

오이 잎에서 *Chlorella fusca* 처리에 의한 오이탄저병 발생 억제 기작Illustration of Disease Suppression of Anthracnose on Cucumber Leaves by Treatment with *Chlorella fusca*이윤주¹ · 고윤정¹ · 전용철^{1,2*}¹제주대학교 생명자원과학대학 생물산업학부 식물자원환경전공,²제주대학교 아열대농업생명과학연구소Yun Ju Lee¹, Yun Jung Ko¹, and Yong Chull Jeun^{1,2*}¹Major of Plant Resources and Environment, Faculty of Bioscience and Industry, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea²The Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Seogwipo 63604, Korea

*Corresponding author

Tel: +82-64-754-3319

Fax: +82-64-725-2351

E-mail: ycjeun@jejunu.ac.kr

Chlorella is known as chlorophyceae which can live autotrophically by photosynthesis, promote the growth of plants and suppress some plant diseases. However, a few researches in inhibition mechanism of plant diseases by *Chlorella* have been carried out. In this study cucumber leaves pre-treated with *Chlorella fusca* suspension were investigated whether anthracnose by *Colletotrichum orbiculare* is suppressed or not. Furthermore, in order to illustrate how the algae can restrain the anthracnose, the infection structures of *C. orbiculare* were observed on the cucumber leaves pre-treated with the algae. Consequently, appressorium formation rate was apparently reduced in the cucumber leaves pre-treated with *C. fusca* compared to untreated control one. Also, the numbers of conidia found at the inoculation sites were significantly reduced compared to untreated one. On the other hand, on the leaves pre-treated with Benomyl[®] appressorium formation were decreased remarkably and numbers of conidia were also reduced similar with those pre-treated with *C. fusca*. Based on these results, it was revealed that occurrence of anthracnose can be suppressed by *C. fusca* pre-treatment and suggested that biochemical or structural hinderance by *C. fusca* resulting in the decline of appressorium formation on the leaf surfaces may play an important role in the disease suppression.

Keywords: Algae, Biofungicide, *Colletotrichum orbiculare*, Fluorescence microscopy, Infection structures

Received August 17, 2016

Revised November 5, 2016

Accepted November 8, 2016

서 론

자낭균에 속하는 *Colletotrichum orbiculare*에 의해 발생하는 오이탄저병은 오이뿐 아니라 수박과 머스크멜론 등 박

과류에서도 피해를 입히는 매우 중요한 식물병이다(Agrios, 2005). 한국에서는 *Colletotrichum acutatum*에 의한 고추탄저병이 연중 생산량의 10% 이상 발생하는 병해로 고추에 매우 심각한 피해를 입히고 있으나(Kim 등, 2008) 오이탄저병에 의한 대발생 피해 사례는 최근까지 보고되지 않았다. 그러나 최근 기후변화로 인해 오이탄저병 발생에 적합한 기후 환경이 조성된다면 대발생할 가능성을 배제하기 어렵다. C.

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

©The Korean Society of Plant Pathology

©This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*orbiculare*는 식물체에 침입 과정에서 식물체표면에 부착기를 형성하며 부착기 내부의 멜라닌 층으로 인한 팽압을 유도해 식물체 내부로 침입하여 병을 발생시킨다고 알려져 있다(Agrios, 2005). 최근 *C. orbiculare*가 식물체 감염 시 초기에는 기주세포와 활물영양 관계를 이루고 2차 감염균사 발생 후에는 사물영양 단계를 이룬다고 알려져 있다(Gan 등, 2013).

우리나라에서는 오이탄저병에 대한 방제는 주로 농약에 의존하며 Benomyl®, Chlorothalonil®과 Kasugamycin®이 약제로 등록되어 있다. 그러나 최근 안전한 농산물을 찾는 소비자들의 요구에 따라 친환경농산물에 대한 관심이 증가하고 있다. 한국농촌경제연구원에서 발표된 자료에 따르면 친환경농산물은 2000년 대비 2010년에는 52배 증가하였으며 매년 51.6%의 급신장세를 보이고 있다고 보고되었다(Jeong 등, 2012). 친환경농산물을 생산하기 위해 미생물을 이용하여 식물병을 방제하기 위한 연구들이 많이 진행되고 있다.

클로렐라는 광합성을 통해 독립적으로 생활할 수 있는 녹조류로서 인체에 필요한 영양소인 단백질, 탄수화물, 색소, 비타민, 미네랄을 생산하는 원료가 되며(Mata 등, 2010), 바이오연료, 인간의 영양소, 동물의 먹이, 폐수정화, 농업적 활용 등으로 다양하게 적용되고 있다. 국외에서는 클로렐라를 농업적으로 활용하여 수확량 증가에 따른 소득이 증대되고 있는데, 클로렐라 추출물을 밀 엽면에 살포하였더니 수확량이 140% 증가되었고 비료로서도 유용하게 사용될 수 있다고 하였다(Safi 등, 2014; Shaaban, 2001). 국내에서도 클로렐라의 농업적 활용 가능성이 증가되고 있다. 예를 들면 가축인소에 영양원으로 공급되는 볏짚사일지리에 클로렐라를 처리하였더니 조단백질의 함량이 증가되는 것으로 나타났다(Choi 등, 2015). 또한 과수에서도 그 효과가 확인되었는데 거창지역 사과 과원에서 클로렐라를 처리한 결과 상품과 비율이 30% 증가하는 것으로 나타났다(Ha, 2015).

클로렐라를 농업에 보다 적극적으로 활용하기 위하여 클로렐라의 생물학적 특성을 조사하여 클로렐라의 배양조건을 밝혔으며(Kim 등, 2014a), 클로렐라 처리에 의한 콩나물의 생육촉진 효과와 항산화 능력 증진에 대한 연구결과를 보고하였다(Kim 등, 2015). 또한 클로렐라에 의한 작물의 저장성 병해 억제 효과에 대해서도 연구되었는데 딸기에 클로렐라를 처리하였더니 무처리구에 비해 저장성 병해가 약 74% 감소하는 것으로 나타났으며 엽채류의 경우도 클로렐라의 처리구에서 저장성 병해가 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(Kim 등, 2014b). 이는 클로렐라 처리가 친환경 농산물의 생육촉진과 기능성물질의 증대뿐만 아니라 식물병 발생을 억제하는 데도 효과적이라 할 수 있다.

그러나 클로렐라에 의한 식물병 발생 억제 기작에 대해서는 아직까지 연구가 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 클로렐라를 오이식물에 전처리하였을 때 부착기를 형성하는 식물병원균인 *C. orbiculare*와 오이식물과의 상호작용을 형광현미경을 통하여 관찰하였다. 또한 클로렐라를 이용한 식물병 방제 가능성을 알아보고자 오이탄저병 방제에 시판되는 살균제 Benomyl®을 전처리한 오이식물과도 비교하였다.

재료 및 방법

식물. 시판되고 있는 오이종자 중 오이탄저병에 감수성으로 공시한 오이품종 정선삼척(*Cucumis sativus* L; cv. Jeongseonsamcheok; Dongbu Farm Hannong Co., Ltd., Seoul, Korea)을 구입하여 실험에 사용하였다. 오이 종자를 발아시키기 위하여 Petri-dish에 filter paper (diameter 90 mm)를 넣고 멸균수 3 ml로 습윤 처리한 후 오이 종자를 넣고 25°C에서 24시간 동안 암배양하였다. 최아된 오이종자를 시판되는 원예용 상토(Tuksimi®; NongwoogreenTec, Suwon, Korea)가 채워진 플라스틱 포트(diameter 8 cm)에 파종하고 주간 25°C±1°C, 야간 18°C±1°C, 광주기 12:12가 유지되는 식물 배양실에서 재배하였으며 정식 후 10일 후인 제1엽이 완전히 전개된 직후의 식물에서 유사한 면적의 제1엽을 채취하여 실험재료로 사용하였다.

조류. *Chlorella fusca* CHK0059 균주를 국립농업과학원으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 이 조류를 배양하기 위해서 Bold's basal 배지(Thompson 등, 1988)와 BG11배지(Anderson, 2005; Stanier 등, 1971)의 질소원과 탄소원, 미량원소를 적절히 조화시켜 변형한 BGMM (BG11 Modified Medium)을 Kim 등(2014a)의 방법에 따라 작성하였다. *C. fusca*를 5% BGMM 고체배지에 3단 분리법으로 접종하여 28°C에서 5일간 배양하여 순수 분리하였다. 배양된 단일 균총을 기포발생기(SH-A2; Chosion Electric Appliance Factory, Beijing, China)가 설치된 배양용기에 담긴 BGMM 5%를 첨가한 액체배지에 재접종한 후 28°C, 5,000 lux에서 7일간 배양하였다. 클로렐라 처리를 위해서 hemocytometer (Hausser Scientific Inc., Horsham, PA, USA)를 이용하여 세포 수를 1.0×10⁷ cells/ml로 조정하였다. 준비된 현탁액에 Tween 20을 0.01%의 농도로 첨가한 후 분무기(Aervoe Industries Inc., Gardnerville, NV, USA)를 이용하여 오이 식물에 처리하였다.

병원균. 오이에 탄저병을 일으키는 *C. orbiculare* 균주

를 potato dextrose agar (PDA; Becton, Dickson and Company, Claix, France) 배지에 접종하고, 배양기(DA-MIL-2500; DONG-A, Siheung, Korea)로 옮겨 25°C에서 10일간 배양하였다. 분생자충(acervuli)이 형성된 탄저병균의 plate에 멸균수 10 ml를 넣고 loop를 이용하여 포자 현탁액을 작성하였다. 포자현탁액은 miracloth (Calbiochem corporation, La Jolla, CA, USA)로 여과하여 균사를 제거한 후 hemocytometer를 이용하여 포자 농도를 1.0×10^5 conidia/ml로 조정하여 사용하였다. 식물에 접종을 하기 위해서는 병원균이 오이 잎에 잘 부착되도록 포자현탁액에 Tween 20을 0.01%의 농도로 첨가한 후 분무기를 이용하여 접종하였다.

C. fusca 전처리와 C. orbicularis 접종. 실내실험을 통해 *C. orbicularis*에 대한 직접적인 항균활성이 확인된 *C. fusca*가 오이식물에서도 오이탄저병 발생을 억제하는지 여부를 확인하기 위해 *in vivo* 실험을 실시하였다. *C. fusca* 현탁액의 농도를 2.0×10^5 , 2.0×10^6 , 2.0×10^7 cells/ml로 조정한 후 준비된 오이식물 엽면에 분무 살포하였다. 이 조류를 처리한 오이식물체를 상온에서 5시간 동안 건조시킨 후 *C. orbicularis* 현탁액(1.0×10^5 conidia/ml)을 분무하여 접종하였다. *C. orbicularis*가 접종된 오이식물을 상대습도 99%가 유지되는 항온습습기(DA-DC; DONG-A)에서 28°C, 24시간 동안 보관한 후 주간 25°C±1°C, 야간 18°C±1°C가 유지되는 식물 배양실로 옮기고 10일 동안 병 발생 여부를 관찰하였다. 한편, *C. fusca*의 오이탄저병 발생 억제 정도를 보다 정확하게 측정하기 위하여 *C. fusca* 현탁액 대신 살균수 그리고 시판 중인 benzimidazole계 살균제인 Benomyl® (a.i. 50%, WP; Agrotech, Seoul, Korea)을 0.7 g/l 농도로 각각 처리하였다. 병 발생 정도는 병원균 접종 10일 후에 병반수를 계수하여 측정하였다. 실험은 2주일 간격으로 총 3번을 실시하였다. 각 실험마다 처리구당 5개의 식물을 반복하여 15개의 식물체를 사용하였다.

C. orbicularis의 감염구조 관찰. *C. fusca*에 의한 *C. orbicularis*의 감염 억제 여부를 알아보기 위해 *C. orbicularis*의 감염구조를 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 살균수, *C. fusca*, Benomyl®을 전처리하고 *C. orbicularis*를 접종한 후 1, 3, 5일 간격으로 오이 잎을 채취하여 Jeun 등(2000)이 보고한 방법에 따라 시료를 작성하였다.

오이탄저병에 감염된 오이 잎의 병반 부위(diameter 9 mm)를 채취하여 2% glutaraldehyde를 포함한 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2)에 2시간 동안 고정된 후 동일한 phosphate buffer로 10분 동안 각각 3회 세척하였다. 오이 탄저병균의 세

포벽을 염색하기 위해 0.2% diethanol (UVtex-2B; Polysciences Europe GmbH, Muellheim, Germany)을 포함한 phosphate buffer에 20분 동안 염색하고 phosphate buffer로 10분 동안 3회 세척하였다. 염색을 마친 식물조직을 slide glass로 올려놓고 70% glycerol을 한 방울 떨어뜨린 후 cover glass로 mounting 하였다. 각 시료들은 형광 필터(exciter filter, BP 400-440; interference beam splitter, FT 460; barrier filter, LP 470)가 갖추어진 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 *C. orbicularis*의 감염구조를 관찰하였고 병원균의 포자, 발아관 그리고 부착기를 계수하였고 관찰된 포자수에 대한 발아율(=발아관 수/포자 수)과 발아관에 대한 부착기 형성률(=부착기 수/발아관 수)을 산정하였다. 실험은 2주일 간격으로 3번의 분리된 접종 실험을 실시하였으며 각 실험마다 처리구별로 오이식물 5개를 준비하였고 각 엽에서 임의로 3개 부분을 채취하여 관찰하였다.

통계분석. 살균수, *C. fusca*, Benomyl®을 전처리한 후 오이탄저병을 접종한 오이 잎에서 조사된 *C. orbicularis*의 전체 포자수, 발아된 포자수 및 형성된 부착기수의 각 처리구 평균 간의 차이에 의한 유의성 검정은 SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용한 Duncan의 다중검정방법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

오이식물체에 C. fusca 전처리에 의한 오이탄저병 발병 정도 억제. *C. fusca*의 직접적인 항균활성이 오이탄저병 발생을 억제하는지 여부를 알아보기 위해 오이식물에 *C. fusca*를 처리한 잎과 처리하지 않은 잎에 *C. orbicularis*를 접종한 후 나타난 오이탄저병의 병반수를 조사하였다.

무처리한 오이 잎에서의 병반 형성은 병원균 접종 후 3일째부터 작은 반점들이 조금씩 보이기 시작해 5일째부터 병반이 뚜렷하게 나타났으며 병반의 모양은 경계가 명확하지 않은 원형의 겹둥근무늬로 나타났다. 접종 10일 후 병이 진전되면서 작은 병반들의 크기가 증가되고 합쳐지면서 잎의 부정형 원형병반으로 점점 확대되었다(Fig. 1A-a).

*C. fusca*를 전처리한 오이 잎에서는 처리한 *C. fusca*의 농도가 높아질수록 오이탄저병의 병반 수가 감소하는 경향을 보였다. *C. fusca* 농도가 10^5 cells/ml인 현탁액을 처리한 잎에서는 처리를 하지 않은 무처리 잎에 비해 병원균 접종 10일 후에 약 56% 병반 수가 감소하였다. 그러나 *C. fusca* 현탁액 농도가 10^7 cells/ml 현탁액을 전처리한 잎에서는 병반 수가 더

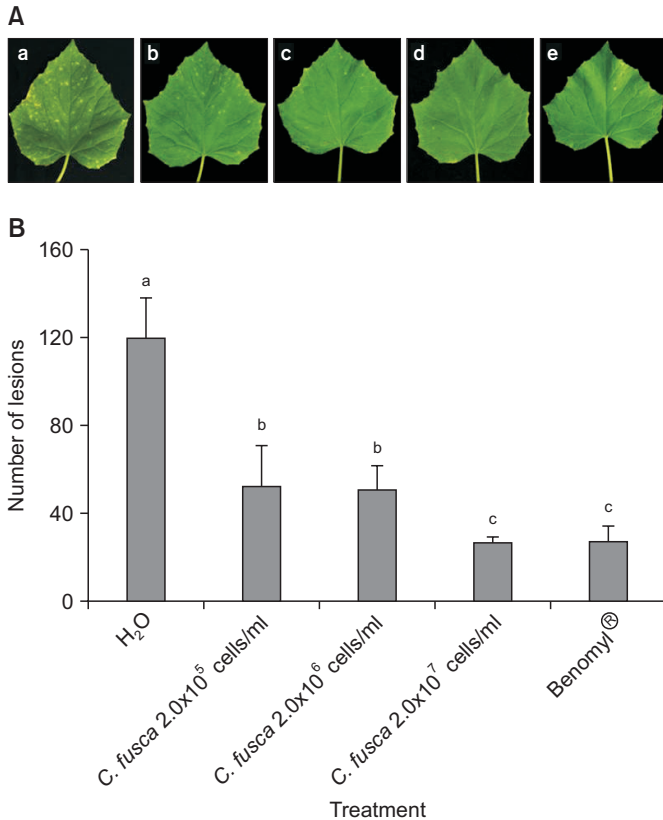


Fig. 1. (A) Disease severity on cucumber leaves pre-treated with H₂O (a), suspension of *Chlorella fusca* at concentration with 2.0x10⁵ cells/ml (b), 2.0x10⁶ cells/ml (c), and 2.0x10⁷ cells/ml (d) and a commercial fungicide Benomyl[®] (e) at 6 days after inoculation with anthracnose pathogen *Colletotrichum orbiculare*. The suspension of *C. fusca* were treated at 5 hours before the fungal inoculation. The concentration of *C. orbiculare* and the Benomyl[®] (a.i. 50%, WP) were 1.8x10⁵ conidia/ml and 0.7 g/l, respectively. (B) The lesion number was counted at 10 days after inoculation with *C. orbiculare*. The vertical bars indicate the standard deviation of 3 replications. Different letters on the columns indicate significant differences ($P < 0.001$) according to Duncan's multiple range test.

속 감소되어 약 78%까지 감소하였다(Fig. 1A-d). 또한, 형성된 병반의 크기가 작아서 시간 경과에 따라 병반이 합쳐지는 양상은 나타나지 않았다. 따라서 *C. fusca* 현탁액 처리에 의해 오이탄저병의 발생이 억제됨을 알 수 있었다.

한편, *C. fusca*의 오이 탄저병 억제효과를 시판농약과 비교하기 위하여 benzimidazole계 Benomyl[®] 수화제를 오이 잎에 동일한 방법으로 전처리한 후 형성된 병반 수를 조사하였다. 시판 농약을 전처리한 오이 잎에서 무처리구에 비해 병반 수가 77.0% 적게 나타났으며 이는 *C. fusca*를 10⁷ cells/ml로 처리했을 때와 유사한 억제효과가 있는 것으로 조사되었다(Fig. 1B).

조류에 의해 식물병이 억제되는 사례는 이미 보고되어 있

다. 주로 해초로 불리는 바다 조류에서 항균활성을 지닌 물질이 발견되었으며 이들의 추출물에 의해 식물병이 억제되었다고 보고되었다(Kulik, 1995). 최근 보고에 따르면 건조된 클로렐라를 포도묘목에 처리하였더니 유묘기에 생육이 촉진되었으며 포도나무에 GFLV를 매개하는 *Xiphinema*의 개체 수가 감소되었다(Bileva, 2013). 또한 엽채소나 딸기를 저장하기 전에 *C. fusca*와 같은 속인 *C. vulgaris* CHK008을 엽면처리하면 저장성이 현저하게 향상되는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2014b). 이러한 클로렐라의 생육촉진 효과, 직접적 항균활성 뿐만 아니라 식물의 방어반응인 유도저항성의 발현에 관한 연구도 진행되었다. Lee와 Ryu (2016)에 따르면 *Arabidopsis*에 *C. fusca*를 처리하고 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*를 접종한 후 RNA-seq를 진행한 결과 *C. fusca*를 처리한 *Arabidopsis*에서 ROS와 식물방어유전자의 발현은 *C. fusca*에 의해 저항성이 유도된 결과라고 보고하였다.

그러나 *C. fusca*에 의해 식물병 발생이 억제되는 기작에 대해서는 뚜렷하게 알려져 있지 않다. 따라서 이번 연구에서는 *C. fusca*를 전처리하고 병원균을 접종한 오이잎의 형태학적 변화를 형광현미경으로 관찰하였다.

C. orbiculare의 감염구조 관찰. *C. fusca*에 의한 오이 탄저병 발생 억제 원인을 보다 정확하게 알아보기 위해 오이잎에서 *C. orbiculare*의 감염 부위를 접종 후 시간별로 *C. orbiculare*의 포자수, 발아율과 부착기 형성률을 형광현미경을 이용하여 조사하였다.

무처리한 오이 잎에 *C. orbiculare*를 접종한 다음 1일 후에 접종한 잎의 표면을 관찰하였더니 약 60개/시료의 *C. orbiculare* 포자가 관찰되었고 그 중 80% 이상이 발아되었다(Fig. 2A, 3A, B). 많은 경우 발아 직후 부착기를 형성한 포자가 많이 관찰되었고, 관찰된 전체 포자 중 35% 정도가 부착기를 형성하였다(Fig. 2A, 3C). 접종 후 3일째에는 포자수와 포자의 발아율 그리고 부착기 형성률에는 1일째에 비해 뚜렷한 차이가 없었다(Fig. 2D, 3A, B). 접종 후 5일째에도 관찰된 포자수, 포자의 발아율 그리고 부착기 형성률에는 별다른 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3A, B). 이는 병원균이 식물과 접촉한 후 포자가 발아하고 식물체에 침입하기 위한 부착기 형성이 접종 후 24시간 이내에 이루어진다고 볼 수 있다.

*C. fusca*를 전처리한 오이 잎의 표면에서 조사된 *C. orbiculare*의 포자수는 접종 후 1일째 무처리한 잎에 관찰된 포자수에 비하여 유의성 있게 감소되었다. 이러한 포자수 감소는 접종 후 3일째와 5일째에서도 유사하게 조사되었다(Fig. 3A). 미생물을 전처리한 감귤잎에 더듬이병원균을 접종한

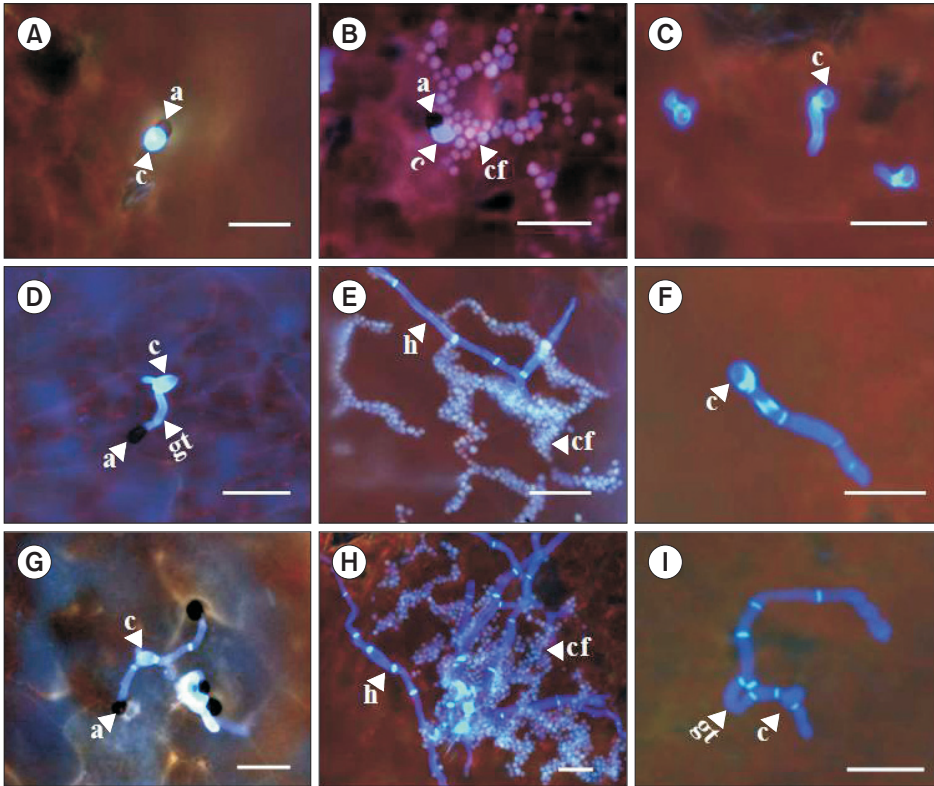


Fig. 2. Fluorescence microscopical observations of infection structure on the leaves of cucumber plants untreated (A, D, G), pre-treated with *Chlorella fusca* (B, E, H) and a commercial fungicide Benomyl® (C, F, I) after inoculation with *Colletotrichum orbiculare* for 1 days (A–C), 3 days (D–F), and 5 days (G–I). The concentration of *C. fusca*, *C. orbiculare* and Benomyl® (a.i. 50%, WP) were 1.0×10^7 cells/ml, 1.0×10^5 conidia/ml, and 0.7 g/l, respectively. All bars=50 μ m. a, appressorium; c, conidium; cf, *C. fusca*; gt, germ tube; h, hyphae.

결과 무처리에 비해 포자수와 발아율이 감소되는 것을 형광 현미경을 통해 확인하였으며 이는 미생물 처리가 식물의 접종 부위에 접종원의 밀도를 감소시킨다는 결과라고 판단된다(Kim 등, 2011). 따라서 *C. fusca*의 전처리에 의한 식물 접종 부위의 병원균 밀도 감소가 오이탄저병 억제에 한 원인으로 작용할 수 있다고 볼 수 있다. 이는 *C. fusca*의 전처리에 의한 식물 잎에서 공간적 경쟁에 의해 병원균의 밀도가 감소한 것으로 추측할 수 있지만 정확한 원인을 규명하기 위해서는 추가적인 생화학적 연구가 수행되어야 한다.

*C. fusca*를 처리한 잎에서 포자의 발아율은 접종 후 1일째 다소 감소하였다. 그러나 접종 후 3일째와 5일째에서는 무처리에 비해 포자 발아율은 감소되지 않았다(Fig. 3B). 따라서 *C. fusca*에 의한 오이탄저병의 병 억제는 포자 발아를 감소 시킴으로 나타나는 현상이라고 보기는 어렵다. 그러나 일반적으로는 포자 발아를 억제하여 병발생을 효과적으로 방제할 수 있다고 알려져 있다. 예를 들면, *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas putida* 등의 미생물제제에 의해 고추탄저병의 포자 발아가 억제되었으며(Kwak 등, 2012), 옥수수 밀둥썩음병 방제를 위해 *Bacillus methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*를 처리한 결과 포자 발아와 균사생장이 억제되어 약 70%의 방제가를 나타내는 것

으로 보고하였다(Han 등, 2015).

*C. fusca*에 의한 오이탄저병 발생 억제는 병원균의 부착기 형성 억제에 의한 것으로 여겨진다. *C. fusca*를 전처리한 오이 잎에서 병원균 접종 후 1일째 *C. orbiculare*의 부착기 형성이 무처리한 잎에 비해 급격하게 감소하였으며 그 이후에도 *C. fusca*를 전처리한 잎에서는 *C. orbiculare*의 부착기를 관찰하기 어려웠다(Fig. 2B, E, H, 3C). 부착기는 탄저병균을 포함한 몇몇 식물병원균이 식물체를 침입하기 위해서 형성하는 균사의 한 형태로서 탄저병균과 도열병균은 부착기 내부가 멜라닌 성분으로 되어 있어 내부 팽압에 의해 식물체를 침입한다고 알려져 있다(Agrios, 2005; Howard와 Ferrari, 1989; Than 등, 2008). 이러한 병원균의 식물체 침입에 관련된 기관의 형성 감소는 직접적으로 병 발생 감소를 의미한다. *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* 등과 같은 길항미생물 처리에 의해 옥수수 밀둥썩음병원균의 부착기 형성이 억제되는 것으로 나타났으며(Han 등, 2015), 미생물 외에도 오배자나무에서 추출한 식물추출물을 처리하면 벼도열병의 부착기 형성률을 감소시킴으로써 벼도열병 발생을 억제하였다고 보고되었다(Ahn 등, 2005).

한편 Benomyl®을 전처리한 오이잎에 관찰된 포자수는 접종 후 시간에 관계없이 무처리구에 비해 유의성 있게 감소

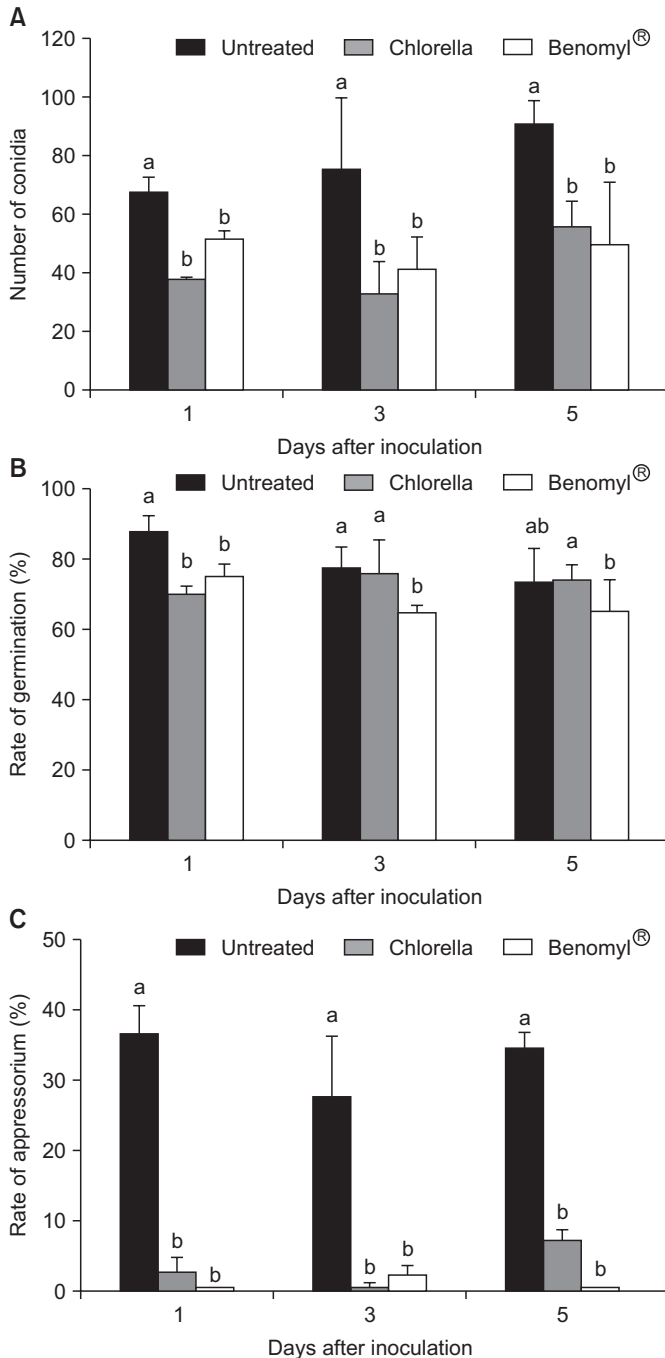


Fig. 3. Number of conidia (A), germination rate (B), and rate of appressorium formation (C) of *Colletotrichum orbiculare* untreated, pre-treated with *Chlorella fusca* and a commercial fungicide Benomyl®. The concentration of *C. fusca*, *C. orbiculare*, and Benomyl® (a.i. 50%, WP) were 1.0×10^7 cells/ml, 1.0×10^5 conidia/ml, and 0.7 g/l, respectively. The different letters represent significant differences ($P < 0.001$) according to Duncan's multiple range test from three independent experiments.

하였고(Fig. 3A) 포자 발아율도 무처리에 비해 일관성 있게 감소하였다(Fig. 3B). 또한 병원균의 부착기는 접종 후 5일째까지 거의 찾아볼 수가 없었다(Fig. 2C, F, I, 3C). Benomyl®은 세

포내에서 methyl 2-benzimidazole carbamate로 전환되어 세포분열을 억제함으로써 살균효과를 나타내는데(McCarroll 등, 2002), *C. fusca*를 전처리한 식물에서도 유사하게 부착기 형성률의 감소가 현격하게 감소하였으므로 이러한 부착기 형성억제가 오이탄저병 발생 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

*C. fusca*에 의한 *C. orbiculare*의 부착기 형성 억제 기작에 대해서는 알려진 바가 없다. 다만 *C. fusca*의 분비물질에 의해 *C. orbiculare*의 부착기 형성 능력이 저하될 가능성이 있다. 예를 들면, 동일한 속에 속하는 *C. vulgaris*는 성장 과정 중 지방산과 탄수화물의 혼합체인 chlorellin이라는 물질을 분비하는데 이 물질은 다른 조류와 세균에까지 독성을 나타낸다고 보고되었다(McCracken 등, 1980). 따라서 *C. fusca*에 의한 오이탄저병의 발생감소는 *C. fusca* 전처리에 의한 *C. orbiculare*의 부착기 형성 억제가 결정적인 원인일 것으로 판단되지만 보다 정확한 기작을 밝히기 위해서는 추가적인 생화학적 또는 세포구조학적 연구가 필요하다고 판단된다.

요 약

클로렐라는 광합성을 통해 독립적으로 생활할 수 있는 녹조류로서 작물의 생육촉진효과와 더불어 식물병 발생을 억제한다고 알려져 있다. 그러나 클로렐라에 의한 식물병 억제 기작에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다. 본 연구에서 클로렐라 일종인 *C. fusca*의 현탁액을 오이 잎에 전처리하였을 때 오이탄저병 진전이 억제되는지 여부를 조사하였으며, *C. fusca*를 전처리한 오이 잎에서 오이탄저병 억제 기작을 알아보았다. 그 결과, 무처리한 잎에 비해 *C. fusca*를 전처리한 잎에서 *C. orbiculare*의 부착기 형성률이 뚜렷하게 감소하였다. 또한 접종 부위에서 발견된 포자수도 무처리한 잎에 비해 유의성 있게 감소하였다. 한편, 살균제 Benomyl®을 전처리한 오이 잎에서도 *C. orbiculare*의 부착기 형성률이 크게 감소하였으며 포자수도 *C. fusca*를 전처리한 잎과 유사하게 감소되었다. 따라서 이들 결과를 통해 *C. fusca* 전처리에 의해 오이탄저병 발생이 억제되며 이는 *C. fusca*에 의한 식물 잎 표면에서 생화학적 또는 구조적 작용으로 인한 *C. orbiculare*의 부착기 형성 감소가 그 원인 중 하나일 것이라고 생각된다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

We are thankful to Dr. Shim C.K., Organic Agriculture Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, for supplying the *Chlorella fusca* strain. This work was carried out with the support of “cooperative research Program for Agriculture Science and Technology Development (Project No. PJ01170704)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Agrios, G. N. 2005. How pathogens attack plants. In: Plant Pathology, ed. by G. N. Agrios, pp. 175-203, Elsevier Academic Press, Burlington, VT, USA.
- Ahn, Y. J., Lee, H. S., Oh, H. S., Kim, H. T. and Lee, Y. H. 2005. Antifungal activity and mode of action of *Galla rhois*-derived phenolics against phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* 81: 105-112.
- Anderson, R. A. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier/Academic Press, Burlington, MA, USA. 578 pp.
- Bileva, T. 2013. Influence of green algae *Chlorella vulgaris* on infested with *Xiphinema index* grape Seedlings. *J. Earth Sci. Climate Change* 4: 136.
- Choi, K. C., Ilavenil, S., Arasu, M. V., Park, H. S. and Kim, W. H. 2015. Effect of addition of chlorella and lactic acid bacteria on nutritive value and fermentation quality of fresh rice straw silage. *J. Korean Soc. Grassl. Forage Sci.* 35: 159-165. (In Korean)
- Gan, P., Ikeda, K., Irieda, H., Narusaka, M., O'Connell, R. J., Narusaka, Y., Takano, Y., Kubo, Y. and Shirasu, K. 2013. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytol.* 197: 1236-1249.
- Ha, J. S. 2015. Field investigation of major apple diseases and pests in Geochang, and evaluation of Chlorella and reflective film treatment for apple quality improvement. Master thesis. Gyeongsang National University, Jinju, Korea. 52 pp.
- Han, J. H., Park, G. C., Kim, J. O. and Kim, K. S. 2015. Biological control of *Fusarium* stalk rot of maize using *Bacillus* spp. *Res. Plant Dis.* 21: 280-289. (In Korean)
- Howard, R. J. and Ferrari, M. A. 1989. Role of melanin in appressorium function. *Exp. Mycol.* 13: 403-418.
- Jeong, H. K., Kim, C. G. and Moon, D. H. 2012. Analysis of contribution of environment-friendly agricultural products to health promotion. *Korean J. Org. Agric.* 20: 125-142.
- Jeun, Y. C., Siegrist, J. and Buchenauer, H. 2000. Biochemical and cytological studies on mechanisms of systemically induced resistance to *Phytophthora infestans* in tomato plants. *J. Phytopathol.* 148: 129-140.
- Kim, J. T., Park, S. Y., Choi, W. B., Lee, Y. H. and Kim, H. T. 2008. Characterization of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. *Plant Pathol. J.* 24: 17-23.
- Kim, M. J., Shim, C. K., Kim, Y. K., Hong, S. J., Park, J. H., Han, E. J., Jee, H. J., Lee, S. B. and Kim, S. C. 2015. Effect of *Chlorella* sp. on improving antioxidant activities and growth promotion in organic soybean sprout cultivation. *Korean J. Org. Agric.* 23: 939-950.
- Kim, M. J., Shim, C. K., Kim, Y. K., Hong, S. J., Park, J. H., Han, E. J., Jee, H. J., Yun, J. C. and Kim, S. C. 2014a. Isolation and morphological identification of fresh water green algae from organic farming habitats in Korea. *Korean J. Org. Agric.* 22: 743-760. (In Korean)
- Kim, M. J., Shim, C. K., Kim, Y. K., Park, J. H., Hong, S. J., Ji, H. J., Han, E. J. and Yoon, J. C. 2014b. Effect of *Chlorella vulgaris* CHK0008 fertilization on enhancement of storage and freshness in organic strawberry and leaf vegetables. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 32: 872-878. (In Korean)
- Kim, S. Y., Hyun, J. W. and Jeun, Y. C. 2011. Suppression effect and mechanism of citrus scab in the citrus pre-inoculated with rhizobacterial strains. *Res. Plant Dis.* 17: 302-310. (In Korean)
- Kulik, M. M. 1995. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 585-599.
- Kwak, Y. K., Kim, I. S., Cho, M. C., Lee, S. C. and Kim, S. 2012. Growth inhibition effect of environment-friendly farm materials in *Colletotrichum acutatum* in vitro. *J. Bio-Environ. Control* 21: 127-133. (In Korean)
- Lee, S. M. and Ryu, C. M. 2016. *Chlorella fusca* elicits induced resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis*. In: The 2016 KSPP Fall Meeting and International Conference, ed. by The Korean Society of Plant Pathology, pp. 120. The Korean Society of Plant Pathology, Pyeongchang, Korea.
- Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14: 217-232.
- McCarroll, N. E., Protzel, A., Ioannou, Y., Frank Stack, H., Jackson, M. A., Waters, M. D. and Dearfield, K. L. 2002. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutat. Res./Rev. Mutat. Res.* 512: 1-35.
- McCracken, M. D., Middaugh, R. E. and Middaugh, R. S. 1980. A chemical characterization of an algal inhibitor obtained from *Chlamydomonas*. *Hydrobiologia* 70: 271-276.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y. and Vaca-Garcia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 35: 265-278.
- Shaaban, M. M. 2001. Green microalgae water extract as foliar feeding to wheat plants. *Pak. J. Biol. Sci.* 4: 628-632.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* 35: 171-205.
- Than, P. P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. W. and Hyde, K. D. 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9: 764-778.
- Thompson, A. S., Rhodes, J. C. and Pettman, I. 1988. Culture and Collection of Algae and Protozoa. Culture Collection of Algae and Protozoa Freshwater Biological Association, Cumbria, UK. pp. 13-35.