

생강나무와 산앵두나무의 뿌리에서 분리한 *Penicillium* spp.의 지베렐린 생산성

최화열 · 이진형 · 신기선¹ · 이인중² · 이인구³ · 김종국*

경북대학교 미생물학과, ¹한국생명공학연구원, ²경북대학교 농학과, ³경북대학교 농화학과

Isolation of Gibberellin-producing *Penicillium* spp. from the Root of *Lindera obtusiloba* and *Vaccinium koreanum*

Wha-Youl Choi, Kee-Sun Shin¹, In-Jung Lee², In-Koo Rhee³, Jin-Hyung Lee and Jong-Guk Kim*

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

²Department of Agronomy, ³Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

(Received November 14, 2003)

ABSTRACT: The gibberellins (GAs) play important roles in plant growth and development. Twenty three fungi were isolated from the roots of *Lindera obtusiloba* and *Vaccinium koreanum*. The numbers of GA-producing fungi were six strains from *Lindera obtusiloba* and four strains from *Vaccinium koreanum*. The fungi with GAs-producing activity were incubated for seven days in 40 ml of Czapek's liquid medium at 25°C, 120 rpm, and the amount of each GA in the medium was measured by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) to determine the productivity of GAs. *Penicillium griseofulvum* KNU5379 produced more GA in case of GA₃ than *Neurospora crassa* known as a GAs-producing fungus. *P. griseofulvum* KNU5379 was shown to produce GA₁ 9.79 ng, GA₃ 133.58 ng, GA₄ 2.46 ng, GA₇ 7.80 ng and GA₅₃ 0.73 ng in 25 ml of liquid medium. Bioassay using culture fluid of GAs-production fungi was performed on rice sprout.

KEYWORDS: Bioassay, Gibberellins

Gibberellins(GAs)은 diterpenoid 복합체로서, 녹색식물과 곰팡이 그리고 세균에 의해서 생산되며(B. Tudzynski, 1999) 식물의 성장과 종자의 발아, 줄기의 신장, 잎의 성장, 개화촉진 그리고 과육의 성숙을 조절한다고 알려져 있다(Olszewski et al., 2002; Rademacher, 1997). 1935년 Yabuta에 의해 벼가 웃자라는 벼키다리병(bakanae disease)의 원인이 되는 균인 *Gibberella fujikuroi*가 분리되었으며, GAs는 이균이 생산하는 이차대사산물이다(Heedden, 1999). 지금까지 130종류의 GAs가 있다고 알려져 있으며, 그 중에서 GA₁, GA₃, GA₄ 그리고 GA₇이 생화학적으로 활성이 높은 것으로 알려져 있다(Hedden and Phillips, 2000; Kobayashi, 2000). 이러한 GAs는 상업적으로 널리 이용되는데 대부분이 GA₃이며 포도 종자의 성장과 감귤류의 외피를 부드럽게 하고 과피의 상태를 좋은 상태로 유지하여 노화를 억제하며 해충 및 다른 환경요소들로부터의 훼손을 막아 상품성을 높이기도 한다. 특히, 사과에서는 외피의 적갈색 반점들을 조절하여 품미를 향상시키고, 일반적으로 꽃이 피지 않는 계절에 꽃의 개화를 유도하여 장식용으로도 이용되고 있다. 때때로 몇몇 식물에서는 종종

개화에 문제가 있을 수도 있는데 이러한 경우에도 GAs가 적용되고 있다(Mander, 2003). GAs를 생산한다고 알려져 있는 균으로는 *G. fujikuroi*(Avalos et al., 1997; Tudzynski, 1999)를 비롯하여 *Spaceloma manihoticola* (Rademacher and Graebe, 1979; Rossen Rochev et al., 1997), *Neurospora crassa*(Kawanabe et al., 1983), *Phaeosphaeria* sp. L487 (Sassa et al., 1989; Kawaide and Sassa, 1993) 등이 있으나 아직까지 상업적으로 이용되는 균은 *G. fujikuroi* 외에는 별로 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 농업과 원예분야에 매우 유용한 GAs를 생산하는 새로운 미생물을 탐색하기 위하여 생강나무와 산앵두나무의 뿌리에서 GAs 생산균을 분리·동정하였으며, 여러 종류의 GAs 중 활성이 있다고 알려진 GA₁, GA₃, GA₄와 GA₇ 그리고 GA₅₃의 생산량을 분석하였다.

재료 및 방법

시험균주 및 식물시료

본 연구에 사용된 미생물은 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 분양 받은 *Gibberella fujikuroi*(KCCM 12329), *Neurospora crassa*(KCCM 60460) 등을 실험 균주로 사

*Corresponding author <E-mail: kimjg@kyungpook.ac.kr>



(A)



(B)

Fig. 1. *Lindera obtusiloba* (A) and *Vaccinium koreanum* (B) used for isolation of GAs-producing fungi.

용하였다. 사용된 생강나무(*Lindera obtusiloba*)와 산앵두나무(*Vaccinium koreanum*)들은 경남 함천군에 위치한 가야산에서 채집된 5년 이하의 어린 나무들을 사용하였으며 채집한 시료는 비닐 팩에 담아 4°C에서 보관하며 연구재료로 사용하였다(Fig. 1).

균 분리

식물뿌리로부터 곰팡이의 분리는 Bayman 등의 방법을 응용하였는데 우선 나무의 뿌리부분을 절단한 후 흐르는 물에서 뿌리에 있는 흙을 모두 제거한 뒤 계면활성제인 Tween 80을 5분간 처리하여 교반시킨 후 증류수로 세척하였다. 표백제인 perchloric acid(1%)에 뿌리를 완전히 침전시킨 후 5분간씩 2회 살균한 뒤 멸균수로 3회 세척하고, 멸균된 가위를 이용하여 1.5 cm 정도로 절단한 후 멸균 종이 위에서 물기를 완전히 제거한 뒤 Hagem 배지를 이용하여 24°C에서 배양하며, 사상균을 순수분리하였다(Bayman *et al.*, 1997).

배지 및 배양조건

균의 증식에는 Hagem(0.5% glucose, 0.05% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% NH_4Cl , 0.5 ml of FeCl_3 ,

streptomycine 80 ppm, 1.5% agar, pH 5.6) 배지에서 배양하였으며, GAs의 활성을 측정하기 위해 100 ml의 플라스크를 이용하여 40 ml의 Czapek's(1% glucose, 1% Bacto-peptone, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% KCl , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.3 ± 0.2) 액체배지를 이용하여 25°C에서 120 rpm으로 7일 동안 배양하였다.

GAs 생산성측정

GAs 농도의 측정은 Holbrook 등(1961)이 개발한 산성 조건에서 gibberellic acid를 gibberellenic acid로 전환시켜 254 nm에서 흡광도를 측정하는 spectrophotometric method을 이용하여 측정하였다.

GAs 분석

내생 gibberellins의 추출: GAs의 추출방법은 Lee 등(1998)의 방법을 이용하였다. 7일 동안 미생물을 배양한 후 배양액을 membrane filter로 여과시킨 후 6 N HCl을 이용하여 pH를 2.5로 조절하며, 내부표준물질로는 20 ng의 [$^{17,17-^3}\text{H}_2$] GA_1 , GA_3 , GA_4 , GA_7 그리고 GA_{33} 을 추출하기전 배양액에 첨가하였다. 배양액에 동일한 양의 ethyl acetate를 첨가하여 3개로 나눈 후 ethyl acetate를 휘발시키고 60% methanol로 희석한 후 2 N NH_4OH 로 pH를 8.3으로 조정하였다. 시료는 C_{18} column(90–130 μm , 60 Å pore size, Altech)을 통과시킨 후 감압농축하였다. 농축된 잔사는 Celite/ SiO_2 column(용매 formic acid로 포화된 ethyl acetate : hexane=95 : 5)으로 통과시킨 여액을 감압농축하여 인산완충용액(pH 8.0)에 녹인 다음 2 N NaOH로 pH를 8–9로 조정하고 인산완충용액을 이용하여 3회 분획한뒤 여액(인산완충용액)에 PVPP를 가하여 1시간 동안 진탕하였다. 여과한 여액의 pH를 6 N HCl을 이용하여 2.5로 조정한 후 ethyl acetate로 3회 분획한 후 감압농축하였다. 농축한 잔사를 methanol에 용해시켜 0.2 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC용 분석 시료로 사용하였다.

High-performance liquid chromatography(HPLC) 분석: HPLC column은 μ Bondapak C_{18} column(3.9×300 mm)을 사용하였으며 각 GA는 1% acetic acid를 포함한 28% methanol과 100% methanol 용액의 농도구배로 분리하였다. 유속은 분당 1.5 ml로 유지하였으며 1.5 ml씩 총 50분획으로 나누었다. 각 GA의 정확한 머무름 시간은 각 분획당 소량(15 μl)을 취하여 liquid scintillation spectrometry를 이용(Beckman, 1801)하여 ^3H -GA 표준물질의 유무를 확인하여 결정하였다.

Gas Chromatography/Mass Spectrometer(GC-MS) 분석: 건조시킨 각각의 GA 분획들을 100% methanol에 용해시킨 후 동일 GA를 포함한 분획을 합하여 1 ml의 reaction vial로 옮긴 후 40°C에서 질소가스로 건조시켰다. GA 분획 중 불순물을 많이 함유한 분획은 NH_2 PreSep

extraction cartridge를 사용하여 GA의 불순물을 제거한 후 reaction vial로 옮겼다. 각 GA는 2차례 ethereal diazomethane으로 methyl ester로 유도한 후 질소가스로 건조하였다. Silylation이 필요한 GA는 35 μ l의 pyridine과 35 μ l의 *N, D*-Bis(trimethyl silyl)-trifluoroacetamide(1% TMCS 포함)로 65°C에서 30분간 반응시킨 후 질소가스로 건조하였다. 시료는 무수 dichloromethane으로 녹인 후 1 μ l를 30 m \times 0.25 mm(i.d.), 0.25 μ m film thickness HP-1 Capillary Column(J & W)이 장착된 GC-MS에 주입하였다.

내부 GAs의 정량: 5973 Network Mass Selective Detector(Hewlett Packard)가 부착된 GC-MS를 사용하였으며 Data는 HP5970C Chemstation(Hewlett Packard)을 사용하여 처리하였다. 정성과 정량분석을 위해 Hydrocarbon standard를 이용하여 KRI값을 구하였으며, 각 GA와 [²H₂]GA internal standards(obtained from Prof. Lewis N. Mander, Australian National University, Canberra, Australia)의 3개의 주요 ion mass를 비교하여 정량하였다.

미생물의 동정

배양된 균체로부터 DNA를 분리하여 Internal Transcribed Spacer 영역을 증폭하였다. PCR로 증폭한 단편들은 QIAquick PCR purification kit(Qiagen Inc., Germany)를 사용하여 정제하였고 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(PE Biosystems, USA)를 사용하여 sequencing 반응을 수행하였으며, 생산된 DNA 단편들은 ABI 310 DNA sequencer(PERKIN ELMER, New Jersey, USA)를 사용하여 분석하였다. ITS 영역의 PCR 증폭 및 염기서열 분석반응을 위해 사용한 primer는 ITS1(forward)과 ITS4(reverse)였으며 염기배열은 다음과 같다.

ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'

ITS4: 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'

Bioassay

크기가 일정한 Waito-c(난쟁이 벼씨) 벼씨를 선별한 후 종자살균제인 '스포탁'으로 종자를 살균하였다. 이때 성장억제제인 'Uniconazol'을 20 ppm의 농도로 함께 처리하고 24시간 살균한 후 증류수로 종자에 남아 있는 살균제를 완전히 세척하였다. 세척한 종자를 증류수에 5일 동안 침전시켜 일정하게 발아한 종자를 선별하여 0.8% water agar(WA)에 파종을 하고 30°C에서 배양하며, 2 엽기에 GAs를 생산하는 미생물배양액을 처리하고 7일 동안 배양하였다. 실험결과와 통계처리는 SAS(statistical analysis system) program을 이용하여 평균값과 표준편차를 구하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

생강나무와 산앵두나무의 뿌리로부터 모두 23종의 사

Table 1. Isolation of GAs-producing fungi from *Lindera obtusiloba* and *Vaccinium koreanum*

Source of plant	No. of fungi isolated	No. of GAs-producing fungi
<i>Lindera obtusiloba</i>	16	6
<i>Vaccinium koreanum</i>	7	4

상균을 분리하였으며, 분리한 균주에 대해 GAs 생산 활성에 대하여 조사를 하였다. 생강나무에서는 16균주 중 6종이, 산앵두나무에서는 7종의 균주 중 4종의 균주가 GAs를 생산하는 것을 확인하였다(Table 1).

GAs 생산균의 선별

생강나무와 산앵두나무에서 분리한 GAs 생성 균주의 GAs 생성력을 조사하기 위해 GAs의 분석은 1차적으로 Holbrook 등이 기술한 Spectrophotometric method를 사용하여 GA₃의 생산력을 조사하였다. GA₃ 분석결과 생강나무에서는 C01 균주가 0.55 mg/ml, C02 균주가 1.38 mg/ml, C03 균주가 6.08 mg/ml, C06 균주가 1.00 mg/ml, C07 균주가 0.98 mg/ml 그리고 C08 균주가 0.26 mg/ml을 생산하였으며, 그 중에서 C03 균주가 GA₃를 가장 많이 생산하였다. 산앵두나무에서는 E01 균주가 1.80 mg/ml, E02 균주가 0.52 mg/ml, E03 균주가 2.26 mg/ml 그리고 E04 균주가 0.2 mg/ml을 생산하였고, 그 중에서 GA₃를 가장 많이 생산하는 미생물이 E03 균주인 것을 확인하였다(Fig. 2).

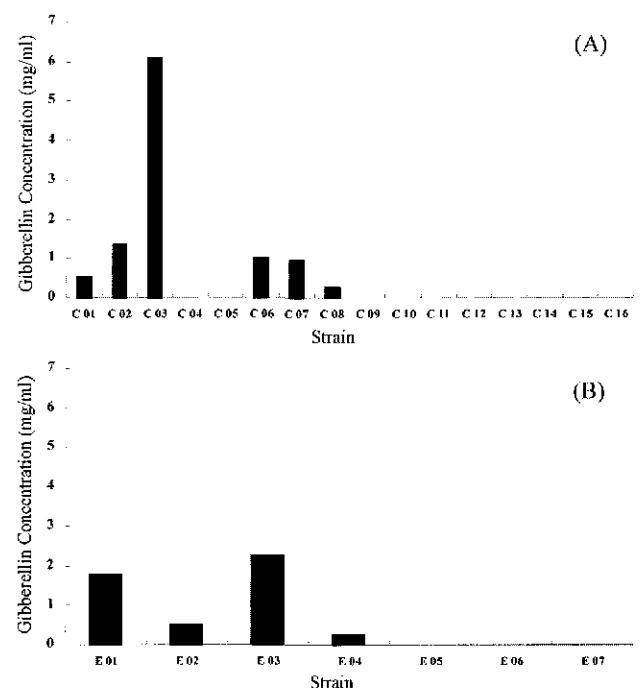


Fig. 2. Isolation of GA-producing fungi from the roots of *Lindera obtusiloba* (A) and *Vaccinium koreanum* (B). GA₃ productivity was determined by the method described by Holbrook *et al.* (1961).

(A)

GGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTGTTTATTACCTTGTGCTTCGGGGGGC
 CGGCCTAACTGGCCGCGGGGGGCTCACGCCCGGGCCCGCCGCGCCGAAGACAC
 CCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAATATAAATTATTAAAAAC
 TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAGCAGGAAATGCGAT
 ACGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCG
 CCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCGTGTCCGAGCGTCATTGCTGCGCTGAAGCAGG
 CTGTGTGTGGGGCCCCGCTCCGATTCCGGGGGACGGGGCCGAAAGGCAGGGGG
 GCACCGCTCCGGTCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCGGCTCTGTAGGGCCGGN
 CGGGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCANGTTCACCTGGATC

(B)

AACTCCACCCGTTTATTACCTTGTGCTTCGGGGGGCCCGCTTAACTGCC
 GCGGGGGGCTCACGCCCGGGCCCGCCGCGCCGAAGACACCTCGAATCTGTCT
 GAAGATTGTAGTCTGAGTGAATAATAAATTATTAAAACTTCAACAACGGATC
 TCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAGCAGGAAATGCGATACGTAATGTGAATTG
 CAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTCGCGCCCTGGTATTCCGG
 GGGCATGCGTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCAGGCTGTGTGTGGGCC
 CGTCTCCGATTCCGGGGGACGGGGCCGAAAGGCAGCGGGCACCCTCCGGTCC
 TCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCGGCTCTGTAGGGCCGGGGCTTTCGCGATCA
 ACCAAATTTTATCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAACCTTA
 AGCATATCAATAAGC

Fig. 3. Nucleotide sequence of ITS region of strain C03 (A) and strain E03 (B). These sequences showed 99% nucleotide identities to the ITS region of *Penicillium urticae* (A) and *P. griseofulvum* (B), respectively.

균주의 동정

GA₃를 가장 많이 생산하는 생강나무에서 분리한 C03 균주와 산앵두나무에서 분리한 E03 균주에 대하여 ITS의 염기서열을 분석하여 동정한 결과 C03 균주는 *Penicillium urticae*, E03 균주는 *P. griseofulvum*과 매우 근연균임이 확인되었으므로, 각각 *P. urticae* KNUC03, *P. griseo-*

fulvum KNUE03이라 명명하였다(Fig. 3).

GA_s 분석

Spectrophotometric method로 활성이 가장 높은 *P. urticae* KNUC03과 *P. griseofulvum* KNUE03에 대하여 여러 GA_s 중 생물학적 활성이 높다고 알려진 GA₁, GA₃, GA₄와 GA₇ 그리고 GA₅₃에 대하여 GC-MS로 분석하였다(Fig. 4). 분석결과 생강나무에서 분리한 *P. urticae* KNUC03은 배양액 25 ml당 GA₁ 7.08 ng, GA₃ 30.80 ng, GA₄ 1.27 ng, GA₇ 0.88 ng 그리고 GA₅₃ 0.13 ng을 생산하였으며, 산앵두나무에서 분리한 *P. griseofulvum* KNUE03은 GA₁ 9.79 ng, GA₃ 133.58 ng, GA₄ 2.64 ng, GA₇ 7.80 ng 및 GA₅₃ 0.73 ng을 생산하였다(Table 2). GA_s 생산균주의 선별시 사용한 spectrophotometric method에서는 *P. urticae* KNUC03이 *P. griseofulvum* KNUE03에 비해 GA_s를 높게 생산한다는 결과가 나왔으나 GC-MS를 이용하여 분석해본 결과 이와는 반대로 전반적인 GA_s 생산에 있어서 *P. griseofulvum* KNUE03의 생산성이 높다는 것을 알 수 있었다. 이러한 이유는 아마도 산성조건에서 gibberellic acid를 gibberellenic acid로 전환시켜 254 nm에서 흡광도를 측정하는 Holbrook 방법은 GA_s 외에 구조적으로 유사한 다른 화합물들이 측정에 영향을 미쳤기 때문이라 생각된다. 기존에 알려진 여러 GA_s 생산균주들과 GA_s의 생산량을 비교해 보기 위해 GA_s를 가장 많이 생

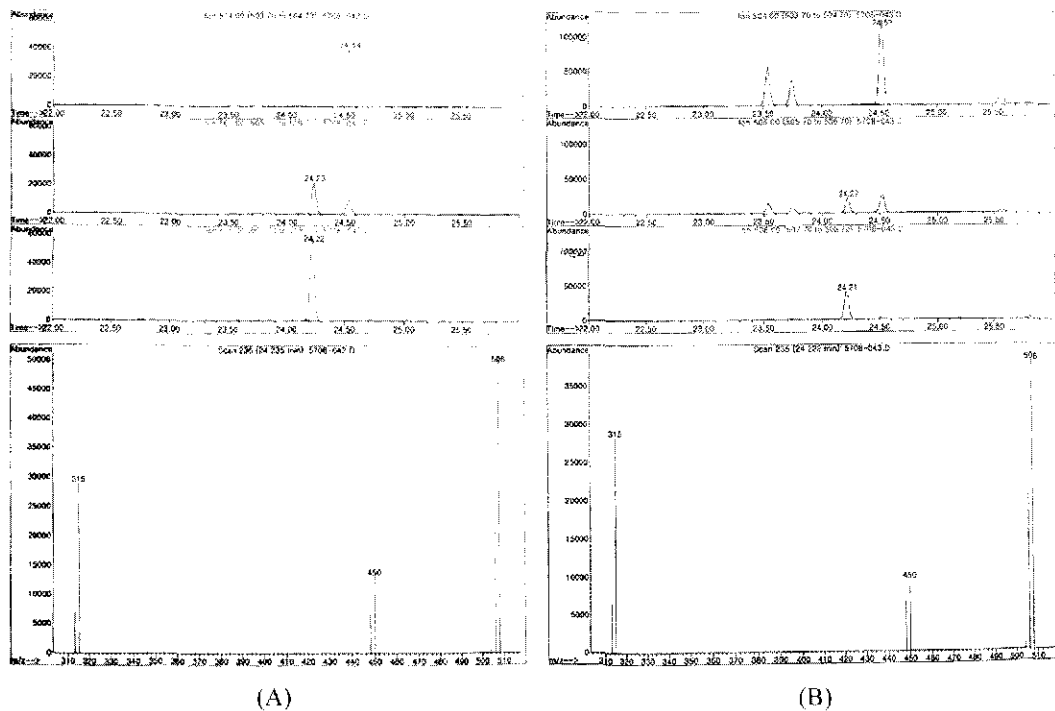


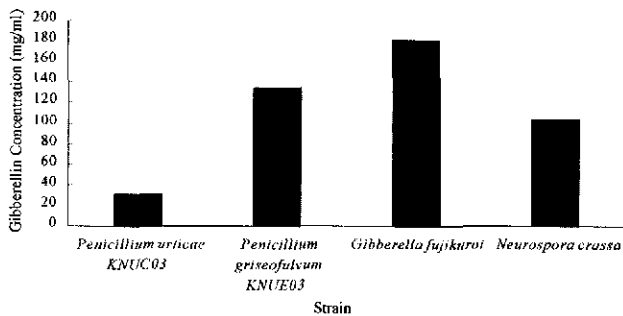
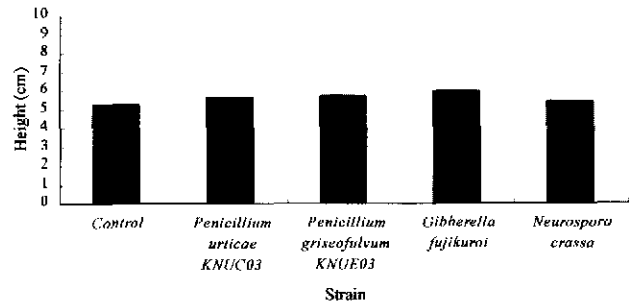
Fig. 4. GC-MS analysis of culture filtrates of the *Penicillium urticae* KNUC03 (A) and *P. griseofulvum* KNUE03 (B). Quantification of gibberellin was based on the peak area ratios of endogenous to deuterated GA_s, after correcting for any contribution from the deuterated standard to non-deuterated GA. The endogenous contents of GA₁ and GA₃ were calculated from the peak area ratios of 506/508 and 504/506, respectively.

Table 2. GAs productivity of *Penicillium urticae* KNUC03 and *P. griseofulvum* KNUE03 determined by GC-MS

Strain	GA ₁	GA ₃	GA ₄	GA ₇	GA ₅₃
<i>P. urticae</i> KNUC03	7.08*	30.80	1.27	0.88	0.13
<i>P. griseofulvum</i> KNUE03	9.79	133.58	2.64	7.80	0.73

*ng/25 ml.

산한다고 알려진 *Gibberella fujikuroi*, 그리고 *Neurospora crassa*와 생강나무에서 분리한 *P. urticae* KNUC03 그리고 산앵두나무에서 분리한 *P. griseofulvum* KNUE03의 4종류의 균주에 대하여 상업적으로 가장 많이 이용되는 GA₃에 대한 생산량을 분석하였다. 분석결과 배양액 25 ml 중 *P. urticae* KNUC03 균주가 30.80ng, *P. griseofulvum* KNUE03 균주가 133.58 ng, *G. fujikuroi*가 180.69 ng, *N. crassa*가 103.28 ng을 생산하는 것을 확인하였다(Fig. 5). 특히, 산앵두나무에서 분리한 *P. griseofulvum* KNUE03은 *G. fujikuroi* 보다는 적지만 *N. crassa* 보다는 많은 양의 GA₃를 생산하는 것으로 나타났다. GAs의 생산에 있어서 중요한 요소로 작용하는 것으로 영양원으로는 질소원과 탄소원이 있으며, 환경적 요인으로는 균주의 배양시간, 온도, pH 그리고 배양속도 등이 있다. 우선 질소원인 Nitrogen은 GAs의 생산의 양과 질에 있어서 중요한 영향을 미치며(Tudzynski, 1999), 배양액에서는 GAs의 생산을 저해한다고 알려져 있다(Borrow et al., 1964). 야생의 *G. fujikuroi* IM158289와 다른 균주들은 질소원을 소모하기 전에는 GAs를 생산하지 않았으며(Borrow et al., 1964; Candau et al., 1992), 질소원을 다 소모한 후에 GAs를 생산한다고 보고되었다(Tudzynski, 1999). 또한 탄소원인 glucose는 높은 농도에서 GAs 생산에 저해제로 작용한다고 보고되었고(Borrow et al., 1964), GAs 생산에 있어서 최적조건은 배양 시간 6~8일, pH는 4.0, 교반속도는 400 rpm이라고 보고되었다(Bruckner et al., 1991; 이 등, 1983). 지금까지 보고된 GAs 생산량에 비하여 GAs의 양이 적은 이유는 아마도 이러한 최적조건으로 배양을 수행하지 않았기 때문이라

**Fig. 5.** GA₃ production of *Penicillium urticae* KNUC03, *P. griseofulvum* KNUE03, wild-type *Gibberella fujikuroi* and wild-type *Neurospora crassa* grown in Czapek's liquid medium for 7 days in the dark at 30°C.**Fig. 6.** Bioassay of rice sprout using culture filtrates of GA-producing fungi. The GA-producing fungi were incubated for 7 days in Czapek's liquid medium in the dark at 30°C. Waito-c rice seeds were treated with culture filtrate of fungi.

생각된다.

Bioassay

Czapek's 배지에서 30°C, 7일 동안 배양한 *P. urticae* KNUC03, *P. griseofulvum* KNUE03, wild-type *G. fujikuroi*, wild-type *N. crassa* 균주의 배양액을 Waito-c 볍씨에 처리하여 줄기 신장의 정도를 측정하였다. 무처리에 비하여 모두 Waito-c 볍씨의 줄기 신장을 촉진하였으며, 그 중에서도 GA₃의 분석결과와 동일하게 wild-type *G. fujikuroi*가 *P. griseofulvum* KNUE03 보다는 Waito-c 볍씨의 줄기 신장을 촉진하는 것을 확인하였다. 분석결과 무처리에 비해 *P. urticae* KNUC03 균주는 0.35 cm, *P. griseofulvum* KNUE03 균주는 0.42 cm, wild-type *G. fujikuroi* 균주는 0.62 cm 그리고 wild-type *N. crassa* 균주는 0.12 cm의 Waito-c에서 볍씨 줄기 신장 촉진효과를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이상의 결과로 미루어 볼 때, 식물뿌리 내생 사상균이 GAs를 생성함을 확인하였으며, 이들 균주를 이용한 GAs의 대량생산을 위해서는 배양조건 최적화 및 균주의 개량등에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

적 요

Gibberellins(GAs)는 식물의 성장과 발전에 있어서 중요하게 작용한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 농업과 원예분야에 매우 중요한 새로운 GAs 생성미생물을 탐색하고자 실험을 수행하였다. 생강나무(*Lindera obtusiloba*)와 산앵두나무(*Vaccinium koreanum*)의 뿌리에 존재하는 사상균을 분리하여 GAs 생산 활성을 측정하였으며, 비색법으로 GA 생산량을 분석하였을 때 이들 중에서 GAs 생산량이 가장 많은 것으로 확인된 두 균주에 대하여 여러 GAs 중에서 식물생장촉진 활성이 높다고 알려진 GA₁, GA₃, GA₄와 GA₇, GA₅₃에 대하여 생산정도를 분석하고, 동정을 수행하였으며, Waito-c(난장이 볍씨)에

서 Bioassay를 수행하였다. 생강나무에서는 6종의 균주, 산앵두나무에서는 4종류의 GAs 생산균을 분리하였고, 분리된 균주 GAs를 가장 많이 생산하는 균주들에 대하여 동정한 결과, 생강나무에서 분리한 C03 균주는 *P. urticae* KNUC03으로 동정되었으며, 산앵두나무에서 분리한 F03 균주는 *P. griseofulvum* KNUE03으로 동정되었다. 생합성된 GAs를 분석한 결과 *P. urticae* KNUC03 균주는 배양액 25 ml 중에 GA₁ 7.08 ng, GA₃ 30.80 ng, GA₄ 1.27 ng, GA₇ 0.88 ng 및 GA₃₃ 0.13 ng을 생산하였고 *P. griseofulvum* KNUE03은 GA₁ 9.79 ng, GA₃ 133.58 ng, GA₄ 2.64 ng, GA₇ 7.80 ng 및 GA₃₃ 0.73 ng을 생산하는 것이 확인되었다. 두 균주 중에서 *P. griseofulvum* KNUE03이 GAs를 더 많이 생산함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 Biogreen 21과제 연구비로 수행한 연구결과와 일부로, 농촌진흥청의 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 이인중, 김길웅, Morgan, P. W. 1997. 수수의 절간 신장에 미치는 지베렐린과 파이토크롬 β의 영향. *한국작물학회지* **42**: 548-555.
- 이영선, 손형진, 김익환, 민태의. 1983. 지베렐린 생산에 관한 연구. *한국산업미생물학회지* **11**: 217-222.
- Avalos, J., Sanchez-Fernandez R., Fernandez-Martin R. and Candau, R. 1997. Regulation of Gibberellin production in the fungus *Gibberella fujikuroi*. *Recent Res. Dev. Plant Physiol.* **1**: 105-115.
- Bayman, B., Lebron, L. L., Tremblay, R. L. and Lodge, D. J. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytol.* **135**: 143-149.
- Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E. G., Kessel, R. H. J., Lloyd, P. B., Rothwell, A., Rothwell, B. and Swait, J. C. 1964. Metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.* **10**: 407-444.
- Brucker, B. and Bleschmidt, D. 1991. Nitrogen regulation of Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 646-650.
- Candau, R., Avalos, J. and Olmedo, E. C. 1992. Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol.* **100**: 1184-1188.
- Desjardins, A. E., Manandhar, H. K., Plattner, R. D., Manandhar, G. G., Poling, S. M. and Maragos, C. M. 2000. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1020-1025.
- Doumas, P., Imbault, N., Moritz, T. and Oden, P. C. 1992. Detection and identification of gibberellins in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) shoots. *Physiologia Plantarum.* **85**: 489-494.
- Escamilla Silva, E. M., Dendooven, L., Magana, I. P., Parra, R. and De la Torre, M. 2000. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *J. Biotechnol.* **76**: 147-155.
- Hasan, H. A. 2002. Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **49**: 105-118.
- Hendden, P. and Phillips, A. L. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Science* **5**: 523-530.
- _____, _____. Rojas, M. C., Carrera, E. and Tudzynski, B. 2002. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: A case of convergent evolution? *J. Plant Growth Regulation.* **20**: 319-331.
- _____, and Probsting, W. M. 1999. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* **119**: 365-370.
- Holbrook, A. H., Edge, W. J. and Bailey F. 1961. *Adv. Chem. Series.* **28**: 159.
- Kawaide, H. and Sassa, T. 1993. Accumulation of gibberellin A₁ and the metabolism of gibberellin A₉ to gibberellin A₁ in a *Phaeosphaeria* sp. L 487 culture. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1403-1405.
- Kawanabe, Y., Yamane, H., Murayama, T., Takahashi, N. and Nakamura, T. 1983. Identification of gibberellin A₉ in mycelia *Neurospora crassa*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 1693-1694.
- Karabaghli, C., Frey-Klett, P., Sotta, B., Bonnet, M. and Le Tacon, F. 1998. In vitro effect of *Laccaria bicolor* S238 N and *Pseudomonas fluorescens* strain BBc6 on rooting of derooted shoot hypocotyls of Norway spruce. *Tree Physiol.* **18**: 103-111.
- Kim, K. S. and Lee, Y. S. 2000. Rapid and accurate species specific detection of *Phytophthora infestans* through analysis of ITS regions in its rDNA. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 651-655.
- Lange, T. 1998. Molecular biology of gibberellin synthesis. *Planta.* **204**: 409-419.
- _____, Foster, K. R. and Morgan P. W. 1998. Photoperiod control of gibberellin levels and flowering in sorghum. *Plant Physiol.* **116**: 1003-1011.
- Lovegrove, Alison and Hooley, R. 2000. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Science* **5**: 102-110.
- Macmillan, J. 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J. Plant Growth Regul.* **20**: 387-442.
- _____, Ward, D. A., Phillip, A. L., Sanchez-Beltran, M. J., Gaskin, P., Lange, T. and Hedden, P. 1997. Gibberellin biosynthesis from gibberellin A₁₂-aldehyde in endosperm and embryos of marah macrocarpus. *Plant Physiol.* **113**: 1369-77.
- Mander, L. N. 2003. Twenty years of gibberellin research. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 49-69.
- Mihlan, M., Homann, V., D.Liu, T.-W. and Tudzynski, B. 2003. Area directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol. Microbiol.* **47**: 975-991.
- Olszewski, N., Sun, T.-P. and Gubler, F. 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell.* **14**: 61-80.
- Petter, T. I., Rood, S. B. and Zanewich, K. P. 1999. Light intensity, gibberellin content and the resolution of shoot growth in *Brassica*. *Planta.* **207**: 505-511.
- Rachev, Rossen, Gancheva, Vjara., Bojkova, Sebastiana., Christov, Christo and Zafirova, Tiha. 1997. Gibberellin biosynthesis by *Fusarium moniliforme* in the presence of hydrophobic resin Amberlite XAD-2. *Bulg. J. Plant Physiol.* **12**: 24-31.
- Robinson, T., Singh, D. and Nigam, P. 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 284-289.
- Sanchez-Fernandez R., Avalos, J. and Cerda-Olmedo, E. 1997.

- Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*. *FEBS Letters*. **413**: 35-39.
- _____. 1999. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 298-310.
- _____. and Holter, K. 1998. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* **25**: 157-170.
- _____, Mihlan, M., Cecilia Rojas, M., Linnemannstons, P., Gaskin, P. and Hedden, P. 2003. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: des and P450-3 encode GA4 desaturase and the 13-hydroxylase, respectively. *J. Biol. Chem.* **278**: 28635-28643.
- Vazquez, M. M., Cesar, S., Azcon, R. and Barea, J. M. 2000. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol.* **15**: 261-272.
- Vierheilig, H., Garcia-Garrido, J. M., Wyss, U. and Piche, Y. 2000. Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. *Soil Biol Biochem.* **32**: 589-595.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. *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, C.A., U.S.A.