

보 문

## 동해안 자생식물로부터 분리된 내생균류의 식물생장촉진활성 및 동정

유영현<sup>1,4</sup> · 진용주<sup>2</sup> · 강상모<sup>3</sup> · 오세종<sup>4</sup> · 이명철<sup>4\*</sup> · 김종국<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 생명과학부, <sup>2</sup>국립농업과학원 농업미생물과, <sup>3</sup>경북대학교 응용생명과학부, <sup>4</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터

## Plant growth-promoting activity and identification of endophytic fungi isolated from native plant in East coast

Young-Hyun You<sup>1,4</sup>, Yong Ju Jin<sup>2</sup>, Sang-Mo Kang<sup>3</sup>, Sejong Oh<sup>4</sup>, Myung-Chul Lee<sup>4\*</sup>, and Jong-Guk Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Korean Agricultural Culture Collection, Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Jeollabuk-do 565-851, Republic of Korea

<sup>3</sup>School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

<sup>4</sup>National Agrobiodiversity Center, NAAS, RDA, Jeonju 560-500, Republic of Korea

(Received February 9, 2015; Accepted March 5, 2015)

**ABSTRACT:** Coastal plant species, *Plantago camtschatica* Cham. native to the coastal region of the East Sea were sampled and then morphologically different 20 endophytic fungal strains were purely isolated. Phylogenetic analysis of isolates was done by the Bayesian program based on sequenced internal transcribed spacer (ITS-rDNA) region. Culture filtrates of each of 20 isolates were treated to Waito-c rice (WR) seedlings for verifying plant growth-promoting activity, respectively. As the results, E/PC/10/1 strain showed the highest plant growth-promoting activity among them. The culture filtrate of the strain E/PC/10/1 was revealed as containing gibberellins (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>) by using HPLC, and gas GC/MS with selected ion monitoring (SIM). Finally, this strain was identified as novel *Penicillium spinulosum* species that producing new GAs with microscopic observation and further molecular analysis with beta-tubulin gene sequence.

**Key words:** *Penicillium spinulosum*, endophytic fungi, gibberellin, plant growth-promoting activity

우리나라의 해안지역은 내륙생태계와 해양생태계가 만나는 전이지대로 백두대간, 비무장지대와 더불어 자연환경관리를 위한 3대 생태축이다(Jang and Park, 2009). 내륙지역에 비해 고온, 염분, 바람, 자외선 등의 영향을 크게 받는 열악한 환경으로서 이들 환경에 생육하기 위하여 특수하게 적응된 식물들이 자생하고 있으며(Jang and Park, 2009), 특히, 우리나라 동해안은 다양한 해안식물들이 군락을 형성하고 있다(Kim et al., 2014). 해안식물은 내생균류의 도움을 받거나 상호관계를 가진다고 보고되고 있으며(You et al., 2012, 2013), 식물의 생장에 많은 영향을 준다고 알려져 있다.

내생균류는 식물이 생육하기에 척박한 환경조건인 건조, 고온 및 염분토양 등의 생장방해조건들에 대하여 내염성과 저항성을 길러주며(Redman et al., 2002; Rodriguez et al., 2004, 2008), 생장촉진, 영양분섭취, 항균효과 및 면역활성 등에 영향을 미친다(Redman et al., 2002; Waller et al., 2005; You et al., 2012). 그리고 내생균류는 식물생육발달에 관여하는 이차 대사산물로서 식물호르몬인 옥신(Auxin; IAA)과 다양한 종류의 지베렐린(Gibberellin; GA)을 생산한다(Khan et al., 2008, 2011; Hamayun et al., 2009). 지베렐린은 diterpenoid 복합체로서 식물의 생장, 종자발아, 줄기신장, 개화촉진, 과육성숙에 관여하며(Hedden and Phillips, 2000; Choi et al., 2004; Rim et al., 2005), 현재 136 종류가 알려져 있다. 대부분의 지베렐린은 생합성 과정의 중간 대사산물이며, 생리활성을 나타내는 지베렐린은 GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> 및 GA<sub>7</sub>으로서 소수에 불과하다

\*For correspondence. (J.G. Kim) E-mail: kimjg@knu.ac.kr;  
Tel.: +82-53-950-5379; Fax: +82-53-955-5379  
(M.C. Lee) E-mail: mcleekor@korea.kr;  
Tel.: +82-63-238-4900; Fax: +82-63-238-4909

(Hedden and Phillips, 2000; Rim *et al.*, 2005; You *et al.*, 2013).

해안지역에 자생하는 내생균류가 생산하는 지베릴린으로 현재까지 *Aspergillus* 속(Hamayun *et al.*, 2009), *Penicillium* 속(Khan *et al.*, 2009; You *et al.*, 2012) 및 *Cadophora* 속(You *et al.*, 2013) 등의 균류에서 생산된다고 보고되고 있다. 해안지역에 자생하고 있는 식물 및 미생물자원에 대한 연구는 거의 없는 실정으로서 점차적으로 연구되고 있는 추세이다.

본 연구는 우리나라 해안지역에 자생하고 있는 해안식물의 뿌리로부터 분리된 내생균류의 유연관계를 분석하였으며, 분리된 내생균류에 대한 식물생장촉진활성을 확인하였다. 그리고 식물생장활성능을 가지는 내생균류에 대하여 이차대사산물의 분석 및 분류학적인 위치를 확인하고자 동정을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물시료의 채집 및 내생균류의 분리

경상북도 영덕군에 위치하고 있는 동해안에서 해안식물인 개질경이(*Plantago camtschatica* Cham.)를 채집하였고, 식물시료의 뿌리로부터 내생균류를 분리하여 실험재료로 사용하였다.

채집한 식물뿌리는 세척해서 토양을 제거하고, 계면활성제(Tween 80)와 표백제(Perchloric acid 1%)로 살균처리를 하였으며(Khan *et al.*, 2008; You *et al.*, 2013), 수분을 제거하고 뿌리시료를 3-4 cm 길이로 절단하여 실험재료로 사용하였다. 그리고 뿌리시료의 배양 중에 세균의 증식을 억제하기 위하여 스트렙토마이신(Streptomycin) 80 mg/L이 포함된 hagem minimal (HM) 배지를 사용하여 25°C에서 배양하였으며(Rim *et al.*, 2005; You *et al.*, 2012), 뿌리시료의 끝 단면에서 성장한 균사를 희석도말을 이용한 계대배양법을 통하여 순수 분리하였다.

### 식물생장촉진활성 검증

식물생장촉진활성을 검증하기 위하여, 분리된 내생균류를 Czapek broth medium (CBM) 50 ml, 25°C, 180 rpm 조건으로 진탕배양 하였고, filter paper (Whatman)를 사용하여 여과하였으며, 배양여과액(30 ml)을 동결건조시킨 후에 30배 농축액으로 만들어서 실험재료로 사용하였다(Khan *et al.*, 2009; You *et al.*, 2012).

난장이벼(Waito-c rice)의 종자를 1일 동안 유니코나졸(20 mg/L)과 스포탁을 처리하고, 4-5일 동안 증류수에 침지시켜 발아한 종자를 water agar (0.5%)에 파종하였다. 7일간 생장

한 유묘의 이엽기 엽액 부분에 30배 농축된 배양여과액(10 µl)을 처리하여 7일간 유묘의 생장을 관찰하였다. 그리고 대조구는 물과 농축된 CBM 배지를 같은 조건으로 만들어 사용하였고, 난장이벼의 지상부길이(Shoot length)와 식물체길이(Plant length)를 측정하였으며, 생장촉진활성 스크리닝을 5 반복 진행하였다. 통계처리는 SPSS 프로그램(Version 18.0)을 이용해서 일원배치분산분석(ANOVA)으로 기술통계값을 확인하였고, 사후검정은 Duncan's multiple range test (DMRT)의 방법을 사용하여 유의확률  $P < 0.05$  수준에서 결과값을 도출하였다.

### 내생균류의 유연관계 분석 및 동정

내생균류들은 potato dextrose broth (PDB) 배지에 접종하여 25°C, 140 rpm, 7일간 암조건에서 배양한 균체를 확보하였고 동결건조 시켜 시료로 준비하였다. 시료는 DNeasy plant mini kit (Qiagen)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 추출된 genomic DNA는 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 프라이머를 사용하였고(White *et al.*, 1990), PCR 반응조건은 pre-denaturation (94°C, 4 min), denaturation (94°C, 1 min), annealing (58°C, 1 min), extension (72°C, 2 min), total 35 cycles, final extension (72°C, 2 min)으로 rDNA-ITS 영역을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 purification kit (AccuPrepPCR & Gel Extraction Kit, Bioneer)를 사용하여 정제한 후에 ABI 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 해독하였다. 해독된 ITS 염기서열은 NCBI의 GenBank에서 Blast 검색을 통하여 데이터베이스와 상동성이 높은 근연종들과 비교하였다. 계통학적인 유연관계 분석을 위해 염기서열을 ClustalW2 프로그램으로 multiple alignment를 하였으며, MrBayes 프로그램(Version 3.1)을 사용하여 phylogenetic tree를 작성하였다. Phylogenetic tree는 metropolis-coupled Markov-chain Monte Carlo (MCMC) 알고리즘을 사용하였으며, branch의 신뢰도를 위하여 bootstrap 값은 1000번 반복하였다.

식물생장활성능을 가지는 내생균류의 동정은 beta-tubulin 유전자의 염기서열을 이용하였다. 사용된 프라이머는 Bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3')와 Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3')를 사용하였고(Glass and Donaldson, 1995), PCR 반응조건은 pre-denaturation (94°C, 5 min), denaturation (94°C, 1 min), annealing (58°C, 1 min), extension (72°C, 1 min), total 30 cycles, final extension (72°C, 6 min)으로 증폭하였다. 해독된 염기서열을 NCBI의 GenBank에 Blast 검색을 이용하여 데이터베이스에서 상동성이

높은 종과 문헌조사를 통하여 비교하였다. 근연종과 유연관계도 작성은 MEGA 프로그램(Version 6.0)을 이용하였고, ClustalW 방법으로 multiple alignment를 하였으며, phylogenetic tree는 neighbor-joining (NJ)을 이용하여 Tamura-nei 상수모델 알고리즘으로 분류학적 위치를 확인하여 동정하였다(Tamura et al., 2013).

### 식물생장활성 내생균류의 형태적인 관찰

형태적 관찰을 위하여, malt extract agar (MEA), czapek yeast extract agar (CYA), 및 creatine sucrose agar (CREA) 배지를 사용하였으며, 배양조건은 25°C의 암조건에서 1주일 동안 배양하였다. 그리고 MEA 배지에서 성장한 내생균류를 광학현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 분생포자경(Conidiophore)과 분생포자(Conidium) 등을 관찰하였다.

### 이차대사산물의 분석

식물생장촉진활성이 확인된 E/PC/10/1 균주의 배양여과액을 membrane filter로 여과시켜 pH를 조정하였고, 내부표준물질로는 20 ng의 [17, 17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] GAs를 추출하기 전에 배양여과액에 첨가하였다. 배양여과액에 ethyl acetate (EtOAc)를 첨가하여 휘발시켰으며, methanol을 처리하여 pH를 8.3으로 조정하였다. 시료는 C<sub>18</sub> column (90–130 μm, 60 Å pore size, Altech)과 Celite/SiO<sub>2</sub> column (용매 formic acid로 포화된 ethyl acetate : hexane = 95 : 5)을 이용하여 농축하였다. 이를 인산완충용액과 EtOAc 및 polyvinylpyrrolidone (PVPP)를 이용하여 진탕하였다. 그리고 pH를 조정하고 EtOAc를 처리하여 농축하였다. 농축된 잔사를 methanol에 용해시켜 membrane filter로 여과한 후에 분석시료로 사용하였다(Khan et al., 2009, 2011; You et al., 2012). E/PC/10/1 균주가 생산하는 이차대사산물의 분석을 확인하기 위하여 HPLC column은 μ Bondapak C<sub>18</sub> column (3.9 × 300 mm)을 사용하였으며, GAs는 acetic acid (1%)를 포함한 methanol의 농도구배에 의하여 분리하였다. 건조한 각 GAs의 분획을 reaction vial에 각각 분주하여 질소가스로 고정화하였다. GAs는 ethereal diazomethane으로 methyl ester로 유도한 후에 질소가스로 고정화 하였다. 시료는 dichloromethane에 용해시켜서 30 m × 0.25 mm (i.d.), 0.25 μm film thickness HP-1 capillary column이 설치된 GC/MS에 주입하였다(Khan et al., 2008, 2009; You et al., 2012). 5973 Network Mass Selective Detector (Hewlett Packard)가 설치된 GC/MS를 이용하여 hydrocarbon standard를 통하여 정량분석 및 KRI value를 나타냈으며, 각 GA와 [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] GA internal

standards (Obtained from Prof. Lewis N. Mander, Australian National University, Canberra, Australia)의 3개의 ion mass를 비교하여 정량 분석하였다(Khan et al., 2012; You et al., 2013).

## 결과 및 고찰

### 내생균류의 분리 및 식물생장촉진활성 검증

개질경이의 뿌리로부터 내생균류를 순수분리 하였으며, 형태적으로 다른 균류를 선별하였다. 개질경이로부터 형태적으로 다른 20균주를 순수분리하여 CBM 배지에 접종하였고, 농축배양여과액을 실험재료로 사용하였다. 발아한 난장이법씨를 7일간 배양하였을 때, 이엽기 엽액 부분이 형성되었으며 30 배 농축된 배양여과액을 10 μl 처리하였다. 그 결과, 개질경이로부터 분리된 E/PC/10/1 균주가 대조구와 다른 처리구보다 성장촉진활성이 우수하였다(Table 1). 증류수를 처리한 대조구의 경우에 지상부길이가 4.22 cm와 식물체길이는 8.74 cm로 측정되었고, 농축된 CBM 배지를 처리한 경우에 지상부길이가 4.92 cm와 식물체길이는 9.92 cm로 측정되었다. E/PC/10/1 균주는 지상부길이가 7.10 cm와 식물체길이는 16.06 cm로 측정되었다. 식물생장활성 검정을 통하여 E/PC/10/1 균주의 배양여과액에는 식물생장을 촉진시키는 유용물질이 함유되어 있을 것으로 생각되었다. 그래서 본 연구에서는 식물생장과 관련된 물질을 탐색하기 위하여 HPLC 및 GC-MS-SIM를 사용하여 분석하였다.

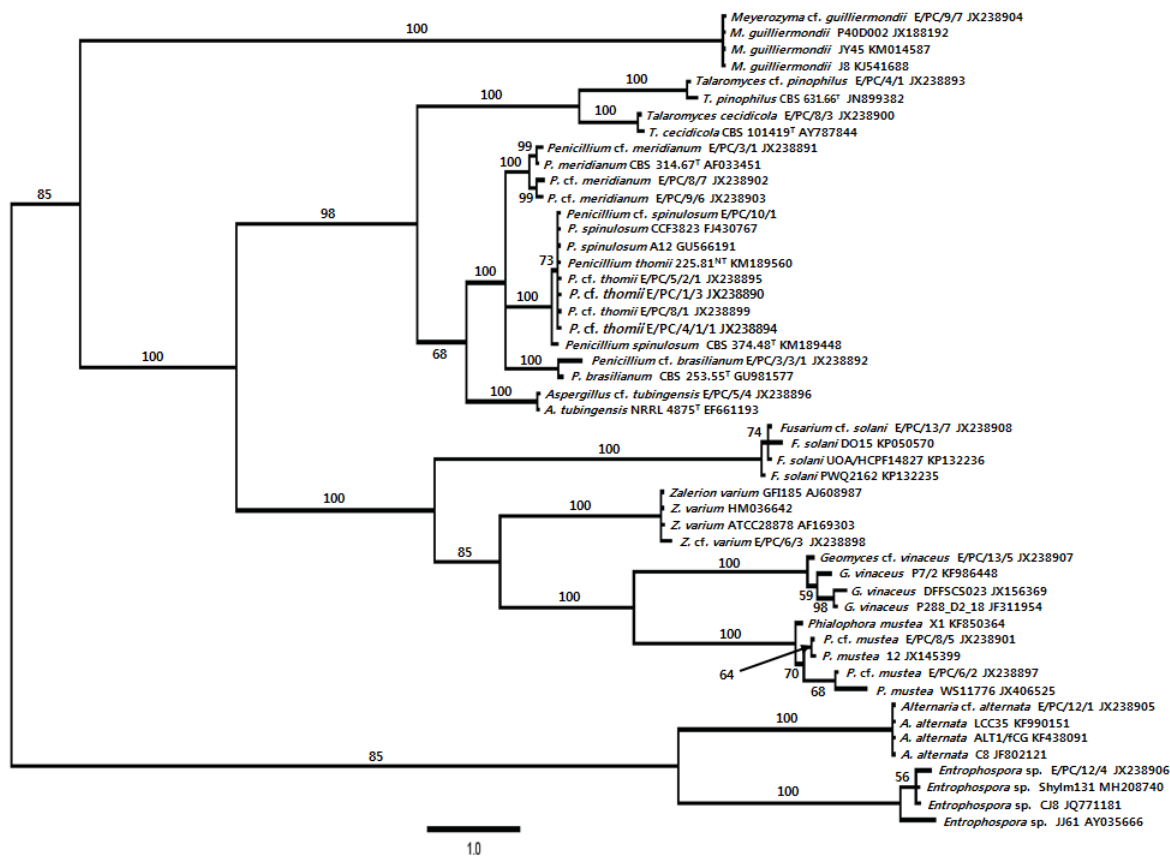
### 내생균류의 유연관계 분석 및 동정

개질경이의 뿌리로부터 분리된 내생균류의 계통학적인 위치를 분석하기 위하여 내생균류의 표준균주와 참고균주들의 ITS영역 염기서열을 이용하였다. 그리고 분리된 균류에 대한 유연관계는 bayesian tree를 작성하여 분석하였으며(Fig. 1), 개질경이[JX238890-JX238908, KP691068]의 염기서열을 NCBI GenBank에 등록하였다(Kim et al., 2014). 유연관계 분석결과, 분리된 내생균류들 각각의 표준균주와 참고균주들은 높은 support value (>90%)로 group을 형성하여 정확한 계통학적 위치를 확인할 수 있었다. 그렇지만, 식물생장촉진활성 균주인 E/PC/10/1은 두 가지 종(*P. spinulosum*과 *P. thomii*)이 함께 높은 support value로 group을 형성하여 정확한 동정이 어려웠다. 그래서 본 실험에서는 식물생장능이 우수한 E/PC/10/1 균주의 beta-tubulin 유전자 염기서열[KP691067]을 표준균

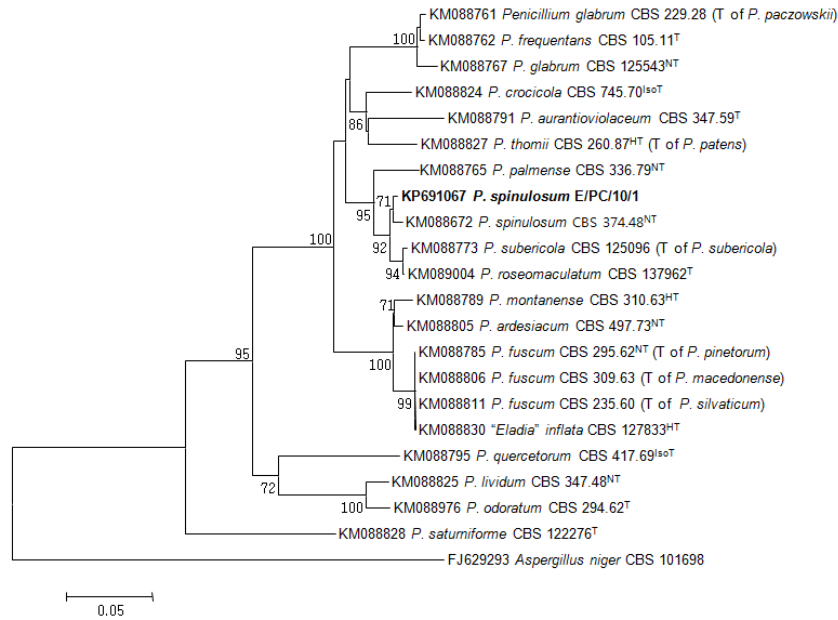
**Table 1.** Screening for plant growth-promoting activity of WR seedling with FCFs of endophytic fungi isolated from *P. camtschatica*

Fungal isolates	SL	PL	Fungal isolates	SL	PL
N.D	3.80±0.22ijk	7.74±0.34k	E/PC/8/1	4.92±0.45e	10.44±0.55cde
D.W	4.22±0.28hi	8.74±0.28ij	E/PC/8/3	5.50±0.28b	11.08±0.63c
CBM	4.92±0.17e	9.92±0.33efg	E/PC/8/5	4.04±0.29hijk	8.66±0.64j
E/PC/1/3	4.46±0.27fgh	9.36±0.34ghi	E/PC/8/7	4.34±0.27gh	9.62±0.55fgh
E/PC/3/1	4.16±0.19hij	8.98±0.46hij	E/PC/9/6	3.74±0.39jk	8.04±0.56k
E/PC/3/3/1	4.28±0.26h	8.90±0.38ij	E/PC/9/7	4.96±0.23de	10.40±0.52de
E/PC/4/1	4.76±0.31efg	10.32±0.45de	E/PC/10/1	7.10±0.24a	16.06±0.36a
E/PC/4/1/1	4.88±0.41ef	10.04±0.56def	E/PC/12/1	4.26±0.29h	9.60±0.48fgh
E/PC/5/2/1	5.04±0.24cde	10.50±0.48cde	E/PC/12/4	3.62±0.28k	7.80±0.35k
E/PC/5/4	5.38±0.24bcd	10.72±0.41cd	E/PC/13/5	4.14±0.22hij	9.00±0.60hij
E/PC/6/2	5.08±0.28bcde	10.52±0.31cde	E/PC/13/7	5.42±0.29bc	11.70±0.62b
E/PC/6/3	4.32±0.28h	9.10±0.29hij			

Ten microliters of lyophilized fungal culture filtrates (FCFs) were treated to WR seedlings. The shoot length and plant length of Waito-c rice (WR) seedlings were measured after a week of treatment. According to DMRT ( $P < 0.05$ ), the different letters in a row indicate significant differences. The letters indicate that values are not significantly different. Data are expressed as mean value  $\pm$  standard deviation. SL, Shoot length; PL, Plant length; N.D, Not treated; D.W, Distilled water; CBM, lyophilized liquid of Czapek broth medium.



**Fig. 1.** Bayesian tree based on ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences. This is a 50% majority rule consensus tree among  $1.4 \times 10^6$  pooled trees from two independent Bayesian MCMC runs. The maximum likelihood bootstrap probability values from 1,000 replicates (Shown as percentage for values above 50%). GenBank accession number for each sequence is provided behind the species name.



**Fig. 2. Phylogenetic analysis of endophytic fungal strain isolated from the roots of *P. camtschatica*.** Taxonomic position of *P. spinulosum* E/PC/10/1 was based on data of the partial beta-tubulin gene sequences [5, 6]. CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. The ‘T’ after the collection number indicates the type strain of the species.

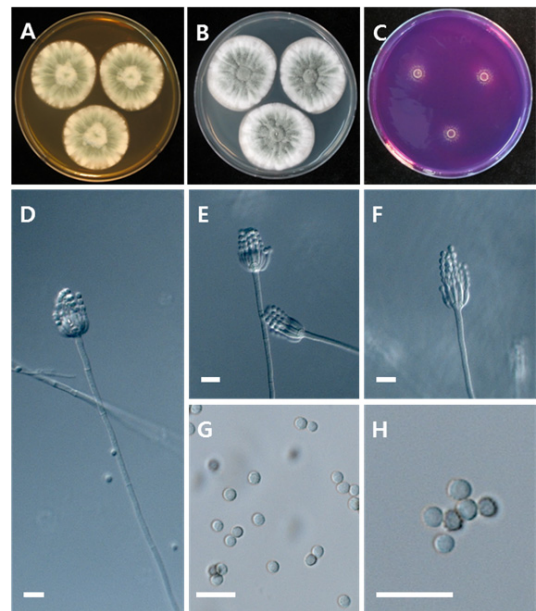
주와 문헌자료를 비교하여 계통학적인 위치를 확인하였을 때 (Houbraken and Samson, 2011; Houbraken *et al.*, 2014), *Penicillium* subgenus *Aspergilloides*의 section *Aspergilloides*에 포함되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

**식물생장활성 내생균류의 형태적인 관찰**

형태적 동정을 위하여 25°C 조건의 MEA 배지에서 생장한 E/PC/10/1 균주의 생장특성을 관찰하였고, 광학현미경을 이용하여 분생포자경과 분생포자 등의 미세구조를 관찰하였다. E/PC/10/1 균주의 분생포자경의 자루(Stipe)는 200–800 × 2.0–3.5 μm 크기에 표면에 조금 거칠었고, 경자(Phialides)는 7–12 × 2.5–3.5 μm 크기였으며, 분생포자는 2–2.3 × 1.7–2 μm 크기인 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 그리고 stipe에 마디가 있는 것을 관찰할 수 있었고, 경자의 형태와 분생포자의 형태를 비교하였을 때에 *P. spinulosum* 종과 흡사한 형태를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 분자적인 특징과 형태적인 특징을 토대로 E/PC/10/1 균주는 *Penicillium spinulosum* Thom으로 최종 동정되었다.

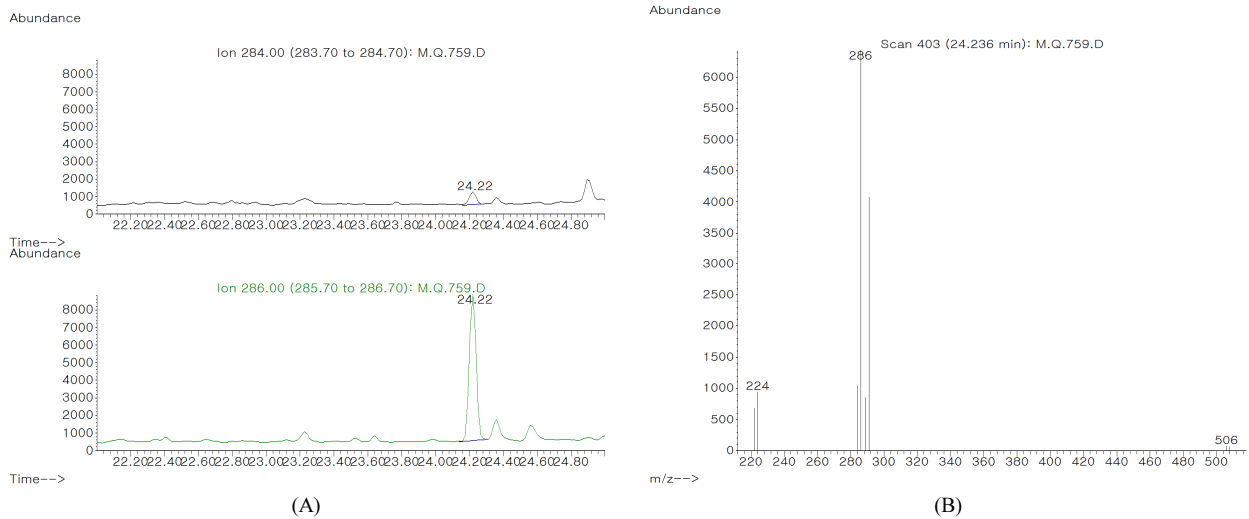
**이차대사산물의 분석**

식물생장활성능을 나타내는 E/PC/10/1 균주의 농축배양여과액을 추출하여 HPLC의 retention time을 확인하여 후보물질을 선정하였다. 선별된 내생균류의 배양여과액을 표준물질



**Fig. 3. Description of endophytic fungal strain isolated from coastal plant. *P. spinulosum* E/PC/10/1 (A, Colonies on MEA; B, Colonies on CYA; C, Colonies on CREA; D-F, Conidiophores; G-H, Conidia). Scale bars, (D-H) 10 μm.**

과 비교 분석한 결과, 3종류의 GAs들을 생산하는 것이 확인되었다. 그리고 정량분석을 하기 위하여, GC/MS-SIM으로 분석한 결과 E/PC/10/1 균주는 GA<sub>1</sub> (0.33 ng/100 ml), GA<sub>3</sub> (1.17 ng/



**Fig. 4.** The GC-MS SIM spectra for GA<sub>4</sub> in fungal culture filtrate of the *P. spinulosum* E/PC/10/1. Arrow indicates the peak of fungal GA<sub>4</sub> that coincides with that of internal standard GA<sub>4</sub>. GC-MS peak of *P. spinulosum* E/PC/10/1; (A) GC-MS peak of fungal culture filtrate, and GC-MS peak of standard GA<sub>4</sub>, (B) Ion value of standard GA<sub>4</sub>.

100 ml)과 GA<sub>4</sub> (5.1 ng/100 ml)를 생산하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

본 연구는 동해안에 자생하고 있는 개질경이의 뿌리로부터 분리된 내생균류의 ITS 영역 염기서열을 해독하여 계통학적인 유연관계를 분석하였다. 그리고 내생균류가 식물생장과 관련하여 성장저해 또는 성장촉진 등의 영향을 미치는지 스크리닝하기 위하여 미생물이 생산하는 이차대사산물 중에서 식물 호르몬을 분석하였다. 본 실험에서는 비교적 다루기 쉬운 난장이벼를 이용하였고, 내생균류의 농축된 배양여과액을 처리하였을 때, E/PC/10/1 균주가 성장촉진활성이 우수한 것이 확인되었다.

식물성장촉진활성을 나타내는 E/PC/10/1 균주를 분자적인 방법과 형태적인 방법으로 관찰하였고, 최종적으로 *P. spinulosum*으로 동정되었으며, 분류학적으로 *Penicillium* section *Aspergilloides*에 속하는 것이 확인되었다. 또한, E/PC/10/1 균주의 배양여과액을 HPLC와 GC/MS-SIM으로 분석한 결과, 식물성장촉진 호르몬인 지베렐린 GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>를 생산하는 것이 확인되었다. GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>는 생리활성을 나타내는 활성 지베렐린으로 식물-내생균류 상호관계 및 유용물질에 대한 연구 소재로서 환경분야와 농업분야에서 보고되고 있다 (Rim *et al.*, 2005; You *et al.*, 2012). 최근 해안지역에 자생하는 내생균류가 식물호르몬을 생산한다는 보고가 점차적으로 보고되고 있으며(Khan *et al.*, 2008; You *et al.*, 2013), *Penicillium* 속의 종들에 의하여 보고되고 있다. 그리고 *P. spinulosum*종에서 생산한다는 것은 본 연구에서 처음 확인되었고, 점차적으

로 다양한 종들에서 보고될 것이며, 이들을 식물의 생장에 활용한다면 친환경적으로 좋은 효과를 보여 줄 것으로 생각된다.

현재까지 많은 연구가 이루어지지 않은 해안지역의 암반지대, 모래지역, 염습지에 대한 연구가 필요할 것이다. 특히, 이런 지역들은 고온과 염에 노출되어 있으며, 유용미생물 발굴이 비교적 높으면서 다양한 미생물들이 자생하고 있다. 그리고 염습지의 경우는 해안지역에 속하지만 해수의 영양을 받기 때문에 해양생태계의 조건을 가지고 있고, 많은 유용미생물자원이 자생하고 있을 것으로 생각된다. 해안지역과 더불어 국내에 다양한 담수, 산림, 습지, 농경지 등과 같은 환경지역에 자생하는 균류자원에 대한 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 적 요

동해안에 자생하는 해안식물인 개질경이를 채집하였고, 뿌리로부터 형태적으로 다른 내생균류 20균주를 선별하였다. 개질경이 뿌리에 공생하는 내생균류의 ITS-rDNA 염기서열을 분석하였으며, 분리된 내생균류의 유연관계는 Bayesian 프로그램을 이용하여 계통분석을 하였다. 모든 내생균류의 농축 배양여과액을 난장이벼에 처리하여 식물성장촉진활성을 스크리닝하였고, 분리된 균류 중에서 E/PC/10/1 균주가 성장촉진활성이 우수한 것으로 확인되었다. E/PC/10/1 균주의 배양여과액을 HPLC와 GC/MS-SIM을 이용하여 분석한 결과, 식물호르몬인 지베렐린 GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>가 정량분석 되었다. 그

리고 E/PC/10/1 균주의 명확한 동정을 위하여, beta-tubulin 유전자 염기서열을 이용한 분자적인 방법과 현미경을 이용한 형태적인 방법으로 동정하였다. 최종적으로 E/PC/10/1 균주는 GAs을 생산하는 새로운 *P. spinulosum*으로 동정되었다.

## 감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01087102)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

- Choi, W.Y., Sin, K.S., Lee, I.J., Rhee, I.K., Lee, J.H., and Kim, J.G. 2004. Isolation of gibberellin-producing *Penicillium* spp. from the root of *Lindera obtusiloba* and *Vaccinium koreanum*. *Kor. J. Mycol.* **32**, 16–22.
- Glass, N.L. and Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1323–1330.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, M.A., Khan, A.L., Kang, S.M., Kim, S.K., Joo, G.J., and Lee, I.J. 2009. Gibberellin production by pure cultures of a new strain of *Aspergillus fumigates*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1785–1792.
- Hedden, P. and Phillips, A.I. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* **5**, 523–530.
- Houbraken, J. and Samson, R.A. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud. Mycol.* **70**, 1–51.
- Houbraken, J., Visagie, C.M., Meijer, M., Frisvad, J.C., Busby, P.E., Pitt, J.I., Seifert, K.A., Louis-Seize, G., Demirel, R., Yilmaz, N., *et al.* 2014. A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Stud. Mycol.* **78**, 373–451.
- Jang, D.H. and Park, J.H. 2009. Assessment of coastal landforms for ecological networks establishment of Chungnam coastal zone. *J. Photo. Geography* **19**, 73–95.
- Khan, A.L., Hamayun, M., Ahmad, N., Hussain, J., Kang, S.M., Kim, Y.H., Adnan, M.D., Tang, S., Waqas, M., Radhakrishnan, R., *et al.* 2011. Salinity stress resistance offered by endophytic fungal interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and *Glycine max.* L. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 893–902.
- Khan, A.L., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Jung, H.Y., Lee, J.H., and Lee, I.J. 2012. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiol.* **12**, 3.
- Khan, S.A., Hamayun, M., Kim, H.Y., Yoon, H.J., Lee, I.J., and Kim, J.G. 2009. Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated strain of *Gliomastix murorum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 829–833.
- Khan, S.A., Hamayun, M., Yoon, H.J., Kim, H.Y., Suh, S.J., Hwang, S.K., Kim, J.M., Lee, I.J., Choo, Y.S., Yoon, U.H., *et al.* 2008. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiol.* **8**, 231.
- Kim, H., You, Y.H., Yoon, H., Seo, Y., Kim, Y.E., Choo, Y.S., Lee, I.J., Shin, J.H., and Kim, J.G. 2014. Culturable fungal endophytes isolated from the roots of coastal plants inhabiting Korean east coast. *Mycobiology* **42**, 100–108.
- Redman, R.S., Sheehan, K.B., Stout, R.G., Rodriguez, R.J., and Henson, J.M. 2002. Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. *Science* **298**, 1581.
- Rim, S.O., Lee, J.H., Choi, W.Y., Hwang, S.K., Suh, S.J., Lee, I.J., Rhee, I.K., and Kim, J.G. 2005. *Fusarium proliferatum* KGL0401 as a new gibberellin-producing fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 809–814.
- Rodriguez, R.J., Henson, J., Van, V.E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Y., and Redman, R.S. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME J.* **2**, 404–416.
- Rodriguez, R.J., Redman, R.S., and Henson, J.M. 2004. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change* **9**, 261–272.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruscha, T.H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D.V., *et al.* 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to saltstress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13386–13391.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- You, Y.H., Yoon, H., Kang, S.M., Shin, J.H., Choo, Y.S., Lee, I.J., Lee, J.M., and Kim, J.G. 2012. Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon bay. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1549–1556.
- You, Y.H., Yoon, H., Kang, S.M., Woo, J.R., Choo, Y.S., Lee, I.J., Shin, J.H., and Kim, J.G. 2013. *Cadophora malorum* Cs-8-1 as a new fungal strain producing gibberellins isolated from *Calystegia soldanella*. *J. Basic Microbiol.* **53**, 630–634.