

## 菌根菌, *Pisolithus tinctorius*가 生産하는 Gibberellin樣 活性

朴根亨·姜聲薰·金銅淵  
金 燿·李鍾旭·鄭址忻

全南大學校 農科大學 食品加工學科  
(1983. 12. 20일 수리)

### Gibberellin-like Activities Produced by mycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*

Keun-Hyung Park, Sung-Hoon Kang, Dong-Youn Kim,  
Kwan Kim, Chong-Ouk Rhee and Ji-Heun Jung

Department of Food Science and Technology, College of  
Agriculture, Chonnam National University, Kwang-Ju 500, Korea

#### Abstract

Experiments on the GA production ability by ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius* was carried out to investigate specific physiological phenomena of growth increase in host plants by formation of mycorrhizae. The culture extract of *P. tinctorius* was purified by solvent fractionation, sephadex LH-20 chromatography, silica gel partition chromatography and TLC, successively. GA activities in the purified GA fractions were monitored by micro-drop bioassay using dwarf rice seedlings, "Tan-ginbozu". 30~60% EtOAc elution fractions of silica gel partion chromatography and the zone of  $R_f$  0.1~0.4, 0.6~0.8 of TLC exhibited the GA-like activities. The GA activities were increased with the more treated amount of culture extracts. This activity in 100ml of culture solution was equivalent to 0.1ng of GA<sub>3</sub>.

#### 緒 論

自然條件에서 高等植物의 根과 特定の 菌이 菌根組織을 形成하여 共生關係를 갖는것은 거의 1세기전부터 알려져 왔으며<sup>1)</sup> 共生關係가 形成된 植物은 形成되지 않은 植物에 비해 生長促進등의 現象<sup>2,3,4)</sup>을 보여 植物利用面에서 볼 때 커다란利

點을 갖고 있다.

菌根形成에 따른 植物組織의 形態的 變化는 共生菌의 培養濾液에 依해서 誘導될 수 있다는 報告<sup>5)</sup>는 菌이 生産하는 物質에 依해서 菌根形成에 따른 現象이 發現될 수 있는 可能性이 示唆된 以來, 原因物質의 究明에 있어서는 주로 indole 化合物에 集中<sup>6,7,8)</sup>되어 왔다.

한편 植物 hormone인 gibberellin(GA)은 最

\*이 논문은 1983년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

初 *Gibberella fujikuroi*의 代謝產物에서 單離된 것으로 自然界에 存在하는 遊離의 GA는 지금까지 *G. fujikuroi* 由來의 것으로 25種과 高等植物에 그 存在가 증명된 것으로 50種이 알려져 있다.<sup>9)</sup>

本 研究는 高等植物의 菌根形成에 따른 生長促進의 特異한 生理現象을 究明하기 위한 一環으로 植物의 生理現象 發現에 重要한 役割을 하고 있는 GA에 注目하여, 칩엽수의 外生菌根 主 形成 菌인 *Pisolithus tinctorius*가 生産하는 GA活性에 對해 檢索하여 報告한다.

材料 및 方法

1. 使用菌株, 培地組成

實驗에 使用한 菌株는 菌根研究所(USDA Forest Service, Gorgia, Athens, USA)로부터 分讓 받은 菌根菌, *Pisolithus tinctorius*\*250을 使用하였다.

菌株의 保存은 斜面培地에 1個月 間격으로 繼代培養하여 4°C에서 保存하였다. 使用培地는 pH 5.6으로 調整한 MMN 培地<sup>10)</sup>로써 組成은 Table 1과 같다.

Table 1. The culture medium for *P. tinctorius*

Components(nutrients)	Concentration(g/l)
Glucose	10.0
Malt extract	3.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HFO <sub>4</sub>	0.25
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.15
CaCl <sub>2</sub>	0.05
FeCl <sub>3</sub> (1%)	1.2ml
NaCl	0.025
Thiamine HCl	0.0001
ZnSO <sub>4</sub>	0.002

2. 培養方法

(1) 前培養: MMN培地 40ml를 200ml 삼자 플라스크에 分注하여 120°C에서 15分間 殺菌後 保存菌株를 페트리 접시에서 10일 培養시켜 活性이 강한 菌株를 供試菌으로 하여 가장자리에서 5mm 圓型으로 1白金耳씩 接種하여 25°C, 暗所에서 왕복진탕기(120rpm, stroke 5cm)를 使用하여 7일간 培養한 후 本培養에 使用하였다.

(2) 本培養: 上記한 培地 4l를 제조하여 5l 둥근플라스크에 넣고 前培養液(胞子현탁액) 200ml를 無菌的으로 接種하여 25°C, 暗所에서 7일 通氣培養한 후 收穫하였다.

3. GA 劃分의 抽出 및 精製

(1) 抽出, 溶媒分劃: 培養液을 pH 3으로 調整한후 同量의 醋酸에질을 加하여 暗所에서 하루 防置한 후 여과(Toyo 여지 No. 2 使用)된 濾液에 對해서 Fig 1에 나타낸 方法으로 溶媒分劃하여 EtOAc soluble acidic 區(AE 區)를 얻었다.

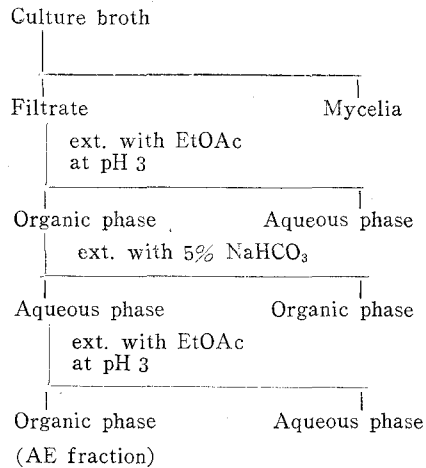


Fig. 1. Solvent fractionation procedure for gibberellins.

(2) Sephadex LH-20 管 크로마토그래피: Sephadex LH-20(25~100μ, pharmacia 社)을 MeOH-Acetone(1:1, v/v)의 溶媒系<sup>11)</sup>로 充分히 平衡시킨뒤 管(18×825mm)에 充塡하여 同 溶媒系로 展開하였다.

(3) 調製 薄層 크로마토그래피(TLC): Silica gel 薄層(20×20cm, 0.5mm, Merck社)을 제조하여 EtOAc-CHCl<sub>3</sub>-AcOH(15:5:1, v/v/v)의 溶媒系<sup>20)</sup>로 15cm 展開하였다. 分取는 Rf值에 依해 分劃하여 EtOAc-MeOH(6:4, v/v) 溶媒系<sup>12)</sup>로 溶出하였다.

(4) Silica gel 分配 크로마토그래피: Park 等의 方法<sup>13)</sup>으로, 固定相으로서 0.5M 胍비酸을 使用한 Silica gel(100~200mesh, 管 크로마토그래피用 Sigma社) 2g을 n-Hexane으로 유리管(7×350mm)에 充塡시켜, 試料는 抗生物質 檢索用 圓形濾紙를 使用하여 吸着, 乾燥시켜 管상단에 올려 미리 0.5M 胍비酸에 포함시킨 EtOAc-n-Hexane 溶媒系로 醋酸에질 농도를 10%에서 10%씩 단계적으

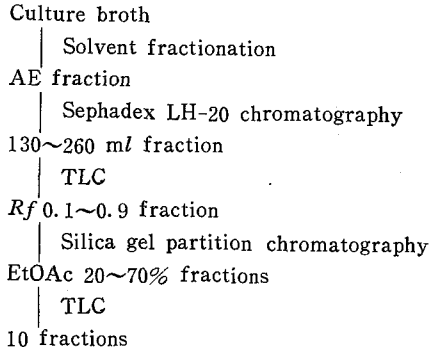


Fig. 2. Purification process of gibberellin fractions from *P. tinctorius*.

로 증가시켜 20ml씩 順次 溶出하였다. 以上의 方法으로 抽出, 精製한 과정을 Fig. 2에 나타내었다

4. GA 活性에 對한 生物檢定

生物檢定은 벼의 第二葉鞘 伸張 test인 micro-drop法<sup>13)</sup>으로 行하였다.

水稻品種으로, 短銀坊主<sup>13)</sup> (dwarf)와 IR<sub>667-98</sub> (semi-dwarf)를 使用하여 同一한 條件에서 反應性を 調査하여 檢定用 材料로 채택하였다. 生物檢定에 依한 活性의 強度는 對照區를 100으로 換算분율로 表示하였으며 活性은 標準品의 GA<sub>3</sub>에 依한 檢量線을 作成하여 換算하였다.

結果 및 考察

1. GA 活性에 對한 生物檢定

短銀坊主와 IR<sub>667-98</sub>을 使用하여 幼菌個體當 0.01ng에서 100ng의 GA<sub>3</sub>를 처리하여 GA 活性을 조사한 結果 Table 2와 같은 反應을 나타내었다.

短銀坊主는 GA<sub>3</sub> 0.01~100ng의 범위에서 112~350%의 活性을, IR<sub>667-98</sub>은 0.1~100ng의 범위에서

Table 2. Activities of GA on rice seedlings by micro-drop method

ng GA <sub>3</sub> /seedling	Tan-ginbozu	IR <sub>667-98</sub>
Control	13.30±0.65	33.08±3.16
0.01	14.90±1.08	31.57±2.59
0.1	20.50±2.58	36.00±3.75
1	25.64±2.59	38.57±2.96
10	34.42±3.16	45.29±3.70
100	46.25±1.98	53.43±4.63

Each values represent the mean length(mm) of 2nd leaf sheath and its standard deviation.

서 109~160%의 活性을 나타냈다. 이러한 活性은 檢定方法에 差異가 있어 직접 比較할 수는 없지만, 文의 結果<sup>15)</sup>와 약간 差異가 있으나 GA에 對한 反應은 dwarf쪽이 민감하다는 一般的인 通說과는 잘 一致하고 있다. 따라서 本研究에서는 GA<sub>3</sub> 0.01~100ng의 범위에서 定量性을 나타낸 短銀坊主를 材料로 채택하여 GA 活性에 對한 生物檢定을 實施하였다. GA 活性은 標品의 GA<sub>3</sub>에 依한 生物活性度에 依해 檢量線(Fig. 3)을 作成, 定量하였다.

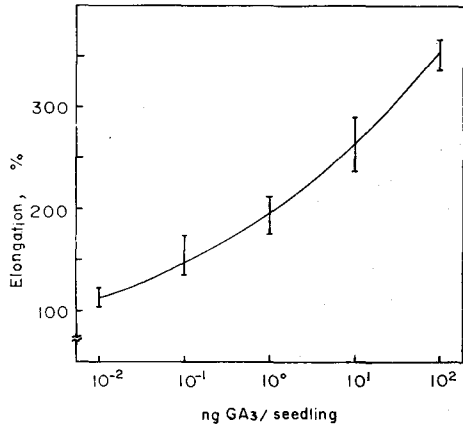


Fig. 3.

2. *P. tinctorius*의 培養液에서의 GA劃分의 精製와 GA活性

培養液 4l에서 AE區로 37.8mg을 얻었다. 醋酸에 醜에 抽出되기에 어려운 高極性의 GA<sub>28</sub><sup>16)</sup>, GA<sub>32</sub><sup>17)</sup>, GA<sub>43</sub><sup>18)</sup>을 除外한 大部分의 遊離型 GA는 AE區에 劃分되어진다.

이어서 Sephadex LH-20 管크로마토그래피를 行하였다. 吸着反應을 줄이면서 分子체 效果를 利用하여 GA를 좁은 범위에서 溶出하기 爲해 MeOH-Acetone의 溶媒系를 使用하였다. 이러한 條件에서 GA는 Ve(溶出容量)/Vt(bed容量)가 0.7~1.0 범위에서 溶出<sup>11,12)</sup>되므로 GA劃分으로 130~260ml 사이의 溶出區인 19.2mg을 얻었다. EtOAc-CHCl<sub>3</sub>-AcOH(15:5:1, v/v/v)의 溶媒系에 依한 遊離의 GA는 Rf 0.1~0.9 범위에 屬하므로<sup>19)</sup> Rf 0.1~0.9 溶出區를 모아 Silica gel 分配크로마토그래피에 依해 劃分하고, 各 劃分區에 對해 生物檢定을 實施한 結果는 Fig. 4와 같다.

幼菌當 *P. tinctorius* 培養液 30ml 相當의 抽出物을 處理한 結果 30~60% 醋酸에 醜 溶出區에서 GA活性을 나타냈다.

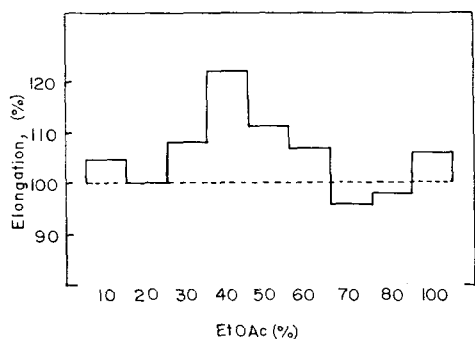


Fig. 4.

GA활성에 대한 確認과 活性本體의 GA에 對해 情報를 얻을 目的으로 20~70% 醋酸에칠 溶出區를 모아 TLC를 행하여 Rf值에 따라 10분割하고, *P. tinctorius* 培養液 100ml相當 抽出液을 처리한 生物檢定 測定結果는 Fig 5와 같다.

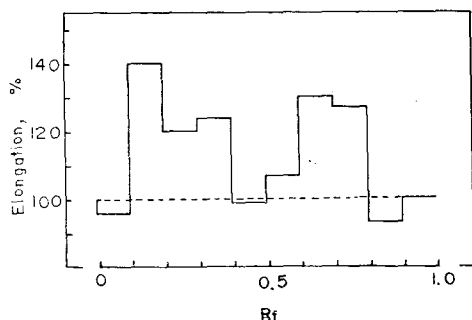


Fig. 5.

GA활성은 Rf 0.1~0.4, 그리고 Rf 0.6~0.8 두 群에서 나타났으며 또 生物檢定에 使用된 培養抽出液의 量을 증가함으로써 GA활성도 현저히 증가함을 나타내 GA활성을 再確認할 수 있었다.

GA활성은 培養液 100ml當 GA<sub>3</sub>로 환산하여 0.1ng 정도의 活性을 나타냈으나 *P. tinctorius*가 生産하는 GA활성은 *P. tinctorius*의 培養方法, 收穫시기에 따라 상당한 차이가 있으리라 예상되며 이에 대한 검토가 必要하리라 생각된다.

Silica gel 分配크로마토그래피에 있어서의 GA 溶出位置<sup>12,20)</sup>와 TLC의 Rf值들을 綜合하여 보면 GA活性本體로서 水酸基(-OH)가 2개 있는 GA와 보다 極성이 낮은 GA로 적어도 2種 以上の GA生産可能性이 示唆된다. *P. tinctorius*가 生産하는 GA樣 活性의 本體인 GA를 確認, 同定하기 위해서는 微量 GA의 同定, 定量法으로 確立되어 있는 GC-SICM(gas chromatography-selected ion

current monitoring) 分析法<sup>21)</sup>이나 感度와 特異性이 뛰어난 radioimmunoassay法<sup>22)</sup> 등을 利用한 후속적인 研究가 수행되어야 할 것이다.

以上の 結果, 菌根 形成菌, *P. tinctorius* 培養抽出物의 GA劃分이 GA樣活性을 갖고 있다는 事實이 밝혀졌다. 이러한 實驗의 結果는 共生關係를 맺음으로서 나타난 植物生長의 促進的 現象은 菌根形成菌이 生産한 GA樣 活性物質을 포함한 活性物質群에 依해서 現象發現의 一益을 담당하고 있다고 說明되어지며 Greene等<sup>23)</sup>의, *P. tinctorius* 처리한 사과나무의 生長促進현상이 GA를 포함한 植物 hormone에 依해 促進되리라는 示唆를 뒷받침해주는 결과이기도 하다. 또한 지금까지 自然界에 GA生産能이 알려진 *G. fujikuroi*와 고등식물외에 菌根菌, *P. tinctorius*도 GA生産可能性이 強力히 示唆되어진다.

### 抄 錄

高等植物이 菌根菌과 共生關係를 이루면 生長促進의 特異現象을 보이는데, 이러한 生理現象을 究明하기 위하여 침엽수의 外生菌根의 主形成菌인 *Pisolithus tinctorius*가 生産하는 GA활성을 檢索하였다. *P. tinctorius* 培養液에서 抽出, 溶媒分割, Sephadex LH-20管크로마토그래피, Silica gel分配 크로마토그래피, TLC에 依해 分割, 精製된 抽出物을 短銀坊主를 使用한 生物檢定에 依해 GA활성을 조사한 結果 Silica gel 分配 크로마토그래피의 醋酸에칠 30~60% 溶出區와 TLC의 Rf 0.1~0.4, 0.6~0.8에서 GA활성을 나타냈다. GA활성은 幼苗個體當 培養抽出液의 처리양을 증가하면 活性도 따라서 증가하였으며, 活性은 *P. tinctorius* 100ml當 GA<sub>3</sub> 0.1ng에 相當하였다.

### 謝 辭

별시를 제공하여 주신 全南大學校 農科大學 朴淳直 教授와 菌株를 제공해 주신 同校 吳光仁 教授에게 심심한 謝意를 표하는 바이다.

### 參 考 文 獻

1. Schenck, N.C.: In 'Methods and Principles of Mycorrhizal Research', Preface, The

- American Phytopathological Society, Minnesota (1982).
2. Greene, D.W., Manning, W.J. and Cooley, D.R.: Hortscience 17 : 655(1982).
  3. Marx, D.H.: Can. J. Microbiol., 23(3) : 217(1977).
  4. Ruehle, J.L.: Science, 206 : 26(1979).
  5. Slankis, V.: Physiol. Plant., 3 : 40(1950).
  6. Slankis, V.: In 'Physiology of Forest Trees' (K.V. Thimann, ed.) pp.427~43. Ronald Press, N.Y.(1958).
  7. Moser, M.: Arch. Mikrobiol., 34 : 251 (1959).
  8. Gogala, N.: Biol. Vestn., 15 : 290(1964).
  9. Takahashi, N.: Chemical Regulation of Plants, 16 : 65(1981).
  10. Marx, D. H.: Phytopathology., 59 : 153 (1968).
  11. Yamaguchi, I., Fujisawa, S., and Takahashi, N.: Phytochemistry, 21 : 2049(1982).
  12. Park, K.-H., Fujisawa, S., Sakurai, A., Yamaguchi, I. and Takahashi, N.: Plant and Cell Physiol., 241 : 1241(1983).
  13. Murakami, Y.: Bot. Mag.(Tokyo), 81 : 33.
  14. Yu, T.Y., Yeam, D.Y. and Kim, Y.J.: J. Kor. Soc. Hort. Sci., 16 : 114(1981).
  15. 문 원 : 서울대학교 석사학위논문(1980).
  16. Fukui, K., Koshimizu, K. and Mitsui, T.: Phytochemistry, 10 : 671(1971).
  17. Yamaguchi, I. Yokota, T., Murohushi, N. and Takahashi, N.: Agri. Biol. Chem., 34 : 1144(1970)
  18. Beeley, L.J., Gaskin, P. and MacMillan, J.: Phytochemistry, 14 : 779(1975).
  19. Cavell, B.D., Macillan, J., Pryce, R.J. and Sheppard, A. C.: Phytochemistry, 6 : 867 (1967).
  20. Kurogochi, S.: Ph. D. thesis, The University of Tokyo(1978).
  21. Park, K.-H.: Ph. D. thesis, The University of Tokyo(1983).
  22. Weiler, F.W. and Wiczorek, U.: Planta, 152 : 159(1981).
  23. Park, K.-H., Sakurai, A. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 45 : 2955(1981).