

과제 구분	지역농업 기술개발	Code: LS0604	수행시기	전반기	연구기간	'00 ~ '02(3년차완결)
연구과제명	토양미생물대사산물을 이용한 미세종자작물 생력재배 기술 개발				연구책임자	사 종 구
연구항목명	유용미생물 대사산물분리					
연구원별임무						
구 분	소 속		성 명		담 당 임 무	
세부과제책임자	환경농업연구과		정 태 성		연구계획, 수행, 총괄	
공동연구자	"		김 성 일		연구대행 및 조사	
	"		이 재 흥		"	
색인 용어	액체배양, 크로마토그래피, 발효조건, 식물생장호르몬					

ABSTRACT

The bacteria isolates which increased seed germination rate by cell inoculation incubated in Carbohydrate and Nitrogen source plenty media. The partition extracted with Ethyl acetate increased seedling emergence rate in field test. The partition prepared from *Bacillus mycoide*0023 culture increased the seedling emergence rate of *Platycodon grandiflous* more than 25%. The seed germination rate increasing fungi produced Plant growth regulator high effectively in carbon source abundant media. The seed germination rate increasing bacteria produced Plant growth regulator high effectively in nitrogen source abundant mediaper media unit. In L-tryptophan added media B. mycoide produced more PGR and the ability to increase germination rate also increased. Fungi grew in glycerl added media vigorously and Aspergillus produced more PGR above 75% than Sucrose added media. Among the Gibbrellic acid-like metabolite nonporar materail also have more effective seed germination rate increasing ability on *Platycodon grandiflous*. The fraction separated by thin layer chromatography(benzen- buthanol-acetic acid=16:3:1) sited on Rf value=0.2). at 100ppm it increased the germination rate to 20 ~ 28%.

1. 연구배경

토양에서 분리한 유용미생물들은 주로 작물증수나 토양병 생물적방제를 위한 길항작용에 대한 연구가 진행되고, 일부 균주들은 상품으로생산되어 유통되고 있으나 종자에 처리한 유용균주들이 발아율향상에 관여하는 미생물대사산물의 분리 및 기작에 대한연구는 미흡한 실정이다. 토양미생물 중 식물생장촉진에 관여하는 기작으로 식물생장조절물질(Plant growth Regulator : PGR)생산능력이 여러 연구자들에 의해 보고되고있다. PGR은 식물체내에서 합성하여 일정한 작용부위에서 식물의 생장이나 형태발생에 관여하는 식물호르몬(Phytohormone)과 구분하기 위한 용어로 인공합성과정이나 식물체외에서 자연적으로 생산

되는 호르몬을 총칭한다. 미생물이 생산하는 PGR은 Gibberllin, Cytokinin, Kinetin, Auxin, Ethylene 및 미확인 물질들이 있으며, 이들은 식물체외에서 생산되어 흡수된 후 식물체의 생리적반응에 영향을 준다. 식물성장호르몬은 분자량이 크고 불안정한 구조를 가지고 있어 합성시 시약과 생산공정과정에서 비용이 많이들어 가격이 비싸 그 사용범위가 고소득작물에 국한되고 있다. 그러나 식품, 의약분야 등 발효기술의 이용범위가 확대됨에 따라 미생물대량배양을 위한 시설설치가 용이하게 되었고, 분석화학과 측정기구들의 정확도가 높아짐에 따라 이들의 존재여부를 빠르고 정확하게 확인할 수 있게 되었다. 즉 과거 식물호르몬 활성 조사에 활용되었던 종자발아반응은 식물세포나 효모 이용으로 조사기간이 크게 단축되었다. 특히 미생물을 대량배양하여 준비한 물질의 분리·정제도 Column chromatography로 분획처리가 가능하고, HPLC 나 Mass-GC등의 정밀 분석장치들도 연구에 큰 도움을 주고 있다. 이러한 기술과 시설들은 미생물이용 식물호르몬 대량생산에 필요한 것들로, 현재 미생물을 이용한 발효기법으로 생산되는 Gibberellin(GA₃)은 가격이 저렴한 대표적인 예이다. 즉 GA₃는 합성에 의해 생산되는 Cytokinin, Kinetin, Auxin에 비해 훨씬저렴하여 소비자가 싼가격으로 구입할수 있어 이용범위도 크게 증가하고 있다. GA₃의 대량생산은 *Gibberella fujikuroi* 과 같은 생산능이 뛰어난 균주확보에서 시작되었다. GA₃이외의 PGR생산 균주들은 세균, 곰팡이, 방선균등 다양하게 보고되어 있으며, Auxin의 경우 Tryptophan과 같은 전구물질을 배지에 첨가하였을 때 생산효율이 크게 증가한다고 하였다. 따라서 각 식물성장호르몬을 생산하는 미생물을 분리하고, 배지조성, 배양조건 등 발효공정에 필요한 연구가 선행되면 가격이 비싸 농가에서 사용하지 못하고 있는 PGR들도 저렴한 가격으로 농가에 보급할수 있게 되고, 사용한 농가에서는 고품질 농산물생산과 수확기 조정등 경제적영농으로 농가소득에 이바지할 것으로 예견된다. 특히 우리나라 농가에서 소규모로 재배하고 있는 산채류나 약용작물들은 자가채종에 의해 종자가 공급되고 있다. 따라서 채종체계가 제대로 갖추어지지 않아 발아율이 낮은 이유로 과밀파종으로 재배지 관리가 어려울 뿐만아니라 상품성이 낮아 농가소득에 도움을 주지 못하고 있다. 이러한 자가채종종자들의 낮은 발아율은 미숙배에 기인한 것으로 종자전처리에 의해 개선할 수 있다. 토양미생물들은 식물호르몬과 같은 활성을 갖는 PGR생산능력을 가지고 있다. 이들이 생산하는 PGR은 Auxin, GA, CK, Etylene 그리고 이들의 유도체들이 보고되어 있으며(Ashard 등, 1993). 근권에서 토양미생물에 의해 생산된 PGR은 토양미생물에 의해 분해되거나 토양입자에 의해 불활성화 되기 이전에 식물 뿌리에 의해 흡수된다. 미생물 유래 PGR에 대해 식물은 특정한 생육단계와 재배환경에서 형태발생이나 생육촉진과 같은 반응을 한다. Salamone등(1997)은 식물성장촉진근권세균(Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR)로 알려진 세균인 *Pseudomonas fluoresces* G20-18, *P. aureo-efaciens* 63-28, *P. putida* G8-32들은 Cytokinin을 생산하여 무의 뿌리생육을 촉진하여 수분이나 영양흡수를 촉진하여 생체량을 증가시켜준다고 하였다. Young등(1990)은 PGPR수집을 연구하였는데 그들은 PGPR에 의해 생산된 Cytokinin이 식물의 뿌리성장, 세포분열, Chloro- phyll 응집, 잎의 성장, 잎의 노화지연과정을 인공 합성한 시약 Cytokinin 과 비교연구하였다.

식물체로부터 식물호르몬을 추출하는 것은 경제성이없고, Gibberellin의 경우 식물건체량 kg

당 0.001 ~ 1.0mg(Grabe 등, 1978), 목화 미성숙 열매 225kg으로부터 Absisic acid 9mg, Cytokinin 1mg(Ohkuma 등, 1963)의 극소량 PGR추출이 가능하였다. 뿐만 아니라 추출과정에서 변성이 일어나기 쉬워 ABA는 건조에 민감하고(Hirai 1986), 이성체화가 쉽게 일어나(Lenton 등 1971) 수확은 전문인력의 숙련된 조작이 요구된다. 현재 상품으로 판매되는 PGR(Gibberellin, Cytokinin, Auxin, Kinetin)들은 가격이 비싸 토양처리나 대면적재배를 하는 곡물에는 사용되지 못하고, 고소득작물재배에 제한적으로 사용되고있으나(Nickell 1978, 1982, 1983), PGR을 농업에 사용하면 농산물의 질, 수량, 상품가치를 높여줄 뿐만 아니라 수확기를 조절하여 경제적으로 많은 이익을 창출시켜준다. 농업에 사용되고 있는 PGR 중 Gibberellin은 Cytokinin, Kinetin보다 가격이 싼데 그 이유는 이들이 곰팡이를 이용한 발효에 의해 상업적으로 생산되기 때문이다. 그러나 Gibberellin 이외의 GPR에 대한 발효공정연구는 미미하다. 생산성이 높고 고부가 가치를 창출하는 PGR생산 발효기술은 고체발효기술(Solid State Fermentation:SSF)의 개발로 Gibberellin를 성공적으로 생산한 것과(Kumar 등 1989) 같이 다른 PGR에 대해서도 이 분야에 대한 관심을 가질 필요가 있다.

미생물을 이용한 PGR 생산발효기술은 식물체로부터 추출하는것보다 유리한 데 그 이유는 이상적으로 잘 조절된 환경에서 균을 배양할 수 있고, 배양조건을 조절함으로써 수량증대가 가능하고, 배양기간이 짧고, 생산공간이 좁고, 생산공정과정을 쉽게 변경가능하여, 새로운 PGR생산을 위해 필요한 시설이나 구조변경을 단기간에 수행할 수 있기 때문이다. PGR발효 생산에 이용가능한 미생물은 세균, 곰팡이, 방선균, 조류 등 다양하게 보고되어 있는데, 토양병 생물적방제제로 연구되고 있는 *Bacillus*속과 *Pseudomonas* 속에 속하는 PGPR균주들은 식물체를 자극하는 대사산물이나 화합물을 생산하는 능력도가지고 있다고 하였다(Chaway 1997, Handelsman 등 1996, Maringui 등 1992). *Azospirillum*은 그램음성의 질소고정세균으로 잔디와 곡물의 근권에 서식한다(Vande Broek 등, 1995). 이 세균은 PGPR에 속하는 균으로 직접 식물생장촉진 기능을 가지고 있으며(Glic, 1995) 식물에 접촉하면 뿌리털과 측근수가 증가하고 이에따라 영양분과 수분의 흡수가 촉진된다(Okon 등, 1986). 이효과는 주로 세균이 생산하는 식물호르몬 Indole -3-acetic acid(IAA)생산에 의한 것이다. IAA의 전구물질은 Tryptophan인데 이를 이용하여 IAA를 합성할수 있는 IpyA decarboxylase를 형성해주는 유전인자를 가지고 있는 균주들은 *Enterobacter cloacae*(Koga 등, 1991), *Azospirillum brasilense* (Costacurta 등 1994), *Erwinia herbicola*(Bran이 등, 1996)이 보고되어져 있다.

토양근권에 분포하면서 IAA를 생산하는 균들은 유용한 세균과 병원성세균 모두가 포함되어 있으며(Costacurta 등 1995, Fett 등 1987, Kobayashi 등 199, Patten 등 1996), 이들이 생산하는 IAA의 근권에서의 농도에 따라 식물에 유용하거나 유해한 결과를 초래한다. 즉 IAA를 과량생산하는 미생물을 근권에 처리하면 뿌리발육을 억제하고(Dubeikovsky 등 1993, Loper 등 1986, Sarwar 등 1995, Xie 등 1998) 실제로 식물에서 추출한 IAA를 반응분계점 이상으로 처리하면 뿌리생육이 억제된다(Scott, 1972). 생물적방제에 효과가 있는 *Pseudomonas fluorescens* CHO에 *P. syringae* pv. savatanoi (Yamada 등, 1985)의 IAA 생산관련 유전인자를 삽입하여 준비한 IAA과잉생산 *P. fluorescens* CHO-Rif 유전자재조합

변이체는 오이와 콩 종자표면에 처리하면 근권에 정착된 균수에 따라 서로다른 처리효과를 보인다. 즉 토양내 다른 미생물의 영향을 완전히 배제하여 정착이 용이한 멸균토양에서 *P. fluorescens* CHO-Rif를 처리하면 뿌리생육이 *P. fluorescens* CHO처리구에 비해 2~8배까지 억제되나 멸균처리하지 않은 자연토양에서는 반대로 *P. fluorescens* CHO-Rif 처리구의 생육이 촉진되어 오이와 콩 모두 *P. fluorescens* CHO 처리구 대비 뿌리는 41%, 28%, 생체량은 26%, 16% 증가한다(Beyeler 등 1997). 이는 IAA과량생산균주가 자연토양에서 생태 균형에 의한 근권정착율이 낮거나 분비된 IAA가 식물에 흡수되기전에 *Rhizbium*과 같은 IAA 분해 토양미생물들에 의해 일부 분해(Ernstsen 등, 1987)되기 때문이다. 미생물 유래 PGR 생산에 대한 연구로 Azc6n 등(1975)은 *Azotobater vinelandii*, *A. beijernickii*균주를 배양한 배양여액에는 Auxin, 3종의 Gibberellin 유사체와 3종의 Cytokinin유사체를 함유하고 있다고 하였으며 이 배양여액을 토마토에 처리하면 식물생장을 촉진하고 과일수량을 증대시켜주고 이 효과는 식물호르몬에 의한 것이라고 하였다.

본 연구는 토양에서 분리한 발아촉진에 관여한 균주들이 생산하는 대사산물 중 종자발아와 유근생장에 도움을 주어 직파작물 파종시 출현율 증대를 위한 종자전처리 물질로 이용하기 위해 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시균주

식물근권에서 분리한 균주 중 균체를 수확하여 도라지, 더덕종자표면에 처리하였을 때 발아율을 향상시킨 세균 9균주, *Aspergillus* 3균주, *Fusarium* 3균주, *Rhizopus* 2균들이 생산하는 PGR을 조사하기 위해 각 균주들을 액체배양하여 분리재료로 준비하였다. 세균배양은 Nutrien broth와 Modified 'B' 배지(Lochhead 등, 1943) [배지조성 : Glucose-5g, K_2HPO_4 -1g, NH_4NO_3 -0.4g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0.4g, $CaCl_2$ -0.2g, NaCl-0.1g, $FeCl_3$ -trace, 증류수 1l, pH 6.8 - 7.2]를 준비하여 500ml 삼각플라스크에 200ml분주하고 면전솜으로 입구를 막아 멸균(121℃, 1.5 atm, 30min)하였다. 보존중인 균주는 Nutrient broth 배지에 (20ml in 100ml 플라스크) 접종하여 2일간 배양한 후 Modified 'B' 배지 200ml 접종하여 5일간 진탕배양하였다(120rpm, 30℃). 배양 후 세균배양액은 원심분리(6,000rpm, 15min with Supra 30K, Hanil Co. Rotar No.11)하여 균체를 제거하여 상층액을 준비하였다. Auxin 생산능은 Tryptophan을 첨가하지 않은 것과 L-Tryptophan을 첨가한(0.2g/l, 여과살균 0.2μm membrane filter)배지를 각각 준비하여 조사하였다. 곰팡이류는 PDA배지에 5일 배양하여 형성된 집락의 가장자리에서 0.3cm Cork bore로 균체와 함께 떼어내어 배양병에 5개씩 배지에 잠기지 않도록 조심하면서 접종하였다. 시험에 사용한 배양병은 1,200ml Roux형 배양병(260X122X56mm)으로 액체배지를 200ml 씩 분주하였다. 배양은 10일간 28℃ 배양하여 배지표면이 균사로 완전히 덮일 때까지 배양하고 배양여액은 Glass Wool을 사용하여 준비하였다.

나. PGR 추출

세균 및 곰팡이 배양여액은 원심분리하여 균체를 제거하고 0.1N HCl로 pH 3으로 조절한 다음 2등분하여 그림 1과 같이 실험에 사용하였다. Ethyl acetate로 분획하여 형성된 유기용매층과 물층은 모두 Kinetin활력을 조사하였고 그 이유는 유기용매층에서 수확된 Kinetin이 소량 물층에도 녹아들었기 때문이다(Hemberg 등, 1973; Navarro 등, 1973). 도표 1.에서 준비한 시료들은 그림 2, 3의 과정을 거쳐 분리하고자 하는 PGR물질들의 순도를 높이고 시료의 손실을 최소화 하였다.

다. Thin layer chromatography

추출물들은 Isopropanol : ammonia : Water(10:1:1)로 전개하였으며, 전개후 발색시약 (5% H₂SO₄ in Methanol)으로 처리하기 전에 단파장 UV(350nm)로 조사하여 조사하였다, Rf치는 IAA의 경우(Merck AG Darmsta, Germany) 0.3에서 0.4 사이이고, GA₃(Sigma chemical Co., St Louis, Missouri, USA)는 0.5~0.7, Kinetin(Sigma)는 0.7~0.8이었으며 이들을 표준시약으로 공시하였다. 전개된 각 분획은 7일 이상 건조한 후 전개판 전체를 10 등분하여 수확한 후 모두에 대한 생물활성을 조사하였다.

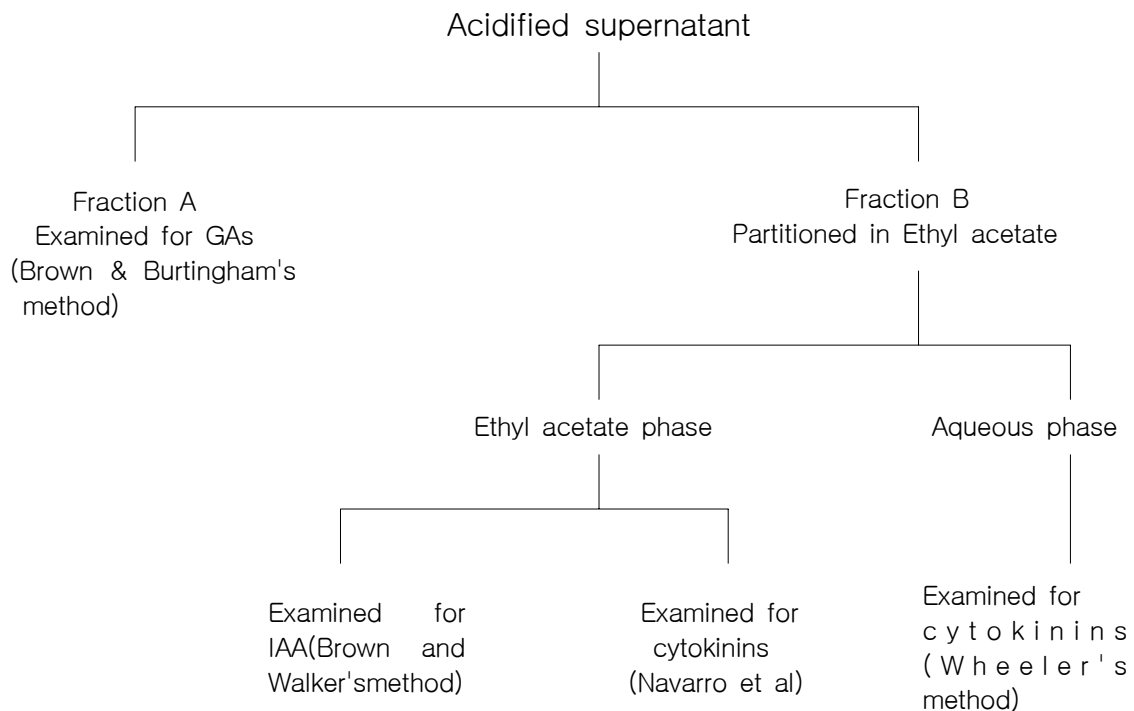


그림 1. PGR 분리과정

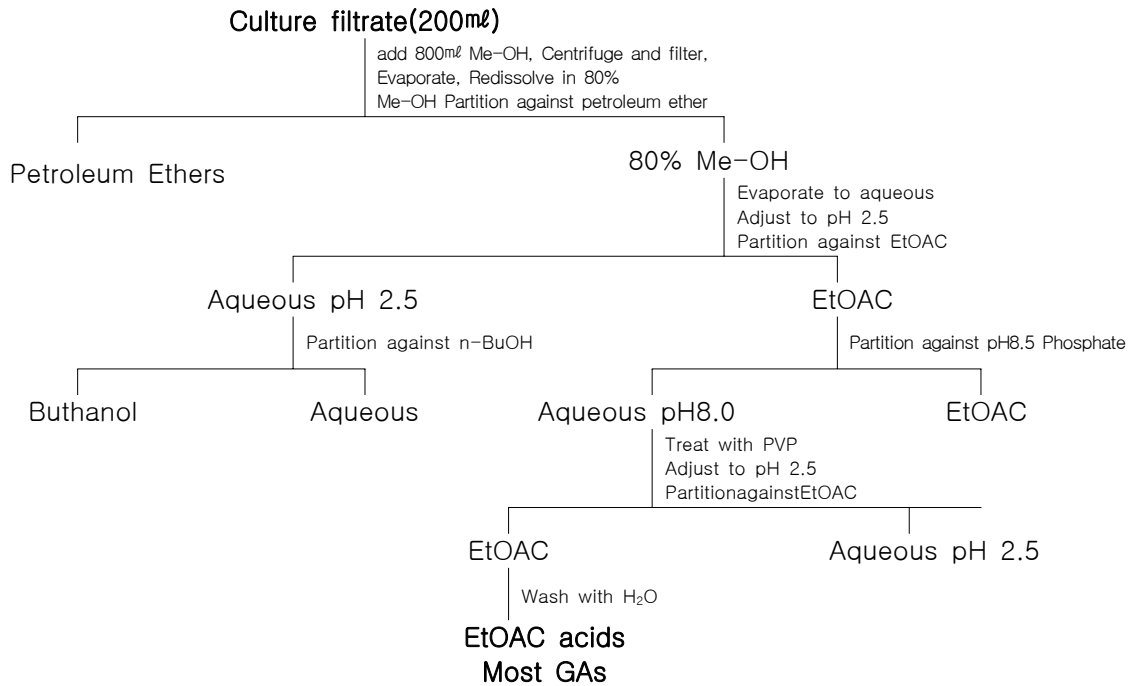


그림 2. Gibberellin 분리과정

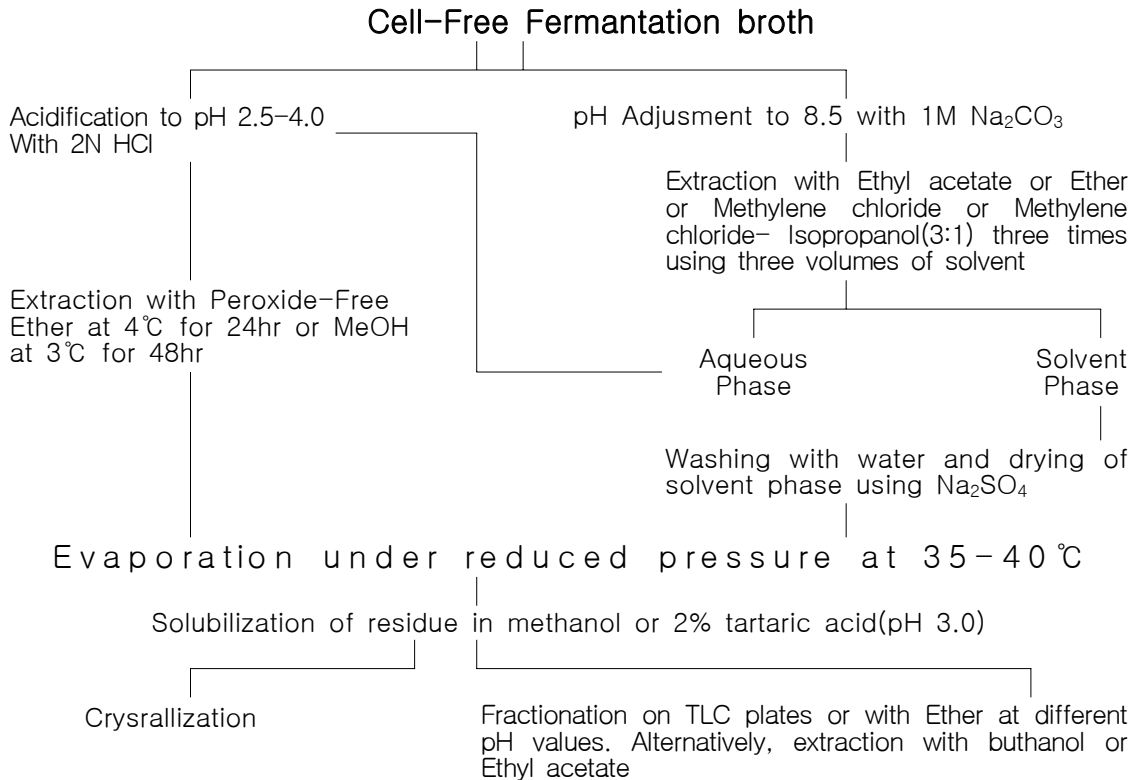


그림 3. 미생물발효에 의한 Auxin 분리과정

라. Auxin과 Gibberellin 유사체 추출

Tryptophan을 첨가하지 않은 배지에서 준비한 세균배양여액은 1N HCl로 pH 2.0-3.0으로 조정된 다음 Peroxide free ethyl ether 100ml로 2번 추출하였다. Ether 추출물은 40-45°C에서 진공건조시키고 잔류물은 2ml Methanol에 녹여 Auxin조사자료로 사용하였다. L-Tryptophan을 첨가한 배지에서 준비한 배양여액은 100ml Ethyl acetate로 2회 더 추출하여 Ether 추출물과 합한 후 40-45°C에서 진공건조시키고 잔류물은 2ml Methanol에 녹여 조사자료로 준비하였다.

공팡이 배양배지에 함유된 페놀성분물질은 Polyclar AT(water-insoluble Polyvinylpyrrolidone)으로 제거하고, 이를 위해서 Ether와 Ethyl acetate로 추출하여 건조시킨 재료들을 0.5M Phosphate buffer(pH 8.0) 5ml에 녹인 후 0.1M Phosphate buffeer(pH 8.0) 50 ml에 Polyclar AT을 1-2g 첨가한 곳에 녹여 2-3시간 진탕한다. Schott's filter로 거르고 Ether나 Ethyl acetate 2회 추출하여 건조하고 2ml Methanol에 녹인다. 모든 추출물에는 소량의 Kupral결정을 첨가하였다(Diethyldithocabamate-Na:salt)

마. Auxin유사체 분리 및 생물검정

Methanol에 녹여 준비한 시료 0.2ml(15ml배양여액 함유량)를 Whatman No. 3 Filter paper에 loading하고, 전개용매는 Isopropanol: Ammonia: Water(10:1:1 v/v/v)를 사용하였다. 전개는 암조건하에서 25cm이상 진행되게하였고, 밤새(12시간이상)송풍건조하였다. 건조된 Filter paper는 10등분하고 각 분획은 2% saccharose용액 4ml로 추출하였다. 추출물에 있는 Auxin은 Avena coleoptile test(Nitch 등, 196)으로 확인하였다. 생산된 Auxin양은 IAA(Indoleacetic acid, Fisher Scientific company, USA) Standard dose curve로 측정하였다. 최종적으로 배지 1ml와 건량 1g당 IAA equivalents(E.IAA)로 표시하였다. 처리간 차이는 LSD(P=0.05)로 판정하였다.

바. Gibberellin 유사체 분리 및 생물검정

Methanol에 녹여 준비한 시료 0.3ml를 MN-Kieselgel G(Macherey, Nagel and Co., GFR)로 박피처리한 유리판에 loading 한 후 Chloroform: Acetic acid: Ethyl acetate(90:10:5 v/v/v)로 10cm이상 전개시키고 송풍하면서 48시간 건조시킨다. TLC판은 10등분하여 각분획은 증류수로 추출하고 Gibberellin활성은 Lettuce hypocotyl test (Frankland 등, 1960)로 확인하였다. Giberellin의 총량은 GA₃ (Gibberellic acid, Eastman organic chemicals, Rochester 3. New York) 표준반응곡선으로 판정하였고, 최종적으로 배지 1ml와 건량 1g당 GA₃ equivalents(E.GA₃)로 표시하였다. 처리간 차이는 LSD(P=0.05)로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

종자표면에 균체를 처리하였을 때 발아촉진효과를 유도한 *Bacillus* sp.2019 등 근권세균들을 액체배양하고, 균체를 완전히 제거한 배양여액을 종자에 처리하여 발아율을 조사한 결과(표 1, 2), 도라지의 발아율은 무처리구(58.3%)에 비해 발아율이 향상되었다. 특히 Nutrien broth에 L-Tryptophan을 첨가한 배지의 배양여액에서 발아율 높아지고 Ethyl aceate로 추출하여 처리한 종자의 발아율도 84%이상의 높은 발아율을 보였다.

더덕과 도라지는 발토양에서 시험조건보다 발아율이 낮았다. 이는 토양내에서 종자주변 환경요인에 기인하는 것으로 예측된다. 세균배양여액을 처리한 종자들은 토양내에서 발아율이 75% 이상으로 무처리 처리구에 비해 발아율 현저히 증가하여 분리한 세균균주들은 종자전처리 물질생산의 재료로 확인되었다.

표 1. 도라지, 더덕 세균배양여액 및 유기용매 추출물질 발아촉진효과

분리균주	파 종	도라지 발아율(%)				더덕 발아율(%)			
		배양여액			NBT배양후 여액 EA추출물	배양여액			NBT배양후 여액 EA추출물
		NB	KB	NBT		NB	KB	NBT	
<i>Bacillus</i> sp.2019	습실처리	80.3	89.8	92.4	87.6	87.4	92.7	98.7	87.6
	발 토 양	68.7	70.6	67.8	62.8	72.6	80.4	77.3	74.2
<i>B.</i> <i>mycooides</i> 0412	습실처리	-	80.7	86.7	92.4	-	92.4	90.2	84.7
	발 토 양	-	68.7	75.4	74.2	-	86.5	84.5	82.7
<i>B.</i> <i>mycooides</i> 0023	습실처리	-	83.2	89.4	90.6	-	94.3	89.7	92.6
	발 토 양	-	82.4	76.8	83.7	-	75.4	80.6	80.3
<i>B.</i> <i>mycooides</i> 0124	습실처리	-	84.3	87.6	95.7	-	96.0	94.3	94.7
	발 토 양	-	58.3	82.6	78.6	-	68.6	65.7	74.2
<i>B.</i> <i>pumilus</i> 3013	습실처리	85.3	82.7	92.8	94.4	92.6	90.8	96.7	89.2
	발 토 양	62.7	65.4	60.5	65.7	76.4	70.4	80.7	83.4
<i>B.</i> <i>pumilus</i> 0125	습실처리	88.7	82.4	88.6	86.7	89.7	93.3	100	76.5
	발 토 양	67.2	73.4	70.3	68.7	82.6	76.7	68.4	70.2
<i>B.</i> <i>megatherium</i> 007 2	습실처리	85.8	80.2	84.7	89.2	92.0	89.7	92.8	92.4
	발 토 양	72.8	68.7	76.2	72.4	74.7	83.5	76.7	80.3
<i>B.</i> <i>subtilis</i> 0129	습실처리	82.6	89.8	90.6	84.5	94.8	92.4	87.6	92.6
	발 토 양	65.4	69.7	70.4	69.7	58.6	62.7	68.5	82.7
<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> 0314	습실처리	81.6	86.7	95.2	90.7	94.2	96.5	94.2	95.4
	발 토 양	62.6	76.4	68.7	80.2	62.4	70.3	68.5	73.4

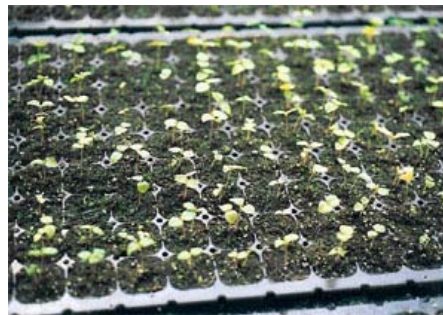
표 2. 참깨 세균배양여액 및 유기용매 추출물질 발아촉진효과

분리균주	파 종	참깨 발아율(%)			
		배양여액			EA 추출물
		NB	KB	NBT	
<i>Bacillus</i> sp.2019	습실처리	97.1	94.7	93.3	92.7
	발 토 양	90.6	94.4	94.2	94.7
<i>B. mycooides</i> 0412	습실처리	-	97.3	90.7	94.7
	발 토 양	-	85.7	87.7	87.6
<i>B. mycooides</i> 0023	습실처리	-	89.3	89.6	87.9
	발 토 양	-	94.6	86.5	91.5
<i>B. mycooides</i> 0124	습실처리	-	93.7	92.5	92.7
	발 토 양	-	90.6	97.3	86.7
<i>B. pumilus</i> 3013	습실처리	89.7	93.6	91.0	87.0
	발 토 양	86.3	86.4	94.2	94.3
<i>B. pumilus</i> 0125	습실처리	92.7	90.7	87.4	94.5
	발 토 양	87.6	89.3	89.7	87.6
<i>B. megatherium</i> 0072	습실처리	89.0	89.0	96.8	92.6
	발 토 양	94.7	78.7	93.7	78.6
<i>B. subtilis</i> 0129	습실처리	94.6	92.0	97.3	94.7
	발 토 양	94.6	70.2	90.0	80.7
<i>Pseudomonas putida</i> 0314	습실처리	92.3	94.6	98.6	90.0
	발 토 양	86.4	68.3	92.3	92.7

Nutrient broth와 PDA를 혼합하여 준비한 PDNB배지에 분리균주들을 배양하여 준비한 배양여액에서 Ethyl acetate로 추출한 물질을 종자에 처리하여 토양에 파종하면 도라지, 더덕의 출현율은 현저히 증가하나(그림 4), 참깨의 경우 *B. megatherium*0072와 *B. subtilis*0129을 처리하였을 때 출현율이 감소하였다(표 3).



도라지



더덕

그림 4. 미생물배양여액처리종자 발아율조사

공시한 균주들의 발아촉진물질 생산능은 곰팡이 균주들이 높았다. 세균의 경우 질소원이 풍부한 배지에서 단위부피 당 생산량이 많았으며, L-tryptophan을 첨가해준 배지에서 *B. mycooides*의 생산능은 증대되었고(표 4), 생산물질의 발아율 향상능도 높았다. 곰팡이의 경우 탄소원으로

Glycerol을 첨가해준 배지에서 생육이 왕성하고, 물질생산능도 증대되어 *Aspergillus*균의 경우 탄소원으로 Sucrose만을 첨가한 CPDB배지에서 보다 70% 증수되었다(표 6). 정제된 Gibberellic acid 유사물질들 중 비수용성물질들의 발아촉진효과가 높았으나, *Bacillus*균들이 생산하는 물질들은 극성 Gibberellic acid 유사물질들도 도라지의 발아율을 크게 높여주었다(표 8, 그림 5).

표 3. PDNB액체배양 후 Ethyl acetate 추출물 출현율촉진효과

분리균주명	출현율(%)		
	도라지	더덕	참깨
<i>Bacillus</i> sp.2019	62.8	74.2	94.7
<i>B. mycooides</i> 0412	74.2	82.7	87.6
<i>B. mycooides</i> 0023	83.7	80.3	91.5
<i>B. mycooides</i> 0124	78.6	74.2	86.7
<i>B. pumilus</i> 3013	65.7	83.4	94.3
<i>B. pumilus</i> 0125	68.7	70.2	87.6
<i>B. megatherium</i> 0072	72.4	80.3	78.6
<i>B. subtilis</i> 0129	69.7	82.7	80.7
<i>Pseudomonas putida</i> 0314	80.2	73.4	92.7
무처리	58.3	60.2	84.3

표 4. 액체크로마토그래피에 의한 발아촉진 미생물 대사산물 분리 (mg/l)

균주	배양배지	추출양(mg)	
		n-Butanol	Ethylacetate
<i>Bacillus mycooides</i>	NB	62.5	27.8
	NBT	71.2	65.0
	Medium B	41.7	29.5
<i>B. megatherium</i>	NB	60.5	41.7
	NBT	54.5	43.5
	Medium B	45.7	31.5
<i>Pseudomonas putida</i>	NB	60.7	40.5
	NBT	47.2	53.5
	Medim B	33.0	36.5
<i>Trichoderma</i> sp.	PDG	113	148
	PDB	94	106
	CPDB	57	87
<i>Aspergillus</i> sp.	PDG	162	116
	PDB	105	162
	CPDB	86	78

표 5. 곰팡이 Methanol 추출물질에 의한 도라지 발아촉진효과

분리균주	처 리	배양배지		
		PDA	PDAM	PDAG
TRICHO 16	습실처리	85.4	80.6	87.6
	발 토 양	76.2	85.7	68.7
UKFUN 9	습실처리	87.8	82.4	85.9
	발 토 양	74.8	82.7	69.2

표 6. 미생물대사산물 추출용매내 각 물질의 도라지 발아촉진효과

균 주	배양배지	발아율(%)	
		n-Butanol	Ethylacetate
<i>Bacillus mycooides</i>	NB	64	90
	NBT	97	94
	Medium B	63	89
<i>B. megatherium</i>	NB	90	94
	NBT	96	98
	Medium B	91	90
<i>Pseudomonas putida</i>	NB	89	97
	NBT	71	90
	Medium B	88	83
<i>Trichoderma hamatum</i>	PDG	87	95
	PDB	95	83
	CPDB	82	94
<i>Aspergillus niger</i>	PDG	92	87
	PDB	79	93
	CPDB	90	83
0.2M KOH		75	
100ppm Gibberellic acid		93	

표 7. 곰팡이 Methanol 추출물질에 의한 더덕, 참깨 발아촉진효과

분리균주	처 리	더덕			참깨		
		PDA배지	PDAM	PDAG	PDA	PDAM	PDAG
TRICHO 16	습실처리	95.7	90.0	96.8	94.3	89.2	94.8
	발 토 양	73.1	76.7	82.7	83.7	86.3	89.7
UKFUN 9	습실처리	92.4	92.8	94.6	93.6	92.7	90.3
	발 토 양	76.7	72.8	90.3	79.7	91.5	84.3

표 8. *B. mycooides*0023 생산 Gibberellin 유사물질 발아촉진효과

작 물	발아율(%)			
	0ppm	100ppm	200ppm	300ppm
도라지	56.2	84.3	94.3	87.5
더 덕	64.7	87.4	90.4	89.7
참 개	92.4	93.8	92.7	94.3

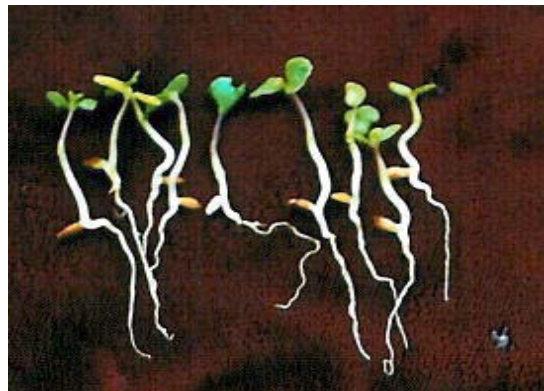


그림 5. Gibberellin 유사체 더덕 발아율조사

4. 적 요

균체처리시 발아율을 높여주는 세균균주들을 탄수화물과 질소원이 풍부한 PDN배지에 배양하여 Ethylactate로 추출한 후 종자에 처리하여 발토양에 파종하면 발아율이 현저히 증가하고 특히 *B. mycooides*0023은 도라지에 처리한 결과 25%이상의 높은 발아촉진효과를 보였다. 공시한 균주들의 발아촉진물질 생산능은 곰팡이 균주들이 높았다. 세균의 경우 질소원이 풍부한 배지에서 단위부피 당 생산량이 많았으며, L-tryptophan을 첨가해준 배지에서 *B. mycooides*의 생산능은 증대되었고 산물질의 발아율 향상능도 높았다. 곰팡이의 경우 탄소원으로 Glycerol을 첨가해준 배지에서 생육이 왕성하고, 물질생산능도 증대되어 *Aspergillus*균의 경우 탄소원으로 Sucrose만을 첨가한 CPDB배지에서 보다 70% 증수되었다. 정제된 Gibberellic acid 유사물질들 중 비수용성물질들의 발아촉진효과가 높았으나, *Bacillus*균들이 생산하는 물질들은 극성 Gibberellic acid 유사물질들도 도라지의 발아율을 크게 높여주었다. 이 균주가 생산하는 물질을 박층크로마토그래피(Benzen-Buthanol: Aetic acid=16:3:1, silica gel)로 분리한 결과 Rf=0.2인 분리물질이 발아촉진효과를 보여 100ppm 처리시 20~28%의 발아촉진효과를 보였다.

5. 인용문헌

- Beyeler M., P. Michaux, C. Keel, and D. Haas(1997)** Effect of enhanced production of indole-3 acetic acid by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO on plant growth. In the 4th PGPR Int. Workshop organizing committee. 310-312
- Brandle, M.T. and S. E. Lindow(1996).** Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indol-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. Applied environmental Microbiology 62, 4121-4128.
- Chanway, C.P.(1997)** Introduction of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. Forest Science 43(1), 99-112.
- Costacurta A., V. Keijers, and J. Vanderleyden(1994).** Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilens* indole-3-pyruvate decarboxyase gene. Molecular and General Genetics 24, 463-472.
- Costacurta A., and Vanderleyden, J. (1995)** Synthesis of Phytohormones by plant associated bacteria. Critical reviews in Microbiology 21, 1-18.
- Dubeikovsky A.N., E.A. Mordukhova, V.V. Kochetkov, F.Y. Polikarpova, and A.M. Boronin(1993)** Growth promotion of black current softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. Soil Biology and Biochemistry 25, 1277-1281.
- Fett W.F., S.F. Osmann, and M.F. Dunn(1987)** Auxin production by plant pathogenic Pseudomonads and Xanthomonads. Applied and Environmental Microbiology 53, 1839-1845.
- Glick, B.R.(1995)** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian ournal of Microbiology 41, 109-117.
- Grabe,J.E., and Ropers, H.J.(1989)** Gibberellins. In Phytohormones and related compounds(D.S. Letham, P.B. Goodwin, and T.J.V. higgins, eds.), Elsevier, Amsterdam,107-204.
- Handelsman, J., and Stabb, E.V. 1996.** Biocontrol of soil-borne plant pathogens. The Plant Cell 8. 1855-1869
- Hirai, N.(1986)** Abscisic acid. In Chemistry of plant hormones(N. Takahashi, ed.) CRC press, Boca Ranton, 201-247.
- Kobayashi M., T. Suzuki, T. Fujita, M. Masutda, and S. Shimizu(1995)** Occurance of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrilie in plant associated bacteria *Agrobacterium* and *Rhizobium*. Proceedings of National Academy of Sciences USA 92, 714-718.
- Koga, J., T. Adachi, H. Hidaka(1991)** Molecular cloning of the gene for indolepyruvate

- decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. Molecular and General Genetics 226, 10–16.
- Kumar, P.K.R., and Lonsane, B.K. 1989.** Microbial production of Gibberellic acid: State of art. In advances in applied microbiology, Vol.34(S.L.Neidelman ed.). Academic Press, New York, 29–139.
- Lenton, J.R., V.M. Perry, and P.F. Saunders(1971)** The identification and quantitative analysis of abscisic acid in plant extracts by gas–liquid chromatography. Planta, 96:271–280.
- Loper J.E., and M.N. Schroth(1986)** Influence of bacterial sources of indole–3–acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathology 76, 386–389.
- Maringui, P., G. Lahuesses, Berge, O. and Heuli, T.(1992)** Genetic and pathotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and wheat rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology 58, 1894–1903.
- Nickell, L.G. (1978)** Plant growth regulators. Chem.Eng. News. 56(41):18–34.
- Nickell, L.G. (1982)** Plant growth regulators:Agricultural uses. Springer–Verlag, Berlin, 1–173
- Nickell, L.G. (1983)** Plant growth regulating chemicals, Vols. 1 and 2. CRC Press, Boca Raton, 1–280 and 1–256.
- Ohkuma, K., J. L. Lyon, F. T. Addicot, and O. E. Smith(1963)** Abscisin II, an abscission–accelerating substance from young cotton fruit. Science, 142:1952–1953.
- Okon Y., and Y. Kapulnik(1986)** Development and function of *Azospirillum*–inoculated roots. Plant and Soil 90. 3–16.
- Patten C.L., and B.R. Glick(1996)** Bacterial biosynthesis of indole–3–acetic acid. Canadian Journal of Microbiology 42, 207–220.
- Sarwar M., and R.J. Kremer(1999)** Enhanced suppression of plant growth through production of L–tryptophan–derived compounds by deleterious rhizobacteria. Plant and Soil. 172, 261–269
- Scott T.K.(1972)** Auxins and roots. Annual Review of Plant Physiology. 23, 235–258.
- Vande Broek, A., and J. Vanderleyden(1995)** Review : Genetics of the *Azospirillum*–plant root association. Critical reviews in Plant Science 14, 445–466.
- Xie H. J.J. Pasternak, and B.R. Glick(1996)** Isolation and characterization of mutants of the plant growth–promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* CR12–2 that overproduce indoleacetic acid. Current Microbiology. 32, 67–71.
- Yamada T., C.J. Palm, B. Brooks, and T. Kosuge(1985)** Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homologies with *Agrobacterium tumefaciens* T–DNA, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 82, 6522–6526.