

RESEARCH ARTICLE

약용작물의 뿌리에서 분리된 3종의 국내 미기록 내생균

박혁¹, 정충렬², 엄안흠^{1,*}¹한국교원대학교 생물교육과, ²국립산림과학원 산림약용자원연구소

Three Novel Endophytic Fungal Species Isolated from Roots of Medicinal Crops in Korea

Hyeok Park¹, Chung Ryul Jung², Ahn-Heum Eom^{1,*}¹Department of Biology Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173 Korea²Forest Medicinal Resources Research Center, National Institute of Forest Science, Yeongju 36040 Korea

*Corresponding author: eomah@knue.ac.kr

ABSTRACT

We isolated endophytic fungal strains from the roots of three medicinal crops, *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica gigas*, and *Cnidium officinale*, cultivated at Yeongju, Korea. The fungal strains were identified based on their morphological characteristics and molecular analyses of their internal transcribed spacer, large subunit rDNA, and beta-tubulin regions. Thereby, we identified three previously unrecorded endophytic fungal species, *Dactylonectria pauciseptata*, *Rhizopycnis vagum*, and *Sistotrema sernanderi*, in Korea. In this report, we describe the morphological characteristics and phylogenetic analyses of these three fungal species.

Keywords: *Dactylonectria pauciseptata*, Endophytic fungi, Medicinal crops, *Rhizopycnis vagum*, *Sistotrema sernanderi*

서론

약용식물은 질병의 치료 혹은 건강의 증진에 도움을 줄 수 있는 천연 약재로 사용될 수 있는 식물을 말한다[1]. 한국에서 자생하고 있는 약용식물은 약 900여 종 정도로 알려져 있으며, 이 가운데 약재 혹은 건강식품으로써 활용가치가 있어 약용작물로써 재배하거나 임산물로 채취하는 종은 약 60여 종으로 추정된다[2]. 약용식물이 보이는 효능으로는 주로 항균작용[3], 항산화작용[4], 항암작용[5] 등이 있는데, 이러한 효능을 약재로써 이용하기 위해 국내외에서 현재 약용식물에서 분리한 추출물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다.

내생균(endophytic fungi)은 식물의 잎, 줄기, 뿌리 등 조직 내에서 서식하며 병원성을 나타내지 않고 살아가는 균류이다[6]. 내생균은 주로 식물체 내에서 2차 대사산물을 분비하여 포식자인 초



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249Kor. J. Mycol. 2019 June, 47(2): 113-20
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190014>Ahn-Heum Eom
<https://orcid.org/0000-0002-6821-1088>Received: June 3, 2019
Revised: June 15, 2019
Accepted: June 17, 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.

식곤충, 혹은 식물 병원체 등으로부터 식물을 보호하는 역할을 한다[7]. 또한 이러한 대사물질의 항균, 항암작용[8]이 밝혀짐에 따라, 내생균의 분비물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 상황에서 약용작물에 서식하는 내생균에 대한 연구는 위와 같은 연구들을 뒷받침할 수 있는 기초자료로서 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 약용작물로서 재배하고 있는 식물의 뿌리에서 내생균을 분리하던 중 확인된 3종의 국내 미기록 내생균에 대한 형태적 특성과 분자계통분석의 결과를 기술하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 채집은 2017년 9월 경북 영주에 위치한 산림약용자원연구소 내의 경작지(N36°52'40.5", E128°32'11.5")에서 진행되었다. 국내에서 임산물로 많이 재배되고 있으며, 뿌리를 약재로 이용하는 약용작물인 토천궁(*Ligusticum chuanxiong* Hort.), 참당귀(*Angelica gigas* Nakai), 일천궁(*Cnidium officinale* Makino)의 뿌리를 채집하여 24시간 이내에 실험실로 운반하였다. 뿌리는 증류수로 씻어 흙을 완전히 제거한 후에 3% NaClO 용액에 3분, 70% EtOH에 1분간 차례로 처리하여 표면살균하였고, 100 µg/mL 농도의 streptomycin 용액에 10분간 처리한 뒤 멸균수로 3회 씻어주었다. 표면살균된 뿌리는 filter paper를 이용하여 물기를 완전히 제거한 뒤 0.5 cm 길이로 잘라 water agar(WA) 배지의 네 귀퉁이에 치상하였다[9]. 25° C의 암소에서 배양하면서 매일 관찰하여 균사가 뻗어 나오는 것이 확인되면 메스를 이용하여 potato dextrose agar (PDA, BD Difco™, USA) 배지로 계대배양하였으며, 순수 분리된 균주는 PDA배지와 더불어 malt extract agar (MEA, BD Difco™, USA)배지에서 7일간 배양하여 해부현미경 및 광학현미경 상에서 형태적 특성을 관찰하였다(Table 1). 형태적으로 분류된 균주의 분자계통학적 동정을 위해 DNeasy plant mini kit (Qiagen, USA)을 이용하여 균사에서 DNA를 추출한 뒤, ribosomal DNA (rDNA)의 5.8S 지역을 포함하는 internal transcribed spacer (ITS)영역을 균류 특이적 primer인 ITS1F와 ITS4 [10]를 이용하여 증폭하였으며, 보다 정확한 동정을 위하여 rDNA의 large subunit (LSU)영역을 primer LR0R과 LR16 [11]을 이용하여 증

Table 1. Morphological characteristics of fungal strains isolated in this study

Strain	<i>D. pauciseptata</i> 17E023	<i>D. pauciseptata</i> [14]	<i>R. vagum</i> 17E011	<i>R. vagum</i> [17]	<i>S. semanderi</i> 17E012	<i>S. semanderi</i> [20]
Colony	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 25°C, 7 days	PDA, 25°C, 25 days	PDA, 25°C, 7 days	uncultured
Color	White in center, margin nearly colorless; reverse beige, margin nearly colorless	White to grayish brown; reverse brownish yellow to cinnamon brown, margin pale yellow	Surface brightly white; reverse yellowish brown in center, margin felty white to beige	Dark brown to brown, margin lighter, generally felty	Brightly white	Basidiocarp white to cream
Size	34~35 mm	35~50 mm	34~36 mm	85 mm	20~23 mm	uncultured
Shape	Raised, margins nearly entire	Felty due to aerial mycelium	Convexed, mycelium dense, margins faintly zonate, nearly entire	Mycelium dense, faintly zonate	Raised, radial margin due to aerial mycelium	uncultured
Conidia	Macroconidia 2~3 septate, spindle to subcylindrical, (25.04~) 29.54 (~36.78) × (7.82~) 8.52 (~9.00) µm in diam; microconidia aseptate, ovoid to ellipsoid, (5.95~) 7.63 (~8.73) × (3.72~) 4.66 (~5.87) µm	Macroconidia predominantly 3~septate, cylindrical, (37~) 42~45~47 (~54) × (7.0~) 8.5~9.0~9.5 (~10.0) µm in diam; microconidia aseptate, subglobose to ovoidal, (3.5~) 4.4~5~5.4 (~7.8) × (2.4~) 2.9~3.3~3.7 (~4.6) µm	Hyaline, cylindrical, 1~2 septate, (8.12~) 10.76 (~13.02) × (1.30~) 2.23 (~3.16) µm	Hyaline, cylindrical to fusiform, 1~3 septate, (16~) 18~25 (~28) × (4.0~) 4.5~6.0 (~6.9) µm	Basidia subcylindrical, light brown to dark brown, (23.21~) 26.18 (~29.18) × (4.35~) 4.83 (~5.77) µm	Basidia narrowly uniform to subcylindrical, 20~30 x 4~6 µm

폭하였고, beta-tubulin (TUB) 영역을 primer Bt2a와 Bt2b [12]를 이용하여 증폭하였다. PCR반응은 SolGent PCR smartmix (SolGent, Daejeon, Korea)의 protocol에 따라 95°C 2분, (95°C 20초, annealing 40초, 72°C 1분)을 35 cycle 반복, 72°C 5분, 8°C에서 종료로 진행하였고, annealing 온도는 ITS영역은 50°C, LSU영역은 44°C, TUB 영역은 55°C로 설정하였다. PCR이 끝난 DNA는 1.5% agarose gel에 20분간 전기영동하여 각각 DNA 단편의 크기를 확인한 후 염기서열 분석을 의뢰하였다 (SolGent, Daejeon, Korea). DNA 염기서열은 미국 국립생물정보센터(NCBI) 상에서 BLAST하여 유사도를 확인하고, MEGA7 프로그램을 이용하여[13] 두 영역 혹은 세 영역의 염기서열을 이어 neighbor-joining 방식으로 계통수를 작성하였다. 확인된 미기록종 균주는 국립생물자원관(NIBR)에 기탁하였으며, BLAST 유사도검색 및 계통수 작성에 이용된 염기서열은 NCBI에 등록하였다.

결과 및 고찰

Dactylonectria pauciseptata (Schroers & Crous) L. Lombard & Crous, *Phytopathologia Mediterranea* 53: 527 (2014)

일천궁의 뿌리에서 분리된 균주이다. PDA배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 34~35 mm 정도이고, 균총의 앞면은 전체적으로 흰색이나 가장자리에서는 균사의 밀도가 줄어들어 무색에 가까게 보였다. 뒷면 역시 전체적으로 베이지색을 띠지만 앞면과 같이 가장자리에서는 무색에 가까운 균총이 확인되었다. 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기된 형태이며 균총의 가장자리는 둥근 형태에 가깝다(Fig. 1A). MEA배지에서 7일간 배양된 균총의 직경은 35~38 mm 정도이고, 균총의 색은 앞·뒷면 모두 중앙부에서는 연한 베이지색을 띠며 가장자리로 갈수록 색이 옅어진다. 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기된 형태이며 가장자리는 균사들이 조밀하게 뻗어 나가 방사형을

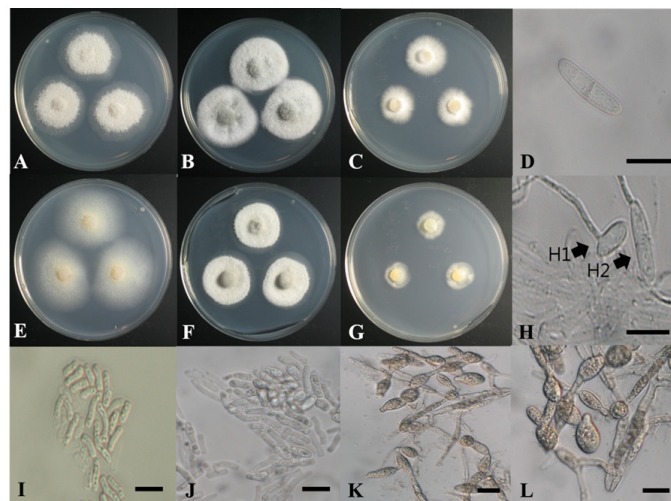


Fig. 1. Colonies of strain 17E023 (*Dactylonectria pauciseptata*) grown for 7 days on potato dextrose agar (PDA) (A) and malt extract agar (MEA) (E), macroconidium (D), microconidium (H1) and macroconidium (H2). Colonies of strain 17E011 (*Rhizopycnis vagum*) grown for 7 days on PDA (B) and MEA (F), conidia (I, J). Colonies of strain 17E012 (*Sistotrema semanderi*) grown for 7 days on PDA (C) and MEA (G), basidia (K, L). (scale bars: D=20 µm, H-L=10 µm).

이룬다(Fig. 1E). 분생자(conidia)는 격벽(septate)에 의해 3~4부분으로 나누어지는 길쭉한 방추형의 대분생자(macroconidia)와(Fig. 1D), 격벽이 확인되지 않는 짧은 타원형의 소분생자(microconidia)가 함께 확인되었다(Fig. 1H). 두 종류 모두 투명한 색을 띠고 크기는 대분생자가 (25.04~) 29.54 (~36.78) × (7.82~) 8.52 (~9.00) μm 정도이며 소분생자는 (5.95~) 7.63 (~8.73) × (3.72~) 4.66 (~5.87) μm (n=20)로 확인되었다.

Specimen examined: Yeongju, Gyeongsangbukdo, Korea, N36°52'40.5", E128°32'11.5", September 20, 2017, *Dactylonectria pauciseptata*, isolated from root of *Cnidium officinale*, strain 17F023, NIBRFG0000503364, GenBank No. MK968524.

Notes: *D. pauciseptata*는 2008년 Schroes & Crous에 의해 *Cylindrocarpon pauciseptatum*으로 최초 보고되었으나[14], 2014년 Lombard & Crous에 의해 Nectriaceae 내의 속을 재정립하는 과정에서 *Dactylonectria*로 속명이 수정되었다[15]. 3개의 격벽을 가진 대분생자와 격벽이 없는 하나의 세포로 이루어진 소분생자를 갖는 것이 특징이며[14], 본 연구에서도 대분생자가 2~3개의 격벽에 의해 나뉘는 것을 확인할 수 있었고 격벽이 없는 소분생자를 확인하였다. 최초 분리는 뉴질랜드에서 진달래과 식물(*Erica melanthera*)의 뿌리, 슬로바키아의 포도나무 줄기 및 뿌리에서 분리되었으며[14], 이후에도 호주의 담배속(*Nicotiana*) 식물에서 내생균으로 분리된 기록이 존재한다[16]. ITS, LSU, TUB 영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS는 *D. pauciseptata* MF440370.1과 99.64%, LSU는 *D. pauciseptata* KM515903.1과 99.83%, TUB는 *D. pauciseptata* JF735435.1과 98.12%의 일치도를 보였으며 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 2).

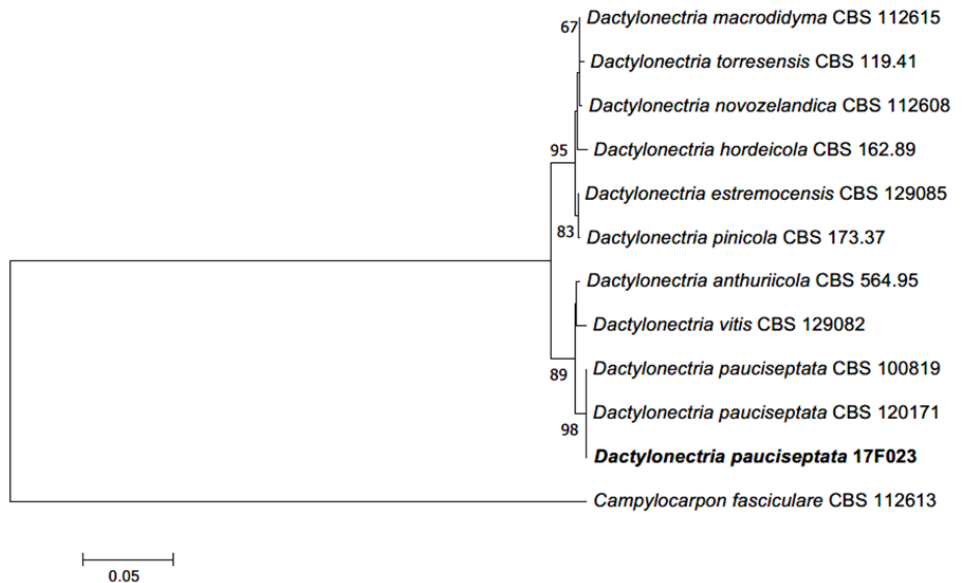


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of the internal transcribed spacer (ITS), large subunit (LSU), and beta-tubulin (TUB) sequences. *Campylocarpon fasciculare* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). The fungal strain isolated in this study is in bold.

***Rhizopycnis vagum* D.F. Farr, Mycologia 90: 291 (1998)**

토천궁의 뿌리에서 분리된 균주이다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 34~36 mm 정도 이고, 균총의 앞면은 전체적으로 밝은 흰색을 띠며 뒷면은 중앙부에서 황갈색을, 가장자리에서는 베이지색 혹은 흰색을 띤다. 균총의 고도는 볼록 융기된 형태이고 가장자리는 등근형태이다 (Fig. 1B). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 32~35 mm 정도이며, 균총의 색은 앞면은 전체적으로 밝은 흰색을 띠고 뒷면은 중앙부에서는 옅은 올리브색을 띠며 가장자리에서는 베이지 색 혹은 아이보리색을 띤다. 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기된 형태이고, 균총의 가장자리는 entire형에 가깝다(Fig. 1F). 분생자는 길고 투명한 원통형이며, 1~2개의 격막을 가지고 있다. 분생자의 크기는 (8.12~) 10.76 (~13.02) × (1.30~) 2.23 (~3.16) μm (n=20)로 확인되었다(Fig. 1I, 1J).

Specimen examined: Yeongju, Gyeongsangbukdo, Korea, N36°52'40.5", E128°32'11.5", September 20, 2017, *Rhizopycnis vagum*, isolated from root of *Ligusticum chuanxiong*, strain 17F011, NIBRFG0000503360, GenBank No. MK968525.

Notes: *R. vagum*은 1998년 D.F. Farr에 의해 속과 종이 동시에 기록되었다[17]. 속명의 *Rhizopycnis* 는 뿌리(rhiza-)에 분포자기(pycnidium)를 형성하는 것에서 유래되었다. 분생자경(conidiophore)이 확인되지 않고 conidiomata에서 1~3개의 격막을 가진 방추형 혹은 원통형의 분생자를 형성하는 것이 특징이며[17], 본 연구에서도 분생자경 없이 길쭉한 원통형으로 형성되는 1~2개의 격막을 가진 분생자를 상당량 확인하였다. 최초 보고는 멜론과 사탕수수의 뿌리에서 분리된 균주이고[17], 담배(*Nicotiana tabacum*)의 뿌리에서 내생균으로 분리된 *R. vagum* 균주가 분비하는 물질이 인간 암세포를 억제할 수 있다는 연구 결과가 존재한다[18]. ITS와 LSU 영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS는 *R. vagum* HQ610503.1과 98.78%, LSU는 *R. vagum* JN859474.1과 100%의 일치도를 보였으며 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 3).

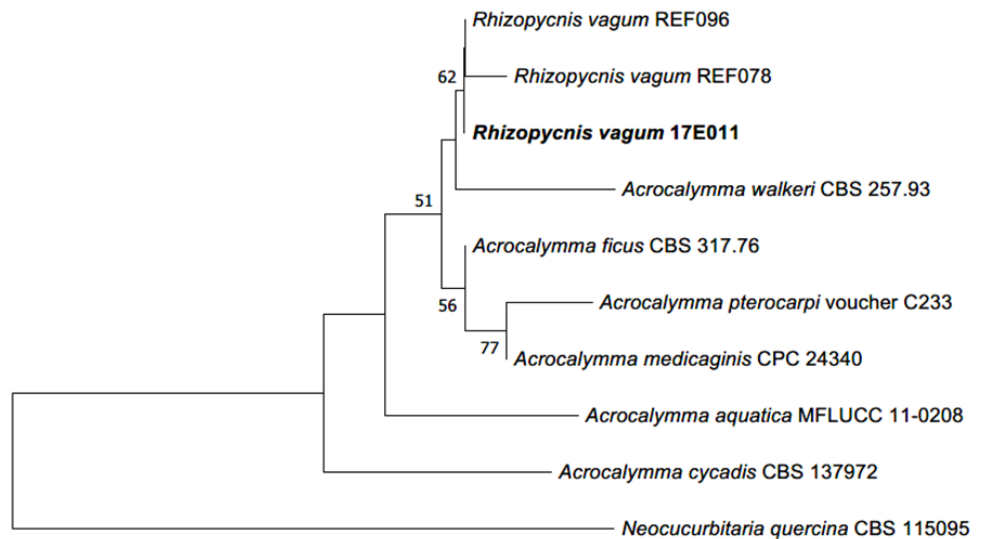


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) sequences. *Neocucurbitaria quercina* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). The fungal strain isolated in this study is in bold.

***Sistotrema seranderi* (Litsch.) Donk, Fungus 26: 4 (1956)**

참당귀의 뿌리에서 분리된 균주이다. PDA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 20~23 mm 정도 이고, 균총의 색은 앞·뒷면 모두 밝은 흰색을 띤다. 균총의 고도는 배지에서 살짝 융기된 형태이며, 가장자리로 공중균사가 뻗어 나가 방사형을 이룬다(Fig. 1C). MEA 배지에서 7일간 배양된 균총의 크기는 15~16 mm 정도로 매우 느리게 자라며, 균총의 색은 앞·뒷면 모두 무색에 가까운 흰색을 띤다. 균총의 고도는 배지에 납작하게 붙어 있고, 가장자리는 불규칙하게 균사가 뻗어 있다 (Fig. 1G). 균사 생장의 말단 부위에서 원통형의 연갈색 혹은 흑갈색 담자기(basidia)가 형성되며, 크기는 (23.21~)26.18 (~29.18) × (4.35~)4.83 (~5.77) μm (n=20)이다(Fig. 1K, 1L).

Specimen examined: Yeongju, Gyeongsangbukdo, Korea, N36°52'40.5", E128°32'11.5", September 20, 2017, *Sistotrema seranderi*, isolated from root of *Angelica gigas*, strain 17F012, NIBRFG0000503359, GenBank No. MK968526.

Notes: 학명 *S. seranderi*는 1956년 Donk에 의해 *Gloeocystidium seranderi*에서 *Sistotrema*속으로 재 조합되었다[19]. Basidiomycota에 속하며, 흰색 혹은 크림색의 균사를 갖고 20~30 x 4~6 μm 정도 크기의 원통형 담자기에서 불규칙한 소시지형(subballantoid)의 담자포자(basidiospore)를 형성하는 것이 특징이다[20]. 본 연구에서는 담자포자는 확인되지 않았으나, 원통형 담자기의 크기와 형태가 참고문헌과 일치하는 것을 확인하였다. 가문비나무(*Picea abies*)와 너도밤나무(*Fagus sylvatica*)에서 분리된 기록이 존재하며[20], 주로 나무 껍질 조직에서 많이 분리된다[21, 22]. ITS와 LSU

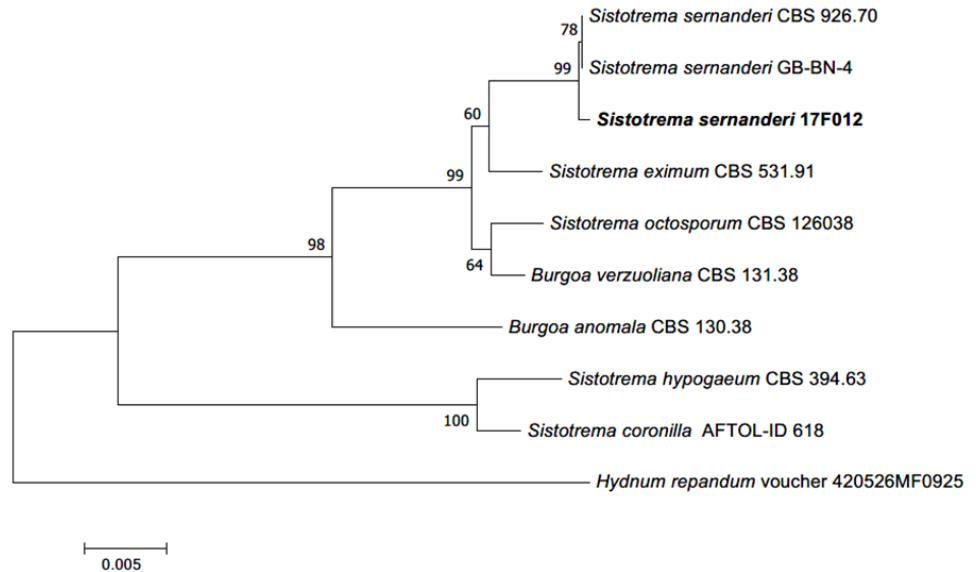


Fig. 4. Neighbor-joining phylogenetic tree based on a concatenated alignment of internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) sequences. *Hydnum repandum* was used as an outgroup. Numbers on branches indicate bootstrap values (1,000 replicates). Fungal strain isolated in this study is in bold.

영역의 DNA 염기서열 분석 결과 ITS는 *S. seranderi* AY805624.1과 99.82%, LSU는 *S. seranderi* AM259219.1과 99.68%의 일치도를 보였으며 모두 같은 계통을 형성하였다(Fig. 4).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Project on Survey and Discovery of Indigenous Fungal Species of Korea funded by NIBR of the Ministry of Environment (MOE), Republic of Korea.

적요

경북 영주의 산림약용자원연구소에서 재배하고 있는 약용작물 3종(토천궁, 참당귀, 일천궁)의 뿌리에서 내생균을 분리하였다. 분리된 균주는 형태적 특성과 internal transcribed spacer, large subunit rDNA, beta-tubulin 영역의 분자적 분석을 토대로 동정하였다. 연구 과정에서 3종의 국내 미기록종 내생균 균주를 확인하였고, 확인된 종은 *Dactylonectria pauciseptata*, *Rhizopycnis vagum*, *Sistotrema seranderi*이다. 미기록종 내생균 균주의 형태적 특성 확인 및 계통 분석 결과에 대해 기술하였다.

REFERENCES

1. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: Past history and future perspective. *J Herbmed Pharmacol* 2018;7:1-7.
2. Chang CS, Lee JW. Production and marketing analysis of medicinal plants. *Korean J Forest Econ* 1999;7:76-91.
3. Nostro A, Germano M, D'angelo V, Marino A, Cannatelli M. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol* 2000;30:379-84.
4. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process* 2011;89:217-33.
5. Ueda J, Tezuka Y, Banskota AH, Le Tran Q, Tran QK, Harimaya Y, Saiki I, Kadota S. Antiproliferative activity of Vietnamese medicinal plants. *Biol Pharm Bull* 2002;25:753-60.
6. Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 1988;69:2-9.
7. Clay K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 1988;69:10-6.
8. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers* 2010;41:1-16.
9. Kim JH, Kim DY, Park H, Cho JH, Eom AH. *Neocosmospora rubicola*, an unrecorded endophytic fungus isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis* in Korea. *Kor J Mycol* 2017;45:63-7.
10. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 1993;2:113-8.
11. Moncalvo JM, Lutzoni FM, Rehner SA, Johnson J, Vilgalys R. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Syst Biol* 2000;49:278-305.

12. 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.
13. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-4.
14. Schroers H-J, Žerjav M, Munda A, Halleen F, Crous PW. *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycol Res* 2008;112:82-92.
15. Lombard L, Van Der Merwe NA, Groenewald JZ, Crous PW. Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathol Mediterr* 2014;53:515-32.
16. Dastogeer KM, Li H, Sivasithamparam K, Wylie SJ. *In vitro* salt and thermal tolerance of fungal endophytes of *Nicotiana* spp. growing in arid regions of north-western Australia. *Arch Phytopathol Plant Protect* 2018:1-15.
17. Farr D, Miller M, Bruton B. *Rhizopycnis vagum* gen. et sp. nov., a new coelomycetous fungus from roots of melons and sugarcane. *Mycologia* 1998;90:290-6.
18. Lai D, Wang A, Cao Y, Zhou K, Mao Z, Dong X, Tian J, Xu D, Dai J, Peng Y. Bioactive dibenzo- α -pyrone derivatives from the endophytic fungus *Rhizopycnis vagum* Nitaf22. *J Nat Prod* 2016;79:2022-31.
19. Donk MA. Notes on resupinate Hymenomycetes III. *Fungus* 1956;26:3-24.
20. Bernicchia A, Gorjón S. Corticiaceae s. l. *Fungi Europaei* 12. Italy: Candusso Edizioni; 2010.
21. Heilmann-Clausen J, Boddy L. Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species. *Microb Ecol* 2005;49:399-406.
22. Heilmann-Clausen J. A gradient analysis of communities of macrofungi and slime moulds on decaying beech logs. *Mycol Res* 2001;105:575-96.