

담수에 자생하는 수생식물에서 분리된 내생균류의 지베렐린 생산과 동정

유영현^{1,3} · 강상모² · 최유미³ · 이명철^{3*} · 김종국^{1*}

¹경북대학교 생명과학부, ²경북대학교 응용생명과학부, ³농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터

Gibberellins Production and Identification of Endophytic Fungi Isolated from Aquatic Plant in Fresh Water

Young-Hyun You^{1,3}, Sang-Mo Kang², Yu-Mi Choi³, Myung-Chul Lee^{3*} and Jong-Guk Kim^{1*}

¹School of Life Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, RDA, Jeonju 560-500, Korea

ABSTRACT: Aquatic plant *Hydrocharis dubia* (Blume) Backer was collected from the Dalsung wetland in Daegu. Sixteen endophytic fungi with different colony morphologies were isolated from the roots of aquatic plants. Waito-c rice (WR) seedlings were treated with fungal culture filtrates (FCF) for screening plant growth-promoting activity. In the results, HD1008 strain isolated from aquatic plant showed highest plant growth-promoting activity. The FCF of HD1008 strain was analyzed using gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) with selected ion monitoring (SIM). Analysis of the FCF of HD1008 strain found that it contained gibberellins (GA) (GA₁, 1.2 ng/100 mL; GA₃, 5 ng/100 mL). Phylogenetic tree of HD1008 strain was constructed by partial internal transcribed spacer (ITS) region and partial beta-tubulin gene sequences. Therefore, we describe HD1008 strain as a new gibberellin-producing *Penicillium trzebinskii* based on morphological and molecular characteristics.

KEYWORDS : Endophytic fungi, Fresh water, Gibberellin, *Penicillium trzebinskii*, Plant growth-promoting activity

습지는 육상생태계와 수생태계의 전이지대로서 두 지역의 생태계를 완충하고 홍수조절, 정화작용, 동식물의 서식처제공, 물질의 이동통로이자 변환장소, 이산화탄소의 농도증가를 억제하여 기후를 안정하게 하는 역할을 한다[1]. 특히, 습지는 생물 종의 변환에 대하여 종 다양성을 유지하는데 우수하고, 생물상 발달에 유리한 측면을 가지고 있으며, 규모에 비하여 다른 생태계들 보다 생물다양성이 높

다고 알려져 있다[2]. 우리나라는 하천을 중심으로 크고 작은 내륙습지 및 강 배후 습지가 많이 분포하고 있으며, 이를 서식처로 하는 다양한 수생식물들이 분포하기에 적합한 환경을 가지고 있다[3].

강 배후 습지생태계는 독특한 식생환경을 가지고 있으며 특히 배후 습지의 식생변화는 강의 범람과 매우 밀접한 관계를 가진다고 보고되고 있다[4]. 그리고 배후 습지에는 다양한 수생식물이 자생하며 이들은 하천 및 습지생태계의 1차 생산자이자 습지생태계의 구조와 기능을 유지하는 역할을 한다고 알려져 왔다[5]. 습지생태계에 자생하는 수생식물은 그 분포와 군락 및 개체수에 따라 퇴적과정 [6], 수체의 흐름 [7], 용존산소량 변화 [8], 빛투과정도 [9] 등에 영향을 미친다. 수생식물은 다양한 생물 및 미생물들과 상호관계에 있지만 담수생태계에 자생하는 균류 및 내생균류에 대한 연구는 어류의 물곰팡이병에 대한 소수의 연구가 있지만 [10, 11] 수생식물과 연관된 연구는 거의 없는 실정이다.

내생균류는 식물의 잎, 줄기, 뿌리 등 식물체에 다양하게 분포하고 있으며, 식물의 성장활성 및 면역력 등에 다양한

Kor. J. Mycol. 2015 March, 43(1): 71-76
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.1.71>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: mcleekor@korea.kr; kimjg@knu.ac.kr

Received January 24, 2015

Revised February 2, 2015

Accepted February 3, 2015

©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.

영향을 미친다. 염환경에 자생하는 염생식물은 내생균류와 상호관계에 있으며, 이들 균류에 의하여 유익한 영향을 받는다고 보고되고 있다[12]. 그러나 수생식물과의 상호관계적인 연구는 국내외적으로 거의 없는 실정이며, 수생태계에서 내생균류가 어떤 영향을 미치는지에 대하여 연구가 필요하다.

본 연구는 담수지역인 강 배후 습지에 자생하는 수생식물의 내생균류에 대한 연구로서 내생균류가 수생식물의 생장에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 그래서 수생식물의 뿌리로부터 분리된 내생균류를 활용하여 식물생장촉진활성 스크리닝, 이차대사산물 분석 및 유용미생물의 동정을 수행하였다.

달성습지에 자생하고 있는 수생식물인 자라풀(*Hydrocharis dubia* (Blume) Backer)을 채집하여 식물뿌리를 세척하고, 계면활성제(tween 80)와 표백제(perchloric acid 1%)를 처리하여 살균하였다. 그리고 스트렙토마이신 80 ppm이 포함된 hagem minimal 배지를 사용하여 25°C에서 식물뿌리시료를 배양하였으며[13] 뿌리 단면에서 성장한 균사를 희석도말법을 이용하여 분리하였다. 식물생장촉진활성 스크리닝을 위하여 분리된 내생균류를 Czapek broth medium (CBM) 50 mL에 진탕배양한 후에 여과하였으며, 배양여과액을 동결건조하여 농축액을 실험재료로 사용하였다[14].

난장이벼의 종자를 uniconazol (20 ppm)과 스포탁에 1일 처리를 통하여 발아시켜 water agar에 파종하였으며, 유묘의 이엽기 엽액 부분에 균류의 농축된 배양여과액(10 µL)을 처리하여 7일간 생장을 관찰하였다. 대조구는 물과 농축된 CBM배지를 같은 조건으로 사용하여 5반복으로 진행하였으며, 난장이벼의 지상부길이(shoot length)와 식물체길이(plant length)를 측정하였다. 통계처리는 SPSS ver. 18.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test (DMRT) 사후검정을 통하여 결과값을 도출하였다.

식물생장촉진활성을 나타내는 HD1008 균주의 배양여과액을 추출하여 high performance liquid chromatography (HPLC)로 분석하였고, 후보물질을 선정하여 chromatography mass spectrometry with selected ion monitoring (GC/MS-SIM)으로 정량분석 하였다[12-14].

식물생장촉진활성을 나타내는 HD1008 균주의 분자적인 동정을 위하여, 동결건조된 균체를 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였고, beta-tubulin 유전자(primers: Bt2a, Bt2b) [15]의 염기서열을 동정에 이용하였으며, NCBI GenBank에 blast 검색과 문헌조사를 통하여 근연종의 유전자 염기서열을 선발하였다. 선발된 근연종들과의 유연관계도 작성은 MEGA ver. 6 프로그램과 다중정렬은 ClustalW, 거리계산은 Tamura-Nei 상수 모델, 계통수(phylogenetic tree)는 neighbor-joining (NJ) 방법을 이용하였다[16]. 그리고

Table 1. Screening for plant growth-promoting activity of WR seedling with FCFs of endophytic fungi

Fungal isolates	SL	PL
N.D	4.12 ± 0.29 ij	8.44 ± 0.45 g
D.W	4.56 ± 0.32 fgh	9.48 ± 0.47 fg
CBM	5.02 ± 0.18 cde	10.30 ± 0.58 de
HD1001	4.90 ± 0.16 def	9.82 ± 0.38 ef
HD1002	4.92 ± 0.26 def	10.54 ± 0.49 de
HD1003	4.50 ± 0.33 fghi	9.60 ± 0.52 fg
HD1004	5.42 ± 0.24 bc	11.00 ± 0.52 cd
HD1005	5.48 ± 0.28 b	11.88 ± 0.38 b
HD1006	5.06 ± 0.21 cde	11.00 ± 0.39 cd
HD1007	4.32 ± 0.24 ghij	8.98 ± 0.53 fg
HD1008	7.70 ± 0.20 a	16.06 ± 0.31 a
HD1009	4.20 ± 0.32 hij	9.50 ± 0.50 fg
HD1010	4.58 ± 0.19 fgh	10.34 ± 0.65 de
HD1011	4.64 ± 0.46 efg	10.46 ± 0.53 de
HD1012	4.34 ± 0.40 ghij	9.30 ± 0.73 fg
HD1013	4.92 ± 0.19 def	11.48 ± 0.58 bc
HD1014	4.06 ± 0.34 j	8.32 ± 0.51 g
HD1015	4.66 ± 0.35 efg	10.84 ± 0.59 cd
HD1016	5.24 ± 0.50 bcd	11.76 ± 0.57 b

Ten microliters of lyophilized fungal culture filtrates (FCFs) were treated to Waito-c rice (WR) seedlings. The shoot length (SL) and plant length (PL) of WR seedlings were measured after a week of treatment. According to Duncan's multiple range test (DMRT) ($p < 0.05$), the different letters in a row indicate significant differences. The letters indicate that values are not significantly different. Values are presented as mean ± SE.

N.D, not treated; D.W, distilled water; CBM, concentrated solution of Czapek broth medium.

형태적인 관찰을 위하여, MEA배지, CYA배지, CREA배지를 사용하였고, 광학현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 분생포자경(conidiophore)과 분생포자(conidium)의 미세구조를 관찰하여 동정에 이용하였다.

자라풀의 뿌리로부터 형태적으로 다른 16개 균주를 분리하였으며, 이들 균류의 농축된 배양여과액을 난장이벼에 처리하였을 때, 다른 균류들보다 성장촉진활성이 우수한 HD1008 균주를 선발하였다(Table 1). 대조구 중에서 증류수를 처리한 조건의 경우에 지상부길이 4.56 cm, 식물체길이 9.48 cm였고, 농축된 배지를 처리한 경우에는 성장능의 지상부길이가 5.02 cm, 식물체길이 10.30 cm였으며, HD1008 균주는 지상부길이 7.70 cm, 식물체길이 16.06 cm 인 것을 측정할 수 있었다. 성장촉진활성 스크리닝을 통하여 HD1008 균주의 배양여과액에는 식물생장을 촉진시키는 유용물질이 포함되어 있을 것으로 생각되었다. 그래서 식물생장과 관련된 유용물질을 탐색하기 위하여 HPLC 및 GC/MS를 사용하여 표준물질과 비교분석하였을

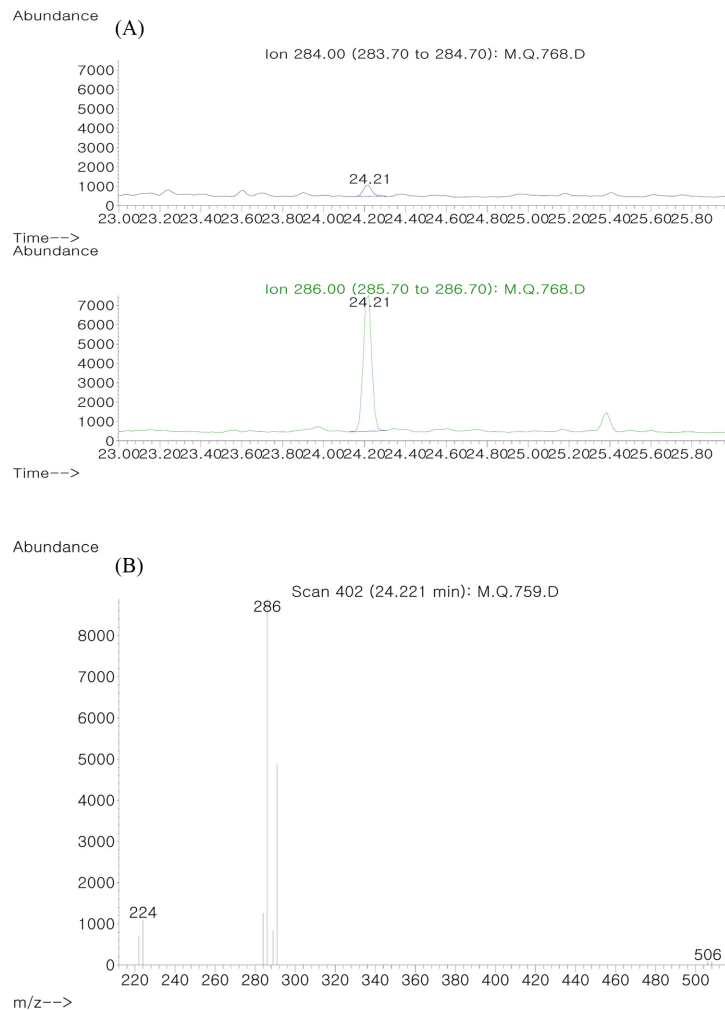


Fig. 1. The chromatography mass spectrometry (GC/MS) with selected ion monitoring (SIM) spectra for GA_4 in fungal culture filtrate of the HD1008 strain. Arrow indicates the peak of fungal GA_4 that coincides with that of internal standard GA_4 . GC/MS peak of HD1008 strain; (A) GC/MS peak of fungal culture filtrate, and GC/MS peak of standard GA_4 , (B) Ion value of standard GA_4 .

때, HD1008 균주의 배양여과액에서 GA_1 (1.2 ng/100 mL) 과 GA_4 (5 ng/100 mL)가 정량분석되었다(Fig. 1).

HD1008 균주의 염기서열을 NCBI GenBank에 등록하여 internal transcribed spacer (ITS)영역에서 accession number KP691070과 beta-tubulin의 accession number KP691069를 받았다. 그리고 HD1008 균주의 beta-tubulin 유전자 염기서열을 사용하여 동정을 수행하였을 때, HD1008 균주는 *Penicillium*속의 section *Aspergilloides*에 포함되는 *P. trzebinskii* 균주로 확인 할 수 있었으며, 분류학적인 위치를 확인하기 위하여 표준균주와 참고문헌들을 활용하여 계통학적인 위치를 확인할 수 있었다(Fig. 2) [17, 18].

형태적인 동정을 위하여, 다양한 배지에서 성장한 균주의 형태를 관찰하였고, MEA배지에서 성장한 균주를 광학 현미경으로 관찰하였을 때, 분생포자경의 자루(stipe)는 200~600 × 2.5~3.5 μm 크기에 표면이 거칠었고, 경자(phi-

alides)는 9~12 × 2.5~3.5 μm 크기였으며, 분생포자는 2.5~3 × 2~2.5 μm 크기의 원형에 가까운 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한, 형태적인 특징을 확인했을 때, *P. trzebinskii*에 속하는 종으로서 자루에 마디가 형성되는 유사한 특징을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 HD1008 균주는 *P. spinulosum*과 *P. trzebinskii*와 매우 유사한 종으로서 계통학적으로는 *P. trzebinskii*에 속하는 균주들과(ex-type of *P. mediocre*, *P. toxicarium*, *P. tannophagum*) 같은 그룹을 형성하고 있는 것을 확인할 수 있었으며 [17, 18], 분자적인 특징과 형태적인 특징을 토대로 HD1008 균주는 *P. trzebinskii* var. *trzebinskii*로 최종 동정되었다.

본 연구는 달성습지에 자생하고 있는 수생식물인 자라풀의 뿌리로부터 분리된 내생균류가 식물생장과 관련하여 생장저해 또는 생장촉진 등에 영향을 미치는지 확인하였다. 생장활성 스크리닝과 이차대사산물을 분석하여 생리활성

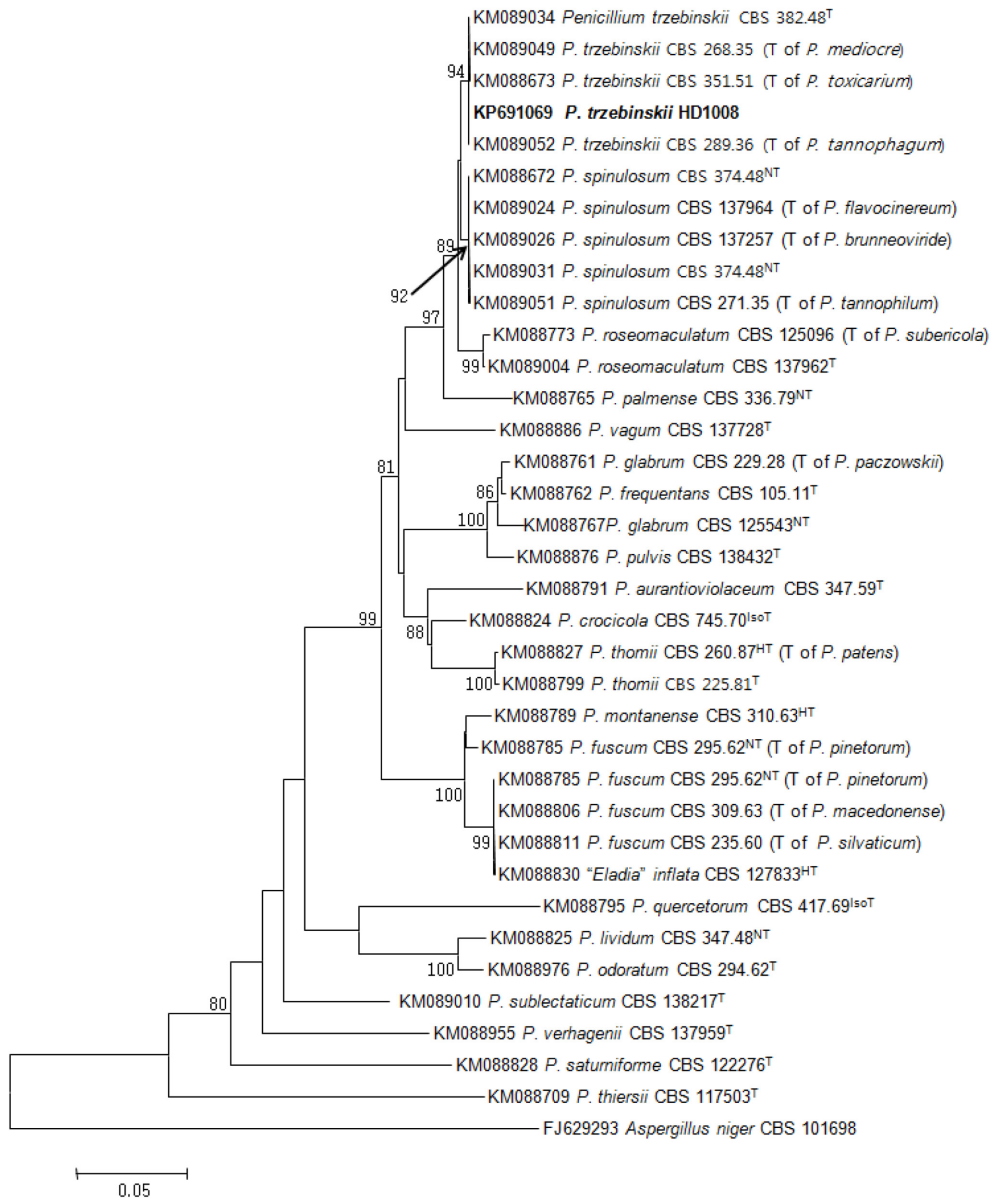


Fig. 2. Taxonomic position of *Penicillium trzebinskii* HD1008 isolated from the aquatic plant. Phylogenetic tree of *Penicillium* section *Aspergilloides* was based on data of partial beta-tubulin gene sequences [17, 18]. CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. The 'T' after the collection number indicates the type strain of the species.

을 나타내는 활성 지베렐린 중의 하나인 GA₁과 GA₄는 식물-내생균류 상호관계 및 유용물질에 대한 연구 소재로 보고되고 있다[13, 14]. 해안생태계 같은 염환경에 자생하는 균류의 경우에는 다양한 지베렐린을 생산하고[14], 성장 발달 [19], 스트레스완화[20]등에 영향을 미친다고 알려져 있다.

특히 염환경에 자생하는 균류 중에서 *Penicillium*속에 포함되는 종들에 의하여 생산한다고 알려져 있으며[12, 14], 드물게 *Aspergillus*속[21], *Cadophora*속[14], *Cladosporium*속[22]에서도 생산한다고 보고되고 있다. 현재 수생식물과 공생하는 내생균류의 식물호르몬 생산에 대한 연구는 거의 없는 실정이므로 본 연구에서 보고하고자 한다. 물론 다양

하고 많은 양의 지베렐린을 생산하는 것은 아니지만 본 연구를 시작으로 수생식물과 공생하는 내생균류뿐만이 아니라 내생세균 등 다양한 공생미생물에 대한 연구가 필요할 것이다. 또한 이들 공생미생물은 수생식물의 성장증진, 면역력증진 등의 영향으로 수생식물의 성장활성에 도움을 줄 것이며, 이는 수생식물이 습지 및 담수생태계에 대한 수질 정화 등과 연계될 것으로 생각된다. 그리고 달성습지의 경우 크게 보면 하천습지에 속하지만 세부적으로는 강 배후 습지로 구분되며, 강의 범람에 영향을 매우 크게 받는 지역으로 하천과 내륙습지의 중간 형태를 가지는 독특한 생태계를 구성하고 있다. 그리고 이들 생태계에 대하여 생태

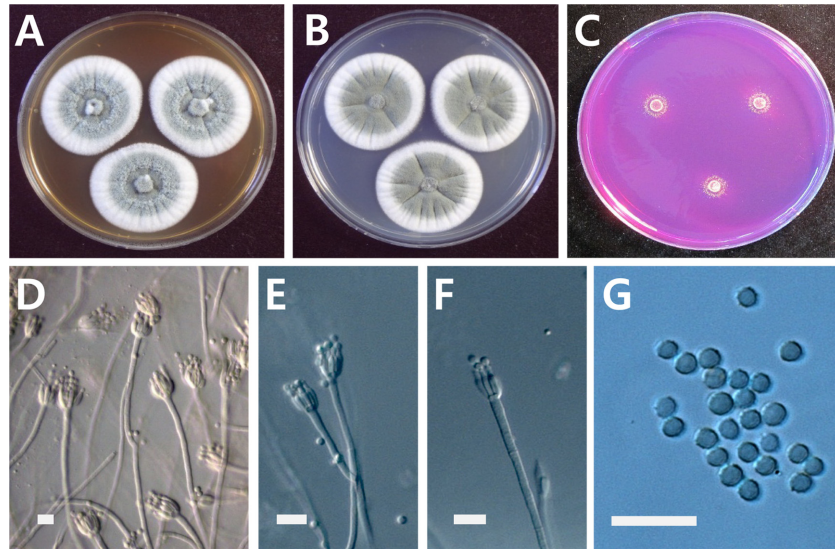


Fig. 3. Description of *Penicillium trzebinskii* HD1008 isolated from the roots of aquatic plant in fresh water. (A) Colonies on MEA, (B) Colonies on CYA, (C) Colonies on CREA, (D~F) Conidiophores, (G) Conidia (D~G scale bars = 10 μ m).

적인 식생연구뿐만이 아니라 다방면적인 식물-미생물 연구가 필요 할 것이고, 독특한 형태의 유용미생물자원이 자생하고 있을 것으로 생각된다. 또한, 강 배후 습지와 더불어 국내에 다양한 하천, 산림, 고산습지 등과 같은 담수환경지역에 자생하는 균류자원에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

수생식물 샘플은 낙동강과 금호강이 만나는 달성습지에서 자라풀을 채집하였다. 자라풀의 뿌리에서 내생균류를 분리하고 형태가 다른 균주를 관찰하여 최종적으로 16개 균주를 선별하였다. 내생균류의 배양여과액은 식물생장촉진 활성 검정을 위하여 난장이벼에 처리하여 스크리닝하였으며, HD1008 균주가 식물생장촉진활성이 가장 높은 것으로 확인되었다. HD1008 균주의 배양여과액을 HPLC와 GC/MS-SIM을 이용하여 분석하였고, HD1008 균주가 식물호르몬인 지베렐린 GA_1 (1.2 ng/100 mL)과 GA_4 (5 ng/100 mL)를 생산하는 것을 정량분석을 통하여 확인하였다. 또한, HD1008균주의 beta-tubulin 유전자 염기서열을 이용하여 동정에 이용하였으며, 분자적인 방법과 형태적인 방법으로 관찰하였을 때, 지베렐린을 생산하는 새로운 *P. trzebinskii*로 동정되었다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant (PJ01010602) from National Academy of Agricultural Science, RDA, Republic of Korea.

REFERENCES

- Whitaker V, Matvienko B. The denitrification potential and hydrological conditions in the wetlands of the Lobo reservoir. In: Proceeding of Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie; 1995 Jul 23-29; São Paulo, Brazil. International Association of Theoretical & Applied Limnology; 1995. p.1377-82.
- Denny P. Biodiversity and wetlands. *Wetlands Ecol Manag* 1994;3:55-61.
- Kuczynska-Kippen N. Habitat choice in rotifer communities of three shallow lakes: impact of macrophyte substratum and season. *Hydrobiologia* 2007;593:27-37.
- Mitsch WJ, Gosselink JG. *Wetlands*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 2000.
- Carpenter S, Lodge DM. Effects of submersed macrophytes on ecosystem processes. *Aquatic Bot* 1986;26:341-70.
- Clark SJ, Wharton G. Sediment nutrient characteristics and aquatic macrophytes in lowland English rivers. *Sci Total Environ* 2001;266:103-12.
- Sand-Jensen K, Pedersen O. Velocity gradients and turbulence around macrophyte stands in streams. *Freshw Biol* 1999;42:315-28.
- Desmet NJ, Van Belleghem S, Seuntjens P, Bouma, TJ, Buis K, Meire P. Quantification of the impact of macrophytes on oxygen dynamics and nitrogen retention in a vegetated lowland river. *Phys Chem Earth* 2011;36:479-89.
- Yeh TY, Ke TY, Lin YL. Algal growth control within natural water purification systems: macrophyte light shading effects. *Water Air Soil Pollut* 2011;214:575-86.
- Kim HJ, Park JS, Kim SY, Koo JG, Bang IC, Kwon SR. Identification of water mold from wild brook lamprey, *Lethenteron reissneri*. *J Fish Pathol* 2013;26:39-44.
- Jee BY, Lee DC, Kim NY, Jung SH, Park SI. Identification and chemotherapeutic effects of the fungi from three salmonid species and their eggs. *J Fish Pathol* 2007;20:147-60.

12. You YH, Yoon H, Kang SM, Shin JH, Choo YS, Lee IJ, Lee JM, Kim JG. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon bay. *J Microbiol Biotechnol* 2012;22:1549-56.
13. Khan SA, Hamayun M, Yoon H, Kim HY, Suh SJ, Hwang SK, Kim JM, Lee IJ, Choo YS, Yoon UH, et al. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiol* 2008;8:231-40.
14. You YH, Yoon H, Kang SM, Woo JR, Choo YS, Lee IJ, Shin JH, Kim JG. *Cadophora malorum* Cs-8-1 as a new fungal strain producing gibberellins isolated from *Calystegia soldanella*. *J Basic Microbiol* 2013;53:630-4.
15. 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.
16. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
17. Houbraeken J, Samson RA. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud Mycol* 2011;70:1-51.
18. Houbraeken J, Visagie CM, Meijer M, Frisvad JC, Busby PE, Pitt JI, Seifert KA, Louis-Seize G, Demirel R, Yilmaz N, et al. A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Stud Mycol* 2014;78:373-451.
19. Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim YO, Redman RS. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME J* 2008;2:404-16.
20. Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 2002;298:1581.
21. You YH, Yoon HJ, Woo JR, Seo YG, Shin JH, Choo YS, Lee IJ, Kim JG. Plant growth promotion activity of endophytic fungi isolated from the roots of *Calystegia soldanella*. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2011;39:324-9.
22. Hamayun M, Khan SA, Khan AL, Rehman G, Kim YH, Iqbal I, Hussain J, Sohn EY, Lee IJ. Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Mycologia* 2010;102:989-95.