RESEARCH NOTE

담수생태계로부터 분리된 *Filosporella* 3종의 국내 최초보고

문혜연*, 오유선, 고재덕, 정남일
국립낙동강생물자원관 담수생물연구본부 균류연구팀

First report of three *Filosporella* species isolated from freshwater ecosystem in Korea

Hye Yeon Mun*, Yoosun Oh, Jaeduk Goh, Namil Chung
Fungi Research Team, Microbial Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Korea

*Corresponding author: outcastm@nnibr.re.kr

ABSTRACT

To investigate the diversity of aquatic fungi, we collected deposits of soil, plants, and plant litter from ponds and streams. NNIBRFG1552 was isolated from soil deposits and NNIBRFG3013 from plant deposits in Namsaengi-mot in Jeju, Korea in 2016; NNIBRFG5472 was isolated from plant litter in Bocheong-cheon, Boeun, Korea in 2018. Based on morphological characteristics and phylogenetic analysis using rDNA sequences of the internal transcribed spacer (ITS), NNIBRFG1552, NNIBRFG3013, and NNIBRFG5472 were identified as *Filoporella exilis* (100% similarity with KC834046), *F. fistucella* (99.8% with KC834047), and *F.* cf. *annelidica* (100% with KC834044), respectively. Furthermore, cultural and morphological characteristics were analyzed to confirm the molecular identification. No species of the genus *Filosporella* has yet been reported in Korea.

Keywords: Freshwater fungi, *Filosporella, F. exilis, F. fistucella, F. annelidica*, Korea

Check for updates

OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2019 June, 47(2): 165-72
https://doi.org/10.4489/KJM.20190020

Hye Yeon Mun
https://orcid.org/0000-0002-3156-9481

Received: April 1, 2019
Revised: June 5, 2019
Accepted: June 8, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http: //creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Filosporella 속은 수생균류로서 자낭균문에 속하나 과, 목, 강 등의 하위 분류체계는 정해지지 않았으며, 1976년 Nawawi에 의해 처음으로 보고된 이래 침전식물체에서 분리된 *F. aquatica* Nawawi, *F. fistucella* Marvanová & Fisher, *F. versimorpha* Marvanová, *F. exilis* Gulis & Marvanová, 담수포말에서 분리된 *F. annelidica* Crane & Shearer, *F. pinguis* Marvanová & Bärl을 포함하여 총 6종이 보고되었다. [1-7]

Bachine 등[8]은 수생균류의 분자생물학을 기반으로 하는 분류체계를 연구하였으며, *Filosporella* 중 *F. exilis, F. fistucella, F. versimorpha*는 Ascocoryne-Hydrocina clade에 속하고, *F.* cf. *annelidica*는 Cudonella-Hymenoscyphus clade에 속하는 다분류체계를 가지는 것으로 보고하였다.

6종에 대한 보고 및 분류체계에 대한 논문을 제외하고는 *Filosporella*에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았으며, 국내에서는 *Filosporella* 속의 존재여부조차 보고된 바가 없다. 본 논문에서는

*Filosporella*속의 3종인 *F. exilis, F. fistucella, F. annelidica*의 분자계통학적 위치 및 형태학적 특징을 비교 분석하여 국내 미기록종으로 보고하고자 한다.

담수환경에 서식하는 곰팡이를 분리하기 위해, 제주 남생이못, 충북 보은군 보청천에서 토양, 수변식물 및 침전식물체 시료를 채집하였다. 토양시료는 하천의 바닥에 퇴적된 하천토를 채집하였으며, 담수침전식물체는 하천에서 부식된 식물잎을 폴리에틸렌 봉투에 담아서 채집하였다. 시료는 수분이 있는 상태에서 냉장보관하면서 실험에 사용하였다. 토양시료는 희석평판도말법을 이용하여 처리하였고, 채집한 수변식물의 뿌리에서 내생균류를 분리하기 위하여 뿌리의 외부를 Tween80과 1% 차아산염소나트륨(NaOCl)을 이용하여 표면소독 하였다. 세척한 뿌리를 1 cm 길이로 잘라 Hagem Media (HM; H_2O, KH_2PO_4, NH_4Cl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $C_6H_{12}O_6$, malt extract, $FeCl_3$)에 올려 25°C에서 일주일간 배양하였다. 자른 뿌리의 단면에 균사가 나타나면 순수분리를 위하여 HM 배지에 계대배양하였다. 담수식물침전체는 세척한 후 여과된 현장수를 첨가하여 20°C에서 7일간 배양하였다. 배양액 100 μl를 WA(water agar: 20 g/L agar, 1 L distilled water, streptomycin100 ppm)배지에 도말한 후 15°C에서 배양하며 단포자 분리하였다. 순수분리된 균류는 PDA (potato dextrose agar; Difco; BD, Franklin Lakes, NJ, USA)배지에 접종하고 20°C에 배양하였고, 15% 글리세롤에 담은 후 -80°C에 저장하였다.

환경조건에 따른 생장률을 조사하기 위해 5°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 45°C의 7개 온도 범위와 PDA, malt extract agar (MEA), oatmeal agar (OA; Difco) 등 8가지 배지 종류를 실험에 사용하였다. 5일 동안 균사생장을 측정하였고, 3반복으로 실시하였다. 실험에 사용한 배지는 PDA, MEA (malt extract 2%; agar 2%/1 L), OA, Czapeck-dox solution agar (CDA; Difco), corn meal agar (CMA; Difco), yeast extract peptone dextrose agar (YPDA; Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands), Dichloran glycerol chloramphenicol (DG18; Merck Millipore, Billerica, MA, USA), potato carrot agar (PCA; HiMedia, Mumbai, India)이다.

포자생성을 조사하기 위해 멸균된 액체 배지(0.1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg KNO_3, 0.55 mg K_2HPO_4, 0.5 g MOPS buffer, 1 L distilled water)에 agar조각을 접종한 후 20°C에서 50 rpm으로 배양하면서 생성된 포자를 현미경으로 관찰하였다.[9]

분자계통학적 연구를 위해서 PDA에 배양한 균사체를 수확하여 glass bead가 담긴 tube에 넣고 균질화시킨 후 Nucleospin Plant II DNA extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren, German)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 ITS1 및 ITS4 프라이머를 사용하여 PCR을 실시하였다[10]. DNA 염기서열 정렬 및 편집, 계통수 작성을 위해 MEGA 7.0.26을 사용하였다[11].

Taxonomy

Filosporella exilis Gulis & Marvanová, Mycotaxon 68: 313 (1998) [4] [Figs. 1&2]

MycoBank No.: MB444879

*Filosporella exilis*는 잘 알려진 수생균류로서, Gulis & Marvanová에 의해 담수침전식물체에서 분리되었음이 보고되었다. 유성세대는 알려져 있지 않으며, 연구가 거의 이루어지지 않았다.

NNIBRFG1552균주는 제주 남생이못의 담수퇴적토에서 분리되었다. 이 균주의 ITS rDNA 영역의 염기서열을 NCBI에 등록된 염기서열과 비교하여 분석한 결과, *F. exilis* (KC834046)와 100%의 상동성을 보였으며, 계통수(Fig. 1)에서 *F. exilis*와 동일한 Ascocoryne-Hycrocina clade에 속하는 것을 확인하였다.

NNIBRFG1552 균주는 PDA상에서 배양했을 때 20℃에서 1.6 mm/day의 생장률로 아주 느리게 자라며, PCA상 25℃에서 2.0 mm/day으로 생장율이 가장 높았고, 30℃ 이상에서는 거의 생장하지 못했으며, 대부분의 배지에서 주황색으로 배지색을 변화시키는 것을 관찰하였다. 콜로니의 앞은 가운데 부분이 진한 주황색을 띄다가 가장자리는 연한 회색을 띄었다. 콜로니의 뒷 부분은 가운데는 어두운 갈색을 띄다가 가장자리는 연한 주황색을 띄었으며, 균사체의 밀도가 높고 중앙이 볼록 융기된 형태로 중앙에서 가장자리로 갈라짐을 보이며 가장자리는 대체로 둥근형태이다.

NNIBRFG1552 균주의 균사는 투명하였으며, 수중에서 배양했을 때 포자를 형성하였으나 분생자경은 관찰하지 못했다. 소형분생포자는 긴 타원형 또는 주로 원통형의 막대모양으로 2~3개의 격벽을 이루고 있으며, 크기는 6~20 μm x 1.5~2μm 이다. 주로 길이가 짧은 분생포자를 생성하며, 본 연구에서는 다른 형태의 포자는 관찰하지 못했다.

Habitat: Soil in pond

Specimen examined: Namsaengi-mot, Jeju, Korea, 22 Mar 2016, NNIBRFG1552, Nakdonggang National Institute of Biological Resources

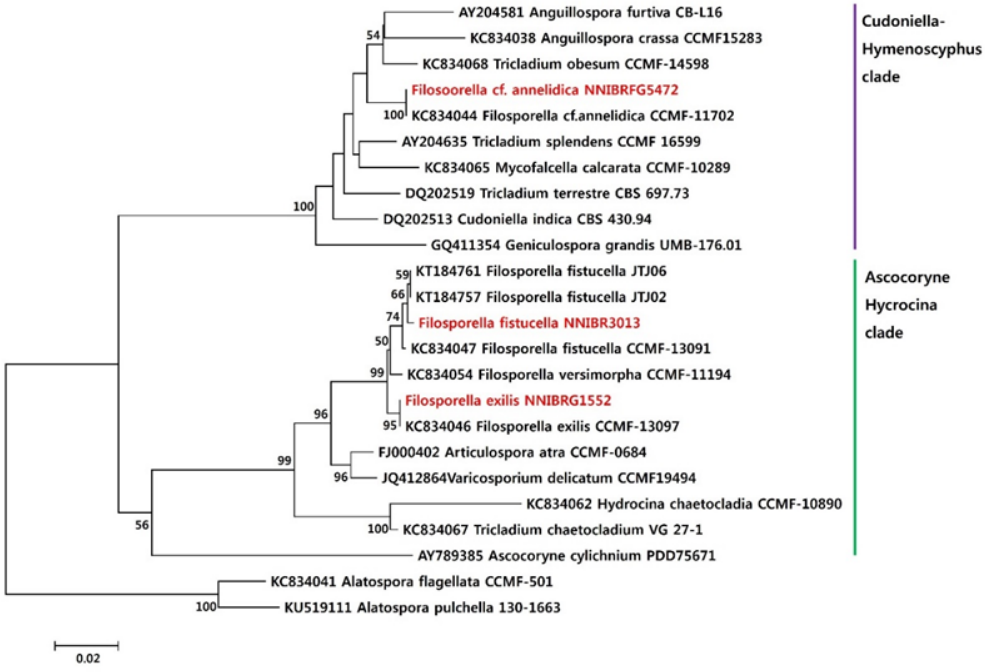

Fig. 1. Phylogenetic tree inferred using Neighbor-Joining method of an alignment of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS rDNA) sequences of three *Filosporella* species including *F. exilis*, *F. fistucella* and *F. annelidica* (in red colour). *Alatospora flagellata* and *A. pulchella* were used as an outgroup. The optimal tree with the sum of branch length = 0.66981201 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches.

Filosporella fistucella Marvanová & Fisher, Nova Hedwigia 52 (1-2): 33 (1991) [2] [Figs. 1&3]

MycoBank No.: MB130194

*Filosporella fistucella*는 내생균류로서, Marvanová & Fisher에 의해 검은오리나무(*Alnus glutinosa*) 뿌리의 껍질에서 최초 보고되었다. 유성세대는 알려져 있지 않으며, 연구가 거의 이루어지지 않았다. NNIBRFG3013균주는 제주 남생이못의 수변식물인 어리연꽃(*Nymphoides indica*)에서 분리되었다. 이 균주의 ITS rDNA 영역의 염기서열을 NCBI GenBank 염기서열과 비교하여 분석한 결과, *F. fistucella* (KC834047)와 99.8%의 상동성을 보였으며, 계통수(Fig. 1)에서 *F. fistucella*와 동일한 Ascocoryne-Hycrocina clade에 속하는 것을 확인하였다.

NNIBRFG3013 균주는 PDA상에서 배양했을 때 20℃에서 1.7 mm/day의 생장률로 아주 느리게 자라며, CDA상 20℃에서 2.2 mm/day으로 생장율이 가장 높았고, 30℃ 이상에서는 거의 생장하지 못했다. 콜로니의 앞은 연한 회색을 띄었고, 콜로니의 뒷 부분은 가운데는 짙은 회색을 띄다가 가장자리는 흰색을 띄었으며, 균사체의 밀도가 높고 가장자리는 둥근형태이다.

NNIBRFG3013 균주의 균사는 투명하였으며, 수중에서 배양했을 때 포자를 형성하였으나 소형분생포자의 분생자경만 관찰하였다. 소형분생포자경은 대형분생포자의 끝부분 또는 중간부분에서 생성되었으며, 소형분생포자는 원통형으로 크기는 3 μm정도이다. 대형분생포자는 주로 가늘고 긴 원통형의 막대모양으로 9~19개의 격벽을 이루고 있으며, 길이는 최대 120 μm, 폭은 1.5~2 μm 정도이다.

F. fistucella 와 *F. exilis*는 분자계통학적 위치 및 막대모양의 포자형태가 비슷하였으나, 배지상

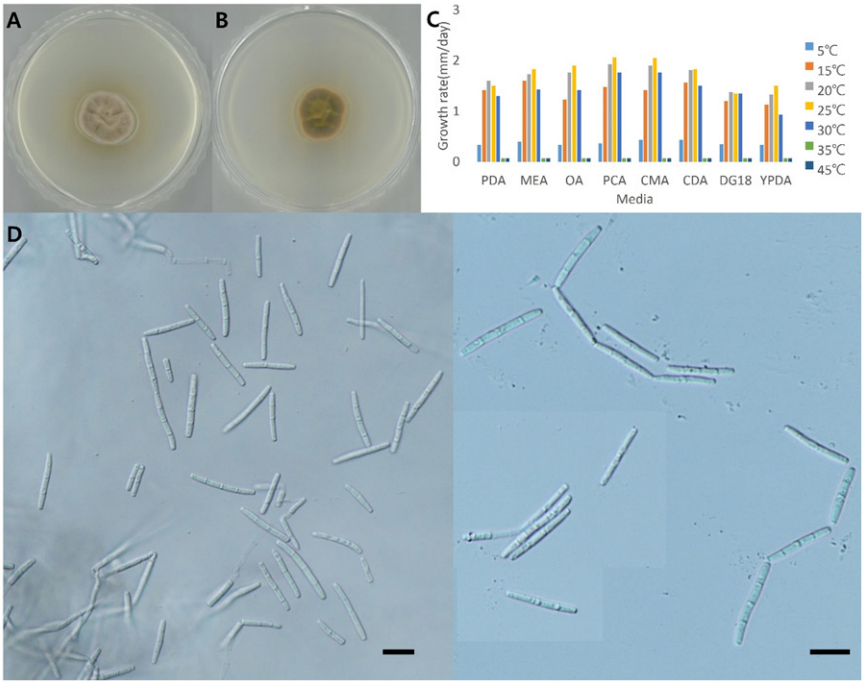

Fig. 2. Colony shape, growth rate, and conidia of *Filosporella exilis* NNIBRFG1552. A: front, B: back of PDA at 20℃ on 7 days, C: growth rate on eight media and seven temperatures, D: conidia captured under a light microscope (x400, size bare=10μm).

에서의 콜로니의 형태와 생장 온도 등에서 다른 양상을 보였으며, 포자생성에서도 *F. exilis*는 배지에 색소를 띄고, 소형포자를 주로 생성하였으나, *F. fistucella*는 배지에 색소를 띄지 않고, 대형포자를 주로 생성하는 등 차이를 보였다.

Habitat: endophyte in *Nymphoides indica* from edge of the pond

Specimen examined: Namsaengi-mot, Jeju, Korea, 9 Aug 2016, NNIBRFG3013, Nakdonggang National Institute of Biological Resources

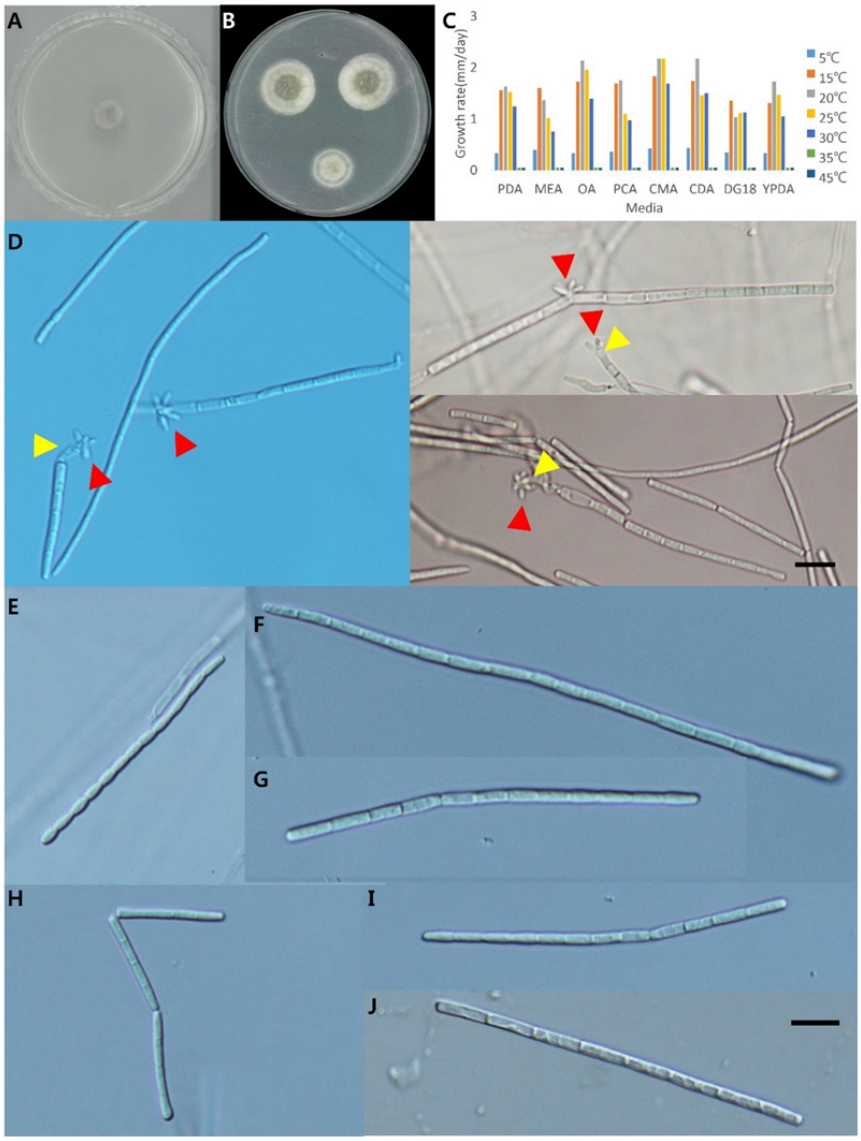

Fig. 3. Colony shape, growth rate and conidia of *Filosporella fistucella* NNIBRFG3013. A & B: colony of PDA at 20℃ on 7 days(A) & 15 days(B), C: growth rate on eight media and seven temperature, D: microconidia (yellow arrow head conidiophore, red arrow head microconidia), E-J: macroconidia captured under a light microscope (x400, size bars 10μm).

Filosporella annelidica Shearer & J.L. Crane, Mycotaxon 6(1): 28 (1977) [6] [Figs. 1&4]

MycoBank No.: 314134

Synonym: Rogersia annelidica Shearer & J.L. Crane, Mycologia 68(4): 949 (1776) [5]

*Filosporella annelidica*는 Sheare & Crane에 의해서 처음 *Rogersia annelidica*로 보고되었으나, F. *aquatica*와의 형태적 유사성을 고려하여 *F. annelidica*로 재명명되었다. 유성세대는 알려져 있지 않으며, 연구가 거의 이루어지지 않았다.

NNIBRFG5472 균주는 충북 보은 보청천의 담수침전식물체에서 분리되었다. 이 균주의 ITS rDNA 영역의 염기서열을 NCBI에 등록된 염기서열과 비교하여 분석한 결과, *F.* cf. *annelidica* (KC834044)와 일치하였고, 계통수(Fig.1)에서도 *F.* cf. *annelidica*와 동일한 Cudoniella-Hymenoscyphus clade에 속하는 것을 확인하였다.

NNIBRFG5472 균주는 PDA상에서 배양했을 때 20℃에서 1.1 mm/day의 생장률로 아주 느리게 자라며, OA상 20℃에서 1.5 mm/day으로 생장율이 가장 높았고, 30℃ 이상에서는 거의 생장하지 못했다. 콜로니의 앞은 연한 회색을 띄었고, 콜로니의 뒷 부분은 가운데는 짙은 회색을 띄다가 가장자리는 흰색을 띄었다. 균사체의 밀도가 높고 중앙이 볼록 융기되며 중앙에서 가장자리로 갈라짐을 보이고, 가장자리는 대체로 둥근형태이다.

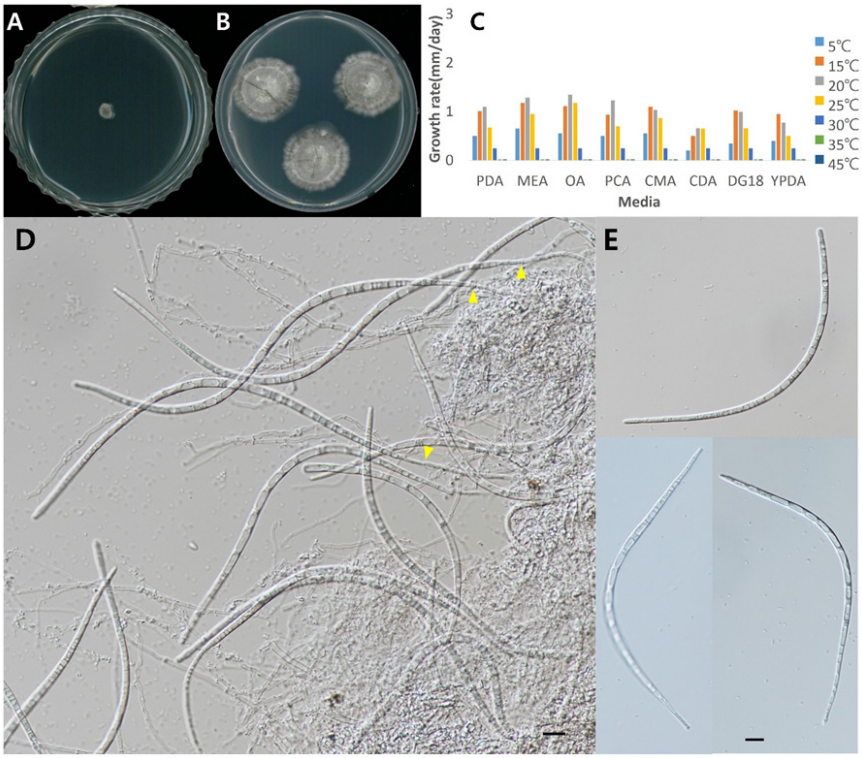

Fig. 4. Colony shape, growth rate and conidia of *Filosporella annelidica* NNIBRFG5472. A & B: colony of PDA at 20℃ on 7 days (A) & 30 days (B), C: growth rate on eight media and seven temperature, D: conidia and conidiophore (yellow arrow head conidiophore), E: conidia captured under a light microscope (x400, size bars 10 μm).

NNIBRFG5472 균주의 균사는 투명하였으며, 수중에서 배양했을 때 포자를 형성하였다. 분생자경은 균사의 끝부분 또는 중간부분에서 관찰되었다. 분생포자는 약간 휜 활모양으로 투명하고, 7~10개의 격벽을 가지며, 길고 얇은 원통형으로 끝으로 갈수록 좁아졌다. 크기는 180~220 μm x 3.5~5 μm, 끝은 1.5~2.5 μm (width) 정도이다. NNIBRFG5472 균주와 *F. annelidica*의 기준 균주가 비슷한 형태를 보였다. NCBI 상에 등록된 염기서열과 분석했을 때 *F.* cf. *annelidica*와 일치하였고, 형태적인 특징을 토대로 *F. annelidica*로 동정할 수 있을 것으로 판단된다.

*F. annelidica*는 형태적 및 분자계통학적인 면에서 *Filosporella* 속의 종들과 다른 양상을 보였다. 분자계통학적인 측면에서는 *F. exilis, F. fistucella* 등과 다른 clade에 속하며, 포자의 형태에 있어서도 소형과 대형포자를 따로 구분해서 생성하지 않았으며, 포자의 크기가 크고 구부러진 활모양으로 원통형의 막대모양인 다른 종들과 차이가 있었다.

Habitat: plant litter in stream

Specimen examined: Bocheong-cheon, Boen-gun, Chungcheongbuk-do, Korea, 9 Mar 2018, NNIBRFG5472, Nakdonggang National Institute of Biological Resources

적요

담수생태계에 서식하는 균류의 다양성을 조사하기 위해 연못과 하천에서 담수퇴적토, 수변식물, 담수침전식물체를 채집하였다. NNIBRFG1552와 NNIBRFG3013은 2016년 제주 남생이못에서 채집한 담수퇴적토와 수변식물에서 각각 분리되었고, NNIBRFG5472는 2018년 충북 보은의 보청천에서 채집한 담수침전식물체에서 분리되었다. 이들 3균주의 형태적 및 분자계통학적 특징을 바탕으로 동정한 결과 NNIBRFG1552, NNIBRFG3013, NNIBRFG5472는 각각 *Filoporella exilis* (100%, KC834046), *F. fistucella* (99.8%, KC834047), *F.* cf. *annelidica* (100%, KC834044)로 확인되었다. 또한, 이들 3개 균주의 배양 및 형태학적 특성이 분자계통학적 분류와 일치되는 것을 확인하였다. *Filosporella* 속은 국내에서는 보고된 바 없으며 본 보고가 국내 최초이다.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the research program named "The Survey and Discovery of Freshwater Bioresources" (NNIBRFG201901107) of the Nakdonggang National Institute of Biological Resources.

REFERENCES

1. Nawawi A. *Filosporella* gen. nov., an aquatic hyphomycete. Trans Br Mycol Soc 1976; 67:173-6.
2. Marvanová L, Fisher PJ. A new endophytic hyphomycete from alder roots. Nova Hedwigia 1991;52:33-7.
3. Marvanová L, Fisher PJ, Aimer R, Segedin BC. A new *Filosporella* from alder roots and from water. Nova Hedwigia 1992;54:151-8.
4. Gulis VI, Marvanová L. *Filosporella exilis* sp. nov. on submerged plant debris from Belarus. Mycotaxon 1998;68:313-20.
5. Shaerer CA, Crane JL. Illinois fungi No. 7. *Rogersia annelidica* gen. & sp. nov. an aquatic

hyphomycete colonizing leaves in the Sangamon river. Mycologia 1976;68:946-50.
6. Crane JL, Shearer CA. *Rogersia*, a later name for *Filosporella*. Mycotaxon 1977;6:27-8.
7. Marvanová L, Bärlocher F. New species *Filosporella, Pachycladina* and *Pleuropedium* from Canadian streams. Mycol Res 1998;102:750-4.
8. Baschien C, Tsui CKM, Gulis V, Szewzyk U, Marvanová L. The molecular phylogeny of aquatic hyphomycetes with affinity to the Leotiomycetes. Fungal Biol 2013;117:660-72.
9. Chauvet E, Suberkropp K. Temperature and sporulation of aquatic hyphomycetes. Appl Environ Microbiol 1998;64:1522-5.
10. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
11. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 2016;33:1870-4.