

소나무 유묘에서 송이 외생균근 형성 균주의 선발

가강현^{1*} · 박현¹ · 허태철² · 박원철¹

¹국립산림과학원 화학미생물과, ²경북대학교 농업과학기술연구소

Selection of Ectomycorrhizal Isolates of *Tricholoma matsutake* and *T. magnivelare* for Inoculation on Seedlings of *Pinus densiflora* *In Vitro*

Kang-Hyeon Ka^{1*}, Hyun Park¹, Tae-Chul Hur² and Won-Chull Bak¹

¹Division of Wood Chemistry and Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

²Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook University, Daegu 702-701, Korea

(Received December 3, 2007. Accepted October 6, 2008)

ABSTRACT: We inoculated hyphal suspension of *Tricholoma matsutake* and *T. magnivelare* were examined on *Pinus densiflora* seedlings grown in a granite soil substrate with 1/2 PDMP (12 g/l potato dextrose broth, 1.5 g/l malt extract, and 0.5 g/l peptone) medium. Four months after inoculation, the pine seedlings were examined for infection rate, matsutake aroma, and Hartig-net formation. The roots of pine seedling formed ectomycorrhizal roots in the 9 isolates from 12 isolates of *T. matsutake* and *T. magnivelare*. However, the seedlings showed different ectomycorrhizae forming rates among the 9 isolates. While matsutake aroma was confirmed from the ectomycorrhizal seedlings, the pine seedling contaminated by bacteria or fungi did not form matsutake ectomycorrhizae with sickening smell. Thus, the aroma was chosen as a good way for the verification of mycorrhizal infection. At the early stage, the mycorrhizal roots showed unramified and branched types without root hair. They also showed thin mantle layers, Hartig-nets, and turned into black color at later stage. Among the examined strains, that of Yecheon isolated in 1995 showed the best infection rate, which indicated that we need to pay attention to the selection of isolates for better result.

KEYWORDS : Ectomycorrhizal formation, *Pinus densiflora*, *Tricholoma magnivelare*, *Tricholoma matsutake*

동북아시아에서 송이는 매우 고가의 버섯이기 때문에 인공재배를 위한 시도들이 많이 이루어졌지만 아직까지 성공하지 못한 상태이다. 그러나 최근에 소나무 유묘에 송이 균근을 형성시키는 연구가 많이 진척되어 송이 인공재배의 가능성을 한층 높여주고 있다(Yamada *et al.*, 1999; Guerin-Laguette *et al.*, 2000; Vaario *et al.*, 2000; 가 등, 2002).

뉴질랜드에서는 소나무와 라디아타소나무에 송이균근 형성을 성공하였고(Wang *et al.*, 1997), 일본에서는 Yamada 등(1999)이 소나무에 송이 균근을 2개월만에, Vaario 등(2000)은 2주만에 성공하였다(Guerin-Laguette *et al.*, 2000). 그러나 이들 기술들은 모두 특허권 문제로 우리가 쉽게 사용하기 어려운 실정이다. 아울러 송이 균근 형성 기술도 복잡하여 쉽게 사용하기가 어렵다.

한편, 우리나라는 1996년 동해안 산불과 2000년 동해안 산불로 인해 막대한 송이산이 피해를 입었다(임업연구원, 1996; 동해안산불피해지 공동조사단, 2000). 그래서

앞으로 피해 입은 송이산을 빠른 시일 안에 복원할 수 있는 방법이 필요하다. 하나의 방법으로 송이 접종묘를 이용한 접근법이 가능할 것으로 판단된다. 이에 따라 국내에서도 송이 접종묘목을 만드는 방법에 대한 연구가 1990년대 중반부터 진행되어 왔으며, 이에 따라 PDMP 배지를 이용한 송이 접종묘 생산기술이 학술대회 등을 통하여 발표된 바 있다(가 등, 2002).

본 연구는 국내외에서 수집된 균주를 이용하여 송이 접종묘를 만들 수 있는 방법을 구체적으로 제시하고, 균주 간에 송이 균근을 형성률에 차이가 있음을 보고하는 것이다. 본 보고에서 제시하는 송이 균근 형성기술은 기존의 학계에 보고된 방법보다 단순하여 후속 연구자들이 쉽게 이용할 수 있을 것으로 생각한다.

재료 및 방법

소나무 종자 발아

소나무 종자는 2001년 왕산 채종원의 것으로 1일간 수돗물에 침수시킨 다음 물 속에 가라앉은 것만 골라서 정

*Corresponding author <E-mail : kalichen@yahoo.co.kr>

선하였다. 정선된 종자는 30% H₂O₂에서 20분간 표면살균하고, 바로 PDA 배지에 치상하여 20°C 조건으로 발아를 유도하였다. 소나무 종자는 5일 이후부터 발아하기 시작하여 10일 정도 지나면 대부분이 발아되었다. 무균적으로 발아된 종자는 마사토양을 기본으로 준비하여 멸균한 1.2 l 조직배양 병에 옮겼다.

배지 조제 및 송이균 접종

배지의 기본배질은 마사토이며, 직경 4 mm 체로 쳐서 통과된 토양을 풍건시킨 후 1.2 l 조직배양 병에 600 ml씩 넣었다. 배지는 PDMP 배지(24 g Potato dextrose broth, 3 g Malt extract, 1 g Peptone, 증류수 1 l, pH 5.5)를 1/2로 희석한 후 토양 용적량의 1/10에 해당하는 양을 넣었다.

송이균 접종은 소나무 발아묘목을 조직배양 병에 이식한 후 정상적으로 어린 싹이 발생한 것에 소나무 주변 4방위와 중앙에 각각 1 ml씩, 총 5 ml를 접종하였다. 이 실험에 사용된 송이 균주는 12균주이었으며, 각 균주는 MMN (sucrose 대신 glucose 첨가) 액체배지에서 2개월간 배양된 균주를 사용하였다(Table 1; Marx, 1969). 각 처리는 균주 당 4반복으로 수행되었으며, 소나무와 송이균이 접종된 조직배양 병은 3,500 lx, 24시간 광조건의 23°C에서 4개월간 배양하였다.

송이 균근 형성을 조사

송이 균근 형성유무는 4개월 배양 후 각 배양 병에서 소나무를 수확하여 뿌리 주변의 토양을 제거한 다음 해부현미경 20배 아래에서 관찰하였다. 이 중 외형상 송이균근이 형성된 것으로 판단되는 것은 동결마이크로톰(Leica CM 1900)을 이용하여 20 µm 크기로 절단 후 광학현미경(Leica DMRE) 상에서 하티그넷 등 뿌리 내부조직의 변

화를 관찰하였다. 또한 조직배양 병에서 토양을 제거하는 과정에서 송이 향기의 유무를 정성적인 방법으로 판단하였으며, 감염률은 뿌리 전체 중 감염된 부분의 비율로 계산하였다.

결과 및 고찰

송이 균근 형성 균주 선발

송이 균근 형성은 12개 균주 중 9개 균주에서 성공하였으며, 송이 균근 형성 정도는 균주별로 차이가 있었다



Fig. 1. Culture bottle after 4 months. The seedlings of *Pinus densiflora* with mycelium of *Tricholoma matsutake*. Bar = 5 cm.

Table 1. Isolates and ectomycorrhizal status of *Tricholoma matsutake* and *T. magnivelare* used in ectomycorrhizal synthesis in the 1/2 PDMP medium for 4 months

| Isolate number | Origin of basidiocarp | Year of isolation | Number of matsutake ectomycorrhizae observed | Mycorrhizal status | Infection rate (%) | Smell of <i>T. matsutake</i> |
|----------------|-----------------------|-------------------|--|--------------------|--------------------|------------------------------|
| KFRI 421 | Yecheon | 1995 | 4(0)† | ecto | 65‡ | Yes |
| KFRI 431 | Hongcheon | 1995 | 1(3) | ecto | 2.5 | Yes |
| KFRI 432 | Hongcheon | 1995 | 4(0) | - | 0 | No |
| KFRI 435 | Uljin | 1996 | 2(2) | ecto | 5 | Yes |
| KFRI 439 | Yeongdong | 1996 | 3(1) | ecto | 13.8 | Yes |
| KFRI 440 | Yeongdong | 1996 | 1(3) | ecto | 12.5 | Yes |
| KFRI 445 | Japan | 1996 | 3(1) | - | 0 | No |
| KFRI 457 | Oregon, U.S.A | 1996 | 2(2) | ecto | 10 | Yes |
| KFRI 458 | Oregon, U.S.A | 1996 | 2(2) | - | 0 | No |
| KFRI 449 | Oregon, U.S.A | 1997 | 1(3) | ecto | 10 | Yes |
| KFRI 461 | Kyeongju | 1997 | 2(2) | ecto | 12.5 | Yes |
| KFRI 462 | Cheongdo | 1996 | 2(2) | ecto | 20 | Yes |

†This experiment was done by four replicates. The parentheses indicate total number of bottle contaminated by bacteria or fungi. All contaminated bottles did not form matsutake ectomycorrhizae.

‡Infection rate was observed by the external appearance indicates the mean of four replicates.

(Table 1, Fig. 1). 감염률이 가장 높았던 균주는 예천에서 수확한 자실체로부터 1995년 분리하나 균주이었으며 그 감염률은 65%로 다른 균주에 비하여 훨씬 높은 비율을 나타내어 균주 간에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

송이 균근 형성이 많이 된 것은 송이 향기도 매우 진하게 발생하였다. 따라서 송이 향기 유무를 가지고도 송이 균근 형성 유무를 판단 할 수 있었다. 그러나 송이 균근 형성이 안된 것은 조직배양 병에서 역겨운 냄새가 발생하였고, 사상균 보다는 주로 세균 오염이 많았다(Table 1). 송이 균근이 형성된 부분은 뿌리털이 없고, 송이 균이 감염되지 않은 뿌리 부분은 많은 뿌리털이 발달되었다. 세균 및 사상균에 오염된 것은 모두 송이 균근 형성이 되지 않았고, 송이 균근 형성에 치명적인 영향을 주는 것으로 나타났다.

송이 균근의 관찰

소나무 유묘를 이용하여 만들어진 균근은 국내 자생송이와 미국송이에서 구분하기 어려울 정도로 매우 유사하였고, 좀더 시간이 경과하면 야외에서 관찰되는 송이균근 모양으로 진행될 것으로 예상되었다. 송이 균근은 발달되면서 균근 표면이 검은색으로 변하였다. 한편, 소나무 유묘는 별도의 수분공급 없이 조직배양병 속에서 2년 이상 생장이 가능하였다.

국내 자생 송이균주를 이용하여 소나무 유묘에 형성된 외생균근은 비분지형과 가지 친 모양으로 직경은 0.29~0.33 mm이었다(Fig. 2A). 외생균근의 표면은 황갈색~검은색이었고 백색의 송이균사에 의해 덮여 있었다. 맨들층은 5~25 μm 두께이었고, 피층세포는 50~75 μm 두께로 하티그넷이 관찰되었다(Fig. 2B). 표피세포는 갈색화가

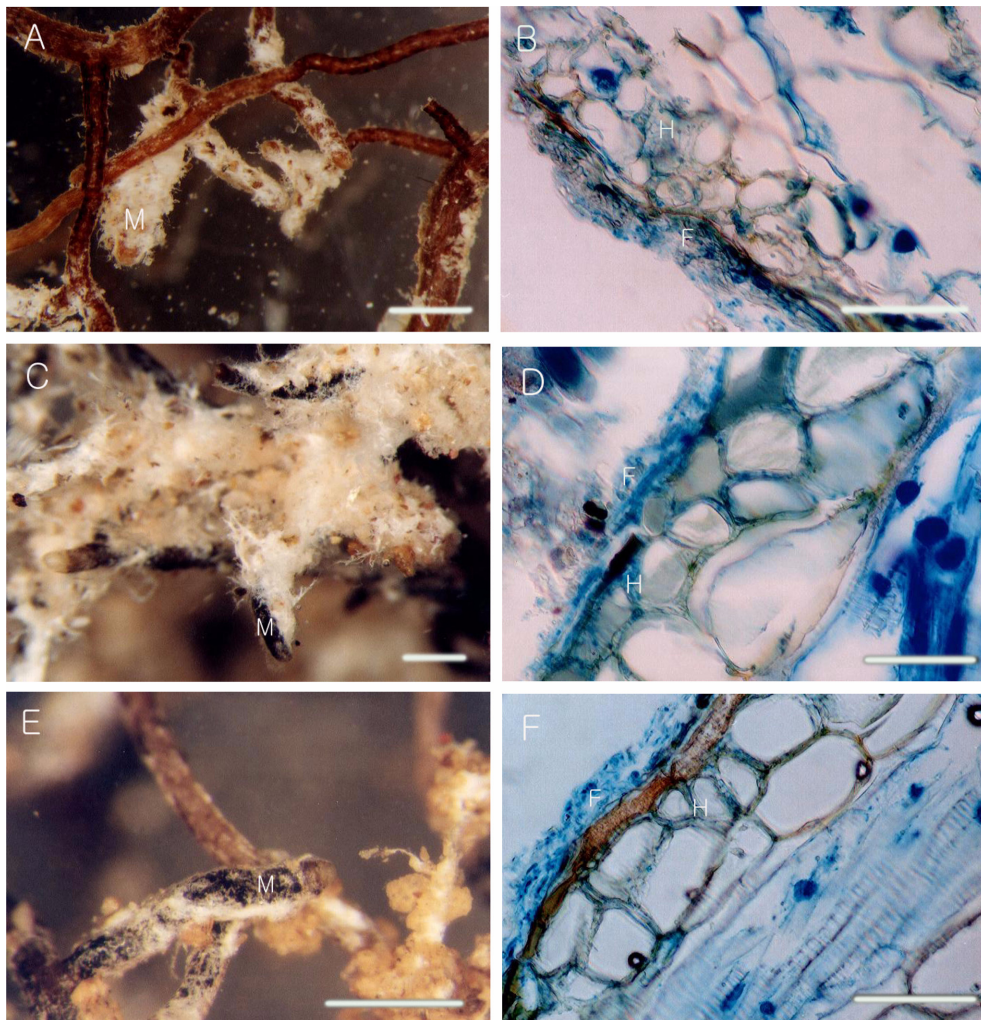


Fig. 2. Ectomycorrhizal formation of *Tricholoma matsutake* and *T. magnivelare* with *Pinus densiflora* seedling *in vitro*. A, Ectomycorrhizae (M) of *T. matsutake* KFRI 421. Bar = 0.5 mm; B, Fungal mantle (F) and Hartig net (H) staining with cotton blue of label A ectomycorrhiza. Bar = 50 μm ; C, Ectomycorrhizae (M) of *T. magnivelare* KFRI 459. Bar = 0.5 mm; D, Fungal mantle (F) and Hartig net (H) staining with cotton blue of label C ectomycorrhiza. Bar = 50 μm ; E, Ectomycorrhizae in natural fairy ring of *T. matsutake*. Bar = 0.5 mm; F, Fungal mantle (F) and Hartig net (H) staining with cotton blue of label E ectomycorrhiza.

진행되었다.

미국송이를 이용하여 소나무 유묘에 형성된 외생균근은 비분지형과 가지 친 모양으로 직경 0.32~0.42 mm이었다 (Fig. 2C). 외생균근의 표면은 국내 송이에 의해 만들어진 외생균근과 동일하였다. 맨틀층은 5~20 μm 두께이었고, 피층세포는 70~100 μm 두께로 하티그넷이 관찰되었다 (Fig. 2D). 포피세포는 갈색화가 진행되었다.

송이 발생지의 송이 균환 내 송이 균근은 매우 심하게 차상분지형으로 발달되었고 직경 0.28~0.35 mm이었다 (Fig. 2E). 외생균근의 표면은 갈색~검은색이었고 백색의 송이균사체가 덮여 있었다. 맨틀층은 12 μm 두께 내외 이었고, 피층세포는 75~100 μm 두께로 하티그넷이 관찰되었다 (Fig. 2F). 포피세포는 암갈색이었다.

4개월만에 관찰된 송이 균근은 단순형과 가지 친 모양을 가지고 있었고, 구(2005)가 보고한 것과 같은 빗자루형으로 발달된 것은 야외 송이 균환 내 송이 균근에서 관찰되었지만, 접종 4개월 후의 송이 균근에서는 확인할 수 없었다. 가지 친 모양이 좀더 발달하면 위와 같은 모양으로 발전할 수 있을 것으로 추측되었다. 따라서 조직배양병 속에서 만들어진 송이 균근은 전형적인 외생 균근을 만들었다.

송이 균근 형성 방법

Yamada 등(1999)은 배양병 내에서 송이 균근이 전형적인 외생균근을 형성하는 것으로 보고하고 있으나, 송이 향기 유무의 언급은 없다. 본 연구에서는 송이 균근이 전형적인 외생균근을 만들었고, 야외 토양에서 발견된 송이 균근과 매우 유사한 모양을 가졌다. 그리고 본 연구는 배지를 PDMP를 이용하였고, Yamada 등(1999)은 MNC 배지를 이용한 것에서 차이점을 가지고 있다.

Guerin-Laguette 등(2000)은 송이 균근 합성에서 탄소원이 없는 배지를 이용한 것이 균근 합성의 시기를 촉진시키며, 야외에 적용 시 다른 미생물의 오염원 발달을 제어하는데 도움을 주어 좋을 것으로 추측하고 있다. 한편, Yamada 등(1999)은 송이균근 합성에서 탄소원이 없는 배지에서는 송이균근이 형성되지 않았으나, 포도당이 2~10 g/l 첨가된 배지에서는 송이균근의 형성을 보고하였다. 즉, 그들은 실험실 조건에서는 송이균근을 형성하는데 탄소원이 필요하다고 서술하였다. 본 연구는 배지에 풍부한 탄소원이 포함되어 있는 상태로 송이균근 형성시에 어린 소나무에서 받는 탄소원이 매우 적을 것으로 예상되며, 실험실 조건에서 풍부한 균근 형성을 위해서는 탄소원이 필요한 것으로 판단되었다. 한편, 국내에서는 경북산림환경연구소가 인공토양과 탄소원이 포함된 복잡한 배지를 이용하여 송이균근을 형성하였다(박 등, 2003; 천 등, 2003). 이 방법은 특허등록된 것으로 다른 연구자가 쉽게 접근하기는 어려운 상태이다. 본 연구의 방법은 누구나 사용할 수 있는 방법이고 일본과 견주어 보았을 때도 결코 뒤지지 않는 방법으로 판단된다.

송이 균근 합성에서 사용된 배지 매질은 Yamada 등(1999)과 Vaario 등(2000)은 인공 토양을 이용하였고, Guerin-Laguette 등(2000)은 소나무림 토양을 이용하였다. 본 연구도 후자와 같은 소나무림 토양을 이용하였다. 송이 향기는 송이균이 소나무 뿌리에 외생균근을 형성하면서 더욱 강해지는 것으로 확인되었다. 송이균의 단독 배양에서는 송이 균환에서 맡을 수 있을 정도로 강한 송이 향기를 가지고 있지 않았다. 그래서 송이향기 유무를 가지고도 송이 균근의 형성유무를 판별할 수 있는 중요한 지표가 될 수 있었다.

Yamada 등(1999)이 소나무에 송이 균근을 2개월만에 형성하였다고 보고하였고, Vaario 등(2000)은 2주만에 송이 균근을 형성하여, 매우 빠른 송이 접종묘 생산 방법을 제시하였다. 본 연구는 4개월이 경과된 시점에서 관찰한 것이므로 아마도 그 이전에 송이 균근이 형성되었을 것으로 판단되나, 송이 균근이 몇 일만에 형성되는 지는 좀더 조사할 필요가 있었다. 하지만, 위의 방법들에 비해 본 연구에서 사용한 방법은 기존에 알려진 방법들에 비해 매우 단순하다는 장점을 가지고 있다.

적 요

토양매질에 1/2 PDMP 배지를 넣고 소나무 유묘를 키운 후, 송이와 미국 송이의 배양액을 이용하여 송이균을 접종하고 관찰하였다. 접종 4개월 후, 송이 감염률, 송이 향기 및 하티그 넷 층을 조사하였다. 송이와 미국 송이의 외생균근 형성은 12개 균주 중 9개 균주에서 성공하였으며, 송이 균근 형성 정도는 균주별로 차이가 있었다. 송이 균근이 형성된 것은 송이 향기도 매우 진하게 발생한 반면, 세균과 사상균에 오염된 소나무는 송이 균근이 형성되지 않았고 역겨운 냄새도 발생하였다. 따라서 송이 향기 유무를 가지고도 송이 균근 형성 유무를 판단할 수 있었다. 송이 균근은 초기에 비분지형과 가지 친 모양으로서 뿌리털이 없었다. 후기에는 맨틀 층과 하티그넷 층을 나타내었으며, 균근이 형성된 부근의 뿌리는 검게 변했다. 균주 간에는 예천에서 1995년 분리한 균주가 타 균주에 비하여 훨씬 높은 감염률을 나타내어 균주 선발 필요성이 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2000~2006년도 농림부 농림기술개발사업의 “송이 생산성 향상을 위한 재배기술 개발” 과제(2000-300009-6)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

가강현, 박 현, 허태철, 여운홍, 박원철. 2002. 소나무를 이용한

- 송이 균근 합성. 2002년도 한국임학회 학술연구 발표논문집. pp. 235-236.
- 구창덕. 2005. 송이 외생균근의 형태적 특징. 한국임학회지 94: 16-20.
- 동해안산불피해지 공동조사단. 2000. 동해안 산불지역 정밀조사 보고서 II. 311pp.
- 박무창, 심상갑, 천우재. 2003. 송이 균주와 소나무 무균 발아묘의 공동배양에 의한 소나무 송이균 감염묘 형성방법. 특허청 특허자료(<http://patent2.kipris.or.kr>).
- 임업연구원. 1996. 고성 산불지역 생태조사 결과 보고서. 169pp.
- 천우재, 심상갑, 박무창. 2003. 송이 인공증식 연구. 2003년도 한국임학회 학술연구 발표논문집 pp. 146.
- Guerin-Laguette, A., Vaario, L. M., Gill, W. M., Lapeyrie, F. L., Matsushita, N. and Suzuki, K. 2000. Rapid in vitro ectomycorrhizal infection on *Pinus densiflora* roots by *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 41:389-393.
- Marx, D. H. 1969. The influence of ectotrophic, mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59:153-163.
- Vaario, L. M., Guerin-Laguette, A., Gill, W. M., Lapeyrie, F. and Suzuki, K. 2000. Only two weeks are required for *Tricholoma matsutake* to differentiate ectomycorrhizal Hartig Net structures in roots of *Pinus densiflora* seedlings cultivated on artificial substrate. *J. For. Res.* 5:293-297.
- Wang, Y., Hall, I. R. and Evans, L. A. 1997. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 1. *Tricholoma matsutake* and related fungi. *Economic Botany* 51(3):311-327.
- Yamada, A., Maeda, K. and Ohmasa, M. 1999. Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* in vitro. *Mycoscience* 40:455-463.