

뽕나무버섯균 균사속과 천마의 공생관계에 대한 조직학적 관찰

김용규 · 김명곤^{1*} · 윤 숙² · 홍재식²

한국인삼연구초연구원, ¹익산대학 식량자원과, ²전북대학교 식품공학과

Histological Observation on the Symbiotic Relationships Between *Gastrodia elata* and Rhizomorph of *Armillaria mellea*

Yong-Kyoo Kim, Myung-Kon Kim^{1*}, Sook Yoon² and Jai-Sik Hong²

Korea Gengeng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea
¹Department of Food Resources, Iksan National College, Iksan 570-752, Korea
²Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

ABSTRACT: The histological studies were conducted to investigate the symbiotic relationships between *Gastrodia elata* and *Armillaria mellea* by using light and electron microscopes. The fungus, *A. mellea*, penetrated into the cortex of *G. elata*, in which endomycorrhizal mycelia in the cortical cells appeared to be dissolved and digested, and seemed to be consequently used as nutritional sources for *G. elata* growth. Staining of infected tissues revealed that protein- and fat-like substances were localized in the cells. The nuclei of cells infected by the fungal mycelia were hypertrophied 1.5 to 2 times as those without the fungal infection.

KEYWORDS: Histological observation, *Gastrodia elata*, *Armillaria mellea*, symbiotic relationships

천마(*Gastrodia elata*)는 잎과 뿌리가 없는 난과식물로 진균을 영양원으로 살아가는 독특한 다년생 기생식물로 한방에서 鎮經, 鎮靜, 強壯藥으로서 간질병, 중풍, 경기, 두통, 강장 기타 신경질환 치료의 특효약으로 널리 사용되고 있다. 천마가 뽕나무버섯균이란 균과 공생하고 있다는 것은 1911년 Kusano에 의해 밝혀진 이래 Zhuang 등(1983)은 isotopic labelling technique를 이용하여 천마가 토양뿐만 아니라 주 영양원을 뽕나무버섯균 균사속으로 부터 공급받는다 고 하였으며, Zhang and Li(1980)도 영양생장줄기(vegetative stem) 역시 영양분을 흡수한다고 보고된 바 있다. 천마에서 뽕나무버섯균이 내생근균을 이루어 천마의 노화층 세포내에 침입하면 균사는 그의 침단이 파열되기 때문에 원형질과 핵을 토하여 놓게 되며 천마 피경의 세포는 소화 흡수하면서 영양을 섭취하게 되므로 천마는 뽕나무버섯을 떠나서는 생존할 수 없는 것으로 알려져 있다(Wang 등, 1992). 뽕나무버섯균은 천마와 접촉할 때 천마가 존재하기 때문에 영양분을 대량 소모하여 자신의 발육을 억제당하는 결과를 초래하며, 천마가 많이 번식하고 있다면 균사속(rhizomorph)은 별로 오래 생존해 있지 못하므로 자실체를 형성하지 못하며 뽕나무버섯균은 천마에서 얻을 수 있는 물질은 거의 없는 것으로 알려져 있다(Zhang and Li, 1980). 따라서 천마는 뽕나무버섯균의 균사속으로 부터 영양을 공급받아 생육하기 때문에(Zhang and Li, 1980) 천마의 인공재배를 위해서는 천마와

공생하고 있는 뽕나무버섯균에 대한 체계적인 연구가 절실히 요망되고 있다. 그러나 뽕나무버섯균에 관한 연구는 주로 삼림의 병원성(Lopez-real 등, 1975; Redfern, 1978), 분포(Anderson 등, 1979)와 생태학(Anderson 등, 1979; Melin, 1953) 및 형태학적 특성(Watling, 1982)에 관한 연구가 주를 이루고 있다.

따라서 본 연구에서는 뽕나무버섯균과 천마의 관계를 정확히 규명하는 것은 천마의 성장발육 과정을 탐색하는데 대단히 중요한 부분이며, 또 천마 생산의 최적 조건 확립과 높은 생산량을 내는데 일조할 수 있을 것으로 사료되어 천마의 성장과정 중 뽕나무버섯균 균사속과의 관계 구명을 위한 광학 및 전자현미경을 이용한 뽕나무버섯균 감염부위의 조직학적 관찰을 수행하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

전북 장수 지구의 야생천마와 포장에서 재배한 천마의 뽕나무버섯균 감염 부위를 재료로 하여 광학현미경 및 전자현미경을 이용하여 조직관찰을 실시하였다.

즉 천마를 토양에서 꺼낸 후 모래와 흙을 씻어버린 후 뽕나무버섯균 감염부위를 0.5 mm³으로 절단하여 탈수 후 paraplast로 포매하여 조직 구조를 관찰하였다. FAA에서 24시간 고정 후 butyl alcohol에서 series로 탈수한 후 paraplast에 포매하였고 10 μm 두께의 절편을 만들어 slide glass 위에 고정시킨 다음 xylene으로 paraplast를 제거하고 DW에서

*Corresponding author

10분간 방치한 다음 지방, 단백질, 탄수화물 염색액으로 염색하고 glycerin으로 mounting하여 광학현미경으로 관찰하였다.

단백질은 coomassie brilliant blue R 250으로, 지방은 sudan III로, 전분은 5% potassium iodide용액으로 각각 염색하였다. 한편 전자현미경용 sample은 감염절편을 5% 당을 함유한 glutaraldehyde 용액으로 4°C에서 하룻밤 동안 전고정한 후 0.1 M 인산완충용액(pH 6.7)으로 고정액을 수회 세척 제거하고 2.5% 당을 함유한 1% OsO₄ 용액으로 1시간 동안 후고정 하였다. 다시 인산완충액으로 3회 세척한 후 acetone과 methanol로 series 탈수하고 100% acetone:100% epon-araldite(1:1) 용액에서 30분 침지한 후 epon-araldite 혼합용액으로 embedding(65°C, 28시간)하였다. Epon block을 ultratome으로 10 μm 두께로 자른 후 SEM으로 검정하였다.

결과 및 고찰

천마는 잎과 뿌리가 없는 난과식물로 진균을 영양원으로 독특하게 살아가는 기생식물로 알려져 있어(Kusano, 1911; Wang 등, 1992) 뽕나무버섯균과 천마의 관계를 정확히 규명하는 것은 천마의 생장발육 과정을 탐색하는데 대단히 중요한 자료가 될 수 있을 것이다. 천마는 꽃이 피고 열매맺는 시기를 제외하고는 뽕나무버섯균이 천마 유묘의 형성, 영양기관의 갱신 및 영양생장에서 생식생장으로 전환하는데 모두 결정적으로 작용하는 것(Zhang and Li, 1980)으로 보여 지기 때문에 광학 및 전자현미경을 이용한 천마와 뽕나무버섯균 균사속과의 공생관계 구명을 위한 조직학적 관찰은 당면 천마 생산 중에 나타날 수 있는 많은 문제를 해결하고 진일보한 재배기술로 천마의 다수확을 꾀하는데 크게 기여할 수 있을 것이다.

광학현미경을 이용한 천마에 대한 뽕나무버섯균의 침식 및 분해과정을 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1의 A는 천마에 의해서 유도된 뽕나무버섯균의 균사속이 천마와 접촉하는 단계이다. 사진상의 모든 화살표는 뽕나무버섯균 균사속 감염부위를 나타내고 있다. 천마에 의한 뽕나무버섯균의 유인에 관한 연구로 홍 등(1990)은 천마 중에 존재하는 휘발성 유기산으로 n-propionic acid, iso-butyric acid, iso-valeric acid, n-valeric acid, iso-caproic acid, n-caproic acid 와 n-peptanoic acid 등을 gas chromatography에 의해 정량한 바 n-valeric acid의 함량이 가장 높았으며, n-valeric acid의 첨가는 0.1% 농도에서 뽕나무버섯균 균사속 생장에 상당한 촉진 효과를 보였고 경시적으로 첨가 하였을 때는 이보다 훨씬 적은 저농도에서도 활발한 생육을 보인다고 하였다. 또한 Moody and Weinhold(1972)도 천마에 존재하고 있는 휘발성 유기산 중 acetic acid를 제외한 propionic acid, butyric acid, valeric acid 등에서 좋은 효과를 보였다고 하였으며, Pentland(1967)는 ethanol의 뽕나무버섯균 균사속 유도 효과를 관찰한 결과 일시에 500~700 ppm의 농도로 첨가하는 것보다 50 ppm씩 1일 간격으로 첨가했을 때 탁월한 유

도효과를 관찰한 바 있어 천마의 뽕나무버섯 균사속 유도효과는 상당부분 천마 중에 존재하는 휘발성 유기산류나 알코올류들에 의해 기인하는 것으로 추정된다. B와 C는 뽕나무버섯균 균사속과 천마의 접촉이 일어난 후 뽕나무버섯 균사속이 천마의 조직내부로 침입하면서 천마의 표피층에 심한 손상을 일으키게 된다. 뽕나무버섯균은 기주식물에 대한 침투성이 강하여 감염 초기에는 표피층에 심각한 붕괴 현상을 유발하지만 일정한 시기가 경과하면 그 외향적인 흔적은 사라지고 뽕나무버섯균 균사속은 천마의 cortex 층에서 내생균근의 형태로 존재하기 때문에 천마는 정상적인 형태로 보이거나 cortex층에는 크게 형성된 뚜렷한 뽕나무버섯 균사속을 볼 수 있다(D). 뽕나무버섯균은 활물 및 사물기생하는 균으로 삼림에 막대한 피해를 주는 담자균의 일종이며, 특히 뽕나무재배에 치명적인 피해를 주는 뽕나무근 부후균으로 잘 알려져 있다(이 등, 1985). 또한 이의 삼림에 대한 병원성(Lopez-real 등, 1975; Redfern, 1978)도 상당한 연구가 이루어진 바 있다.

그러나 E는 천마의 cortex 층에 존재하는 내생균 균사속으로 부터 균사들이 인접한 각 피층세포들에 침투해 들어가는 모습이며, 침입 초기보다 균사속의 결속 정도는 상당히 와해된 형태를 보이고 있다. F는 균사속으로 부터 피층세포에 세포벽을 뚫고 세포 안으로 들어오기는 하나 이때 부터 천마의 각종 식균 효소들에 의해 용해되어 G에서와 같이 천마 중에서 분해·소실되는 것으로 미루어 뽕나무버섯균 균사는 결국 천마의 영양원으로 활용되는 것으로 추정된다.

H는 뽕나무버섯균의 침입을 받지 않은 정상 cortex 세포 조직이고 I는 뽕나무버섯균의 침식을 받은 부위로서 세포의 크기와 세포핵의 크기가 비감염 부위보다 1.5~2배 가량 커짐을 확인 할 수 있어 잎과 뿌리를 가지고 있지 않아 독립적으로는 생활할 수 없을 것으로 여겨지는 천마의 영양생장에 뽕나무버섯균이 필연적임을 확인할 수 있었다.

Fig. 2와 3은 뽕나무버섯균이 침입한 천마의 피층세포 부위를 전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과이다.

Fig. 2의 A는 감염되지 않은 정상세포이고 B는 천마의 내부로 침투한 뽕나무버섯 균사속이 내생균근의 형태로 천마의 피층세포에 분포하고 있는 모습이다. C는 감염된 천마 피층세포의 확대된 모습으로 천마 세포질 내에 뽕나무버섯 균사속(내생균근)으로 완전히 만들어진 모습을 보여주고 있다. D는 뽕나무버섯균의 강력한 세포벽 용해효소에 의해 천마의 인접한 세포의 벽을 뚫고 천마의 세포내로 침입하는 모습이며, Fig. 3의 E는 세포벽의 용해부분을 확대하여 본 모습이다. F는 뽕나무버섯균 균사속으로 부터 천마 세포에 침입한 균사들의 모습으로 이 때부터는 천마가 생산하는 anti-fungal protein과 같은 항균성 물질들로 인하여 뽕나무버섯균의 생육이 정상적인 형태를 취하지 못하고 균사의 침단부위가 G와 같이 점점 등글게 뭉쳐지는 현상을 보였으며, 천마의 길항현상에 의해 생육이 계속 진행되지 못하고 균사들의 정점 부분이 다발을 형성하여 등글게 형성된 균사집단은 시간이 갈수록 천마의 용균효소들에 의해 H와 같이 뽕나무버섯균

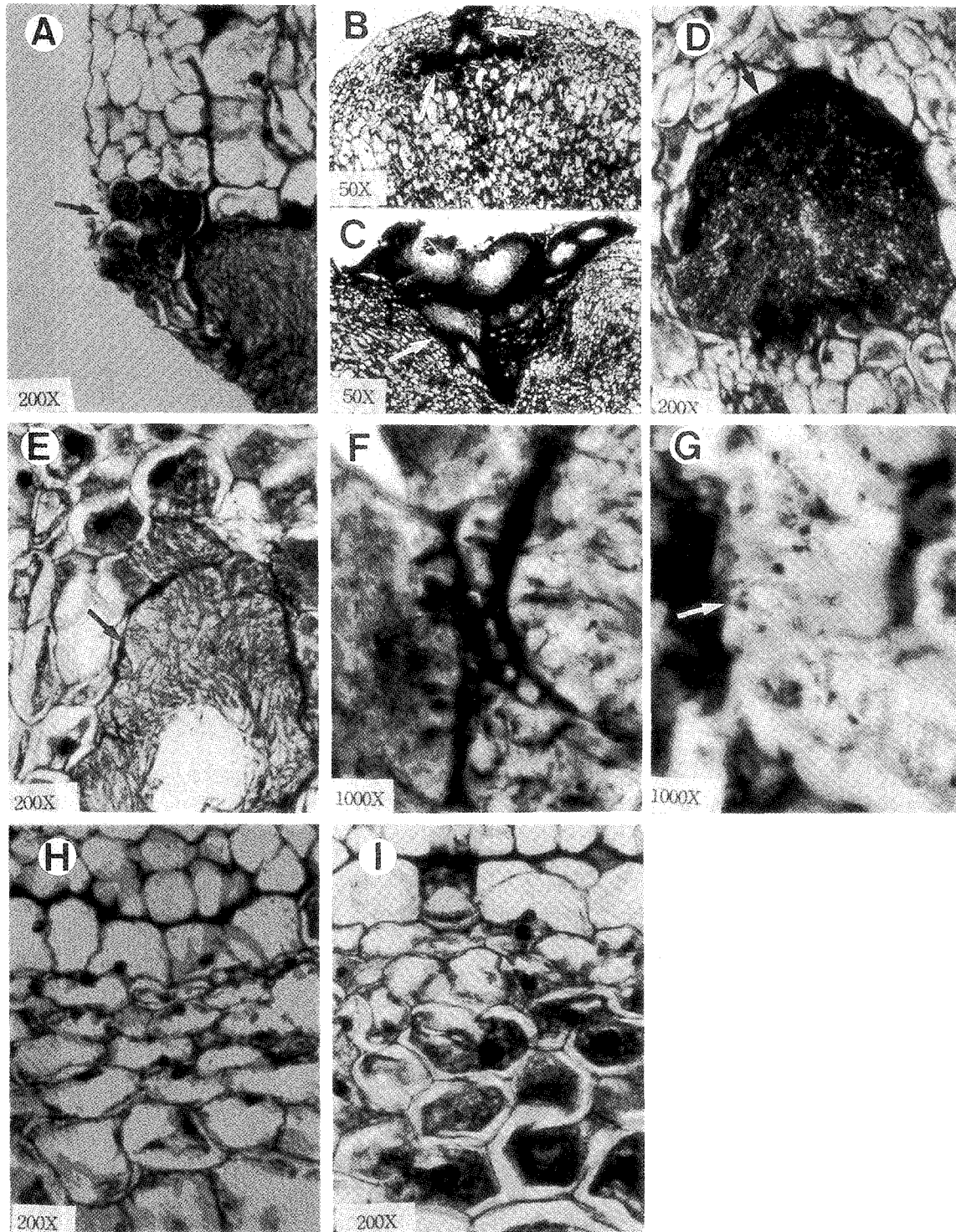


Fig. 1. Light micrographs of *Gastrodia elata* tuber invaded by *Armillaria mellea*.

A, B, C; Initial stages of the hyphae invading the cortical cell. D, E; The hyphae passes through the rhizomorph into cortex. F; The hyphae passes through the cell wall of *G. elata*. G; Digested hyphae of *A. mellea* in the cortical cell. H; Uninfected cortical cell. I; Infected cortical cell.

균사들은 용해·용출되어 점점 일그러져가는 모습을 확인할 수 있었다.

Wang and Wang(1992)은 썩나무버섯균 균사속 침입시 다량의 acid phosphatase를 균사속이 거의 저분자 화합물로 분

해될 때까지 방출한다고 하였고, Liu(1982)는 썩나무버섯균 감염부위에서 다량의 acid-phosphatase, esterase, ATPase, peroxidase, polyphenol oxidase의 활성이 나타남을 fluorescence microscope에 의해 확인한 바 있다. Yang and Hu(1990)는

천마로부터 빵나무버섯균 감염시 유도되는 chitinase와 β -1,3-glucanase를 gel filtration과 hydroxyapatite column chromatography에 의해 분리·정제하여 SDS-PAGE로 확인한 결과 각각 31.5 KD, 94 KD의 분자량을 보였다고 보고하였다. 또한 Hu 등(1988)은 천마 1kg으로 부터 chitinase나 β -1,3-glucanase가 아닌 약 20mg의 *Trichoderma reesei*에 강한 항

균력을 보이는 분자량 14 KD의 anti-fungal protein(GAFG)을 분리 확인한 바 있다.

Fig. 4는 빵나무버섯균의 감염부위의 영양성분의 동태를 파악하기 위하여 천마 cortex 조직 중의 탄수화물, 지질, 단백질을 각각 5% potassium iodide(B), sudan III(C), coomassie brilliant blue R 250(D)으로 염색하여 본 결과이다. 빵나무버섯균의 감염으로 비감염부위(A)에 비하여 염색 강도에서 상당한 차이를 볼 수 있었는데 탄수화물류는 cortical cell이 아닌 천마의 내층 세포에 대부분 존재하고 있었으며, 지방이나 단백질들이 감염부위에서 많이 분포함을 볼 수 있어 빵나무버섯 균사속 유래의 영양원들이 cortex층의 주된 영양원으로 이용됨을 알 수 있었다. 한편, 참나무곰목에서 증식시켜 채취한 빵나무버섯균 균사속과 활엽수 나무의 그루터기에서 채취한 야생 빵나무버섯 자실체의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 두 시료 모두 가장 많은 함량을 보인 것은 수분이었으나 건물을 기준으로 일반성분들을 비교하면 균사속에서 가장 많은 함량을 보이는 성분은

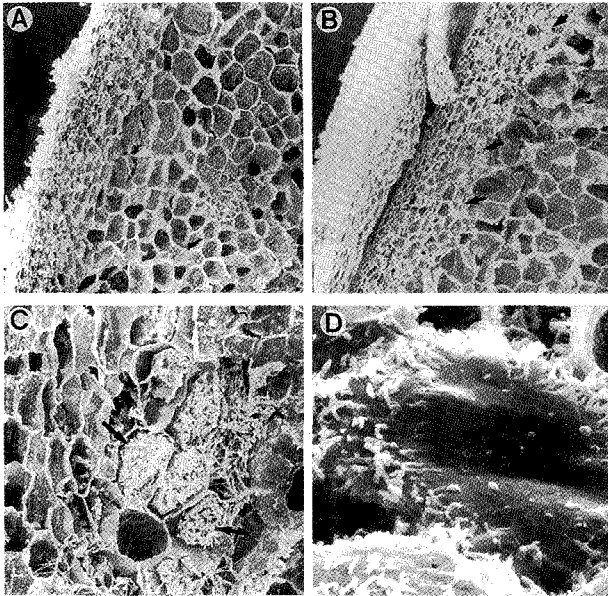


Fig. 2. Scanning electron micrographs of *Gastrodia elata* tuber invaded by *Armillaria mellea*. A; Uninfected cortical cell ($\times 50$). B, C; Infected cortical cell ($\times 50$, $\times 200$), D; Initial stage of the hyphae invading the cortical cell ($\times 1000$).

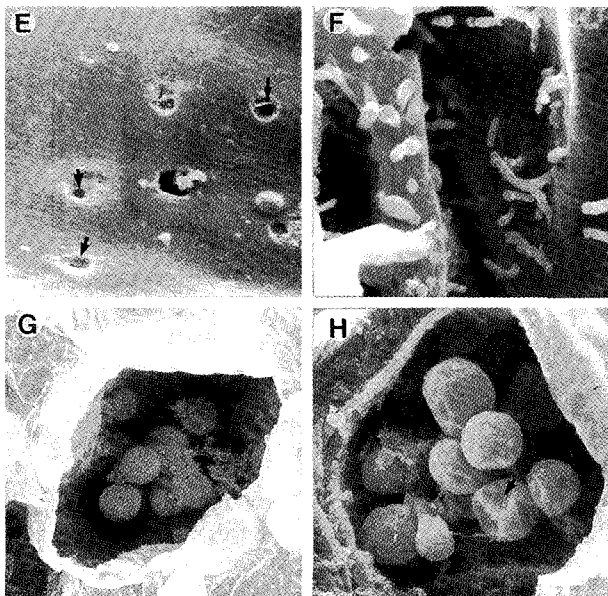


Fig. 3. Scanning electron micrographs of *Gastrodia elata* tuber invaded by *Armillaria mellea*. E, F; Initial stage of the hyphae invading the cortical cell ($\times 10000$, $\times 3000$), G, H; Digested hyphae of *A. mellea* in the cortical cell ($\times 500$, $\times 1000$).

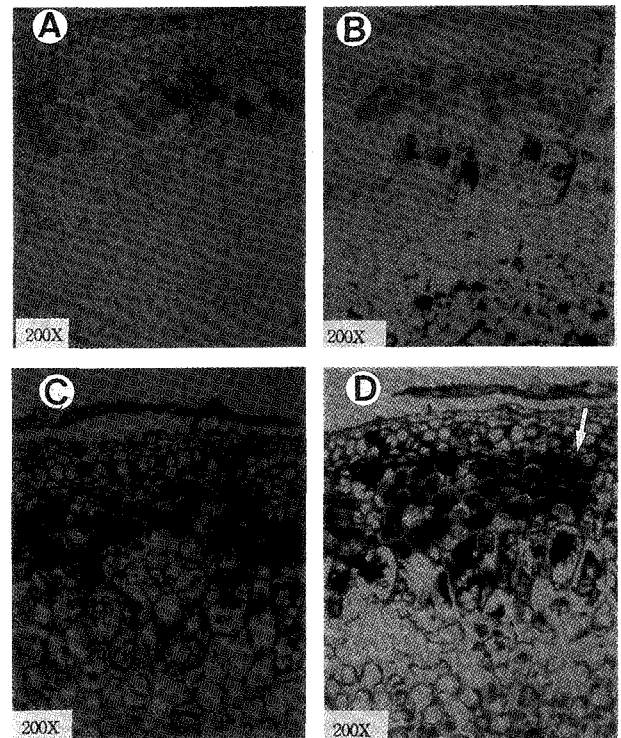


Fig. 4. Localization of nutrients in the cortical layers of the ancestor tuber invaded by *Armillaria mellea*. A; Control, B; Stained by 5% potassium iodide, C; Stained by Sudan III, D; Stained by coomassie brilliant blue R 250.

Table 1. Nutritional composition of rhizomorph and fruiting body of *Armillaria mellea* (% , db)

	Crude				Carbohydrate	Water
	Fat	Fiber	Protein	Ash		
Rhizomorph	3.98	11.06	53.68	7.43	23.85	85.07
Fruiting body	3.02	13.10	17.54	4.22	62.12	88.34

조단백(53.68%)과 탄수화물(23.85%)이었으나, 자실체에서는 탄수화물(62.12%)과 조단백(17.54%)으로 균사속과 자실체는 일반성분 함량에서 상당한 차이를 보였다. 특히 단백질과 무기질 함량에서 균사속이 자실체 보다 월등히 높음을 알 수 있었다. 이로 미루어 천마의 생장에는 성분조성이 우수한 뽕나무버섯균 균사속의 성분들이 주요 영양원으로 사용될 것으로 추정된다. 따라서 뽕나무버섯균은 천마와 접촉할 때 영양분의 대부분을 천마가 소모하기 때문에 자신의 발육을 억제하는 결과를 초래하고 균사속도 오래 생존해 있지 못하므로 자실체가 형성되지 않는 것으로 알려져 있다(Zhang and Li, 1980).

적 요

천마와 뽕나무버섯균 균사속과의 공생관계 규명을 위한 광학 및 전자현미경을 이용한 조직학적 연구를 수행한 결과 천마에 의해서 유도된 뽕나무버섯균의 균사속이 천마와 접촉하면 뽕나무버섯균 균사속의 침입에 의해 천마의 표피층은 심한 손상을 받게되며, 뽕나무버섯균의 균사속이 cortex층에 침입하여 내생균근을 형성하였다. 천마의 cortex층에 존재하는 내생균근으로부터 균사들이 각 피층세포에 침투해 들어간 균사속은 시간이 경과할 수록 균사결속이 상당히 와해되어지며, 균사속으로 부터 피층세포에 세포벽을 뚫고 세포 안으로 들어온 균사들은 천마에 의해 용해·분해·소화되어 뽕나무버섯 균사는 결국 천마의 영양원이 됨을 확인하였다. 또한 뽕나무버섯균의 침식을 받은 cortical cell에서 세포 및 핵이 비감염 부위보다 1.5~2배 가량 커짐을 확인 할 수 있다.

참고문헌

- 이지열, 홍순우. 1985. 한국동식물도감. 제28권 고등균류편(버섯류). 문교부.
- 홍재식, 김명곤, 이재홍, 김형무. 1990. 알코올 및 휘발성 유기산류가 뽕나무버섯균의 균사속 생산에 미치는 영향. 한국균학회지. **18(3)**: 158-163
- Anderson, J. B. and Ullrich, R. C. 1979. Biological species of *Armillaria mellea* in north America. *Mycologia* **71**: 402-414.
- Hu, Z., Yang, Z. and Wang, J. 1988. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from *Gastrodia elata*. *Acta Bot. Yunnanica* **10(4)**: 373-380.
- Kusano, S. 1911. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. *J. Agric. Coll. Tokyo*. **4**: 1-66.
- Liu, C. Y. 1982. The changes in the vitality of *Armillaria mellea* and the histochemical localization of some enzymes in the hypae during the infective period in *Gastrodia elata*. *Acta Bot. Sin.* **24(4)**: 307-311.
- Lopez-real, J. M. and Swift, M. J. 1975. The formation of pseudosclerotia ('zone line') in wood decayed by *Armillaria mellea* and *Stereum hirsutum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **64**: 473-481.
- Melin, E. 1953. Physiology of mycorrhizal relations in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **4**: 325-346.
- Moody, A. R. and Weinhold, A. R. 1972. Fatty acids and naturally *Armillaria mellea*. *Phytopathology* **62**: 264-267.
- Pentland, G. D. 1967. Ethanol produced by *Aureobasidium pullulans* and its effect on the growth of *Armillaria mellea*. *Can. J. Microbiol.* **13**: 1613-1639.
- Redfern, D. B. 1978. Infection by *Armillaria mellea* and some factors affecting host resistance and the severity of disease. *Forestry*. **51**: 120-135.
- Wang, H. and Wang, Y. S. 1992. Ultrastructural localization of acid phosphatase in the digesting cell of tuber of *Gastrodia elata* infected by *Armillaria mellea*. *Chin. J. Bot.* **4(2)**: 148-152.
- Wang, H., Xu, J. Q. and Xu, J. T. 1992. Role of lysosomal vesicles in the digestive process of *Armillaria mellea* by the large cells of *Gastrodia elata*. *Acta Bot. Sin.* **34(6)**: 405-409.
- Watling, R. 1982. The genus *Armillaria*-nomenclature, typification, the identity of *Armillaria mellea* and species differentiation. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **78**: 271-285.
- Yang, Z. and Hu, Z. 1990. A preliminary study on the chitinase and β -1,3-glucanase in corms of *Gastrodia elata*. *Acta Bot. Yunnanica*. **12(4)**: 421-426.
- Zhang, W. J. and Li, B. F. 1980. The relationship of *Gastrodia elata* and *Armillaria mellea*. *Acta Bot. Sin.* **22(1)**: 57-62.
- Zhuang, Y., Wang, Y., Zhang, W., Ain, M., Xie, Z., Chen, Y., Chen, X., Shao, Y. and Zheng, R. 1983. A study on the source of secondary nutrients for *Gastrodia elata*. *Acta Bot. Yunnanica*. **5(1)**: 83-90.