

식물내생곰팡이의 제초활성 검정 및 소나무에서 분리한 *Gliocladium catenulatum*이 생산하는 제초활성 물질의 특성 규명

최경자 · 박중협 · 김홍태 · 이선우 · 최정섭 · 홍경식 · 조광연 · 김진철*

한국화학연구원 생물화학연구부 생물기능연구팀

Phytotoxicity of Endophytic Fungi and Characterization of a Phytotoxin Isolated from *Gliocladium catenulatum* from *Pinus densiflora*

Gyung Ja Choi, Joong-Hyeop Park, Heung Tae Kim, Seon-Woo Lee, Jung-Sup Choi,
Kyung-Sik Hong, Kwang Yun Cho and Jin-Cheol Kim*

Biological Function Research Team, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Taejon 305-600, Korea
(Received December 9, 2003)

ABSTRACT: This study was conducted to discover new phytotoxins which may be used as lead molecules for the development of new herbicides. A total of 187 endophytic fungi were isolated from 11 plant species, which were collected from 8 locations in Korea. Their herbicidal activities were screened *in vivo* by herbicidal and duckweed bioassays after they were cultured in potato dextrose broth and rice solid media. Both fermentation broth and solid culture extract of *Gliocladium catenulatum* F0006 isolated from red pine (*Pinus densiflora*) showed 70% herbicidal activity only against cocklebur (*Xanthium strumarium*) out of the 10 weeds tested. Solid culture extract of F0034 isolated from arrowroot (*Pueraria thunbergiana*) exhibited 20 to 100% herbicidal activities against all of the weeds. Especially, shattercane (*Sorghum bicolor*), barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*), large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*), and fall panicum (*Panicum dichotomiflorum*) were sensitive to the solid culture extract of F0034. In addition, solid culture extract of F0043 isolated from red pine displayed 20% to 70% herbicidal activities only against 5 grass species, but not against 5 broad-leaf plant species. On the other hand, as the results of duckweed assay, 8 fermentation broths showed 100% growth inhibitory activity at concentrations less than 5.0% of culture supernatants and 12 solid cultures had a potent inhibitory activity against duckweed growth. A toxic metabolite was purified from the solid cultures of *G. catenulatum* F0006 by repeated column chromatography and bioassay. It caused a phytotoxic syndrome only on cocklebur out of the 10 weeds tested; it completely killed cocklebur seedlings at 500 $\mu\text{g/ml}$ and showed 85% herbicidal activity against cocklebur at 100 $\mu\text{g/ml}$. The molecular weight of the toxic metabolite is 238 daltons and its structure determination is underway.

KEYWORDS: Endophytic fungus, *Gliocladium catenulatum*, Phytotoxicity, Toxic Metabolite

직·간접적으로 막대한 피해를 끼치는 식물병, 해충 및 잡초의 방제를 위하여 유기합성 농약을 널리 사용하고 있으나 계속적이고 광범위한 사용 및 오남용으로 인하여 환경오염, 저항성 출현, 인축독성 등의 많은 문제가 야기되었다(Ames *et al.*, 1979; Staub *et al.*, 1984). 이러한 유기합성 농약의 문제를 극복하기 위하여 환경과 조화를 이루는 방제 수단으로 저항성 품종, 경종적 방제, 생물학적 방제, 천연물 농약 등이 이용되고 있다(Baker *et al.*, 1983; Belanger and Labbe, 2002; Copping and Menn, 2000; Istvan, 2002; Katz and Demain, 1977; Kiss, 2003; Kim *et al.*, 1999, 2001; Lange *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1993; Powel *et al.*, 1993). 특히 천연물 농약은 그 활성 성분 자체뿐 아니라 그 골격을 이용하여 새로운 합성 농

약을 만들 수 있기 때문에 이 분야의 연구는 널리 수행되고 있다. 유기 합성 주도의 신물질 연구는 선도 화합물의 부족으로 한계 상황에 처해있는 실정이며 최근에 개발되고 있는 농약들의 상당한 부분이 미생물에서 유래한 화합물을 선도물질로 하여 개발되고 있다.

미생물은 곰팡이의 경우 150만종이 있을 것으로 추정하지만 이제까지 알려진 곰팡이는 70,000종(4.7%)에 지나지 않으며 95.3%는 아직 발견되지 않은 것으로 생각되고, 세균의 경우는 300만종이 있을 것으로 추정되며 그 종 이체까지 알려진 종은 4,000여종으로 단지 0.1%에 지나지 않는 실정이다(Porter *et al.*, 1993). 따라서 아직 분리하지 않은 미생물을 찾아내어 자원화 할 때 그 부가가치는 매우 크다고 할 수 있다. 농약 개발을 위한 미생물의 이용은 크게 미생물 자체를 이용하는 방법, 미생물 발효에 의해 생산되는 대사물질을 이용하는 방법과 새로운 농약 합성

*Corresponding author <E-mail: kjinc@kRICT.re.kr>

을 위한 선도 화합물로 미생물 대사물질을 이용하는 방법 등으로 다양하다. 최근에는 지금까지 가장 많이 신물질이 보고되었던 방선균의 비율이 감소하고 있는데 반하여 진균으로부터는 신물질에 대한 보고가 급증하고 있어 진균으로부터 효과가 크면서도 새로운 물질을 분리할 가능성이 매우 높다 하겠다.

식물내생진균은 건강한 식물체에서 식물과 공생관계에 있는 진균을 일컫는데, 이들은 다른 진균에서 발견되지 않은 독특한 구조의 물질을 분비하는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 1995; Stierle *et al.*, 1993; Strobe and Hess, 1997; Wang *et al.*, 2000). Sinclair와 Cerkauskas(1997)는 약 130만종의 식물내생진균이 존재한다고 하였으며 신물질 재료로는 “전혀 이용되지 않은 자원”이라고 하였다.

본 실험에서는 식물내생곰팡이로부터 새로운 제조활성 물질을 탐색하기 위하여 우리나라 강원도 지역에 자생하고 있는 다양한 식물체로부터 총 187개의 식물내생진균을 분리한 후 균주들의 액체배양 및 고체배양 후에 얻어진 배양체를 이용하여 발잡초 및 좁개구리밥에 대한 제조활성 등을 조사하여 활성이 우수한 균주를 선발하였다. 그리고 활성이 우수한 균주들 중에서 *Gliocladium catenulatum* F0006 균주의 배양체가 도꼬마리(*Xanthium strumarium*)에 대해서만 선택적으로 제조활성을 보여 이 배양체로부터 제조활성물질을 분리하였다.

재료 및 방법

시료의 채집

Park 등(2003)이 보고한 바와 같이 1999년 8월 원주, 대관령, 양양, 고성군, 미시령, 인제, 신남 및 홍천 등 강원도 8개 지역으로부터 소나무(*Pinus densiflora*) 5개 시료, 전나무(*Abies holophylla*) 2개 시료, 은행나무(*Ginkgo biloba*) 3개 시료, 칩(*Pueraria thunbergiana*) 3개 시료, 아카시아(*Robinia pseudo-acacia*) 3개 시료, 싸리(*Lespedeza bicolor*) 4개 시료, 낙엽송(*Larix kaempferi*) 2개 시료, 참나무(*Quercus acutissima*) 3개 시료, 단풍나무(*Acer formosum*) 1개 시료, 잣나무(*Pinus koraiensis*) 2개 시료 및 피(*Echinochloa crus-galli*) 3개 시료 등 총 31개 시료의 건강한 가지와 줄기 부위를 채집하였다.

식물내생진균의 분리 및 보관

시료의 균 분리를 위해 두 가지 표면 살균법을 실시하였다. 시료를 1 cm 정도의 크기로 자른 다음 96% ethanol에 1분, 3.25% NaOCl에 3분간 담근 다음 다시 30초간 96% ethanol로 표면 살균을 하였다. 1차로 표면 살균한 시료를 다시 alcohol lamp를 이용하여 화염 살균하였다. 이렇게 표면 살균한 시료를 일반적으로 식물내생진균을 분리하는데 사용되어지는 배지인 50 µg/ml chloramphenicol (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)이 첨가된 cornmeal

malt yeast extract agar medium[17.0 g cornmeal agar (Becton and Dickinson Co., Sparks, Maryland, USA), 20.0 g malt extract(Becton and Dickinson Co.), 2.0 g yeast extract(Becton and Dickinson Co.), 1.0 l distilled water]에 치상하고, 25°C 항온조건 하에서 균 분리를 실시하였다. 분리한 균들은 다시 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA; Becton and Dickinson Co.) 상에서 단균사 분리를 실시하였으며, 분리한 187개의 균주들은 감자한천사면배지에 배양한 다음 실험에 사용하였다. 분리한 187개 균주의 장기간 보관을 위해 감자한천배지에서 7일 동안 배양된 균주 선단부를 떼어내 멸균 증류수와 6% dimethyl sulfoxide(DMSO) 용액에 넣은 다음 실온과 -70°C에서 각각 보관하였다.

생물활성을 위한 시료의 제작

분리한 187개 균주들의 여러 가지 생물활성을 조사하기 위하여 액체배양 및 고체배양을 실시하였다. 액체배양의 경우 멸균한 200 ml 감자즙액배지(potato dextrose broth; Becton and Dickinson Co.)에 감자한천배지에서 자라고 있는 균주의 선단부위를 cork borer(지름 8 mm)로 떼어낸 조각 4개씩을 접종한 다음 25°C, 150 rpm으로 10일간 진탕 배양하였다. 배양액을 10,000×g에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 액체배지 시료로 사용하였다. 고체배양의 경우에는 멸균한 쌀배지 200 g에 균사를 포함하고 있는 한천조각(지름 8 mm)을 4개씩 넣어 접종한 다음 25°C에서 28일간 배양하였다. 배양 후 600 ml methanol(MeOH)을 가하여 잘 마쇄한 후 30분간 진탕한 다음, Whatman No. 2(Whatman International Ltd., Maidstone, England) 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과액을 간압 농축한 후 다시 고체시료 10 g당 DMSO 1 ml 비율로 완전히 용해한 DMSO 용액을 생물활성을 위한 고체시료로 사용하였다.

In vivo 제조활성 검정

표면적 350 cm² 사각포트에 풍건 마쇄한 말토양을 일정량씩 담고 파종구를 만들어 준비된 잡초종자를 파종한 후 복토(0.5~1.0 cm)하였다(박 등, 2000). 잡초종자는 종류별로 휴면타파 및 보관방법이 다르지만 모두 발아력이 90% 이상인 것을 사용하였다. 수수(*Sorghum bicolor*), 돌피(*E. crus-galli*), 개밀(*Agropyron smithii*), 왕바랭이(*Digitaria sanguinalis*), 미국개기장(*Panicum dichotomiflorum*) 등 화분과 5종과 까미중(*Solanum nigrum*), 자귀풀(*Aeschynomene indica*), 어저귀(*Abutilon theophrasti*), 도꼬마리(*Xanthium strumarium*), 매꽃(*Calystegia japonica*) 등 광엽 5종을 포함하여 총 10가지 잡초를 사용하였다. 파종 10일 후에 액체배지 시료는 액체배양체 상층액의 원액 14 ml에 Tween 20을 1,000 µg/ml 수준으로 첨가한 다음 염면 살포하였고, 고체배지 시료는 Tween 20이 1,000 µg/

ml 수준으로 포함된 용액에 DMSO 추출액을 최종 농도 1%가 되도록 처리한 후, 온실(25±5°C)에서 14일 동안 식물체를 키운 다음 제조활성을 달관 조사하였다(Faust *et al.*, 1985). 한편 F0006 균주로부터 분리한 물질의 제조활성을 조사하기 위하여 MeOH에 용해한 후 MeOH의 최종 농도가 10%가 되도록 Tween 20 용액에 희석한 다음 식물체에 처리하였다. 처리한 물질의 최종농도는 500 µg/ml 과 100 µg/ml였다.

좁개구리밥을 이용한 제조활성 검증

24-well plate(Corning Co., New York, USA)의 각 well 에 시료를 포함한 Hutner 배지(400 mg K₂HPO₄, 200 mg KOH, 500 mg EDTA, 200 mg NH₄NO₃, 354 mg Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 500 mg MgSO₄ · 7H₂O, 24.9 mg FeSO₄ · 7H₂O, 17.9 mg MnCl₂ · 4H₂O, 65.9 mg ZnSO₄ · 7H₂O, 3.95 mg CuSO₄ · 5H₂O, 25.2 mg Na₂MoO₄ · 2H₂O, 14.2 mg H₃BO₃, 0.2 mg Co(NO₃)₂ · 6H₂O, 1.0 l distilled water)를 2 ml씩 4반복으로 가한 다음 계대 배양한 좁개구리밥 1개씩을 치상하였다. 액체배지 시료는 액체배지 상층액의 최종농도 5%가 되도록 처리하였고, 고체배지 시료의 경우에는 DMSO 추출액의 최종농도 0.32%가 되도록 처리하였다. 시료처리 후 30°C 항온실에서 5일간 배양한 다음 결과를 관찰하였다.

F0006 균주의 동정

10가지 발잡초에 대한 제조활성을 조사한 결과 흥미롭게도 F0006 균주의 액체배양체와 고체배양체의 추출물이 도꼬마리에 대해서만 선택적으로 제조활성을 보여 이 균주를 가지고 계속적인 연구를 진행하였다. 이 균주의 동정을 위하여 PDA 배지와 malt extract agar(MEA) 배지에서 14일간 배양한 후 콜로니의 성상, 분생자병 및 포자 등을 광학현미경하에서 관찰하였다. 균총의 색, 분생자병의 모양, 포자 색 및 포자 크기 등을 통하여 Domsch 등(1980)의 방법에 따라 종의 수준까지 동정하였다.

Gliocladium catenulatum F0006로부터 제조활성 물질의 분리

F0006의 동정 결과 *Gliocladium catenulatum*으로 동정되었다. *G. catenulatum* F0006 균주로부터 제조활성 물질을 분리하기 위하여 쌀고체배지 2 kg에 접종한 후 4주간 25°C에서 배양하였다. 고체배양체를 MeOH(6 l)로 추출한 후 감압농축하였다. 농축 후 최종 부피가 1 l가 되도록 증류수를 첨가한 다음 HCl을 가하여 pH를 2.0으로 조절하였다. 이 수용액층을 동량의 ethyl acetate(EtOAc)로 2회 추출한 후 EtOAc 추출물을 감압농축하였다(17.3 g). 추출물을 MeOH로 용해한 후 1/2에 해당하는 양을 Sephadex LH-20 resin(50 g)이 충전된 컬럼(3.2 cm×45 cm)에 가한 후에 MeOH로 용출하였다. 용출액을 fraction

collector를 이용하여 시험관당 12 ml씩 받은 후 박층크로마토그래피(thin-layer chromatography, TLC)분석을 실시하였다. TLC분석 및 도꼬마리에 대한 생물검정을 실시한 후 활성이 있는 분획만 모아서 감압농축하였다. 나머지 시료에 대해서도 동일한 방법으로 컬럼크로마토그래피를 수행하였다. 이렇게 하여 활성이 있는 F0006E1 분획(3.06 g)을 획득하였다. F0006E1시료를 다시 순화하기 위하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. 위에서 언급한 것과 동일한 컬럼과 용매를 사용하였으며, 이 과정을 통하여 활성이 있는 F0006E11 분획(380 mg)을 획득하였다. 최종적으로 제조활성물질을 순수하게 분리하기 위하여 Toyopearl HW-40F(250 g)이 충전된 컬럼(3.6 cm×60 cm)에 가한 후 MeOH로 용출하였다. 용출액을 fraction collector로 받은 후 TLC 분석을 실시하였다. 이 과정을 통하여 얻어진 물질(40 mg)의 최종적인 순화를 위하여 MeOH를 이용하여 재결정화를 실시하여 F0006 물질이라 명명된 침모양의 노란색 물질을 22.3 mg 획득하였다.

제조활성물질의 기기분석

분리된 물질의 구조를 규명하기 위하여 여러 가지 기기 분석을 실시하였다. 물질을 MeOH에 용해한 후 UV spectrum을 얻었고, electron impact (EI)-mass spectrum은 double-focusing high resolution mass spectrometer (JEOL JMS-DX303; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. Accelerating voltage는 10 kV였고, EI mass filament electron voltage는 70 eV였다. 한편 분자량을 확인하기 위하여 chemical ionization (CI)-mass spectrum을 얻었고, 이 때 분석가스로 methane을 사용하였으며, CI ion source pressure는 61 Pa였고, CI mass filament electron voltage는 40 eV였다.

결과 및 고찰

In vivo 제조활성

화분과 5종과 광엽 5종의 발 잡초를 이용한 *in vivo* 제조활성 검증에서 식물내생진균 187개 균주의 액체배지에서 1개(0.53%) 시료, 고체배지에서 3개(1.6%)의 시료가 공시한 10가지 잡초 중에서 한 가지 이상의 잡초에 대하여 70% 이상의 방제효과를 나타내었다(Table 1). 액체배지 시료에서는 소나무에서 분리한 F0006 균주가 도꼬마리에 대해서만 선택적으로 70%의 방제효과를 나타내었으며(Table 1 and Fig. 1), 고체배지 시료에서는 F0006 균주가 액체배지에서와 같이 도꼬마리에 대해서만 선택적으로 70%의 방제효과를 나타내었다(Table 1). 그리고 침에서 분리된 F0034 균주는 수수에 80%, 돌피에 대하여 70%, 왕바랭이에는 95% 및 미국개기장에 대해서는 100% 방제효과를 보여 제조활성이 큰 것으로 나타났다(Table 1). 그

Table 1. Liquid and solid cultures of endophytic fungi showing potent herbicidal activities against several weeds^a

Isolate	Source	Medium ^c	Herbicidal activity (%) ^b										
			SOR ^d	ECH	AGR	DIG	PAN	SOL	AES	ABU	XAN	CAL	
F0006	PD ^e	LM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0
F0006	PD	SM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0
F0034	PT	SM	80	70	30	95	100	40	40	20	40	40	30
F0043	PD	SM	40	30	20	60	70	0	0	0	0	0	0

^aThe weeds were treated with culture supernatants and the extracts of rice solid cultures of 187 endophytic fungi by foliar spraying.

^bEach data recorded 14 days after treatment and values presented as visual rating based on a scale of 0 (no control) to 100 (complete control).

^cLM, liquid medium; SM, solid medium.

^dSOR, *Sorghum bicolor*; ECH, *Echinochloa crus-galli*; AGR, *Agropyron smithii*; DIG, *Digitaria sanguinalis*; PAN, *Panicum dichotomiflorum*; SOL, *Solanum nigrum*; AES, *Aeschynomene indica*; ABU, *Abutilon theophrasti*; XAN, *Xanthium strumarium*; CAL, *Calystegia japonica*.

^ePD, *Pinus densiflora*; PT, *Pueraria thunbergiana*.



Fig. 1. Herbicidal activity of fungal isolate F0006. The arrows indicate *Xanthium strumarium* damaged severely by the culture supernatant.

리고 소나무에서 분리한 F0043 균주는 미국개기장 등 화본과 식물에 대해서만 제초활성을 보였다(Table 1).

동일 균주들을 대상으로 *in vivo* 항균활성을 조사한 결과, 항균활성을 보이는 균주들의 비율이 제초활성을 보이는 균주들의 비율보다 훨씬 높게 나타났다(Park *et al.*, 2003). 즉, 액체배양체의 경우 6가지 식물병 중에서 한 가지 이상의 식물병에 대하여 90% 이상의 항균활성을 보이는 균주가 20균주(11%)였고, 고체배양체 추출물의 경우에는 10균주(5.3%)였다. 이러한 경향은 각종 토양 및 식물체로부터 분리한 *Fusarium*속 균주들에서도 나타났다(박 등, 2000).

한편, 본 실험 결과 대부분의 천연물이나 미생물 배양 여액이 여러 가지 식물에 광범위하게 제초활성을 나타내는 것에 비하여 F0006 균주는 액체배지와 고체배지에 상관없이 실험한 10가지 식물들 중에서 도꼬마리에만 선택적으로 독성을 보이는 물질을 생성하는 것으로 나타나 매우 흥미로웠으며, 따라서 이 균주로부터 제초활성 물질을 분리를 실시하였다.

Table 2. Liquid cultures of endophytic fungi showing potent herbicidal activities against duckweeds^a

Isolate	Source	EC ₁₀₀ value (%) ^b
F0023	PT ^c	5.0
F0026	PT	2.5
F0031	PT	5.0
F0056	RP	5.0
F0098	LK	5.0
F0113	PT	5.0
F0139	EC	2.5
F0202	EC	5.0

^aEach duckweed was floated on Hutner's medium after treating with culture supernatants of 187 endophytic fungi isolates.

^b% concentration of the liquid culture supernatants of endophytic fungi in a Hutner's medium causing 100% inhibition of duckweed growth.

^cPT, *Pueraria thunbergiana*; RP, *Robinia pseudo-acacia*; LK, *Larix kaempferi*; EC, *Echinochloa crus-galli*.

좁개구리밥을 이용한 제초활성

식물내생진균 187개 균주의 액체배지 시료와 고체배지 시료의 좁개구리밥을 이용한 제초활성 검증결과 액체배지 시료에서는 액체 배양액 5% 이하 수준에서 총 8개(4.3%) 시료가 좁개구리밥의 생장을 100% 억제하였다(Table 2). 칩에서 분리한 F0026 균주와 피에서 분리한 F0139 균주는 2.5% 수준에서 좁개구리밥 생장을 완전히 억제하였다. 또한 칩에서 분리한 F0023 균주, F0031 균주 및 F0113 균주, 아카시아에서 분리한 F0056 균주, 싸리에서 분리한 F0098 균주, 피에서 분리한 F0139 균주 및 F0202 균주 등은 5% 수준에서 좁개구리밥의 생장을 100% 억제하였다.

고체배지 시료에서는 DMSO 추출액 0.1% 이하의 수준에서 12개(6.4%) 균주가 좁개구리밥의 생장을 100% 억제하였다(Table 3). 아카시아에서 분리한 F0056 균주는 DMSO 추출액 0.001% 농도에서, 그리고 은행나무에서 분리한 F0022 균주는 0.0032%, 아카시아에서 분리한 F0191 균주는 DMSO 추출액 0.032% 농도에서 좁개구리밥 생장을 완전히 억제하여 제초활성이 큰 것으로 나타

Table 3. Solid cultures of endophytic fungi showing potent herbicidal activities against duckweeds^a

Isolate	Source	EC ₁₀₀ value (%) ^b
F0022	GB ^c	0.0032
F0026	PT	0.10
F0034	PT	0.10
F0056	RP	0.0010
F0065	LB	0.10
F0109	AH	0.10
F0113	PT	0.10
F0114	PT	0.10
F0117	PK	0.01
F0153	GB	0.10
F0162	PT	0.10
F0191	RP	0.032

^aEach duckweed was floated on Hutner's medium after treating with the extracts of rice solid cultures of 187 endophytic fungi.

^b% concentration of DMSO solutions of the methanol extracts of rice solid cultures of endophytic fungi causing 100% inhibition of duckweed growth.

^cGB, *Ginkgo biloba*; PT, *Pueraria thunbergiana*; RP, *Robinia pseudo-acasia*; LB, *Lespedeza bicolor*; AH, *Abies holophylla*; PK, *Pinus koraiensis*.

났다.

공시한 10개의 발잡초에 대하여 효과가 우수하게 나타났던 시료들 중에서 F0006 시료는 좁개구리밥에 대하여 거의 활성이 없는 것으로 나타난 반면에 F0034 균주의 고체배양체 추출물의 경우에는 좁개구리밥에 대해서도 효과가 우수한 것으로 나타났다. 그러나 F0043 균주의 경우에는 고체배양체 추출물이 발잡초, 특히 미국개기장을 포함한 화분과 식물에 우수한 효과를 보였음에도 불구하고 좁개구리밥에는 효과가 낮은 것으로 나타났다.

액체배양체 가운데 좁개구리밥 생장을 억제하는데 높은 활성을 보인 8개의 균주들 중에서 F0026, F0056 및 F0113 등의 세 균주의 고체배양체 추출물은 좁개구리밥에 대해서 높은 활성을 보였지만 나머지 5개의 균주의 액체배양체의 경우에는 좁개구리밥에 대하여 높은 활성을 보이지 않았다. 이러한 결과는 많은 균주가 배지에 따라 생산하는 2차 대사산물의 양 및 종류가 다를 수 있다는

것을 나타낸다. 따라서 곰팡이를 포함한 미생물로부터 새로운 생리활성 물질을 탐색하는데 있어서 고체 배지와 액체 배지에 동시에 배양하여 스크리닝을 실시한다는 것은 신물질 탐색 가능성을 증가시킨다고 볼 수 있다.

F0006 균주의 동정

액체배지 시료 및 고체배지 추출물 시료 모두에서 도꼬마리에만 선택적으로 제초활성을 보인 F0006 균주를 대상으로 연구를 계속 진행하였다. F0006 균주는 균총 뒷면의 색이 PDA 배지에서는 노란색이었고, MEA 배지에서는 흰색이었으며, 두 가지 type의 conidiophore를 가지고 있었다(Fig. 2). Primary conidiophore는 *Verticillium* type이며(Fig. 2A), 그 중에서도 동일한 방향으로 phalide가 퍼지는 convergent type이 아닌 사방으로 퍼지는 divergent type이었다. 그리고 secondary conidiophore는 Fig. 2B에서와 같이 densely penicillate type이었다. 포자는 옅은 녹색이었고, 포자 크기는 $7.3 \times 4.7 \mu\text{m}$ 였다(Fig. 2C). 그리고 무색의 chlamydospore가 관찰되었다. 이상의 결과 F0006 균주는 *Gliocladium catenulatum*으로 동정되었다(Domsch *et al.*, 1980). *G. catenulatum*는 범세계적으로 널리 퍼져 있는 것으로 보고 되고 있으며, 주로 토양에서 자주 분리 되는데, 토양에 묻혀있는 식물 잔재에서 서식하는 것으로 알려져 있다. 또한 이 균은 mycoparasite로서 보고 되기도 하였는데, Joshi 등(1999)은 *Aspergillus flavus*의 mycoparasite라 보고하였다. 제초활성에 대하여 Domsch와 Gams (1968)는 *G. catenulatum*이 강낭콩, 밀 및 rape 유묘의 뿌리 신장을 크게 억제한다고 보고하였다.

G. catenulatum F0006 균주로부터 제초활성 물질의 분리 및 기기 분석

G. catenulatum F0006 균주의 쌀고체배양체(2 kg)로부터 MeOH 추출, EtOAc 추출, 2회에 걸친 Sephadex LH-20컬럼 및 1회의 Toyopearl HW-40 컬럼 등을 걸쳐 한 개의 노란색을 띠는 F0006 물질이라 명명된 한 개의 제초활성 물질을 순수하게 분리하였다. 이 물질을 MeOH에 용해한 후에 UV spectrum을 얻은 결과 UV maxima는



Fig. 2. Primary *Verticillium*-type (A), secondary penicillate type conidiophores (B), and spores (C) of *Gliocladium catenulatum* F0006. Bar represents 10 μm .

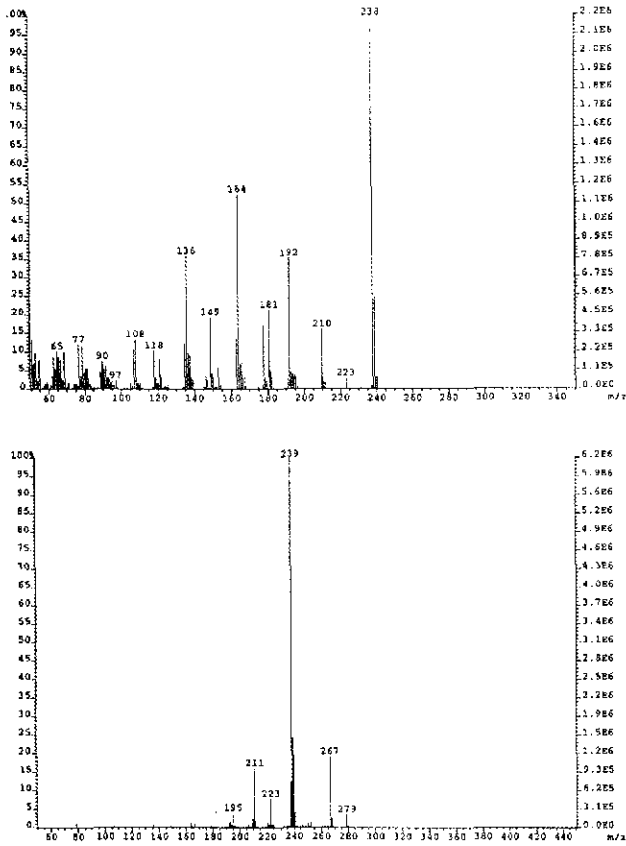


Fig. 3. Electron impact (top) and chemical ionization (bottom)-mass spectra of a phytotoxin purified from *Gliocladium catenulatum* F0006.

277.0 nm와 369.4 nm로 나타났다. 그리고 EI 질량분석을 실시한 결과 분자이온은 m/z 238에서 나타났고, 주요 fragment ion은 m/z 210, 192, 181, 164, 149, 136, 118 및 108 등이었다(Fig. 3). 분자량을 확인하기 위하여 CI 질량분석을 실시한 결과 $[M+1]^+$ ion이 m/z 239에서 나타났고, $[M+29]^+$ ion이 m/z 267에서 나타났고, $[M+41]^+$ ion이 m/z 279에서 나타나 분자량이 238 daltons임을 알 수 있었다(Fig. 3).

*Gliocladium*속 균은 tetracycline(Wong *et al.*, 1993), piperazines(Chu *et al.*, 1995), peptides(Huang *et al.*, 1995), sesquiterpene(Itoh *et al.*, 1980), polyprenols(Joshi *et al.*, 1999; Nishida *et al.*, 1992; Tomoda *et al.*, 1992) 및 polyketides(Kohno *et al.*, 1999) 등의 다양한 구조의 이차대사산물을 생산하는 것으로 보고 되고 있어 생물농약 개발이나 신물질 탐색에 많이 이용되고 있는 곰팡이다. 현재까지 *G. catenulatum*이 생산하는 것으로 알려진 활성 물질에는 verticillin(Joshi *et al.*, 1999), glisprenin(Joshi *et al.*, 1999), anthrotainin(Wong *et al.*, 1993) 등이 알려져 있는데, 질량분석 및 여러 가지 화합물의 성질을 비교할 때 F0006 물질은 이들 물질들과는 다른 물질이기 때문에 신물질일 가능성이 높다고 추정된다.

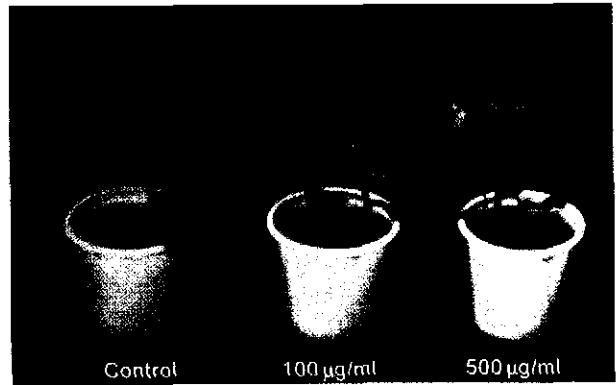


Fig. 4. Herbicidal activity of a phytotoxin purified from *Gliocladium catenulatum* F0006 against *Xanthium strumarium*.

F0006 물질의 제초활성

분리한 F0006 물질을 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 도꼬마리를 포함한 10가지 식물체 유묘에 처리한 결과 도꼬마리를 제외한 나머지 식물체에 대해서는 전혀 활성을 보이지 않았다(데이터 미제시). 그러나 Fig. 4에서와 같이 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 도꼬마리를 완전히 고사시켰고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 85% 고사효과를 나타내었다. 제초 증상으로서 는 처리 후 잎이 신속히 위조 괴사한 후 결국 생장이 억제되는 특징을 보였다. 이와 같이 F0006 물질은 도꼬마리에 대해서만 특이적으로 제초활성을 보였다. 일반적으로 제초제의 경우 광엽식물에 효과가 있는 약제는 대부분의 광엽식물에 대해서 광범위하게 약효를 보이는데 반하여 F0006 물질이 도꼬마리에 대해서만 선택적인 활성을 보 인다는 것은 선택적 제초제 개발에 매우 유용하게 이용될 가능성이 있음을 보여준다. 특히 이 물질의 구조가 결정 되면 직접적으로 신제초제 개발에 선도물질로 이용될 수도 있고, 또한 이 물질의 작용기작을 규명한 후 새로운 생물검정법을 개발하여 보다 구조가 간단하면서도 효과가 우수한 물질을 선발하는데 기여할 수도 있다.

적 요

새로운 제초제 개발을 위한 선도물질을 발견하고자 본 연구를 실시하였다. 국내에 8개 지역으로부터 채취한 11개 자생식물로부터 총 187개의 식물내생곰팡이를 분리한 후 감자즙액배지와 쌀고체배지에 배양한 다음, 발잡초와 쯤개구리밥에 대한 제초활성을 조사하였다. 그 결과, 소나무에서 분리한 *Gliocladium catenulatum* F0006 균주의 액체배지와 고체배지 추출물이 실험에 사용한 10개의 발잡초 중에서 도꼬마리에 대해서만 선택적으로 70%의 제초활성을 보였다. 쯤에서 분리한 F0034 균주의 고체배지 추출물은 10가지 발잡초 모두에 20%에서 100%까지의 제초활성을 보였는데, 특히 수수, 돌피, 왕바랭이 및 미국

개기장 등이 민감하게 반응하였다. 그리고, 소나무에서 분리한 F0043 균주의 고체배지 추출물은 5가지 화분과 식물에 대해서만 20%에서 70%까지의 제초활성을 보였다. 한편, 좁개주리밥에 대한 실험 결과, 액체배지는 8개 균주가 배지농도 5% 이하의 농도에서, 고체배지 추출물에서는 12개 균주가 좁개리밥의 생장을 100% 억제하는 높은 활성을 보였다. *G. catenulatum* F0006 균주의 고체배양체로부터 반복적인 컬럼과정과 생물검정을 통하여 한 개의 제초활성 물질을 분리하였다. 이 물질은 도꼬마리에 대해서만 특이적으로 제초활성을 보였는데, 500 µg/ml에서는 완전히 치사시켰고, 100 µg/ml에서는 도꼬마리 생장을 85% 억제하였다. 분리한 물질의 분자량은 238 daltons 이었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 것이기에 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- 박중협, 김진철, 최경자, 김홍태, 홍경식, 송철, 김진석, 김정규, 조광연. 2000. 토양 및 식물체로부터 분리한 *Fusarium*속 균주들의 생물활성. *한국농약과학회지* 4(3): 19-26.
- Ames, B. N. 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204: 587-593.
- Baker, C. J., Stavely, C. A., Thomas, M., Sasser, M. and MacFall, J. S. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology* 73: 1148-1152.
- Belanger, R. R. and Labbe, C. 2002. Control of powdery mildews without chemicals: prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. pp. 256-267. In: Belanger, R. R., Bushnell, W. R., Dik, A. J. and Carver, T. L. W. Eds. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Chu, M., Truumees, I., Rothofsky, M. L., Patel, M. G., Gentile, F., Das, P. R., Puar, M. S. and Lin, S. L. 1995. Inhibition of c-fos proto-oncogene induction by Sch 52900 and Sch 52901, novel diketopiperazine produced by *Gliocladium* sp. *J. Antibiot.* 48: 1440-1445.
- Copping, L. G. and Menn, J. J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag. Sci.* 56: 651-676.
- Domsch, K. H. and Gams, W. 1968. Die bedeutung vorfruchtbaengiger verschiebungen in der bodenmikroflora. 1. Der einfluss von bodenpilzen auf die wurzelentwicklung von weizen, erbsen und raps. *Phytopath. Z.* 63: 64-74.
- _____, _____ and Anderson, T.-H. 1980. *Gliocladium corda* 1840. pp. 369-377. In: *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London, UK.
- Faust, W. 1985. Important weeds of the world (Scientific and Common Names and WSSA/WSSJ Approved Computer Codes), The Agrochemical Division of Bayer AG, Leverkusen, Germany.
- Huang, Q., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Nishi, A., Tubaki, K. and Tanaka, K. 1995. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. II. Metabolites of *Trichoderma koningii*. *Chem. Pharm. Bull.* 43: 223-229.
- Istvan, U. 2002. Transforming natural products into natural pesticides-experience and expectations. *Phytoparasitica* 30: 439-442.
- Itoh, Y., Kodama, K., Furuya, K., Takahashi, S., Haneguchi, Y. and Arai, M. 1980. A new sesquiterpene antibiotic, heptelic acid producing organisms, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* 33: 468-473.
- Joshi, B. K., Gloer, J. B. and Wicklow, D. T. 1999. Novel verticillin and glisoprenin analogues from *Gliocladium catenulatum*, a mycoparasite of *Aspergillus flavus* sclerotia. *J. Nat. Prod.* 62: 730-733.
- Katz, E. and Demain, A. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41: 449-475.
- Kim, H.-J., Kim, J.-C., Kim, B. S., Kim, H. K. and Cho, K. Y. 1999. Antibiotic and phytotoxic activities of ophiobolins from *Helminthosporium* species. *Plant Pathol. J.* 15: 14-20.
- Kim, J.-C., Choi, G. J., Park, J.-H., Kim, H.-T. and Cho, K. Y. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* 57: 554-559.
- Kiss, L. 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Manag. Sci.* 59: 475-483.
- Kohno, J., Nishio, M., Sakurai, M., Kawano, K., Hiramatsu, H., Kameda, N., Nishi, N., Yanashita, T., Okuda, T. and Komatsubara, S. 1999. Isolation and structure determination of TMC-151s: novel polyketide antibiotics from *Gliocladium catenulatum* Gilman & Abbott TC 1280. *Tetrahedron* 55: 7771-7786.
- Lange, L., Breinholt, J., Rasmussen, F. W. and Nielson, R. I. 1993. Microbial fungicides-the natural choice. *Pestic. Sci.* 39: 155-160.
- Lee, J. C., Lobkovsky, E., Pliam, N. B., Stroble, G. A. and Clardy, J. 1995. Subglutinol A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *J. Org. Chem.* 60: 7076-7077.
- Nishida, H., Huang, X. H., Nishida, H., Masuma, R., Kim, Y. K. and Omura, S. 1992. Glisoprenins, new inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Gliocladium* sp. FO-1513. II. structure elucidation of glisoprenins A and B. *J. Antibiot.* 45: 1202-1206.
- Park, J.-H., Park, J. H., Choi, G. J., Lee S.-W., Jang, K. S., Choi, Y. H., Cho, K. Y. and Kim, J.-C. 2003. Screening for antifungal endophytic fungi against six plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 31: 179-182.
- Porter, N. and Fox, F. M. 1993. Diversity of microbial products-discovery and application. *Pestic. Sci.* 39: 161-168.
- Powel, K. A. and Justsum, A. R. 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pestic. Sci.* 37: 315-321.
- Sinclair, J. B. and Cerkaskas, R. F. 1997. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. pp. 3-29. In: Redlin, S. C. and Carris, L. M. Eds. *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants-Systematics, Ecology, and Evolution*. APS Press, St. Paul, M.N., U.S.A.
- Staub, T. and Sozzi, D. 1984. Fungicide resistance: a continuing challenge. *Plant Dis.* 68: 1026-1031.
- Stierle, A., Strobel, G. A. and Stierle, D. 1993. Taxol and taxane

- production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungi of Pacific yew. *Science* **260**: 214-216.
- Stroble, G. A. and Hess, W. M. 1997. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. *Chem. Biol.* **4**: 529-536.
- Tomoda, H., Huang, X. H., Nishida, H., Masuma, R., Kim, Y. K. and Omura, S. 1992. Glisoprenins, new inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Gliocladium* sp. FO-1513. I. Production, isolation and physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **45**: 1202-1206.
- Wang, J., Li, G., Zheng, H., Huang, Y. and Su, W. 2000. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**: 249-253.
- Wong, S.-M., Kullnig, R., Dedinas, J., Appell, K. C., Kydd, G. C., Gillum, A. M. and Cooper, R. 1993. Anthrotainin, an inhibitor of substance P binding produced by *Gliocladium catenulatum*. *J. Antibiot.* **46**: 214-221.