

Article

내생조류인 *Ulvella ramosa*의 성장 및 숙주
꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*)의 성장 억제 연구

이정록^{1,2} · 박서경^{1,2} · 신지하^{1,2} · 김영식³ · 최한길^{1,2*} · 남기원⁴

¹원광대학교 자연과학대학 생명과학부

²씨앤바이오테크

(54538) 전라북도 익산시 익산대로 460

³군산대학교 해양과학대학 해양생물공학과

(54150) 전북 군산시 대학로 558

⁴부경대학교 수산과학대학 자원생물학과

(48513) 부산광역시 남구 용소로 45

A Study on Growth of Endophytic *Ulvella ramosa* and Growth Inhibition
for Host *Gracilaria vermiculophylla*

Jung Rok Lee^{1,2}, Seo Kyoung Park^{1,2}, Ji Ha Shin^{1,2}, Young Sik Kim³,
Han Gil Choi^{1,2*}, and Ki Wan Nam⁴

¹Faculty of Biological Science, College of Natural Science

²Sea & Biotech

Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

³Department of Marine Biotechnology, College of Ocean Science and Technology

Kunsan National University, Kunsan 54150, Korea

⁴Department of Marine Biology, College of Fisheries Science, Pukyong National University

Busan 48513, Korea

Abstract : Zoospore release and germling growth of endophytic *Ulvella ramosa* were examined under various temperatures (10, 15, 20, 25°C) × irradiances (20, 60, 100 μmol photons m⁻² s⁻¹). Additional growth experiments were performed at different salinities (15, 25, 35, 45 psu) and daylengths (8, 12, 16 h). Growth of host *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss was estimated under combinations of temperatures (15, 20, 25, 30°C) and irradiances (20, 60, 100 μmol photons m⁻² s⁻¹). Endophyte effects on the host growth were tested in the two temperatures (20, 30°C) and irradiances (60, 100 μmol photons m⁻² s⁻¹). Zoospore release was maximal at 20°C and 20 μmol photons m⁻² s⁻¹, and germlings grew best under 20°C and 60 μmol photons m⁻² s⁻¹. No salinity effect on the growth of endophytes was found but endophyte growth was maximal under the daylength of 12 h. *G. vermiculophylla* grew better at higher irradiances but no growth differences were found between temperatures of 15–30°C. The growth of host species was significantly inhibited by endophytes under 20°C and 60 μmol photons m⁻² s⁻¹, but host *G. vermiculophylla* grew well in the endophyte inactive culture conditions of 30°C and 100 μmol photons m⁻² s⁻¹. In conclusion, endophyte effects on the production of host *G. vermiculophylla* could be minimized by controlling cultivation depth and harvest period to inhibit endophyte activity.

Key words : *Gracilaria vermiculophylla*, *Ulvella ramosa*, growth, endophyte, infection

*Corresponding author. E-mail : hgchoi@wku.ac.kr

1. 서론

꼬시래기류(*Gracilaria* spp.)는 한천 및 켈러드 원료이며 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있어서 경제적 가치가 높으며, 생장이 빠르기 때문에 70년대 초반부터 전 세계적으로 대량으로 양식되는 종이다(Orduña-Rojas and Robledo 1999; Almeida et al. 2011; Michetti et al. 2013; Saminathan et al. 2015). 또한, 꼬시래기는 다양한 해양생물의 생활 터전으로 활용되지만, 이러한 생물에 의해 성장 억제와 수확량 감소가 발생하게 된다. 예를 들면, *Gracilaria chilensis*의 연화(softening), 백화(whitening) 및 절편(fragmentation)은 내생아메바(endophytic amoeba)에 의해 발생하며(Correa and Flores 1995), *Gracilaria conferta* 엽체의 정단부 파괴는 박테리아와 관련이 있다(Weinberger et al. 1997). 또한, 착생 해조류(*Ulva lactuca*, *Acrosorium corallinarum*)는 *G. chilensis*의 피층을 파괴하고, *Ceramium rubrum*과 *Polysiphonia harveyi*는 수층까지 침투하여 조직을 파괴하였다(Leonardi et al. 2006). 양식 해조류에서 내생조류(endophyte)는 품질 저하와 수확량 감소를 일으켜 막대한 경제적 손실을 일으키며(Correa et al. 1988; Schoenrock et al. 2013), 숙주 해조류의 포자방출을 감소시키거나(Friedlander 1992), 박테리아 감염의 원인을 제공하기도 한다(Cancino et al. 1987; Buschmann and Gómez 1993). 따라서, 내생조류에 관한 생리·생태적 연구는 야외에서 숙주 해조류의 개체군 파괴, 나아가 연안생태계의 불안정 및 양식해조류의 경제적 피해를 감소시키기 위한 중요한 연구분야이다(Ogandaga et al. 2017).

내생조류는 녹조류, 갈조류와 홍조류로 다양하며, 현재까지 100 여종이 넘게 알려져 있으며, 전 세계적인 분포를 보인다(Guiry and Guiry 2018). 이들은 숙주 해조류 조직 내에 서식하는 미세조류로서 관찰이 어렵고, 생활사 연구와 종 동정에 대한 연구가 부족한 실정이다. 내생조류는 숙주 해조류와 공생관계에 있는 종으로 인식되기도 하였지만(Correa et al. 1988; Apt 1988), 일부 내생조류(*Ulvella*, *Phaeophila*, *Bolbocoleon* spp. 등)는 숙주에 종양을 생성하여 조직의 피사를 발생시키는 해로운 종으로 기록되었다(Correa and McLachlan 1994; Ogandaga et al. 2017). 내생녹조류인 *Ulvella* 속(genus)에는 64종이 존재하며, 진두발류(*Chondrus* spp.)와 은행조류(*Mazzaella* spp.)에 존재하면서 숙주의 조직을 피사시키고 성장을 억제시키는 것으로 확인되었다(Sánchez et al. 1996). 양식 대상종인 꼬시래기 속(genus)에 대하여 착생조류가 숙주 해조류의 성장에 미치는 영향에 대한 연구가 수행되었으나(Leonardi et al. 2006), 꼬시래기의 생산량 증대 및 품질과 관련되는 내생조류의 종류, 숙주에 대한 영향 등에 관한 연구는 절실하게 필요함에도 불구하고 현재까지 수행되지 않았다.

국내에서 보고된 *Ulvella* 속(genus)의 해조류는 가지녹실딱지(*Ulvella viridis* = as *Entocladia viridis*)가 최초이며, 왜비단잘록이(*Griffithsia japonica*)의 착생조류로 기록되었다(Lee et al. 1998). 이후, *Ulvella* sp.가 한국산 진두발(*Chondrus ocellatus*)의 내생조류로서 보고되었으며(Lee et al. 2013), 도박류(*Grateloupia* spp.)에서 *Ulvella leptochaete*가 분리 및 동정되었다(Kim et al. 2014). Choi et al. (2015)은 진두발의 내생조류를 *Ulvella ramosa*로 동정하였고, Ogandaga et al. (2016)은 진두발에서 분리 및 단독 배양된 *U. ramosa*를 숙주 진두발에 재감염시켜서 *U. ramosa*의 감염 경로, 숙주의 생리적 특성을 파악하였다. 한편, Kim and Kim (2015)는 가는개도박(*Grateloupia lanceolata*)에서 분리된 *Ulvella leptochaete*는 창자파래(*Ulva intestinalis*), 잘록이고리매(*Scytosiphon lomentaria*), 꼬시래기(*Gracilaria vermiculophylla*), 참도박(*Grateloupia elliptica*)과 진두발을 숙주로 사용할 수 있다고 하였다. 또한, 충남 무창포 해안에서 2017년 4월 13일에 채집된 꼬시래기 60개체 중에서 32개체가 내생녹조류인 *Ulvella ramosa*에 감염된 것(감염률 53%)을 예비조사를 통하여 확인하였다. 따라서, 본 연구의 목적은 다양한 숙주 해조류를 가지는 *U. ramosa*의 포자방출과 배아 성장을 위한 최적 환경조건을 파악하고 내생조류가 경제종인 숙주 꼬시래기의 성장에 미치는 영향을 파악하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

내생조류 *Ulvella ramosa*의 포자방출과 배아성장

내생녹조류인 *U. ramosa*는 충남 태안군 만리포(36°78'N, 126°08'E)에서 2014년 5월에 채집된 진두발에서 분리 및 정치 배양한 계통주를 사용하였다(Ogandaga et al. 2017). 숙주 진두발 엽체의 녹색 부위를 절단하여 15 mL의 PES 배지(Provasoli 1968)가 담긴 페트리디쉬에 넣고 20°C, 60 μmol photons m⁻² s⁻¹와 12:12 h L:D로 세팅된 인큐베이터에서 배양하였다. PES 배지에 돌말류의 성장을 억제시키기 위하여 GeO₂ (3 μg L⁻¹)를 첨가하였으며, *U. ramosa*가 숙주 엽체의 표면까지 성장하였을 때 새로운 Petri dish (Ø 10 cm)에 분리하여 동일한 조건에서 단종 배양하였다.

내생녹조류인 *U. ramosa*의 유주자 방출에 미치는 온도와 광도의 영향을 파악하기 위하여, 먼저 *U. ramosa*를 PES 배양액(100 mL)과 슬라이드글라스 조각(2 × 2 cm)이 담긴 Plant culture dish (Ø, 10 cm; H, 4 cm)에 넣고 3주 동안 배양하였다. 슬라이드 표면이 *U. ramosa*로 완전히 피복되었을 때, 슬라이드 표면(4 cm²)에 부착한 *U. ramosa*를 면도날로 모두 제거하여, 새로운 슬라이드 조각과 배양액(15 mL)이 담긴 36개의 Petri dish를 준비하였다. 서로 다른 온도(10, 15, 20, 25°C)로 세팅된 배양기에

Table 1. Experimental regimes used to examine the growth of *Ulveella ramosa* germlings

Experiments	Temperature (°C)	Irradiance ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Daylength (h)	Salinity (psu)
Temp. × Photon irradiance	10, 15, 20, 25	20, 60, 100	12	35
Daylength	20	60	8, 12, 16	35
Salinity	20	60	12	15, 25, 35, 45

각기 9개의 Petri dish를 배분하였고, 이들을 3개 광도(20, 60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)로 구분하였다. 배양기의 광주기는 12:12 h L:D로 동일하였으며, 실험구별로 3개의 반복구를 두었다. 유주자 방출은 24 h마다 슬라이드 표면 (10 mm²)에 착생된 배아를 Sedwick-Rafter chamber을 이용하여 계수하였다. 배양액과 슬라이드 조각은 7일 동안 매일 교환하면서 새로 방출된 유주자를 계수하였다.

*U. ramosa*의 배아생장에 환경요인이 미치는 영향을 확인하기 위하여, *U. ramosa* 엽체 표면의 해수를 페이퍼 타올로 제거한 후, 0.03 g의 엽체를 PES 배양액(100 mL)과 12개의 슬라이드 조각(2 × 2 cm)이 담긴 3개의 Plant culture dish에 접종하였다. *U. ramosa*의 유주자는 20°C, 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 와 12:12 h L:D의 광주기로 세팅된 배양기에서 2일 동안 방출시켰으며, 동일한 조건에서 2주 동안 배양하면서 초기 생활사를 관찰하였다. 배양 2일 후, 슬라이드 조각에 착생된 *U. ramosa*의 배아를 광학현미경으로 확인하였고 PES 배양액(15 mL)이 담긴 Petri dish에 슬라이드 조각 1개씩을 넣고, 다양한 온도 × 광도, 광주기와 엽분 실험구에서 7일 동안 배양하였다(Table 1). 배아생장 실험에서 배양액은 3일 간격으로 전량 교환하였고 실험구별로 3회 반복구를 두었으며, 반복구별로 30개의 배아 길이를 측정하였다. 배양 7일 후, *U. ramosa*의 배아는 광학현미경에 부착된 디지털카메라로 촬영한 후 Image J 프로그램으로 길이를 측정하여 아래의 식으로 상대성장률(RGR, relative growth rate)을 계산하였다(Serisawa et al. 2002).

$$\text{RGR (\% day}^{-1}\text{)} = 100 (\ln L_2 - \ln L_1) / T_2 - T_1$$

L_2 는 배양 종료 시 길이, L_1 은 배양 개시 때의 길이, $T_2 - T_1$ 는 배양일 수(day)를 나타낸다.

숙주 꼬시래기의 생장

온도와 광도가 숙주 꼬시래기의 생장에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 충남 보령시 무창포 해안에서 2017년 4월 13일에 채집한 과포자체의 정단부(3.5–5.9 mm)를 절단하여 2일 동안 통기 배양하여 순응시킨 후, 건강한 절편 180개를 선별하여 실험에 사용하였다. 꼬시래기 절편 5개와 PES 배양액 15 mL이 포함된 36개의 Petri dish (Ø 6 cm)를 준비하여 4개 온도(15, 20, 25, 30°C)로 설정

된 배양기에서 광도를 20, 60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 다르게 하여 배양하였다. 이때 배양기의 광주기는 12:12 h L:D로 동일하였으며, 광도는 형광등인 광원과의 거리를 조절하거나 검은색 망으로 Petri dish를 감싸서 실험 광도를 만들었다. 배양액은 3일 간격으로 전량 교환하였으며, 실험구별로 3회 반복구를 두었다. 배양 42일 후, 꼬시래기 절편은 상기한 방법으로 길이를 측정하여 상대성장률을 계산하였다.

U. ramosa 감염에 따른 꼬시래기의 생장

내생조류인 *U. ramosa*가 숙주 꼬시래기의 생장에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 충남 보령시 무창포 암반 해안에서 2017년 10월 27일에 과포자체를 채집하였다. 엽체의 정단부를 절편하여 2일 동안 통기 배양하면서 순응시켰고 건강한 절편 60개를 선별하여 실험에 사용하였다. 내생조류에 감염된 꼬시래기의 절편을 확보하기 위하여, 사상형 *U. ramosa* 1 g을 멸균해수(1 L)와 함께 믹서기에 넣고 균일하게 절단한 내생조류 현탁액을 준비하였다. 이후, PES 배양액 100 mL이 담긴 한개의 Plant culture dish에 꼬시래기 절편 30개를 넣고 준비된 *U. ramosa* 현탁액 10 mL을 접종하여 내생조류를 감염시켰으며, 다른 한 개의 Plant culture dish에는 대조구(비감염구)로서 멸균 해수를 10 mL 첨가하였다. 2개의 Plant culture dishes (감염구, 대조구)는 20°C, 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 와 12:12 h L:D의 광주기로 세팅된 인큐베이터에서 7일 동안 배양하였고, 7일 후에 혼합배양(내생조류와 꼬시래기)에서 내생조류에 의해 꼬시래기가 감염되었음을 광학현미경으로 확인하였다.

내생조류에 감염된 꼬시래기 절편 5개와 PES 배양액 15 mL이 포함된 6개의 Petri dish (Ø 6 cm)와 비감염된 꼬시래기 절편 5개와 배양액이 포함된 6개의 Petri dish를 각기 준비하였다. 배양 온도와 광도는 내생조류의 최적생장 조건인 20°C와 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 과 숙주 꼬시래기의 최적생장 조건인 30°C와 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 설정하였다. 단종 및 혼합 배양 7일 후, 배양 개시 때, 꼬시래기 절편의 길이는 $4.91 \pm 0.26 \text{ mm}$ (mean \pm SE, $n = 50$ apical tips)였다. 배양기의 광주기는 12:12 h L:D로 동일하게 유지하였으며, 광원과의 거리를 조절하여 실험 광도를 만들었다. 배양액은 3일 간격으로 전량 교환하였

으며, 실험구별로 3회 반복구를 두었다. 배양 42일 후, 숙주 꼬시래기는 길이와 상대생장률은 상기한 방법으로 측정 및 계산하였다.

통계분석

내생 녹조류인 *U. ramosa*의 유주자 방출과 배아생장에 환경요인이 미치는 영향과 *U. ramosa* 감염이 숙주 꼬시래기의 생장에 미치는 영향을 파악하기 위하여 통계분석을 실시하였다. 데이터의 동질성을 확인하기 위하여 등분산검정(homogeneity of variances)을 Cochran's test로 실시하였으며, *U. ramosa*의 유주자 방출과 배아 성장실험에서 환경요인이 조합된 실험은 two-way ANOVA로, 단일 환경요인 실험은 one-way ANOVA test로 유의차를 검정하였다. 숙주 꼬시래기의 생장에 미치는 온도와 광도의 영향은 two-way ANOVA로, 양한 온도와 광도의 조합조건에서 *U. ramosa*에 감염 여부에 따른 숙주 꼬시래기의 길이생장의 비교는 three-way ANOVA로 유의차 검정을 실시하였다. 평균에 대한 유의차가 발견되면 Tukey's HSD test 방법으로 사후 검정을 실시하였으며(Sokal and Rohlf 1995), 데이터 분석을 위해 사용된 통계 프로그램은 STATISTICA version 5.0이었다.

3. 결 과

내생조류의 유주자 방출과 배아생장

내생조류의 유주자 방출 실험을 다양한 온도(10, 15,

20, 25°C)와 광도(20, 60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)의 조합에서 실시한 결과, 10°C의 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 착생된 유주자가 거의 없었으며(Fig. 1A), 20°C의 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 125 zoospores mm^{-2} 로 최대였다(Fig. 1). 내생조류의 유주자 방출은 온도에 따른 유의차를 보였으나 광도별 유의차는 없었다(Table 2). 유주자 방출량은 15°C에서는 실험 개시 6-7일 후에 모든 광도에서 높게 나타났으며, 20°C에서는 2일 간격으로 증감하였으며, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 4일 후에, 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 6일 후에 최대였다(Fig. 1C). 유주자는 25°C에서 소량 방출되었으며, 배양 1-4일까지 증가한 후에 감소하였다(Fig. 1D).

내생조류인 *U. ramosa*의 유주자를 20°C, 60 μmol

Table 2. Results of two-way ANOVA for the number of *Ulvella ramosa* zoospores settled. Zoospores released for 7 days under four temperatures (10, 15, 20, 25°C) and three photon irradiance levels of 20, 60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Factors	df	MS	F	P
Temperature (T)	3	19.09	68.50	< 0.001
Photon irradiance (P)	2	0.23	0.83	0.44
Interaction (T × P)	6	0.49	1.75	0.11
Tukey HSD Test ($P = 0.05$)				
Temperature	20 > 15 > 25 > 10			
Photon irradiance	100 = 60 = 20			

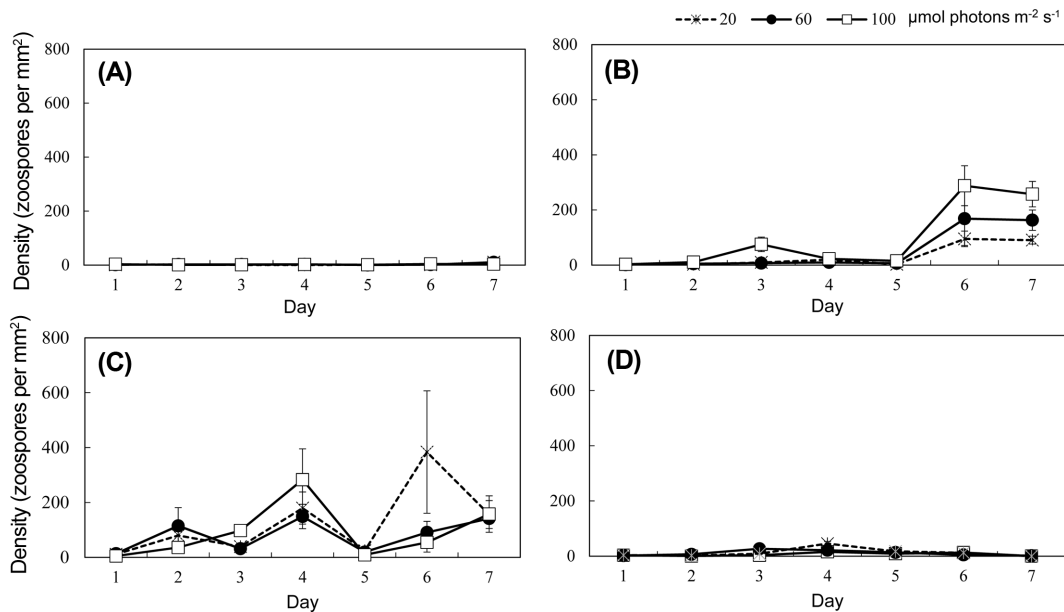


Fig. 1. The effects of temperature (A; 10, B; 15, C; 20 and D; 25°C) and photon irradiance (20, 60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on zoospore release of *Ulvella ramosa* over the study period of 7 days. Vertical bars indicate mean \pm SE ($n = 3$ replicates). The values are *U. ramosa* germlings settled on mm^2 of the slide glass

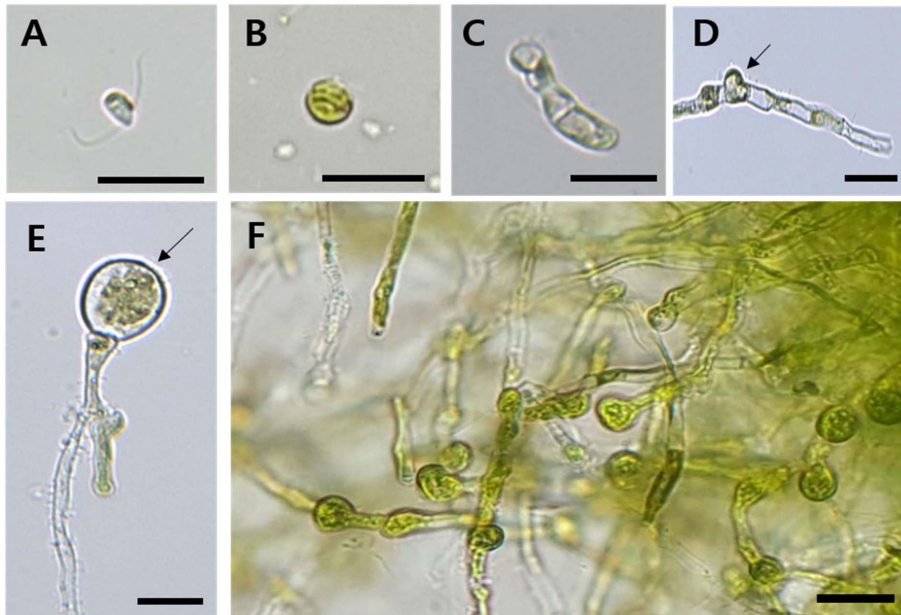


Fig. 2. Morphological features of *Ulvella ramosa* in culture. Scale bar, 10 μm . (A), Zoospore (B), Zygote (C), One-day old germling with four cells (D), Three-day old juvenile with developing unilocular sporangium (arrow) (E), Seven-day old matured thallus with unilocular sporangium (arrow) (F), Matured thalli with many unilocular sporangia after 14 days in culture

photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 와 광주기 12:12 h L:D로 세팅된 배양기에서 2일 동안 방출시킨 후 동일한 배양 조건에서 배양하며 관찰한 결과, 유주자는 6 h 이내에 착생하였다(Fig. 2A, B). 착생된 유주자는 1일 후 4개 세포로 분열되었으며(Fig. 2C), 3일 후에는 단자낭이 형성되기 시작하였고(Fig. 2D) 7일 후, 단자낭 내에서 유주자 형성이 확인되었다(Fig. 2E). 배양 14일 후에는 엽체에서 많은 단자낭이 형성되었으며 엽체는 짙은 초록색을 보였다(Fig. 2F).

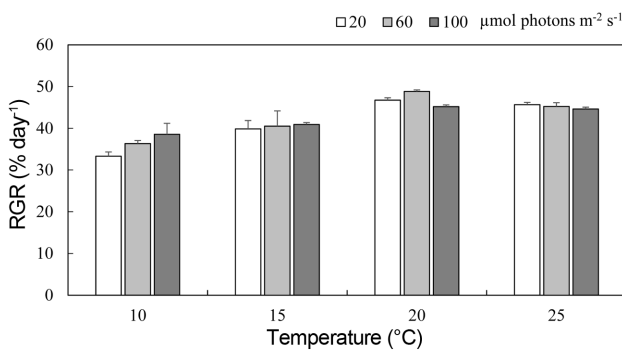


Fig. 3. Relative growth rate (RGR) for lengths of *Ulvella ramosa* germlings cultured for 7 days under four temperatures and three irradiance levels. Vertical bars indicate mean \pm SE ($n=3$ replicates). Photo-period was constant with 12:12 h L:D. Vertical bars indicate mean \pm SE ($n=3$ replicates)

내생조류의 성장을 다양한 온도(10, 15, 20, 25°C)와 광도(20, 60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 확인한 결과, 실험 전에 슬라이드에 착생한 *U. ramosa*의 유주자 직경은 $4.84 \pm 0.10 \mu\text{m}$ (mean \pm SE, $n=90$ germlings)였으며, 배아 생장은 모든 실험 온도(10–25°C)와 광도(20–100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 일어났다(Fig. 3). 배양 7일 후, 내생조류의 배아 길이는 50.15–147.85 mm (상대성장률, 33.32–48.83% day^{-1})였으며, 20°C의 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 최대였고 10°C의 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 최소였다(Fig. 3). 내생조류의 배아 생장은 온도별 유의

Table 3. Results of two-way ANOVA for the growth of *Ulvella ramosa* germlings. Germlings were cultured for 7 days under combinations of temperatures (10, 15, 20, 25°C) and photon irradiances of 20, 60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Germlings were cultured at 35 psu and 12:12 h L:D. Data represent mean \pm SE ($n=3$ replicates)

Factors	df	MS	F	P
Temperature (T)	3	222.07	39.53	< 0.001
Photon irradiance (P)	2	4.10	0.73	0.49
Interaction (T \times PI)	6	9.17	1.63	0.18
Tukey HSD Test ($P=0.05$)				
Temperature	20 = 25 > 15 > 10			
Photon irradiance	60 = 100 = 20			

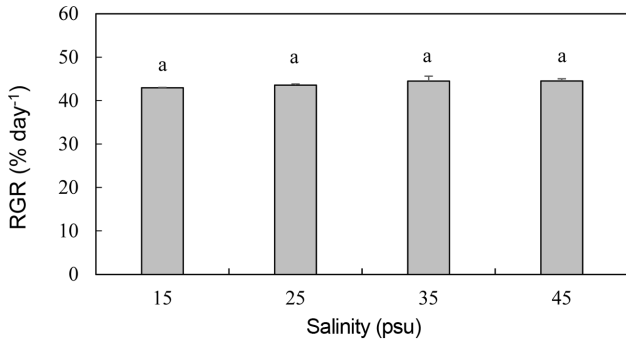


Fig. 4. Germling lengths of *Ulvella ramosa* cultured for 7 days at four different salinities. The other culture conditions were 20°C, 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 12:12 h LD. Vertical bars indicate mean \pm SE (n = 3 replicates). Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

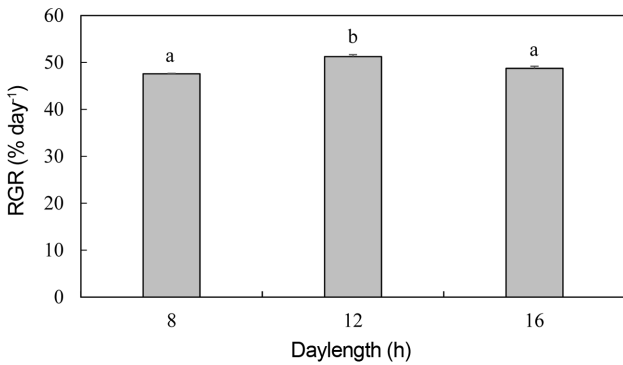


Fig. 5. Germling lengths of *Ulvella ramosa* cultured for 7 days under three different daylengths. The other culture conditions were the same with 20°C, 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 12:12 h LD. Vertical bars indicate mean \pm SE (n = 3 replicates). Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

차를 보였으나, 광도 및 온도 \times 광도의 상호작용은 영향이 없는 것으로 확인되었다(Table 3). 내생조류의 배아는 저온(15, 10°C)에 비해 고온(20, 25°C)에서 빠른 성장을 보였으며, 15°C에서는 10°C에 비해 높은 성장률을 보였다(Table 3).

내생조류인 *Ulvella ramosa*의 배아는 다양한 염분(15, 25, 35, 45 psu)에서 성장하였으며, 배양 7일 후 배아 길이는 98.09–109.89 mm였다. 배아의 상대성장률은 42.98–44.54% day^{-1} 로서 빠른 성장을 보였으나, 염분별 차이는 나타나지 않았다($F_{3,8} = 1.47, P = 0.29, \text{Fig. 4}$).

또한, *Ulvella ramosa*의 배아는 다양한 일장(8, 12, 16 h)에서 성장하였으며, 7일 후 배아 길이는 135.47–175.12 mm였다. 배아의 상대성장률은 일장에 따라 47.59–

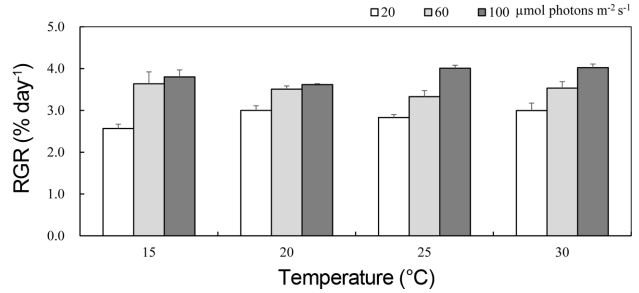


Fig. 6. Relative growth rate (RGR) for the lengths of *G. vermiculophylla* thalli cultured under combination of four temperatures (15, 20, 25, 30°C) and three photon irradiances levels (20, 60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for six weeks. Photoperiod was kept constant with 12:12 h L:D. Vertical bars indicate mean \pm SE (n = 3 replicates)

Table 4. Analysis of variance (two-way ANOVA) for the effects of temperatures (15, 20, 25, 30°C) and photon irradiances (20, 30, 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on the relative growth rate (RGR, % day^{-1}) of *G. vermiculophylla* carposporophytes for the length of apical fragments after 6 weeks in culture

Factors	df	MS	F	P
Temperature (T)	3	0.055	0.942	0.44
Photon irradiance (P)	2	3.167	53.818	<0.001
Interaction (T \times P)	6	0.115	1.951	0.11
Tukey HSD Test ($P = 0.05$)				
Photon irradiance		100 > 60 > 20		

51.25% day^{-1} 였으며 12 h 에서 단일(8 h)과 장일(16 h)에 비해 빠른 성장을 보였으나($F_{2,6} = 26.37, P < 0.01$), 단일과 장일 조건에서 유의차는 발견되지 않았다(Fig. 5).

숙주 꼬시래기 성장

숙주 꼬시래기는 다양한 온도(15, 20, 25, 30°C)와 광도(20, 60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 성장하였으며, 상대성장률(RGR)은 2.57–4.02% day^{-1} 였으며, 최소생장은 15°C, 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서, 최대생장은 30°C, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 일어났다(Fig. 6). 꼬시래기의 성장에 대한 광도별 차이는 확인되었으나 온도별 유의차는 없었으며, 상호작용은 없는 것으로 나타났다(Table 4). 실험한 광도 범위에서, 꼬시래기의 성장은 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 최대였으며, 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 최소였고 광도별 유의차가 나타났다(Table 4).

꼬시래기 성장과 내생녹조류 영향

단종 배양(꼬시래기)과 혼합 배양(꼬시래기와 *U. ramosa*)

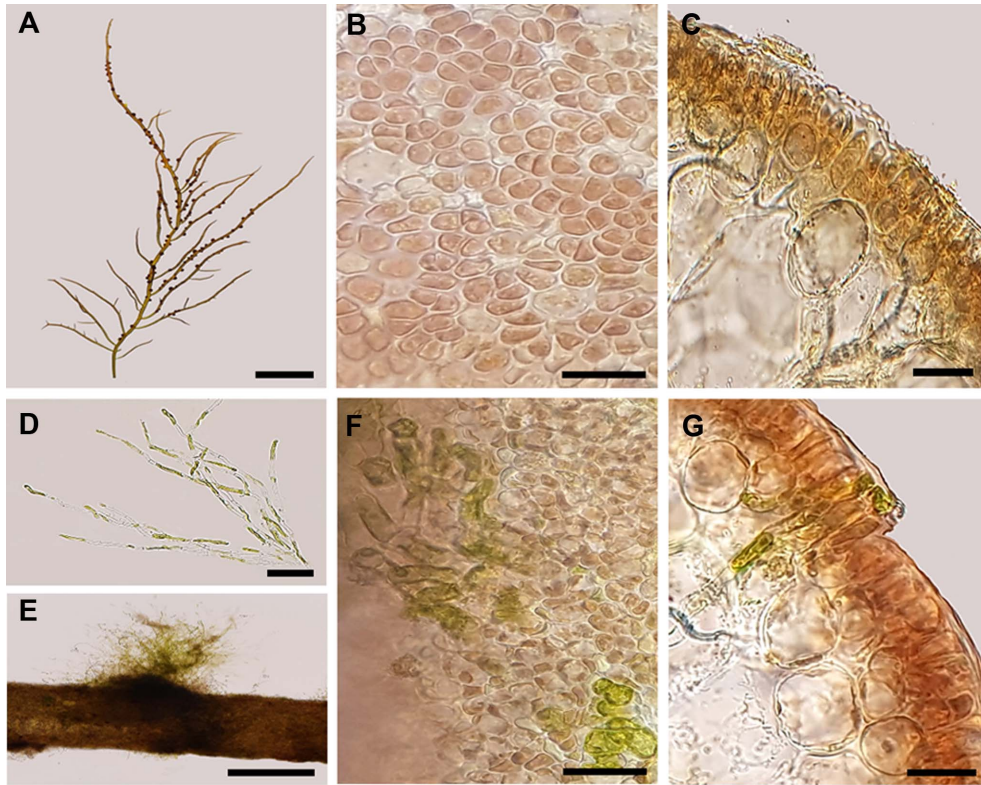


Fig. 7. Healthy and infected *G. vermiculophylla* by a green endophyte *Ulvella ramosa*. (A), Female gametophyte with cystocarps, scale bar, 1 cm. (B), Healthy tissue surface, scale bar, 50 μm . (C), Healthy tissue cross section, scale bar, 25 μm . (D), Thallus of *Ulvella ramosa*, scale bar, 50 μm . (E), An infected *G. vermiculophylla* branch by *U. ramosa*, scale bar, 500 μm . (F), Infected *G. vermiculophylla* tissue with *U. ramosa*, scale bar, 50 μm . (G), Tissue cross section of infected *G. vermiculophylla* thallus, scale bar, 25 μm

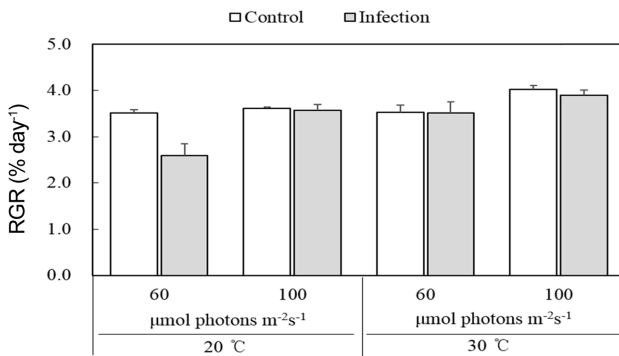


Fig. 8. Relative growth rate (RGR) for the lengths of *G. vermiculophylla* thalli infected and no-infected by *Ulvella ramosa*. *G. vermiculophylla* thalli were cultured under combination of two temperatures (20, 30°C) and photon irradiances (60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) for six weeks. Photoperiod was kept constant with 12:12 h L:D. Vertical bars indicate mean \pm SE (n = 3 replicates)

을 7일 동안 실시하여 *U. ramosa*의 감염을 확인하였다 (Fig. 7). 배양 시작 때, 꼬시래기 정단부 길이는 $4.91 \pm$

Table 5. Analysis of variance (three-way ANOVA) for the effects of endophyte (No-infection and infection), temperatures (20, 30°C) and photon irradiances (60, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) on the relative growth rate (RGR, % day⁻¹) of *G. vermiculophylla* fragments after 6 weeks in culture

Factors	df	MS	F	P
Endophyte (E)	1	0.45	8.69	<0.01
Temperature (T)	1	1.07	20.68	<0.001
Photon irradiance (P)	1	1.42	27.55	<0.001
Interaction (E \times T)	1	0.26	4.97	<0.05
Interaction (E \times P)	1	0.21	4.13	0.06
Interaction (T \times P)	1	0.02	0.37	0.55
Interaction (E \times T \times P)	1	0.36	6.98	<0.05

0.26 mm (n = 50)였으나, 배양 6주 후 대조구(*U. ramosa* 비감염구)의 꼬시래기는 17.33–20.87 mm로 성장하였고, *U. ramosa* 감염구에서는 12.57–19.98 mm로 성장하였다. 꼬시래기의 길이 성장에 대한 상대성장률은 비감염구에서 3.51–4.02% day⁻¹ (평균, 3.67% day⁻¹)로서 감염구의

2.60–3.90% day⁻¹ (3.40% day⁻¹)에 비해서 높게 나타났다 (Fig. 8). 배양 6주 후, 꼬시래기의 생장은 내생조류에 감염되지 않은 대조구에서, 고온(30°C)과 고휘도(100 μmol photons m⁻² s⁻¹)에서 높았다(Table 5). 또한 꼬시래기의 생장은 *U. ramosa* 감염 × 온도, 감염 × 온도 × 광도의 상호작용이 있는 것으로 확인되었다(Table 5).

4. 고찰

본 연구에서 내생 녹조류인 *Ulvelia ramosa*의 유주자 방출과 배아생장의 최적 온도는 20°C였으며, 유주자 방출에서 광도의 영향은 없었으나, 배아생장은 60 μmol photons m⁻² s⁻¹에서 최대로서 저광도에 비해 고휘도에서 빠르게 나타났다. 또한, *U. ramosa*의 배아는 실험조건에서 33.32–48.83% day⁻¹의 높은 성장률을 보였으며, 최적 온도와 광도의 조합에서는 성장률이 약 50% day⁻¹였다. Deng et al. (2011)은 *Ulvelia leptochaete* (= *Acrochate leptochaete*)를 다양한 온도(9, 13, 17, 21, 25, 29°C)와 다양한 광도(36, 72, 108 μmol photons m⁻² s⁻¹)에서 배양하였으며, 성장(세포 길이와 단위 면적당 엽체수)을 위한 최적 온도는 25°C였으며, 광도별 성장차이는 보이지 않았으나 짙은 초록색을 보이는 높은 광도에서 광합성이 촉진된다고 하였다. Kim and Kim (2015)은 *Ulvelia leptochaete*의 실내배양에서 최적 성장온도는 21°C (실험온도; 9, 13, 17, 21, 25, 29°C)였으며, 60 μmol photons m⁻² s⁻¹에 비해 100 μmol photons m⁻² s⁻¹에서 빠른 성장을 보인다고 하였다. 본 연구 대상종인 *U. ramosa*의 성장을 위한 최적 온도 및 광도는 동일한 속(genus) 혹은 다른 속의 *Ulvelia leptochaete*, *Bolbocoleon piliferum*와 *Blastophysa rhizopus*와도 매우 유사하였으며(Kim and Kim 2015), 숙주에서 분리된 내생조류가 단종배양이 가능함을 확인하였고, *U. ramosa*를 포함한 내생조류의 대부분은 20°C 이상의 수온인 늦은 봄에서 여름에 주로 성장하는 것으로 사료된다.

본 연구에서 진두발에서 분리한 *Ulvelia ramosa*는 꼬시래기에도 감염되었으며, 감염된 꼬시래기의 생장은 감소되었다. Kim and Kim (2015)는 가는개도박에서 분리한 동일한 속의 *Ulvelia leptochaete*는 녹조류(창자파래), 갈조류(잘록이고리매)와 홍조류(꼬시래기, 진두발과 참도박)를 감염시킨다고 하였으나, 이 종에 감염된 숙주의 형태변화에 대한 기록은 없었다. Ogandaga et al. (2016)은 *U. ramosa*를 숙주 진두발에 다시 감염시키면, 숙주가 종양을 형성한다고 보고하였다. 본 연구에서 *U. ramosa*에 의해 감염된 꼬시래기를 6주 동안 배양하였으나 엽체에서 특이한 병변이나 세포조직의 변화 등이 관찰되지 않았다. 또한, 내생조류 *U. ramosa*에 의해 53%가 감염된 꼬시래기의 야외개체군에서도 형태 변화 및 괴사 증상은 관찰되지

않아서 종양을 형성한 진두발과는 구별되는 특성을 확인할 수 있었다. 1970년대에 꼬시래기(*G. vermiculophylla*)에서 종양의 형성(tumor-like formation)에 대한 기록이 한번 있었으나, 원인생물은 바이러스와 유사한 구조(virus-like structure)를 가졌다고 하였다(Tripodi and Beth 1976). *G. chilensis*에서 엽체의 백화(whitening), 괴사(decay)와 절편화(fragmentation)은 내생아메바(endophytic amoeba)에 의해서 발생한다고 하였다(Correa and Flores 1995). 향후 내생조류인 *U. ramosa*의 연구에서는 숙주 특이성과 장기간의 연구를 통하여 숙주 해조류의 형태적 변화에 대한 확인이 필요할 것이라고 생각된다.

본 연구에서 내생조류 *U. ramosa*에 의해 감염된 숙주 꼬시래기의 생장은 억제하였으며, 광도와 온도 조건에 따라 성장 저해의 정도는 다르게 나타났다. 다시 말하면, 내생조류의 최대 생장이 일어난 배양조건(20°C, 60 μmol photons m⁻² s⁻¹)에서 숙주 꼬시래기는 최소생장이 일어났으며, 숙주 꼬시래기의 성장에 적합한 고온(30°C)과 고휘도(100 μmol photons m⁻² s⁻¹)에서는 내생조류가 숙주 성장에 영향을 거의 미치지 않음을 확인되었다. 선행연구에서 착생 해조류가 경제종인 숙주 꼬시래기류(*Gracilaria* spp.)와 공간, 영양염, 무기탄소에 대한 직접경쟁으로 숙주 해조류의 성장 감소와 생물량 손실을 초래하며, 나아가 생산성 감소와 품질 악화로 인한 경제적 피해를 가져온다는 것은 잘 알려졌지만(Muñoz and Fotedar 2010), 내생조류에 의한 숙주 꼬시래기의 성장 감소는 본 연구에서 최초로 기록되었다. 따라서, 높은 온도와 광도에서 내생조류인 *U. ramosa*가 꼬시래기에 생산성에 미치는 영향이 최소라는 점을 적극 활용하여 고휘도에 노출될 수 있는 꼬시래기의 양식 수심과 고수온 시기에 수확하는 등의 자료로 활용될 수 있을 것이다. 향후, 무생물적 요인(온도, 광도, 염분 등), 생물적 요인이 내생조류와 숙주 해조류의 성장 및 상호작용에 미치는 영향에 대한 연구와 내생조류가 숙주에 감염되는 경로 등에 대한 보다 세밀한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 한국연구재단의 이공분야기초연구사업의 지원을 받아 연구되었습니다(NRF-2016R1A2B1013402). 또한, 본 연구의 일부는 해양수산부의 재원으로 해양수산생명공학기술개발사업 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

Almeida CLF, Falcão HS, Lima GRM, Montenegro CA,

- Lira NS, Athayde-Filho PF, Rodrigues LC, Souza MFV, Barbosa-Filho JM, Batista LM (2011) Bioactivities from marine algae of the genus *Gracilaria*. *Int J Mol Sci* **12**:4550–4573. doi:10.3390/ijms12074550
- Apt KE (1988) Galls and tumor-like growths on marine macroalgae. *Dis Aquat Org* **4**:211–217
- Buschmann AH, Gómez P (1993) Interaction mechanisms between *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and epiphytes. *Hydrobiologia* **260**:345–351
- Cancino JM, Muñoz M, Orellana MC (1987) Effects of epifauna on algal growth and quality of the agar produced by *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss. *Hydrobiologia* **151**:233–237
- Choi HG, Kim C, Kim YS, Lee SJ, Park MA, Nam KW (2015) Phenology of host *Chondrus ocellatus* with filamentous green endophyte infection. *Ocean Sci J* **3**:519–527. doi:10.1007/s12601-015-0047-8
- Correa JA, Nielsen R, Grund DW (1988) Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). II. *Acrochaete heteroclada* sp. nov., *A. operculata* sp. nov., and *Phaeophila dendroides* (Chlorophyta)l. *J Phycol* **24**:528–539 doi: 10.1111/j.1529-8817.1988.tb04258.x
- Correa JA, McLachlan JL (1994) Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). V. Fine structure of the infection by *Acrochaete operculata* (Chlorophyta). *Eur J Phycol* **29**:33–47. doi:10.1080/09670269400650461
- Correa JA, Flores V (1995) Whitening, thallus decay and fragmentation in *Gracilaria chilensis* associated with an endophytic amoeba. *J Appl Phycol* **7**:421–425
- Deng Y, Tang X, Ding L, Lian S (2011) A new record from China of epiphytic marine algae, *Acrochaete leptochaete* (Chaetophoraceae, Chlorophyta) with its primary experimental biology. *Chin J Ocean Limn* **29**:350–355. doi: 10.1007/s00343-011-0053-3
- Friedlander M (1992) *Gracilaria conferta* and its epiphytes: the effect of culture conditions on growth. *Bot Mar* **35**:423–428
- Guiry MD, Guiry GM (2018) World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. *AlgaeBase*. <http://algaebase.org> Accessed 1 Aug 2018
- Kim C, Kim YS, Choi HG, Nam KW (2014) New records of three endophytic green algae from *Grateloupia* spp. (Rhodophyta) in Korea. *Algae* **29**:127–136. doi:10.4490/algae.2014.29.2.127
- Kim C, Kim YS (2015) Effects of temperature and irradiance on growth and infection of three endophytic green algae. *Kor J Fish Aquat Sci* **48**:88–95. doi:10.5657/KFAS.2015.0088
- Lee HB, Kim JI, Lee JW, Oh BG (1998) Notes on little known algae in Korea (I). *Algae* **13**:165–172
- Lee SJ, Park MA, Ogandaga CAM, Park SK, Kim H, Kim YS, Choi HG (2013) A study on the growth and disease of *Chondrus ocellatus* in Korea. *J Fish Pathol* **26**:263–272. doi:10.7847/jfp.2013.26.3.265
- Leonardi PI, Miravalles AB, Faugeron S, Flores V, Beltrán J, Correa JA (2006) Diversity, phenomenology and epidemiology of epiphytism in farmed *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) in northern Chile. *Eur J Phycol* **41**:247–257. doi:10.1080/09670260600645659
- Michetti KM, Martín LA, Leonardi PI (2013) Carpospore release and sporeling development in *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) from the southwestern Atlantic coast (Chubut, Argentina). *J Appl Phycol* **25**:1917–1924. doi:10.1007/s10811-013-0029-0
- Muñoz J, Fotedar R (2010) Epiphytism of *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar & Kraft) from western Australia. *J Appl Phycol* **22**:371–379. doi:10.1007/s10811-009-9469-y
- Ogandaga CAM, Choi HG, Kim JK, Nam KW (2016) Growth responses of *Chondrus ocellatus* Holmes (Gigartinales, Rhodophyta) to two endophytes, *Mikrosyphar zosterae* Kuckuck (Ectocarpales, Ochrophyta) and *Ulvelia ramosa* (N.L. Gardner) R. Nielsen (Ulvales, Chlorophyta) in culture. *Algae* **31**:363–371. doi:10.4490/algae.2016.31.12.9
- Ogandaga CAM, Na YJ, Lee SR, Kim YS, Choi HG, Nam KW (2017) Wart-like spot formation on the fronds of *Chondrus ocellatus* (Gigartinales) by a brown alga, *Mikrosyphar zosterae* (Ectocarpales) in Korea. *J Appl Phycol* **29**:2539–2546. doi:10.1007/s10811-016-1028-8
- Orduña-Rojas J, Robledo D (1999) Effects of irradiance and temperature on the release and growth of carpospores from *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta). *Bot Mar* **42**:315–319. doi:10.1515/BOT.1999.035
- Provasoli L (1968) Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: *Cultures and Collections of Algae*. Proceedings of US-Japan Conference, Hakone, 12–15 Sep 1966, pp 63–75
- Saminathan KR, Ashok KS, Veeragurunathan V, Mantri VA (2015) Seedling production in the industrially important agarophyte *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* **27**:1541–1548. doi:10.1007/s10811-014-0450-z
- Sánchez PC, Correa JA, Garcia-Reina G (1996) Host-specificity of *Endophyton ramosum* (Chlorophyta), the causative agent of green patch disease in *Mazzaella laminarioides* (Rhodophyta). *Eur J Phycol* **31**:173–179 doi:10.1080/09670269600651351
- Schoenrock KM, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2013) Endophyte presence as a potential stressor on

- growth and survival in Antarctic macroalgal hosts. *Phycologia* **52**:595–599. doi:10.2216/13-188.1
- Serisawa Y, Yokohama Y, Aruga Y, Tanaka J (2002) Growth of *Ecklonia cava* (Laminariales, Phaeophyta) sporophytes transplanted to a locality with different temperature conditions. *Phycol Res* **50**:201–207. doi:10.1046/j.1440-1835.2002.00274.x
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry*. Freeman, New York, 880 p
- Tripodi G, Beth K (1976) Unusual cell structures in tumor-like formations of *Gracilaria* (Rhodophyta). *Arch Microbiol* **108**:167–174
- Weinberger F, Hoppe HG, Friedlander M (1997) Bacterial induction and inhibition of a fast meiotic response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *J Appl Phycol* **9**:277–285

Received Aug. 24, 2018

Revised Oct. 23, 2018

Accepted Nov. 13, 2018