

천마 종자의 발아 조건에 관한 연구

홍인표* · 남성희 · 정이연 · 성규병 · 남학우¹ · 정종천 · 박정식² · 허현 · 이민웅³

¹농촌진흥청 농업과학기술원 잠사양봉과, ²응용미생물과, ³동국대 응용생물학과

Studies on the Conditions of Seed Germination of *Gastrodia elata*

In-Pyo Hong*, Sung-Hee Nam, I-Yeon Jung, Gyo-Byung Sung, Hack-Woo Nam¹,
Jong-Chun Cheong, Jeong-Sik Park², Hyeon Hur and Min-Woong Lee³

¹Department of Sericulture and Apiculture,

²Department of Applied Microbiology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

³Department of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715

(Received April 12, 2004)

ABSTRACT: *Gastrodia elata* has been cultivated using mycorrhizal fungi including *Armillaria mellea* as an energy source (myco-heterotrophy) because it is aphyllous and achlorophyllous archid. But the yields of *G. elata* have been recently decreased owing to the degeneration of spawn tuber arised from successive asexual reproduction. Therefore, this study was carried out to solve this degeneration by seed germination, namely sexual reproduction. The seed germination of *G. elata* was excellent on the fallen leaves medium of oak tree. The fructification rate of the capsule of *G. elata* by artificial pollination was 94.1% and better than natural pollination. The living weight of capsules of *G. elata* suitable for seeds germination was above 31 mg. The middle-matured seeds and matured seeds of capsules were largely germinated, while the immatured seeds was small germinated. The storage temperature of the cropped capsules suitable for a favorable seed germination was 0-5°C and the storage period of it was one month.

KEYWORDS: Asexual reproduction, *Gastrodia elata*, Myco-heterotrophy, Seed germination

천마(*Gastrodia elata* Blume)는 한국, 중국, 일본 등 동북아 지역의 고산지대에서 자생하며, 한방에서는 땅속의 덩이줄기(괴경 : tuber)를 고혈압, 경기, 두통, 현기증, 중풍과 신경성 질환 등의 치료 약재로 널리 이용하고 있다(Huang, 1985; Chang and Bul, 1986). 천마는 고등식물이지만 잎과 뿌리가 없어서 탄소동화 능력이 없는 퇴화된 다년생 난과식물로 담자균류인 뿔나무버섯속균(*Armillaria* spp.)과 공생적으로 생육한다(Kusano, 1911). 중국에서 1970년대 초에 천마 연구가 시작되어 1980년대에 뿔나무버섯균(*Armillaria mellea*)을 이용한 천마의 무성번식 증식법이 성공하였다(능, 1995). 한국에서는 천마와 뿔나무버섯속균과의 관계(이, 1983), 뿔나무버섯균의 균사 배양 및 균사속 생산(Choi and Lee, 1983; 홍 등, 1990), 천마와 *Armillaria gallica*와의 공생관계(성 등, 1994) 등 주로 생리·생태적인 연구가 진행되었으며, 천마 재배는 1995년 농촌진흥청에서 천마재배용 뿔나무버섯균인 천마 1호(*Armillaria gallica*)가 보급되면서 대량생산이 가능하였다. 천마의 생산량은 1998년에 286톤에 달하였으나, 천마의 무성증식이 계속됨으로서 퇴화현상이 발생되어 품종과 수량이 저하되어 2000년에는 생산량이 57톤에 불과하였다

(농림부, 2003).

퇴화된 천마는 개체가 가늘고 길어서 상품가치가 없으며, 지속적인 무성번식시에는 어린 마(juvenile tuber)만 발생하여 그 다음해에는 성숙마(mature tuber)가 생산되지 않는다. 난과식물의 품종 퇴화 문제를 해결할 수 있는 가장 좋은 방법 중의 하나가 종자발아, 즉 유성번식이다. 유성번식은 우수한 품질의 종자(자마)를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 부족한 자마 문제를 동시에 해결할 수 있는 장점이 있다(Clements *et al.*, 1986). 그러나 천마 종자는 매우 작으며, 또한 배유가 없어서 자연계에서 발아율이 극히 저조하다.

적자 등은 천마 종자의 발아를 촉진시킬 수 있는 균류(발아균)를 분리 배양하는데 성공하여 그 균류의 특성을 이미 보고한 바 있으며(Hong *et al.*, 2002), 본 연구에서는 종자의 수분방법, 종자수확 시기 및 보존 등 천마종자의 발아 최적 조건에 관하여 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

발아균

본 시험에 사용한 발아균은 야생 천마 자생지에서 분리한 H-21 균주(Hong *et al.*, 2002)를 Yeast Malt Agar

*Corresponding author <E-mail: jphong20@rda.go.kr>

(Peptone 5 g, Yeast extract 3 g, Malt extract 3 g, Dextrose 10 g, Agar 20 g, Distilled water 1,000 ml) 평판배지에 계대 배양하면서 본 실험에 이용하였다.

최적 발아배지 선발

천마종자 발아에 적합한 배지를 선발하고자 천마재배의 주 재료로 이용되는 상수리나무(*Quercus acutissima*)낙엽, 신갈나무(*Q. mongolica*)낙엽, 떡갈나무(*Q. dentata*)낙엽와 대나무 잎, 폐편 등 5종의 재료에 미강을 20%(v/v) 비율로 첨가하여 혼합하고 수분을 65%로 조절한 다음 500 ml 배양병에 넣고 121°C에서 60분간 살균하였다. 살균이 끝난 배지에 톱밥배지에서 자란 발아균을 접종하여 발아균이 배지에 만연될 때까지 배양한 후 종자를 파종하여 3개월간 배양한 다음 발아정도를 조사하였다.

종자파종

파종방법은 배양 상자(60×45×30 cm)에 습윤한 낙엽을 한층 깔 다음, 그 위에 발아균이 만연한 낙엽배지에 천마종자를 파종하여 올려놓고 다시 한 층의 낙엽을 덮었다. 파종은 발아균이 성장한 낙엽배지를 하나 하나 분리하여 편 다음 그 위에 붓으로 천마종자를 2~3차례 반복하여 균일하게 파종하였다. 파종이 끝나면 10 cm 두께로 가는 모래를 덮고, 그 위에 다시 습윤한 낙엽을 3~5 cm 두께로 덮어 습도를 60% 정도로 유지하였다.

꼬투리(삭과)의 수분률

종자의 발아율을 안정적으로 유지하기 위하여 자연 상태에서 수분된 꼬투리와 인공수분을 실시하여 얻은 꼬투리의 종자 결실률을 조사하였다. 인공수분방법은 꽃이 핀 당일에 왼손으로 꽃받침을 잡고 오른손으로 핀셋을 이용하여 꽃밥을 점액성 암술머리에 이식한 후 종자 결실률을 조사하였다.

온도가 종자발아에 미치는 영향

천마 종자의 발아에 적합한 온도를 조사하기 위하여 종자 파종이 끝난 배양상자를 15°C, 20°C, 25°C, 30°C로 각각 조절된 재배사로 옮겨 3개월간 배양한 후 발아정도를 조사하였다.

꼬투리 중량 및 종자 등속도가 발아에 미치는 영향

종자발아에 이용할 수 있는 꼬투리의 중량을 조사하기 위하여 꼬투리의 생체중을 30 mg이하, 31~40 mg, 41~50 mg, 51~60 mg, 60 mg 이상으로 구분하여 발아배지에 파종하여 종자 발아정도를 조사하였다. 또한 발아에 적합한 종자를 선발하기 위하여 천마종자를 미성숙 종자, 중숙종자, 완숙종자 등 등속도별로 구분하여 채취한 다음 발아배지에 파종하여 종자의 발아정도를 조사하였다. 중숙종자는 수분 후 꼬투리가 팽배해져 상하로 6 가닥의 선

이 돌출되고 딱딱해지기 시작하는 시점의 종자를 기준으로 하였다.

꼬투리의 저장온도 및 저장기간이 종자 활력에 미치는 영향

수확한 종자의 활력보존방법 및 보존기간의 기준을 설정하기 위하여 수확한 꼬투리를 실내에서 보존이 가능한 -5°C, 0~5°C, 10°C, 20°C로 조절된 항온기에서 각각 3일, 5일, 10일, 15일, 30일간 저장한 다음 발아배지에 파종하여 저장온도 및 저장기간에 따른 종자의 활력을 조사하였다.

원구경 관찰

천마종자가 발아한 원구경(원구체; protocorm)의 조직을 5×5 mm²의 크기로 절단하고 Tissue Freezing Medium으로 포매한 다음 microtome(HM 560)을 이용하여 10 μm 두께로 절단하였다. 절단한 조직절편은 safranin으로 염색한 다음 Canada balsam으로 mounting하여 광학현미경으로 관찰하였다. 한편 전자현미경(TEM)의 처리 과정은 다음과 같다. 원구경 조직을 Karnovsky's 용액으로 4°C에서 overnight하여 전고정한 다음 0.05M cacodylate buffer로 3회 세척하여 고정액을 제거하고, 1% Osmic acid(OsO₄) 용액으로 4°C에서 2~4시간 고정하였다. 0.05 M cacodylate buffer로 3회 세척한 다음 ethanol로 series 탈수한 후 propylene oxide로 다시 탈수하였다. 포매는 propylene oxide : epon(1 : 1) 용액에서 4~8시간, propylene oxide : epon(1 : 2) 용액에서 4~8시간, epon 용액에서 교반하면서 overnight 시킨 후 epon-DMP-30(1.5%) 혼합용액으로 40°C에서 24시간, 60°C에서 48시간 실시하였다. Epon block을 microtom(ultracut, leica)을 이용하여 10 μm 두께로 자른 후 TEM(LEO912AB, Carl Zeiss, Germany)으로 검정하였다.

원구경의 생육조건

종자가 발아하여 형성된 원구경이 정상적으로 백마(immature tuber)와 성숙(mature tuber)로 생육할 수 있는 뽕나무버섯균(천마균)과의 결합시기를 구명하기 위하여 다음과 같이 3처리 하였다. 천마종자와 발아균, 뽕나무버섯균 등 3종을 동시에 매몰하는 방법, 천마종자를 발아균이 성장한 발아배지에 파종하여 형성된 원구경을 뽕나무버섯균에 이식하는 방법, 반대로 천마종자를 발아배지에 처리하여 형성된 원구경에 뽕나무버섯균을 이식하는 방법 등을 처리하여 원구경의 형성율과 생육상태 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

최적 발아배지 선발

천마종자의 발아에 적합한 배지를 선발하고자 신갈나무

Table 1. Effect of the culture media on the seed germination

Germination degree ^a				
Media				
Fallen leaves				Cotton waste
<i>Quercus acutissima</i>	<i>Quercus mongolica</i>	<i>Quercus dentata</i>	Bamboo	
+++ ^b	++	+	-	-

^aGermination degree was measured after incubation for 3 months in box container.

^b+ : small quantity sprouting, ++ : middle quantity sprouting, +++ : large sprouting.

낙엽 등 5종의 배지에 종자를 파종하여 3개월간 배양한 후 발아정도를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 천마종자는 상수리나무 낙엽배지에서 다량 발아되어 가장 양호하였으며, 떡갈나무 낙엽배지에서는 소량만 발아되었다. 한편 천마의 일종인 *Gastrodia verrucosa*의 종자 발아배지인 대나무 낙엽배지(Tashima *et al.*, 1978)와 버섯 재배시 이용되는 폐면배지에서는 종자가 발아되지 않아 천마종자 발아용 배지로는 부적합한 것으로 판단되었다.

종자의 결실률

종자의 발아율을 높이기 위하여 자연 상태에서 수분된 꼬투리와 인공수분을 실시하여 얻은 꼬투리의 종자 결실률을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 자연 수분된 천마 꼬투리의 종자 결실률은 노지재배에서는 53.7%, 시설재배는 66.5%, 야생은 54.5%로 모두 70% 이하였으며, 재배 장소와 재배방법에 따라 결실률에 차이가 심하며, 또한 안정적이지 못하였다. 이는 천마의 꽃이 자연 상태에서는 꼬투리가 오무라져 있고, 향이나 맛이 없어서 곤충매개에 의한 수분율이 매우 저조하며, 또한 개화 당시의 기후에 따라 종자 결실률에 차이가 있었다. 그러나 인공수분을 실시한 꼬투리의 종자 결실률은 90% 이상으로 조사되었다. 따라서 안정적으로 종자를 확보하고 또한 종자의 발아율을 높이기 위해서는 인공수분을 실시해야 할 것으로 생각된다.

종자발아 온도

천마의 종자 발아에 적합한 온도를 조사한 결과는

Table 2. Effect of various pollination method on the fructification of seed

Pollination method	Culture method	No. of flowers	No. of pollination	Fructification rate (%)
Natural	Ground	1056	568	53.7
	House	981	652	66.5
	Nature	321	175	54.5
Artificial	House	4192	3943	94.1

Table 3. Effect of the culture temperature of the sown seeds on sprouting

Germination degree			
Temperature (°C)			
15	20	25	30
- ^b	++	+++	-

^aGermination degree was measured after incubation for 3 months in box container.

^b- : non-sprouting, + : small quantity sprouting, ++ : middle quantity sprouting, +++ : large quantity sprouting.

Table 3에서와 같이 25°C에서 배양한 처리구에서는 종자가 다량 발아되었으나, 15°C와 30°C에서 종자가 발아되지 않았다. 천마종자의 발아에 적합한 온도는 20~25°C로서 천마와 공생관계인 뽕나무버섯균과 발아균의 균사생장 적온인 25~30°C 보다는 낮았다(홍 등, 1990; Hong *et al.*, 2002).

꼬투리 중량 및 종자 침속도와 종자 발아

꼬투리의 중량은 종자의 수에 비례하므로 꼬투리내의 종자의 수가 너무 적으면 파종시 작업 능률이 떨어지고 잡균에 오염될 확률이 높아진다. 따라서 천마 종자 발아에 이용할 수 있는 꼬투리의 최소 생체중의 기준을 설정하고자 꼬투리의 중량별로 발아정도를 조사한 결과는 Table 4에서와 같다. 꼬투리 생체중 30 mg 이하에서는 소량만 종자가 발아하였으며, 41 mg 이상에서는 종자가 다량 발아하였다. 따라서 천마종자를 발아시키기 위해서는 꼬투리의 생중량 41 mg 이상, 최소한 생체중 31 mg 이상의 꼬투리를 선별하여 파종해야 발아율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

Table 4. Effect of the living weight of seeds on germination

Germination degree ^a				
Living weight (mg)				
below 30	31~40	41~50	51~60	above 61
+ ^b	++	+++	+++	+++

^aGermination degree was measured after incubation for 3 months in box container.

^b+ : small quantity sprouting, ++ : middle quantity sprouting, +++ : large sprouting.

Table 5. Effect of the ripeness degree of capsules on germination

Germination degree ^a		
Ripeness degree of seed		
Immature seeds	Middle-matured seeds	Mature seeds
+ ^b	+++	+++

^aGermination degree was measured after incubation for 3 months in box container.

^b+ : small quantity sprouting, +++ : large sprouting.

한편 발아에 적합한 꼬투리의 수확 시기를 조사하기 위하여 꼬투리의 등숙도에 따라 미성숙 꼬투리, 중숙 꼬투리, 완숙 꼬투리 등으로 구분하여 채취한 다음 발아배지에 파종하여 종자의 발아 정도를 조사한 결과는 Table 5와 같다. 인공수분 후 15일경에 수확한 미숙 꼬투리의 종자를 파종한 처리구에서는 소량만 발아하였으나, 18일 이후에 수확한 중숙 꼬투리와 완숙 꼬투리의 종자를 파종한 처리구에서는 다량 발아하였다. 균류(발아균)를 이용한 천마종자 발아에는 조직배양에서는 이용할 수 없는 완숙종자도 이용이 가능하였으나, 꼬투리가 너무 성숙하여 터지면 종자의 손실이 크므로 수분 19일 이전에 꼬투리를 수확하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

꼬투리의 저장온도 및 저장기간이 종자 활력에 미치는 영향

종자의 활력 보존방법 및 보존기간의 기준을 설정하기 위하여 수확한 꼬투리의 저장온도 및 저장기간에 따른 종자활력을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 수확한 꼬투리는 저장온도에 관계없이 10일까지는 종자활력이 유지되었으나, 꼬투리를 실온인 20°C에서 보존하면 15일경부터는 종자 활력이 급격히 떨어지며 30일 이후부터는 종자가 발아되지 않았다. 따라서 꽃대 1개에서 피는 꽃의 수는 50~70개 정도이며, 꽃이 아래부터 결실되기 시작하여 위의 마지막 꽃이 결실되기까지는 약 15~20일이 소요되므로, 수확한 꼬투리의 종자를 즉시 파종하지 않고 종자를 모아서 파종할 경우에는 수확한 꼬투리를 5°C 이하에서 보존해야 종자의 활력을 유지할 수 있었다.

원구경 관찰

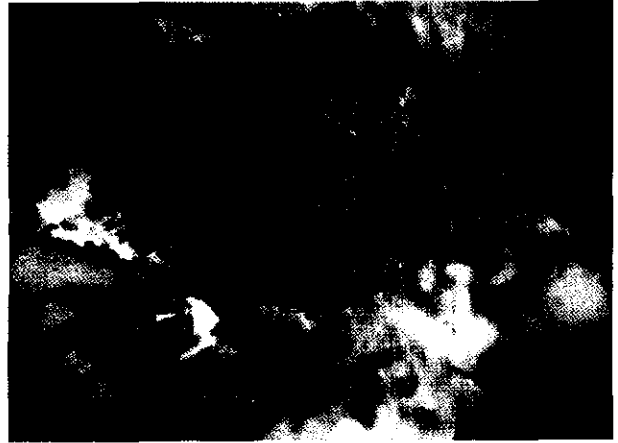
수확한 꼬투리의 천마종자를 발아균이 만연한 상수리 낙엽 배지에 파종하여 배양하면서 천마종자의 발아상태를 조사하였다. 종자 파종 후 2개월이 경과하면서 종자가 발아되기 시작하여 3개월 후에는 천마종자가 발아하여 원구

Table 6. Effect of the storage period and the storage temperature of capsules on germination

Periods of storage (days)	Germination degree ^a			
	Temperature (°C)			
	-5	0~5	10	20
1st day	+++ ^b	+++	+++	+++
3th days	+++	+++	+++	+++
5th days	+++	+++	+++	+++
10th days	+++	+++	+++	+++
15th days	++	++	++	+
30th days	++	++	+	-

^aGermination degree was measured after incubation for 3 months in box container.

^b- : non-sprouting, + : small quantity sprouting, ++ : middle quantity sprouting, +++ : large quantity sprouting.



Oak leaf medium inoculated with the fungus



Protocorms formed after 3 months of incubation

Fig. 1. Seed germination of *Gastrodia elata*.

경이 형성되었다(Fig. 1). Microtome을 이용하여 발아한 원구경을 10 μm 두께로 절단한 후 safranin 으로 염색하여 횡단면을 관찰한 결과 원구경 세포와 그 주변에 파열된 종피가 관찰되었으며(a), 원구경의 일부 세포에서는 침투한 발아균(b)을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 한편 TEM을 이용하여 원구경의 조직세포를 관찰한 결과에서도 발아균 균사를 확인할 수 있었으며(c), 또한 원구경 세포의 세포막에서 확장된 변형체가 발아균 균사를 향해 돌출되거나 발아균 균사를 포위한 현상이 관찰되었으며(d), 일부 발아균의 균사에서는 내용물이 소실되어 관찰할 수 없었다(e). 이는 천마가 뽕나무버섯균 균사를 영양원으로 이용된다는 보고와 유사한 결과로 천마 종자 발아시에도 균류를 영양원으로 이용하는 것으로 추정된다(Zhang and Li, 1980).

원구경의 생육조건

종자가 발아하여 원구경(원구체; protocorm)이 형성되더라도 정상적인 자마로 성장하기 위해서는 천마 공생균으로 알려진 뽕나무버섯균으로부터 영양을 공급받아야 하

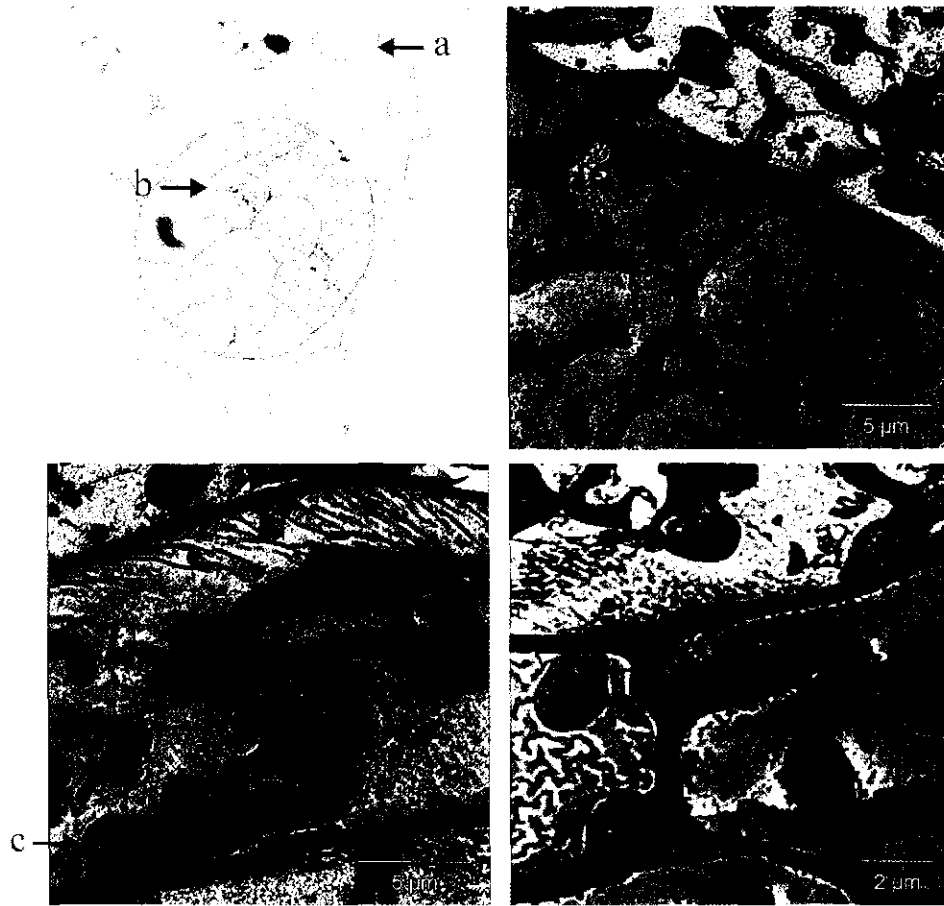


Fig. 2. Protocorms of *Gastrodia elata* penetrated by the symbiotic fungi.

며(김 등, 2000), 뽕나무버섯균과 결합이 이루어지지 않거나 결합시기가 늦으면 자마로 성숙하지 못하고 미숙하나 백마로 성장하거나 고사하게 된다. 따라서 종자발아에 의한 유성번식에서는 원구경과 뽕나무버섯균과의 결합방법이 매우 중요하다. 원구경이 정상적으로 성장할 수 있는 뽕나무버섯균과의 결합시기를 조사한 결과는 Table 7에서와 같다. 원구경 형성은 천마종자를 발아배지에 파종하는 방법이 천마종자와 발아균, 뽕나무버섯균을 동시에 매몰하는 방법보다 양호하였다. 즉, 뽕나무버섯균은 천마종자 발아에 영향을 못 미치거나 억제시킨다는 보고와 유사하다(Xu and Mu, 1990). 또한 원구경과 뽕나무버섯균과의 결합 방법은 발아된 원구경에 뽕나무버섯균(골목)을 이식하는 방법이 원구경 생육이 양호하였다.

적 요

천마의 퇴화 현상을 해결하고 우수한 품질의 종마를 얻을 수 있는 천마 종자의 최적 발아 조건을 조사하였다. 천마종자는 상수리나무 낙엽 배지에서 발아가 가장 잘되었으며, 또한 자연수분보다는 인공수분에서 얻은 종자가 결실률이 높고 안정적이었다. 천마 종자 발아는 생중량 41 mg 이상의 증숙꼬투리나 완숙꼬투리에서 양호하였으며, 파종은 종자 수확 직 후가 가장 좋았으며, 장기 보존 시에는 5°C 이하에서 가능하였다. 천마 생육 시 뽕나무버섯균이 천마의 영양원으로 이용되는 것처럼 천마 종자 발아 시에도 균류가 영양원으로 이용되는 것으로 추정된다.

Table 7. Effect of the conjugation time of protocorms (seeds) and symbiotic fungus (*Armillaria mellea*) on the development of tubers

Treatment	Formation of protocorms	Development of tuber	Size of tuber (length × dia.; mm)
Seeds + Sprouting fungus + <i>A. mellea</i>	+	++	23.8 × 2.8
Transplant of protocorms to <i>A. mellea</i>	+++	+	15.6 × 2.0
Transplant of <i>A. mellea</i> to protocorms	+++	+++	40.2 × 5.4

*-; poor, +; normal, ++; good, +++; excellent.

참고문헌

- 김용규, 김명곤, 윤숙, 홍재식. 2000. 뽕나무버섯 균사속과 천마의 공생관계에 대한 조직학적 관찰, 한국균학회지 **28**(1): 41-45.
- 능여연. 1995. 식용균계배학. 중국농업과학출판사. 156-166.
- 성재모, 양근주, 이현경, T. C. Harrington. 1994. 한국산 뽕나무버섯균의 종에 관한 연구. 한국식물병리학회지 **10**(4): 261-269.
- 이지열. 1983. 천마의 인공재배법. 대한민국특허공고.
- 홍재식, 김명곤, 소규호, 김영희. 1990. *Armillaria mellea*의 균사배양 및 균사속 생산에 관한 연구. 한국균학회지 **18**(3): 149-157.
- 농림부. 2003. 2002 특용작물생산실적. 68-75.
- Chang, H. M. and But, P. H. 1986. Pharmacology and Application of Chinese Materia Medica, Vol. I, World Scientific, Singapore. 185.
- Choi M. J. and J. Y. Lee. 1983. Physiological and ecological studies on mycelial of *Armillaria mellea*. *Kor. J. Mycol.* **11**(2): 79-84.
- Clements, M. A., Muir, H. and Cribb, P. J. 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of European Terrestrial orchids. *Kew Bull.* **41**: 437-445.
- Hong, I. P., Kim, H. K., Park, J. S., Kim, G. P., Lee, M. W. and Guo, S. H. 2002. Physiological characteristics of symbiotic fungi associated with the seed germination of *Gastrodia elata*. *Kor. J. Mycol.* **30**(1): 22-26.
- Huang, Z. L. 1985. Pharmacologic studies and clinical applications of *Gastrodia elata* Bl. *Journal of Modern Development Traditional Media* **5**: 251-254.
- Kusano, S. 1911. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. Imperial University of Tokyo. *Journal of the College of Agriculture* **4**: 1-65.
- Tashima, Y., Terashita, T., Umata, H. and Matsumoto, M. 1978. *In vitro* development from seed to flower in *Gastrodia verrucosa* under fungal symbiosis. *Trans. mycol. Soc. Japan* **19**: 449-453.
- Xu, J. T. and Mu, C. 1990. The relation between growth of *Gastrodia elata* protocorms and fungi. *Acta Botanica Sinica* **32**(1): 26-31.
- Zhang, W. J. and Li, B. F. 1980. The biological relationship of *Gastrodia elata* and *Armillaria mellea*. *Acta Botanica Sinica* **22**: 57-62.