

## 신규 애주름버섯 NIFOS101을 이용한 천마 종자의 발아효율 증진

이효련 · 한무호 · 최미나 · 이호신 · 이석우 · 박응준

### Enhancement of the germination efficiency of *Gastrodia elata* seeds using a new *Mycena* species

Hyo-Ryeon Lee · Muho Han · Mi Na Choi · Hyoshin Lee · Seok-Woo Lee · Eung-Jun Park

Received: 6 February 2017 / Revised: 15 March 2017 / Accepted: 15 March 2017  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** This study investigated the *in vitro* symbiotic seed germination of the achlorophyllous orchid, *Gastrodia elata*, using a new *Mycena* species. A leaf-disc (2x2 cm) of *Quercus acutissima* was inoculated with either of the two fungal species, NIFOS101 (NCBI accession number KY449288) or KFRI1212 (HQ662845), following which it was placed on water agar medium, prior to sowing seeds of *G. elata*. After 20 days of symbiotic culture, NIFOS101 and KFRI1212 germinated 94% and 70% of *G. elata* seeds, respectively, although the initiation of protocorm development was induced much earlier by KFRI 1212 than by NIFOS101. Furthermore, the NIFOS101 mycelia grew much faster than KFRI 1212 at all temperatures tested. A phylogenetic analysis using the internal transcribed spacer (ITS) sequences showed that NIFOS101 belonged to a clade with *M. purpureofusca*, which completely differed from the clade with KFRI1212. This study not only identified a new fungal species, NIFOS101, which improved the rate of symbiotic seed germination up to 94% as compared to KFRI1212 (70%), but also revealed that *G. elata* required a broad taxonomic range of fungi for its symbiotic germination.

**Keywords** Achlorophyllous orchid, *Quercus acutissima*, Protocorm, *Mycena purpureofusca*, Phylogenetic analysis

### 서 언

천마(*Gastrodia elata*)는 광합성 능력이 퇴화되어 독립적인 생육이 불가능한 난과(*Orchidaceae*)의 고등식물이다. 생장 단계에 따라 애주름버섯균(*Mycena*)과 뿔나무버섯균(*Amillaria mellea*)이 공생하는 기생식물이다(Lee 1982; Kim et al. 2012). 주로 한국, 중국 및 일본 등에 분포하는 다년생 식물로, 덩이 줄기(tuber)는 굵으며 긴 타원형이고 길이는 7~15 cm 정도이다. 천마의 꽃대는 높이가 1 m 정도이고 개화기인 5~6월에만 관찰이 가능하다. 꽃의 색깔에 따라 홍천마(*Gastrodia elata* for. *elata*), 청천마(*Gastrodia elata* for. *glauca*) 그리고 녹천마(*Gastrodia elata* for. *viridis*)로 구분한다(Kim et al. 2013). 꽃은 이삭화서로 약 5~7일에 걸쳐 꽃대 아래에서 위로 개화하며, 1개의 꽃대에서 약 30~100개의 꽃이 핀다. 꽃은 끝이 모아진 봉우리 형태이고, 향기와 맛이 없어서 곤충 매개에 의한 수분율이 매우 저조하다(Hong et al. 2004). 뿐만 아니라 천마의 종자는 배유가 없고 배만 있어서 자연상태에서 균류와의 공생 없이는 발아가 불가능하다(Smith and Read 2008).

천마의 주요 기능성 물질로는 gastrodin, vanillyl alcohol 및 ergothionine 등이 알려져 있다(Bin and Chen 2004; Hayashi et al. 2002; Lee et al. 2002). 중풍, 고혈압, 현기증 그리고 신경성 질환 등 각종 신경계통의 질환에 약효를 나타낸다고 알려진 천마의 생산량은 지속적으로 증가하고 있다(Huang 1985; Chang and But 1986).

천마의 인공재배는 1995년 농촌진흥청에서 개발한 뿔나무버섯균 ‘천마1호’와 1998년 국립산림과학원이 개발한 ‘홍릉천마균’이 보급되면서 무성증식법으로 이루어졌다. 그러나 지속적인 무성증식으로 인해 개체가 가늘고 길어져 상품가치가 떨어지는 문제가 발생되었다. 또한, 자마의 수확과 저장 시 발생하는 상처를 통하여 곰팡이와 세균이 오

H.-R. Lee · M. Han · M. N. Choi · H. S. Lee · S.-W. Lee · E.-J. Park (✉)  
국립산림과학원  
(Korea Forest Research Institute, 39 Onjeong-ro, Gwonseon-gu, Suwon 441-847, Korea)  
e-mail: pahkej@korea.kr

염되어 천마의 생산량이 감소하는 주요 원인이 되고 있다 (Bae et al. 2012). 이러한 문제점을 해결하기 위해 천마의 종자로부터 무병(disease-free)한 상태의 자마를 생산할 수 있는 유성증식법이 개발되었다(Park et al. 2012; Kim and Park 2013). Park과 Lee (2013)는 천마의 종자를 발아시킬 수 있는 *Mycena osmundicola* (KFRI1212)와 *Mycena* sp. (KFRI1212)를 선발하였다. 비교적 발아율이 높게 나타났던 KFRI1212 균주를 이용하여 천마의 종자를 발아시킬 경우 원구경의 형성 효율은 좋으나 균사의 성장 속도가 느린 문제를 가지고 있다. 이러한 문제는 원구경의 길이 신장, 측지 형성 및 발달이 균일하지 못하게 되거나 균사와 물리적으로 접촉되지 못한 종자들은 미발아 상태로 남게 되는 문제를 야기한다.

본 연구에서는 천마 종자의 신규 발아균주인 NIFOS101을 공시하고, 종래의 발아 균주인 KFRI1212에 비해 발아 효율 및 원구경의 생장이 증진되는 것을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 기내 배양조건

덕유산(35°51'N, 127°39'E, 고도 400 m)에 있는 참나무류 식재지의 낙엽에서 성장 중인 균사를 채집한 후 항생제(ampicillin, 200 mg/L)를 첨가한 PDA배지(potato starch 4 g/L, dextrose 20 g/L, agar 15 g/L)에 배양하였다. 배양된 균사를 외과용 메스를 이용하여 0.5x0.5 cm 크기로 잘라내어 PDA배지에 다시 접종한 후 24°C의 항온기에서 배양하였다. 이때 단일 균사만을 새로운 배지에 이식하여 단일 균주로 분리하였다.

### 형태학적 특성 분석

단일 균주로 분리된 애주름버섯속 NIFOS101 (KY449288)과 KFRI1212 (HQ662845)의 균사체를 각각 PDA배지에 올려놓은 후 24°C에서 3주 동안 배양하여 균총 형성을 관찰하였다. 두 균주 간의 유전적 차이를 구분하는 방법으로 대치배양방법(Bak et al. 2009)을 사용하여 대선형성을 관찰하였다. 이를 위해 PDA배지에 배양 중인 각각의 균사체를 지름 0.8 cm의 크기로 잘라내어 새로운 PDA배지에 대칭되게 올려놓은 후 24°C에서 배양하여 대선형성 유무를 관찰하였다.

### 분자유전학적 특성 분석

NIFOS101의 분자생물학적인 동정을 위해 PDA배지에 배양된 균사를 긁어내어 Genomic DNA Prep Kit (SolGent, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다. Internal transcribed spacer (ITS)의 영역을 증폭하기 위해 ITS 5 (5'-GGAAGTAAA AGTCGTAACAAGG-3')와 ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAT

ATGC-3') 프라이머를 사용하였다(White et al. 1990; Han et al. 2016). Polymerase chain reaction (PCR) 반응조건은 94°C에서 5분간 1회, 94°C 30초, 58°C 30초 그리고 72°C 1분의 과정을 총 35번 반복하고 72°C에서 10분간 1회 실시하였다. PCR 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였고, HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Real Biotech Corporation, Taiwan)를 사용하여 정제한 후 DNA 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 National Center for Bio-technology Information (NCBI)의 BLAST 프로그램을 사용하여 GenBank에 등록되어 있는 염기서열과 비교하였다. 분자유전학적 계통분석을 위해 GenBank에 등록된 애주름버섯속(*Mycena*) 10종의 염기서열과 Park과 Lee (2013)에 의해 천마 발아균으로 알려진 *Mycena* sp. HQ662845 (KFRI1212) 균주의 염기서열을 사용하였다. 다중염기서열정리(alignment)는 BioEdit v7.0.9 프로그램을 사용하였고, 계통분석은 MEGA 7.0 프로그램을 사용하여 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)을 수행하였다.

### 천마 종자의 발아활성 검정

Park 등(2012)의 방법에 따라 단일 균주를 잔나비배지(FGM; glucose 25 g/L, yeast extract 2 g/L, glutamic acid 1 g/L, biotin 0.5mg/L, thiamine 0.1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, 0.1M FeCl 5 ml/L, MnSO<sub>4</sub> 0.1 g/L, pH4.5)에서 1주간 (27±1°C) 100rpm으로 진탕배양하였다. 배양된 균주를 상수리나무의 낙엽(2x2 cm)을 포함한 낙엽미강배지(미강:물=1:4)에 접종하였다. 이와 별개로 천마의 종자를 가지고 있는 꼬투리를 화염 소독하고 WA배지(agar 10 g/L)에 종자를 파종한 다음 NIFOS101과 KFRI1212가 접종된 상수리나무의 낙엽을 잘라 WA배지의 중앙에 올려 놓았다. 종자 파종 후 24±1°C에서 7주간 배양하면서 종자의 발아 유무와 발아특성(발아율, 원구경의 길이 신장 및 측지 형성)을 관찰하였다.

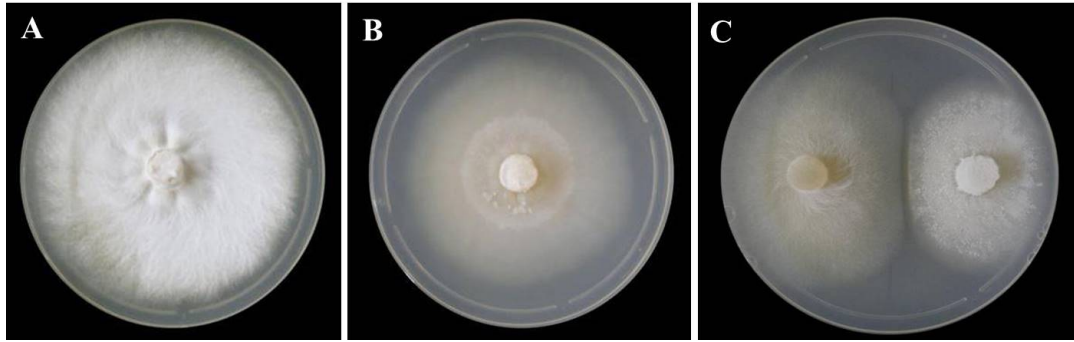
### 온도별 성장특성 분석

단일 균주로 분리된 NIFOS101과 KFRI1212를 각각 PDA배지에 배양하였다. 두 균주의 균사를 동일한 크기로 새로운 PDA배지에 접종한 후 각각 16°C, 20°C, 24°C 및 28°C로 설정된 항온기에서 20일간 배양하여 온도에 따른 균사의 생장을 비교하였다.

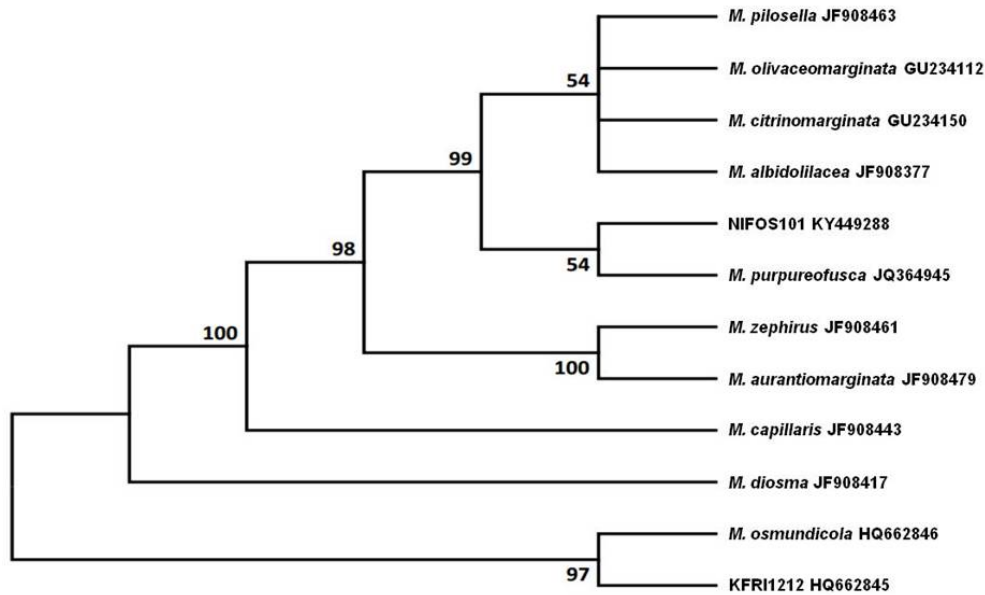
## 결과 및 고찰

### 형태학적 및 분자생물학적 특성

KFRI1212는 균총의 밀도가 상대적으로 낮고 균사의 생장



**Fig. 1** Mycelia growth of NIFOS101 (A) , KFRI1212 (B) and the formation of incompatibility line in the confrontation growth of NIFOS101 and KFRI1212 (C) on Potato Dextrose Agar medium at 24°C for three weeks



**Fig. 2** Phylogenetic analysis of the two fungal species NIFOS101 (KY449288) and KFRI1212 (HQ662845) using 10 other *Mycena* species, based on ITS region sequence comparison. The tree was constructed using UPGMA method and bootstrap support values (%) from 1000 replicates are shown above branches

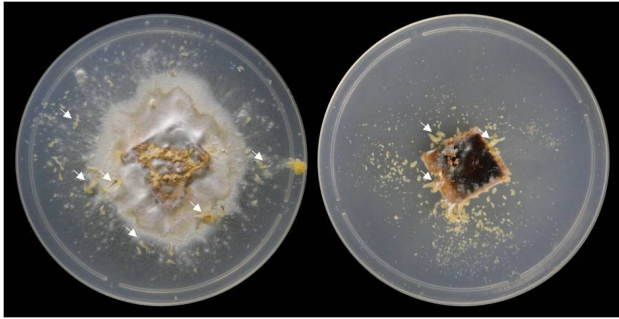
활력을 쉽게 잃어 균층의 색이 변하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 1). 반면 신규 분리된 NIFOS101은 흰색의 균사가 오랫동안 높은 밀도로 유지되어 생장활력이 높은 것으로 확인되었다. 또한 두 균사 간의 경계가 명확하게 구분되어 독립 균주로 확인되었다. KFRI1212는 균사의 대선행성 이후 오래 배양된 균층에서 나타나는 균핵과 유사한 구조가 관찰되어 경쟁 균주의 출현시 활력을 쉽게 잃어버리는 것으로 판단되었다. 반면 NIFOS101은 대선행성 이후에 흰색의 균사가 왕성하게 발달하는 것이 관찰되어 경쟁 균주의 출현 및 혼재시에도 정상적인 생장의 유지가 가능한 것으로 나타났다.

NIFOS101과 KFRI1212를 포함한 애주름버섯속의 균주 간 근연관계를 구명하기 위해 ITS영역의 DNA 염기서열을 분석하였다(Fig. 2). 그 결과 NIFOS101은 KFRI1212와 낮은 유연관계를 나타내었고, 붉은둘레애주름버섯(*Mycena purpureofusca*)

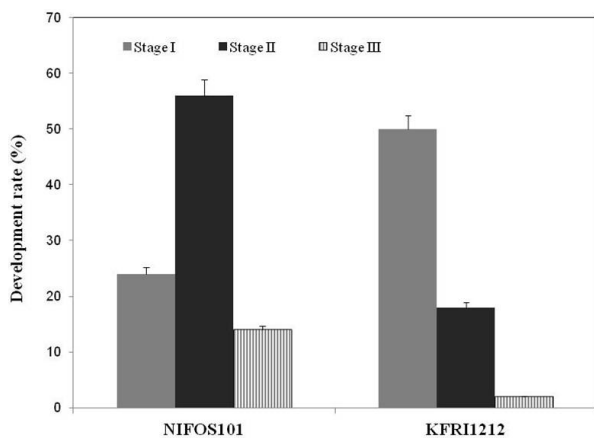
과 유연관계가 가장 높은 것으로 나타났다.

#### 천마 종자의 발아활성 검증

NIFOS101과 배양한 천마의 종자는 KFRI1212와 배양한 종자와 비교하여 종자의 발아율이 높은 것으로 나타났다(Fig. 3). 한 NIFOS101과 배양한 천마의 종자는 발아체인 원구경의 발달도 많이 이루어진 것을 확인하였다(Fig. 4). 즉 Park과 Lee (2013)가 보고한 바와 같이 KFRI1212는 발아율이 70%이고, 발아 후에 원구경에서 발달이 정지된 것이 50%로 나타나서 다음 단계로의 발달이 잘 이루어지지 않는 것으로 나타났다. 이에 반해 NIFOS101의 경우는 발아율이 94%에 이르고, 발아 후 원구경에서 발달이 정지된 것이 24%에 불과했다. 또한 KFRI1212와 배양한 천마의 종자는 원구경의 길이 신장까지는 18% 그리고 측지 형성까지 이루어진 것은



**Fig. 3** Symbiotic germination of *Gastrodiaelata* seeds by two fungi, NIFOS101 (left) and KFRI1212 (right). Seeds of *G. elata* were cultured symbiotically with each fungal species on water agar medium at 24°C for 7 weeks

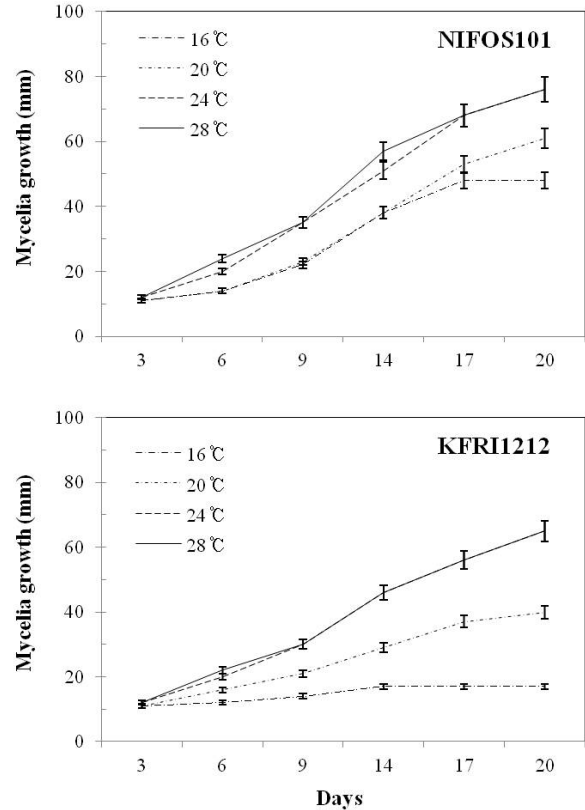


**Fig. 4** Symbiotic seed germination of *Gastrodiaelata* and subsequent development of protocorms. At Stage I, embryos burst through the testa and became globular or oval-shaped. Subsequently they were further elongated at Stage II and then produced side branches at right angles to the main axis of the protocorms at Stage III

2%에 불과했다. 이에 반해, NIFOS101과 배양한 천마의 종자는 원구경의 길이신장까지는 56% 그리고 측지 형성까지 이루어진 것이 14%로 나타나서 원구경의 발달이 훨씬 잘 이루어짐을 알 수 있었다. 따라서 KFRI1212는 원구경의 형성 효율은 좋으나 길이 신장과 측지 형성 및 발달에 비효율적인 반면에 NIFOS101은 원구경의 형성뿐만 아니라 생장을 증진시킬 수 있어 효율적인 천마의 기내생산이 가능할 것으로 사료된다.

**온도별 성장특성**

NIFOS101과 KFRI1212의 배양온도(16°C, 20°C, 24°C 및 28°C)에 따른 균사의 성장력을 확인한 결과 두 균주의 성장속도는 초기(배양 14일 이전)에는 비슷했지만 후기(배양 14일 이후)에는 NIFOS101의 생장이 더 빠르게 나타났다(Fig. 5). 배양 후 20일 경과시 총 성장량 또한 NIFOS101이 높게 나타났다. 저온 조건인 16~20°C에서 NIFOS101의 균사 생장은 적



**Fig. 5** Mycelia growth of NIFOS101 and KFRI1212 on Potato Dextrose Agar medium for 20 days at several different temperatures

정 생장온도인 24~28°C 조건에서와 거의 동일한 생장을 보였다. 특히 저온인 16°C에서 NIFOS101의 균사 생장이 KFRI1212에 비하여 월등히 높게 나타났다. 따라서 저온에서도 빠른 생장을 나타내는 NIFOS101에 의해 유성증식된 자마를 추후 온도조건이 일정하지 않는 일반노지 재배 시 생산성이 더욱 높을 것으로 기대된다.

**적 요**

천마는 광합성 기능이 퇴화된 난과식물로 독립적인 생육이 불가능하다. 성장 단계에 따라 애주름버섯균(*Mycena*)과 뽕나무버섯균(*Amillaria mellea*)을 이용하여 유성증식법으로 생산한다. 본 연구에서는 신규 발아균주인 NIFOS101과 기존의 KFRI1212를 이용하여 천마종자의 발아효율과 원구경의 생장을 비교하였다. 두 균주를 낙엽미강배지에 접종한 후 천마 종자가 파종된 WA배지에 옮겨 배양하였다. 그 결과 NIFOS101과 KFRI1212를 이용한 발아율은 각각 94%와 70%이었으며, NIFOS101을 이용할 경우 KFRI1212에 비하여 원구경의 발달이 빠른 것으로 확인되었다. 또한 배양온도에 따른 균사의 성장력을 비교한 결과 NIFOS101이 KFRI1212 보다 균사의 생장이 빠른 것을 확인하였다. ITS 영역의 염기서열을 비교한 결과 애주름버섯속에서 NIFOS101

은 붉은돌레애주름버섯과 유연관계가 높은 반면에 KFRI1212와는 유연관계가 낮은 것으로 나타났다. 본 연구에서는 천마의 신규 발아균으로 NIFOS101을 동정하고 천마의 기내 발아율 증진과 원구경의 생장 증진을 확인함으로써 향후 천마의 생산성을 높이는데 도움이 될 것으로 판단된다.

## References

- Bae KH, Ko MS, Choi SA, Lee HB, Kim NY, Song JM and Song GP (2012) *In vitro* germination of *Gastrodia verrucosa* Blume and *Hetaeria sikokiana* Tuyama treated by NaOCl. J Plant Biotechnol 39:163-168
- Bak WC, Lee BH and Ka KH (2009) Characteristics of new shiitake strain “Sanlim No. 7” produced by di-mon hybridization method. Korean J Mycol 38(1):25-28
- Bin H and Chen F (2004) Preparative isolation and purification of gastrodin from the chinese medicinal plant *Gastrodia elata* by high-speed counter current chromatography. J Chromatogr A 1052:229-232
- Chang HM and But PH (1986) Pharmacology and application of chinese materia medica. World Scientific Publishing, Singapore, 185
- Han MH, Kim KD, Pyee JH, Choi SM and Park DS (2016) Observation of *Sclerophthora macrospora* causing downy mildew from Zoysiagrass with leaf yellowing and excessive tillering. Weed Turf Sci 5:23-28
- Hayashi J, Sekine T, Deguchi S, Lin Q, Horie S, Tsuchiya S, Yano S, Watanabe K and Ikegami F (2002) Phenolic compounds from *Gastrodia rhizoma* and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation. Phytochemistry 59:513-519
- Hong IP, Nam SH, Jung IY, Sung GB and Nam HW (2004) Studies on the conditions of seed germination of *Gastrodia elata*. Korean J Mycol 32:39-44
- Huang ZL (1985) Recent developments in pharmacological study and clinical application of *Gastrodia elata* in china. Chung-His-I-Chieh-Ho-Tsa-Chih 5:251-254
- Kim HT, Kim JA and Park EJ (2012) Genetic diversity and metabolite analysis of *Gastrodia elata* by inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. Korean J Medicinal Crop Sci 20:440-446
- Kim HT and Park EJ (2013) Change of major functional components of *Gastrodia elata* Blume with cultivation conditions and harvest times. Korean J Medicinal Crop Sci 21:282-288
- Kim HT, Kim ST, Lee WY and Park EJ (2013) Induction and growth of vegetative stems through *In vitro* culture of *Gastrodia elata*. Korean J Medicinal Crop Sci 21:142-147
- Lee BY, Choi HS and Hwang JB (2002) Analysis of food components of *Gastrodia rhizoma* and changes in several characteristics at the various drying conditions. Korean J Food Sci Technol 34:37-42
- Lee JY (1982) The propagation of *Gastrodia elata* by using rhizomorphs of *Armillariella mella*. Seoul Women’s University. Rural Development Res Service 7:39-45
- Park EJ, Lee WY and Ahn JK (2012) *In vitro* propagation of myco-heterotrophic *Gastrodia elata*. Hort Environ Biotechnol 53:415-420
- Park EJ and Lee WY (2013) *In vitro* symbiotic germination of myco-heterotrophic *Gastrodia elata* by *Mycena* species. Plant Biotechnol Rep 7:185-191
- Smith SE and Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis (2nd ed). Academic Press. San Diego
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ(ed.). PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press. NY. USA. pp.315-322