한국산 가송이(가칭)의 균사생장 특성과 소나무에 외생균근 형성

전성민[1] · 기강현[1]* · 홍기성[2]

[1]국립산림과학원 화학미생물과, [2]산림조합중앙회 산림버섯연구센터

Mycelial Growth and *in vitro* Ectomycorrhizal Synthesis on *Pinus densiflora* Seedlings of *Tricholoma bakamatsutake* in Korea

Sung-Min Jeon[1], Kang-Hyeon Ka[1]* and Ki-Sung Hong[2]

[1]*Division of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea*
[2]*Forest Mushroom Research Center, National Forestry Cooperative Federation, Gyeonggi 469-803, Korea*

ABSTRACT : *Tricholoma bakamatsutake* is one of the edible ectomycorrhizal mushrooms as an allied species of *Tricholoma matsutake*. This is the first report on physical characteristics of *T. bakamatsutake* strains collected from *Quercus mongolica* forests in Korea. The pure cultures of these strains were isolated from the tissues of fruit bodies and the culture characteristics were investigated under different conditions (media, temperatures, nitrogen sources). Most strains showed the highest mycelial growth on potato dextrose agar (PDA) at 20 or 25°C. Two strains of *T. bakamatsutake* preferred the ammonium-form rather than the nitrate-form as an inorganic nitrogen source. *T. bakamatsutake* showed significantly slower mycelial growth when compared with *T. matsutake* from a Korean forest, although the optimum culture conditions for the two allied species were similar. We also tested the ability to form mycorrhizae as well as cellulase activity of *T. bakamatsutake*. All strains showed cellulase activity on a carboxymethylcellulose (CMC) agar plate. The mycorrhizae on axenic *Pinus densiflora* seedlings were formed by two strains of *T. bakamatsutake* after 3 or 8 months of inoculation. *P. densiflora* seedlings inoculated with *T. bakamatsutake* had a much higher biomass than un-inoculated seedlings.

KEYWORDS : Cellulase, Ectomycorrhizal synthesis, Mycelial growth, *Pinus densiflora*, *Tricholoma bakamatsutake*

서 론

Tricholoma bakamatsutake Hongo는 주름버섯목(Agaricales), 송이과(Tricholomataceae)에 속하는 외생균근성 버섯류의 하나로[1], 일본에서는 'バカマツタケ(Bakamatsutake)'라 부른다[2]. *T. bakamatsutake*는 송이(*T. matsutake*)와 일반적인 외형이 거의 비슷하며, 송이향과 맛이 강하게 나기 때문에 이 두 균종을 쉽게 혼동할 수 있다[3]. 또한 실제 분류 및 계통발생학적으로도 *T. bakamatsutake*와 송이는 유연 관계가 있는 것으로 밝혀졌다[4]. 그러나 자세히 살펴보면, *T. bakamatsutake*는 송이보다 조금 더 작고, 조직이 부숴지기 쉬우며, 주름살에 주름낭상체(cheilocystidia)가 존재하는 것으로 알려져 있다[3]. 송이는 한국, 일본, 중국 북동부, 러시아 등지의 소나무림에 널리 분포하고 있는 반면, *T. bakamatsutake*는 한국, 일본, 대만, 중국의 신갈나무, 아시아산 tanoak, chinkapin 종 등과 같은 활엽수림에 분포하는 것으로 알려져 있다[3].

우리나라 고서에서도 *T. bakamatsutake*에 관한 기록을 찾아볼 수 있는데, 조선 후기의 실학자인 최한기가 지은 종합 농서 '농정회요(農政會要)'에는 '假松茸'이라 표기되어 있

Kor. J. Mycol. 2014 December, **42**(4): 312-321
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.4.312
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
E-mail: kasymbio@korea.kr

Received November 29, 2014
Revised December 8, 2014
Accepted December 9, 2014

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

으며, 송이 냄새가 나서 먹을 수 있다고 기술하였다[5]. 이러한 기록을 보면 과거 우리나라에도 *T. bakamatsutake*가 발생하여 식용으로 취급되었을 것이라 추정할 수 있다.

*T. bakamatsutake*는 동아시아의 송이(*Tricholoma matsutake*), 북미산 송이(*Tricholoma magnivelare*) 그리고 북아프리카, 유라시아, 북미 등지에서 발견되는 *Tricholoma caligatum* 등과 함께 전세계에서 상업적으로 가치가 있다고 알려진 송이속 4종에 속하는 버섯 중의 하나이다[6]. 또한 *T. bakamatsutake*는 일본에서 식자원으로 이용 가능한 균근성 버섯류 300종 안에 포함되며[7], *T. bakamatsutake*의 몇몇 균주들은 미국의 ATCC (American type culture collection)에 등록되어 있는 상태이다[8]. 중국에서는 *T. bakamatsutake*의 자실체를 건조하여 식용으로 판매하고 있다. 이러한 가치 때문인지 일본에서는 *T. bakamatsutake*에 대한 생리적 특성을 조사하고, 그 근연종인 송이와의 생태적, 유전적 비교 연구도 이미 체계적으로 이루어진 상태이다[9-11]. 그러나 우리나라의 경우, *T. bakamatsutake* 분포지 중의 하나라는 보고만 있을 뿐, 최근까지 *T. bakamatsutake*가 발생하였다는 보고도 없고, 이에 대한 연구 자료도 거의 없는 상태였다. 다행히 2012년 9월과 2013년 8~9월에 강원도 홍천의 신갈나무림에서 *T. bakamatsutake*가 발생하여(Fig. 1a, 1b) 이들에 대한 생태 및 생리적 특성을 파악할 수 있게 되었다. 이에 본 연구에 앞서 *T. bakamatsutake*는 우리나라에서 수집한 균주이므로, 앞서 기술한 농정회요에 기록된 '가짜 송이'라는 의미를 담아 본 논문에서는 *T. bakamatsutake*의 한글명(가칭)을 '가송이'라 칭하였다. 본 논문은 우리나라 산림에서 수집한 가송이 균주들의 배지 또는 온도별 균사생장 특성과 질소원 선호도, cellulase 활성, 균근 형성력 등을 시험하여 그 특성을 밝히고, 선행문헌 조사를 통해 가송이와 근연종인 송이와의 배양 특성을 비교한 것으로 이에 대한 내용을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

가송이 균주의 수집, 분리 및 접종원 준비

가송이(*T. bakamatsutake*) 균주는 2012년과 2013년 8월 말~9월 초순에 강원도 홍천군 신갈나무림(*Quercus mongolica*)에서 수집하였다. 시험 균주는 자실체의 조직으로부터 순수분리하였으며, 자실체의 형태학적 특징과 균사체의 ITS (internal transcribed space) 염기서열 분석을 통해 균을 동정하여 국립산림과학원(Korea Forest Research Institute, KFRI)에 등록된 균주를 사용하였다. KFRI 1981과 1982는 2012년 9월 초순에, KFRI 2237은 2013년 8월 말에, 그리고 KFRI 2253과 2254는 2013년 9월 초순에 각각 수집한 것으로 총 5균주를 본 연구에 사용하였다. 대사 활성이 우수한 접종원을 얻기 위해 사면배지에 냉장보존(4°C) 중이던 각 균주들을 potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종하여 25°C에서 2개월간 암배양한 후, 이를 다시 증균하여 각 시험에 사용하였다.

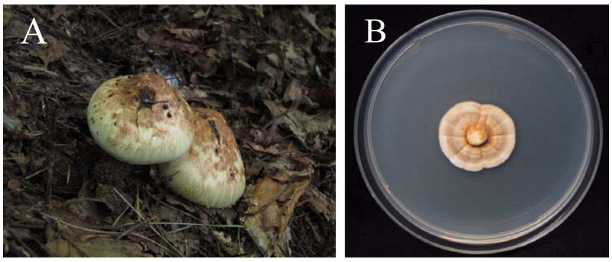

Fig. 1. *Tricholoma bakamatsutake* collected from *Quercus mongolica* forest in Korea. A, Fruiting bodies; B, Mycelial colony grown on potato dextrose agar plate at 25°C for 60 days.

고체배지의 종류에 따른 균사생장 특성 조사

고체배지의 종류에 따른 가송이 5균주(KFRI 1981, 1982, 2237, 2253, 2254)의 균사생장 특성을 알기 위해 potato dextrose agar (PDA; glucose 20 g, potato starch 4 g, agar 15 g per 1L), malt extract agar (MEA; maltose 12.7 5 g, dextrin 2.75 g, glycerol 2.35 g, peptone 0.78 g, agar 15 g per 1L), sabouraud dextrose agar (SDA; dextrose 40 g, pancreatic digest of casein 10 g, peptic digest of animal tissue 5 g per 1L)등 상용배지 3종을 선택하여 제조사(Difco, USA)의 지시에 따라 정량을 계량하여 시험배지(pH 6.0)를 제조하였다[12]. 또한 sucrose를 glucose로 대체한 Modified Melin-Norkran's medium[13]에 agar를 첨가하여 반합성 배지인 MMNA(glucose 10 g, malt extract 3 g, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.25 g, $CaCl_2$ 0.05 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4·7H_2O$ 0.15 g, NaCl 0.025 g, 1% $FeCl_3$ 1.2 mL, thiamine· HCl 0.1 mg, agar 15 g per 1L, pH 5.5)를 제조한 후, 이를 시험에 사용하였다(Marx, 1969). 각각의 배지를 고압증기멸균(121°C, 20 min)한 후, petri dish (bottom 85 × height 15 mm)에 25 mL씩 분주하여 고형화하였다. 각 배지의 중앙에 접종원(직경 6 mm)을 1개씩 접종하고, 25°C 항온 배양기에서 60일간 암배양하였다. 균총의 형태적 특징을 조사한 후, 디지털 버어니어캘리퍼스로 균총의 크기(접종원의 직경 제외)를 측정하여 배지의 종류별로 균 생장력을 비교하였다.

온도 변화에 따른 균사생장 특성 조사

고체평판배지 상에서 각 균주가 생장할 수 있는 온도 범위를 조사하기 위해 PDA 배지(pH 6.0)의 중앙에 접종원(직경 6 mm)을 1개씩 접종하고, 5종류(10, 15, 20, 25, 30°C)의 온도로 설정된 각각의 항온 배양기 내에서 60일간 암배양하였다. 균총의 크기(접종원의 직경 제외)를 측정한 후, 각 시험 균주의 기본 생장온도(최저 생장온도, 최적 생장온도, 최고 생장온도)를 설정하였다.

질소원의 종류에 따른 균사생장 특성 조사

외생균근균의 분리와 배양에 널리 사용되는 Modified

Melin-Norkran's medium (MMN)[13]의 일부 성분을 대체하여 Jeon 등[14]이 제시한 방법에 따라 질소원이 서로 다른 4종류의 액체배지(M, M0, M1, M2)를 제조하였다. 질소원 시험 배지 M(1L 기준)은 glucose 10 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 g, $CaCl_2$ 0.05 g, NaCl 0.025 g, thiamin·HCl 0.1 mg, $FeCl_3$(1% sol.) 1.2 ml에 유기질소원(malt extract 3 g)과 무기질소원[$(NH_4)_2HPO_4$ 0.25 g]이 모두 포함되도록 제조하였다. M 배지에서 thiamin·HCl, malt extract, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.25 g 등 질소를 함유한 성분들을 모두 제외한 배지(M0), M0 배지에 무기질소원으로 $(NH_4)Cl$를 첨가한 배지(M1), 그리고 M0 배지에 무기질소원으로 KNO_3를 첨가한 배지(M2)를 각각 제조하였다. 무기질소원인 ammonium phosphate [$(NH_4)_2HPO_4$], ammonium chloride [$(NH_4)Cl$], potassium nitrate (KNO_3)는 배지에 각각 0.25 g/L씩 동일하게 첨가하였다.

질소원 시험배지(pH 5.5, 20 mL / flask) 당 시험균(직경 6 mm 접종원)은 1개씩 접종하였으며, 시험균주(KFRI 1981, 1982, 2253, 2254)는 정치 상태로 25±2°C에서 56일간 암배양하였다. 각 균주의 배양체를 여과 및 건조(70°C, 2일)한 후, 건중량(mg/flask)을 측정하여 질소원 시험배지별로 비교하였다.

섬유소 분해효소 활성 조사

가송이 균주들의 섬유소 분해효소(cellulase) 생산 유무 및 활성도를 조사하기 위해 carboxymethylcellulose(CMC)를 기질로 사용하였다. Kasana 등[15]이 제시한 효소 검색용 배지의 조성에 따라 증류수 1L에 $NaNO_3$ 2 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4$ 0.5 g, KCl 0.5 g, carboxymethylcellulose sodium salt 2 g, peptone 0.2 g을 혼합하였다. 효소 검색용 배지의 pH 변화에 따른 carboxymethylcellulase (CM-cellulase) 활성을 조사하기 위해 Jeon 등[16]이 제시한 방법에 따라 시험배지 4종을 제조하였다. 효소 검색용 배지 혼합액의 최종 pH를 5, 6, 7, 8로 조정하고, 여기에 agar 15 g씩을 첨가하여 각각 고압증기멸균(121°C, 20 min)하였다. 소형 petri dish (55×15 mm)에 배지를 10 mL씩 분주하여 CMC agar plate를 제조한 후, 배지 중앙에 각 균주의 접종원(직경 6 mm)을 1개씩 접종하였다. 25°C에서 8일간 암배양한 후, 배지의 중앙에 염색시약인 Gram's iodine solution (KI 2 g, I_2 1g, 증류수 300 mL)을 1~2 mL씩 떨어뜨려 배지에 고르게 분산시킨 후, 알루미늄 호일로 차광한 상태에서 약 2시간 동안 상온(25±2°C)에 방치하였다. 배지 내 cellulase 비활성 영역(암적색으로 염색)과 cellulase 활성 영역(투명대)을 관찰한 후, 투명대의 직경(접종원의 직경 제외)만을 mm 단위로 측정하여 기록하였다.

균근 합성

가송이 균주들의 균근 형성력을 조사하기 위해 Ka 등[17]이 수행한 무균용기 내 배양법(*in vitro* culture system)을 참조하여 Table 5와 같이 균주별로 시기를 나누어 균근 합성을 시도하였다. 2012년 수집 균주인 KFRI 1982는 2013년도에 소나무 실생묘에 접종하여 3개월간 배양하였으며, 2013년 수집 균주인 KFRI 2254는 2014년도에 소나무 실생묘에 접종하여 8개월 간 배양하였다. 배양 기간을 제외하고는 두 균주 모두 다음과 같이 동일한 조건에서 균근 합성을 시도하였다. 기본 매질은 체(sieve, 체눈 직경 4 mm)를 통과하여 풍건한 마사토(decomposed granite soil)로, 조직배양용 유리용기(규격 1.2 L)에 이를 각각 600 mL씩 담고 여기에 액체배지인 1/4 PDMP (potato dextrose broth 6 g, malt extract 0.75 g, peptone 0.25 g per 1L, pH 5.5)를 100 mL씩 고르게 분주한 후, 토양을 90분간 고압증기멸균하였다. PDA 배지에서 무균 발아시킨 소나무(*Pinus densiflora*) 실생묘를 멸균 토양이 담긴 용기에 핀셋을 이용하여 무균적으로 이식하였다. Sucrose 대신 glucose가 첨가된 Modified Melin-Norkran's medium (MMN, pH 5.5)에서 약 2.5개월 간 배양한 균사체를 실생묘 주변에 총 5 mL씩 접종한 후, 식물조직배양실 내에서 일정기간 명배양(3,500 lux, 23°C)하였다. 시험 균주의 균근 형성력을 조사하기 위해 균을 접종한 실생묘와 균을 접종하지 않은 실생묘(control)의 뿌리를 수돗물과 증류수로 수세한 후, 육안 및 해부현미경을 통해 균근 형성 유무를 관찰하였다. 또한 균 접종이 식물 생장에 미치는 영향을 조사하기 위해 소나무 실생묘 지상부의 길이(shoot length)를 측정하고, 지상부(top; T)와 지하부(root; R)의 건중량도 함께 측정하여 T/R ratio를 구하였다.

결과 및 고찰

고체 배지의 종류에 따른 균사생장 특성

가송이와 그의 근연종인 송이는 외생균근성 균류로 균생장이 비교적 느리며, 이 중 특히 가송이는 생장이 더 느려 다른 균종들과 배양 특성을 비교한 연구가 많지 않다[9]. 이와 같이 가송이는 그들의 생장 특성 상 연구에 제약이 따르기는 하지만, 이미 일본에서는 졸참나무(*Quercus serrata*)나 종가시나무림(*Quercus glauca*)에서 몇몇 가송이 균주를 분리하여 ATCC에 등록을 하였으며, 현재 냉동된 상태로 고가(for profit: $354)에 거래되고 있다[8]. 이들 균주의 배양을 위해 ATCC에서 권장하는 고체배지의 성분을 조사한 결과, 균주별로 생장배지의 조성과 함량은 조금씩 달랐으나, 공통적으로 한 종류의 배지 내에는 균류의 생장에 필수적인 탄소원과 질소원이 모두 포함되어 있었다. 권장 배지 내 주탄소원은 glucose (10 또는 20 g per 1L)였으며, 질소원은 yeast extract, malt extract, peptone 등 각 균주의 권장 배지별로 1~3종류 정도 함유되어 있었다[8]. 또한 가송이의 일부 균주들은 송이와 같이 비록 고체 배지는 아니지만 액체배지 내 고분자인 전분을 분해하여 탄소원으로 이용하는 경우가 있는데, 특히 Ohta[2]는 소량의 포

Table 1. Mycelial growth of *Tricholoma bakamatsutake* strains on four different solid media

KFRI strain No.	Mycelial growth (mm / 60 days)			
	PDA	MEA	SDA	MMNA
1981	4.2 ± 1.0	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.2	5.3 ± 0.4
1982	25.2 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.2	8.3 ± 1.6
2237	9.7 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.5 ± 0.1
2253	23.5 ± 1.2	0.0 ± 0.0	9.1 ± 1.5	9.6 ± 2.8
2254	14.4 ± 1.0	0.0 ± 0.0	7.6 ± 0.3	7.1 ± 1.0

1)KFRI strain: mushroom strain registered in Korea Forest Research Institute, Korea.
2)Refer to Materials and Methods for the abbreviations of the media.
3)The bottom size of agar plate containing the solid agar medium is 85 mm in diameter.
4)Values (except for the size of inoculants, 6 mm in diameter) are mean ± SD of three replicates

도당을 전분과 함께 액체배지에 넣어 배양함으로써 가송이를 포함한 몇몇 외생균근성 균류들이 전분을 탄소원으로 이용할 수 있음을 보여 주었다.

이와 같은 가송이 배양 배지의 성분을 고려하여 탄소원 및 질소원의 종류와 함량이 서로 다른 고체배지에서 가송이 5균주(KFRI 1981, 1982, 2237, 2253, 2254)를 배양한 결과, 5 균주 모두 PDA와 MMNA에서는 균이 생장했으나, MEA에서는 전혀 균이 생장하지 않았다(Table 1). KFRI 1981의 경우, PDA (4.2±1.0 mm)와 MMNA (5.3±0.4 mm)에서 균 생장대의 크기는 유의한 차이가 없었다(p<0.05). KFRI 1981을 제외한 나머지 4균주들은 MMNA에서보다 PDA에서 2~3배 정도 균이 더 잘 생장했으며, PDA에서 가장 높은 균 생장대를 나타낸 균주는 KFRI 1982였다. MMNA는 탄소원, 질소원, 기타 미량원소들이 함유되어 있지만, 탄소원만으로 구성된 PDA에서보다 균 생장대의 크기가 더 작은 것으로 조사되었다. 이러한 결과를 통해 배지 내 질소원보다는 탄소원의 함량이 가송이의 균사 생장에 있어 더 중요한 영향을 끼칠 수도 있음을 알게 되었다. ATCC에서 권장하는 가송이 배양 배지의 대부분에는 포도당이 20 g (per 1 L)씩 포함되어 있으며, 본 연구의 시험배지 중의 하나인 PDA 또한 이와 동량으로 포도당이 포함되어 있다. 그러나 MMNA에는 포도당이 PDA보다 1/2 적게 함유되어 있고, 질소원을 포함한 여러 종류의 미량원소들이 가송이의 포도당 흡수를 저해하는 요인으로 작용할 가능성도 배제할 수 없어 균 생장대의 크기가 PDA에서보다 더 작았던 것으로 생각된다. 또한 전술한 일본 균주의 배양 특성과 같이 가송이 국내 균주 또한 PDA 내 포도당뿐만 아니라 고분자인 전분을 분해하여 탄소원으로 이용하는 능력이 있어 균사 생장에 영향을 끼친 것으로 추론해 볼 수도 있다. KFRI 2237의 경우에는 균 생장이 미약하였으며, 타 균주들에 비해 생장 가능한 배지의 종류도 적어 PDA와 MMNA에서만 균이 생장하였다. SDA 배지에는 탄소원과 질소원이 모두 포함되어 있고, 탄소원인 dextrose가 PDA의 2배, MMNA의 4배 더 포함되어 있었음에도 불구하고 KFRI 2237은 생장하지 않았다. 또한 KFRI 1981이나 1982 역시 SDA에서 균 생장력은 매우 약했다. 따라서 4종의 시험배지 중 PDA는 우리나라 산림에서 수집한 가송이 5균주를 배양하는 데에 가장 적합한 배지로 볼 수 있다.

국내 산림에서 수집한 두 균종(가송이와 그의 근연종인 송이)의 배지별 배양 특성이 유사한지를 비교하였다. 후자는 Jeon 등[16]이 발표한 결과를 참고하였다. 가송이와 송이 모두 MEA에서는 전혀 생장하지 않았으며, 두 균종의 일부 균주들 또한 SDA에서 전혀 생장하지 않았다. PDA와 MMN에서 두 균종 모두 균이 생장하였으나, 가송이의 균 생장력은 송이에 비해 약했다. PDA, SDA, MMNA에서 가송이의 균 생장대의 크기는 송이에 비해 각각 2~10배, 2.5배, 0.5~5배 정도 작았다. 또한 60일 배양 후 가송이와 송이가 형성한 균총(mycelial colony)의 형태적 특성을 비교한 결과, 두 균종 모두 배양 과정 중 배지를 착색시키는 현상은 관찰되지 않았으며, MMNA에서 배양 시 뚜렷하고 규칙적인 간격의 주름은 거의 형성하지 않았다. PDA에서 배양 시 가송이의 균총은 흰색, 옅은 황색, 갈색 등의 균사체가 동심원을 이루거나 균총 내에 산발적으로 혼재되어 있었으며, 균총의 선단부가 불규칙한 형태로 생장하는 모습이 관찰되었다. 반면, 송이의 균총은 PDA에서 배양 시 흰색 또는 크림색을 띠며, 균주 간의 차이는 있으나 비교적 규칙적인 주름을 형성하며 균총의 가장자리가 방사형으로 생장하는 특성이 있다. 가송이의 경우에도 생장이 조금 빠른 일부 균주들은 Fig. 1(c)에서와 같이 PDA 상에서 주름을 형성하나 송이만큼 규칙적인 간격의 주름은 형성하지 않았다. 송이와 같이 균류가 고체배지에서 규칙적인 생물 주름을 형성하는 것이 균사 생장에 더 유리할 지에 관해서는 좀 더 고찰이 필요하다.

온도변화에 따른 균사생장 특성

Terahshima[9]는 일본 Chiba 현에서 수집한 가송이 균주를 GPY(glucose 20 g, polypeptone 5 g, yeast extract 5 g, 기타 무기물로 구성된 한천 배지)에 접종하고, 5~35°C 온도 범위에서 균을 배양한 결과, 5 °C와 35 °C에서는 균이 전혀 생장하지 않았으며, 25 °C에서는 균이 최대로 생장하였다고 보고하였다. ATCC에 등록된 5개의 가송이 일본 균주의 경우에도 포도당을 주 탄소원으로 하는 각 균주의 권장 배지에서 권장 배양 온도는 22(2균주), 23, 25, 26°C였다[8].

본 연구에서는 앞선 GPY나 ATCC에서 권장하는 가송이 생장배지와 포도당 함량 (20 g per 1 L)이 유사하면서도 구입과 제조가 용이한 PDA 배지를 선택하여 이 배지에서 가송이 5 균주(KFRI 1981, 1982, 2237, 2253, 2254)가 생장할 수 있는 온도 범위를 조사하였다. 각 균주를 5 종류

Table 2. Mycelial growth of *Tricholoma bakamatsutake* strains at five different temperatures

KFRI strain No.	Mycelial growth (mm / 60 days)					Cardinal temperature (°C)		
	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	Minimum	Optimum	Maximum
1981	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.5	3.8 ± 0.2	4.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	15	20-25	25
1982	0.0 ± 0.0	7.0 ± 0.4	9.8 ± 0.7	24.7 ± 0.7	3.0 ± 0.7	15	25	30
2237	0.0 ± 0.0	4.2 ± 0.6	5.8 ± 1.3	10.7 ± 1.3	1.6 ± 0.3	15	25	30
2253	0.0 ± 0.0	7.6 ± 1.3	23.5 ± 0.2	23.0 ± 0.7	6.6 ± 0.1	15	20-25	30
2254	0.0 ± 0.0	4.7 ± 0.2	6.6 ± 1.5	16.3 ± 1.2	3.7 ± 1.4	15	25	30

1)All strains were cultured on PDA plates (pH 6.0, 85 mm in diameter) at 25°C.
2)Values (except for the size of inoculants, 6 mm in diameter) are mean ± SD of three replicates

(10, 15, 20, 25, 30°C)의 온도에서 60일간 암배양한 결과, 10°C에서는 모든 균주가 생장하지 않았고, 15~25°C에서는 모든 균이 생장하였다(Table 2). 30°C에서는 KFRI 1981을 제외한 4균주 모두 생장하였으나, 접종원(6 mm)을 제외한 균 생장대의 크기가 1.6~6.6 mm로 생장이 매우 미약하였다. 이와 같은 결과로부터, 가송이 5균주가 생장할 수 있는 최저 온도는 15°C이며, KFRI 1981을 제외한 나머지 4균주들이 생장할 수 있는 최고 온도는 30°C임을 알 수 있었다. Harvey[18]는 외생균근성 균류들이 토양 미생물이기 때문에 그들의 균사 생장이 가능한 최대 온도는 30°C 부근 또는 그 이하가 될 것이라는 것이라 언급하였는데, 본 연구의 가송이 균주 또한 일반적인 토양 미생물들의 생장 특성과 크게 다르지 않았다. 각 균주들의 최적 배양온도를 조사한 결과, 2균주(KFRI 1981, 2253)는 20~25°C에서, 나머지 3균주들은 25°C로 나타나 우리나라 산림에서 수집한 가송이는 25°C에서 영양세포의 생장이 가장 활발한 것을 알 수 있었다. KFRI 1981은 가송이 5균주 중 균사 생장력이 가장 미약하였으며, 기본생장 온도 범위도 15~25°C로 가장 좁았다. 반면 KFRI 2253은 20~25°C에서 배양 시 생장대의 크기가 KFRI 1981보다 약 6배 더 컸으며, 시험균주 중 가장 높은 균 생장력을 나타냈다. 배양 온도 변화에 대한 가송이의 생장 특성은 우리나라와 일본 균주가 크게 다르지 않았다. 또한 국내 산림에서 수집한 가송이와 송이의 최적 생장 온도 또한 20~25°C로 유사하였다[16]. 그러나 이 두 균종의 기본생장 온도 범위는 서로 달라 가송이 균주들의 대부분은 15~30°C인 반면, 송이는 10~25°C로 조사되었다. 버섯의 자실체가 발생할 수 있는 온도 범위와 균사가 생장할 수 있는 온도 범위가 거의 일치한다고 보기는 어렵다. 그러나, 일반적으로 미생물이 생장할 수 있는 온도는 미생물이 서식했던 장소의 평균 온도 범위를 반영하는 경우가 많기[19] 때문에 이들의 자실체 발생 시기와 균사체의 기본 생장 온도 범위가 다소 관련이 있을 것으로 생각된다. 가송이 균주들의 자실체는 우리나라 산림에서 8월 말~9월 초순에 발생하였고, 전술한 송이의 국내 수집 균주들의 자실체는 9월 중순~10월 중순에 발생하였다. 가송이가 송이보다 약 20~50일 먼저 발생한 것으로, 지역별로 온도 차이가 있기는 하나 우리나라의 경우 10월보다는 9월의 온도가 조금 높기 때문에 송이균은 30°C의 고온에 대해, 가송이는 10°C 저온에 대한 적응력이 낮아 균이 생장하지 않은 것으로 보인다.

질소원의 종류에 따른 균사생장 특성

외생균근을 형성하는 균류들은 토양 속에 존재하는 무기 암모늄염뿐만 아니라 유기질소화합물까지 분해하여 질소원을 획득할 수 있는 능력을 가지고 있다. Terashima[10]는 실험실 내 배양을 통해 일본에서 수집한 가송이 균주의 질소원 이용 능력을 조사하였다. 그 결과, 효모 추출물이나 펩톤과 같은 유기 질소원이 첨가된 배지에서 균사 생장이 우수하게 나타나 이들이 유기질소원 분해 능력이 있음을 보고하였다. 무기질소원 또한 산림에 풍부하며, 대부분의 균근성 균류들은 질산염보다는 암모늄 형태의 무기질소원을 더 잘 이용하는 것으로 알려져 있다[20]. 가송이 일본 균주 역시 유기질소원 뿐만 아니라 무기 질소원도 이용할 수 있는데, 무기 질소원 중에서도 질산염 형태의 질소원(예: KNO_3, $NaNO_3$)보다는 암모늄 형태의 질소원(예: NH_4Cl, $(NH_4)_2C_4H_4O_6$)이 함유된 배지에서 균체량이 더 높은 것으로 조사되었다[10]. 우리나라 산림에서 수집한 송이 균주들의 경우, 질산염보다는 암모늄 형태의 무기질소원을 더 잘 이용하는 것으로 나타나[14] 그의 근연종인 가송이 또한 암모늄 형태의 질소원이 함유된 배지에서 균이 더 잘 생장할 것이라 예측하였다. 또한, Terashima[10]의 앞선 연구 결과에서와 같이 우리나라 산림에 서식하는 가송이 균주들도 암모늄 형태의 질소원 배지에서 더 잘 생장하는 특성을 가질 것이라 생각되었다. 이에 본 연구에서는 가송이 균주의 질소원 요구성을 조사하기 위해 M1과 M0 배지에서의 균체량을 비교한 결과, 가송이 4균주 모두 M0배지에서 보다 유기질소원과 무기질소원이 모두 포함된 배지(M)에서 1.6~1.8배 더 높았다(Table 3). 또한 유기질소원은 없으나 무기질소원이 대체된 M1과 M2배지에서의 균체량은 M0 배지에서와 같거나 1.1~1.2배 정도 높았으며, M배지에서 보다는 1.3~1.9배 정도 낮아 가송이 균주들의 생장에 있어 무기질소원보다는 유기질소원 요구도가 좀 더 높은 것을 알 수 있었다. 무기질소원이 서로 다른 M1과 M2 두 배지에서의 균체량을 비교한 결과, KFRI 1981과 1982는 M2보

Table 3. Mycelial growth and preference for nitrogen source of *Tricholoma bakamatsutake* grown in liquid media containing different nitrogen sources

KFRI strain No.	Mycelial growth (Dry weight of mycelium, mg/flask)				Preference for nitrogen source	
	M	M0	M1	M2	M1	M2
1981	29.9 ± 1.8	17.1 ± 0.6	20.3 ± 0.5	18.8 ± 0.2	●	
1982	36.6 ± 0.7	21.6 ± 0.7	28.3 ± 0.7	19.6 ± 1.0	●	
2253	28.2 ± 0.8	17.3 ± 0.7	21.0 ± 1.3	20.6 ± 0.3	●	●
2254	27.1 ± 0.1	15.6 ± 0.3	17.0 ± 0.6	17.4 ± 0.2	●	●

1)Refer to Materials and Methods for the abbreviations of the media.
2)Black points (●) indicate the preferred nitrogen sources (ammonium or nitrate form) on the mycelial growth of *T. bakamatsutake*.
3)The above values are mean ± SD of three replicates.

다 M1배지에서 균체량이 유의하게 높아 질산염보다는 암모늄 형태의 질소원을 더 잘 이용하는 것으로 조사되었다. KFRI 1981과 1982의 이러한 특성은 우리나라 산림에서 수집한 송이 균주들이나 일본산 가송이 균주들 보여 준 결과 즉, 질산염보다 암모늄 형태의 질소원에 대한 이용 능력이 더 높다는 선행 연구결과들[10, 14]과도 일치한다. 반면, KFRI 2253과 2254는 두 배지에서 균체량에 유의한 차이가 없었으나 무기질소원이 결여된 M0배지에서보다 균체량이 높게 나타나 이 두 균주 모두 무기질소원을 필요로 하기는 하나 특정한 형태의 무기질소원을 선택하여 이용하는 것이라고 보기는 어려웠다.

섬유소 분해효소 활성

산림에 서식하는 목재부후균들은 cellulase나 laccase와 같은 목질분해효소를 이용하여 그들의 생존과 생장에 필요한 영양원을 섭취한다. 특히 목재를 구성하는 성분 중 고분자인 cellulose를 저분자의 형태로 분해하여 이용하는 능력은 부후성 균류만이 갖는 것으로 인식되어 왔다. 그러나 외생균근성 균류들의 일부가 cellulase 활성을 나타내며[16], 송이의 경우에도 전분이나 셀룰로오스를 분해할 수 있는 효소를 생산한다는 것이 밝혀졌다[21, 22]. Kusuda 등[21]은 송이가 2종류의 효소를 이용하여 탄소원을 획득할 수 있는 경로를 각각 설명하면서 고분자인 cellulose를 cellulase가 먼저 oligosaccharides로 분해한 후, oligosaccharide에 존재하는 β-1,4 glucosidic bond를 β-glucosidase가 순차적으로 끊음으로써 최종 분해산물인 glucose의 형태가 된다고 보고하였다. 또한 Terashita[22]는 송이의 7균주가 CM-cellulase 활성을 나타낸다고 보고하였다. 이와 같이 cellulase나 β-glucosidase 활성이 있다는 것은 송이가 부후적 특성을 갖고 있다는 의미로 해석할 수 있다. 또한 함께 공생하는 기주식물로부터 탄소원인 포도당을 공급받지 못하는 경우에도 셀룰로오스 등과 같은 목질분해효소를 생산하여 주변의 목재를 이용 가능한 형태의 영양원으로 선택적으로 전환하는 능력이 있을 것으로 생각된다. 이러한 분해효소들의 활성도 또한 균이 접하게 되는 생태적 환경에 따라 달라질 것으로 생각된다. 벌목 등으로 산림 내 기주식물의 광합성 능력이 현저히 저하되거나 병원균에 감염된 경우 주변의 죽은 나무나 벌채목 등에서 탄소원을 섭취해야 하기 때문에 목질분해효소의 생산과 활성이 강화될 것이다. 또한 실험실 내 인공배지에서 계대배양을 지속하는 경우에도 배지에 함유되어 있는 탄소원의 종류에 따라 분해효소의 활성이 서로 다르게 나타날 것이다.

과거 송이는 자연계에서 기주식물과 공생하며 탄소원을 공급받기 때문에 기주식물 없이는 인공재배도 불가능한 것으로 생각되었다. 그러나 전술한 바와 같이 송이를 비롯한 일부 외생균근성 균류들이 cellulase와 같은 부후적 특성을 대변하는 목질분해효소를 생산한다는 점은 비록 많은 조건들을 고려해야 하겠지만 송이도 기주식물 없이 부후성 균류처럼 인공재배가 가능할 수 있다는 기대를 갖게 한다. 송이의 근연종인 가송이 또한 외생균근성 균류이면서 식용버섯으로서의 발굴 가치가 있는 균류 중의 하나로 이들의 생리적 특성 또한 송이와 유사할 것이라 판단되어 본 연구에서는 이들의 CM-cellulase 활성을 시험하여 국내 송이 균주의 CM-cellulase 활성을 조사한 기존의 연구 결과[16]와 비교하였다.

가송이 2균주(KFRI 1981, 2253)는 pH 5-6 범위의 CMC agar plate 상에서, 나머지 3균주들은 pH 6.0의 plate 상에서 CM-cellulase 활성이 가장 높게 나타났으며, pH 8.0에 가까울수록 효소의 활성이 감소하는 경향을 나타냈다 (Table 4). 5균주 중 3균주(KFRI 1981, 1982, 2254)는 CMC agar plate의 모든 pH 범위에서 CM-cellulase 활성을 나타냈으며, 특히 KFRI 1982는 모든 pH 범위에서 다른 4균주들보다 높은 효소 활성을 나타냈다. KFRI 2237은 pH 5.0과 pH 8.0인 CMC agar plate에서, KFRI 2253은 pH 5.0에서 각각 효소 활성이 전혀 나타나지 않았다. 이 두 균주와 같이 CM-cellulase 활성을 나타내는 CMC agar plate의 pH 범위가 타 균주들에 비해 좁다는 것은 이 균주들이 cellulose를 분해할 때에 주변 pH에 더 민감하게 반응할 수 있다는 의미로 해석된다. 5 균주들 중 효소 활성이 전반적으로 가장 낮게 나타난 균주는 KFRI 2253으로 pH 6.0인 CMC agar plate 상에서는 KFRI 1982보다 효소 활성이 5.6배 낮았다. 이는 cellulose와 같은 고분자 탄소원이 주어진

Table 4. CM-cellulase activity of *Tricholoma bakamatsutake* on carboxylmethylcellulose (CMC) agar plate with different pH

KFRI strain No.	CM-cellulase activity (mm)[3]			
	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
1981	7.6 ± 0.6	5.9 ± 1.6	5.1 ± 0.3	3.3 ± 0.2
1982	14.1 ± 0.1	14.4 ± 0.0	10.3 ± 0.5	7.6 ± 0.1
2237	0.0 ± 0.0	12.1 ± 1.0	5.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0
2253	3.8 ± 0.7	2.5 ± 0.4	1.6 ± 0.3	0.0 ± 0.0
2254	6.8 ± 0.1	8.4 ± 0.5	4.9 ± 0.3	3.0 ± 0.1

[1)]Strains were incubated on solid agar media containing 0.2% (w/v) CMC with different pH (pH 5-8) for 8 days at 25°C.
[2)]The bottom size of CMC agar plate is 55 mm in diameter.
[3)]The CM-cellulase activity was determined by the size (mm in diameter) of cellulolytic zone only.
[4)]Values are mean ± SD of three replicates.

환경에서 KFRI 2253이 타 균주들보다 영양원을 획득하는 경쟁에서 다소 불리할 것으로 생각된다.

본 연구와 동일한 방법으로 수행했던 선행 연구 결과에서는 송이 7균주의 CM-cellulase 활성이 pH 5.0의 CMC agar plate에서 최대였으며, pH 8.0에 가까울수록 효소 활성이 감소하였고, 시험 균주 중의 한 균주는 pH 8.0인 plate에서 전혀 효소 활성이 나타나지 않았다. 이는 앞서 기술한 가송이의 CM-cellulase 활성과 유사한 특성으로 송이와 그의 근연종인 가송이 모두 섬유소를 분해할 수 있는 능력은 있으나, 그 활성도가 CM-cellulase의 활성 기질(cellulose)이 놓여있는 pH의 조건에 따라 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 또한 CM-cellulase의 최대 활성은 두 균종 모두 pH 5-6 부근의 CMC agar plate에서 나타났는데, 대부분의 균류가 pH 5-6 부근의 agar plate에서 균 생장이 활발한 것과 같이 이러한 pH 범위에서는 균류의 균사 생장이나 세포외 효소 생산 등 물질대사에 관여하는 일련의 유전자들이 활성화되기에 최적인 환경 조건 중의 하나가 되기 때문이라 생각한다. 효소 활성도 면에서는 가송이와 송이 모두 동일 종내 균주 간 차이가 있다는 점은 비슷했으나, 송이 균주들에 비해 가송이의 CM-cellulase 활성은 전반적으로 약하였다. 한 예로 pH 6.0인 CMC agar plate 상에서 송이 균주들의 효소 활성대의 크기는 10.6~37.4 mm 범위 였으며, 가송이 균주들의 효소 활성대의 크기는 2.5~14.4 mm 범위였다.

균근 형성

최근 Yamanaka 등[23]은 일본 침엽수림에서 수집한 송이 2균주와 참나무림에서 수집한 송이의 두 근연종(가송이 4균주와 *T. fulvocastaneum* 1균주)을 대상으로 *in vitro* 환경에서 균근 합성을 시도하였다. 그 결과, 송이의 한 균주를 제외하고는 6균주 모두 소나무(*Pinus densiflora*), 신갈나무(*Quercus serrata*), 졸가시나무(*Qercus phillyraeoides*) 무균 묘목과 외생균근을 형성하여 이들의 기주 범위가 자연계보다 *in vitro*에서 더 넓다는 것을 보고하였다. 우리나라 신갈나무림에서 수집한 가송이 또한 기주 범위가 참나무류에 국한되어 있지는 않을 것이라 생각되며, 실험실 내에서도 참나무보다는 소나무의 무균 묘목 생산이 용이하기 때문에 이러한 이유로 균근 합성에 소나무 유묘를 사용하였다.

가송이(KFRI 1982)는 신갈나무림에서 발생한 균주임에도 불구하고, 그 순수배양체를 분리하여 실험실의 배양병 내 소나무 유묘에 접종한 결과, 약 3개월 만에 100% 균근을 형성하였다(Table 5). KFRI 1982를 접종한 소나무 뿌리의 외형을 육안으로 관찰한 결과, 한 소나무 개체 내에서도 크게 2가지 서로 다른 형태적 특징을 갖는 부위가 공존하였다(Fig. 2a, 2b). 첫째, 주근(main root)의 일부나 측근(lateral roots), 세근(fine roots)이 검정 또는 갈색을 띠며 뿌리가 비후화되어 있지 않고 균사체의 흔적이 없는 부위 즉, 균에 감염되지 않은 부위가 존재하였다. 둘째, 측근이 다소 가늘게 신장되어 있고 흰색 또는 옅은 크림색을 끼며, 흰색의 가지 모양의 세근들이 다발 형태로 마사토와 밀착되어 균에 감염되었다고 생각되는 부위가 관찰되었다. 이

Table 5. Condition for mycorrhizal synthesis, mycorrhization, and growth of *Pinus densiflora* seedlings by *Tricholoma bakamatsutake* strains

KFRI strain No.	Condition for mycorrhizal synthesis				Mycorrhization (%)	Shoot length (mm)	Dry weight biomass (mg /seedling)		T/R ratio
	Incubation period	Soil	Medium	Seedling			Top	Root	
Control	3 months	Granite soil	1/4PDMP	P. densiflora	0 (n=3)	31.3 ± 9.0	26.5 ± 6.5	6.5 ± 0.2	4.1 ± 1.0
1982	3 months	Granite soil	1/4PDMP	P. densiflora	100 (n=3)	32.2 ± 6.8	57.8 ± 8.4*	18.9 ± 6.4*	3.2 ± 0.6
Control	8 months	Granite soil	1/4PDMP	P. densiflora	0 (n=5)	39.4 ± 10.3	85.8 ± 1.4	17.5 ± 6.3	5.3 ± 1.5
2254	8 months	Granite soil	1/4PDMP	P. densiflora	100 (n=5)	46.2 ± 5.9	161 ± 39.5*	59.7 ± 18.4*	2.8 ± 0.6

[1)]Refer to Materials and Methods for the abbreviation and composition of medium
[2)]Seedling growth of *P. densiflora* is expressed as shoot length and biomass (top and root) measured after 3 or 8 months
[3)]A series of t tests were used to determined the differences between un-inoculated (Control) and inoculated seedlings
*significantly different values when compared with control (p<0.05).

Fig. 2. Morphological characteristics of *T. bakamatsutake* (KFRI 1982) ectomycorrhizae observed on *P. densiflora* seedlings after 3 months of inoculation. A, External view of *P. densiflora* seedling inoculated with *T. bakamatsutake* (KFRI 1982); B, Enlarged view of *P. densiflora* seedling root inoculated with *T. bakamatsutake* (KFRI 1982); C, Roots of un-inoculated *P. densiflora* seedling by stereomicroscope; D, Ectomycorrhizal roots of *P. densiflora* seedling infected by *T. bakamatsutake* (KFRI 1982). Scale bar = 1 mm.

를 해부현미경으로 관찰한 결과, 흰색의 균사체가 소나무 유묘의 뿌리 표면을 두껍게 감싸 군락화를 이루었으며, 주로 측근에서 파생된 세근의 말단에 단순형 또는 차상분지형의 균근이 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2d, 2e). 균을 접종하지 않은 대조군의 경우에는 뿌리털이 관찰되었으나, 균근 주위에는 뿌리털이 관찰되지 않았다. KFRI 1982의 접종이 소나무 유묘의 생장에 끼치는 영향을 알기 위해 신초 길이(shoot length), 지상부와 지하부의 건중량, 지상부와 지하부의 비율(T/R ratio) 등을 구하여 대조군(균을 접종하지 않은 소나무 유묘)과 비교하였다. 그 결과, 신초 길이는 KFRI 1982를 접종한 시험군(31.3±9.0 mm)과 균을 접종하지 않은 대조군(32.2±6.8 mm) 모두 유의한 차이를 나타내지 않았다(t-test, $p<0.05$). 그러나 소나무 유묘의 지상부(shoot 또는 top)와 지하부(root system)의 건중량은 KFRI 1982를 접종한 시험군이 대조군보다 각각 약 2.2배, 2.9배 더 큰 것으로 측정되었다(Table 5). 이러한 결과를 통해 시험균이 소나무 유묘의 길이 생장보다는 생체량 증가에 더 영향을 끼침을 알 수 있었다. 소나무 유묘의 T/R ratio를 조사한 결과, KFRI 1982를 접종한 시험군은(3.2±0.6)과 대조군(4.1±1.0) 간 유의한 차이를 볼 수 없었다. 자연계에서 식물이 T/R ratio 1.0을 유지하며 생장하려는 특성과는 달리, 무균 배양병 내에서 배양 시에는 시험군과 대조군 모두 지상부가 지하부보다 약 3-4배 더 비대하게 생장하는 특성을 나타냈다.

위의 KFRI 1982를 이용한 균근 합성 실험과는 별도로 가송이가 소나무와 균근을 형성하는 지를 재 검증하기 위해 신갈나무림에서 분리한 또 다른 새로운 가송이 균주 KFRI 2254를 이용하여 균근 합성을 시도하였다. 또한 배양기간이 길어지면 무균 배양병 내에서 소나무 유묘의 생장 특성이 어떻게 변화하는지를 알기 위해 균근 합성 기간을 8개월로 연장하여 실험하였다. 균을 접종한 지 8개월 후, KFRI 2254와 소나무 유묘 간 균근 형성률은 100%였다.

균을 접종하지 않은 대조군과 KFRI 2254를 접종한 시험군의 소나무 유묘의 외형을 관찰한 결과, 전반적으로 시험군이 대조군에 비해 지상부와 지하부의 생장이 우월한 것으로 보였다. 또한 대조군의 경우, 뿌리가 검정 또는 갈색을 띠며 측근의 굵기가 비교적 일정한 반면(Fig. 3a), KFRI 2254를 접종한 시험군에서는 대조군과 유사한 특성이 있는 부위뿐만 아니라 측근의 일부가 다소 가늘어지고 밝은 갈색이나 흰색을 띠는 부위가 두드러지게 관찰되고 뿌리털이 발달하지 않는 등 KFRI 1982에서와 유사한 외형적 특성을 나타냈다(Fig. 3c).

KFRI 2254를 접종한 소나무 유묘를 해부현미경을 통해 관찰한 결과, 소나무 유묘의 뿌리에 균의 군락화가 치밀하게 이루어졌으며, 세근의 말단부가 균에 의해 비후화되어 흰색의 단순형 또는 차상분지형의 균근을 형성한 것을 볼 수 있었다(Fig. 2d). 앞서 기술한 대조군과 시험군의 외형적 차이를 정량적인 자료로 검증하기 위해 두 집단 간 신초 길

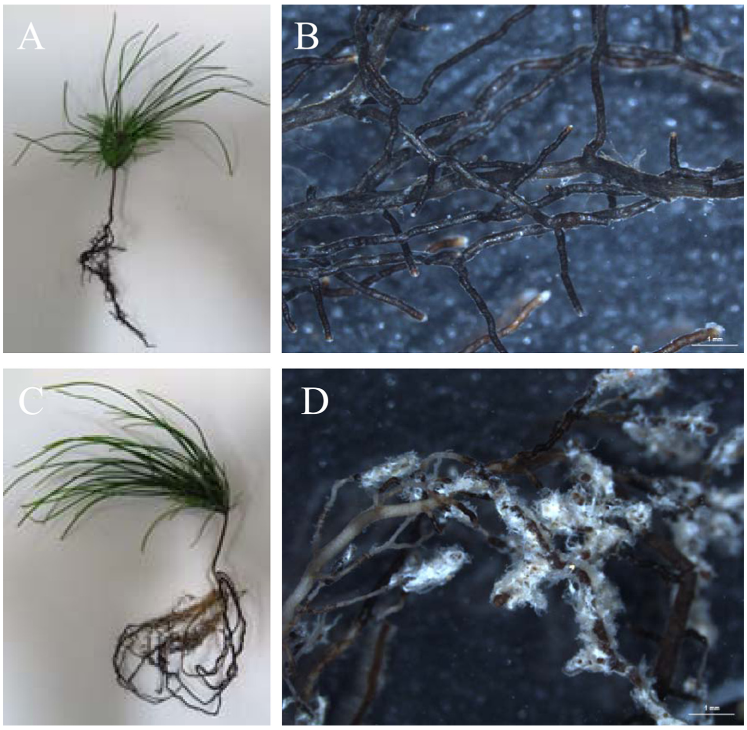

Fig. 3. Seedling growth of *P. densiflora* and morphological characteristics of *T. bakamatsutake* (KFRI 2254) mycorrhizae after 8 months of inoculation. A, External view of un-inoculated *P. densiflora* seedling showing a poor growth; B, Roots of un-inoculated *P. densiflora* seedling by stereomicroscope; C, External view of *P. densiflora* seedling inoculated with *T. bakamatsutake* (KFRI 2254); D, Ectomycorrhizal roots of *P. densiflora* seedling by *T. bakamatsutake* (KFRI 2254). Scale bar = 1 mm.

이, 지상부와 지하부의 건중량, T/R ratio 등을 비교하였다. 소나무 유묘의 신초 길이는 대조군과 시험군 모두 통계적으로 유의한 차이가 없어(t-test, $p<0.05$) KFRI 1982를 접종한 앞선 실험에서와 같이 소나무 유묘의 신초 길이 생장에는 KFRI 2254가 영향을 끼치지 않았다(Table 5). 그러나 소나무 유묘의 지상부와 지하부의 건중량은 KFRI 2254를 접종한 시험군이 대조군에 비해 각각 약 1.9배, 3.4배씩 더 큰 것으로 조사되어 KFRI 2254가 소나무 유묘의 생장량을 유의하게 증가시켰다. T/R ratio는 KFRI 2244를 접종한 시험군이 대조군보다 1.9배 더 낮게 나타나 지상부와 지상부가 균형을 이루며 생장하려는 경향이 대조군보다는 시험군에서 좀 더 높음을 알 수 있었다.

비록 서로 다른 가송이 균주를 대상으로 별도로 진행한 균근 합성 실험이긴 하지만, 소나무 유묘의 신초 길이는 대조군과 시험군 모두 3개월이나 8개월 배양 후에도 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 균근 합성용 무균배양병 내 공간적 제약으로 인해 소나무 유묘의 신초가 길이 생장할 수 있는 기회가 감소됨으로써 병 내의 특정 길이까지만 생장이 제한되어 나타난 결과로 해석된다. 또한 접종 균주, 접종 시기, 시험 묘목의 수가 동일한 상태에서 배양 기간만을 달리하여 균근 합성을 시도한 것은 아니지만, 대조군과 시험군 모두 소나무 유묘의 생체량이 배양 3개월째보다는 8개월인 유묘에서 더 크게 나타났다. 이를 통해 비록 자연 생태계는 아니지만, 무균배양병 내에서도 일정기간 유묘의 배양기간을 증가시키면 자연 상태에서의 식물 생장 현상과 같이 유묘의 생체량이 증가한다는 사실을 알 수 있었다. T/R율을 비교한 결과, 3개월 배양 후에는 대조군과 시험군 간에 차이가 없었으나, 8개월 배양 후에는 대조군(5.3±1.5)보다 균을 접종한 시험군(2.8±0.6)에서 더 낮게 나타나는 경향이 있었다(Table 5). KFRI 1982를 접종했던 소나무 유묘보다 KFRI 2254를 접종했던 유묘의 T/R ratio가 낮은 이유는 배양기간이 길어짐에 따라 균에 감염되기 쉬운 어린 뿌리들이 많이 생성되고, 여기에 균근이 함께 발달하여 지하부가 비대해짐으로써 생중량이 증가하기 때문에 상대적으로 T/R율은 대조군보다 낮아진 것이라 생각된다.

우리나라 산림에서 수집한 가송이 균주들의 균사체는 CM-cellulase 활성이 있으면서 그들의 자실체가 발생했던 기주가 아닌 소나무 유묘와도 균근을 형성하였다. 이는 Yamanaka 등[23]의 연구 결과와도 일치하는 것으로 우리나라의 가송이 균주들 또한 자연계보다 *in vitro*에서 기주범위가 더 확장될 수 있다는 것을 의미한다. 가송이가 외생균근성 균류이긴 하지만, 때로는 cellulase 활성과 같은 부후적인 특성을 나타내는 이유 또한 그들이 처한 환경에 적응하면서 살아가기 위한 일종의 생존 전략이라 생각된다. 또한 가송이뿐만 아니라 많은 외생균근성 균류들이 목질분해효소와 같은 부후적인 특성을 나타내는 유전자들을 획득

하고 발현하는 데에는 산림 내 식생이나 기후 변화, 실험실 내에서의 계대배양 등이 중요한 인자로 작용할 것이라 생각되며, 이에 대한 검증과 해석은 유전적 접근을 통해 가능할 것이다.

적 요

가송이(*Tricholoma bakamatsutake*)는 송이(*Tricholoma matsutake*)의 근연종으로 식용 가능한 외생균근성 버섯 중의 하나이다. 본 연구는 우리나라 신갈나무림에서 수집한 가송이 균주들의 생리학적 특성에 관한 최초의 보고로, 자실체의 조직으로부터 순수 분리한 균주를 대상으로 다양한 조건(배지, 온도, 질소원)에서 이들의 배양 특성을 조사하였다. 대부분의 균주들은 PDA 배지, 20 또는 25°C의 배양온도에서 균 생장력이 높았으며, 시험균 중 2균주는 그들의 균사생장에 질산염보다 암모늄 형태의 무기질소원을 더 선호하였다. 가송이는 근연종인 송이와 최적배양 조건이 유사하기는 하나, 균사생장 속도가 송이보다 더 느림을 알 수 있었다. 가송이의 모든 균주들은 carboxymethylcellulose 배지 상에서 cellulase 활성을 나타냈다. 또한 가송이 2균주는 소나무 실생묘에 이들 균을 접종한 지 3 또는 8개월 후 균근을 각각 형성하였으며, 균을 접종하지 않은 묘목보다 균을 접종한 묘목의 생체량이 더 큰 것으로 조사되었다.

감사의 글

본 연구는 국립산림과학원 '산림미생물 유전자원의 수집 및 증식 보존 기술 연구(FP 0801-2010-01)'와 '송이 시험지 모니터링 및 송이 실현재배(FP 0801-2013-01)'의 지원을 받아 수행되었습니다.

REFERNCES

1. Index Fungorum. Search Index fongorum [Intenet]. Index Fungorum Partnership; 2014. Available from http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=324912.
2. Ohta A. Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. Mycoscience 1997;38:403-8.
3. Hosford D, David P, Randy M, Michael A. Ecology and management of the commercially harvested American matsutake mushroom. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-412. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station; 1997.
4. Yamada T. Isolation of *Tricholoma matsutake* and *T. bakamatsutake* cultures from collected filed-collected ectomycorrhizas. Mycoscience 2001;42:43-50.
5. Choi HK. Nongzhenghuiao III. In: Lee GY, editor. Ancient agricultural books that were collected and translated by RDA (Rural Development Administration); 2007.
6. Wills RM, Lipsey RG. An economic strategy to develop non-timber forest products and services in British Columbia. Final Report; Forest Renewal BC Project No. PA97538-ORE. Cognetics International Research Inc.; 1999.
7. Yamada A. Utility of mycorrhizal mushrooms as food resources in Japan. J Fac Agric Shinshu Univ 2002;38:1-17.
8. American Type Culture Collection (ATCC); 2014 Available from http://www.atcc.org/
9. Terashima Y. Change in medium components and colony morphology due to mycelial growth of ectomycorrhizal fungus *Tricholoma bakamatsutake*. Mycoscience 1994;35:153-9.
10. Terashima Y. Carbon and nitrogen utilization and acid production by media of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma bakamatsutake in vitro*. Mycoscience 1999;40:51-6.
11. Yamanaka T. Researches for development of the cultivation of *matsutake*, a prized mushroom produced by the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. Bulletin of FFPRI 2012;11:85-95.
12. Zimbro MJ, Power DA. Manual of microbiological culture media. Sparks: Becton Dickinson and Company; 2003.
13. Marx DH. 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 1969;59:153-63.
14. Jeon SM, Ka KH. Nitrogen source-requirement and preference of ectomycorrhizal fungi in pure culture. Kor J Mycol 2013;41:149-59.
15. Kasana RC, Salwan R, Dhar H., Dutt S, Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Curr Microbiol 2008;57:503-7.
16. Jeon SM, Kim MS, Ka KH. Effects of medium, temperature and pH on mycelial growth and cellulase activity of ectomycorrhizal fungi from Korean forests. Kor J Mycol 2012;40:191-203.
17. Ka KH, Park H, Hur TC, Bak WC. Selection of ectomycorrhizal isolates of *Tricholoma matsutake* and *Tricholoma magnivelare* for inoculation on seedlings of *Pinus densiflora in vitro*. Kor J Mycol 2008;36:148-52.
18. Harvey LM. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. Biotech Adv 1991;9:13-29.
19. Madigan MT, Martinko JM and Parker J. Brock biology of microorganisms. 9th ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc.; 2000.
20. Read DJ, Leake JR, Langdale AR. The nitrogen nutrition of mycorrhizal fungi and their host plants. In: Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi. Cambridge University Press; 1989. p. 181-204.
21. Kusuda M, Ueda M, Miyatake K, Terashita T. Characterization of the carbohydrase productions of an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. Mycoscience 2008;49:291-7.
22. Terashita T, Kono M, Yoshikawa K, Shishiyama J. Productivity of hydrolytic enzymes by mycorrhizal mushrooms. Mycoscience 1995;36:221-5.
23. Yamanaka T, Ota Y, Konno M, Kawai M, Ohta A, Neda H, Terashima Y, Yamada A. The host ranges of conifer-associated *Tricholoma matsutake*, Fagaceae-associated *T. bakamatsutake* and *T. fulvocastaneum* are wider *in vitro* than in nature. Mycologia 2014;106:397-406.