

자연산 다묵장어, *Lethenterone reissneri*에서 발생한 물곰팡이병 원인체의 동정

김형준, 박정수* · 김성연* · 구자근** · 방인철*** · 권세련†

국립수산물품질관리원 인천지원, *선문대학교 수산생명의학과, **인천수산자원연구소,
***순천향대학교 생명시스템학과

Identification of water mold from wild brook lamprey, *Lethenterone reissneri*

Hyoung Jun Kim, Jeong Su Park*, Sung Yeon Kim*, Ja Geun Koo**, In-Chul Bang*** and Se Ryun Kwon†

National Fishery Products Quality Management Services, Incheon Regional Office, Incheon 400-800, Korea

*Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea

**Incheon Fisheries Research Institute, Incheon 409-874, Korea

***Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

Saprolegnia isolate from wild brook lamprey was identified on the basis of its morphological and molecular characteristics. The isolates showed aseptate hyphae and clavate zoosporangium. Zoospores discharge was typically saprolegnoid. Neither oogonia nor antheridia was observed in this study. ITS sequence obtained from the isolate was compared with other *Saprolegnia spp.* to analyse their phylogenetic relationships. Results showed that the isolate belongs to clade I including *Saprolegnia parasitica*. Based on the asexual organs, zoospore discharge manner and ITS sequence analysis, the isolate was identified as *S. parasitica*.

Key words : *Saprolegnia parasitica*, Internal transcribed spacer sequence, ITS sequence, Phylogenetic analysis

물곰팡이병은 자연산이나 양식산 담수어류 및 그 난에 물곰팡이가 기생하는 것으로 그 원인체는 주로 편모균아문의 난균강, *Oomycetes*, 수생균목, *Saprolegniales*, 수생균과, *Sapolegniaceae*에 속하는 균류이다(Diéguez-Urbeondo *et al.*, 1994; 지 등, 2001). 이 병은 다양한 종류의 어류 및 갑각류, 양서류에도 감염되고, 숨털 모양의 균사체가 아가미, 지느러미, 체표, 알 등에 기생하는 것이 특징이며, 세균감염이나 상처에 의한 2차 감염으로 일어난다 (Meyer, 1991). 물곰

팡이병은 20°C 이하인 저수온기에 발생하여 균사의 신장이 심한 경우에는 표피는 물론 진피, 피하지방 조직, 체측근 조직까지 뚫어 나오게 되어 체표가 광범위하게 괴사되는데, 어류가 폐사하게 되는 원인은 삼투압 조절기능의 파괴 때문으로 여겨진다 (박과 오, 2011).

진균증의 원인체의 동정 및 분류는 조란기, 조정기, 조정기의 기원, 조란기 내의 난구 수 및 난구의 배열, 난포자, 난포자 내의 지방방울의 위치 등을 포함한 유성생식기관의 정확한 관찰 및 해석에 근간을 두고 있다 (Ke *et al.*, 2009). 그러나 다수의 분리 균주들을 *in vitro* 배양했을 때 유성생식기관을 생산하지

†Corresponding author : Se Ryun Kwon

Tel : 041-530-2289, Fax : 041-530-2917

E-mail : srkwon@sunmoon.ac.kr

못하는 경우가 종종 발생한다는 보고가 있으며 (Hatai *et al.* 1990; Stueland *et al.* 2005; Diéguez-Urbeondo *et al.* 2007), 이러한 형태적 분류는 균류의 동정 시간 많이 소요되고 전문적 소견이 필요하다.

형태학적 동정을 대신하여 최근에는 유전학적 동정 및 확인 방법이 이용되고 있다. 연어과어류에서 분리된 *Saprolegnia* 분리균에는 DNA fingerprinting 법 (Whisler, 1996), 또는 radom amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR)도 적용된 바 있다 (Diéguez-Urbeondo *et al.* 1996; Bangyeekhun *et al.* 2001). 최근에 Diéguez-Urbeondo *et al.* (2007)은 여러 어종에서 분리된 *S. diclina* 및 *S. parasitica* 분리 균주를 대상으로 하여 ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences를 사용한 계통학적인 분석 결과와 유성생식기관의 특징에 기초한 형태학적인 분석 결과 및 숙주와 지리학적 기원을 바탕으로 계통학적인 유연관계를 재분석한 바 있다.

본 연구에서는 다목장어, *Lethenterone reissneri*에서 발생한 물곰팡이병의 원인체를 동정하기 위하여 ITS1 gene, 5.8S rDNA 및 ITS2 gene을 포함하고 있는 ITS sequences를 분석하고, *Saprolegnia* 속의 종들과 형태학적 특징을 비교하여 원인균을 분류하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양

경남 하동군 적량면 섬진강 지역에서 채집한 체장 14.8 cm, 체중 4.68 g의 자연산 다목장어, *Lampetra reissneri*에서 체포로 인해 발생한 상처에 물곰팡이로 의심되는 균사를 발견되었다.

균주의 분리에는 glucose-yeast extract agar (GY agar; 1% glucose, 0.25% yeast extract, 1.5% agar) 배지

가 사용되었다. 다목장어 미병부 표면에서 관찰되는 솜 모양의 물곰팡이 균사를 절취하여 GY agar에 접촉한 뒤 20°C에서 배양하였다. 곰팡이가 성장한 GY agar를 1cm x 1cm의 크기로 잘라 새로운 배지에 옮겨 심은 후 20°C에서 배양하였다.

형태학적 관찰

배양된 균주는 평판배지를 1cm x 1cm의 크기의 block으로 잘라 penicillin과 streptomycin이 첨가된 멸균 증류수에 담가 20°C에서 배양하면서 균사체를 현미경 (Olympus)으로 관찰하였다.

DNA 분리 및 PCR 반응

유전자 동정을 위해 순수 분리된 균주를 절취해서 DNA 분리 kit를 (ExgeneTM Tissue SV; GeneALL) 사용하여 Genomic DNA를 추출하였다. PCR 반응은 TaKaRa사의 Ex-Taq 사용하였으며, PCR에 사용된 primer로는 White *et al.* (1990)의 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C denaturation 30초, 50°C annealing 30초, 72°C extension 1분 30초를 35cycles 반응시키고, 72°C에서 7분간 post-extension 반응을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하고, ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 특이 밴드를 확인하고 SV Gel and PCR Clean-up system (Promega)으로 정제한 후 Bioneer (Korea)에 의뢰하여 sequence 분석을 실시하였다. 분석된 ITS sequence는 GenBank에 등록된 *Saprolegnia* 분리주들 가운데 Diéguez-Urbeondo *et al.* (2007)가 보고한 14개의 분리주의 ITS sequence에 기초하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

결과 및 고찰

다목장어로부터 분리한 물곰팡이 균주는 GY agar에 접종하고 20°C에서 1주일이상 배양한 결과 목화솜과 같은 집락을 형성하였고 (Fig. 1A), 평판배지에서 균사는 나뭇가지 모양과 같이 뻗어 나가는 것이 관찰되었다 (Fig. 1B). 본 연구에서 관찰된 물곰팡이의 균사는 지 등 (2007)이 무지개송어 수정란에서 분리한 물곰팡이의 균사와 같이 나선형으로 꼬여서 성장하는 모습은 관찰할 수 없었다. 균사가 자란 평판배지의 block을 멸균 증류수에 담가 현미경으로 관찰한 결과 가늘고 길며 격벽이 없는 균사체를 확인할 수 있었다.

물곰팡이 분리주의 무성생식 기관을 관찰한 결과, 가늘고 긴 모양의 유주자낭 내에 활발한 운동성을 보이는 유주자가 여러 줄로 배열되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A). 유주자의 방출 방식은 유주자낭의 선단에서 휴면하지 않고 한꺼번에 방출되는 전형적인 *Saprolegnia* 속의 특징을 보여주었다 (Fig. 2B). 지 등 (2007)의 연구에서도 연어과 어류에서 분리한 4종의 분리주 가운데 연어 수정란에서 분리한 한 균주에서만 GY agar에 접종하고 5°C에서 약 15일간 배양한 후에야 조란기가 관찰되었다고 보고하였다. 그 밖에 Stueland *et al.* (2005)는 물곰팡이의 유성생식기가 고온에서보다는 상대적으로 5°C 정도의 저온에서 잘 형성한다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 균사의

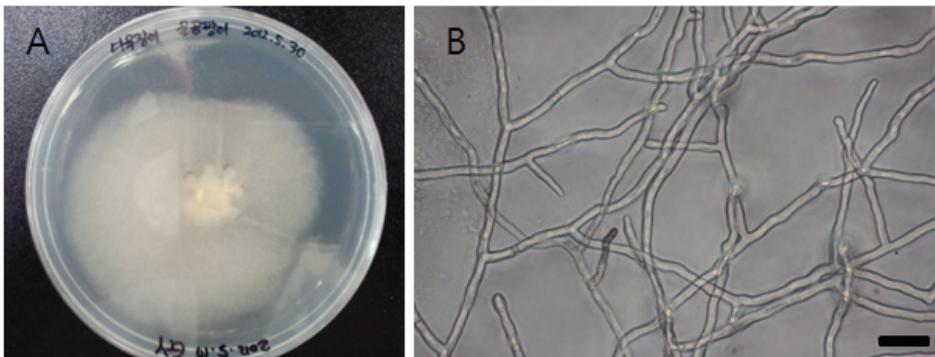


Fig. 1. Morphological characteristics of *Saprolegnia parasitica*. Cotton like colony (A) and branched aseptate hyphae (B). Bar = 50 μ m

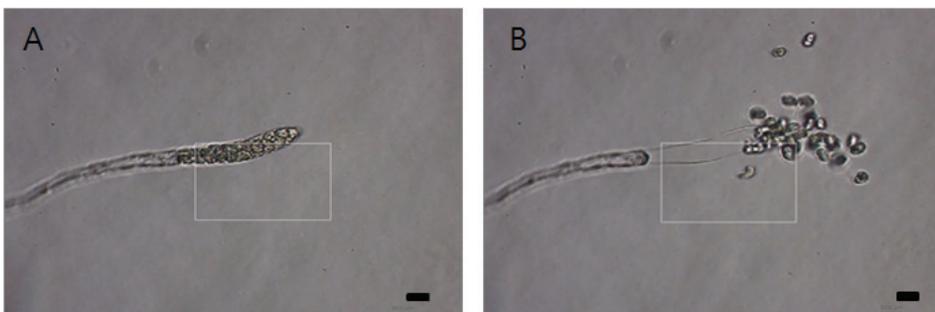


Fig. 2. Light micrographs of *Saprolegnia parasitica*. Pyriform zoosporangium (A) and release of zoospores (B). Bar = 50 μ m

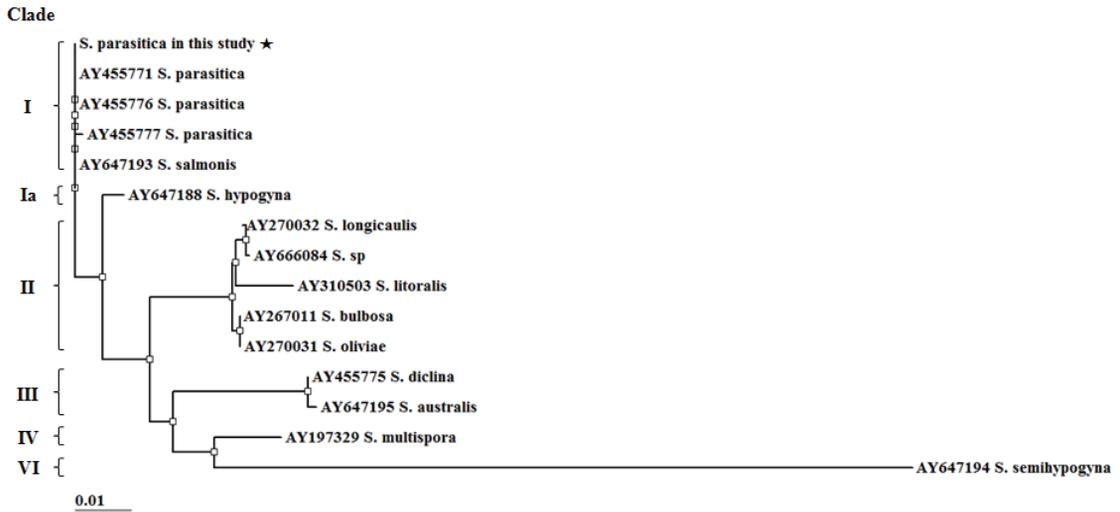


Fig. 3. Phylogenetic relationships among 15 saprolegnia isolates based on internal transcribed spacer (ITS) sequence homology. The scale represents 0.01 nt substitutions per position.

배양 및 관찰을 20°C에서 실시하였는데, 실험 기간 중 유성생식기관인 조랑기와 조정기는 관찰되지 않았다. 물곰팡이의 *in vitro* 배양에서 다수의 *Saprolegnia* 균주가 유성생식기를 형성하지 않는다는 보고가 있다 (Yuasa and Hatai, 1995; Hussein *et al.*, 2001).

물곰팡이 균사체에서 분리한 DNA를 ITS1, 5.8S rDNA 및 ITS2 유전자들을 증폭할 수 있는 primer를 사용하여 PCR한 결과 710 bp의 band를 얻을 수 있었다 (data not shown). 이 PCR 산물의 sequence 분석을 통하여 primer 부분을 제외한 분리주의 ITS sequence가 본 연구에서 비교한 14개의 균주 중에서 *S. parasitica* (AY455771, AY455777) 및 *S. salmonis* (AY647193)와 100% 일치하는 것을 확인하였다. 또한 Neighbor-Joining method (BioEdit Version 7.1.7)로 phylogenetic tree를 작성한 결과, *S. parasitica*, *S. diclina* Type 1, *S. salmonis*, *S. hypogyna* 및 *Saprolegnia sp*가 속하는 clade I에 분류되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). Diéguez-Uribeondo *et al.* (2007)의 ITS sequence를 바탕으로 한 계통학적 분석 결과에 따르

면 총 6개의 clade로 분류될 수 있다. Clade I은 *S. parasitica*를 대표로 하여 *S. diclina* Type 1, *S. salmonis*, *S. hypogyna* 및 다수의 *Saprolegnia sp*가 속하는데, 이들 분리주들은 다양한 지역과 숙주로부터 기원하고 있다. Clade II에는 *S. ferax*, *S. diclina* Type 2, *S. bulbosa*, *S. litoralis*, *S. lonicaulis*, *S. oliviae*, *Saprolegnia sp*가 속한다. 한편 clade III과 clade V에는 모든 *S. diclina* 분리주가 포함되어 있다. 즉 영국에서 분리된 한 종과 스페인에서 분리된 6종의 *S. diclina* 균주, *S. ferax*, 일본에서 분리된 *S. diclina*, *S. australis*가 clade III에 분류되며, clade V에는 스페인의 브라운 송어의 난에서 분리된 6종의 *S. diclina*가 속해있다. Clade IV는 칠레와 프랑스에서 분리된 *S. australis*와 *S. multispora*가 포함되어 있다. 마지막으로 clade VI에는 *Leptolegnia sp*, *S. semihypogyna*, *S. litoralis*가 속해있다.

형태학적인 각각의 차이에 대한 연구 결과를 바탕으로 분석한 결과, 본 연구에서 관찰한 균사체와 유주자낭의 형태는 길고 가늘었으며 유주자낭 속의 성숙

한 유주자는 길게 늘어어서 생성되어 전형적인 *S. parasitica*의 특징과 일치하였다 (Shahbazian *et al.*, 2010). 한편 ITS sequence 분석에서 동일한 clade I에 속해있는 *S. hypogyna*와 형태적으로 비교해 보았을 때 *S. hypogyna*의 조란기는 구형이며 유주자낭 속의 포자 또한 크고 둥글게 보고된 반면 (Diéguez-Urbeondo *et al.*, 2007; Shahbazian *et al.*, 2010), 본 연구에서는 실험 기간 중 조란기가 관찰되지 않았다. 또한 ITS sequence 분석에서 100% 동일한 결과를 보였던 *S. salmonis*와 비교했을 경우, *S. salmonis*는 *S. parasitica*와 달리 조정기와 조란기 등의 유성생식기관이 명확히 관찰되며, 중심형 또는 아중심형의 난포자를 가진다고 보고되었다 (Hussein *et al.*, 2001). 이상의 결과로부터 무성생식기관의 형태 및 유주자 방출방식 및 ITS sequence의 phylogenetic analysis에 근거하여 자연산 다묵장어에서 관찰된 물곰팡이병의 원인체는 *S. parasitica*인 것으로 동정되었다.

요 약

자연산 다묵장어, *Lethenterone reissneri*에서 발생한 물곰팡이병의 원인체를 형태학적 및 유전학적 연구를 통하여 동정하였다. 분리균주는 격벽이 없는 균사를 형성하였고, 가늘고 긴 모양의 유주자낭 내에 활발한 운동성을 보이는 유주자가 여러 줄로 배열되었다가 유주자낭의 선단에서 휴면하지 않고 한꺼번에 방출되는 특징을 보였다. 한편 유성생식기관인 조란기와 조정기는 관찰되지 않았다. 또한 분리균주의 ITS sequence를 분석하고 *Saprolegnia* 속의 다른 분리균주와 유전학적 상관관계를 조사한 결과, *S. parasitica*가 속해있는 clade I에 분류되는 것을 확인할 수 있었다. 무성생식기관의 형태, 유주자 방출방식 및 ITS sequence의 phylogenetic analysis에 근거하

여 자연산 다묵장어에서 관찰된 물곰팡이병의 원인체는 *S. parasitica*인 것으로 동정되었다.

감사의 말씀

이 논문은 국토해양부에서 시행한 지역 R & D 역량강화(경기 씨그랜트 사업) 사업비와 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2011-0013382)입니다.

참고문헌

- Bangyeekhun, E., Quiniou, S. M. A., Bly, J. E. and Cerenius, L.: Characterisation of *Saprolegnia* sp. isolates from channel catfish. Dis. Aquat. Org., 45:53-59, 2001.
- Diéguez-Urbeondo, J., Cerenius, L. and Söderhäll, K.: *Saprolegnia parasitica* and its virulence on three different species of freshwater cryfish. Aquaculture, 120:219-222, 1994.
- Diéguez-Urbeondo, J., Cerenius, L., Söderhäll, K.: Physiological characterization of *Saprolegnia parasitica* isolates from brown trout. Aquaculture, 140:247-257, 1996.
- Diéguez-Urbeondo, J., Juan M. Fregeneda-Grandes, J. M., Cerenius, L., Pérez-Iniesta, E., Aller-Gancedo, J. M., Tellería, M. T., Söderhäll, K. and Martín, M. P.: Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. Fungal Genet. Biol., 44:585-601, 2007.

- Hatai, K., Willoughby, L. G. and Beakes, G. W.: Some characteristics of *Saprolegnia* obtained from fish hatcheries in Japan. *Mycol. Res.*, 94:182-190, 1990.
- Hussein, M. M. A., Hatai, K., and Nomura, T.: *Saprolegniosis* in salmonids and their eggs in Japan. *J. Wildl. Dis.*, 37:204-207, 2001.
- Ke X. L., Wang, J. G., Gu, Z. M., Li, M. and Gong, X. N.: Morphological and molecular phylogenetic analysis of two *Saprolegnia* sp. (Oomycetes) isolated from silver crucian carp and zebra fish. *Mycol. Res.*, 113:637-644, 2009.
- Meyer, F. P.: Aquaculture disease and health management. *J. Anim. Sci.*, 69:4201-4208, 1991.
- Stueland, S., Hatai, K., Skaar, I.: Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 28:445-453, 2005.
- Shahbazian, N., Ebrahimzadeh, M. H. A., Soltani M., Khosravi, A. R., Mirzargar, S., and Sharifpour, I.: Fungal contamination in rainbow trout eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on Saprolegniaceae. *Iran. J. Fish. Sci.*, 9:151-160, 2010.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press Inc., San Diego, CA, pp.315-322, 1990.
- Whisler, H. C.: Identification of *Saprolegnia* spp. Pathogenic in Chinook salmon final report, DE-AC79-90BP02836. US Department of Energy, Washington, D.C, pp. 43, 1996.
- Yuasa, K. and Hatai, K.: Relationship between pathogenicity of *Saprolegnia* spp. isolation to rainbow trout and their biological characteristics. *Fish Pathol.*, 30:101-106, 1995.
- 박성우, 오명주: 수산생명 질병학: pp. 371-372, 바이오사이언스, 2011.
- 지보영, 이택찬, 김나영, 정승희, 박수일: 3종의 연어과 어류와 수정난으로부터 분리한 물곰팡이병 원인 진균의 분류와 약물 효과. *한국어병학회지*, 20:147-160, 2007.

Manuscript Received : January 30, 2013

Revised : April 1, 2013

Accepted : April 2, 2013