

GOVP1200625651

최 중  
연구보고서

T0616363

송이 생산성 향상을 위한 재배기술 개발  
Development of Cultivation Methods for  
Improving Productivity of Pine-Mushroom

연구기관  
산림청 국립산림과학원

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “송이 생산성 향상을 위한 재배기술” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 27일

주관연구기관명 : 국립산림과학원

총괄연구책임자 : 박 원 철

연 구 원 : 박 현

연 구 원 : 가 강 현

연 구 원 : 김 명 길

연 구 원 : 윤 갑 희

연 구 원 : 구 창 덕

연 구 원 : 허 태 철

연 구 원 : 김 희 수

연 구 원 : 이 봉 훈

연 구 원 : 유 성 열

세부연구책임자 : 안 진 권

연 구 원 : 이 위 영

연 구 원 : 노 은 운

연 구 원 : 이 재 순

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 박 찬 영

연 구 원 : 한 현 각

연 구 원 : 은 종 방

연 구 원 : 김 정 윤

연 구 원 : 류 동 완

연 구 원 : 한 신 진

연 구 원 : 김 동 진

# 여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

송이 생산성 향상을 위한 재배기술 개발

## II 연구개발의 목적 및 필요성

송이 재배를 위해서는 송이와 소나무간의 생리적인 특성을 구명하기 위한 기초 연구부터 최근에 개발된 각종 첨단기법을 활용한 접근방식이 필요하다. 특히, 어떠한 기작을 통하여 송이가 공생관계를 맺게 되며, 어떤 경로로 송이 자실체가 발생하게 되는가를 과학적으로 설명할 수 있어야 한다. 본 연구는 송이 균의 생리·생태적인 기작에 대한 이해의 폭을 확대하며, 기존의 연구가 지닌 문제점이 무엇인지 파악하며 송이 재배를 위한 전환점을 마련하고자 수행되었다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 송이 균사 대량배양기술 개발

송이 재배를 위한 연구의 첫 단계로서 생물반응기를 이용한 송이 균사 대량배양기술을 정립하면서 송이에 대한 적극적인 연구의 기틀을 마련하였다. 송이 균사의 액체대량배양 및 고체매질에서의 배양조건을 찾고자 연구를 수행하였다. 생물반응기에서 송이균사를 배양하기 위한 초기 seed 접종량은 균사 건중으로 0.14g/l 이상 처리하는 것이 바람직한 것으로 판단되었으며, 초기 접종량의 농도가 높을수록 성장속도가 빨라 수확시기를 단축시킬 수 있었다. 송이 균사 배양을 위한 배지조성은 탄소원으로서 starch의 적정 농도가 20g/l 일 때 생산 효율이 가장 높은 것으로 나타났으며, 균사 접종 후 초기 성장기간을 단축시키기 위하여 소량의 glucose을 첨가하여 주는 것이 좋은 것으로 판단되었다. 질소원으로서 yeast extract의 적정 농도는 3g/l 가 가장 효율적이었으나 peptone 또는 soytone의 병행처리가 더욱 좋은 것으로 나타났다. 인산의 첨가는 무처리에 비해 소량의 균사생산량의 증가를 보여주었으며 배지의 pH를 조절하는 효과가 있었다.

공기부양식 생물반응기 내에서의 균사 생장은 배양 5일 후부터 성장하기 시작하여 배양 20일 전후로 부피 생장이 완료되었다. 삼각플라스크 배양에서는 생육정체기가 30일이 소요되어 10일 전후의 배양기간을 단축할 수 있었다. 반응기



형태별 송이 균사체의 생산량은 풍선형 생물반응기에서 평균 12 g, external-loop 형의 기포통기식 생물반응기에서 평균 11.4 g, 칼럼형 생물반응기는 평균 9.5 g을 생산하여, 풍선형 생물반응기가 가장 우수하였다. 성장기간도 풍선형 생물반응기에서 균사 접종 후 16일 이후부터 정체기에 이르는 것으로 20일 이후에 나타난 칼럼형 및 기포통기형 생물반응기 보다 빠르게 성장하는 것으로 나타났다.

고체매질을 이용한 송이균사체 배양은 영양원으로 보릿가루가 좋았으며, 보릿가루의 농도가 증가할수록 균사체 생산량도 증가하였다. 고체매질은 마사토나 펄라이트가 우수한 것으로 나타났고, 소나무 톱밥이나 피트모스에서는 생장이 가장 저조한 것으로 나타났다. 고체매질에서 송이 균은 접종 7~8주면 생육정체기에 이르는 비교적 빠른 균사생장을 보였다. 이와 같이 보릿가루를 영양원으로 하고 백마사나 펄라이트를 고체매질로 이용한 송이 균 배양방법은 접종된 연구나 송이 배양환경 등에 대한 영향을 평가하는 재료로도 응용될 수 있었다. 고체매질에서 송이균의 성장을 위한 적합한 수분함량은 30~70%로 나타났으며, 또한 고체매질에 부엽토를 첨가(10% 이상)해 주는 것이 송이 균 성장에 도움을 주는 것으로 나타났다.

## 2. 실내 송이증산 환경조절과 송이 자실체발생 촉진기술 개발

송이 연구의 궁극적인 목적은 자실체를 형성하는 것이다. 따라서 앞서 진행한 연구와 더불어 송이 자실체의 형성을 촉진하는 방법을 연구하였다. 먼저, 송이가 많이 생산될 수 있도록 송이산의 환경을 조절하는 방법에 대하여 연구하였다. 실내에서 환경을 조절하는 방법을 시뮬레이션에 의하여 추진하였으며, 이를 현지에 적용하고자 시도하였다. 하지만, 현지 적용단계에는 이르지 못하였다.

또한, 송이 발생 촉진을 위하여 세라믹 제재나 토양 미생물 복합제제를 투입하고 이러한 처리의 효과를 검증하고자 하였다. 첫 단계로서, 송이 자생 지역 주변의 토양에 존재하는 미생물의 양상을 조사하였다. 미생물의 분포를 조사하기 위해 세라믹 제제를 도포한 지역과 비도포지역의 토양을 채취하여 균을 분리하여 동정하였다. 송이 발생 촉진을 위하여 세라믹 제제를 도포한 지역과 비도포지역의 미생물 분포를 조사하기 위하여 각 세라믹 제제를 도포한 지역과 도포하지 않은 지역이 토양을 채취하여 분리 동정하였다. 그 결과, 세라믹제제 비도포지역 토양에서 동정된 균주 중에서 세균은 *Tsukamurella inchonensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus halodurans*가 colony 수 및 지름에서 우점종인 것으로 나타났으며,

곰팡이는 *Aspergillus niger*가, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotoruula glutinis*, *Dipodascus capitatus*가 colony 지름에서 우점종인 것으로 나타났다. 그리고 세라믹 제재 도포지역이 토양에서 동정된 균주 중에서 세균은 *Bacillus cereus*, *Acinetobacter johnsonii/genospecies 7*, *Bacillus alcalophilus*가 colony 면적에서 우점종이었으며 곰팡이는 *Mucor racemosus*, *Aspergillus tarmarii*가, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*가 colony 면적에서 우점종인 것으로 나타났다.

미생물의 분리, 동정과 더불어 미생물 혼합체를 투여하고 그 효과를 검증하고자 할 때는 송이 균환부에 존재하는 것으로 알려진 *Mortierella* 속 균의 처리를 시도해볼지 하다. 하지만, 본 연구에서는 이러한 방법보다는 다른 연구과제를 통하여 자체개발한 미생물 복합제재를 실험에 사용하면서 주관 연구기관과 원활한 협조를 이루지 못하고 실질적인 성과를 얻지 못한 채 마무리 된 점은 아쉽다.

### 3. 송이 접종묘를 이용한 송이 균환 형성 기술

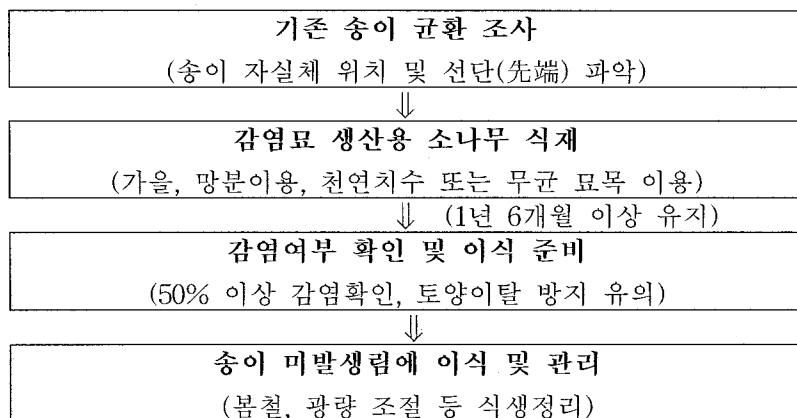
본격적인 송이 재배는 송이 균환이 없는 곳에 새로운 균환을 만들어 송이를 많이 생산할 수 있도록 하는 것이다. 본 연구에서는 이러한 목적을 달성하고자 송이 접종원 및 감염묘 생산을 시도하며, 이들을 현지에 접종하거나 이식하는 등 다각적인 기법을 활용하여 새로운 송이 균환을 형성하거나 송이 균환을 확대시키는 방법을 모색하였다.

실내에서 송이 균근을 형성하기 위하여 마사토양에 PDMP 배지를 넣고 발아시킨 소나무를 식재하여 성공적인 결과를 얻을 수 있었다. 송이와 미국송이는 모두 본 실험공정을 통하여 성공적인 균근 형성모습을 나타내었지만 균주별로 균근 형성 정도에 차이가 있었다. 송이 균근은 비분지형으로서 뿌리털이 없어지고, 얇은 균투층과 하티그망을 가지는 전형적인 외생균근의 모습을 띠었다. 송이와 미국 송이의 외생균근은 야외 균환 토양 내 외생균근과 매우 유사하였다. 또한, 송이 균근 형성이 많이 된 것은 송이 향기도 진하게 발생하였다.

송이 균근은 PDMP 배지의 1/4 희석에서 가장 성공률이 높았다. 또한, 본 균근 형성공정에서는 최소한 4개월 이상 키우는 것이 바람직 할 것으로 판단되었다. 송이 균의 아밀라아제 활성과 송이 균근 형성과는 어떠한 일관성을 갖지 않았다. 단지 본 연구에서 송이 균근 형성균주로 선발한 KFRI 421균주는 아밀라아제 활성이 1.3  $\mu\text{mol}$  정도에 해당하는 균주에 속했다.

#### 4. 송이 감염묘를 이용한 송이 균환 형성 기술

송이 감염묘 이식은 송이 균을 가진 소나무를 이식하여 송이 균환을 새롭게 형성하는 기술이다. 감염묘의 송이 균 감염율과 이식 후 송이 균 생존율의 관계를 분석한 결과, 송이 감염율이 50~60%의 감염묘를 이식할 경우 가장 높은 송이 균 생존율을 나타내었다. 감염묘 생산용 야외 소나무는 수고 1m 이상의 건전한 소나무를 선택하는 것이 중요하였으며, 감염묘 생산용 소나무 식재는 우리나라의 봄철 가뭄을 감안할 때 가을철이 유리하였다. 한편, 생산된 감염묘의 이식은 반대로 가을철보다 봄철에 하는 것이 송이 균 정착을 위하여 유리하였다. 따라서 송이 감염묘는 가을철에 송이 균환 선단에 소나무를 식재하여 생산하되 송이 균이 뿌리의 40~50% 감염율을 갖게 하도록 1년 6개월을 기다려서 봄철에 이식하는 것이 바람직하다. 봄철에 식재한 소나무는 2년이 경과한 봄철에 이식하는 것이 좋다. 이식한 화분에서 송이 균 생장은 야외의 송이 균환에서와 같이 방향성을 가지고 있었고, 이식 전에 생장하였던 화분 안의 송이 균은 이식 후에 대부분 죽었다. 따라서 감염묘 자체에 균근을 형성한 뿌리를 유지, 발전시키는 것이 매우 중요하며, 이식한 소나무가 건전하게 자랄 수 있도록 가지치기 등 환경 조절을 해 주어야 한다. 또한, 이식한 송이 감염묘는 2년 이상 경과 후에 송이 균 생존 유무를 색대를 이용하여 확인하는 것이 바람직하다. 이러한 전반적인 결론을 토대로 아래와 같이 ‘송이 감염묘 생산 및 이식과 관련한 모식도’를 도출할 수 있었다.



<송이 감염묘 생산 모식도>

## 5. 송이 고체 접종원을 이용한 송이 균환 형성기술

새로운 송이 균환 형성을 위하여 고체 매질에 배양한 송이 균사를 활용하는 방법을 강구하였다. 고체 접종원을 직접 투여하는 방법과 매개체로서 소나무를 사용하는 방법을 모색하였는데, 특히 접종묘를 생산하는 소형 소나무 묘목을 사용하는 경우에는 자실체 형성이 요원하므로 대형 소나무를 사용하는 방법을 시도하였다. 첫째는 취목을 통하여 대형 무균묘목을 생산하고 고체 접종원을 투여하여 접종묘목을 만드는 방법을 시도하였으며, 둘째는 단근 처리후 소나무 뿌리 주변에 고체 접종원을 직접 투여하는 방법을 시도하였다.

취목묘를 이용한 송이 접종묘목 생산을 시도하였는데, 취목에 의하여 생산된 소나무는 수율이 1.4%(2분)로서 이후 연구를 추진하기에는 수량이 충분하게 확보되지 못했으며, 확보된 수목조차 뿌리가 한 쪽으로 치우쳐 발달하는 등 접종묘목을 생산하기에 적합하지 않았다. 원래 계획은 이를 멸균 토양을 담은 대형 화분에 이식하여 고체 매질에서 배양된 송이 접종원을 투여하고 송이 균근 형성 여부를 확인하고자 하였으나, 전 단계의 취목묘 생산이 쉽지 않아서 이후의 실험을 진행할 수 없었다.

고체매질에서 대량으로 배양된 송이 접종원을 이용하여 새로운 송이 균환을 만드는 방법을 시도하였다. 취목기법을 통하여 대형 소나무 무균묘목을 만들고 이에 고체매질에서 성장한 송이 접종원을 투여하여 화분에서 키우는 방식을 시도하였지만 소나무 취목 자체가 어려워 뚜렷한 성과를 거둘 수 없었다. 이 시도를 위해서는 먼저 소나무 취목기술이 안정적으로 정립되어야 할 것이다.

고체 접종원을 직접 산지로 가지고 나가서 송이가 생산되지 않는 산에 직접 투여하고 송이 균근이 형성되는지 여부를 확인해 보았다. 소나무의 단근처리 및 훈증처리 후 고체 접종원 투입을 시도하여 단기간에 송이가 안정화될 수 있는 방법을 모색한 결과, 훈증처리는 다른 오염균의 유입을 막는 탁월한 효과가 있었지만 단근처리에 의해 새롭게 성장하는 뿌리에게 약해를 입히는 모습이 관찰되었다. 따라서 훈증제의 사용농도를 조정하거나 훈증을 먼저 한 후 단근을 실시하는 방법 등을 강구하여 할 것으로 판단되었다. 한편, 훈증을 하지 않은 경우에는 뿌리 발달은 좋지만 투입된 송이 접종원이 쉽게 분해되는 모습을 확인할 수 있었는데, 춘계에 5개의 블록을 모아서 투입한 경우에는 뿌리발달도 좋으면서 균사도 버티고 있는 모습을 보여 금후 발전 가능성을 확인할 수 있었으나 본 과제의 협약기간으로 인하여 현 시점에서 보고할 수 없음은 아쉬움으로 남는다.

## 6. 송이의 생태적 특성 연구

생태학적으로는 송이산 소나무림 생태계의 구조와 기능을 밝히고 이들이 토양수분 동태에 미치는 영향을 구명하는 것은 송이 생산 변동을 이해하는데 기여할 것으로 생각한다. 송이산 소나무림 생태계에서 주요한 구성종은 소나무 이외에 진달래, 철쭉, 신갈나무, 쇠물푸레나무 이었다. 광합성과 증산에 있어서 신갈나무는 10월말까지 다른 활엽수들 상당히 감소한 후에도 계속되었다. 이 현상은 신갈나무가 늦게까지 자라면서 소나무와 효율적으로 경쟁하므로 소나무의 활력과 땅속 송이 균이 불리해짐을 암시한다. 이에 반하여 쇠물푸레나무는 10월 중순이면 단풍이 들고 낙엽이 지므로 토양수분 이용을 멈추므로, 송이균은 토양수분이용에 유리하게 된다.

송이는 약 90%가 수분이고, 이 수분을 땅속 균환으로부터 흡수한다. 이 연구는 송이 균환 내부에서 토양수분의 시간-공간적 변화상태를 구명할 목적으로 수행하였다. 송이산에 관수를 하기 전에 토양수분함량은 송이 균이 없는 균환 외부에서 12.8%, 선단으로부터 0~5cm 범위에서 8.0%, 선단으로부터 10~15cm 범위(전년도 송이 자실체 발생부위)에서 6.2%로, 균환 내부가 균환 외부보다 4.8~6.4% 낮았다. 그리고 균환 선단으로부터 20~40cm 후방지점에서는 6.5~7.5%, 80cm 지점에서는 균환 외부와 비슷한 12.1%이었다. 에르고스테롤 함량은 토양수분 함량과는 반대의 경향으로, 송이균이 없는 균환외부에서 토양 생중량당  $0.4\mu\text{g/g}$  미만으로 가장 낮았고, 균환 선단부 0~5cm 범위에서  $4.9\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았으며, 선단에서 10~15cm 부위인 송이발생지점에서는  $3.8\mu\text{g/g}$ , 20cm 지점에서  $1.1\mu\text{g/g}$ 이었고, 40cm 이후 지점은  $0.4\mu\text{g/g}$ 로 균환 외부와 비슷하였다. 그리고 송이 균환 내 수분함량의 변동은 관수를 하는 8월부터 10월 사이에 13.5~23.0%로 비균환 부위의 14.5~26.0%에 비하여 1.0~3.0%가 낮았다. 이 결과는 송이 균환 부위가 비균환 부위보다 수분을 많이 소비하며, 균환내부에서도 선단~30cm 범위가 수분소비에 특히 주요한 곳임을 나타낸다.

송이 균환 내부에서의 수분함량이 균환외부나 균환사멸부위에서의 수분함량보다 낮은 것은 송이균사와 소나무 균근의 생리활동으로 수분이 소비되었기 때문으로 생각된다. 이것은 송이버섯 성장에는 직접적으로 송이균환부위에 수분공급이 중요함을 의미한다. 토양수분함량과 송이성장 관계를 이해하기 위해서는 식생의 강우차단, 광합성, 생리활동 등 생태계의 구조와 기능을 고려한 장기적인 연구를 바탕으로 하여 새로운 가설의 설립과 검정이 필요하다.

송이 균근은 일반적인 외생균근과는 형태적으로 매우 다른 면이 있다. 송이균 사표면은 작은 알갱이로 덮혀 있어서 매우 밝은 흰색을 띠며, 세포벽은 매우 얇은 단순한 막질이고, 연결격쇄(clamp connection)는 없었다. 각 개 송이 균근은 정단부에 균사층이 없이 길게 자라면서 가지를 많이 치므로 보통 외생균근에서 많이 볼 수 있는 Y자형이나 산호모양이 아니고, 전체적으로는 빗자루 또는 우묵가사리형이다. 균근 부위 중에서 균사층이 잘 발달된 부위에서는 Hartig 망이 1-2층 발달하였으나, 세포내부로 침입하여 들어간 균사는 없었다. 한편 뿌리 외부의 균사층이 덜 발달한 부분에서는 표피세포나 피층세포층에서 Hartig 망이 형성되지 않았으며, 이들 세포의 내부에서 전분체가 약  $2\mu\text{m}$ 는 크기의 반원형 알갱이 형태로 세포벽을 전체적으로 덮고 있었다. 송이 균사가 소수성을 띠는 원인을 알 수는 없었다. 그러나 주기적인 토양건조에 신축성이 커서 원형질분리가 잘 일어나지 않고, 낮아진 세포질내 수분포텐셜에서도 서서히 수분을 흡수하기 위한 기능이라고 생각되었다.

송이균이 소나무에 어떻게 기여하는 지에 대하여서는 많은 연구가 절실하다. 송이가 발생하고 나면 많은 송이 균사가 사멸하여 분말상으로 되고, 균근의 표피와 피층세포의 사멸은 더욱 뚜렷할 것이다. 비록 송이가 균근의 표피와 피층세포만을 사멸시키더라도, 소나무로부터는 광합성 산물을 심하게 유출시킨 셈이다. 그러므로 송이는 병원성은 아니더라도 기주로부터 많은 탄수화물을 요구하는 독특한 성격을 지닌 균근균이라고 생각한다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구는 송이 재배를 위한 초석을 마련하였다는 점에서 큰 의미가 있다. 송이 균사를 액체 생물반응기 및 고체매질에서 대량 배양하는 기술을 개발하여 금후 다양한 연구를 할 수 있는 기반을 구축한 것은 큰 의미를 지닌다. 또한, 기존의 소나무를 매개로 하는 송이 균환 이식방식의 문제점을 파악하고 대안을 제시하여 새로운 균환을 형성하는 기술을 마련하였다는 점도 본 연구의 큰 성과이다. 특히, 송이 접종묘의 송이 균 존재 여부를 분자생물학적으로 검증하는 기법은 산업화를 위하여 중요한 성과이며, 고체매질에 배양된 송이를 직접 송이가 생산되지 않는 산에 투여하는 방식의 실마리를 제공한 점은 송이 재배를 위한 전환점을 마련한 성과라고 할 수 있다. 다만, 자실체 형성을 촉진하는 연구를 본격적으로 적용할 수 없었으며, 연구과제의 협약 상 7월에 연구가 종료되어 송이 감염묘 이

식 후 자실체 발생여부를 확인하지 못한 채 마치게 된 점은 아쉬움으로 남는다.

송이가 생산되는 숲은 어린 소나무 숲이 아니라 30세 이상 장년에 이른 숲이다. 마찬가지로 송이 연구는 단기간에 뚜렷한 성과가 도출되는 것이 아니라 처리 효과를 검증하는 시간이 필요하다. 본 연구성과가 지속적으로 모니터링되고 실질적으로 활용될 수 있도록 연구결과 및 활용면에서도 지원이 될 수 있는 시스템이 구축될 수 있기를 건의한다.

# SUMMARY

## I. Title of the Research

Development of cultivation methods for improving productivity of pine-mushroom

## II Objectives and Significance of the Research

For the cultivation of pine-mushroom, the study for the physiological characteristics of host tree (*Pinus densiflora*) and mycorrhizal mushroom (*Tricholoma matsutake*) is a fundamental step. In addition, we have to understand the mechanism of symbiotic relationships between the two organisms, and that of fruiting-body formation. In this study, we tried to enlarge the knowledge about the ecophysiology of *T. matsutake*, and to find the solutions to overcome the barriers of past studies for making new mycelial clusters of the mushroom.

## III. Contents and Scope of the Research

### 1. Mass Propagation of *Tricholoma matsutake*

As the first step for the cultivation of pine-mushroom, we developed a method for the mass propagation of *T. matsutake* by use of bioreactor. In addition, we also tried to make a scheme for culturing the fungus on solid matrix.

The amount of seed for culturing *T. matsutake* in bioreactor was at least 0.14g/ $\ell$  in dry weight to get stable mass propagation. Much amount of seed resulted faster growth of the mycelium, which results in rapid production. Mycelial growth was good when the starch was supplied more than 20g/ $\ell$  as the carbon source, and addition of small amount of glucose made a promotion of the growth with rapid growth in early stage. As the nitrogen source, yeast extract with the amount of 3g/ $\ell$  resulted in best as a sole source, but additional treatments with peptone or soytone showed better results.



Phosphorus addition resulted little promotion of mycelial growth, but it made a buffering effects for the pH of liquid medium.

Mycelial growth in an air bubble bioreactor started from 5 days after inoculation, and reached stationary stage around 20 days after the inoculation. It reduced about 10 days for culturing in comparison to the culture in an erlenmeyer flask which took about 30 days to reach the stationary stage. The balloon type of air bubble bioreactor produced the largest amount of mycelia with 12g in average followed by the external-loop type air-lift bioreactor with 11.4g, and the column type of air bubble bioreactor with 9.5g. The balloon type also showed the shortest time for culturing with 16 days to reach the stationary stage while the other types took 20 days.

For the culturing in a solid matrix, the powder of barley made a good result, and the larger amount of it resulted better production of mycelia. As a solid matrix, sandy soil and perlite showed the best results for the culturing, while the sawdust of pines or peatmoss resulted poor growth. It took about 7~8 weeks to reach stationary stage for the growth of *T. matsutake* in a solid matrix. Therefore, the method for culturing *T. matsutake* in a solid matrix based on sandy soils or perlite with barley flour addition is a good way for further study such as inoculant, fruiting mechanism, or environmental control. Suitable moisture for the solid culture ranged from 30 to 70% and humus addition with 10% resulted good growth of the mycelia.

## **2. Environmental Control for the Promotion of Fruiting**

The ultimate objective of pine-mushroom related study is making fruiting body artificially. Thus, we also put our efforts to get a way to promote fruiting body formation. First, we studied a way to control the environment of pine-mushroom productive forest artificially. To get an idea we made a simulation study within a laboratory to apply the result *in situ* later. But we couldn't accomplish the field application.

We planned to apply ceramic materials and microbial mixture on the fairy rings of *T. matsutake* to promote primordium formation. As a first step, we

made an assay for the microbial flora in the pine-mushroom productive area. We collected soils to compare the microbial flora of the ceramic applied region and that of control. We could identified several microorganisms from the fairy-rings of *T. matsutake*; the bacteria were dominated by *Tsukamurella inchonensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus halodurans*, and the fungi were mainly *Aspergillus niger*, and we also found *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotoruula glutinis*, *Dipodascus capitatus* as the dominant species of yeast. We found several microorganisms from the ceramic-applied region; the bacteria were *Bacillus cereus*, *Acinetobacter johnsonii/genospecies 7*, and *Bacillus alcalophilus* were dominated ones, while *Mucor racemosus* and *Aspergillus tarmarii* were the main fungi, and *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus* were major yeast.

By the way, the key microorganism should be considered for the application of microbial mixture. Since *Mortierella* spp. are reported as a key microorganism in the fairy ring of *T. matsutake*, the species should be isolated from the study. But, we could get the species. Thus, we couldn't make further research from the viewpoint of microbial ecology.

### **3. Mycorrhizal Synthesis for Making New Mycelial Cluster**

Cultivation of *T. matsutake* means promotion of pine-mushroom productivity by making a new fairy rings in pine-mushroom non-productive area. To accomplish the objectives, we tried to make a mycorrhizal synthesis *in vivo* and to make a mycorrhizae-infected tree *in situ*. We transplanted the mycorrhizal trees on pine-mushroom non-productive sites to make a new fairy ring of *T. matsutake*.

We could make a mycorrhiza synthesized tree with *T. matsutake* by use of *Pinus densiflora* seedling on sandy soils with addition of PDMP *in vitro*. Both of *T. matsutake* and *T. magnivelare* made a good mycorrhizal synthesis although their effectiveness was somewhat different. The pine roots showed no hair roots with rod type as they infected by *T. matsutake*. The roots showed very thin fungal mantle and hartig net, which were the typical

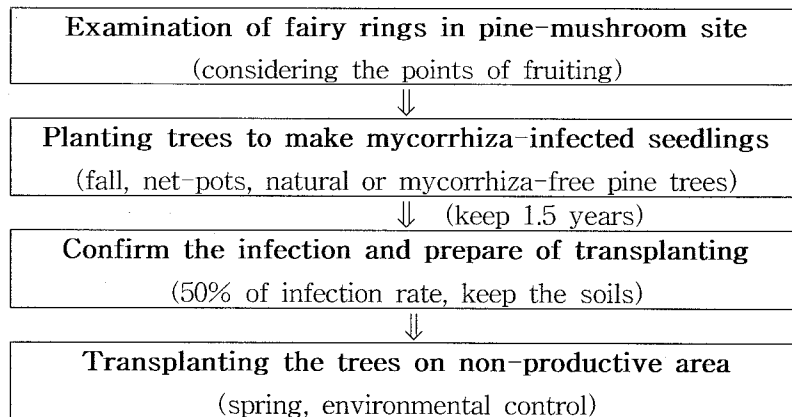
feature of ectomycorrhiza. The feature was quite similar to that of mycorrhizal roots *in situ*. In addition, the mycorrhizal roots with large amount of *T. matsutake* made an aroma of pine-mushroom very strongly.

The effectiveness of mycorrhizal synthesis was the best when we used 1/4 PDMP media. It took at least 4 months to make a stabilized mycorrhizal synthesis. We couldn't find significant relationships between the effectiveness of mycorrhizal synthesis and amylase activity. The activity of the strain used for this study, KFRI 421, showed 1.3  $\mu\text{mol}$  of amylase activity.

#### **4. Transplanting of Mycorrhiza-Infected Seedling**

Transplanting of mycorrhiza-infected seedling is the technique to make a new fairy rings of *T. matsutake* in pine-mushroom non-productive area. The survival rate of *T. matsutake* showed the best when the infection rate ranged from 50 to 60%. Natural trees for making mycorrhiza-infected seedling should be used taller than 1m in healthy condition. The planting for the preparation of mycorrhiza-infected seedling was better when applied in fall compare to spring due to drought. By the way, transplanting of the seedling was better in spring than fall because the mycorrhiza can be stabilized easily during spring. Thus, the preparation of mycorrhiza-infected seedling need to be applied in fall and sustained one and half years to get the infection rates up to 40~50%. If the preparation was applied during spring, then the tree need to be sustained 2 years, and transplant during spring.

The mycorrhiza infected in a pot showed a dimensional characteristics, which perished about a year after the transplanting. Thus, it is important to make an own development of the mycorrhiza with indigenous trees on new area. Environmental control such as thinning and pruning should be applied to provide a good condition for the transplanted pine trees. In addition, the transplanted trees should be sustained safely at least 2 years. The rice bag trier could be a good option to be used for checking the condition of mycorrhiza. With these conclusions, we could make a scheme for the transplanting technique of mycorrhiza-infected seedling.



<Scheme for making mycorrhiza-infected seedling>

### 5. Formation of Mycelial Cluster using Solid Matrix

We also tried to use the mycelia cultured on solid matrix to make a new fairy ring of *T. matsutake*. We not only applied the culture directly on soils but also tried to use a seedling as a vector. We tried the technique of layering to make a mycorrhiza-free seedling. For the direct inoculation, we made a root-cutting before the treatments.

From the layering we could get only 2 trees over 144 trees (1.4%), which refrain us from further study due to the lack of mycorrhiza-free seedling. In addition, the roots of seedling obtained from layering were grown one spot, which was not suitable to be used as a vector. To use this method for transplanting of mycorrhizal cluster, the layering technique of *Pinus densiflora* should be prepared first.

Direct inoculation of the mycelia cultured on solid matrix was done with root-cutting and soil fumigation. Soil fumigation resulted in good sterilization of other contaminants, but it made a harmful effect of the pesticide on root development. Thus, the concentration of pesticide used for the fumigation should be reallocated. As another way, the fumigation need to be applied before the root-cutting.

The control(without fumigation) showed good feature of root development. But, the mycelia inoculated in the soil were decomposed easily. The inoculant

applied during spring with 5 blocks showed good root development and fine condition for mycelial development. The mycelia was expected to be developed as a mycorrhizal root, but we couldn't confirm the result since this project is finished on July.

## 6. Ecological Characteristics of *T. matsutake*

Ecological characteristics of *T. matsutake* with soil moisture may take a good role for the understanding of changes in the productivity of pine-mushroom. Major species of pine-mushroom productive site were *Rhododendron mucronulatum*, *Rhododendron schlippenbachii*, *Quercus mongolica*, and *Fraxinus rhynchophylla*. *Q. mongolica* kept photosynthesis and transpiration until late October, which made a strong competition for soil moisture with *Pinus densiflora* or *T. matsutake*. By the way, *F. rhynchophylla* littered mid- October, which might make little competition for soil moisture with *P. densiflora* or *T. matsutake*.

The fruiting body of *T. matsutake* is composed 90% of water, and the water is obtained from soil. So, in this study, we monitored the temporal and spatial changes in soil moisture within the fairy ring of *T. matsutake*. Soil moisture in the pine-mushroom productive before the irrigation was 12.8% at the region far from fairy ring of *T. matsutake*, region, 8.0% at the region 0~5cm from the fairy ring, 6.2% at the region 10~15cm from the fairy ring (mushroom produced point); soil moisture inside of the fairy ring was lower in 4.8~6.4% than that of outside. Soil moisture at the region apart 20~40cm from the fairy ring was 6.5~7.5%, and that at the region apart 80cm from the fairy ring was similar to that at the outside of fairy ring(12.1%)

Ergosterol contents showed negative correlations to soil moisture. It was the lowest at the outside of fairy ring with 0.4 $\mu$ g/g soil, and the highest at the region 0~5cm from the fairy ring with 4.9 $\mu$ g/g soil, followed by 10~15cm (3.8 $\mu$ g/g soil), 20cm (1.1 $\mu$ g/g soil) and 40cm (0.4 $\mu$ g/g soil).

The changes in soil moisture at the fairy ring from August to October was 13.5~23.0%, which was 1.0~3.0% lower than control(14.5~26.0%). The

results indicated that the fairy ring consume much water than general soils without the mycelial cluster. Especially, the water consumption was the largest at the region of fairy ring and up to 30cm from the region. The lower moisture within the fairy ring than that of outside was thought to be resulted from the consumption by *P. densiflora* and *T. matsutake*. This phenomenon indicated that the water supply on the fairy ring was very important for the fairy ring. It is need to be hypothesized and validated for the role of interception, photosynthesis and other eco-physiological activity of vegetation to soil moisture and the growth of *T. matsutake*.

Mycorrhiza of *T. matsutake* was quite different from other mycorrhizal roots from the viewpoint of morphology. The surface of the mycelium was covered by small particles, which resulted in bright color. The cell wall of the mycelium showed very thin membranous feature and had no clamp connection. Although general mycorrhial roots show Y-type or coral shape due to branching activity, *T. matsutake* showed rod shape. It showed hartig nets in the mycorrhizal roots, but the mycelium did not penetrate into the cell. The hemispheric amyloplast granules lined in epidermal and cortical cell walls of mycorrhiza with very thin mantle. We couldn't acknowledge the reason why the mycelium of *T. matsutake* showed hydrophobic feature. But, it was thought that the buffering capacity might result in the slow respond to the moisture change.

The role of *T. matsutake* in the symbiotic relationships with *P. densiflora* should be studied more in detail. After mushroom production, the mycelium perishes and becomes a granule. Although *T. matsutake* is not a germ, the fungus is a special mycorrhiza which demands much carbohydrates from host trees.

#### **IV. Prospects for the utilization of results**

It is very meaningful for this project that a fundamental tools for the cultivation of pine mushroom is prepared. Mass propagation of *T. matsutake* by use of liquid bioreactor and solid matrix. The technique can be used for

further studies in relation to *T. matsutake*. In addition, we thoroughly analyzed the problem in transplanting of mycorrhiza-infected tree and provided another option for making a new fairy ring in pine-mushroom non-productive area. Especially the molecular biological technique for the validation of mycorrhizal synthesis is an important technique for further use of mycorrhiza synthesizing tool in industry. The culturing method of *T. matsutake* in a solid matrix and the provision of clue for direct inoculation of the solid matrix are epoch-making events for pine-mushroom study. But we are sorry that we couldn't manifest the fruiting of the mushroom from the transplanted trees since the project has been finished in July while the mushroom is produced during September.

The pine-mushroom productive forests are older than 30 years in general. At the same way, the outcome of pine-mushroom study can't be obtained within short time. Thus, we hope that the study for monitoring the effects of previous treatments for the promotion of pine-mushroom productivity can be supported continuously.

## CONTENTS

<b>Chapter 1. Outline of the Study</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapter 2. Recent Trend of Research &amp; Development</b> .....	<b>6</b>
<b>Chapter 3. Contents of the Research</b> .....	<b>8</b>
Section 1. Mass Propagation of <i>Tricholoma matsutake</i> .....	8
1. Introduction .....	8
2. Methods and Materials .....	9
A. Preparation .....	9
B. Methods for Mycelial Culture .....	9
C. Culture of Mycelium in Various Bioreactors .....	9
D. Mycelial Growth and Medium Composition .....	10
E. Mass-Culture of <i>T. matsutake</i> in Solid Matrix .....	11
F. Composition of Solid Matrix for the Culture .....	11
G. Amount of Seed for the Solid Culture .....	11
H. Mycelial Growth of <i>T. matsutake</i> in Solid Matrix .....	12
I. Moisture Condition for the Solid Culture .....	12
J. Effects of Humus on <i>T. matsutake</i> .....	12
K. Ergosterol Contents in Mycelium of <i>T. matsutake</i> .....	12
3. Results and Discussion .....	13
A. Composition of Medium for Mass Culture in Liquid .....	13
B. Optimization of Bioreactor's Condition .....	15
C. Mycelial Growth of <i>T. matsutake</i> in Various Bioreactors .....	22
D. Propagation of <i>T. matsutake</i> in Solid Matrix .....	28
4. Conclusions .....	34



<b>Chapter 3. Contents of the Research .....</b>	<b>8</b>
Section 2. Environmental Control for the Promotion of Fruiting	36
1. Introduction .....	36
2. Approaches .....	36
A. Technique for the Control of Environment <i>in situ</i> .....	36
B. Technique for Stimulating Fruiting Body Formation .....	37
3. Results and Discussion .....	38
A. Artificial Control of Environment <i>in situ</i> .....	38
B. Application of Ceramic Composite for Stimulation of Fruiting	53
C. Stimulation of Fruiting by Artificial Control .....	61
Section 3. Mycorrhizal Synthesis for Making New Mycelial Cluster	
.....	63
1. Mycorrhizal Synthesis of <i>Tricholoma matsutake</i> .....	63
A. Introduction .....	63
B. Methods and Materials .....	64
C. Results and Discussion .....	65
D. Conclusions .....	71
2. Validation Technique for Mycorrhizal Synthesis .....	72
A. Introduction .....	72
B. Methods and Materials .....	74
C. Results and Discussion .....	76
3. Transplanting of Mycorrhiza-Synthesized Seedling .....	91
A. Introduction .....	91
B. Methods and Materials .....	91
C. Results and Discussion .....	92
D. Conclusions .....	93

4. Another Approach for the Acclimation of Synthesized Seedling ·	94
A. Introduction .....	94
B. Methods and Materials .....	94
C. Results and Discussion .....	97
 Section 4. Transplanting of Mycorrhiza-Infected Seedling .....	 103
1. Introduction .....	103
2. Methods and Materials .....	104
A. Production and Transplanting of Mycorrhiza-Infected Trees ··	104
B. Identification of <i>T. matsutake</i> on the Infected Trees .....	105
3. Results and Discussion .....	106
A. Production of Mycorrhiza-Infected Trees .....	106
B. Transplanting of Mycorrhiza-Infected Trees .....	109
C. Methods for Transplanting .....	112
D. Identification of <i>T. matsutake</i> on the Infected Trees .....	113
E. Function of Infection Rates on Acclimation .....	115
F. Mechanism for the Stabilization of <i>T. matsutake</i> .....	115
G. Places for Production and Transplanting .....	116
4. Conclusions .....	117
 Section 5. Formation of Mycelial Cluster using Solid Matrix ···	 118
1. Introduction .....	118
2. Production of Mycorrhiza-free Seedling by Layering .....	118
A. Methods and Materials .....	118
B. Results and Discussion .....	119

3. Direct Inoculation of <i>T. matsutake</i> Cultured on Solid Matrix .....	121
A. Methods and Materials .....	121
B. Results and Discussion .....	123
C. Conclusions .....	125
 Section 6. Ecological Characteristics of <i>T. matsutake</i> .....	 126
1. Relationships between Vegetation and Soil Moisture .....	126
A. Introduction .....	126
B. Methods and Materials .....	126
C. Results .....	127
D. Discussion .....	131
2. Temporal and Spatial Changes in Soil Moisture .....	132
A. Introduction .....	132
B. Methods and Materials .....	133
C. Results .....	135
D. Discussion .....	138
E. Conclusions .....	141
3. Morphological Characteristics of <i>T. matsutake</i> .....	142
A. Introduction .....	142
B. Methods and Materials .....	143
C. Results .....	144
D. Discussion .....	150
E. Conclusions .....	154

<b>Chapter 4. Achievements and Contributions .....</b>	<b>155</b>
1. Achievements of Original Objectives .....	155
2. Technical Contributions .....	156
3. Economical and Industrial Contributions .....	160
<b>Chapter 5. Prospects for the utilization of results .....</b>	<b>161</b>
1. Mass Propagation of <i>Tricholoma matsutake</i> .....	161
2. Seeds for Making New Mycelial Cluster of <i>T. matsutake</i> .....	161
3. Artificial Control of Environment <i>in situ</i> for Promoting Fruiting Body Formation .....	162
<b>Chapter 6. Related information in abroad .....</b>	<b>163</b>
1. Mycorrhizal Synthesis of <i>Tricholoma matsutake</i> .....	163
2. Studies on <i>Tricholoma matsutake</i> .....	164
3. Studies on Ectomycorrhizal Mushrooms .....	169
<b>Chapter 7. Literature Cited .....</b>	<b>179</b>

## 목 차

제1장 연구개발과제의 개요 .....	1
제2장 국내외 기술개발 현황 .....	6
제3장 연구개발 수행의 내용 및 결과 .....	8
제1절 송이 균사 대량배양기술 .....	8
1. 서론 .....	8
2. 재료 및 방법 .....	9
가. 시료 조제 .....	9
나. 균사배양 방법 .....	9
다. 생물반응기 형태별 균사체 배양 .....	9
라. 균사 성장량 조사 및 배지 분석 .....	10
마. 고체매질에서 송이균 배양방법 .....	11
바. 송이균 배양용 고체매질 조성 .....	11
사. 고체매질에서 송이균 접종량 조사 .....	11
아. 고체매질에서 배양 기간별 송이균 성장량 조사 .....	12
자. 고체매질에서 송이균 성장을 위한 수분조건 조사 .....	12
차. 부엽토가 송이균 성장에 미치는 영향 조사 .....	12
카. 송이균사체내의 에르고스테롤 함량 분석 .....	12
3. 결과 및 고찰 .....	13
가. 송이균사 대량생산을 위한 생물배양기내 배지조성 확립 .....	13
나. 생물배양기에서 균사배양 최적화 .....	15
다. 생물반응기 형태별 송이균사체 배양 .....	22
라. 고체매질 내에서의 송이 균사체 배양 .....	28
4. 결론 .....	34

제2절 임내 송이증산 환경조절과 송이 자실체 발생 촉진기술 개발 ...	36
1. 서론 .....	36
2. 접근방법 .....	36
가. 임내 송이증산 환경조절 인공지능 제어기술 확립 .....	36
나. 송이 자실체 발생 촉진 환경 탐색 및 인공 환경 조성 .....	37
3. 결과 및 고찰 .....	38
가. 임내 송이증산 환경조절 인공지능 제어기술 확립 .....	38
나. 송이발생 촉진용 세라믹 제재 도포효과 검증 .....	53
다. 송이 자실체 발생 촉진 환경 탐색 및 인공 환경 조성 .....	61
제3절 송이 접종묘를 이용한 송이 균환 형성 기술 .....	63
1. 송이 접종묘 생산 .....	63
가. 서론 .....	63
나. 재료 및 방법 .....	64
다. 결과 및 고찰 .....	65
라. 결론 .....	71
2. 송이 접종 성공여부 판별기법 연구 .....	72
가. 서론 .....	72
나. 재료 및 방법 .....	74
다. 결과 및 고찰 .....	76
3. 송이 접종묘의 이식 .....	91
가. 서론 .....	91
나. 재료 및 방법 .....	91
다. 결과 및 고찰 .....	92
라. 결론 .....	93

4. 송이 접종묘의 순화를 위한 또 다른 시도 .....	94
가. 서론 .....	94
나. 재료 및 방법 .....	94
다. 결과 및 고찰 .....	97
제4절 송이 감염묘를 이용한 송이 균환 형성 기술 .....	103
1. 서론 .....	103
2. 재료 및 방법 .....	104
가. 송이 감염묘 생산 및 이식 .....	104
나. 송이 감염묘에서 송이균 번식 확인 .....	105
3. 결과 및 고찰 .....	106
가. 감염묘 생산방식 .....	106
나. 송이 감염묘의 이식 .....	109
다. 송이 감염묘의 이식방법 .....	112
라. 송이 감염묘의 송이균 확인 .....	113
마. 송이 감염묘의 정착에 있어 초기 송이균 감염율과의 관계 .....	115
바. 송이 감염묘에서 송이균의 생존 기작 .....	115
사. 송이 감염묘의 생산과 이식 장소 .....	116
4. 결론 .....	117
제5절 송이 고체 접종원을 이용한 송이 균환 형성 기술 .....	118
1. 서론 .....	118
2. 취목묘 이용을 통한 시도 .....	118
가. 재료 및 방법 .....	118
나. 결과 및 고찰 .....	119

3. 고체매질을 직접 토양에 투여하는 방식 연구 .....	121
가. 재료 및 방법 .....	121
나. 결과 및 고찰 .....	123
다. 결론 .....	125
제6절 송이 균의 생태적 특성 .....	126
1. 송이산 식생과 송이균환부의 토양수분과의 관계 .....	126
가. 서론 .....	126
나. 재료 및 방법 .....	126
다. 결과 .....	127
라. 고찰 .....	131
2. 송이 균환내 토양수분의 시·공간적 변화 .....	132
가. 서론 .....	132
나. 재료 및 방법 .....	133
다. 결과 .....	135
라. 고찰 .....	138
마. 결론 .....	141
3. 송이 외생균근의 형태적 특성 .....	142
가. 서론 .....	142
나. 재료 및 방법 .....	143
다. 결과 .....	144
라. 고찰 .....	150
마. 결론 .....	154



<b>제4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 .....</b>	<b>155</b>
1. 목표달성도 .....	155
2. 기술적 기여도 .....	156
3. 경제·산업적 기여도 .....	160
<b>제5장 연구개발 결과의 활용계획 .....</b>	<b>161</b>
1. 송이 균사배양 촉진기술 개발 .....	161
2. 송이 접종원 및 균환 형성기술 개발 .....	161
3. 임내 송이증산 환경조절과 송이 자실체발생 촉진기술 개발 .....	162
<b>제6장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술 정보 .....</b>	<b>163</b>
1. 송이 균근 형성 성공 사례 .....	163
2. 각국의 송이 연구 .....	164
3. 각국의 외생균근성 버섯 연구 .....	169
<b>제7장 참고문헌 .....</b>	<b>179</b>

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

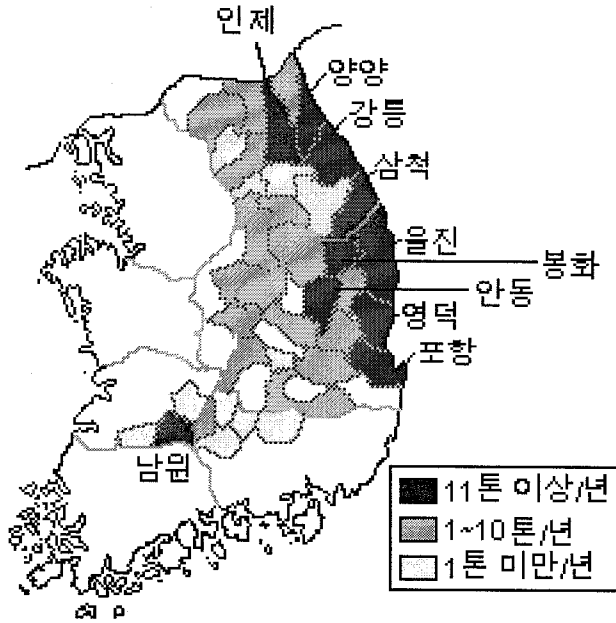
전 세계적으로 식용할 수 있는 버섯은 약 2,000여종에 이르며, 이 중 50여종은 재배가 원활히 이루어지는 버섯으로 알려져 있으며 그 가운데 약 30여종이 상업적으로 시판되고 있다. 하지만, 이들은 대부분 부후성(腐朽性) 버섯으로서 다른 유기물을 분해하면서 성장하는 버섯들이다. 반면, 송이와 같은 균근성(菌根性) 버섯은 유기물 분해 능력이 낮아 식물과 공생(共生)하며 살아가는 버섯인데, 일정한 시기에만 생산되는 시간적 제약과 수확된 생버섯의 저장기간도 짧아서 대체로 비싸게 거래된다. 따라서 이러한 버섯에 대하여 많은 사람들이 인공재배를 시도하고 있지만, 인공배지에서 증식조차도 쉽지 않아서 연구의 진전을 보지 못하고 있는 형편이다.

우리나라에서는 대표적인 균근성 버섯으로 송이와 능이를 꼽을 수 있는데, 송이는 국내에서 최근에는 그 생산량이 줄어들었지만 연간 400여 톤이 생산되어 4,000만 불 내외의 외화를 벌어들이는 매우 중요한 임산물 수출품목이다. 한편, 일본은 연간 3,000톤 이상의 송이를 소비하고 있지만 200톤/년 내외의 생산량에 그치고 있어서 우리나라와 중국, 북한, 미국 등지에서 엄청난 양의 송이를 수입하고 있다.

송이는 화강암 및 화강편마암이 모재로 하는 소나무림에서 주로 발생한다. 우리나라는 화강암 및 화강편마암이 전 국토의 40%를 차지하고 소나무림은 산림면적의 약 30%를 차지하며, 특히 3~4영급에 속하는 소나무림이 87%를 차지하고 있어서 매우 좋은 송이 발생림의 조건을 갖추고 있다. 그런데, 이들 산림에서 모두 송이가 발생하는 것은 아니다. 조선시대에는 송이가 전국의 소나무 숲에서 생산된 것으로 기록되어 있지만, 1970년대 초에는 송이 생산량이 제법 많았던 경기도(가평, 광주), 충청남도(예산), 전라남도(담양, 함평, 화순 등)에서는 현재 송이 수매가 이루어지지 않고 있다. 이러한 현상은 송이가 생산되던 야산을 개발하여 농경지로 만들거나 소나무 숲이 다른 종류의 나무가 많은 숲으로 바뀌게 된 탓으로 여겨진다. 즉, 환경의 변화에 따라 남서해안에서는 송이 생산량이 급격히 줄어들었다.

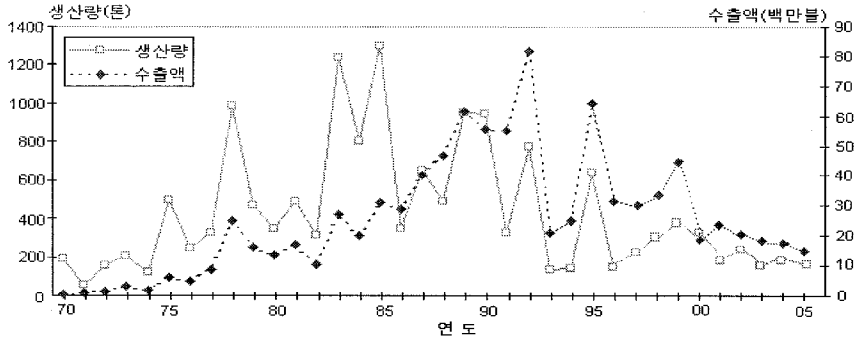
한반도의 송이 생산지를 살펴보면, 남한의 경우 경상북도의 울진, 봉화, 영덕과 강원도 양양 등 태백산맥이나 소백산맥 줄기에서만 주로 생산된다(그림 1-1).

북한의 경우도 평안도 지역보다는 함경도 지역에 송이가 더 많이 나고 있어서 백두대간 줄기를 따라 송이가 주로 발생하고 있다고 설명할 수 있다. 즉, 전반적인 여건으로는 우리나라 전역의 소나무림이 송이산이 될 수 있는 좋은 조건을 갖추고 있지만, 환경의 변화에 따라 송이가 생산되지 않는 산으로 변화되고 있음은 안타까운 일이다.



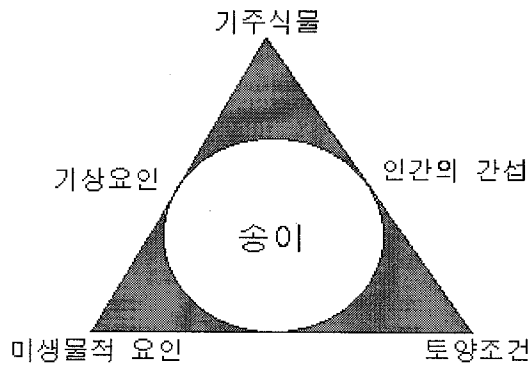
<그림 1-1> 우리나라의 주요 송이 산지

생산면적의 감소와 더불어 국내 송이 생산량은 정점을 기록했던 1985년의 1,313톤을 기점으로 매년 감소추세에 있다(그림 1-2). 따라서 자연적으로 송이를 채취하는 방식에서 가꾸어서 생산하는 방식으로 전환하여야 한다는 인식이 확대되고 있다. 송이의 생산량을 지속적으로 유지·증가시킬 수 있는 방안에 대한 요구가 매우 높아지면서 1980년대는 감소 추세에 있는 송이산을 어떻게 관리하여 지속적으로 송이를 생산할 수 있는가에 대하여 연구가 진행되었는데, 자체의 기술보다는 일본의 연구를 적용시키는 방법이 국내에서 시도되었다. 1990년대에 이르러는 우리나라의 특성을 감안한 자체적인 연구노력이 활발히 전개되었는데, 국립산림과학원에서 주관하여 실시한 농림부 특정 현장애로기술과제 ‘송이산 환경관리기술 개발’을 통하여 생산성이 쇠퇴하는 송이산의 환경관리를 위한 기준 정립의 결실을 낳았다.



<그림 1-2> 우리나라의 종이 생산량 변화

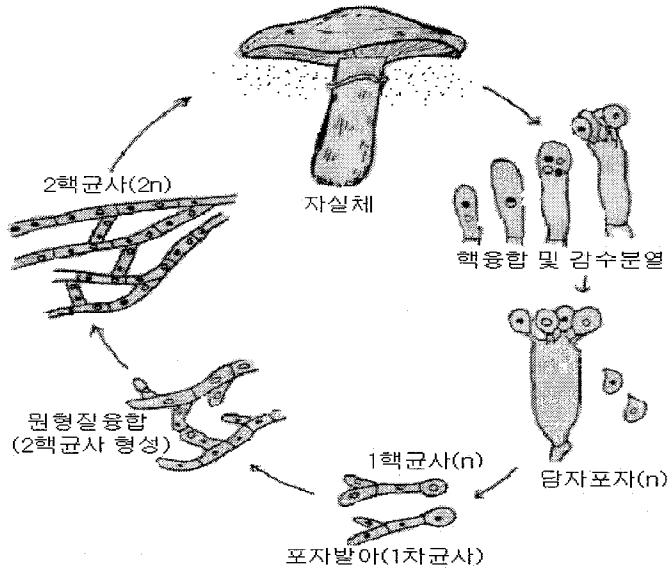
이러한 결실을 토대로 송이가 나지 않던 곳에서도 송이가 생산될 수 있도록 하기 위한 노력이 다각적으로 시도되었다. 하지만, 본 과제가 추진되기 이전까지는 뚜렷한 성과를 거두지 못한 상태이었는데, 종이 재배가 제대로 되지 않은 것은 송이의 생물학적인 특성에 대한 충분한 이해가 부족한 탓이라 할 수 있다. 사실, 현재까지의 연구수준은 송이 재배를 위한 근본적인 틀이라 할 수 있는 송이 자실체 형성의 triangle에 대한 완전한 이해가 되지 않은 상태이다(그림 1-3).



<그림 1-3> 송이 자실체 발생의 조건을 나타내는 모식도.

또한, 송이의 시작은 일반 버섯처럼 포자를 만들어 번식하거나, 야생동물에 의한 전파, 균사의 성장에 따른 자리 이동 등 다양한 경로가 있을 것으로 여겨지지만, 아직까지 명확하게 밝혀진 내용은 없다. 따라서 일반적인 버섯의 생활사와

비슷한 것으로 생각하는데(그림 1-4), 포자에서 발아된 송이 균사는 땅 속에서 다른 균사를 만나 2핵 균사를 만들어 성장하게 되며, 이후 소나무 세균에 침입하여 송이 균근(菌根)을 만든 이후 자실체 형성의 단계에 이르게 될 것으로 추측되지만 이에 대한 정확한 생화학적 기작은 아직 제대로 이해되지 못한 상태이다.



<그림 1-4> 송이의 생활사

그러므로 송이 재배를 위해서는 송이와 소나무간의 생리적인 특성을 구명하기 위한 기초적인 연구부터 최근에 개발된 각종 첨단기법을 활용한 접근방식이 필요하다. 특히, 어떠한 기작을 통하여 송이가 공생관계를 맺게 되며, 어떤 경로로 송이 자실체가 발생하게 되는가를 과학적으로 설명할 수 있어야 한다. 이러한 기작에 대한 정확한 설명이 가능하게 된다면 송이 인공 접종묘목을 생산할 수 있으며, 송이 자실체를 인공적으로 형성시킬 수 있을 것이다. 과거 우리나라와 일본의 연구는 주로 생산성 유지·증진을 위한 노력이 중심이 되었기에 생태학적인 특성연구에 초점이 맞추어져 있었다. 이에 따라 본 연구에서는 송이균의 생리·생태적인 기작에 대한 이해의 폭을 확대하며, 기존의 재배를 위한 다각적인 시도가 지닌 문제점이 무엇인지 파악하며 송이 재배를 위한 전환점을 마련하고자 수행되었다. 기존의 고정관념에서 벗어나 송이 문제의 해결방식을 찾고자 노력하였으며, 최신기술을 적극적으로 활용하여 정확한 기작을 파악해 보았다.

생물반응기를 이용한 송이 균사 대량배양기술을 정립하면서 송이에 대한 적극적인 연구의 기틀을 마련하였으며, 각종 아이디어를 도입하여 송이가 생산되지 않던 곳에 새로운 송이 균환을 형성하고자 노력하였다. 또한, 송이의 생물학적인 특성에 대한 이해 폭을 확대하고자 최신 기자재와 분석기법을 활용하여 송이 발생환경의 이화학적인 특성 변화를 보다 정밀하게 분석해 보았다. 이를 통하여 송이 자실체의 발생기작을 정확히 이해하고자 시도하였으며, 분자생물학적인 기법과 더불어 공학적인 아이디어를 총 동원하여 송이 재배의 기반을 구축하고자 노력하였다.

송이의 재배체제를 구축한다는 목표를 달성하기 위하여 본 연구에서는 송이 균환 형성을 위한 각종 과거 시험의 사례를 정밀 검토하여 문제점을 고찰하고, 최근 일본에서 성공한 균근(菌根) 접종기술의 현주소를 확인하는 등 현대의 최신 분석기법을 도입하여 새로운 송이 균환의 형성기술을 개발하고자 노력하였다. 즉, 과거의 미진한 점을 보완하고 생화학적 기법 및 분자생물학적 기법을 이용하여 송이균의 증식이나 송이균의 접종, 송이균의 활력 유지·증진의 기본 조건에 대하여 명확히 이해한 후, 각 제한인자를 극복해 나가는 방식의 추진전략을 갖고 접근하였다.

먼저, 본 연구의 주 대상이라고 할 수 있는 송이균의 대량 확보를 위하여 송이 균사배양 촉진 기술을 개발하고, 실외 및 실내의 송이균 감염 뿌리를 면밀히 분석하여 송이균과 기주식물의 생리적 특성을 면밀하게 분석하였다. 아울러, 균근을 형성한 뿌리가 확실히 송이에 의하여 형성된 균근인지 파악할 수 있는 기법으로서 분자생물학적인 기법을 도입하여 시도하였다.

본 과제의 궁극적인 목표는 송이 균환이 없는 곳에 새로운 균환을 만들어 송이를 많이 생산할 수 있도록 하는 것이므로, 송이 접종원 및 감염묘 생산을 시도하며, 이들을 현지에 접종하거나 이식하는 등 다각적인 기법을 활용하여 새로운 송이 균환을 형성하거나 송이 균환을 확대시키는 방법을 모색하였다.

본 연구는 2단계로 추진되었는데, 제1단계는 1차년도~3차년도의 3년간 송이와 기주식물과의 관계 등 송이 주변의 자실체 발생환경에 대한 명확한 조사와 이해로 송이 재배를 위한 기반을 구축하였다. 제2단계는 제1단계에서 구축된 자료를 토대로 실제로 송이 균환을 확대하거나 새로 만들고, 송이 자실체를 인위적으로 생성시키는 시도를 하였다. 다만, 본 연구과제의 협약 상 7월에 연구가 종료되어 자실체 발생여부를 확인하지 못한 채 마치게 된 점은 아쉬움으로 남는다.

## 제 2 장 국내의 기술개발 현황

우리나라의 송이 연구는 1970년대 초반 산림청 임업시험장과 농촌진흥청 농업기술연구소에서 시작되었지만 전반적인 송이 생산지의 분포나 송이균의 실내 배양을 위한 시도의 수준에 머물렀다(김 등, 1975). 그런데, 한·일 과학기술장관의 협의에 따라 한일 공동연구로 1980년부터 실시된 송이 산지 분포 조사 및 송이 인공재배 시도는 송이 연구를 위한 큰 전환점을 마련하였다. 이 때를 기점으로 임업시험장(현재의 임업연구원)에서는 이 등(1983)의 논문을 비롯하여 수많은 연구보고와 연구자료가 나오기 시작하였는데(이 등, 1984a; 1984b; 임업시험장, 1981; 1984), 우리나라 송이 발생립의 전반적인 입지환경 특성조사가 충분히 이루어졌으며, 일본에서 시도했던 각종 송이 인공재배시도(포자액 살포, 감염묘 이식)와 더불어 송이산 환경정리에 대한 각종 사업이 활발히 전개되었다. 하지만, 1970년대 이래로 계속 시도된 포자, 균사체, 균환 또는 균환과 함께 묘목이식 등의 방법은 아직 어느 것도 정확히 성공한 바가 없다.

이러한 상황은 송이 연구의 최고 선두주자라 할 수 있는 일본도 마찬가지로서, 송이와 관련되는 논문이 100편 이상 발표된 일본에서도 아직까지 인공재배와 관련해서는 뚜렷한 성공기술을 제시하지 못하고 있는 상태이다. 더구나, 앞서 언급한 것처럼, 장기간에 걸친 많은 연구자들의 노력에도 불구하고 뚜렷한 연구 성과를 제시하지 못하는 상황은 인공재배가 불가능하다는 잠정결론을 내리는 수준에 도달하였다.

한편, 임업연구원에서는 1995년 이후 ‘송이 발생 예측에 의한 환경관리기술 개발’이라는 현장애로 연구과제를 통하여 송이 발생의 생태학적 요인에 대한 전반적인 재검토를 하였으며, 기존 송이산의 생산성 유지 및 증진기법에 대한 정리를 거의 마무리 할 수 있었다(임업연구원, 1998). 특히, 이 연구를 수행하면서 우리나라의 송이 발생환경을 기후적인 인자의 분석을 통하여 정밀하게 검토할 수 있었으며, 이를 통하여 극복할 수 있는 방안을 제시하고, 아울러 일본의 연구에서 제시한 환경개선 기법의 효과분석이나 개선방안을 제시할 수 있었다(박 등, 1995; 1996, 1998; 송 등, 1999; Park 등, 1997). 나아가 송이산의 쇠퇴도 파악을 위한 지표개발을 위하여 균근성 버섯상을 이용하는 기법(Park 등, 1998)이나 토양효소의 활성도를 이용하는 기법(허 등, 1998)을 제시하기도 하였으며, 이러한

노력은 일본의 연구에 이끌려가던 틀을 벗어나 독자적인 연구의 형태를 갖추는 계기가 되었다고 생각한다.

일본의 경우 송이가 매우 고가로 거래되고 있으므로 재배를 위한 노력은 오래 전부터 있었다. 송이의 재배연구는 1974년경에 일본의 국공립 임업시험장을 중심으로 송이 감염묘 연구가 활발하게 이루어졌다(マツタケ研究懇話會, 1983). 그 결실은 1983년 히로시마 임업시험장에서 단 한번의 성공과 함께 연구의 어려움 때문에 중단되었다(小川과 伊藤, 1989). 그리고 1990년대에 들어서 송이 감염묘 연구를 지속적으로 발전시켰지만(Kazuyuki, 1992), 현재까지 이렇다할 연구결과가 없었다.

송이 재배 연구가 송이 감염묘에서 1990년 말부터는 송이 접종묘로 전환되었다(Yamada 등, 1999). 이 연구에서는 송이균을 종자 발아된 소나무 유묘에 접종시키는 기술로 실험실내에서 성공을 실외로 전환시키는 연구가 진행되고 있다. 또한 이 기술은 실험실내에서 소규모 생산에서 대량생산 할 수 있는 시스템 개발로 전환되고 있다. 한편, 송이 접종묘 생산 기술은 야외의 큰 소나무림에서 적용하는 기술도 개발되고 있다. Guerin-Laguette 등(2005)은 야외의 큰 소나무 뿌리에 송이균을 접종하는 기술을 개발하였지만, 이 기술도 아직 송이균이 성장하여 송이균환을 만들었다는 보고는 없다. 단지 야외에서 송이 균근을 형성시켰다는 것으로 송이 접종묘 연구를 한 단계 업그레이드 된 수준이다.

송이 포자를 이용한 방법은 일본의 동북지방에서 1994년에 소나무 천연림에서 송이 포자를 접종하여 새로운 균환형성을 성공하였다는 보고는 있지만(김 등, 1999), 아직까지 정립된 기술로 보기 어렵다. Ohta(1986)는 송이 포자 발아조건에서 n-butyric acid에서 23%까지 발아율을 높일 수 있는 연구결과를 발표하였다. 앞으로 송이 포자를 활용한 기술은 위와 같은 연구결과를 토대로 더 발전할 수 있는 기회가 있을 것으로 기대된다.

송이의 균사체를 활용한 기술은 아직 개발되지 않았다. 하나의 접근법으로는 소나무의 취목묘에 의한 혼시메지 균근합성 및 버섯발생이 성공하였다는 보고가 있어(伊藤과 岩瀬, 1997), 이러한 기술을 송이에 활용하고자 하는 시도이다.



## 제 3 장 연구개발 수행의 내용 및 결과

### 제1절 송이 균사 대량배양기술

#### 1. 서론

2000년까지 우리나라와 일본, 중국, 그리고 북한에서는 송이의 생산량을 증가시키기 위한 일환으로 송이 발생지의 환경에 대한 연구, 송이균환 형성에 대한 연구 및 송이 균환의 확장을 위한 인위적인 균근 형성 등의 연구가 진행되었다. 하지만, 야외에서의 연구가 지니는 한계는 충분한 양의 송이 균환을 얻기 어렵다는 점이다. 즉, 송이의 생산성을 높이거나 새로운 송이 균환을 형성하기 위해서는 송이 균사를 단기간에 대량으로 배양할 수 있어야 한다.

1950년대에 하마다가 송이 균사 배양을 위한 배지를 개발한 이래 1990년대에 일본 교토임업시험장에서 Ohta가 균근성 균사를 배양하기 위한 배지의 물리화학적 특성을 구명하였다. 국내에서도 송이 균사의 액체배양을 위한 배지조건을 구명하였는데, 대부분의 송이 균사 배양은 고체배지나 삼각플라스크 수준에서 실시되었다. 즉, 대량배양을 위한 생물반응기내에서의 균사 성장특성 및 배지의 조성변화 등과 관련한 연구는 극히 부진한 실정이었다.

본 연구는 생물반응기를 이용하여 생물반응기 내에서 송이 균사 배양을 하기 위한 배지의 최적화를 도모하고, 균사 배양에 따른 배지 조성 변화 및 균사 성장 특성을 구명하여, 송이 균사체 배양에 적합한 생물반응기 형태를 선별하고 송이 균사체를 신속하게 대량배양하기 위하여 실시되었다.

한편, 송이 균사의 액체배양 조건과 더불어 고체매질 내에서 인위적으로 신속하게 인공배양을 하는 방법이 확립된다면 실제 현지에 적용하면서 송이 균환의 확장을 위한 각종 환경인자에 대한 평가, 균근 형성 등과 관련한 기내 연구 등의 전개가 가능할 것이다. 그렇지만 기내에서 송이균을 대상으로 대형 고체 매질을 이용한 배양연구 보고는 거의 없다. 이에 따라 본 연구에서는 인공토양과 같은 고체 매질에서 송이 균사체를 신속하게 대량 배양할 수 있는 방법을 개발하였다. 본 연구 결과는 2단계 연구에서 고체 접종원을 이용한 송이 균환 형성 개발에도 활용되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 시료 조제

시험에 사용된 송이 균주는 산림청 국립산림과학원에서 송이 자실체부터 균사를 분리하여 고체 배지에서 배양하고 있는 송이 균주 FRI 91028(양양)의 2종을 사용하였다.

시험처리를 하기 위한 균사는 고체 배지에 배양중인 균사체를 500ml 삼각플라스크에 잘게 썰어 넣고, 1개월간 진탕기에서 110rpm으로 SYP 배지를 이용한 액체배양을 통해 준비되었다. 액체 배양된 균사체를 균질기로 13,000rpm에서 20초간 분쇄하며 잘 혼합한 후 생물반응기 배양용 시료로 사용하였다.

### 나. 균사배양 방법

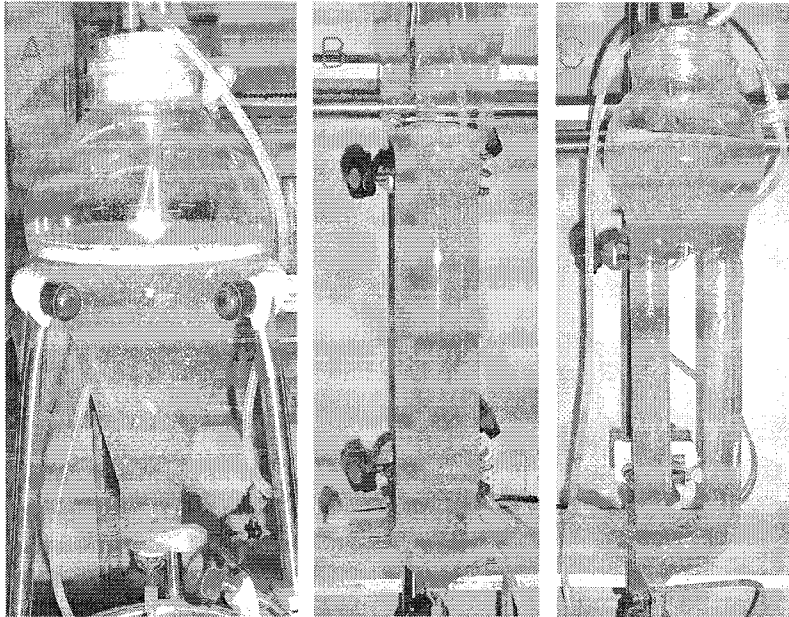
삼각플라스크 수준에서의 액체 배양조건 실험은 250ml 삼각플라스크에 배지액 100ml을 채워 실시하였다. 송이 균사 접종량은 부피비로 5%로 하였고, 4주간 110rpm의 진탕기에서 배양하였다.

생물반응기를 이용하여 송이 균사를 배양하기 위해 5ℓ 및 10ℓ 급 풍선형 공기 부양식 생물반응기(balloon-type air bubble bioreactor)를 사용하였고, 희분 배양을 하였다. 배양 온도는 24℃, 초기 배양액 pH는 5.4로 조절하였고, air 공급량은 0.06-0.12vvm으로 하였다. 균사는 접종 후 28일간 배양하였다.

배양배지 조성(SYP 배지)은 starch 15 g/ℓ, glucose 5 g/ℓ, yeast extract 2 g/ℓ, peptone 1 g/ℓ, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/ℓ, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/ℓ로 하였다. 단 배지를 최적화시키기 위한 실험에서 이들 성분의 함량에 변화를 주었다. 즉 starch농도 처리는 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 g/ℓ 별, yeast extract 농도 처리는 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 g/ℓ 별, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 농도는 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 g/ℓ 별로 처리하여 28일간 배양하여 건중량을 비교하였다.

### 다. 생물반응기 형태별 균사체 배양

송이 균사를 배양하기 위해 사용한 생물반응기는 모두 전체 용량이 3ℓ인 용기이었다. 본 연구진이 자체 제작한 풍선형의 공기 부양식 생물반응기(Son과 Lee, 1997)와 원통형으로서 지름 75mm, 높이 350mm인 깔림형 공기 부양식 생물반응기, 상승 및 하강관의 지름이 40mm이고, 높이가 300mm인 외부 순환형 기포 통기식 생물반응기 등 3종류를 사용하였다(그림 3-1-1).



<그림 3-1-1> 3종류의 송이 균사 대량배양을 위한 생물반응기(bioreactor).

- A: 풍선형 공기부양식(balloon type), B: 칼럼형(column type),  
 C: 외부 순환형 기포 통기식(external-loop type)

각 배지의 탄소원은 starch(15g/l)와 glucose(5g/l)로 대체 처리하였다. Seed 접종량은 0.85g(건중)/4l 로 처리하였으며, 28일간 배양한 후 건조된 균체량을 비교, 분석하였다.

#### 라. 균사 성장량 조사 및 배지 분석

균사의 성장량을 조사하기 위해 생물반응기에 균사 접종 후 2-3일마다 충전 세포용량(Packed cell volume)을 측정하였고, 최종 수확된 균사체는 흐르는 물로 세척하고 70℃ 건조기에서 3일간 건조 후 균사의 건중량을 측정하였다. 송이 균사 배양 중의 배지소모량을 측정하기 위해 배양액을 2일 주기로 분취하여 즉시 0.45 um filter로 여과 후 여액을 -40℃에 냉동 보관하여 당 및 전질소 분석용 시료로 사용하였다.

Glucose 함량은 HPLC로 carbohydrate column (waters, 4.6×250mm)을 이용하여 RI detector로 정량하였다. 환원당은 배양액 자체 내의 환원당을, 전체 환원당은 배양액을 산가수분해 후의 환원당을 Modified DNS 방법(Miller, 1959)에 의해

함량을 분석하였다. 전질소는 배양액을 황산 습식법으로 산분해하여 boric acid 적정법(한 등, 1988)으로 정량하였다.

#### 마. 고체매질에서 송이균 배양방법

고체매질 재료는 마사토, 펄라이트(Pamix, Korea), 피트모스(Acadian, Canada), 질석 그리고 소나무 톱밥이었다. 마사토는 화강암이 모재로서 2mm 체를 통과한 것을 사용하였다. 고체매질 조제는 60cm<sup>3</sup> 고체 매질과 보릿가루 1.8g을 혼합하여 함수율(습량 기준)을 40~50%로 조절 후 경질 시험관(Ø 3.5 × 15cm)에 넣고, membrane 필터(Gelman, Ø 3cm, pore size 0.2µm)가 장착된 실리콘 마개로 막은 후 121℃에서 30분간 고압 멸균하였다. 송이 균사 접종은 액체 배양된 송이 균사체를 0.12g/60cm<sup>3</sup>(건중량 기준)의 비율로 하였으며, 접종 균사체와 고체 매질을 무균적으로 혼합하였다.

고체 매질의 영양원은 보릿가루를 사용하였고, 보릿가루 첨가량 10, 30, 50, 70g/400cm<sup>3</sup>로 처리하였으며 처리당 3반복으로 실험하였다. 고체 매질은 마사토: 질석: 펄라이트: 소나무 톱밥(1: 1: 1: 1)을 부피 비율로 혼합한 것을 사용하였다. 송이 균사의 생장량은 24℃에서 60일간 배양한 후에 에르고스테롤 함량으로 조사하였다.

#### 바. 송이균 배양용 고체매질 조성

송이 균사체 배양에 적합한 매질의 종류를 알아보기 위해 매질종류는 마사토, 펄라이트, 질석, 피트모스 및 소나무 톱밥을 대상으로 실험하였다. 단 백 마사토는 4mm 체를 통과한 것을 사용하였다. 각각의 배지는 앞선 실험과 같은 조건으로 조제하여 송이균을 접종하고 에르고스테롤 정량법으로 송이균의 생장량을 조사하였다.

#### 사. 고체매질에서 송이균 접종량 조사

고체매질 조성은 앞선 고체매질 실험에서 사용한 것과 마찬가지로 마사토: 펄라이트: 질석: 소나무 톱밥을 1: 1: 1: 1의 부피비율로 혼합한 것이다. 각 시험관에 송이균의 접종량은 고체 매질 부피 100cm<sup>3</sup>당 송이 균사체가 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6g(건중량)이 함유되도록 처리하였으며 처리당 3반복으로 하였다.

#### 아. 고체매질에서 배양 기간별 송이균 성장량 조사

고체매질과 송이균 접종은 앞선 실험과 동일한 방법으로 하였다. 이때 고체매질에 보릿가루는 3.6g/60cm<sup>3</sup>을 첨가하였다. 배양기간은 1주부터 13주까지로 설정하였고, 각 배양기간별 3반복 실험을 하였으며, 송이균의 성장량은 에르고스테롤 함량으로 조사하였다. 송이균의 성장정도를 비교하기 위해, 강원도 홍천군 동면에 소재한 국립산림과학원의 송이 시험림에서 2000년 10월 초에 송이 균환 선단 부분의 4개 지점에서 토양을 채취하였다. 채취된 송이 균환 토양은 아이스 박스에 넣어 실험실로 이송하여 곧바로 -70℃ 초저온 냉동고에 넣어 보관하며 에르고스테롤 함량 분석용 시료로 사용하였다.

#### 자. 고체매질에서 송이 균 성장을 위한 수분조건 조사

고체매질은 마사토: 펄라이트: 소나무 톱밥(2: 1: 1, v/v/v) 혼합체를 사용하였고, 보릿가루를 1.8g/60cm<sup>3</sup> 첨가하였다. 고압 멸균 후 냉각하여 일부 고체매질을 105℃에서 24시간 건조하여 건조 전, 후의 무게 차이로 수분 함량을 측정하였고(한 등, 1998), 이를 기준으로 증류수를 첨가하여 수분함량(습량 기준)을 10, 30, 50, 70, 90%로 조절하였다. 각 수분 함량별로 3반복 실험을 하였다.

#### 차. 부엽토가 송이균 성장에 미치는 영향 조사

고체매질은 마사토: 펄라이트(1: 1, v/v) 혼합체를 사용하였다. 부엽토는 강원도 홍천 소재 송이 시험지 내의 활엽수 혼효림에서 암갈색의 낙엽 부엽토를 채취하여 기건 후 2mm체를 통과한 부엽토를 사용하였다. 부엽토 함량비율은 마사토와 펄라이트를 1: 1로 혼합한 인공토양과의 비율로 처리하였다. 부엽토량은 10, 30, 50, 70, 100%로 처리를 하였다. 각 처리별로 3반복으로 실험을 하였다. 배지조제는 앞선 실험과 동일한 방법으로 하였다.

#### 카. 송이 균사체 내의 에르고스테롤 함량 분석

각 생물반응기에서 배양중인 균사체를 4일 간격으로 분취하여 흐르는 물로 세척 후 탈수하여 즉시 -40℃에 냉동 보관하여 에르고스테롤의 함량 분석용 균사체로 사용하였다. 고체 매질의 송이균사의 성장량 및 송이 균환 토양 내 송이 균 함량은 모두 에르고스테롤(ergosterol) 분석을 통해 비교하였다. 각 처리별 분석시료는 잘게 부쇄 일정하게 혼합한 다음에 에르고스테롤 함량을 분석하

였고, 처리별로 이중 일부의 시료는 건중량을 측정하였다. 건중량은 105℃ 항온기에서 24시간 건조하여 측정하였다(한 등, 1998).

균사체의 에르고스테롤 함량은 Mottonen 등(1998)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 즉 균사체 3g(생중)을 MeOH 100ml에 넣어 3분간 sonication (Branson, 8210)하고 EtOH 20ml와 KOH 10g을 넣고 80℃ 환류냉각장치에서 1시간 사포닌화한 후 여과하여 일정 여액을 분취하여 Hexane으로 3회 분획, 건조 후 메탄올에 녹여 에르고스테롤 함량 측정용 시료로 사용하였다. 에르고스테롤 함량은 HPLC(TSP operating system)에서 LiChrospher 100RP-18S(5 $\mu$ m, 4.6 x 250mm) 칼럼을 이용하여, 이동상으로 MeOH: H<sub>2</sub>O = 98: 2의 혼합용액을 사용하며 유속은 2ml/min로 하여, UV검출기(TSP 3000HR) 282nm에서 측정, 정량하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 송이균사 대량생산을 위한 생물배양기내 배지조성 확립

##### 1) 배지 특성별 균사 성장량

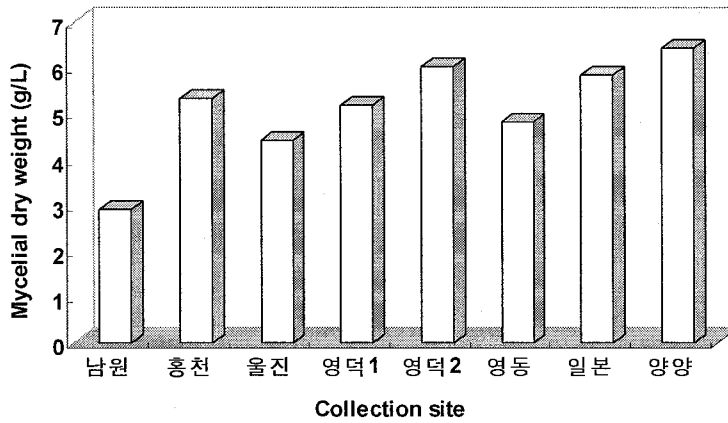
풍선형 공기 부양식 생물반응기(5L급)를 이용해 배지 종류별 균사 생산량을 비교한 결과, YMM, 변형 Hamana, TMM 및 SYP 배지가 배양액 L당 균사 건중량 10g 내외를 생산하여 우수한 배지로 판단되었다(표 3-1-1).

<표 3-1-1> 액체배지별 송이 균사 성장량(풍선형 공기 부양식 배양기)

배지 종류	조성(g/L)							균사 건중량 (g/L)
	yeast extract	peptone	malt extract	soytone	beef extract	potato extract	기타 미량원소	
YMM	3	5	3	-	-	-	-	10.38
NGM	-	5	-	-	3	-	-	5.76
CDY	1	-	-	-	-	-	NO <sub>3</sub> , K, Mg, Cl, Fe, Na	5.36
변형된 Hamada	5	-	-	-	-	-	K, P	10.84
MMN	-	-	3	-	-	-	NH <sub>4</sub> , K, P, Mg Ca, Fe, Na, Thiamin	4.77
PDMP	-	1	3	-	-	24	-	6.31
TMM	1.5	-	-	1.5	-	-	-	10.26
MYG	5	-	5	-	-	-	-	8.92
SYP	1.5	1.5	-	-	-	-	K, P, Mg	9.85

## 2) 송이균사체의 산지(군주 종류)별 성장량

산지별 송이 균사체의 성장량을 비교하기 위해 생물반응기에서 액체 배양을 한 결과 전반적으로 산지간의 차이는 크게 없었으나 일부 산지의 균사체에서 성장량이 저조한 것으로 나타났다(그림 3-1-2). 이러한 결과에 따르면 송이 균사체의 생산량을 증가시키기 위해서는 생장이 우수한 균사체를 선발할 필요도 있는 것으로 생각된다.

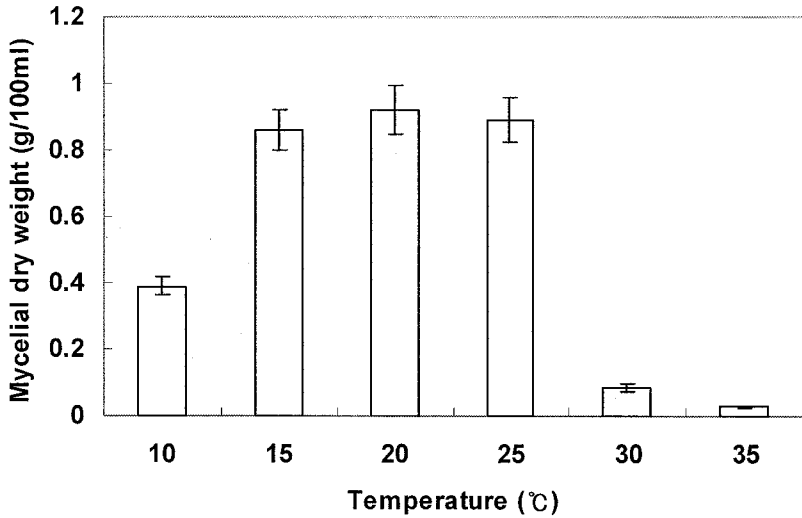


<그림 3-1-2> 송이 산지별 균사 성장량 비교 결과(풍선형 공기 부양식 배양기).

## 3) 배양 조건 및 배지 조성

송이 균사체는 5℃의 저온에서도 성장속도가 느리지만 성장을 하나, 고온에서는 매우 약하여 35℃ 이상에서는 수 시간 안에 활력을 잃어버리는 특성을 지니고 있다. 일반적으로 송이 균사의 액체배양 15℃~25℃로서 최적온도는 23℃ 전후이었다. 15℃에서도 잘 자라는 경향이었으나 성장 속도가 20℃보다 다소 느린 경향이었다(그림 3-1-3).

배지의 pH는 5.3 내외에서 생장이 양호하고 pH가 3.5 이하로 낮거나, 6.5 이상에서는 생장이 낮아졌다. 탄소원으로서 전분(starch)이 포도당(glucose)보다 균사 생장이 우수한 것으로 나타났다. 그러나 균사의 초기 배지적응 및 초기 성장기간을 앞당기기 위해서 전분과 포도당이 혼합된 배지가 균사 성장에 좋은 것으로 나타났다. 질소원은 효모추출물(yeast extract)과 펩톤(peptone) 병행 처리가 효모추출물 단일 처리보다 우수하였다. 또한 효모추출물의 농도를 낮추고 무기이온 형태의 질소를 첨가하는 경우도 좋은 결과를 나타내었다.



<그림 3-1-3> 배양 온도별 송이 균사 성장량 비교 결과.

삼각 플라스크를 이용한 송이균사체의 적정 배양조건을 조사한 결과 pH는 5.3 전후, 배양온도 15~25°C, 적정 배지 조성은 starch 15g/L, glucose 5g/L, yeast extract 3g/L, peptone 1g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5g/L인 것으로 나타났다. 이러한 조성으로 생물반응기에 배양 시 배양액 L당 균사체 건중 12g을 생산하였다.

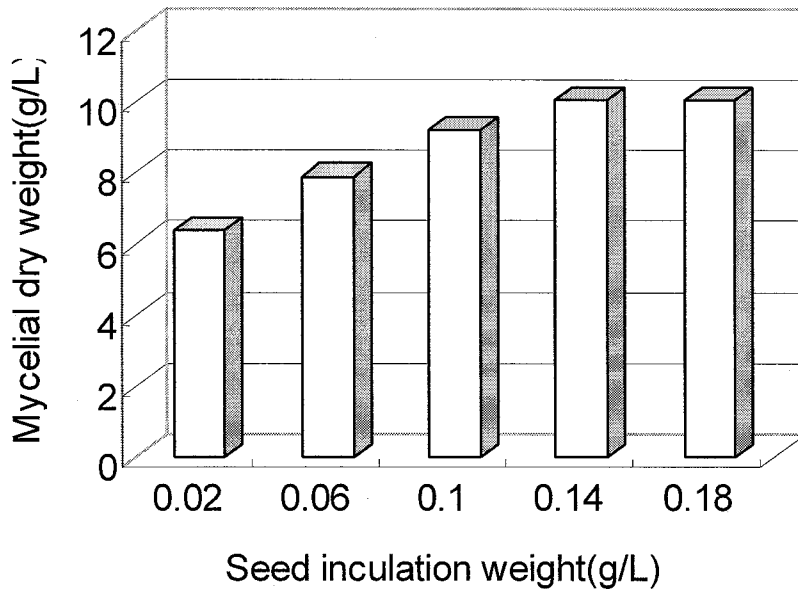
#### 나. 생물배양기에서 균사배양 최적화

##### 1) 초기 균사 접종량 구명

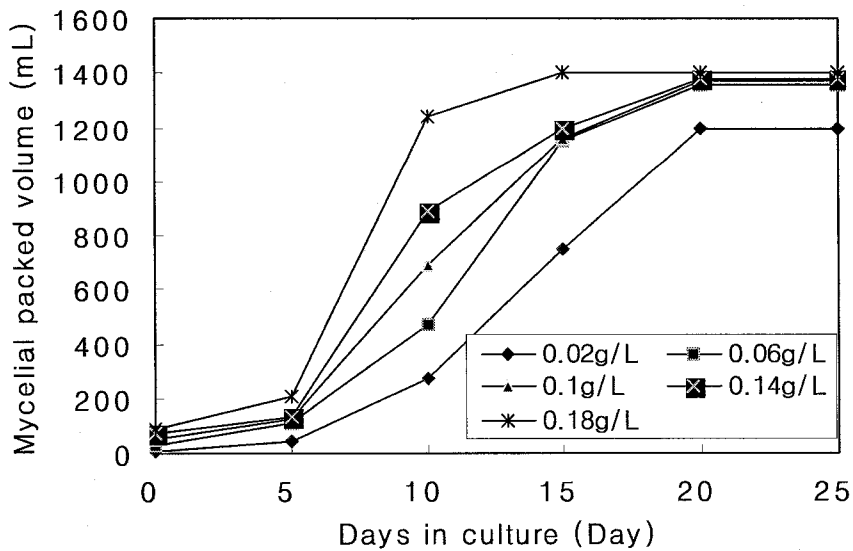
생물배양기내에서 균사 성장을 최적화시키기 위해 적정 초기균사 접종량을 구명하였다. 풍선형 공기부양식 생물반응기(5L급)을 사용하였고, SYP 배지를 이용하여 FRI 91009(양양)를 접종 후 28일간 배양하였다.

균사의 부피 생장은 배양 20일 후면 거의 정지상태에 도달하였으며, 균사의 건물 중량은 접종량이 증가할수록 증가하다가 0.1g/L 와 0.14g/L 사이에서 변곡점이 생성되고, 0.14g/L처리 이상에서는 차이가 없는 것으로 나타났다(그림 3-1-4). 생물배양기에 송이 균사를 배양하기 위한 적정 균사 접종량은 건중으로 0.12~0.14g/L 이상 처리하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 특히 초기 접종량이 많을수록 수확시기도 앞당길 수 있는 것으로 나타났다.





<그림 3-1-4> 송이 접종량에 따른 균사 성장량(풍선형 공기 부양식 배양기).

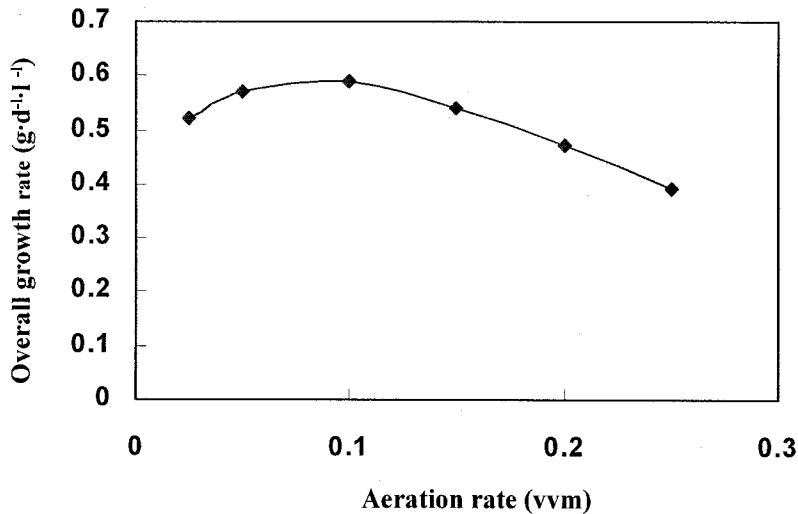


<그림 3-1-5> 송이 접종량에 따른 균사 성장량 변화(풍선형 공기 부양식 배양기).

## 2) 생물반응기에서의 공기공급율

송이는 호기성균이므로 생물반응기에서 액체배양 시 적정량의 공기가 공급되어야 한다. 공기 공급은 배지 내의 산소 공급 외에도 배양체를 섞어 주어 성장, 증식을 촉진하는 작용도 한다.

배양액의 공기 공급량은 용존 산소를 측정하여 배양체의 생산량과의 관계를 구명하여 최대의 생산성을 유지하도록 산소 공급량을 조절한다. 그러나 일반적으로 송이 균사체는 성장속도가 다른 균사체에 비해 느리기 때문에 일시에 많은 산소가 필요로 하지 않는 특성이 있다. 따라서 송이 균사체 배양 시 배양액의 공기 공급량은 용존 산소량보다는 균사체의 뭉침 작용이나 침강을 막기 위한 순환을 유지토록 하는데 필요로 하는 것으로 판단된다.



<그림 3-1-6> 공기 공급률에 따른 송이 균사 성장률 변화(풍선형 공기 부양식 배양기에서 24℃의 조건으로 17일간 배양한 결과).

송이 균사체의 공기 공급량은 0.05~0.1vvm으로 처리하는 것이 가장 좋은 것으로 나타났다(그림 3-1-6). 송이 균사체의 생장은 낮은 공기 공급량이 초기 배양에서는 우수하였으나 배양기간이 경과되면서 균사들의 침강과 뭉침으로 인해 점차 낮아지는 경향을 보여주었다. 따라서 균사의 성장량을 증가시키기 위해서는 균사의 뭉침이나 침강이 되지 않는 정도의 낮은 공기 공급이 되도록도 배양하는

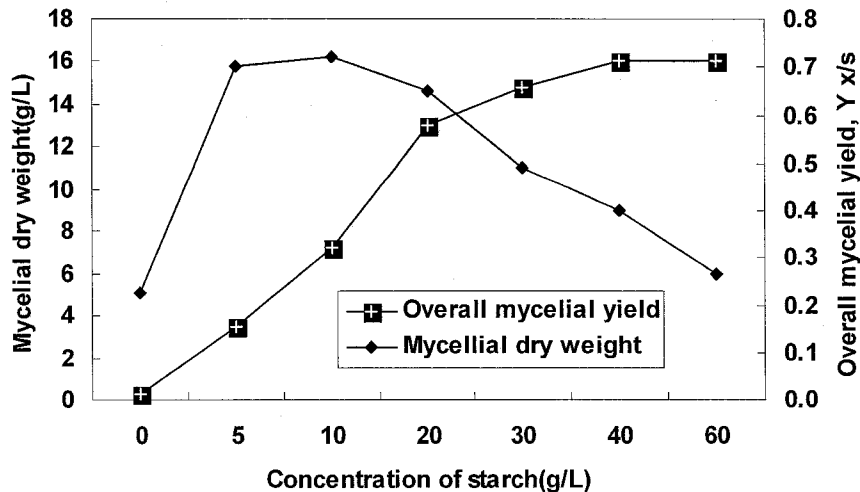
것이 좋으며, 균사의 생육과 더불어 균사가 침강이 되지 않도록 점차 공기공급량을 높여주는 것이 좋을 것으로 추정된다.

이러한 적정 공기 공급율은 생물반응기 형태에 따라 다르게 나타나므로 배양을 통한 적정 공기 공급율을 결정해야 한다. 통상 공기 부양식 생물반응기에서는 0.1vvm이 적당한 것으로 추정된다.

### 3) 송이 균사배양을 위한 배지 최적화

송이 균사배양에 적합한 탄소원은 starch와 glucose이며 특히 starch가 매우 우수한 것으로 보고되어 있으므로(이 등, 1997) starch를 대상으로 배지 적정 농도시험을 하였다. 또한 질소원으로서 yeast extract 3g/l와 peptone 1g/l을 병행 처리하였다.

<그림 3-1-7>과 같이 starch의 함량이 증가할수록 균사생산량은 증가하는 경향이었으나 40g/l 이상 처리부터는 더 이상 증가하지 않는 경향이였다. 배양액 l당 20g처리는 균사 생산량이 건중으로 12g을, 40g/l 처리에서는 15g를 생산하였다.

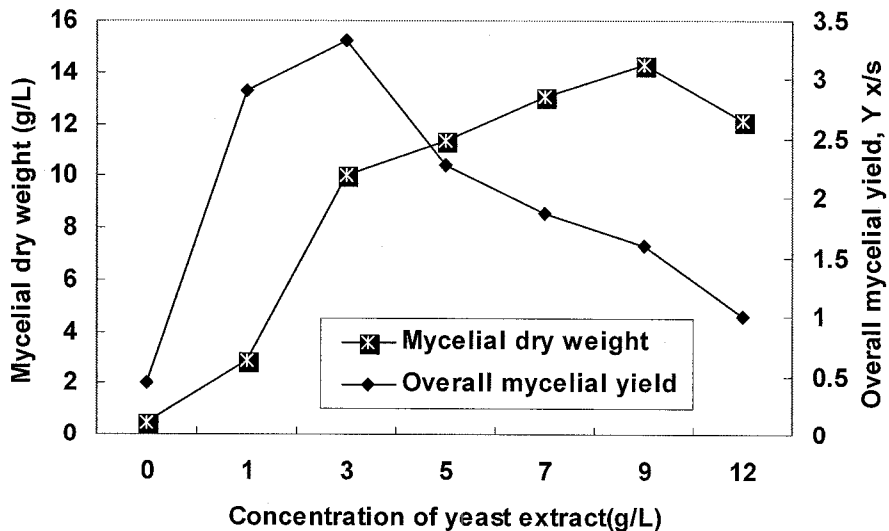


<그림 3-1-7> 전분 농도에 따른 송이 균사 성장량 변화.

Yx/s(g dry mycelial weight/g starch source used)는 생산된 균사 건중량(g) 대비 처리한 starch량(g)의 비율로서 이 수치가 높을수록 생산 효율이 높음을 나

타낸다. Starch를 10g/ℓ로 처리한 것이 0.71로 가장 효율이 높았고, 20g/ℓ 처리에서는 0.68로 큰 차이가 없어 이 이상 처리부터는 생산효율이 급격히 낮아졌다. 생산 효율이 높은 적정 starch량은 20g/ℓ 전후인 것으로 추정되었다.

송이 균사배양에 적합한 질소원으로서 단일 성분들은 아직 명확히 구명되지 않았으나, 복합 질소원으로서 yeast extract가 대표적이다. <그림 3-1-8>은 탄소원으로서 starch을 15g/ℓ과 glucose 5g/ℓ를 병행처리한 대조구와 질소원으로 yeast extract를 농도별로 처리하면서 균사 생산량을 비교한 것이다. yeast extract의 처리농도가 높을수록 송이 균사의 성장량이 증가하였으나 9g/ℓ 이상 처리부터는 오히려 생산량이 감소하였다. yeast extract 농도에 따른 균사 생산효율은 3g/ℓ 처리가 가장 높았으며 이 이상 농도부터는 효율이 급격히 저하되어 3g/ℓ 처리가 가장 효율적인 것으로 나타났다.



<그림 3-1-8> 효모추출물의 농도에 따른 송이 균사 성장량 변화.

다양한 조성의 배지에 송이 균사를 생물반응기를 이용하여 배양한 결과 peptone과 yeast extract와의 병행 처리도 우수한 것으로 나타났다.

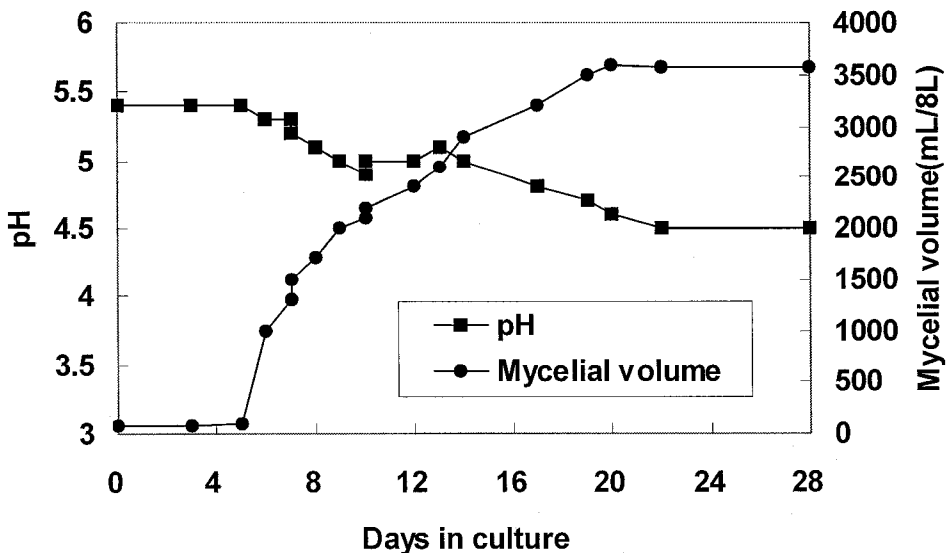
인산의 농도에 따른 송이 균사의 최종 건중량을 비교한 결과 인산의 처리는 무처리(건중 10g/ℓ)와는 큰 차이는 없었지만 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>로 1.2g/ℓ 처리(건중 13g/ℓ)

ℓ)까지는 균사 생산량이 증가하는 경향이였다. 한편 인산의 처리는 송이 균사 배양 배지의 pH의 변화를 다소 억제하는 효과가 있었다. 최종 수확기의 배지 pH는 인산의 처리가 무처리에 비해 0.5 수치 정도가 높게 나타났다.

#### 4) 생물반응기 내 송이 균사 성장 특성

##### 가) 배양일자별 송이 균사 성장량 및 pH 변화

균사의 생장은 접종 후 5일부터 급격히 성장하여 20일 이후부터 부피 증가는 멈추고 정체기에 있다가 미미하게 감소하기 시작하였다(그림 3-1-9). 생물반응기 내에서의 송이 균사의 부피생장은 배양 후 20일이면 완료되는 것으로 나타났다. 그러나 초기 접종량을 0.15g/ℓ 이상으로 접종할 경우 이보다 더욱 성장 속도가 빠를 것으로 추정된다. 한편 극히 일부 균사는 초기생육 시기가 늦어 7일 이후에 시작되는 경우도 있었으나 전반적으로 5일 이후부터 생장이 시작되었다. 통상 고체배지에서는 송이균사의 생장은 매우 느려 접종 후 7일 이후부터 균사가 육안으로 자라는 것을 확인할 수 있으며 삼각플라스크에서는 액체배양을 할 경우 성장완료에 30일 이상이 소요된다.



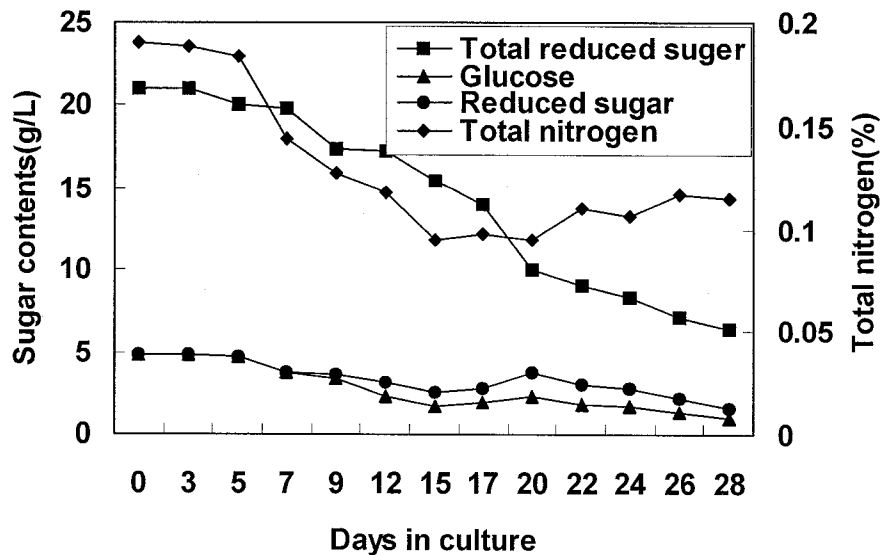
<그림 3-1-9> 배양일자별 송이 균사 성장량 및 pH 변화.

배양액의 pH는 초기 5.4에서 부피 증가와 더불어 낮아져 수확기에 pH 4.7로 나타났다. 균사 모양은 직경 5-8mm 정도의 펠렛(pellet) 형태로서 표면에 침상을 갖고 있는 형태였다. 송이 향은 배양 3주 후부터 발생하기 시작하였다.

배양액의 전환원당의 함량은 배양액을 산가수분해하여 환원당으로 분해하여 배양액 내 전체의 당 함량을 나타낸 것이다. 배양액의 전환원당의 함량은 송이 균사배양 5일 후부터 감소하여 수확기까지 초기 농도의 73%를 소모하였다.

#### 나) 배양일자별 기질소모 특성

<그림 3-1-10>에서와 같이 성장 초기에 송이균사는 glucose를 사용하다가 접종 7일 이후부터 전분을 분해하는 것으로 나타났다. 배양액의 환원당 함량은 초기에 넣어준 glucose량과 송이 균사가 전분을 분해하여 환원당으로 전환시킨 양의 합을 나타낸 것이다. 배양액 내의 환원당 함량은 초기에 넣어준 glucose의 함량인 0.5%를 넘지 못하였다. 이는 송이 균사가 전분을 환원당으로 분해하여 즉시 흡수하여 배양액 내에 남기지 않거나 3탄당 이상의 형태로도 흡수하고 있다는 것으로 추정할 수 있다. 한편 배양 8일 이후부터 starch에 대한 요오드 반응이 미미하게 나타나 대부분의 전분이 덱스트린형태로 전환된 것으로 추정된다.



<그림 3-1-10> 송이 배양에 따른 배지 내 포도당, 환원당 및 전질소 함량 변화.

환원당과 glucose의 함량 변화는 배양 5일 이후부터 감소하다가 배양 17일경에 다시 증가하여 수확기까지 계속 감소하는 경향이였다. 한편 탄소원은 부피생장이 완료된 20일 이후에도 계속적으로 소비가 되고 있는 것으로 나타났다.

배양액의 질소함량은 배양 5일 후부터 감소하기 시작하여 16일 전후로 최소치에 있다가 20일 이후부터 다시 조금씩 증가하는 경향이였다. 이는 배양 20일 이후부터 흡수되었던 질소가 오히려 체외로 분비된다는 것으로 추정된다. 한편 질소의 이용율이 50% 정도로 낮은 상태이므로 앞으로 배지의 최적화를 위해서 질소원의 연구가 필요하다.

## 다. 생물반응기 형태별 송이 균사체 배양

공기부양식의 생물반응기는 비교적 송이 균사체 배양에 좋은 형태로서 이들은 다시 풍선형 및 칼럼형과 air-lift형의 일종인 internal-loop 또는 external-loop형의 기포통기형의 생물 반응기로 분류된다. 따라서 생산성을 향상시키기 위해서는 이러한 배양기 형태 중 송이 균사체 배양에 가장 적합한 형태를 선발할 필요가 있다. 송이 균사체를 이들 배양기에 심부 배양하여 생물반응기 형태별 균사체의 성장특성을 비교하였다. 또한 각 배양기에서 배양과정 중의 송이균사체에 주는 스트레스 정도를 비교하기 위하여 살아있는 균사체에서 다량 존재하는 ergosterol의 함량 변화를 측정하여 균사체 활성도를 비교함으로써 각 배양기 형태에 따른 송이 균사체 성장특성을 비교 검토하였다.

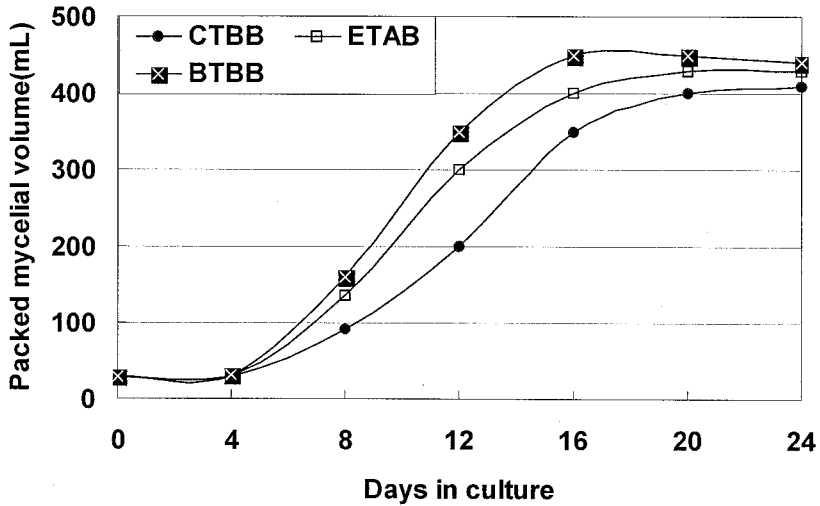
### 1) 생물반응기 형태에 따른 송이 균사의 성장 특성

생물반응기 형태에 따른 송이 균사체 성장량을 비교 분석하기 위하여 생물반응기(working volume 2ℓ)에 송이 균사체를 접종하여 24일간 배양하면서 배양 4일 단위로 세포 충전 용량을 측정하였다(그림 3-1-11).

공기 부양식 생물배양기에서 송이 균사체는 통상 접종 후 4~6일 이후부터 생장이 시작되어 성장 정체기는 배양 20일 전후가 된다. 풍선형 생물반응기에서의 송이 균사체의 성장 정체기는 접종 후 16일부터 시작되었으며, external-loop형 기포 통기형 생물반응기는 20일 이후, 칼럼형 생물반응기는 24일 이후부터 생육 정체기에 이르는 것으로 나타났다.

생물반응기에서 24일간 배양 후 송이 균사체의 생산량을 생물반응기 형태별로 비교한 결과 풍선형 생물반응기에서 평균 12g, external-loop형 기포 통기형

생물반응기에서는 11.4g, 칼럼형 생물반응기에서는 9.5g을 생산하여 송이균사체 배양에 풍선형 생물반응기가 가장 우수한 것으로 나타났다. 칼럼형에서는 송이균사체가 뭉쳐 자라는 현상이 다른 형태의 생물배양기 보다 크게 나타났다. 이는 칼럼형에서 균사체 생산량이 가장 적게 생산된 이유로 추정된다.

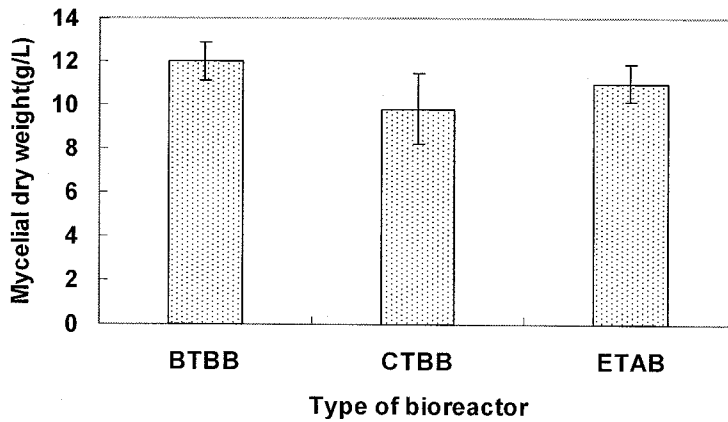


<그림 3-1-11> 생물반응기 형태별 송이 성장패턴 차이.

BTBB: 풍선형(balloon type of air bubble bioreactor),

CTBB: 칼럼형(column type of air bubble bioreactor),

ETAB: 외부순환형(external-loop type of air-lift bioreactor)

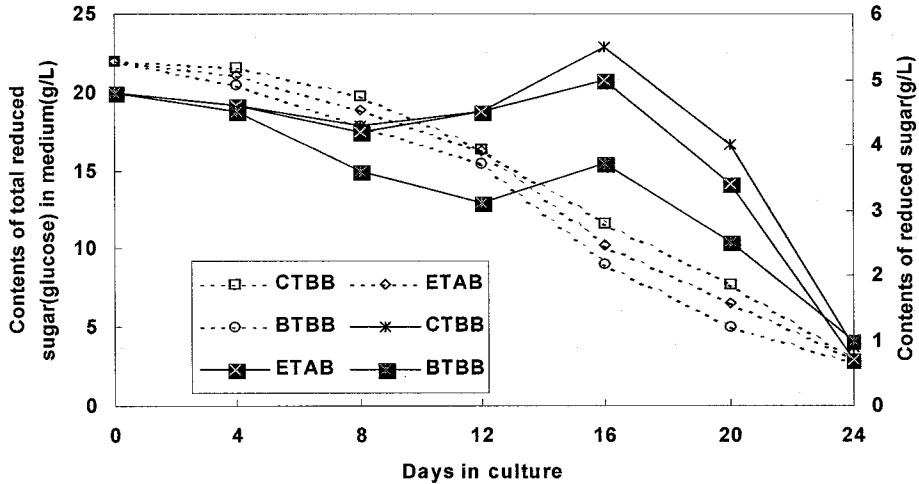


<그림 3-1-12> 생물반응기 형태별 송이 성장량 차이.



2) 생물반응기 형태에 따른 기질소모 특성

생물반응기 형태별 배양시기별 송이 균사 배양액의 전체 환원당 및 환원당의 함량변화는 <그림 3-1-13>과 같다. 전체 환원당은 송이 배양액의 탄소원으로 전분 및 포도당을 사용하였기 때문에 배양액을 산가수분해한 후 배양액의 포도당 함량으로 전체 환원당을 나타내었고, 환원당은 배양액 내의 포도당 함량과 송이 균사체에 의하여 전환된 환원당의 양을 표시한 것이다.



<그림 3-1-13> 생물반응기 형태별 배양시기별 송이 균사 배양액의 전체 환원당 및 환원당의 함량변화.

BTBB: 풍선형(balloon type of air bubble bioreactor),  
 CTBB: 컬럼형(column type of air bubble bioreactor),  
 ETAB: 외부순환형(external-loop type of air-lift bioreactor)

배양액의 전체 환원당 함량은 풍선형이 가장 높았고, 기포통기형이 중간 정도, 컬럼형이 가장 적은 순으로 결과를 얻었으며, 24일째에는 모든 종류의 반응기에서 거의 유사한 양으로 감소하는 경향이였다. 환원당의 함량은 초기 22g/l에서 4~5일의 잠복기에는 이용량이 거의 없었으나, 대수성장기에는 서서히 환원당의 감소가 있었고, 정체기에 이르는 16일 이후 다소 증가하다가 급격히 낮아져 수확기인 24일째에는 생물반응기 대부분이 g/l 이하로 감소하였다.

감소된 환원당 1g당 균사생산량( $Y_{x/s}$ )을 보면 풍선형에서 0.62로 가장 높았으며, 이것은 균사 성장량이 가장 높은 것과 일치하는 경향이였다. 균사 성장속도

는 총 균사량을 총 배양기간으로 나눈 값(Rx)으로 풍선형은 0.5, 기포 통기형은 0.48, 컬럼형에서는 0.4로 나타났다. 이러한 수치는 Kawogoe 등(1999)이 보고한 최대 0.46의 수치보다 높은 값으로 풍선형과 기포 통기형에서 얻을 수 있었다(표 3-1-2).

<표 3-1-2> 세 가지 생물반응기를 이용한 송이 균사 배양결과

Bioreactor <sup>a</sup>	Cell concentration (g/ℓ) <sup>b</sup>	Stagnant time(day)	Residual Reducing sugar(g/ℓ)	Overall cell yield, Y <sub>x/s</sub> <sup>c</sup>	Overall growth rate Rx(g/d/ℓ) <sup>d</sup>
BTBB	12	16	2.7	0.62	0.50
ETAB	11.4	20	3	0.60	0.48
CTBB	9.5	24	2.9	0.50	0.40

<sup>a</sup> BTBB : 풍선형(balloon type of air bubble bioreactor), CTBB: 컬럼형(column type of air bubble bioreactor), ETAB: 외부순환형(external-loop type of air-lift bioreactor)

<sup>b</sup> 24시간 배양 후의 균사 건중량

<sup>c</sup> 초기 환원당 농도는 22g/ℓ, Y<sub>x/s</sub>는 단위 환원당 소비량 대비 생산된 세포량

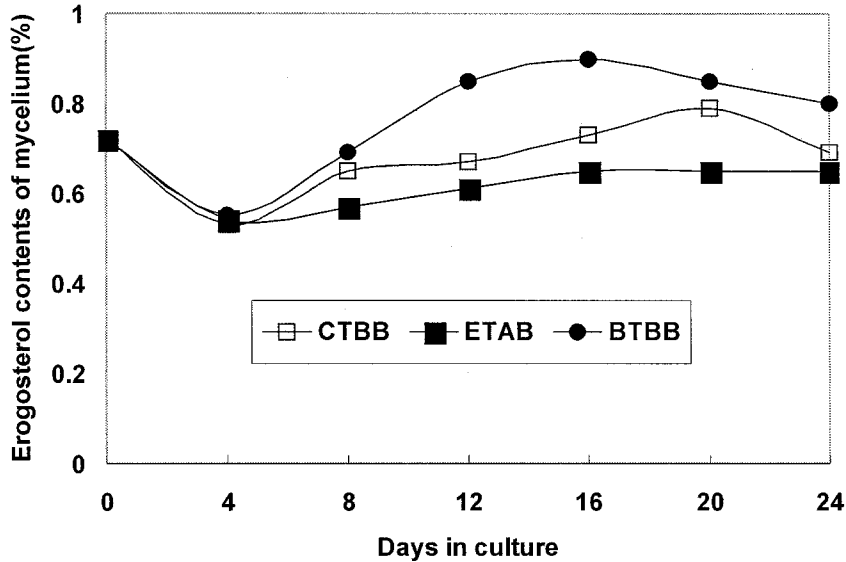
<sup>d</sup> Rx는 배양 최후의 세포농도를 배양기간으로 나눈 값

### 3) 생물반응기 형태별 송이 균사체의 ergosterol 함량 변화

Ergosterol은 고등균류나 자낭균류에 주로 존재하는 것으로서 세포막의 주요한 성분을 이루고 있으며, 살아있는 세포에 존재하여 세포가 변형되거나 활력을 잃었을 시 그 함량은 급격히 감소하게 된다. 일반적으로 ergosterol함량은 균체량을 추정하는데 이용되고 있다. 그러나 균체의 ergosterol 함량은 균체의 생육단계나 배양환경의 조건에 따라 다르게 나타나고 있다. 이러한 특성을 이용하여 반응기의 형태별에 따른 단위 균사체의 ergosterol 함량을 정량하여 반응기 형태가 송이균사체 성장에 주는 스트레스 정도를 추정하는데 이용하였다.

<그림 3-1-14>와 같이 균사체의 성장 시기별 송이 균사체의 ergosterol 함량은 대수성장기에서 정체기에 해당하는 때에 전반적으로 높게 나타났고, 그 이후부터는 점차 감소하는 경향이다. 특히 풍선형 생물배양기에서 가장 높은 함량을

보여주었으며 이어서 칼럼형, 기포 통기형 순이었다. 풍선형 생물배양기가 다른 배양기에 비해 배양기간별로 전반적으로 균사체의 ergosterol 함량이 높게 나타나 환경 스트레스를 가장 적게 받는 것으로 나타났다.

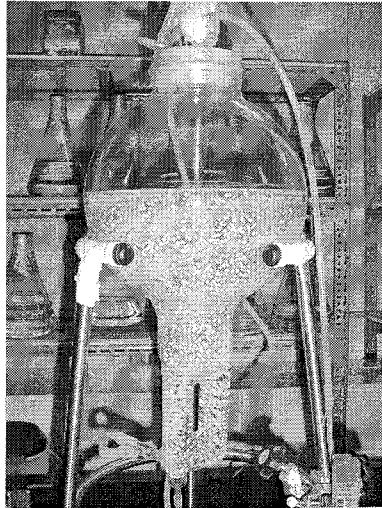


<그림 3-1-14> 송이 균사체 내의 ergosterol 함량 변화.

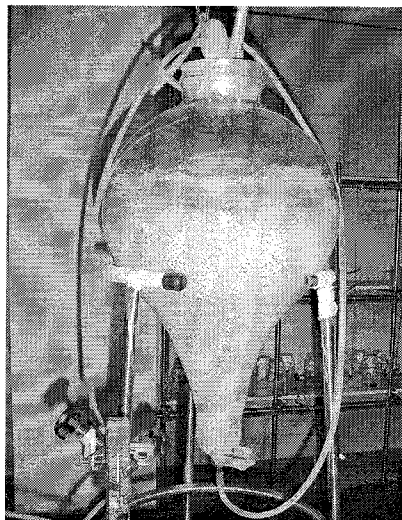
풍선형 공기부양식 생물반응기에서 송이균사체의 ergosterol 함량이 높게 나타난 것은 풍선형 반응기가 구조 특성상 칼럼형 공기부양식 생물반응기보다 윗부분의 표면적이 넓은 형태이기 때문이다. 이러한 형태는 공기의 산포율을 높여 용존 산소량을 높여 주고 직접적인 공기방울이 터지면서 세포에 주는 스트레스를 감소시켜주었으며, 또한 배양체의 순환율을 높여 고르게 성장하도록 하기 때문인 것으로 추정된다. 반면 기포 통기형 생물반응기가 칼럼형보다 ergosterol 함량이 낮은 이유는 공기 방울의 영향과 더불어 과도한 유체의 흐름에 의한 전단력 증가로 세포가 받는 스트레스가 컸기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 송이균사체 배양에 스트레스를 가장 적게 주는 반응기의 형태는 풍선형의 공기부양식 생물반응기인 것으로 나타났다.

한편 칼럼형 및 풍선형 공기부양식 생물반응기는 스파자 부근에서 균사체가 착생하여 점차 크게 뭉쳐 성장하여 공기공급을 차단하는 경향이 있었다. 그러나

기포 통기형 생물반응기에서는 유체의 순환으로 이러한 경향은 적게 나타나므로 송이균사체 배양에 적절한 배양기 형태는 풍선형 반응기의 형태를 유지하면서 스파자 부근의 균사체 부착생장을 막기 위해 스파자 부근은 기포 통기형 반응기의 유체 순환식 형태를 유지 하도록 하는 것이 좋을 것으로 추정된다(그림 3-1-15).



<그림 3-1-15> 풍선형, 외부순환형 및 공기부양식 등 세 가지 방식을 혼합한 생물반응기에서 송이 균사체를 배양하는 모습



<그림 3-1-16> 풍선형 공기부양식 생물반응기에서의 송이 배양 모습.

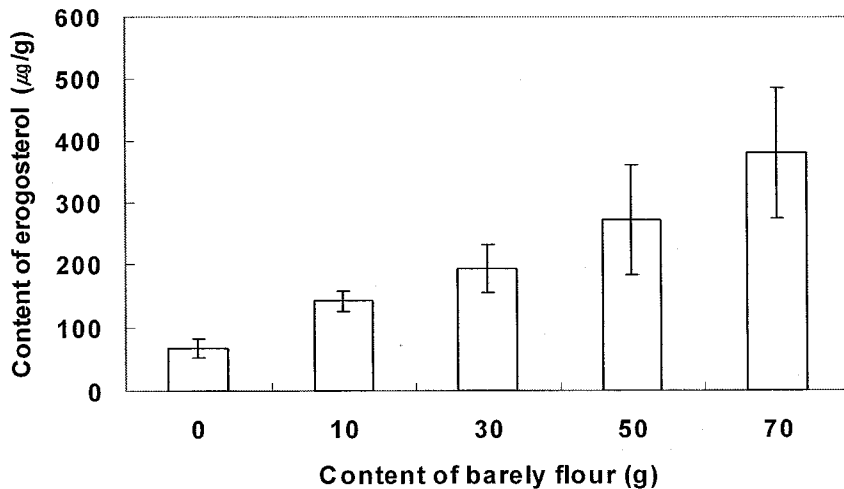
### 라. 고체매질에서의 송이 균사체 배양

액체 배양한 송이균을 고체 매질에 접종하고 이를 고체매질 내에서 신속히 대량으로 배양할 수 있는 방법을 연구하였다. 토양과 같은 고체 매질에서의 배양환경 영향, 균근 형성 등과 관련한 기내연구가 진행되어야 송이를 재배하는 단계에 이를 수 있을 것이다.

본 연구는 송이균을 인공적으로 고체매질 내에서 배양하기 위한 고체매질의 종류별 송이균 성장량을 비교하였고, 매질 내의 수분함량, 부엽도 첨가 효과를 비교하여 고체매질 내에서의 송이균 배양조건을 구명하여 야외 접종용 균사로서의 배양 가능성을 타진하고 또한 송이균의 배양환경조건에 따른 성장특성을 구명하고자 하였다.

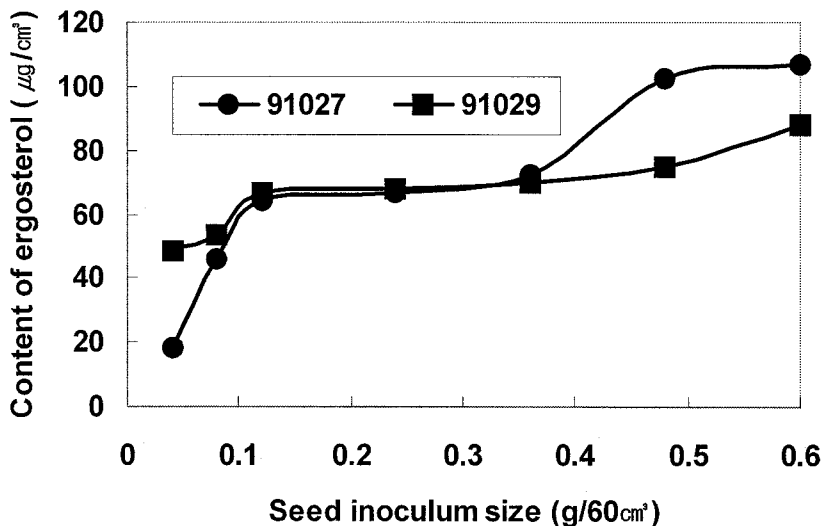
#### 1) 고체매질에서의 송이 균사 배양조건 및 고체매질 조성

송이 균사체를 고체매질에서 배양하기 위한 적합한 복합영양분을 곡물류를 대상으로 예비 실험을 한 결과 보리에서 생장이 우수하였고, 이어서 황옥 수수 가루가 양호하였으나 현미, 밀가루 등에서는 생장이 불량하였다. 본 실험에서는 생장이 우수하였던 보리를 송이 균사배양의 영양분으로 사용하였다. 고체매질에 보릿가루의 첨가량이 많을수록 송이균사체의 성장량도 증가하였다 (그림 3-1-17). 본 실험에서는 고체매질의 부피 60cm<sup>3</sup>당 보릿가루 6g을 첨가, 혼합하여 송이 균사체를 배양하였다.



<그림 3-1-17> 고체매질에서의 보릿가루 첨가에 따른 송이 균사 성장 비교.

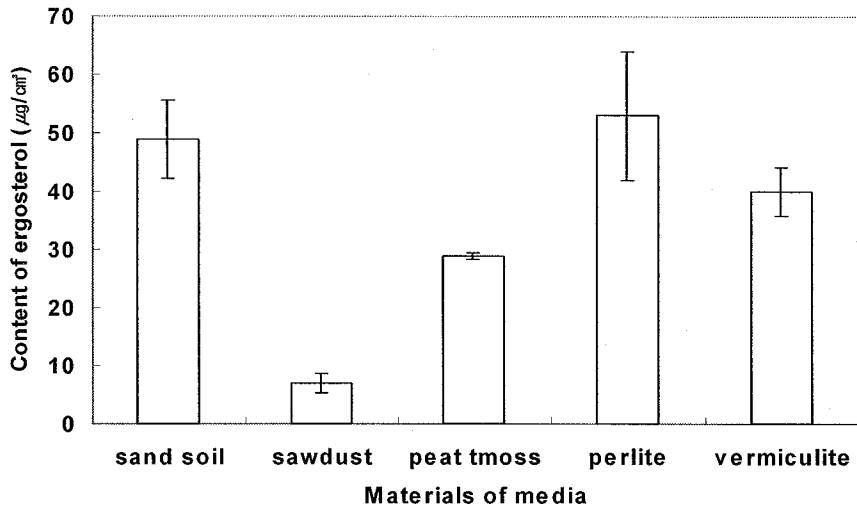
고체매질에 적정한 송이 균사체 접종량을 구명하기 위해 송이 균사체 접종량 별 성장량을 조사 한 결과는 <그림 3-1-18>과 같다. 접종량 0.12g(건중량)부터 완만한 성장 증가를 나타내어 고체매질의 부피 100cm<sup>3</sup>당 송이균사체 0.2g의 접종 비율로 하여 실험을 하였다.



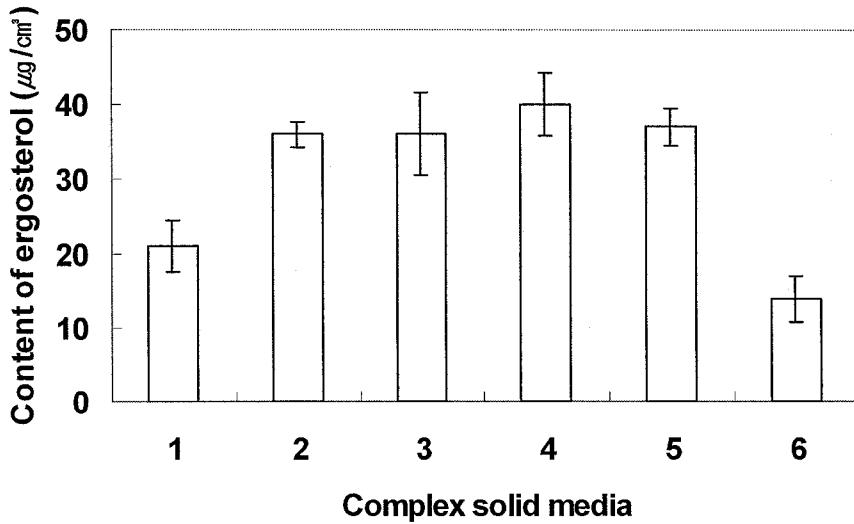
<그림 3-1-18> 고체매질에서의 접종량에 따른 송이 균사 성장 비교.

송이 균사체를 고체 매질 내에서 성장시키기에 적합한 매질의 종류를 구명하기 위해 백마사, 펄라이트(perlite), 질석(vermiculite), 피트모스(peat moss) 및 톱밥을 대상으로 송이 균사체의 성장량을 분석, 비교하였다. <그림 3-1-19>와 같이 단일 재료를 고체매질로 사용하였을 경우 백마사와 펄라이트와 같이 공극이 큰 재질에서 송이균사체 생장이 가장 양호하였고, 질석이 그 다음 순이었으나 톱밥이나 피트모스에서는 생장이 저조하였다. 톱밥이나 피트모스는 송이균사 성장을 억제하는 물질이 포함되어있지 않은가 사료된다.

한편 고체매질의 습도 등의 배양환경을 조절하기 쉽게 하기 위해 상기의 재료를 혼합하여 송이균사 성장량을 비교하였다. <그림 3-1-20>과 같이 톱밥이나 피트모스의 양이 고체 매질의 조성에 적게 함유되면 송이 균사체 성장에는 큰 영향이 없는 것으로 나타났다.



<그림 3-1-19> 고체매질의 조성에 따른 송이 균사 성장 비교.



<그림 3-1-20> 고체매질의 종류에 따른 송이 균사 성장 비교.

1: sand soil: vermiculite: perlite: peat moss: sawdust = 1: 1: 1: 1: 1,

2: sand soil: vermiculite: perlite: peat moss=1: 1: 1: 1,

3: sand soil: vermiculite: perlite = 1: 1: 1,

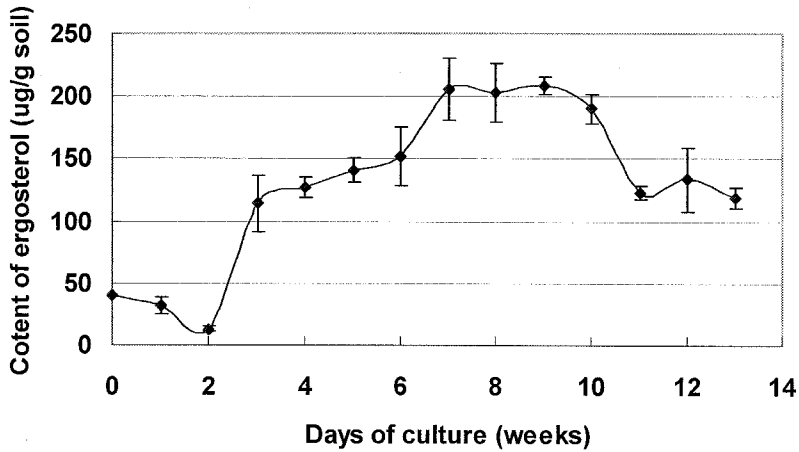
4: sand soil: perlite: peat moss : sawdust = 1: 1: 1: 1,

5: sand soil: peat moss: sawdust = 1: 1: 1,

6: sand soil: sawdust = 1: 1.

2) 고체매질에서의 송이균사 성장 특성

마사토: 펄라이트: 질석: 톱밥 = 1: 1: 1: 1(v/v/v/v)로 조성된 고체 매질에 영양분으로 보릿가루를 첨가하여 배양일자별로 송이 균사체를 배양하여 성장유형을 조사하였다. 송이 균사 접종 후 2주간은 오히려 생장이 감소하였으나 2주 이후부터 급격히 생장이 진행되어 배양 7~8주경에 생육 정체기에 이르고 배양 10주 이후부터 생육 감퇴기에 이르는 것으로 나타났다(그림 3-1-21).



<그림 3-1-21> 고체매질에서의 송이 균사 성장에 따른 ergosterol 함량 변화.

접종 후 2주 사이에 에르고스테롤 함량이 감소하였는데 이는 액체배지의 송이균사가 고체 배지로 옮겨와 적응하는 시기로 송이균사의 활력이 저하되기 때문으로 추정된다. 이상의 성장 유형 분석으로 송이균사는 보릿가루를 영양분으로 한 고체매질에서 통상 8주 배양하면 생육 정체기에 이르는 것으로 나타났다.

한편, 산지 송이 균환 토양의 에르고스테롤 함량은  $15.5\mu\text{g/g}$ (건중량 비교)이었으나 고체매질의 에르고스테롤 함량은  $206\mu\text{g/g}$ (건중량 비교)으로 높게 나타났다(표 3-1-3).

<표 3-1-3> 송이 균환과 고체매질에서 배양된 송이 균사의 ergosterol 함량 비교

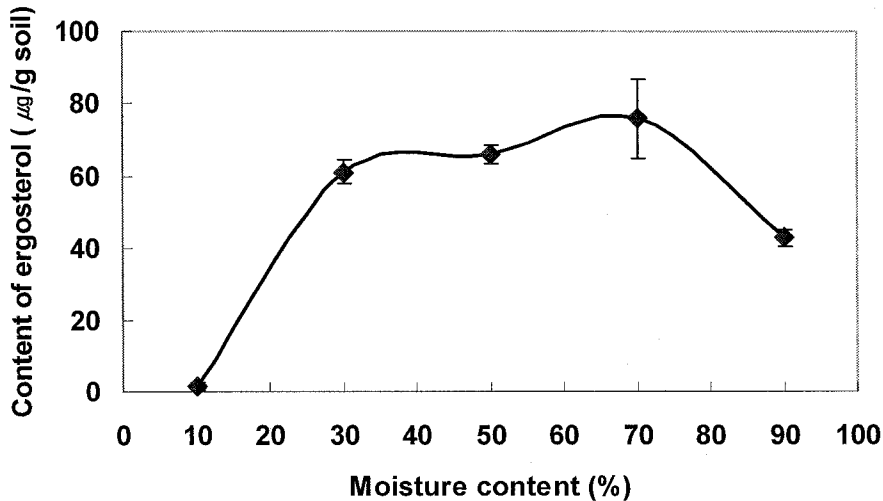
	송이 균환 토양	고체매질의 송이 균사	액체배지 송이 균사
Ergosterol ( $\mu\text{g/g d.w}$ )	$15.5\pm 5.1^4)$	$206\pm 21$	$8517\pm 1084$



구 등(2003)은 송이 균환 선단 토양에서 에르고스테롤 함량이  $4.9\mu\text{g/g}$ (생중량 비교)으로 가장 높았다고 보고한 바 있는데, 송이 균환부 토양의 수분함량이 30% 내외임을 감안하면 본 연구의 결과가 훨씬 높은 값을 나타내었다. 한편 고체매질의 가비중은 0.66으로 낮았으나 균환 토양의 가비중은 1 내외로(유 등, 1980; 허 등, 2004) 고체매질보다는 크다. 따라서 단위 용적으로 환산하였을 경우 산지의 송이 균환 토양보다 고체매질의 송이 균사체량이 8.7배 높은 것으로 계산될 수 있었다.

### 3) 수분 함량이 송이균사 성장에 미치는 영향

고체 매질 내에서 수분 함량에 따른 송이균사체의 성장량을 조사하였다. <그림 3-1-22>와 같이 매질 내의 수분 함량이 30% 이상에서는 유사한 성장량을 보였으며 70%에서 최대의 성장량을 보이는 경향이었으나 70%보다 높은 상태에서는 감소하는 경향을 보였다.



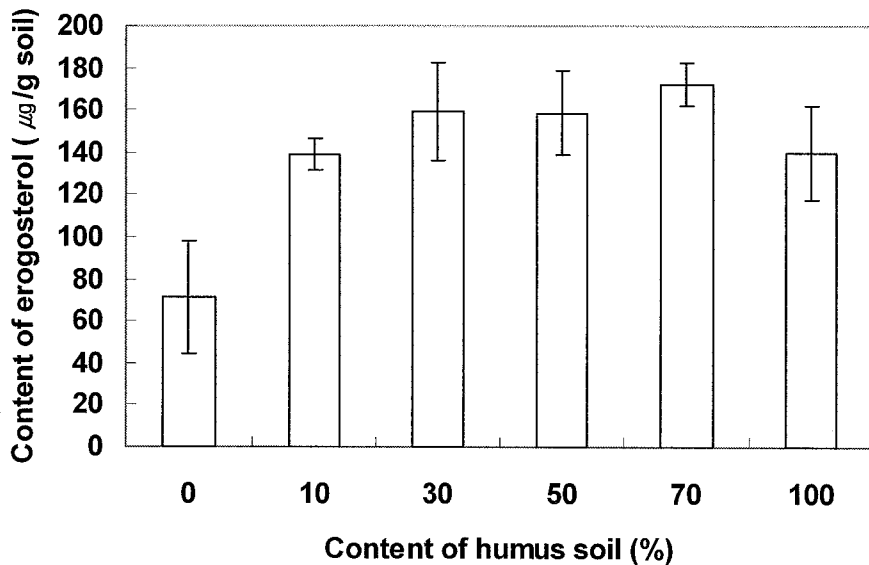
<그림 3-1-22> 수분함량이 송이 균사 성장에 미치는 영향.

본 실험에서는 접종초기의 수분함량으로  $24^{\circ}\text{C}$ 의 조건에서 더 이상 수분을 공급하지 않는 상태로 2개월간 배양하였기 때문에 실지 송이 산지의 토양수분 조건과는 직접적으로 비교할 수가 없으나 토양수분이 30% 전후에서 균사체 생장이 좋았고 과도한 수분 공급에서는 생장이 저하 되었으며, 10% 이하에서는 균사가

생장하지 않는 것으로 나타나 송이버섯의 생산량을 높이기 위해서는 적절한 토양수분이 공급되어야 한다는 것을 제시할 수 있었다.

#### 4) 부엽토가 송이 균사 성장에 미치는 영향

송이 균사가 토양 내의 유기물을 생장에 이용하고 있는지를 알기 위하여 송이 균사 배양용 고체매질 내에 부엽토를 함량별로 처리하여 송이 균사 성장량을 조사하였다(그림 3-1-23). 부엽토 함량이 30%까지는 증가할수록 송이 균사 성장량이 증가하였고, 30%에서 70% 처리까지는 유사하게 성장하였으나 70% 이상부터는 오히려 감소하는 경향이였다.

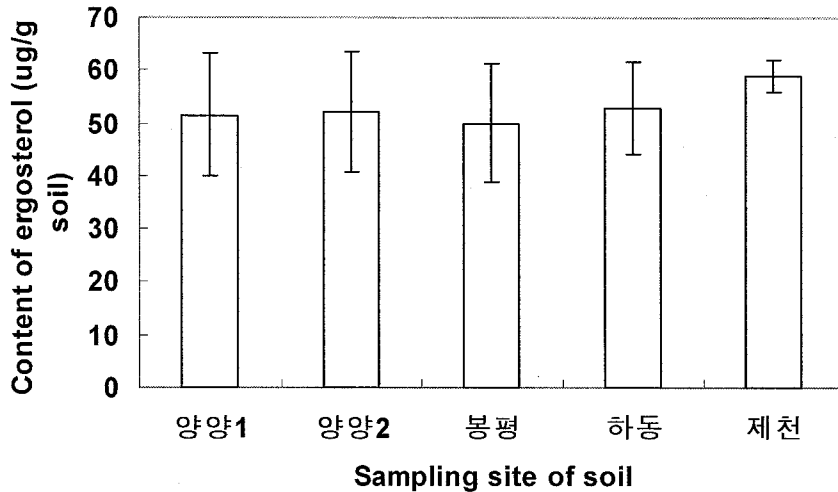


<그림 3-1-23> 부식함량이 송이 균사 성장에 미치는 영향.

송이 균사는 부엽토 처리에서 무처리보다 전반적으로 높았기 때문에 부엽토는 송이 균사 성장에 도움을 주고 있는 것으로 사료된다. 즉, 송이는 균근성 버섯이므로 유기물 분해 능력이 거의 없으므로(小川, 1991) 부식이 전혀 없는 토양을 좋아한다는 기존의 개념과 달리, 토양수분 보존 등의 효과를 나타내는 부식이 다소 있는 토양에서 잘 자랄 수 있음을 시사한다. 한편, 부엽토 처리와 달리 피트모스나 톱밥 단독 처리에서는 송이 균사의 생장이 저조하였다.

#### 5) 고체 매질 내의 토양 영향

송이균사 인공배양을 위해 고체매질을 송이가 생산되고 있는 산지의 토양을 사용하여 배양하였다. 고체 매질은 산지의 토양만으로 하고 주된 영양성분으로 보리를 사용하였다. 대부분 토양이 화강암을 모재로 한 마사토인 관계로 토양 산지별 송이 균사체 성장량 간에는 차이가 없는 것으로 나타났다.



<그림 3-1-23> 고체매질에 사용한 토양의 산지별 균사 성장 비교.

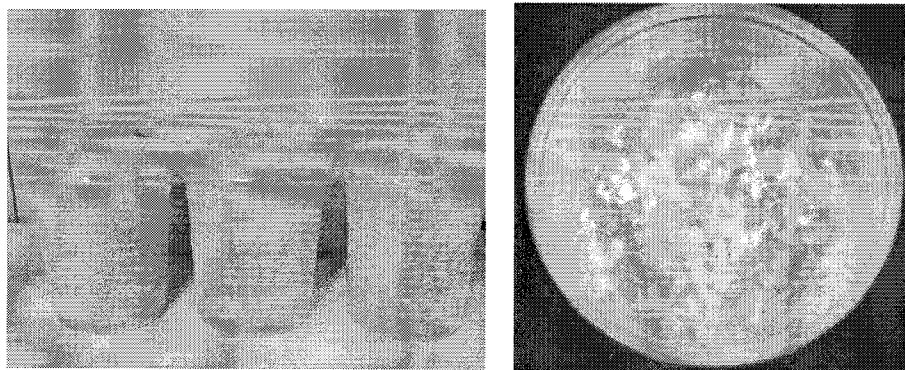
#### 4. 결론

송이 균사의 액체대량배양 및 고체매질에서의 배양조건을 찾고자 연구를 수행하였다. 생물반응기에서 송이 균사를 배양하기 위한 초기 seed 접종량은 균사 건중으로 0.14g/l 이상 처리하는 것이 바람직한 것으로 판단되었으며, 초기 접종량의 농도가 높을수록 성장속도가 빨라 수확시기를 단축시킬 수 있었다.

송이 균사 배양을 위한 배지조성은 탄소원으로서 starch의 적정 농도가 20g/l 일때 생산 효율이 가장 높은 것으로 나타났으며, 균사 접종 후 초기 성장기간을 단축시키기 위하여 소량의 glucose을 첨가하여 주는 것이 좋은 것으로 판단되었다. 질소원으로서 yeast extract의 적정 농도는 3g/l 가 가장 효율적이었으나 peptone 또는 soytone의 병행처리가 더욱 좋은 것으로 나타났다. 인산의 첨가는 무처리에 비해 소량의 균사생산량의 증가를 보여주었으며 배지의 pH를 조절하는 효과가 있었다.

공기부양식 생물반응기 내에서의 균사 생장은 배양 5일 후부터 성장하기 시작하여 배양 20일 전후로 부피생장이 완료되었다. 삼각플라스틱 배양에서는 생육 정체가 30일이 소요되어 10일 전후의 배양기간을 단축할 수 있었다. 반응기 형태별 송이 균사체의 생산량은 풍선형 생물반응기에서 평균 12 g, external-loop 형의 기포통기식 생물반응기에서 평균 11.4 g, 칼럼형 생물반응기는 평균 9.5 g을 생산하여, 풍선형 생물반응기가 가장 우수하였다. 성장기간도 풍선형 생물반응기에서 균사 접종 후 16일 이후부터 정체에 이르는 것으로 20일 이후에 나타난 칼럼형 및 기포 통기형 생물반응기 보다 빠르게 성장하는 것으로 나타났다.

고체매질을 이용한 송이균사체 배양은 영양원으로 보릿가루가 좋았으며, 보릿가루의 농도가 증가할수록 균사체 생산량도 증가하였다. 고체매질은 마사토나 펠라이트가 우수한 것으로 나타났고, 소나무 톱밥이나 피트모스에서는 생장이 가장 저조한 것으로 나타났다. 고체매질에서 송이균은 접종 7~8주면 생육정체에 이르는 비교적 빠른 균사생장을 보였다. 이와 같이 보릿가루를 영양원으로 하고 백마사나 펠라이트를 고체매질로 이용한 송이 균 배양방법은 접종원 연구나 송이 배양환경 등에 대한 영향을 평가하는 재료로도 응용될 수 있었다. 고체매질에서 송이균의 성장을 위한 적합한 수분함량은 30~70%로 나타났으며, 또한 고체매질에 부엽토를 첨가(10% 이상)해 주는 것이 송이 균 성장에 도움을 주는 것으로 나타났다.



<그림 3-1-25> 고체매질에서 배양된 송이 균사체의 모습.

## 제2절 임내 송이증산 환경조절과 송이 자실체발생 촉진기술 개발

### 1. 서론

송이에 대한 많은 연구가 있어 왔지만, 궁극적으로 송이 연구를 통하여 우리가 얻고자 하는 것은 송이 균환이 아니라 송이 자실체이다. 따라서 송이가 존재하는가도 중요한 것이지만 실질적으로 송이 자실체가 많이 생산될 수 있도록 하는 것이 매우 중요하다.

본 절에서는 송이가 많이 생산될 수 있도록 송이산의 환경을 조절하는 방법에 대하여 연구한 결과를 서술한다. 특히, 이제까지의 송이와 관련된 많은 연구가 생물학적인 관점이나 생태학적인 관점에서 이루어져 왔으므로 기존의 연구결과를 토대로 송이가 균(菌)의 모습으로 존재하고 있는 곳에서 송이를 더 많이 생산할 수 있도록 제어하는 기술을 개발하고자 노력하였다.

본 절의 연구내용은 협동연구팀으로 참여한 전남대학교에서 주관한 내용이지만, 4년차의 연구까지 추진을 하면서 수행한 결과를 정리한 것이다. 기획과제의 성격상 농림기술관리센터의 중재에 따라 전남대학교가 본 연구분야를 담당하였으나 4년차까지의 연구 이후에 연구 종료시점까지 추가로 얻을 수 있는 연구성과가 없는 것으로 판단되어 5년차 이후부터는 연구를 추진할 수 없게 되어 본 연구부분은 완성을 이루지 못한 채 마무리되었음을 밝힌다.

### 2. 접근방법

#### 가. 임내 송이증산 환경조절 인공지능 제어기술 확립

박 등(1995)의 연구에서 이미 송이의 자실체 형성에 가장 큰 영향을 미치는 인자는 온도와 습도임이 밝혀진 바 있으므로 이들을 조절하는 방식을 개발한다면 송이 자실체의 생산을 제어할 수 있을 것이다. 이를 위하여 먼저 본 연구에서는 생장환경 조절실에서 주요 기상인자를 제어하는 시스템을 구축하였다. 송이 서식지 현장에서 측정된 기후자료를 토대로 송이 생산량이 많은 시기의 기상을 그대로 재현할 수 있는 인공지능제어 알고리즘을 개발하였다. 생장환경 조절실을 제어하는데 필요한 냉각기, 가열기, 가습기, 물분무기 등을 설치하여 1차적으로 개발한 프로그램이 현장 상황을 재현하는지를 프로그램을 바꾸어가면서 시험하였다. 이러한 절차를 단계별로 설명하면 다음과 같다.

1) 기후특성이 균사 성장, 자실체 생성 및 증산환경에 미치는 영향 조사  
현장조사는 양양지역을 대상으로 실시하였으며, 1989년부터 1995년까지의 양양지역 기상자료를 그 해의 송이 출하량과 비교 검토하였다. 이후 현장에서 임내에 온도, 습도, 조도가 송이 성장과 자실체 발생에 미치는 영향을 현지에 설치한 환경측정기로부터 나온 자료와 자실체 발생 개체수를 연관시켜 해석하였다.

### 2) 토양매질 상의 균사 성장모형 제작 및 시뮬레이션 실시

아울러, 실내에서는 송이 서식지 토양과 유사한 몇 가지 토양재료를 성장환경 조절실의 선반에 놓고 수분함량과 습도, 그리고 온도를 조절하면서 서식지에서 잘 자란 균들이 어떻게 성장하는지를 관찰하고, 소나무 이외의 다른 식물이 자라는 모습도 관찰하였다.

### 3) 유기물, 미생물상 및 임내환경 정밀 계측

송이 생산지인 강원도 양양군 현남면 명지리 소재 송이 시험지에 반경 20m 이내에 6개 지점을 온도, 습도, 조도가 지상 1.2m와 지상 20cm에서 변화하는 모습을 매 30분 간격으로 측정된 기상 데이터를 현지 기상대에서 관측한 자료와 비교 검토하면서 그곳에 존재하는 미생물상의 변화를 Biolog system으로 검사하였다.

## 나. 송이 자실체 발생 촉진 환경 탐색 및 인공 환경 조성

기존 연구결과를 통하여 본 연구진이 보유하고 있는 항균 무기물을 산지에 직접 뿌려 주면서 송이산의 변화를 조사하였다. 항균 무기물은 염화 제2철( $\text{FeCl}_2$ )에 Mg, Mn과 Zn 등 미량성분이 섞여있는 것으로서 고온에서 소성하고 분쇄하여 코디어라이트 구조 세라믹 분말로 제조되었고 이 무기물을 질산은 용액에 침적하여 은으로 코팅하였다. 이렇게 만든 항균 무기물을 송이 산지에 직접 도포하고 병해충 방제와 송이 균사체 성장 및 송이 자실체 개체수 발생에 미치는 영향을 조사하였다.

아울러, 미생물 혼합체를 자극제로 사용하여 송이가 증산될 수 있도록 하는 방법을 시도하였다. 송이 균환부에 존재하는 것으로 알려진 몇 가지 미생물을 송이 분쇄물과 같이 혼합하여 실내의 성장환경 조절실에서 인위적으로 조정된 환경에서 성장시키면서 변화를 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 실내 송이증산 환경조절 인공지능 제어기술 확립

##### 1) 인공지능제어 알고리즘과 제어 결과

일반적으로 성장환경 조절실은 산소 농도와 온도를 일정한 수준으로 유지하거나 변화시킨다고 해도 아주 서서히 변하는 경우에 이용된다. 여기서 우리가 시도하고자 하는 바는 송이 산지 현장의 기후를 그대로 실험실에서 묘사하는 것이므로 특수한 방법 즉 인공지능 제어기법을 이용하자는 것이다. 인공지능은 사람이 생각하는 것과 같이 전자계측기와 조절기가 판단하여 조절하는 것인데 신경회로망 기법은 컴퓨터 메모리나 처리 속도가 대단히 커야 하므로 여기서는 자기학습방식을 이용하였다.

자기학습 방식은 쉽게 표현하면 “해 보고 안 되면 다시 방법을 달리하여 해 보는 방식”이다. 예를 들어 가습기를 10분 돌리고 5분 후에 실내 습도를 측정해보면 습도가 40%이던 것이 55%로 올라갔다면 60%를 유지하려면 다시 10분 돌리는 것이다. 이렇게 해 보고 안 되면 또 해 보는 방식이 자기학습방식이다. 이 방식은 실험실 내 공간 한 모퉁이에 설치된 인공 성장환경 조절실이 다른 실외에 설치되었다 하더라도 걱정할 것이 없는 방식이다.

성장환경 조절실에 적용되는 인공지능 판단 알고리즘은 다음과 같다. 우선 시험실 외기 온도와 시험실 현재 온도를 시험실 목표온도 즉 설정 값과 비교하여 모의 시험실 초기 운전 형태(Initial operation mode)를 결정한다. 아무리 보운 차단이 잘된 시험실이라 할지라도 완전히 열이 차단될 수는 없으므로 밖으로부터 열이 들어올 경우와 밖으로 빠져나갈 경우를 판단한다. 이 경우 시험실 내에 무엇이 있느냐에 따라 달라질 수 있는데, 농수산물만은 재배 중에 거의가 열을 내므로 밖에 온도가 시험실 설정 온도보다 상당히 낮은 경우가 아니라면 시험실 내부 온도는 올라가는 경향을 보일 것이다. 이 경우에는 냉각기를 돌릴 필요가 있는 경우이다. 그 반대로 시험실 온도가 내려가는 경우라면 가열기를 돌려야 되는 경우가 된다. 그러므로 초기 운전형태 판단 단계에서는 일정 기간동안 시험실 내 온도 변화 추이를 판단하는 단계이다. 이 온도 변화 추이는 현재 시험실에 설치된 냉각기 냉각 능력이나 가열기 가열 능력이 조절하기에 충분한지를 판단하는 근거가 된다. 예를 들어 시험실 내부 용량이 100m<sup>3</sup>이라면 10평짜리 시험실에 비유되며 이때 온도를 내려 시험실 내부 온도를 식혀야 할 경우라면 냉각기가 먼

저 작동된다. 냉각기가 작동되어도 온도가 내려가지 않는다면 냉각능력이 부족한 경우이고, 그 반대로 가열기가 작동되어도 온도가 올라가지 않으면 가열기 능력이 떨어진 경우에 속한다.

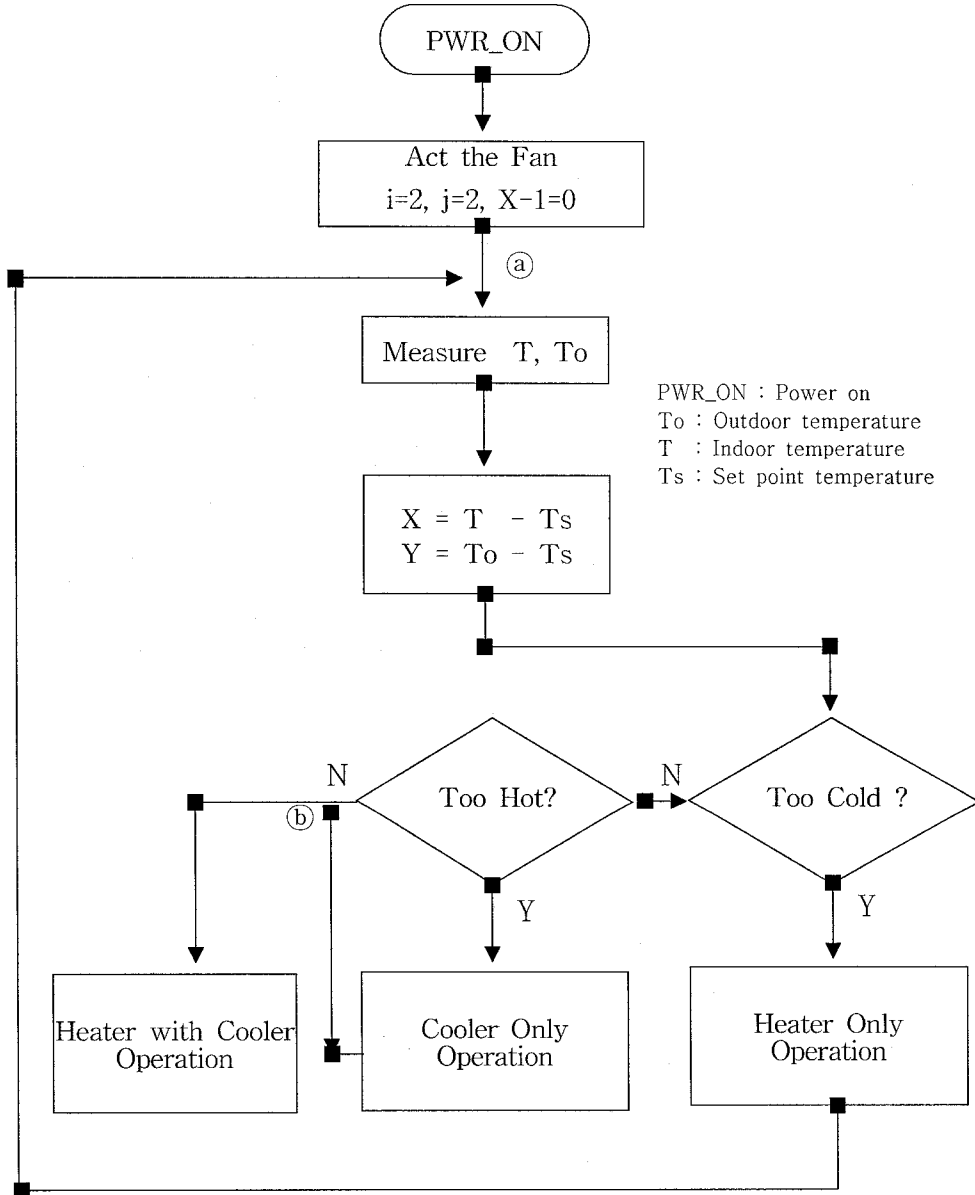
두 번째 단계는 냉각기나 가열기를 계속 작동시켜야 할지를 결정하는 단계이다. 그런데 냉각기에 딸린 압축기는 그 속에 있는 증발기 측과 이루는 냉매 압력차가 거의 같아지는데 소요되는 시간이 경과된 다음에 다시 운전되어야 무리 없이 운전할 수 있다. 냉각기를 ‘작동-중지-작동’ 반복에 필요한 충분한 중지 시간이 필요하다. 시험실 온도 조절 허용 범위 내에서 이 운전이 가능하다고 판단되면 이 방식으로 작동한다. 압축기를 켜다 끄는 사이에 온도가 조절 범위를 넘어 올라간다면 이제는 냉각기는 항상 작동되면서 나머지 넘치는 냉각 능력은 가열기가 보상하게 한다. 이 두 번째 단계는 가열기가 주역인 경우에도 적용된다. 그러나 가열기는 아무리 자주 켜고 꺼도 별 손상이 없으므로 이 경우에는 냉각기 운전시간에 대하여 고려하면 된다. 물론 냉각기 운전 및 휴지 시간이 불충분한 경우에는 냉각기가 주역인 경우에 해당된다.

마지막 단계는 냉각기가 계속 작동되는 경우만 해결하는 단계이다. 이 경우에는 가열기에 전류를 보내는 시간을 조절하는 전력 공급시간 간격 조절 방식(Pulse with modulation, 이하 PWM이라 칭함)을 사용하여 온도를 허용된 범위 내로 조절하게 된다. 이때 이용된 방식이 경험학습 제어방식이다. 이 방식은 목표 온도와 현재 온도차를 먼저 계산한다. 예를 들어 현재 온도가 목표 온도보다 5°C가 높다고 하면 이제까지 운전하던 PWM 형태에서 일정 비율로 그 공급되는 시간 폭 즉 width를 줄여 가열기 전원 공급량을 줄여 본다. 그렇게 줄여서 나타난 결과를 토대로 그 다음에 폭을 더 줄여야 할 지를 결정한다. 예를 들어 5°C가 높았던 온도가 그 폭을 이전에 진행했던 값의 3분의 1로 줄였더니 목표 온도에 거의 다다르고 있다면 그 폭은 더 길어져야 한다. 아니면 너무 냉각될 우려가 있기 때문이다. 반대로 3분의 1로 줄인 폭으로 온도가 목표 값에서 떨어져 있다면 - 예를 들어 5°C 높았던 온도가 0.5°C 밖에 내려오지 않았다면 - 가열기는 가동 간격을 더 줄여야 한다.

만일 냉각기가 꺼졌는데도 온도가 계속 목표 값 아래로 내려간다면 밖에서 빼앗아 가는 열이 더 많다는 의미로 밖에 온도가 아주 낮아져 있음을 의미한다. 그럴 때에는 맨 처음 알고리즘으로 돌아간다. 이 경우에는 첫 번째 단계에서 가열기를 작동할지 냉각기만 작동할지의 경우 중에서 냉각기만 ‘꺼다-켜다’ 하는



경우이거나 가열기만을 작동시키는 경우에 해당된다. 이러한 과정은 외기온도가 급변하는 경우가 아니라면 드물게 일어나는 현상이 될 것이다.



<그림 3-2-1> 자기학습 조절계에 따른 저장실의 온도 조절을 위한 알고리즘

이제까지 설명한 이론적 개념을 구체화하여 <그림 3-2-1>에 도식화한 제어 알고리즘을 나타내었다. 처음 Power On에서는 실험실 경험학습 제어기에 전원

을 공급하는 단계이다. 두 번째 단계는 외기온도와 실내온도를 측정하여 운전 형식을 결정하는 단계이다. 실내 온도가 목표 온도보다 충분히 낮으면 가열기만 운전한다. 만일 실내 온도가 너무 높으면 냉각기만 운전한다. 적당히 높으면 냉각기와 가열기를 동시에 운전하되 이 경우에는 가열기를 주로 작동 또는 정지시킨다. 이 모든 작동과정은 30분을 주기로 반복된다. 여기서 30분이라는 주기를 설정한 것은 앞에서 측정한 송이 산지의 기후자료가 약 30분 간격으로 측정되어 임의로 정한 것이며, 이 순환 주기도 차후에 시험하는 송이산지 기후 모사 시험에서는 경험학습법이 도입되어 스스로 판단하여 그 주기를 결정할 수 있도록 하였다. 다음에서는 각각의 운전 형태에 해당하는 보기를 실례를 들어 설명한다.

i) 가열기만 가동되어야 할 경우

예를 들어 목표온도( $T_s$ )가 섭씨로 영상 4.0도인데 실내 온도( $T$ )가 영하 1.2도이고 외기 온도( $T_o$ )가 영하 5.1도라고 하자. 그렇다면,

$$Y = T_o - T_s$$

로부터 외기 온도는 목표온도보다 9.1도나 낮고

$$Y = -9.1$$

실내온도는 목표온도보다 5.2도나 낮은 상태임을 알게 된다.

$$X = T - T_s = -1.2 - 4.0$$

$$X = -5.2$$

$X$ 값이  $Y$ 값보다 크고  $Y$ 가 -5보다 작으므로(이 경우 가열기는 계속 켜져 있어도 실내 공기를 30분 동안에 5도 이상을 가열시킬 수 없는 경우임) 외기 온도가 충분히 낮고 실내온도도 목표온도보다 너무 낮은 경우이므로 이 경우에는 가열기만 가동하는 형태로 운전할 것을 결정한다. 이 결정은 판단문 “Too cold?”에서 판단한다. 물론 가열기 성능은 미리 시험되어 있는 상태에서 이 5도라는 한계가 결정된다. 그와는 반대로  $Y$ 가  $X$ 보다 크다면-예를 들어  $X = -5$ 이고  $Y = -2$ 라면 -외기 온도가 충분히 낮지 않으므로 그 이전 단계에서 냉각기만 운전했는데 과도하게 냉각된 상태일 것이나 냉각기와 함께 가열기가 동시에 가동되는 세 번째 단계일 것이다.

ii) 냉각기만 가동되어야 할 경우

만일  $Y = 10.3$ 이고  $X = 5.2$ 라 하자.  $Y$ 가  $X$ 보다 크고  $X$ 가 양수인 이 경우는 실내가 5도 이상 높으므로 냉각기만 운전한다. 이 경우도 위 단계에서와 마찬가지로

냉각기 성능은 미리 시험하여 5도라는 한계가 결정된 것으로 한다. 다시 말하면 냉각기는 30분간 계속 가동되어도 5도 이상은 실내 온도를 냉각시키지 못하는 단계를 말한다. 이 단계가 판단문 “Too hot?” 단계이다. 이 단계에서 냉각기만 운전될 때에는 냉각기 속에 있는 압축기 전 후 냉매 압력차이가 평형에 가까워 지는데 소요되는 시간이 10분간이라 하면 어떤 형태로 운전되어야 할지를 판단해야 한다. 예로 든 이 경우에도 실내 온도가 목표온도보다 10도 이상 높으면 30분 동안 계속 압축기를 가동한 후 가동을 유지한 채 맨 처음 과정으로 돌아가 다시 판단한다. 30분간 냉각기가 가동된 상태에서도 10도 이상 실내온도가 높으면 다음 30분간도 계속 가동될 것이다. 만일 실내 온도가 목표 값보다 5도 이상 10도 이하로 높으면 20분간 가동 후 10분간 정지한다. 이렇게 운전되면 처음에는 10도 이상 높았던 실내 온도가 어느 순간에는 목표 값을 5도 이내로 근접하게 될 것이다. 그러면 이제는 가열기가 동시에 작동되는 제3 단계에 이른다.

iii) 냉각기 계속 가동과 함께 가열기로 조절 할 경우

만일 1 단계에서와는 반대인 경우 즉, X값이 0도 보다는 낮으면서 Y값보다 작을 경우에는 외기 온도가 목표 값보다 낮지만 냉각기 없이도 실내 온도가 목표 값을 충분히 유지할 지가 의문인 경우이다. 즉 너무 춥지도 너무 덥지도 않은 경우이므로 냉각기는 계속 가동되면서 가열기로 온도를 조절해야 하는 경우에 해당한다. 또한 2 단계에서 냉각기만 작동되다가 온도가 5도 이내로 좁혀져서 가열기가 보조 역할을 하는 경우도 이에 해당한다.

앞에서 체계화한 경험학습 이론을 이용하여 송이 서식지에서 측정된 온도, 습도 및 광도를 모의 시험실에 구현하기 위해서는 시간에 따라 계속 변하는 설정 값을 잘 추적할 수 있는 좀더 복잡한 알고리즘이 필요하다.

설정 값이 시간에 따라 변하므로 제일 먼저 저장된 자료에서 시간과 그 시간에서 온도, 습도 및 광도를 읽어온다. 이 값들은 전부 디지털 값으로 표현되어 있으므로 환산식을 이용하여 실제 온도, 습도 및 광도로 바꾼다. 자료에서 읽어 들인 첫 번째 시간과 현재시간과의 차이(Date, Time, Term)를 계산하고 현재시간에 Date-Time-Term을 더하여 일치하는 시간을 저장된 자료에서 찾고, 이 값을 다음 설정 값으로 한다.

제일 먼저 결정해야 할 사항이 냉각기를 작동할 것인지 아닌지는 판단해야 하는데, 실험실 외부온도가 설정온도보다 낮다면 냉각기를 작동할 필요가 없을

것이나, 실험실이 단열이 잘 되어 있다면 설정온도와 현재온도의 차가 클 경우나 설정온도와 외부온도차가 클 경우에는 냉각기를 작동해야 할 것이다. 냉각기나 가열기를 작동하지 않으면서 외부온도 변화에 따라 변화는 시험실 내부온도의 변화를 측정하여 냉각기작동의 범위를 정하여야 할 것이다. 설정온도가 현재온도보다 높은 경우라면, 냉각기는 작동하지 않을 것이고 가열기만을 이용하여 현재온도를 설정온도에 맞춰갈 것이다. 냉각기의 판단 여부를 결정한 다음에는 가열기의 작동여부를 결정해야 하는데, 여기에 앞에서 검증한 경험학습법을 도입한다.

앞서 검증한 경험학습법에서는 가열기 운전방식을 5단계로 간단하게 구분하였으나 좀더 정확한 온도제어를 위해서 가열기 운전방식을 20가지로 구분하고, 현재온도와 설정온도의 차에 따라 운전방식을 결정하도록 하였다(표 3-2-1). 0 또는 1이라는 숫자는 0일 때는 가열기를 작동하지 않으며, 1일 때는 3초간 가열기를 작동한다는 의미이다. 이렇게 하여 하나의 패턴이 작동되면 1분이 소요되고, 패턴을 바꾸는 주기가 3분이라면 3회를 반복하게 된다. 그러나 현재온도와 설정온도간의 온도차에 따라 결정한 운전방식으로 가열기를 운전했을 때 현재온도를 설정온도에 정확하게 맞출 수 있다면 좋겠지만, 외부온도가 변하거나 다른 외부 요인으로 실내온도가 바뀐다면 각 패턴으로 운전했을 때 처음에 설정한 온도만큼 현재온도가 변하지 않을 것이다. 따라서 초기값으로 운전하였을 때 측정된 온도변화량( $\Delta T$ )으로 초기 값을 대체하고, 다음에 운전할 때는 그 값으로 운전하며 또 다시 오차가 생긴다면 그 오차만큼 온도변화량을 바꿔서 기록하고 계속하여 최적 값을 찾아갈 수 있도록 하여야 한다. 그러나 가열기나 냉각기의 특성상, 현재 운전 중인 패턴에 따른 온도변화가 바로 나타나는 것이 아니고, 일정 시간동안 지연된 다음에 나타나기 때문에 현재 측정된 온도 변화량만을 가지고 패턴을 결정하거나, 임의의 패턴으로 운전했을 때 변화하는 온도를 예상하거나 온도변화량을 결정할 수는 없고 시간지연에 따른 영향, 즉 앞서 시행한 운전방식이 현재온도에 미치는 영향을 고려하여야 한다.

앞서 시행한 운전방식에 따른 영향은, 두 단계 앞의 패턴의 영향까지 고려하면 충분할 것이라 여겨지며, 여기에 냉각기 가동이 온도변화에 미치는 영향, 그리고 외부온도와 내부온도 차이에 의한 영향들을 고려하여 각 패턴으로 운전하였을 때 온도변화량과 다음 패턴을 결정하여야 한다. 앞에서 시행한 운전방식으로 운전했을 때 변화할 예상온도가 구해지면, 이 예상온도만큼 현재온도가 변했을 때 설정온도에 맞추기 위한 다음 패턴을 결정하여야 한다.



위 식의 t0 패턴에 의한 영향에 패턴 0부터 20까지 ΔT 값을 대입하여 그 값이 최소가 되는 패턴을 구하여 다음 운전방식으로 결정한다. 결정된 운전방식으로 가열기를 운전했을 때 온도 변화량이 이전 값과 다르다면 새로운 값으로 온도변화량을 바꿔주어야 한다. 이때에도 오차만큼 온도변화량을 상승시키면 단 한번의 잘 못된 신호에 의해서 온도가 크게 변할 수 있으므로 몇 차례의 경험에 의해서 온도변화량이 서서히 변할 수 있게 해주어야한다. 또한 운전방식에 따른 온도변화는 가열기의 특성이라고 볼 수 있으므로 하나의 운전방식에서 나타나는 영향이 다른 운전방식에서 나타날 것이 확실하므로 아래의 식에서 구해진 패턴의 온도변화량을 모든 패턴에 적용해주어야 한다.

$$\text{패턴1의변화온도} = (\text{현재온도} - \text{예상온도}) / \text{패턴} / 7.0 \quad (3)$$

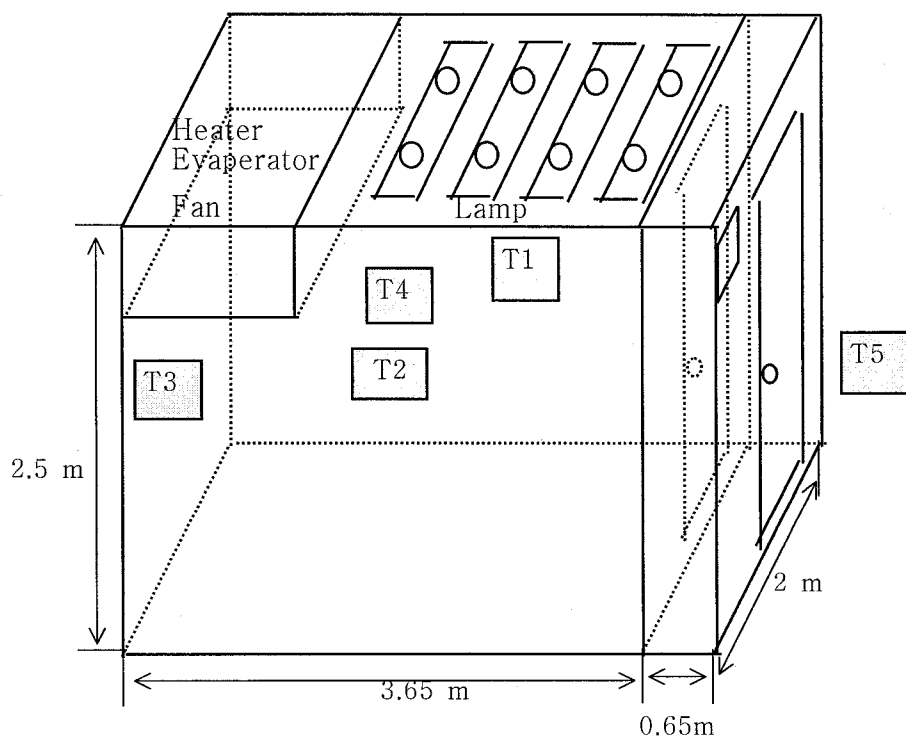
패턴 1로 운전했을 때 온도변화가 구해졌다면 나머지 다른 패턴은 패턴번호에 패턴1의 온도변화량만큼 곱하여 온도변화량을 얻을 수 있다. 이렇게 하여 온도변화량과 패턴을 스스로 변화시키면서 운전을 반복한다면 짧은 시간에 설정온도에 도달 할 수 있을 것이며 작은 오차 범위에서 설정온도를 유지할 수 있을 것이다.

온도변화와는 달리 송이 서식지 습도변화는 계절에 따라 크게 변하기는 하지만, 비가 오는 경우가 아니면 짧은 시간에 크게 변하지 않고 온도처럼 시간지연이 발생하지도 않기 때문에 현재습도가 설정 습도보다 낮다면 가습기를 작동시키고, 높다면 작동하지 않는 단순한 방식으로 조절 할 수 있을 것이다. 광도 또한 밤과 낮으로 나누어 모의 시험실의 전등을 켜고 끌 수 있다면 크게 영향을 미치지 않을 것이다. 다음 측정시간에 도달할 때까지는 설정값이 일정한 온도, 광도 및 습도를 갖게 되므로 패턴을 바꾸어 가면서 온도를 조절하고, 가습기와 전등을 켜고 끄는 이상의 동작을 반복하면 각 설정점에 도달할 수 있을 것이다.

## 2) 모의실험실

<그림 3-2-2>에 본 연구에서 사용한 모의 시험실을 나타내었다. 실험실의 가로, 세로, 높이는 각각 3.65, 2, 2.5m이고 입구는 이중으로 문을 만들어 열고 닫을 때의 열손실을 되도록 적게 하도록 하였다. 냉각기에는 1.5마력 (CRAQ-0150, COPELAND, USA) 압축기를 사용하였고, 가열기는 6kW(3kW×2) 가열 능력을 가진 것을 이용하였으며, 가습기는 물 분무량이 시간당 400cc

(H-656, LG, Korea)인 것을 두 대 사용하였다. 대류방식은 강제대류방식을 채택하였으며 가열기와 냉각기를 작동하기 전에 팬이 작동하도록 하여 팬이 작동하지 않아 자연대류방식으로 열기와 냉기가 퍼지며 가열기의 과열과 냉각장치 증발기의 동결을 막도록 하였다. 팬과 가열기, 그리고 냉각기의 위치는 가열기가 가장 안쪽에 위치하고, 다음이 냉각기 그리고 팬이 가장 바깥에 위치해서 팬이 뒤쪽의 열기와 냉기를 앞쪽으로 끌어당겨 강제대류 시킬 수 있도록 하였다. 가습기는 팬 앞쪽에 위치하여 불어오는 바람을 타고 초음파로 분쇄된 물방울들이 모의 시험실에 퍼지도록 하였다.



<그림 3-2-2> 모형 온도조절실의 체계도

온도 센서는 25℃에서 저항이 10kΩ이고 저항오차가 ±5%인 NTC 계열 (DSC103J3, DSC Electronics Co., Ltd) 써미스터를 사용하였다. 저장실 입구좌측 천장 부위에 센서 1개(T1), 저장실 중앙의 50cm높이에 온도센서 1개(T2)와 저장실 좌측 끝 부위 1.5m높이에 온도센서 1개(T3), 우측 중앙부위 1.5m 높이에 온

도센서 1개(T4) 그리고 저장실 외부에 온도센서 1개(T5) 등 온도센서 5개를 설치하여 온도를 측정하였으며, 습도센서와 광도센서는 중앙부 온도센서 T2와 같은 위치에 설치하였다. 온도조절에서 실내온도는 중앙에 설치된 온도 센서 T2에서 측정한 온도를 현재의 실내온도로 사용하였다. 온도, 습도, 그리고 광도를 조절하는데 핵심이 되는 조절장치는 실험실 외부에 설치하였다.

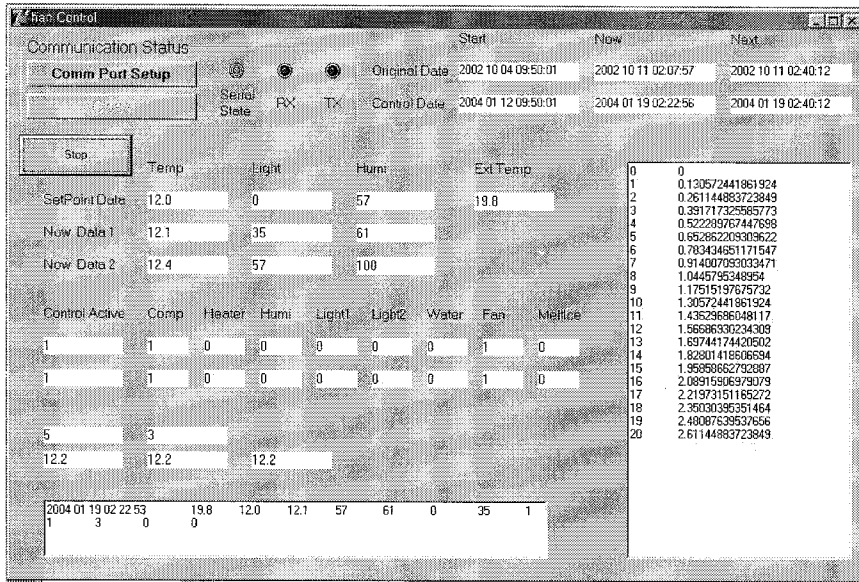
### 3) 온도, 습도 그리고 광도 조절

센서를 통해서 얻어지는 저장실의 온도, 광도 습도변화는 전압 값으로 측정되고 이 전압변화는 12bit A/D 변환기(Microchip, MCP 3202C)를 거치면서 0~4095 범위의 디지털 값으로 바뀌게 된다. 이 디지털 값은 RS-232(Dallas Semiconductor, MAX232CPE)칩을 통하여 컴퓨터로 보내지고, 컴퓨터에서는 Delphi를 이용하여 만든 프로그램에서 이 데이터를 받아 컴퓨터에 저장한다.

경험학습제어 알고리즘의 유용성 여부를 확인하기 위하여 시행한 첫 번째 시험에서는 온도만을 조절하였으므로, 냉각기와 가열기만을 제어하여 원하는 온도로 모의 시험실의 온도를 맞추도록 하였다. 이때는 알고리즘을 최대한 단순화하여 PICBASIC-1S 모듈에 있는 EEPROM에 온도 제어프로그램을 저장하고 PICBASIC -1S 가 가진 21개의 핀 중에서 RS232와 같은 다른 부품을 구동하는데 사용하지 않는 두 개 핀을 골라 각각의 핀에 가열기와 냉각기를 구동하는데 사용하는 SSR(240VAC 50A, SDA1-250Z, Union Elecom 사)의 +단자를 연결하여 여기에 0V와 5V 신호를 보내 가열기와 냉각기에 공급하는 220V 전원을 끊거나 연결하면서 모의시험실 내부온도가 설정온도에 도달하도록 제어하였다.

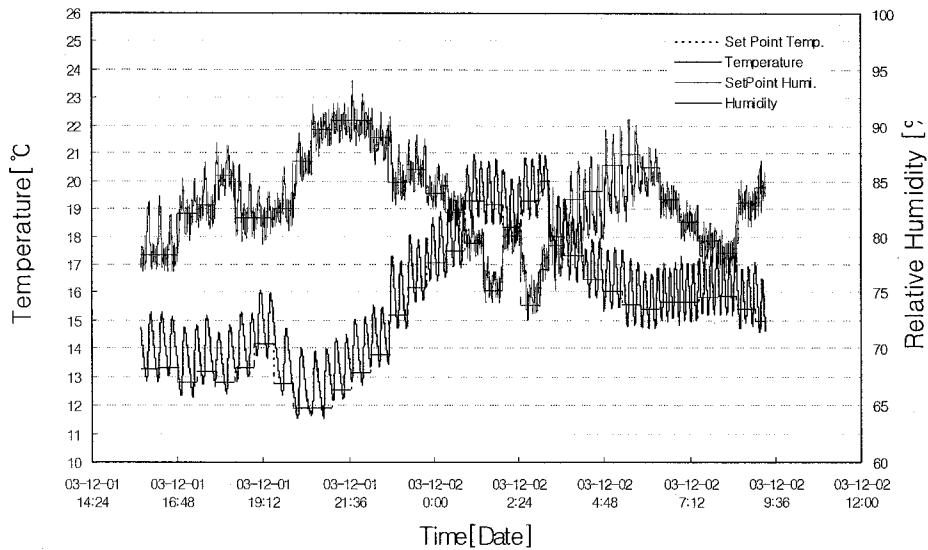
송이산지에서 측정한 기후자료를 모의 시험실에 구현하기 위해서는 온도뿐만 아니라 습도와 광도 또한 제어해야하므로 앞서 실험한 방법보다 더 복잡한 프로그램과 복잡한 장치가 필요하였다. 우선 제어 대상이 온도 하나에서 습도와 광도가 더해져 셋으로 늘었기 때문에 두 개의 SSR을 더하여 SSR 네 개를 사용하였으며, 제어대상이 늘어난 만큼 복잡해진 제어 프로그램을 실행하기 위하여 실수연산이 불가능한 PICBASIC -1S 모듈을 대신해서 시리얼포트로 PICBASIC -1S와 연결된 컴퓨터를 사용하여 계산하고 제어명령을 내렸다. 모든 제어명령은 Delphi로 제작한 프로그램의 명령 창에서 이루어졌으며, 온도, 습도 그리고 광도 변화와 제어명령들 역시 실시간으로 Delphi 프로그램을 통하여 확인하였다(그림 3-2-3 참조).



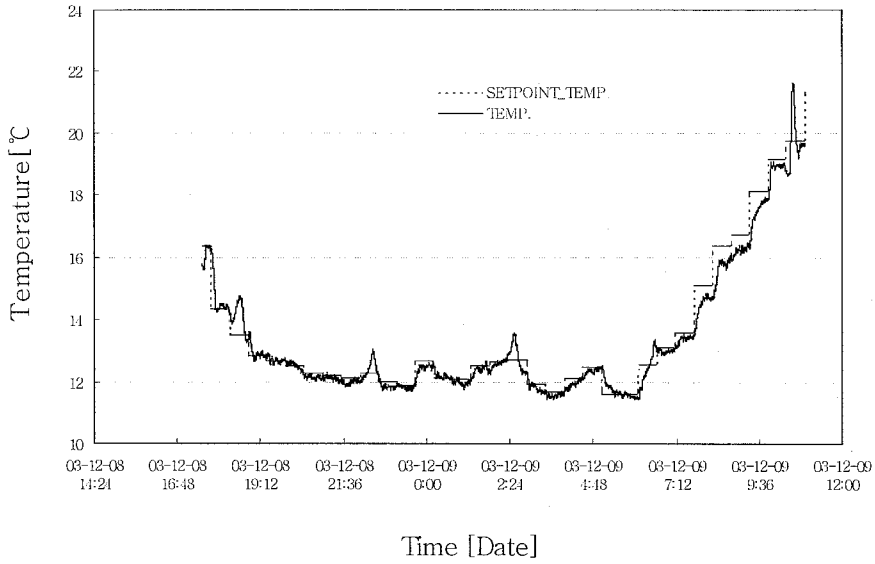


<그림 3-2-3> 냉방조절실의 조절 창

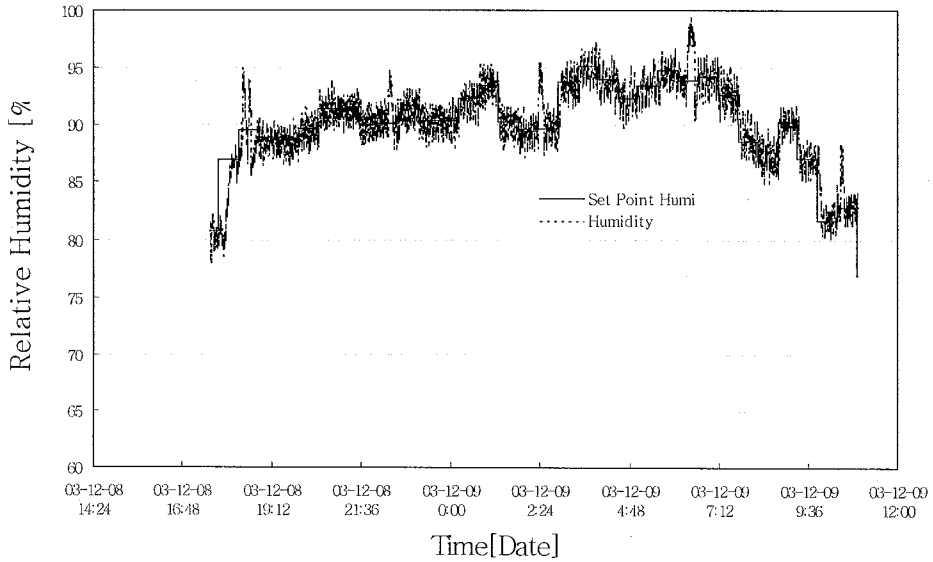
이 알고리즘에서 단순 제어 방식 즉 드림 2에 있는 테이블 rule base로 조절된 인공 성장환경 조절실 내 온도와 습도 변화를 <그림 3-3-4>에 나타내었다



<그림 3-2-4> 단순 자기학습조절 시스템에 의한 온도 및 습도 특성.



<그림 3-2-5> 단순 자기학습조절 시스템에 의한 온도 특성.



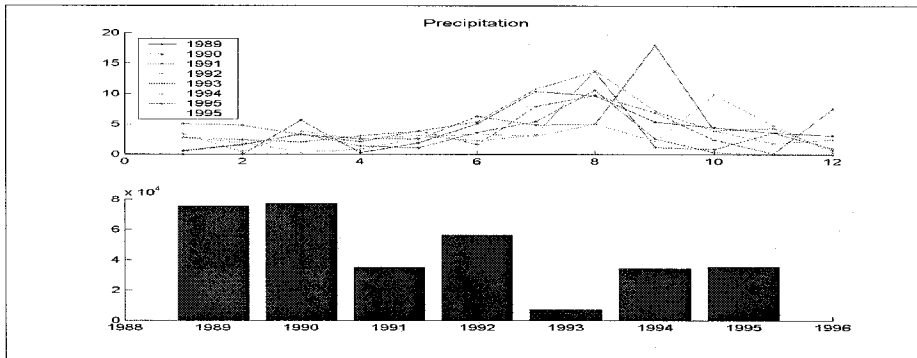
<그림 3-2-6> 송이 생산지의 습도 변화

<그림 3-2-4>에 나타난 온도와 습도 변화는 단순 제어 방식이다. 그러나 <그림 3-2-5>와 <그림 3-2-6>에 나타난 온도 및 습도 조절 결과는 송이 산 현지에서 측정된 2003년 12월 8일에 개발된 계측기로 측정된 기상 데이터 중에서

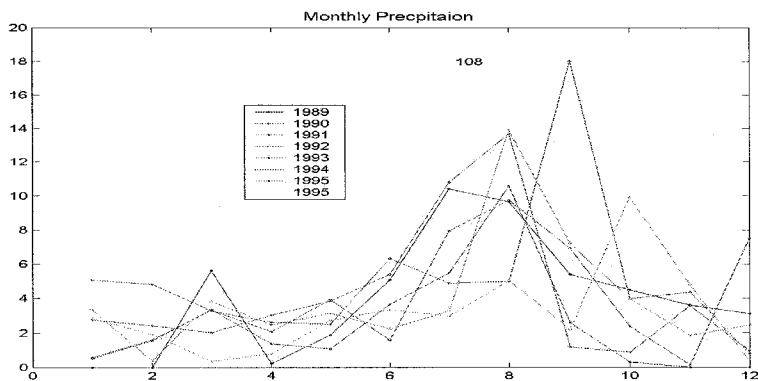
온도와 습도를 조절한 결과 중에서 온도만을 추적한 것을 나타내었다. 이 결과를 보면 성장환경 조절실에서 충분히 송이 산 현장의 기후환경을 재현할 수 있음을 알 수 있다.

4) 기후특성이 균사와 자실체 생성촉진 및 증산환경에 미치는 영향 조사

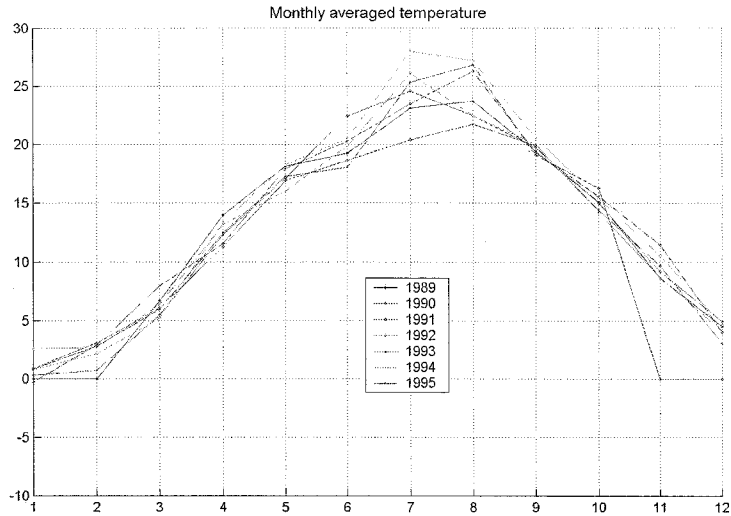
과거 1989년부터 1995년까지의 양양지역 기상 자료를 그해의 송이 출하량과 비교 검토하였다. <그림 3-2-7>에서 윗부분 그림은 1989년부터 1995년 사이에 양양 송이 산 기상청에서 측정된 강수량을 월 평균한 값을 위에 보여주고 아래 막대 그림은 1989년부터 1995년 사이에 그곳에서 출하된 송이의 양을 비교 검토하기 위한 그림이다.



<그림 3-2-7> 강수량과 송이 생산량의 비교.



<그림 3-2-8> 양양군의 평균 강수량.



<그림 3-2-9> 양양군의 평균 기온.

송이가 많이 나온 1989년과 1990년에는 전반적으로 1년 내내 다른 해보다는 장수량이 많았던 것으로 보인다. 1991년에는 전반적으로 장수량이 적었다(그림 3-2-8). 한편 월평균온도 그래프를 보면, 그 기간동안 월 평균 온도차는 크게 차이가 나지 않는다(그림 3-2-9).

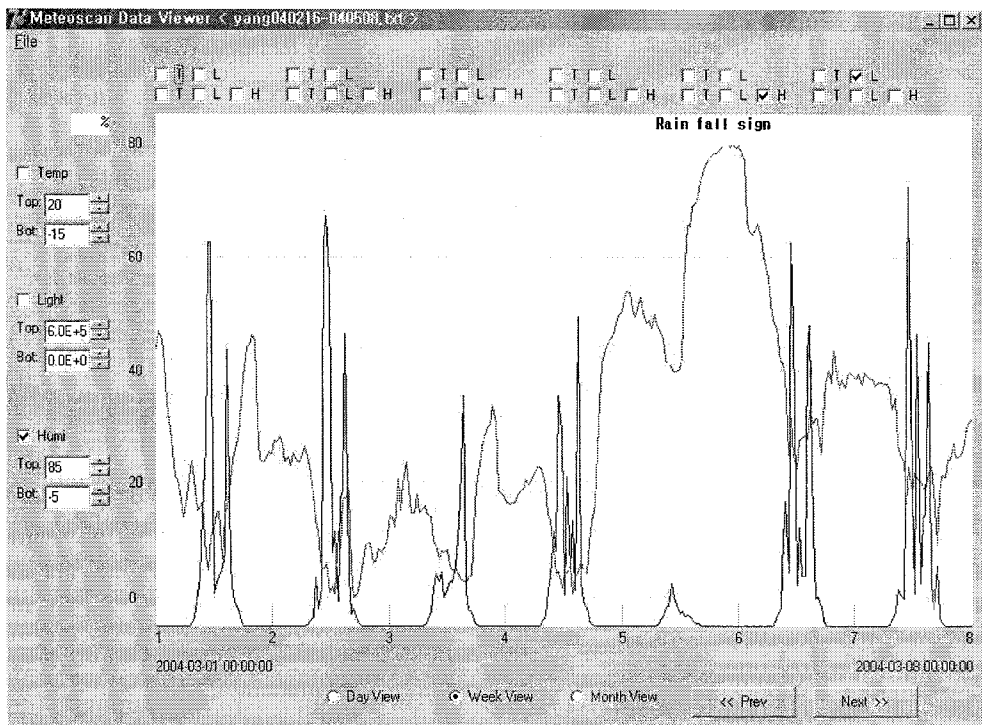
이번에는 본 연구에서 개발된 측정 장비로 얻은 데이터를 살펴보겠다. <그림 3-2-10>에서는 속초기상대에서 측정하여 발표한 자료와 본 연구를 통해 개발한 장비로 측정한 데이터 중에서 해당 부분만을 골라서 나타낸 것이다. 기상청 자료는 3월 5일에 비가 1.5mm 내렸다고 하였고 그날 평균 습도는 66%이었고 평균 기온은 -0.6도 일조 시간은 1.2시간이라고 하였다. 우리 자료에서 녹색선으로 표시된 습도 변화 곡선을 보면 그날 3월 5일 밤부터 습도가 급격히 올라가서 3월 6일 아침에는 푸른색 곡선인 Lux 조도는 해가 뜨는 모습을 알 수 있다.

y축에는 습도 값이 그리고 x축에는 날짜가 적혀있는 이 그림은 날짜가 적혀있는 tick이 0시이다. 따라서 그날 언제 해가 뜨고 습도가 얼마나 변했는지를 잘 알 수 있다.

이 측정 장비로 측정한 기상 자료는 일조시간과 더불어 얼마만한 강도로 몇 시간 해가 조사되었는지를 계산할 수 있다. 임내에 온도 습도 조도가 여러 미생물 성장과 송이 자실체 발생에 미치는 영향은 현지에 설치한 환경측정기로부터

나온 자료와 현지 미생물 균락을 분석한 자료를 이용하여 송이 발생 개체 수를 연관시켜 해석할 예정이었다. 하지만, 본 연구를 추진하는 협동연구팀이 2004년 이후 연구수행을 중단하게 되면서 더 이상의 결과를 얻을 수 없었다.

년 월 일	일평균기온	최저온도	최고온도	일조시간	상대습도%	강수량mm
2004 03 01	2.5	-0.4	5.1	7.6	30.1	0.0
2004 03 02	-1	-3.5	3.1	8.5	25.3	0.0
2004 03 03	-1.2	-3.5	3.1	2.9	26.5	0.0
2004 03 04	-0.9	-5	2.6	8.1	38.8	0.0
2004 03 05	-0.6	-2.4	1.7	1.2	66	1.5
2004 03 06	-1.2	-3.4	3.1	8.5	38	0.0
2004 03 07	-0.1	-5.7	4.6	9.2	29.9	0.0
2004 03 08	5.4	-0.7	9.2	7.1	29.8	0.0



<그림 3-2-10> 양양지구 기상대의 자료와 현지 측정자료의 비교.

## 나. 송이발생 촉진용 세라믹 제재 도포효과 검증

### 1) 서론

송이는 적당한 서식지가 필요한데 기주인 소나무 뿌리와 유기물이 적고 배수가 잘되는 토양에서의 발생률이 높다. 송이는 소나무의 뿌리에 공생하여 균근을 형성하여 소나무로부터 탄수화물을 받아 성장하고 자실체를 만들어 포자를 생산하므로 소나무가 없으면 송이도 없어진다. 송이균근은 땅 속에 있는 다른 균과도 경쟁을 한다. 유기물이 많고 수분이 충분히 비옥한 토양인 경우에 적응된 균근이 소나무와 공생관계를 맺으면 송이는 경쟁에서 물러나게 된다. 구체적으로 이런 비옥한 토양에서 어떤 물질, 소나무의 어떤 생리적 변화가 송이에게 불리하게 작용하는지는 알려지지 않고 있다.

본 연구에서는 송이 발생 촉진을 위하여 세라믹 제재가 토양의 미생물에 대해 어떠한 관계가 있는지 알아보기 위하여 세라믹 제재를 도포한 송이 자생 지역 주변의 토양에 존재하는 미생물의 양상을 조사하였다. 미생물의 분포를 조사하기 위해 세라믹 제재를 도포한 지역과 비도포지역의 토양을 채취하여 균을 분리하여 동정하였다.

### 2) 재료 및 방법

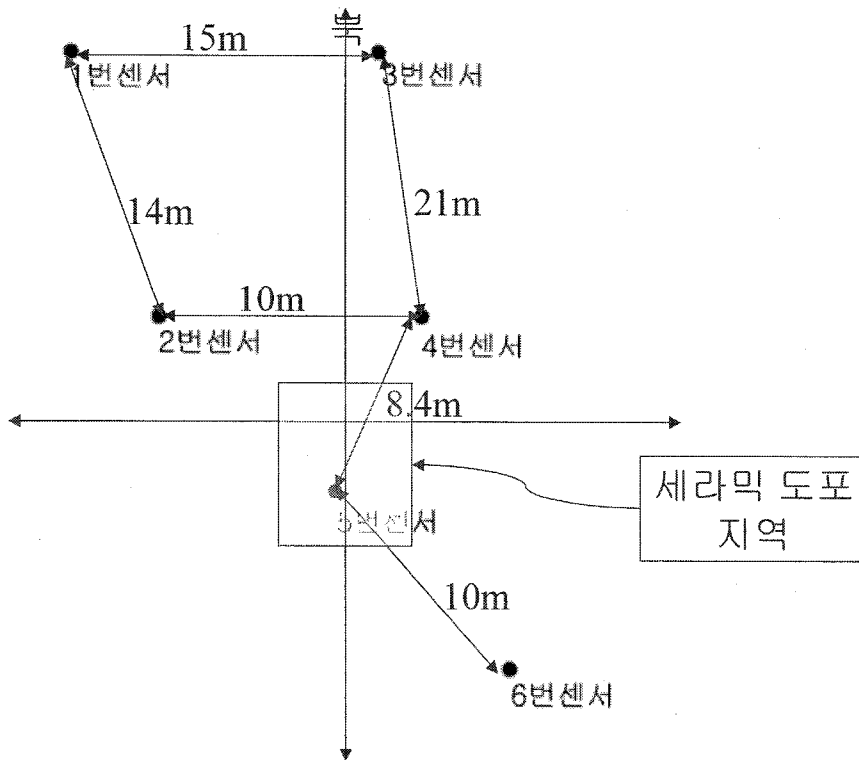
시료는 세라믹 제재 도포지역과 비도포지역의 토양을 지면을 기준으로 30cm 깊이 까지 채취를 하였으며 이 토양을 10cm 간격으로 상층, 중층, 하층으로 나누어 미생물의 분포 및 동정을 실시하였다. 토양 1g을 미리 멸균한 0.85%생리 식염수를 이용하여 희석시켰다. 이때 0.85%생리식염수 10-5까지 희석하였으며 100 $\mu$ l씩 5종류의 배지에 도말하였다. 고체 배양을 위하여 사용한 배지는 Difco 매뉴얼의 Yeast Malted broth 31g/l, Lactose broth 13g/l, Nutrient broth 8g/l, Potatose-dextrose agar 40g/l, Lactobacilli MRS broth 55g/l 등을 이용하였다. 이렇게 도말한 미생물을 30oC에서 incubator에서 24시간 배양하였다. 배양한 후 생육된 colony를 각각 똑같은 배지에 다시 분리하고 이를 다시 24시간 30oC에서 배양하였다. 앞의 방법에 따라 분리된 균주를 3번 계대 배양하여 동정에 사용하였다.

분리된 미생물을 Biolog MicroLog 4.02A를 통하여 동정하였다. Microplate에 접종하기 위하여 각각의 미생물을 Gram염색법과 KOH법을 이용하여 Gram 양성, 음성을 확인하였다.

이렇게 분리한 각각의 균을 접종액에 면봉을 이용하여 단일 colony를 분리하여 접종하였다. 이때 탁도계(21907, BIOLOG, CA, USA)를 이용하여 탁도를 0.3으로 조절하였다. Gram 양성균의 경우에는 GP2 MicroPlate에 접종하고 Gram 음성균의 경우에는 GN2 MicroPlate에 접종하였다(각 well당 150 $\mu$ l씩 접종하였다). 각각의 MicroPlate는 30oC incubator에서 5시간 배양 후 Biolog software에서 결과를 확인하였다.

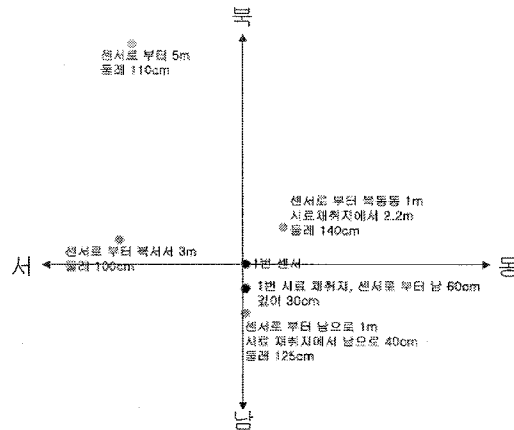
### 3) 결과 및 고찰

<그림 3-2-11>은 강원도 양양의 환경인자를 조사하기 위한 센서의 위치와 송이발생 촉진을 위하여 세라믹 제재를 도포한 지역을 도식화한 것이다. 센서의 위치는 4번 센서가 가장 높은 곳에 위치하며, 3번 센서가 가장 낮은 곳에 설치되어 있다. 센서 2, 4, 5번은 사람이 통행하기 편한 곳에 위치하고 있으나, 1, 3, 6번은 사람의 통행이 거의 없는 곳에 설치되어 있다.

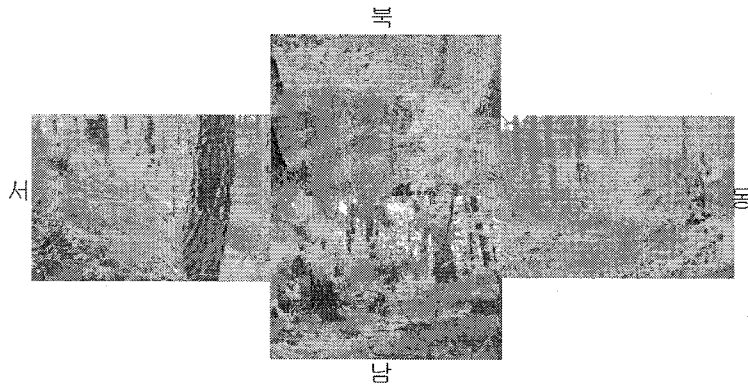


<그림 3-2-11> 송이 자생 지역에 설치한 센서의 위치 및 세라믹 도포 지역.

각 센서별 주위의 식생에 대해서는 <그림 3-2-12~13>에 나타내었다. 양양 현지의 환경인자 측정을 위한 센서 1번 주위의 소나무 식생과 세라믹 비도포지역인 센서 1번 위치에서 시료를 채취한 곳을 나타낸 것이다. 센서 1의 위치를 중심으로 고도의 차이는 남쪽이 높고 북쪽이 낮다. 시료의 채취는 센서 1번에서 남쪽으로 60cm 떨어진 곳에서 깊이 30cm 까지 토양을 채취 하였다. 주위의 소나무의 식생은 반경 5 m 내에 4그루의 소나무가 서식하고 있다. 센서에서 남쪽으로 1m 떨어진 곳에 서식하는 소나무는 둘레가 125cm 이고, 북동동쪽으로 1 m 떨어진 곳의 소나무는 둘레가 140cm 이다. 그리고 센서에서 북서서 방향으로 3 m 떨어진 곳에서 서식하는 소나무는 둘레가 100cm, 북서북 방향으로 5 m 떨어져 서식하는 소나무는 둘레가 110cm 이다. 이와 같은 방법으로 6개의 조사구를 형성하여 환경인자 조사를 수행하였다.



<그림 3-2-12> 1번 센서 주위의 주요 소나무의 위치와 시료 채취 장소.



<그림 3-2-13> 센서 1번 주위의 식생.



<표 3-2-2>는 세라믹 제재 도포지역과 비도포 지역에서 각각의 배지별 분리된 균주 수를 나타낸 것이다. 비도포 지역에서 총 124개이고, 도포지역의 총 37개의 균주가 분리되었다. 비도포지역의 상층에서는 23개, 중층에서는 46개, 하층에서는 55개의 균주가 분리되었으며, 도포지역은 상층에서 17개, 중층에서 7개, 하층에서 13개의 균주가 분리되었다. 비도포 지역에서 분리된 균주 중 Lactose broth에서 가장 많은 46개의 균주가 분리되었다.

<표 3-2-2> 세라믹 제재 도포지역과 비도포 지역에서 분리된 균주

		NUT	LB	YM	PDA	MRS	합계
비도포지역	상층	9	5	2	6	1	23
	중층	24	12	5	4	1	46
	하층	2	46	3	4	-	55
도포지역	상층	6	5	4	1	1	17
	중층	2	2	2	1	-	7
	하층	-	4	6	3	-	13

(MRS : Lactobacilli MRS broth, LB : Lactose broth, YM : Yeast Malted broth, NB : Nutrient broth, PDA : Potato dextrose agar, - : 검출 없음)

<표 3-2-3> 세라믹 제재 비도포 지역 중 상층의 미생물 동정

	학명	유형	콜로니	
			수	지름(cm)
	<i>Tsukamurella inchonensis</i>	GP-ROD	4	4.38
	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	GP-ROD	2	1.21
	<i>Vibrio tubiashij</i>	GN-NENT	2	0.96
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GP-ROD SB	1	0.82
	<i>Aquaspirillum dispar</i>	GN-NENT	1	0.47
	<i>Bacillus cereus</i>	GP-ROD SB	1	3.04
세균	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	GP-ROD	1	2.25
	<i>Brevibacterium otitidis</i>	GP-ROD	1	0.20
	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	GP-ROD	1	0.82
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	GP-ROD	1	0.31
	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	GP-ROD	1	0.31
	<i>Gordona sputi</i>	GP-ROD	1	0.20
	<i>Haemophilus paragallinarum</i>	GN-FAS	1	0.21
균류	<i>Aspergillus niger</i>	FG	3	3.19
효모	<i>Sterigmatomyces elviae</i>	N/A	1	0.10
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	N/A	1	1.13

세라믹 제재를 도포하지 않은 지역의 표층 토양으로부터 동정된 미생물을 <표 3-2-3>에 나타내었다. 동정된 균은 총 15종이었으며, 이곳의 토양에서 동정된 균주 중에서 세균은 *Tsukamurella inchonensis*, 곰팡이는 *Aspergillus niger*, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*가 우점종인 것으로 나타났다.

<표 3-2-4>는 세라믹 제재를 도포하지 않은 지역 중 중층의 토양에서 미생물을 동정한 결과를 나타낸 것이다. 동정된 균은 총 26종으로 세균은 *Bacillus cereus*, 곰팡이의 경우는 *Aspergillus niger*, 효모는 *Rhodotoruula glutinis*가 우점종인 것으로 나타났다.

<표 3-2-4> 세라믹 제재 비도포 지역 중 중층의 미생물 동정

	학명	유형	콜로니	
			수	지름(cm)
	<i>Bacillus cereus</i>	GP-ROD SB	5	1.22
	<i>Taukamurella inchonesis</i>	GP-ROD	4	1.18
	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	GP-ROD	3	0.48
	<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	GP-ROD	2	0.34
	<i>Acinetoacter johnsonii/genospecies 7</i>	GN-NENT	2	2.33
	<i>Paenibacillus macerans</i>	GP-ROD	2	0.49
	<i>Aureobacterium terregens</i>	GP-ROD	2	0.24
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GP-ROD SB	2	0.52
세균	<i>Deinococcus radiopugnans</i>	GP-COC	2	0.70
	<i>Dermacoccus nishinomiyensis</i>	GP-COCCUS	2	0.48
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	GP-ROD	2	0.35
	<i>Vibrio tubiashij</i>	GN-NENT	2	0.57
	<i>Aeromonas schuertii dna group 12</i>	GN-NENT	1	0.14
	<i>Allopococcus oitis</i>	GP-COCCUS	1	1.13
	<i>Aureobacterium terregens</i>	GP-ROD	1	0.22
	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	GP-ROD	1	0.58
	<i>Kytococcus sedentarius</i>	GP-COCCUS	1	0.34
	<i>Leuconosyoc meesnteroides</i>	GP-COC	1	0.25
균류	<i>Aspergillus niger</i>	FG	3	3.20
	<i>Aspregillus tarmarii</i>	FG	2	1.30
	<i>Candida maris</i>	N/A	1	0.20
	<i>Clavispora lusitaniae</i>	N/A	1	0.57
효모	<i>Rhodotoruula glutinis</i>	N/A	1	0.82
	<i>Sterigmatomyces elviae</i>	N/A	1	0.67
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	N/A	1	0.82

세라믹 제재를 도포하지 않은 지역 중 심토로부터 동정된 미생물을 <표 3-2-5>에 나타내었다. 동정된 균은 총 24종으로 세균은 *Bacillus halodurans*, 곰팡이의 경우 *Aspergillus niger*, 효모는 *Dipodascus capitatus*가 colony 면적 혹은 수에서 우점종인 것으로 나타났다.

<표 3-2-5> 세라믹 제재 비도포 지역 중 심토의 미생물 동정

	학명	유형	콜로니	
			수	지름(cm)
	<i>Bacillus halodurans</i>	GP-ROD SB	6	2.25
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	GP-ROD CAT+	6	2.05
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GP-ROD SB	5	1.86
	<i>Brevibacterium Mcbrellneri</i>	GP-ROD	3	1.44
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	GP-ROD	3	1.10
	<i>Aureobacterium terregens</i>	GP-ROD	3	0.60
	<i>Deinococcus radiopugnans</i>	GP-COCCUS	3	0.77
	<i>Taukamurella inchonesis</i>	GP-ROD	3	0.86
	<i>Corynedacterium Jeikeium</i>	GP-ROD	2	0.64
세균	<i>Streptococcus oralis</i>	GP-COC CAT-	2	0.26
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GP-COC CAT+	2	0.22
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	GP-COC CAT-	2	0.84
	<i>Bacillus alcalophilus</i>	GP-ROD SB	1	0.71
	<i>Bacillus cereus</i>	GP-ROD SB	1	0.33
	<i>Bacillus cereusithuringiensis</i>	GP-ROD SB	1	0.21
	<i>Bacillus mycoides</i>	GP-ROD SB	1	0.36
	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>	GP-ROD	1	0.27
	<i>Paeniacyllus larvae ss larvae</i>	GP-ROD SB	1	0.12
	<i>Paenibacillus macerans</i>	GP-ROD	1	0.19
	<i>Aspergillus niger</i>	FG	3	4.74
균류	<i>Mucor racemosus</i>	FG	2	0.45
	<i>Penicillun citroeoviride</i>	FG	1	0.34
효모	<i>Dipodascus capitatus</i>	N/A	1	0.21
	<i>Gyilliermonodella selenospora</i>	N/A	1	0.20

세라믹 제재를 도포한 지역 중 상층의 토양으로부터 동정된 미생물을 <표 3-2-6>에 나타내었다. 동정된 균은 총 24종으로 동정된 균주 중에서는 *Bacillus cereus*, 곰팡이는 *Mucor racemosus*, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* 만이 분리 동정되었다.

<표 3-2-6> 세라믹 제재 도포지역 중 상층의 미생물 분리동정

	학명	유형	콜로니	
			수	지름(cm)
	<i>Alloiococcus otitis</i>	GP-COCCUS	1	2.25
	<i>Aquaspirillum dispar</i>	GN-NENT	1	0.47
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GP-ROD SB	1	0.82
	<i>Bacillus cereus</i>	GP-ROD SB	1	3.04
	<i>Bacillus fastidiosus</i>	GP-ROD SB	1	1.19
	<i>Bacillus halodurans</i>	GP-ROD SB	1	2.25
세균	<i>Brevibacterium Mcbrellneri</i>	GP-ROD	1	2.25
	<i>Corynebacterium afermentans</i>	GP-ROD CAT+	1	0.21
	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	GP-ROD CAT+	1	2.25
	<i>Gordona sputi</i>	GP-ROD		0.20
	<i>Pseudomonas syringae pv tabaci A</i>	GN-NENT	1	0.10
	<i>Rhodococcus equi</i>	GP-ROD CAT	1	0.20
	<i>Rhodococcus ruber</i>	GP-ROD CAT	1	0.14
균류	<i>Mucor racemosus</i>	FG	1	2.14
효모	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	N/A	1	1.13

<표 3-2-7>은 세라믹 제재를 도포한 지역 중 중층의 토양으로부터 동정된 미생물을 나타낸 것이다. 동정된 균은 총 7종으로 동정된 균주 중에서는 *Acinetobacter johnsonii/genospecies 7* 가 colony 면적에서 우점종인 것으로 나타났다으며 곰팡이는 분리 되지 않았다.

<표 3-2-7> 세라믹 제재 도포지역 중 중층의 미생물 분리 동정

	학명	유형	콜로니	
			수	지름(cm)
	<i>Acinetobacter johnsonii/genospecies 7</i>	GN-NENT	1	1.91
	<i>Aeromonas schuertii dna group 12</i>	GN-NENT	1	0.14
	<i>Allopococcus oiitis</i>	GP-COCCUS	1	1.13
	<i>Clavibacter michigenense ss michiganense</i>	GP-ROB	1	0.58
	<i>Clavibacter michigenense ss tessellarius</i>	GP-ROD	1	0.34
	<i>Corynebacterium hoagii</i>	GP-ROD CAT+	1	0.25
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	GP-COC CAT-	1	0.22

세라믹 제재를 도포한 지역 중 심토로부터 동정된 미생물을 <표 3-2-8>에 나타내었다. 동정된 균은 총 12종으로 동정된 균주 중에서는 *Bacillus alcalophilus*가 colony 수 및 면적에서 우점종인 것으로 나타났으며, 곰팡이는 *Aspergillus tarmarii*, 효모는 *Cryptococcus albidus*가 colony 면적에서 우점종인 것으로 나타났다.

<표 3-2-8> 세라믹 제재 도포지역 중 심토의 미생물 분리동정

	학명	유형	콜로니	
			수	지름(cm)
	<i>Bacillus alcalophilus</i>	GP-ROD SB	2	0.71
	<i>Bacillus cereus</i>	GP-ROD SB	1	0.33
	<i>Bacillus halodurans</i>	GP-ROD SB	1	0.12
	<i>Claribacter michigenense</i>	GP-ROD	1	0.19
세균	<i>Corynebacterium flavescens</i>	GP-ROD CAT +	1	0.36
	<i>Corynedacterium Jeikeium</i>	GP-ROD	1	0.47
	<i>Kocuria keristinae</i>	GP-COC CAT+	1	0.27
	<i>Rhodococcu equi</i>	GP-ROD CAT +	1	0.21
	<i>Streptococcus oralis</i>	GP-COC CAT-	1	0.18
균류	<i>Aspergillus tarmarii</i>	FG	1	1.28
효모	<i>Clavispora lusitaniae</i>	N/A	1	0.14
	<i>Cryptococcus albidus</i>	N/A	1	0.22

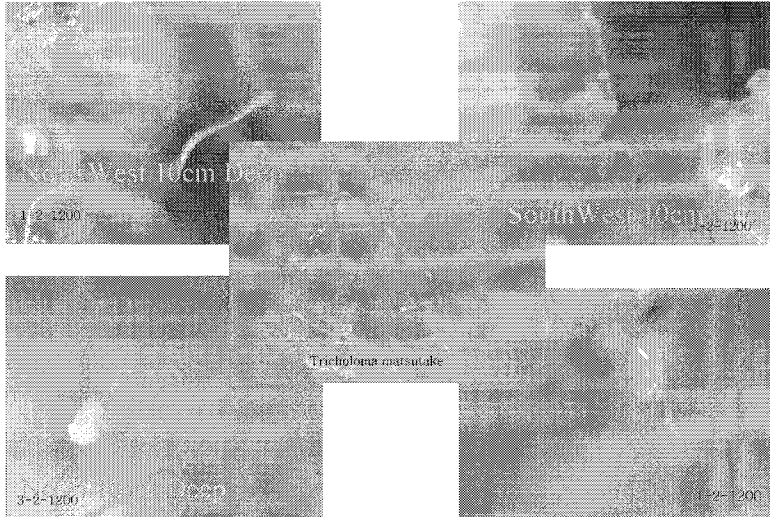
#### 4) 결론

송이 발생 촉진을 위하여 세라믹 제재를 도포한 지역과 비도포지역의 미생물 분포를 조사하기 위하여 각 세라믹 제재를 도포한 지역과 도포하지 않은 지역이 토양을 채취하여 분리 동정하였다. 그 결과, 세라믹제재 비도포지역 토양에서 동정된 균주 중에서 세균은 *Tsukamurella inchonensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus halodurans*가 colony 수 및 지름에서 우점종인 것으로 나타났으며, 곰팡이는 *Aspergillus niger*가, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotoruula glutinis*, *Dipodascus capitatus*가 colony 지름에서 우점종인 것으로 나타났다. 그리고 세라믹 제재 도포지역이 토양에서 동정된 균주 중에서 세균은 *Bacillus cereus*, *Acinetobacter johnsonii/genospecies 7*, *Bacillus alcalophilus*가 colony 면적에서 우점종이었으며 곰팡이는 *Mucor racemosus*, *Aspergillus tarmarii*가, 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*가 colony 면적에서 우점종인 것으로 나타났다.

다. 송이 자실체 발생 촉진 환경 탐색 및 인공 환경 조성

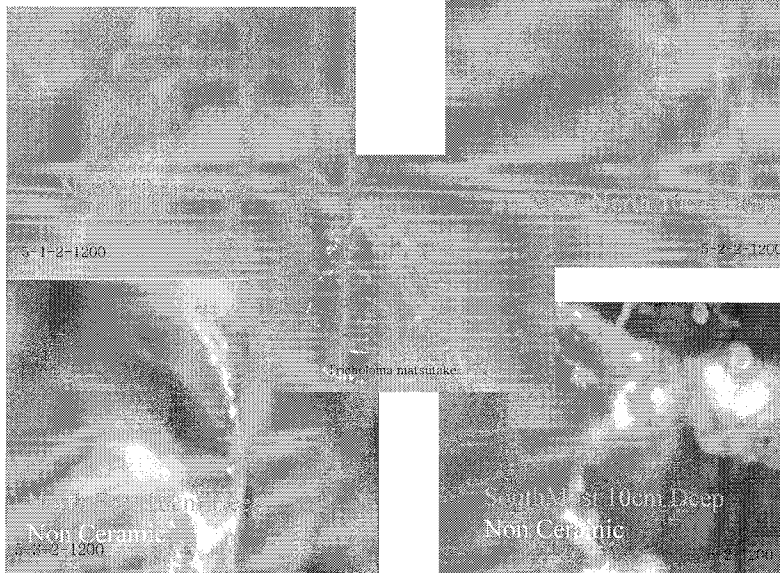
1) 항공 무기물 산지 도포(병해충, 균사생장 및 자실체에 미치는 영향)

<그림 3-2-14>와 <그림 3-2-15>는 현지에서 표본 채취한 토양 사진으로서 송이 균사체가 많이 활성화되고 있음을 보여준다.



<그림 3-2-14> 세라믹 분말을 처리하지 않은 토양 시료.

### Ceramic Treated



<그림 3-2-15> 세라믹 분말을 처리한 토양 시료.

본 세라믹 제제는 염화 제2철( $\text{FeCl}_3$ )에 Mg, Mn과 Zn 등 소량성분들을 바꾸어가면서 고온에서 소성하고 분쇄하여 코디어라이트 구조 세라믹 분말을 제조하였고, 이 무기물을 질산은 용액에 침적하여 은으로 코팅한 것이다. 이렇게 만든 항공 무기물을 송이 산지에 지난해에 도포한 곳을 2004년 이후 지속적으로 송이 자실체 발생 개체 수를 확인하며 그 영향을 평가하고자 연구 설계가 되어 있었지만, 그 효과에 대한 실질적인 검증을 하지 못한 채 본 연구는 마무리하게 되었다. 특히, 이후에 다른 연구항목을 통하여 살펴보게 될 토양수분과 송이균의 생장이 어떤 연관성을 지니고 있는가를 고려하면서 각종 토양환경의 변화를 유도하는 처리가 얼마나 효과를 나타낼 수 있는 지 검정할 수 있었으면 하는 아쉬움을 남긴 채 본 연구는 마무리하게 되었다.

## 2) 송이균과 미생물 혼합 공생에 의한 송이 증산 시도

알려진 몇 가지 미생물을 송이 분쇄물과 같이 혼합하여 성장환경 조절실에서 인위적으로 조정된 환경에서 성장시켜 그 성장 정도를 확인하고 있다. 하지만 본 연구항목은 연구진 내부에서도 논란의 여지가 있었던 사안으로서 송이가 다른 부후균과 달리 균근의 형태를 띠지 않은 상태에서 실험을 하는 것이 사실상 의미가 없으므로 설계에 대한 변경이 요구된 사안이었다.

송이의 경우 균근을 형성한 소나무 뿌리가 괴사하는 현상과 수분에 금방 적셔지지 않는 현상, 그리고 순수한 송이균만이 아니라 다른 각종 균류가 섞여 있는 송이 균환의 특성에 대한 명확한 이해가 필요하며, 특히 토양미생물이 어우러져 있는데 그 조성이나 역할에 대한 연구는 극히 미진한 실정이다. 본 연구를 통하여 송이 균환부의 토양미생물을 정확히 분리, 동정하고 관련되는 미생물을 단계별로 투입하면서 효과를 검증하는 연구를 하는 것이 바람직하다는 미련을 남게 한다.

특히, 단순한 미생물의 분리, 동정 수준에서 미생물 혼합체를 투여하고 그 효과를 검증하고자 할 때는 송이 균환부에 존재하는 것으로 알려진 *Mortierella* 속 균의 처리가 있을 수 있다. 하지만, 본 연구에서는 이러한 방법보다는 다른 연구과제를 통하여 자체개발한 미생물 복합제제를 실험에 사용하면서 주관 연구기관과 원활한 협조를 이루지 못하고 실질적인 성과를 얻지 못한 채 마무리된 점은 큰 아쉬움으로 남는다.

### 제3절 송이 접종묘를 이용한 송이 균환 형성 기술

#### 1. 송이 접종묘 생산

##### 가. 서론

송이는 동북아시아에서 매우 고가의 버섯이나 생산량의 감소 때문에 송이 재배에 대한 관심이 매우 높으며, 일본에서 연간 3,000톤 이상 수입하고 있기에(伊藤, 2000) 미국, 뉴질랜드, 스웨덴 등지의 다른 나라에서도 송이 연구에 관심을 갖고 있다(Ito, 2000; Hosford 등, 1997; Bergius와 Danell, 2000, Wang 등, 1997). 최근에는 뉴질랜드, 일본, 우리나라에서 소나무 유묘에 송이균을 감염시켜 송이 인공재배의 가능성을 한층 높여주고 있다(Wang 등, 1997; Yamada 등, 1999, 가 등, 2002; Guerin-Laguette 등, 2005).

Wang 등(1997)은 시험관 내에서 소나무(*Pinus densiflora*)와 라디아타소나무(*P. radiata*)에 송이 균근을 형성시키고 보고한 바 있다. 일본에서는 Yamada 등(1999)이 소나무에 송이 균근을 2개월 만에 형성하였고, Vaario 등(2000)은 2주 만에 송이 균근을 형성하는 매우 빠른 송이 접종묘 생산 방법을 제시하였다. Yamada 등(1999)은 탄소원으로 포도당이 들어 있는 배지를 사용하였고, Vaario 등(2000)은 송이 균사체에서 양분을 제거한 다음 소나무 뿌리에 접종하였다. 전자는 송이 균근 합성에는 약간의 탄소 양분의 필요함을 말하고 있으나, 후자는 탄소양분 없이도 균근 합성이 가능하며, 야외에 접종할 때에도 양분이 없기 때문에 다른 균들의 오염에 대하여 더 저항성이 있을 것으로 제안하고 있다.

우리나라에서는 2001년에 경북산림환경연구소에서 조직배양병에 인공토양을 이용하여 송이 균근을 형성시켰다는 매스컴의 보도가 있었고(농민신문, 2001), 가 등(2002)은 소나무림 토양을 이용하여 소나무에 송이 균근을 형성시키는 방법을 발표한 바 있다. 단, 기존의 연구결과를 보면 실질적으로 송이 균근을 형성시킨다고 할 지라도 송이가 접종된 소나무가 제대로 생존하지 못하거나 이식 후 송이균이 탈락되는 현상이 많았다. 이에 따라 본 연구에서는 소나무 유묘에 송이 송이 균근을 만들어 장기간 유지할 수 있는 최적의 배지조건을 찾고자 수행되었다. 특히, 종자 멸균, 발아, 접종의 모든 공정을 산업화할 수 있는 수준으로 개발하고자 추진되었다.



## 나. 재료 및 방법

### 1) 소나무 종자 멸균 및 발아 유도

소나무 종자는 1일 동안 수돗물에 침수한 다음에 상처를 받거나 충실하지 못한 것을 선별하였다. 건전한 종자는 30% Hydrogen peroxide에 20분 처리한 다음 멸균수로 3회 씻은 후 PDA 배지에 옮겨서 23°C에서 발아시켰다.

### 2) 배지 조제 및 송이 균 접종

토양배지는 1.2ℓ 조직배양병에 600ml의 마사토를 넣고 PDMP 배지(24g potato dextrose broth, 3g malt extract, 1g peptone, 1,000ml distilled water, pH 5.5)를 1/2로 희석하여 토양 부피비의 1/10을 넣었다. 준비된 배지는 121°C에서 60분간 고압멸균을 하였다. 무균적으로 발아된 소나무 유묘를 준비된 배양병에 2개씩 옮겨 심었다.

접종할 송이균은 MMN 액체배지에서 2개월 정도 키웠다. 소나무 싹이 땅위로 나온 조직배양병은 송이균을 어린 소나무 주변 토양 속에 4ml씩 접종하였다. 송이균을 접종한 것은 22~25°C시 조직배양실에서 4개월간 키웠다(Figure 1). 배양이 끝난 조직배양병은 소나무와 토양을 분리하고 소나무 뿌리에 송이균균 형성유무를 조사하였다.

### 3) 송이 균균 형성을 조사

송이 균균 형성유무는 4개월 배양 후에 소나무 뿌리에 송이 균균이 형성된 것을 해부현미경 20배에서 관찰하였다. 또한 일부 송이 균균은 동결마이크로톰(Leica CM 1900)으로 12μm 크기로 절단 후 광학현미경(Leica DMRE) 상에서 하티그망을 관찰하며, 현미경 촬영은 Leica DMRE 로 수행하였다. 송이 균균 형성을 높은 털어낸 후에 전체 뿌리에 대한 송이균균 형성정도를 가지고 판단하였다. 그리고 송이 균균 형성은 조직배양병에서 토양을 제거하는 과정에서 송이 향기의 유무로도 판별할 수 있었다. 야외 송이 균균은 2002년 4월에 양양군 어성전리의 송이균환 토양에서 채취하였다.

### 4) 송이 균균 형성을 위한 최적 PDMP 배지량 조사

앞의 실험과 마찬가지로 추진하면서, PDMP 배지의 농도를 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32로 희석하여 토양 부피비의 1/10을 넣었다. 조직배양병은 4개월과 6개월 배양한 후에 3반복씩 조사하였다. 송이 균균 형성 유무는 앞의 실험과 마찬가지로 방법으로 해부현미경과 조직을 동결마이크로톰(Leica CM 1900)을 이용하여 관찰하고 검정하였다.

5) 아밀라아제 활성과 송이균근 형성과의 관계

송이 균사는 100ml 삼각플라스크에 50ml PDMP 배지를 넣고 송이균을 접종하여 60일 배양한 다음, 각 송이 균주의 성장량과 DNS법에 의한 배양액의 아밀라제 활성을 조사하였다(Hur 등, 2001).

다. 결과 및 고찰

1) 송이 접종묘 생산

배양병을 이용한 송이 균근 형성 시도에서 사용한 12개 균주 중 KFRI 421번 균주가 송이 균근 형성율이 가장 높았다. 12개 균주 중 3균주는 송이 균근을 형성시키지 않았고(표 3-3-1), 세균 혹은 곰팡이 오염된 것은 전혀 송이 균근을 형성하지 못했다. 송이 균근이 형성된 것은 야외 송이균환에서 맡을 수 있는 송이 향기를 지닌 반면, 송이 균근이 형성되지 않은 소나무 뿌리에서는 전혀 송이 향기가 나지 않았다.

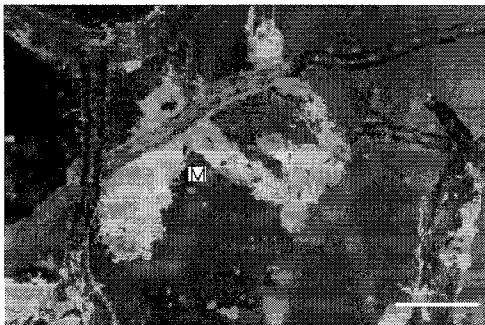
<표 3-3-1> 4개월간 배양 후 점검한 송이 접종묘 생산 결과

균주번호r	원산지	분리시기	오염량	균근형태	접종률	향기
KFRI 421	예천	1995	4(0)	외생균근	65%	있음
KFRI 431	홍천	1995	1(3)	외생균근	2.5%	있음
KFRI 432	홍천	1995	4(0)	-	0	없음
KFRI 435	울진	1996	2(2)	외생균근	5%	있음
KFRI 439	영동	1996	3(1)	외생균근	13.8%	있음
KFRI 440	영동	1996	1(3)	외생균근	12.5%	있음
KFRI 445	일본	1996	3(1)	-	0	없음
KFRI 457	미국	1997	2(2)	외생균근	10%	있음
KFRI 458	미국	1997	2(2)	-	0	없음
KFRI 459	미국	1997	1(3)	외생균근	10%	있음
KFRI 461	경주	1997	2(2)	외생균근	12.5%	있음
KFRI 462	청도	1996	2(2)	외생균근	20%	있음



<그림 3-3-1> 4개월간 배양병에서 키워진 송이 접종 소나무 묘목.

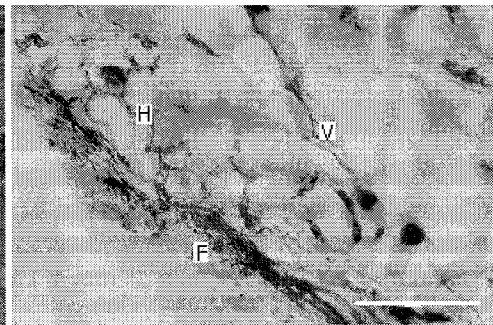
송이 균근은 모두 비분지형(simple type)으로서, 소나무 뿌리에서 균근 형성 부위는 검은색화 되었고, 균근이 더 발전된 것에는 검은색화가 더 뚜렷하였는데, 다른 외피층은 갈색화 되어 있었다(그림 3-3-2; 3-3-4). 현미경을 통하여 내부를 확인해 본 결과, 균투층은 얇고(5-25 $\mu$ m) 뿌리 표면에 약하게 붙어 있었다. 피층은 하티그 망을 형성하였고, 도관부에는 균사 침입이 없었다(그림 3-3-3; 3-3-5). 이러한 모습은 우리나라의 송이(*T. matsutake*) 균주를 사용한 경우와 미국에서 분리한 균주(*T. magnivelare*)를 사용한 예에서 비슷하게 나타나서 두 균주가 비슷한 성격을 지니고 있음을 알 수 있었다.



<그림 3-3-2> 송이 균근 KFRI 421,

*Tricholoma matsutake*.

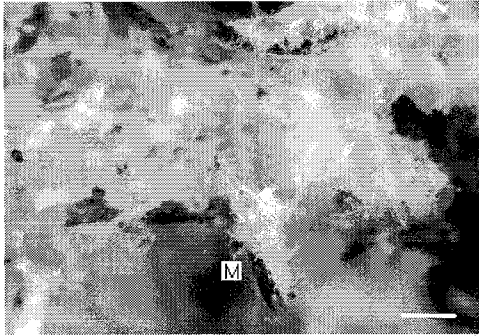
M: 외생균근. Bar=0.5mm



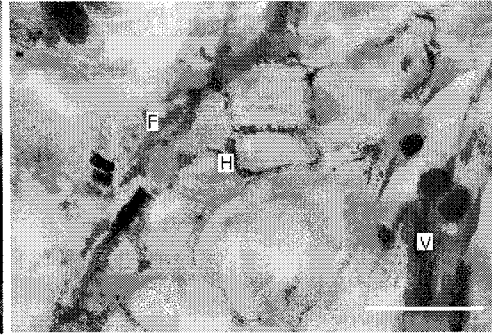
<그림 3-3-3> 좌측사진 시료의 뿌리

내부 모습. Bar=50 $\mu$ m

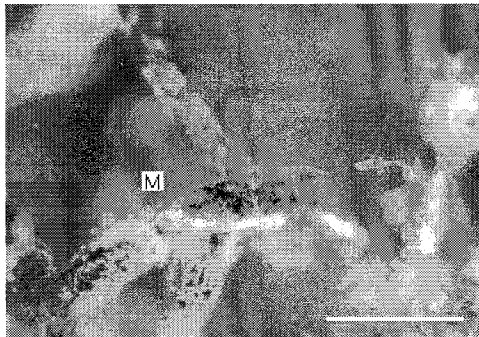
F: Fungal mantle, H: Hartig net



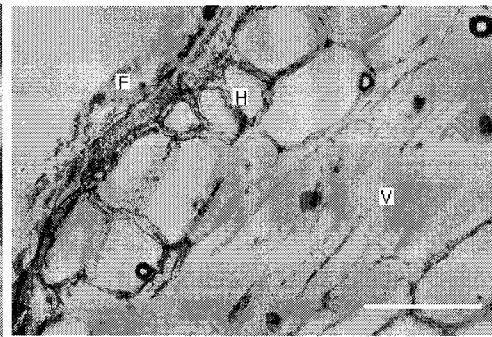
<그림 3-3-4> 송이 균근 KFRI 459,  
*Tricholoma magnivelare*.  
M: 외생균근. Bar=0.5mm



<그림 3-3-5> 좌측사진 시료의 뿌리  
내부 모습. Bar=50 $\mu$ m  
F: Fungal mantle, H: Hartig net



<그림 3-3-6> 양양의 송이산지에서  
채취한 송이 균근의 모습.  
M: 외생균근. Bar=0.5mm



<그림 3-3-7> 좌측사진 시료의 뿌리  
내부 모습. Bar=50 $\mu$ m  
F: Fungal mantle, H: Hartig net

모든 송이 균근 시료의 경우 내부 현미경 사진을 위해서는 cotton blue 염색약을 사용하였으며, Melzer's reagent에서 세포 내용물은 색 변화가 없었다.

Yamada 등(1999)은 MNC 배지를 이용하면서 배양병 내에서 소나무에 송이균을 이용하여 송이 균근 형성을 보고한 바 있다. 그들은 송이 균근이 전형적인 외생균근을 형성하는 것으로 보고하고 있지만 송이 향기 유무의 언급은 없었다. 본 연구에서는 송이 균근이 전형적인 외생균근을 만들고 송이 향을 지님을 확인하였고, 야외 토양에서 발견된 송이 균근과 매우 유사한 모양임을 다시 확인할 수 있었다. 특히, 본 실험은 Yamada 등(1999)과 달리 PDMP 배지를 이용하였다.

송이 균근 합성에서 사용된 배지 매질은 Yamada 등(1999)과 Vaario 등(2000)은 합성 토양을 이용하여 송이 균근 합성을 하였고, Guerin-Laguette 등(2000)은 소나무림 토양을 이용하였다. 본 실험에서는 소나무림 토양을 이용하여 송이 균근을 형성시켰다. 매질 조건이 야외의 송이산 토양과 동일한 것을 사용하였기에, 조직배양병 속에서 만들어진 송이 균근은 야외 송이 균환 내의 것과 비슷한 것으로 생각되었다.

한편, 송이 향기는 송이균이 소나무 뿌리에 균근을 형성하면서 발생하는 것으로 확인되었다. 송이균의 단독 배양에서는 송이 균환에서 맡을 수 있을 정도로 강한 송이 향기를 가지고 있지 않았다. 따라서 송이 향기 유무가 송이 균근의 형성유무를 판별할 수 있는 중요한 지표로 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

Wang 등(1997)은 송이 균근 합성에서 송이균이 소나무나 라이아타소나무의 뿌리를 김계 변화시키며 죽이는 병원성을 나타나는 것으로 보고한 바 있다. 하지만, Guerin-Laguette 등(2000)과 Yamada 등(1999)은 송이 균근이 전형적인 외생균근을 형성하는 것으로 보고하고 있다. 구 등(2000)은 송이 균근은 시공간적으로 전형적인 외생균근 형성과 병원성의 증상이 함께 전개되는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는, 송이 균근은 전형적인 외생균근을 형성하면서 오래된 균근 부분들에서는 흑색화가 되어가면서 정상적인 기능을 못하는 것으로 나타나고 있었다. 하지만, 10개월 이상 키워도 소나무가 죽지 않고 정상적으로 자라는 것으로 보아 Wang 등(1997)이 소나무 뿌리가 균근을 형성하였다가 turn-over 되는 현상을 병원성으로 오판한 것으로 생각된다. 물론, Wang 등(1997)이 사용한 균주가 다른 연구자들이 사용한 균주와 차이가 있어서 병원성의 문제가 발생할 가능성도 완전히 배제할 수는 없다.

## 2) 송이 균근 형성의 최적 PDMP 배지량 조사

송이 균근 형성은 4개월째에는 PDMP 1/2과 1/4 희석 배지에서 이루어졌으며, 송이 균근 형성의 초기 단계 모습을 띠었다. 6개월 경과시점에서의 조사에서는 모든 배지 희석조건에서 송이 균근이 형성되었으나, PDMP 1/4배지에서 가장 양호하게 송이 균근이 형성되었다(표3-3-2; 그림 3-3-8, 9). 반면, PDMP 1/2배지에서는 1병은 송이 균근이 형성되었으나, 2개 병은 다른 균의 오염에 의한 역겨운 냄새와 함께 송이 균근이 형성되지 않았다. 배지 농도가 1/8 이하로 희석될 경우에는 시간이 지남에 따라 송이 균근이 형성되는 비율이 낮아

졌다. 즉, 송이 접종을 위해서 초기에는 일정한 양의 탄소원이 제공되어야 함을 알 수 있었다.

<표 3-3-2> PDMP 배지의 희석배율별 송이 균근의 형성률 차이

PDMP 희석비율	4개월 경과시점	6개월 경과시점
1/2	67%	33%
1/4	67%	100%
1/8	0	67%
1/16	0	67%
1/32	0	67%



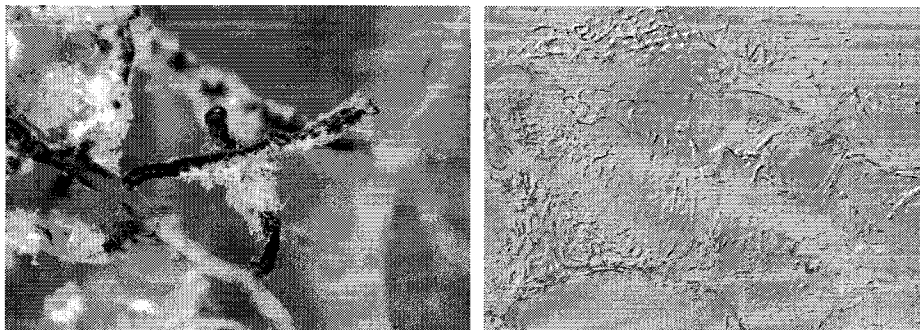
(a)

(b)

(c)

<그림 3-3-8> 송이가 접종된 소나무 묘목의 4개월 시점 모습(PDMP 1/4배지)

(a) 배양병, (b) 송이가 접종된 소나무, (c) 송이 균근



(a)

(b)

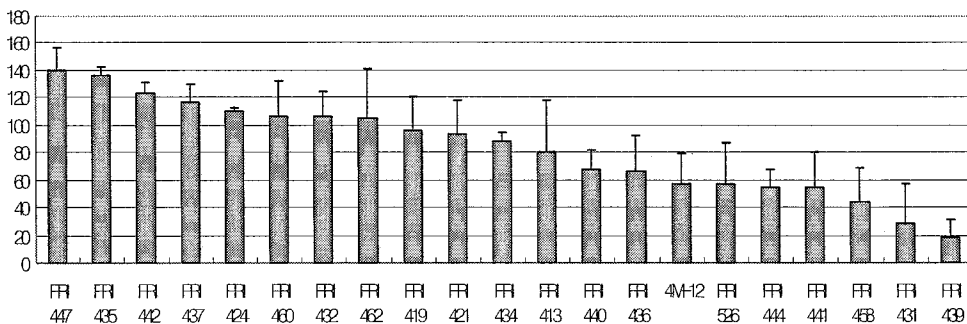
<그림 3-3-9> 송이가 접종된 소나무 묘목의 6개월 시점 모습(PDMP 1/4배지)

(a) 성숙된 송이 균근, (b) 송이 균근의 하티그 망이 형성된 모습

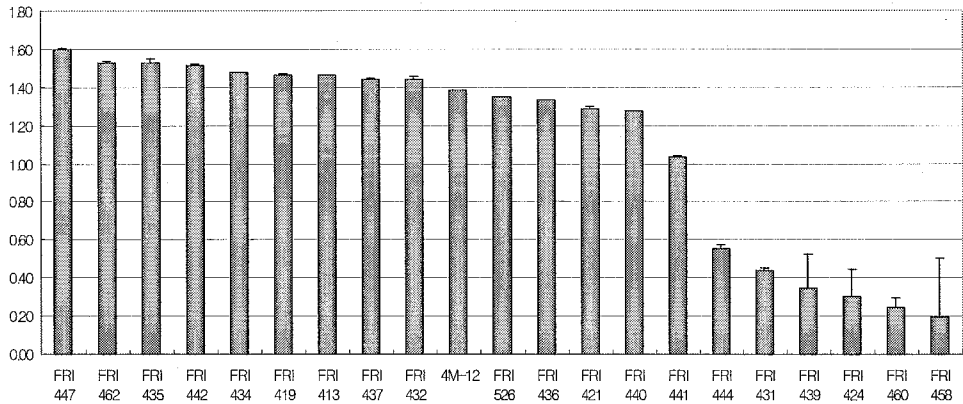
Guerin-Laguette 등(2000)은 송이 균근 합성에서 탄소원이 없는 배지를 이용하는 것이 균근 합성의 시기를 앞당길 수 있으며, 야외에 적용 시 다른 미생물의 오염원 발달을 제어하는데 도움을 주게 되므로 더 좋은 방법이라고 언급하였다. 반면, Yamada 등(1999)은 송이 균근 합성에서 탄소원이 없는 배지에서는 송이 균근이 형성되지 않았으나, 포도당이 2-10g/l 첨가된 배지에서는 송이 균근이 형성되었다고 보고하면서 실험실 조건에서는 송이 균근을 형성하는데 탄소원이 필요하다고 제안하였다. 본 연구 결과는 Yamada 등(1999)의 연구결과와 마찬가지로 배지에 풍부한 탄소원이 포함되어 있는 상태로서 송이 균근 형성 시에 어린 소나무에게서 받을 수 있는 탄소원이 극히 적으므로 상대적으로 많은 탄소를 공급해 주어야만 송이균이 제대로 생존할 수 있는 것으로 판단되었다.

### 3) 아밀라아제 활성과 송이 균근 형성과의 관계

송이균의 아밀라제효소 활성은 일본 균주(KFRI 447)가 가장 높은 활성을 보였으며 미국 균주(KFRI 458)가 가장 낮은 활성을 나타내었다(그림 3-3-10, 11). 송이의 균사 성장량과 아밀라아제의 활성정도는 일치하는 경향성을 나타내었다. 한편, 앞서 <표 3-3-1>에서 나타내었듯이, KFRI 421, 431, 435, 439, 440, 457, 459, 461, 462 균주는 송이 균근을 성공적으로 형성한 균주이며, 다른 균주는 균근을 형성하지 못한 균주이다. 그런데, 송이 균근 형성과 아밀라제효소 활성과의 관계를 살펴보면, KFRI 462와 435는 아밀라아제 활성이 높고, KFRI 421과 440은 중간이며, KFRI 431과 439는 낮아서 어떤 일관성을 찾기는 어려웠다. 즉, 송이 균근을 성공적으로 형성하는 지 여부와 아밀라제 활성과는 밀접한 관계를 갖고 있지 않는 것으로 판단되었다.



<그림 3-3-10> 50ml PDMP 배지에서 2개월간 자란 송이 균사의 성장량(mg).



<그림 3-3-11> 50ml PDMP 배지에서 2개월간 자란 송이의 아밀라제 활성 (μmol 환원당/분).

## 라. 결론

### 1) 송이 집종묘 생산용 균주 선발

실내에서 송이 균근을 형성하기 위하여 마사토양에 PDMP 배지를 넣고 발아시킨 소나무를 식재하여 성공적인 결과를 얻을 수 있었다. 송이와 미국 송이는 모두 본 실험공정을 통하여 성공적인 균근 형성모습을 나타내었지만 균주별로 균근 형성 정도에 차이가 있었다. 송이 균근은 비분지형으로서 뿌리털이 없어지고, 얇은 균투층과 하티그망을 가지는 전형적인 외생균근의 모습을 띠었다. 송이와 미국 송이의 외생균근은 야외 균환 토양 내 외생균근과 매우 유사하였다. 또한, 송이 균근 형성이 많이 된 것은 송이 향기도 진하게 발생하였다.

### 2) 송이 균근 형성에 있어 최적 PDMP 배지량 조사

송이 균근은 PDMP 배지의 1/4 희석에서 가장 성공률이 높았다. 또한, 본 균근 형성공정에서는 최소한 4개월 이상 키우는 것이 바람직 할 것으로 판단되었다.

### 3) 아밀라아제 활성과 송이 균근 형성과의 관계

송이균의 아밀라아제 활성과 송이 균근 형성과는 어떠한 일관성을 갖지 않았다. 단지 본 연구에서 송이 균근 형성균주로 선발한 KFRI 421균주는 아밀라아제 활성이 1.3 μmol 정도에 해당하는 균주에 속했다.



## 2. 송이 집종 성공여부 판별기법 연구

### 가. 서론

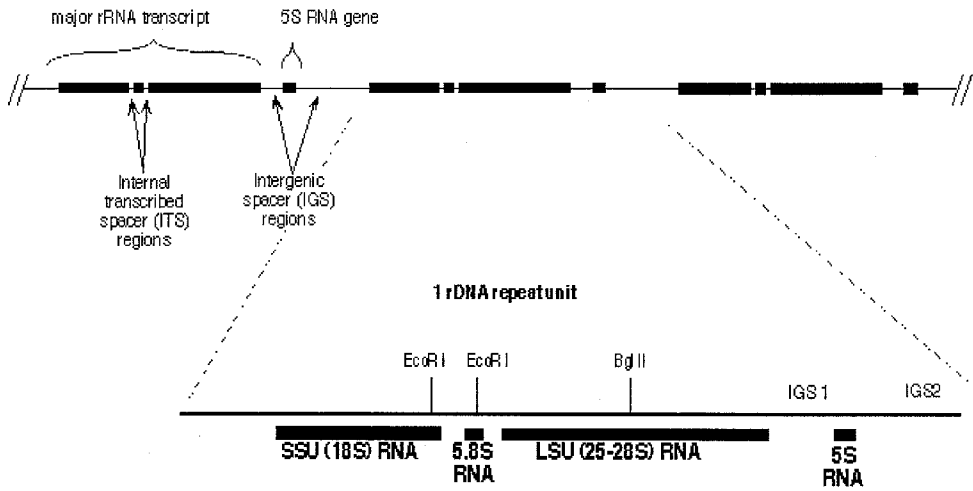
외생균근은 산림에서 중요한 역할을 담당하는 존재로서, 북반구에서는 거의 대부분의 산림 지역에서, 남반구에서는 주로 너도밤나무림에서 발견된다. 외생균근의 생리적 특성 및 분류를 위해서는 산림생태계를 잘 이해하는 것이 중요한데, 일반적으로 자실체 생산 과정에서 공생하는 기주식물이 오염되지 않는 수준에서 다른 식용 버섯과 같이 나타나는 경우가 많다(Amicucci 등, 2000; 2001; Paolocci 등, 1999). 외생균근을 분류함에 있어 버섯의 색깔이나 모양의 특성을 살핀 거시적인 특성과 미시적인 현미경적 특성을 살핌으로서 이루어졌다. 그러나 대부분의 버섯의 형태학적 특성이 자세히 기술되지 않고 형태학적 특성만으로는 기주식물의 근계 시스템과 연관하여 완전한 분류 작업을 하기 어려운 형편이다(Comandini와 Pacioni 1997; Zambonelli 등, 1997; 1999).

최근에 DNA 수준에 기초한 분류 방법이 많이 발전되고 있는 상황에서, ribosomal DNA region을 지표로 하여 이루어지는 분류 방법이 널리 사용되어지고 있다. 여기에는 RFLP(Restriction fragment Length Polymorphism) 기법, Species specific primers 이용, conserved rDNA의 염기서열 결정에 의한 분류 방법들이 있다(Horton과 Bruns 2001; Hotron 2002, Landeweert 등, 2003; Kaldorf 등, 2004; Karen 등, 1997; Paolocci 등, 1995).

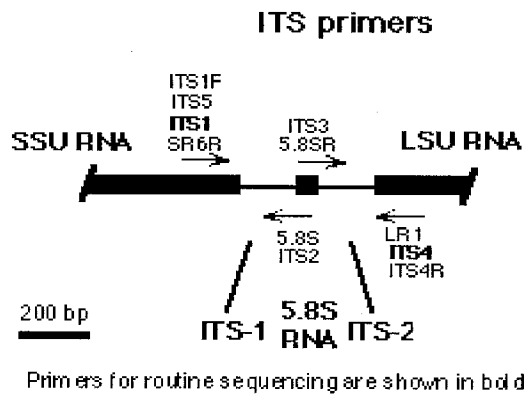
균근의 rDNA unit는 <그림 3-3-12>와 같이 small size unit에는 18S가 있고, 5.8S rDNA, 그리고 large size unit, 5S unit로 구성되어 있다. 주로 균근은 ITS(Internal transcribed spacer) 영역과 IGS(Intergenic spacer)이 conserved 영역으로 이루어져 있어 특이 primer에 의한 영역 증폭으로 균근을 비롯한 곰팡이의 분류 시 많이 사용되어지고 있다(White 등, 1990). 그 중에서도 ITS영역에 대한 specific primer에 관한 연구(White 등, 1990; Gardes와 Bruns, 1993)가 많이 되어 있어 rDNA의 부분 염기서열에 의한 균근을 포함한 외생균근의 분류에는 유용하다(그림 3-3-13, 표 3-3-3).

또한, 김 등(1998)은 여러 균주의 18S rDNA 염기서열을 비교하고 송이 균만이 가지는 특수 DNA 밴드를 이용하여 2개의 specific primer, 즉 TMF(AAGGT GCCGTTTCCGGCTCC)와 TMR(GCTTTTGCTGGCCGCTGGCTTCTTAC)를 제작하여 연구한 결과 송이 균과 다른 균을 구분해 낼 수 있었다.

본 연구에서는 대량배양된 송이 균사를 배양병 안에 있는 소나무에 접종하는 기법으로 접종묘를 생산하였는데, 접종묘 내 소나무 뿌리 내에 송이 균사가 침투하여 감염이 되었는지를 판별하는 방법으로 여러 가지 primer를 비교하여 적절한 한 primer set를 선택하여 정하고, 그를 바탕으로 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)와 홍릉수목원(서울시 동대문구 청량리 2동) 내에서 수집한 다른 균근과 비교하고자 RAPD(Rapid Amplified polymorphic DNA) 기법을 수행하였다.



<그림 3-3-12> 외생균근의 rDNA 체계



<그림 3-3-13> rDNA의 ITS 영역

<표3-3-3> ITS 영역의 특이 프라이머(primers)

primer 이름	sequence (5'→3')	참고문헌
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White 등, 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White 등, 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White 등, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White 등, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White 등, 1990
ITS1-F	CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA	Gardes와 Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes와 Bruns, 1993
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	Vilgalys lab
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG	Vilgalys lab
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG	Vilgalys lab

## 나. 재료 및 방법

### 1) 공시재료

첫 번째 실험은 TMF/TMR, MK56/MK57 및 ITS primer pair 간의 비교를 통하여 적당한 primer set을 결정하기 위하여 우리나라 송이(*Tricholoma matsutake*, KFRI 689)와 미국송이(*T. magnivelare*, KFRI 457)로 실시하였다.

두 번째 실험은 결정된 primer pair에 의한 증폭 결과로 얻은 염기서열 결정으로 접종묘 내의 소나무 뿌리에 송이균이 감염되었는지 여부를 알아보하고자 접종묘 내 소나무 뿌리를 채취하여 실시하였다.

마지막으로 송이균 외 다른 균근과의 RAPD 비교를 위해 모래밭버섯, 못버섯, 노랑민길그물버섯, 젖비단그물버섯, 호박젖버섯, 황소비단그물버섯, 황금피꼬리버섯, 무늬노루털버섯, 젖버섯아재비, 노랑젖버섯, 능이, 노랑무당버섯, 비단그물버섯, 땅송이버섯, 우산버섯 등 23가지 버섯으로 실시하였다.

### 2) 실험 방법

#### 가) 균근의 genomic DNA 추출 및 PCR

동결건조한 후 또는 액체 질소에서 곱게 간 소나무 뿌리, 균사체, 및 자실체를 lysis buffer를 넣고 잘 섞은 후 65°C에 1시간 반응시켜 동량의 phenol : chloroform을 넣고 원심분리하여 DNA를 포함한 상층부를 새 튜브로 옮

졌다. 3M NaOAc로 침전시키고 isopropanol로 세척하여 genomic DNA를 회수하였다(Lee & Taylor, 1990). 분리한 유전자를 증폭하기 위하여 TMF/TMR primer; AAGGTGCCGTTTCCGGCTCC/GCTTTTGCTGGCCGCTGGCTTCTTAC는 94°C에서 2분간 one cycle, 94°C에서 1분간, 63°C에서 30초간, 72°C에서 2분간 set을 35 cycles로 하고, 72°C에서 10분간 1 cycle로 PCR을 수행하였고, MK56/MK57 primer; GTAGGTGAACCTGCGGAAGGA/GTTTCTTTCCTCCGCT는 94°C에서 1분간 1 cycle, 45°C에서 30초간, 72°C에서 2분간 set을 35 cycles로 하고, 72°C에서 10분간 1 cycle로 PCR을 수행하였다. ITS primer set은 <표 3-3-3>에 명시된 대로 ITS1/ITS2, ITS1/ITS4, 및 ITS1/ITS 5.8 primer set으로 하여 94°C에서 4분간 1 cycle, 94°C에서 1분간, 58°C에서 1분간, 72°C에서 1분간 set을 35 cycles로 하고, 72°C에서 7분간 1 cycle로 PCR을 수행하였다.

#### 나) 부분 염기서열 결정

pGEM-T Easy Vector System을 이용하여 ligation하고, 여기에서 얻어진 competent cell을 42°C에서 90초 동안 heat shock후 얼음에 5분동안 방치하고 LB broth를 첨가해 37°C에서 1시간 배양한 후 spin 해서 100 $\mu$ l로 양을 줄인 후, 배지에 도달하여 white colony를 선발하였다. 선발한 colony를 배양하여 lysis buffer와 fresh lysozyme으로 선별하고 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25/24/1)을 가하여 원심분리하여 상층을 떠낸 후, NaOAc를 가하고 EtOH를 첨가하여 플라스미드 정제 과정을 거쳐 염기서열 결정을 하였고 BLAST search 검색을 위하여 GenBank database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)에서 균주를 동정, 분류하였다.

#### 다) RAPD(Random Amplified polymorphic DNA)에 의한 분류

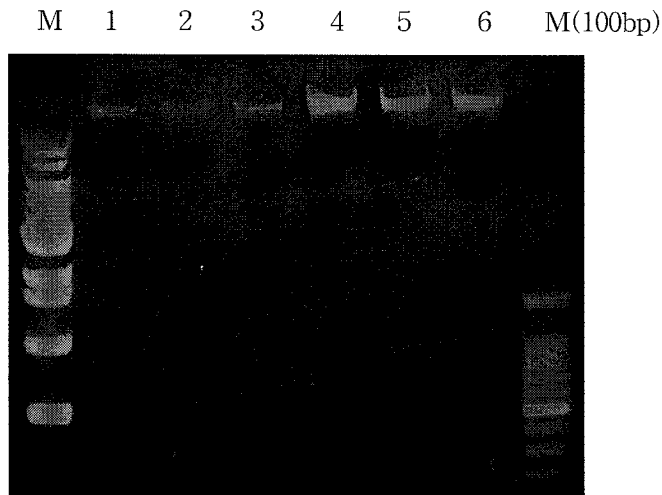
이미 알려진 Operon Technologies primers 중에서 OPA4 primer; AATCGGGCTG, OPA7 primer; GAAACGGGTG, OPA8 primer; GTGACGTAGG로 하여 92°C에서 1분간 one cycle, 35°C에서 1분간, 72°C에서 2분간 set을 45 cycles로 PCR을 수행하였고(Maki 등 2001; Zhang & Molina, 1995), 밴드의 상동성 검색은 Fingerprinting II Informatix Software(Bio-Rad) program에 의해 수행하였다.

## 다. 결과 및 고찰

### 1) 송이 균사체 내에서 분리

#### 가) Genomic DNA 분리

송이 접종묘에서 송이를 추출하여 확인하기 전에 대조할 수 있는 DNA band를 확인하기 위하여 먼저 송이 균사체 내에서 DNA를 추출하는 방법을 점검하였다. 본 연구에서 추후 사용하고자 하는 우리나라 균주 및 미국 균주를 각각 액체배양하여 DNA 추출을 시도한 결과, 우리나라 송이(KFRI 689) 및 미국송이(KFRI 457) 균주 모두 genomic DNA 분리가 잘 되었다(그림 3-3-14).



<그림 3-3-14> 2종 외생균근의 genomic DNA.

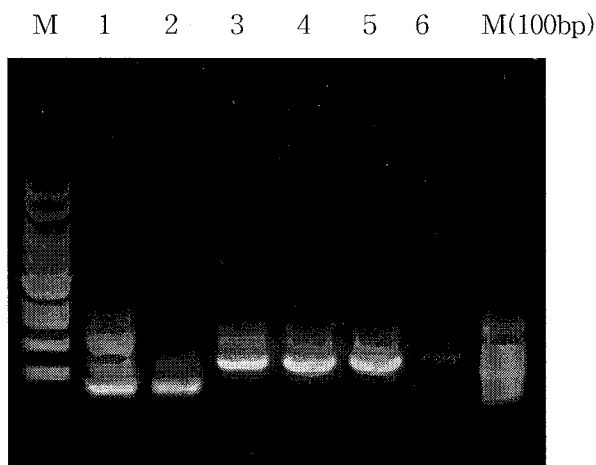
Lane 1-3 : *Tricholoma magnivelare*(KFRI 457),

Lane 4-6 : *T. matsutake*(KFRI 689).

#### 나) TMF/TMR, MK56/MK57 primer에 의한 PCR

본 실험은 기존의 농림부 특정 현장으로 과제를 수행하면서 교원 대학교와 함께 연구한 결과(교원대학교 공동연구)와 본 과제의 4차년도까지의 연구 성과를 통하여 추천된 여러 가지 primers 및 PCR 조건의 검정을 통하여 정확하면서 간단하게 송이 균 판별을 위하여 사용할 수 있는 적절한 primer pair를 먼저 결정하고자 수행하였다. 하지만, 추출된 genomic DNA를 바탕으로 TMF/TMR primer 및 MK56/MK57 primer에 의한 PCR 산물은 송이 DNA band가 다중으로 나오거나 우리나라 송이 균주와 미국 균주를 구별하기 어려웠

다(그림 3-3-15). PCR 기종과 각종 조건의 차이에 기인할 수 있으나 과학의 기본적인 특성인 재연성 및 구별성이 떨어지는 기법이라고 판단되어 기존의 연구 결과를 적극적으로 수용하여 활용할 수 없다는 결론을 얻었다.



<그림 3-3-15> TMF/TMR 및 MK56/MK57을 이용한 2종 외생균근의 PCR 증폭결과.

Lane 1 : *Tricholoma magnivelare*(KFRI 457), TMF/TMR

Lane 2 : *T. matsutake*(KFRI 689), TMF/TMR

Lane 3-4 : *T. magnivelare*(KFRI 457), MK56/MK57

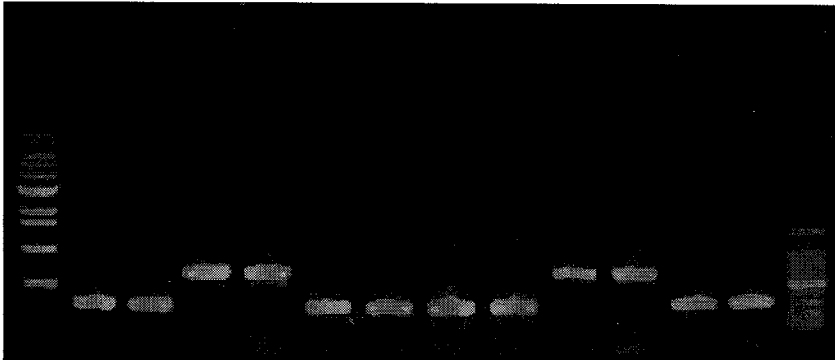
Lane 5-6 : *T. matsutake*(KFRI 689), MK56/MK57

#### 다) ITS primer에 의한 PCR

앞 선 실험에서 기존의 DNA 증폭 방식을 송이 균주의 구분을 위하여 사용할 수 없는 것으로 결론을 내리게 되었으므로, 버섯류에 특징적으로 conserved하게 가지고 있는 ITS 영역 primer를 이용한 PCR을 실시하게 되었다. ITS primer의 조합에 의한 PCR은 모든 영역에서 밴드가 깨끗이 분리되었고, primer set의 조합에 따라서 우리나라 송이 균주와 미국 송이 균주를 분별할 수 있었다.

또한, 이후에 설명하게 될 송이 집종 소나무 묘목의 뿌리 속에 있는 송이 균주의 존재 여부도 확실히 파악할 수 있어서 ITS primer에 의한 PCR 기법을 소나무 묘목의 송이 집종 여부의 판단 기준이 되는 primer pair로 결정할 수 있었다.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M(100bp)



<그림 3-3-16> ITS primer set에 의한 PCR 증폭결과.

Lanes 1-2 : *Tricholoma magnivelare*(KFRI 457), ITS1/ITS2;

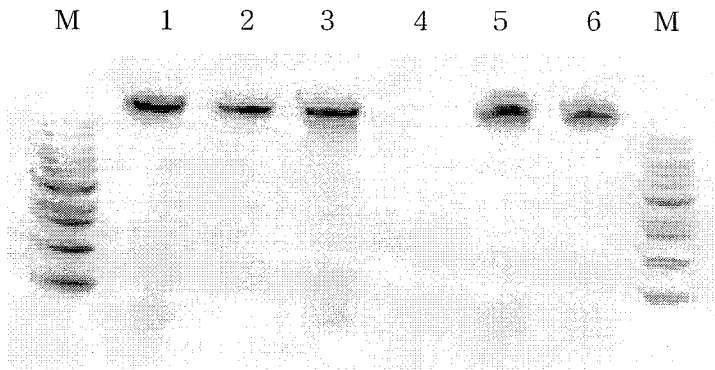
Lanes 3-4, *Tricholoma magnivelare*(KFRI 457), ITS1/ITS4;

Lanes 5-6, *Tricholoma magnivelare*(KFRI 457), ITS1/ITS5.8s;

Lanes 7-8, *Tricholoma matsutake*(KFRI 689), ITS1/ITS2;

Lanes 9-10, *Tricholoma matsutake*(KFRI 689), ITS1/ITS4;

Lanes 11-12, *Tricholoma matsutake*(KFRI 689), ITS1/ITS5.8s.



<그림 3-3-17> 소나무 뿌리에서 추출한 genomic DNA.

Lanes 1-2 : 송이가 접종되지 않은 뿌리

Lanes 3-4 : 다른 균에 의하여 오염된 뿌리

Lanes 5-6 : 송이(*Tricholoma matsutake*, KFRI 689)가 접종된 뿌리

## 2) 접종묘 내에서의 확인

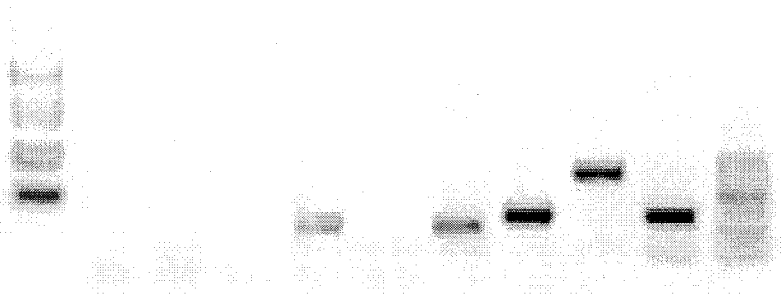
### 가) Genomic DNA 분리

결정된 primer pair에 의한 증폭 결과로 얻은 염기서열 결정으로 접종묘 내의 소나무 뿌리에 송이균이 감염되었는지 여부를 알아보기 위하여 접종묘 내 소나무 뿌리를 채취하여 실시하였다. 무균 소나무 뿌리, 송이 접종 소나무 뿌리 및 잡균이 오염된 소나무 뿌리시료에서 DNA 추출 및 확인을 하였는데(그림 3-3-17), 다른 균에 의하여 오염된 뿌리는 송이 접종 소나무 생산과정에서 발견된 것으로서 다음 단계에서 어떤 균인지 확인할 수 있었다.

### 나) ITS primer에 의한 PCR

잡균을 포함한 뿌리는 sequencing 결과 *Penicillium* 계통 균으로 확인되었고, 송이 접종 소나무 뿌리는 sequencing 결과 *Tricholoma matsutake* (우리나라 송이)를 포함하고 있음을 확인하여 접종묘 내 감염 여부를 판단하는 판별 기법으로 확정할 수 있었다.

M    1    2    3    4    5    6    7    8    9    M(100bp)



<그림 3-3-18> 소나무 뿌리에서 추출한 genomic DNA의 PCR 증폭 결과.

Lanes 1-3 : 송이가 접종되지 않은 뿌리, ITS1/ITS2, ITS1/ITS4, ITS1/ITS5.8s

Lanes 4-6 : 다른 균에 의하여 오염된 뿌리, ITS1/ITS2, ITS1/ITS4, ITS1/ITS5.8s

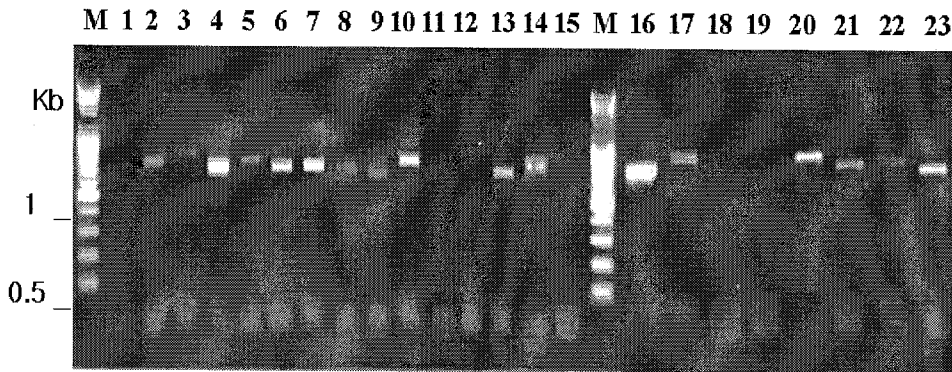
Lanes 7-9 : 송이(KFRI 689)가 접종된 뿌리, ITS1/ITS2, ITS1/ITS4, ITS1/ITS5.8s



### 3) 다른 균근과의 비교

#### 가) DNA 추출 및 PCR, band 확인

송이균 외 다른 균근과의 RAPD 비교를 위해 국립산림과학원 내 홍릉 수목원(서울시 동대문구 청량리 2동)에서 수집한 7개의 균근성 버섯 및 대조구로 강원도 양양 서면에서 생산된 송이버섯과 강원도 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)에서 수집한 15개의 균근성 버섯 중 1, 11, 12, 15, 18, 19 lanes 를 제외한 16개의 다른 균주의 genomic DNA는 대체적으로 잘 분리되었다. 여기에서 잘 분리되지 않은 6가지의 균주는 여러 가지 PCR 조건을 맞추어 가면서 분리를 계속 시도하였으나 잘 분리되지 않아 이 균주들은 제외하고 부분 염기서열 결정에 들어갔다.



<그림 3-3-19> 여러 종류의 외생균근 genomic DNA 추출결과.

Lanes 1-7 : 홍릉 시험림에서 수집된 외생균근 균주

Lanes 8 : 양양군 서면에서 수집된 송이 균주

Lanes 9-23 : 홍천 시험지에서 수집된 외생균근 균주

#### 나) 부분 염기서열에 의한 동정

GenBank database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)를 통한 BLAST 검색 (Index 참고)결과, 서울시 동대문구 청량리 2동 국립산림과학원 내 홍릉수목원에서 수집한 6개의 균근은 <표 3-3-4>에서 보는 바와 같이 상동성이 매우 높게 나타났다. 한편 강원도 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)에서 수집한 균주 들은 10개의 균주로 검색되었다(표 3-3-5).

<표 3-3-4> 홍릉 시험림에서 수집된 외생균근 균주의 식별결과

번호	분류명	학명(추정 이름)	BLAST 결과	상동성(%)
2	모래밭버섯	<i>Pisolithus tinctorius</i>	<i>Pisolithus tinctorius</i>	611/626(97%)
3	못버섯	<i>Chroogomphus rutilus</i>	<i>Chroogomphus rutilus</i>	480/487(98%)
4	노랑민길 그물버섯	<i>Phylloporus bellus</i>	<i>Leucogyrophana pinastri</i>	173/176(98%)
5	젓비단 그물버섯	<i>Suillus granulatus</i>	<i>Suillus granulatus</i>	623/637(97%)
6	호박젓버섯	<i>Lactarius laeticolorus</i>	<i>Lactarius laeticolorus</i>	427/435((98%)
7	황소비단 그물버섯	<i>Suillus bovinus</i>	<i>Suillus bovinus</i>	650/641(99%)

<표 3-3-5> 홍천 시험지에서 수집된 외생균근 균주의 식별결과

번호	분류명	학명(추정 이름)	BLAST 결과	상동성(%)
9	황금피꼬리버섯	<i>Craterellus lutescens</i>	<i>Craterellus lutescens</i>	110/121(90%)
10	무늬노루털버섯	<i>Sarcodon scabrosus</i>	<i>Thelephoroid mycorrhizal</i>	610/620(98%)
13	젓버섯아재비	<i>Lactarius hatsudake</i>	<i>Lactarius quieticolor</i>	595/612(97%)
14	송이	<i>Tricholoma matsutake</i>	<i>Tricholoma matsutake</i>	502/505(99%)
16	노랑젓버섯	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	633/681(92%)
17	능이	<i>Sarcodon aspratus</i>	<i>Sarcodon aspratus</i>	485/493(98%)
20	노랑무당버섯	<i>Russula flavida</i>	<i>Russula versicolor</i>	155/185(83%)
21	비단그물버섯	<i>Suillus luteus</i>	<i>Suillus luteus</i>	625/633(98%)
22	땅송이	<i>Tricholoma terreum</i>	<i>Tricholoma terreum</i>	637/642(99%)
23	우산버섯	<i>Amanita vaginata</i>	<i>Amanita vaginata</i>	399/420(95%)

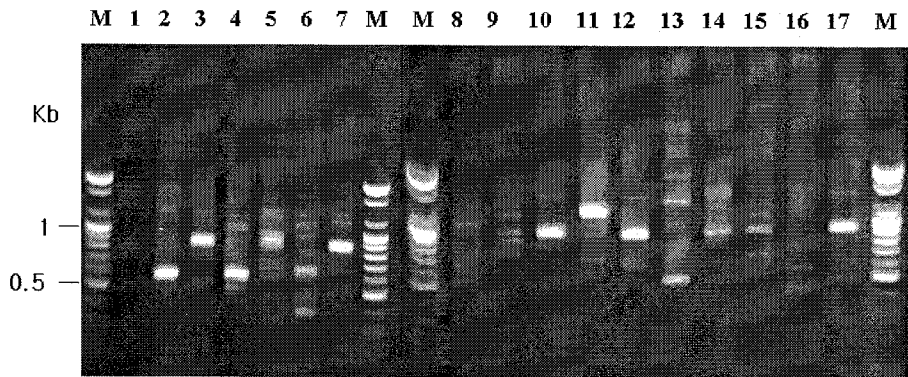
다) RAPD 기법에 의한 분류

(1) OPA primer에 의한 분류

여러 가지 Operon primer 들 중에서 OPA 4, 7 및 8을 중심으로 RAPD 분석을 해 본 결과 OPA 7(그림 3-3-22, 23)에 의한 결과는 밴드가 나오

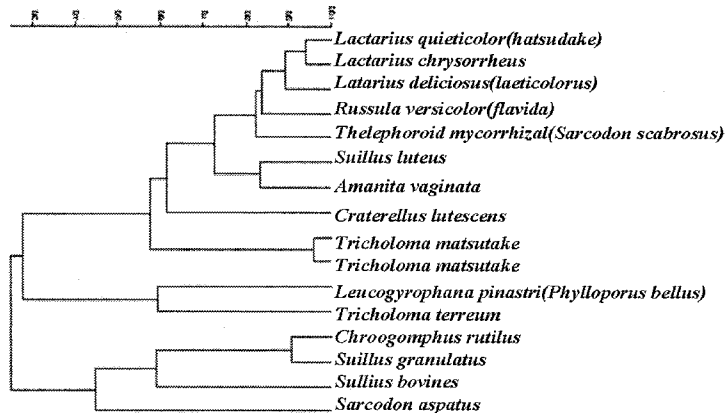
지 않은 것들이 보이고, OPA 8(그림 3-3-24, 25)을 이용한 결과는 밴드가 보이기는 하나 변별력을 보이지 않았다. 그러나 OPA 49(그림 3-3-20, 21)는 대체적으로 밴드가 분류할 수 있는 수준으로 나와 다른 균주와의 비교에는 OPA 4 primer에 의한 연관 지도를 작성하는 것이 바람직하다고 결론지었다. 그러나 Operon primer는 대체적으로 fungi의 RAPD 분류에 잘 적용되는 것으로 알려져 있었으나(Maki 등, 2001), 외생균근의 분류와 연관성을 검색할 때 적합한지는 좀더 연구가 필요한 부분이며, 외생균근에 적합한 marker 개발이 이루어져야 할 것으로 보여졌다.

### OPA4 Primer에 의한 분류



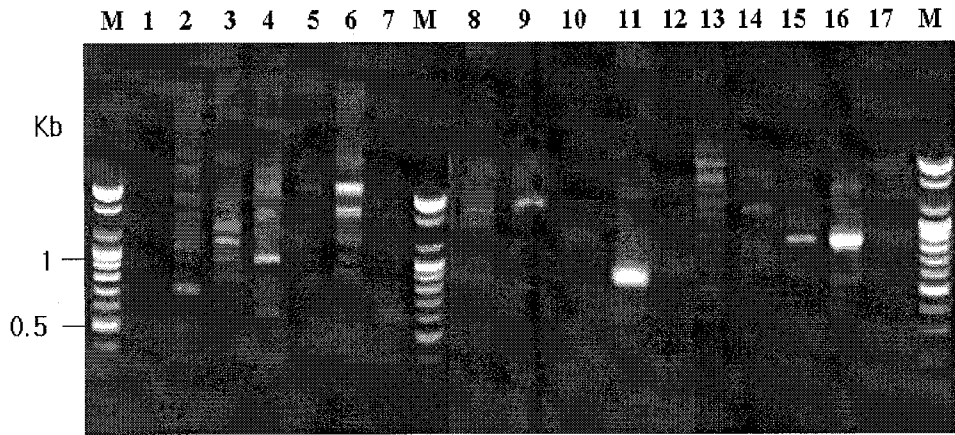
<그림 3-3-20> OPA4 primer를 이용하여 얻은 외생균근의 RAPD 지문.

Lanes 1-6 : 홍릉 시험림에서 수집된 외생균근 균주  
 Lanes 7 : 양양군 서면에서 수집된 송이 균주  
 Lanes 8-17 : 홍천 시험지에서 수집된 외생균근 균주



<그림 3-3-21> OPA4 primer를 이용하여 얻은 외생균근의 계통수

## OPA7 Primer에 의한 분류

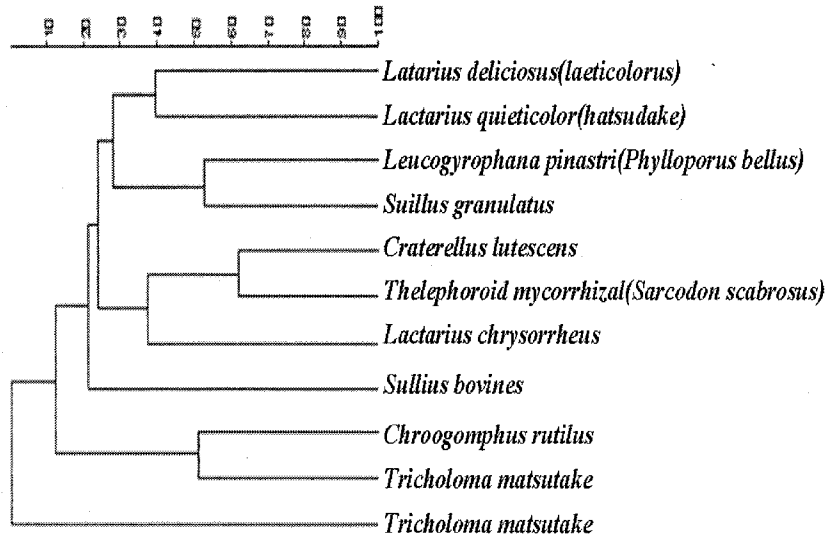


<그림 3-3-22> OPA7 primer를 이용하여 얻은 외생균근의 PAPD 지문.

Lanes 1-6 : 홍릉 시험림에서 수집된 외생균근 균주

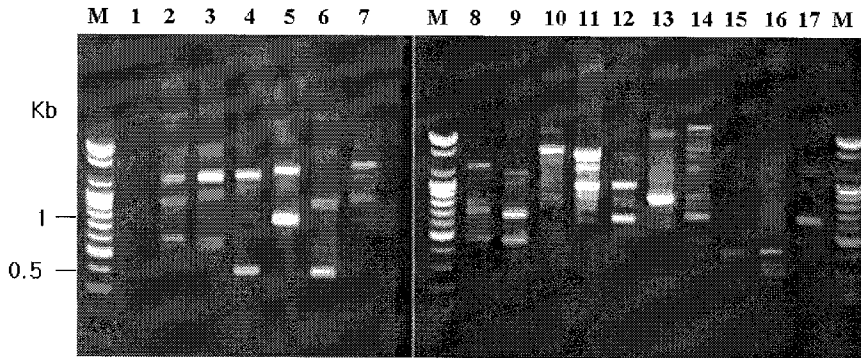
Lanes 7 : 양양군 서면에서 수집된 송이 균주

Lanes 8-17 : 홍천 시험지에서 수집된 외생균근 균주



<그림 3-3-23> OPA7 primer를 이용하여 얻은 외생균근의 계통수

### OPA8 Primer에 의한 분류

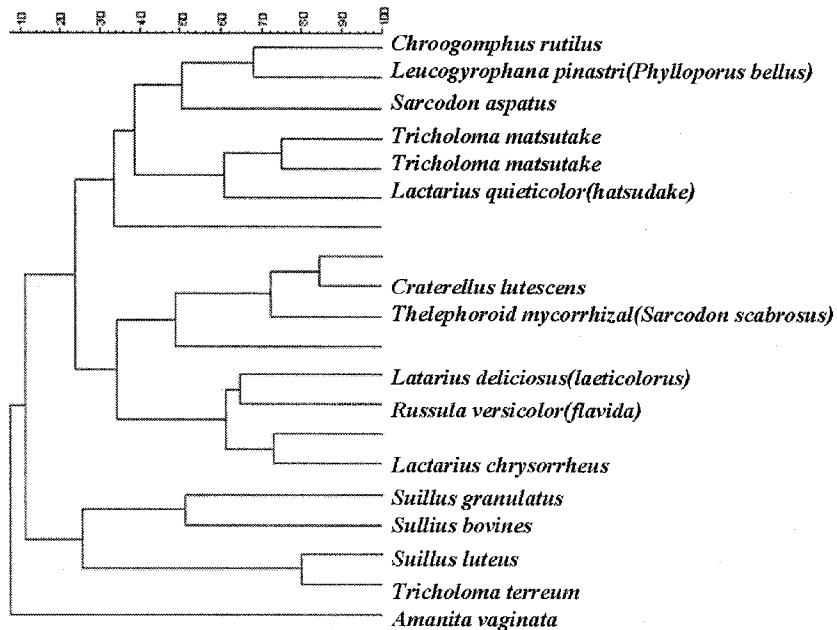


<그림 3-3-24> OPA8 primer를 이용하여 얻은 외생균근의 PAPD 지문.

Lanes 1-6 : 홍릉 시험림에서 수집된 외생균근 균주

Lanes 7 : 양양군 서면에서 수집된 송이 균주

Lanes 8-17 : 홍천 시험지에서 수집된 외생균근 균주



<그림 3-3-25> OPA8 primer를 이용하여 얻은 외생균근의 계통수

<참고> 각종 외생균근의 부분 염기서열에 의한 INDEX

1. 모래밭버섯(*Pisolithus tinctorius* Coker et Couch)

*Pisolithus tinctorius*

Identities = 611/626 (97%), Gaps = 12/626 (1%)

16 AGGGTGCAGAGGGGGN-CGGAGAGATCCGTTCCCTCCGAAGCCCTTCGTTTTTACTCTTTG 74  
22 AGGGTGCAGAGGGGGATCGGAGAGATCCGTTCCCTCCGAAGCCCTTCGTTTTTACTCTTTG 81  
75 ACACACCCCGGTGCACCCCATTCGCAAGGGTCCCTTCGGGACCTGTGCGTTTCGTCTCTG 134  
82 ACACACCCCGGTGCACCCCATTCGCAAGGGTCCCTTCGGGACCTGTGCGTTTCGTCTCTG 141  
135 ACTCCGATGCTACAGAATGTCGATAGCATTGATATATATATAAAAAATACAACCTTTCAG 194  
142 ACTCCGATGCTACAGAATGTCGATAGCATTGATATATATATAAAAAATACAACCTTTCAG 201  
195 CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATCGCGATAAGTAATGTG 254  
202 CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATCGCGATAAGTAATGTG 261  
255 AATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTC 314  
262 AATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTC 321  
315 CGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATCGAAATCTCAAACCAAGCCTTCnnnnnnGACT 374  
322 CGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATCGAAATCTCAAACCAAGCCTTCTTTTTTTGACT 381  
375 TCGGTCCAAGGCTCGGGTPTGGATCGTTGGNAGTCTGCGGGCGACGCACGTGCTCGGCTC 434  
382 TCGGTCCAAGGCTCGGGTPTGGATCGTTGGGAGTCTGCGGGCGACGCACGTGCTCGGCTC 441  
435 TCCTGAAATGCATTAGCGGTGGGCATGCAAGTCTTGCTTGGCACCAGCCTCTCCCGGCGT 494  
442 TCCTGAAATGCATTAGCGGTGGGCATGCAAGTCTTGCTTGGCACCAGCCTCTCCCGGCGT 501  
495 CATAATGATCGTCCGGGCTTGCCAGCTGCAAAGGGACGTFGCCATGCTTCTCCAACCTT 554  
502 CATAATGATCGTCCGGGCTTGCCAGCTGC-AAGGGACGTFGCCATGCTTCTCCAACCTT 560  
555 TCGGAGCCC-----CCTCTCCTGGGCGCTCTGCATTGCAAGGCTTGACCTCAAAT 604  
561 TCGGAGCCCCCACCCTCCTCTCCTGGGCGCTCTGCATTGCAAGGCTTGACCTCAAAT 620  
605 CAGGTAGGGCTACCCGCTGAACTTAA 630  
621 CAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA 646

2. 못버섯(*Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) O. K. Miller)

*Chroogomphus rutilus*

Identities = 480/487 (98%), Gaps = 3/487 (0%)

18 CTGATTTGAGGTCAA-CATAAAGAAGGAAGACATCGAAGGCGATGTCGACGTGTTGGAGG 76  
666 CTGATTTGAGGTCAAACATAAAGAAGGAAGACATCGAAGGCGATGTCGACGTGTTGGAGG 597  
77 CACGAGACCTTCTGTTCATGCGCTTCAGAAGACGGCGATCATTATCACGCCGAAAGCCTTG 136

536 CACGAGACCTTCTGTTCATGCGCTTCAGAAGACGGCGATCATTATCACGCCGAAAGCCTTG 537  
 137 TCGCGCAAAGTCGAAAGTCGATCGCAAGCCGATGCATTTTCAGGAGAGCCCAAGTCCCAGA 196  
 536 TCGCGCAAAGTCGAAAGTCGATCGCAAGCCGATGCATTTTCAGGAGAGCCCAAGTCCCAGA 477  
 197 CGCAAAGGTCAGGTCTCTGGCAGCCCCACTATCCAAGCTCCCCCTCGAAGCTAATCGA 256  
 476 CGCAAAGGTCAGGTCTCTGGCAGCCCCACTATCCAAGCTCCCCCTCGAAGCTAATCGA 417  
 257 GAGGGGTTGAGAATTTACTGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAACACCGAGGAGCGC 316  
 416 GAGGGGTTGAGAATTTACTGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAACACCGAGGAGCGC 357  
 317 AATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGTAGATCTGCAATTCACATTACATATCGCA 376  
 356 AATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGTAGATCTGCAATTCACATTACATATCGCA 297  
 377 ATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCATTGCTGAAAGTTGTAATAA 436  
 296 ATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCATTGCTGAAAGTTGTAATAA 237  
 437 CTTTTTATCTCGCCGANCCNCGTCGTGGGNTCGACGANAGTAAACATTCAGAGACTTTTC 496  
 236 C-TTTTTATCTCGCCGA-CCCACGTCGTGGGCTCGACGATAGTAAACATTCAGAGACTTTTC 179  
 497 TAAACTG 503  
 178 TAAACTG 172

### 3. 노랑망길표코버섯(*Phylloporus bellus* (Mass.) Corner)

*Leucogyrophana pinastri*(이불버섯속) ??

Identities = 173/176 (98%), Gaps = 0/176 (0%)

353 TGGTTGAGAATTAATTTGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAG 412  
 444 TGGTTGAGAATTTAAATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAG 385  
 413 ATGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTTGAAATCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATT 472  
 384 GTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTTGAAATCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATT 325  
 473 CGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTAATA 528  
 324 CGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTAATA 269

### 9-황금피꼬리버섯(*Cantharellus luteocomus* Bigelow")

*Craterellus lutescens*

Identities = 110/121 (90%), Gaps = 1/121 (0%)

334 GAGAGATTCAAATGACCCTCNANN-GATGTACCCCTATGAGTCAACCCCAATTGGAAG 392  
 422 GAGAGATTCAAATGACCCTCAAACAGATGTACCCCTATGAGTCAACCCCAATTGGAAG 363  
 398 CGANCGAGAGGGCGCAATTGCGTTCNAAGATTCNATGAATCACTTGGGGTTATTCGTAAA 452  
 362 CAACCGAGAGGGCGCAATTGCGTTCNAAGACTCGATGATTCACTTGGTGTATTCGTAAA 303  
 453 T 453  
 302 T 302

**10-무늬노루털버섯(*Sarcodon scabrosus* Karst.)**

*Thelephoroid* mycorrhizal

Identities = 610/620 (98%), Gaps = 7/620 (1%)

16 TGATTTGAGGTCGAAGGGTCAAAGAAATACTTTAACAAGCCCCCTCTAGGCTTTTCTCTGC 75  
625 TGATTTGAGGTCGAAGGGTCAAAGAAATACTTTAACAAGCCCCCTCTAGGCTTTTCTCTGC 566  
76 GACGTAGATAATTATCACGTCAAAGATACTTTGCGCCGAGATAACAAAAGGCTTGGAATG 135  
565 GACGTAGATAATTATCACGTCAAAGATACTTTGCGCCGAGATAACAAAAGGCTTGGAATG 506  
136 CTTTTAGGAGCAGCCGGTAACAAAAGGCCAGCAAAGCGCTCCAAATCCAAC TTCACCCCTC 195  
505 CTTTTAGGAGCAGCCGGTAACAAAAGGCCAGCAAAGCGCTCCAAATCCAAC TTCACCCCTC 446  
196 TT-AAGAAAAGAGGGCAGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAAT 254  
44 TTTAAGAAAAGAGGGCAGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAAT 386  
255 ACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCACAT 314  
385 ACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCACAT 326  
315 TACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAA 374  
325 TACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAA 266  
375 AGTTGTATTCAATTCGCGTCAGACGCGGTTACAAACGTTCTAATAGACTTTAACAAAGCG 434  
265 AGTTGTATTCAATTCGCGTCAGACGCGGTTACAAACGTTCTAATAGACTTTAACAAAGCG 206  
435 TTCGTAAAAACTTCATAGCCGAGGCATTCGAAACCAAAAAGGCTTCGTGATCATCCCCAGC 494  
205 TTCGT-AAAACCTTCATAGCCGAGGCATTCGAAACCAAAAAGGCTTCGTGATCATCCCCAGC 147  
495 TACAGTTGGTGCACAAGGTGTGAAGAAAGGACTGAAACGCCAGGGGTCAAGGCGTGCACA 554  
146 TACAGTTGGTGCACAAGGTGTGAAGAAAGGACTGAAACGCCAGGGGTCAAGGCGTGCAC- 88  
555 TATACCTCAACGAAGAGGGCCAGCAACAACCCGGACGATTCCCCAAACGTTCCGGTGT TTC 614  
87 -ATACCTCAACGAAGA-GGCCAGCAACAACCCAGACGATT-CCCAAACGTTCCGGTGT TTC 31  
615 ATTAATGATCCTTCCGCAGT 634  
30 A-TAATGATCCTTCCGCAGT 12

**13-젓버섯아재비(*Lactarius hatsudake* Tanaka)**

*Lactarius quieticolor* sporocarp

Identities = 595/612 (97%), Gaps = 3/612 (0%)

18 CGATTTGAGGTCA-GGGTTCGTGGGGTCGAGAGAGTCTCCCGAGAAGGGAGACACTCCCA 76  
689 CGATTTGAGGTCAAGGGTTCGTGGGGTCGAGAGAGTCTCCCGAGAAGGGAGACACGCCCA 630  
77 AACNTCGTCTCGTCGAGACGGTTAGAAGCAGGTCCCAAATGCAACAGAGCCAGAAACCGA 136  
629 AACGTCGTCTCGTCGAGACGGTTAGAAGCAGGTCCCAAATGCAACAGAGCCAGAAACCGA 570  
137 GTCATGGAACATCTTATCACATGTCAAGGATCGGCAAAGAGGACCCCGCTAATTCATTT 196



569 GTCATGGAAACATCTTATCACATGTC AAGGATCGGCAAAGAGGACCCCGCTAATTCATTT 510  
 197 AAGAGGAGCTGGCTCTAGAGAGANGCCAGCAAAGGCCTCCAAAGTCCAAGCCTCCTTCGG 256  
 509 AAGAGGAGCTGGCTCTAGAGAGACGCCAGCAAAGGCCTCCAAAGTCCAAGCCTCCTTCGG 450  
 257 TGTCCAGAAGAAAACCGAGAAGGTTGAGATTTTCACGACACTCAAACGGGTGTGCCCTC 316  
 449 TGTCCAGAAGAAAACCGAGAAGGTTGAGATTTTCACGACACTCAAACGGGTGTGCCCTC 390  
 317 GGAATACCAAGGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAATT 376  
 389 GGAATACCAAGGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAATT 330  
 377 CACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTG 436  
 329 CACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTG 270  
 437 TTGAAAGTTGTATTGATTGCGTIGICATCGCAAAGTGGGGTCATTCTACACTTTTTTAAAA 496  
 289 TTGAAAGTTGTATTGATTGCGTIGICATCGCAAAGTGGGGTCATTCTACACTTTTTTAAAA 210  
 497 GGGGTTTGTGTGAAAACCGCANGCATCCCAAAGGGTGCCCGCGGNGGTGCAC-AAANNG 555  
 209 GGGGTTTGTGTGAAAACCGCAAGCATCCCAAAGGGTGCCCGCGGTTGGTGCACAAAAGGG 150  
 556 NGAGATGGNITTTTATGTGAGAGAGAGGACGTGCTCC-GNNTGCACGACTTTTIGNNICAAA 614  
 149 TGAGATGGATTTTATGTGAGAGAGAGGACGTGCTCCGGCGTGCACGACTTTTGTGTCAA 90  
 615 AAGTCAGCGACA 626  
 89 AAGTCAGCGACA 78

#### 14-총이

*Tricholoma matsutake*

Identities = 502/505 (99%), Gaps = 2/505 (0%)

15 CTGATTTGAGGTCAAA-TGTCAGAGATTGTCTCTTTTACGAGACGATTAGAAGCCGACCTA 73  
 630 CTGATTTGAGGTCAAAAATGTCAGAGATTGTCTCTTTTACGAGACGATTAGAAGCCGACCTA 571  
 74 TTACATTGTTTACAATGGCGTAGATAAATTATCACACCAAATGCTAGACAACAAGGGCCCC 133  
 570 TTACATTGTTTACAATGGCGTAGATAAATTATCACACCAAATGCTAGACAACAAGGGCCCC 511  
 134 GCTAATACATTTAAGGAGAGCAGACTTCTGAGCAGCCTGCAACAACCTCCAAAAATCCAAG 193  
 510 GCTAATACATTTAAGGAGAGCAGACTTCTGAGCAGCCTGCAACAACCTCCAAAAATCCAAG 451  
 194 CCTATTCAACAAAAAGCTGAAAAGGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCC 253  
 450 CCTATTCAACAAAAAGCTGAAAAGGTTGAGAATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCC 391  
 254 TCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAA 313  
 390 TCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAA 331  
 314 TTCACATTACTIONTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGT 373  
 330 TTCACATTACTIONTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGT 271  
 374 TGTTGAAAGTTGTATAAGGTTTACTGGCAATTAAGCCAACCAATAACATTCCATGACAT 433

270 TGTTGAAAGTTGTATAAGGTTTACTGGCAATTAAGCCAACCAAATAACATTCCATGACAT 211  
 434 ACCGAGTGTATAATAAAAATGCATAGGCTGGnnnnnnCAAGGAAAGCCTGGCTTTTGCAG 493  
 210 ACCGAGTGTATAATAAAAATGCATAGGCTGGAAAAATACAAGGAAAGCCTGGCTTTTGCAG 151  
 494 CACGGCAATCCCTCAAACCGAGCTT 518  
 150 CACGGCAAT-CCTCAAACCGAGCTT 127

16-노란젓버섯

*Lactarius chrysorrheus*

Identities = 633/681 (92%), Gaps = 8/681 (1%)

17-능이(*Sarcodon aspratus* S. Ito)

*Sarcodon aspratus*

Identities = 485/493 (98%), Gaps = 3/493 (0%)

23 AGGGTGTGTGCTGGCCTCCTCTCTAGAGGGGGTATGTGCACGCCTGAATCGTTTATCCTC 82  
 26 AGGGTGTGTGCTGGCCTCCTCTCTAGAGGGGGTATGTGCACGCCTGAATCGTTTATCCTC 85  
 83 CCTTCTTTACACCCTGTGCACAACCTGTAGCTTGGGATGATCACGGAGCGTGCCACTTG 142  
 86 CCTTCTTTACACCCTGTGCACAACCTGTAGCTTGGGATGATCACGGAGCGTGCCACTTG 145  
 143 TGTGGCCGCTCGAATGCCCTCGCTATGAACGCTTTTATATAAAACCCCTTATAAAGTCTT 202  
 146 TGTGGCCGCTCGAATGCCCTCGCTATGAACGCTTTTATATAAAACCCCTTATAAAGTCTT 205  
 203 GTAGAATGTCAA-TAAGCGTGTAAACAGCGCGAAAAATAATACAACCTTTCAGCAACGGATC 261  
 206 GTAGAATGNCAAATAAGCGTGTAAACAGCGCGAAAAATAATACAACCTTTCAGCAACGGATC 265  
 262 TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA 321  
 266 TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA 325  
 322 ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCAT 381  
 326 ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCAT 385  
 382 GCCTGTTTGAGTGTATGAAGTCTCAACTGCTTTGACTTTGTGTGTAAGTGAAGTTGG 441  
 386 GCCGTGTTGAGTGTATGAAGTCTCAACTGCTTTGACTTTGTGTGTAAGTGAAGTTGG 445  
 442 AGTTGGA-GGGTCTTTGCTGGCGTGGGCTTGTGTGT-GGTTTTGCTACATGCTTGTCTG 499  
 446 AGTTGGAGGGTCTTTGCTGGCGTGGGCTTGGTGTGNGGGTTTGTACATGCTTGTCTG 505  
 500 CTTGTCGGCTCCT 512  
 506 CTTGNCGGCTCCT 518

20-노랑무당버섯(*Russula flavida* Frost et Peck)

*Russula versicolor*

Identities = 155/185 (83%), Gaps = 1/185 (0%)

256 AGAAANGGACTTTGAGAATTTTCANGACNCTCAAACGGGTGNGCCCTCGGAATGCCAAGG 315  
414 AGAAAAGGATTTTGAGAATTTTCACGACACTCAAACGGGTGTGCCCTCGGAATGCCAAGG 355  
316 GCGCACGGNGCGNCAANGATTTCGANGANTNNTGNANTCTGNAATTCACAATACGNAT 375  
354 GCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATICTGCAATTCACATTACGTAT 295  
376 CGCATTTTCGNTGNGTNTCTTCATCGATGCNANAGCCNNTNAGATCCGTTGTGNAAGNTGN 435  
294 CGCATTTTCGCTGCGT-TCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGT 236  
436 ATTGA 440  
235 ATTGA 231

### 21-비단그물버섯(*Suillus luteus*(L.) S. F. Gray

*Suillus luteus*

Identities = 625/633 (98%), Gaps = 2/633 (0%)

21 TTTGAGGTCAA-CGTCAAATGAGGAAGACGCCCTAGAGGGCTCGACGCATTAGAGGCACG 79  
653 TTTGAGGTCAAACGTCAATGAGGAAGACGCCCTAGAGGGCTCGACGCATTAGAGGCACG 594  
80 GGACCATTCTGTCTTGCACCTTCGGCGAACGGCGATCATTATCACGCCAAAGGCCTTGTC A 139  
598 GGACCATTCTGTCTTGCACCTTCGGCGAACGGCGATCATTATCACGCCAAAGGCCTTGTC A 534  
140 TGCAAAGTCGAAAGTCGACCGCNAGCCGATTCATTTAAGAGGAGCCCGAGTCTCGGACGA 199  
533 TGCAAAGTCGAAAGTCGACCGCGAGCCGATTCATTTAAGAGGAGCCCGAGTCTCGGACGA 474  
200 AATCCAGTGTCTCCGGCAGCCCCAACATCCAAGCACCCGCTCGAAGCAAATCGAGAGGG 259  
473 A-TCCAGTGTCTCCGGCAGCCCCAACATCCAAGCACCCGCTCGAAGCAAATCGAGAGGG 415  
260 GTTGAGAATTTACTGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAACACCGAGGAGCGCAAGGT 319  
414 GTTGAGAATTTACTGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAACACCGAGGAGCGCAAGGT 355  
320 GCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGTAGATCTGCAATTCACATTACATATCGCGATTTCG 379  
354 GCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGTAGATCTGCAATTCACATTACATATCGCGATTTCG 295  
380 CTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTAATAACTTTT 439  
294 CTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTAATAACTTTT 235  
440 TTCICAAAGAATCGCGTCTCCTAGAAAGTCGCGACTCGATGATGGTAAAACATTCAAAGAC 499  
234 TTCICAAAGAATCGCGTCTCCTAGAAAGTCGCGACTCGATGATGGTAAAACATTCAAAGAC 175  
500 TTTCTACACGAAGAGGTATATGAAGACGGGGTCGCCCCACGCCATACGGCGAAAGGTC 559  
174 TTTCTACACGAAGAGGTATATGAAGACGGGGTCGCCCCGCGCCATACGGCGAAAGGTC 115  
560 CGGAAGAGAGCGTGCACATGCCCTAGAGGCCAGCTACANCTCTCCGCCTTTCCCTTCGC 619  
114 CGGAAGAGAGCGTGCACATGCCCTAGAGGCCAGCTACAACCTCTCCGCCTTTCCCTTCGC 55  
620 NGGATTATAATTTTCATTAATGATCCNNCCGCAG 652  
54 CGGATTATAATTTTCATTAATGATCCTTCCGCAG 22

### 3. 송이 접종묘의 이식

#### 가. 서론

최근의 송이 인공재배 연구는 소나무 유묘에 송이 균근을 형성하는 방법에 초점이 맞춰져 있다(Wang 등, 1997; Yamada 등, 1999; Vaario 등, 2000; 가 등, 2002). 그리고 야외의 성숙한 소나무에 접종하는 시도도 조금씩 이루어지고 있다(Guerin-Laguette 등, 2005). 그래서 현재의 기술로는 소나무 유묘에 송이 균근을 형성하는 것은 어려운 문제가 아니다. 문제는 송이 균근을 가진 유묘를 어떻게 송이가 발생하지 않는 소나무립에 옮겨서 지속적으로 송이균이 자랄 수 있게 하는 것이다.

Yamada 등(2001)은 멸균한 토양을 담은 화분에 송이 접종묘를 이식하였으나, 몇 개는 적어도 4개월 정도 생존하였고, 대부분은 한 달 안에 죽는 현상을 발견하였다. Guerin-Laguette 등(2005)은 성숙한 소나무 뿌리에서 새 뿌리를 유도하여 송이균을 접종하여 송이 균근을 형성하였다고 한다. 이와 같은 기술들은 기존의 송이 접종묘 접근에서 직접 성숙한 소나무로의 전환된 개념이다. 또한 야외 송이 감염묘의 실험도 감염묘 생산은 성공적이었지만, 이 감염묘를 송이가 발생하지 않는 소나무 성립에 옮겨서 지속적인 송이 및 버섯발생을 보고한 예도 매우 드문 편이다. 일본에서 송이 감염묘에서 송이 발생을 보고한 적은 있으나, 이 방법도 성공률이 높지 않아 지속적인 연구가 이루어지지 않은 것으로 여겨졌다.

본 연구에서는 송이 접종묘를 어떻게 하면 소나무 성립에 옮겨서 송이균을 생존시킬 수 있는 방법을 찾고자, 송이 접종묘의 순화처리와 순화처리 없이 직접 산에 식재하는 방법들에 대해서 검토하였다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 1) 송이 접종묘 순화 처리

조직배양병 속에서 6개월간 자란 KFRI 421의 송이 접종묘는 소나무립 토양을 멸균한 것과 멸균하지 않은 것을 이용하여 화분(직경 15cm 높이 17cm)에 식재하였다. 이때 송이 접종묘는 조직배양병 속의 토양을 제거한 것과 제거하지 않을 것을 식재하였다. 화분은 조직배양실에 옮겨 매 5일 간격으로 100ml 수돗물을 공급해 주었다. 6개월간 키운 소나무는 송이균의 존재를 송이 향기 유무를 가지고 판별하였다.

## 2) 송이 접종묘 비순화 처리

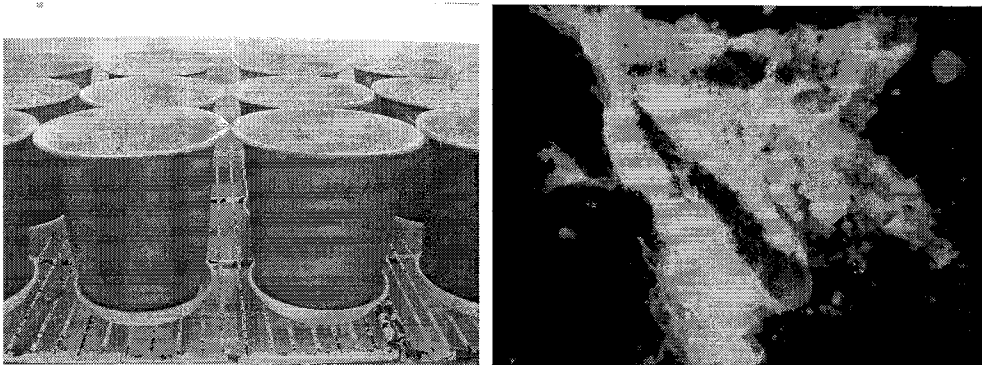
조직배양병 속에서 5개월간 자란 송이 접종묘는 홍천 송이 시험지에 2006년 4월에 이식하였다. 이때 송이 접종묘는 병을 깨어 송이균의 감염 유무를 송이향기 유무로 판별하였다. 송이 접종묘는 KFRI 421 등 4군주 10반복(총 40병)으로 처리하였다. 송이 접종묘는 50cm 간격으로 25년생 소나무림 아래에 식재를 하였다. 그리고 2개월이 경과된 시점에서 송이균의 생존 유무를 외형적 관찰로 판별하였다.

### 다. 결과 및 고찰

#### 1) 송이 접종묘 순화 처리

송이 접종묘의 순화처리는 멸균토양과 비멸균 토양을 5반복 처리하였다. 6개월 이후에 송이균은 멸균한 토양에 식재하고 송이 접종묘의 조직배양병 속의 토양을 제거한 것과 제거하지 않은 것 1개씩이 정상적으로 생존해 있었다(그림 3-3-26). 생존한 송이균은 직경이 2cm 정도로 매우 작았다. 하지만, 나머지 8개에서는 송이균이 성장한 흔적을 발견할 수 없었다. 즉, 송이 균이 사라지는 현상을 확인할 수 있었으며, 토양 비멸균 처리구는 모두 소나무 뿌리에 다른 외생균근이 감염되어 있었고 송이균은 발견할 수 없었다. 즉, 송이 접종묘의 순화처리는 반드시 멸균 토양의 화분을 사용해야 함을 시사한다.

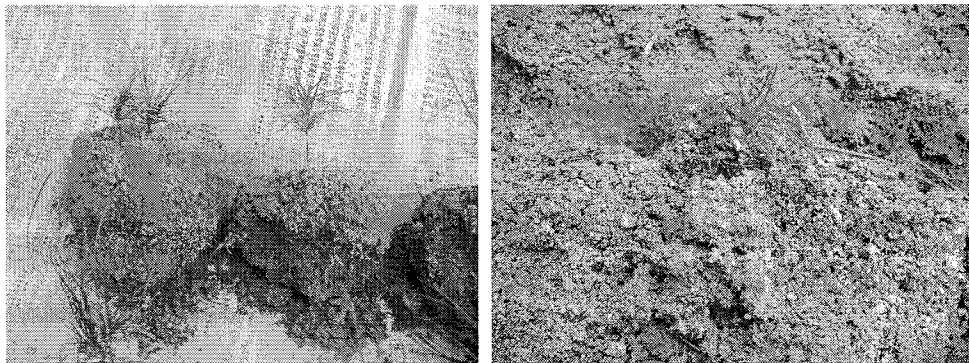
Yamada 등(2001)의 실험에서도 송이 접종묘가 멸균되지 않은 상태에서 송이균이 버티는 힘이 매우 적음을 시사하고 있다. 본 실험에서는 6개월 시점에서 점검을 하였지만, 멸균하지 않은 경우에는 이 정도의 기간을 송이균이 버티기도 힘들다는 것을 알 수 있었다. 한편, 배양병의 수분이 적으므로 조직배양실에서 순화처리하면서 소나무의 생존을 유지시키기 위한 것도 쉬운 일은 아니었다.



<그림 3-3-26> 송이 접종 6개월 시점의 소나무 묘목 순화처리.

## 2) 송이 접종묘 비순화 처리

본 실험은 조직배양실에서 순화처리 없이 직접 송이 접종묘를 야외의 큰 소나무 주변에 식재한 결과이다. 4월에 처리하여 2개월이 지난 후에 송이 접종묘를 확인하였을 때, 송이균이 살아 있는 것에서는 송이균의 존재를 확인할 수 있었고, 소나무도 정상적으로 생존하고 있었다(그림 3-3-27). 그래서 앞서 처리한 순화처리 실험에서 송이 접종묘의 순화처리가 어렵다면 직접 송이가 생산될 수 있을 정도의 미풍화 토양에 직접 이식하는 방법도 강구할 수 있는 것으로 판단되었다. 하지만, 본 실험은 보고서 작성 이후에도 계속 모니터링이 필요한 내용이다. 특히, 이 경우에는 소나무가 양수(陽樹)이므로 이식한 소나무 묘목이 잘 생존할 수 있을지가 큰 문제가 되며, 이식한 지역의 광량 조절을 위한 간벌 및 가지치기 작업이 병행되어야만 할 것이다.



<그림 3-3-27> 순화처리 없이 직접 이식한 송이 접종묘의 생존 모습(이식 후 2개월 경과 시점).

## 라. 결론

송이 접종묘의 순화처리를 위해서는 반드시 토양을 멸균하여 화분을 만든 후 사용할 필요성이 있었다. 한편, 순화 처리에 어려움을 극복하기 위한 대안으로 송이가 생산될 수 있을만한 미풍화 토양에 직접 이식하는 방법도 고려해 볼 필요가 있었다. Guerin-Laguette 등(2005)은 액체 배양한 송이 균사체를 소나무 뿌리에 직접 접종한 방법에서 송이 균근을 형성시켰기에 액체 배양한 송이 균사체 대신 송이 접종묘를 직접 접종하는 방법도 시도해 볼 필요성이 있었다.

#### 4. 송이 접종묘의 순화를 위한 또 다른 시도

##### 가. 서론

앞에서 순화처리를 위한 시도에서 실패를 거듭하면서 본 연구는 쉽게 진척되지 못했다. 송이 산지에서 묘목에 송이 균근을 형성시킨 후 새로운 장소로 옮겨 심거나 야외에서 힘들게 작업하지 않고 실내에서 소나무에 송이 균근을 형성시킨 다음 야외로 내보내는 방법은 불가능한 것일까?

이런 의문에 대한 답을 찾기 위해 문헌을 다시 고찰하면서 새로운 시도를 하게 되었는데, Yamada 등(1999)이 소나무 묘목에 송이 균근을 만든 경우에서도 6개월 이상 장기 관찰하며 순화처리를 했지만 야외에 안정적으로 이식하지 못한 것을 알 수 있었다. 한편, Guerin-Laguette 등(2005)은 소나무 뿌리에 Sphagnum moss를 감은 후 auxin을 처리하고 12개월 후 새롭게 자란 뿌리에 송이 균을 접종했을 때 송이 균근이 형성되었다고 보고하였는데, 본 연구성과는 수분 공급이라는 측면에서 기존의 시도와 다르다는 판단을 하게 되었다. 이에 따라 소나무 묘목에 송이균을 접종하고 최대한 장기간 실내에서 배양하며, 균근 형성이 된 묘목에 충분히 수분을 공급하면서 점차적으로 순화시켰을 때 어떤 모습을 띠게 되는지 검토하는 작업을 실시하였다.

##### 나. 재료 및 방법

###### 1) 실내 무균배양 접종묘의 균근 형성을 조사

###### 가) 송이균 접종묘 준비

1.2ℓ 용량의 조직배양병에 마사토양 600ml를 넣고 pH 5.5로 조절된 1/4 PDMP 배지를 60ml 씩 넣은 후 고압멸균 하였다. 이렇게 준비된 토양배지에 무균상태에서 발아시킨 소나무를 1~2개씩 이식하고 15~20일 경과 후 소나무 싹이 토양 밖으로 노출되면 액체 배양한 송이균 5ml를 뿌리 부분에 접종하였다. 접종묘의 배양은 20~25℃, 24시간 명조건(2,000~5,000 LUX)에서 진행되었고 배양 기간은 4~12개월로 하였다. 균근 형성을 조사에는 45개 접종묘 배양병이 사용되었다.

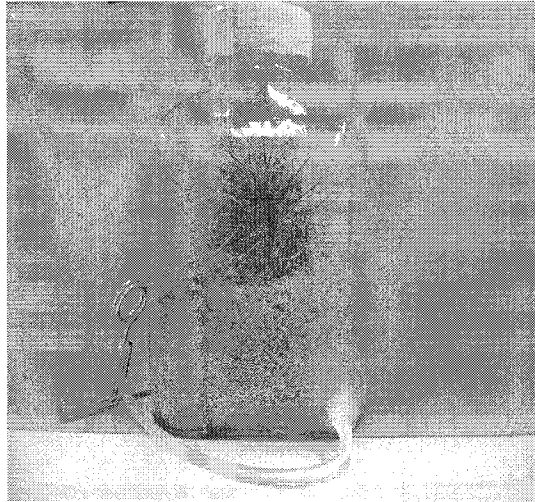
###### 나) 균근 형성 여부 확인

균근 형성여부는 먼저 육안으로 노출된 소나무 뿌리부분을 관찰하고, 송이 균근 특유의 냄새를 확인한 후 현미경 관찰을 통해 최종 확인했으며, 길이 10mm 이상의 모든 뿌리에 대해 균근이 형성된 부분의 길이를 측정하였다.

## 2) 실외 순화처리

### 가) 송이균 접종묘 준비

균근 형성을 조사에서 사용했던 것들과 동일한 방법으로 제작되고 배양된 접종묘를 사용하였다. 단, 화분을 이용하여 멸균토양을 넣고 순화처리를 한 기존 실험에서 송이 균근이 포함된 토양의 구조가 급격히 훼손되면서 토양의 이화학적 변화가 심한 것을 감안하여 배양병을 그대로 이용하는 방법을 강구하였다. 병을 그대로 유지하면서 관수 및 배수처리가 가능한 구조를 만들기 위하여 접종묘를 배양 중인 배양병 하단에 천공기(DREMEL Multipro 395JA)를 이용하여 구멍을 뚫고 실리콘관(3×4.5mm)을 연결한 후 실리콘관의 끝 부분을 클립으로 개폐할 수 있게 하였다(그림 3-3-28). 실외 순화처리에 들어갈 때 이들의 배양일수는 송이균 접종 후 20~28개월이 경과한 시점이었다.



<그림 3-3-28> 송이균 접종묘의 순화처리를 위한 준비

### 나) 접종묘의 순화처리

실리콘 관을 연결해서 야외로 내 보낸 배양병에의 수분 공급은 8가지 처리로 했으며, 처리 당 8반복으로 하였다(표 3-3-6). 배양병 내의 토양은 건조해지거나 과습하지 않게 관리했으며, 물을 줄 때에는 메스실린더를 사용해서 각 처리구별로 병당 45ml를 넣어주었다. 실험은 국립산림과학원 구내의 야외조건에서 실시하였고, 차광막과 비닐로 만들어진 간이시설 내부의 온도 및 습도 조사를 위해 디지털온습도계(HOBO)를 설치하였다.



<표 3-3-6> 송이균 접종묘의 순화처리에 사용된 물질들

처리번호	처리 재료
1	증류수
2	증류수 + Tween 80(0.02 %)
3	증류수 + Tween 80(0.1 %)
4	증류수 + Tween 80(0.5 %)
5	증류수 + Tween 80(2.5 %)
6	증류수 + 1/4 PDMP(10 %)
7	증류수 + 1/4 PDMP(1 %)
8	증류수 + Tween 80(0.5 %) + 1/4 PDMP(10 %)

다) 순화처리 기간별 관리방식

(1) 순화처리 6주 경과시점

실험은 2006년 3월 21일~5월 3일까지 차광막과 비닐로 햇빛과 비를 차단한 사방이 트인 간이시설에서 실시했으며, 광도가 20,000 LUX 이하가 되도록 관리했다.

수분을 공급할 때는 배양병 뚜껑을 열고 메스실린더를 이용해서 넣어 준 후 바로 뚜껑을 닫았다. 물 주입이 끝난 다음에는 배양병 하단에 연결한 실리콘관의 클립을 열어 3시간 정도 배수해 준 다음 다시 클립으로 밀봉했다. 실험종료까지 3회 관수하였다.

(2) 순화처리 12주 경과시점

실험은 2006년 3월 21일~6월 13일까지 '6주 순화처리'와 동일한 장소에서 같이 순화처리 하다가 '6주 순화처리'에 대한 결과를 확인한 후 비닐은 그대로 둔 채로 간이시설의 차광막을 벗겨내고 자연광에 배양병을 그대로 노출시켰다. 동시에 배양병 내부온도상승 방지를 위해 배양병 뚜껑을 모두 개방하고 실리콘관의 클립도 모두 개방했다. 물은 실험종료까지 3회 공급하였고 '6주 순화처리' 때까지 고려하면, 6회 공급한 것이 된다.

라) 균근형성 확인

균근 형성 상태가 지속적으로 유지되고 있는지 여부에 대한 확인은 '실내 무균배양을 통한 균근 형성을 조사'에서와 동일한 방법으로 실시하였다.

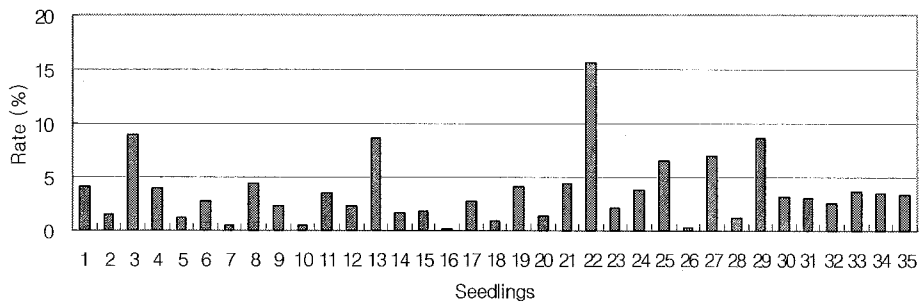
#### 다. 결과 및 고찰

##### 1) 실내 무균배양 접종묘의 균근 형성을 조사

실내 무균배양 접종묘 생산을 위하여 사용된 배양병 중 22%가 잡균에 의하여 오염되었는데, 오염되지 않은 배양병 중 54.3 %에서 균근 형성을 확인할 수 있었다(그림 3-3-29). 실내 배양에 있어서 오염의 대부분은 *Penicillium* sp.에 의해 발생하는데, 주로 토양표면에 발생할 뿐 묘목에 발생하는 경우는 6% 수준에 불과하여, 토양의 멸균시간을 늘리는 방법으로 해결할 수 있을 것으로 판단되었다.



<그림 3-3-29> 접종묘의 뿌리에 형성되어 있는 송이 균근(화살표).

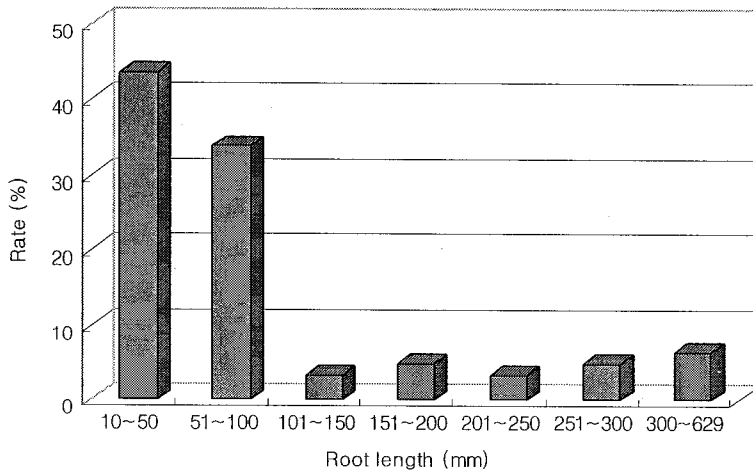


<그림 3-3-30> 균근이 형성된 묘목 당 총뿌리길이 대비 균근의 비율

균근 형성이 확인된 접종묘의 총 뿌리길이에서 균근이 형성된 부분의 길이는 0.2~15.7%(평균 3.5%)인 것으로 나타났다(그림 3-3-30). 뿌리가 긴 것, 즉 뿌리

의 생장이 좋은 것과 상대적으로 더디게 성장하는 것 간에 차이를 발견하기 어려울 정도의 비슷한 비율로 균근을 형성하는데, 이는 뿌리 생장이 양호하다면, 균근이 형성되는 부분도 그에 비례해서 늘어나기 때문에 더 많은 균근을 확보할 수 있다는 의미로 받아들일 수 있다. 특히, 균근 형성여부의 확인을 위하여 묘목의 뿌리 일부를 표본 추출하는 방식을 고려한다면, 가능한 수준에서 뿌리 발달이 많이 이루어질 수 있도록 유도하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

균근이 확인된 접종묘에서 뿌리길이에 따라서 균근 형성율의 차이가 나는 것을 확인할 수 있는데, 뿌리길이 10~100mm 사이에 균근의 77.4%가 형성되어 있었다(그림 3-3-31). 이들 뿌리는 주로 묘목의 지상부와 가까운, 송이균을 접종했던 부위 부분에 밀집해 있다는 특징을 가진다. 뿐만 아니라 100mm 이상의 뿌리에 형성되어 있는 균근의 상당부분도 지상부와 가까운 부분에 형성되어 있다. 따라서 향후 접종묘를 이용한 실험에 이런 특징을 고려한 계획이 세워져야 할 것이다.



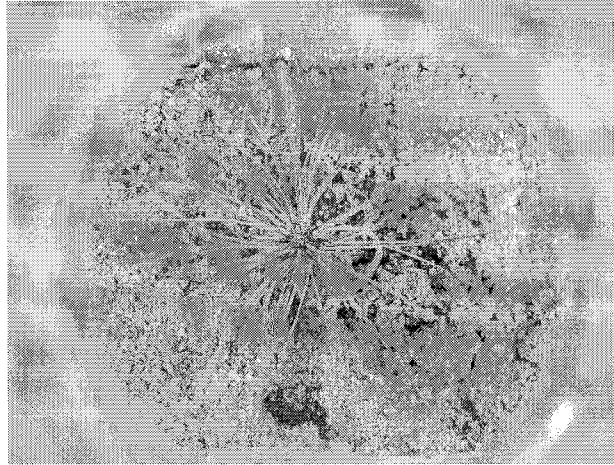
<그림 3-3-31> 균근이 확인된 접종묘의 뿌리길이에 따른 균근형성을 차이.

## 2) 실외 순화처리

### 가) 잡균에 의한 오염

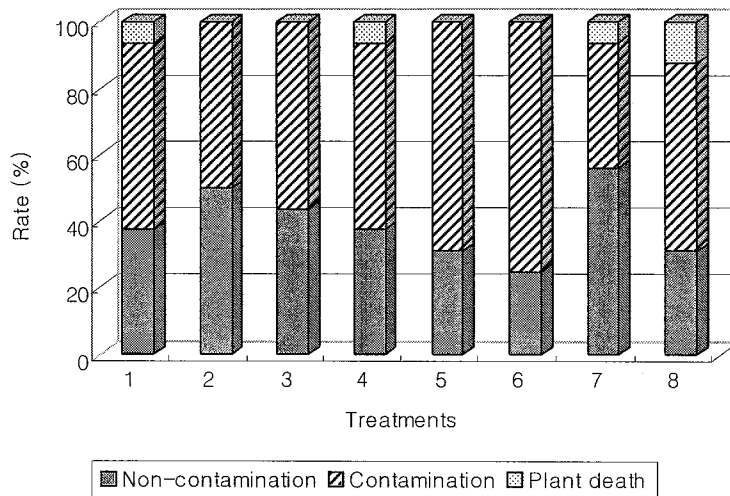
실내배양 시 잡균에 의한 오염의 대부분이 *Penicillium* sp.에 의해 발생되고 주로 잎보다는 토양표면에서 발견되었지만, 실외 순화처리에서는 대부분의 오염이 *Trichoderma* sp. 등과 같은 잡균에 의해 발생하였다. 특히, 토양 표면 뿐만 아니라 잎에서도 적지 않게 발생하는 것으로 나타났다(그림 3-3-32).

*Trichoderma* sp. 등과 같은 잡균에 의한 오염이 많은 것은, 뚜껑이 닫혀 있는 밀폐된 환경에서 높은 온, 습도에 노출되는 빈도가 늘어났기 때문이라 생각된다.



<그림 3-3-32> 송이균 접종묘가 있는 토양표면에 발생한 잡균

순화처리 초기에는 오염되는 병 숫자가 적었지만 6주에 가까워질수록 숫자가 늘어나기 시작했다. 물만 넣어준 1번 처리구 보다 오염율이 낮은 처리구들은 Tween 80을 각각 0.02%, 0.1% 섞어준 2, 3번 처리구와 1/4 PDMP를 1/100로 희석 처리한 7번 처리구 이었다(그림 3-3-33).



<그림 3-3-33> 실외순화처리 후 6주까지 확인한 오염 및 고사목의 비율

실험설계 단계에서는 배지를 희석해서 공급할 경우 오염율이 높아질 것으로 예상하여 1/4 PDMP를 1/10로 희석 처리한 6번 처리구가 가장 높은 오염율을 나타냈 것으로 추측하였다. 하지만 비록 매우 낮은 농도까지 희석을 했어도 7번 처리구가 가장 낮은 오염율을 보였다는 것은 의외의 결과로서, 그 원인으로는 농도가 낮은 PDMP 배지가 항균작용을 했거나 이 농도로 자란 소나무 묘목에 접종된 송이 균사의 활력이 가장 강하여 항균물질을 발생하였을 가능성에 대하여 자세히 검토하지 못한 아쉬움이 남는다.

한편, 순화과정 중 일부 처리구에서는 묘목이 고사하는 모습을 나타내었는데 8번 처리구의 경우 12.5%에 이르렀다(그림 3-3-33). 하지만, 고사한 묘목은 순화 처리에 들어가기 전 실내배양 단계부터 활력이 약했던 개체로서 실내배양 단계에서 건강했던 묘목이 순화처리 중 오염 균 등의 영향으로 고사한 예는 없었다.

#### 나) 순화처리 기간별 송이 균근 형성률 변화

6주 순화처리 실험에 사용된 모든 처리구를 대상으로 할 때, 40.6%가 오염되지 않았고 이들 중 4개 처리구(1, 4, 5, 6번 처리구)에서 독특한 송이 향을 맡을 수 있는 송이 균근을 확인하였으며, 순화 성공율은 16.0%였다. 반면, 오염된 처리구에서는 1개(6번 처리구)에서만 균근을 확인하여 순화성공율이 2.6%이었는데, 이 때 균근이 확인된 배양병 내부 상태는 토양표면에는 오염이 없이 묘목의 앞에 잡균이 약간 붙어 있는 상태이었기 때문에 송이 균근에 악영향을 미치지 않았다고 판단된다. 따라서 순화처리 중인 배양병이 오염되지 않는다면, 순화 성공율은 상당히 높아질 것으로 생각된다.

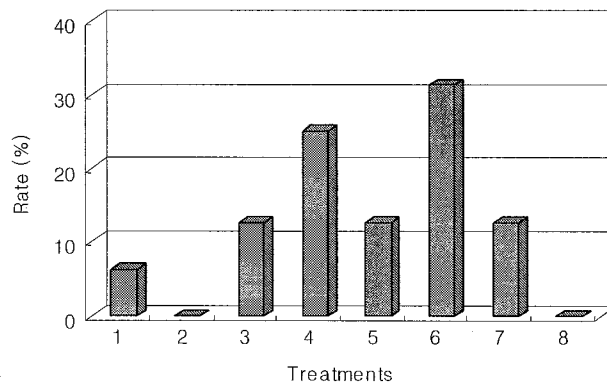
비록 본 실험과 같은 순화처리에 사용한 것은 아니지만, Vaario 등(2002)이 소나무 수피를 이용한 실내 균사배양에 Tween 80과 40을 0.5% 사용하면서 이들 물질을 사용하지 않은 처리구보다 55% 이상의 균사 성장효과를 보았다는 결과는 본 실험에서 Tween 80이 각각 0.5%, 2.5% 첨가된 4번, 5번 처리구에서 균근을 확인할 수 있었다는 점을 고려할 때 의미있는 결과라고 생각된다. 하지만, 이 경우에는 단순히 급수만 한 처리구에 비하여 오염율이 높았다는 점이 아쉽다.

균근이 가장 많이 확인된 6번 처리구는 오염된 병이 가장 많았던 처리구라는 점을 고려할 때, 오염되지 않은 병 대비 순화 성공율은 상당히 높다고 볼 수 있다. 또한 균근이 확인된 처리구 중에 증류수만 처리한 1번 처리구가 포함되었다는 것은 별다른 처리 없이 물만 주어도 순화에 성공할 수 있다는 것을 의미한다.

‘6주 순화처리’에서는 토양표면이 잡균에 의해 오염된 반면에 ‘12주 순화처리’에서는 잡균보다는 이끼가 형성되는 모습이 관찰되었다. 심지어는 송이 균근이 확인된 것들의 토양 표면에서도 관찰된다. 이는 순화처리 6주까지 배양병 뚜껑을 그대로 덮어주고 배수 용도로 설치한 실리콘 관을 배수 후 다시 막아주는 등 외부환경과의 격리조치가 해소되면서 외부 공기의 출입이 자유로워지고 이로 인해 단일 균의 번성이 방해받을 받은 데에 그 원인이 있을 것으로 생각된다.

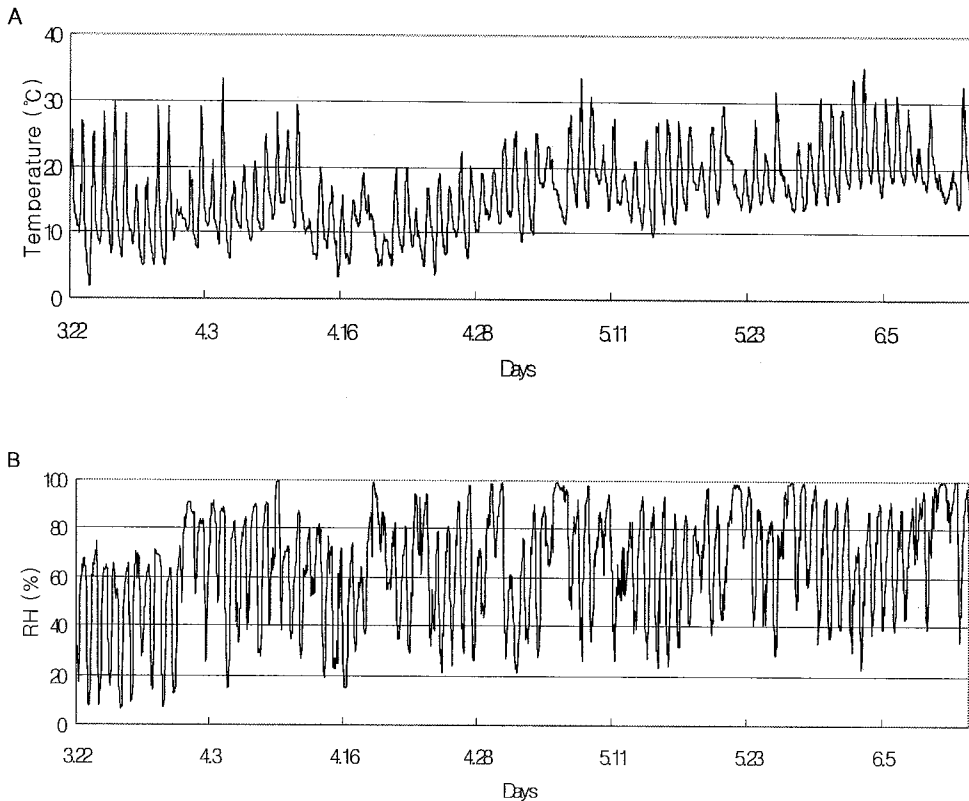
3, 4, 6, 7번 처리구 등 4개 처리구에서 균근 형성을 확인했으며, 순화 성공율이 가장 높은 처리구는 4, 6번 처리구 이었다. ‘6주 순화처리’에서와 마찬가지로 실외 순화처리 후 6주까지의 관찰을 통해 토양 표면이 잡균에 오염되지 않은 상태로 ‘12주 순화처리’에 들어간 처리구에서 대부분의 균근이 확인되어 순화 성공율은 28.0%였으며, 4번 처리구는 토양표면이 오염되지 않았던 것들 모두에서 송이 균근이 확인되었다. 그리고 토양표면까지 내려가지 않고 옆에만 오염되었던 것들 중 일부에서도 균근을 확인할 수 있었고 순화 성공율은 10.3%이었다. 또한 ‘6주 순화처리’에서 보다는 비율이 낮긴 하지만 뿌리길이 10~100mm 사이에 균근의 64.3 %가 형성되어 있으며, 균근형성이 확인된 접종묘의 총 뿌리길이에서 균근이 형성된 부분의 길이는 0.5~27.9%(평균 6.0%)로 ‘실내 무균배양 접종묘의 균근형성을 조사’ 당시보다 균근이 늘어난 것으로 나타났다.

본 순화처리 실험 전체를 통해서 가장 높은 순화 성공율을 보이는 것은 6번 처리구(증류수 + 1/4 PDMP(10 %) 처리)로서 묘목의 31%에서 균근을 확인할 수 있었고 2, 8번 처리구에서는 균근 형성을 확인할 수 없었다(그림 3-3-34).



<그림 3-3-34> 순화처리 전공정을 통해 균근 형성이 확인된 묘목의 비율

순화처리 기간 중 접종묘목이 있던 곳의 온도는 2~35℃(평균 16.2℃), 습도는 7~100%(평균 65.0%) 이었다(그림 3-3-35). 대부분의 곰팡이들이 30℃ 이상의 고온에 노출되면 활력이 떨어지는 것과 마찬가지로 송이균 또한 고온에 적응하지 못하는 것은 당연하다. 따라서 시험기간 중 25℃ 이상 온도에서의 잦은 노출은 고온 자체 또는 고온과 고습의 영향을 받는 잡균의 발생으로 인해 실내배양 중 이미 형성되었던 균근이 사멸될 수 있다고 생각하며, 송이 균근이 지상부와 가까운 부분에 상당수가 분포하는 것도 피해증가에 있어서 하나의 원인이 되었을 것이다. 이는 실제로 '실내 무균배양 접종묘의 균근 형성을 조사'에서는 오염되지 않은 배양병 중 54.3%에서 균근 형성을 확인할 수 있었지만, 순화처리 6주 후 확인 때는 16.0%였고 12주 후 확인 때는 28%에 불과했다는 점에서도 일부 확인할 수 있다.



<그림 3-3-35> 순화처리 기간 중의 온도(A) 및 습도(B) 변화

## 제4절 송이 감염묘를 이용한 송이 균환 형성 기술

### 1. 서론

송이(*Tricholoma matsutake*)는 동북아시아 지역에서 상업적으로 매우 중요한 버섯이다. 따라서 송이 생산성 향상을 위한 노력과 송이 재배 시도가 한국과 일본에서 주로 이루어져 왔다(富永, 1978; Ogawa 등, 1978; 이 등, 1984; Inaba 등, 1995; 박 등, 1995; 鳥越, 1998; 가와 구, 2002). 심지어 남반구에 위치한 뉴질랜드에서도 동북아시아 지역의 송이 가치를 인정하고 재배를 향한 노력을 하고 있다(Wang 등, 1997). 특히, 뉴질랜드는 Crop & Food Research 연구소를 중심으로 고가의 다양한 외생균근 버섯들에 대한 인공재배를 시도하고 있다(Wang과 Hall, 2004). 스웨덴에서 발생하는 스웨덴 송이(*T. nauseosum*)는 유전자 분석에서 동북아시아 지역의 송이와 동일하다는 결론을 얻어, 그동안 무관심했던 스웨덴 송이의 가치를 부각시키고 있다(Bergius와 Danell, 2000). 이와 같은 일련의 일들은 송이의 중요성을 다시 한번 말해주는 것이라고 볼 수 있다.

송이 재배를 위한 연구는 송이 포자, 송이 자실체, 토양의 송이 균사체 덩어리, 송이 균환 전방에 소나무를 식재하여 송이 감염 소나무를 생산, 이식하는 등 여러 가지 시도들이 있었다(富永, 1978; 이태수 등, 1984; 浜田과 小原, 1984; 小川과 伊藤, 1989). 이 중에서 송이 감염 소나무 이식은 다른 방법에 비해 송이 특성을 가장 잘 반영하고 자연에 가장 근접한 방법으로 판단된다. 이 방법은 한번의 성공사례가 일본에서 보고되었고(小川과 伊藤, 1989; Kazuyuki, 1992), 그 이후에 보완적인 연구들이 있어왔지만 성공적이지는 못한 상태이다(マツタケ研究懇話會, 1983). 이 등(1984)은 송이 감염묘의 육성방법에 초점을 맞춰 연구하였지만, 그 이후 연구는 지속적으로 진행되지 못한 아쉬움도 있었다.

최근에는 소나무 종자발아 묘목에 송이 균을 감염시켜 송이를 야외에서 재배하려는 다양한 시도들이 일본과 우리나라에서 연구되고 있고, 몇몇 시도는 송이 균근 형성에서 매우 성공적인 것으로 보고하고 있다(Shinya, 1990; Yamada 등, 1999; Vaario 등, 2000; 가 등, 2002). Guerin-Laguette 등(2005)은 야외의 성숙한 소나무의 뿌리에 액체배양한 송이균을 접종하여 외생균근의 형성을 보고하고 있어, 송이 연구의 새로운 전환점이 될 것으로 시사되고 있다. 하지만, 아직까지 버섯이 나왔다는 보고가 없는 상태이다.

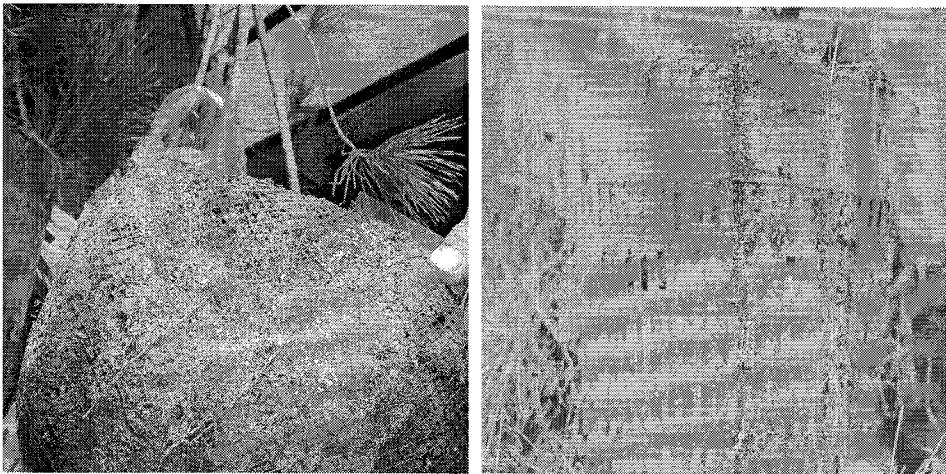


본 연구는 이러한 배경 아래, 우리나라에서 송이 감염묘 생산과 이식 및 송이균의 활착을 높일 수 있는 방법에 대하여 2000~2006년간의 연구결과를 토대로 고찰한 것이다. 송이 감염묘의 육성 방법, 이식시기, 이식방법, 송이균의 정착, 송이균의 확인 및 생존기작에 대한 세부적인 검토를 바탕으로 앞으로 송이 인공재배의 가능성을 제시하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 송이 감염묘 생산 및 이식

송이 감염묘 생산은 2000년 봄과 가을에 강원도 양양군 현북면 어성전리 소재 송이 생산지에서 실시하였다. 송이가 생산되고 있는 숲에서 송이 균환을 찾아 선단부(先端部)에 50cm 간격으로 인근에 분포하는 천연치수 311본(5~15년생)과 연극 묘포장에서 양묘된 2~3년생 297본을 식재하였다. 식재방법은 枯木(1980)이 실험한 전년 가을에 송이 발생위치에서 약 15cm 외측에 식재하는 방법과 비슷한 것이지만, 본 실험에서는 직접 균환 선단을 찾아서 폭과 깊이 20cm 내외의 그물과 망분(직경 23cm, 높이 17cm)에 신선한 B층 흙을 각각 담은 후 소나무를 심어서 균환 선단에 식재하였다(그림 3-4-1; 표 3-4-1). 2002년도에 홍천 송이 시험지에서도 송이 감염묘를 육성하기 위하여 위와 같은 동일한 방법으로 소나무를 식재하였다.



<그림 3-4-1> 송이 감염묘 생산을 위해 사용한 그물망 및 망분.

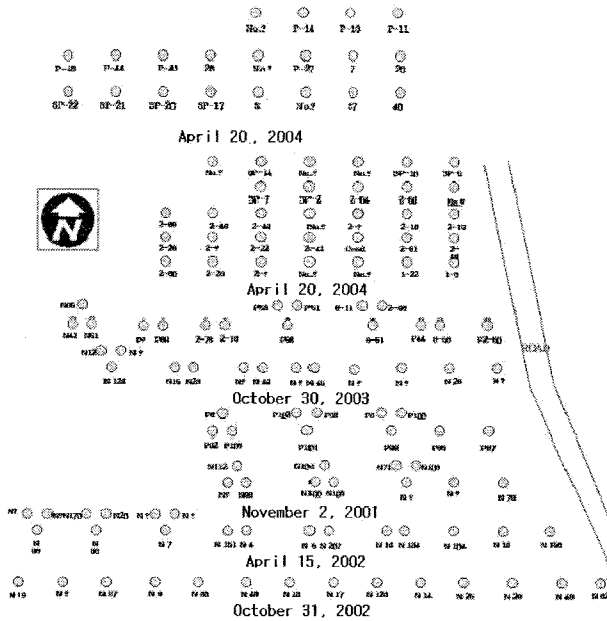
<표 3-4-1> 감염묘 생산을 위한 송이 균환 선단부의 소나무 식재

소나무 유형	식재일자	식재본수	식재유형	
			망분	그물망
천연치수	2000년 4월	204	106	98
	2000년 11월	107	51	56
2년생 양묘치수	2000년 4월	104	55	49
	2000년 11월	102	60	42
3년생 양묘치수	2000년 11월	91	30	61
계		608	302	306

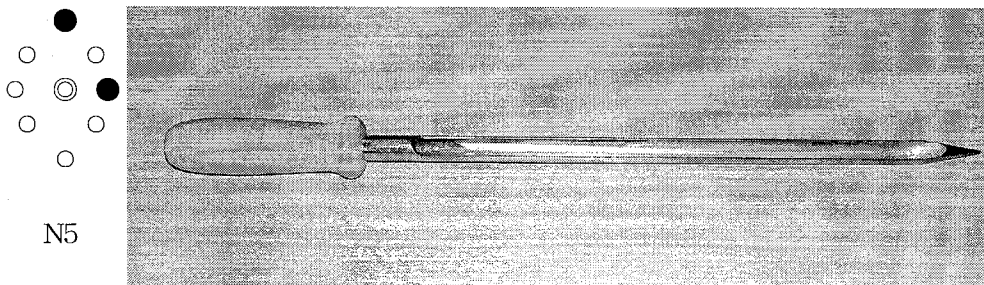
6개월과 1년 경과 후 식재된 555본에 대한 소나무의 활착율을 조사하였다. 그리고 송이균의 감염 여부는 2년 후에 이식하는 과정에서 화분의 겉 표면에 둘러싸인 송이 균사의 면적을 육안으로 확인하였고, 송이균이 뿌리에 붙어 있는 것으로 판단된 소나무를 인근의 송이가 생산되지 않는 40~50년생 소나무림과 홍천의 23년생 소나무림(송이가 생산되지 않는 숲)에 이식하였다.

#### 나. 송이 감염묘에서 송이균 번식 확인

감염묘의 송이 균 확인은 2001년에 이식된 감염묘가 1년이 경과된 2002년 10월에 양양에 식재한 양묘 12본과 천연치수 12본, 그리고 홍천에 식재한 7본을 조사하였다. 이식된 소나무는 완전히 파내서 송이 균사의 생존유무를 확인하고 다시 식재하였다. 위의 방법에서 1년 후에 다시 송이 균사를 확인한 결과 살아있던 송이균이 죽어가는 결과를 얻어 그 이후부터는 색대(직경 1.2cm, 길이 30cm)를 이용하여 표본 추출하여 확인하는 방법을 이용하였다. 2005년 5월과 2006년 6월에 이식한 소나무를 대상으로 송이균의 생존여부를 조사하였는데, 표본은 홍천 시험지에 이식된 송이 감염묘를 중심으로 8방위를 정한 후 이식 경과 기간에 따라 송이균의 이동 여부를 감안하여 확인 거리에 차별을 두고 실시하였다(그림 3-4-2, 3). 그리고 일부는 송이균의 생존을 확인하기 위하여 화분을 완전히 굴취하여 밑부분을 확인하였다.



<그림 3-4-2> 홍천시험지의 송이 감염묘 이식지 배치도.



◎ : 송이 감염묘목, ○ : 송이가 없는 부분, ● : 송이가 있는 부분

<그림 3-4-3> 송이 감염묘의 송이 균근 존재여부 확인을 위해 사용된 색대 (길이 30cm, 직경 1.2cm).

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 감염묘 생산방식

2001년 4월 2000년에 식재한 소나무의 활착율을 조사한 결과, 봄에 식재한 것은 80%가 활착(조사대상 318본 가운데 63본 고사)한 반면, 가을에 식재한 것은 96.6%가 생존(조사대상 237본 가운데 8본 고사)한 것으로 파악되었다(표

3-4-2). 이 등(1984)은 소나무 식재가 가을 보다는 봄이 더 좋은 것으로 보고한 반면, 小川 등(1978)은 11월부터 3월 하순에 소나무를 식재하는 적기로 보았는데 가장 중요한 것은 나무의 생장 시작 전에 수행하는 것이 타당하다고 하였다.

하지만, 감염묘 생산용 소나무 식재는 지역별 기후를 감안한 식재가 필요할 것으로 판단된다. 특히 우리나라의 경우, 강원도 동해안 지역은 봄철 가뭄으로 인해 가을철에 식재한 소나무에 비하여 봄에 식재한 소나무의 활착율이 낮은 것으로 판단되었다(표 3-4-2). 봄철에 비하여 가을철에 식재한 소나무의 생존률이 훨씬 높아서 우리나라의 경우에는 계절상 가을이 봄에 비하여 유리한 것으로 판단되었다.

<표 3-4-2> 계절, 소나무 종류 및 식재유형에 따른 소나무 묘목의 생존률

계절	계	생존률	소나무 유형	소계	생존률	식재유형	소계	생존률
봄	318	80%(255)*	양묘치수	103	81.6%(84)	망분	54	72.2%(39)
						그물망	49	91.8%(45)
			천연치수	215	79.5%(171)	망분	109	83.5%(18)
						그물망	106	75.5%(26)
가을	237	96.6%(229)	양묘치수	156	95.5%(149)	망분	60	100%(60)
						그물망	96	92.7%(89)
			천연치수	81	98.8%(80)	망분	56	98.2%(55)
						그물망	25	100%(25)

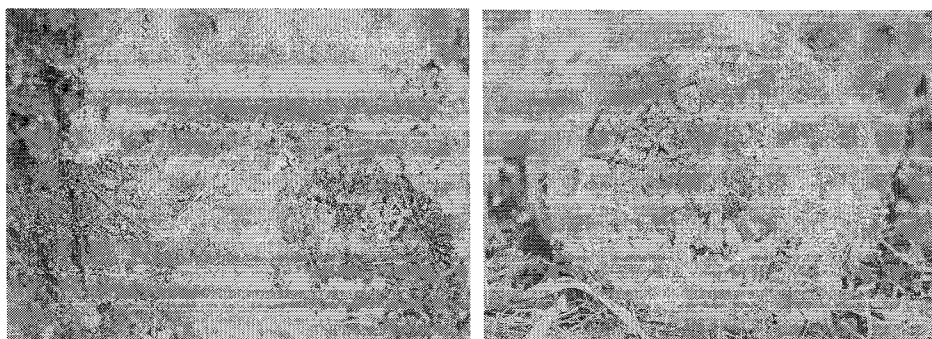
\* 괄호 안의 수치는 생존한 소나무의 숫자를 의미함.

감염묘 식재 시 중요한 것은 식재한 소나무가 정상적으로 자랄 수 있도록 주변의 빛을 가리는 나무들은 제거해 주는 작업이다. 특히, 빛을 가리는 참나무류는 모두 베어서 충분히 빛이 들어올 수 있도록 해주어야 한다. 그래야만, 식재한 소나무도 정상적으로 자라고, 송이 균이 감염된 균도 정상적으로 자랄 수 있기 때문이다. 송이 균은 시간이 지남에 따라 땅 속에서 자라는 데는 문제가 없는 것으로 나타났다.

소나무 종류에 따라서는 큰 차이가 나지 않았으며, 용기 종류에 따라서는 식재시기에 따라 상반된 결과가 나타나서 명확한 해석이 곤란하였다. 즉, 어떤 종류의 소나무나 용기를 사용하는가는 큰 문제가 되지 않지만, 식재 시기는 매우 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

감염묘를 얻는데 소요되는 시간은 균환 선단과 감염묘를 만들 소나무의 식재 위치 및 식재 깊이에 따라 결정된다(小川 등, 1978; 枯木, 1980; マツタケ研究懇話會, 1983). 이 등(1984)은 용기 개선 및 균근대 선단 천식법으로 5개월 만에 평균 89.7%의 송이균 감염율을 얻은 것으로 보고한 바 있다. 小川 등(1978)도 위와 유사한 방법으로 봄에 식재한 것에서 7~8개월 만에 감염묘를 얻을 수 있다고 하였지만, 확실히 송이균이 부착한 감염묘를 얻는 데는 1년 이상 경과시키는 것이 좋은 것으로 보고하고 있다. 枯木(1980)은 균환 선단 심식법으로 소나무 식재 후 1년째에 송이균 감염율이 65% 정도 2년째에 100%로 감염율을 확인한 바 있다. 균근대 선단 천식법은 균환 선단 심식법에 비해 송이균의 감염시간 단축과 균환훼손을 최소화하는 것으로 알려져 있다(小川 등, 1978). 하지만, 枯木(1980)은 균환선단 심식법에서 송이 발생에 큰 영향을 주지 않는 것으로 보고하고 있으나, 장기간의 조사 필요성을 언급하고 있다.

송이 균은 화분과 화분 사이의 공간과 망분을 사용한 경우에는 화분 바닥 아래쪽으로 성장하고 있었다(그림 3-4-4). 따라서 송이 감염묘 생산방법은 기존의 송이 균에게 다소 영향을 줄 수 있다고 판단되었다. 본 실험에서는 균환 선단 심식법을 사용하였는데, 감염묘를 이식하는 과정에서 송이 균환의 부분적인 훼손은 불가피하였으나, 송이균은 지속적으로 성장하고 있었다. 또한, 송이 감염묘를 이식하기 직전까지 송이 자실체가 형성되는 모습을 확인할 수 있었다. 과거에 송이 감염묘 실험을 한 곳은 모두 송이가 발생하지 않는다고 주민들이 주장하고 있는데, 그러한 원인을 현재로서는 명확히 알 수 없으나, 본 실험에서 사용한 방법을 적용한다면 기존의 송이 균에 미치는 피해를 줄이고 지속적으로 송이를 채취할 수 있다고 여겨진다.



<그림 3-4-4> 송이 감염묘가 형성된 망분의 아랫부분 모습.

육안의 확인방식에 따르면, 송이 감염묘 생산을 위하여 봄에 식재한 소나무는 1년 후의 봄에, 가을에 식재한 소나무는 1년 6개월이 경과된 후의 봄에 이식 가능할 정도로 송이 균이 감염되어 있었다. 즉, 송이 감염묘 생산을 위해서는 송이 균이 주로 성장하는 여름철을 반드시 1회 이상 거쳐야만 될 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 최적의 감염묘를 얻을 수 있는 식재위치와 식재시기에 중점을 두었으므로, 균환 선단에 깊이 심어서 2년간 놓아두는 방식이 좋을 것으로 판단되었다. 식재 2년째에 감염묘를 이식하며 확인한 송이 균의 성장 모습을 보면, 송이 균환이 1년에 10cm 내외로 성장함에도 불구하고(가 등, 2002), 선단에 인접하여 심었던 감염묘 유도용 소나무가 직경 23cm 화분에서 90% 이상 감염된 경우는 그리 많지 않았다. 홍천시험지에 옮긴 감염묘의 경우 총 150개 중에서 7개 정도가 90% 이상의 감염율을 나타내었다.

#### 나. 송이 감염묘의 이식

한편, 송이 감염묘를 송이가 나지 않는 산에 이식한 후에 파악된 송이 균의 생존율은 봄에 이식한 감염묘의 송이균 생존율(33%)이 가을에 이식한 감염묘의 송이균 생존율(10%)에 비하여 훨씬 높게 나타났다(표 3-4-3). 우리나라의 봄철은 가뭄이 심하여 소나무 자체의 활착률에 문제를 야기할 수 있지만, 소나무의 생존여부가 큰 문제가 되지 않는다면 송이 균의 생존을 위해서는 감염묘를 봄철에 이식하는 것이 유리하였다. 이는 봄철이 뿌리의 발달과 함께 송이 균이 활발히 활동을 할 수 있는 시점인 반면, 가을철에는 송이 균이 휴식기에 들어가기 때문으로 판단된다.

<표 3-4-3> 송이 감염묘의 균균 생존률(조사시점 : 2005년 및 2006년)

계절	계	생존률	소나무유형	소계	생존률	식재유형	소계	생존률
봄	69	33.3%(23)	양묘치수	19	26.3%(5)	망분	9	44.4%(4)
				50	36%(18)	그물망	10	10%(1)
			천연치수	50	36%(18)	망분	10	30%(3)
				40	37.5%(15)	그물망	40	37.5%(15)
가을	81	9.9%(8)	양묘치수	29	0%(0)	망분	12	0%(0)
				52	15.4%(8)	그물망	17	0%(0)
			천연치수	52	15.4%(8)	망분	35	20%(7)
				17	5.9%(1)	그물망	17	5.9%(1)

\* 괄호 안의 수치는 살아있는 송이 균균을 지닌 묘목의 숫자를 의미함.

이식한 감염묘 속에 존재하는 송이 균은 기존 송이 균환의 소나무에서 양분을 받는 것이 거의 대부분이다. 그리고 화분 속 소나무 뿌리에 감염된 송이 균은 작은 소나무에서 양분을 받아야 한다. 봄철에는 소나무가 활력을 되찾기 시작하여 성장하는 시기이기에 송이 균에게 줄 수 있는 양분이 가을철에 옹근 것에 비하여 많을 것이다. 가을철은 소나무의 생장이 거의 정지단계이지만, 뿌리에 감염된 송이 균의 생명을 유지하기 위한 에너지를 소나무에서 얻기에 봄철에 비해 충분한 양의 양분을 소나무가 송이 균에게 제공하기 어려울 것이다.

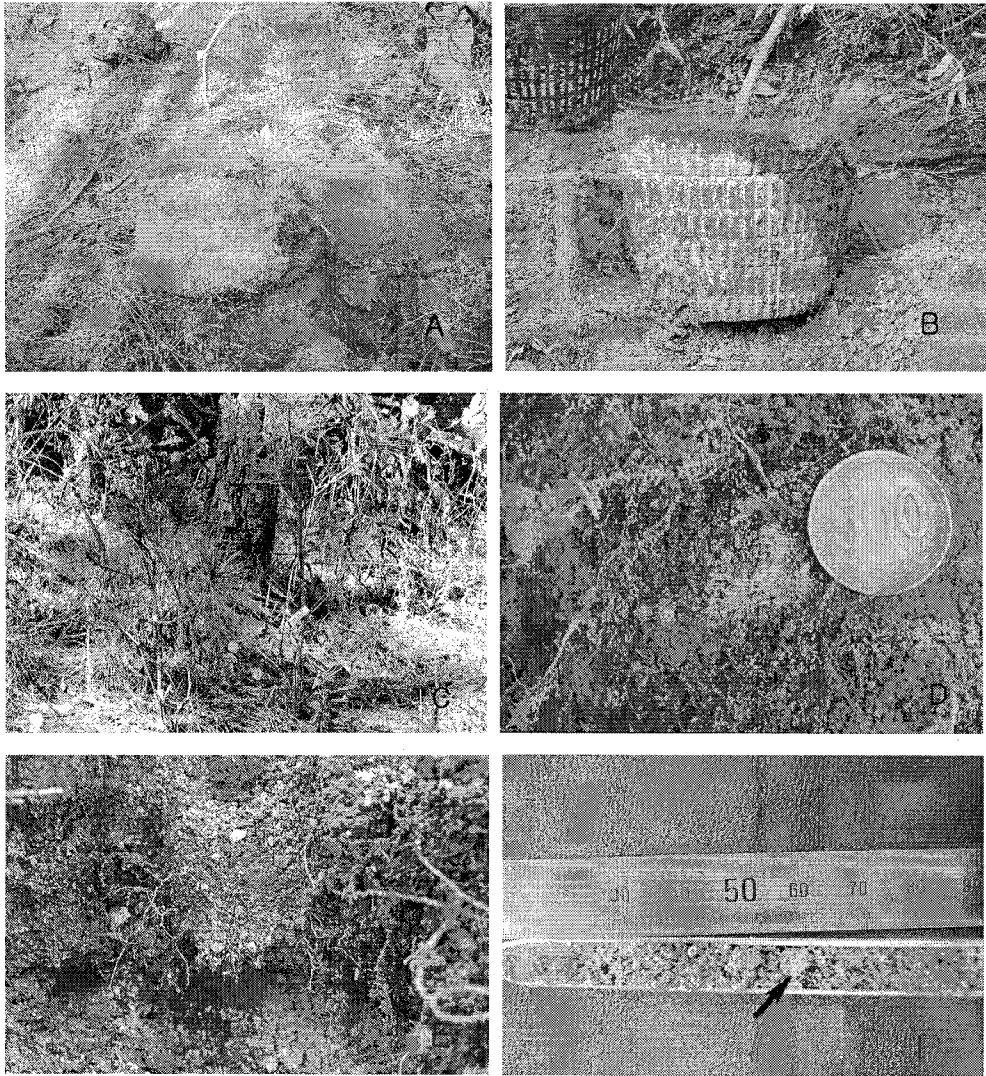
감염묘 식재시, 그물과 망분은 벗겨서 심거나 벗기지 않고 심을 수 있다. 본 연구에서는 두 가지 모두 수행해 보았는데, 그 차이를 명확히 알 수 없었으나, 벗기지 않고 심는 것이 좋을 것으로 판단되었다. 그물과 망분은 소나무 뿌리와 송이 균이 자라는 데는 영향을 주지 않는 것으로 생각되었다. 그리고 감염묘를 식재할 때 그물과 망분을 벗기지 않고 식재하는 것이 벗겨서 식재하는 것보다 훨씬 쉬웠고, 감염된 송이균과 소나무뿌리의 피해도 줄일 수 있을 것으로 여겨졌다.

감염묘의 이식 시기는 일본의 경우 3~4월과 7~8월의 우기가 적당한 것으로 보고하고 있으나(マツタケ研究懇話會, 1983) 본 연구에서는 4월과 10월말~11월 초에 수행되었다. 우리나라의 기후는 일본의 기후와 차이가 있어 시기적인 면을 비교하기 어렵지만, 전반적으로 봄철에 이식하는 것이 송이 균의 활착에 유리한 것을 알 수 있었다. 우리나라의 여름철은 30℃ 이상이 되는 날들이 있기에 송이 균의 생존에 치명적인 영향을 줄 수 있다(가, 2001). 한편, 송이 채취시기를 전후하여 감염묘를 이식하는 것은 송이 채취자와 마찰을 야기할 수 있으므로 송이 채취시기가 되기 훨씬 전이나 후에 이식실험을 진행하였다.

송이 감염묘 이식후 송이균의 생존율은 그물을 이용한 경우 20.2%, 망분의 경우 21.2%로 송이균 생존에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(표 3-4-3, 그림 3-4-5). 그물을 그대로 이용한 경우는 플라스틱 망분에 비하여 생산한 송이 감염묘를 이동할 때 외부의 충격으로 송이가 감염된 부분이 이탈되는 손실을 더 받을 수 있으므로 감염묘의 운반을 고려하면 그물 보다는 망분이 편리한 장점이 있었다.

한편, 천연치수를 이용하여 만든 감염묘에서는 송이균이 25.5% 생존율을 나타냈지만, 양묘장에서 생산된 묘목을 이용한 소나무의 감염묘에서는 단지 3년생 양묘 5개만이 송이균을 1년 이상 유지하고 있어서 이식 후 송이 균 생존율이 10.4%로 매우 낮았다. 천연치수의 경우에도 수고가 대개 1m 이상 되는 것에서

송이 균이 정상적으로 유지된 점을 감안하면, 양묘된 소나무의 경우, 근계의 발달로 인하여 소나무 자체의 활착률은 높지만 나무 자체가 너무 작아 송이 균과의 공생관계 유지가 어려운 것이 아닌가 생각된다.



<그림 3-4-5> 송이 감염묘 생산, 이식 및 균근 형성여부 점검 모습.

A : 그물망, B : 망분, C : 이식 1년 후,

D : 이식 1년 시점의 생존한 송이 균사,

E : 잦은 조사로 쇠퇴하는 송이 균사의 모습,

F : 색대를 이용한 송이 확인(화살표는 살아있는 송이 균사)



만일 양묘한 소나무를 이용한다면, 마사토양에서 양묘한 소나무를 식재하는 것이 좋을 것으로 판단되었다. 본 연구에서 홍천에 식재한 양묘한 소나무는 마사토양에서 매년 옮겨심기를 하여 키운 3년생 소나무 이었다. 양묘장에서 키운 소나무는 뿌리 발달이 매우 잘 된 것으로 여겨질 수 있으나, 마사토양에서 양묘한 소나무가 천연치수에서 보이는 소나무 뿌리와 더 비슷하였다. 또한 송이균이 감염되는 것도 양묘장에서 양묘한 소나무는 마사토양에서 양묘한 소나무에 비해 덜 송이균이 침투하는 것을 알 수 있었다. 아직 그 이유는 알 수 없으나, 양묘장 토양환경과 송이산의 토양환경에 큰 차이로 인하여 생긴 것으로 여겨졌다.

송이 감염묘를 대량으로 만든다고 할 때는 마사토양에서 양묘한 소나무를 이용하는 것이 바람직 할 것이다. 마사토양에서 양묘한 소나무의 뿌리는 천연치수에서 보이는 소나무 뿌리와 매우 유사하고 천연치수보다 훨씬 많은 뿌리를 가지고 있어 소나무의 활착에도 유리하다. 본 실험에서는 3년생 소나무를 사용하였지만, 실험하는 과정에서 얻어진 결론은 마사토양에서 양묘한 5년생 내외의 소나무를 이용하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

マツタケ研究懇話會(1983)의 경우, 감염묘 생산을 위해서는 송이산 주변의 소나무로서 1~1.5m의 7년생 전후 혹은 전용으로 육성된 묘목을 권장하고 있다. 본 연구에서는 송이산 주변 소나무와 양묘장에서 양묘한 것을 사용하였으나, 송이산 주변의 소나무를 이용하는 것이 더 좋을 것으로 판단되었다. 그리고 양묘한 소나무를 이용할 경우 마사토양에서 양묘한 소나무를 이용하는 것이 바람직하였다.

#### 다. 송이 감염묘의 이식방법

マツタケ研究懇話會(1983)의 경우, 이식방법에서 2~3본의 감염묘를 모아서 이식하는 것이 좋을 것으로 보고하였다. 하지만 본 연구에서 1, 2, 3, 4본씩 각각 이식하여 조사하여 본 결과, 모아서 심는 것은 특별한 영향을 주지 않고 개별 감염묘의 활착된 송이 균근 유무가 중요한 점으로 인식되었다(그림 3-4-6). 즉, 이식되는 감염묘가 높은 활력을 지닌 송이 균근을 가지고 있는지 유무가 가장 중요한 인자로 볼 수 있었다. 왜냐하면, 이식한 감염묘의 거의 대부분의 송이 균은 1년 안에 죽고 새롭게 송이 균이 성장하는 것은 일부분의 이식한 소나무 뿌리의 송이 균근에서 시작되기 때문이다. 따라서 송이 균의 생존 및 생장은 묘목을 모아서 식재하는 것의 영향을 받지 않는다.



<그림 3-4-6> 송이 감염묘를 1분, 2분, 3분 또는 4분씩 식재하는 모습.

#### 라. 송이 감염묘의 송이균 확인

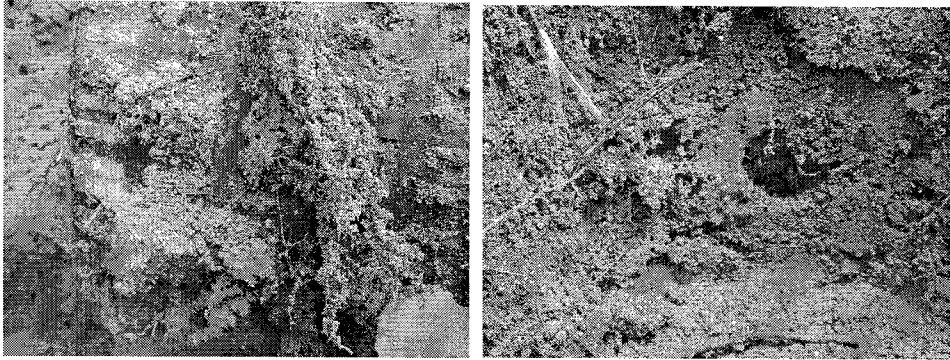
송이 균 생존 유무는 송이 감염묘 이식 후 1년이 경과한 시점에 양양의 24본과 홍천의 7본을 대상으로 조사하였다. 이때 식재된 소나무는 완전히 뽑아서 관찰하였는데, 양양에서는 천연치수 2본, 홍천에서는 양묘된 소나무 1본에서 송이 균이 생존하고 있음을 확인하였다. 양양에서 조사된 소나무는 송이 균이 직경 4cm와 10cm 크기로 성장하고 있었으며, 홍천의 소나무는 직경 4cm 크기로 송이 균이 자라고 있었다(그림 3-4-5-D). 하지만, 조사 후 소나무를 원래 위치에 다시 식재하고 1년 후에 송이 균의 생존 유무를 확인한 결과, 송이 균이 생존하였던 3그루 모두 송이 균의 활력이 떨어져 사멸하고 있었다(그림 3-4-5-E).

송이 감염묘의 송이 균 확인은 이식 후 1년이 경과한 시점부터 송이 균의 생존 유무를 확인할 수 있으나, 소나무를 완전히 파내서 확인하는 것은 살아있던 송이 균을 죽이는 부작용을 낳았다. 이에 따라 소나무를 완전히 굴취하지 않고 송이 균의 생존유무를 확인하는 방법이 필요하였는데, <그림 3-4-3>의 색대를 이용하는 방법을 사용하였다. 결국, 송이 감염묘의 송이 균 성장 확인은 이식하고 2년 이상 경과된 후에 색대 등을 이용하여 소나무 뿌리를 파내지 않고 확인하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.

송이 감염묘에서 송이 균을 확인하기 위하여 감염묘를 파내는 것이 왜 송이 균에게 영향을 주는가? 송이 감염묘를 파내면, 소나무 뿌리가 뽑히거나 잘린 상황이 벌어지고 송이 균의 정착환경에 급격한 변화가 온다. 그리고 소나무가 다시 정착하기 위해 많은 양분을 소모하기에 송이 균에게 전해질 수 있는 양분이 부족하게 되어 결국 송이 균의 성장에 치명적인 해가 되는 것으로 판단되었다. 과

거에 많은 송이 감염묘 연구를 수행하면서 양은 많지 않은 상황에서 수시로 송이 균근의 존재 여부를 파악했던 것도 성공하지 못했던 이유의 한 가지가 될 수 있었음을 시사한다.

송이 감염묘에서 송이 균을 확인하기 위해서 소나무를 들어내지 않고 송이 균의 생존유무를 확인할 수 있는 방법으로 색대를 이용할 수 있다. 이 방법은 소나무와 송이 균에 최소한의 피해를 주면서 송이 균의 생존유무를 확인할 수 있었다. 색대를 이용한 송이 균의 확인은 송이 균이 매년 약 5cm 정도 자라기에 송이 감염묘 이식 후 2년 정도 지나면 송이 균이 화분 밖으로 뻗어가지 시작하기에 2년 혹은 3년째에 화분의 가장자리 바로 안쪽부분을 확인하면 된다(그림 3-4-7).

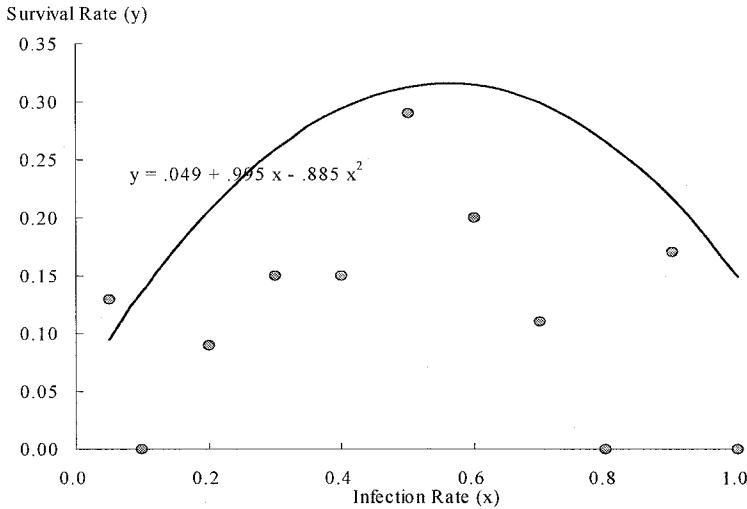


<그림 3-4-7> 이식 2년 후의 송이 균사 생존 모습(흰색 균사 덩어리).

한편, 감염묘 이식장소에서 가장 중요한 것은 이식한 소나무가 건전하게 자랄 수 있는 환경을 만들어 주는 것이다. 특히 충분한 햇빛이 들어오도록 소나무림의 가지치기를 해주어야 한다. 과거 실험에서 송이 감염묘가 실패한 가장 큰 요인은 이식한 소나무가 잘 자랄 수 있는 환경여건이 아니었고, 송이 균을 확인하는 과정에서 자주 감염묘를 굴취한데 있었던 것으로 판단되었다. 小川과 伊藤(1989)의 경우, 송이 감염묘 이식 후 6년째에 송이가 발생하는 것을 확인한 바 있다고 보고하였는데, 식재한 감염묘가 정상적으로 자랄 수 있도록 상층의 소나무는 가지치기를 해 주고, 송이 균의 성장 유무 확인을 위해 감염묘를 굴취하는 일이 없어야 한다.

**마. 송이 감염묘의 정착에 있어 초기 송이균 감염율과의 관계**

송이 감염묘의 이식 시점에 조사한 감염율과 이식 후에 송이균의 생존율과의 관계를 알아보기 위하여 2차 함수를 구한 결과, 송이 감염묘는 감염율이 약 50~60%일 때 최적의 생존율을 나타내었다(그림 3-4-8). 이는 송이 균이 감염묘 생산을 위하여 뿌리의 50%를 감싼 시점에 이식을 할 경우 송이 균의 생존율이 가장 높음을 시사하는 것이다.



<그림 3-4-8> 감염묘 이식 시점의 감염정도와 송이 균사의 생존비율의 관계.

マツタケ研究懇話會(1983)는 감염묘 생산용 소나무 뿌리에 송이 균의 감염은 외형상 송이균이 30~50% 정도 일 때 내측의 소나무 뿌리에 균근이 형성되었고, 50% 정도가 가장 좋은 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서도 여러 가지 송이 균 감염정도를 통해서 외형상 50~60% 정도가 가장 송이균 활착율이 높게 나타남을 알 수 있었다.

**마. 송이 감염묘에서 송이균의 생존 기작**

송이 감염묘를 이식한 이후 화분 속에 존재하는 대부분의 송이 균은 죽는다. 화분속의 대부분의 송이 균근 부분은 기존의 균환에서 자라나온 송이 균 및 소나무 뿌리이다. 소나무 화분을 옮길 때는 균환부분에서 자라나온 소나무 뿌리들이 절단되어 화분 속에 포함된 송이 균근은 양분공급이 차단되어 죽어가고,

화분에 심겨진 소나무 뿌리에 송이 균근이 형성된 부분만 생존하여 성장하기 시작한다. 이식 후 2년이 경과해야 주변의 큰나무의 뿌리에 송이 균이 전이될 수 있는 상태가 된다.

송이 감염묘 이식 후, 땅 속에서 송이 균의 생장은 방향성을 가지고 있었다. 감염묘의 이식과정에서 기존의 균환으로부터 화분 속으로 뻗어온 송이 균사체와 송이 균근은 모두 죽고, 감염묘로 식재한 소나무 뿌리에 송이 균근이 형성된 부분만 생존하게 된다. 즉, 감염묘 생산을 위한 땅분이나 그물 내의 송이 균근은 이식과정에서 양분을 제공하던 원래 송이 균환부의 소나무 뿌리가 절단됨으로 인해 양분공급이 차단하게 된다. 이로 인해, 화분 내의 많은 송이 균은 영양을 공급받지 못하게 됨에 따라 죽게 되고 단지 감염묘용 소나무 뿌리에 송이 균근을 형성한 경우에만 지속적으로 양분공급을 받을 수 있으므로 이식 후에도 생존할 수 있는 것이다. 한편, 이식된 감염묘의 송이 균의 성장방향은 송이 균이 감염되지 않은 부분이므로, マツタケ研究懇話會(1983)가 기술한 것처럼 뿌리 선단에 송이 균 감염부위를 접하게 하는 방식보다는 그와 반대방향으로 감염묘를 이식하는 것이 더 바람직 할 것으로 판단된다. 즉, 이식되는 감염묘 뿌리의 성장방향과 이식지 소나무의 뿌리방향을 일치시키는 것이 바람직한데, 이는 새로운 뿌리들이 송이 균이 없는 곳으로 발전해 나가면서 성장하는 송이 균 선단과 만날 수 있는 확률이 높기 때문이다(그림 3-4-6).

#### 사. 송이 감염묘의 생산과 이식 장소

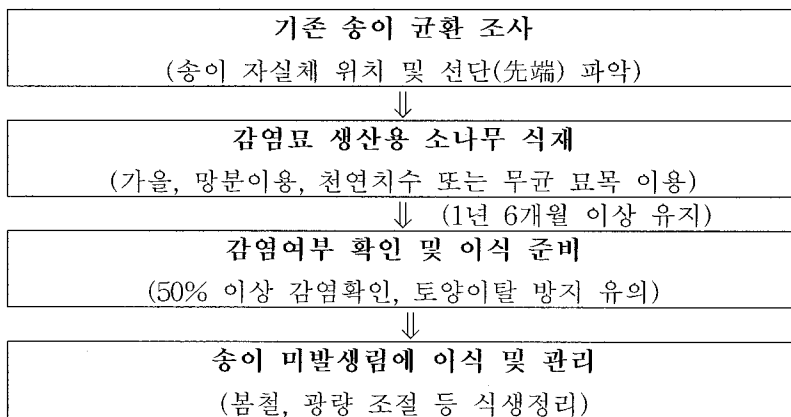
송이 감염묘의 생산지와 이식지의 차이에 따라 송이균의 생존율에 큰 차이를 보였다. 양양에서 만들어진 송이 감염묘를 홍천으로 옮겨온 것은 12%의 송이균 생존율을 보였으나, 홍천에서 만들어진 송이 감염묘를 같은 지역에 옮긴 것은 37%의 송이균 생존율을 나타내었다. 신토불이의 원리인가?

한편, 송이 감염묘를 식재하는 과정에서, 화분 속의 흙을 털어 송이 균이 감염된 부분만 남기고 식재를 하였다. 산자락에서 산 위로 송이 감염묘를 옮기는 작업의 효율성을 감안하여 미리 확인하면서 불필요한 흙은 제거하는 취지에서 실시하였는데, 이렇게 처리할 경우 송이 균은 천연치수(17본)에서 35.3%, 양묘(16본)에서 0%의 생존하는 결과를 낳았다. 이는 토양의 제거에 의한 결과라고 판단되기 보다는 천연치수와 양묘치수의 차이로 파악할 수도 있는데, 이 부분에 대하여는 다소 논란의 여지가 있는 것이 사실이다.

#### 4. 결론

송이 감염묘 이식은 송이 균을 가진 소나무를 이식하여 송이 균환을 새롭게 형성하는 기술이다. 감염묘의 송이 균 감염율과 이식 후 송이 균 생존율의 관계를 분석한 결과, 송이 감염율이 50~60% 의 감염묘를 이식할 경우 가장 높은 송이 균 생존율을 나타내었다. 감염묘 생산용 야외 소나무는 수고 1m 이상의 건전한 소나무를 선택하는 것이 중요하였으며, 감염묘 생산용 소나무 식재는 우리나라의 봄철 가뭄을 감안할 때 가을철이 유리하였다. 한편, 생산된 감염묘의 이식은 반대로 가을철보다 봄철에 하는 것이 송이 균 정착을 위하여 유리하였다. 따라서 송이 감염묘는 가을철에 송이 균환 선단에 소나무를 식재하여 생산하되 송이 균이 뿌리의 40~50% 감염율을 갖게 하도록 1년 6개월을 기다려서 봄철에 이식하는 것이 바람직하다. 봄철에 식재한 소나무는 2년이 경과한 봄철에 이식하는 것이 좋다. 이식한 화분에서 송이 균 생장은 야외의 송이 균환에서와 같이 방향성을 가지고 있었고, 이식 전에 성장하였던 화분 안의 송이 균은 이식 후에 대부분 죽었다. 따라서 감염묘 자체에 균근을 형성한 뿌리를 유지, 발전시키는 것이 매우 중요하며, 이식한 소나무가 건전하게 자랄 수 있도록 가지치기 등 환경 조절을 해 주어야 한다. 또한, 이식한 송이 감염묘는 2년 이상 경과 후에 송이 균 생존 유무를 색대를 이용하여 확인하는 것이 바람직하다.

이러한 전반적인 결론을 토대로 <그림 3-4-8>와 같이 ‘송이 감염묘 생산 및 이식과 관련한 모식도’를 도출할 수 있었다.



<그림 3-4-9> 송이 감염묘 생산 모식도

## 제5절 송이 고체 접종원을 이용한 송이 균환 형성 기술

### 1. 서론

1단계의 연구를 통하여 송이의 대량배양 조건을 확립할 수 있었으며, 특히 고체 매질에 송이를 키울 수 있는 방법이 개발되었다. 이는 고체매질에 배양된 송이 균사를 직접 송이가 나지 않는 곳으로 가지고 나가거나 기타 중간 매개체로 활용하면서 새로운 송이 균환을 형성하거나 실내에서 소나무와 무관하게 송이 자실체를 유도하는 시도를 할 수 있음을 의미한다.

하지만, 송이 채취업을 통하여 소득을 올리고 있는 농가의 입장과 송이의 자실체 형성조건을 명확히 파악하지 못하고 있는 연구수준을 고려하여 본 연구에서는 고체 접종원을 이용하여 송이 균환을 새롭게 만드는 방법을 시도하였다. 첫째는 소형 소나무 접종묘목 생산은 가능하게 되었지만 이를 통해서도 소나무가 일정한 수준 이상으로 성장할 때까지 기다려야만 하는 문제를 해결하고자, 대형 소나무 무균묘목을 만들고 이에 고체매질에서 성장한 송이 접종원을 투여하여 화분에서 키우는 방식을 시도하였다. 둘째는, 고체 접종원을 직접 산지로 가지고 나가서 송이가 생산되지 않는 산에 직접 투여하고 송이 균근이 형성되는지 여부를 확인해 보았다. 접종한 송이 균사체가 일반적인 야외조건에서 지속적으로 송이 균사를 뺄 수 있게 하는 것은 Eto 등(1982)의 연구결과를 고려할 때 매우 어렵다. 예비실험에서도 특별한 처리가 없이 현지에 직접 처리실험에서 송이균은 모두 오염되는 모습을 보였다. 따라서 소나무의 단근처리 및 훈증처리 후 고체 접종원 투입을 시도하여 단기간에 송이가 안정화될 수 있는 방법을 모색해 보았다.

### 2. 취목묘 이용을 통한 시도

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 취목처리

대형 소나무 무균묘목을 생산하기 위하여 소나무의 가지를 환상박피하고 IAA(sodium 5-chloro-3-indole acetate)를 처리하여 발근을 유도하는 공중 취목을 4월 말에 실시하였다. 직경 2cm 내외의 3~4년생 가지를 대상으로 하여, 3개 산지별로 12본씩을 선정하고 4방위별로 총 144본의 소나무 가지에 취목을 실시하였다. 취목 처리는 소나무 가지를 환상박피한 후 0.5% IAA powder를 붓

으로 돌아가면서 발라준 후, 수태(sphagnum moss)로 덮고 투명 비닐로 감싸 놓았다. 취목 처리 후 6개월 및 1년 경과 후 발근여부를 확인하였다.

환상박피를 실시한 소나무는 7월에 중간 점검을 하였을 때 초두부의 생장에 전혀 지장이 없는 모습을 보여서(그림 3-5-1) 수피 부분을 벗겨내고 처리한 방식이 소나무의 생존에는 문제를 야기하지 않음을 알 수 있었다.



<그림 3-5-1> 대형 무균 소나무 묘목 생산을 위한 취목 처리모습.

## 2) 취목묘를 이용한 송이 접종묘목 생산

취목이 성공하여 발근된 소나무는 원래의 가지부분에서 잘라내어 실험실로 이동한 후 멸균한 토양에 고체매질에서 성장한 송이 접종원을 3~5개씩 투여하여 그 효과를 점검하고자 실시하였다. 하지만, 이후 결과 및 고찰에서 설명할 취목묘 생산량이 극히 저조하여 진행할 수 없었다.

## 나. 결과 및 고찰

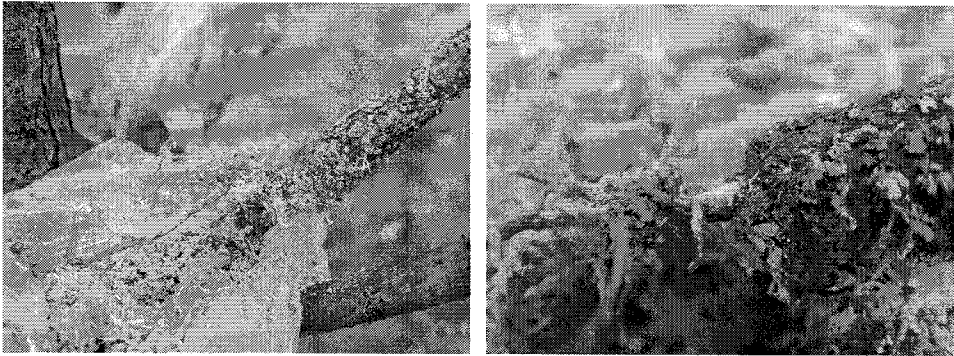
### 1) 취목묘 생산

취목 처리한 소나무를 점검한 결과, 144본의 가지 가운데 단 2본(성공률 1.4%)이 발근된 모습을 확인할 수 있었다(그림 3-5-2). IAA의 처리 시에 탄올에 녹이는 농도 및 환상박피(環狀剝皮) 후 도포(塗布) 시의 농도에 기인한 것으로 판단되며, 취목에 성공한 나뭇가지는 다른 처리에 비하여 가지가 옆으로 누워있는 경향이 강하고 수태(sphagnum moss)의 양은 많지만 수분을 상대적으로 적게 함유하고 있었다. 본 연구를 추진한 시험지가 소나무 산지시험을 하는 곳이었기에 산지시험 결과에 영향을 미치지 않도록 아랫부분의 가지를 사용한

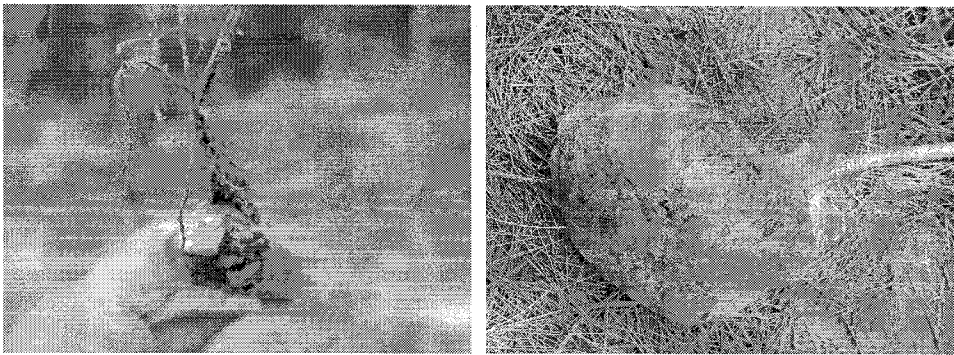


관계로 임연부의 가지는 문제가 없으나 임분 내부에 위치한 소나무의 가지 중에서는 일부 고사한 모습을 확인할 수 있었다. 따라서 소나무 취목을 목적으로 한다면, 독립목이나 임연부에 위치한 나무를 활용하는 것이 바람직하다.

또한, 취목에 성공한 2본 모두 뿌리가 골고루 발생하지 않은 상태로서 한 쪽에 치우쳐진 모습을 나타내었는데(그림 3-5-3), 이는 IAA를 도포하면서 윗 부분에 집중하여 도포를 한 탓으로 여겨진다.



<그림 3-5-2> 취목을 통하여 발근된 소나무 가지의 모습.



<그림 3-5-3> 한쪽에 치우쳐 발근된 모습 및 이식을 위한 포장 상태.

## 2) 취목묘를 이용한 송이 접종묘목 생산

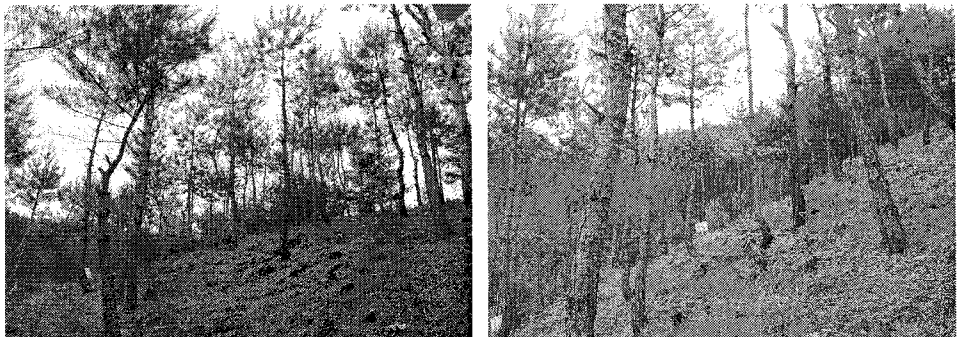
취목에 의하여 생산된 소나무는 단 2본으로서 수량이 충분하게 확보되지 못했으며, 확보된 수목조차 뿌리가 한쪽으로 치우쳐 발달하는 등 접종묘목을 생산하기에 적합하지 않았다. 원래의 계획은 이를 멸균토양을 담은 대형 화분에 이식하여 고체 매질에서 배양된 송이 접종원을 투여하고 송이 균근 형성 여부를 확인하고자 하였으나 전단계의 취목묘 생산이 쉽지 않아서 이후의 실험을 진행할 수 없었다.

### 3. 고체매질을 직접 토양에 투여하는 방식 연구

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 시험지 선정 및 준비

송이 고체 집중원 처리를 위한 시험지는 강원도 홍천군 동면 소재 송이 시험지에서 약 1km 떨어진 지점의 낙엽송 조림지 내부에 위치한 소나무림에 확보하였다. 본 지역은 원래 송이가 전혀 생산되지 않던 지역으로서 송이 감염묘 이식을 통해 새로운 송이 균환을 형성하려는 연구를 진행하고 있는 곳이다. 시험지 확보(20m × 20m)를 위하여 감염묘 이식 시험지 옆의 소나무 숲에서 유입된 활엽수를 제거하고 소나무의 밀도 조절을 실시하였다. 기존의 농림부 특정과제로 수행된 연구결과를 반영하여(박 등, 1999), RSI(상대공간지수) 35 이상의 조건을 확보할 수 있도록 수고 10m 기준으로 나무사이의 공간이 3.5~4.0m의 거리가 되도록 강도의 간벌 실시 후 폐기물은 대상지 외부로 반출하였다.



<그림 3-5-2> 송이 고체집중원 집중을 위한 시험지 관리 후 모습

##### 2) 단근 및 훈증처리

2005년 11월에 소나무의 뿌리 생장이 멈춘 시점에 단근처리를 하였으며, 일부 처리구에는 토양 훈증제를 이용한 훈증처리를 실시하였다. 각 시험구는 단근처리, 단근 및 훈증처리의 2종류를 각각 2m × 25cm의 크기로 6반복이 진행될 수 있도록 준비하였다. 단근 처리구 삼으로 2m × 25cm의 길이 및 폭으로 30cm 이상 굴취한 후 뿌리를 전정가위를 이용하여 세밀하게 단근처리한 후 다시 토양을 덮어 놓는 방식으로 처리하였다.

단근 및 훈증 동시 처리구는 단근처리구와 동일한 처리를 한 후 토양을 덮으면서 토양 훈증제(밧사미드 입제)를 토양에 잘 혼합하며 투입한 후 비닐을 덮고

다시 그 위에 흙을 얹어서 토양훈증제가 2주일간 남아 있을 수 있도록 처리하였다. 처리 당시의 토양온도는 12.5~13℃ 이었으며, 2주일 후 비닐을 벗겨내고 2주일간 훈증제가 휘산될 수 있도록 기다렸다.



단근(斷根) 처리구의 굴취모습



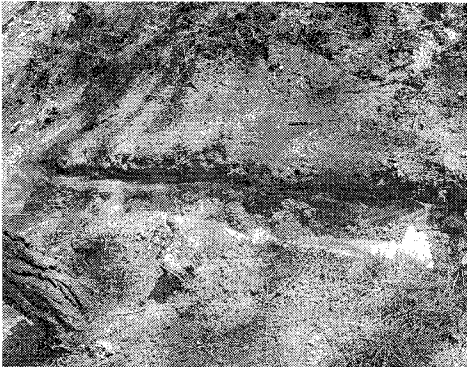
단근(斷根) 처리 세부모습(폭 25cm)



훈증제



훈증제 혼합



훈증제 혼합 후 비닐 피복



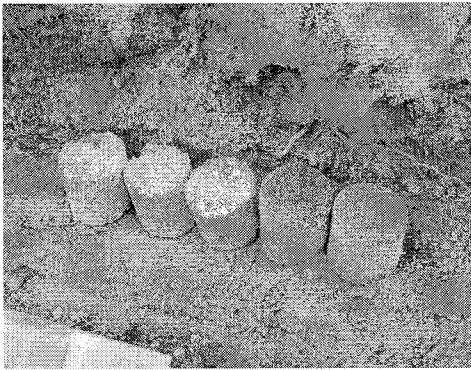
피복이 완료된 상태

<그림 3-5-3> 단근 및 훈증처리 모습

### 3) 고체 접종원 투여

고체 접종원 처리는 단순 투여, 단근 투여, 훈증 투여, 단근 훈증 투여로 2지역(홍천, 홍릉)에 2수준(3~5개 블록)으로 5반복 처리를 하였다. 단근 및 훈증 이후 2주가 경과한 후 가을철 투여를 하였으며, 봄철 처리구는 2006년 4월에 가을철과 마찬가지로 방법으로 고체접종원을 투여하였다.

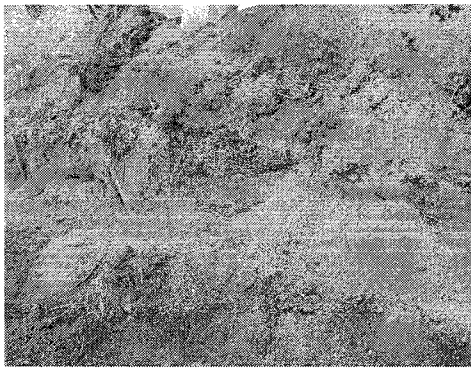
미리 준비한 2m × 25cm 크기의 각 처리구각 좌측에는 3개, 우측에는 5개의 송이 고체 접종원을 각각 투입한 후 토양을 피복하였다(그림 3-5-4).



단근 및 접종원 투입 준비



접종원 투입(3개 및 5개)



접종원 투입 후 흙 피복



접종원 투입후 정리된 모습

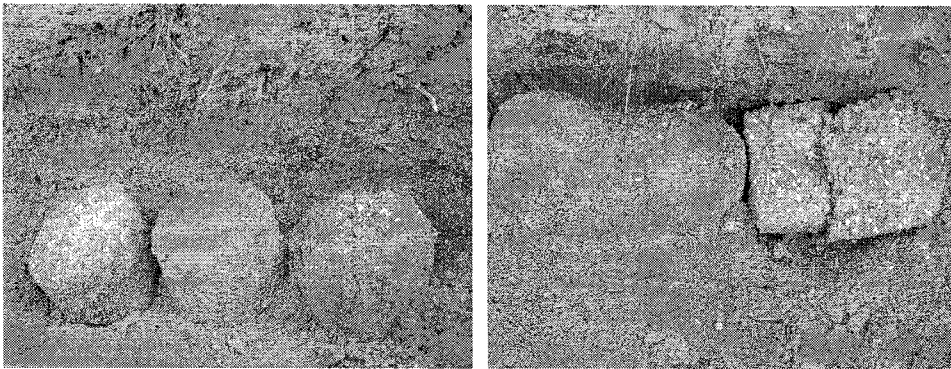
<그림 3-5-4> 접종원 투입 및 흙 피복 모습

### 나. 결과 및 고찰

2006년 6월에 접종원 및 뿌리의 발달상태를 조사하였지만, 훈증 처리구의 경우에는 훈증처리(2005년 11월 8일 ~22일)에 사용한 밧사미드 입체의 범

새가 잔존하고 있었다. 즉, 훈증토양의 경우에는 토양온도가 매우 높은 여름철이 지나기 전까지는 훈증제의 영향에서 벗어나지 못하는 것으로 판단된다. 각 훈증 처리구의 경우에는 추계 투입(2005년 11월 28일)과 춘계 투입(2006년 3월 16일)에 상관없이 투입된 송이 접종원은 투입당시 모습과 큰 변화없이 잔존된 상태이었다. 훈증제의 영향으로 다른 균이 전혀 침입하지 못한 상태이었다.

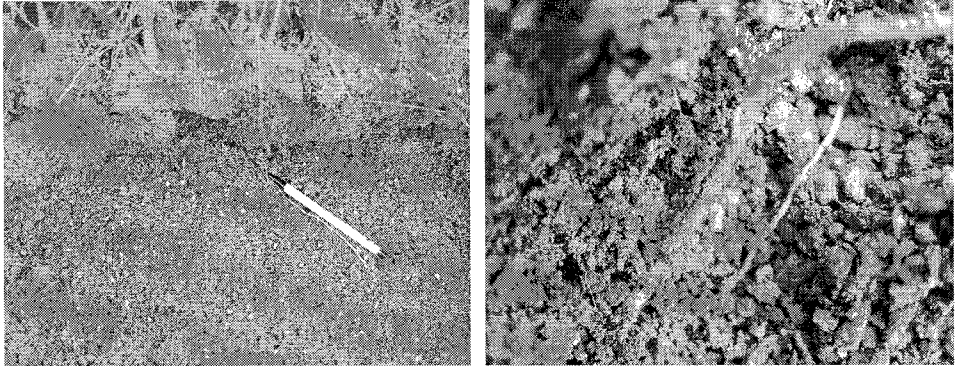
한편, 소나무를 비롯한 식물 뿌리 발달이 거의 없이 resin이 형성되며 발달이 정지된 상태로 머물고 있었다. 즉, 처리한 훈증제의 농도가 너무 높아 오염을 유발하는 균만이 아니라 식물 뿌리의 성장에도 장애를 초래하고 있는 것으로 판단되었다. 일반적으로 훈증제를 처리하고 나면 오랜 시간이 지난 후에 파종이나 기타 처리를 하는 반면, 본 연구에서는 단근 처리를 한 후 훈증처리를 함에 따라 약해가 발생한 것으로 생각된다. 따라서 금후 이 방법을 도입할 경우에는 훈증제의 사용농도를 조정하거나 훈증을 먼저 한 후 단근을 실시하는 방법 등을 강구하여 할 것으로 판단된다.



<그림 3-5-5>훈증 처리구의 잔존 송이 균사체 및 소나무 뿌리 미발달 광경

반면, 단순 단근 처리구(훈증 비처리구)의 경우에는 소나무 뿌리를 비롯한 각종 식물 뿌리의 발달이 매우 활발하여 소나무 뿌리의 경우 새 뿌리가 15cm 정도 발달한 상태로서 접종원 속으로 뿌리가 발달된 모습도 확인할 수 있었다. 하지만, 투입된 송이 접종원의 균체 대부분이 분해된 상태이며, 송이 균의 활력이 거의 없는 모습으로 판단되었다(그림 3-5-6). 단, 춘계(4월) 투입구로서 5개의 접종원을 함께 투입한 경우에는 아직 송이 접종원이 분해되지 않고 모습을 유지하고 있었는데, 뿌리 발달이 활발하므로 송이 균사가 소나무 뿌리를 만날 기회를 형성할 수 있을 것으로 판단되었다. 즉, 가을철에 단근을 한 후 많은 수의 접종원을 춘계에 투입하는 방식을 도입하면 고체 접종원을 이용하여 새롭게 송이 균환을

형성하는 방식이 가능할 것으로 추측되었다. 본 연구과제가 7월에 종료됨으로 인하여 가을철까지 뿌리가 발달하면서 송이 균근이 형성될 수 있는지 확인할 수 없다는 아쉬움이 남는다.



<그림 3-5-2> 훈증 비처리구의 소나무 뿌리 모습

#### 다. 결론

고체매질에서 대량으로 배양된 송이 접종원을 이용하여 새로운 송이 균환을 만드는 방법을 시도하였다. 취목기법을 통하여 대형 소나무 무균묘목을 만들고 이에 고체매질에서 성장한 송이 접종원을 투여하여 화분에서 키우는 방식을 시도하였지만 소나무 취목 자체가 어려워서 뚜렷한 성과를 거둘 수 없었다. 이 시도를 위해서는 먼저 소나무 취목기술이 안정적으로 정립되어야 할 것이다.

고체 접종원을 직접 산지로 가지고 나가서 송이가 생산되지 않는 산에 직접 투여하고 송이 균근이 형성되는지 여부를 확인해 보았다. 소나무의 단근처리 및 훈증처리 후 고체 접종원 투입을 시도하여 단기간에 송이가 안정화될 수 있는 방법을 모색한 결과, 훈증처리는 다른 오염균의 유입을 막는 탁월한 효과가 있었지만 단근처리에 의해 새롭게 성장하는 뿌리에게 약해를 입히는 모습이 관찰되었다. 따라서 훈증제의 사용농도를 조정하거나 훈증을 먼저 한 후 단근을 실시하는 방법 등을 강구하여 할 것으로 판단되었다. 한편, 훈증을 하지 않은 경우에는 뿌리 발달은 좋지만 투입된 송이 접종원이 쉽게 분해되는 모습을 확인할 수 있었는데, 춘계에 5개의 블록을 모아서 투입한 경우에는 뿌리발달도 좋으면서 균사도 버티고 있는 모습을 보여 금후 발전 가능성을 확인할 수 있었으나 본 과제의 협약기간으로 인하여 현 시점에서 보고할 수 없음은 아쉬움으로 남는다.



## 제6절 송이 균의 생태적 특성

송이산 생태계에서 식생구조가 땅속 송이 균에게 가용한 토양수분에 어떤 영향을 미치는지에 대하여는 알려진 것이 매우 적다. 그러므로 공생관계에 있는 송이의 자실체 생산량을 늘리기 위해서는 송이산 식생과 송이균환부의 토양수분과의 관계, 송이 균환 내 토양수분의 시공간적 변화 등에 대하여 명확히 이해할 필요성이 있다. 이에 따라 본 연구에서는 송이산의 수분에 대하여 면밀히 살펴보면서 특히 송이 외생균근이 소수성(疏水性)을 띠는 지 여부를 확인하기 위하여 형태적 특징에 대하여 자세히 연구하였다.

### 1. 송이산 식생과 송이균환부의 토양수분과의 관계

#### 가. 서론

송이는 소나무와 공생하면서도 특이한 환경에서만 발생하므로, 송이산 소나무림의 생태계의 구조와 기능을 밝히는 것은 송이 생산의 지속가능한 경영면에서 매우 중요한 일이다. 송이산에서 소나무림이 울폐되면 송이는 잘 나지 않게 되며, 참나무속의 수종은 다른 외생균근과 공생관계를 맺고 있으므로 송이에게 불리하다고 할 수 있다. 하지만 철쭉과 진달래, 쇠물푸레나무는 오히려 송이에게 유리하거나 특별한 경쟁관계에 있지 않는 것으로 알려져 있다.

이러한 사실은 송이 발생에는 빛이 중요하다는 개념이면서도 토양수분 흡수에서 식생간에 경쟁이 있음을 암시한다. 지상부 식생이 과다하다는 것은 토양수분이 적어진다는 것을 뜻한다. 그러므로 본 연구에서는 송이산 식생과 송이 균환부의 토양수분과의 관계를 이해하고자 하였다.

#### 나. 재료 및 방법

본 연구는 송이 균환의 분포가 기록된 충북 괴산군 칠성면 속리산 국립공원 내 송이 생산 소나무림에서 수행되었다. 조사는 3개의 독립변수와 1개의 종속변수를 측정하여 관계를 분석하였다. 첫째 독립변수는 송이산 소나무림 생태계의 주요구성원인 소나무, 진달래, 철쭉, 신갈나무, 쇠물푸레나무이었으며, 둘째 독립변수는 엽면적지수, 세번째 독립변수는 소나무림 생태계의 기능으로 광합성, 증산속도, 잎의 수분 포텐셜이었다. 그리고 종속변수는 토양수분의 동태이다.

시험지의 주 수종은 조사구내 상층우점종인 소나무와 신갈나무, 하층 우점종으로는 진달래, 칠썩, 쇠물푸레나무 이었다. 잎면적지수는 LAI-2500 광학센서와 LAI-2000 식물수분 분석기로, 광합성속도와 증산량은 LICOR-6400 광합성 시스템으로, 선택된 수종의 수분포텐셜은 식물수분 분석시스템(Model 1000, PMS Co, Corvallis, USA)으로 측정하였다. 토양수분 동태는 Hydrosensor 휴대용 토양수분 측정기로써 주기적으로 측정·기록하였고, 연중 토양수분함량의 변화는 Time Domain Reflectometer 센서 측정된 수분량을 CR10X 데이터 로거에 기록하여 데이터를 보완하였다. 자료는 시기별로 측정된 식생구조와 기능-토양수분동태와의 관계를 독립변수: 종속변수의 관계로써 분석하였다.

송이 균환 부위별 송이균사체량은 에르고스테롤을 분석하여 추정하였다. 에르고스테롤 분석과정은 다음과 같다. (1) 시료 생중량 1.0g(전방, 선단, 20cm, 40cm 각각 3개씩 총 60개). (2) 에탄올 95% 10ml 첨가 후 mixing. (3) KOH 40% 5ml (KOH 40g + 물 60g) : 5배 --> KOH(200g) + 증류수(300g) = 500g. (4) vortex mixing한 후 sonication. (5) 80℃에서 45분간 중탕. (6) HEXANE 첨가 후 MIXING(완전히 섞이도록). (7) HEXANE과 물이 분리된 후 위에 있는 HEXANE을 추출 2회 실시 3ml씩. (8) HEXANE을 휘산. (9) 메탄올 1ml을 첨가하여 시험관 벽에 있는 에르고스테롤을 완전히 섞게 한다. (10) 주사기를 이용하여 섞인 메탄올을 추출한다. (11) 0.2마이크로미리 필터를 사용하여 필터링한 후 micro-tube에 보관한다. (12) HPLC 분석을 한다.

## 다. 결과

### 1) 송이 균환의 온도와 수분

송이 균환 내·외부의 온도를 송이 발생시기 동안 측정된 결과, 일반적으로 알려진 송이 원기 형성온도인 19.0℃는 9월 중순경에 도달한 것으로 추정되었다(표 3-6-1). 송이 균환과 비균환의 온도 차이는 비록 통계적 유의성은 없지만, 활성 송이균환부위인 선단이 송이 균이 없는 전방이나 사멸한 40cm 후방에 비하여 0.2~0.4℃ 높은 경향을 나타내었다(표 3-6-2). 또한, 토양수분은 송이 균환이 비균환보다 약 0.5~2.0% 낮았는데, 이것은 송이 균환이 에너지를 발생하는 대사작용을 하면서 열이 발생하고 수분을 소비하고 있음을 나타낸다. 이 현상은 결국 송이 균환부가 수분함량이 낮은 것은 송이 균사가 수분을 빨아들이지 않기 때문이 아니고, 대사작용으로 수분을 소비하고 있기 때문임을 나타낸다.



<표 3-6-1> 2005년도 송이생산시기동안 송이균환 부위별 토양온도 변화(℃).

날짜	8/31	9/17	10/14	10/28
	평균 ± 편차	평균 편차	평균 편차	평균 편차
전방	20.4 ± 0.8	19.3 ± 0.4	14.2 ± 0.6	11.5 ± 0.5
선단	20.6 ± 0.4	19.5 ± 0.8	14.4 ± 0.2	12.0 ± 0.3
20cm	20.7 ± 0.5	19.3 ± 0.4	14.3 ± 0.2	11.8 ± 0.2
40cm	21.1 ± 1.3	19.2 ± 0.2	14.3 ± 0.3	11.7 ± 0.2

\* 각 부위별로 3장소 반복의 평균과 편차임.

<표 3-6-2> 송이산 균환 내 위치별 토양수분 함량과 온도 변화.

(2005년 4월 30일 3개 측정치의 평균)

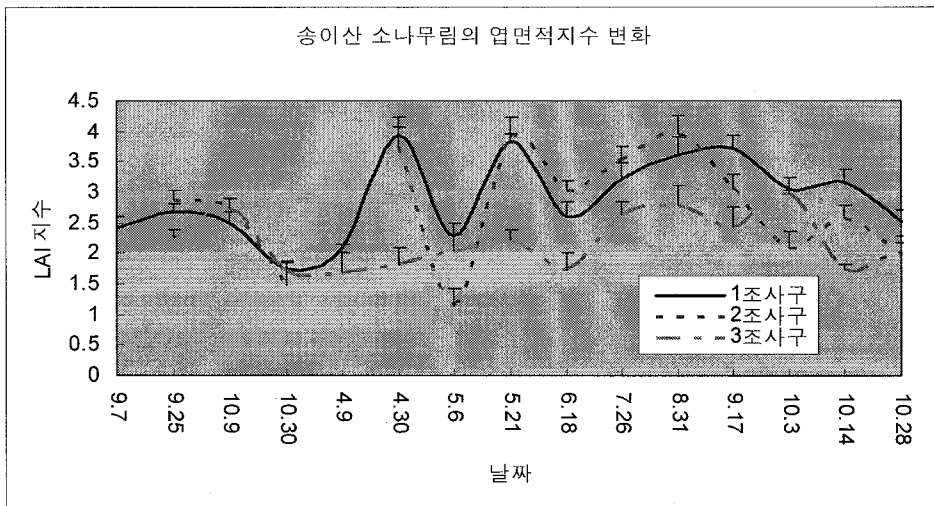
균환내 위치(cm)	수분함량(%)	온도(℃)
-20	13.5±2.1	
-10	14.5±0.7	13.3
-5	13.0±0.1	13
0	12.5±0.7	13.3
5	12.3±1.5	13.4
10	11.0±1.4	13.6
20	9.0±0.1	13.4
30	10.0±0.1	13
40	9.5±0.7	13.1
50	8.5±2.1	13.6
60	9.0±0.1	13.6
70	10.0±1.4	13.3
80	11.0±1.4	12.6

## 2) 엽면적지수와 토양수분과의 관계

엽면적지수와 토양수분과의 관계는 상관계수 0.055정도로써 통계적으로는 유의성이 전혀 없었다. 이처럼 유의성이 없게 된 주요 이유로서는, 이번에 측정된 엽면적지수는 생장시기와 관련된 것인 반면에, 토양수분 변동은 주로 계절적인 강우량과의 관련이 있었기 때문이다. 현재 수준에서는 송이산 소나무림생태계의 구조와 기능이 토양수분 변동에 어떤 영향을 주는지에 대해서는 충분히

분석을 하지 못한 상태이다. 차후 이 자료를 기초로 하여 보다 상세한 분석을 할 계획이다.

송이산의 수직적 구조로써 주요 상층식생은 소나무이었고, 중상층은 신갈나무, 하층은 진달래, 철쭉, 신갈나무, 쇠물푸레나무 이었다. 엽면적지수는 1.5 - 4.0으로 연중 변화하였고, 엽면적지수가 높은 시기는 4월, 5월, 9월로서 활엽수 잎이 무성해지는 시기이었다. 그러나 엽면적지수의 일시적 감소는 봄철의 곤충 피해, 여름철의 폭풍우피해에 기인하고 가을의 낙엽으로 장기적인 감소가 있었다. 송이산 식생의 엽면적지수는 가을에 2.6에서, 겨울에 2.1로 감소하고 늦봄에는 3.8로 증가하였다(그림 3-6-1).

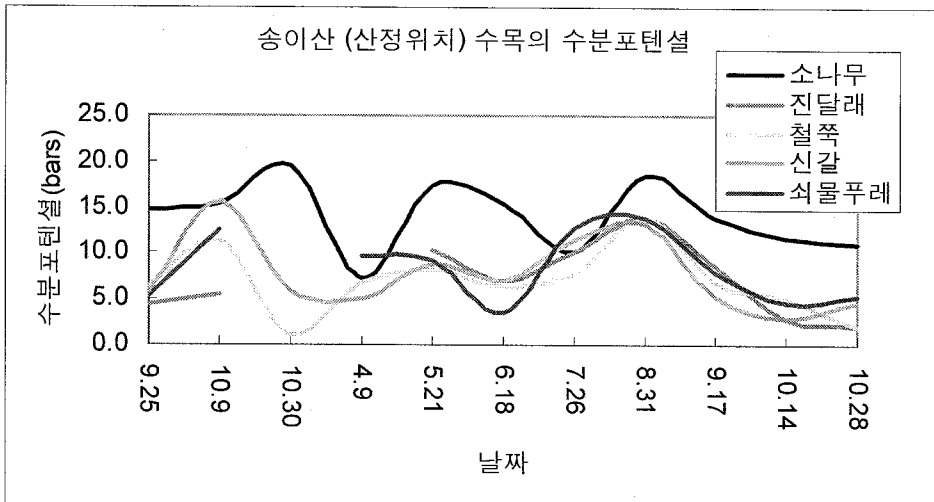


<그림 3-6-1> 송이산의 엽면적지수(LAI) 변화.

송이산 내 수목들의 광합성은 8월 말경부터 계속 감소하였다. 8월말 경 광합성량은  $6.0 \sim 7.0 \mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 10월 말경에 소나무  $4.0$ , 신갈  $2.0 \mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 감소하였으며, 철쭉은 마이너스 값으로 줄어들었으며, 쇠물푸레는 낙엽이진 후였다. 한편 송이산 내 수목들의 증산량은 8월말 경에  $2.5 \sim 3.5 \text{ mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$ 로부터 계속 감소하여 10월 중순경에는 약  $1.0 \text{ mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$ 이었다. 광합성은 송이철이 시작하는 8월 말경부터 계속 감소 하였으며 특히 철쭉과 쇠물푸레나무가 심하였다. 이에 비하여 신갈나무는 광합성감소가 늦었으며, 진달래는 중간이었다. 수분 증산량은 신갈나무에서 늦게까지 이어졌다.

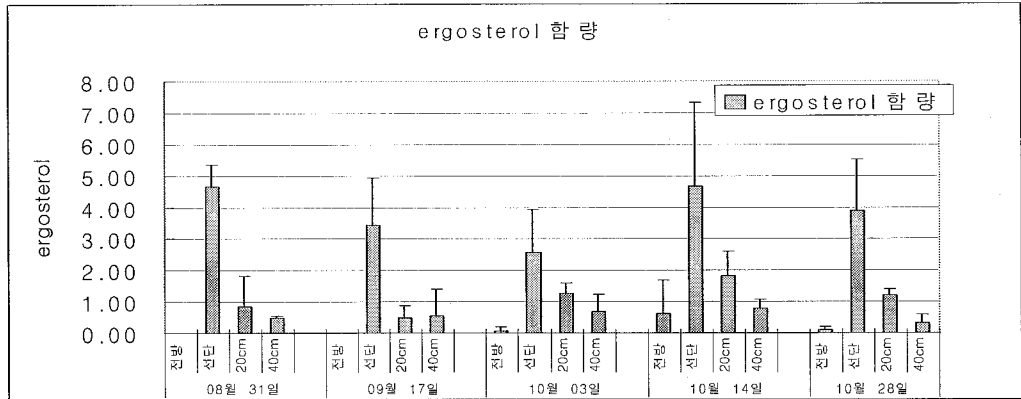
송이산의 토양수분은 지형과 관련이 깊었다. 산 능선부위인 2조사구에서 수분 함량이 대체로 낮은 7~11%였고, 중간인 산복은 8~15%, 그리고 산록은 11~19%의 범위이었다(그림 3-6-2). 송이산 소나무림에서 각 수종의 수분포텐셜은 소나무가 가장 낮은 -15bars 내외로 계절에 따라 -10~-22 bars까지 변화였다. 그 외 진달래, 철쭉, 신갈나무 쇠물푸레나무는 -5~-12bars의 범위로 변화하였는데, 8월 말경이 -12 bars로 가장 낮았고, 점차로 높아져서 송이생산이 거의 끝나는 10월 중순경에 -3bars 정도이었다.

이 기간동안 균환부의 토양수분변화는 전방이 가장 높은 12~19%, 선단이 10~11%, 후방 20cm에서는 9~11%로 가장 낮았고, 후방 40cm에서는 11~15% 범위였다.



<그림 3-6-2> 송이산 소나무림 내 산정 조사구 수목의 수분 포텐셜 변화.

에르고스테롤 함량은 송이 균이 없는 균환의 전방에서는 0~0.7 $\mu$ g/g 토양으로 매우 낮았으며, 균환의 선단부위에서는 2.5~4.8 $\mu$ g/g토양으로 가장 높았고, 20cm 부위에서 0.5~1.8 $\mu$ g/g토양, 그리고 40cm 부위에서는 0.3~0.8 $\mu$ g/g토양으로 낮아졌다. 균환부위별로 에르고스테롤함량에서 이런 변화는 2003년도의 8월과도 비슷한 경향이였다. 그러나 8월부터 10월까지 시기에 따른 에르고스테롤의 함량변화는 통계적으로 유의성이 없었다.



<그림 3-6-3> 송이 균환 내부의 부위별 에르고스테롤 변동.

#### 라. 고찰

이 연구에서는 당초 목표로 하였던 가설을 충분히 검정하지는 못하였지만, 송이발생에 철쭉과 쇠물푸레는 오히려 도움을 줄 수 있고 신갈나무는 그러하지 못하다는 설을 뒷받침한다. 엽면적지수와 토양수분과의 관계는 상관계수 0.055정도로써 통계적으로는 유의성이 전혀 없었다. 이 유의성이 없게 된 주요 이유로서는, 이번에 측정된 엽면적지수는 성장시기와 관련된 것인 반면에, 토양수분변동은 주로 계절적인 강우량과의 관련이 있었기 때문이었다.

생태학적으로는 송이산 소나무림 생태계의 구조와 기능을 밝히고 이들이 토양수분동태에 미치는 영향을 구명하는 것은 송이생산 변동을 이해하는데 기여할 것으로 생각한다. 송이산소나무림생태계에서 주요한 구성 종은 소나무 이외에 진달래, 철쭉, 신갈나무, 쇠물푸레나무였다. 광합성과 증산에 있어서 신갈나무는 10월말까지 다른 활엽수들 상당이 감소한 후에도 계속되었다. 이 현상을 신갈나무가 늦게까지 자라면서 소나무와 효율적으로 경쟁하므로 소나무의 활력과 땅속송이균이 불리해짐을 암시한다. 이에 반하여 쇠물푸레나무는 10월 중순이면 단풍이 들고 낙엽이 지므로 토양수분 이용을 멈추므로, 송이균은 토양수분이용에 유리하게 된다. 그러나 이 연구에서는 목표로 한 소나무림의 생태계의 구조와 기능이 토양수분동태에 미치는 영향을 충분히 밝히지는 못하였다. 그래도 이 연구로써 송이산 소나무림에서 일어나는 기능을 이해하여 산림생태학적으로 이해의 폭을 넓히게 되었다. 이 연구에서 사용된 토양수분측정기술과 연구결과는 효과적이고 경제적인 송이산의 토양수분관리를 통한 송이증산에 크게 응용될 것이며, 지

속가능한 송이산 경영의 기초가 될 것이다. 송이 균환의 수분관리에 관한 연구결과는 능이와 덩이와 같은 미개발된 균근성 버섯의 생산기술 개발에도 기여할 것이다.

## 2. 송이 균환내 토양수분의 시·공간적 변화

### 가. 서론

연간 송이생산은 송이가 나는 시기인 가을철 강우량과 온도에 따라 주로 좌우된다(박 등, 1998; 구, 2000; 조와 이, 1995). 최근 10년 동안에도 연간 송이 생산 집계량은 160~650톤으로 풍년과 흉년 간에 4배의 큰 차이가 있는데(구 등, 2001), 그 대표적인 예로써 가을철에 비가 흡족히 내린 2000년도에는 산림조합의 송이 공판량이 650톤인 반면에, 100년만의 가뭄인 2001년도에는 극심한 흉년으로 160톤 정도에 그쳤다(산림조합: <http://www.nfcf.or.kr>).

현재 국내에서 송이증산을 이루는 가장 중요 시도는 송이산에 관수하는 것으로 그 효과는 기상조건과 지역에 따라 30배 이상 나타났다(박 등, 1995). 그러나 2001년도는 전국적으로 100년만의 극심한 가뭄으로 송이가 전혀 나지 않은 곳이 매우 많았다. 전국 여러 곳에서 관수를 하였지만 송이증산은 이루지를 못하여 일부에서는 송이산 관수의 무용론이 나오기도 하였다. 하지만 충북 괴산군 칠성면의 속리산 쌍곡계곡에서는 오직 송이 균환을 중심으로 집중적으로 관수한 결과, 10m x 10m 시험구에서 12개의 송이가 발생하였다. 이에 반하여 수분이 부족한 주위 산에서는 전체적으로 송이가 전혀 나지 않았다 (충북산림환경연구소, 괴산군 산림조합, 충북대학교 미발표 자료).

이것은 송이 생장이 주위의 토양수분에 매우 크게 좌우된다는 것과 송이가 나는 곳은 송이균환이 분포하고 있는 곳 중에서도 특정한 지점이라는 것을 의미한다. 송이산은 대체로 능선부에 위치하여 수분이 더욱 모자라고, 이곳까지 수분을 공급하는 것은 에너지가 많이 드는 과정이므로, 수분이 필요한 정확한 위치에 관수하는 것은 수분과 에너지의 효율을 높이는 길이라고 생각한다.

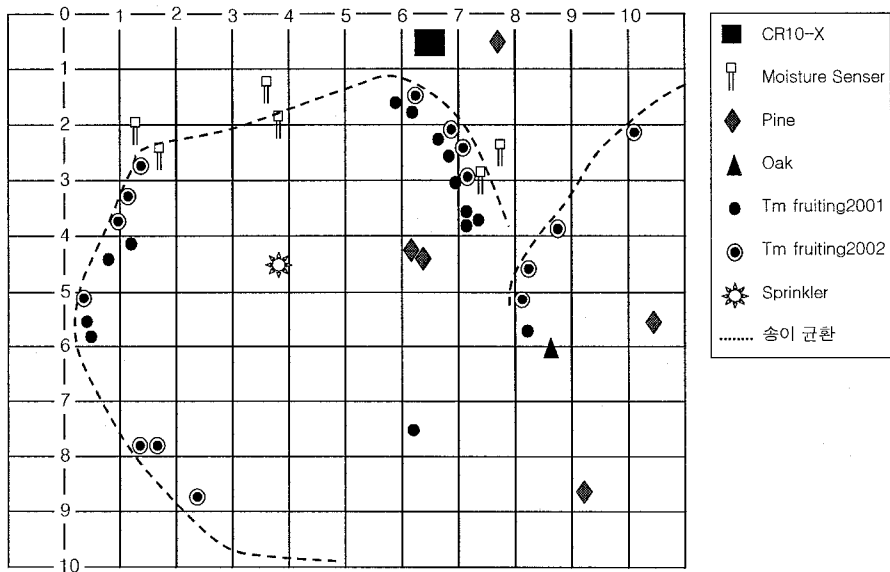
양송이나 느타리 같이 재배되는 버섯인 경우에는 물이 필요한 장소와 시기를 확인하여 조절하고 있다(Noble 등, 2000). 이번 연구에서는 관수를 하고 있는 송이산지에서 땅 속 송이 균환 내부의 수분 변화상태를 시간 및 공간적으로 밝혀 보고자 시도하였다.

## 나. 재료 및 방법

### 1) 시험구

이 연구는 송이생산을 위하여 송이철에 관수를 하고 있는 피산군 칠성면 쌍곡리 속리산국립공원 내 쌍곡계곡의 송이산지에서 2000~2002년의 8~10월에 수행하였다. 이 곳은 90년생의 소나무 피복도가 약 20%되는 곳으로 2000년도에 소나무, 진달래, 쇠물푸레나무, 철쭉나무를 제외한 거의 대부분의 활엽수가 제거되었다. 잔존 소나무는 흉고직경이 25~28cm 높이가 15m이다. 경사방향은 남동-북동으로 약 20도의 경사이며 능선부분이다.

조사대상 송이균환은 지름이 약 7.5~8.5m 되는 원호모양으로, 연간 송이발생 위치 변화가 약 12cm 이므로, 약 30년생으로 추정된다(그림 3-6-4). 이 균환은 땅속 2~32cm에 분포하였고 균환원의 약 3/4이 살아있으며 사멸부위는 주위 균환과 만나는 부분이었다. 조사는 균환부위별로 균환의 특징을 기록하고, 각 부위에서의 토양수분량과 에르고스테롤함량을 측정하였으며, 8월부터 10월까지 비균환과 송이균환 부위에서 토양수분변화를 측정하였다.



<그림 3-6-4> 속리산 쌍곡계곡 시험지의 송이 균환과 온·습도 측정용 TDR 센서 배치도. 송이 균환을 중심으로 균환 내·외부에 센서를 배치, 측정함.

## 2) 송이 균환 내 토양수분의 공간적 변화

송이산에서 송이 균이 있는 자리를 파악하기 위하여 小川(1991)의 서술을 참고하였다. 즉, 송이균과 소나무뿌리의 공생체인 균근은 땅속에 원형의 균환을 만든다. 이 균환은 매년 약 10~15cm씩 자라나가고 그 내부는 사멸하여 등근 환상이 된다. 송이균환의 폭은 대체로 약 1m에 이르지만, 균사가 살아있는 부분은 선단의 약 30cm로, 이 범위의 선단에서만 균이 계속 성장하여 뻗어나가고, 중간부는 송이를 발생시키며, 그 후단부는 송이버섯생장에 에너지를 공급한 후 점차로 사멸한다 (伊藤, 岩頼, 1997).

小川(1991)의 균환에 관한 서술을 참조하여 땅속의 송이 균환 내부의 종단면 구조는 송이균사와 소나무 뿌리의 발달상태에 따라 4개 부위로 나누었으며, 6개 수분측정 지점은 송이 균사가 아직 들어가지 않은 전방 (-5~0cm), 균사가 활발히 자라는 선단 (0~5cm), 당년에 송이가 날 예상 지점 (10~15cm), 지난 해 송이가 났던 지점 (20~25cm), 그리고 그 후방 40~45cm와 80~85cm에 휴대용 토양수분측정기인 Hydro-Sensor(Decagon Co.: volumetric 수분함량을 측정함)에 12cm 수분센서 probe를 장착하여 측정하였다. 대상 균환 내 3개의 지점에서 반복하여 측정하였다.

## 3) 에르고스테롤 분석

에르고스테롤은 균류에만 있는 스테로이드 화합물로서 살아있는 균사의 생체량과 비례하므로(Nylund와 Wallander, 1992), 송이 균환 내 부위별로 활성균사의 양을 알기 위하여 이 성분을 분석하였다. Hydro-Sensor로 토양수분을 측정한 송이균환 부위에서 2cm 직경의 토양시료채집기로 5~10cm 깊이의 시료를 채집하여 질퍽에 넣어 실험실로 가져와서 4℃에 보관하면서 24시간 내에 에르고스테롤을 추출하였다. 균환토양 2g을 50ml 시험관에 넣고 95% 에탄올에 녹인 10% KOH 용액 20ml를 첨가한 후 80℃에서 60분간 중탕하였다. 중탕한 후 상등액에 대한 에르고스테롤 정량과정은 구 등(2000b)의 방법을 따랐다. 에르고스테롤 분석시료는 조사대상 균환 내 3개 지점에서 반복하였다.

## 4) 토양수분과 온도의 시간적 변화측정을 위한 TDR 센서 설치

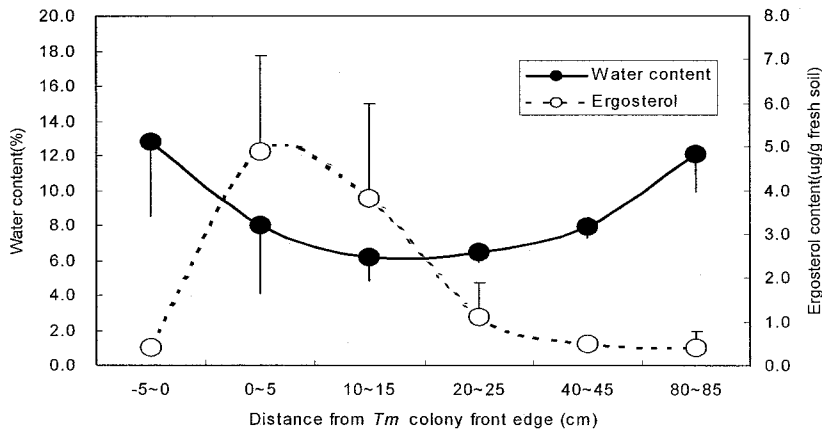
본 시험지에서 송이균환은 땅속 2~30cm 깊이범위에 분포하므로 TDR센서의 probe 길이를 25cm짜리를 사용하였다. 원호를 이루는 송이균환에서

지를 방향으로 송이 균이 없는 균환선단 외부 부위 5~10cm와 송이 균이 활발히 자라는 균환선단 부위 5~10cm에서 TDR 수분센서 각각 1개를 토양 속에 수직으로 매설하였다. 이렇게 하여 더 이상의 균환을 손상시키지 않고 균환 내 수분변화를 측정하였다. 토심이 25cm 이하이거나, 자갈이 많아서 토양수분의 변이가 너무 큰 지점은 피하였다. 이와 같은 요령으로 3개의 균환에 대하여 TDR 센서를 반복설치하였다. 각 수분센서에 병행하여 온도 센서를 그리고 지상 1.5m 높이의 나무줄기에 기온 센서를 설치하였다. 각 센서는 CR10X data logger(Campbell Co.)에 리드선으로 연결하고, 1시간마다 측정된 자료를 data logger에 저장한 것을 분석하였다.

#### 다. 결과

##### 1) 송이 균환 내 수분과 에르고스테롤 함량의 공간적 변화

송이 산지에 관수하기 전인 8월경에 송이 균환 내 수분함량은 균환이 없는 균환선단외부에서  $12.8 \pm 4.3\%$ 였지만, 균환의 선단 0~5cm에서는  $8.0 \pm 3.9\%$ , 그리고 선단으로부터 10~15cm 지점인 전년에 송이가 발생하였던 곳에서는  $6.2 \pm 1.4\%$ 로 수분이 더욱 적었다(그림 3-6-5). 그리고 선단으로부터 20~40cm 지점부터는 수분이 약간 많아져서 6.5~7.5%, 그리고 80cm 후방에서는 균환이 없는 곳과 비슷한  $12.1 \pm 2.2\%$ 였다.

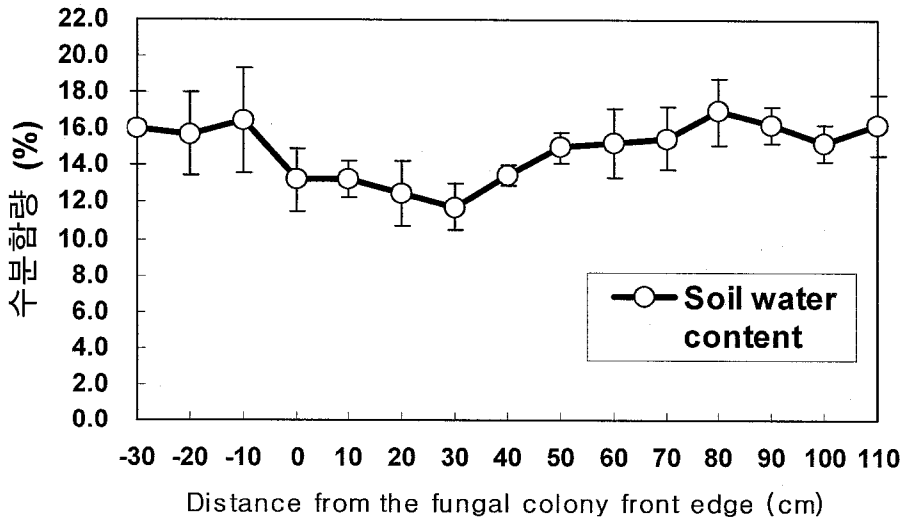


<그림 3-6-5> 토양 내 송이 균환의 수분과 에르고스테롤 함량. 각 점은 평균치를 나타내며, 선은 표준편차를 나타냄.



이에 반하여, 살아있는 균사의 양과 비례하는 에르고스테롤 함량은 송이 균사가 없는 선단외부에서 토양 생증량 단위 g당  $0.4\mu\text{g/g}$ , 송이 균사와 균근이 가장 활발히 발달하는 균환 선단 0~5cm에서 가장 높은  $4.9\mu\text{g/g}$ , 송이가 발생하였던 지점 10~15cm에서  $3.8\mu\text{g/g}$ , 선단에서 20~25cm 후방에서는  $1.1\mu\text{g/g}$ , 그리고 80cm 후방에서는 균환이 없는 선단외부와 비슷한  $0.4\mu\text{g/g}$ 이었다.

2002년 5-8월 조사에 의하면, 토양수분 함량은 균환 내에서도 활력이 있는 부위에서 낮았다(그림 3-6-6). 균환이 없는 균환전방은 15.8~16.5% 내외인 반면에, 활성 균환대인 균환 선단에서부터 약 30cm 폭은 토양 수분이 11.8~13.5%로 약 2~4%가 낮았다. 그리고 송이균환이 사멸한 40cm 지점 이후부터는 토양수분이 증가하여 약 15.0~17.0%로 균환이 없는 선단 외부와 비슷하였다.

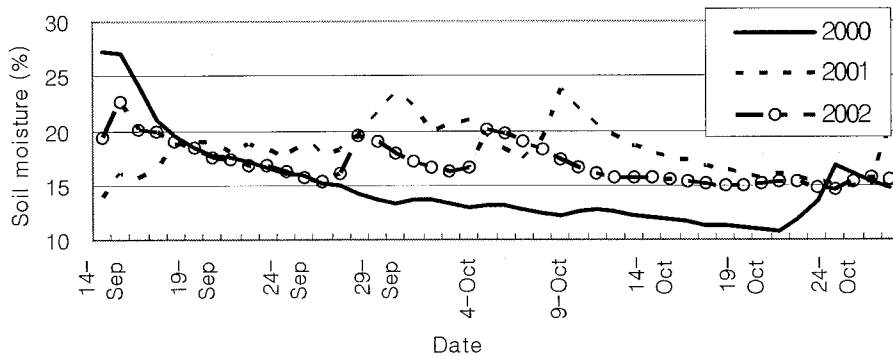


<그림 3-6-6> 송이 균환 선단부에서의 거리에 따른 토양수분 변화. 각 점은 평균치를 나타내며, 선은 표준편차를 나타냄.

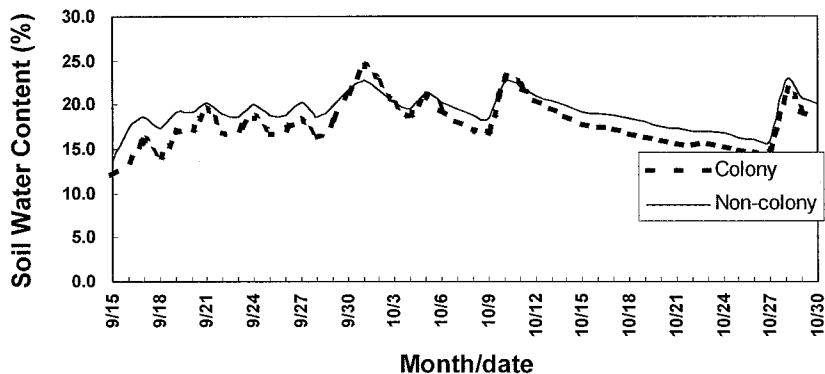
## 2) 송이 균환 내 토양수분 및 온도의 시간적 변화

2001년과 2002년도 9월과 10월에는 강수와 지속적인 관수의 영향으로 토양수분은 15% 이상 이었다(그림 3-6-7). 2002년도에 관수를 하는 동안 8월 24일부터 10월 30일까지 쌍곡 송이 발생지에서 송이균환내 평균 토양수분은 16.8%이고 비균환의 평균 토양수분은 19.0%로써 비균환의 토양수분이 2.2% 정

도 높았다(그림 3-6-8). 송이발생량은 10m x 10m 시험구에서 2001년도에 12개, 2002년도에 15개였다 (충북산림환경연구소 미발표자료). 그러나 관수시설 설치 이전인 2000년도 9월 말경부터 10월 중순까지는 토양수분량이 15% 미만으로 조사된 균환주위에서 송이 발생이 없었다.

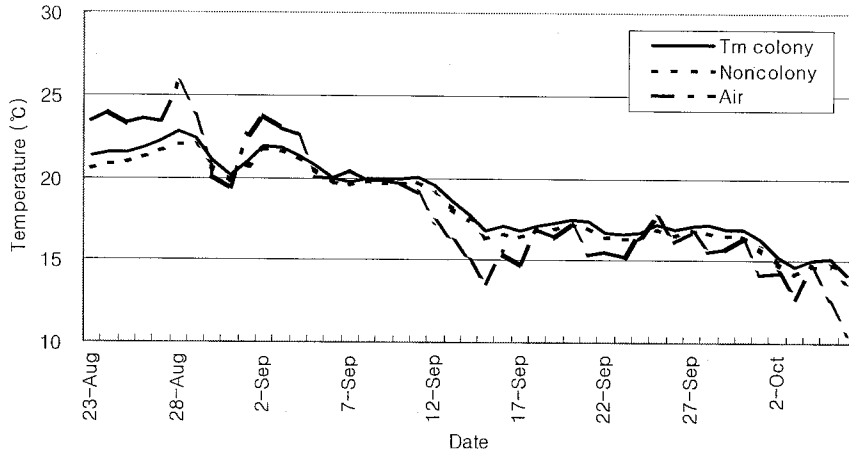


<그림 3-6-7> 2000년~2002년 송이 발생기의 송이 균환부 토양수분 변화.



<그림 3-6-8> 2002년 송이 발생기의 송이 균환부 및 비균환부 토양수분 변화.

대기온도는 9월 5일까지는 지중온도보다 높았지만 그 이후로는 계속 낮았다 (그림 3-6-9). 조사지의 평균지중온도는 발생지가 16.3℃이고 비발생지가 15.9℃로, 발생지가 0.4℃ 정도 높았으며, 온도변화는 대기온도가 가장 심하였고, 9월 12일부터는 19℃ 이하로 낮아졌다. 그리고는 10월 초순부터 15℃ 미만으로 낮아졌다.



<그림 3-6-9> 2002년 송이 발생기의 기온 및 토양온도 변화.

#### 라. 고찰

2000년도와 2001년 2002년의 3년간 토양수분변화를 비교하여 보면, 송이발생과 성장에는 토양수분이 15% 이상 유지하는 것이 필요한 것으로 생각되었다. 극심한 가뭄으로 강수량이 적었던 2001년도에도 관수시설을 설치하여 토양수분은 15% 이상이 유지되었다. 그 결과 주위 송이 산지에서는 송이가 전혀 발생하지 않았으나, 관수를 행한 이 시험구역 (10m x 10m, 균환길이 약 22m)에서만 12개의 송이가 발생하였던 것은(충북산림환경연구소 미발표자료) 송이균환에 직접 관수하는 것이 효과적이고 또한 일정 수준 이상의 토양수분이 유지되어야 송이가 발생함을 나타내는 것이라고 생각한다. Deacon(1998)은 배지의 습도가 14% 미만에서는 균사가 성장하지 못하고, 15~16%에서 생장이 가능하다고 하였다. 이 결과는 송이산의 식생과 수분관리와 관련하여 다음 네 가지 관점에서 고찰된다.

##### 1) 송이의 경제적 가치와 식생변화

우리나라의 소나무림이 생산하는 산물 중에서 가장 중요한 것 중의 하나는 송이버섯이다. 산림청(<http://www.foa.go.kr>)에 따르면, 송이는 연간 약 300톤이 일본에 수출되어 약 3,000만\$의 외화를 벌어들인다. 산림에서 목재생산으로 얻는 수익은 20년~40년을 지나도 불확실하지만 송이는 매년 수익을 제공하므로 산지에 따라서는 목재생산으로 얻는 수익 이상의 혜택을 산주에게 제공한다(김 등, 1999). 미국 오레곤주 산림에서 미국송이는 적어도 목재생산 만큼의

토지기망 가치(Soil Expectation Value)를 가지고 있다(Duncan, 2000). 하지만 많은 송이산이 솔잎혹파리 피해로 소나무가 쇠약하고 수고생장을 못하는 동안 참나무 등의 활엽수가 무성해져서, 송이의 절대기주인 소나무가 쇠퇴하여 송이는 점점 그 발생이 감소하였다. 그렇다고 활엽수림의 경제적 가치가 고려될 만큼 큰 것은 아니다. 번성한 활엽수의 증산작용으로 토양수분이 빨리 소비되므로 송이개는 더욱 불리해지고 있다.

## 2) 버섯과 물

버섯의 균사조직은 팽압을 유지하고 양분흡수등 생리활동을 하면서 수분을 소비한다. 대부분의 버섯은 90~95%가 물이므로, 버섯 배지가 함유하고 있는 수분함량이 버섯 성장을 좌우한다(Kalberer, 1991). Beyer 등(2000)은 양송이 재배에서 퇴비와 복토층에 각각 TDR 수분측정 시스템을 설치하여 배지내 수분을 모니터링한 결과, 버섯생장과 수확에 따라 신속히 수분량이 변하며, 복토층에 있는 수분이 버섯생장에 필요한 수분을 대부분 공급하고, 버섯의 수확량과 품질이 수분량과 관련이 있음을 확인하였다.

Noble 등(2000)은 양송이 재배 복토내 가용수분의 양을 전자수분장력계(electronic tensiometer)를 이용하여 계속적으로 측정한 결과, 버섯생장에 적당한 배지의 기질 수분 포텐셜은  $-8 \sim -10\text{kPa}$ 이었고 버섯이 성장하는 동안 복토 내 수분 포텐셜은  $-40 \sim -50\text{kPa}$ ( $-0.4 \sim -0.5$  bars)인 경우 버섯생산량이 가장 높다는 것을 밝혀내었다(버섯재배 배지의 수분 포텐셜은 기질 포텐셜과 삼투 포텐셜의 합이다). 이들은 또한 버섯의 성장에는 복토의 기질 포텐셜이 삼투 포텐셜보다 중요하다고 결론지었다. 한천배지에서도 버섯의 균사생장 또한 삼투 포텐셜보다는 기질 포텐셜에 더 민감하다 (Magan 등, 1995). 퇴비를 이용하여 재배되는 양송이버섯의 성장에 대하여는 배지의 수분변화를 계속적으로 모니터링하면서 효과적인 배지의 수분관리에 대한 과학적인 실험(Beyer 등, 2000)이 이미 이루어지고 있다. 양송이재배에서 배지의 수분상태가 중요함과 같이 송이산에 자연 발생하는 송이에 대하여도 토양 속 송이균환내의 수분상태가 중요하다고 생각한다.

## 3) 송이와 물

송이 자실체의 약 90%를 차지하는 수분(박, 1999)은 송이버섯 균사조직이 팽압을 유지하고 계속 성장하는데 절대적으로 필요한 것이다. 송이생산이 9월 강수량에 크게 영향을 받는 것은 이런 이유 외에, 송이산지가 토양수분의 공

급을 하늘의 강우에 의존할 수밖에 없는 산능선이나 산정부에 있기 때문이기도 하다 (박 등, 1995). 전국적으로 많은 송이산지가 이런 수분스트레스를 받기 쉬운 곳에 분포한다.

송이균환부에서 토양수분함량이 적다는 이번 결과는 허(1998)의 결과와 일치한다. 이렇게 수분함량이 적은 이유는 균환부위에 소나무 세근이 많고(허 등, 1999), 소나무+송이 균근이 토양의 물을 흡수하여 소나무 잎으로 올려 보내는 동시에 송이균사와 송이 자체가 물을 소비하기 때문이라고 생각된다. 1999년 9월과 10월중에 월악산 송이산지에서도 토양수분은 송이 균환이 없는 지점에서 12~25% 이었고, 송이발생지점 부근의 균환에서는 8.5~12%이었다(미발표 자료).

그러나 이 결과는 송이가 소수성이라는 설(허 등, 1999)을 지지하지는 않는다. 송이 균환의 수분함량이 비균환보다 대체로 낮기는 하지만, 강우나 관수로 수분이 공급됨에 따라 균환부의 수분함량이 증가하는 것은 균환부위가 수분을 흡수하기 때문이다. 실제로 송이 균사가 수분과 친화성이 없는 소수성이라면, 송이의 90%가 수분인데 이 수분을 공급할 수가 없을 것이다. 그리고 일반적으로 버섯이 순식간에 크게 성장하는 것은 세포가 팽창함과 동시에 세포액의 삼투포텐셜에 의하여 물이 유입하기 때문이다(Beecher와 Magan, 2000). 그러므로 좁쌀만한 송이원기가 수확할 정도(약 100cm<sup>3</sup>)로 커진다면 부피가 약 10만 배 팽창하는 것인데, 이 부피팽창은 주로 흡수된 수분에 의한 것이다.

또한 송이 균환 부위의 수분함량이 주위보다 낮은 것은 송이균사가 소수성이기 때문보다는 살아있는 송이균사와 소나무+송이 균근이 수분을 소비하였기 때문이라고 생각한다. 균사의 활력과 관련이 있는 에르고스테롤의 함량이 높은 곳에서 수분함량이 적었다. Yamada 등(1999)이 송이자실체가 발생된 주위의 검정색을 띠는 송이균근에서 소수성 왁스유사물질을 언급하면서, 이 소수성은 클로로폼이나 에탄올을 첨가하였을 때 없어진다고 하였다. 하지만 이것을 소수성과 관련짓는 것은 옳은 설명이 아니다. 왜냐하면 알콜이나 클로로폼에 모두 젖는다는 것은 소수성과는 관련이 없는 현상이다. 그러므로 외관상으로 수분이 적은 송이 균환에 수분방울이 금방 흡수되지 않는 현상은 물의 표면장력 때문으로 설명할 수 있다. 그러므로 송이산에 관수할 때에는 실제로 활성이 있는 송이균환 부위에 수분을 분무하여 흡수력을 높일 수 있다고 생각한다.

이번 연구에서는 토양수분과 송이생장과와의 관계는 조사하지 못하였지만 송이산의 토양수분이 적을 때 관수에 의한 송이 증산효과는 이미 증명되었다 (박 등,

1995). 그러므로 풍흉의 생산 변동의 차이를 줄이면서 지속가능한 송이생산을 실현하기 위해서는 송이의 발생과 생장에 필요한 균환 내 최소수분량이나 적정 수분량을 구명할 필요가 있다.

#### 4) 송이산 관수와 식생

관수를 할 때 임분의 수관층에 관수를 하면 대부분의 수분이 나뭇잎과 가지로 구성된 수관층에 묻고 실제로 물이 필요한 땅속의 송이균에게는 충분히 공급되지 못할 수 있다. 즉 우리나라와 일본의 소나무림에서 연간 수관차단량은 19~20%인데, 강우량이 적을수록 수관 차단율은 높아져서 3mm의 강우가 있을 경우 차단율은 더욱 높아져서 65%나 되므로, 결국 토양에 도달하는 강우량은 전체 강우량의 35%에 지나지 않는다 (한, 1996). 그러므로 수분이 모자랄수록 땅속 활력이 있는 송이 균환의 선단부 30cm 범위에 직접 관수하는 것이 더욱 효과적일 수 있다. 여기에 더하여 임분에서 일부 수관이 제거되면 수관의 증산량이 감소되므로 토양균류에게 이용될 수 있는 수분량은 증가한다(Miller and Lodge, 1997). 전나무림도 간벌하는 경우 수관의 강우차단 손실율이 17.6% 감소한다(김 등, 2003). 결국 송이산의 식생정리사업은 소나무림의 우점 유지와 함께 강우가 토양에 도달하는 양을 증가 시켜서 송이의 토양수분 가용성을 높이는 상승효과가 있으므로, 내부투자수익률이 18%에 이르게 될 수 있다(Koo와 Bilek, 1998).

그러나 이번 연구결과는 식생을 이미 정리하여 소나무가 우점인 한 지점에서 조사된 것으로, 식생정리효과를 직접 검증하지는 못하였다. 연중 성장하고 변화하는 균환에서(구 등, 2000a) 시간적으로 공간적으로 일어나는 수분변동을 이해하기 위하여서는 소나무림 생태계의 구조와 기능 면에서 연구가 꼭 필요하다. 즉, 균환내부의 수분 동태는 강우량, 계절, 송이산 식생구조, 엽면적지수, 광합성, 토양속 송이균환, 그리고 송이생장 등 여러 요소를 고려하여 종합적으로 이해되어야 한다고 생각한다.

#### 마. 결론

송이는 약 90%가 수분이고, 이 수분을 땅속 균환으로부터 흡수한다. 이 연구는 송이 균환 내부에서 토양수분의 시간-공간적 변화상태를 구명할 목적으로 송이철에 관수를 하는 괴산군 칠성면 쌍곡리 속리산 국립공원 내 쌍곡계곡의 송이산지에서 수행하였다. 송이균환내부의 수분상태를 알기 위하여 송이자실체 발생지점을 포함하여 균환의 지름방향으로 6개 지점에서 수분함량을 측정하

고, 균사의 활력을 나타내는 에르고스테롤 함량을 분석하였다. 그리고 송이 균환 내 토양수분의 시간적인 변화상태를 알기 위하여 Time Domain Reflectometry (TDR) 수분센서를 송이균사 활력이 왕성한 균환선단과 송이균이 없는 균환선단 외부에 설치하고, 2000~2002년에 8월부터 10월까지 토양의 수분함량의 변화를 CR10X 데이터 로거에 기록하여 분석하였다.

송이산에 관수를 하기 전에 토양수분함량은 송이균이 없는 균환 외부에서 12.8%, 선단으로부터 0~5cm 범위에서 8.0%, 선단으로부터 10~15cm 범위(전년도 송이 자실체 발생부위)에서 6.2%로, 균환 내부가 균환 외부보다 4.8~6.4% 낮았다. 그리고 균환 선단으로부터 20~40cm 후방지점에서는 6.5~7.5%, 80cm 지점에서는 균환 외부와 비슷한 12.1%이었다. 에르고스테롤 함량은 토양수분함량과는 반대의 경향으로, 송이균이 없는 균환외부에서 토양 생중량당 0.4 $\mu$ g/g 미만으로 가장 낮았고, 균환 선단부 0~5cm 범위에서 4.9 $\mu$ g/g으로 가장 높았으며, 선단에서 10~15cm 부위인 송이발생지점에서는 3.8 $\mu$ g/g, 20cm 지점에서 1.1 $\mu$ g/g이었고, 40cm 이후 지점은 0.4 $\mu$ g/g로 균환 외부와 비슷하였다. 그리고 송이 균환 내 수분함량의 변동은 관수를 하는 8월부터 10월 사이에 13.5~23.0%로 비균환 부위의 14.5~26.0%에 비하여 1.0~3.0%가 낮았다. 이 결과는 송이 균환 부위가 비균환 부위보다 수분을 많이 소비하며, 균환내부에서도 선단~30cm 범위가 수분소비에 특히 주요한 곳임을 나타낸다.

송이산의 토양수분은 시간적으로 공간적으로 항상 변화가 있었다. 송이균환내부에서의 수분함량이 균환외부나 균환사멸부위에서의 수분함량보다 낮은 것은 송이균사와 소나무 균근의 생리활동으로 수분이 소비되었기 때문으로 생각된다. 이것은 송이버섯 성장에는 직접적으로 송이균환부위에 수분공급이 중요함을 의미한다. 토양수분함량과 송이생장 관계를 이해하기 위해서는 식생의 강우차단, 광합성, 생리활동 등 생태계의 구조와 기능을 고려한 장기적인 연구를 바탕으로 하여 새로운 가설의 설립과 검정이 필요하다.

### 3. 송이 외생균근의 형태적 특징

#### 가. 서론

송이 균근은 1999년 이후에야 전형적인 외생균근임이 확실하여졌다. 1999년 이전에는 송이균근에 대한 관찰은 기생적인 의미가 강하였다. 즉 小川(1991)과 Wang 등(1997)의 관찰로는 송이균이 소나무 뿌리의 표피와 피층세포

내에 침투하여 세포를 괴사시키는 것으로 기술하였다. 하지만 Yamada 등(1999a)은 자연 상태의 송이균근에서 외생균근의 특징인 Hartig 망을 확인하였다. Yamada 등(1999b)과 Gill 등(2000), Vaario 등(2000), Guerin-Laguette 등(2000)은 배양된 송이균사를 시험관내 무균상태의 소나무묘목에 접종하여 형성된 송이균근에서도 송이균사가 Hartig 망을 형성하고, 내피세포층 이상의 안쪽으로는 들어가지 않음을 관찰하여서, 송이 균근이 전형적인 외생균근임을 증명하였다.

한편 송이 균근은 여전히 일반적인 외생균근과는 형태적으로 매우 다른 면이 있다. 즉 일반적인 외생균근에서 많이 볼 수 있는 Y자형이나 산호모양은 전혀 이루지 않고, 전체적으로는 빗자루형(小川, 1991)이고, 각 뿌리는 길게 자란다. 균사는 매우 밝은 흰색이며 연결격쇄(clamp connection)는 없으며, 수분에 금방 젖지 않는다. 이러한 특징은 현미경적으로 송이 균근임을 확신시키는 것은 아니므로 송이균근의 확인을 위해서는 추가적인 형태적 특징분석과 DNA 분석이 필요하다.

송이균환에서는 소나무뿌리 괴사현상(Yamada 등, 1999a; 구 등, 2000; Gill *et al.*, 2000)과 수분에 금방 적셔지지 않는 현상(허 등, 1994)이 알려져 있다. 위 두 현상 때문에 송이균은 기생이라는 설(小川, 1991)과, 송이균사는 소수성(허 등, 2004)이라는 설이 있다. 그러나 송이 균근의 끝부분은 살아있으며(구 등, 2000), 송이균환의 수분함량은 강우나 인위적인 관수에 의하여 13.5 - 23.0% 범위로 변하므로 소수성이라는 것은 일시적인 현상이라고 생각되었다(구 등, 2003). 하지만 이런 현상의 원인에 대한 연구는 부족하다.

그러므로 이 연구에서는 일반 균근과는 달리 송이균근은 왜 Y자나 산호모양을 형성하지 않고 계속 자라며, 송이균사가 왜 매우 밝은 흰색을 띠면서 물에 잘 젖지 않는지를 알고자 하였다. 이런 현상은 송이균근과 균사의 구조적 특징 때문일 것이라는 가설을 가지고 소나무림내 땅속 송이균환에서 채집한 송이균근과 송이균사의 특징을 주사전자현미경을 이용하여 조사하였다.

#### 나. 재료 및 방법

1999년부터 송이발생지점이 표시된 속리산 국립공원내 쌍곡계곡(충북 괴산군 청천면 쌍곡리) 송이산지에서 송이균환 선단부의 송이균근을 채집하였다. 이 균근시료를 2시간 내에 수돗물로 세척 후 곧 2.5% glutaraldehyde 용액에 고정하였고, 서울대 농업생명과학대 부설 NICEM에서 탈수 및 OsO<sub>4</sub>고정과정을 거친 후 금도금하여 균근과 균사의 표면형태를 주사전자현미경으로 관찰하였다. 또



한 송이균환 선단부에서 채집한 균사를 물이나 70% 에탄올에 적신 후 1000배 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

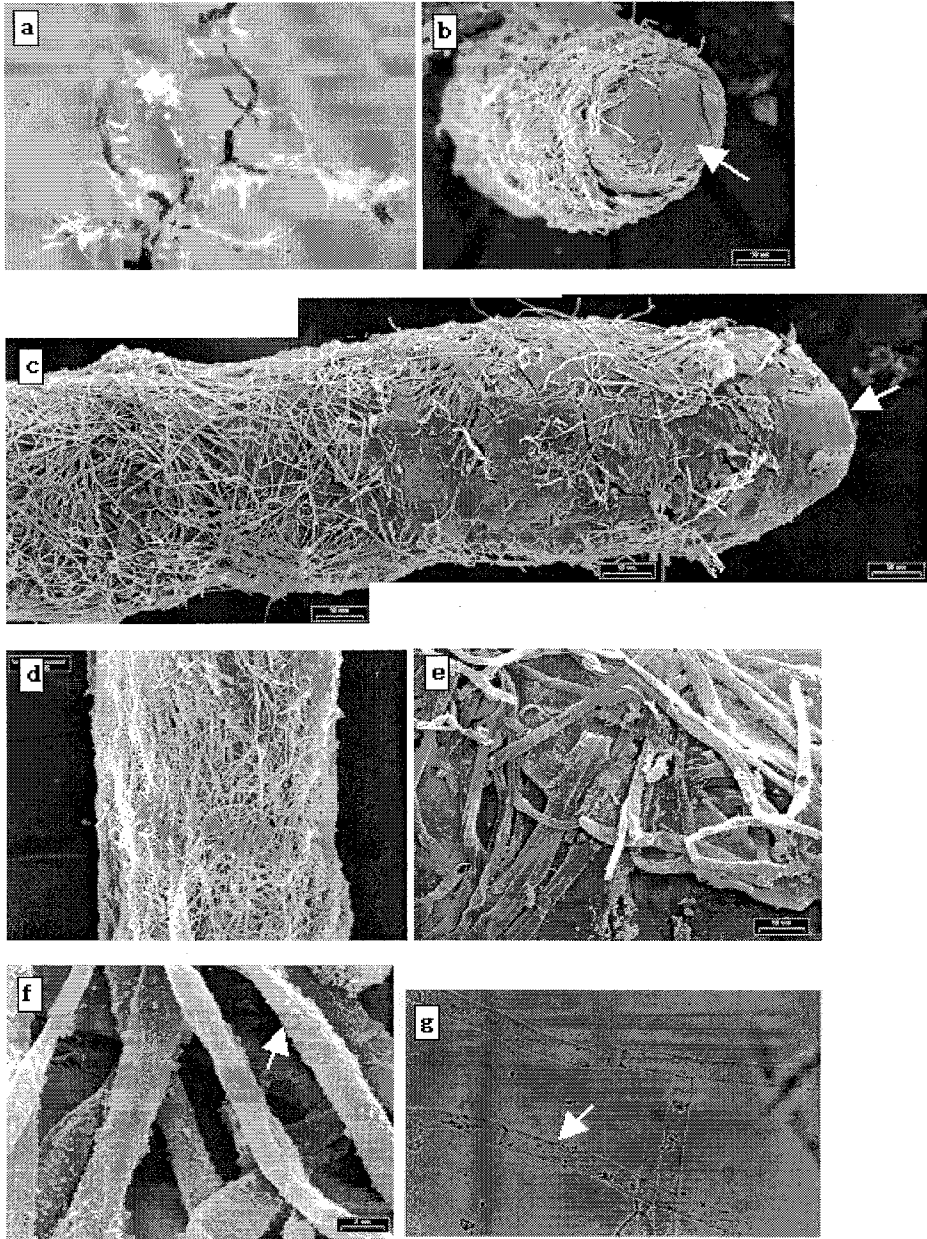
##### 1) 송이 균근의 외부형태적 특징: 정단부에 균사층이 없음

송이 균환내 균근(그림 3-6-10-a)은 밝은 흰색의 균사로 밀하게 둘러싸여 있으나, 수돗물을 세차게 뿌리면 많은 균사가 물에 젖지 않고 뜨면서 송이균근으로부터 분리되었다. 하지만 균근표면에 밀착한 얇은 균사층은 망상형으로 각개 균사가 구분되어 보이며 뿌리털은 발달하지 않았다. 이런 균사층의 형태는 Agerer(1991)의 구분에 따르면 plectenchymatous형이다.

균근에 부착된 균사층은 하단부에서는 매우 조밀하지만 정단부로 갈수록 얇아졌으며, 정단부를 둘러싸는 균사층은 없었다(그림 3-6-10-b, -c). 그리고 정단부에 뿌리골무로 보이는 구조는 없었다. 일반적으로 송이균근은 정단부를 제외하고는 여러 층의 균사층으로 둘러싸여 있었다(그림 3-6-10-d, -f). 이렇게 송이균근 정단부에서 균사층이 없는 현상에 대하여 小川(1992)과 박(1997)은 송이와 같이 기생성이 강한 균의 균사가 퍼지면 뿌리는 탄닌을 분비하여 표피세포를 변형시키고, 이에 따라 균사층이 잘 발달하지 않고 불완전하며 Hartig 망 형성이 불완전하게 되고, 뿌리는 도장하여 심하게 분지하고 병에 걸린 것 같이 보이나, 성장점에는 균사가 침투하지 않아 고사하지는 않는다고 하였다.

송이 균근은 정단부에 균사층이 없기 때문에 계속 자랄 수 있어서 빗자루나 우묵가사리 형태로 되고, Y자형이나 산호 또는 깃털모양으로는 되지 않는다고 생각한다. 일반적으로 정단부에 단단한 균사층이 발달하면 뿌리는 길이 성장을 못하여 옆으로 가지를 쳐서 Y자형이 되고, 이런 현상이 심한 경우는 산호모양이 된다. 그러나 송이균근은 정단부생장을 억제하지 않는 반면에 측근의 발달을 촉진시켜서 빗자루모양으로 뿌리의 밀도를 증가시키는 것으로 생각한다(구 등, 2000). 이렇게 뿌리를 계속 가지치게 하는 것은 결국 표피세포와 피층세포를 증가시키는 것으로, 결국 송이는 소나무로부터 탄수화물을 받을 수 있는 세포의 양과 면적을 증가시키는 것이다.

송이는 다른 균근과 달리 표피세포와 피층세포가 검게 사멸하면서도 정단부는 계속 성장한다(Yamda 등, 1999a; Gill 등, 2000). 이런 현상을 시간적 공간적으로 종합적으로 관찰할 경우 송이는 역동적인 뿌리 공생균임을 확인하게 된다.



<그림 3-6-10> 소나무에 형성된 종이 균근의 외부 형태적 특징.

- a : 자연계의 종이 균근, bar = 1mm;
- b : 균근이 없는 뿌리 정단부(화살표);
- c : 개략적인 균근 모습(화살표는 비 감염부);
- d : 맨틀 인접부위;
- e : 균근의 균사 배열모습;
- f : 부정형 입자가 있는 굵은 균사의 모습;
- g : 매우 얇은 세포막을 지나고 미세한 점이 있는 균사, bar = 5  $\mu$ m.

## 2) 송이균사의 특징

### 가) 송이 균사 표면

송이 균사 표면은 빛나는 흰색으로 표면은 불규칙한 크기의 분말로 덮혀서 거칠게 보였다(그림 3-6-10-a, d, e, f, g). 대부분  $0.5\mu\text{m}$  이하 크기의 매우 잔잔한 돌기들이 불규칙하게 덮혀져 있었다. 이 돌기 때문에 송이균사가 매우 밝은 흰색을 띠게 되며, 수분에 잘 적셔지지 않았던 것으로 생각된다. 그러나 송이균사 표면에 에틸알콜 용액을 떨어뜨리면 순식간에 균사표면 전체가 폭 젖으면서 밝은 흰색은 없어졌다.

일반적으로 메마른 송이 균사나 균환에는 수분이 잘 스며들지 않으므로 이들이 소수성이라고 알려져 있다. 그러나 8월~10월 중에 송이 균환 내 수분함량은 13.5~23.0%의 변화가 있으므로 이들이 수분을 흡수하는 것으로 생각된다(구, 2003). 한편, Wessels(1994)는 균사생장에 대한 분자생물적 연구에서 치마버섯 균사(*Schizophyllum commune*)를 액체 속에서 배양할 경우, 소수성 단백질(hydrophobins)을 균사정단부에서 액체배지로 분비하여 균사벽에 집적시킨 결과, 균사가 액체 밖으로 돌출된다고 하였다. 그러나 치마버섯은 건조하면 수축하지만 물에 담그면 원형으로 돌아가는 수분을 매우 잘 흡수하는 버섯이다(今關 등, 1988).

송이 균사의 세포벽에서 이런 소수성 물질에 대한 보고는 없지만, 메마른 송이균환이 물에 잘 젖지 않는 것은 두 가지 면에서 설명될 수 있다고 생각한다. 즉 균사표면의 소수성물질과 물의 표면장력이다. 송이균사 표면에는 알려지지 않은 소수성의 미세한 표면 입자로 인하여 표면장력이 큰 물방울이 잘 접촉하지 못하기 때문으로 생각된다. 그러나 균사는 동시에 수분을 흡수해야 하므로 송이 균사 세포벽은 친수와 소수의 이중 성격을 지닌 것으로 생각된다. 그러므로 이러한 송이균사의 방수현상은 일시적인 것으로, 삼투포텐셜이 매우 낮아진 건조한 균사가 갑자기 수분을 많이 흡수하는 것을 막는 생태학적인 생존전략이라고 생각된다.

그러나 이 돌기들이 송이 균사의 세포벽에서 유래한 것인지 아니면 외부 토양으로부터 유래한 것인지, 그리고 이 돌기들이 소수성에 관련이 있는지는 밝히지 못하였다. 하지만 이 돌기의 불규칙한 모양과, 크기, 분포 등으로 판단하여 볼 때, 이것은 균사의 분비물과 토양에서 유래한 물질과의 혼합체라고 생각한다. 균근균의 균사가 분비물을 내는 종류의 예가 있는데, 토양내 자실체를 형성하는 *Hysterangium* 속 균근균의 균사는 옥살산을 분비하여 토양광물의 풍화를 촉진

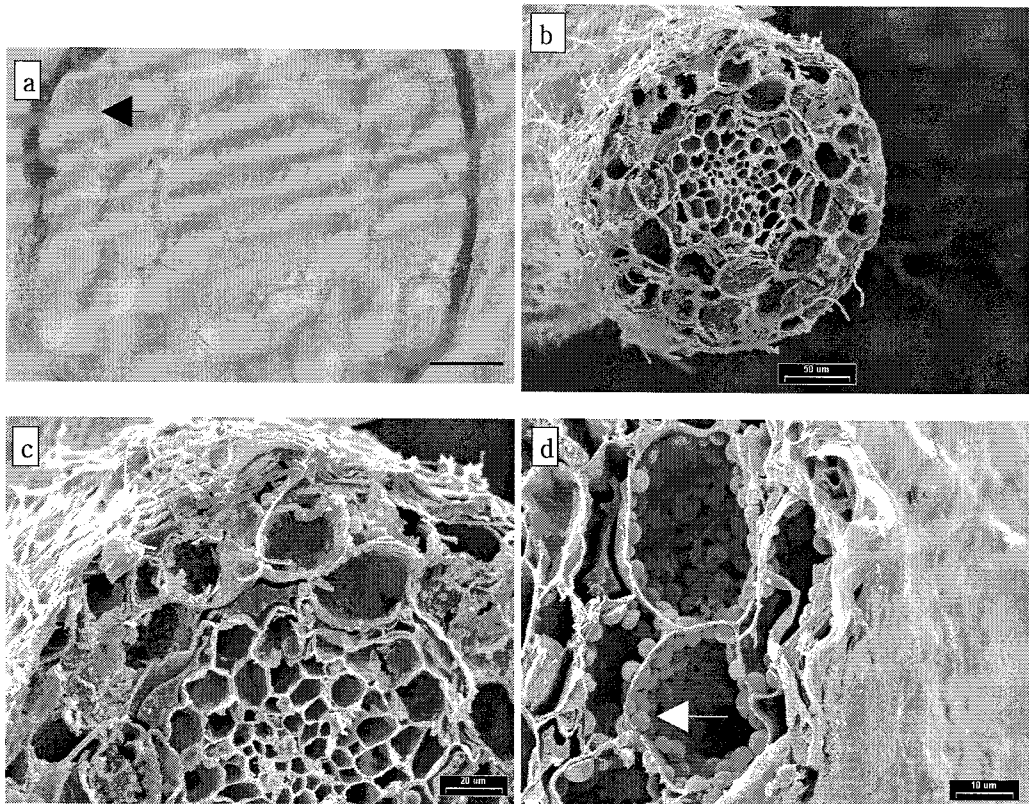
하고 토양양분의 용해도를 증가시키기도 한다(Cromack 등, 1979). 송이균환도 칼륨 같은 무기양분을 집적시키는 것으로 알려져 있다(허 등, 2004). 하지만 송이균사벽의 소수성에 대하여는 물리, 화학적인 원인 구명이 되지 않았다.

#### 나) 송이균사의 세포벽

송이균사의 세포벽은  $0.3\mu\text{m}$  이하의 매우 얇은 막(membrane)이었으며 (Figure 1-g), 주사전자현미경 시료를 만들기 위한 탈수과정에서 형태변형과 수축이 심하여 송이균근표면에 리본모양으로 매우 납작하게 밀착하였다 (Figure 1-f, Figure 2-d). 송이균사 세포벽이 매우 얇은 것은 건조하기 쉬운 산능선부와 급경사지에 분포하여 생존하는데 유리한 것으로 생각된다. 우선 세포벽의 신축성이 커서 쉽게 수축할 수 있으므로, 건조시에 수분을 잃을 경우에도 원형질막이 세포벽과 분리되는 현상을 피할 수 있다. 그리고 수분을 잃음에 따라 원형질막내부의 농도가 높아지므로 삼투압을 낮추어서 주위의 수분스트레스에 강하게 견딜 수 있다. 또한 강우나 이슬 등으로 토양에 수분이 공급되면 낮은 삼투압을 이용하여 신속히 수분을 흡수하고, 높은 신축성으로 수분을 최대한 흡수할 수 있다고 생각한다. 이에 비하여 균사의 세포벽이  $1.0\mu\text{m}$ 에 달하는 능이 버섯의 균사는 대체로 토양수분 공급이 풍부한 경사면 하부나 산록, 북향경사면에 분포한다(김홍은 등 2000). 그러므로 이렇게 수분환경에 신축적인 얇은 세포벽은 수분스트레스가 수시로 닥치는 환경에 생태적으로 적응한 기능적인 구조라고 생각한다.

#### 3) 송이 균근의 내부 형태적 특징

균근 중에서 균사층이 잘 발달된 부위에서는 Hartig 망이 1-2층 발달하였으나, 세포내부로 들어간 균사는 없었다(그림 3-6-11-a). 한편 뿌리 외부의 균사층이 덜 발달한 부분에서는 표피세포나 피층세포층에서 Hartig 망이 형성되지 않았으며, 이들 세포의 내부에서 약  $2\mu\text{m}$  크기의 반원형 알갱이가 세포벽을 전체적으로 덮고 있었다. 이 알갱이는 Moore 등(1995)에 의하면 식물뿌리의 피층세포내에 존재하는 전분체(amyloplasts)로 생각된다. 이 전분체 알갱이는 균근부위 중에서도 균사층이 좀 더 발달한 곳에서는 크기가 작고 그 수가 적었다. Gill 등(2000)도 송이균근의 피층세포내에 이런 알갱이의 존재를 언급하였으나, 이것의 정체를 서술하지는 않았다.



<그림 3-6-11> 소나무에 형성된 송이 균근의 내부 특징.

- a : 하티그 망(화살표 부분)과 맨틀을 지니고 있는 균근의 횡단면, bar=20 $\mu$ m
- b : SEM으로 본 외생균근의 횡단면(얇은 맨틀층은 있으나 하티그 망은 없음)
- c : 횡단면의 확대 모습, d : 반구형 전분체(화살표)

송이 균근의 횡단면에서 내피 세포 안쪽에는 있는 체부와 사부 그리고 형성층으로 구성된 통도조직 세포에 균사가 침입한 것은 없었다 (그림 3-6-11-a, -b, -c). 이것은 송이균이 뿌리를 사멸시키는 기생균은 아님을 보여주는 것이라고 생각한다.

#### 4) 송이 균환 선단에서의 송이 균근

송이 균환선단은 송이버섯이 생겨난 지점으로부터 약 17cm 앞까지 땅속에서 뻗어있었고, 밝은 흰색의 균사가 토양, 뿌리, 토양입자를 매우 치밀하게 점유하고 있었다. 균환선단 부위의 송이 균근을 포함한 뿌리전체가 송이의 흰색

균사로 덮여있고, 이 균사뭉치를 헤집어 보면 얇은 갈색 내지 갈색의 균근이 드러났다. 송이 균사 속에 묻혀서 새로 돌아나는 송이 균근의 정단부는 불투명한 무색 내지 아주 연한 갈색이며 끝이 뭉툭하고, 뿌리털은 없었다. 길이생장을 한 송이 균근은 뿌리의 이형성(긴 뿌리와, 짧은 뿌리의 형태적 구분이 뚜렷한 현상)이 뚜렷하지 않았다. 길어진 균근은 정단 부분만이 연갈색 내지 갈색이고, 하단부는 일부가 짙은 갈색으로 주글주글하게 되었다.

흰색의 송이 균사 뭉치는 2 - 5 $\mu\text{m}$ 의 굵기의 반투명한 균사가 단순하게 집합을 이룬 것으로 형태적으로 뚜렷한 뿌리 모양의 균사속(rhizomorphs)은 없었다. 균사 뭉치 내부에도 형태적으로 뚜렷이 구분되는 다른 형태의 균사는 없었다. 송이 균근의 균투표면은 송이균사가 불규칙하고 느슨하게 싸고 있는 상태로, Agerer (1991)의 구분에 따르면 불규칙한 plectenchymatous 형이었다.

송이 균근의 표피 색깔과 모양별로 횡단면을 보면, 끝이 뭉툭하고 밝은 갈색의 것은 균투 두께가 5-10 $\mu\text{m}$ 이고, 표피세포는 갈색이다. 송이균사는 대개 1-2개 층으로 된 피층세포들의 간극에 들어가서 하티그 망을 형성하였고, 내피세포층 이상의 안쪽으로는 균사가 들어가지 않았으므로, 전형적인 외생균근을 형성하였다. 어린 송이 균근의 피층세포의 세포벽은 반투명한 옅은 갈색이나, 균근의 갈색이 짙으면, 하티그 망의 피층 세포벽도 갈색이 짙어진다.

송이 균근의 하단부에 있는 흑갈색의 주글주글한 부위의 횡단면을 보면 표면에 얇은 균투가 있으며, 표피와 피층세포들, 하티그 망이 짙은 갈색으로 주름잡혀 있는 것을 볼 수 있다. 반면에 내피는 갈색이 짙으나 주름잡히지는 않았고 원형질이 있는 내초를 포함한 통도조직은 무색에 가깝다. 어디에도 송이 균사가 세포 내로는 들어가지 않았다.

##### 5) 송이 발생지점 부근의 송이 균근

다음으로 송이가 발생한 지점 부근에서, 송이 균근은 분말상으로 되는 흰색균사로 싸여있고, 균근 표면은 짙은 갈색 내지 검정색으로 주글주글하여 사멸한 것처럼 보인다. 이 흰색균사와 검정색 뿌리부분은 소수성물질이 덮고 있는 것으로 알려져 있으나 에틸알코올로 적시면 흠뻑 배어 들어가서 흰색의 균사는 반투명하게 그리고 주글주글한 뿌리표면의 주름은 약간 펴진다. 이 부분을 자세히 보면, 정단부는 균사가 없이 연갈색으로 반투명하며 끝은 세모꼴로서 살아 있으나 균근 형성이 된 것은 아니었다.

#### 6) 이미 송이가 발생하였던 곳의 균근

이미 송이가 났던 균환 후방 부위에 있는 송이 균근은 외형상 흑갈색이 더욱 짙고 주글주글하여 대부분이 사멸한 것처럼 보이지만 뿌리 정단부위는 새로 성장하고 있으며 그 경계는 잘록하다. 대부분의 송이 균근 횡단면에서는, 균투 두께는 더욱 얇아져서  $5\mu\text{m}$  정도이며 1-2개의 균사 층으로 보였다. 표피와 피층세포의 세포벽은 흑갈색이며 심하게 찌그러져 있는 반면에, 송이균이 세포막을 둘러싸지 않은 내피세포는 두드러지게 크다. 그 안쪽 층에는, 살아있는 세포로서 원형질이 있는 내초(pericycle)가 통도조직인 목부와 사부를 에워싸고 있다.

이 상태에서 표피와 피층세포 층이 벗겨지면, 내피세포가 드러나고, 연노랑색의 뿌리가 보인다. 살아있는 뿌리 끝 부분은 다른 균이 공생하여 다른 형태의 균근이 발달하는 것도 있었다(그림 3-6-22). 하지만 완전히 사멸한 것도 있다.

#### 7) 다른 균근

자연 상태에서 소나무 뿌리에 발달한 균근은 전형적인 이형성 뿌리로 연한 갈색의 산호모양이었으며, 균근 주위에서는 뿌리형태의 균사속이 무수히 발달하였다. 균투는  $10-20\mu\text{m}$ 이나 하티그 망은 피층세포 2개 층까지 뚜렷이 발달하였고, 내피층이나 내초에는 균사가 들어가지 않았다. 이 산호형 균근에서는 송이 균근과 달리 길이생장이 거의 없으며, 균투나 표피가 암갈색이나 검정색으로 된 부분도 없었다.

황소비단그물버섯이 소나무 뿌리에 형성한 균근은 우윳빛 흰색으로 짧게 가지친 Y자형이며 균사가 뭉친 뿌리형태의 균사속이 발달하였다. 균근의 횡단면을 보면 균투는 송이 균근에 비하여  $30-60\mu\text{m}$ 로 매우 두꺼우며, 하티그 망은 송이 균근처럼 피층세포 2개 층까지만 뚜렷이 발달하였다. 피층세포 간극에 균사가 들어간 두께가  $10\mu\text{m}$ 에 이른다. 산호형 균근처럼 이 균근에서도 길이생장은 거의 없으며 암갈색이나 흑색으로 변한 부분도 없다.

#### 라. 고찰

우리의 결과는 송이균은 소나무 뿌리에 얇은 균투와 하티그 망을 형성하고, 어떤 세포의 내부에도, 내피세포층 이내의 통도조직으로도 균사가 들어가지 않는 전형적인 외생균근을 형성한다는 Yamada 등 (1999)과 Gill 등(1999)의

보고와 일치한다. 그러나 송이 균근은 계속 길이생장을 하면서 정단부 가까이에  
는 균투와 하티그 망을 만들지만 그 아래 부위에서는 점차 표피세포와 피층세포  
가 사멸하여 흑갈색으로 변화된다. 그래도 내피세포 안쪽의 형성층과 통도조직은  
살아남는다. 이런 세포의 사멸 현상이 심하게 일어나는 것은 소나무가 송이균에  
게 탄수화물을 많이 공급함을 의미한다. 표피와 피층세포는 사멸하여 떨어져 나  
가더라도, 내피세포층의 안쪽에 있는 뿌리 형성층의 발달로 인하여 뿌리는 계속  
생장하고 걸뿌리를 발생시킬 수 있으므로, 송이균이 옮겨간 후 그 뿌리에는 다른  
균이 새로운 균근을 형성하게 된다.

### 1) 표피와 피층세포의 사멸에 따른 기생-공생의 논란

송이가 소나무에 기생한다는 설과 (小川, 1991; Wang과 Hall, 1997),  
공생한다는 설 (Yamada 등, 1999)은 우선 송이균사가 소나무 뿌리 내 세포 안에  
들어가서 세포를 사멸시키는 현상이 있는가 없는가에 따라 설명되었다. 小川  
(1991)은 자연송이산에 채집한 뿌리에서, 그리고 Wang과 Hall (1997)은 무균 시  
험관내에서 송이균을 소나무 묘목에 접종하여 얻은 균근에서, 송이균사가 뿌리의  
피층세포에는 들어가지 않으나 곧 병원성으로 되고 사물기생성으로 된다고 하였다.

하지만 최근 Yamada 등(1999)은 자연 송이 균환에서 채집된 송이 균근이 전  
형적인 외생균근의 특징인 균투와 하티그 망을 형성한다고 하면서, 1927년 일본  
의 Masui가 처음 기록한 송이 균근도 전형적인 외생균근이라고 하였다. 그리고  
그들은 小川(1975)은 일반적인 균근 즉 측근을 사용하지 않고 긴 뿌리(피층세포  
층이 4-5개 층)를 사용하면서 해부학적인 기록을 충분히 하지 않았다고 하였다.  
송이 균환 선단부에서 채집하여 조사된 균근 중에서 뿌리 정단부의 연한 갈색  
부위는 명확히 균투와 하티그 망을 형성한 전형적인 외생균근이었으므로, 이 논  
문은 Yamada(1999)의 보고를 지지한다.

한편 Yamada 등(1999)은 이런 상태의 검정색 뿌리를 언급하면서 소수성의  
왁스 같은 물질이 뿌리표면을 덮고 있고 이 검정부분에 하티그 망의 흔적이 있  
음을 보여주고 있다. 이런 형태의 하티그 망은 이번 조사에서도 관찰되었다. 그  
래도 小川(1991)과 Wang 등(1997), Yamada 등(1999)은 균근의 세포 내에 송이  
균사가 들어가 있다는 점에서는 일치한다.

하지만 우리의 관찰에서는 송이균사가 균근 내 피층세포 내로 들어 있는 흔  
적은 볼 수 없었다. Gill 등(1999)도 야생 균환에서 채집한 송이균근을 탈색 시킨



후 chlorazol black E로 염색하여 본 결과 피층세포내에는 균사가 없었다. 그들은 다만, 외생균근의 전형적인 구조인 하티그 망에 형성되는 손바닥 모양의 균사체 (palmettis)를 확인하였다.

송이 균환 내의 많은 뿌리에서 정단부의 아래 부분은 짙은 갈색 내지 검정색으로 쭈글쭈글하게 변한 것이 많은데, 이것은 하티그 망이 발달하였던 표피세포와 피층세포벽이 사멸하였기 때문이다. 이 부분은 뿌리로부터 잘 벗겨져 나간다. 小川(1975, 1991)은 이런 현상을 의미 있게 여겨서 송이가 기생성이 강하다고 생각하였다.

하지만 검정색으로 변한 균근의 내피세포와 통도조직과 정단부의 뿌리 생장점은 살아있다. 내피세포층은 피층세포층 중에서 가장 안쪽 층으로 세포간극이 없이 서로 강하게 붙어있고 리그닌과 수베린으로 된 카스파리안 띠(Casparian strip)로 엮여져있기 때문에 이 층의 안팎으로 수분과 양분이온의 통과는 세포막 (symplast)을 거쳐야만 한다(Moore 등, 1995). 내피세포는 표피나 피층세포와는 달리 주름잡히지 않고 그 형태를 유지하고 있는 것으로 보아서 이 세포들이 통도조직의 수분과 양분을 유지시키면서 송이균으로부터 뿌리를 보호하고 있는 것으로 생각한다.

그리고 살아있는 뿌리생장점은 계속 표피와 피층세포를 분화시키므로 새로운 균이 균근을 형성할 수 있게 되는 것 같다. 이 점에 대하여서는 아직 알려진 바가 없지만, 이번 조사에서는 작은 1개의 뿌리에서도 균근균의 천이현상이 나타날 수 있음을 알게 되었다. Park 등(1998)이 파악한 송이 균환의 안쪽에 발생하는 균근성 버섯들(황소비단그물버섯, 그물버섯류, 싸리버섯)이 이런 천이에 관여한다고 생각된다. 실제 실험실내에서 소나무 묘목뿌리에 먼저 모래발버섯균근을 형성한 후 미식별된 외생균근균을 접종하면 점차로 나중 균으로 대체됨이 확인된 바 있다(Wu 등, 1999). 그리고 뿌리가 새로 길이생장을 시작함으로써 남게 된 정단부의 잘룩한 부분은 Massicotte 등(1999)이 설명한대로 수분 온도 양분 등의 토양환경 변화에 따라 뿌리 생장에도 변화가 있었음을 나타낸다고 생각한다.

## 2) 공생 위치의 변화

송이 균근은 정적인 상태가 아니고 뿌리의 길이생장과 함께 그 위치가 변하여 가는 역동적인 상태라 할 수 있다. Harley (1991)는 균근은 뿌리의 정단부가 생장하는 조직에서 발달하여 성숙하고, 시간이 지나면 사멸한다고 하였

다. 즉 균근도 성장 발달하고, 결국은 늙어서 죽는 뿌리이다. 하지만 대부분의 균근은 길이생장이 매우 느리며, 있던 지점에서 사멸하고 새로운 뿌리가 나오면 다시 그 균근으로 균근이 형성된다(구창덕과 김재수, 1999). 이에 반하여 송이 균근 집단은 소나무림 생태계 내에서 이 성장-사멸의 과정을 장소를 한 방향으로 조금씩 옮겨가면서 존재한다고 생각한다.

균환부위 중에서도 주로 송이가 발생하기 전인 균환의 선단부에서만 균투와 하티이 망이 형성된 송이 균근이 있고, 송이가 발생하여 지나간 균환의 후단부에서는 뿌리 대부분이 표피나 피층세포가 사멸하여 검정색으로 쭈글쭈글하여 벗겨지고 정단부만이 활력이 있다. 즉 송이 균근 정단부위가 길게 계속 자라면서 정단부에 진정한 균근이 형성된 후, 차츰 표피와 피층세포는 에너지를 송이에게 주고 사멸한다. 공생위치가 뿌리가 성장함에 따라 계속 변하며, 표피세포와 피층세포가 사멸하는 부위도 점진적으로 옮겨간다.

사실상 뿌리가 직경 성장하면 내초세포 층의 안쪽에 있는 형성층으로부터 발달하는 목부와 사부의 영향으로 그 바깥쪽인 표피와 피층은 사멸하고 떨어져 나간다. 짧게 발달하는 Y자형이나 산호모양 균근과는 달리, 송이 균근은 측근이 길게 발달하면서 표피와 피층세포의 사멸현상이 전진하는 특이한 형태의 균근이다. 小川(1991)은 이런 형태의 균근은 송이류 2-3종에서만 생긴다고 하였다.

한편 이렇게 송이 균근의 표피와 피층이 사멸하는 동안에도 땅속 송이 균환은 전체적으로 매년 약 10cm씩(小川, 1991) 한 방향으로 전진한다. 그리고 일단 송이균환이 전체적으로 그 지점을 지나가고 나면 뿌리 정단부위는 계속 성장하더라도 송이균근은 더 이상 형성되지 않는 것 같다. 이 현상은 비록 송이가 병원성은 아니더라도, 송이균 접종묘를 화분과 같은 좁은 용기 내에서 장기간 유지할 수가 없음을 설명한다. 즉 화분 내에서는 새로운 뿌리와 송이균사가 새로운 장소로 뻗어나갈 공간이 없다는 것이다.

그러나 자연 산림토양에서는 그 공간이 매우 크다. 동시에 송이균사가 지나가고 난 뒤에 살아 남은 뿌리의 정단은 토양내 있던 또는 새로 이입되는 새로운 균근균에 의하여 균근이 형성될 것이다. 이렇게 기주식물과 곰팡이간의 공생관계 개념을 시-공간적으로 고려하는 것은 복잡한 생태계 현상을 보다 잘 이해하는 계기가 된다 (Rillig와 Allen, 1999).

## 마. 결론

송이 균근은 일반적인 외생균근과는 형태적으로 매우 다른 면이 있다. 송이균사표면은 작은 알갱이로 덮혀 있어서 매우 밝은 흰색을 띠며, 세포벽은 매우 얇은 단순한 막질이고, 연결격쇄(clamp connection)는 없었다. 각 개 송이 균근은 정단부에 균사층이 없이 길게 자라면서 가지를 많이 치므로 보통 외생균근에서 많이 볼 수 있는 Y자형이나 산호모양이 아니고, 전체적으로는 빗자루 또는 우묵가사리형이다. 균근 부위 중에서 균사층이 잘 발달된 부위에서는 Hartig 망이 1-2층 발달하였으나, 세포내부로 침입하여 들어간 균사는 없었다. 한편 뿌리 외부의 균사층이 덜 발달한 부분에서는 표피세포나 피층세포층에서 Hartig 망이 형성되지 않았으며, 이들 세포의 내부에서 전분체가 약  $2\mu\text{m}$ 는 크기의 반원형 알갱이 형태로 세포벽을 전체적으로 덮고 있었다.

송이 균사가 소수성을 띠는 원인을 알 수는 없었다. 그러나 송이균사의 세포벽이 매우 얇으면서 작은 알갱이로 덮혀 있고 수분에 잘 젖지 않는 것은, 주기적인 토양건조에 신축성이 커서 원형질분리가 잘 일어나지 않고, 낮아진 세포질내수분포텐셜에서도 서서히 수분을 흡수하기 위한 기능이라고 생각한다.

송이균이 소나무에 어떻게 기여하는 지에 대하여서는 많은 연구가 절실하다. 송이가 발생하고 나면 많은 송이균사가 사멸하여 분말상으로 되고, 균근의 표피와 피층세포의 사멸은 더욱 뚜렷할 것이다. 비록 송이가 균근의 표피와 피층세포만을 사멸시키더라도, 소나무로부터는 광합성 산물을 심하게 유출시킨 셈이다. 그러므로 송이는 병원성은 아니더라도 기주로부터 많은 탄수화물을 요구하는 독특한 성격을 지닌 균근균이라고 생각한다. 한편 시간적으로 길게 보면 송이는 다른 형태로 기주식물에 기여할 수도 있다. 즉 송이균사가 탄수화물은 소나무에서, 무기양분은 땅속에서 흡수하여 자란 후, 송이를 발생시키고 사멸하면, 토양 속에 이것이 남아 분해된 후 다른 균에 의하여 새로 형성된 균근에 의하여 흡수될 것이라는 것이다. 즉 한 장소와 한 시점에서만 보면 공생, 또는 기생일 수도 있지만 생태적으로 시간과 장소의 스케일을 길고 크게 보면 다른 형태의 공생이라고 할 수 있다. 이러한 송이 균근집단의 변화과정을 시-공간적으로 이해하는 것은 미래의 송이산 관리에 중요하게 기여하리라 생각한다.

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 1. 목표달성도

#### 가. 송이 균사배양 촉진기술 개발

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	착 안 사 항	달성도(%)
1차년도 (2000)	○ 적정 배양조건 탐색을 위한 배양조건이 다양한가	100
	○ 액체배양조를 이용한 대량증식 체제가 구축되었는가	100
2차년도 (2001)	○ 송이 배양의 적정 조건이 구명되었는가	100
	○ 균사체 활용기법의 재배와의 연관성이 조사되었는가	100
	○ 송이의 분자생물학적 marker 탐색이 조사되었는가	100
3차년도 (2002)	○ 대량배양 균사의 활용도가 조사되었는가	100
	○ 유전자를 이용한 송이 균근 판별기법이 조사되었는가	100
	○ 송이 식별용 marker가 개발되었는가	100

#### 나. 송이 접종원 및 균환 형성 기술 개발

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	착 안 사 항	달성도(%)
1차년도 (2000)	○ 송이접종묘 생산의 접근방법이 타당한가	100
	○ 송이 감염묘를 식재하였는가	100
	○ 송이 균근이 형성되었는가	100
2차년도 (2001)	○ 송이 접종묘의 순화과정중 생존여부를 조사하였는가	100
	○ 감염묘 이식이 성공하였는가	100
3차년도 (2002)	○ 이식된 송이 접종묘의 활착여부를 조사하였는가	100
	○ 이식된 송이 감염묘의 활착여부를 조사하였는가	100
4차년도 (2003)	○ 고체 접종원의 접종 성공률을 조사하였는가	100
	○ 송이 접종묘 및 감염묘의 활용성을 조사하였는가	100
5차년도 (2004)	○ 접종묘를 이용한 신규 균환 형성기법의 타당성 여부	100
	○ 감염묘를 이용한 신규 균환 형성기법의 타당성 여부	100
6차년도 (2005)	○ 고체 접종원의 안정화 정도를 조사하였는가	100
	○ 접종묘와 감염묘의 산업적 이용가능성을 조사하였는가	100

다. 실내 송이증산 환경조절과 송이 자실체 발생 촉진기술 개발

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	착 안 사 항	달성도(%)
1차년도 (2000)	○ 서식 환경 계측장비 설계 논리가 타당한가	100
	○ 광과장, 온도, 습도를 기록하였는가	100
	○ 실내 송이균 주변 미생물 순환생태를 조사하였는가	100
2차년도 (2001)	○ 인공제어 시스템 구축을 위한 알고리즘 분석 여부	100
	○ 과장조절용 코디어라이트를 제조하였는가	100
	○ 병해충 방제용 항균 무기물 도포시험을 하였는가	100
3차년도 (2002)	○ 시험구역 선정 및 서식지 환경인자를 조사하였는가	100
	○ 송이서식지에 번식하는 미생물상을 조사하였는가	100
4차년도 (2003)	○ 온도, 습도, 광도 조절용 전자제어 회로와 운용프로그램을 완성하였는가	100
	○ 자실체 생성이 촉진되는 기후특성을 분석하였는가	100

2. 기술적 기여도

가. 송이 균사 배양 촉진기술 개발

송이 균사 배양 촉진 기술의 연구과정에서 구명된 연구결과는 송이균사를 대량으로 배양하여 이용하는 가공 연구에 폭넓게 응용될 수 있으므로 송이 균사 배양 기술 전반에 미치는 파급효과도 상당히 크다.

송이 균사 배양을 위한 배지조성의 최적화에서는 탄소원으로써 전분이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 배양기 형태별 성장특성 조사에서는 교반식보다는 풍선형 air bubble 형태가 거품발생에 대처할 수 있어 우수한 것으로 나타났다. 또한, 균사생장이 우수한 균주를 선발함으로써 앞으로의 실험에 공시할 수 있는 균주를 택할 수 있게 하였다.

송이 균사체 및 고체매트릭스(토양 등)내 균사생장량을 계량화할 수 있는 ergosterol 함량 정량방법을 개발하였다. 즉, 균사체 건조과 ergosterol 함량간에 정의 상관관계가 있음을 구명하였다. 항생제가 송이 균사체에 미치는 영향을 조사하였는데, 무처리에 비해 항생제 처리구가 모두 균사 성장에 양호한 결과를 나타내어 항생제 처리가 송이 균사 성장에 도움을 주고 있는 것으로 나타났다. 즉, 배양된 송이 균사체를 산지에 적용하였을 경우 현지에 자생하고 있는 세균의 영

향을 감소시키기 위해 항생제를 살포함으로써 세균의 밀도를 감소시키거나 오염을 줄일 수 있을 것이다. 그러나, 살균제의 처리는 송이 균사의 성장을 억제하는 것으로 나타났다.

송이 균사체의 암세포 성장 저해 효과시험에서는 송이 균사체의 추출물에서의 암세포 억제작용은 간암세포의 억제작용이 매우 강하게 나타나고 있었으며, 폐암 및 유방암 세포에서도 다소 활성이 있는 것으로 나타났다. 특히 70% 에탄올 추출물 및 단백질당체는 정제되지 않은 조추출물이므로 정제 및 활성 물질의 분리과정을 거치면 활성도가 더욱 높게 나타날 것으로 추정된다. 송이버섯의 주요 향기 성분은 1-octen 3-ol과 trans-methyl cinnamate로 각각 70%와 20% 내외를 점유하고 있으며, 기타 30여종 이상의 향기 성분이 조합을 이루어 뛰어난 풍미를 지니고 있다. 송이향을 증진시키기 위해 다양한 유기 시약을 배양액에 첨가한 결과, tannic acid, thiamine 및 mevalonic acid 처리에서 1-octen 3-ol의 함량을 다소 증가시킬 수 있었다.

송이균 판별기법에서는 본 연구에서 송이의 ITS 지역의 염기서열 분석을 기초로 하여 몇가지 새로운 primer를 Web primer design program을 이용하여 개발한 ITS primer 및 제한효소를 이용할 경우 송이 유사 균주의 식별이 가능함이 증명되었고, 토양 및 뿌리에 감염된 송이 균사의 탐지도 가능하였다.

#### 나. 송이 접종원 및 균환 형성 기술 개발

소나무 감염묘를 유도하기 위하여 봄에 식재한 소나무는 16.2%가 고사한 반면, 가을에 식재한 소나무는 99% 이상 생존하였다. 특히, 천연치수의 활착률이 낮은 반면 양묘한 소나무의 활착률이 매우 높게 나타나 근계의 안전성이 매우 중요함을 알 수 있었다. 아울러, 영국 셰필드대학교의 Read 교수와 현장 답사를 통하여 자문을 얻으면서, 우리나라의 봄철 가뭄을 감안할 때 춘계 식재보다는 후기 식재가 더욱 유리하다는 조언을 얻었으며, 추후 감염묘 유도용 소나무 식재는 가을철에 추진하는 것이 바람직하다고 사료된다.

송이 감염묘 이식 1년째 결과에서 송이균이 활착하여 생존하는 것이 관찰되었다. 봄에 송이균의 생장이 지속적으로 유지되는 것으로 보아 앞으로 몇 년 후에는 송이가 발생할 수 있을 정도의 송이균사량으로 성장할 것으로 기대된다. 송이균 확인시 송이균의 활력이 지장이 없이 확인하는 방법이 필요하였다. 그 일환으로 색대를 이용하는 방안을 강구하였다.

송이 균의 생존 여부 확인방법으로 소나무 뿌리를 파서 확인하는 방법이 있으나 송이 균 생존여부를 판단한 후 다시 식재를 한 후, 1년이 경과한 후 다시 파서 확인한 결과 송이 균이 활력을 잃었다. 이에 따라, 본 연구에서 송이균의 확인방법으로써 색대(직경 1.2m)를 이용하여 송이 균을 파악하는 방법을 이용하였다. 이식한 소나무를 대상으로 송이균의 생존여부를 조사하였는데, 표본은 이식된 묘목을 중심으로 8방위 정한 후 이식 경과기간에 따라 송이 균의 이동 여부를 감안하여 확인 거리에 차별을 두고 실시하였다.

송이 감염묘용 소나무는 수고가 1m 정도의 건전한 천연치수 혹은 양묘는 3-4년생 이상이 되어야 할 것으로 판단되었다. 소나무를 옮기기 쉽게 하기 위해서 사용되는 분은 그물분보다는 망분이 일하기가 편리하였다. 송이 감염묘용 소나무가 균환선단에 식재하고 적어도 2년이상(여름 시기 2회)이 필요하였다.

현재 소나무림에 이식한 송이감염묘의 약 15%에서 송이 균의 활력이 매우 양호한 것으로 보아 수년내에 송이 자실체의 수확을 기대할 수 있는 단계에 온 것으로 예측되어 앞으로의 결과에 기대를 하고 있다.

송이 접종묘 연구에서 송이균균 형성조건을 파악하였다. 송이균균 형성 조건은 1/4 PDMP배지에서 송이균과 함께 소나무유묘를 6개월째 배양하여 뿌리 전체의 50% 내외의 송이 균균형성이 관찰되었다. 송이 균균이 형성된 부분은 뿌리가 검은색화 되고 송이 균사들이 느슨하게 균근을 둘러싸고 있고, 비분지된 균근을 만들었다.

송이 접종묘의 순화실험에서 6개월간 수돗물만 주면서 키운 송이 접종묘 순화실험의 결과, 토양을 멸균한 것은 송이균이 6개월이 지난 다음에도 20%가 살아 있는 것으로 나타났다. 토양을 멸균하지 않은 것은 이미 다른 외생균근균에 감염되었고, 송이균을 찾아 볼 수 없었다. 결론적으로 순화실험은 반드시 토양을 멸균한 것을 사용할 필요가 있다.

송이 접종묘를 접종 5개월 후 순화처리 없이 직접 이식한 묘목을 검정하였는데, 이식 후 2개월 시점까지 송이 균사와 소나무가 양호하게 나타나 현재 그 결과를 기대하고 있다.

야외 접종용 접종원 개발 시험을 위하여 고체 접종원을 대량생산하였는데, 토양을 포함하는 고체배지에서의 송이 생장은 매우 양호하였다. 이에 따라 고체접종원을 이용하여 대형 소나무 뿌리 근처에 송이 접종원을 매립하여 그 효과를 검정하고 있다. 처리는 단순 투여, 단근 투여, 훈증 투여, 단근 훈증 투여로 현지

에 집중처리를 한 후 균근 형성률을 조사하고 있는데, 현재 균사상태가 일부 양호하게 나타나 균근이 형성될 것으로 기대하고 있다.

#### 다. 입내 송이증산 환경조절과 송이 자실체 발생 촉진기술 개발

송이 서식지의 인자분석을 위한 환경계측기를 설계, 조립하였다. 미국 Microchip Inc.에서 개발한 PIC 16C7XX 칩을 기본 CPU로 선정하여 이 chip에 Analog와 Digital 신호가 각각 1024개씩 모두 2048개의 신호를 처리할 수 있도록 설계하였다. 측정시스템은 넓은 지역에 분포하고 있는 송이를 효과적으로 측정하기 위하여 모듈별 센서의 분배를 기본으로 하였으며, 수집된 데이터에 대한 안전한 저장, 운반 및 산출을 위하여 충분한 용량의 메모리를 사용하였으며 모듈화하였다.

송이산 기상환경과 생산량과의 관계를 검토하여 인공지능 제어 알고리즘을 완성하기 위하여 우선 기상자료를 수학적으로 표현할 수 있는 함수를 찾은 결과 1년간 기상 변화 자료는 전체적으로 변형된 가우스 함수로 나타낼 수 있었다. 이 결과, 겨울에는 따뜻하고 여름에는 좀 차가우며 가을은 일찍 차가울 때 송이가 많이 생산된다는 결론을 도출할 수 있었다.

송이산지에서 측정된 기후자료를 모의 실험실에 구현하기 위해서는 온도뿐만 아니라 습도와 광도 또한 제어해야 하므로 더 복잡한 프로그램과 장치가 필요하였다. 우선 제어 대상이 온도 하나에서 습도와 광도가 더해져 셋으로 늘었기 때문에 두 개의 SSR을 더하여 SSR 네 개를 사용하였으며, 제어대상이 늘어난 만큼 복잡해진 제어 프로그램을 실행하기 위하여 실수연산이 불가능한 PICBASIC-1S 모듈을 대신해서 시리얼포트로 PICBASIC-1S와 연결된 컴퓨터를 사용하여 계산하고 제어명령을 내렸다. 이 결과, 생장환경 조절실에서 충분히 송이산 현장의 기후환경을 재현할 수 있었다.

송이 서식지 주변 토양의 미생물 분포를 송이 자생지 주변 몇 곳의 토양을 채취하여 균을 분리하고 Biolog사 MicroLog 4.02A system을 이용하여 동정하였다. 송이 자생지 토양에서 분리한 미생물을 5가지의 배지에서 배양한 결과 총 107개의 미생물이 분리되었고, 동일 배지에서 배양한 비 자생지 토양에서는 총 98개의 미생물이 분리되었다.

과장 조절용 코디어라이트 구조 세라믹 분말을 제조하였다. 염화제2철 수용액에 수산화나트륨 용액을 부어 ferrofluid를 만들고 이것을 700도로 소성하여 코



디어라이트 구조로 변환하였다. 이를 병해충 방제에 이용하였는데, 합성된 세라믹분말을 50g 정도 마련하여 질산은 수용액에 넣고 침지시킨 후 항균실험을 실시한 결과, 1.0% 질산은 농도이상에서 처리되었던 세라믹 분말이 항균능력을 보여 주었다.

### 3. 경제 · 산업적 기여도

#### 가. 종이 군사배양 촉진기술 개발

종이 군사체의 대량배양기술 확립으로 종이 자실체를 대신하여 종이 향기를 내는 종이 군사체 대량생산을 통한 산업화가 이루어 질 것이며, 종이 군사체에서 추출되는 항암성분을 이용하여 건강식품을 만들 수 있는 토대를 마련하였다고 볼 수 있다.

#### 나. 종이 접종원 및 균환 형성 기술 개발

종이 감염묘, 접종묘 및 고체접종원에 의한 종이재배기술의 진전이 이루어 지면 종이 자실체 생산에 커다란 증산 효과를 가져올 수 있어, 현재 약 300에서 500억원에 달하는 종이 시장이 크게 확장될 것으로 기대된다. 아울러 대일 수출이 크게 늘어날 것이며, 내수시장도 종이 단가 하락으로 보다 많은 소비자가 종이를 구매하고 소비할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 다. 임내 종이증산 환경조절과 종이 자실체 발생 촉진기술 개발

본 연구 결과, 종이 서식지의 인자분석을 위한 환경계측기는 종이산의 넓은 지역의 환경인자를 측정할 수 있는 장비의 개발로 앞으로 이의 사용이 기대된다. 또한, 인공생장환경조절실의 개발은 종이산 현장의 기후환경을 재현할 수 있어 실험실내의 종이재배기술 연구를 가능하게 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

### 1. 송이 군사배양 촉진기술 개발

본 연구에서 개발된 기술을 산림청, 각도 산림환경연구소, 전국 시군 농업기술센터, 기타 버섯관련기관 및 버섯관련회사의 교육과 전국의 산림조합을 통하여 보급하여 실용화한다. 현재 송이자실체의 인공재배가 되지 않은 상태에서 송이군사체를 대량배양하여 군사체 추출물을 송이향이 나는 제품개발이나 향암 물질로 이용하고자 하는 회사나 민간인에게 기술이전을 하여 군사배양기술을 실용화한다.

본 연구에서 개발된 primer를 이용한 송이균 식별기술을 현지에 적용하여 송이균 감염 여부를 정확히 확인하는데 활용한다.

### 2. 송이 접종원 및 균환 형성기술 개발

본 연구의 성과를 산림청, 산림청산하 국유림관리소, 각 교육기관, 각도 산림환경연구소, 전국 시군 농업기술센터, 기타 버섯관련기관 및 버섯관련회사의 교육과 전국의 산림조합을 통하여 송이재배자에게 보급하여 실용화한다.

시험을 통해 아직까지 송이자실체 생산을 보지는 못했지만 연구를 통해 송이 감염묘, 접종묘 및 고체접종원 제조에 상당한 진전을 이루었으므로 수년내에 송이의 인공재배기술이 확립될 것으로 기대되며 추후의 연구는 국립산림과학원 일반과제로 계속 수행해 나갈 예정이다. 따라서 현재까지 이루어진 송이 감염묘, 접종묘 및 고체접종원 제조기술을 홍보하여 기술정보를 관련기관 및 재배자에게 제공한다. 이를 위해서는 보고서는 물론 여러 가지 전문학술지 등을 통해 누구나 본 연구성과를 접할 수 있도록 홍보하고 있다. 그 동안의 연구 결과를 전문학술지에 여러 편의 논문으로 게재하였고, 최근에는 “고체매질을 이용한 송이 군사체의 대량생산 방법”을 특허출원하였다. 본 발명은 송이 군사체가 고체 매질 내에서 신속한 대량 생산을 가능하게 함으로써, 송이 자실체 생성을 위한 생리·생태적 연구와 송이 접종원 생산을 위한 군사체 배양용으로 이용될 수 있다. 또한, 본 발명을 통하여 송이가 새롭게 발생할 수 있는 균환을 인공적으로 형성하거나 고체배지 상에서 자실체를 인공적으로 유도하는 연구를 추진하는 등 인공재배 기술개발을 위한 초석이 될 수 있을 것이다.

궁극적으로 본 연구에서 추구하는 송이 감염묘, 접종묘 및 고체접종원 등은 송이발생을 기후와 환경의 변화 및 관리에만 의존하고 있는 현 시점에서 송이 증수와 수출 및 내수를 활성화할 수 있는 송이재배법을 향상시키는데 크게 기여할 것이다.

### 3. 임내 송이증산 환경조절과 송이 자실체발생 촉진기술 개발

본 연구의 결과를 산림청, 버섯관련기관, 버섯관련회사, 전국의 산림조합 및 송이 재배자에게 제공하여 실용화를 도모한다. 이를 위해서는 보고서는 물론 여러 가지 전문학술지 등을 통해 누구나 본 연구성과를 접할 수 있도록 홍보하고자 한다.

아직까지 본 연구에서 개발된 시스템으로 송이산 환경인자를 충분히 분석하거나 실제로 송이재배 환경을 제어하는 시험까지 도달하지는 못하였지만 그 활용가능성을 부각시키고, 그 동안의 연구 결과를 전문학술지에 논문으로 발표하고, 특허출원을 할 계획이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

### 1. 송이 균근 형성 성공 사례

송이균을 소나무에 감염시키는 시도는 増井(1924)에 의해 이루어 졌으며, 당시에는 성공하지 못한 것으로 알려져 있다(鳥越, 1998; 표 6-1). Kawai와 Ogawa(1981)는 포자나 송이균환 토양내 균사체를 접종원으로 하여 소나무에 송이균근 형성을 성공하였으나, 그 이상의 송이연구 진전은 없었다. 横山와 山田(1987)는 삼각플라스크내의 소나무에 송이균근을 형성하는데 성공하였으나, 다량의 송이균근을 형성하지는 못했다. 다만 송이균근 형성을 성공하였다는데 의미를 둘 수 있겠다.

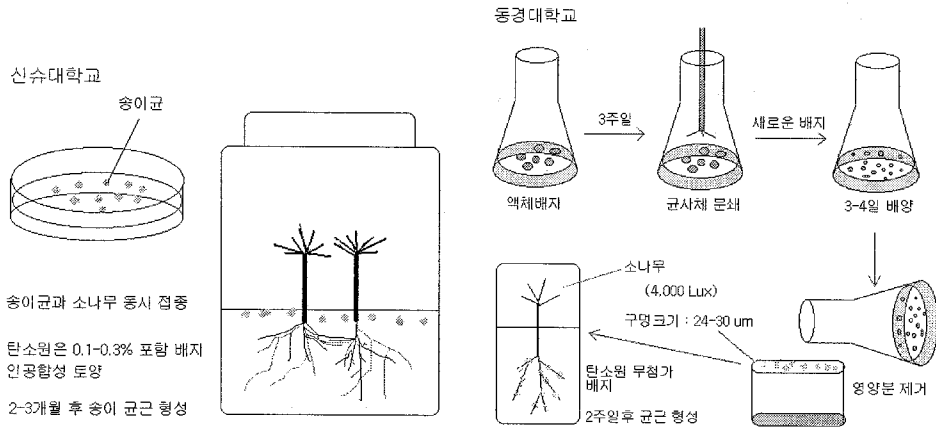
<표 6-1> 소나무 유묘에 송이 균근 형성의 연구 현황

연구자	기주 식물	방법	사용배지	형성 기간	국가	비고
増井 公木(1924)	소나무	소나무와 송이균 동시 접종	?	?	일본	실패, 균근합성 최초시도
Kawai와 Ogawa(1981)	소나무	포자, 송이균환토양 접종, 온실재배	멸균된 광물질 토양	8-12 개월	일본	균근형성
横山 了爾, 山田 卓三(1987)	소나무	삼각플라스크	1/10MS 한천 배지	6개월	일본	균근형성
Wang 등(1997)	소나무, 라이아타	삼각플라스크 Molina & Palmer(1982) 법	MMN(?)	?	뉴질랜드	균근형성, 기생특징발견
Yamada 등(1999)	소나무	조직배양병 질석:이끼	MMC, 포도당 포함, 비포함	2개월	일본	균근형성 (포도당포함)
Vaario 등(2000)	소나무	직사각형배양판 질석:펄라이트:피트:자작톱밥	개량된 SH배지	2주일	일본	균근형성
Guerin-Laguette 등(2000)	소나무	직사각형배양판 송이산 토양	SH 배지 (포도당 포함 안됨)	4주일	일본	균근형성

한편, Wang 등(1997)은 시험관내에서 소나무와 라디아타소나무에 송이균근을 형성시켰으나, 송이균근의 뿌리 세포에서 파괴증상이 나타나, 정부차원에서 야의 실험을 금지시켰다. 그러나 최근에 파일럿 실험을 재개한 것으로 알려져 있다. Yamada 등(1999)과 Vaario 등(2000)은 소나무에 송이균근 형성을 성공하였다(그림 6-1).

공통적으로 인공토양을 이용한 송이균근 형성실험으로, 전자는 송이균근 형성에 포도당의 유무가 중요함을 밝혔고, 후자는 송이균근 형성시기를 획기적으로

단축시키는 결과를 얻었다. Guerin-Laguette 등(2000)은 소나무에 송이균근 형성 시 소나무림 토양과 포도당이 포함되지 않은 배지를 이용하여 짧은 시간내에 송이균근을 형성하는 것에 성공하였으나, 여전히 실험은 진행 중에 있다(그림 6-1). 현재 야외 적용시험이 진행 중에 있고 아직 정확한 결과는 보고되고 있지 않으나, 조만간에 좋은 결과가 나오지 않겠는가 하는 낙관적인 견해를 가지고 있다.



<그림 6-1> 일본 신슈대학교과 동경대학교에서 송이 접종묘 실험 모식도.

Guerin-Laguette 등(2005)은 액체배양한 송이균사를 이용하여 야외에서 자라는 성숙한 소나무 뿌리에 송이균을 감염시키는 연구도 진행 중에 있다. 이 연구는 소나무 뿌리를 찾아 이끼로 감싸아서 새로운 뿌리를 나오게 한 다음에, 송이균을 접종하는 방식이다. 매우 획기적인 방법으로 생각되며, 앞으로 우리의 송이 연구에도 적용해볼 가치가 있는 것으로 판단된다.

## 2. 각국의 송이 연구

### 가. 북한

북한의 송이 발생지는 북부(부령, 양덕, 나진, 초산 등), 중부(금강산)의 소나무림이고 드물게 가문비나무림에서 발생하는 것으로 알려져 있다(임, 1999). 북한의 송이 연구는 송이 증수를 위한 산림 관리 측면에서 기초적인 연구가 진행된 것으로 생각되나, 북한의 송이 연구 정보를 거의 알 수 없어, 어느 정도의 연구가 진행되었는지는 알 수 없다(Li and Kang, 1992). 최근에 일본으로의 송이 수출물량을 살펴보면, 2003년에 북한은 일본에 284톤을 수출하여 국별 수입

시장 점유율 13%를 차지하여 우리나라보다 많은 량의 송이가 일본으로 수출되고 있음을 알 수 있다.

## 나. 일본

일본에서 송이에 관한 최초의 학술적 보고는 국립임업시험장의 三村(1908)에 의한 것으로, 송이가 소나무에 균근을 만든다는 지식은 당시에는 선각적인 연구였다(鳥越, 1998). 1920~30년대에는 교토의 千原飛山, 滋賀의 中村源藏, 관동지방의 山崎光美, 사국중국지방의 朝田盛, 上村正行 등이 재배시험과 전시림을 설정하여 활발하게 수행하였다. 1940년대에는 광도현의 金行幾太郎의 金行方式에 의한 송이산의 손질법을 서일본 전역에 보급하였다. 이러한 기술은 그 이후에 소나무림과 송이에 관해적인 시업기술로 전국 각지에 정착되었다.

1963년에 浜田稔, 徳本孝産 등의 제언으로 대학과 국가, 부현이 지방대책으로 본격적인 조사연구를 착수, 국립임업시험장 관서지장을 중심으로 “송이연구회”가 발족되었다. 1966년에는 13부현의 국립임업시험장에서 “송이 발생환경조사와 환경개선시험”이 시작되었다. 실험대상 소나무림은 대부분이 송이가 발생하는 40년생 전후의 산으로 식생정리, 시로의 이식, 포자산포 등을 수행하였고, 시업후의 환경변화와 시업효과를 격년별로 조사하여, 송이가 확대되는 자료를 얻었다.

그 이외에, 도쿄 부임시의 시험지에서도 비슷한 효과가 보였다. 그 시험지는 25년생의 어린 소나무림으로 시업 10년후에 송이의 시로가 대조구에 비하여 2.5배 증가하였다. 성공의 이유로 식생작업을 연속적으로 수행하여 임내환경이 송이균의 감염이 쉬운 상태로 변화되어 송이포자가 감염된 소나무의 수령은 제한되었고, 시업의 시기가 일치한 것으로 생각되었다. 이는 어린 소나무림을 대상으로 한 재현시험에도 성공하였다.

1978년 민유림을 대상으로 국고보조 형태로 “송이발생환경조절사업”이 도쿄부에서 시작하였고, 농림가들은 송이산가꾸기의 지침서를 작성하였고, 이와 함께 적지판정기준이 정립되었다. 그 후에, 이 사업은 廣島, 岡山, 滋賀, 兵庫, 鳥根, 山口, 長野, 岩手, 福島의 각현으로 확대되었고, 현재는 임지면적이 2,000ha 이상이 되었다. 어린 소나무림에서는 꽤 높은 확률로 새로운 시로가 형성되었고, 지역의 관심이 고조되었으며, 임지재배는 순조롭게 전개되기 시작하였다.

그러나, 1965년경에 시작된 소나무재선충에 의한 소나무림 고사피해가 서일본으로 확산되면서 송이의 감소가 시작되었다. 피해가 적은 고령지와 동북지방을

제외하고는 산지인의 생산의욕이 점차 떨어지고 있다. 때문에, 소나무의 감소에 따라서 증가한 활엽수와 소나무의 혼효림과 소나무 이외의 수종의 목재활용이 추구되고 있다.

1987년 공립임업시험장에서 국고보조로 “균근성식용 버섯의 재배기술 개발” 연구가 수행되어 그후에도 인공접종기술, 안정성기술과 그 이름을 변형하여 송이 연구가 계속되고 있다.

2001년에 방문한 동경대학 농학부 산림식물연구실은 Dr. Kazuo Suzuki 교수를 중심으로 박사후 과정에 Dr. Alexis Guerin-Laguette(프랑스인), 박사과정에 Norihisa Matsushita, 그리고 석사과정에 2명(중국인, 일본인)이 송이 인공 감염묘, 송이 생태학 연구를 수행하고 있었다. 송이 인공 감염묘 연구는 대량생산 조건 설정 실험과 각 산지별 송이의 PCR-RFLP 분석에 의한 차이 검정을 실시하였고, 5년간(1997-2001)에 걸쳐 약 100,000,000¥의 연구비로 송이연구 프로젝트를 실시하였다. Guerin-Laguette 박사는 현재 뉴질랜드의 Corp & Food Research 연구소에서 외생균근성 버섯의 인공재배 연구팀을 이끌고 있다.

신슈대학 응용생명과학과는 Dr. Akiyoshi Yamada와 석사과정 1명(일본인)이 송이와 다른 소나무속 식물들 간의 송이균근 형성 실험과 황소비단그물버섯의 균근형성 실험을 하고 있었다. 나가노현 송이산의 소나무림은 30-40년생이고 송이산이 서사면을 따라 부분적으로 분포하고 있다. 이 지역은 일본에서 소나무재선충병으로 대부분의 소나무가 전멸하였고 해발 800m 이상에 위치하고 있는 소나무만이 소나무재선충의 피해를 받지 않고 남아 있다. 나가노 현의 송이산은 우리의 송이산과 매우 유사한 특성을 가지고 있고, 도시지역이 해발 800에 위치하여 기후조건은 우리의 중부지방과 비슷하였다.



<그림 6-2> Yamada 박사의 외생균근균 실험하는 모습.

일본은 현재 40-50개의 연구기관에서 약 100여명의 연구자가 송이를 연구하고 있고, 최근까지 젊은 연구자들에 의해 매우 활발하게 연구를 진행하고 있다. 우리와는 매우 대조적인 것으로, 앞으로 우리나라의 송이연구 발전을 위해서는 더 많은 젊은 연구자들이 분발해야 할 것이다.

#### 다. 중국

중국에서는 송이를 송구마(松口蘑)라고 부르며 혹은 송심(松蕈), 송고(松菇), 송균(松菌)이라고 부른다. 송이는 주로 동북지구의 흑룡강성, 길림성, 서남지역의 사천성, 운남성, 귀주성, 저장 등에 주로 분포하고 있다. 동북지역의 장백산(백두산) 지역은 중국 송이 주산지중 하나이다.

중국의 송이 연구는 송이 분포지역, 발생환경, 기후인자와 환경인자에 대한 연구와 인공재배의 시도가 진행되었고(潭偉, 1994; 황 등, 2000), 송이균의 분리 동정에 대한 DNA 분석법의 연구도 진행되었다(Zeng 등, 2001).

#### 라. 미국과 캐나다

북미지역에서의 송이 학명은 *Tricholoma magnivelare*로 동양의 송이와는 형태적으로 차이가 있고 종명인 *magnivelare*가 큰 갓을 의미하듯 갓이 큰 것은 35cm까지 자란다. 미국 송이는 *Tsuga plicata*, *T. heterophylla*, *Pseudotsuga menziesii*(douglas fir), *Pinus contorta* 등 침엽수림에서 발생하고 있다. 미국이나 캐나다는 일본으로 수출하기 때문에 그 중요성이 최근에 한층 높아졌다. 미국은 주로 지속가능한 버섯생산 전략에 입각한 송이 연구가 이루어지고 있으며, 송이 균환 발달, 버섯발생 등 매우 세부적인 연구도 이루어졌다(Hosford 등, 1997).

캐나다 BC주에서 가장 중요한 야생 채취버섯은 미국송이, 곰보버섯류, 피꼬리버섯류, 까치버섯, 그물버섯, 꽃송이버섯, 턱수염버섯이다. BC주에서 미국송이는 배수가 양호한 성숙한 산림토양(약 80-120년생)의 western hemlock (*Tsuga heterophylla*), Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) 또는 Lodgepole pine (*Pinus contorta*)이 우점한 산림에서 발생하고 있다(Berch와 Wiensczyk, 2001; Kranabetter 등, 2002). 연구자 수는 소수이고 주로 상업적으로 중요한 버섯들에 대한 생태학적인 연구가 주를 이룬다.

BC주에서 상업적으로 중요한 버섯의 생산성을 증가시키기 위한 방법이 책으로 출판된 적은 없지만, Carrier와 Krebs(2002)는 물주기가 버섯의 생산성을 증가



시킬 수 있다는 것을 발견하였다. BC주의 산림지역의 대부분은 상업적으로 중요한 버섯을 수확하는 곳이 주정부 산림지역이다. BC주에서 목재수확이 여러 가지 소유권 (예를 들면, 수목농장 면허, 목재 판매, 산림용지, 공유 산림) 아래에서 관리를 받지만, 버섯과 같은 비목재 산물에 대한 소유권 제도는 없다. 이것은 버섯 채취자들에게 인센티브가 없어 생산을 증가시키기 위한 노력을 하지 않게 하는 원인 중 하나이다. 또한 산림과 산맥 작업에 관한 조약 168 조항이 있어 법적인 규제를 받지만 비목재 산림산물의 관리에 대해서는 정부에서 규제를 하지 않는다.

BC주 산림에서 수확된 대부분의 미국 송이들이 일본으로 수출되고 다른 버섯들은 일본으로 수출되지 않고 있다. 이 가정을 기초로 1999-2003년 사이 BC주에서 일본에 수출된 신선 미국송이는 평균 302,771kg으로 \$11.2백만(185,129 - 490,358kg, \$5.3-\$17.4백만)로 kg당 \$37에 해당한다.

#### 마. 지중해 지역

지중해 지역에서 발생하는 송이의 학명은 *Tricholoma calicatum*으로 동양송이와 크기, 향기, 서식처 측면에서 매우 유사하다(Hosford 등, 1997). 유럽 송이는 모로코, 알제리 등지에서 주로 *Cedrus libanotica*와 다른 침엽수림에서 발생하고 있다.

#### 바. 뉴질랜드

뉴질랜드는 남반구에 위치한 국가로 북반구의 송이 발생지와 비슷한 기후조건을 가지고 있어, 북반구에서 고가로 팔리고 있는 송이, 덩이버섯(Truffle), 그물버섯의 인공재배를 시도하였다. 소나무와 라디아타소나무에 송이 균을 감염시켰지만, 송이균의 병원성 증상 때문에 야외 산림에 적용은 미룬 상태였다(Wang 등, 1997). 하지만, 최근에 실외 적용시험을 진행 중인 것으로 알려져 있다.

#### 사. 스웨덴

스웨덴에서 발생하는 스웨덴 송이는 *Tricholoma nauseosum*로 동양 송이인 *T. matsutake*와 같은 종으로 알려져 있다. 스웨덴에서는 송이가 *Pinus sylvestris* 산림지역에서 주로 발생하고, 이 종에 대하여 200년전부터 연구를 하였지만 상업적으로 중요하게 인식되지는 않았다. 스웨덴 송이의 증명에서 볼 수 있듯이 *nauseosus*의 의미는 불결한, 나쁜 냄새의 의미를 가지고 있다. 그래서 옛

날에는 송이를 식용하지 않은 것으로 생각된다. 송이의 진한 향기가 스웨덴 사람들에게는 동양인과 달리 나쁜 냄새로 인식되어온 것은 아마도 문화적인 차이 때문에 생긴 일로 생각된다.

1998-2000사이에 스웨덴 송이가 rDNA ITS 분석에서 우리나라와 일본의 송이와 같은 것으로 확인되었다(Bergius and Danell, 2000). 스웨덴 송이는 북부 스웨덴에서 풍부하게 발생하고, 스웨덴 산림의 200,000km<sup>2</sup>가 송이 생산지로 밝혀졌다. 스웨덴 송이 연구 조사지에 송이는 1995-1997년에 1-10개/ha, 11-30개/ha, 31-200개/ha로 생산되었고, 1988년에는 매우 많은 비로 31-200개/ha가 생산, 1-2등급은 30-50g 해당하고 가장 큰 것은 156g 이었다. 4개소 송이 시험지는 구주 적송으로 수고가 10-15m, 수령이 120-150년생 이었다. 송이 발생은 8월 10일경 시작하여 9월 17일경에 끝났다. 시장에서는 송이가 5-50\$/kg 거래되었다.

### 3. 각국의 외생균근성 버섯 연구

#### 가. 일본

일본의 균근성 버섯의 재배연구는 실험실내에서 균근이 형성된 묘목을 화분에 옮겨 버섯을 발생시키고 있다(Yamada 등, 2001). 이 연구에 사용된 버섯균은 모래꽃만가닥버섯, 땅찌만가닥버섯, 송이, 금버섯, 할미송이, *T. portentosum*, 젓비단그물버섯, 황소비단그물버섯, 비단그물버섯, 젓버섯아재비, 피젓버섯, 알버섯이고 이들 버섯균은 무균 소나무에서 2-4개월 안에 균근형성을 하였다. 각각의 감염묘는 멸균한 토양을 토양부피 800ml 화분에 옮겨서 순화처리 하면서 균의 생장 유무 및 버섯발생을 확인했다. 송이를 제외한 다른 균들은 9개월 동안 새로운 균근을 발달시켰고 알버섯의 경우는 이식후 5개월이 경과했을 때 버섯을 만들어 성숙되었다. 이식후 9개월 뒤에는 피젓버섯, *T. portentosum*, 할미송이는 버섯을 만들었다. 송이 균근은 대부분 1개월 안에 노화증상이 나타났고 소수의 송이균근이 적어도 4개월 정도 생존하였다. 할미송이와 금송이는 3.5리터 화분에 옮긴지 1년 후에 버섯을 생산하였다. 현재 연구를 기초로 피젓버섯, 알버섯, *T. portentosum*, 할미송이가 실제적인 균근버섯 재배의 후보종으로 선발되었다.

#### 나. 중국

중국산 덩이버섯은 1990년대 초에 처음으로 유럽으로 수출되었고, 최근에는 다량의 덩이버섯이 유럽으로 수출되고 있다. 중국산 덩이버섯의 주산지는

Yunnan과 Sichuan이다. 중국에서는 주요한 덩이버섯을 구분하기 위하여 형태적 분자생물학적 연구를 하고 있다. Yunnan과 Sichuan에서 채취된 덩이버섯은 형태적 분류와 ITS 부분분석으로 13개 스트레인이 6개 그룹으로 구분되었다. 그중에 *T. chineseexcavatum*과 *T. pseudoborchii*는 신종이고, *T. aestivum*, *T. uncinatum*, *T. sinense*, *T. himalaynese*는 같은 종으로 보고하였다.

덩이버섯의 생산지인 Dongchuan지역의 생태조사에서, 한 곳은 *Pinus armandii* Franch.이고, 2개소는 *Keteleeria evelyniana* Mast., *Cyclobalanopsis glaucoides* Schottky, *Alnus nepalensis* D. Don. 혼효림으로 밝혀졌다. 토양은 pH 6.8-6.9, 약간의 탄산칼슘(3.6-4.6%)이 검출되었다. 높은 부식층과 여러 가지 macronutrient이 검출되었다.

#### 다. 캐나다와 미국

캐나다 BC주에서 가장 중요한 야생 채취버섯은 미국송이, 곰보버섯류, 피꼬리버섯류, 까치버섯, 그물버섯, 꽃송이버섯, 턱수염버섯이다. BC주에서 상업적으로 중요한 식용 야생버섯은 9월과 10월에 채취된다. 단, 곰보버섯류는 5월과 6월에 채취된다. 태평양 피꼬리버섯은 습하고 60-80년생 western hemlock 산림에서 풍부하게 발생하고 있다.

캐나다지역에서 1990-2003년 기간 동안, 평균 104,665 kg의 생버섯 또는 냉동버섯이 유럽으로 수출되었으며, 이것은 연간 \$1.7백만에 해당한다. 주로 피꼬리버섯류가 수출되지만, 곰보버섯류와 몇몇 다른 종이 포함되어 있다. 또한 많은 곰보버섯류가 BC주 밖으로 수출된다.

BC주에서 비목재산림산물에 대한 연구를 하는 사람은 소수이다. BC주는 27개 대학교를 가지고 있지만 비목재산림산물을 전문적으로 연구하는 곳은 거의 없다. 비록 많은 교수들이 식물과 동물에 대한 연구를 수행하고 있지만 상업적으로 중요한 버섯만 연구하는 교수는 없다. BC주의 교육기관들 중에서 Royal Roads University에서만 상업적으로 중요한 버섯과 비목재 산림산물에 대한 연구를 하고 있다. Royal Roads 대학에서는 비목재 산림산물에 대한 정규 코스와 자격증 프로그램이 있고, 2004년에는 비목재 산림산물의 센터로 발족하여 세계의 온대와 한대지역 내 비목재산림산물의 지속적인 이용에 대한 연구에 착수하였다.

BC주에는 상업적으로 중요한 야생버섯의 생산자, 구매자, 수출업자를 대표하는 전문 협회가 없다. 4개의 버섯클럽이 Vancouver, Victoria, Kelowna, and

Roberts Creek 지역에 있지만, 이들 클럽은 상업적인 버섯 수확을 직접적으로 지원하는 것은 아니고, 사람들이 버섯에 관한 지식을 배우는 것을 격려하는 정도이다. 사실 버섯 클럽 멤버들은 상업적인 버섯의 지속적인 수확에 주안점을 두고 활동하고 있다.

BC주에는 Truffle Association of BC(TABC) 가 등록되어 2004년부터 활동을 시작하였다. 이 협회에서는 주로 검은덩이버섯(*T. melanosporum*)의 생산적지 분석을 통해서 southern interior and south western BC 가 적합한 것으로 판단하고 있다.

1980년대 초에 미국은 유럽의 덩이버섯 농장에서 수입된 나무를 미국에 식재 하였으나, 이들 덩이버섯 나무들의 관리불량으로 대부분은 버려졌다. 그러나 북부 캘리포니아의 한곳, 노오스캐롤리나에서 1988과 1993년에 덩이버섯 생산이 각각 성공하였다.

버섯발생 잠재능력은 버섯발생 계절에 버섯발생을 위한 최적의 기후 조건, 4-10년간의 평균 시험지 생산 자료, 목표 종의 균근이 공간적으로 차지하는 분포와 광합성을 통해 고정된 탄소의 총량(GPP), 나무나 균근성 버섯이 성장하면서 이용할 수 있는 순수 탄소량(NPP) 등으로 측정하였다. 대개 NPP는 GPP의 47% 해당하고, 지표면에 할당된 NPP중 뿌리에 할당되는 부분은 나무줄기에 할당된 NPP의 약 25%를 차지하고, 그 나머지는 세균과 균근을 이용하고 있다.

*Morchella*의 자실체 발생 패턴조사에서 토양온도는 2°C 이상에서 자실체 발생이 시작되고, 강우량은 적어도 10mm 이상이 되어야 한다는 결과를 얻었다. 그리고 관수에 의해 곰보버섯류의 버섯발생이 촉진된다는 사실도 확인 되었다.

동양권의 피꼬리버섯과 유사한 *Cantharellus formosus*와 백색을 띠는 *C. subalbidus* 는 Douglas-fir와 western hemlock 임지에서 주로 생산되고 있다. 간벌 첫해에 버섯생산량이 크게 감소하고, 간벌에 의한 버섯의 생산량은 6년 안에 사라졌다. 간벌효과는 기주식물을 제거한 것에 비례하여 생산량이 감소하는 것으로 보고되었다.

#### 라. 아랍권 국가의 외생균근성 버섯 연구

아랍권 국가에서는 이스라엘과 이란에서 균근성 버섯에 대한 재배연구 발표를 하였다. 이스라엘은 *T. melanosporum* 버섯을 이탈리아와 프랑스에서 얻은 참나무와 hazel suckers에 접종하였다. 포자접종 후 3달째에 두 식물에서

외생균근이 관찰되었다. 균을 감염시킨 1-2년생 묘목은 야외 시험지에 식재 후 4년이 지난 다음에도 묘목의 뿌리에서 *T. melanosporum* 균이 검출되었고, 처음 버섯 발생은 2000년에 조사구중 한곳에서 발견하였다.

이란은 덩이버섯의 형태적 및 생태적 연구로, 버섯은 주로 겨울철 중순-초봄 특히 1-3월에 채취하고 있다. 덩이버섯은 2종류로, 한종류는 크기가 호도크기, 표면은 검은색, 내부는 백색, 땅속 2-10cm 아래 토양에서 발견되었다. 나머지 한종류는 크기는 큰 감자 크기, 표면은 노랑고 딱딱한 조직을 가지며 땅속 5-10cm 아래에서 발견하였다.

#### 마. 유럽 국가에서 외생균근 버섯 연구

스웨덴은 90년대에 자국에서 덩이버섯류인 *T. aestivum*, *T. mesentericum*이 발견되어 연구가 활발하게 이루어졌다. 이 버섯류의 기주식물은 주로 *Corylus avellana*이고, 또한 *Quercus robur*로도 조사되었다. 실험방법은 토양조성, 포자농도로 *Quercus robur*, *Corylus avellana*, *Carpinus betulus*를 이용하여 2000-2001년에 상업적으로 만들어진 덩이버섯 감염묘를 3,000개 생산하였다. 아울러 대표적인 균근성버섯중 하나인 피꼬리버섯의 인공재배 및 기주식물과 균간의 탄소전달 연구를 하였다.

프랑스와 이탈리아는 다양한 종류의 덩이버섯류를 연구하고 있다. 프랑스는 Burgundy truffle(*Tuber uncinatum*)로 이 버섯은 프랑스 북부지역에서 주로 발생하고, *T. melanosporum* 보다 서식처의 환경이 다양하다. 이 덩이버섯은 유기물량이 매우 풍부하고, C/N율이 높고, 탄산칼슘 농도가 낮거나 심지어 없고, pH 7.0-8.0 이상이다. 기주식물은 *Quercus petraea*, *Q. pubescens*, *Carpinus betulus*, *Ostrya carpinifolia*, *Corylus avellana*, *C. colurna*, *Tilia* spp., *Pinus nigra austriaca*, *Cedrus atlantica* 이었다. *T. uncinatum*은 건조에 약하므로 식재지는 입목밀도가 높게 요구되어 800-1200/ha였고, 나무의 가지치기는 최소화하였다.

*T. uncinatum*은 아마도 유럽에서 가장 공통적인 식용 덩이버섯으로 생각되며, 자연적으로 중앙유럽(프랑스, 영국, 벨지움, 네델란드, 스위스, 서독, 오스트리아), 북유럽(덴마크, 스웨덴), 동유럽(동독, 체코, 헝가리, 불가리아, 폴란드, 발틱공화국), 남유럽(포르투갈, 스페인, 이탈리아, 세르비아)에서 발생하고 있다.

덩이버섯의 성공적인 생산을 위한 4가지 조건은 1) 시험지 선정, 2) 덩이버섯 감염묘로 토양에 접종, 3) 시험지에 가장 적합한 수종 이용, 4) 과수원식 관리이다.

*T. uncinatum*의 재배는 *T. melanosporum*보다 더 최근 일이고 1980년대에 식재지가 개발되었다.

1. 시험지 선정은 기후조건이 광범위하다. 2. 토양조건은 매우 다양하고, 물리적 특성도 매우 다양하고 점토-사질토가 많다. 배수관계와 수분보유능력도 중요한 인자이다. *T. melanosporum*은 토양분석이 시험지 선정 전에 필수적이기는 하나, 이 종은 토양조건에 덜 민감하여 pH는 > 7이 필수조건이다. 또한 유기물함량은 20% 수준, C/N율은 9-12이지만 20까지도 될 수 있다. 인산은 대개 낮은 편이고 칼륨농도 높은 곳에서도 발견되었다. 3. 기주식물은 다수의 식물이 감염되고, 공통적으로 hazel(*Corylus avellana*), white hornbeam (*Ostrya carpinifolia*, 이탈리아), cedar(*Cedrus atlantica*) 이다. 일부 다른 사람들은 pines(*Pinus nigra austriaca*), white hornbeam(*Carpinus betulus*), Byzantium hazel(*Corylus colurna*), oaks(*Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*) 이용한다.

감염묘의 식재밀도는 많은 인자에 의해 좌우되기 때문에, 토양이 비옥하고 관개시설이 있거나, 기주식물이 빠르게 자라는 나무와 토양이 깊으면 식물을 덜 뺏아 심는다. *T. melanosporum*은 400개/ha 혹은 그 미만이지만 *T. uncinatum*은 800-1200개/ha 이다.

덩이버섯 재배 모델은 Sourzat가 *T. melanosporum*을 위해 제안한 2가지 모델을 약간 수정하여 *T. uncinatum*에 적용할 수 있다. "Pallier model"은 과수재배 방법을 덩이버섯 재배에 적용한 것으로 균근묘를 양호한 토양에 심고, 관수조절, 규칙적인 토양관리, 심한 그늘을 피하기 위하여 자주 가지치기를 하였다. 이 방법은 비용이 많이 들지만 일반적으로 좋은 결과를 얻는 것으로 알려져 있다. 그러나 일부 나무들이 오염되었을 때, 예를 들면 *T. brumale*에 의해 덩이버섯 나무 주변으로 오염이 퍼지는 경향이 있었다. "Tanguy model"은 감염묘는 일단 정착되면 그 심은나무를 제고하고 초본식생의 자연적 발달은 그대로 방치한다. Tanguy모델은 덩이버섯생산이 Pallier 모델보다 늦게 시작하지만 생산량은 매우 좋은 편이다. 토양유지와 잡초조절은 식재 첫해동안 나무 주변의 잡초는 인위적으로 뽑아주거나 멀칭으로 제거할 필요성이 있고 제초제를 자주 사용하기도 한다.

*T. uncinatum*은 프랑스의 북동부지역(Lorraine)에서 1974년 봄에 식재한 22개체 감염묘 hazel을 식재한 곳에서 1979년부터 생산되기 시작하였다. *T. uncinatum* 감염된 black hornbeams, hazels, pubescent oaks가 1988년 가을에 Parma 지역에 식재하였다. black hornbeams 주변에서 1992년과 1995년 가을과

1997년에 모든 hornbeams에서 덩이버섯이 생산되었다. 1996년에 800m<sup>2</sup>에서 덩이버섯 1kg이 생산되어 12.5kg/ha에 해당하였다. 처음 버섯 수확은 식재후 5년이 걸렸고 10년이 지나서야 덩이버섯나무들은 충분한 그늘을 만들었다. 15-16년 후에 50kg/ha 이상이 수확되었고, 모든 나무들은 식재 후 9년째에 버섯이 생산되었다.

프랑스는 15년기간 매년 1000ha의 덩이버섯 감염묘를 식재하고 있으며, Federation francaise des trufficulteurs(FFT)는 덩이버섯 재배에 대한 방법, 허가, 측정, 법규 등을 개발하여 보급하고 있다. 최근에 프랑스와 이탈리아는 상업적인 외생균근성 버섯재배에 대한 프로젝트를 수행하고 있다. 이 프로젝트는 VERCHAMP 이름 하에 덩이버섯류, 꺾이버섯류와 그물버섯류를 연구하고 있다. HAD(Hautes Alpes Developpement)는 이들 균류의 클론을 채집하고, 이들 균이 감염된 묘목을 공급하며, 각 나라에 적어도 12개의 실험 농장을 개설하였다. 또한 전문가 기술팀에 의해 재배지 선정을 책임지고 있으며, 이러한 일은 땅 소유자와 투자자에 의해 이루어지고 있다. 실제로 프랑스에서는 24개소의 시험지가 이미 만들어졌고, 이탈리아에는 15개 시험지가 만들어졌다. 이 연구를 통해, 15년 동안 기주식물과 버섯에 대한 재배연구를 하여, 새로운 재배법을 개발 및 보급하기 위한 실질적인 정보를 제공할 예정이다. 또한 이 프로젝트는 덩이버섯 생산에 적합한 파일롯 지도와 Piemonte phenotypes 분류를 제공하고 있다.

이탈리아에서는 *T. borchii* 재배를 시도하였다. 이 종은 과거에 냄새가 나쁜 *T. maculatum*, *T. foetidum*, *T. dryophilum*, *T. puberulum*과 형태적으로 매우 비슷하여 혼동되어 판매되었다. 이 버섯은 bianchetto(white truffle)라고 부르며 이탈리아의 white truffle(*T. magnatum*)과 구별하기 위한 것이다. 현재는 형태학적 분자생물학적 기술에 의해 냄새가 나쁜 종들과 구분이 가능하며, 균사체로 감염묘를 생산할 수 있는 기술 개발로 야외 실험이 진행되어 비교적 빠르게 이 버섯을 생산할 수 있다. 이 버섯은 초기 침입단계의 균류에 대해 높은 생태학적 적응력, 낮은 기주특이성, 순수배양 능력, 포자를 토양에 넣었을 때 유묘뿌리에 감염, 다른 균근균과 강한 경쟁력을 가지고 있다. 이 버섯의 크기는 완두콩 크기에서 달걀크기 까지 다양하고, peridium은 황색-적갈색을 띠어 *T. magnatum*과 매우 비슷한 특징을 가지고 있다. 두 버섯사이의 가장 큰 차이는 *T. borchii*의 gleba가 더 어둡고, 더 넓은 veins을 가지고 있고, 겨울과 봄에 채집되는 반면에 *T. magnatum*은 가을에 채취된다. *T. magnatum*은 생산량이 15kg/ha/year 이고, 토양 pH는 8.0 이다. 이 버섯에 대한 토양특성, 식생, 기후특성 등이 연구되었다.

상업적으로 중요한 버섯, 특히 덩이버섯류에 대한 균근 검정에 적용된 방법은 RAPD, ITS 분석(RFLP, PCR, multiplex PCR), MP-PCR (microsatellite- primed PCR), PAMPO(random amplification microsatellite polymorphism)의 분자생물학적 기술로 생활사의 어떤시기에나 적용 가능하고, 빠르고, 민감하고, 믿을 수 있는 동정기술을 제공한다. 재료는 버섯, 균사체, 균근합성 성공유무, 덩이버섯의 존재유무, 덩이버섯 농장에서 가장 오염되기 쉬운 균류의 존재 유무 판별, 식품에서 덩이버섯 확인이 가능하다.

스페인 은 프랑스와 이탈리아와 마찬가지로 덩이버섯류에 대한 연구를 집중적으로 하고 있다. *Tuber nigrum*은 스페인의 Soria 지역 석회암토양에서 1979년에 600ha 식재하였다. 이때 사용한 감염묘는 holm-oak(*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp)를 이용하였다. 덩이버섯은 1년에 2500kg 생산하고 있으며, 20% 이상의 덩이버섯이 이미 식재한 곳에서 생산된다. 그리고 매년 500ha 이상의 덩이버섯 농장이 스페인에서 만들어지고 있다. 그리고 덩이버섯 양묘는 매년 100,000개 이상의 접종묘가 생산되고 있다.

스페인에서 덩이버섯류의 가격은 \$150-\$550/kg이고 검은덩이버섯은 포자접종에 의한 감염묘 생산기술이 개발되었다. 기주식물은 holm oak, oak, hazelnut, *Quercus ilex* 등이 사용되고 감염묘를 식재후 버섯이 생산되기 까지는 6-12년이 걸린다. 감염묘의 상품성 평가는 균근형성 개수를 가지고 판단하고 있다. 또한 대부분의 유럽산 덩이버섯류의 외생균근은 동정할 수 있으나, 아시아산 *T. himalayensis*, *T. indicum* 같은 외생균근은 균근만을 가지고 구분하기 어려워 분자생물학적인 방법으로 구분하고 있다.

검은덩이버섯을 성숙한 나무에 접종하는 기술은 1) 덩이버섯을 가진 임지에서 나무 뿌리가 덩이버섯 균사층까지 도달하게 하는 방법과 2) 잔뿌리를 많이 발생시키는 기술을 적용한 후에 균을 접종하고 있다. 기주식물은 Lusitan oak (*Quercus faginea*)과 Holm oak(*Q. ilex*)를 주로 이용하고 있다. 접종방법은 트랙터로 깊이 20-30cm, 폭 30-40cm 파고, 접종원은 버섯을 질석과 물로 섞어 사용하고 있다. 리터당 10, 30, 50g 버섯이 들어가게 처리하고 hydrogel을 처리하고 충분히 물을 준다. 검은덩이버섯의 균근형성 유무는 1-2년이 경과된 후에 확인할 수 있다.

스페인 전역에서 덩이버섯 생산량이 감소하는 가장 중요한 이유는 방목이 감소, 장작 수집의 근절, 야외경작의 결핍에 의한 산림의 밀도증가 때문이다. 산림



밀도의 증가는 시골인구가 도시로 옮겨 가면서 부쩍 증가하였다. 또한 지중해만의 오염에 의한 영향, 자연자원의 파괴로 인한 그 지역의 강수량의 감소도 한 원인이 되고 있다. 따라서 산림을 가꾸고 재배하는 개념이 도입되기 시작하였다. 덩이버섯 생산림의 관리기준을 마련하기 위해 120개의 자연산 덩이버섯 생산림의 연구를 시작하였다.

검은덩이버섯의 재배지에서 burn size와 덩이버섯 생산량과의 관계 조사에서, 433개 burns이 8개 유형의 산림서식처에서 6년 이상 조사하였다. 기주식물은 *Quercus faginea*, *Q. ilex subsp. ballota*, *Corylus avellana*, *Cistus laurifolius*, *Tilia platyphyllos*이었다. 검은덩이버섯 재배지역은 산악지역으로 해발 1000m 이상지역에 주로 분포하였다. 그리고 평균강수량은 800mm, 연평균기온은 10℃ 내외이고 겨울은 매우 추운 곳이다. Burn 크기는 검은덩이버섯 생산량 변이의 39-51%의 상관관계가 성립되었다.

최근에는 상업적인 균근성 버섯인 붉은젓버섯에 대한 연구도 시작하였다. 붉은젓버섯은 *Pinus pinaster* Ait와 *Quercus pyrenaica* Willd.의 순림과 혼효림에서 버섯 생산에 대한 생태조사를 3년에 걸쳐(2002-2004) 33개 150m<sup>2</sup> plots에서 하였다. 버섯생산은 순림에서 11.3kg/ha, 혼효림에서 23.0kg/ha 이었고, 11월에 pure zone에서 64%, mixed zone에서 81% 생산되었다. 소나무와 참나무가 공존하고 있는 곳이 순림보다는 2배 이상의 생산량을 가지고 있어 나무의 다양성이 붉은젓버섯 생산에 좋은 것으로 나타났다. 그리고 유령림이 노령림보다 생산량이 높게 나타났다.

포르투칼은 밤나무류(*Castanea sativa*)와 관련된 식용 균근성 버섯이 연구되었다. 유럽밤나무는 포르투칼의 북동부지역에서 사회·경제적으로 중요하다. 고품질 밤과 목재생산은 경제적으로 매우 중요한 산업이다. 식용버섯 생산은 밤나무 재배자들의 중요한 수입 대체원이다. 유럽밤나무와 관련된 버섯은 55속 179종이었고, 이들중 67%는 균근성 버섯 종이고 나머지는 비균근성 버섯종이었다. 또한 균근성 버섯의 58%는 식용버섯이었다. 포르투칼은 밤나무가 53,800 ha를 차지하고, 프랑스(40%), 브라질(26%), 스페인(18%)으로 수출된다. 밤나무 목재는 고가의 가구, 나무통, 수공예 바구니의 재료가 되고 있다. 대부분의 포르투칼인은 버섯을 식용으로 즐기지 않으며, 특히 야생버섯은 먹지 않는다. 과거 10년이상 이탈리아, 스페인, 프랑스 사람들이 포르투칼의 야생버섯 채취에 관심을 가져왔고, 현재 지역사람들만이 경제적 가치를 인식하기 시작하였다. 개인당 야생버섯을 팔아

한 달에 약 \$1,800 수입을 올리고 있다. 주요 버섯은 그물버섯, 피꼬리버섯, 붉은 젖버섯이 해당하고 있다.

#### 바. 뉴질랜드의 외생균근 버섯 연구

뉴질랜드는 New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited를 중심으로 1980년대 초부터 값비싼 균근성 버섯의 인공재배에 대한 연구를 활발하게 시도하였고, 1987년에 *T. melanosporum* 감염묘가 처음 성공하였다. 이 버섯의 재배를 위한 최적조건은 따스한 여름과 추운 겨울, 배수양호, 토양산도 7.5이상 최적은 pH 7.9, 통기성이 좋은 석회암지대이다. 그래서 자연적인 산성토양 지역에서는 다량의 석회를 투입하여 산도를 증가시켰다. 석회시비는 2톤/ha, 10cm 깊이까지 처리하였다. 특히 산성토양에는 50톤/ha 이상 처리한 곳도 있었다. 석회시비는 토양 구조를 개선시키나, 철, 마그네슘, 구리, 붕소의 이용능력을 떨어뜨리는 부작용도 있었다. 그래서 미량원소는 엽면시비로 문제점을 극복하고 있다.

검은덩이버섯 재배지는 80곳 이상으로 30,000개의 감염묘를 식재하였다. 토양산도가 5.5 미만인 곳은 40톤 석회/ha 투입하였다. 이런 조건하에서 식재 후 5년이 경과된 곳은 1993년에 덩이버섯을 처음 수확하였다. 1997년과 2002년, 5월에서 9월초 사이에 이들 0.5ha 조림지에서 9-60kg이 생산되었다. 5곳의 다른 덩이버섯 농장에서 2000과 2001년 겨울동안에 덩이버섯을 생산하였다. 뉴질랜드에서 1등급의 덩이버섯은 농장가격으로 US\$1,522/kg에 팔린다. 이것은 덩이버섯 생산 시기 가격의 약 2배이다.

알버섯과 붉은젖버섯은 라디아타소나무 조림지에서 생산할 수 있었다. 야외시도는 *T. borchii*, *T. uncinatum*, 송이균이 감염된 나무들이 시도되었다. 붉은젖버섯은 유럽에서 도입되었고, 알버섯은 뉴질랜드에서 채취한 것이다. 또한 1990년도 라디아타소나무에 그물버섯, 1998년에 알버섯의 연구가 시작되었다. 붉은젖버섯은 라디아타소나무, 소나무, 가문비나무가 기주식물로 적합했고, 알버섯은 라디아타소나무가 기주식물로 적합하였다. 식재 실험은 묘목이 18-26개월 되었을 때 좋았고, 6-12개월 후에는 경쟁하는 균류의 오염에 의해 좋지 않았다. 1990년에는 라디아타소나무에 그물버섯, 1998년에는 알버섯의 연구가 시작되었다. 알버섯은 감염묘를 식재한 후 12개월 지난 곳에서 모두 알버섯균이 유지되었고, 식재 후 21개월 후에 버섯이 발견되었다. 뉴질랜드에서 추구하는 것은 *T. borchii*, *T. uncinatum*, *T. magnatum*, 그물버섯, 송이를 생산하는 것이다.

현재 뉴질랜드는 순수배양 균사를 이용하여 온실조건에서 균근성 버섯의 접종묘목을 생산하고 있다. 접종방법은 *T. borchii*는 *Q. robur*와 *C. avellana*에서, *T. melanosporum*은 *Corylus avellana*와 *Quercus pubescens*에서, *T. rufum*과 *T. aestivum*은 *Ostrya carpinifolia*에서 멸균 calcareous 토양을 이용하여 접종후 5개월째에 균근 묘목을 얻었다. *T. borchii*, *T. melanosporum*, *T. macrosporum*, *T. maculatum*, *T. rufum*, *T. brumale*, *T. aestivum*종이 실험 중에 있다.

#### 사. 남미지역의 외생균근 버섯 연구

칠레는 기후조건이 지중해성 온대기후이기 때문에 지중해 연안국가에서 상업적으로 재배되는 덩이버섯류의 재배적지로 적합하여, 덩이버섯 재배농장이 2002년에 처음 시작되었다. 2004년 8월에 Agrobiotruf S.A. 회사는 칠레에 상업적인 덩이버섯 감염묘를 생산할 수 있는 양묘장을 설치, 첫해에 4,400개 검은 덩이버섯 감염묘를 생산할 수 있는 시설을 갖췄다. 현재 이 회사는 덩이버섯 생산에 대한 인증프로그램 개발 중에 있고 10,000 덩이버섯 나무 생산하여 2006년 9월에 대략 35ha를 조성할 예정이다.

## 제 7 장 참고문헌

- 가강현, 구창덕. 2002. 송이 인공재배 연구를 향한 질문들. *Trends in Agriculture & Life Science* 2(1): 1-6.
- 가강현, 박현, 허태철, 여운홍, 박원철. 2002. 소나무를 이용한 송이 균근 합성. 2002년도 한국임학회 학술연구 발표논문집. pp. 235-236.
- 가강현. 2001. 송이의 생장 특성과 기생균에 관한 연구. 동국대학교 박사학위논문 pp.105.
- 강안석, 차동렬, 김양섭, 박용환, 유창현. 1989. 송이(*Tricholoma matsutake*) 생산과 관련되는 기후 특성 분석. *한국균학회지* 17: 51-56.
- 구창덕, 김재수, 박제인, 가강현. 2000. 송이와 소나무간의 공생관계에서 외생균근의 시-공간적 구조변화. *한국임학회지* 89: 389-396.
- 구창덕, 김재수, 이상희, 박제인, 안광태. 2003. 송이 균환내 토양수분의 시공간적 변화. *한국임학회지* 92: 632-641.
- 김재수, 조재명, 김세빈, 박현, 김현중, 정태공, 구창덕. 1999. 송이, 지속 가능한 생산 전략. *신농민강좌시리즈* 38집. 농민신문사.
- 김홍은, 구창덕, 김재수, 박제인, 신원섭, 신창섭. 2002. 참나무 임분 토양내 능이 외생균근 집단의 생태적 특징. *한국임학회지* 91:457-464.
- 농민신문. 2001. 송이 인공재배 길 열었다. 11월 5일자.
- 박용환. 1997. 최신 버섯학. *한국버섯원균영농조합*. pp. 502.
- 박현, 김교수, 구창덕. 1995. 한국에서 9월의 기상인자가 송이 발생에 미치는 영향과 그 극복방안. *한국임학회지* 84(4) : 479-488.
- 박현, 신기일, 김현중. 1998. 자기회귀모형을 이용한 송이생산 제한 기후인자 파악. *산림과학논문집* 57:213-221.
- 왕인경, 장숙평, 송개. 2000. 중국적송의 현상 및 보호와 이용 책략. *울진 소나무림 보전을 위한 국제 심포지움*. 145-186.
- 이창윤, 홍윤표, 정명준, 한영환. 1998. 송이균사(*Tricholoma matsutake*) 배양액의 세포외 효소 활성. *한국균학회지* 26(4) : 496-501.
- 이태수, 김교수, 심우섭, 김세현, 주영환, 오세원, 조재명, 이지열. 1984. 송이 인공 증식에 관한 연구(I). *임시연보* 31: 109-123.

- 이태수, 김교수, 심우섭, 김세현, 주영환, 오세원, 조재명, 이지열. 1984. 송이인공 증식에 관한 연구( I). 송이 감염묘의 육성방법 개선. 임시연보 31 : 109-123.
- 조덕현, 이경준. 1995. 29개 지역의 10년간 송이 발생림의 기상인자와 송이발생량과의 관계. 한국임학회지 84: 277-285.
- 한기학, 박준규, 정이근, 이춘수, 윤정희, 김원출, 이상규. 1988. 토양화학 분석법, 농업기술연구소 450pp.
- 허태철, 박현, 가강현, 주성현, 2004. 송이균환부에서 토양이화학적 특성의 동태. 한국임학회지 93: 26-34.
- Agerer, R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza. *In* Methods in Microbiology. vol 23. edited by J. R. Norris, J. J Read and A. K. Varma. Academic Press. London. pp. 25-73.
- Alexis, G. L., Vaario, L. M., Gill, W. M., Lapeyrie, F., Matsushita, N. and Suzuki, K. 2000. Rapid in vitro ectomycorrhizal infection on *Pinus densiflora* roots by *Tricholoma matsutake*. Mycoscience 41 : 389-393.
- Amicucci A, Zambonelli A, Guidi C, Stocchi V, 2001. Morphological and molecular characterization of *Pulvinula constellatio* ectomycorrhizae. FEMS Microbiology letters 194: 121-125.
- Amicucci A, C. Guidi, A. Zambonelli, L. Potenza and V. Stocchi. 2000. Multiplex PCR for the identification of white *Tuber* species. FEMS Microbiology letters 189: 265-269.
- Berch, S. M. and A. M. Wiensczyk. 2001. Ecological description and classification of some pine mushroom (*Tricholoma magnivelare*) habitat in British Columbia. Research Report 19. Ministry of Forests Research Program. 54p.
- Bergius, N. and Danell, E. 2000. The Swedish matsutake (*Tricholoma nauseosum* syn. *T. matsutake*): Distribution, abundance and ecology. Scand. J. For. Res. 15: 318-325.
- Beyer, D.M., Lomax, K.M., Beelman, R.B. 2000. The use of time domain reflectometry to monitor water relations in mushroom substrate and casing. 15th Science and Cultivation of Edible Fungi. pp. 341-348.
- Carrier, P. and C.J. Krebs. 2002. Trophic effects of rainfall on *Clethrionomys*

- rutilus*voles: an experimental test in a xeric boreal forest in the Yukon Territory. *Canadian Journal of Zoology* 80: 821-829.
- Comandini O, Pacioni G, 1997. Mycorrhizae of asian black truffles, *Tuber himalayense* and *T. indicum*. *Mycotaxon* 63: 77-86.
- Cromack, K., Sollins, P., Graustein, W.C. Speidel, K., Todd, A.W., Spycher, G., Li, C.Y. and Todd, R.L. 1979. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus, *Hysterangium crassum*. *Soil Biol. Biochem.* 11:463-468.
- Edible Mycorrhizal Mushrooms and Their Cultivation. 2001. Proceedings of the second international conference on edible mycorrhizal mushrooms, 3-6 July, New Zealand.
- Edible Mycorrhizal Mushrooms. 2005. Abstract book, fourth international workshop, 28 November to 2 December, Spain.
- Ekblad A., Wallande, H. and Näsholm, T. 1998. Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytologist* 138 : 143-149.
- Gill, W. M., Guerin-Laguette, A., Lapeyrie, F. and Suzuki, K. 2000. Matsutake-morphological evidence of ectomycorrhiza formation between *Tricholoma matsutake* and host roots in a pure *Pinus densiflora* forest stand. *New Phytol.* 147:381-388.
- Guerin-Laguette, A., L. M. Vaario, W. M. Gill, F. Lapeyrie, N. Matsushita and K. Suzuki. 2000. Rapid in vitro ectomycorrhizal infection on *Pinus densiflora* roots by *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 41: 389-393.
- Guerin-Laguette, A., Matsushita, N. Lapeyrie, F., Shindo, K. and Suzuki, K. 2005. Successful inoculation of mature pine with *Tricholoma matsutake*. *Mycorrhiza* 15:301-305.
- Horton T. R. 2002. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil* 244: 29-39.
- Horton T. R. and T. D. Bruns. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black-box. *Molecular ecology* 10: 1855-1871.

- Hosford, D., D. Pilz, R. Morina, and M. Amaranthus. 1997. Ecology and Management of the Commercially Harvested American matsutake Mushroom. Gen. Tech. Rep. PNW-GT R-412. Portland, OR: USDA Forest Servies, Pacific Northwest Research Station. 68p.
- Hur, T. C., K. H. Ka, S. H. Joo and T. Terashita. 2001. Characteristics of the amylase and its related enzymes produced by ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. *Mycology* 29(4): 183-189.
- Imberger K. T. and Chiu, C. Y. 2001. Spatial changes of soil fungal and bacterial biomass from a sub-alpine coniferous forest to grassland in a humid, sub-tropical region. *Biology & Fertility of Soils* 33 : 105-110.
- Inaba, K., Yoshida, T., Takano, Y., Mayuzumi, Y., Mitsunaga, T. and Koshijima, T. 1995. An instance of the fruiting-body formation of *Tricholoma matsutake*. *Environ. Control in Biol.* 33(1): 59-64.
- Irie, T., Sato, T. Saito, K. Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M., and Enei, H. 2003. Construction of a Homologous Selectable Marker Gene for *Lentinula edodes* Transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(9): 2006-2009.
- Ito, T. 2000. Matsutake Pp. 9-21. In: *Mushroom Handbook*. Eds K. Kinugawa and M. Ogawa. Japan.
- Kaldorf M, Renker C, Fladung M, Buscot F, 2004. Characterization and spatial distribution of ectomycorrhizas colonizing aspen clones released in an experimental field. *Mycorrhiza* 14: 295-306.
- Kärén O, Högberg N, Dahlberg A, Jonsson L, Nylund JE, 199. Inter and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* 136: 313-325.
- Kawagoe, M, K. Kawakami, Y. Nakamura, K. Naoe, K. Miki, and H. Noda. 1999. Submerged culture of *Tricholoma matsutake* mycelium in bubble column fermentors. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 87(1) : 116-118.
- Kawai, M. and M. Ogawa. 1981. Some approaches to the cultivation of a

- mycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. Mushroom Science XI: 869-883.
- Kazuyuki, M. 1992. Growth of pine saplings to be infected by *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. Bulletin of the Hiroshima Prefectural Forestry Experiment Station No. 26: 45-61.
- Koo, C. D. and Bilek, E. M. 1998. Financial analysis of vegetation control for sustainable production of Songyi (*Tricholoma matsutake*) in Korea. Journal of Korea Forest Society. 87 : 519-527.
- Kranabetter, J. M., R. Trowbridge, A. Macadam, D. McLennan and J. Friesen. 2002. Ecological descriptions of pine mushroom (*Tricholoma magnivelare*) habitat and estimates of its extent in northwestern British Columbia. Forest Ecology and Management 158: 249-261.
- Kulkarni, R. 1991. DNA Polymorphisms in *Lentinula edodes*, the Shitake Mushroom. Applied & Environ. Microbiology. 57(6): 1735-1739.
- Landeweert R, Leeflang PO, Kuypers TW, Hoffland E, Rosling A, Wernars K, Smit E, 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. Applied and Environmental Microbiology 69: 327-333.
- Lee, C. Y., Hong, O. P., Jung, M. J. and Han, Y. H. 1997. Effect of carbon sources and vitamins on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. The Korean Journal of Mycology. 25(3) : 226-232.
- Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pp. 282-287. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Eds. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic press. Sandiego.
- Li, J. H. and S. C. Kang. 1992. Forest management for increasing the yield of *Tricholoma matsutake* Sing. pp. 30-40. In: Development of mushroom cultivation technology and its utilization. Proceedings of National Mushroom Symposium. Pyongyang, Korea.
- Maki, C. S., Teixeira, F. F., Paiva, and E. Paccola-Meirelles, L. D. 2001. Analysis of genetic variability in *Lentinula edodes* through mycelia responses to different abiotic conditions and RAPD molecular markers.



- brazillian J. of microbiology. 32: 170-175.
- Miller, G. L. 1959. use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3) : 426-428.
- Min, E. G., K. K. Chung, and Y. H. Han. 1988. Effect of complex nitrogen source on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. *The Korean Journal of Mycology*. 26(3): 361-364.
- Moore, R., Clark, W.D. and Stern, K.R. 1995. *Botany*. Wm. C. Brown Publishers. London. pp. 336-342.
- Mottonen, M., Jarvinen, E., Hokkanen, T. J., Kuuluvainen, T. and Ohtonen, R. 1998. Spatial distribution of soil ergosterol in organic layer of a mature Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) forest. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 503-516.
- Noble, R., Rama, T., Dobrovin-Pennington, A. 2000. Continuous measurement of casing soil and compost water availability in relation to mushroom yield and quality. *15th Science and Cultivation of Edible Fungi*. pp. 433-440.
- Ogawa, M. 1975. Microbial ecology of mycorrhizal fungus-*Tricholoma matsutake*(Ito et imai) Sing. in pine forest I. Fungal colony(Shiro) of *Tricholoma matsutake*. *Bull. Gov. For. Exp. Sta.* 272 : 79-121.
- Ogawa, M., Umehara, T., Kontani, S. and Yamaji, K. 1978. Cultivating method of the mycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. (I) Growing method of the pine saplings infected with *T. matsutake* in the field. *J. Jap. For. Soc.* 60: 119-128.
- Ohta, A. 1986. Basidiospore germination of *Tricholoma matsutake* (I). Effects of organic acids on swelling and germination of the basidiospores. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 27: 167-173.
- Ohta, A. 1990. A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 31 : 323-334.
- Paek K. Y., Hahn, E. J. and Son, S. H. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 149-157.
- Paolocci F, Angelini P, Cristofari E, Granetti B, Arcioni S, 1995. Identification

- of Tuber spp. and corresponding ectomycorrhizae through molecular markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69: 511-517.
- Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Arcioni S, 1999. Rapid molecular approach for a reliable identification of Tuber spp. Ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 23-30.
- Satomura, T., Nakatsubo, T. and Horikoshi, T. 2003. Estimation of the biomass of fine roots and mycorrhizal fungi: a case study in a Japanese red pine (*Pinus densiflora*) stand. *J. For. Res.* 8:221-225.
- Shinya, E. 1990. Cultivation of the pine seedlings infected with *Tricholoma matsutake* by use of in vitro mycorrhizal synthesis. *Bulletin of the Hiroshima Prefectural Forestry Experiment Station No. 24*: 1-6.
- Son, S. H. and Lee, Y. H. 1997. Balloon type air-lift bioreactor for plant cell culture. Korea Patent Submission No. 357510.
- Suzuki, K. 2005. Ectomycorrhizal ecophysiology and the puzzle of *Tricholoma matsutake*. *J. Jpn. For. Soc.* 87:90-102.
- Vaario, L. M., A. Guerin-Laguette, W. M. Gill, F. Lapeyrie, and K. Suzuki. 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.
- Vaario, L.-M., Guerin-Laguette, A., Matsushita, N., Suzuki, K. and Lapeyrie, F. 2002. Saprobic potential of *Tricholoma matsutake*: growth over pine bark treated with surfactants. *Mycorrhiza* 12 : 1-5.
- Wang, Y. and I. R. Hall. 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can. J. Bot.* 82: 1603-1073.
- Wang, Y., Hall, I. R. and Evans, L. A. 1997. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies, 1. *Tricholoma matsutake* and related. *Economic Botany* 51(3) : 311-327.
- 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.
- Weete, J. D. and Gandhi, S. R. 1996. Biochemistry and molecular biology of

- fungal sterol. pp. 421-438. *In*: Esser, K. and Lemke, P. A. Eds. *The Mycota*. Springer, B31. Yamada, A., Kanekawa, S. and Ohmasa, M. 1999. Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* on *Pinus densiflora*. *Mycoscience* 40 : 193-198.
- Wessels, J.G.H. 1994. Development of fruit bodies in homobasidiomycetes. *In* *The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality*. edited by J.G.H Wessels and F. Meinhardt. pp. 351-366.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: A Guid to MMethods and Applications*. Academic press, San Diego, pp. 315-322.
- Wu, B., Nara, K. and Hogetsu, T. 1999. Competition between ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza* 9:151-159.
- Yamada, A., K. Maeda, and M. Ohmasa. 1999. Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* in vitro. *Mycoscience* 40: 455-463.
- Yamada, A., S. Kanekawa and M. Ohmasa. 1999a. Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* on *Pinus densiflora*. *Mycoscience* 40:193-198.
- 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.
- Yamada, A., T. Ogura and M. Ohmasa. 2001. Cultivation of some Japanese edible ectomycorrhizal mushrooms. *Edible Mycorrhizal Mushrooms and Their Cultivation*. Proceedings of the second international conference on edible mycorrhizal mushrooms, 3-6 July.
- Zeng, D. F., X. C. Luo, and W. J. Fu. 2001. Studies on the isolation and DNA identification of isolates of *Tricholoma matsutake*. Proceedings of the Fifth Korea-China Joint Symposium for Mycology pp. 1-10.
- Zhang, Y. and Francis I. M. 1995. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. *FEMS Microbiology letters* 131: 17-20.
- 今關六也, 大谷吉雄, 本郷次雄. 1998. 日本のきのこ. 山と溪谷社. 東京. pp. 624.

- 潭偉. 1994. 松口蘑栽培理論及方法. 食用菌學報 1(1): 53-63.
- 富永保人. 1967. 氣象とマツタケ発生量との関係について. 廣島農短大研究報告 1-11p.
- 小川 眞, 梅原武夫, 紺谷修治, 山路木曾男. 1978. マツタケ菌の増殖法 (I). マツタケ感染苗の育成法. 日林誌. 60(4): 119-128.
- 小川 眞, 伊藤 武. 1989. マツタケは栽培できるか. 林業改良普及双書 102. 全国林業改良普及協會.
- 小川眞. 1991. マツタケの生物学. 築地書館. 東京. pp. 333.
- 小川眞. 1992. 生態. 古川久彦 編集, きのご學. pp 116-140. 共立出版株式會社. 東京.
- 伊藤 武, 岩瀬 剛二. 1997. マツタケ 果樹園感覚で殖やす育てる. 農山漁村文化協會.
- 伊藤 武. 2000. マツタケ. pp. 9-21. In: きのごハンドブック. 衣川堅二郎, 小川 眞 編集. 朝倉書店.
- 伊藤武, 岩瀬剛二, 1997. マツタケ. 果樹園感覚で 殖やす 育てる. 新特産シリーズ. 農文協 181pp.
- 日本 京都府 林業試験場. 1982. マツタケ. 試験研究シリーズ. No 6. 26pp.
- 鳥越 茂. 1998. 菌根菌栽培-林地から施設まで-: マツタケとその他菌根菌の林地栽培の歩み. 日菌報 39: 113-116.
- 横山 了爾, 山田 卓三. 1987. マツタケ菌とマツの器内培養. 日菌報 28: 331-338.
- マツタケ研究懇話會. 1983. マツタケ山のつくり方. 柱式會社 創文.
- 枯木熊人. 1980. ポットを利用したマツタケ菌感染苗の育成 (I). 廣島縣立林業試験場研究報告 第15号: 49-64.
- 浜田 稔, 小原 弘之. 1984. マツタケ -人工増殖の試み-. 農山漁村文化協會. pp. 142.
- マツタケ研究懇話會. 1983. マツタケ山のつくり方. 柱式會社 創文. pp. 163.
- 小川 眞, 梅原武夫, 紺谷修治, 山路木曾男. 1978. マツタケ菌の増殖法 (I) マツタケ感染苗の育成法. 日林誌 60: 119-128.
- 小川 眞, 伊藤 武. 1989. マツタケは栽培できるか. 林業改良普及双書 102. 全国林業改良普及協會. pp. 181.
- 鳥越 茂. 1998. 菌根菌栽培-林地から施設まで-: マツタケとその他菌根菌の林地栽培の歩み. 日菌報 39: 113-116.
- 富永保人. 1978. マツタケ栽培の實際. 養賢堂. pp. 171.