

## 다시마(*Saccharina japonica*) 배우체의 미동정 진균증

정하나 · 오명주 · 최성제<sup>1</sup> · 서정수<sup>2</sup> · 박명애<sup>3</sup> · 김위식\*

전남대학교 수산생명의학과, <sup>1</sup>전라남도 해양수산과학원, <sup>2</sup>국립수산과학원 수산방역과, <sup>3</sup>국립수산과학원 남동해수산연구소

## Unidentified Mycosis of Kelp *Saccharina japonica* Gametophytes

Ha-Na Jeong, Myung-Joo Oh, Sung-Je Choi<sup>1</sup>, Jung-Soo Seo<sup>2</sup>, Myoung-Ae Park<sup>3</sup> and Wi-Sik Kim\*

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

<sup>1</sup>Algae Research Institute, Jeollanamdo Fisheries Research and Development Institute, Wando 59146, Korea

<sup>2</sup>Aquatic Life Disease Control Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 46083, Korea

<sup>3</sup>Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Tongyeong 53085, Korea

In 2015, white cottony tufts were observed on gametophytes of the kelp *Saccharina japonica*. Wet mount and histopathology examination revealed numerous fungal hyphae and mycelium around the gametophytes. The gametophytes surrounded by fungal hyphae were generally round and empty. A specific 610-bp fragment of the internal transcribed spacer (ITS)-5.8S rDNA-ITS gene of fungi was amplified by polymerase chain reaction and the nucleotide sequence showed 100% identity with those of *Acremonium sclerotigenum*, *Acremonium* sp. and *Ascomycota* sp. When fungus-infected gametophytes were mixed with healthy gametophytes, a high transmission rate (100%) resulted. This is the first report of mycosis of gametophytes in Korea.

Key words: Fungi, Gametophyte, Kelp, *Saccharina japonica*

### 서론

다시마(*Saccharina japonica*)는 갈조류에 속하는 한류성 해조류로서 우리나라에서는 동해안 북부인 원산만 이북 해역에서 자연 서식하는 다년생 해조류에 속한다. 다시마는 만니톨(mannitol)과 글루타민산(glutamic acid)이 함유되어 있어 특유한 맛을 나타내고, 또한 요오드, 알긴산 및 라미나린을 다량 함유하고 있어 건강식품으로 각광을 받고 있는 수산 식물 중 하나이다(Jang, 2010). 국내 다시마 양식은 1967년 일본 북해도산 다시마 어미 엽체를 도입하여 인공양식의 개발에 성공하면서 1974년도에 2,300톤이 생산되었고(Jang, 2010), 2004년도에는 약 22,500톤이 생산되었다(KOSIS, 2015). 2005년도에는 전복 양식 산업이 활성화되면서 다시마 생산량이 급격히 늘어나(전복 먹이로 사용), 연간 생산량이 약 100,000톤으로 증가하였고, 2014년도에는 약 370,000톤으로 증가하였다(KOSIS, 2015). 최근 다시마 생산량은 우리나라 해조류 생산량의 약 34%를 차지하고 있다(KOSIS, 2015).

다시마에서 발생하는 질병은 원인에 따라 환경성 질병과 감염성 질병으로 구분할 수 있다. 환경성 질병은 조도 불량, 담수 유

입, 영양염의 부족 등으로 인해 발생하며, 감염성 질병은 세균, 진균, 착생동물 등에 의해 발생한다(Park et al., 2009). 이 중 국내 다시마 양식장에서는 착생동물인 히드라충과 이끼벌레가 다시마 엽체에 부착하여 상품가치를 하락시키고 있다(Park and Hwang, 2012; Oh et al., 2015). 다시마로부터 분리한 미생물 또는 생물에 대한 병원성을 조사하기 위해서는 수중에서 사육 중인 다시마를 이용하거나 배우체, 유엽 등을 사용해서 감염실험을 실시해야 한다. 이 중 배우체는 실험실에서 무균적으로 관리가 가능하며, 연중 저비용으로 쉽게 배양할 수 있는 장점을 가지고 있어 유용하게 사용될 수 있다. 2015년 다시마 엽체로부터 분리한 세균의 병원성을 조사하기 위해 다시마 배우체를 분양받아 관리하는 과정에서, 전체 배우체의 약 10%에서 진균의 증식이 관찰되었다. 따라서, 본 연구에서는 다시마 배우체에서 발생하는 진균증에 대해 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

2015년 전라남도 해양수산과학원 해조류연구센터로부터 다시마 배우체를 분양받아, 식물배양기에서 관리[온도, 15°C; 조

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2017.0219>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(2) 219-221, April 2017

Received 29 July 2016; Revised 19 October 2016; Accepted 23 March 2017

\*Corresponding author: Tel: +82. 61. 659. 7177 Fax: +82. 61. 659. 7177

E-mail address: [wisky@jnu.ac.kr](mailto:wisky@jnu.ac.kr)

도, 1,000-1,500 lx; 광주기, 14:10 h (L:D)] 하였으며, 2주 간격으로 enriched seawater Saga-2 (ESS-2) 배지를 교환하였다. 배우체의 크기가 지름 2.0 mm 이상으로 성장하게 되면 멸균 핀셋으로 배우체를 약 1/2 등분하여 배양하였다. 위와 같은 방법으로 배우체를 관리하던 과정에서 하얀 솜털로 뒤덮인 배우체가 관찰되어 본 시료를 채집하여 실험에 사용하였다. 채집된 시료로부터 육안 및 현미경 관찰을 실시하였고, 병리조직학적 검사를 위해 시료를 5% 중성 포르말린액에 고정한 후 상법에 따라 70%에서 100%까지 단계별 농도의 에탄올 수용액 내에서 탈수하고, 자일렌으로 투명화하여 파라핀을 침투시켜 포매 후, 조직 절편을 만들어 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다. 배우체에 부착된 진균을 동정하기 위해, 배우체로부터 균사체를 분리한 후 proteinase K와 phenol-chloroform 용액을 사용하여 DNA를 분리한 후(Kim et al., 2005), 진균 검출용 primer인 internal transcribed spacer 5 (ITS5) (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')와 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다(타겟 gene: ITS-5.8S rDNA-ITS 부위) (White et al., 1990). PCR 반응은 30 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 μM의 각 dNTP, 1 U Taq DNA polymerase가 포함되어 있는 혼합물(PCR pre-mix, Bioneer, Korea)에 20 pmol의 각 primer와 추출된 DNA 1 μL (100 ng/ μL)를 첨가하여 실시하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denature시킨 후, 95°C에서 1분간 denature, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 반응을 30 cycles을 진행시키고, 72°C에서 5분간 post-extension 하였다. PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel을 이용하여 확인하였고, gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제 후 ABI PRISM dye terminator sequencing chemistry (Applied Biosystems, U.S.A.)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 GenBank의 blast 분석을 실시하여 동정하였다. 감염실험은 2개의 25 flask에 ESS-2 배지를 30 mL씩 첨가한 후 국립수산과학원 해조류연구센터로부터 분양받은 건강한 배우체(지름, 1.7-2 mm)를 5개씩 넣어주었다. 실험구에는 진균이 부착되어 있는 배우체(1.7 mm)를 1개 넣어주었고, 대조구에는 건강한 배우체(1.7 mm)를 1개 넣어 준 후 15°C에서 1,500 lx로 7일간 배양하였다. 진균의 부착 여부는 1일 간격으로 현미경 검사를 통해 확인하였고, 건강한 배우체의 주위에 균사가 약 20% 이상 부착되었을 경우 양성으로 판정하였다. 감염실험에 사용한 배우체는 현미경 검사를 통해 기생충과 진균에 대하여 음성인 것을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

2015년 연구목적으로 다시마 배우체를 관리하는 과정에서 전체 40개 중 4개의 페트리디쉬에서(1개의 페트리디쉬: 3-4개의

배우체가 들어 있음) 배우체에 솜털 모양의 이물질이 덮여 있는 것이 관찰되었다(Fig. 1A). 이물질로 덮여 있는 배우체를 현미경으로 관찰한 결과, 가늘고 긴 균사들이 배우체를 뒤덮고 있었다(Fig. 1B). 진균이 부착된 배우체는 약 30일간 정상적인 배우체의 색을 유지하였으나, 시간이 경과됨에 따라 배우체가 하얗게 변화하면서 폐사되었다. 균사로 뒤덮인 배우체를 대상으로 병리조직학적 검사를 실시한 결과, 배우체 내부에는 균사가 관찰되지 않았으며, 배우체 주위로 다수의 균사체와 균사들이 관찰되었다(Fig. 2). 균사로 뒤덮인 배우체는 정상 배우체와 달리 전반적으로 둥그런 형태를 보이거나 내부가 비어 있었다(Fig. 2). 이상의 연구 결과, 배우체에 솜털 모양으로 뒤덮인 이물질은 진균으로 확인되었다. 또한 진균은 배우체 내부로 침입하지는 않지만 진균 주변의 배우체들은 형태가 변형되거나 내부가 비어 있는 것으로 보아 배우체는 진균에 의해 영향을 받는 것으로 추정된다. 배우체에 부착된 진균을 이용하여 PCR을 실시한 결과, 약 610 bp의 PCR 산물이 확인되었다(data not shown). PCR 산물을 사용하여 염기서열을 분석한 결과(556 bp, primer 염기서열 미포함), *Acremonium sclerotigenum*, *Ascomycota* sp., *Acremonium* sp. (GeneBank Accession Number KU059865의 염기서열 17-572 bp와 동일)와 100% 일치하는 것으로 확인되었다. 배우체로부터 분리한 진균을 사용하여 감염실험을 실

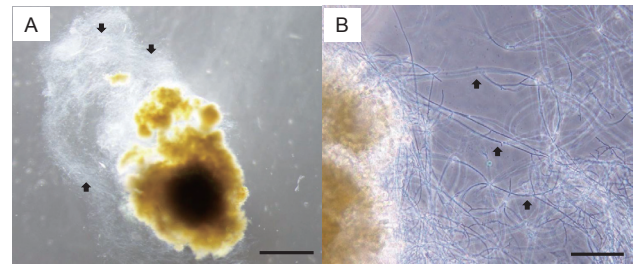


Fig. 1. Gametophyte attached to fungi (arrows) (A). Magnification of fungi (arrows) (B). Scale bar=500 μm (A), 50 μm (B).

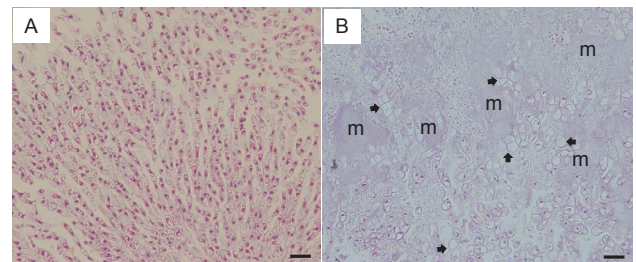


Fig. 2. Histopathology of gametophyte attached to fungi. Normal gametophyte (A) and fungi-affected gametophyte (B). Numerous fungal hyphae and mycelium (m) were observed around gametophyte and the fungi-affected gametophyte were generally rounded and empty (arrows). Scale bar=20 μm (A, B).

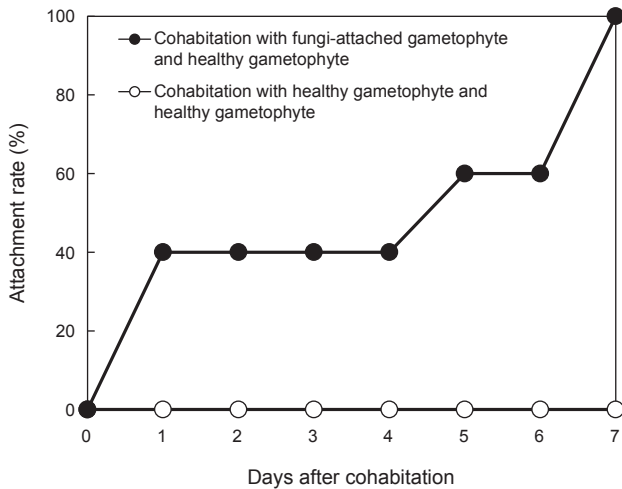


Fig. 3. Attachment rate (%) of fungi in gametophyte cohabitation with fungi-attached gametophyte. Cohabitation with fungi-attached gametophyte and healthy gametophyte (●), cohabitation with healthy gametophyte and healthy gametophyte (○).

시한 결과, 건강한 배우체(5개)와 진균에 부착된 배우체(1개)를 혼합 배양한 실험구에서는 1일째부터 건강한 배우체의 40%에서 진균의 부착이 관찰되었고 7일째는 모든 배우체에서 진균이 관찰되었다(부착률, 100%) (Fig. 3). 대조구에서는 진균의 부착이 관찰되지 않았다. 이상의 연구 결과, 배우체에 부착된 진균은 *Acremonium sclerotigenum*, *Ascomycota* sp., *Acremonium* sp.와 예기서열이 100% 일치하므로 *Acremonium* sp. 또는 *Ascomycota* sp.로 추정되며, 빠른 전파력을 지닌 것으로 확인되었다. 다시마에서 분리되는 진균으로는 *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Dendryphiella* sp. 등이 보고되어 있다(Schatz, 1980; 1984; Zvereva, 1998). 이중 *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp., *Dendryphiella* sp.는 다시마 엽체에서 분리되었으며, *Fusarium* sp.는 다시마 배우체에서 분리되었다. 본 연구에서는 다시마 배우체에서 처음으로 *Acremonium* sp. 또는 *Ascomycota* sp.로 추정되는 진균증을 확인하였다. 진균의 오염은 배우체를 관리하는 과정에서 발생했기 때문에 사용한 실험도구, 배지, 실내 환경 등으로부터 유입되었을 것으로 추정된다. 본 진균은 배우체에 빠르게 전파되어 증식하므로 실내에서 배우체를 관리할 경우, 본 진균에 의한 오염에 주의가 필요하다.

## 사 사

본 연구는 국립수산물품질관리원 수산물안전연구사업 수산물방역 프로그램 개발운영과제(R20166069)의 지원으로 수행된 연구입니다.

## References

- Jang GN. 2010. Seaweed and crustacean culture. 2<sup>nd</sup> ed, Samkwang publishers, Seoul, Korea. 88-129.
- Kim WS, Oh MJ, Jung SJ, Kim YJ and Kitamura SI. 2005. Characterization of an iridovirus detected from cultured turbot *Scophthalmus maximus* in Korea. *Dis Aquat Org* 64, 175-180.
- Korean statistical information service (KOSIS). 2015. Fishery production survey: Statistics by type of fishery and species[Internet]. Retrieved from [http://kosis.kr/statisticsList/statisticsList\\_01List.jsp](http://kosis.kr/statisticsList/statisticsList_01List.jsp) on July 2016.
- Oh MJ, Kim WS, Kim JO, Jeong HN and Kim JO. 2015. Study on management of seaweed (kelp) disease. Nation Fisheries Res Develop Instit. Busan, Korea.
- Park CS and Hwang EK. 2012. Seasonality of epiphytic development of the hydroid *Obelia geniculata* on cultivated *Saccharina japonica* (Laminariaceae, Phaeophyta) in Korea. *J Appl Phycol* 24, 433-439. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-011-9755-3>.
- Park SW, Lee JH and Kim YS. 2009. Seaweed disease. Bioscience, Seoul, Korea, 105-116.
- Schatz S. 1980. Degradation of *Laminaria saccharina* by higher fungi: a preliminary report. *Bot Mar* 23, 617-622.
- Schatz S. 1984. Degradation of *Laminaria saccharina* by saprobic fungi. *Mycologia* 76, 426-432.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. eds., Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Academic Press, San Diego, U.S.A., 315-322.
- Zvereva LV. 1998. Mycobiota of the cultivated brown alga *Laminaria japonica*. *Russ J Mar Biol* 24, 19-23.