

## 담수로부터 分離한 *Saprolegnia* sp.의 生理 및 生殖의 特性

朴東喆·李炯煥·李址烈\*

建國大學校 生物學科 · \*建國大學校 遺傳工學研究所

### Physiological and Reproductive Characteristics of *Saprolegnia* sp. isolated from a Freshwater

Dong-Cheal Park, Hyung-Hwan Lee and Ji-Yul Lee\*

Department of Biology and \*Institute for Genetic Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

**ABSTRACT:** *Saprolegnia* sp. was isolated from water sample of Illgam lake in Kon-Kuk university and physiological and reproductive characteristics of this isolate were studied. The isolate grew at a broad range of temperature of 25°C to 30°C and of pH 5 to 6. The maximum growth was attained at the concentrations of 5 mM to 10 mM of phosphate and of 14 g/l of vitamin-free casamino acid. Size of asexual reproductive propagule, zoospore, was 10.3 $\mu$ m in diameter and cyst, 11.6 $\mu$ m. Diameter of oogonium was 47-85 $\mu$ m and oospores, 21-27 $\mu$ m.

**KEYWORDS:** *Saprolegnia* sp, Zoospore, Oospore

*Saprolegnia* 종들은 잘 알려진 수생균으로 습지의 토양이나 또는 담수에서 서식하며 *S. ferax* 와 *S. parasite* 같은 몇몇 종은 식물에 병원성이며 어류와 물고기 그리고 수생동물에 기생성이어서 경제적으로 중요한 종도 있다(Dick, 1972).

*S. ferax* 는 검정파리(*Simulium vittatum*)의 장에서 성장하는 것을 관찰하였으나 비 병원성이었고 자연상태에서 쌍시류 유충과 번데기에 병원성이 있는 것으로 보고되었다(Nolan et al., 1974).

Lichard(1979) 등은 *S. parasite* 와 *S. ferax* 에 대한 생리적 특성을 보고하였는데 각 종마다 발육조건이 차이가 있음을 알았고 대체로 발육온도는 19~20°C이며 생육 최적 pH는 5.6이었으며 phosphate 농도는 10 mM 이었고 영양분으로 Vitamin-free Casamino acid 는 최적 4g/l 라고 보고하였다. 또한 Casamino acid 로부터 영양체 성장은 3g/l 가 최고의 건중량을 나타낸다고 보고하였으며 3일후부터는 Casamino acid 의 이용산물인 ammonia 를 검출할 수 있었고 배양후 5일까지 taurine 과 urea 는 검출되지 않았으며 모든 복합 화합물들은 빠른 영양체 성장시에 이용한다고 보고하였다.

형태학적 분류 측면에서는 완전 수생균으로 표준 균주(type species)은 *S. ferax* 이며 이것의記載를 기준으로 영양체 성장, 난포자, 유주자 형성과정과 형태, 피낭 등의 구조와 운동성 균의 생리적 특성 등으로 비교 분류할 수 있다. 여기에 근거하여 Padgett, D. A. (1976)는 표준균주에 대한 *S. australis* 의 차이점을 비교하여 보고하였다.

*Saprolegnia* 속에 속하는 종들은 합성배지에서 방사상으로 영양체 성장을 하며 환경에 따라 유주자를 생산하여 번식하는 무성생식 단계와 난포자를 형성하는 유성생식 단계가 발견된다.

무성생식 단계는 균사의 정점에서 격막이 생기며 부풀어서 곤봉 형태의 유주자낭이 형성되고 내부에서 유주자가 분화, 발육되고 성숙해지면 삼투압에 의해서 방출된다고 보고하였으며 유주자의 형태가 두가지인 이형성(dimorphic)이며 1차 유주자는 방출후 정점에 2개의 편모를 가지고 유영하다가 40분 정도 지나면 편모를 감싸며 1차 피낭을 형성하고 2차 유주자를 방출하게 된다. 방출된 2차 유주자는 측면에 2개의 편모를 가지며 강한 운동력을 가지고 유영하다 적당한 환경에 이르게 되면 편모를 떼어내

고 2차 피낭에 쌓인 후 발아를 한다고 보고하였다 (Fuller, M. S. 1977).

Pickering, A. D. (1979) 등은 2차 피낭포자 표면에는 다수의 부리 같은 갈고리가 많아서 쉽게 기질에 부착할 수 있고 즉시 발아하여 영양체 성장을 할 수 있다고 보고하였다.

한국에서는 지금까지 *Saprolegnia* 속에 관한 연구가 전혀 없었다. 본 연구는 한국에서 분리한 *Saprolegnia* sp.에 대하여 생리적, 생태적 특성에 관해 연구한 바를 밝히고자 하였다.

## 材料 및 方法

### 菌分離

호수 주변의 습지의 토양과, 수면하 2~3cm 깊이의 호수에서 멸균된 유리병을 사용하여 채취하였고, 서울 성동구에 있는 건국대학교 구내의 호수와 지리산에서 채집한 것을 공시균주로 사용하였다.

### 培地

#### 1) 保存培地

Dextrose Peptone Yeast extract 배지를 사용하였고, 조성은 Yeast extract 1.25g, Bacto peptone 1.25g, Dextrose 3g을 증류수 1l에 용해한 후 121°C, 15Lb에서 15분간 가압습윤 멸균하여 사용하였다.

#### 2) 分離培地

Hemp seed를 끊어서 무균적으로 껍질을 제거한 후 멸균 증류수 20ml과 함께 사용하였다.

#### 3) YPSS 培地

보관중인 균체를 활성화 시켜서 유주자 형성을 유도하고 생리적 특성조사를 위해 사용한 배지 조성은 Powdered yeast extract (Difco) 4g, K<sub>2</sub>HOP<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, Soluble starch (Difco) 15g을 121°C, 15Lb에서 15분간 가압습윤 멸균한 후 pH5.8로 조정하여 사용하였다.

### 菌株의 分離

채취한 재료 15ml과 멸균수 10ml이 들어있는 플레이트에 껍질을 무균적으로 제거한 삼썬(hemp)를 넣고 실온에서 일주일동안 배양하였으며 순수분리를 위해서 Malt agar에 균사를 접종한 뒤 27°C에서 3일간 배양하였으며 오염을 막기 위해서 플레이트 가장자리 균사를 새로운 배지에 옮겨 순수 배양한 후 보관, 사용하였다.

### 生理的 特性觀察

#### 1) 成長曲線의 測定

Daniel (1964) 방법을 수정하여 측정하였다. YPSS 배지 100ml에 균사를 접종하고 28°C에서 4일동안 회전진탕 배양하면서 6시간 간격으로 성장곡선을 측정하였다.

액체 배양한 영양균사를 여과지(No.2)로 여과시킨 후 80°C에서 6시간 동안 건조 탈수시킨 후 건조량을 측정하였다.

#### 2) 培地의 pH가 營養體 成長에 미치는 影響

pH 변화에 따른 영양체 성장변화에 대한 조사는 Child (1973)의 방법을 수정하여 사용하였다. YPSS 배지 100ml을 pH3~9로 각각 조정한 후 28°C에서 3일간 회전진탕 배양한 후 건조량을 측정하였다.

#### 3) 溫度가 營養體 成長에 미치는 影響

YPSS agar 배지에 균사를 접종하고 4, 10, 15, 20, 25, 27, 30, 37°C별로 항온기에서 5일간 배양한 후 건조량을 측정하였다.

#### 4) Phosphate 濃도가 營養體 成長에 미치는 影響

Phosphate 농도에 따른 영양체 성장의 변화는 Nolan (1979)의 방법을 사용하였다.

YPSS 배지 100ml을 phosphate 농도 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM로 조정하고 접종한 후 28°C에서 2일간 회전진탕 배양하면서 건조량을 측정하였다.

#### 5) Casamino acid 濃도가 營養體 成長에 미치는 影響

YPSS 배지 100ml을 각각 Casamino acid 농도가 5, 10, 15, 20, 25mg/l 되게 조정한 후 균사를 접종하고 28°C에서 2일간 회전진탕 배양하여 건조량을 측정하였다.

### 生活史的 顯微鏡的 觀察

#### 1) 無性生殖

보관중인 균의 활성을 위해 28°C에서 2일간 전배양하고 무성생식 단계를 관찰하기 위해 균체를 원심분리(4,000rpm, 10분)한 후 멸균된 10mM 인산완충액 100ml에 옮긴 후 24시간 동안 실온에 방치하여 유주자의 생성을 유도하였다. 유주자의 생성으로부터 상층액만을 새로운 플레이트에 옮긴 후 1% aniline blue로 염색한 후 검경하였다.

피낭포자와 발아의 유도는 Ho (1975)의 방법을 적용하였다. 유주자가 관찰된 인산완충액안에 무균처리한 삼썬을 넣어서 피낭포자의 형성을 유도하였고 2시간 후 삼썬을 멸균증류수 20ml이 들어있는 플레이트에 옮기고 진탕한 다음 상층액만을 멸균된 플레

이트에 옮기고 하루동안 방치한 후 발아과정을 검경하였다.

2) 有性生殖

Malt agar 상에서 충분히 영양체 성장이된 균사에 20ml의 멸균수를 첨가하고 24시간마다 갈아주면서 실온에서 5~6일 배양한 후 현미경으로 검경하였다.

結果 및 考察

*Saprolegnia* sp. 菌株의 分離

보관균주를 Malt 배지에 접종, 배양한 후 멸균증류수나 10mM 인산 완충액으로 유성생식과 무성생식을 유도해본 결과 난포자의 형성(Fig. 11), 유주자의 형성(Fig. 7), 영양체 성장(Fig. 6) 등 Sapparow (1960)의, 표준균주인 *Saprolegnia ferax*의 기재와 유사하여 *Saprolegnia* sp.임을 확인하였다.

生理的 特性調査

1) 成長曲線

분리한 *Saprolegnia* sp.의 성장특성을 조사하기 위해서 시간별로 배양한 후 건중량의 측정결과 Fig. 1과 같은 도표를 얻었다. 10시간부터 유도기에 들어갔으며 24시간 후부터는 왕성한 영양체 성장을 볼

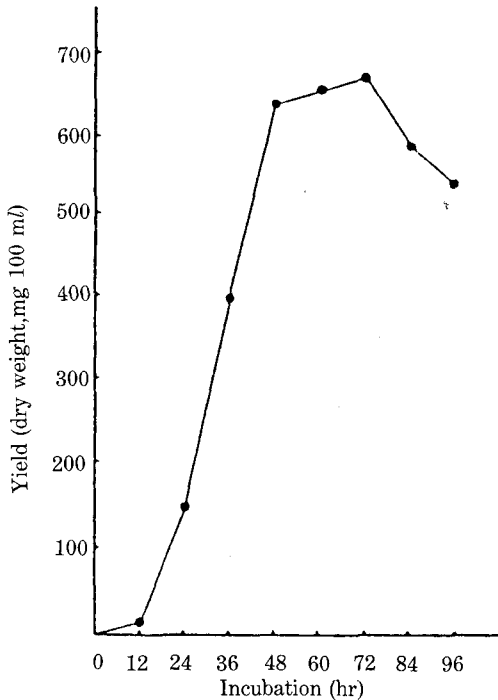


Fig.1. The growth curve of mycelium of *Saprolegnia* sp.

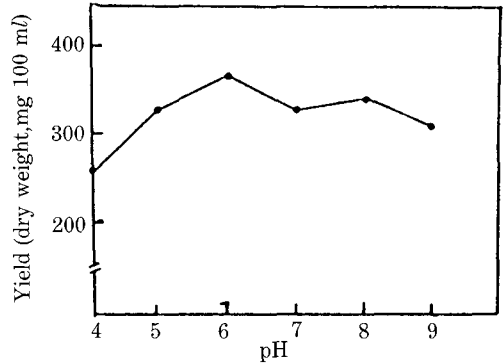


Fig.2. Effect of pH on the growth of *Saprolegnia* sp. in YPSS media.

수 있었고 72시간 후부터는 쇠퇴기임을 알 수 있었다.

2) 培地の pH 變化에 따른 成長曲線

분리균주의 pH 변화에 따른 영양체 성장의 변화의 결과는 Fig. 2와 같으므로 pH의 변화에도 불구하고 고르게 성장했다. 도표상에서 적정 pH는 5~6이었고 최적 pH는 5.8이었다.

3) 培養溫度 變化에 따른 成長曲線

분리균주의 온도에 대한 영양체 성장의 변화는 Fig. 3과 같다.

*S. ferax* (Sapparow, 1960)와는 달리 광범위한 온도에서 성장했고 특히 25~30°C 사이에서 왕성하게 성장했으며 최적온도는 28°C이었다.

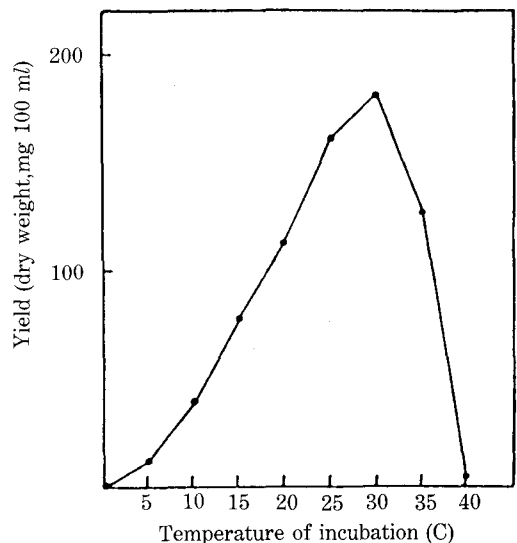


Fig.3. Effect of temperature on the growth of *Saprolegnia* sp. in YPSS media.

4) Phosphate 濃度 變化에 따른 成長曲線

Phosphate 농도에 따른 영양체 성장의 변화는 미소한 차이를 보였지만 *S. ferax*의 경우는 10mM이 최적농도이고 10mM 이상이면 급격하게 영양체 성장이 억제되나(Saparrow), 본 연구결과는 5~10mM이 최적이었으며 10mM 이상이면 영양체 성장이 완전하게 억제되는 것을 알 수 있다(Fig. 4).

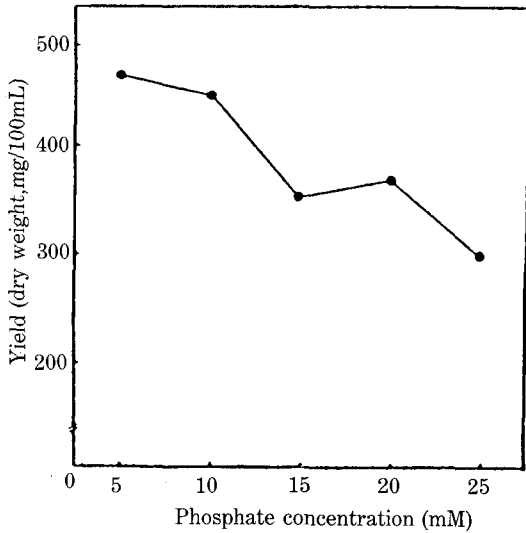


Fig. 4. Growth of *Saprolegnia* sp. in the various concentrations of phosphate in YPSS media.

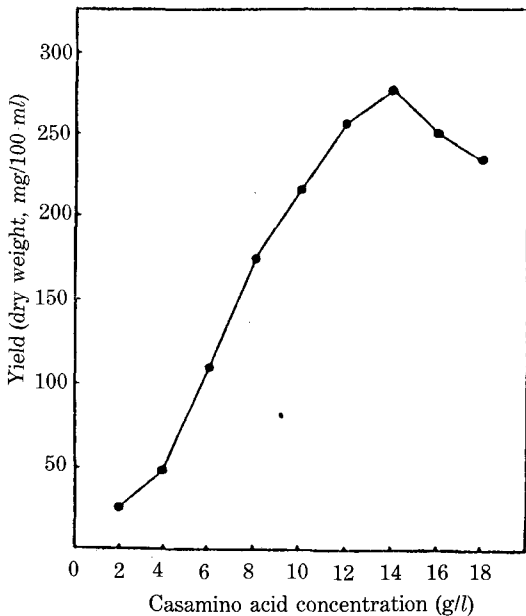


Fig. 5. Growth of *Saprolegnia* sp. in the various concentrations of casamino acid in YPSS media.

5) Casamino acid 濃度 變化에 따른 成長曲線

Casamino acid의 농도별로 조사해본 결과 표준 균주인 *S. ferax*는 최적농도가 4g/l인 반면(Saparrow), 본 연구에서는 14g/l이었다(Fig. 5).

生活史의 顯微鏡的 觀察

1) 營養體成長

Malt 배지에서 영양체 성장은 방사상의 형태로 균사가 자라며 다핵체(Coencyte)이며 균사의 내벽에 세포질층이 있으며 원형질의 유동과 다수의 과립들을 볼 수 있었는데 이는 균사벽의 전구체라 생각된다. 영양균사의 크기는 지름이 29~34 $\mu$ m이었으며 균사의 선단은 가늘었다.

2) 無性生殖

영양체 성장으로부터 유주자 형성의 유도결과 유주자낭은 균사의 끝에서 발달하며 곤봉형태(Club shaped)로 관찰되며 Fig. 6과 같이 세포벽 내부에 다수의 핵과 세포질이 밀집된다. 유주자 형성과정의 길이는 143~217 $\mu$ m이고 넓이는 17~28 $\mu$ m이며 정점에 유주자가 분화, 발달해서 방출할 수 있는 투명

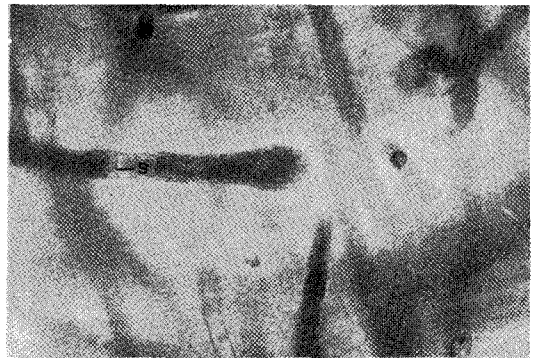


Fig. 6. The early stage of a zoosporangium of *Saprolegnia* sp. ( $\times 640$ ) S: Septum.



Fig. 7. The formation of a zoosporangium of *Saprolegnia* sp. ( $\times 660$ ) A: Apex. Z: zoospore S: Septum.

한 세포질의 돌기를 볼 수 있다(Fig. 7).

유주자 형성 유도 후 24시간이 지나면 유주자의 형태를 관찰할 수 있었고 크기는  $10.3\mu\text{m}$ 로 원형의 형태였다(Fig. 8)

형성된 유주자로부터 피낭포자로의 유도결과 삼씨 주위에서 형성된 피낭포자를 볼 수 있었으며 발아는 유도된 후 24시간만에 이루어짐을 관찰하였다(Fig. 9, 10).

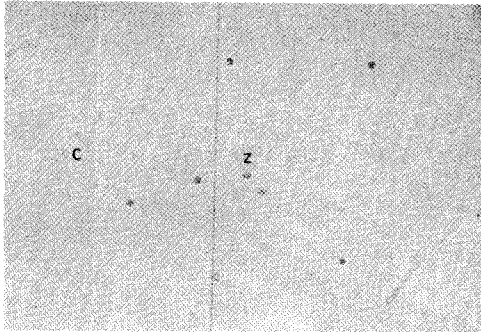


Fig.8. Zoospore and cyst of *Saprolegnia* sp. ( $\times 420$ ) Z: zoospore. C: cyst.

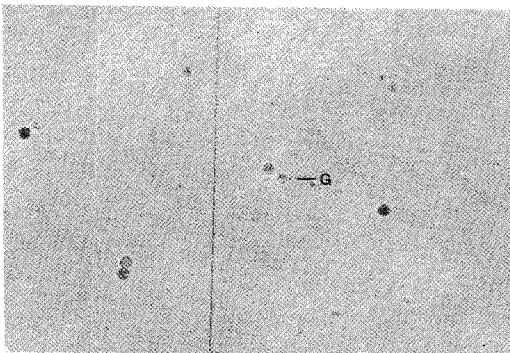


Fig.9. The germination of cyst of *Saprolegnia* sp. ( $\times 530$ )

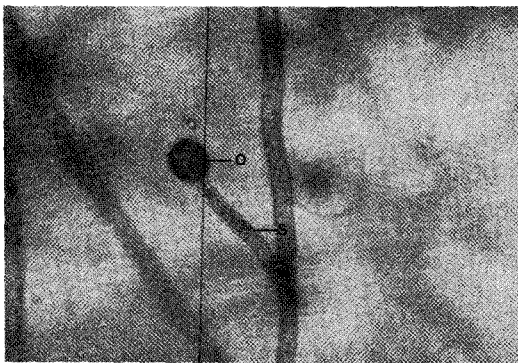


Fig.10. The early stage of an oogonium formation of *Saprolegnia* sp. ( $\times 1170$ ) O: oogonium. S: septum.

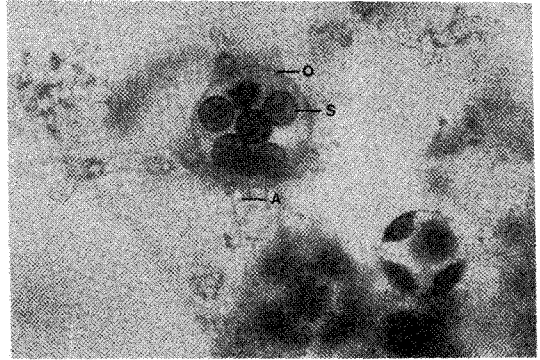


Fig.11. The late stage of an oogonium formation of *Saprolegnia* sp. ( $\times 1170$ ) O: oogonium. S: oospore. A: antheridium.

피낭포자의 형태는 원형이었으며 크기는  $11.3\mu\text{m}$ 이었다.

### 3) 有性生殖

배양된 균사를 현미경으로 검정한 결과 여러 단계의 유성생식 단계를 볼 수 있었다.

난포자 형성과정의 기원은 유주자 형성과정과 같은 균사의 끈에서 발생하였으며 발생초기에는 균사 끝부분에 격막이 생겨남을 볼 수 있었다(Fig. 10).

난포자는 성숙 후 수정관에 의해 핵물질이 전달되는데 homothallic 이었으며 수정 후 난포자의 분화 과정에서 조란기내의 난포자는 4~8개로 나타났으며 크기는 같은 조란기내에서 다양하지만 대체로  $21\sim 31\mu\text{m}$ 로 측정되었고 조란기의 크기는  $47\sim 85\mu\text{m}$ 이었다(Fig. 11). 또한 분류의 Key가 되는 지질과립의 분포는 중심성(centric)이었다.

## 摘 要

일감호 호수와 연못의 물에서 *Saprolegnia* sp.를 분리하였고 생리적 특성과 생활사에 대해 관찰한 바를 요약하면 다음과 같다.

1. 생활사중 유성생식 단계의 조란기의 크기는 지름이  $47\sim 85\mu\text{m}$ 이었고 난포자의 크기는  $21\sim 31\mu\text{m}$ 이었다.

무성생식 단계의 유주자의 크기는 지름이  $10.3\mu\text{m}$ 이었고 피낭포자의 크기는  $11.6\mu\text{m}$ 이었다.

2. 생리적 특징은 광범위한 pH와 Casamino acid 농도에서 영양체 성장을 하였다.

최적온도는  $28^{\circ}\text{C}$ , 최적 pH는 5.8이었으며 최적 Phosphate 농도는  $5\sim 10\text{mM}$ , 최적 Casamino acid 농도는  $14\text{g/l}$ 이었다.

## 参考文献

- Ainsworth, G.C. *et al.*, (1973): The fungi. *Academic Press*. **4**: 61-73.
- Booth, C. (1971): Methods in Microbiology. *Academic Press*. **4**: 252-253.
- Child, J.J. and C. Knapp. (1973): Improved pH control of fungal culture media. *Mycology*. **65**: 1078-1086.
- Dick, M.W. (1972): Morphology and taxonomy of the *Oomycetes*, with special reference to *Saprolegniaceae*, *Leptomitaceae*, and *Pythiaceae*. *New Phytologist*. **71**: 1151-1159.
- Fuller, M.S. (1977): The zoospore Hallmark of the aquatic fungi. *Mycology*. **69**: 1-21.
- Gleason, F.H. (1974): Cyanide-insensitive respiration in *Saprolegnia*. *Mycology*. **66**: 73-76.
- Ho, H.H. (1975): Observation on the behavior of zoospores of a *Saprolegnia* species. *Mycology*. **67**: 425-428.
- Hunter, R.E. (1976): Water mold of the river great Ouse and its tributaries. *Transaction of the British Mycological Society*. **65**: 101-108.
- Neish, G.A. (1977): Observations on *Saprolegnia*-sis of adult sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). *Journal of Fish Biology*. **10**: 513-522.
- Nolan, R.A. (1976): Physiological studies *Saprolegnia megasperma* isolated with the fresh water nematode *Neomesomermis flumenalis*. *Canadian Journal of Botany*. **53**: 3032-3040.
- Nolan, R.A. (1976): Physiological studies on an isolate of *Saprolegnia ferax* from the larval gut of the blackfly *simulian vittatum*. *Mycology*. **68**: 523-540
- Nolan, R.A. (1979): Physiological comparison of a North Carolina isolate of *Saprolegnia australis*. *Mycologia*. **71**: 1136-1149
- Padgett, D.E. (1976): An isolate of *Saprolegnia australis* from Southeastern North Carolina. *Mycologia*. **68**: 1258-1260.
- Pickering, A.D., Willoughby, L.G. and McGrory, C.B. (1979): Fine structure of secondary zoospore cyst cases of *Saprolegnia* isolates from infected fish. *Transaction of the British Mycological society*. **72**: 427-436.
- Saparrow, F.K. (1960): Aquatic phycomycetes. The University of Michigan Press. 833-838.
- Williams, R.J. and Owen, H. (1976): Susceptibility of Barley Cultivars to leaf blotch and aggressiveness of *Rhynchosporium secalis* races. **65**: 109-114.
- Willoughby, L.G. and Pickering, A.D. (1977): Viable *Saprolegniaceae* on the epidermis of the solmid fish *Salmotrutta* and *Salvelinus alpinus*. *Transaction of the British Mycological Society*. **68**: 91-95.

Accepted for Publication 20 February 1989