH β (KF719238)	Forward	5'-ACT GTC CTC CTG ATG TGA-3'
	Reverse	5'-CTA GTA GTA GAA AAG TAT GTC ATT CA-3'
ER (KT229624)	Forward	5'-GAT GTC CCT CAC CAA CCT-3'
	Reverse	5'-AGA ATC TCC AGC CAG CAG-3'
VTG (KT229625)	Forward	5'-CTA CAG CAT ACA ATT ACA TCT TGA A-3'
	Reverse	5'-GTG AAA GGT GAG AAC TGG AT-3'
SOD (KT229626)	Forward	5'-ACA TTA CAG AGG AGA AAT A-3'
	Reverse	5'-CACC ATT TGG AGA GAG GTT-3'
CAT (KT229627)	Forward	5'-ACC CAG ATT ATG CAA TTG G-3'
	Reverse	5'-GAC CAA ACC TTG GTC AGA-3'
GPX (KT229628)	Forward	5'-CCC TAT TGA ACG ACC CAA AG-3'
	Reverse	5'-GGA ACC TTC TGC TGT AAC G-3'
β -actin (AB179839)	Forward	5'-CGA CCT CAC AGA CTA CCT-3'
	Reverse	5'-TTG ATG TCA CGC ACG ATT-3'

5) 혈중 GnRH, FSH, LH, E₂ 및 VTG 농도 분석

혈장 내 GnRH, FSH, LH, E₂ 및 VTG 농도 분석은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit [GnRH (catalog no. CSB-E08810f; Cusabio Biotech, China), FSH (catalog no. MBS035576; Mybiosource, USA), LH (catalog no. MBS283097; Mybiosource, USA), E₂ (catalog no. MBS283228; Mybiosource, USA), VTG (catalog no. CSB-E14116Fh; Cusabio Biotech, China)를 이용하여 측정되었다. 각각의 특이적인 항체(GnRH, FSH, LH 및 E₂ 및 VTG)가 코팅되어 있는 plate에 혈장 50 μ L와 50 μ L의 HRP-conjugate를 각각의 well에 넣은 후, 혈장 내 호르몬이 plate에 붙어 항체와 반응할 수 있도록 37 ℃에서 2시간 동안 반응시켰다. Plate를 washing한 후, 50 μ L의 substrate A와 substrate B를 37 ℃에서 15분간 반응시켰으며, stop solution 50 μ L를 분주하

여 반응을 정지시켰다. 마지막으로 각각의 농도는 450 nm 파장을 이용하여 흡광도를 측정하였다.

6) SOD, CAT, GPX, cortisol 활성 및 glucose 농도 분석

혈장은 heparin sodium을 처리한 주사기를 사용하여 어류의 미부혈관으로부터 혈액을 채취한 후, 원심분리(4 °C, 10000 × g, 10분)하여 상등액을 분석용 샘플로 사용하였다. 혈장 내 SOD, CAT 및 GPX 분석은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit [SOD (catalog no. CSB-E15929Fh; Cusabio Biotech, China), CAT (catalog no. CSB-E15928Fh; Cusabio Biotech, China), GPX (catalog no. MBS024388; Mybiosource, USA), cortisol (catalog no. CSB-E08487f; Cusabio Biotech, China)]를 이용하여 측정하였다. 각각의 특이적인 항체(SOD, CAT, GPX 및 cortisol)가 코팅되어 있는 plate에 혈장 50 µL와 50 µL의 HRP-conjugate를 각각의 well에 넣은 후, 혈장 내 호르몬이 plate에 붙어 항체와 반응할 수 있도록 37 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. Plate를 washing한 후, 50 µL의 substrate A와 substrate B를 37 °C에서 15분간 반응시켰으며, stop solution 50 µL를 분주하여 반응을 정지시켰다. 마지막으로 각 농도는 450 nm 파장을 이용하여 흡광도를 측정하였다. 또한 혈장 내 glucose 농도는 biochemistry autoanalyzer (Fuji Dri-Chem 4000; Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

7) H₂O₂ 농도 및 지질과산화(Lipid hydroperoxide, LPO) 수치 분석

H₂O₂ 농도는 Nouroozadeh (Nouroozadeh et al., 1994)의 실험 방법을 응용한 Peroxid Detect kit (Sigma, St Louis, MO, USA)을 이용하여 측정하였다. H₂O₂ 농도는 560 nm의 흡광도에서 측정하였으며, 농도는 표준 곡선을 이용하여, nM/ml로 표현하였다.

LPO는 polyunsaturated fatty acid (PUFA) hydroperoxides의 분해된 산물인 malondialdehyde (MDA)와 4-hydroxynonenal (4-HNE)의 양을 측정하여 지질과산화 정도를 파악하는데, 본 연구에서는 Lipid Hydroperoxide Assay Kit (catalog no. MBS013426; Mybiosource, USA)를 이용하여 측정하였다. 흡광도는 500 nm 파장에서 측정하였으며, 단위는 MDA and 4-HNE/g protein (nM/g)로 나타내었다.

8) Melatonin, lysozyme 및 endorphin 활성 분석

혈중 melatonin, lysozyme 및 endorphin 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit [melatonin (catalog no. MBS013211; Mybiosource, USA), lysozyme (catalog no. CSB-E17296Fh; Cusabio Biotech, China), endorphin (catalog no. MBS036835; Mybiosource, USA)]를 이용하여 450 nm 흡광도에서 측정하였다.

10) 통계 분석

각 실험 결과로부터 얻어진 자료 값 사이의 유의차 유무는 Statistical Package for the Social Sciences software program (SPSS; version 10.0)에 의한 One-way ANOVA 및 Newman Keul's

multiple range test를 실시하여 평균 간의 유의성($P < 0.05$)을 검정하였다.

나. 결 과

1) LED 광원에 의한 방어의 성숙 관련 유전자 및 호르몬 변화

Green LED 파장 및 형광등 조명이 방어의 성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 성 성숙 유전자(GnRH, GTH, FSH, LH, ER 및 VTG) mRNA의 발현과 혈장에서 각각의 호르몬 변화를 관찰하였다(Fig. 22~25).

모든 실험구에서 3월에 가장 높은 값을 나타내었으나 이후 감소하는 경향이 관찰되었으며, 광원별 실험구별로 분석한 결과 대조구(형광등)에 비하여 Green과 Green+가온 실험구에서 성 성숙 유전자의 발현과 혈장 호르몬이 유의적으로 높게 관찰되었다. 그러나 Green과 Green+가온 실험구 사이에서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

본 연구결과와 유사한 연구 보고로 Volpato (2000, 2004)에 의하면 *Matrinxa fish*, *Brycon cephalus*을 Green 파장에 노출시킨 결과 높은 수치의 성숙/번식 관련 호르몬이 검출되어, Green 파장이 어류의 번식 능력을 증진시키는 효과가 있다고 보고한 바 있다.

따라서 본 연구결과도 이전의 연구결과와 유사하게 Green 파장이 방어의 성숙에 긍정적인 영향을 미치고 있는 것으로 사료된다.

2) LED 조명에 의한 방어의 항산화 관련 유전자 및 호르몬 변화

Green LED 파장 및 대조구인 형광등 조명이 방어의 항산화 능력에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 항산화 유전자(SOD, CAT 및 GPX) mRNA 발현과 혈장 내 항산화 효소의 활성 변화를 관찰하였다(Fig. 26~28).

그 결과, 대조구(형광등)에 비하여 Green과 Green+가온 실험구에서 항산화 유전자 발현 및 혈장 내 항산화 효소의 활성이 유의적으로 낮게 관찰되었다. 그러나 Green과 Green+가온 실험구 사이에서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

본 연구와 유사한 연구로 Choi et al. (2012)의 연구에 의하면 cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*를 12일간 절식시켜 산화스트레스를 유발시킨 후, 형광등과 Red, Green 및 Blue LED에 노출시킨 결과, Green LED 실험구에서는 대조구에 비하여 항산화 유전자 및 항산화 단백질 발현이 유의적으로 감소하였다고 보고한 바 있다.

따라서 본 연구결과도 이전의 연구와 유사하게 Green 파장의 빛은 방어의 산화스트레스를 감소시키는 역할을 하는 것으로 보인다.

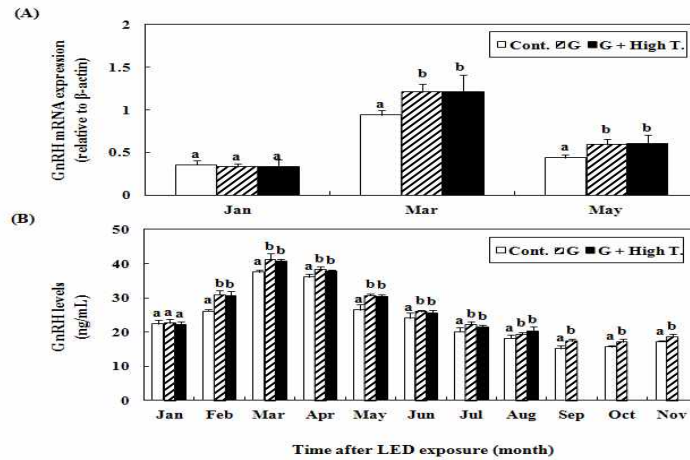


Fig. 22. Expression and activity of GnRH in the brain and plasma of yellowtail exposed to green light-emitting diodes (G), green LED + high-water temperature (G + High T.) and white fluorescent bulb (Cont.). (A) GnRH mRNA levels relative to β -actin mRNA levels in the same sample. (B) The plasma activity of GnRH was also analyzed with a plate reader. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

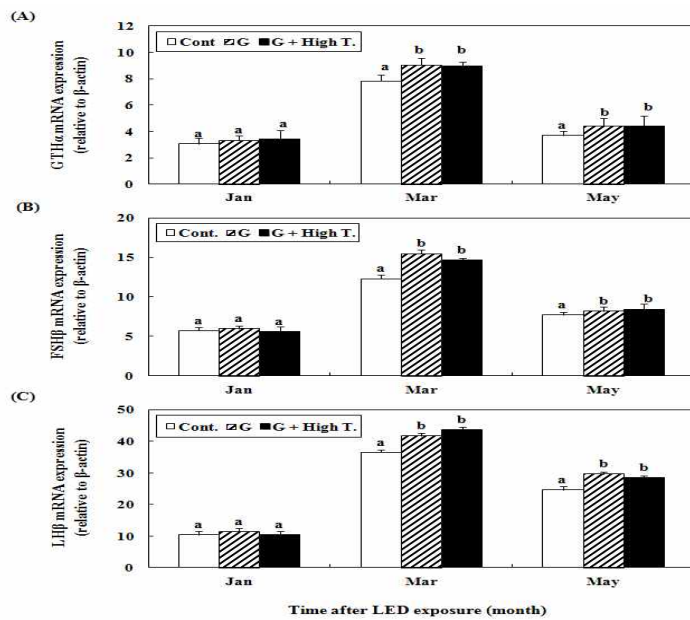


Fig. 23. Expression GTHs (GTH α (A), FSH β (B), and LH β (C)) in the pituitary of yellowtail exposed to green light-emitting diodes (G), green LED + high-water temperature (G + High T.) and white fluorescent bulb (Cont.). GTHs mRNA levels relative to β -actin mRNA levels. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

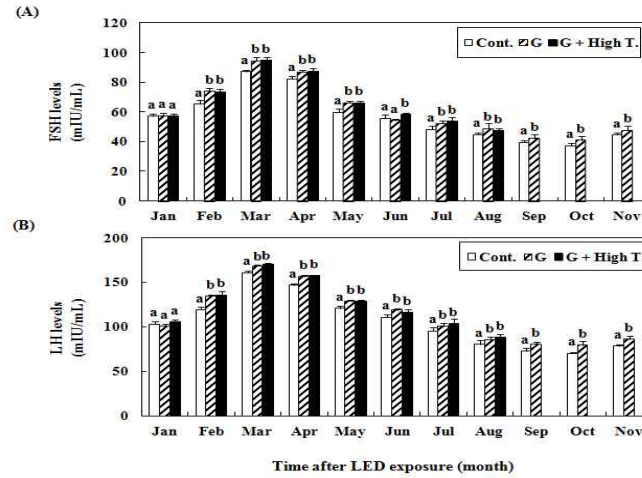


Fig. 24. Levels of plasma FSH (A) and LH (B) of yellowtail exposed to green (G) light-emitting diodes (LEDs), green LED + high-water temperature (G + High T.), and white fluorescent bulb (Cont.). Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

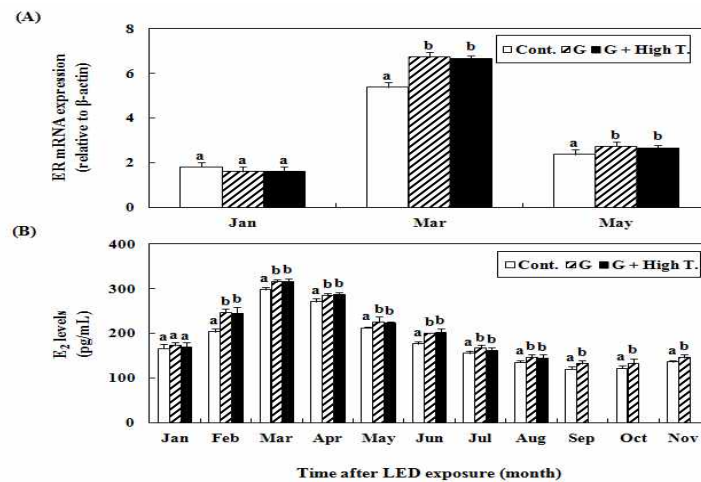


Fig. 25. Expression and activity of ER and E₂ in the gonad and plasma of yellowtail exposed to green light-emitting diodes (G), green LED + high-water temperature (G + High T.) and white fluorescent bulb (Cont.). (A) ER mRNA levels relative to β -actin mRNA levels in the same sample. (B) The plasma activity of E₂ was also analyzed with a plate reader. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

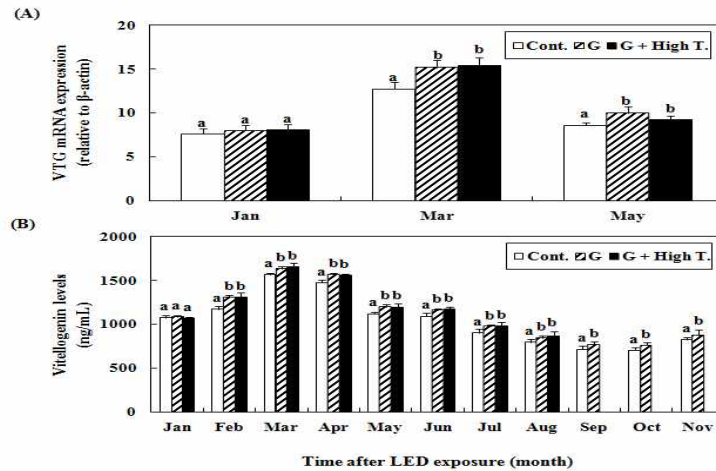


Fig. 26. Expression and activity of VTG in the liver and plasma of yellowtail exposed to green light-emitting diodes (G), green LED + high-water temperature (G + High T.) and white fluorescent bulb (Cont.). (A) VTG mRNA levels relative to β -actin mRNA levels in the same sample. (B) The plasma activity of VTG was also analyzed with a plate reader. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

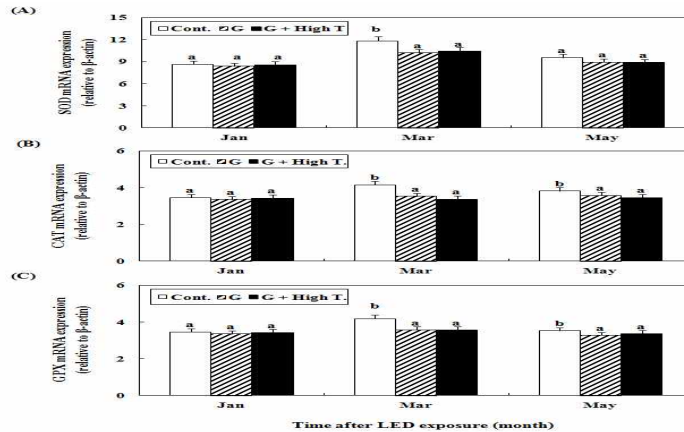


Fig. 27. Expression SOD (A), CAT (B), and GPX (C) in the liver of yellowtail exposed to green light-emitting diodes (G), green LED + high-water temperature (G + High T.) and white fluorescent bulb (Cont.). mRNA levels relative to β -actin mRNA levels. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

3) LED 조명에 의한 방어의 활성산소(H_2O_2), 지질과산화(LPO), cortisol 및 glucose 농도 변화
Green LED 파장과 대조구인 형광등 조명이 방어 체내의 활성산소, 지질과산화, cortisol 및 glucose 생성에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 혈장 내 H_2O_2 및 LPO 활성과 cortisol 및 glucose 농도 변화를 관찰하였다(Fig. 29~30).

그 결과, 대조구(형광등)에 비하여 Green과 Green+가온 실험구에서 H_2O_2 , LPO 활성 수치, cortisol 및 glucose 농도 모두가 유의적으로 낮게 검출되었다. 그러나 Green과 Green+가온 실험구 사이에서는 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

본 연구와 유사한 연구로 Shin et al. (2011)의 연구에서는 clownfish, *Amphiprion clarkii*를 다양한 LED 파장에 노출시킨 결과, 대조구에 비하여 H_2O_2 농도가 유의적으로 감소하였다고 보고한 바 있다.

따라서 본 연구에서도 이전의 연구와 유사하게 Green 파장 빛은 방어에서도 체내 활성산소를 감소시켜 지질과산화를 억제시킨 것으로 사료된다.

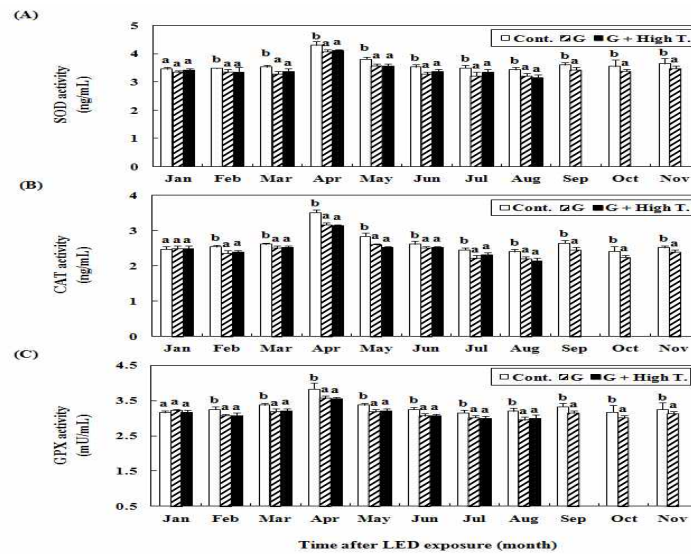


Fig. 28. Levels of plasma SOD (A), CAT (B), and GPX (C) of yellowtail exposed to green (G) light-emitting diodes (LEDs), green LED + high-water temperature (G + High T.), and white fluorescent bulb (Cont.). Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

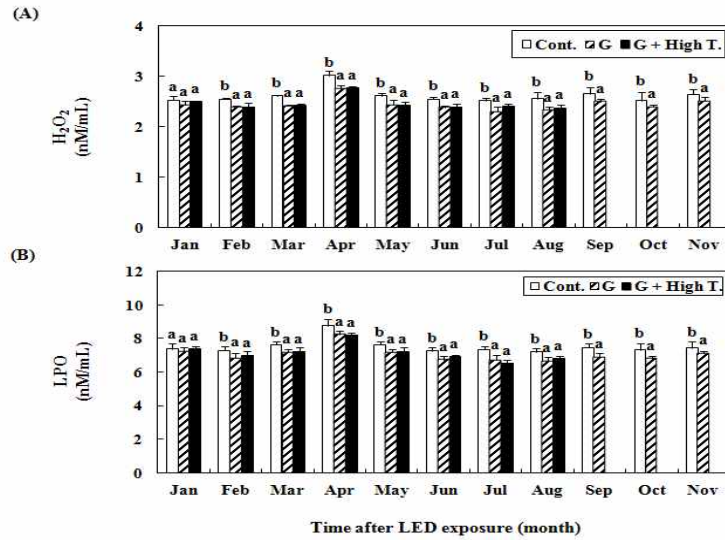


Fig. 29. Levels of plasma H_2O_2 (A) and LPO (B) of yellowtail exposed to green (G) light-emitting diodes (LEDs), green LED + high-water temperature (G + High T.), and white fluorescent bulb (Cont.). Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

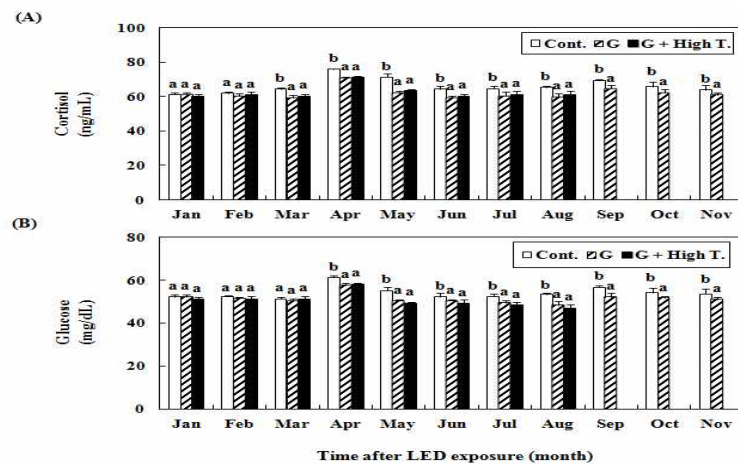


Fig. 30. Levels of plasma cortisol (A) and glucose (B) of yellowtail exposed to green (G) light-emitting diodes (LEDs), green LED + high-water temperature (G + High T.), and white fluorescent bulb (Cont.). Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

4) LED 조명에 의한 방어의 면역 관련 호르몬 변화

Green LED 파장 및 대조구인 형광등 조명이 방어에 면역력에 미치는 정도를 파악하기 위하여, 체내에서 면역력을 증진시키는 호르몬인 melatonin, lysozyme 및 endorphin의 활성 변화를 관찰하였다(Fig. 31).

그 결과, 대조구(형광등)에 비하여 Green과 Green+가온 실험구에서 melatonin, lysozyme 및 endorphin수치가 유의적으로 높게 관찰되었다. 그러나 Green과 Green+가온 실험구 사이에서는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

본 연구결과와 유사한 연구로 Choi et al. (2012)는 cinnamon clownfish를 절식시켜 산화스트레스를 유발시킨 후, 형광등과 Red, Green 및 Blue LED에 노출시켜 혈중 lysozyme 농도를 조사한 결과, Red LED 실험구에서는 lysozyme의 농도가 유의적으로 감소하였으나, Green 실험구에서는 유의적으로 증가하였다고 보고한 바 있다.

따라서 본 연구도 이전 연구와 유사하게 Green 파장의 빛은 방어에서도 면역력을 증진시키는 효과가 있는 것으로 판단된다.

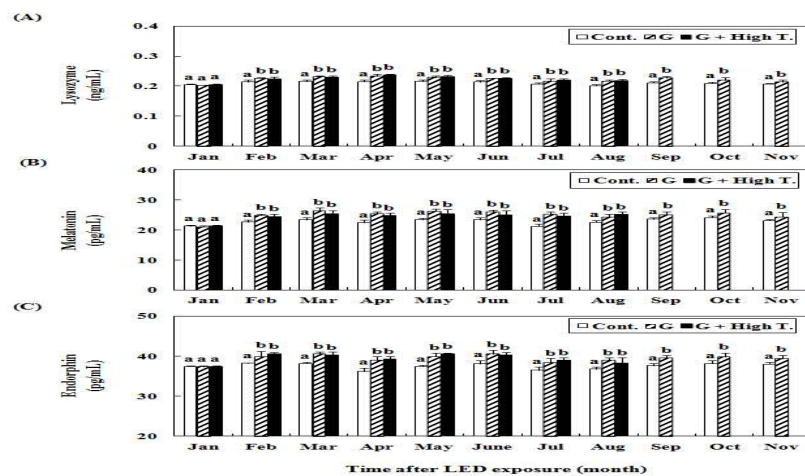


Fig. 31. Levels of plasma lysozyme (A), melatonin (B), and endorphin (C) of yellowtail exposed to green (G) light-emitting diodes (LEDs), green LED + high-water temperature (G + High T.), and white fluorescent bulb (Cont.). Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

2. LED 파장별 방어의 성숙과 면역 관련 호르몬 분석

특정 파장의 조사에 따른 방어의 성숙 유도 효과와 항산화 및 면역력 증진 효과를 확인해 보기 위하여, 세 개의 실험구[대조구: 자연광+자연수, 실험구 I (Green 파장+가온수), 실험구 II(형광등 + 가온수)]로 구분한 후, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 기법을 활용하여 성숙과 면역 관련 호르몬의 월별 변화를 비교하였다.

가. 재료 및 방법

1) 실험어

성숙한 암컷 방어(평균 15.7 ± 1.34 kg)를 실험에 사용하였다. 본 실험을 진행하기 위하여 실험어를 세 그룹[대조구: 자연광+자연수, 실험구 I (Green 파장+가온수), 실험구 II (형광등+가온수)]으로 구분하여 사육하였으며, 형광등 및 green LED 파장 실험구는 각각 27 W 및 0.5 W/m^2 의 세기로 일정하게 조절하였다(Fig. 5).

2) 샘플링

월별로 각각의 실험구에서 세 마리씩을 채집하여 체장과 무게를 측정하였으며, 혈액을 샘플링하였다. Heparin sodium을 처리한 주사기를 사용하여 미부혈관으로부터 혈액을 채취한 후, 원심분리(4°C , $10000 \times g$, 10분)하여 얻은 혈장을 호르몬 분석 전까지 -80°C 의 초저온 냉동고에 보관하였다.

3) 혈중 GnRH, FSH, LH, E_2 및 VTG 농도 분석

혈장 내 GnRH, FSH, LH, E_2 및 VTG 농도 분석은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit [GnRH (catalog no. CSB-E08810f; Cusabio Biotech, China), FSH (catalog no. MBS035576; Mybiosource, USA), LH (catalog no. MBS283097; Mybiosource, USA), E_2 (catalog no. MBS283228; Mybiosource, USA), VTG (catalog no. CSB-E14116Fh; Cusabio Biotech, China)를 이용하여 측정되었다. 각각의 특이적인 항체(GnRH, FSH, LH 및 E_2 및 VTG)가 코팅되어 있는 plate에 혈장 $50 \mu\text{L}$ 와 $50 \mu\text{L}$ 의 HRP-conjugate를 각각의 well에 넣은 후, 혈장 내 호르몬이 plate에 붙어 항체와 반응할 수 있도록 37°C 에서 2시간 동안 반응시켰다. Plate를 washing한 후, $50 \mu\text{L}$ 의 substrate A와 substrate B를 37°C 에서 15분간 반응시켰으며, stop solution $50 \mu\text{L}$ 를 분주하여 반응을 정지시켰다. 마지막으로 각각의 농도는 450 nm 파장을 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4) Melatonin 및 lysozyme 활성 분석

혈중 melatonin 및 lysozyme 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit [melatonin (catalog no. MBS013211; Mybiosource, USA) 및 lysozyme (catalog no. CSB-E17296Fh; Cusabio Biotech, China)]를 이용하여 각각 405 nm 파장을 이용하여 흡광도를 측정하였다.

나. 결 과

1) LED 광원에 의한 방어의 성숙 관련 호르몬 변화

Green LED 파장 및 형광등 조명이 방어의 성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 혈장에서 각각의 성 성숙 호르몬(GnRH, GTH, FSH, LH, E_2 및 VTG) 변화를 관찰하였다(Fig. 32~35).

모든 실험구에서 4월에 가장 높은 값을 나타내었으나 이후 감소하는 경향이 관찰되었다.

Green LED+가온(19°C) 실험구에서는 5월 초에 산란한 것으로 확인되었으나, 대조구(자연광) 및 형광등+가온(19°C) 실험구에서는 산란이 확인되지 않았다.

광원별 실험구별로 분석한 결과, 산란이 확인되기 직전인 4월에는 대조구 및 형광등+가온 실험구에 비하여 Green LED+가온(19℃) 실험구에서 성 성숙 호르몬의 농도가 유의적으로 높게 관찰되었다.

본 연구결과와 유사한 연구 보고로 Volpato (2000, 2004)에 의하면 *Matrinxa* fish, *Brycon cephalus*을 Green 파장에 노출시킨 결과 높은 수치의 성숙/번식 관련 호르몬이 검출되어, green 파장이 어류의 번식 능력을 증진시키는 효과가 있다고 보고한 바 있다.

따라서 본 연구결과도 이전의 연구결과와 유사하게 green 파장이 방어의 성숙 및 산란유도에 긍정적인 영향을 미치고 있는 것으로 사료된다.

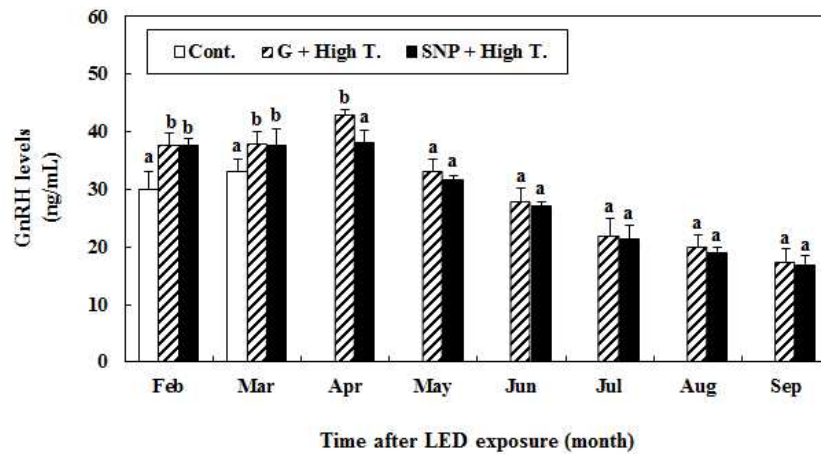


Fig. 32. Activity of GnRH in plasma of yellowtail exposed to green light-emitting diodes (G), green LED + high-water temperature (G + High T.), white fluorescent bulb (SNP) + high-water temperature (SNP + High T.) and natural light (Cont.). The plasma activity of GnRH was analyzed with a plate reader. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

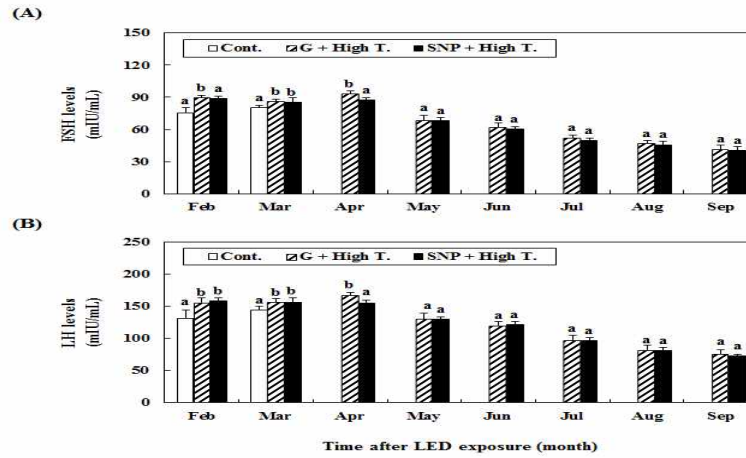


Fig. 33. Activity of FSH (A) and LH (B) in plasma of yellowtail exposed to green (G) light-emitting diodes (LEDs), green LED + high-water temperature (G + High T.), white fluorescent bulb (SNP) + high-water temperature (SNP + High T.) and natural light (Cont.). The plasma activity of FSH and LH was analyzed with a plate reader. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

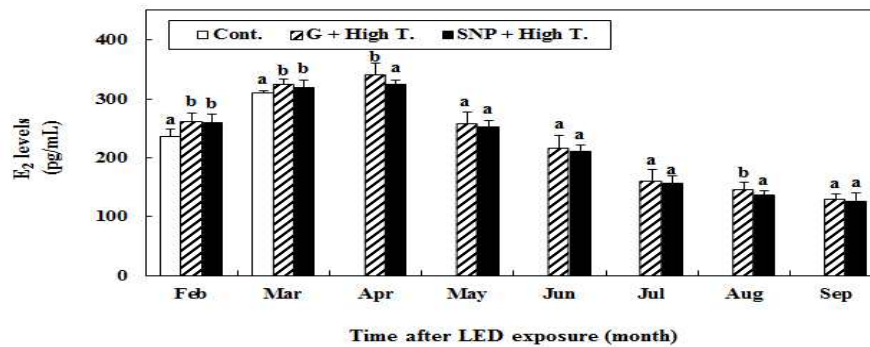


Fig. 34. Activity of E₂ in plasma of yellowtail exposed to green (G) light-emitting diodes (LEDs), green LED + high-water temperature (G + High T.), white fluorescent bulb (SNP) + high-water temperature (SNP + High T.) and natural light (Cont.). The plasma activity of E₂ was analyzed with a plate reader. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

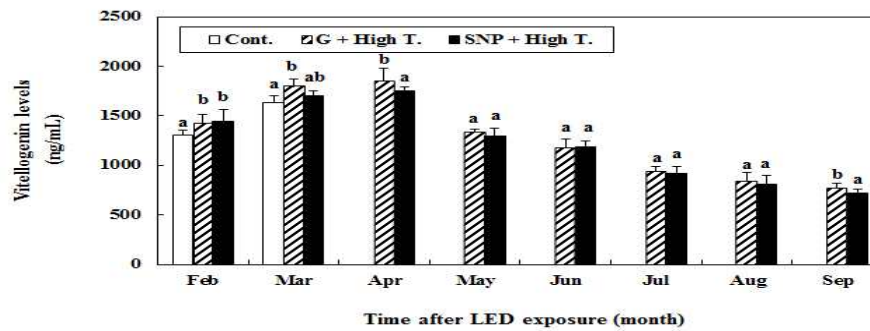


Fig. 35. Activity of VTG in plasma of yellowtail exposed to green (G) light-emitting diodes (LEDs), green LED + high-water temperature (G + High T.), white fluorescent bulb (SNP) + high-water temperature (SNP + High T.) and natural light (Cont.). The plasma activity of VTG was analyzed with a plate reader. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

2) LED 조명에 의한 방어의 면역 관련 호르몬 변화

Green LED 파장 및 대조구인 형광등 조명이 방어에 면역력에 미치는 정도를 파악하기 위하여, 체내에서 면역력을 증진시키는 호르몬인 melatonin 및 lysozyme의 활성 변화를 관찰하였다(Fig. 36).

그 결과, 4월부터 9월까지 대조구(자연광) 및 [형광등+가온(19°C)] 실험구에 비하여 Green+가온(19°C) 실험구에서 혈장 내 melatonin 및 lysozyme 수치가 유의적으로 높게 관찰되었다.

본 연구결과와 유사한 연구로 Choi et al. (2012)는 cinnamon clownfish를 절식시켜 산화스트레스를 유발시킨 후, 형광등과 Red, Green 및 Blue LED에 노출시켜 혈중 lysozyme 농도를 조사한 결과, Red LED 실험구에서는 lysozyme의 농도가 유의적으로 감소하였으나, Green 실험구에서는 유의적으로 증가하였다고 보고한 바 있다.

또한, Wang et al. (2008)은 sea cucumber, *Apostichopus japonicas*을 대상으로 한 염분변화 연구에서, 급격한 염분변화 요인은 체내에서 산화스트레스를 유발시켜 혈중 lysozyme의 농도를 감소시킨다고 보고한 바 있다.

따라서 본 연구도 이전 연구와 유사하게 green 파장의 빛은 방어에서도 면역력을 증진시키는 효과가 있는 것으로 판단된다.

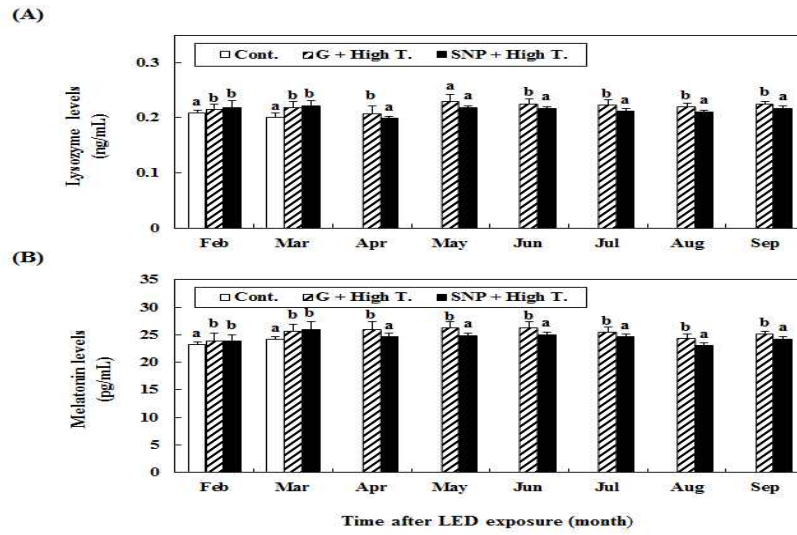


Fig. 36. Levels of plasma lysozyme (A), melatonin (B) of yellowtail exposed to green (G) light-emitting diodes (LEDs), green LED + high-water temperature (G + High T.), white fluorescent bulb (SNP) + high-water temperature (SNP + High T.) and natural light (Cont.). The plasma levels of lysozyme and melatonin was analyzed with a plate reader. Values with letters indicate significant differences among lights of different wavelengths ($P < 0.05$). All values are means \pm SE ($n = 3$).

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절. 목표 달성도

세부 연구 목표	달성도 (%)	자체평가
방어 종자생산 연구	80%	<ul style="list-style-type: none"> - 산란기 전후 조직학적 분석을 통하여 생식소 발달 파악 - 환경조절에 의한 성숙 유도 및 수정란 생산 - 종묘생산은 부화 18일까지 사육후 폐사
부시리 종자생산 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 자연산란에 수정란 생산 및 산란 특성 파악 - 종자생산 기술력 확보 - 밀도와 수온에 따른 성장 및 종묘 기형 조사
부시리 중간 육성어 성장 및 경제성 분석	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 지하해수 공급에 따른 중간어 성장 특성 파악 - 먹이 종류(생사료, EP 사료)에 따른 중간어 성장 특성 파악 - 중간 육성어 현장 모니터링 및 손익분기점 분석
방어 산란유도에 미치는 광반응 효과	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 방어 및 부시리의 성 성숙 관련 유전자의 클로닝 - Green LED 광원 노출에 따른 성숙 관련 호르몬의 활성화 및 성숙 관련 유전자의 발현량 변화 조사 - LED 광원이 방어 및 부시리에 미치는 산화스트레스 정도와 스트레스 관련 호르몬의 농도 변화를 비교 분석 - LED 파장의 종류(Green와 Red)와 세기(0.3과 0.5 W/m²) 따른 방어 및 부시리의 체내 면역력에 영향을 미치는 호르몬 농도 변화 조사 - 방어 및 부시리의 항산화 관련 유전자의 클로닝 - LED 파장의 종류(Green와 Red)와 세기(0.3과 0.5 W/m²) 따른 방어 및 부시리의 체내 항산화 능력에 영향을 미치는 호르몬 농도 변화와 관련 유전자의 발현량 변화 조사

제 2절 연구개발 성과

1. 연구 성과

(단위 : 건수, cc, 마리)

연도	논 문		유전자 등록	분양		기타
	SCI	비SCI		수정란	종묘	
2014	0	1	0	2,000	12,000	
2015	2	0	14 (방어 6, 부시리 8)	0	5,500	
2016	1	2	0	4,500	0	

2. 논문 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자			
2104	사육밀도와 수온에 따른 자바리(<i>Epinephelus bruneus</i>)의 적응특성	양상근	이영돈	김승철, 문태현, 김중만, 김성훈, 이치훈	한국수산과학회지	47(6), 847-852	
2015	Effects of waterborne selenium on toxic and physiological stress response in goldfish, <i>Carassius auratus</i>	Young Jae, Choi	Cheol Young, Choi	Sang-Geun, Yang, Min-Min, Jeong, Bong-Seok, Kim	Molecular and Cellular Toxicology	11: 35-46	SCI
2015	Time-related effects of various LED light spectra on reproductive hormones in the brain of the Goldfish, <i>Carassius auratus</i>	Cheol Young, Choi	Cheol Young, Choi	Sang-Geun, Yang, Bong-Seok, Kim	Biological Rhythm Research	46: 671-682	SCI
2016	Management of Sexual Maturation and Natural Spawning of Captive-Reared Yellowtail Kingfish, <i>Seriola lalandi</i> , in an Indoor Rearing Tank	Sang Geun Yang	Young-D on Lee2	Seung Cheol Ji, Sang Gu Lim, Sang Woo Hur, Minhwan Jeong, Chi Hoon Lee, Bong Seok Kim	Development and Reproduction	20(2) 141~147	
2016	Morphological Development of Embryo, Larvae and Juvenile in Yellowtail Kingfish, <i>Seriola lalandi</i>	Sang Geun Yang	Young-D on Lee	Sang Woo Hur, Seung Cheol Ji, Sang Gu Lim, Bong Seok Kim, Minhwan Jeong, Chi Hoon Lee	Development and Reproduction	20(2) 131~140	

2016	The effect of green and red light spectra and their intensity on the oxidative stress and non-specific immune responses in gold-striped amberjack, <i>Seriola lalandi</i>	Young Jae, Choi	Cheol Young, Choi	Bong-Seok, Kim, Sang Geun, Yang	Marine and Freshwater Behaviour and Physiology	49: 223-234	SCI
------	---	-----------------	-------------------	---------------------------------	--	-------------	-----

3. 부시리 수정란 분양

업 체 명	대표자	분양량(cc)	분양시기	비 고
동 북 수 산	김광배	2,000	2014. 5. 10-5.30	종묘생산용
동 북 수 산	김광배	4,500	2016. 6. 4-6.29	종묘생산용

4. 부시 종묘 분양

업체명	대표자	분양물량(마리)	분양일자	비 고
개 인	문영일	4,000	2014. 7. 31	
해미래영어조합법인	배경왕	4,000	2014. 8. 11	
추자도 수협	이정호	4,000	2014. 8. 13	
진일영어조합법인	김영태	5,500	2015. 9. 8	
계	-	17,700	-	

제 5장 연구개발결과의 활용계획

1. 신규과제 “방어 인공종자 생산기술 개발(2017~2020)”의한 방어 인공종자 기술 개발

- 방어의 인공종자 생산기술을 확보하여 미래 수산물 수요에 대비

2. 부시리 수정란 및 인공종자 생산기술

- 민간 종묘생산 업체 수정란 분양 및 인공종자생산 기술 매뉴얼 제공

3. 방어의 수정란 생산기술

- 안정적인 방어 수정란 확보 및 참다랑어 등 대형어종 수정란 생산에 활용

4. LED 파장에 따른 방어의 성숙 및 면역력 증가 효과 연구

- 넙치 대량폐사 저감을 위해 LED 불빛 장치로 면역력 증가, 스트레스 감소에 따른 성장과 질병 제어 적용

제 6장 참고문헌

- Baglolle CJ, Murray HM, Goff GP and Wright GM. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. J. Fish Biol. 51, 120-134.
- Brooks S, Tyler CR, Sumpter JP. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? Rev Fish Biol Fish 7, 387-416.
- Canino MF and Bailey KM. 1995. Gut evacuation of walleye pollock larvae in response to feeding conditions. J. Fish Biol. 46, 389-403.
- Cahu C and Zambonino Infante J. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200, 161-180.
- Chen BN, Qin JG, Kumar MS, Hutchinson W and Clarke S. 2006. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture 256, 489-501.
- Choi, C.Y., Shin, H.S., Choi, Y.J., Kim, N.N., Lee, J., Kil, G-S., 2012. Effects of LED light spectra on starvation-induced oxidative stress in the cinnamon clownfish *Amphiprion melanopus*. Comp. Biochem. Physiol. A 163, 357-363.
- Ebisu R and Tachihara K. 1993. Mortality caused by cannibalism in seed production of gold striped amberjack *Seriola lalandi*. Bulletin Nagasaki Prefecture Institute Fisheries 19, 1-7 (in Japanese).
- Fugita S and Yogata T. 1984. Induction of Ovarian Maturation, Embryonic Development and Larvae and Juveniles of the Amberjack, *Seriola aureovittata*. Japanese J Ichthyol 30, 426-434.
- Govoni JJ. 2004. The development of form and function in fishes and the question of larval adaptation. In: Govoni, J.J. (Ed.), The development of form and function in fishes and the question of larval adaptation. American Fisheries Society, Symposium, vol. 40. Bethesda, Maryland, pp. 1-7.
- Kamler E. 1992. Early Life History of Fish: an Energetics Approach. Chapman and Hall, New York.
- Kolkovski S. 2004. Evaluation of Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) grow out in land-based and seacage systems and broodstock management. Report submitted to the aquaculture Development Council of Western Australia.
- Kolkovski S and Sakakura Y. 2007. Yellowtail kingfish, from larvae to mature fish - problems and opportunities. World Aquac 38, 44-48.
- Mizuta Y. 1981. On the seedling production of buri, *Seriola quinqueradiata*. Saibai Gyogyo

- Gijyutsu Kaihatsu Kenkyu (Technical Reports of Japanese Sea Ranching Programs) 10, 85-97 (in Japanese).
- Moran D, Smith CK, Gara B and Poortenaar CW. 2007. Reproductive behaviour and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). Aquaculture 262, 95-104.
- Nakada M. 2000. Yellowtail and related species culture. In: Stickney, R.R. (Ed.). Encyclopedia of Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc. New, York, NY. pp. 1007-1036.
- NFRDI. 2004. Commercial fishes of the coastal & offshore waters in Korea. pp. 162.
- Otterlei E, Nyhammer G, Folkvord A and Stefansson SO. 1999. Temperature and size-dependent growth of larval and early juvenile atlantic cod (*Gadus morhua*): a comparative study of norwegian coastal cod and northeast Arctic cod. Can J Fish Aquat Sci 56, 2099-2111.
- Sakakura Y and Tsukamoto K. 1999. Ontogeny of aggressive behaviour in schools of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Environmental Biology of Fishes 56, 231-242.
- Seoka M, Kurata M, Hatanaka Y, Biswas AK, Ji SC and Kumai H. 2007. Possible nutrients in artemia affecting the larval growth of pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Aquaculture Sci., 55-564.
- Shiozawa S, Takeuchi H and Hirokawa J. 2003. Improved seed production techniques for the amberjack, *Seriola dumerili*. Saibai Giken 31, 11-18. (in Japanese).
- Shin, H.S., Lee, J., Choi, C.Y., 2011. Effects of LED light spectra on oxidative stress and the protective role of melatonin in relation to the daily rhythm of the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. A 160, 221-228.
- Shin, H.S., Kim, N.N., Choi, Y.J., Habibi, H.R., Kim, J.W., Choi, C.Y., 2013. Light-emitting diode spectral sensitivity relationship with reproductive parameters and ovarian maturation in yellowtail damselfish, *Chrysiptera parasema*. J. Photochem. Photobiol. B 127, 108-113.
- Song YB, 2004. Induction of sexual maturation and early development of the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. Ph.D. Thesis, Jeju National University, Jeju, Korea.
- Stuart K and Drawbridge M. 2012. Spawning and Larval Rearing of California Yellowtail (*Seriola lalandi*) in Southern California. Bull Fish ResA gen 35, 15-21.
- Verakunpiriya V, Watanabe T, Mushiaki K, Kiron V, Satoh S and Takeuchi T. 1996. Effect of broodstock diets on the chemical components of milt and eggs produced by yellowtail. Fish Sci 62, 610-619.
- Volpato, G.L., 2000. Aggression among farmed fish. In: Flos, R., Creswell, L. (Eds), Aqua

- 2000: Responsible aquaculture in the new millennium: European Aquaculture Society Special publication, 28. Nice, France.
- Volpato, G.L., Duarte, C.R.A., Luchiari, A.C., 2004. Environmental color affects Nile tilapia reproduction. Braz. J. Med. Biol. Res. 37, 479-483.
- Wang, F., Yang, H., Gao, F., Liu, G., 2008. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. A 151, 491-498.
- Watanabe T and Kiron V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture 124, 223-251.
- Yamazaki H, Shiozawa S and Fujimoto H. 2002. Present status of seedling production of yellowtail at the japan sea farming association. Suisanzoshoku 50, 503-506. (in Japanese).
- Yang SG, Ji SC, Moon TS, Son MH, Kim KM, Hur SP, Lee CH and Lee YD. 2014. Adaptive Characteristics of the Longtooth Grouper *Epinephelus bruneus* according to Stocking Density and Water Temperature. Kor J Fish Aquat Sci 47(6), 847-852.
- Yoo SK. 1989. The coastal aquaculture. pp. 530-531.
- Zhenhua M. 2014. Food ingestion, prey selectivity, feeding incidence, and performance of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae under constant and varying temperatures Aquacult Int 22, 1317-1330.
- 代田昭彦. 1970. 魚類仔魚期の口徑に関する研究. 日水誌 36(4), 353-368.