

## 식물뿌리내부에 존재하는 지베렐린 생산균 분리와 동정

임순옥 · 이진형 · 수메라 아프잘 칸 · 이인종<sup>1</sup> · 이인구<sup>2</sup> · 이경수<sup>3</sup> · 김종국\*  
경북대학교 미생물학과, <sup>1</sup>경북대학교 농학과, <sup>2</sup>경북대학교 농화학과, <sup>3</sup>영남이공대학 식음료조리계열

**Isolation and Identification of Fungal Strains Producing Gibberellins from the Root of plants.** Rim, Soon-Ok, Jin-Hyung Lee, Sumera Afzal Khan, In-Jung Lee<sup>1</sup>, In-Koo Rhee<sup>2</sup>, Kyung-Soo Lee<sup>3</sup>, and Jong-Guk Kim\*. Department of Microbiology, Daegu 702-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Agromony, Daegu 702-701, Korea, <sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, <sup>3</sup>Division of Food, Beverage and Culinary Art, Yeungnam College of Science and Technology, Daegu 705-037, Korea – 249 fungal strains were isolated from the roots of 26 plants, and the production of GAs was spectrophotometrically examined. As a result 76 fungal strains were shown to produce GAs. Bioassay of culture broth from seventy six fungal strains producing GAs was carried out with waito-c rice, that is dwarf rice. The seventy six fungi with GAs-producing activity were incubated for seven days in 40 mL of Czapek's liquid medium at 30°C and 180 rpm, and the culture broth of fungi were treated on the 2-leaf rice sprout. Fifteen of these showed plant growth promoting activity and the amount of each GAs in the medium was measured by Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). Nine of these fungi were also identified by genetic analysis of the nucleotide sequences in the internal transcribed spacer region of the ribosomal DNA.

**Key words :** Gibberellin, Gibberellins-producing fungi, Bioassay, Gas chromatography-mass spectrometer

지베렐린은 식물성장 호르몬으로서 식물이나 곰팡이 또는 세균에서 생산되고 있다[6]. 1920년대 일본의 식물병리학자인 Kurosawa에 의해 벼의 줄기를 웃자라게 하는 bakanae 병의 원인균인 *Gibberella fujikuroi*가 처음 연구되었고, Yabuta와 Sumiki에 의해 이 균주로부터 식물생장촉진물질이 순수분리 되었다[10]. 지베렐린은 *G. fujikuroi* 외에도 *Paceloma manihoticola*[11], *Neurospora crassa*[8], *Phaeosphaeria* sp. L487[7], *Pseudomonas* sp.[1] 등에서 생산되고 있으나 아직까지 상업적으로 이용되는 균은 *G. fujikuroi* 외에는 별로 알려져 있지 않다.

지베렐린은 diterpenoid 복합체로서 식물의 성장과 종자의 발아, 줄기의 신장, 잎의 성장, 개화유도 및 휴면 타파 그리고 과육의 성숙을 조절한다고 알려져 있다[5]. 그러나 주요 기능은 줄기신장이다.

지금까지 136종류의 지베렐린이 밝혀졌으며, GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> 그리고 GA<sub>7</sub>이 생물학적 활성을 가지고 있으며, 그 중 GA<sub>3</sub>가 가장 높은 식물생장 촉진활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[2].

이러한 지베렐린은 산업적으로 많이 이용되어지고 있으며, 년 간 약 25톤 생산되어 약 10억 달러의 매출을 기록하고 있다[13]. 이것은 포도 종자의 성장과 감귤류의 외피를 부드럽

게 하고 과피를 좋은 상태로 유지하여 노화를 억제하며 해충 및 다른 환경요소들로부터의 훼손을 막아 상품성을 높이기도 한다. 특히, 사과에서는 외피의 적갈색 반점들을 제어하여 품질을 향상시키고, 일반적으로 꽃이 피지 않는 계절에 꽃의 개화를 유도하므로 화훼류의 생산에도 이용되고 있다[10].

최근 *G. fujikuroi*에서 7개의 지베렐린 생합성유전자인 *ggs-2*(geranylgeranyl diphosphate), *cps/ks*(ent-kaurene synthase), *des*(desaturase gene), *p450-1*(GA<sub>14</sub> synthase), *p450-2*(GA20-oxidase), *p450-3*(C13-oxidase), *p450-4*(ent-kaurene oxidase)가 클로닝 되었고, 이 유전자들의 기능이 밝혀졌다[14].

본 연구에서는 지베렐린 생산성이 있는 다양한 균주를 확인하고자, 식물의 뿌리에서 지베렐린을 생산하는 진균류를 분리하고, 여러 종류의 지베렐린 중 활성이 있다고 알려진 GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>과 GA<sub>9</sub>의 생산량을 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometer)로 측정하였고, Internal Transcribed Spacer(ITS)의 염기서열 분석을 수행하여 미생물을 동정하였다.

본 연구에 사용된 미생물은 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 분양 받은 *Gibberella fujikuroi*(KCCM 12329)를 control 균주로 사용하였으며, 황금등 73종의 식물뿌리를 봉화약초시험장 및 대구칠곡 농업기술센터에서 수집하여 사용하였고, 시료는 비닐 팩에 담아 4°C에서 보관하였다.

식물뿌리로부터 곰팡이의 분리는, 식물의 뿌리부분을 절단한 후 흐르는 물에서 뿌리에 있는 흙을 모두 제거하고, 계

\*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5379, Fax: 82-53-955-5379

E. mail: kimjg@knu.ac.kr

면활성제인 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(0.5% glucose, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% NH<sub>4</sub>Cl, 0.1% FeCl<sub>3</sub>, Streptomycin 80 ppm, 1.5% Agar, pH 5.6) 배지를 이용하여 25°C에서 배양하여, 사상균을 순수분리 하였다. 실험 결과 황금등 26종의 식물뿌리로부터 249 종의 진균을 분리하였다.

1차적으로 배양액 속의 지베렐린 농도의 측정은 산성조건에서 gibberellic acid를 gibberellenic acid로 전환시켜 254 nm에서 흡광도를 측정하는 spectrophotometric method을 이용하여 측정하여 [9], 249종의 진균에서 79종의 지베렐린 생산균이 확인되었다(Table 1).

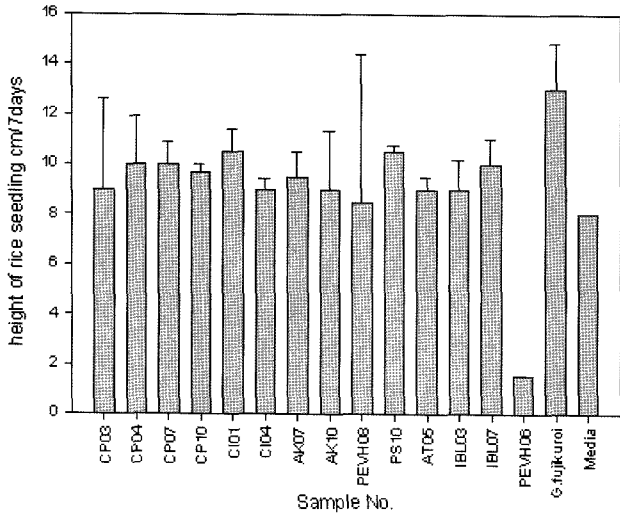
Spectrophotometric method를 사용하여 밝혀진 지베렐린 생산균을 Czapek's(1% glucose, 1% Bacto-peptone, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% KCl, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.3±0.2) 액체배지에 접종한 후 30°C에서 180 rpm으로 일주일간 진탕 배양한 배양액을 여과한 후 30

배 농축한 농축액을 waito-c의 이엽기 엽액 부분에 10 ul를 처리해서 일주일간 유묘의 생장을 측정하였다. Bioassay 결과 control인 배지를 처리한 벼의 신장은 평균 9.2 cm이고, 배지를 처리한 벼 보다 높게 자란 것은 초롱에서 분리된 CP03, CP04, CP07, CP10균주와 적치커리에서 분리된 CI01, CI04균주, 벌개미취에서 분리된 AK10균주, 자리공상육에서 분리된 PEVH08균주, 마타리에서 분리된 PS10균주와 가는금불초에서 분리된 IBL03, IBL07균주의 배양액을 처리한 경우이었다. 위의 균들이 control보다 높게 자라는 것으로 보아 식물뿌리에서 분리된 내생 사상균 배양액이 식물의 길이 생장을 촉진함을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Bioassay에서 control보다 waito-c 줄기를 신장시키는 균을 Czapek's 액체배지에 접종한 후 30°C에서 180 rpm으로 일주일간 진탕 배양한 배양액을 membrane filter로 여과하고, 6N HCl을 이용하여 pH를 2.5로 조절하였으며, 내부표준물질로는 20 ng의 [17.17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> 그리고 GA<sub>53</sub>을 추출하기 전 배양액에 첨가하였다. 배양액에 동일한 양의 ethylacetate를 첨가하여 3개로 나눈 후 ethyl acetate를 휘발시키고 60% Methanol로 희석한 후 2N NH<sub>4</sub>OH로 pH를 8.3으로 조정하였다. 시료는 C<sub>18</sub> column

**Table 1. Isolation of fungi from the plant roots.**

Plant	No. of isolated fungi	No. of GA-producing fungi
<i>Scutellaria baicalensis</i> (황금)	7	5
<i>Cucurbita</i> spp (호박)	11	1
<i>Liriope platyphylla</i> ( 맥문동)	13	5
<i>Hosta longipes</i> (비비추)	6	3
<i>Sedum sarmentosum</i> (돌나물)	13	7
<i>Acorus calamus</i> var. <i>angustatus</i> (창포)	7	3
<i>Coreopsis drummondii</i> (금계국)	8	2
<i>Rudbeckia hirta</i> (루드베키아)	16	1
<i>Allium tuberosum</i> (부추)	6	2
<i>Patrinia scabiosaefolia</i> (마타리)	12	1
<i>Cichorium intybus</i> L. (적치커리)	21	2
<i>Physalis alkekengi</i> var. <i>francheti</i> (짜리)	14	3
<i>Allium fistulosum</i> (파)	13	5
<i>Aceriphyllum rossii</i> (돌단풍)	7	1
<i>Viola patrinii</i> (흰제비꽃)	3	1
<i>Sedum spectabile</i> (큰평의 비름)	9	1
<i>Cirsium maackii</i> Maxim (영경귀)	6	2
<i>Campanula punctata</i> (초롱)	8	4
<i>Phytolacca esculenta</i> Van Houtte (자리공상육)	8	5
<i>Oriental Lily</i> (오리엔탈나리)	9	6
<i>Disporum smilacinum</i> (애기나리)	8	0
<i>Asparagus cochinchinensis</i> (천문동)	3	2
<i>Super Sesamum indicum</i> (슈퍼참깨)	15	0
<i>Aster Koraiensis</i> (열개미취)	11	7
<i>Aceriphyllum rossii</i> (돌단풍)	7	1
<i>Inula britannica</i> var. <i>linariaefolia</i> (가는금불초)	8	6
Total	249	76



**Fig. 1. Bioassay of rice sprout with cultural fluids of GA producing fungi.** Bioassay of culture fluid from four GAs-producing fungi was carried out with waito-c rice. The GA-producing fungi were cultured for 7 days in Czapek's liquid medium at 30°C, 180 rpm under dark condition. 10 µL of lyophilized culture fluid concentrated to 30 folds was treated on the 2-leaf rice sprout.

(90-130 µm, 60Å pore size, Altech)을 통과시킨 후 감압농축하였다. 농축된 잔사는 Celite/SiO<sub>2</sub> column(용매 formic acid로 포화된 ethylacetate : hexan = 95 : 5)으로 통과시킨 여액을 감압농축하여 인산완충용액(pH 8.0)에 녹인 다음 2N NaOH로 pH를 8-9로 조정하고 인산완충용액을 이용하여 3회 분획한 뒤 여액(인산완충용액)에 polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)을 가하여 1시간 동안 진탕하였다. 여과한 여액의 pH를 6N HCl을 이용하여 2.5로 조정한 후 ethylacetate로 3회 분획한 후 감압농축하였다. 농축한 잔사를 methanol에 용해시켜 0.2 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC용 분석시료로 사용하였다.

HPLC column은 µ Bondapak C<sub>18</sub> 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 50 분획으로 나누었다. 각 GA의 정확한 머무름 시간은 각 분획당 소량(15 µL)을 취하여 liquid scintillation spectrometry를 이용(Beckman, 1801)하여 <sup>3</sup>H-GA 표준물질의 유무를 확인하여 결정하였다.

건조시킨 각각의 GA분획들을 100% methanol에 용해시킨 후 동일 GA를 포함한 분획을 합하여 1 mL의 reaction vial로 옮긴 후 40°C에서 질소가스로 건조시켰다. GA분획 중 불순물을 많이 함유한 분획은 NH<sub>2</sub> PreSep extraction cartridge를 사용하여 GA의 불순물을 제거한 후 reaction vial로 옮겼다. 각 GA는 2차례 ethereal diazomethane을 사용하여 methyl ester로 유도한 후 질소가스로 건조하였다. Silylation이 필요한 GA는 35 µL의 pyridine과 35 µL의 N,

D-Bis (trimethyl silyl)-trifluoroacetamide(1% TMCS 포함)로 65°C에서 30분간 반응시킨 후 질소가스로 건조하였다. 시료는 무수 dichloromethane으로 녹인 후 1 µL를 30 m ×0.25 mm(i.d.), 0.25 µm film thickness HP-1 Capillary Column(J & W)이 장착된 GC-MS에 주입하였다.

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 KRI 값을 구하였으며, 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 주요 ion mass를 비교하여 정량하였다.

그 결과 측정된 모든 균에서 지베렐린이 생산되었지만, 그 중 지베렐린을 가장 많이 생산하는 균주는 적치커리에서 분리된 CI04였다. CI04 배양액 속에 함량 된 지베렐린 양이 GA<sub>1</sub>은 4.35 ng/mL, GA<sub>3</sub>은 6.63 ng/mL, GA<sub>4</sub>는 14.19 ng/mL, GA<sub>7</sub>은 0.05 ng/mL, 그리고 GA<sub>9</sub>는 1.32 ng/mL이었다. 그리고 야생균주 *G. fujikuroi* 배양액 속에 함량 된 지베렐린 양은 GA<sub>1</sub>은 4.07 ng/mL, GA<sub>3</sub>은 4.26 ng/mL, GA<sub>4</sub>는 13.79 ng/mL, GA<sub>7</sub>은 0.04 ng/mL, 그리고 GA<sub>9</sub>는 11.35 ng/mL이었다(Table 2).

이는 같은 조건에서 배양된 야생균주 *G. fujikuroi*와 적치커리에서 분리된 CI04 균주의 지베렐린 생산성이 GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>은 비슷했고, GA<sub>3</sub>은 CI04균주의 배양액에서 1.5배 많은 지베렐린이 생산되었지만, GA<sub>9</sub>은 8.6배 적게 생성되었다(Table 2). 그러나 bioassay에서는 *G. fujikuroi* 배양액을 처리한 waito-c의 줄기가 CI04 배양액을 처리한 것 보다 약 1.5배 높게 자란(Fig. 1) 것으로 볼 때 waito-c의 줄기 신장

**Table 2. Quantitative determination of GA production from the isolated strain by GC-MS** (ng/ml)

Sample No.	GA <sub>1</sub>	GA <sub>3</sub>	GA <sub>4</sub>	GA <sub>7</sub>	GA <sub>9</sub>
CI 01	3.57	4.18	10.48	0.04	0.93
CI 04	4.35	6.63	14.19	0.05	1.32
IBL 03	1.21	3.35	4.74	0.04	0.34
IBL 07	1.10	1.87	1.43	0.10	0.09
AT 05	0.17	0.49	ND	ND	0.01
AK 07	1.06	ND	3.00	ND	ND
AK 10	0.15	0.31	0.91	ND	0.01
CP 03	1.26	2.82	0.64	ND	1.37
CP 04	0.69	3.51	8.61	ND	0.64
CP 07	0.11	0.17	0.65	ND	0.03
CP 10	0.02	ND	0.12	ND	0.00
PEVH 08	0.04	0.50	0.18	ND	0.01
PS 10	0.03	ND	0.38	ND	0.01
VP 03	0.23	ND	0.65	ND	ND
GF	4.07	4.26	13.79	0.04	11.35

ND : Not determined

에는 GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>외에도 GA<sub>9</sub>이 직간접적으로 영향을 미침을 추정할 수 있었다.

9종의 지베렐린생산 균주를 동정하기 위해서 배양된 균체

로부터 DNA를 분리하여 Internal Transcribed Spacer(ITS) 영역을 증폭하였다(Fig. 2). ITS 영역의 PCR 증폭 및 염기서열 분석반응을 위해 사용한 primer는 ITS1(forward)과

#### CI01

```

1 TTGGGCCCGA CGTCGCATGC TCCCGGCCGC CATGGCGGCC GCGGGAATTC GATTCCTCC 60
61 GCTTATTGAT ATGCTTAAGT TCAGCGGGTA TCCCTACCTG ATCCGAGGTC AACCTTAGAA 120
121 ATGGGGTTGT TTTACGGCGT AGCCTCCCGA ACACCCTTTA GCGAATAGTT TCCACAACGC 180
181 TTAGGGGACA GAAGACCCAG CCGGTCGATT TGAGGCACGC GCGGACCAGC GTTGCCCAAT 240
241 ACCAAGCGAG GCTTGAGTGG TGAAATGACG CTCGAACAGG CATGCCCCCC GGAATACCAG 300
301 GGGGCGCAAT GTGCGTCAA AGATTGATG ATTCACTGAA TTCTGCAATT CACATTACTT 360
361 ATCGCATTTT GCTGCGTTC TATCGATGC CAGAACCAAG AGATCCGTTG TTAAGGTTT 420
421 TAATTTATTA ATTAAGTTTA CTCAGACTGC AAAGTTACGC AAGAGTTTGA AGTGTCCACC 480
481 CGGAGCCCCC GCCCGAAGGC AGGGTCGCC CGGAGGCAAC AGAGTCGGAC AACAAAGGGT 540
541 TATGAACATC CCGGTGGTTA GACCGGGGTC ACTTGTAAATG ATCCCTCCGC AAGTTCACCT 600
601 ACGGAAATCA CTAGTGAATT CGCGCCGCCT GCAGGTCGAC CATATGGGAG AGCTCCCACG 660

```

#### CI04

```

1 GCCCGACGTC GCATGCTCCC GGCCGCCATG GCGGCCGCGG GAATTCGATT TCCTCCGCTT 60
61 ATTGATATGC TTAAGTTCAG CGGGTATCCC TACCTGATCC GAGGTCAAGA GTGTAAAAAT 120
121 GTACTTTTGT GACGTCGTCG TTTTGTGCA AAGCGCGAGA TGACTGCGC TCCGAAATCA 180
181 ATACGCCGCG TGCCAATCGT TTTGAGGCGA GTCTGCGCGC AGAGGCGAGA CAAACACCCA 240
241 ACACCAAGCA GAGCTTGAAG GTACAAATGA CGCTCGAACA GGCATGCCCC ATGGAATACC 300
301 AAGGGGCGCA ATGTGCGTTC AAAGATTGCA TGATTCACTG AATTCTGCAA TTCACACTAC 360
361 TTATCGCATT TCGCTGCGTT CTTCATCGAT GCCAGAACCA AGAGATCCGT TGTTGAAAGT 420
421 TGTAATATT AAGTTTTTTC AGACGCTGAT TTCAATGACA AAGGGTTTAA GTTTTGTCCA 480
481 ATCGGCGGGC GGACCCGCGC AGGAAACGAA GGTACTCAA AGACATGGGT AAGAAATGGC 540
541 AGGCAAGCCC GCACTCTAGG TAATGATCCT TCCGCAGGTT CACCTACGGA ATCACTAGTG 600
601 AATTCGCGGC CGCCTGCAGG TCGACCATAT GGGAGAGCTC CCAC 644

```

#### IBL03

```

1 GCCCGACGTC GCATGCTCCC GGCCGCCATG GCGGCCGCGG GAATTCGATT TCCTCCGCTT 60
61 ATTGATATGC TTAAGTTCAG CGGGTATCCC TACCTGATCC GAGGTCAACC TGGATAAAAA 120
121 TTTGGGTTGA TCGGCAAGCG CCGGCCGGGC CTACAGAGCG GGTGACAAAG CCCCATACGC 180
181 TCGAGGACCG GACGCGGTGC CGCCGCTGCC TTTCCGGCCC GTCCCCCGGA ATCGGAGGAC 240
241 GGGGCCCAAC ACACAAGCCG GGCTTGAGGG CAGCAATGAC GCTCGGACAG GCATGCCCCC 300
301 CGGAATACCA GGGGGCGCAA TGTGCGTTCA AAGACTCGAT GATTCACTGA ATTTGCAATT 360
361 CACATTACGT ATCGCATTTT GCTGCGTTC TATCGATGC CGGAACCAAG AGATCCGTTG 420
421 TTGAAAGTTT TAAATAATTT ATATTTTAC TCAGACTTCA ATCTTCAGAC AGAGTTCGAG 480
481 GGTGCTTTCG GCGGGCGCGG GCCCGGGGCG GTGAGCCCCC CGGCGGCCAG TGAAGCGGG 540
541 CCCGCCGAAG CAACAAGGTA AAATAAACAC GGGTGGGAGG TTGGACCCCA GAAGGCCCT 600
601 CACTCGGTAA TGATCCTTCC GCAGGTTTAC CTACGGAAAA TCACTAGTGT 650

```

#### IBL07

```

1 AATTTGGGCG AGTCGCATGC TCCCGGCGCA TGGCGGCCGC GGAATCGAT TTCCTCCGCT 60
61 TATTGATATG CTTAAGTTCA GCGGTATCCC TACCTGATCC GAGGTCAACC TTAGAAATAA 120
121 AGTTGGGTGT CGGCTGGCGC CGGCCGGGCC TACAGAGCGG GTGACAAAGC CCCATACGCT 180
181 CGAGGACCGG ACGCGGTGCC GCCGCTGCCT TTCGGGCCCC TCCCCGGGGG AAACCTGGGG 240
241 ACGGTGGCCC AACACACAAG CCGTGTGTTA GTGGCAGCAA TGACGCTCGG ACAGGCATGC 300
301 CCCCCGGAAT ACCAGGGGGC GCAATGTGCG TTCAAAGACT CGATGATTCA CTGAATTCTG 360
361 CAATTCACAT TACTTATCGC ATTTGCTGCG GTTCTTCATC GATGCCGGAA CCAAGAGATC 420
421 CGTTGTTGAA AGTTTTAACT GATTATGATA ATCAACTCAG ACTGCATACT TTCAGAACAG 480
481 AGTTCATGTG GGGTCTTCGG CNGTGGCGCG GGCCCGGGGG CGCGAGGCCT CCCCAGCGGC 540
541 CGTTCGAAAC GCGGGGCCCG CCGAAGCAAC CAAGGTACC GANTACGACA CGGGTTGAGG 600
601 CAGCGGTTGG AACCAAGAA TGGGCCCTCC AATTCGCGT ACAGTGAATT CCCTCCGCA 660
661 ACGGGTTCCA CATAACGGAA TTCACTACTT 690

```

Fig. 2. Nucleotide sequences of ITS region for the strain CI01, CI04, IBL03, IBL07, VP03, AT05, AK07, CP03 and CP04.

## VP03

1 ATTTGGGCGA CGTCGCATGC TCCGGCCGCC ATGGCGGCCG CGGGAATCGA TCCGTAGGTG 60  
 61 AACTGCGGAA GGATCATTAC CTAAGTTGTA GGCTTTGCCT GCTATCTCTT ACCCATGTCT 120  
 121 TTTGAGTACC TTCGTTTCCT CGGCGGGTCC GCCCGCCGAT TGGACAATTT AAACCATTTG 180  
 181 CAGTTGCAAT CAGCGTCTGA AAAAACTTAA TAGTTACAAC TTTCAACAAC GGATCTCTTG 240  
 241 GTTCTGGCAT CGATGAAGAA CGCAGCGAAA TGCATAAGT AGTGTGAATT GCAGAATTCA 300  
 301 GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACATTG CGCCCCTTGG TATTCATGGG GGCATGCCTG 360  
 361 TTCGAGCGTC ATTTGTACCT TCAAGCTCTG CTTGGTGTG GGTGTTTGTG TCGCCTCTGC 420  
 421 GCGTAGACTC GCCTCAAAAC AATTGGCAGC CGGCGTATTG ATTTCCGGAGC GCAGTACATC 480  
 481 TCGCGCTTTG CACTCATAAC GACGACGTCC AAAAGTACAT TTTTCACACT CTTGACCTCG 540  
 541 GATCAGGTAG GGATACCCGC TGAACTTAAG CATATCAATA AGCGNGAGGA AATCACTACG 600  
 601 TTGAANTTCC GCGGACCGCA CNTGCAGCGT NTCGACCCAN TAATGGNGAC GCAGCTCCAC 660  
 661 CAACCGCCGT TAGGGACTTG GCCATANACC ACCTTTGAAG TTAATAACTC AATAACGTGT 720  
 721 ACAACCTTAA 730

## AT05

1 TGGCGAGTCG CTGCTCCCGG CCGCATGGCG GCCGCGGGAA TTCGATTTCC TCCGCTTATT 60  
 61 GATATGCTTA AGTTCAGCGG GTATTCTTAC CTGATCCGAG GTCAACATTC AGAAGTTGGG 120  
 121 GTTTAACGGC GTGGCCCGCA CGATTACCAG TAACGAGGGT TTTACTACTA GCTATGGAAG 180  
 181 CTCGACGTGA CCGCCAATCA ATTTGGGGAA CGGAATTAA CGCGAGCCCC AACACCAGC 240  
 241 TGTGCTTGGG GGTGGAAGTG ACGCTCGAAC AGGCATGCCG GCCAGAATAC TGGCGGGCGC 300  
 301 AATGTGCGTT CAAAGATTCTG ATGATTCACT GAATTCTGCA ATTACATTA CTTATCGCAT 360  
 361 TTTGCTGCGT TCTTCATCGA TGCCAGAACC AAGAGATCCG TTGTTGAAAG TTTTGATTTA 420  
 421 TTTATGGTTT TACTCAGAAG TTACATATAG AAACAGAGTT TAGGGGTCTT CTGGCGGGCC 480  
 481 GTCCCGTTTT ACCGGGAGCG GGCTGATCCG CCGAGGCAAC AAGTGGTATG TTCACAGGGG 540  
 541 TTTGGGAGTT GTAAACTCGG TAATTGATCC CTCCGAGTTC ACCTACGGAA A 591

## AK07

1 TGGGCCCCGAC GTCGCATGCT CCCGGCCGCC ATGGCGGCCG CGGGAATTCC ATTTCTCTCC 60  
 61 CTATTGATA TGCTTAAGTT CAGCGGTAT CCTACCTGA TCCGAGGTCA ACCTGGAAAA 120  
 121 AAGTTTTGGT TGATCGCAA GCGCCGGCCG GGCTACAGA GCGGGTGACA AAGCCCCATA 180  
 181 CGCTCGAGGA CCGGACGCGG TGCCGCCGCT GCCTTTCGGG CCCGTCCCCC CGGGAAGGGG 240  
 241 GACGAGACCC AACACACAAG CCGGGCTTGA GGGCAGCAAT GACGCTCGGA CAGGCATGCC 300  
 301 CCCCAGAAATA CCAGGGGGCG CAATGTGCGT TCAAAGACTC GATGATTCAC TGAATTCTGC 360  
 361 AATTCACATT ACGTATCGCA TTTGCTGCGG TTCTTCATCG ATGCCGGAAC CAAGAGATCC 420  
 421 GTTGTGAAA GTTTTAAATA ATTTATATTT AGACTCAGAC TGCAATTTTC ATACAGAGTT 480  
 481 CAAGGTGTCT TCGGCGGGCG CGGGCCCCGG GGCAGATGCC CCCCAGCGCG CGTGAGGCGG 540  
 541 ACAATAACA CGGGTGGGAG GTTGAATTCA GAGAATTCTC GCCCGCCGAA GCAACAAGGT 600  
 601 GCTCGGTAAT GATCCTTCCG CAAGTTCACC TACAATCACT AATGAATTCC CGGCCGCTG 660  
 661 CAGGT 665

## CP03

1 TGGGCGACGT CGCATGCTCC GGCCGCATGG CGGCCGCGGG AATCGATTTT CGTAGGTGAA 60  
 61 CCTGCGGAAG GATCATTACC TTTCAATGCA GCAGAATGGG GATGGTTGAG TTTCTCGCCT 120  
 121 CTCTGTTCTG CCTGTATTCT ACCCTTGTTT GTCATATACT ATTATTCTCT CGGCAGGCTT 180  
 181 GCTTGCCGAG TGAACCAAT TATAACCTAT TTAATTTTCA ATCAGCGTCT GAACAAAATT 240  
 241 AATAATTACA ACTTTCAACA ACGGATCTCT TGGTCTGGC ATCGATGAAG AACGCAGCGA 300  
 301 AATGCGATAA GTAGTGTGAA TTGCAGAATT CAGTGAATCA TCGAATCTTT GAACGCACAT 360  
 361 TGGCCCCCTT GGTATTCCAT GGGGCATGCC TGTTGAGCG TCATTTGTAC CTTCAAGCTT 420  
 421 TGCTTGGTGT GGGGTGTGGT CCTGAGGGAC TCGCCTTTAA AGTAATTGGC AGGCCANTGT 480  
 481 CTGGTTTTTCG AAGCGCAGCA CAAAAGTCCG CGATNCAAAG CTATACGCCG GGTTCCTCAA 540  
 541 AAGACTTTTT CACTTTTTGG ACCTCCGGAT CCAGGTACGG GGATTACCCC GTTGAAGCT 600  
 601 NAAAGCANTA TATNCNATTA AAGGTCGGAN GGGCACACAT TCTCACTTAA TTTTGGATAT 660  
 661 TTCCTGGGTG ACCNCAGCCA CTGGGAAGGG 690

Fig. 2. Continued.

CP04  
 1 CCCGACGTCG CATGCTCCCG GCCGCCATGG CGGCCGCGGG AATTCGATTT CCTCCGCTTA 60  
 61 TTGATATGCT TAAGTTCAGC GGGTATCCCT ACCTGATCCG AGGTCAAGAG TGTA AAAATG 120  
 121 TACTTTTGGG CGTCGTCGTT ATGAGTGCAA AGCGCGAGAT GACTGCGCT CCGAAATCAA 180  
 181 TACGCCGGCT GCCAATTGTT TTGAGGCGAG TCTACGCGCA GAGGCGAGAC AAACACCCAA 240  
 241 CACCAAGCAG AGCTTGAAGG TACAAATGAC GCTCGAACAG GCATGCCCCA TGG AATACCA 300  
 301 AGGGGCGCAA TGTGCGTTCA AAGATTCGAT GATTCACTGA ATTCTGCAAT TCACACTACT 360  
 361 TATCGCATTT CGCTGCGTTC TTCATCGATG CCAGAACCAA GAGATCCGTT GTTGAAAGTT 420  
 421 GTA ACTATTA AGTTTTTTC GACGCTGATT GCAACTGCAA ATGGTTTAAA TTGTCCAATC 480  
 481 GCGGGCGGA CCCGCCGAGG AAACGAAGGT ACTCAAAGA CATGGGTAAG AGATAGCAGG 540  
 541 CAAAGCCTAC AACTCTAGGT AATGATCCTT CCGCAGGTT ACCTACGGAA ATCACTAGTG 600  
 601 AATTCGCGGC CGCCTGCAGG TCGACCATAT GGGAGAGCTC CCAACGCGTT GGATGCATAG 660  
 661 C 661

Fig. 2. Continued.

Table 3. Identification of the isolated fungi.

Sample No.	Source of Plant	Identification
CI 01	Chrsantemum indicum	<i>Cladosporium oxysporium</i> KGL0402
CI 04	Chrsantemum indicum	<i>Didymella cucurbitacearum</i> KGL0403
IBL 03	<i>Inula birtannica</i> Var. <i>lineariaefolia</i>	<i>Penicillium venetum</i> KGL0404
IBL07	<i>Inula birtannica</i> Var. <i>lineariaefolia</i>	<i>Neosartorya fischeri</i> KGL0407
VP 03	<i>Viola partinii</i>	<i>Phoma glomerata</i> KGL0408
AT 05	<i>Allium tuberosum</i>	<i>Fusarium Oxysporum</i> KGL0409
AK 07	<i>Aster Koraiensis</i>	<i>Penicillium canescens</i> KGL0405
CP 03	<i>Campanula punctata</i>	<i>Leptosphaeria sp.</i> KGL0419
CP 04	<i>Campanula punctata</i>	<i>Phoma glomerata</i> KGL0406

ITS4(reverse)였으며, 염기배열은 다음과 같다.

Primers	Sequences
ITS1	5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'
ITS4	5' - GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G - 3'

그 결과 적치커리에서 분리된 CI01, CI04 균주는 *Cladosporium oxysporium* KGL0402, *Didymella cucurbitacearum* KGL0403, 그리고 가는금불초에서 분리된 IBL03, IBL07균주는 *Penicillium venetum* KGL0404, *Neosartorya fischeri* KGL0407, 그리고 흰제비꽃에서 분리된 VP03균주를 *Phoma glomerata* KGL0408, 그리고 부추에서 분리된 AT05균주는 *Fusarium Oxysporum* KGL0409, 그리고 벌개미취에서 분리된 AK07균주는 *Penicillium canescens* KGL0405, 그리고 초롱에서 분리된 CP03, CP04균주는 각각 *Leptosphaeria sp.* KGL0419와 *Phoma glomerata* KGL0406이라고 명명하였다 (Table 3).

이로서 식물생장호르몬인 지베렐린은 *G. fujikuroi*외에도 다양한 균주로부터 생성됨을 알 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 환경부 “차세대 핵심환경기술개발사업”으로 지

원받은 과제이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Basiacik, K. S. and N. Aksoz. 2004. Optimization of carbon-nitrogen ratio for production of gibberellic acid by *Pseudomonas sp.*. *Pol. J. Microbiol.* **53**: 117-20.
- Bottini, R., F. Cassan and P. Piccoli. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 497-503.
- Choi, W. Y., S. O. Rim, J. H. Lee, J. M. Lee, I. J. Lee, K. J. Cho, I. K. Rhee, J. B. Kwon, and J. G. Kim. 2005. Isolation of gibberellins-producing fungi from the root of several *Sesamum indicum* plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 22-28.
- Escamilla, E. M., L. Dendooven, I. P. Magana, R. Parra, and M. De la Torre. 2000. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *J. Biotechnol.* **76**: 147-55.
- Hedden, Peter and A. L. Phillips. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trands in Plant Sci.* **5**: 523-530.
- Hedden, P., A. L. Phillips, M. C. Rojas, E. Carrera, and B. Tudzynski. 2002. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: A case of convergent evolution? *J. Plant Growth*

- Regul.* **20**: 319-331.
7. Kawaide, H. and T. Sassa. 1993. Accumulation of gibberellin A<sub>1</sub> and the metabolism of gibberellin A<sub>9</sub> to gibberellin A<sub>1</sub> in a *Phaeosphaeria* sp. L 487 culture. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1403-1405.
  8. Kawanabe, Y., H. Yamane, T. Murayama, N. Takahashi, and T. Nakamura. 1983. Identification of gibberellin A<sub>3</sub> in mycelia *Neurospora crassa*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 1693-1694.
  9. Lee, Y. S., H. J. Son, I. H. Kim, and T. L. Mheen. 1983. Studies on the production of gibberellic acid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **3**: 217-222.
  10. Lewis N. Mander. 2003. Twenty years of gibberellin research. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 49-69.
  11. Rachev, R., V. Gancheva, S. Bojkova, C. Christov, and T. Zafirova, 1997. Gibberellin biosynthesis by *Fusarium moniliforme* in the presence of hydrophobic resin Amberlite XAD-2. *Bulg. J. Plant Physiol.* **12**: 24-31.
  12. Rim, S. O., J. H. Lee, W. Y. Choi, S. K. Hwang, S. J. Suh, I. J. Lee, I. K. Rhee, and J. G. Kim. 2005. *Fusarium proliferatum* KGL0401 as a new gibberellin-producing fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 809-814.
  13. Tudzynski, B. 1999. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 298-310.
  14. Tudzynski B., M. Mihlan, M. Cecilia Rojas, P. Linne-mannstons, P. Gaskin and P. Hedden. 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.

(Received Nov. 2, 2007/Accepted Dec. 5, 2007)