

강원 삼척 및 경북 영주의 담수지역에서 발굴된 수생균류 3종의 국내 최초 보고

문혜연* · 고재덕 · 오유선 · 정남일

국립낙동강국립생물자원관 담수생물조사연구실 균류자원조사부

New Records of Three Aquatic Fungi Isolated from Freshwater in Samcheok and Yeongju, Korea

Hye Yeon Mun*, Jaeduk Goh, Yoosun Oh and Namil Chung

Fungal Resources Research Division, Freshwater Bioresources Research Bureau, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Korea

ABSTRACT : Three aquatic fungi were isolated from samples of freshwater-deposited plant litter and foam collected in Samcheok, Gangwon-do, and Yeongju, Gyeongsangbuk-do, Korea. Based on their morphological characteristics and a phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer (ITS) rDNA region, the three isolates NNIBRFG329, NNIBRFG339, and NNIBRFG19 were confirmed as aquatic fungi: *Articulospora tetracladia*, *Margaritispora aquatica*, and *Aquanectria penicillioides*. These species were known as aquatic fungi but neither species has been previously reported in Korea.

KEYWORDS : Aquatic fungi, *Aquanectria penicillioides*, *Articulospora tetracladia*, *Margaritispora aquatica*

서론

수생 불완전사상균(aquatic fungi = aquatic hyphomycetes)은 수생태계를 중심으로 생활사를 진행하는 다양한 종류의 균류를 총칭하는 것으로서, 1942년 영국의 Ingold [1]에 의해서 처음 정의되었다. 이들 균류는 용존산소가 풍부한 청정수 하천에 침전되어 있는 분해중인 나뭇잎이나 유기물에서 주로 발견된다. 이들은 유기물을 분해하여 2차대 사산물을 생산하는 등 생태계에 양분과 탄소원 순환에 중요한 매개체 역할을 한다[2]. 우리나라 등의 중금속으로 오염

된 하천에서는 중금속을 흡착시키는 등 환경정화 역할도 하고 있다[3]. 현재까지 약 300종 이상의 수생균류가 알려져 있으며, 대부분 자낭균문(Ascomycota)으로서 크게 Sordariomycetes (~11 spp.), Dothideomycetes (~10 spp.), Pezizomycetes (1 sp.), Orbiliomycetes (3~5 spp.), Leotiomycetes (>75 spp.)에 속하는 종들이 차지하고 있다[4]. 하지만 국내에서는 수생균류에 대한 보고나 연구가 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

본 연구에서는 3종의 수생균류, Leotiomycetes에 속하는 *Articulospora tetracladia*, *Margaritispora aquatica*, 그리고 Sordariomycetes에 속하는 *Aquanectria penicillioides*를 국내의 담수환경에서 발굴하였으며, 이를 국내 미기록종으로 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료 채집

강원도 삼척시 소한천, 경상북도 영주시 죽계천의 담수지역에서 침전식물체 및 포말 시료를 채집하였다. 담수 포말은 병에 담은 후 물은 버리고 사용하며, 담수 침전식물체는 폴리에틸렌 봉투에 부식된 식물 잎을 담아서 채집하였다. 시료는 수분이 있는 상태에서 냉장보관하면서 실험에 사용

Kor. J. Mycol. 2016 December, 44(4): 247-251
<https://doi.org/10.4489/KJM.2016.44.4.247>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: outcastm@nnibr.re.kr

Received November 25, 2016
 Revised November 30, 2016
 Accepted December 8, 2016

©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.

하였다.

균 분리

채집한 담수 침전식물체 및 담수 포말 시료를 멸균수에 2 번 세척한 후 멸균수에 넣고 20°C에서 하루 정도 배양시켰다. 배양된 물 100 µL를 water agar (WA; 20 g/L)에 도말한 후 2일 동안 25°C에서 배양하였다. 배양된 배지에서 단포자 분리를 통해 곰팡이를 순수분리하였다. 순수분리된 균류는 potato dextrose agar (PDA; Difco; BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 및 malt extract agar (MEA; Difco; BD) 배지에 접종하고 15°C 또는 20°C에 배양하여 실험에 사용하고, 일부는 15% 글리세롤에 담은 후 -80°C에 저장하였다.

포자생성 유도

분리된 수생균류의 광조건에 따른 포자생성을 조사하였다. 포자생성을 조사하기 위해 멸균된 액체 배지(0.1 g CaCl₂·2H₂O, 10 mg MgSO₄·7H₂O, 10 mg KNO₃, 0.55 mg K₂HPO₄, 0.5 g MOPS buffer, 1 L distilled water) [5]에 agar 조각을 접종한 후 20°C에서 50 rpm으로 배양하면서 생성된 포자수를 현미경으로 관찰하였다. 조건 1은 계속해서 광을 주고, 조건 2는 암상태를 계속해서 유지하면서 9일 동안 배양하였다.

DNA 추출 및 분자계통수 작성

낙동강 유역의 담수 침전식물체 및 담수 포말 시료에서

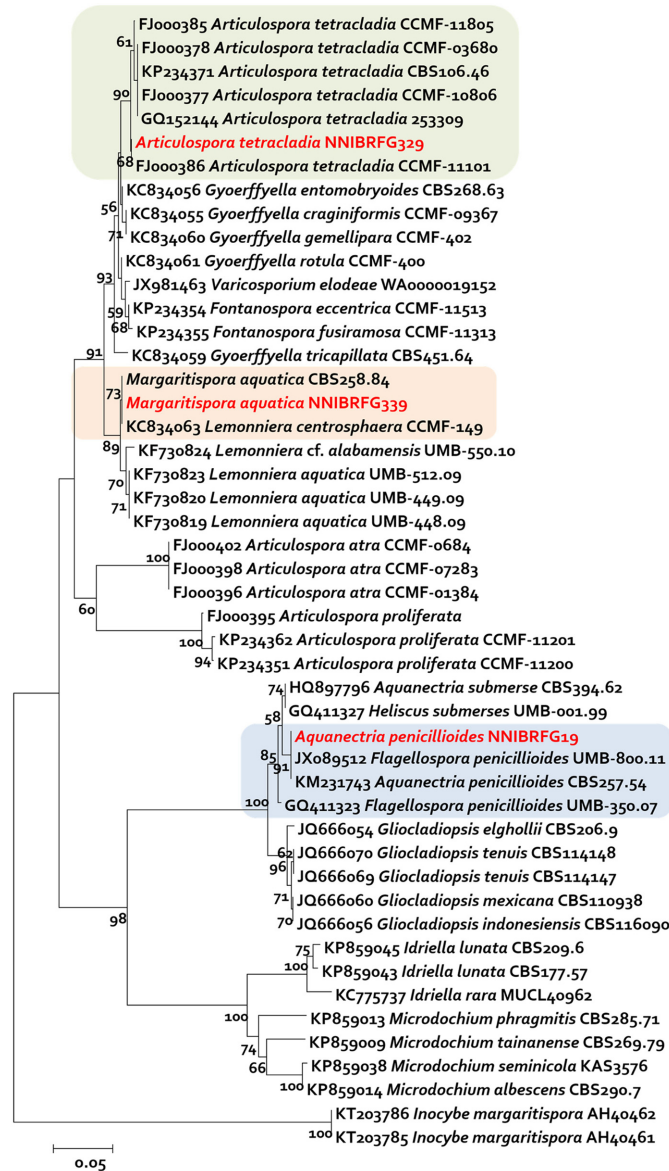


Fig. 1. Neighbor-joining tree of alignment of internal transcribed spacers rDNA region of three aquatic fungi including *Articulospora*, *Margaritispora* and *Aqanectria* species from deposited plant litter and foam. *Inocybe margaritispora* was used as an outgroup. Bootstrap values more than 50% (1,000 replications) were shown at branches.

분리된 균류는 PDA에 배양하여 균사체를 수확하였다. 수확한 균사를 glass bead가 담긴 tube에 넣어 균질화시킨 후 NucleoSpin Plant II DNA extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren, German)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 internal transcribed spacers (ITS) rDNA 부분을 증폭시키기 위해 ITS1 및 ITS4 프라이머를 사용하여 PCR을 실시하였다[6]. DNA 염기서열 정렬 및 편집을 위해 Clustal X2.1 [7]와 Bioedit 7.2.5 [8]를 사용하였고, 계통수 작성을 위해 MEGA 6.07 [9]를 사용하였다.

결과 및 고찰

Articulospora tetracladia C.T. Ingold, Trans. Br. Mycol. Soc. 25: 376 (1942)

*Articulospora tetracladia*는 잘 알려진 수생균류로서 영국의 Ingold에 의해서 1942년에 처음 보고되었다[1]. 유성세대로는 *Hymenoscyphus tetracladius*와 *Ombrophila tetracladia*가 알려져 있으나[10, 11], 많은 연구가 이루어지지 않은 실정이다.

NNIBRFG329 균주는 경북 영주시 죽계천의 담수 포말에서 분리되었다. 이 균주의 ITS rDNA 부분 염기서열을 NCBI에 등록된 염기서열과 비교하여 분석한 결과, *A. tetracladia* (GenBank Accession number FJ00386)와 99.4% (521/524 bp)의 상동성을 보였으며, Fig. 1에서와 같이 계통수 상에서도 *A. tetracladia* group에 속하는 것을 확인하였다.

NNIBRFG329 균주는 MEA 배지에 배양했을 때 15°C에서 7일 동안 20 mm 정도로 느리게 성장하였으며, 균사체는 가운데 부분이 진한 갈색을 띠다가 가장자리 부분은 흰

색을 띠었다. 4개의 arm을 가진 tetradiate 형태(tetrad hyphal-like form)의 포자를 가지고 있으며, 크기는 길이가 40~50 µm, 너비가 3~4 µm이었다(Table 1; Fig. 2A). 광조건에 따른 포자생성율을 측정한 결과, 광을 준 3일 이후부터 포자를 생성하는 것을 확인하였으며, 암조건에서는 7일이 지난 이후에 포자를 생성하기 시작하였다 (Fig. 3A).

Margaritispota aquatica C.T. Ingold, Trans. Br. Mycol. Soc. 25: 352 (1942)

*Margaritispota aquatica*는 1942년에 영국의 Ingold에 의해 처음으로 발견되었다[1]. NNIBRFG339 균주는 경북 영주시 죽계천의 담수 침전식물체(plant litter)에서 분리되었다. 이 균주의 ITS rDNA 부분 염기서열을 NCBI에 등록된 염기서열과 비교하여 분석한 결과, *Lemmoniera centrosphaera* (GenBank Accession number KC834063)와 99.2% (508/512 bp)의 상동성을 보였으나, 형태적인 특징이 일치하지 않았다. 이에 Fungal Barcoding Database [12]에서 염기서열을 비교 분석한 결과, *M. aquatica* CBS 258.84와 99.6%의 상동성을 보였다. 위의 균주를 CBS에서 분양받아 ITS rDNA 염기서열 분석을 실시하여 NNIBRFG339 균주와 비교한 결과, 99.5% (411/413 bp)의 상동성을 보였으며, 계통수 상에서도 같은 group에 속하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 형태적 특징 및 분자계통분류학적 분석을 토대로 NNIBRFG339 균주를 *M. aquatica*로 최종 동정하였다.

이를 MEA 배지에 배양했을 때 15°C에서 7일 동안 25 mm 정도로 느리게 성장하였으며, 균사체는 가운데 부분이 분홍색을 띠다가 가장자리 부분은 갈색을 보였다. 등근 장사방형으로 큐빅(cubic) 모양의 포자를 가지고 있으며, 크

Table 1. Morphological characteristics of three aquatic fungi isolated in this study

Characteristics		Colony	Conidia
<i>Articulospora tetracladia</i>	in the present study	greenish brown, reverse brown, aerial mycelium sparse, felty, slow growth	4 arms radiating (tetradiate), tetrad hyphal-like form, 3 terminal branches length 40~50 µm, width 3~4 µm
	in reference [1]	ND	4 arms radiating from a common point (tetradiate), 3 terminal branches (or 2, one of them forking again)
<i>Margaritispota aquatica</i>	in the present study	slightly reddish, reverse reddish brown, aerial mycelium felty, slow growth	globose cubic to almost stellate 8~13 µm diameter
	in reference [1]	whitish to greyish or typically reddish brown, aerial mycelium sparse, felty, conspicuous sclerotia in concentric rings (or scattered), brown to black	globose with up to six papilliform or cubic to almost stellate (8~)9~13(~14) µm diameter
<i>Aquanectria penicillioides</i>	in the present study	slightly yellowish to whitish, aerial mycelium flat	filiform, curved to slightly sigmoid, aseptate, length 30~40 µm, width 2~3 µm
	in reference [14]	ND	filiform, curved to slightly sigmoid, aseptate to 1-septate, hyaline, smooth

ND, no description.

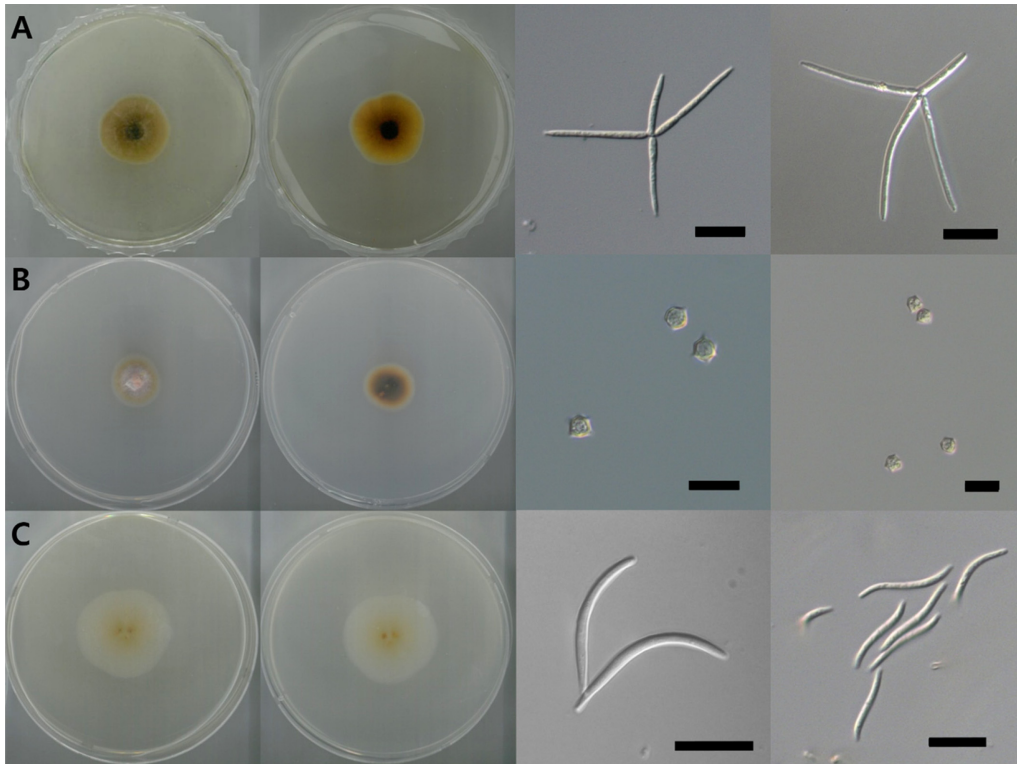


Fig. 2. Colony shape and conidia of three aquatic fungi. A, *Articulospora tetracladia* NNIBRFG329; B, *Margaritispora aquatica* NNIBRFG339; C, *Aquanectria penicillioides* NNIBRFG19 (scale bars = 20 µm).

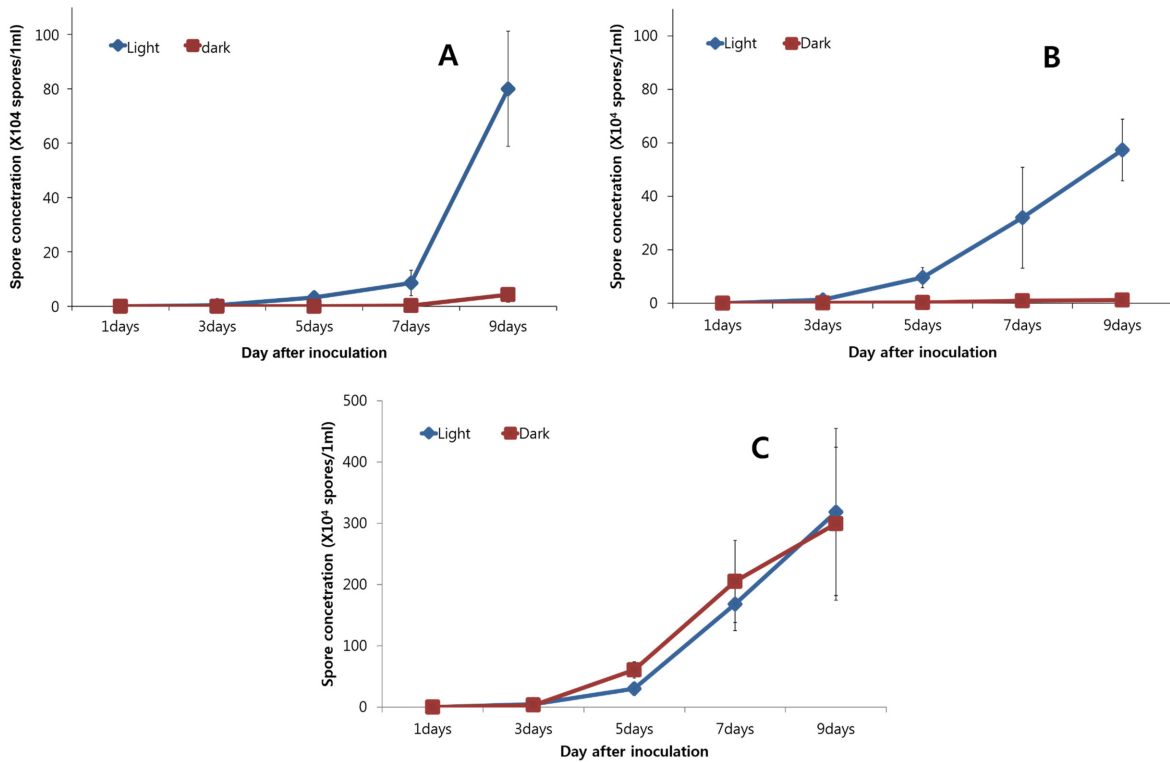


Fig. 3. Effect of light for sporulation rates of three aquatic fungi. A, *Articulospora tetracladia* NNIBRFG329; B, *Margaritispora aquatica* NNIBRFG339; C, *Aquanectria penicillioides* NNIBRFG19.

기는 지름이 8~13 μm 이었다(Table 1; Fig. 2B). 광조건을 계속 유지한 3일 이후부터 포자를 생성하였으며, 암조건에서는 9일이 지나도 포자를 생성하지 않았다 (Fig. 3B).

***Aquanectria penicillioides* (Ingold) L. Lombard & P.W. Crous, Stud. Mycol. 80:207 (2015)**

*Aquanectria penicillioides*는 *Flagellospora penicillioides*로 Ingold [13]에 의해 최초로 보고되었으나, 이후 Lombard 등 [14]에 의해서 *Aq. penicillioides*로 재명명되었다. NNIB RFG19 균주는 강원도 삼척시 소한천의 담수침전식물체 시료에서 분리되었다. 이 균주의 ITS rDNA 부분 염기서열을 NCBI에 등록된 염기서열과 비교하여 분석한 결과, *Aq. penicillioides* (GenBank Accession number KM231743)와 99.5%(547/550 bp)의 상동성을 보였다(Fig. 1).

NNIBRFG19 균주를 MEA 배지에 배양했을 때 15°C에서 7일 동안 40 mm 정도로 성장하였으며, 균사체는 가운데 부분이 연노란색을 띠고 가장자리로 갈수록 흰색을 보였다. *Aq. penicillioides*는 약간 S자 모양으로 구부러진 길고 가는 형태의 투명한 포자를 가지고 있으며, 크기는 길이는 30~40 μm , 너비는 2~3 μm 이었다(Table 1; Fig. 2C). NNIBRFG19 균주는 광조건과 암조건 모두에서 3일이 지난 후부터 포자를 생성하였다(Fig. 3C).

적 요

본 연구에서는 강원 삼척 및 경북 영주 지역의 하천에서 채집해 온 담수 침전식물체 및 담수 포말에서 균을 분리하여 수생균류 3종을 발굴하였다. 분리된 균을 형태학적 특징 관찰과 internal transcribed spacers rDNA 유전자 분석을 통해 동정한 결과, NNIBRFG329, NNIBRFG339, NNIBRFG19 균주는 각각 *Articulospora tetracladia*, *Margaritispora aquatica*, *Aquanectria penicillioides*이었다. 이들 3종의 균류는 불완전균강에 속하는 담수 서식 균류로 국내 미기록종으로 보고하는 바이다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Nakdong-gang National Institute of Biological Resources (Project: The survey and discovery of freshwater bioresources; NNIBR, 2016) of the Republic of Korea.

References

1. Ingold CT. Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. *Trans Br Mycol Soc* 1942;25:339-417.
2. Ferreira V, Encalada AC, Graça MA. Effects of litter diversity on decomposition and biological colonization of submerged litter in temperate and tropical streams. *Freshw Sci* 2012;31: 945-62.
3. Ferreira V, Goncalves AL, Pratas J, Canhoto C. Uranium adsorption by *Articulospora tetracladia*: can aquatic hyphomycetes be natural bioremediators of uranium contaminated streams? In: Mendez-Vilas A, editor. *Microorganisms in industry and environment: From scientific and industrial research to consumer products*. London: World Scientific; 2011. p. 265-9.
4. Baschien C, Tsui CK, Gulis V, Szewzyk U, Marvanová L. The molecular phylogeny of aquatic hyphomycetes with affinity to the Leotiomycetes. *Fungal Biol* 2013;117:660-72.
5. Chauvet E, Suberkropp K. Temperature and sporulation of aquatic hyphomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:1522-5.
6. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1323-30.
7. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23:2947-8.
8. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95-8.
9. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
10. Abdullah SK, Descals E, Webster J. Teleomorphs of three aquatic hyphomycetes. *Trans Br Mycol Soc* 1981;77:475-83.
11. Baral HO, Krieglsteiner GJ. Bausteine zu einer Askomyzeten-Flora der Bundesrepublik Deutschland: In Süddeutschland gefundene Inoperculate Discomyzeten: mit taxonomischen, ökologischen, chorologischen Hinweisen. *Verbreitung und Ökologie ausgewählter Nichtblätterpilze in der Bundesrepublik Deutschland (Mitteleuropa)*. Tübingen: Dt. Ges. für Mykologie; 1985.
12. Fungal Barcoding Database. Identification; Pairwise sequence alignment [Internet]. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2011 [cited 2016 Nov 4]. Available from: <http://www.fungalbarcoding.org/BioloMICSSequences.aspx?file=all>.
13. Ingold CT. Some new aquatic hyphomycetes. *Trans Br Mycol Soc* 1944;27:35-47.
14. Lombard L, van der Merwe NA, Groenewald JZ, Crous PW. Generic concepts in Nectriaceae. *Stud Mycol* 2015;80:189-245.