

최 종  
연구보고서

산불지역의 침엽수고사에 관여하는  
리지나뿌리썩음병의 효과적인 방제기술  
개발

Development of the effective control  
method on Rhizina root rot associated  
with death of conifers in forest fire sites

연구기관

국립산림과학원

(강원도 산림개발연구원, 강원대학교)

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “산불지역의 침엽수고사에 관여하는 리지나뿌리썩음병의 효과적인 방제기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 9월 일

주관연구기관명 : 국립산림과학원  
총괄연구책임자 : 김 경 희  
세부연구책임자 : 김 경 희  
연 구 원 : 이 승 규  
연 구 원 : 이 상 현  
연 구 원 : 이 재 필  
연 구 원 : 박 주 용  
협동연구기관명 : 강원도 산림개발연구원  
협동연구책임자 : 이 성 재  
연 구 원 : 성 길 용  
연 구 원 : 김 종 원  
연 구 원 : 전 두 식  
연 구 원 : 심 주 석  
연 구 원 : 이 종 규  
협동연구기관명 : 강원대학교  
협동연구책임자 : 이 상 용  
연 구 원 : 정 주 해  
연 구 원 : 방 주 희

# 요 약 문

## I. 제 목

산불지역의 침엽수고사에 관여하는 리지나뿌리썩음병의 효과적인 방제기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

'96년 고성에서 발생한 대형산불에 이어 2000년에는 강원도 동해안 일대 약 24,000 ha에 이르는 산림에 산불이 발생하여 엄청난 피해를 입혔다. 특히 이 지역은 소나무를 포함하는 침엽수가 상당부분을 차지하고 있고 산불이 발생한 소나무 임지 중 상당부분은 송이발생임지로써 년 21.6톤의 송이생산으로 이 지역 농가소득의 큰 비중을 차지하였으며 지역 경제에도 크게 이바지하고 있다. 이 지역의 주민정서와 송이 생육환경 복원을 감안하여 약 4,000 ha 정도의 면적에 송이복원을 위하여 소나무 종자 파종 및 용기묘 조립을 실시할 계획이다.

그러나, 2000년 산불발생 직후 소나무임지에는 리지나뿌리썩음병을 일으키는 과상 땅해파리버섯이 대규모로 발생하여 현재 생존하고 있는 나무 뿐 만 아니라 다른 지역으로부터 이식한 소나무 묘목이 이 병에 의해 치명적인 피해를 입고 고사하는 현상이 확인되어 (2000. 11. 4.에 개최된 한국균학회 2000년 추계 학술발표회에서 강원대와 임업연구원이 공동발표), 단계적으로 조립할 소나무 묘목에 큰 피해를 입힐 것으로 예상되었다.

따라서 이 연구과제의 목표는 산불발생 임지에서 대규모로 발생하여 생존목 뿐만 아니라 조립을 위하여 새로 이식하는 소나무 묘목을 고사시키는 리지나뿌리썩음병의 발병생태 및 소나무-균근의 공생관계에 미치는 영향, 리지나뿌리썩음병균의 생리, 유전학적 특성규명 등의 규명과 아울러 리지나뿌리썩음병을 효과적으로 방제할 수 있는 기술을 개발하여 피해를 최소화시킬 수 있는 방안을 제시하는 것이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 리지나뿌리썩음병균의 생리 및 유전학적 특성 규명
  - 가. 리지나뿌리썩음병균의 생리적 특성 규명
    - 균주 분리
    - 균사 생장 특성
    - 자낭포자의 발아 특성
  - 나. 리지나뿌리썩음병균의 기주범위 및 기주특이성 규명
    - 수목 추출물 배지에서의 균사 생장 특성
    - 각 수목 가지에서의 균사 생장 특성
    - 은수원사시나무 추출물이 리지나뿌리썩음병균 균사 생장에 미치는 영향
  - 다. 리지나뿌리썩음병균 분리주의 유전적 다양성 규명
    - Total DNA의 추출 및 PCR 조건
    - RAPD 분석
    - phylogenetic tree 분석법에 의한 유전적 다양성 해석
  
2. 리지나뿌리썩음병의 발병생태와 소나무와의 관계
  - 가. 산불발생 정도별 리지나뿌리썩음병 발생조사
  - 나. 송이복원 조림지에서 조림 묘목의 고사율 및 생장 조사
  - 다. 리지나뿌리썩음병균의 병원성 검정
  - 라. 소나무 용기묘 균근형성 조사
  - 마. 소나무 균근균과 리지나뿌리썩음병균과의 상호관계
  
3. 리지나뿌리썩음병의 효과적인 방제기술 개발
  - 가. 토양개선에 의한 병발생억제 효과 규명
    - 목초액 사용농도
    - 자실체 발생량 조사 및 분석
    - 토양개량제 처리에 의한 토양미생물 밀도 및 변동
    - 우점미생물 조사
  - 나. 생물적 방제기술 개발
    - 1) 길항미생물 방제효과 조사
      - 병발생지 및 산불지역에서 길항미생물 선발, 방제효과 조사
    - 2) 은수원사시나무 칩의 방제효과 조사

다. 서해안 해안림 병발생진전조사

- 고사목 및 리지나자실체 발생조사로 병발생진전사항 조사
- 산악산불지 및 해안림 병발생지의 토양미생물 비교분석

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 리지나뿌리썩음병균의 생리 및 유전학적 특성 규명

###### 가) 리지나뿌리썩음병균의 생리적 특성

각 지역별 및 기주별로 분리한 11종의 분리주를 공시하여 균사 생장 특성을 조사한 결과, 각 분리주간의 균사 생장 활성에는 다소간의 차이는 있었으나, 11종의 분리주 대부분이 최적 생장 온도는 30℃, pH는 4~5 및 최적 균사 생장 배지는 PDA 이었다. 자낭포자는 40~70℃의 열처리에 의하여 발아하였으며, 50℃에서 12시간 이상의 열처리는 자낭포자 발아를 억제시켰으나, 40℃에서는 30시간의 열처리에서도 자낭포자 발아율이 지속적으로 증가하였다. 또한, 자낭포자는 4℃에서 30일간 저장하였을 때에도 발아력을 유지하고 있었다. 이 실험의 결과로 지중 온도에 의한 리지나뿌리썩음병의 발병 환경을 예측할 수 있을 것이다.

###### 나) 리지나뿌리썩음병균의 기주범위 및 기주 특이성 규명

16수종의 수용성 추출물 배지 및 가지와 뿌리에서의 리지나뿌리썩음병균 균사 생장 특성을 조사하였다. 그 결과, 전반적으로 활엽수 보다 침엽수에서 균사 생장이 양호하였다. 한편, 은수원사시나무의 수용성 추출물 배지 및 가지와 뿌리에서의 리지나뿌리썩음병균 균사 생장이 억제되어 항균성 물질이 있음을 시사하여 주었는데, 이는 시판되고 있는 살균제보다 우수한 리지나뿌리썩음병균 균사 생장 억제 효과를 나타내었다. 이 실험의 결과로 리지나뿌리썩음병의 기주범위를 추정할 수 있었으며, 은수원사시나무의 항균성 물질의 이용 가능성을 제시하여 주었다.

###### 다) 리지나뿌리썩음병균 분리주의 유전적 다양성 분석

각 지역별 및 기주별로 분리한 14종의 분리주를 공시하여 유전적 유연관계를 분석하였다. Operon 10-mer Kit B (Operon Tech.) 중 12종의 primer를 사용하여 RAPD 분석 및 이를 기초로한 phylogenetic tree 분석을 실시한 결과, 국내 분리주들은 100%의 상동성을 나타내었으며, 국내분리주들과 일본분리주인 PTJ-1과는 88% 및 PTJ-2와는 83%의 상동성을 나타내었다. 이 실험의 결과로 국내의 리지나뿌리썩음병균 분리주는 일본으로부터 유입되었으며, 현재까지는 동일한 유전형질을 갖고 있는 것으로 추정된다.

## 2. 리지나뿌리썩음병의 발병생태와 소나무와 송이균과의 관계

### 가) 산불발생정도별(심, 중, 경) 리지나뿌리썩음병 발생조사

산불피해 정도별(심-수관화, 중-수간화, 경-지표화) 리지나뿌리썩음병균의 자실체 발생빈도는 산불피해 정도와 상관관계가 있는 것으로 조사되었다.

### 나) 송이복원조림지에서 조림묘목의 고사율 및 성장조사

리지나뿌리썩음병균이 만연한 시기(산화 6개월후)에 이식한 용기묘의 고사율은 자실체가 거의 소멸된 시기(산화 15개월후)에 이식한 경우보다 고사율이 3-4배 높게 나타났으며 용기묘의 근원경, 수고, 가지 발달 정도도 저조하였다. 또한 용기묘와 실생묘를 산불발생 2개월 후에 이식하고 2개월후에 다시 고사율을 비교한 결과, 용기묘에 비하여 실생묘의 고사율이 엄청나게 높게 나타나 용기묘가 리지나뿌리썩음병에 저항성을 나타내는 것으로 추측되며 이는 뿌리에 밀집되어 형성된 외생균근에 기인한 것으로 생각되고 산불지역의 소나무조림에는 용기묘가 훨씬 유리한 것으로 판단된다.

### 다) 리지나뿌리썩음병균의 병원성 검정

병원균에 대한 균근균의 병저항성을 확인하기 위하여 소나무 무균묘에 리지나뿌리썩음병균을 균근균과 동시 또는 균근균을 먼저 접종한 처리에서는 묘목의 고사가 일어나지 않은데 비하여 병원균을 먼저 접종한 경우에는 약 18%의 묘목고사율을 나타내어 균근균이 뿌리병해 저항성에 관여한다는 것이 증명되었다.

### 라) 소나무 용기묘 균근형성 조사

송이복원조림용 소나무 용기묘의 뿌리에 형성된 외생균근 형성유무를 시기별로 확인한 결과, 파종 170일경에는 강릉과 홍천지역 용기묘는 각각 88.3%와 83.3%를 나타낸 반면, 삼척지역의 용기묘는 68.3%의 균근형성율을 나타내었다. 그러나 215일경이 지난 시점에는 3개 지역 모두 약 98%의 균근형성율을 나타내었다. 균근균의 접종은 토양의 멸균, 비멸균에 상관없이 묘목의 균근형성을 증가시켰으며 베노밀과 목초액의 관주처리시 베노밀의 처리시에 균근형성이 증가되었으나 처리농도 및 빈도가 중요한 요인으로 생각되며 목초액 처리시 무처리시보다 균근형성 저조하였다.

마) 소나무 균근균과 리지나뿌리썩음병균과의 상호관계

균근균 3종(자갈버섯, 모래발버섯, 황소비단그물버섯)을 액체배양하여 배양여액을 1,2,3개월 간격으로 수확하여 배지에 첨가하고 뿌리병원균의 생장을 확인한 결과, 자갈버섯이 뿌리병원균의 균사생장 억제효과가 있었으며 배양기간이 길수록 억제효과가 강하였다. 균근균의 대사물질을 첨가한 배지에서 리지나뿌리썩음병균의 균사생장이 최대 76%까지 억제되었다.

3. 리지나뿌리썩음병의 효과적인 방제기술 개발

가) 토양개선에 의한 병발생억제 효과구명

토양개량제 사용에 의한 병발생 억제효과를 구명하기 위하여 병원균의 자실체 발생량, 토양미생물의 밀도 및 토성변화 등으로 종합적으로 분석하였다. 병원균의 자실체 발생량은 조사구에 따라 토양개량제 사용으로 낮은 발생밀도를 나타내거나, 큰 차이를 나타내지 않아 상층을 차지하고 있는 소나무밀도, 하층식생의 피복도에 의한 토양건조가 자실체 발생에 크게 영향을 주는 것으로 판단되었다.

토양개량제 처리에 따른 토양미생물상에 대한 조사결과, 미생물의 밀도에는 전체적으로 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았으나 방선균의 colony 중에서 S1이 가장 높은 우점율을 나타내었다. 아울러 S3는 시간경과에 따라 밀도가 높은 지역에서는 낮은 밀도로, 밀도가 낮은 지역에서는 높은 밀도로 변화하여 전체적으로 토양미생물상이 점차 안정화되는 경향을 나타내었다. 토성과 토양산도 등 리지나뿌리썩음병의 발생환경 요인에 대한 목초액처리효과실험에서 단 1회의 처리로는 뚜렷한 효과를 얻을 수는 없었으나 목초액 처리가 토양의 화학적인 변화에 크게 기여하고 있는 것으로 밝혀져 앞으로 이에 대한 장기적인 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

산불발생당년에 대부분의 소나무림에 다량으로 발생한 과상땅해과리버섯의 자실체는 1년 후에 급격히 감소하였다. 이는 산불발생후 단순해진 토양미생물상에서 우점균으로 대발생한 병원균이 시간이 경과함에 따라 회복된 다른 토양미생물에 의하여 활력을 상실하기 때문인 것으로 판단되었다.

나) 생물학적 방제기술 개발

최우수 길항미생물로 선발된 방선균, Ta22의 포자현탁액을  $53.2 \times 10^6$  cfu/ml 밀도로 토양처리 후 자실체 발생량을 조사하였다. 처리에 따른 자실체 발생량에 유의성이 인정되지 않았으나, 처리전 1.5%의 낮은 분리율을 보였던 Ta22는 토양처리 2개월 후에도 24%의 높은 비율로 분리되어 이 균이 토양내에서 지속적으로 생존가능할 것으로 판단되었다. 앞으로 본 연구에서 분리된 Ta22균주를 이용한 리지나뿌리썩음병의 생물학적 방제연구가 지속적으로 필요할 것으로 사료되었다.

다) 서해안 해안립 병발생 진전조사

2001년 피해가 처음 발생한 서해안 태안 달산리지역의 곰솔 해안사구립에 대한 3년간에 걸친 조사에서 피해는 1) 주로 수목의 생육기인 봄~여름에 급증하였으며, 2) 최초 발생지로부터 불규칙한 동심원상의 군상고사형태를 나타내면서 외곽으로 확산되는 것으로 밝혀졌다. 또한 과상땅해파리버섯의 자실체는 고사목의 외곽지역에 집중적으로 발생하고 있었으나 7월 하순에 발생하지 않는 경우도 있어 봄부터 가을에 걸쳐 상세한 자실체 발생조사가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 본 조사에서는 고사목은 3년간 최대 반경 20m이상 확산되었고 그 외곽에 병원균의 자실체가 분포하고 있어 서해안의 해안 모래땅에서는 년 7m이상의 군사생장이 가능한 것으로 밝혀졌다. 이러한 조사결과는 앞으로 해안립의 효과적인 방제를 위한 방제구역 설정에 유용한 기초자료가 될 것으로 판단되었다.

산악산불지역의 토양미생물 밀도는 태안 병발생지에 비하여 밀도가 높았고, 태안 해안립에서는 병의 회복과 아울러 토양미생물 밀도도 증가하였다. 한편 방선균류의 밀도를 비교한 결과 산악산불지역에서는 S1, S2가 우점균이었으나, 해안립에서는 S1, S3가 우점균으로 밝혀져 S2는 산악산불지역에서만 분포하고 있는 균으로 판단되었다. 기내실험에서 *R. undulata*에 대한 길항성이 우수한 균주로 밝혀진 S3는 산악산불지역에서는 아주 낮은 밀도로 검출되었으나 태안 병발생지에서는 S1 다음으로 밀도가 높은 경향을 보여주었다. 앞으로 이들 방선균류가 본 병원균에 미치는 직·간접적인 영향 등에 대한 연구를 통하여 산악산불지역에 있어서 병원균의 빠른 소멸에 대한 분리 균주들의 직간접적인 역할에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.



# SUMMARY

## (영문요약문)

### 1. Physiological and genetical characteristics of *Rhizina undulata*

#### 1) Physiological characteristics of *R. undulata*

Characteristics of the mycelial growth of *R. undulata* isolates isolated from various diseased sites and host were examined. Optimum temperature, pH and medium of *R. undulata* isolates were 30 °C, 4~5 and PDA medium, with some differences of growth activity among the isolates. Ascospore of *R. undulata* was germinated by heat shock at 40 ~ 70 °C. Heat shock above 12 hours at 50°C was inactivated the germination of ascospores. On the other hand, heat shock for 30 hours at 40°C increased the germination of ascospores than heat shock for 12 hours at 40°C. Ascospores of *R. undulata* were maintained their germination activity above 30 days at 4°C. From these results, outbreak of rhizina root rot disease could be forecast by soil temperature.

#### 2) Host rang and host specificity of *R. undulata*

Mycelial growth of *R. undulata* on water-soluble media, twigs and root from 16 tree species were characterized. Mycelial growth was much better on water-soluble media extracted from conifers than from hardwoods, as a whole. Mycelial growth of *R. undulata* was completely inhibited on water-soluble extract media from *Populus tomentiglandulosa*. In twig and root segment test, *R. undulata* did not grow well on *P. tomentiglandulosa*. It suggests that *P. tomentiglandulosa* has anti-fungal materials. Inhibitory effects on mycelial growth of *R. undulata* by the water-soluble extract from *P. tomentiglandulosa* were more effective than those by commercial anti-fungal chemicals. These results can be used to study the host range and control of *R. undulata*.

#### 3) Genetic diversity of *R.undulata* isolates

Genetic diversity of *R.undulata* isolates isolated from various sites and hosts was investigated. Phylogenetic tree of the isolates was analysed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) using Operon 10-mer Kit B primer (Operon Tech.). Genetic homology among 12 Korean isolates of *R.undulata* was 100%. Genetic homology of Korean isolates with Japanese isolate PTJ-1 and PTJ-2 was

88% and 83%, respectively. From these results, it is presumed that Korean isolates of *R.undulata* was derived from Japan, and have a same genetic characteristics, up to now.

2. Ecological studies on disease occurrence of Rhizina root rot in fire-burned pine forests, and relationships of the disease with transplanted pine seedlings and root symbionts.

1) Disease survey of Rhizina root rot by the degree of damage by fire.

Frequency of fruiting body development of *Rhizina undulata* was positively correlated with the degree of fire damage.

2) Mortality and growth of transplanted pine seedlings in restoration of mycorrhizal association with *Tricholoma matsutake* in fire-burned pine forests.

Mortality of seedlings transplanted 6 months after fire was 3-4 times higher than that of seedlings transplanted 15 months after fire, and diameter at root crown, seedling height, and branch development were also poor.

Comparison in seedling mortality of natural and containerized pine seedlings transplanted 2 months after fire showed higher mortality of natural seedlings than containerized seedlings. It means that containerized seedlings are relatively resistant to Rhizina root rot and the resistance is due to dense formation of mycorrhizae on the seedling roots.

3) Pathogenicity test of *Rhizina undulata*.

To confirm the antifungal activity of mycorrhizal fungi against root pathogenic fungi, *Rhizina undulata* was inoculated before, simultaneously, and after treatment of mycorrhizal fungi. Pre-inoculation of *R. undulata* caused death of inoculated seedlings with the mortality of 18%, while simultaneous and post-inoculation of *R. undulata* caused no death of seedlings, indicating that mycorrhizal fungi play a role in the protection of seedlings from the infection by the pathogen.

4) Mycorrhizal formation in the roots of containerized pine seedlings.

Mycorrhizal formation on the root of containerized pine seedlings grown in Gangnung, Hongcheon and Samcheok were monitored until 215 days after seeding.

Mycorrhizal formation rate of pine seedlings from 3 locations was increased upto 98% at 215 days after seeding.

Artificial inoculation of mycorrhizal fungi into the pot soil increased mycorrhizal formation of pine seedlings regardless of soil sterilization. Trenching of benomyl increased mycorrhizal formation, but wood vinegar decreased mycorrhizal formation. Mycorrhizal formation rate depended on the concentration and frequency of benomyl treatment.

5) Interactions between *Rhizina undulata* and mycorrhizal fungi.

Culture filtrates of 3 mycorrhizal fungi (*Hebeloma cylindrosporum*, *Pisolithus tinctorius*, and *Suillus bovinus*) from liquid culture supplemented in culture media showed that *H. cylindrosporum* have a strong antifungal activity against *R. undulata*. In addition, inhibiting activity was more stronger as culture period is longer.

The maximum inhibition of mycelial growth was 76% on culture media supplemented with culture filtrates from 3 months culturing *H. cylindrosporum*.

### 3. Development of the effective control method for *Rhizina* root rot

1) Effect of soil amendments for the suppression of disease occurrence

In order to investigate the disease suppression effect by the treatment of soil improvements, total occurrence of fruit bodies of *R. undulata*, flora of soil microorganisms and their density, and soil texture were analysed at the diseased forests. As results, there was no significant relationship between the occurrence of *R. undulata* fruit bodies and the soil improvements. It was supposed that occurrence of fruiting bodies of *R. undulata* was related with the density of pine trees and the level of soil dryness, which were dependant on the coverage ratio of the herb vegetation occupying the diseased forest floor.

Changes of flora of soil microorganisms and of their density by the treatment of soil improvements were not confirmed. However, S1 isolate (Sokcho-1) among the colonies of actinomycetes showed the dominance in its density compared to other isolates, but S3 (Sokcho-3) showed the stabilization trend in its density with the passing of time. There was not marked differences in the soil texture and the

soil pH according to the treatment of soil improvements, but it was supposed that treatment of wood vinegar could change the chemical characteristics of soil and give an some effect on the disease development.

Fruit bodies of *R. undulata*, massively occupied forest soil as a dominant microorganism at the mountainous fire-burned pine forest stands just after the forest fire occurred were rapidly decreased in their numbers after one year of fire-burning. It was suggested that the decrease in the population of *R. undulata* at the fire-burned forest soils came from the recovering of many other soil-microbes, which caused loss of viability of *R. undulata* in the soil microbial system.

## 2) Selection of useful antagonistic microorganisms for the bio-control

There was no significant relationship between the occurrence of fruit bodies of *R. undulata* and the treatment of an antagonistic actinomyces of Ta 22 as  $5.32 \times 10^7$  cfu/ml. Isolation ratio of a actinomyces Ta 22 was surveyed to be only 1.5% in soil before treatment, but the density of Ta22 isolate was rapidly increased at 24% two months after treatment. The results showed that Ta 22 could be alive for a long time in soil and be used as an efficient antagonistic microorganism to control Rhizina root rot disease.

## 3) Survey on the disease spreading at the seashores in the Western coast in Korea

First damage at the black pine (*Pinus thunbergii*) seashore forests of Taean located in the Western coast of Korea was occurred in 2001 and spreaded outwards in an irregular asymmetric circles year by year during the growing seasons. Fruit bodies of *R. undulata* were confirmed to be mainly distributed at the outer regions which new dead trees were occurred. Therefore it was suggested that field survey on the fruit bodies must be conducted during the growing seasons from spring to summer because fruit bodies sometimes did not occur since the late July. The survey results on disease development pattern showed that dead trees had been spreading in asymmetric circles with a radius of above 20m outwards from the first damaged areas for three years. Conclusionally the pathogen could move above seven meter outward per one year in soil. This data would be very useful in deciding the proper control range for the effective control of the disease.

Density of soil microorganisms at the mountainous forest areas were higher than those of the diseased seashores at Taeon, in which their density increased with the decrease of the disease. The comparative study on the densities of Actinomycetes among the microorganisms showed that isolates of S1 and S2 were dominant in the fire-burned mountainous forest areas, but isolates of S3 and S4 were dominant in the seashores of Taeon. Therefore it was concluded that S2 isolate is a actinomyces distributed only at the mountainous forest areas. Further examination on these actinomyces must be done for the verification of direct and/or indirect roles of these actinomyces in relation with the rapid extinction of the pathogen at the fire-burned mountainous forest areas.

# CONTENTS

Chapter 1. Overview of Research Project .....	18
Chapter 2. Present Status of Technology Development in Domestic and Foreign Countries .....	20
Chapter 3. Research Methodology and Results	
Project I. Physiological and genetical characteristics of <i>Rhizina undulata</i> .....	21
1. Introduction .....	21
2. Materials and methods .....	22
3. Results and Discussion .....	26
1) Symptoms and signs on pine trees infected with <i>Rhizina undulata</i> .....	26
2) Effects of temperature, pH and media composition on mycelial growth of <i>R. undulata</i> .....	27
3) Effects of temperature on ascospore germination of <i>R. undulata</i> .....	32
4) Characteristics of mycelial growth of <i>R. undulata</i> on water-soluble extracts media from 16 tree species .....	35
5) Characteristics of mycelial growth of <i>R. undulata</i> on twigs from 16 tree species .....	37
6) Effects of water-soluble extracts from <i>Populus tomentiglandulosa</i> on mycelial growth of <i>R. undulata</i> .....	40
7) Total DNA extraction and PCR conditions of <i>R. undulata</i> .....	43
8) Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) analysis of total DNA from 14 <i>R. undulata</i> isolates .....	46
9) Phylogenetic tree analysis of 14 <i>R. undulata</i> isolates .....	48

Project II. Ecological studies on disease occurrence of Rhizina root rot in fire-burned pine forests, and relationships of the disease with transplanted pine seedlings and root symbionts .....	50
1. Materials and methods .....	50
1) Disease survey of Rhizina root rot by the degree(severe, moderate and light) of damage by fire. ....	50
2) Mortality and growth of transplanted pine seedlings in restoration of mycorrhizal association with <i>Tricholoma matsutake</i> in fire-burned pine forests. ....	50
3) Pathogenicity test of <i>Rhizina undulata</i> . ....	51
4) Mycorrhizal formation in the roots of containerized pine seedlings. ....	51
5) Interactions between <i>Rhizina undulata</i> and mycorrhizal fungi. ....	52
2. Results and Discussion .....	54
1) Disease survey of Rhizina root rot by the degree(severe, moderate and light) of damage by fire. ....	54
2) Mortality and growth of transplanted pine seedlings in restoration of mycorrhizal association with <i>Tricholoma matsutake</i> in fire-burned pine forests. ....	56
3) Pathogenicity test of <i>Rhizina undulata</i> . ....	61
4) Mycorrhizal formation in the roots of containerized pine seedlings. ....	65
5) Interactions between <i>Rhizina undulata</i> and mycorrhizal fungi. ....	68
Project III. Development of the effective control method for Rhizina root rot ...	74
1. Materials and Methods .....	74
1) Effect of soil improvements for the suppression of disease development ...	74
2) Development of bio-control methods .....	75
• Control effect by antagonistic microorganisms	
• Control effect by poplar wood chip ( <i>Populus alba</i> x <i>Populus glandulosa</i> )	
3) Survey on the disease spreading at the seashores located in the Western coast region of Korea .....	75
4) Comparative analysis of soil microorganisms between the diseased seashores and the mountainous fire-burned forests .....	75

2. Results and Discussion .....	76
1) Effect of soil improvements for the suppression of disease development ...	76
2) Development of bio-control methods .....	90
· Control effect by antagonistic microorganisms	
· Control effect by poplar wood chip ( <i>Populus alba</i> x <i>Populus glandulosa</i> )	
3) Survey on the disease spreading at the seashores located in the Western coast region of Korea .....	95
4) Comparative analysis of soil microorganisms between the diseased seashores and the mountainous fire-burned forests .....	100
 Chapter 4. Achievement and Contribution to the Related Areas .....	 102
Chapter 5. Application Plan of Acquired Results .....	105
Chapter 6. References .....	106



# 목 차

제 1장 연구개발과제의 개요 .....	18
제 2장 국내외 기술개발 현황 .....	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	21
제 1 절. 리지나뿌리썩음병균의 생리 및 유전적 특성 .....	21
1. 서론 .....	21
2. 재료 및 방법 .....	22
가. 공시 균주 .....	22
나. 균사 배양 .....	23
다. 자낭포자의 열처리 .....	23
라. 수목의 수용성 추출물배지 제조 .....	24
마. 접종용 가지 제조 .....	24
바. 은사시나무 추출물의 제조 .....	24
사. <i>R. undulata</i> total DNA의 추출 .....	25
아. PCR 및 RAPD 분석 .....	25
3. 결과 및 고찰 .....	26
가. 리지나뿌리썩음병 이병목의 병징 및 표징 .....	26
나. 온도, pH 및 배지조성이 리지나뿌리썩음병균의 군사생장에 미치는 영향 .....	27
다. 온도가 리지나뿌리썩음병균 자낭포자의 발아에 미치는 영향 .....	32
라. 16수종으로부터 추출한 수용성추출물 배지에서의 리지나뿌리썩음병균의 군사생장 특성 .....	35
마. 16 수종의 가지상에서의 리지나뿌리썩음병균의 군사생장 특성 .....	37
바. 은사시나무 수용성 추출물이 리지나뿌리썩음병균의 군사생장에 미치는 영향 .....	40
사. 리지나뿌리썩음병균으로부터 total DNA의 추출 및 PCR 조건 .....	43
아. 14종의 리지나뿌리썩음병균 분리주로부터 추출한 total DNA의 RAPD 분석 .....	46
자. 14종의 리지나뿌리썩음병균 간의 유전적 다양성 해석 .....	48

제 2 절. 리지나뿌리썩음병의 발병생태와 소나무와의 관계 .....	50
1. 재료 및 방법 .....	50
가. 산불발생 정도별 리지나뿌리썩음병 발생조사 .....	50
나. 송이복원 조림지에서 조림 묘목의 고사율 및 생장 조사 .....	50
다. 리지나뿌리썩음병균의 병원성 검정 .....	51
라. 소나무 용기묘 균근형성 조사 .....	51
마. 소나무 균근균과 리지나뿌리썩음병균과의 상호관계 .....	52
2. 결과 및 고찰 .....	54
가. 산불발생 정도별 리지나뿌리썩음병 발생조사 .....	54
나. 송이복원 조림지에서 조림 묘목의 고사율 및 생장 조사 .....	56
다. 리지나뿌리썩음병균의 병원성 검정 .....	61
라. 소나무 용기묘 균근형성 조사 .....	65
마. 소나무 균근균과 리지나뿌리썩음병균과의 상호관계 .....	68
제 3 절. 리지나뿌리썩음병균의 효과적인 방제기술 개발 .....	74
1. 재료 및 방법 .....	74
가. 토양개선에 의한 병발생 억제효과 구명 .....	74
나. 생물적 방제기술 개발 .....	75
다. 서해안 해안림 병발생 진전조사 .....	75
라. 산불지역과 해안림 병발생지의 미생물상 분석 .....	75
2. 결과 및 고찰 .....	76
가. 토양개선에 의한 병발생 억제효과 구명 .....	76
나. 생물적 방제기술 개발 .....	90
다. 서해안 해안림 병발생 진전조사 .....	95
라. 산불지역과 해안림 병발생지의 미생물상 분석 .....	100
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	102
제 5장 연구개발결과의 활용계획 .....	105
제 6장 참고문헌 .....	106

## 제 1장 연구개발과제의 개요

### 1) 기술적 측면

- '96년 고성에서 발생한 대형산불에 이어 2000년에는 강원도 동해안 일대 약 24,000 ha에 이르는 산림에 산불이 발생하여 엄청난 피해를 입혔다.
- 특히 이 지역은 소나무를 포함하는 침엽수가 상당부분을 차지하고 있고 산불이 발생한 소나무 임지 중 상당 부분은 송이발생임지로서 년 21.6톤의 송이생산으로 이 지역 농가소득의 큰 비중을 차지하였으며 이 지역 경제에도 크게 이바지하고 있다.
- 이 지역의 주민정서와 송이 생육환경 복원을 감안할 때, 약 4,000 ha 정도의 면적에 송이복원을 위하여 소나무 종자 파종 및 용기묘 조립을 실시할 계획이다.
- 그러나, 2000년 산불발생 직후 소나무임지에는 리지나뿌리썩음병이 대규모로 발생하여 현재 생존하고 있는 나무 뿐 만 아니라 다른 지역으로부터 이식한 소나무 묘목이 이 병에 의해 치명적인 피해를 입고 고사하는 현상이 확인되어 (2000. 11. 4.에 개최된 한국균학회 2000년 추계 학술발표회에서 강원대와 임업연구원이 공동 발표), 단계적으로 조립할 소나무 묘목에 큰 피해를 입힐 것으로 예상된다.
- 실제 고성산불 발생시에 생존목의 60% 정도가 산불발생 1년 후에, 90% 정도가 2년 후에 고사한 것으로 조사되었으며, 이에 대한 정확한 원인은 밝혀져 있지 않지만 생존목의 고사에 리지나뿌리썩음병이 부분적으로 관여하였을 것으로 추정된다.
- 따라서 산불발생지역에서 대규모로 실시될 복원조립사업에서 이식한 소나무 묘목이 이 병으로부터 입는 피해를 최소화할 수 있는 방안은 우리나라에서 아직까지 본격적으로 연구된 바가 없는 산불발생지역에서의 리지나뿌리썩음병의 발병생태 및 송이균과의 관계, 병원균의 생리 및 분자생물학적 특성 규명, 효과적인 방제기술 개발 등에 관한 연구를 수행하는 것이 중요하고 절대적으로 필요하다.

### 2) 경제·산업적 측면

- 2000년 동해안 지역에서 발생한 대형산불은 임목의 피해 뿐 만 아니라 이 지역 산림생태계를 파괴한 우리나라 초유의 대형형산불이었다. 이 지역은 특히 송이가 많이 생산되는 지역으로 강원도 전체 생산량의 20% 정도를 차지할 정도로 농가소득 뿐만 아니라 지역경제에 크게 이바지하여 왔다.
- 그러나 지난 산불에 의해서 송이발생임지 내의 소나무가 거의 불에 타 죽은 상태에서 앞으로 이 지역에서는 당분간 송이생산을 기대할 수 없게 되어 이 지역 경제

- 는 큰 어려움을 겪고 있는 실정이다.
- 송이발생 임지 내의 토양에서 소나무의 뿌리와 공생을 하는 송이균도 소나무가 죽은 상태에서는 1년 6개월을 넘기지 못하고 거의 죽게 되는 것으로 알려져 있다.
  - 따라서 송이복원조림은 이 기간 내에 이루어져야 원래 의도한 송이복원조림이라는 궁극적인 목적을 달성할 수 있는데, 여기에는 리지나뿌리썩음병이라는 무서운 복병이 도사리고 있다.
  - 결론적으로 산불발생지역, 특히 송이생산임지에서 향후 20-30년 후에 송이 재생산을 이룩하기 위해서는 우선 산불발생 토양내 송이균사의 유지관리가 가장 우선되어야 하고 이를 위해서는 조기 복원조림한 소나무 묘목이 리지나뿌리썩음병에 의한 피해를 입지 않아야만 성공할 수 있을 것이다.
  - 따라서 산불이 발생한 송이발생임지 뿐만 아니라 일반 소나무 임지에서 성공적인 소나무조림이 이루어질 수 있도록 리지나뿌리썩음병의 생태와 효과적인 방제기술 개발에 대한 이 연구를 통하여 예산절감과 지역 경제발전에 이바지 하고자 한다.

### 3) 사회·문화적 측면

- 우리나라 동해안 지역은 지리기후적으로 산불발생시 대형산불화될 가능성이 매우 높은 지역이다.
- 동해안 지역의 주민들은 지역 정서상 산불발생지역에 복원조림시 산불에 약한 소나무 조림을 원하고 있다.
- 동해안 산불지역에서 송이생산과 임산부산물(송이버섯)이 주 소득원이었던 이 지역 주민들은 지난 산불로 인해 생활기반을 잃게 되어 또 다른 소득원을 찾아 정든 고향을 떠나게 되고 이 지역은 동공화 현상까지 일어나서 지역사회가 활기를 잃고 있는 실정이다.

## 제 2장 국내외 기술개발 현황

### (1) 국내의 관련기술 현황

- 리지나뿌리썩음병을 일으키는 병원균은 자낭균류에 속하는 *Rhizina undulata* (*R. inflata*)로써 우리나라에서는 ‘과상땅해파리버섯’으로 알려져 있고 1981년에 경주 남산의 모닥불터에서 소나무와 곰솔을 고사시킨 것이 보고된 이후, 동해안의 해안림에서 쓰레기 소각, 취사 및 모닥불이 지속적으로 행해지고 있는 휴양지를 따라 확산되고 있는 추세이다.
- 동해안 해안지역에서 국지적으로 발생하는 리지나뿌리썩음병에 대한 연구는 90년대 초에 부분적으로 수행된 적이 있으나 대형산불 지역에서 리지나뿌리썩음병에 대한 연구가 수행된 적은 없으며, 더구나 송이발생임지에서 소나무와 송이가 공생관계를 맺고 있는 뿌리를 가해하는 리지나뿌리썩음병에 대한 연구는 전 세계적으로 수행된 적이 없는 연구 대상이다 .

### (2) 국외의 관련기술 현황

- 일본에서도 1968년 동북지방의 곰솔 해안림에서 처음 발병이 보고되었으며, 동북지방의 전 지역으로 확산됨에 따라 최근까지도 생물학적 특성 및 방제에 대한 연구가 수행중이다.
- 유럽 및 북미지역에서는 1880년부터 소나무류, 전나무, 가문비나무, 낙엽송, 솔송나무 등 다양한 수종의 침엽수를 군상으로 고사시키는 것이 보고되었는데, 특히 모닥불이나 산불이 발생하였던 임지에서 발생하며 병원균의 포자가 발아하는 데에는 일시적으로 고온이 필요하기 때문에 산불이 본 병의 발생과 직접적으로 관계가 있는 것이 확인되어 있다.
- 유럽과 북미지역에서는 병원균의 생리적 특성, 병발생 임지에서의 묘목 고사율 등에 대한 연구결과가 보고되어 있지만 병원균의 유전 및 분자생물학적 연구, 효율적인 방제기술 등에 대한 연구는 구체적으로 수행된 적이 없다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 리지나뿌리썩음병균의 생리 및 유전적 특성

#### 1. 서론

소나무 리지나뿌리썩음병의 병원균은 *Rhizina undulata* Fr ex Fr. Syn. *Rhizina inflata* (Schaeff) Karst (과상땅해과리버섯)으로, 이는 주로 소나무류를 중심으로한 침엽수류의 뿌리를 부후시켜 임목을 군상으로 고사 시키는 병원균으로 알려지고 있으며, 이에 의한 피해는 1880년 프랑스 및 독일에서 처음으로 침엽수류의 군상고사현상이 보고된 이래<sup>4,6)</sup>, 구미 각국에서도 *Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Tsuga*, *Larix* 및 *Pseudotsuga* 등의 임목이 이에 의하여 군상고사 현상이 발생하였다<sup>1,2,7,8)</sup>. 특히 이 병은 모닥불이나 산불이 발생하였던 임지에서 많이 발생한다는 사실이 보고되었는데<sup>2,3)</sup>, 이는 이 병원균의 자낭포자가 발아하는데 일시적으로 높은 온도가 필요하기 때문인 것으로 밝혀져 산불은 본 병의 발생과 직접적인 관계가 있음을 보고하였다<sup>1,5)</sup>.

일본의 경우는 1968년 동북지방의 곶술 해안림에서 처음으로 이 병이 발견되었는데<sup>10)</sup>, 구미지역과 마찬가지로 산불이나 모닥불이 이 병의 발생과 깊은 관계가 있다는 점과 함께 알카리성 보다 산성토양의 임지에서 그 피해가 심하다는 점 등이 입증되었다<sup>15,16)</sup>. 그 후 이 병이 일본 동북지방의 전지역에 확산됨에 따라서 이 병의 생물학적 특성 및 방제법 등에 관한 전반적인 실험이 최근까지 진행되고 있다<sup>13,21,11,12,14,15,20)</sup>.

우리나라의 경우는 1981년 경주 남산의 산불 임지에서 소나무 및 곶술이 이 병에 의하여 고사된 것이 처음으로 발견되어 이 병을 “리지나뿌리썩음병”이라 명명하였다<sup>22,24)</sup>. 그 후 1987년에는 강릉시의 일부 해안 소나무림에서 군상고사현상이 발견되었는데 그 원인이 리지나뿌리썩음병이라는 것이 밝혀졌으며, 자낭포자는 40℃에서 17시간의 열처리에 의하여 발아가 가능하며 균사의 배양 특성 및 포착목에 의한 이 병지의 진단 방법 등에 관한 연구가 수행되었다<sup>23)</sup>. 이 후, 이 병은 쓰레기 소각, 취사 및 모닥불 등이 지속적으로 행해지고 있는 동해안 휴양지를 따라 주로 북쪽으로 확산되고 있는 추세이다.

한편, 최근에는 본 병의 상습적인 발생지인 동해안 해안림과 인접한 내륙지역의 소나무림에 산불이 발생하여 거의 매년 마다 대면적의 소나무림이 큰 피해를 받고 있는 실정이다. 관련 기관에서는 다각적인 방면으로 산불 피해 임지에의 소나무 묘목의 조림을 통한 복원작업을 수행하고 있으나 다수의 조림한 소나무 묘목이 고사하고

있으며, 소나무 고사 중요 원인 중의 하나는 산불 후에 주로 발생하는 리지나뿌리썩음병에 의한 것으로 추정하고 있다. 따라서, 보다 체계적인 리지나뿌리썩음병의 방제법이 개발되어야 하며, 이를 위하여서는 리지나뿌리썩음병균의 생리적 특성 및 리지나뿌리썩음병 분리주간의 유전적 다양성의 특성 등이 밝혀져야 할 것이다.

본 연구는 리지나뿌리썩음병균의 군사생장 특성 및 자낭포자의 발아특성 등 리지나뿌리썩음병원균의 주요 생리적 특성을 밝히고, 주요 조림 수종의 수용성 추출물 및 가지와 뿌리에서의 군사 생장 특성을 통한 간접적 기주 범위 및 기주 특이성을 규명하고자 하였으며, 지역별 및 기주별로 분리 배양한 리지나뿌리썩음병균의 유전적

다양성을 RAPD 방법에 의하여 분석하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시 균주

본 실험에 사용할 공시 균주를 확보하기 위하여, 강원도의 경우는 고성군, 강릉시 및 삼척시 등 주로 소나무림 산불 발생 지역을 중심으로 하여 리지나뿌리썩음병균 (*Rhizina undulata*)의 자실체를 채집하였으며, 경북지역은 울진군의 해안림 및 충남지역의 경우는 태안군 일대의 해안림 지역에서 *R. undulata*의 자실체를 채집하여 이들 각 자실체의 자낭포자로부터 병원균을 분리 배양하여 본 실험의 공시 균주로 사용 하였다. 표 1은 본 실험에 사용한 목록으로서, 일본 분리주의 경우는 국립산림과학원의 김경희 박사로부터 분양받았다.

표 1. 공시 *Rhizina undulata* isolates

기 주	채 집 장 소	분리주명
낙엽송 ( <i>Larix leptolepis</i> )	강원도 춘천시 동산면 봉명리	92011
소나무 ( <i>Pinus densiflora</i> )	강원도 고성군	97031 (PDK-1)
"	강원도 고성군	97032 (PDK-2)
"	강원도 고성군	97033 (PDK-3)
"	강원도 강릉시	PDG-4
"	강원도 삼척시 원덕읍 호산리	원덕호산 (PDS-5)
"	강원도 삼척시 근덕면 궁촌리	근덕궁촌 (PDS-6)
"	강원도 삼척시 원덕읍 임원리	원덕임원
"	강원도 삼척시 울진군 고평리	울진고평
"	강원도 삼척시 울진군 북면	울진북면
"	강원도 삼척시 울진군 건대연수원	건대연수원
"	경북 울진군 북면	PDW-7
"	경북 울진군 고평리	PDW-8
해송 ( <i>P. thunbergii</i> )	충남 태안군	PTT-1
"	충남 태안군	PTT-2
"	충남 태안군	PTT-3
"	충남 태안군	PTT-4
"	일본	PTJ-1
"	일본	PTJ-2

나. 균사 배양

인공배지의 pH 가 균사 생장에 미치는 영향은 PDA (Difco Co.)배지를 고압 멸균한 후, 약 60 ~ 70℃로 식었을 때, HCl 및 KOH로 PDA 배지의 pH가 4 ~ 9가 되도록 조절한 후, 직경 85mm의 petri dish 에 약 25 ml씩 분주, 고화하였으며, 여기에 미리 PDA배지 상에 25℃에서 일주간 배양한 각 분리주의 균사체를 직경 5mm의 cork borer를 이용하여 분리하고 접종원으로 하여 각 배지의 중앙에 정치시켜 25℃에서 약 7일간 배양한 후, 균사의 직경 성장량을 측정하였다. 온도가 균사 생장에 미치는 영향은 PDA 배지 상에 각 분리주의 균사체를 접종한 후, 5 ~ 40℃에서 약 7일간 배양하였을 시의 균사의 직경 성장량을 측정하였다. 각 실험은 공히 5반복으로 실시하였다.

다. 자낭포자의 열처리

온도가 *R. undulata* 자낭포자의 발아에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 각 조사지로부터 채집한 자실체는 현미경으로 자낭의 형성 유무를 확인한 다음, 24시간 수돗물로 수세한 후, 1 x 1cm의 크기로 절단하여 PDA 배지의 배양점시의 덮개에 자실층이



배지를 향하도록 글리세린으로 접착 및 12시간 실온에서 정치시켰다. 그 결과로 각 배지 상에 낙하한 자낭포자는 30 ~ 80 °C에서 1~ 12 시간 정치시킨 다음, 20 °C 배양기에 옮겨 배양 하면서 이 때 각 온도 및 시간대 처리별 자낭포자의 발아 특성을 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 한편, 60°C 이상의 조건에서는 PDA배지의 용해 현상으로 자낭포자의 현미경 관찰이 어렵기 때문에, PDA 배지상에 cellulose membrane (Cellu · SepT4, Membrane Filtration Products, Inc.)을 깔 후에 자낭포자를 낙하시켰다.

#### 라. 수목의 수용성 추출물배지 제조

각종 수종의 수용성 추출물이 *R. undulata* 균사의 생리 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 소나무외 총 16종의 수종으로부터 추출한 열수 추출물 배지에서의 균사 성장 특성을 분석하였다. 즉, 각 수종의 가지 및 뿌리를 채취, 水洗하여 약 1 x 1cm 크기로 절단한 다음, 각각의 절편 200 g을 삼각플라스크에 넣고 증류수 400 ml를 넣어 60분간 autoclave한 후, 거즈로 여과하여 수용성 추출액을 회수하였으며, 이 추출액에 1.5% agar를 첨가하고 다시 autoclave 하여 petri dish에 분주하여 고화시켰다. 여기에 미리 PDA 배지에서 배양한 *R. undulata* 균사체를 직경 5 mm의 cork borer를 이용하여 위의 수종별 추출물 배지에 접종한 후, 25°C 에서 배양하면서 각 수종별 열수추출물 배지에서의 균사 성장량을 비교 분석하였다.

#### 마. 접종용 가지 제조

소나무 외 16종의 수종의 뿌리 및 가지에서의 *R. undulata* 균사체의 성장 특성을 검정하였다. 즉, 직경 1.5 ~ 2cm, 길이 12cm의 각 수종의 뿌리 및 가지를 채취하여 수돗물로 잘 씻어 aluminium foil로 감싸서 1시간 autoclave하고 상온으로 식힌 다음, 이들을 미리 준비한, 5ml의 PDA배지를 분주하여 *R. undulata* 균사를 배양한, 직경 2.5 cm X 길이 15cm의 시험관 내에 정치하여 25°C에서 배양하면서 각 수종의 뿌리 및 가지에서의 균사성장량을 측정하였다.

#### 바. 은사시나무 추출물의 제조

은사시나무 열수 추출물에서의 항균성 검정은 은사시나무 가지를 채취하여 수피를 벗겨서 사부 (phloem)와 목부 (xylem)를 구분하여 수집 및 분쇄와 건조를 시켰으며, 건조 시료 1-2kg을 아세톤-물 (7:3, v/v)의 혼합용매로 약 3일간 3회 추출한 후 농축하여 분획깔때기에서 유기용매용성 및 수용성으로 분획한 다음, 농축 및 동결건조하여 실험에 사용하였다. 이 추출물은 PDA 배지에 단계적으로 희석 및 첨가하여 공시 배지를 제조하였으며, 직경 5mm의 PDA 배지 배양 *R. undulata* 균사체를 접종하여 25°C 에서 배양하면서 이 때의 각 부위별 및 단계별로 희석한 은사시나무 수용성 추

출물 배지에서의 균사 성장 억제 효과를 검정하였다.

#### 사. *R. undulata* total DNA의 추출

분리주간의 유전적 다양성을 분석하기 위하여, *R. undulata*의 균사체로부터 total DNA는 Yoon 등(1991)의 방법<sup>9)</sup> 및 Promega사의 Wizard Genomic DNA purification kit를 사용하여 추출하였다. Yoon 등(1991)의 방법<sup>24)</sup>을 변형시킨 total DNA의 추출은 PDA 배지에서 배양시킨 균사체를 수집하여 막자사발에서 액체질소로 냉각하여 마쇄한 후 1.5ml micro tube에 옮겼으며, 200 $\mu$ l의 Homogenization buffer (50mM Tris-HCl pH 9, 50mM EDTA pH 7.2, 0.5% SDS, 0.2M sucrose) 및 4 $\mu$ l의 Proteinase K(10mg/ml in TE)를 첨가한 다음, vortex mixer를 이용하여 3분간 혼합하고 65 $^{\circ}$ C thermo bath에서 10분간 처리하였다. 여기에 200 $\mu$ l의 2.4M K-acetate를 혼합하여 4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 2.5배의 99.9% 에탄올을 첨가하여 5분간 실온에서 정치한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 15,000 rpm으로 다시 10분간 원심분리하여 핵산을 침전시켰다. 침전물은 400 $\mu$ l의 TE buffer에 현탁시켜 400 $\mu$ l의 phenol-chloroform-isoamylalcohol(25:24:1)을 혼합하고 3분간 vortex한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 8,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하는 과정을 3회 반복하였다. 상층액에 1/10배(v/v)의 3M Na-acetate(pH 5.2)와 2.5배(v/v)의 99.9% 에탄올을 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 60분간 정치시킨 후, 4 $^{\circ}$ C에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 핵산을 침전시켰다. 침전물은 200 $\mu$ l의 TE buffer에 현탁한 후 1 $\mu$ l의 RNase A(1  $\mu$ g/ $\mu$ l in TE)를 첨가하여 vortex mixer로 3분간 혼합하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리함으로써 RNA를 분해한 후, 200 $\mu$ l의 phenol-chloroform-isoamylalcohol(25:24: 1)을 첨가하여 3분간 vortex한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 8,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하는 과정을 2회 반복하여 침전중의 RNA를 제거하였다. 상층액에 1/10배(v/v)의 3M Na-acetate(pH 5.2)와 2.5/1배(v/v)의 99.9% 에탄올을 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 60분간 정치시킨 후, 4 $^{\circ}$ C에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리에 의하여 total DNA를 침전시켰다. 침전은 100 $\mu$ l TE buffer에 현탁하여 PCR 및 RAPD에 사용하였다.

#### 아. PCR 및 RAPD 분석

*R. undulata* 균사체로부터 추출한 total DNA를 이용하여 RAPD 분석을 실시하였다. PCR reaction mixture의 조성은 sample DNA 1 $\mu$ l, Random primer Kit B primer 1 $\mu$ l(5pM), *Taq* polymerase(Promega Co.) 3 units, 25mM MgCl<sub>2</sub> 2.5 $\mu$ l, 10x *Taq* buffer 2.5 $\mu$ l, 10mM dNTP 1 $\mu$ l의 총 25 $\mu$ l로, PCR 반응은 Minicycler(MJ Research)를 사용하였고, PCR cycling의 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation과 35 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 extension으로 43 cycle을 반복 실행하였으며, 처음 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간, 그리고 마지막 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 이었다.

한편, RAPD 용 Random primer는 Operon 10-mer Kit B (Operon Tech.) 중에서 12종을 사용하였다 (표 2).

PCR 증폭산물의 분석은 Mupid 21(COSMO BIO CO.)을 사용하여 1.5% agarose gel(1X TBE buffer)에서 100V 30분간 전기영동을 실시하였으며 marker는 1 kb DNA ladder (Promega Co.)를 사용하였다. 전기영동 후 ethidium bromide(0.005 $\mu$ l/ml, Bio-Rad)로 15분간 염색하고 2차 증류수에 5분간 세척한 다음 Gel Documentation System(Bio-Rad)의 UPGAMA program으로 Phylogenetic tree를 작성하여 분리주간의 유연관계를 분석하였다.

표 2. PAPD에 공시한 Random primer

Primer No.	5' - 3' sequences	Primer No.	5' - 3' sequences
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPB-11	GTAGACCCGT
03	CATCCCCCTG	13	TTCCCCCGCT
04	GGACTGGAGT	14	TCCGCTCTGG
05	TGCGCCCTTC	15	GGAGGGTGTT
06	TGCTCTGCCC	17	AGGGAACGAG
10	CTGCTGGGAC	20	GGACCCTTAC

### 3. 결과 및 고찰

가. 리지나뿌리썩음병 이병목의 병징 및 표징

표 2 는 기존의 본 연구실에서 보존중인 균주를 포함해서 2004년 09 월 현재까지 확보된 총 19종의 공시균 분리주를 나타낸 것으로서, 표에서 알 수 있는 바와 같이 채집 기주의 대부분이 소나무이며 특히 강원도 및 경북 지역에서부터 분리한 분리주는 모두가 소나무로서, 우리나라의 *R. undulata*에 의한 주요 피해 수종이 소나무임을 시사해 주고 있다. 반면에, 충남 태안 지역 및 일본에서부터 분양받은 분리주는 해송으로부터 분리한 것이다. 이병목의 병징 및 표징 특성으로는, 리지나 뿌리썩음병 이병 소나무 수관부의 침엽은 갈변 및 고사 현상이 나타났으며 뿌리 부위는 부분적인 부후 및 방사상의 부후흔적을 발견할 수 있었다. 또한, 경우에 따라서는 이병목 지체부상에 리지나 뿌리썩음병균의 자실체가 형성되는 경우도 있었다 (그림 1).

한편, 소나무 및 해송 뿐 만 아니라, 산불지역이 아닌 춘천시 근교의 낙엽송 임분상에서도 리지나 뿌리썩음병균의 자실체를 채집할 수 있었는데, 이 경우도 역시 지체부

상에 자실체가 발생한 낙엽송 단목 및 그 주위의 낙엽송도 수관부는 침엽의 갈변 현상과 함께 이미 고사한 경우가 많았으며, 뿌리에서는 본 병의 전형적인 병징 특성인 방사상의 부후 흔적을 형성하였다. 또한, 피해목의 주변에서는 이 병의 발병 유인종의 하나인 모닥불 또는 쓰레기 조각 흔적을 발견할 수 있었다 (그림 2).

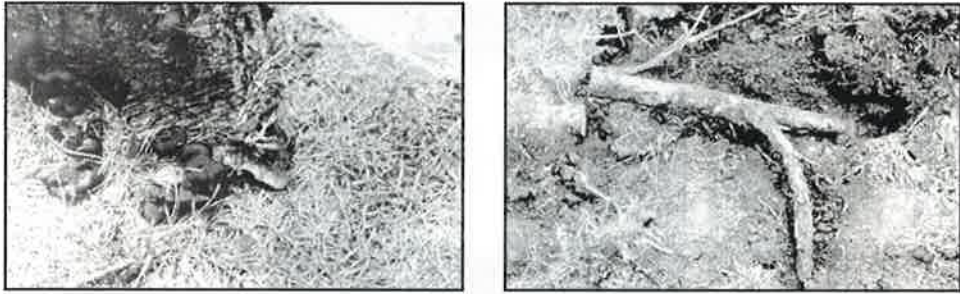


그림 1. 소나무 지제부상의 자실체 (왼쪽) 및 뿌리의 병징 (오른쪽)

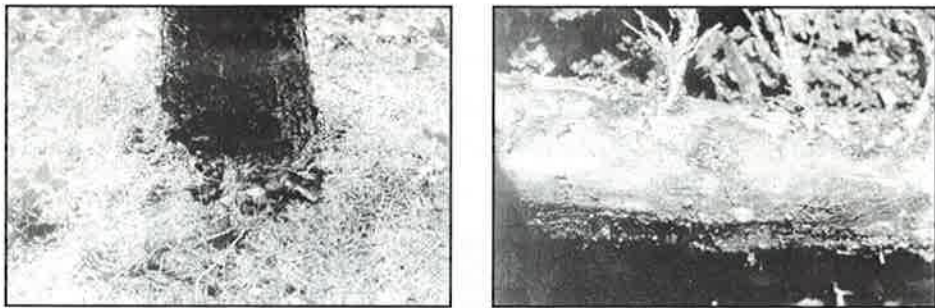


그림 2. 낙엽송 지제부상의 자실체 (왼쪽) 및 뿌리의 병징 (오른쪽)

나. 온도, pH 및 배지조성이 리지나뿌리썩음병균의 군사생장에 미치는 영향

각 분리주로부터 분리 배양한 군사체들의 배양 특성 비교 및 최적 군사 성장 조건을 구명하기 위하여 배지 pH 및 배양 온도에 따른 군사 성장 특성을 조사하는 것과 함께, 각종 인공 배지에서의 균주별 군사 성장 특성을 비교 분석하였다.

1) PDA 배지에서의 군사 성장 특성

그림 3은 petri 접시 PDA 배지에서 배양 중인 소나무림에서 채집한 *R. undulata* 자

실체의 자낭포자로부터 단포자 분리한 *R. undulata* 균사체의 성장 특성으로서, 접종 후 25°C에서 약 1주일간 배양하였을 때 균사가 배지 표면 전체로 퍼지는 비교적 빠른 균사 성장을 보였는데, 이 때 균사체는 백색을 나타내었지만 시간이 경과함에 따라서 오래된 균사체부터 갈색 내지는 흑갈색 (사진 중앙)으로 변색됨을 확인할 수 있었으며, 기저균사체는 근상균사속 (Rhizomorpha)을 형성하는 경우도 있었다.

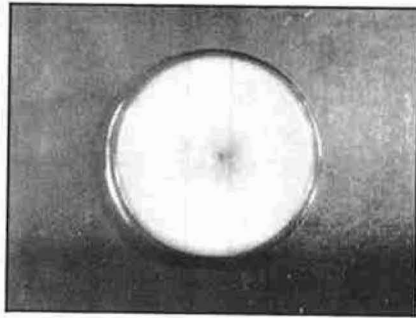
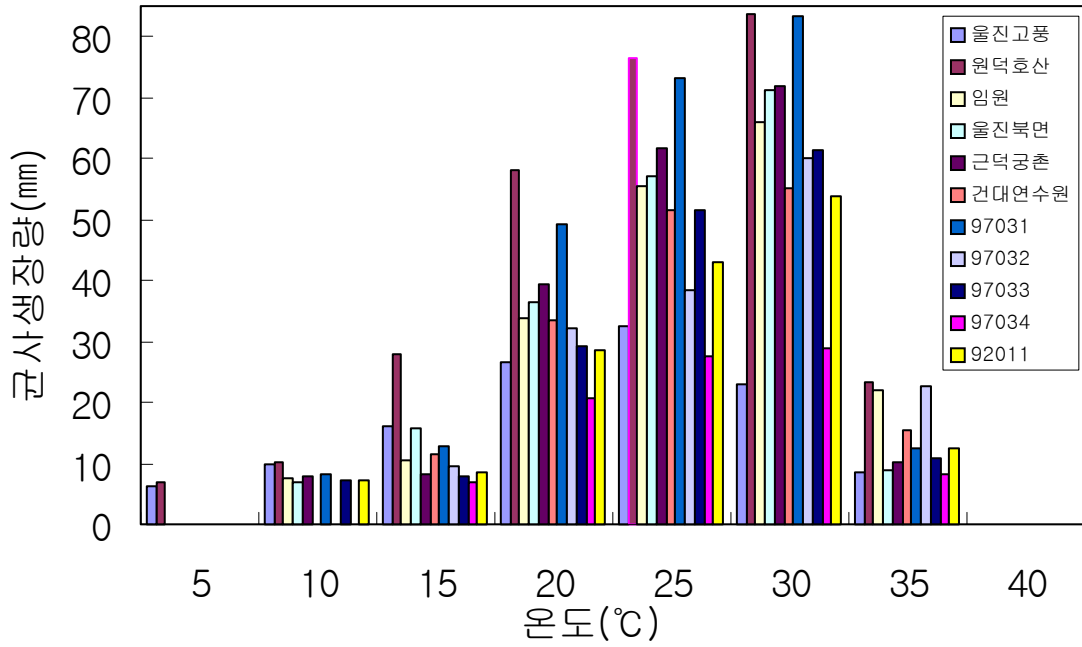


그림 3. PDA 배지상에서 성장중인 *R. undulata*의 균사체

## 2) 온도 및 pH가 균사 성장에 미치는 영향

그림 4는 소나무림과 낙엽송림의 자실체에서 단포자 분리에 의하여 배양한 11개 분리 균주들의 균사 성장특성으로서, 1종의 분리주 (울진 고풍)는 25°C에서 균사 생장이 가장 양호하였으나, 그 외의 분리주들은 모두 30°C에서 최적의 균사생장을 나타내었으며, 35°C에서는 균사 생장이 급격히 둔화되어 40°C에서는 생장이 정지되는 고온에 민감한 반응을 나타내었다 (그림 4-A 및 그림 5). 배양 배지의 pH의 경우는, pH 4 ~ 5에서 균사 생장이 가장 양호하였고, pH 6에서는 다소 균사 생장이 둔화되었으며, pH 7 이상의 알칼리성 배지에서는 균사 생장이 급격히 둔화되기 시작하여, 전반적으로 *R. undulata*의 균사 생장은 산성을 선호하는 특성을 나타내었다 (그림 4-B 및 그림 6).

A



B

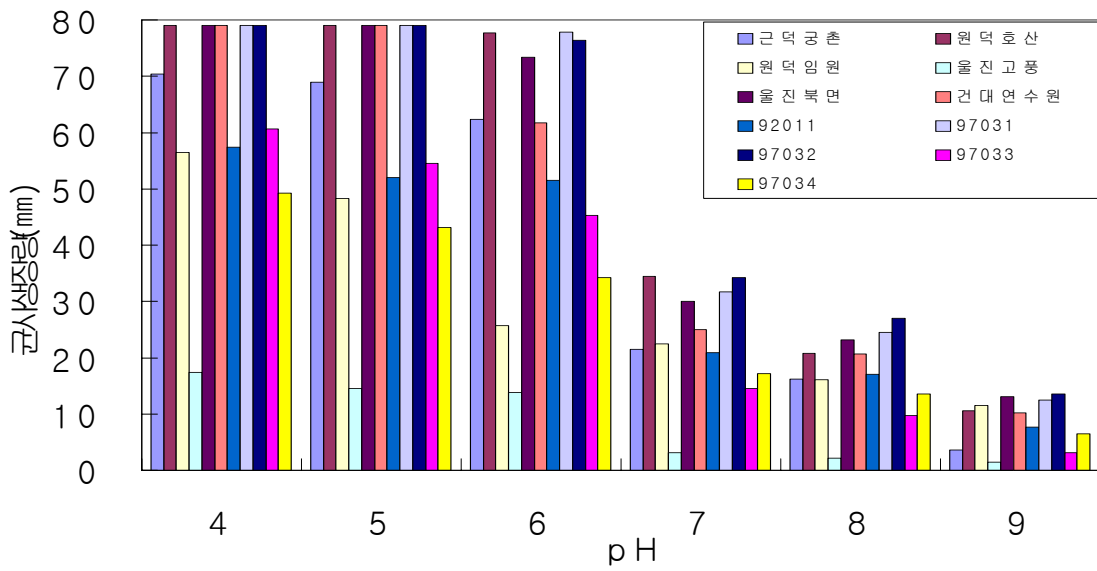


그림 4. 온도(A) 및 pH (B)가 *R. undulata*의 균사 성장에 미치는 영향

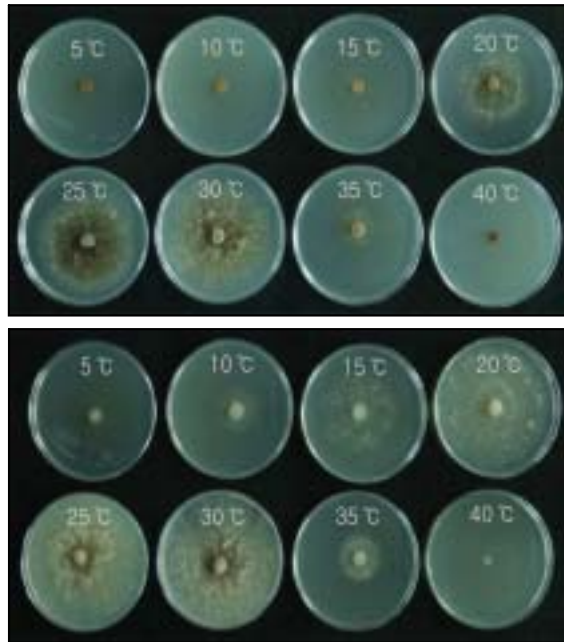


그림 5. 온도별 *R. undulata* 균사생장 (좌 : 92011, 우 : 원덕호산)

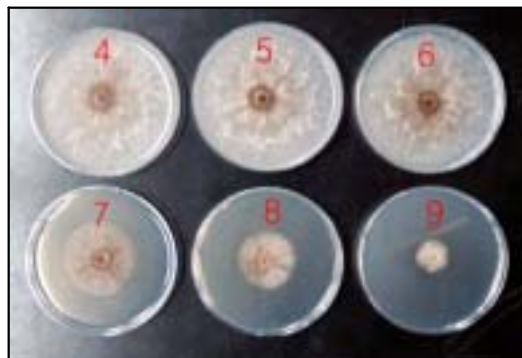


그림 6. pH별 *R. undulata* 균사생장 (좌 : 92011, 우 : 원덕호산)

### 3) 배지 조성이 균사 생장에 미치는 영향

그림 7 및 그림 8 은 3종의 인공배지 상에서 11개 분리 균주의 균사생장특성을 조사한 것으로 인공배지 3종의 조성은 표 3에 나타내었다. 3종의 인공배지 중 PDA 배지에서 생장이 가장 양호하였으며, 그 다음으로 SGM 및 MMM의 순으로 균사 생장이 양호하여, 분리주간의 배지 선호 특이성은 발견하지 못하였다.

표 3. PDA, MMM, SGM 배지의 조성

배 지 명	조 성(ℓ)	
PDA(Potato Dextrose Agar)	Difco PDA	39g
MMM (Mushroom minimal Media)	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	460mg
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
	Dextrose	20g
	DS-Asparagine	2g
	Timin HCL	120μg
	Agar	15g
SGM (Standard Growth Media)	Malt Extract	40g
	Peptone	5g
	Dextrose	20g
	Agar	15g

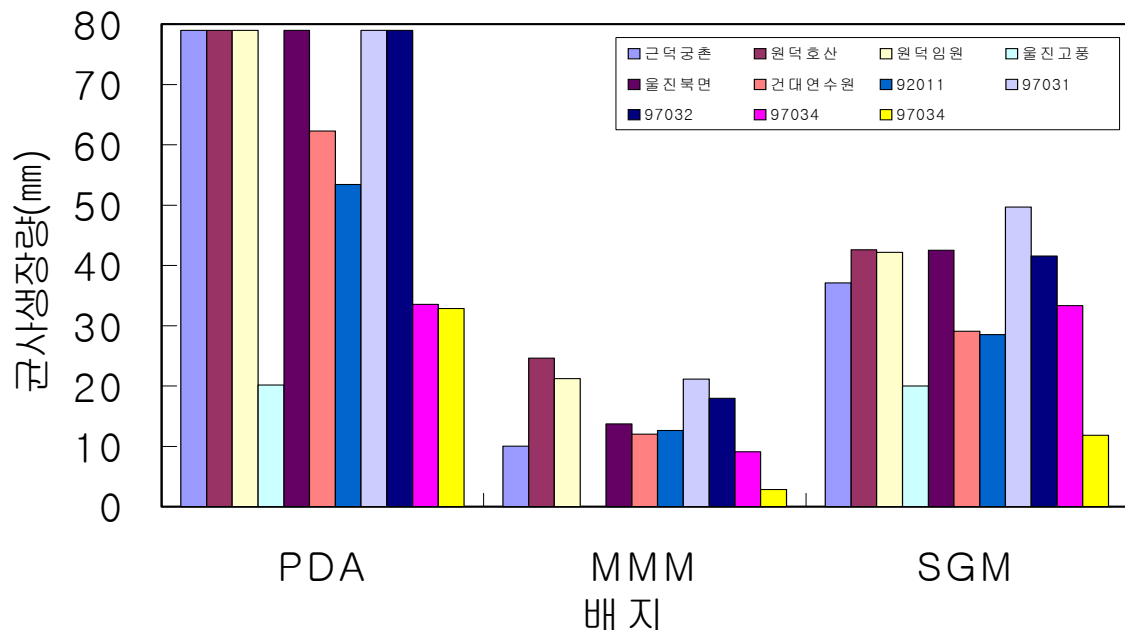


그림 7. 각 인공배지에서의 *R. undulata* 의 군사 성장량



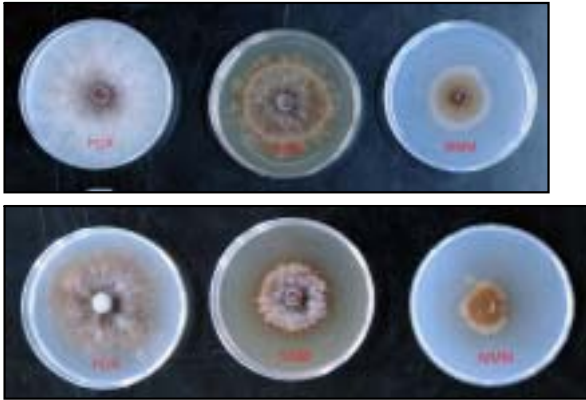


그림 8. 배지종류별 *R. undulata* 의 균사 성장 특성 (좌 : 92011, 우 : 원덕호산)

다. 온도가 리지나뿌리썩음병균 자낭포자의 발아에 미치는 영향

#### 1) 자낭포자 발아 특성

*R. undulata* 자낭포자의 발아 특성을 조사하기 위하여, 각 조사지로부터 채집한 자실체는 현미경으로 자낭의 형성 유무를 확인한 다음, 24시간 수돗물로 수세한 후, 1 x 1cm의 크기로 절단하여 WA (water agar) 또는 PDA 배지의 배양접시의 덮개에 자실층이 배지를 향하도록 접착 및 12시간 정치시켰다. 그 결과로 각 배지상에 낙하한 포자는 30~70 °C에서 3~30 시간 정치시킨 다음, 20°C 배양기에 옮겨 배양하면서 이때 각 처리별로 발아하는 포자 수를 조사하여 온도 및 시간 등의 각 인공환경 조건이 자낭포자 발아에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

그림 9은 소나무림에서 채집한 자실체로부터 위의 방법으로 PDA 배지상에 낙하시킨 자낭포자 (왼쪽) 및 이 자낭포자를 40°C에서 6시간 열처리를 한 후 20에서 4일간 배양하였을 때의 자낭포자로부터의 발아 모습 (오른쪽) 으로, *R. undulata*의 포자는 상온 (20~35°C)에서는 발아하지 않았고, 적절한 고온에서의 heat shock가 발아의 전제 조건임을 확인할 수 있었다.

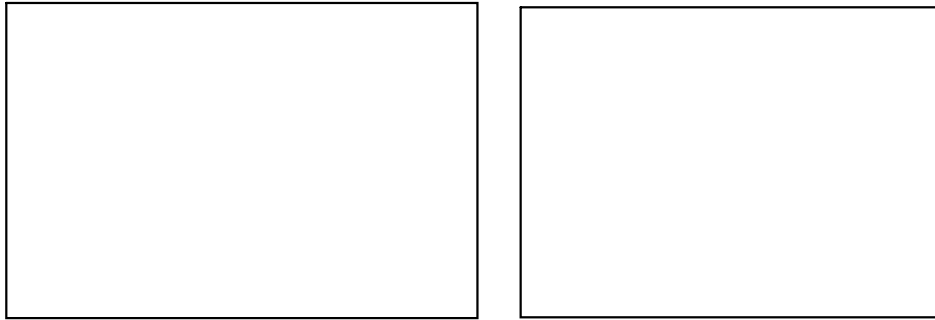


그림 9. 자실체로부터 낙하한 자낭포자 (왼쪽) 및 열처리에 의하여 발아한 자낭포자 (오른쪽)

2) Heat shock 온도 및 시간이 자낭포자 발아에 미치는 영향

온도 및 시간이 자낭포자의 발아에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 자낭포자를 30 ~ 80°C에서 1 ~ 12시간 정치한 후, 25°C에서 배양 하면서 그 때의 발아 유무를 광학 현미경으로 관찰 하였다. 그 결과, *R. undulata*의 자낭포자는 30°C 에서 12시간까지 배양하여도 발아하지 않았으나, 40°C에서는 3시간 열처리하였을 때부터 발아하기 시작하여 12시간 열처리 하였을 경우에도 발아는 지속되었다. 50°C 및 60°C의 경우는 1시간의 열처리에 의하여 발아가 시작되었으나, 50°C의 경우는 12시간 열처리까지 발아가 지속된 반면, 60°C의 경우는 8시간 이상의 열처리에 의하여서는 발아되지 않았다. 한편, 70°C 1시간 이상의 조건에서는 발아되지 않아, *in vitro* 에서의 자낭포자 발아에 필요한 최저 온도와 시간은 40°C 3시간이며, 최저 온도와 시간은 70°C 1시간이었다 (표 4).

표 4. 온도와 시간이 *R. undulata* 자낭포자의 발아에 미치는 영향

시간 (h) / 온도 (°C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
30	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
40	X	X	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
50	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
60	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X	X	X
70	O	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
80	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

3) Heat shock 처리 시간이 자낭포자 발아에 미치는 영향

그림 10은 *R. undulata* 의 자낭포자를 40℃ 및 50℃에서 30시간까지 heat shock 처리를 한 후, 20℃ 배양기에 옮겨 배양하면서 이 때 각 처리별 발아율을 분석한 결과로서, 40℃에서 heat shock를 한 경우는 처리시간이 길수록 발아율도 상승하였는데 즉, 12시간까지는 발아율에 큰 차이를 보이지 않으면서 미미한 상승곡선을 그리다가 24시간 이후 30시간 처리의 경우는 급격하게 발아율이 상승함을 알 수 있었다. 그러나 50℃에서 heat shock를 한 경우는 3-6시간의 처리에서는 발아율의 차이를 보이지 않았으나 9시간 처리에서부터 발아율이 감소하면서 12시간 처리의 경우에는 발아되지 않았다. 이 실험 결과, 자낭포자의 발아는 온도 뿐 만 아니라, 온도 노출 시간도 발아에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

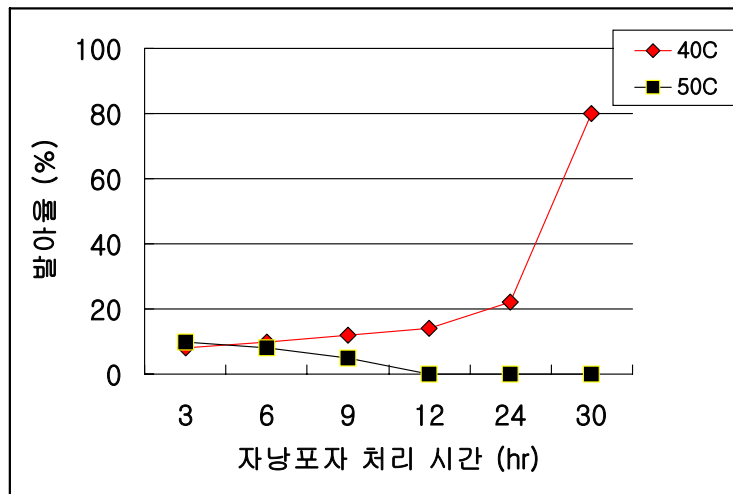


그림 10. heat shock 온도 및 시간이 *R. undulata* 자낭포자의 발아에 미치는 영향

4) 4℃에서의 저장기간이 자낭포자 발아에 미치는 영향

그림 11는 저온 (4℃)에서의 저장기간이 자낭포자의 발아에 미치는 영향을 분석한 결과로서, 4℃에서 일정기간 저장한 자낭포자를 40℃에서 24시간 heat shock 한 후 20℃로 옮겨 배양하면서 발아율을 조사하였을 때, 4℃에서 10일간 저장한 자낭포자는 5일간 저장한 자낭포자에 비하여 발아율이 급격히 하락하였으나, 그 후 30일까지의 조사 기간동안의 발아율에는 큰 변화 없이 비교적 일정한 발아율을 유지함을 알 수 있었다.

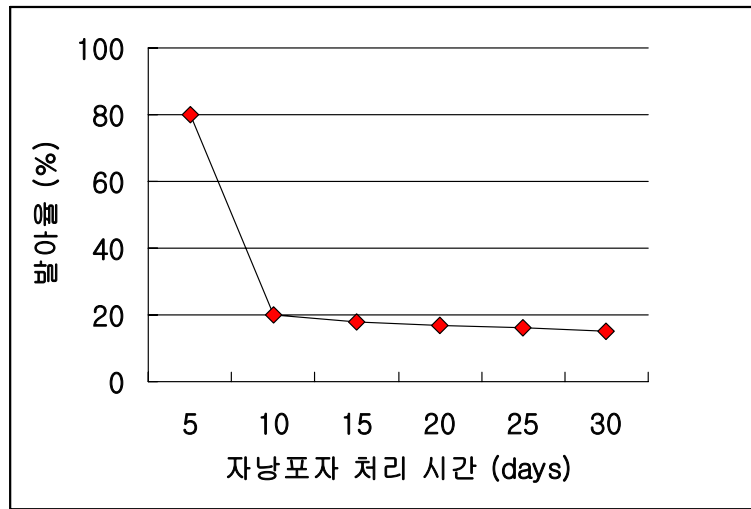


그림 11. 4°C에서의 저장이 *R. undulata* 자낭포자의 발아에 미치는 영향

라. 16수종으로부터 추출한 수용성추출물 배지에서의 리지나뿌리썩음병균의 군사생장 특성

(1) 각 수종의 수용성 추출물 배지에서의 군사생장 특성

각종 수종의 수용성 추출물이 *R. undulata* 군사의 생리 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 소나무의 총 16종의 수종으로부터 추출한 열수 추출물 배지에서의 PDK-1 분리주의 군사 성장 특성을 분석하였다. 그 결과, 그림 12 에서 보는 바와 같이 25°C 4일간 배양시 예, 리기다소나무를 위시하여 대부분의 수종들의 열수 추출물 배지에서의 *R. undulata*의 군사 직경 생장이 약 85mm에 달하여 배양접시 상에 충만하였다. 그러나, 스트로부잣나무 열수추출물 배지에 경우는 분류학적으로 동일한 *Pinus*속에 속하는 소나무, 해송 및 잣나무 등에 비하여 군사 생장이 배 이상 억제되었으며 특히, 이태리포플러와 은수원사시나무 열수추출물에서는 *R. undulata*의 군사 생장이 전혀 이루어지지 않아, 이들 동일 속에 속하는 두 수종의 추출물에는 *R. undulata*의 군사생장을 저해하는 항균성 물질이 있음을 시사하여 주었다.

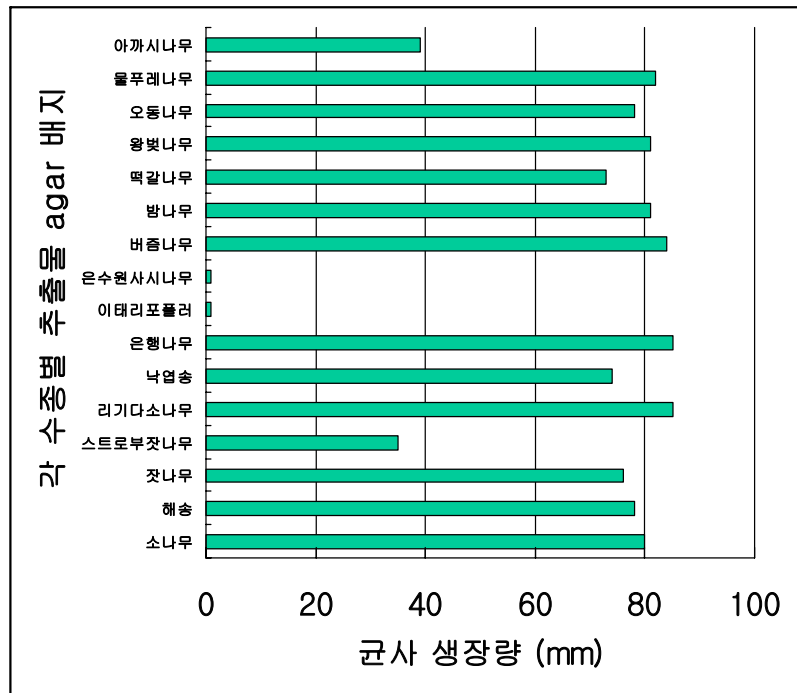


그림 12. 각 수종별 수용성 추출물에서의 *R. undulata*의 균사 성장 특성

(2) 소나무, 해송, 리기다소나무 및 낙엽송 수용성 추출물 배지에서의 분리주간 균사 성장 특성

분리주간의 기주 특이성을 간접적으로 검정할 목적으로 소나무 분리주 (PDK-1), 해송 분리주 (PTT-1) 및 일본 해송 분리주 (PTJ-1)을 공시하여, 소나무, 해송, 리기다소나무 및 낙엽송 열수추출물 배지에서의 균사 성장 특성을 조사하였다. 그 결과, 그림 13 에서 보는 바와 같이, *R. undulata* 분리주 중에서는 일본 해송 분리주가 4종의 수용성 추출물배지에서 전반적으로 균사 생장이 가장 우수하였으며, 수종별 수용성 추출물 배지 중에서는 낙엽송 열수 추출물배지에서의 균사 생장이 비교적 양호 하였으나, 해송 분리주의 경우는 낙엽송 열수 추출물배지 보다는 해송 열수 추출물 배지에서의 균사 생장이 양호하였다.

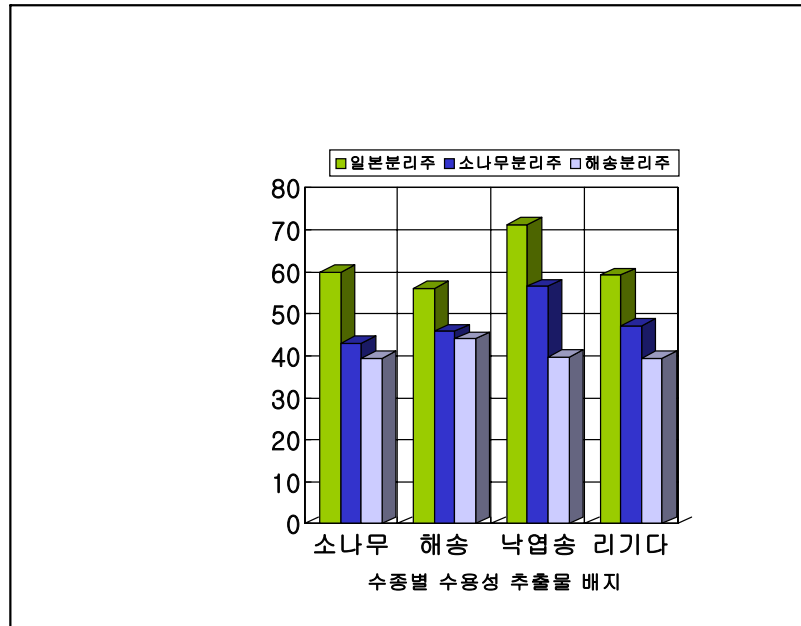


그림 13. 수종별 수용성 추출물배지에서의 분리주간의 균사 성장 특성

마. 16 수종의 가지상에서의 리지나뿌리썩음병균의 균사생장 특성

(1) 각 수종의 가지 및 뿌리상에서의 균사생장 특성

소나무 외 16종의 수종의 뿌리 및 가지를 이용하여 *R. undulata* 의 기주 범위 및 각 수종에서의 PDK-1 분리주의 균사 성장 특성을 검정하였다. 그림 14 는 25℃에서 2주간 배양하였을 때의 각 수종의 뿌리 및 가지 수피상에서의 *R. undulata* 의 균사 성장량으로서, 전반적으로 볼 때, 뿌리에서의 균사생장량이 가지상에서의 균사생장량 보다 높게 나타났다. 또한, 대부분의 공시 침엽수류들에서의 균사 생장이 왕성하게 나타나 *R. undulata* 의 균사는 활엽수 보다는 침엽수에서 잘 성장함을 알 수 있었으며, 이는 침엽수를 주요 기주로 삼고 있는 *R. undulata* 의 병원성의 특성을 *in vitro*에서 재검증할 수 있는 계기가 되었다. 한편, 열수추출물배지에서 *R. undulata*에 대해 강한 항균성을 나타낸 은수원사시나무 및 이태리포플러의 경우는, 이 실험에서도 타 수종에 비하여 *R. undulata* 의 균사생장력이 미약하였고, 특히 가지보다는 뿌리에서의 균사 생장이 둔화되는 경향이었으며, 수피상에서는 균사 생장이 확인되었어도 수피하에서는 리지나뿌리썩음병의 전형적인 병 · 표징인 방사상의 부후 흔적이 발견되지 않는 것으로 보아, 뿌리병원균인 *R. undulata*에 대하여 타 수종에 비하여 상대적으로 강한 내성을 갖는 수종으로 추정되었다. 아까시나무 또한 뿌리 및 가지상에서

의 군사 생장은 인정되었으나, 수피하에서는 부후 흔적이 발견되지 않았다 (그림 15).

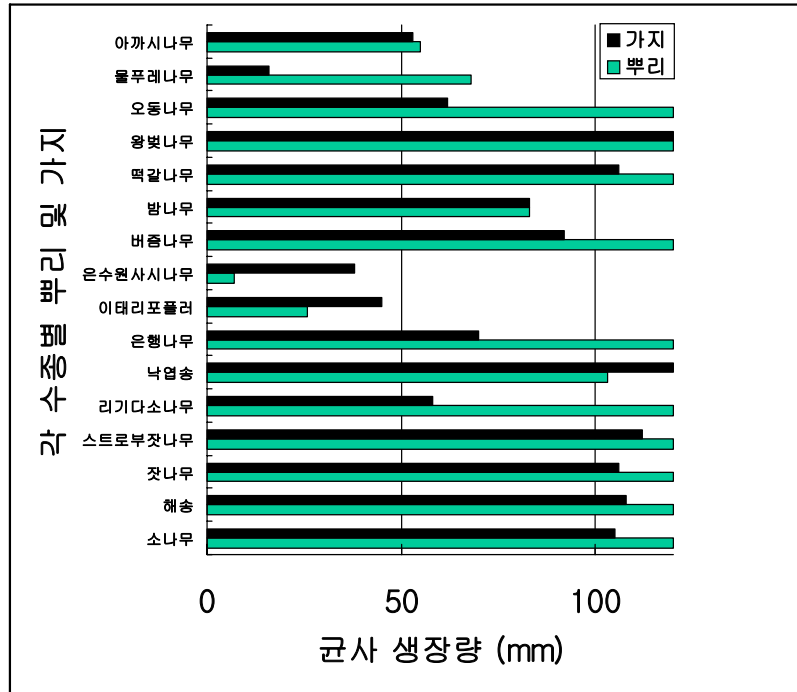


그림 14. 각 수종의 가지 및 뿌리상에서의 *R. undulata*의 군사 성장 특성

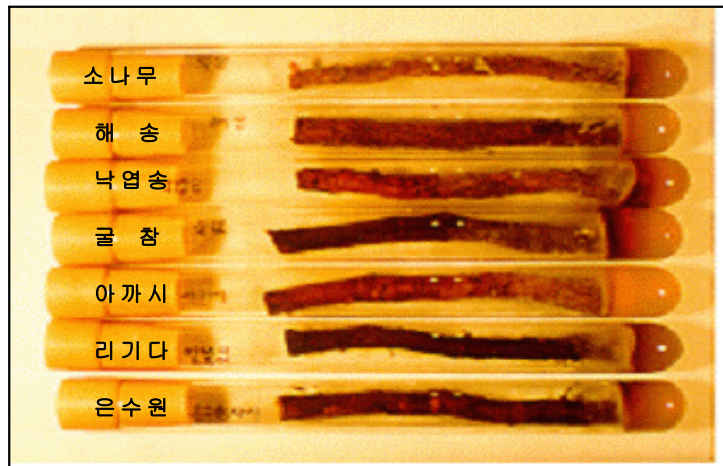


그림 15. 각 수종의 뿌리 상에서의 *R. undulata*의 군사 성장

(2) 소나무, 해송, 리기다소나무 및 낙엽송 가지에서의 각 분리주의 군사생장 특성

분리주간의 기주 특이성을 간접적으로 검정할 목적으로 소나무 분리주 (PDK-1), 해송 분리주 (PTT-1) 및 일본 해송 분리주 (PTJ-1)을 공시하여, 소나무, 해송, 리기다소나무 및 낙엽송의 4 수종의 가지에서의 군사 생장 특성을 비교 분석하였다.

그 결과, 그림 16에서 보는 바와 같이, 열수 추출물에서의 군사 생장 특성과 유사하게, 4수종의 가지에서의 군사 생장 특성도 일본 분리주가 전반적으로 양호하였으며, 해송 분리주도 이와 유사한 군사 생장 특성을 나타내었다. 반면, 소나무 분리주의 경우는, 각 수종의 가지상에서의 군사 생장율이 가장 낮았으며, 수종 중에서도 해송 가지 상에서의 군사 생장이 가장 좋지 않았다. 이상의 결과로 볼 때, 각 *R. undulata* 분리주의 군사 생장은 각 수종의 구성 화학 성분 뿐 만 아니라, 목재 조직의 물리적 특성에 의해서도 영향을 받으며, 기주 수종과는 특별한 관련성이 없는 것으로 추정된다.

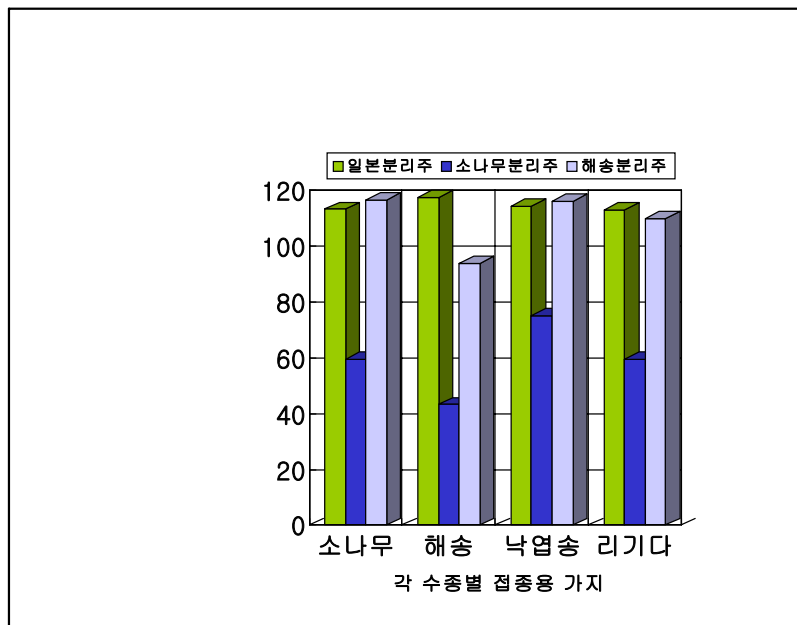


그림 16. 수종별 가지에서의 분리주간의 군사 생장 특성



바. 은사시나무 수용성 추출물이 리지나뿌리썩음병균의 균사생장에 미치는 영향

각 수종의 열수 추출물에서의 *R. undulata* 균사 성장 특성 분석 결과, 항균성 물질을 함유하고 있는 것으로 추정되는 수종 중 하나인, 은수원사시나무를 공시하여 PDK-1 분리주에 대한 항균성 유무를 검정하였다. 그림 17 는 각 단계별 희석배지에서 3일간 배양하였을 때의 균사생장량을 측정한 결과로서, 사부 및 목부 공히 100  $\mu$ g/ml 의 농도에서는 균사생장이 완전히 억제되었으며, 함유량이 감소함에 따라서 균사 성장도 상대적으로 증가되는 사실을 나타내줌으로서, 은사시나무에는 의 균사생장 억제 물질이 존재한다는 것을 재확인할 수 있었다. 단, 사부와 목부 추출물간의 항균 효과는 인정되지 않았으며, 수용성 및 유기용매용성 (Ethyl acetate 및 Chloroform용성) 추출물간에도 항균성의 차이는 인정되지 않았다 (자료 생략). 이러한 결과는 은수원사시나무에 존재하는 단일의 항균성물질의 추출은 이 실험에서 사용한 추출방법으로는 추출할 수 없는 성분이거나 아니면, 이러한 항균성은 단일성분이 아닌 복합 성분에 의한 synergy 효과에 의하여 발현되는 것으로 추정된다.

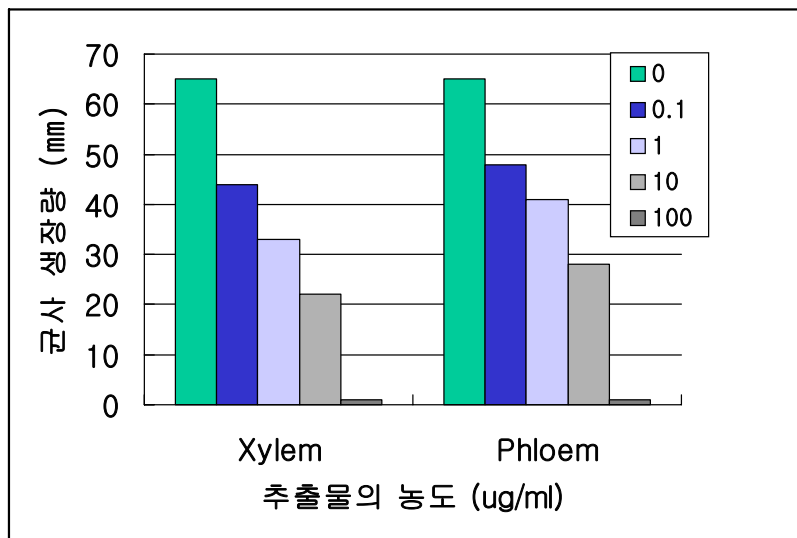


그림 17. 은수원사시나무 수용성 추출물의 *R. undulata*의 균사 성장 억제 효과

한편, 은수원 사시나무 가지 열수 추출물의 균사 성장 억제 효과는 소나무 가지를 이용하여서도 검정하였는데 즉, 직경 1.5-2cm, 길이 10cm의 소나무 생지를 수돗물로 잘 씻어 aluminium foil로 감싸서 1시간 autoclave하여 상온으로 식힌 다음, 은수원사시나무 열수 추출물에 가지 전체가 잠기도록 24시간 침적시킨 후, 무균 상태로 2-3시

간 건조하였으며, 이 가지를 미리 5ml의 PDA배지를 분주하여 *R. undulata* 균사를 배양한 시험관 내에 정치하여 25℃에서 약 10일간 배양하면서 이 때의 소나무 가지 상에서의 균사생장 억제 효과를 조사하였다. 이 때, 베노밀외 4 종의 시판중인 살균제를 공시하여 동일한 방법으로 *R. undulata*에 대한 항균성을 검정함으로써, 은수원사시나무 열수 추출물의 살균 효과를 상대적으로 비교 분석하였다 (그림 18).

그 결과, 그림 19 에서 보는 바와 같이 각각 원액 및 2, 4, 8배로 은수원사시나무 열수추출물을 증류수로 희석하여 소나무 가지를 처리하였을 때, *R. undulata*의 균사생장은 희석배수가 높아질수록 균사 성장도 함께 증가함으로써, 은수원사시나무의 열수 추출물에는 *R. undulata*의 균사 성장을 억제시키는 항균성 물질을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 또한, 은수원사시나무 열수 추출물의 항균성을 시판중인 살균제들과 간접적으로 비교하였을 때, 캡탄이나 지오판 등에 뒤지지 않은 우수한 균사 성장 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (그림 20).

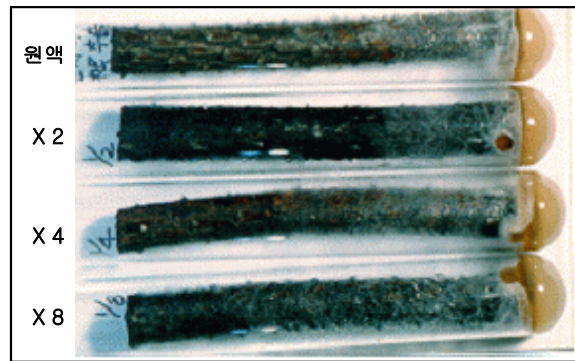


그림 18. 은수원사시나무 수용성 추출물을 처리한 소나무 가지상에서의 *R. undulata*의 균사 성장

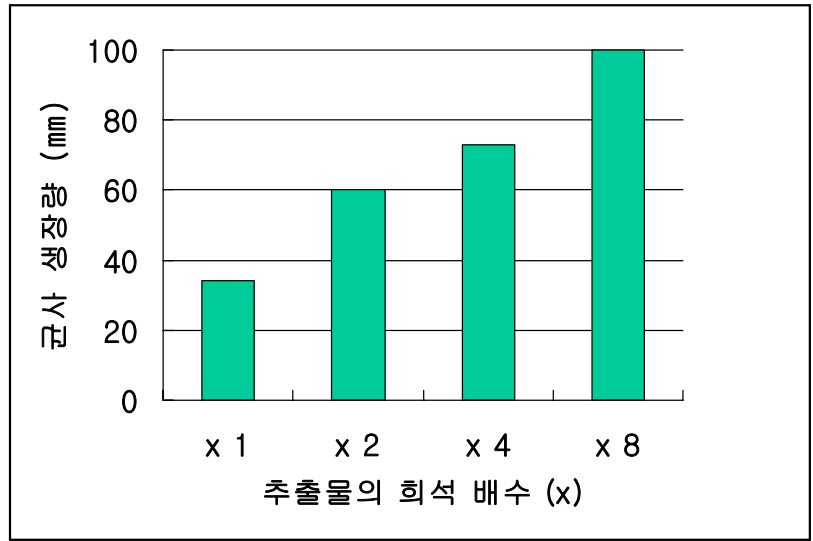


그림 19. 은수원사시나무 수용성 추출물로 처리한 소나무 가지상에서의 *R. undulata*의 균사 생장 억제 효과

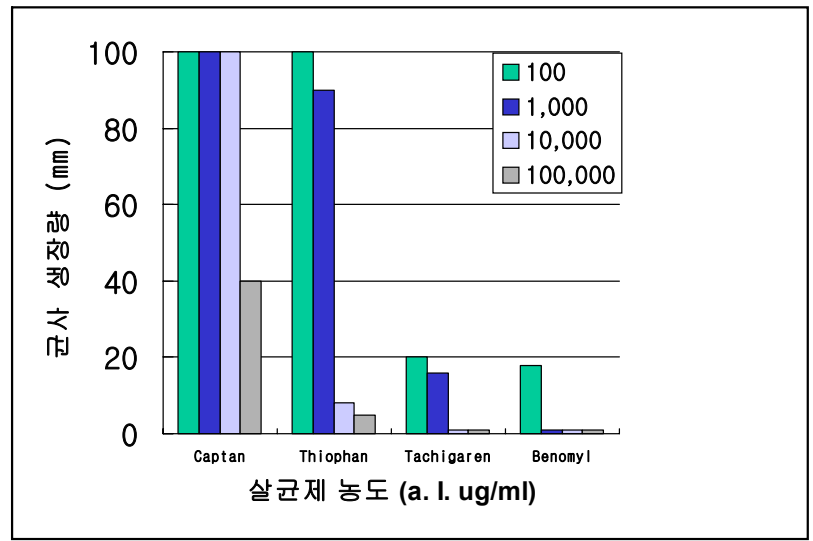


그림 20. 각종 살균제로 처리한 소나무 가지상에서의 *R. undulata*의 균사 생장 억제 효과

사. 리지나뿌리썩음병균으로부터 total DNA의 추출 및 PCR 조건

*R. undulata* 분리주간의 유전적 유연관계를 분석하기 위하여 RAPD (Random amplified polymorphic DNAs)를 실시하고, 이 결과에 의하여 phylogenetic tree를 분석함으로써 분리 지역 및 기주 수종에 따른 분리주들 간의 유전적 변이 특성을 검정하고자 하였다.

(1) 공시 분리주

본 실험에 공시한 *R. undulata* 분리주는 표 2와 같이, 기주 식물 및 지역에 따라서 총 12종의 분리주를 선발하여 사용하였다.

표1. RAPD 분석에 공시한 *R. undulata* 분리주 목록

균주번호	기 주	분 리 장 소
PDK-1	소나무 ( <i>Pinus densiflora</i> )	강원도 고성군
PDK-2	"	강원도 고성군
PDK-3	"	강원도 고성군
PDG-4	"	강원도 강릉시
PDS-5	"	강원도 삼척시 원덕읍 호산리
PDS-6	"	강원도 삼척시 근덕면 궁촌리
PDW-7	"	경북 울진군 북면
PDW-8	"	경북 울진군 고포리
PTT-1	해송 ( <i>P. thunbergii</i> )	충남 태안군
PTT-2	"	"
PTT-3	"	"
PTT-4	"	"
PTJ-1	"	일본
PTJ-2	"	일본

(2) Total DNA의 추출

균사로부터 Total DNA의 추출은 Yoon 등 (1991) 및 Promega사의 Wizard Genomic DNA purification kit를 사용하여 추출하였다.

그림 21은 25℃ PDA 배지에서 10일간 배양한 균사체를 상술한 각각의 방법에 따라서 추출하여 50ul의 TE에 현탁한 후, 그중 5ul를 Mupid21 (COSMO BIO CO.)를 사용하여 1% agarose gel (TBE buffer)에서 50V 30분간 전기영동에 의하여 분석한 결과로서, Yoon등(1991)의 방법<sup>9)</sup>에 의하여 추출한 DNA 보다 Promega사의 Wizard Genomic DNA purification kit를 사용하여 추출한 DNA의 추출 효율이 월등히 양호함을 알 수 있었다.

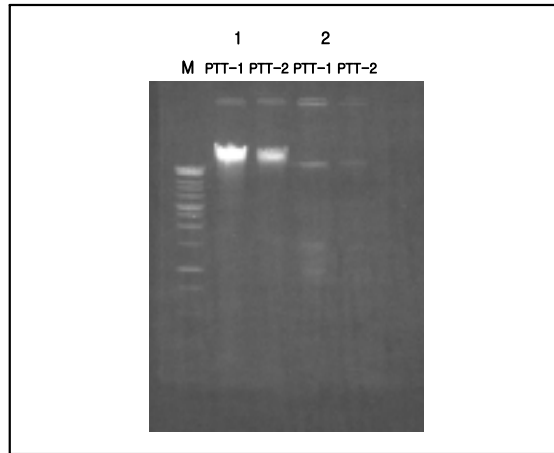


그림 21. *R. undulata* 균사체로부터 추출한 total DNA의 전기영동 분석. M : 1kb DNA ladder (Promega), Lane 1 : Wizard Genomic DNA purification kit로 추출한 DNA, Lane 2 : Yoon 등의 방법(1991)에 의하여 추출한 DNA.

### (3) PCR 조건

분리주 간의 유전적 변이 분석을 위한 RAPD를 실시하기에 앞서서, 최적의 PCR 조건 확립에 필요한 DNA의 농도가 PCR에 미치는 영향, RNase 처리가 PCR에 미치는 영향, 균사양에 따른 PCR 증폭산물의 비교, Random Primer의 농도가 PCR에 미치는 영향 등에 관하여 분석하였다. 단, PCR에 사용한 primer는 Operon 10-mer Kit B (Operon Tech.) 중에서 No. 17을 사용하였다.

그 결과, 그림 22에서 보는 바와 같이 각 분리주로부터 2종의 PCR products를 검출할 수 있었으며, total DNA의 양은 2ul의 DNA를 첨가하였을 때(lane 2)가 PCR 증폭산물의 농도가 가장 높았으며, 4ul에서는 반응 산물을 검출할 수 없었다(lane 4). 또한, total DNA를 RNase로 처리하였을 경우(lane 6)가 처리하지 않았을 경우 (lane 5)보다 증폭 산물의 농도가 높았으며, Random Primer의 농도는 10pM일 때, 증폭 산물의 농도가 가장 높았다. 한편, 분리주의 균사 0.01, 0.1, 1mg으로부터, 언급한 바와 같은 방법으로 각각 total DNA를 추출한 다음, PCR 증폭 산물을 분석한 결과, 각기 다른 균사 양으로부터 추출한 total DNA 간의 PCR 증폭 산물의 차이는 인정할 수 없었다. 따라서, 금 후의 실험에서는 1~2mg로부터 추출한 DNA를 본 실험에 사용하였다 (자료생략).

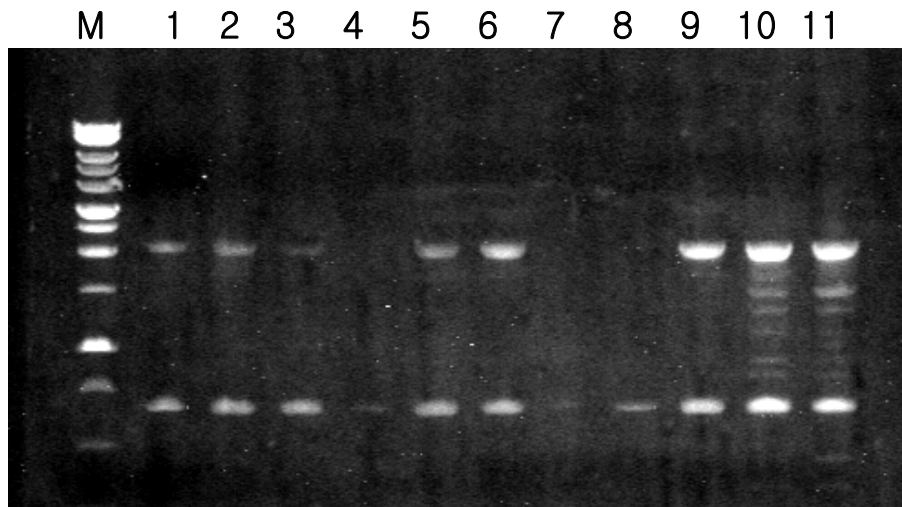


그림 22. Total DNA 및 Primer의 농도, RNase 처리가 PCR에 미치는 영향

- lane 1 : 1ul의 total DNA를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 2 : 2ul의 total DNA를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 3 : 3ul의 total DNA를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 4 : 4ul의 total DNA를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 5 : RNase를 처리하지 않은 total DNA를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 6 : RNase를 처리한 total DNA를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 7 : 2.5pM의 Random Primer를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 8 : 5pM의 Random Primer를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 9 : 10pM의 Random Primer를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 10 : 20pM의 Random Primer를 사용한 PCR의 증폭 산물
- lane 11 : 30pM의 Random Primer를 사용한 PCR의 증폭 산물

이상의 결과에 준하여 확립한 최적의 PCR 반응 조건은 다음과 같으며, RAPD분석은 동일한 방법으로 실시하였다.

<PCR mixture (25ul/1 reaction) condition>

Total DNA	2 ul
10× Taq pol. buffer	2.5 ul
25mM MgCl <sub>2</sub> stock	2.5 ul
10mM stock dNTP	1 ul
125pM decamer primer(OPERON Tech. KIT B)	2 ul
5unit/ul Taq pol.(Promega Co)	0.5 ul
dd water	14.5ul

아. 14종의 리지나뿌리썩음병균 분리주로부터 추출한 total DNA의 RAPD 분석

(1) RAPD (Random amplified polymorphic DNAs) 용 primer의 screening

RAPD에 사용할 primer의 screening을 목적으로 PTT-1 분리주를 대상으로 OPERON Tech. KIT B의 총 20종의 random primer (10-oligomer)를 공시하여 PCR을 실시하였다.

그 결과, 그림 23에서 보는 바와 같이, 총 14종의 primer에서 PCR products가 검출되었으며 그 중에서 1종 이상의 PCR products가 검출된 primer OPB-01, 03, 04, 06, 10, 11, 13, 14, 15, 17 및 20의 총 12종을 RAPD용 primer로 선발하였다.

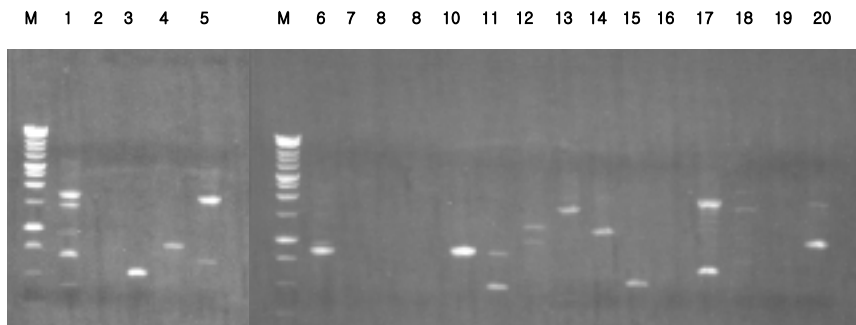
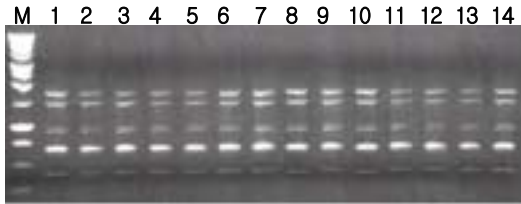


그림 23. random primer 20종을 사용한 *R. undulata* PTT-1균주 total DNA의 RAPD 분석. M : 1kb DNA ladder (Promega), Lane 1-20 : OPERON Tech. KIT B의 primer No (OPB) 1~20.

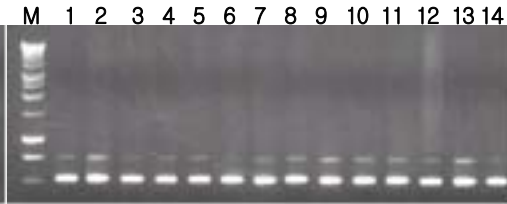
(2) PAPD 분석

Random Primer를 OPB-01부터 순차적으로 사용하여 RAPD를 실시한 후, 그 결과를 Mupid21(COSMO BIO CO.)를 사용하여 1.5% agarose gel(TBE buffer)에서 50V 30~60분간 전기영동에 의하여 분석한 결과 총 50 여종의 PCR 증폭 산물이 검출되었으며, primer OPB- No. 1, 3, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 15, 20에서는 모든 공시 분리주 간의 RAPD에 차이가 없었으나(그림 24 - A, B, C, D, F, G, H, I, J, 및 L), OPB-6 및 17을 사용하였을 때에는 국내 분리주와 일본 분리주간 strain의 RAPD에 차이를 확인할 수 있었다(그림 24 - E 및 K). 또한, 일본 분리주간에도 다소간의 RAPD의 차이가 인정되었다.

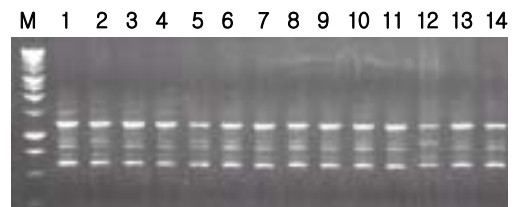
A



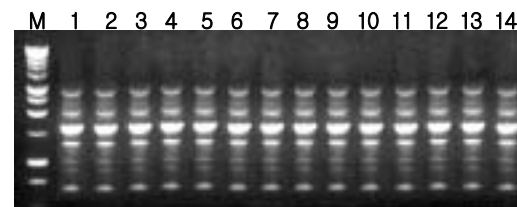
B



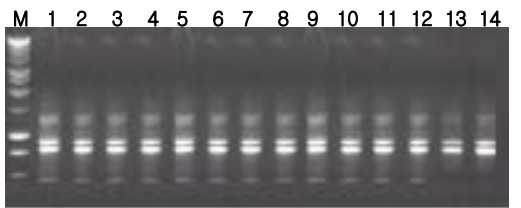
C



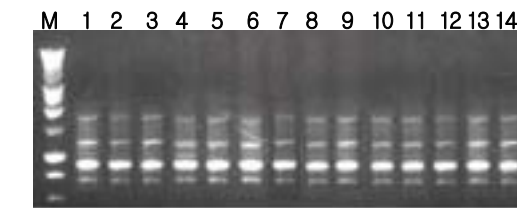
D



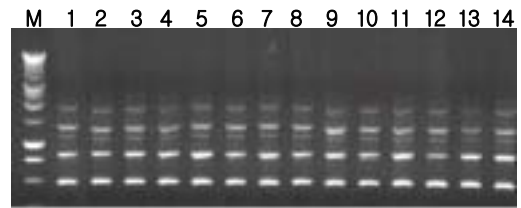
E



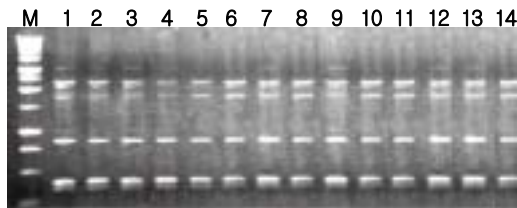
F



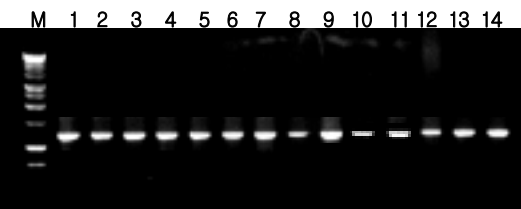
G



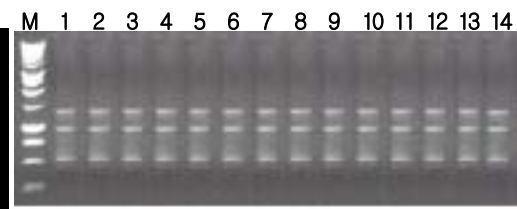
H



I



J





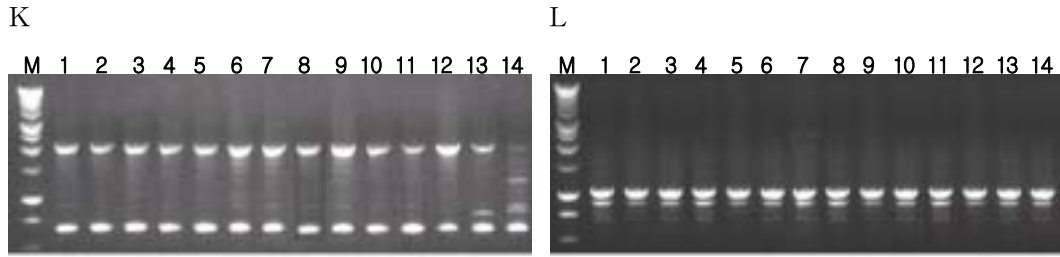


그림 24. OPB- No. 1 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D), 6 (E), 10 (F), 11 (G), 13 (H), 14 (I), 15 (J), 17 (K), 20 (L) (OPERON Tech. KIT B)를 primer로 사용한 *R. undulata* 분리주의 RAPD 분석. M, 1 kb DNA ladder (Promega Co.); lane 1, PDK-1; lane 2, PDK-2; lane 3, PDK-3; lane 4, PDG-4; lane 5, PTT-1; lane 6, PTT-2; lane 7, PTT-3; lane 8, PTT-4; lane 9, PDS-5; lane 10, PDS-6; lane 11, PDW-7; lane 12, PDW-8; lane 13, PTJ-1; lane 14, PTJ-2.

#### 자. 14종의 리지나뿌리썩음병균 간의 유전적 다양성 해석

RAPD 결과를 Gel-Doc 2000 (Bio-Rad Co.)의 UPGAMA program을 이용하여, 공시한 14종의 *R. undulata* 분리주들 간의 phylogenetic tree에 의한 유전적 유연관계를 분석하였다. 그 결과, 그림 25와 같이 국내 분리주들은 소나무 및 해송의 기주간은 물론이고, 지역간의 분리주 간에는 100%의 상동성을 나타내어 국내 분리주들은 현재까지는 변이주가 발생되지 않은 상태의 동일한 유전적 특성을 갖는 것으로 확인되었다. 그러나, 국내 분리주들과 일본분리주 PTJ-1과는 88% 및 PTJ-2와는 83%의 상동성을 나타내어 동일한 종으로 인정되기는 하지만, 분리주 간에 다소간의 유전적 변이가 발생되었음을 확인할 수 있었으며, 일본 분리주인 PTJ-1과 PTJ-2 사이에서도 부분적인 변이가 발생하였음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 일본에 비하여 국내에서 리지나뿌리썩음병이 발생한 시기가, 1980년대 후반으로, 비교적 짧기 때문에 변이주의 발생에는 충분치 않은 시간이었을 것이라는 것을 시사하여 주고 있으며, 일본 분리주인 PTJ-1과 PTJ-2 간의 유전적 상동성 보다도 국내 분리주와 일본 분리주인 PTJ-1의 상동성이 높다는 점은, 국내의 *R. undulata*가 일본으로부터 유입되었을 가능성이 높을 것이라고 추정된다.

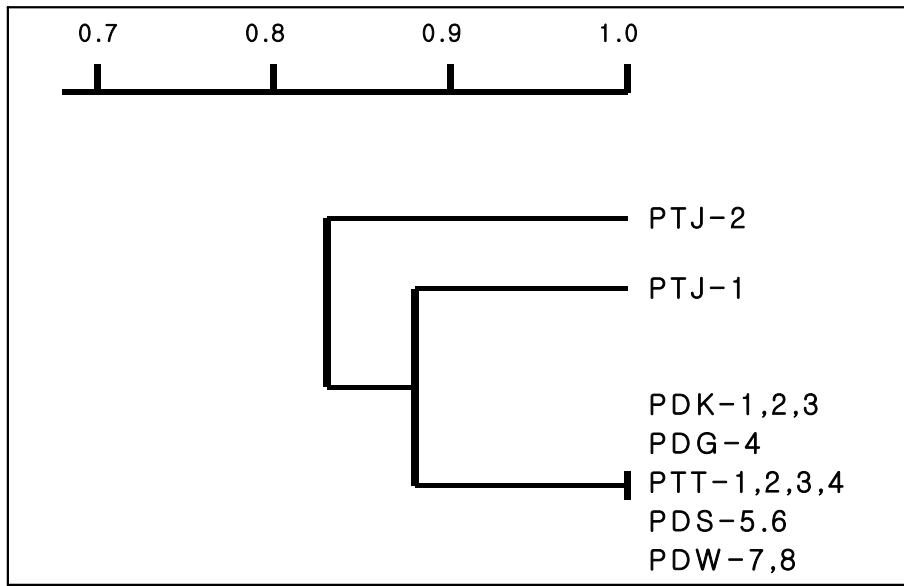


그림 25. RAPD 분석을 기초로 한 *R. undulata* 분리주들의 phylogenetic tree

## 제 2 절. 리지나뿌리썩음병의 발병생태와 소나무와의 관계

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 산불발생 정도별 리지나뿌리썩음병 발생조사

1) 조사장소: 강원도 동해안 일대 2000년 산불피해 지역(고성, 강릉, 삼척, 울진)

2) 조사내용 및 방법:

(1) 피해임지를 산불피해정도별(심, 중, 경)로 구분하고, 리지나뿌리썩음병균의 자실체 발생정도 및 임황, 식생 등을 조사

#### 나. 송이복원 조림지에서 조림 묘목의 고사율 및 생장 조사

1) 조사장소: 고성, 강릉, 동해, 삼척의 각 3개 조사구 (총 12개 조사구)

2) 조사내용 및 방법:

(1) 각 조사지역의 방위, 경사도, 하층식생 조사

각 조사 지역의 방위, 경사도, 하층 식생 등을 조사하여 참고자료로 사용하였다.

(2) 식재 용기묘의 고사율 및 생장 조사

2000년 4월 강원도 삼척, 강릉, 동해, 고성 등지의 대규모 면적에서 발생한 산불이후에 산화 이전에 송이가 발생하던 임지에서는 송이복원사업의 일환으로 송이발생임지에 소나무 용기묘를 이식하는 사업이 2001년부터 2004년까지 약 2,000만본의 소나무 용기묘를 연차적으로 생산하여 수행되고 있다. 그러나 산불발생 직후 침엽수의 뿌리에 기생하는 리지나뿌리썩음병균의 자실체가 산화임지에 만연하여 이 병해에 의한 송이복원용 용기묘의 피해가 우려되었으므로 이식 용기묘의 생존 및 생장에 미치는 영향을 조사하여 송이복원용 용기묘의 피해를 최소화할 수 있는 이식 적기를 선택하는 기초자료를 제공하고자 수행되었다.

○ 용기묘의 준비: 소나무 용기묘는 2000년 4월부터 소나무 용기묘의 일반적인 생산방법에 준하여 양묘하였다.

○ 용기묘 이식지의 선택: 2000년 산불발생 임지중에서 산화 이전에 송이발생이 많이 되었던 소나무 임지(삼척시 근덕면 용화리 산 278-1 영은사 사찰림)중에서 리지나뿌리썩음병균의 자실체가 만연한 임지

○ 용기묘의 이식: 용기묘는 2000년에 파종하여 양묘한 후에 2차에 걸쳐서 일부는 산화 6개월 후(2000년 10월)에 나머지는 산화 15개월 후(2001년 7월)에 해당 임지에 나

누어 이식하였고, 1차 이식 9개월 후(2001년 7월)와 30개월 후(2003년 5월)에 이식 용기묘의 생존과 성장(근원경, 수고, 가지발달 정도 등)을 조사 비교하였다.

### (3) 용기묘와 실생묘의 이식후 고사율 비교(속초)

2004년 4월에 산불이 발생한 강원도 속초시 조양동 온정리 산 93-1에 소나무 용기묘와 일반 묘목을 산불 발생 2개월 후인 2004년 6월 11일에 소나무 용기묘 60본과 일반 묘목 60본을 섞어서 각각 30분씩 산불발생 ‘십’ 지역과 ‘경’ 지역에 나누어 식재하고 식재후 2,5개월이 지난 8월 28일에 용기묘와 실생묘의 고사율을 비교하였다.

#### 다. 리지나뿌리썩음병균의 병원성 검정

- 용기묘 생산토양: 일반적으로 용기묘 생산에 사용하는 토양으로 peat moss: vermiculite: perlite가 2:1:1의 비율로 혼합.
- 토양처리: 토양은 멸균처리한 것과 멸균처리하지 않은 비멸균토양을 사용
- 소나무 수종: 2종(*Pinus densiflora*, *P. thunbergii*).의 종자를 표면소독하여 발아시킨 후에 멸균한 토양에서 이식하고 growth chamber내 무균상태에서 생육하여 사용.
- 리지나뿌리썩음병균의 배양 및 접종:  
리지나뿌리썩음병균을 PDB에서 액체 진탕배양하여 균사체를 수확하고 blender로 갈아 균사현탁액을 제조하여 각 처리별로 500 ml 균사현탁액 접종하고 상온에서 생육.

#### 라. 소나무 용기묘 균근형성 조사

##### 1) 시설 양묘 용기묘의 시기별 균근형성

- 소나무 용기묘: 송이발생 임지의 복원을 위하여 삼척, 강릉, 홍천에 위치한 산림조합 양묘장에서 생산중인 소나무 용기묘
- 용기묘의 확보: 매월 1회 양묘장을 방문하여 무작위로 양묘관을 실험실로 이동하여 뿌리에 형성된 균근을 관찰하고 형성율을 조사
- 균근형성 조사: 유묘의 root tip을 100개씩 해부현미경하에서 관찰하여 외생균근에 의하여 형성되는 전형적인 특징인 Y자형 분지를 확인

## 2) 베노밀과 목초액의 관주처리가 용기묘의 균근형성에 미치는 영향

소나무 속(*Pinus species*)에 속하는 유묘의 성장에는 토양내의 뿌리에서 공생관계를 형성하는 외생균근이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 연구는 산불발생 후 복원조림용으로 대량생산되고 있는 소나무 용기묘의 생산시 범용성 살균제 베노밀과 살균 및 영양제의 효과가 있는 것으로 알려져 최근 농림업 분야에서 많이 사용되고 있는 목초액을 사용시 소나무(*Pinus densiflora*) 유묘에서의 균근형성 및 성장에 미치는 영향을 조사하고자 다양한 처리 농도 및 처리 빈도에 의한 소나무 유묘의 균근형성 및 성장을 조사하였다.

○ 소나무 유묘의 생산: 소나무 종자는 표면소독 후 멸균토양에 파종하여 성장상내에서 65일간 생육하여 펄라이트, 피트모스, 버미큘라이트를 2:1:1(v:v:v)로 혼합한 멸균 및 비멸균 토양이 담긴 포트(450 ml)에 이식한 후 25℃, 50%(RH) 성장상에서 광, 암교대(12:12 시간)로 관리하면서 양묘하였다. 관수는 4-5일 간격으로 pot당 100ml씩 증류수를 관수하였고, 3주 간격으로 3회에 걸쳐 Hoagland's nutrient solution을 처리하여 양분을 공급하였다.

○ 균근균의 배양 및 접종: 접종원으로 사용한 균근균은 4종으로 모래발버섯(*Pisolithus tinctorius*), 자갈버섯(*Hebeloma cylindrosporium*), 알버섯(*Rhizopogon rubescens*), 황소비단그물버섯(*Suillus bovinus*)이고 이들을 PDB(Potato Dextrose Broth)에 접종하여 25℃, 125 rpm의 진탕배양기에서 90일간 배양한 후 수확한 균사체를 blending하여 제조한 현탁액을 각 pot 당 5g/100ml씩 접종하였다.

○ 베노밀 및 목초액의 관주처리: 베노밀과 목초액은 외생균근균 접종 후 2주와 8주 간격으로 총 16주까지 처리하였고, 베노밀의 처리농도는 1회 처리시 25mg과 10mg/100ml, 목초액은 1ml와 0.1 ml/100ml을 처리하였다. 처리한 유묘는 성장실에서 관리 후(Fig.1), 수확하여 외생균근 형성시 전형적인 특징인 Y자형의 분지된 균근의 숫자를 조사하였고(Fig.2), 지상부와 지하부의 중량 및 수고, 근원경 등을 측정하여 비교하였다.

### 마. 소나무 균근균과 리지나뿌리썩음병균과의 상호관계

1) 베노밀과 목초액이 소나무 외생균근균과 리지나뿌리썩음병균의 균사 성장에 미치는 영향

(1) 목초액이 소나무 외생균근균과 리지나뿌리썩음병균의 균사생장에 미치는 영향

## (2) 목초액과 소나무 외생균근

소나무의 뿌리와 공생하는 4종의 균근균(mycorrhizal fungi), 모래발버섯(*Pisolithus tinctorius*), 알버섯(*Rhizopogon rubescens*), 황소비단그물버섯(*Suillus bovinus*), 자갈버섯(*Hebeloma cylindrosporum*)과 리지나뿌리썩음병균(*Rhizina undulata*)에 대하여 목초액의 농도를 달리한 배양배지에서 균사의 성장 억제 및 촉진 효과를 측정하였다. 접종원으로 사용한 균근균의 균주는 PDA 배지상에서 3주간 배양하여 사용하였으며, 리지나뿌리썩음병균의 균주는 1주간 배양한 균사의 가장자리를 cork borer(5 mm dia.)로 떼어내어 사용하였다.

목초액을 첨가한 배지는 참나무 목초액(강원도 산림개발연구원 제공) 원액을 PDA 배지에 농도별로 희석하여 첨가하였으며 희석농도는 10배액(100,000 $\mu$ g/ml), 100배액(10,000 $\mu$ g/ml), 1000배액(1,000 $\mu$ g/ml), 1500배액(750 $\mu$ g/ml), 2000배액(500 $\mu$ g/ml)으로 하였다.

## (3) 목초액과 리지나뿌리썩음병균(일본, 태안)

### 2) 베노밀이 소나무 외생균근균과 리지나뿌리썩음병균의 균사생장에 미치는 영향

목초액의 방법과 동일하게 적용하여 실험하였다.

### 2) 소나무 외생균근균의 대사분비물질이 리지나뿌리썩음병균의 균사 성장과 포자발아에 미치는 영향

#### (1) 균근균 대사분비물질이 리지나뿌리썩음병균의 균사생장에 미치는 영향

##### ○ 사용 균근균 및 뿌리병원균

- 균근균: 3종 (자갈버섯, 모래발버섯, 황소비단그물버섯)
- 뿌리병원균: 리지나뿌리썩음병균(일본, 태안)

##### ○ 균근균 배양

접종원은 PDA에서 1개월동안 배양한 균근균을 cork borer로 가장자리를 떼어내어 300ml PDB배지에 5개씩 접종하여 3개월간 배양하면서 매일 균사배양액을 수확.

배양조건: 25C, 암상태 진탕배양기에서 125 rpm으로 배양

○ 병원균의 배양  
25C, 암상대 항온배양기에서 7일간 배양

○ 접종배지의 조성  
250ml 증류수에 19.5g PDA와 균근균 배양액 250ml(멸균 disc filtering)

(2) 균근균 대사분비물질이 리지나뿌리썩음병균의 포자형성 및 발아에 미치는 영향

## 2. 결과 및 고찰

가. 산불발생 정도별 리지나뿌리썩음병 발생조사

산불피해 정도별(심-수관화, 중-수간화, 경-지표화) 리지나뿌리썩음병균의 자실체 발생빈도는 산불피해 정도와 상관관계가 있는 것으로 조사되었다. 즉, 산불발생 정도가 ‘심’ 지역에서의 자실체 발생빈도는 산불발생 ‘경’ 지역의 발생빈도보다 대체로 높게 나타났다.

산불발생 조사지의 방위는 다양하였으며, 경사도는 5-40도에 걸쳐 분포하였으나 대부분 20-40도 사이에 많이 분포하였고, 식생은 주로 소나무, 신갈, 떡갈, 졸참, 굴참나무 등의 참나무류, 아까시나무, 진달래, 철쭉 등의 철쭉류, 조록싸리, 참싸리 등의 싸리류 등이 우세하였다. 그외에도 억새, 산겨울, 청미래덩굴, 닭의 장풀 등도 흔히 발견되었다.(Table 1)

Table 1. Frequency of fruiting body development of *Rhizina undulata*, degree of fire damage, and understory vegetations in 20 fire-damaged pine forest stands

Site Locations surveyed	Degree <sup>1)</sup> of fire damage	Orienta-tion	slope	Understory vegetation <sup>2)</sup>	Frequency <sup>3)</sup> of fruiting bodies	
Kosung	Toseong I	M	W	40	Q, R, Rh, L	++
	Toseong II	S	W	20	Q, R, Rh, L	+++
	Toseong III	S	E	25	Q, R, L	+++
	Toseong IV	N	N	20	Q, R, Rh, L	-
	Toseong V	S	W	10	Q, R	++
	Toseong VI	M	N	10	Q, R, L	+++
	Geojin	S	N	20	Q, R	+++
Jookwang	M	EN	5	Q, L	+++	
Gangnung	Inhyun	S	EN	10	R	++
	Sacheon	M	SW	10	Q, R	++
Samcheok	Geonduk I	M	WS	25	Q, L	++
	Geonduk II	S	WN	40	Q, L	+++
	Geonduk III	L	SE	52	Q, L	+
	Geonduk IV	N	SW	38	Q, L	-
	Geonduk V	S	S	40	Q, R	++
	Wonduk I	S	S	20	Q, P	++
	Wonduk II	L	WS	40	Q, L	+
Uljin	Wonduk III	S	S	15	Q, L	++
	Nagok	S	W	40	R	++
	Gumseong	S	NW	10	R	++

<sup>1)</sup> Degree of fire damage; S: severe, M: moderate, L: light, N: no damages.

<sup>2)</sup> Understory vegetation; Q: *Quercus* spp., R: *Robinia* spp., Rh: *Rhododendron* spp., P: *Populus* spp., L: *Lespedeza* spp.

<sup>3)</sup> Frequency of fruiting body development of *Rhizina undulata*; +++: abundant, ++: very often, +: few, -: no development of fruiting bodies.



나. 송이복원 조림지에서 조림 묘목의 고사율 및 생장 조사

1) 각 조사지역의 방위, 경사도, 하층식생 조사

송이 복원조림지에 식재된 소나무 용기묘의 리지나뿌리썩음병에 의한 피해유무를 조사하기 위하여 고성, 강릉, 동해, 삼척지역의 2001년 조림지를 대상으로 조사구 설정 및 식생, 임황 등을 조사한 결과는 Table 2 및 3과 같다.

Table 2. Plotting of survey sites for the investigation of the effects of Rhizina root rot on containerized pine seedlings transplanted in fire-burned Matsutake-produced pine forests

지역	조사구 설정위치	방위	경사도	식 생
고성 I	고성군 죽왕면 인정리 산 86번지	SE	18	물오리나무, 참나무, 생강나무, 국수나무, 개웃나무 등
고성 II	"	N	24	
고성 III	"	S	14	
강릉 I	강릉시 사천면 노동리 123-2번지	S	23	곰솔, 뱀딸기, 산딸기, 비수리, 산썩 등
강릉 II	"	N	28	
강릉 III	"	S	22	
동해 I	동해시 지흥동 190번지	SW	24	조개풀, 물오리나무, 기생여뀌, 구절초 등
동해 II	"	SW	24	
동해 III	"	SW	24	
삼척 I	삼척시 근덕면 용화리 140	SE	30	고사리, 양지꽃, 조록싸리, 산초나무, 초피나무 등
삼척 II	"	S	32	
삼척 III	"	E	40	



Fig. 1. 송이복원조림지에 식재(2001.10)한 용기묘의 리지나뿌리썩음병에 의한 피해 유무 및 생장을 조사하기 위한 조사구 설정작업 (강원도 강릉, 2001. 12. 19.)

Table 3. The plant flora(vegetation) in fire-burned pine forests, where Matsutake mushroom was produced before fire outbreak

Location	Classification	Total # of species
Kosung	19(family) 35(genus) 39(species) 5(varieties)	44
Gangnung	22, 37, 42, 7	49
Donghae	12, 17, 19, 1	20
Samcheok	1, 28, 33, 6	39

Investigation was done during June 20-22, 2002.

## 2) 식재 용기묘의 고사율 및 생장 조사

고성, 강릉, 삼척 지역(동해 지역은 산불발생후 개발과 접근의 어려움으로 인하여 조사에서 제외)의 송이복원조림지에 식재된 소나무 용기묘의 고사율과 생장을 각 지역 별로 3개 지역씩 선정하여 조사한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Mortality and growth of containerized pine seedlings transplanted in Matsutake-produced pine forests after forest fire

Site	Kosung			Gangnung			Samcheok		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Growth	18SE	24N	14S	23S	28N	22S	30SE	32S	40E
Good	50	58	44	55	41	48	52	26	41
Bad	0	3	11	1	5	3	6	3	3
Dead	2	2	1	8	0	5	9	11	3
	52	63	56	64	46	56	67	40	47

transplanted date: 2001.10, surveyed date: 2003. 5. 22

Kosung: San 86, Injung-Ri, Jukwang-Myun, Kosung-Gun (two times of fire at '96 and '01)

Gangnung: 123-2, Nodong-Ri, Sacheon-Myun, Gangnung

Samcheok: 140, Yongwha-Ri, Keunduk-Myun, Samcheok

산화 6개월 후에 이식한 용기묘는 이식 9개월 후에 평균 고사율이 22%로 다소 높았고 30개월 후에는 고사율이 32%를 나타내어 약 10% 증가하였으나, 산화 15개월 후에 이식한 용기묘는 이식 15개월 후 고사율이 8%를 나타내어 산화 후 리지나뿌리썩음병균의 자실체가 만연한 시기에 이식한 용기묘의 고사율이 리지나뿌리썩음병균의 자실체가 거의 소멸된 산화 15개월후에 이식한 경우보다 3-4배나 높은 것으로 나타났다 (Table 5). 이 결과는 산화에 의해 리지나뿌리썩음병이 심하게 발생한 임지에서 당해 연도에 이식한 묘목의 고사율은 높게 나타났지만 산화 2-3년이 지난 후에 묘목을 이식시에는 이 병해에 의한 피해를 상당히 줄일 수 있다는 외국의 보고와 어느 정도 일치하는 경향을 나타내고 있다.

또한 산화 15개월이 지난 후에 이식한 용기묘가 근원경, 수고, 가지 발달 정도에 있어서 산화 6개월 후에 이식한 용기묘보다 다소 높은 것으로 나타났다. 따라서 리지나뿌리썩음병균에 의한 소나무 용기묘의 생존 및 성장 피해를 최소화하기 위해서는 용기묘를 산화 15개월 이후에 이식하는 것이 바람직하나 송이발생임지의 경우에는 송이균근 형성복원을 위하여 토양내 송이 균근의 활력이 유지되는 산화 후 1년 이내로 이식 시기를 앞당기는 것이 필요하므로 이식한 용기묘에서의 송이균근 형성여부를 시기적

으로 확인하여 리지나뿌리썩음병에 의한 피해를 최소화하면서 송이균근 형성율을 제고시킬 수 있는 최적의 이식시기 및 방법을 탐색하는 연구가 추가적으로 필요하리라 판단된다.

Table 5. Mortality and growth of containerized pine seedlings transplanted in Matsutake-produced pine forests after forest fire

Degree of fire damage	Severe						Light					
	1		2		3		1		2		3	
Replication												
transplanted year	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001
Good	11	12	9	15	6	12	7	14	13	5	4	14
Bad	4	2	3	0	3	0	1	0	2	15	5	1
Dead	5	6	3	0	6	2	7	0	5	0	6	9
Total	20	20	15	15	15	14	15	14	20	20	15	15

fire outbreak date: April 10, 2000.

transplanted date of containerized pine seedlings: 1st - October 4, 2000(6 months after fire), 2nd - June 10, 2001(15 months after fire).

age of seedlings: one year old seedling (1st planting), two year old seedling (2nd planting).

### 3) 용기묘와 실생묘의 이식후 고사율 비교(속초)

용기묘와 실생묘를 이식한 후, 2.5개월 후에 고사율을 비교한 결과, 용기묘는 고사율이 0%인데 비하여 실생묘는 31.7%의 높은 묘목 고사율을 나타내었다. 산불피해 정도 별로는 산불피해가 경한 지역에 식재된 실생묘가 심 지역에 식재된 실생묘보다 고사율이 2배 이상 높게 나타났다 (Table 6). 산불발생 4.5개월 후, 묘목 이식 2.5개월 후인 8월 말경의 조사에 의하면 산불피해 ‘심’ 과 ‘경’ 지역 모두에서 리지나뿌리썩음병균의 자실체가 발견되었다. 이 결과에 의하면 용기묘는 실생묘에 비하여 리지나뿌리썩음병에 저항성을 나타내는 것으로 확인되었으며 향후 송이발생산에 산불 발생시 송이복원조립을 위하여 당해년도에 조립하여도 리지나뿌리썩음병에 피해를 입지 않고

성공적으로 활착할 수 있는 것으로 확인되었다.

Table 6. Comparison in seedling mortality of containerized and natural pine seedlings transplanted in fire damaged pine forests

Degree of fire damage	Severe			Light			Mortality (%)
	1	2	3	1	2	3	
Replication							
Containerized seedling	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
Natural seedling	2/10	2/10	2/10	3/10	7/10	3/10	31.7
Mortality(%)	20			43.3			

transplanted site: San 93-1, Onjeong-Ri, Choyang-Dong, Sokcho.

transplanted date: June 11, 2004 (2 months after fire).

surveyed date: August 28, 2004 (2.5 months after transplanting)

Containerized and natural pine seedlings are one and three year old seedling, respectively.



Fig. 2. Fruiting bodies of *Rhizina undulata* produced on the surface of burned pine forest soil in April 11, 2004. (2004. 8. 28. Choyang-Dong, Sokcho)

Fruiting bodies were produced in both 'severely' and 'lightly' damaged forests.

#### 다. 리지나뿌리썩음병균의 병원성 검증

용기묘의 경우, 멸균하지 않은 토양에서 멸균처리한 것보다 소나무와 해송 모두 균근 형성율이 큰 차이는 없지만 조금 높게 나타났는데, 그 이유는 용기묘의 경우 이식 당시에 이미 균근이 형성되어 있는 상태이므로 리지나에 의한 피해가 적은 것으로 생각된다.

무균묘의 경우에는, 멸균처리하지 않은 토양에서 멸균처리한 토양보다 소나무와 해송 모두 균근형성율이 2-3.5배 이상 증가하는 경향을 나타내었는데, 그 이유는 토양멸균 후에 리지나뿌리썩음병균을 접종하면 병원균의 생장이 용이하여 균근형성율이 억제되나, 비멸균토양에서는 리지나뿌리썩음병균의 생장이 다소 억제되어 균근형성이 증가하는 것으로 추정된다.

Table 7. 실험묘목 결과조사(용기묘)

Treatment		Height		Fresh weight		Dry weight		근원경	균근형성율
		지상부	지하부	지상부	지하부	지상부	지하부	(mm)	%
PSS 해송	1	17.32	17.24	3.82	2.09	0.73	0.69	3	34
	2	15.35	26.83	4.39	3	1.65	0.89	3.3	26
	3	14.4	25.42	3.19	2.27	1.39	0.85	2.9	32
	4	19.09	15.09	3.25	1.38	1.32	0.45	2.1	30
	5	21.86	22.08	5.52	2.54	2.37	0.88	3.6	42
	6	16.72	15.25	2.47	1.93	0.91	0.56	3.1	16
	평균	17.46	20.32	3.77	2.2	1.4	0.72	3	30
PSN 해송	1	20.85	28.96	5.69	4.11	2.66	1.38	4.3	28
	2	21.68	21.52	4.53	4.59	2.06	1.4	4	20
	3	19.91	20.66	3.79	3.37	1.74	0.82	2.7	50
	4	22.47	22.27	3.49	2.64	1.59	0.84	3	28
	5	22.62	19.8	5.51	5.54	2.37	1.58	4	34
	6	19.25	17.11	4.39	4.71	2.32	1.38	3.5	44
	평균	21.13	21.72	4.57	4.16	2.12	1.23	3.58	34
PSS 해송	1	17.32	17.24	3.82	2.09	0.73	0.69	3	34
	2	15.35	26.83	4.39	3	1.65	0.89	3.3	26
	3	14.4	25.42	3.19	2.27	1.39	0.85	2.9	32
	4	19.09	15.09	3.25	1.38	1.32	0.45	2.1	30
	5	21.86	22.08	5.52	2.54	2.37	0.88	3.6	42
	6	16.72	15.25	2.47	1.93	0.91	0.56	3.1	16
	평균	17.46	20.32	3.77	2.2	1.4	0.72	3	30
PSN 해송	1	20.85	28.96	5.69	4.11	2.66	1.38	4.3	28
	2	21.68	21.52	4.53	4.59	2.06	1.4	4	20
	3	19.91	20.66	3.79	3.37	1.74	0.82	2.7	50
	4	22.47	22.27	3.49	2.64	1.59	0.84	3	28
	5	22.62	19.8	5.51	5.54	2.37	1.58	4	34
	6	19.25	17.11	4.39	4.71	2.32	1.38	3.5	44
	평균	21.13	21.72	4.57	4.16	2.12	1.23	3.58	34

실험요목 결과조사(무균묘)

Treatment		Height		Fresh weight		Dry weight		근원경	균근형성율
		지상부	지하부	지상부	지하부	지상부	지하부	(mm)	%
PSS 강송	1	9.63	15.37	0.5	0.56	0.2	0.13	1.7	2
	2	6.47	17.32	0.14	0.18	0.11	0.06	1	20
	3	7.47	12.94	0.19	0.17	0.07	0.07	1.1	0
	4	8.14	17.32	0.24	0.27	0.17	0.08	1.3	4
	5	8.37	12.49	0.26	0.17	0.11	0.07	1.1	12
	평균	8.02	15.09	0.27	0.27	0.13	0.08	1.24	7.6
PSN 강송	1	10.25	28.27	1.29	1.06	0.55	0.31	2.2	26
	2	10.72	26.24	1.3	1.31	0.52	0.41	2.1	14
	3	10.89	22.46	1.07	1.13	0.43	0.38	2.3	32
	4	13.45	30.11	0.99	1.31	0.48	0.41	2.4	58
	5	12.21	31.79	0.98	1.31	0.45	0.42	2	40
	6	10.78	22.36	1.22	1.05	0.48	0.26	1.9	6
	평균	11.38	26.87	1.14	1.2	0.49	0.37	2.15	29.33
PSS 해송	1	9.55	19.51	0.37	0.41	0.13	0.12	1.1	24
	2	10.77	18.36	0.67	0.47	0.28	0.09	1.4	16
	3	8.38	21.19	0.45	0.37	0.21	0.11	1.2	40
	4	11.93	19.78	0.74	0.57	0.35	0.21	1.6	4
	5	8.57	16.53	0.23	0.24	0.06	0.05	1	2
	평균	9.84	19.07	0.49	0.41	0.2	0.12	1.26	17.2
PSN 해송	1	12.33	17.93	1.63	0.73	0.71	0.27	2.2	28
	2	14.61	20.06	1.71	0.76	0.68	0.28	1.8	38
	3	14.97	20.18	2.66	2.16	1.07	0.65	2.6	28
	4	17.93	15.11	3.81	1.79	1.51	0.59	3.1	34
	5	15.82	15.18	1.74	1.15	0.74	0.33	2.5	14
	6	17.04	20.78	3.63	1.64	1.69	0.54	2.8	38
	평균	15.45	18.21	2.53	1.37	1.07	0.44	2.5	30

PSS: sterilized soil

PSN: non-sterilized soil

Pine seedlings were dead by the pre-inoculation of root pathogens within 6 days



after inoculation, except *R. undulata* which required 9–12 days. Among root pathogens tested, *F. oxysporum* was the most pathogenic with the mortality of 44% (Table 8).

Table 8. Seedling mortality of pine by different inoculation methods of root pathogens

Inoculation methods	<i>Rhizoctonia solani</i> (1)	<i>R.solani</i> (2)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizina undulata</i> (1)	<i>R.undulata</i> (2)
Before <sup>1)</sup>	3/25 <sup>a)</sup>	3/25	11/25	5/25	4/25
Simultaneous	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25
After	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25

<sup>a)</sup> Number of dead seedlings/total number of inoculated seedlings.

<sup>1)</sup> Inoculation methods. Before: inoculation of root pathogens before ECM fungi, Simultaneous: inoculation of both root pathogens and ECM fungi at the same time, After: inoculation of root pathogens after ECM fungi.



Fig. 3. Inoculated pine seedlings in the pots placed in clean growth room.

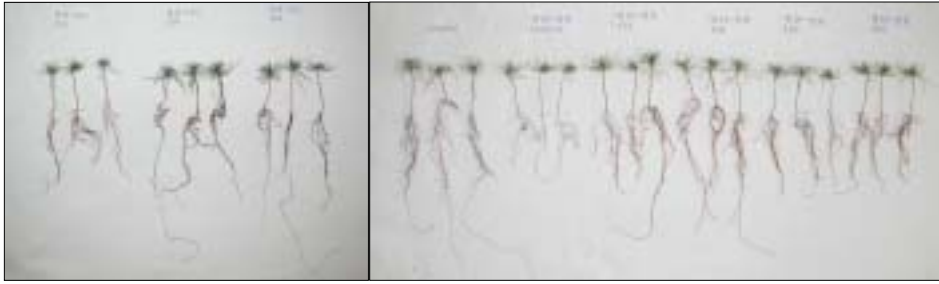


Fig.4. Seedling growth of red pine (left) treated with *R. solani*(1) before, simultaneous, and after *Suillus bovinus*, (right) treated with *Rhizina undulata*(1) before ECM fungi.

라. 소나무 용기묘 균근형성 조사

1) 시설 양묘 용기묘의 시기별 균근형성

송이복원조림용 소나무 용기묘의 뿌리에 형성된 외생균근 형성유무를 시기별로 확인한 결과, 파종 170일경에는 강릉과 홍천지역 용기묘는 각각 88.3%와 83.3%를 나타낸 반면, 삼척지역의 용기묘는 68.3%의 균근형성율을 나타내었다. 그러나 215일경이 지난 시점에는 3개 지역 모두 약 98%의 균근형성율을 나타내었다.(Table 9)

Table 9. The rates of ectomycorrhizal formation on containerized pine seedlings from three different locations by time

Locations	days after seeding		
	170	200	215
Samcheok	68.3 (41/60)	86.7 (52/60)	97.6 (83/85)
Gangnung	88.3 (53/60)	95.0 (57/60)	97.6 (81/83)
Hongcheon	83.3 (50/60)	96.7 (58/60)	98.8 (82/83)



Fig. 5. (좌) 송이복원조림용 소나무 용기묘 생산시설 (삼척), (우) 소나무 용기묘 뿌리에 형성된 전형적인 Y자 모양의 균근. 균근이 형성된 뿌리의 근단부위는 균근균의 생장으로 흰색~노란색으로 나타남.

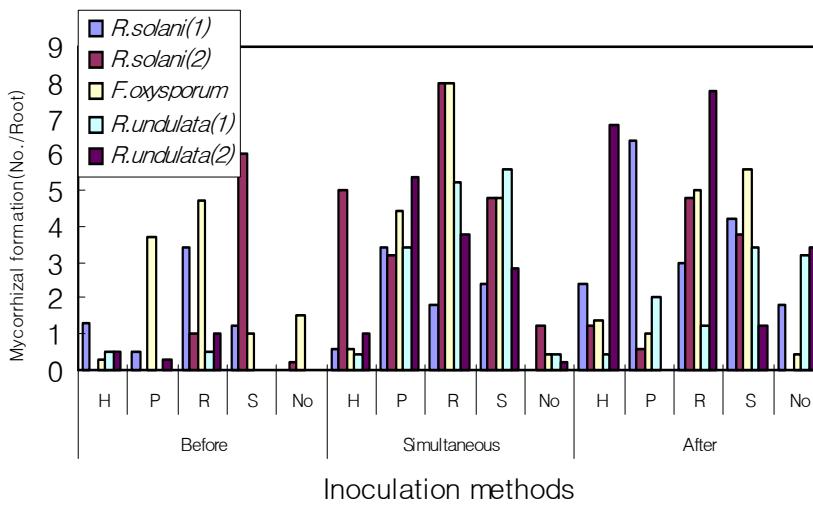


Fig. 6. Mycorrhizal formation of red pine seedlings by the inoculation of both root pathogens and ECM fungi in combinations of before, simultaneous, and after treatment of ECM fungi.

H: *Hebeloma cylindrosporium*, P: *Pisolithus tinctorius*, R: *Rhizopogon rubescens*, No: No mycorrhizal fungi

2) 베노밀과 목초액의 관주처리가 용기묘의 균근형성에 미치는 영향

균근균의 접종처리는 무처리에 비해서 토양의 멸균 및 비멸균에 상관없이 균근의 형성이 증가되었으며, 균근형성은 모래발버섯, 자갈버섯, 알버섯, 황소비단그물버섯의 순으로 효과적이었다. 멸균토양과 비멸균토양에서의 균근형성을 비교시 일반적으로 멸균토양보다는 비멸균토양에서 균근의 형성이 다소 많았으나 모래발버섯의 경우에는 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 7). 베노밀의 처리시 균근의 형성은 대부분의 처리에서 증가하는 경향을 나타내었으나 처리농도 및 처리빈도에 따라서 다소 차이가 있었다. 모래발버섯과 자갈버섯의 경우에는 2주 간격으로 25 mg/ml의 농도로 처리시 멸균 및 비멸균토양에서 모두 균근형성이 가장 많았으나, 알버섯과 황소비단그물버섯의 경우에는 2주 간격으로 10 mg/ml의 농도로 처리시 가장 효과적이었다. 균근의 형성이 촉진되는 처리에서는 무처리에 비해서 지상부, 지하부의 중량 및 수고, 근원경도 대부분 증가하였다 (Fig. 8).

그러나 목초액의 처리시에는 목초액 무처리시보다 대부분의 경우에 균근형성이 저조하였으며 지상부, 지하부의 중량 및 수고, 근원경도 감소하였으나 목초액의 처리 농도와 처리 빈도에 따른 균근형성에 있어서는 특별한 경향을 나타내지 않았다. 일반적으로 비멸균토양에 비해서 멸균토양에 목초액을 처리시 균근형성이 상대적으로 낮은 경향을 나타내었다 (Fig. 9).

이상의 결과에서와 같이 베노밀과 목초액의 처리는 소나무 유묘의 균근형성 및 생장에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 처리 농도와 처리 빈도가 중요한 요인으로 작용하는 것으로 생각된다.

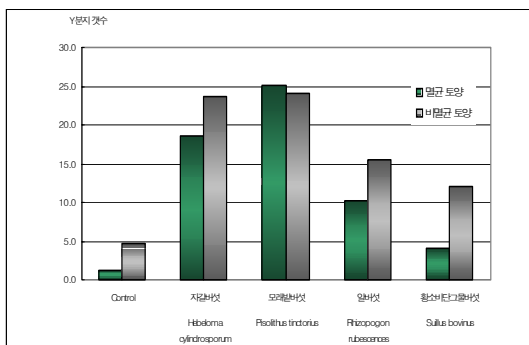


Fig. 7. Comparison in ectomycorrhizal formations of pine seedlings inoculated with different ectomycorrhizal fungi in sterilized and non-sterilized soil.

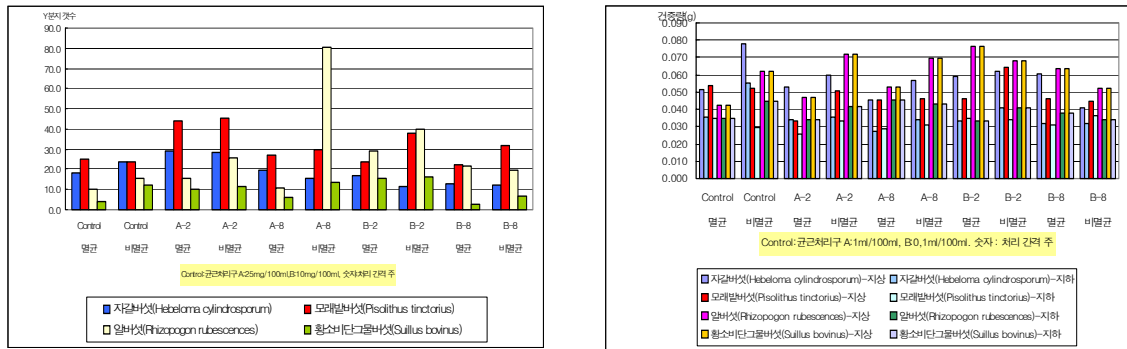


Fig. 8. Trenching effect of benomyl on ectomycorrhizal formation (left) and dry weight (right) of pine seedlings grown in sterilized and non-sterilized soils.

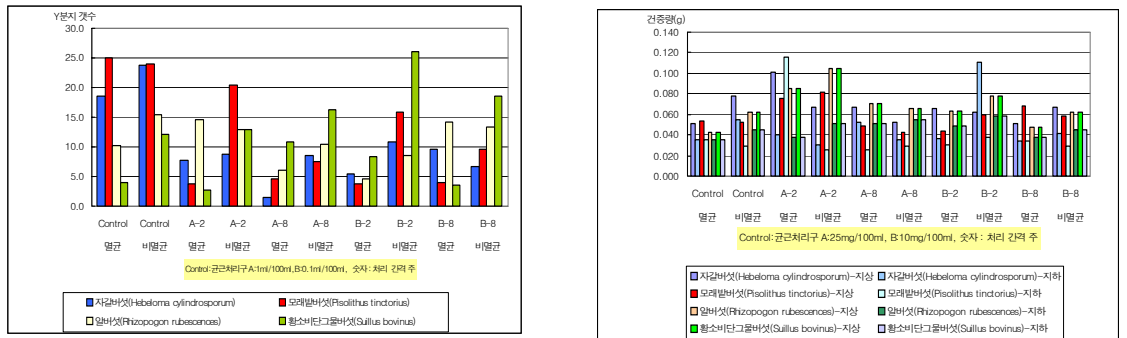


Fig. 9. Trenching effect of wood vinegar on ectomycorrhizal formation (left) and dry weight (right) of pine seedlings grown in sterilized and non-sterilized soils.

#### 마. 소나무 균근균과 리지나뿌리썩음병균과의 상호관계

1) 베노밀과 목초액이 소나무 외생균근균과 리지나뿌리썩음병균의 균사 성장에 미치는 영향

(1) 목초액이 소나무 외생균근균과 리지나뿌리썩음병균의 균사 성장에 미치는 영향

토양내에서 소나무의 뿌리와 공생하며 소나무의 성장에 유용한 역할을 하는 다양한 종류의 균근균에 대한 목초액의 농도별 억제 및 촉진효과를 조사한 결과, 균근균의 종류에 따라 다소 차이가 있었지만 고농도인 10배(100,000 $\mu$ g/ml) 및 100배 희석액

(10,000 $\mu\text{g/ml}$ )에서는 처리한 모든 균근균의 생장이 완전히 억제되었다. 그러나 저농도인 1000배액(1,000 $\mu\text{g/ml}$ ), 1500배액(750 $\mu\text{g/ml}$ ), 2000배액(500 $\mu\text{g/ml}$ )에서는 대조처리인 목초액을 첨가하지 않은 배지에서의 성장량과 거의 비슷하거나 경우에 따라서 오히려 촉진되는 효과가 있는 것으로 확인되었다. 모래밭버섯의 경우에는 접종후 13일째 750 $\mu\text{g/ml}$ 에서의 균사성장량이 대조처리와 거의 비슷하였고(Fig.10-1.), 황소비단그물버섯과 자갈버섯은 1000, 1500, 2000배액로 희석된 저농도에서는 대조처리보다 오히려 생장이 촉진되는 효과가 나타났다(Fig.10-2, Fig.10-3). 그러나 알버섯의 경우에는 저농도에서도 대조처리에 비하여 생장이 억제되었으며 희석농도가 고농도로 갈수록 균사성장량은 감소되어 100배의 희석농도에서는 균사생장이 완전히 억제되었다(Fig.10-2).

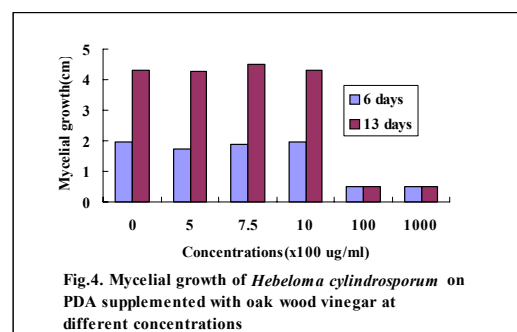
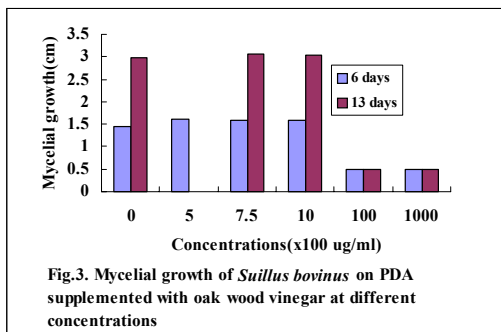
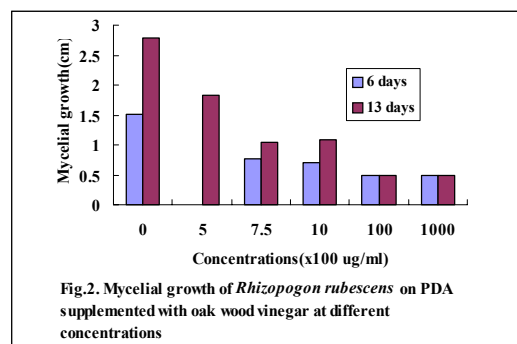
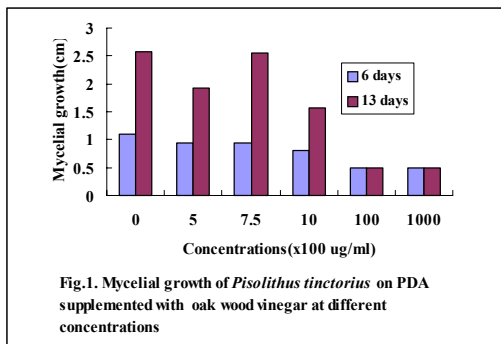


Fig. 10. Mycelial growth of mycorrhizal fungi on PDA supplemented with oak wood vinegar at different concentrations (0 ~ 10<sup>5</sup> $\mu\text{g/ml}$ ). (1) *Pisolithus tinctorius*, (2) *Rhizopogon rubescens*, (3) *Suillus bovinus*, and (4) *Hebeloma cylindrosporum*.

따라서 이 결과는 목초액을 고농도로 처리시 균류의 성장을 억제하고 저농도로 처리시 어느 정도 촉진시킨다는 기존의 연구결과와 비슷한 경향을 나타내고 있다.

그 원인으로는 고농도에서 목초액이 강한 산성을 지니고 있으므로 살균효과가 나타나나 점차 희석되어 저농도로 되면 약산성 내지 중성이 되어 일반적인 균류의 균사생장에 적합한 산도를 유지하게 되고 목초액에 함유되어 있는 다양한 무기성분들이 균류의 성장에 양분으로 작용하여 성장을 촉진시키는 것으로 사료된다.

이에 목초액을 멸균하기 전과 멸균한 후에 희석농도별로 산도를 측정된 결과는 Fig.11에서 나타난 바와 같이 멸균하기 전과 멸균한 후에 큰 차이는 나타나지 않았지만 원액, 100배액(10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 1000배액(1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 희석할수록 pH가 강산성(3.7), 산성(4.6), 약산성(5.4)으로 조금씩 증가하는 것을 알 수 있다.

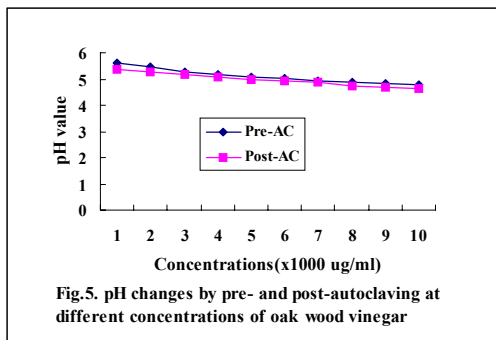


Fig.11. pH changes by pre- and post-autoclaving at different concentrations of oak wood vinegar.

목초액의 농도별시험에서 1000배액에서는 생장이 가능하나 100배액에서는 생장이 완전히 억제되었으므로 100배액(10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서 1000배액(1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 사이의 농도를 다시 여러 농도로 희석하여 균근균의 성장량을 조사한 결과, 모래밭버섯, 황소비단그물버섯, 자갈버섯은 각각 4000, 3000, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 균사생장량이 완전히 억제되었다(Fig 12-1, Fig.12-2, Fig.12-3).

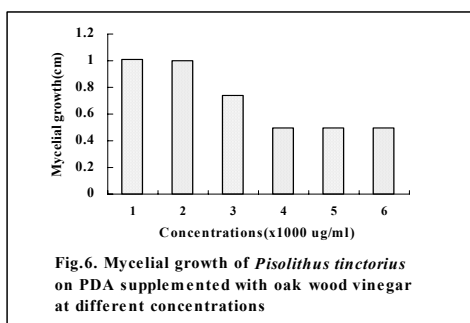


Fig.6. Mycelial growth of *Pisolithus tinctorius* on PDA supplemented with oak wood vinegar at different concentrations

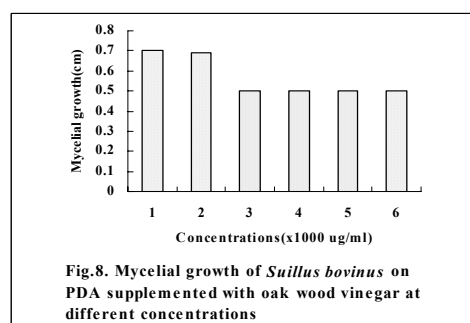


Fig.8. Mycelial growth of *Suillus bovinus* on PDA supplemented with oak wood vinegar at different concentrations

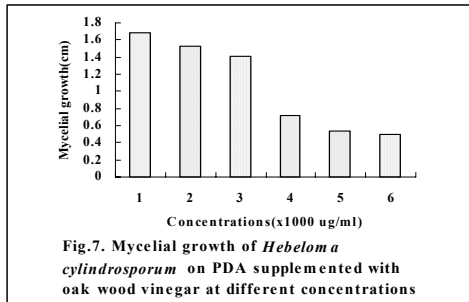


Fig. 12. Mycelial growth of mycorrhizal fungi on PDA supplemented with oak wood vinegar at different concentrations ( $1 \times 10^3 \sim 10^6 \mu\text{g/ml}$ ). (1) *Pisolithus tinctorius*, (2) *Rhizopogon rubescens*, and (3) *Hebeloma cylindrosporium*.

(2) 베노밀이 소나무 외생균근균과 리지나뿌리썩음병균의 균사생장에 미치는 영향

베노밀은 배지 첨가농도 25 ppm에서 자갈버섯, 모래발버섯, 황소비단그물버섯의 균사생장을 각각 100%, 12%, 30% 억제하였다 (Table 10).

Table 10. Mycelial growth of ectomycorrhizal fungi on PDA supplemented with benomyl at different concentrations

Ectomycorrhizal fungi	Benomyl concentrations( $\mu\text{g/ml}$ )			
	0	5	25	50
자갈버섯 ( <i>Hebeloma cylindrosporium</i> )	7.42	2.01	0.80	0.80
모래발버섯 ( <i>Pisolithus tinctorius</i> )	4.96	4.87	4.35	3.57
황소비단그물버섯 ( <i>Suillus bovinus</i> )	4.35	4.05	3.15	2.11

Agar disc (8 mm) was inoculated, and mycelial growth was measured at 18 days after inoculation.

또한 베노밀 배지 첨가농도 5 ppm에서 리지나뿌리썩음병균 2균주(태안과 일본)의 균사생장을 100% 억제하였다 (Table 11).

Table 11. Mycelial growth of *Rhizina undulata* on PDA supplemented with benomyl at different concentrations

Rhizina undulata	Benomyl concentrations( $\mu\text{g/ml}$ )			
	0	5	25	50
Tae-An (태안, 한국)	8.20	0.6	0.6	0.6
Japan (일본)	8.70	0.6	0.6	0.6



Agar disc (6 mm) was inoculated, and mycelial growth was measured at 3 days after inoculation.

2) 균근균 대사분비물질이 리지나뿌리썩음병균의 균사생장에 미치는 영향

균근균 3종(자갈버섯, 모래발버섯, 황소비단그물버섯)을 액체배양하면서 배양 여액을 1,2,3개월 간격으로 수확하여 배지에 첨가하고 뿌리병원균 3종 5균주의 성장과 포자형성(*Fusarium*)을 확인한 결과, 자갈버섯이 공시한 뿌리병원균, 특히 리지나뿌리썩음병균의 균사생장에 억제효과를 나타내었으며 배양기간이 길수록 억제효과가 강하였다 (Table 12).

Table 12. Mycelial growth of root pathogenic fungi on media supplemented with culture filtrates of ectomycorrhizal fungi

Culturing period	ECM fungi	Root pathogens		<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium oxysporu</i>	<i>Rhizina undulata</i>	
		115	124	<i>m</i>	Japan	Tae-An	
1 month	자갈버섯	4.15	3.50	2.58	5.88	2.98	
	모래발버섯	7.94	4.98	3.38	8.40	7.55	
	황소비단그물	8.40	6.08	3.28	8.40	7.85	
	CNT	8.40	5.74	3.26	8.40	7.83	
2 month	자갈버섯	6.16	3.49	2.68	5.39	2.65	
	모래발버섯	8.40	4.87	3.08	8.40	8.07	
	황소비단그물	8.40	5.84	3.34	8.40	8.40	
	CNT	8.40	5.85	3.35	8.40	7.56	
3 month	자갈버섯	4.45	2.86	2.06	3.31	1.86	
	모래발버섯	8.40	5.02	3.15	8.40	7.45	
	황소비단그물	8.40	5.84	3.23	8.40	8.40	
	CNT	8.40	5.74	3.35	8.40	7.76	

Mycelial growth was measured at 2 days after inoculation.

또한 *Fusarium*의 경우에는 처리한 3종의 균근균 배양여액이 모두 포자형성 억제효과를 나타내었다 (Fig. 13). (Sporulation of *F. oxysporum* was greatly reduced by culture filtrates of all ECM fungi tested.)

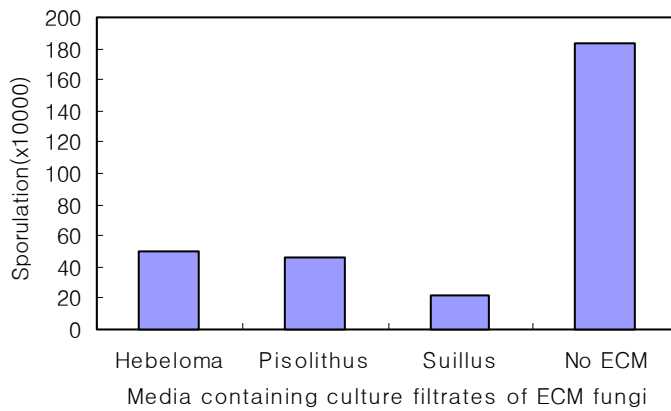


Fig. 13. Sporulation of *F. oxysporum* on media containing culture filtrates of ECM fungi.

*F. oxysporum* conidia incubated for 3 days into holes in cultures of *Rhizopogon rubescens* on PDA medium in Petri plates showed inhibited germination, abnormal swelling, and many cytoplasmic inclusions (Fig. 14).

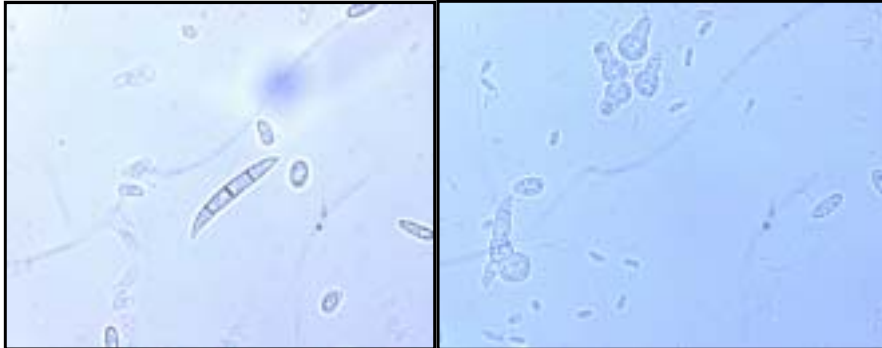


Fig. 14. Light microscopy of normal(left) and abnormal(right) spores of *F. oxysporum* from fungal cultures on PDA medium in Petri plates.

리지나뿌리썩음병균의 자실체를 지난 속초 출장시(2004. 8. 28) 채집하여 자낭포자를 수확한 후, 균근균 대사물질에 의한 포자발아 및 생장억제효과에 대한 실험을 현재 진행중에 있다.

### 제 3 절. 리지나뿌리썩음병균의 효과적인 방제기술 개발

#### 1. 재료 및 방법

가. 토양개선에 의한 병발생 억제효과 구명

1) 시험장소

- 충남 청양군 비봉읍 중목리 산 112-4번지 및 녹평리 산 12-12(2002년 산불지)
- 강원 화천 간동면 당천1리(2003년 산불지)
- 강원 속초시 조양동 온정리 산 93(2004년 산불지)

2) 토양개량제 처리 : 산불지에 조사구를 설정한 후에 아래와 같은 수준으로 토양개량제를 5월~6월에 처리하였다.

- 석회처리구 : 입상소석회(한일석회) 6.25kg을 골고루 뿌렸다.(25kg/100m<sup>2</sup>)
- 숯처리구 : 숯(임협목탄) 5kg을 뿌렸다.(20kg/100m<sup>2</sup>)
- 목초액처리구 : 50배로 희석한 목초액(동양)을 100리터를 뿌렸다.(400 ℓ /100m<sup>2</sup>)
- 숯+목초액처리구 : 숯 5kg을 뿌리고, 50배액 목초액(동양) 100리터를 뿌렸다.

3) 조사시기 및 방법

가) 과상땅해파리머섯 자실체 발생량 조사

조사구내에 발생된 자실체 숫자를 조사하였다.

나) 토양미생물 밀도조사

토양개량제 처리전후로 깊이 4~5cm의 토양을 토양코아(φ5cm)로 4방위에서 1점씩 채취 혼합하여 음건시켰다. 건조된 토양은 잘 섞어 10mesh로 거른 후 1g을 취하여 멸균수에 단계희석하고, 100μl를 취하여 미생물 종류별 배양기(PDA, NA, ISP II)표면에 잘 퍼준다. 배양은 세균 및 방선균은 28~30℃, 곰팡이는 25℃에서 배양한 후 colony를 계산하여 밀도변동을 조사하였다. 사용한 배지별 조성성분은 아래와 같다.

PDA(Potato Dextrose Agar)배지 : 감자 200g, Dextrose 15g, Agar 15g, DW 1 ℓ .

NA(Nutrient Agar)배지 : Beef extract 5g, Peptone 10g, NaCl 5g, Agar 15g, DW 1 ℓ .

ISP(International *Streptomyces* Project) II 배지 : Yeast extract 4g, Malt extract 10g, Dextrose 4g, Agar 20g, DW 1 ℓ .

다) 토양분석

토양개량제 처리전후로 0~5cm 깊이의 토양을 토양코아(φ5cm×H5cm)로 4방위

에서 1점씩 채취 혼합하여 국립산림과학원의 토양분석실에 의뢰하여 토양 pH 등 10개 항목 분석하였다.

#### 나. 생물적 방제기술 개발

##### 1) 길항미생물 방제효과 조사

###### 가) 길항미생물 선발 및 탐색

2000년 산불발생 후에 과상땅해과리버섯이 발생하였다가 미발생한 지역인 강릉시 사천면 직동리, 삼척시 원덕읍 임원리 일대의 토양과 충남 태안군 남면 달산리 병발생지에서 토양을 채집하여 미생물 종류별 배양기(PDA, NA, ISP II)표면에 나타난 미생물의 단일 colony를 순수분리하였고 병원균에 대한 저지력으로 길항미생물을 선발하였다.

###### 나) 선발길항미생물 방제효과 조사

최우수 길항미생물로 선발된 방선균 Ta22균주는 ISP II 배지에서 약2주간 배양하였으며 형성된 방선균 포자는 멸균된 면봉을 이용해 모아서 포자현탁액을 준비하였다. 포자현탁액은  $53.2 \times 10^6$  cfu/ml 밀도로 처리하여 25m<sup>2</sup> 당 20L를 강원도 속초시 조양동 산불피해지에 살포한 후 과상땅해과리버섯의 발생량과 토양미생물의 밀도를 “가”항과 같은 조사방법으로 방제효과를 분석하였다.

##### 2) 은수원사시나무 칩의 방제효과 조사

“제 3절 8에서” 본 병원균의 군사생장 억제물질이 있는 것으로 밝혀진 은수원사시나무(현사시)의 칩을 강원도 속초시 조양동 산불피해지에 40ℓ/25m<sup>2</sup>로 처리 후 과상땅해과리버섯의 발생량과 토양미생물의 밀도를 “가”항과 같은 조사방법으로 방제효과를 분석하였다.

#### 다. 서해안 해안림 병발생 진전조사

2002년 6월 서해안 충남 태안군 남면 달산3리의 약 20ha의 해안 곰솔림에 본 병이 발생하여 년 2회(여름 및 겨울)에 고사목의 진전사항 및 자실체의 분포상황을 지도작업하여 병발생 진전을 조사하였다.

#### 라. 산불지역과 해안림 병발생지의 미생물상 분석

산악산불지역(속초 조양동), 해안림(태안 달산리) 병발생지 및 회복지에서 4~5cm 깊이의 토양을 토양코어(4.5cm)로 4방위에서 1점씩 채취 혼합하여 “가”항과 같은 방법으로 토양미생물상을 조사하고 colony의 특징에 의하여 육안으로 구분한 고밀도의 균주는 *R. undulata*의 군사생육에 미치는 영향을 조사하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 토양개선에 의한 병발생 억제효과 구명

#### 1) 목초액이 병원균의 군사생장에 미치는 영향(실내 검정)

목초액이 리지나뿌리썩음병균인 *Rhizina undulata*의 군사생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 시판되고 있는 7종류의 목초액으로 배양기상의 군사생육상황을 조사하였다. 목초액은 기계식인 거여산업, 동양목초, 청정환경, 대승(주)과 전통식은 강원진참숯, 강원참숯, 태백산참숯의 상품을 사용하였다.

각 목초액의 희석농도별로 조성된 PDA(감자한천)배지 상에서 군사생육상황(25℃)을 조사한 결과 표 1과 같이 공시된 모든 목초액의 50배 희석 배지에서 군사생육이 완전히 억제되어 토양개선편제로서의 목초액 희석농도는 50배 희석액이 적당한 것으로 추정되었다. 또한 기계식의 목초액이 전통식의 목초액에 비해 *R. undulata*의 군사생육 억제력이 높았다.

표 1. 목초액이 *Rhizina undulata*의 군사생육에 미치는 영향

구분	목초액 회사	희 석 배 수			
		10배	50배	100배	500배
기 계 식	거여산업	100.0% <sup>a)</sup>	100.0%	25.8%	0.0%
	동양목초	100.0	100.0	100.0	0.0
	청정환경	100.0	100.0	74.1	0.0
	대승(주)	100.0	100.0	71.4	0.0
전 통 식	강원진참숯	100.0	100.0	0.0	0.0
	강원참숯	100.0	100.0	43.7	0.0
	태백산참숯	100.0	100.0	0.0	0.0

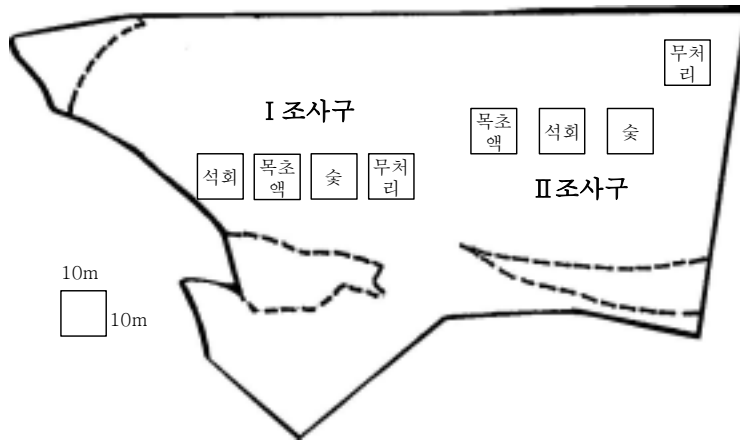
a) 군사생장억제율(%)

= 대조구의 군사생장량-처리구의 군사생장량/대조구의 군사생장량×100

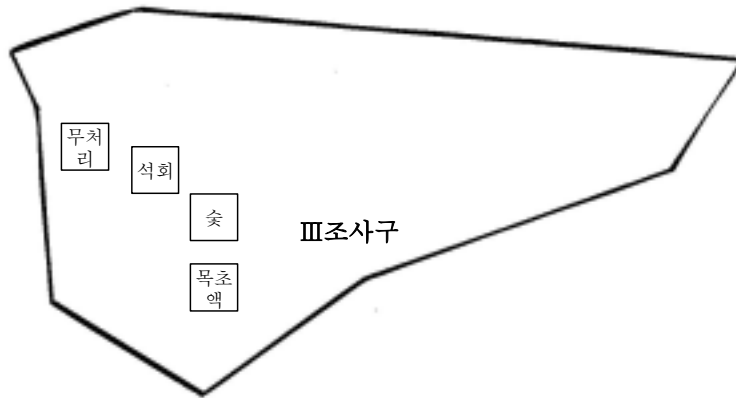
2) 토양개선에 의한 병발생억제 효과 구명(2002년)

석회, 숯 및 목초액 등의 토양개량제 사용에 의한 리지나뿌리썩음병의 억제효과를 구명하기 위하여 충남 청양군 비봉면(2002년 4월 14일 산불발생지) 일대에 시험구를 무작위로 배치(그림 1)하고 석회처리구에는 입상소석회(한일석회)를 25kg/100m<sup>2</sup>, 숯처리구에는 숯(임협목탄)을 20kg/100m<sup>2</sup>, 목초액처리구에는 목초액(동양) 50배액을 100ℓ/100m<sup>2</sup>씩 처리하였다. 이때 토양개량제로 사용한 소석회의 양은 우리나라 산림토양의 토성, 토양산도 및 부식함량을 감안하여 산정하였으며, 숯과 목초액의 사용량은 토양개량제로 사용할 경우의 권장량으로 하였다. 또한 목초액의 희석배수는 “1”함에 서 병원균의 균사생장을 완전히 제어하는 50배액 희석농도로 하였다.

시험구의 산불피해는 중~심으로서 산불전에는 소나무순림이었으며 6월의 하층식생은 참나무류와 철쭉류가 주된 식생이었고 아까시나무, 고사리류도 발생하고 있었다.



청양군 비봉읍 중목리 산112-4번지



청양군 비봉읍 녹평리 산12-12번지

그림 1. 토양개량제 처리에 의한 리지나뿌리썩음병 방제효과 시험지

가) 과상땅해파리버섯 자실체 조사

토양개량제 처리후 약 2개월이 지난 8월 1일에 발생한 병원균의 자실체(과상땅해파리버섯)를 조사한 결과 제 I 조사구의 소석회처리구에서 40개, 숯 처리구에서 36개, 목초액 처리구에서 64개, 무처리구에서 62개의 자실체가 발견되어 숯처리구, 소석회처리구에서 58.1~65.0% 정도의 약간 낮은 발생밀도를 나타내었다. 특히 강산성의 목초액은 일반적으로 살균력이 있는 것으로 알려져 있으나 본 병원균의 생육특성이 강산성에서도 생장이 양호하므로 목초액처리는 본 병원균의 자실체 형성에는 효과가 없는 것으로 판단되었다.

제 II 조사구 및 제 III 조사구에서는 어린 자실체가 발생하기 시작하는 수준이었다.

처리후 약 5개월이 지난 11월 5일과 약 13개월이 지난 2003년 7월 21일에 제 III 조사구에서 발생한 병원균의 자실체수는 표 2와 같이 토양개량제 처리간의 효과는 뚜렷하게 나타나지 않았으며, 산불발생 후 1년이 지나면 본 병원균의 자실체수는 급격하게 떨어져 활력을 잃는 것으로 추정되었다.

그리고 제 I 조사구 및 제 II 조사구는 인근주민들의 경작 및 작업로 확대로 시험지가 훼손되어 조사가 불가능하였다.

표 2. 제Ⅲ처리구에서의 시기별 병원균 자실체 발생수

처 리 \ 조사일	'02. 11. 05	'03. 7. 21	합계
소석회	20	5	25
숯	14	7	21
목초액	16	12	28
무처리	21	8	29

나) 토양미생물 밀도분석

토양개량제(소석회, 숯, 목초액) 처리 직전인 6월 18일, 처리 후에는 8월 1일 및 11월 4일에 토양시료를 채집하여 토양미생물 밀도변화를 조사하였다. 지하 5cm 주변의 토양을 PDA, NA, IPS배지에서 단계회석법으로 시기별 토양미생물 밀도수를 조사한 결과는 표 3, 그림 2와 같다.

표 3. 토양개량제 처리 전후의 토양미생물 밀도변화(단위 :  $\times 10^5$ cfu/g soil)

조사구	토양 개량제	Bacteria			Fungi			Actinomyces		
		6/1	8/1	11/4	6/1	8/1	11/4	6/1	8/1	11/4
제1조사구	소석회	16.30	12.10	35.58	0.66	0.20	0.50	0.00	0.00	1.50
	숯	6.30	4.60	27.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	1.00
	목초액	5.60	1.20	18.83	0.66	0.00	0.50	0.00	0.00	0.50
	무처리	17.00	12.20	38.18	0.66	0.50	3.00	0.33	0.10	3.50
제2조사구	소석회	20.00	15.60	14.00	6.60	4.00	0.50	0.00	0.00	2.00
	숯	10.00	5.20	37.73	10.00	8.20	0.50	0.00	0.00	2.00
	목초액	13.30	8.90	25.23	0.00	0.20	0.50	0.00	0.00	2.00
	무처리	20.00	15.80	45.85	0.00	0.60	5.00	0.00	0.20	2.50
제3조사구	소석회	18.15	14.00	44.25	3.63	2.00	1.50	0.00	0.00	2.50
	숯	8.15	4.60	19.80	5.00	3.00	1.00	0.00	0.10	3.50
	목초액	9.45	4.50	40.88	0.33	0.10	0.50	0.00	0.00	0.50
	무처리	18.50	12.00	51.70	0.33	0.20	6.50	0.16	0.30	4.50

산불발생한지 약 1개월이 지난 6월 중순경, 토중 5cm부근의 세균밀도는  $5.6 \sim 20.0 \times 10^5$ cfu/g soil 수준이었다. 토양개량제 처리 후 약 2개월, 5개월 후의 세균, 곰팡이 방선균의 밀도변화를 분석한 결과, 세균과 방선균은 토양개량제 사용여부와는 상



관없이 가을철에 밀도가 급격히 증가하는 현상을 나타내었으나, 곰팡이류는 소석회 및 숯 사용에 의하여 밀도가 저하하는 경향치를 나타내었다.

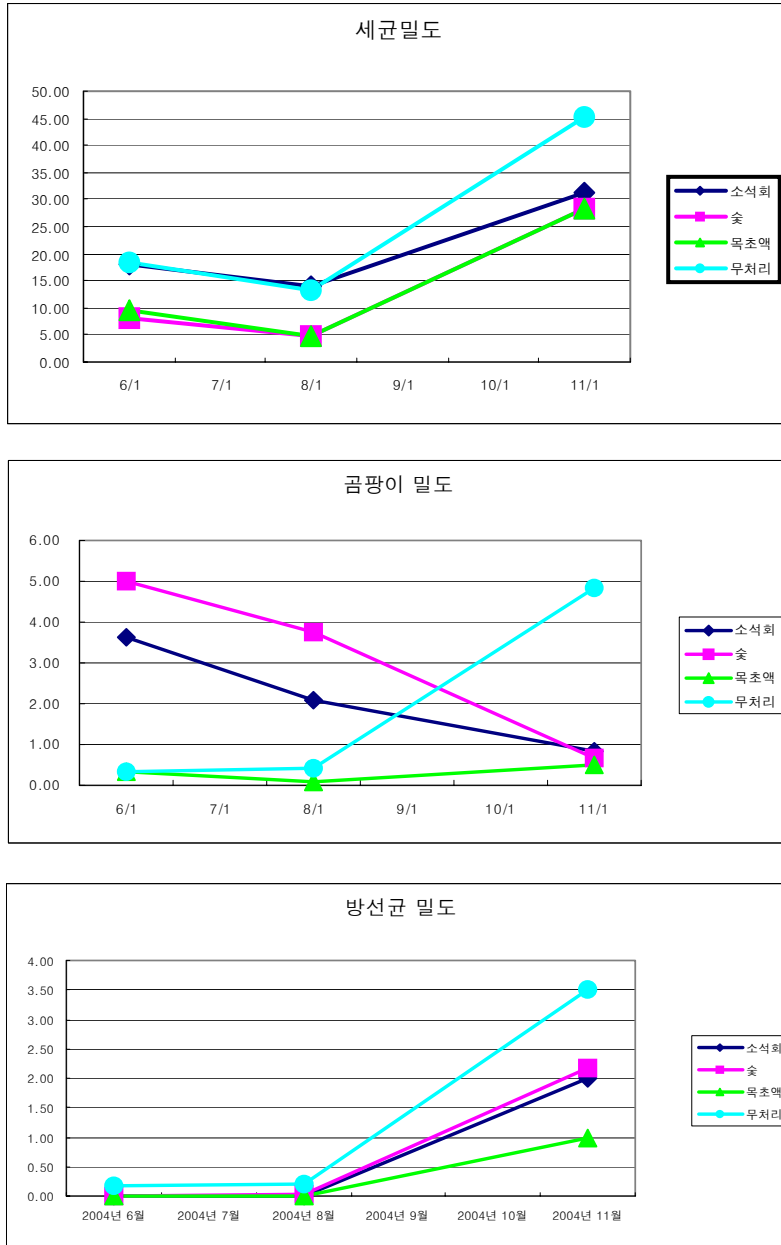


그림 2. 토양개량제 사용 전후의 토양미생물의 밀도변화(단위 :  $\times 10^5$  cfu/g soil)

다) 토양분석

토양개량제 처리전인 6월과 처리한지 5개월이 지난 토양을 분석한 결과는 표 4 및 그림 3과 같다. 토양개량제 사용 후 약 5개월이 지난 상태에서 토양의 산도, 전질소, Na<sup>+</sup>는 크게 변하지 않았다. 유기물은 소석회 사용구를 제외하고는 약간 늘어나는 추세이며 특히 목초액 사용구에서 유기물축적이 다소 높았다. 유효인산, 칼륨, 칼슘은 전반적으로 낮아졌으며 특히 유효인산은 뚜렷한 감소를 나타내었다. 임업연구원(2000)에 의하면 산불발생 직후에는 급격한 토양양분 증가가 나타났다가 산불발생 후에 재생된 식생에 의해 토양양분이 흡수되거나 토양침식에 의한 양분손실로 지속적으로 감소한다고 하였다.

표 4. 토양개량제 사용 전후의 토양분석 비교

토양 개량제	시기	산도 (pH)	유기물 0.M(%)	전질소 T-N(%)	유효인산 (mg/Kg)	C.E.C (cmol <sup>+</sup> /Kg)	치환성 양이온(cmol <sup>+</sup> /Kg)			
							K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>+</sup>	Mg <sup>+</sup>
소석회	6월	4.89	3.52	0.13	13.98	10.71	0.40	0.14	0.68	0.36
	11월	4.92	3.17	0.12	2.92	11.29	0.27	0.14	0.59	0.61
숯	6월	4.83	2.90	0.11	8.36	10.71	0.33	0.13	0.62	0.38
	11월	4.80	3.37	0.12	2.65	12.17	0.26	0.13	0.41	0.31
목초액	6월	4.90	3.24	0.13	8.38	11.07	0.40	0.13	0.62	0.42
	11월	4.68	4.26	0.15	3.83	13.86	0.34	0.14	0.38	0.32
무처리	6월	4.85	3.13	0.11	9.20	11.51	0.38	0.14	0.60	0.33
	11월	4.78	3.64	0.13	2.66	12.25	0.33	0.14	0.33	0.34

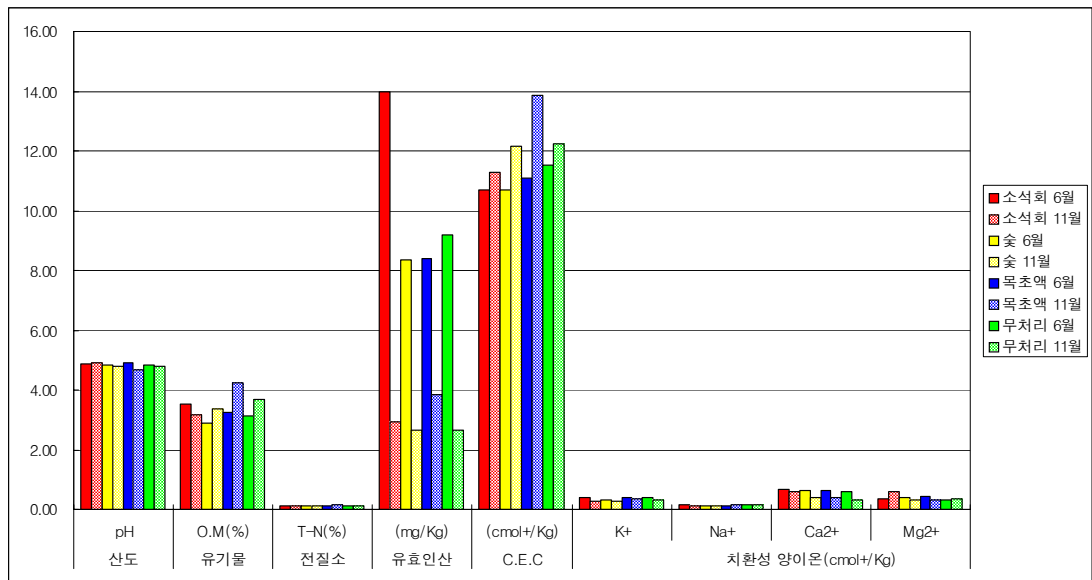


그림 3. 토양개량제 처리 전후의 토양 화학적 성질 변화

한편, 조사구가 훼손되지 않은 제Ⅲ조사구에 있어서 토양개량제 처리전인 6월과 처리한지 5개월이 지난 11월, 약 1년이 지난 2003년 7월에 지하 5cm부근의 토양을 분석한 결과, 표 5에서 보는 바와 같이 토양개량제 사용에 의한 토양산도는 시간의 경과와 아울러 미약하게 높아지는 경향이나 큰 변화는 없었다. 김병윤 등과 이명보 등은 소석회, 숯 및 목초액의 사용에 의한 토양산도변화는 연속적인 사용으로 처리횟수가 증가할수록 높아진다고 하였다. 목초액의 사용은 유기물과 전질소의 함량을 높여 주는 것으로 분석되어 토양의 화학적인 변화에 크게 기여하는 것으로 추정되었다.

표 5. 제Ⅲ조사구에 있어서 토양개량제 사용에 의한 토양분석 비교

처리	시기	산도 (pH)	유기물 0.M(%)	전질소 T-N(%)	유효인산 (mg/Kg)	C.E.O (cmol+/Kg)	치환성 양이온(cmol+/Kg)			
							K+	Na+	Ca2+	Mg2+
소석회	02. 6.	5.06	3.52	0.136	3.48	11.22	0.47	0.15	0.43	0.32
	11.	5.00	2.63	0.123	1.22	11.22	0.31	0.14	0.55	0.53
	03. 7.	5.17	3.72	0.127	2.81	11.22	0.37	0.09	0.93	0.84
숯	02. 6.	4.78	2.32	0.108	5.37	11.66	0.44	0.13	0.57	0.38
	11.	4.86	2.46	0.104	1.56	12.76	0.31	0.13	0.46	0.41
	03. 7.	4.80	3.16	0.133	1.72	11.88	0.33	0.09	0.47	0.50
목초액	02. 6.	4.84	3.59	0.164	4.38	13.64	0.36	0.15	0.58	0.34
	11.	4.83	3.71	0.144	2.00	15.40	0.33	0.14	0.30	0.28
	03. 7.	4.95	5.23	0.198	6.04	12.54	0.36	0.10	0.36	0.46
무처리	02. 6.	4.89	2.54	0.114	7.11	11.88	0.42	0.15	0.68	0.29
	11.	4.80	2.89	0.104	2.24	11.88	0.35	0.14	0.46	0.44
	03. 7.	4.98	4.55	0.164	7.16	11.66	0.27	0.08	0.73	0.52

산불발생지에 있어서 토양개량제 사용에 의한 리지나뿌리썩음병의 병발생 억제 효과를 종합적으로 분석하면 소석회 및 숯 시용구에서 자실체의 발생량이 약간 저지시키는 효과가 있었으며 토양미생물 밀도는 처리별로 뚜렷한 차이가 없었다. 토양분석의 결과에서는 1회의 처리로는 뚜렷한 변화를 볼 수 없었으나 목초액의 사용이 토양의 화학적인 변화에 크게 기여하여 장기적인 관찰이 필요한 것으로 판단되었다. 그리고 산불발생당년에 대부분의 소나무림에 발생한 파상땅해파리버섯의 자실체발생량은 1년 후에는 급격히 감소하여 산불발생후 단순해진 토양미생물상에서 우점균으로 대량 발생한 본 병원균은 회복된 토양미생물에 의하여 활력을 상실하고 있는 것으로 판단되었다.

### 3) 토양개선에 의한 병발생억제 효과 구명(2003년)

숯과 목초액의 혼합사용에 의한 병발생억제 효과를 구명하기 위하여 2003년도 산불발생지인 강원도 화천군 간동면 방천1리에 5m×5m규모의 시험구를 설치하고, 숯, 목초액 단독사용구와 혼합사용과의 차이점을 분석하기 위하여 숯 및 목초액 단독사용구, 무처리구 및 석회시용구를 무작위로 배치하고 2002년과 동일한 방법으로 토양개량제를 처리하였다.

토양개량제 처리후 시기별 자실체 발생량을 조사한 결과, 표 6에서 보는 바와 같이 강원도지역의 집중강우로 시험지가 유실되어 반복처리에 의한 자료는 아니지만 소석회처리구의 주변에는 자실체가 많이 발견되었으나 처리구내에서는 자실체가 10개만

확인되어 무처리에 비하여 64.3%, 솥처리구는 무처리에 비하여 90.5%의 억제효과가 있었으나 이러한 결과는 임업연구원(2000년)의 동해안 산불지역 정밀조사 보고서에서도 지적된 사실로 토양건조나 하층식생의 번무가 자실체발생에 크게 영향을 끼친 것으로 판단되었다.

표 6. 토양개량제 처리에 의한 시기별 병원균의 자실체 발생량

조사구	처 리	8/5	9/23	10/24	합계	비 고
1조사구	소석회	0	6	4	10	조사구 주변에 리지나 24개 발생(8.5) 소석회는 거의 녹지 않았음(9.23)
	솥	1	4	0	5	
	목초액	0	0	0	0	토양건조, 하층식생 밀도 높음
	솥+목초액	0	1	0	1	토양건조, 하층식생 임지피복
	무처리	0	36	3	42	소나무주변 그늘지역에 집중적으로 자실체 발생 또한 조사구 주변에도 집단적으로 자실체 발생
2조사구	소석회	0	0	1	1	집중강우로 토사유출(9.23)
	솥	0	1	0	1	집중강우로 토사유출(9.23)
	목초액	8	9	0	17	소나무주변에 집중적으로 자실체 발생
	솥+목초액	0	0	0	0	집중강우로 토사유출(9.23)
	무처리	0	0	2	2	집중강우로 토사유출(9.23)

#### 4) 토양개선에 의한 병발생억제 효과 구명(2004년)

2003년 강원도 화천지역의 여름철 집중호우로 시험지 토양이 유실되어 정확한 실험이 되지 못한 솥과 목초액 혼합처리에 의한 효과를 조사하기 위하여, 2004년 산불피해지인 강원도 속초시 조양동 온정리 산 93에서 5×5m크기의 조사구를 설정한 후에 토양개량제를 전년도와 동일한 방법으로 5월 4일 처리하였다.

##### 가) 파상팡해파리버섯의 자실체 발생량조사

조사구는 남향~동남향으로서 경사도 10도 정도의 완경사지 동일사면에 설치하였으며, 소나무의 뿌리가 본 병원균의 균사발육을 촉진시키는 것으로 알려져 있으므로(Sato 등) 조사구내에 소나무가 분포되도록 설정하였다. 하층식생은 주로 참나무류, 아까시나무, 싸리나무가 대부분의 조사구내에서 많이 관찰되었으며, 이외에 개암나무, 붉나무, 철쭉류, 산초나무, 청미래덩굴, 고사리 등이 관찰되었다.

표 7. 토양개량제 처리에 의한 과상땅해파리버섯의 자실체 발생량

처리		자실체 발생량(개)				소나무분수*	하층식생 피복율(%)
		7. 22	8. 11	8. 27	총발생량		
제1조사구	소석회	0	21	99	120	6(2)/(2)	90
	숯	0	0	83	83	7(1)/(1)	60
	목초액	1	33	6	40	7(1)/0	90
	숯+목초액	22	156	52	230	6(1)/0	75
	무처리	0	74	144	218	6(3)/0	80
제2조사구	소석회	5	62	107	174	7(3)/(1)	80
	숯	34	52	105	191	6(1)/1	50
	목초액	16	12	141	169	7(2)/(1)	60
	숯+목초액	8	20	98	126	5(1)/0	60
	무처리	4	8	32	44	4/0	50
제3조사구	소석회	0	2	0	2	5/(1)	80
	숯	0	0	3	3	7(3)/2(1)	50
	목초액	0	14	13	27	6(3)/(2)	70
	숯+목초액	0	0	0	0	4(2)/2(1)	90
	무처리	7	7	10	24	4(1)/(2)	70

\* 소나무분수 6(3)/0은 조사구내에 6그루의 소나무가 있는데 그 중 3그루는 고사목, /다음의 숫자는 조사구 바로 옆에 있는 소나무분수를 표시한 것임.

산불발생 후 약3개월부터 자실체가 발생하기 시작하였으며 3차에 걸쳐서 조사한 결과는 표 7과 같다. 제1조사구에서는 무처리와 비교하여 목초액, 숯, 소석회처리별로 자실체발생량이 적었으며, 숯과 목초액혼용은 오히려 자실체발생을 조장한 것으로 나타났다. 또한 제2조사구에서는 토양개량제 처리별로 자실체의 발생량에는 큰 차이가 없었으며 무처리구는 소나무분수도 적었을 뿐만 아니라 하층식생의 피복율도 낮아 토양건조에 의하여 자실체발생이 적은 것으로 추정되었다. 또한 제3조사구는 전반적으로 발생량이 뚜렷하게 저조하여 처리에 의한 경향치의 판단분석이 불가능하였다.

#### 나) 토양미생물 밀도분석

토양개량제(소석회, 숯, 목초액 및 숯과 목초액 혼합) 처리 전 후의 토양미생물 밀도를 조사하였다. 토양은 지하 5cm 주변에서 채취하였으며 PDA, NA, IPS배지를 사용하여 단계희석법에 의하여 시기별로 세균, 곰팡이, 방선균의 밀도수를 조사한 결

과는 표 8 및 그림 4에서 보는 바와 같다. 토양 1g당의 세균 밀도는  $10^5$ 수준, 곰팡이 및 방선균의 밀도는  $10^4$ 수준이었으며, 토양개량제 처리에 의한 뚜렷한 효과는 관찰되지 않았다. 그러나 토양개량제처리에 의하여 세균 및 곰팡이의 밀도는 대조구에 비하여 약간 낮은 밀도를 나타내는 반면 방선균의 밀도는 비슷하거나 약간 높아지는 경향치를 나타내었다.

표 8. 토양개량제 처리 전후의 토양미생물 밀도변화(단위 : cfu/g soil)

처리	세균( $\times 10^5$ )			곰팡이( $\times 10^4$ )			방선균( $\times 10^4$ )			
	5/4	7/22	8/27	5/4	7/22	8/27	5/4	7/22	8/27	
1 조 사 구	소석회	4.70	6.25	4.62	2.07	4.73	3.20	0.98	2.35	3.72
	숯	6.10	8.18	3.80	3.93	4.57	3.97	1.23	1.57	3.58
	목초액	4.25	6.83	6.22	1.85	4.53	4.08	1.27	3.10	3.77
	숯+목초	1.85	5.97	4.13	1.55	5.58	3.50	0.62	2.32	3.08
	무처리	5.73	9.02	7.13	2.20	6.85	7.03	1.47	1.42	3.62
2 조 사 구	소석회	3.63	5.08	4.18	3.45	6.07	5.30	0.70	1.77	2.35
	숯	3.65	6.85	6.00	3.53	7.83	6.48	0.62	1.72	3.78
	목초액	2.07	3.58	2.80	5.32	6.95	6.40	1.02	1.92	2.30
	숯+목초	2.27	4.05	3.95	4.42	7.43	6.02	0.88	2.05	2.50
	무처리	3.73	8.65	7.68	4.77	7.52	6.32	0.97	2.10	3.63
3 조 사 구	소석회	4.40	7.18	6.25	3.05	5.43	3.50	1.88	3.38	5.15
	숯	5.50	7.52	6.42	3.30	7.38	5.75	1.68	3.18	5.27
	목초액	5.03	9.28	5.30	3.02	5.82	4.35	1.25	2.40	2.80
	숯+목초	4.85	6.80	5.12	1.85	5.52	4.97	0.95	2.57	4.37
	무처리	3.72	9.52	5.67	3.45	8.18	6.68	1.47	2.25	3.68

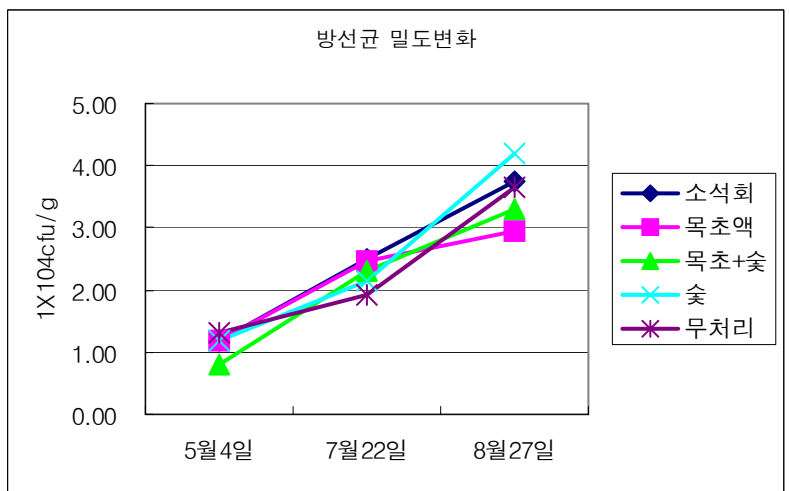
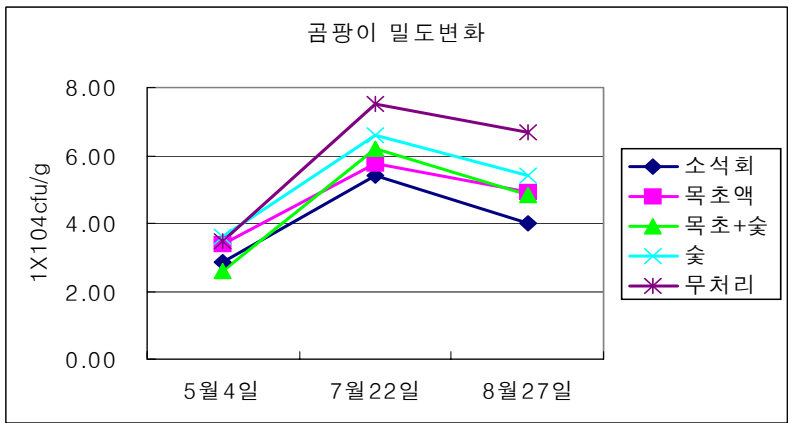
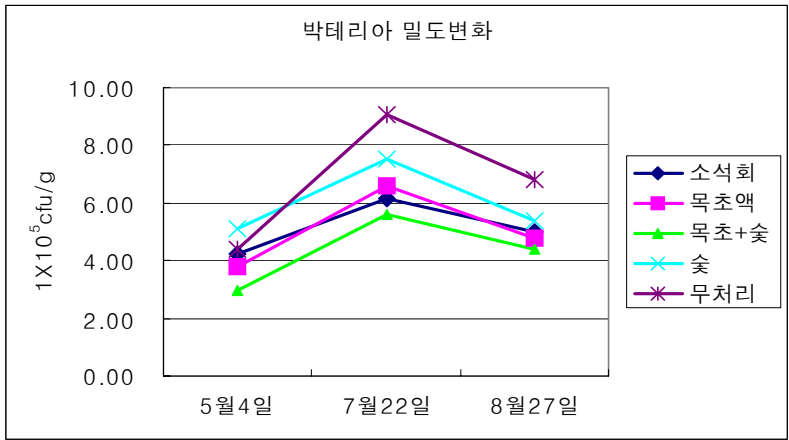


그림 4. 토양개량제 처리 전후의 토양미생물 밀도변화



토양개량제 처리에 의하여 방선균의 밀도가 약간 높아지는 경향치를 나타내고 있고, 방선균은 일반적으로 길항미생물로 많이 알려져 있어 colony 별(그림 5.)로 우점비율을 조사한 결과 표 9와 같이 방선균 S1는 36.9~56.4%의 밀도로 토양개량제 처리와는 상관없이 가장 높은 우점율을 나타내었고, S2의 우점율은 14.3~28.9%로 2위를 차지하였으며 이 들 균주는 시간경과에 따라 약간 증가하는 추세였으며, S3는 시간경과에 따라 밀도가 높은 지역에서는 낮은 밀도로, 밀도가 낮은 지역에서는 높은 밀도로 변화하여 밀도가 안정화되는 것을 추이할 수 있었다.



방선균 S1



방선균 S2



방선균 S3

그림 5. ISPII 배지상의 방선균류의 colony 형태

표 9. 토양개량제 처리별 방선균류의 시기별 우점비율

(단위 : %)

처리	월별	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
석회	5월	54.0	14.3	0.0	9.5	4.8	1.6	0.0	6.3	4.8	1.6	3.2	0.0
	7월	52.6	21.1	0.5	8.9	2.6	3.7	1.6	1.6	3.2	2.1	2.1	0.0
	8월	49.8	26.9	0.8	7.9	3.6	2.8	1.6	1.2	2.4	1.6	1.6	0.0
숯	5월	36.9	20.5	4.9	8.2	7.4	5.7	0.8	3.3	3.3	5.7	2.5	0.8
	7월	42.3	21.4	4.2	8.3	6.0	4.8	1.2	2.4	2.4	4.8	1.8	0.6
	8월	51.0	26.2	2.3	7.0	3.4	3.0	1.0	1.0	1.0	2.7	1.0	0.3
목초액	5월	45.1	20.6	2.0	9.8	6.9	1.0	2.9	3.9	2.0	2.9	2.9	0.0
	7월	51.8	23.1	2.1	7.7	4.6	1.5	2.1	3.1	1.0	1.5	1.5	0.0
	8월	48.8	27.7	1.7	7.4	4.1	2.1	2.1	2.5	1.2	1.2	1.2	0.0
숯+목초액	5월	45.6	19.3	1.8	12.3	7.0	3.5	0.0	5.3	0.0	3.5	1.8	0.0
	7월	56.4	23.1	2.6	5.1	5.1	1.9	0.6	1.9	0.0	1.9	1.3	0.0
	8월	53.4	27.1	2.5	8.3	3.2	1.4	0.7	1.1	0.4	1.1	0.7	0.0
무처리	5월	51.8	19.3	0.9	7.0	2.6	1.8	1.8	4.4	3.5	2.6	3.5	0.9
	7월	53.8	21.2	1.9	5.8	2.6	2.6	1.3	1.9	3.8	1.3	3.2	0.6
	8월	49.2	28.9	1.6	6.1	2.8	2.0	1.6	1.6	2.4	0.8	2.4	0.4

토양개량제 사용에 의한 병발생 억제효과를 구명하기 위하여 병원균의 자실체 발생량, 토양미생물의 밀도 및 토성변화 등으로 종합적으로 분석하였다. 병원균의 자실체 발생량은 조사구에 따라 토양개량제 사용으로 약간 낮은 발생밀도를 나타내거나, 큰 차이를 나타내지를 않아 상층을 차지하고 있는 소나무밀도, 하층식생의 피복도에 의한 토양건조가 자실체 발생에 크게 영향을 주는 것으로 판단되었다.

토양미생물 밀도는 토양개량제 처리별로 뚜렷한 밀도변동은 관찰되지 않았으며, 방선균의 colony 중에서 S1는 가장 높은 우점율을 나타내었고, S3는 시간경과에 따라 밀도가 높은 지역에서는 낮은 밀도로, 밀도가 낮은 지역에서는 높은 밀도로 변화하여 토양미생물이 안정화되는 것을 추이할 수 있었다. 토양분석의 결과에서는 1회의 처리로는 토성이나 토양산도 등에 뚜렷한 변화를 볼 수 없었으나 목초액의 사용이 토양의 화학적인 변화에 크게 기여하여 장기적인 관찰이 필요한 것으로 판단되었다.

그리고 산불발생당년에 대부분의 소나무림에 대량발생한 과상땅해파리버섯의 자실체발생량은 1년 후에는 급격히 감소하여 산불발생후 단순해진 토양미생물상에서 우점균으로 대발생한 본 병원균이 회복된 토양미생물에 의하여 활력을 상실하고 있는 것으로 판단되었다.

나. 생물적 방제기술 개발

1) 길항미생물 방제효과 조사

가) 길항미생물 선발 및 탐색

(1) 길항미생물 탐색

2000년 산불발생 후에 과상땅해파리버섯이 발생하였다가 미발생한 지역인 강릉시 사천면 직동리, 삼척시 원덕읍 임원리 일대의 토양에서 미생물을 분리한 결과, 세균 42점, 방선균 13점이 분리되었다. 또한 충남 태안군 남면 달산리 리지나뿌리썩음병 발생 해안립에서 채취한 토양시료에서 58개 균주(방선균: 36, 박테리아: 22)를 순수 분리하였다.

(2) 길항미생물 선발

산불지역에서 순수분리된 미생물을 *Rhizina undulata*와 대치배양하여 균사생육을 조사한 결과, 표 10과 같이 세균 20점, 방선균 8점이 본 병원균에 활성이 있는 것으로 밝혀졌다. 세균 중에서는 B26, 방선균 중에서는 12, 13균주가 가장 활성이 높았으며, 특히 B26균주는 토양병해인 *Rhizoctinia solani* TG-1, *Fusarium solani* f.sp. *pisi*, *Pythium ultimum*에는 거의 길항효과를 나타내지 않았고 본 병원균에만 특이하게 강한 활성을 나타내어 리지나뿌리썩음병의 생물적 방제에 활용가능성이 높은 것으로 판단되었다(그림 6).



그림 6. B26균주의 *R. undulata* 균사생장억제 효과

표 10. 산불지역에서 선발된 길항미생물의 *Rhizina undulata*에 대한 항균활성

공시균	균사생장억제율(%)	공시균	균사생장억제율(%)
B2	53	B37	37
B3	53	B38	62
B4	48	B39	59
B5	52	B40	56
B6	58	B41	64
B7	62	B42	65
B18	50	A1	32
B21	58	A2	56
B23	58	A3	43
B26	83	A5	34
B27	36	A10	51
B29	58	A11	44
B34	42	A12	61
B36	57	A13	61

B: Bacteria                      A: Actinomycetes

a) 균사생장억제율(%)

$$= \frac{\text{대조구의 균사생장량} - \text{처리구의 균사생장량}}{\text{대조구의 균사생장량}} \times 100$$

또한 2003년, 해안 병발생지인 충청남도 태안에서 길항미생물로 선발한 4균주 (Ta 3, 8, 17, 22), 강원도 화천 산불지역에서 선발한 4균주(Ha 1, 3, 5, 9) 및 동해안 산불지역에서 가장 효과가 높았던 B26균주 중 가장 활성이 높은 균주를 선발하기 위하여 지시균(*Rhizina undulata*)과의 대치배양을 통한 길항효과를 검정하였다. 지시균을 PDA 배지 가운데에 치상하고 길항미생물을 25mm 떨어진 거리에 치상하고 5~10일 후 저지거리를 조사한 결과, 표 11과 같이 태안에서 선발한 Ta22 방선균(그림 7)이 가장 양호한 길항효과를 보였고 산불지역에서 선발된 길항미생물에 비하여 해안 병발생지에서 선발된 길항미생물이 길항효과가 높게 나타났다.

표 11. 길항미생물의 *Rhizina undulata*에 대한 생육저지 효과

Strain	저지거리(mm)	Strain	저지거리(mm)
Ta 3	5.80	Ha 3	4.77
Ta 8	6.43	Ha 5	5.60
Ta 17	8.13	Ha 9	5.27
Ta 22	9.30	B-26	3.13
Ha 1	5.07		

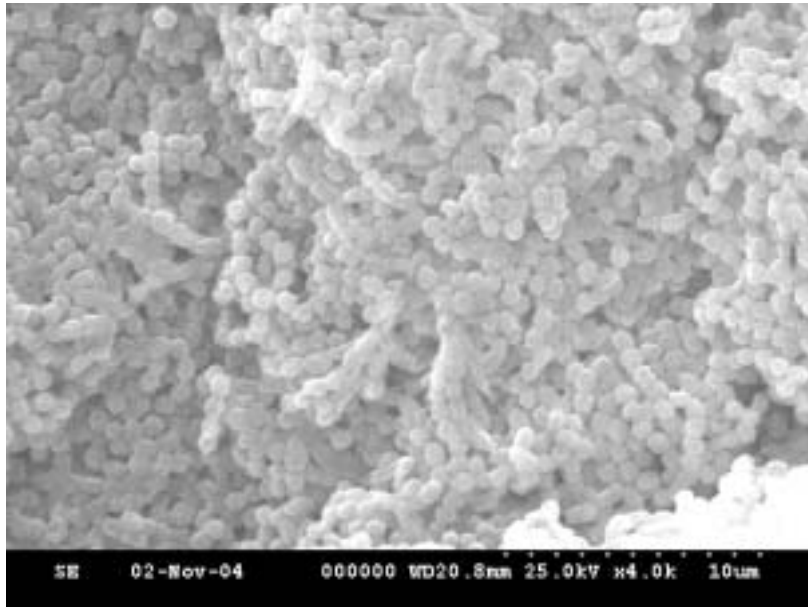
※ T: Taean region, a: Actinomyces(방선균), b: Bacteria(박테리아)



*R. undulata*의 균사생육 저지모습



ISP II 배지상의 colony 형태



Ta22의 포자 (4,000X, HITACHI S-3500, SEM)

그림 7. 길항미생물 Ta22의 병원균 균사생육 저지 및 형태적 특징

나) 선발길항미생물 방제효과 조사

최우수 길항미생물로 선발된 Ta 22균주의 최적배지인 ISP II 배지(ISP II, PDB, 혼합배지 = KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10% 용액 1mL, NaNO<sub>3</sub> 10% 용액 1mL, KCl 10% 용액 1mL, MgSO<sub>4</sub> 10% 용액 1mL, 수용성전분 10g, Sucrose 1g/L 중에서 선발)에서 우수 배양시간 및 항균활성조사를 실시하였다. 28℃에 72시간 배양한 것을 접종원으로 하여 100μl씩 접종하고 3, 5, 7, 10, 15일 진탕배양후 원심분리하여 배양여액을 조제하였다. 원심분리는 8,000rpm 20분 원심하고 그 여액을 다시 millipore filter(0.45μm)를 통과시켜 무균조작하였다. 저지도 조사는 각 배양여액을 penicillin cup에 180μl처리(1회, 2회)하여 지시균(*Rhizina undulata*: 궁촌리, 호산리)과 대치배양(대치거리 40mm)으로 저지거리를 조사한 결과, 배양여액에서는 전혀 저지효과를 보이지 않아 포자로 직접 방제효과를 조사하였다.

강원도 속초시 산불피해지에 Ta 22 방선균 포자현탁액을 53.2×10<sup>6</sup> cfu/ml 밀도로 처리한 후 자실체 발생량을 조사한 결과, 표 12와 같이 조사구간에 유의성을 찾을 수 없었으며 자실체량은 상층 소나무의 점유와 하층식생의 피복율에 의한 토양내 습도와 아주 관련이 깊은 것으로 추정되었다.

표 12. 길항미생물 Ta 22 포자현탁액 살포 후의 병원균자실체 발생량

처 리		자실체 발생량(개)				소나무 본수*	하층식생 피복율(%)
		7. 22	8. 11	8. 27	총발생량		
1조사구	길항미생물	0	0	11	11	7(2)/0	40
	무처리	0	74	144	218	6(3)/0	80
2조사구	길항미생물	11	20	45	76	4(1)/2(2)	30
	무처리	4	8	32	44	4/0	50
3조사구	길항미생물	0	0	0	0	4/3(1)	90
	무처리	7	7	10	24	4(1)/(2)	70

\* 소나무본수 7(2)/0은 조사구내에 7그루의 소나무가 있는데 그 중 2그루는 고사목, /다음의 숫자는 조사구 바로 옆에 있는 소나무본수를 표시한 것임.

살포한 길항미생물 Ta 22(S3)의 토양내 밀도변동을 파악하기 위하여 처리 전후의 방선균류의 우점율을 조사하였다. 그림 8에서 보는 바와 같이 Ta22의 살포로 처리 전 1.5% 점유율의 Ta22(S3)는 2개월 후에 24%로 급격하게 상승하여 지속적으로 땅속에서 생존하고 있는 것으로 분석되었으며 반면 40%와 18%를 점유하던 S1 및 S2의

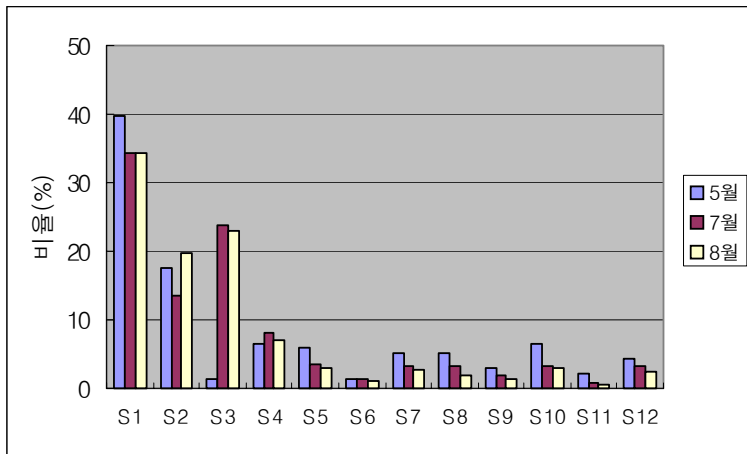


그림 8. 길항미생물 Ta22의 살포 전후의 방선균 밀도변동

밀도는 뚜렷하게 감소하였다. 따라서 Ta22는 밀도는 높지 않지만 일반적으로 흔히 존재하는 방선균으로서 일단 살포된 포자도 토양 내에서 긴 시간 생존가능하여 토양내 정착성이 높은 것으로 판단되어 방제효과도 얻을 수 있을 것으로 추정되었다.

2) 은수원사시나무 칩의 방제효과 조사

제 2협동과제에서 리지나뿌리썩음병균인 *R. undulata*의 군사생육을 강하게 저해하는 것으로 구멍된(제 3장 8절) 은수원사시의 칩을 40 l/25m<sup>2</sup> 로 2004년도 산불발생지인 삼척시 조양동에 뿌려 병원균의 자실체 발생량을 조사한 결과, 표 13과 같이 조사구간에 유의성을 찾을 수 없었으며 자실체량은 상층 소나무의 점유와 하층식생의 피복율에 의한 토양내 습도와 아주 관련이 깊은 것으로 추정되었다. 또한 토양미생물의 밀도도 처리별로 뚜렷한 경향치를 나타내지 않았다.

표 13. 현사시나무 칩 살포 후의 병원균자실체 발생량

처 리	자실체 발생량(개)				총발생량	소나무 본수*	하층식생 피복율(%)
	7. 22	8. 11	8. 27				
1조사구	현사시칩	0	0	0	0	7(3)/2(1)	40
	무처리	0	74	144	218	6(3)/0	80
2조사구	현사시칩	24	55	57	136	4(2)/4(1)	30
	무처리	4	8	32	44	4/0	50
3조사구	현사시칩	18	13	11	42	4(1)/3(1)	90
	무처리	7	7	10	24	4(1)/4(3)	70

다. 서해안 해안림 병발생 진전조사

2002년 6월 서해안 충남 태안군 남면 달산3리의 약 20ha의 해안 곰솔림이 군상으로 고사하고 있어 원인을 조사한 결과 27개소에서 294그루가 리지나뿌리썩음병에 의하여 죽은 것으로 판명되었다(그림 9). 고사피해목의 침엽부착정도로 보아 2001년부터 발생한 것으로 추정되었다(그림 10). 우리나라에서는 1981년 경주 남산의 모닥불터 주변의 소나무와 곰솔이 본 병원균에 의해서 죽은 것으로 밝혀진 이후, 동해안의 적송 및 곰솔의 해안림에서 쓰레기 조각, 취사 및 모닥불이 지속적으로 행해지고 있는 휴양지를 따라 확산되고 있는 추세였으나, 서해안에서의 리지나뿌리썩음병의 발생은 처음으로 밝혀졌다.

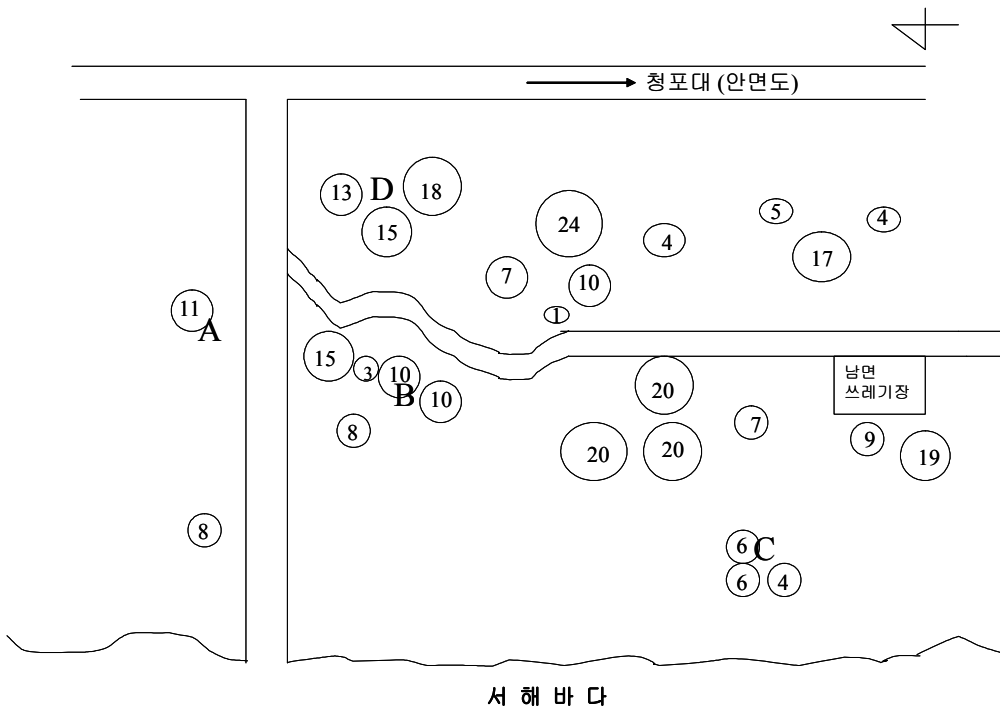


그림 9. 리지나뿌리썩음병에 의한 태안 해안곰솔림의 피해위치 및 조사구 위치도  
\*숫자는 고사본수, A~D는 조사구를 나타냄





그림 10. 해안림에 발생한 리지나뿌리썩음병 발생지  
(태안군 남면 달산3리, 곰솔, 2002. 06)

병발생지는 천연발생 지역으로서, 조사구 4개소 내의 고사목의 흉고직경은 9.1~25.0cm 수준이었으며, 피해현상은 작은 가지는 있으나 침엽이 부착되어 있지 않아 2001년부터 고사된 것으로 추정되었고, 2001년 고사목 외곽으로 2002년 고사목이 발생하고 있었다. 병원균의 자실체는 주로 고사목 외곽지역에서 발생하고 있어 병원균의 균사가 이미 외곽에 분포하고 있는 것으로 판단되었다.

또한 해안림의 토양분석을 실시한 결과, 풍화가 거칠게 이루어진 모래토양으로서 양분이 거의 없는 상태이었으며, 토양산도는 평균 pH 5.28로 산성을 나타내었다(표. 14).

표 14. 태안 달산리 피해지역의 토양특성(2002년 6월)

채집 장소	입도분석 (%)				산 도 pH	유기물 O.M (%)	전질소 T-N (%)	유효 인산 (mg/ Kg)	C.E.C (cmol <sup>+</sup> / Kg)	치환성 양이온(cmol <sup>+</sup> /Kg)				E.C (mS/ cm)
	모래	미사	점토	토성						K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	
태안1	98.22	0.17	1.61	S	5.23	0.26	0.018	34.31	3.08	0.32	0.14	0.64	0.52	0.02
태안2	98.64	0.08	1.28	S	5.33	0.10	0.015	16.89	2.86	0.19	0.12	0.58	0.33	0.02
태안3	98.80	0.24	0.96	S	5.44	0.49	0.021	6.95	3.08	0.13	0.11	0.31	0.12	0.01
태안4	98.94	0.22	0.84	S	5.47	0.33	0.021	9.59	2.86	0.24	0.11	0.69	0.69	0.02
태안5	94.12	3.63	2.25	S	5.79	0.92	0.009	6.04	2.64	0.16	0.11	0.23	0.12	0.01
태안6	92.20	4.91	2.89	S	4.63	0.39	0.086	17.47	5.28	0.24	0.11	0.76	0.52	0.04
태안7	91.42	5.69	2.89	S	5.57	0.34	0.018	8.32	2.86	0.22	0.12	0.70	0.37	0.02
태안8	98.46	0.90	0.64	S	4.80	0.70	0.037	12.25	3.74	0.19	0.11	0.43	0.53	0.02

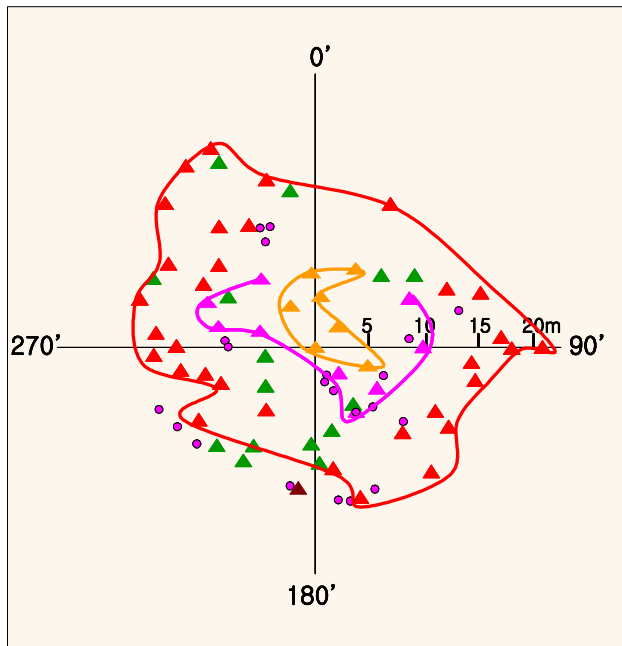
태안 병발생지 중 4개소의 조사구를 선정하여 2002년 6월부터 년 2회에 걸쳐서 한여름인 7월 하순과 이듬해 나무가 성장하기 전인 1~3월에, 피해목의 침엽 부착정도 및 상태를 조사하고 고사목과 파상땅해파리버섯의 위치는 및 병 진전사항을 mapping하였다. 고사목 및 자실체 위치는 중심목을 선정한 후 하가로프측정기로 거리 및 각도를 측정하여 지도화하였으며 자실체의 발생량은 2002년에는 7월 30일, 2003년에는 7월 29일, 2004년에는 7월 27일에 조사된 결과이다.

표 15 및 그림 11에서 보는 바와 같이, 2001년 최초 피해가 발생 한 후, 봄철 토양온도 상승과 함께 병원균의 균사도 활력이 높아져 수분이나 영양분 소모량이 많은 시기인 봄~여름에 피해가 급증한 것으로 판단되었으며, 피해는 균상으로 확산되었다. 또한 파상땅해파리버섯의 자실체는 고사목의 외곽지역에 집중적으로 발생하고 있었으나 7월 하순에 발생하지 않는 경우도 있어 봄부터 가을에 걸쳐 상세한 자실체 발생조사가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 3년간에 걸친 병발생 진전사항을 보면 불규칙한 동심원을 이루면서 최초발생지로부터 외곽으로 계속 확산하면서 피해를 주었다.

Sato 등(1974), Hagner(1962), Gremmen(1971)등은 해안림에서 년간 진행속도가 반경 3~5m로 확산된다고 하였는데, 본 조사에서는 고사목은 3년간 최대 반경 20m이상 확산되었고 그 외곽으로 병원균의 자실체가 분포하고 있어 서해안의 해안 모래땅에서는 년 7m이상의 균사생장이 확산가능한 것으로 판단되었다. 또한 지리적으로 옹덩이가 있던지 소나무가 분포하지 않는 지역이 있을 경우에는 다른 방향으로 보다 넓은 거리로 확산하는 것으로 추정되었다.

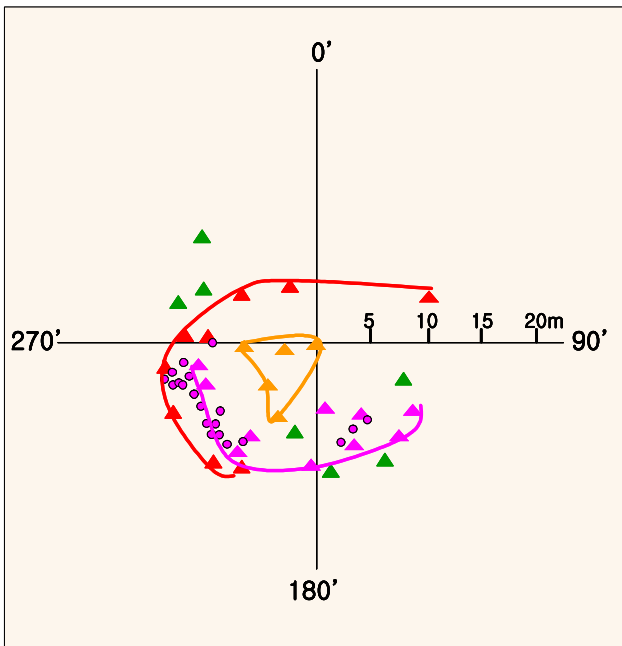
표 15. 리지나뿌리썩음병에 의한 시기별 고사본수

조사구	2001년	2002년		2003년		2004년	총고사본수
		여름 (7.30)	겨울 (03.17)	여름 (7.29)	겨울 (04.17)	여름 (7.27)	
A	7	6	3	32	1	1	50
B	5	7	3	8	1	0	24
C	3	1	0	12	1	3	20
D	4	13	1	16	0	5	39

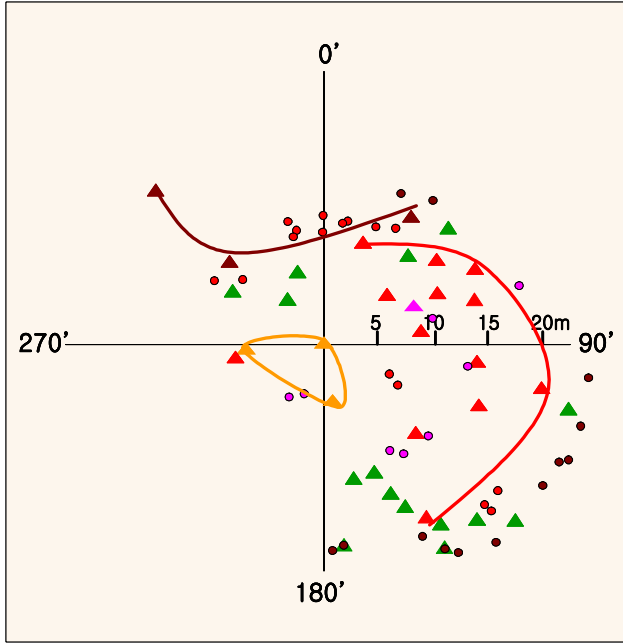


- ▲ : 2001년 고사
- ▲ : 2002년 고사
- ▲ : 2003년 고사
- ▲ : 2004년 고사
- ▲ : 생존 소나무
- : 2002년 자실체
- : 2003년 자실체
- : 2004년 자실체

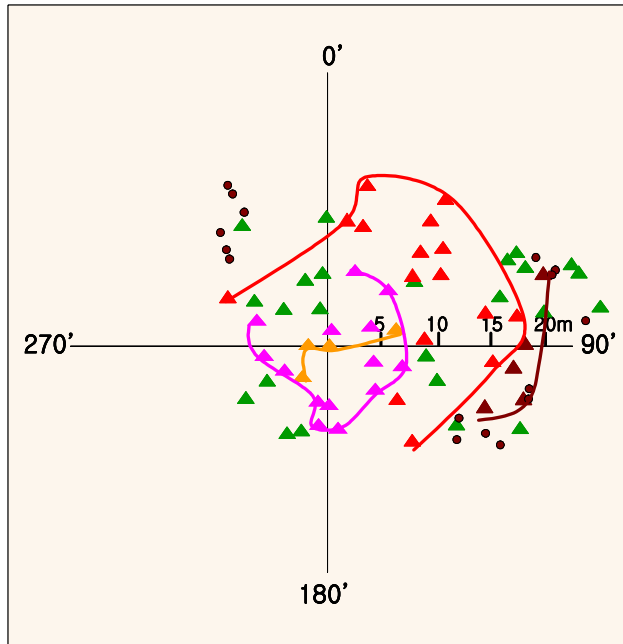
A조사구



B조사구



C조사구



D조사구

그림 11. 연도별 고사목과 파상땅헤파리버섯의 위치

라. 산불지역과 해안림 병발생지의 미생물상 분석

산불발생당년에 대부분의 소나무림에 다량으로 발생한 과상땅해파리버섯의 자실체는 1년 후에 급격히 감소하나 서해안의 해안림에서는 계속적으로 불규칙한 동심원으로 병이 확산되는 것을 볼 수 있었다. 그 원인분석으로 산악산불지역, 병발생 피해지, 병회복지의 토양미생물 밀도를 조사하였다. 산불지역은 2004년 산불지인 속초 조양동 시험지의 무처리구, 태안지역은 병발생진전조사를 실시하고 있는 A, C, D지역의 회복지와 현재 피해지에서 깊이 5cm 부근의 토양을 채집하여 토양미생물 밀도를 단계회석법에 의하여 조사하였다. 표 16과 같이 산불이 발생한 산림지역의 토양미생물 밀도는 태안의 모래땅에 비하여 세균, 곰팡이 및 방선균 공히 뚜렷하게 높은 것으로 확인되었다. 태안해안림의 병회복지는 피해지에 비하여 토양미생물이 증가하는 경향을 나타내어, 병의 회복과 아울러 토양미생물 밀도도 증가하는 것으로 판단되었다.

표 16. 해안림병발생지역과 산불지역의 토양미생물 밀도 비교

지 역	세균( $1 \times 10^5$ )		곰팡이( $1 \times 10^4$ )		방선균( $1 \times 10^4$ )	
	6월17일	8월26일	6월17일	8월26일	6월17일	8월26일
태안 피해지	2.69	3.48	3.83	3.48	0.87	1.69
태안 회복지	3.22	4.34	5.74	4.34	1.29	1.69
속초 산불지	9.06	6.83	7.52	6.68	1.92	3.64

한편 방선균의 colony별로 밀도를 비교한 결과 그림 12와 같이 산악 산불지역에서는 S1, S2가 우점균이었으나, 해안림에서는 S1, S3가 우점균이었고 방선균의 종류는 산악산불지역에 비하여 단조로운 반면 밀도는 약간 높았다. S2는 산악산불지역에서만 검출되는 균으로 판단되며, 길항미생물인 S3는 산악산불지역에는 아주 낮은 밀도였으나 태안의 병피해지 및 병회복지에서는 S1 다음으로 밀도가 높았고 피해지나 회복지간에 유의성은 없었다. 이들 방선균류가 본 병원균에 미치는 직·간접적인 영향 등은 추후 연구되어 산악산불지역에 있어서 병원균의 빠른 소멸에 대한 해석이 구명되어야 할 것으로 생각된다.

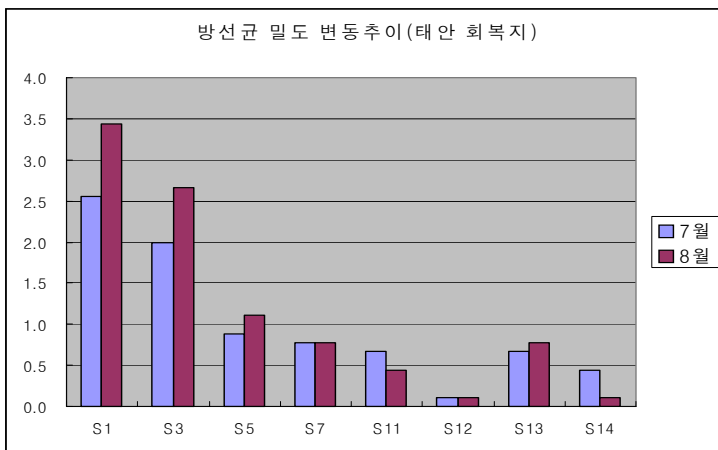
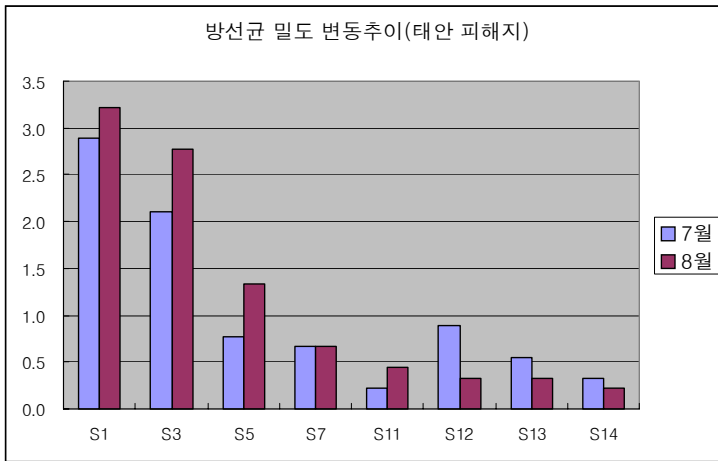
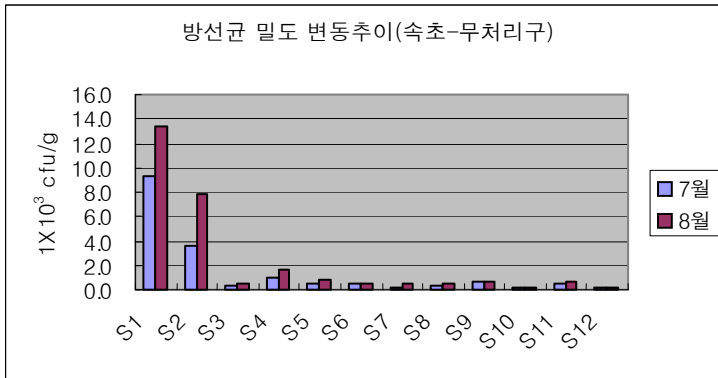


그림 12. 산악산불지역과 태안해안림의 병발생지에 있어서의 방선균 밀도비교 분석

## 제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 목표달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	달성도(%)
1차년도 ( 2001 )	○ 리지나뿌리썩음병균의 생리적 특성규명	100
	○ 산불발생정도별 리지나뿌리썩음병 발생조사	100
	○ 송이복원조림지에서의 조림묘목의 고사율 및 성장조사	100
	○ 길항미생물 탐색 및 선발	100
	○ 토양개선에 의한 병발생 억제효과 구명	100
2차년도 ( 2002 )	○ 리지나뿌리썩음병균의 기주범위 및 침엽수 기주특이성 기작 규명	100
	○ 리지나뿌리썩음병균의 병원성 검정	100
	○ 소나무용기묘 균근형성 조사	100
	○ 토양개선에 의한 병발생 억제효과 구명	100
	○ 길항미생물의 병발생 억제효과 조사	100
3차년도 ( 2003 )	○ 분리 및 확보 균주의 지역적 유전적차이 (분자수준에서 비교) 및 유입경로 확인	100
	○ 소나무균근균과 리지나뿌리썩음병균과의 상호관계	100
	○ 토양개선에 의한 병발생 억제효과 구명	100
	○ 생물학적 방제기술 개발	100
	○ 서해안 해안림 병발생진전조사	100

## 2. 기술적 기여도

- '96년 고성에서 발생한 대형산불에 이어 2000년에는 강원도 동해안 일대 약 24,000 ha에 이르는 산림에 산불이 발생하여 엄청난 피해를 입혔다.
- 특히 이 지역은 소나무를 포함하는 침엽수가 상당부분을 차지하고 있고 산불이 발생한 소나무 임지 중 상당 부분은 송이발생임지로써 년 21.6톤의 송이생산으로 이 지역 농가소득의 큰 비중을 차지하였으며 이 지역 경제에도 크게 이바지하고 있다.
- 이 지역의 주민정서와 송이 생육환경 복원을 감안할 때, 올해부터 약 4,000 ha 정도의 면적에 송이복원을 위하여 소나무 종자 파종 및 용기묘 조립을 실시할 계획이다.
- 그러나, 2000년 산불발생 직후 소나무임지에는 리지나뿌리썩음병이 대규모로 발생하여 현재 생존하고 있는 나무 뿐 만 아니라 다른 지역으로부터 이식한 소나무 묘목이 이 병에 의해 치명적인 피해를 입고 고사하는 현상이 확인되어 (2000. 11. 4.에 개최된 한국균학회 2000년 추계 학술발표회에서 강원대와 임업연구원이 공동 발표), 올해부터 단계적으로 조립할 소나무 묘목에 큰 피해를 입힐 것으로 예상된다.
- 실제 고성산불 발생시에 생존목의 60% 정도가 산불발생 1년 후에, 90% 정도가 2년 후에 고사한 것으로 조사되었으며, 이에 대한 정확한 원인은 밝혀져 있지 않지만 생존목의 고사에 리지나뿌리썩음병이 부분적으로 관여하였을 것으로 추정된다.
- 따라서 올해부터 산불발생지역에서 대규모로 실시될 복원조립사업에서 이식한 소나무 묘목이 이 병으로부터 입는 피해를 최소화할 수 있는 방안은 우리나라에서 아직까지 본격적으로 연구된 바가 없는 산불발생지역에서의 리지나뿌리썩음병의 발병생태 및 송이균과의 관계, 병원균의 생리 및 분자생물학적 특성 규명, 효과적인 방제기술 개발 등에 관한 연구를 수행하는 것이 중요하고 절대적으로 필요하다.

## 3. 경제 · 산업적 기여도

- 지난해 동해안 지역에서 발생한 대형산불은 임목의 피해 뿐 만 아니라 이 지역 산림생태계를 파괴한 우리나라 초유의 대형산불이었다. 이 지역은 특히 송이가 많이 생산되는 지역으로 강원도 전체 생산량의 20% 정도를 차지할 정도로 농가소득 뿐만 아니라 지역경제에 크게 이바지하여 왔다.



- 그러나 지난 산불에 의해서 송이발생임지 내의 소나무가 거의 불에 타 죽은 상태에서 앞으로 이 지역에서는 당분간 송이생산을 기대할 수 없게 되어 이 지역 경제는 큰 어려움을 겪고 있는 실정이다.
- 송이발생 임지 내의 토양에서 소나무의 뿌리와 공생을 하는 송이균도 소나무가 죽은 상태에서는 1년 6개월을 넘기지 못하고 거의 죽게 되는 것으로 알려져 있다.
- 따라서 송이복원조림은 이 기간 내에 이루어져야 원래 의도한 송이복원조림이라는 궁극적인 목적을 달성할 수 있는데, 여기에는 리지나뿌리썩음병이라는 무서운 복병이 도사리고 있다.
- 결론적으로 산불발생지역, 특히 송이생산임지에서 향후 20-30년 후에 송이 재생산을 이룩하기 위해서는 우선 산불발생 토양내 송이균사의 유지관리가 가장 우선되어야 하고 이를 위해서는 조기 복원조림한 소나무 묘목이 리지나뿌리썩음병에 의한 피해를 입지 않아야만 성공할 수 있을 것이다.
- 따라서 산불이 발생한 송이발생임지 뿐만 아니라 일반 소나무 임지에서 성공적인 소나무조림이 이루어질 수 있도록 리지나뿌리썩음병의 생태와 효과적인 방제기술 개발에 대한 이 연구를 통하여 예산절감과 지역 경제발전에 이바지 하고자 한다.

## 제 5장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절 리지나뿌리썩음병균의 생리 및 유전학적 특성 규명

이 실험의 결과로 지중 온도에 의한 리지나뿌리썩음병의 발병 환경 예측과 함께, 리지나뿌리썩음병의 기주범위를 추정할 수 있으며 은사시나무의 항균성 물질의 이용 가능성을 제시하여 주었다. 한편, 국내의 리지나뿌리썩음병균 분리주는 일본으로부터 유입되었으며, 현재까지는 동일한 유전형질을 갖고 있는 것으로 추정되어, 리지나뿌리썩음병의 종합적인 방제에 기초자료로 활용할 수 있을 것이다.

### 제 2절 리지나뿌리썩음병의 발병생태와 소나무와의 관계

용기묘 생산시 베노밀 등의 살균제를 적정농도로 처리하여 균근형성율을 높이고 송이복원조립을 위해서는 산화 당해연도에 가능하면 빨리 용기묘를 이식해야 한다.

### 제 3절 리지나뿌리썩음병의 효과적인 방제기술 개발

본 연구의 결과로 토양내 정착성이 아주 우수하여 생물학적 방제에 활용가능성이 높은 길항미생물이 선발되었고, 산불로 우점적으로 발생한 본 병은 이듬해에는 대부분 활력을 잃는 것으로 밝혀져 소나무 조립시기 결정에 활용될 것이다. 또한 해안림 병발생지의 지속적인 확산형태가 구명됨으로서 방제구역 설정에 활용될 것이며, 병피해 해석에 기초자료가 될 것이다.

## 제 6장 참고문헌

### 1. 리지나뿌리썩음병의 생리 및 유전학적 특성 규명

- Germmen, J. 1971. *Rhizina undulata*. A review of research in the Netherlands. *Eur. J. For. Path.* 1: 1-6.
- Gibson, I. A. S., 1970. Disease of *Pinus patula* review. *Commonw. For. Rev.* 49 : 267-274.
- Ginns, J. H. 1968. *Rhizina undulata* pathogenic on Douglas fir seedlings in western north America. *Pl. Dis. Reprtr.* 52: 579-580.
- Hartig, R. 1892. Untersuchungen uber *Rhizina undulata*. *Bot. Zentble.* 45: 237-238.
- Jalaluddin, M. 1967. Studies *Rhizina undulata*. I Mycerial growth and ascospore germination. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 50: 449-459.
- Prillieux, E. E. and Boulaye, Seurrat de la. 1880. (Quelques renseignements sur la maladie dite du rond dans les pineraies). In *Compt. Rend. Soc. Agr. France.* 11: 386-389.
- Thompson, J. H. and T. A. Tattar. 1973. *Rhizina undulata* associated with disease of 80 - year - old red spruce in Vermont. *Pl. Dis. Reprtr.* 57: 394-396.
- Weir, J. R. 1915. Observation on *Rhizina inflata*. *J. Agr. Res.* 4: 93-95.
- Yoon, C. S., Glawe, D. A. and Shaw, P. W. 1991. A method for rapid small-scale preparation of fungal DNA. *Mycologia* 83: 835-838.
- 木村重義. 1968. 石巻クロマツ海岸林における 虫害枯死木の 發生位置の 推移. 昭和42年度林試東北支場年報 pp.229-238.
- 兵 武人 唐澤清. 1974. つちくらげ病の應急防除對策について. 森林防疫 23: 234-236.
- 龍田利滿. 千村俊夫. 1984. マツのつちくらげ病發生條件の一考察. 森林防疫 33: 12-16.
- 赤祖父 豊雄. 1979. 富山縣雨晴 島尾海岸砂丘林に發生したマツのつちくらげ病 - 被害調査と試み - 森林防疫 28 :156-160.
- 佐藤邦彦. 横澤良憲. 1973. つちくらげ病に關する研究 (II) 病原菌の病原性. 日林東北支誌 23: 233-236.
- 佐藤邦彦. 横澤良憲. 庄司次男. 1970. つちくらげ病に關する研究 (I) 東北地方における被害とその分布. 81回日林講 pp.249-251.
- 佐藤邦彦. 横澤良憲. 庄司次男. 1970. 山火事跡のアカマツ林に發生した病害. 昭和 44年

- 度林試東北支場年報 pp.206-214.
- 佐藤邦彦, 横澤良憲, 庄司次男. 1974. 마쯔類의 群狀枯死을 起こす [つちくらげ] 病に關する 研究. 林試研報 268: 13-48.
- 佐佐木 活. 1980. 德島縣下に 發生したつちくらげ病について. 森林防疫 29: 206-214.
- 陳野好之, 庄司次男. 1980. 마쯔類のつちくらげ病に關する 研究 - 被害地における病原菌の捕捉法について -. 日林東北支誌 32: 232-233.
- 陳野好之, 庄司次男. 1981. 마쯔類のつちくらげ病に關する 研究 - 被害のまん延と病原菌の捕捉との關係. 92回日林論 pp.399-400.
- 八幡一彦, 作山建. 1982. 마쯔つちくらげ病の病原菌の捕捉とマ쯔枯損進行との關係. 日林東北支誌 34: 111-112.
- 呂運鴻. 1981. 樹木病原體의 分離同定에 關한 研究. 1981年度 試驗研究報告書 (山林廳 林業 試驗場) pp.803-813.
- 李相龍, 金完圭. 1990. 소나무 리지나뿌리썩음病에 關한 研究 - *Rhizina undulata*의 生理的 特性 및 病原性. 韓國林學會誌 79: 322-329.
- 李昌根, 呂運鴻, 金教秀, 金京姬. 1982. 잣나무잎녹病等 樹木病害 3種에 關한 研究. 林試研報 29: 253-262.

## 2. 발병생태와 소나무와의 관계구명

- 오광인. 1984. Pt균의 인공접종에 의한 상수리나무 분묘의 성장과 외생균근 발달. 한국임학회지 67 :10-16.
- 오광인, 박화식. 1988. 배양토 및 질소 비료 수준이 모래발버섯균을 접종한 해송묘의 성장과 균근 형성에 미치는 영향. 한국임학회지 77(4) :361-370.
- 이경준, 구민규. 1988. 인공 산성우가 모래발버섯과 비단그물버섯 균근균으로 접종한 리기테다소나무 묘목의 성장에 미치는 영향. 한국임학회지 77(4) :453-459.
- 이경준. 1992. 묘포장에서 균근균으로 인공 접종한 5개 소나무종의 접종 10년 후 조림지에서의 성장 효과. 한국임학회지 81(2) :156-163.
- 이경준, 이돈구, 이원규, 구창덕. 1983. 균근 연구의 농림업에서의 이용. 한국임학회지 59p.
- 이경준, 구창덕. 1984 한국산과 미국산 모래발버섯 균근균의 리기테다 소나무 접종묘에 대한 포자접종 효과 비교. 한국임학회지 65: 43-47.
- Cordell, C.E., Marx, D.H., Lott, J.R., and Kemmey, D.S. (1981). The practical application of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizal inoculum in forest tree nurseries. Forest Regeneration pp.38-42.

- Cordell,C.E.(1985). The application of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae in forest land management. In: Proceedings of 6th North American Conference on Mycorrhizae. Edit by R. Molina. Forest Research Laboratory. Oregon State University. Corvallis. pp.69-71.
- Chakravarty,P. and Unestam,T.(1987). Differential influence of ectomycorrhizae on plant growth and disease resistance in *Pinus sylvestris* seedlings. J. Phytopathology 120: 104-120.
- Duchesne,L.C., Peterson,R.L and Ellis,B.E.(1988). Pine root exudates stimulates the synthesis of antifungal compounds by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. New Phytol. 108: 471-476.
- Duchesne,L.C., Peterson,R.L.,Ellis,B.E.(1988). Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and *Pinus resinosa* induces resistance to *Fusarium oxysporum*. Can. J. Bot. 66: 558-562.
- Duchesne,L.C., Ellis,B.E., and Peterson,R.L.(1989). Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: contribution of oxalic acid. Can. J. Bot. 67: 2726-2730.
- Duchesne,L.C., Peterson,R.L and Ellis,B.E.(1989). The time-course of disease suppression and antibiosis by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. New Phyto. 111: 693-698.
- Farquhar,M.L. and Peterson,R.L.(1990). Early effects of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* on the root rot organism *Fusarium* associated with *Pinus resinosa*. Can. J. Bot. 68: 1589-1596.
- Farquhar,M.L., and Peterson,R.L.(1991). Later events in suppression of *Fusarium* root rot of red pine seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Can. J. Bot. 69: 1372-1383.
- Kryworap,G.N., Grand,L.F.,and Casida,L.E.(1964). The natural occurrence of an antibiotic in the mycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme*. Can. J. Microbiol. 10: 323-328.
- Graham,J.H.and Linderman,R.G.(1980). Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* f.sp.*pini*, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium*-infected Douglas-fir root. Can. J. Microbiol. 26: 1340-1347.
- Graham,J.H., Linderman,R.G.(1981). Effect of ethylene on root growth, ectomycorrhiza formation, and fusarium infection of Douglas-fir. Can. J. Bot. 59: 149-155.

- Ho,Iwan.(1987). Comparison of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity and phytohormone production. Can. J. For. Res. 17: 31-35.
- Johnson,C. N.(1996). Interactions between mammals and ectomycorrhizal fungi. Tree 11(12): 503-507.
- Lee,J.K., I.W.Seo, J.H. Jung, and S.Y.Lee.(2002). Effects of wood vinegar on mycelial growth of different groups of fungi. Mycobiology 30(4): 251-252.
- Marx,D.H and Barnett,J.P.(1974). Mycorrhizae and containerized forest seedlings. North American Containerized Forest Tree Seedling Symposium pp.85-92.
- Marx,D.H.(1968). The influence of mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59: 153-163.
- Marx,D.H., and Davey.C.B.(1968). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 59: 549-558.
- Marx,D.H.(1970). The Influence of Ectotrophic Mycorrhizal Fungi on the Resistance of Pine Roots to Pathogenic Infections. V. Resistance of Mycorrhizae to Infection by Vegetative Mycelium of *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 60: 1472-1473.
- Marx,D.H. and Davey,C.B.(1968). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. IV. Resistance of naturally occurring mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 59: 559-565.
- Marx,D.H.(1968). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungus on the resistance of pine roots to pathogenic infection. II. Production, identification, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis* var.*piceina*. Phytopathology 59: 411-417.
- Marx,D.H., Ruehle,J.L., Kenney,D.S., Cordell,C.E., Riffle,J.W., Molina,R.J., Pawuk,W.H., Navratil., Tinus,R.W., and Goodwin,O.C.(1982). Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. For. Sci. 28(2): 373-400.
- Marx,D.H.(1972). Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. Anu. Rev. Phytopath. pp.429-459.
- Parke,J.L.,Linderman,R.G., and Black,C.H.(1983). The role of ectomycorrhizas in

- drought tolerance of Douglas-fir seedlings. *New Phytol.* 95: 83-95.
- Riffle, J.W. (1971). Effect of nematodes on root inhabiting fungi. p97-113. in *Mycorrhizae*. E. HacsKaylo (ed). U.S.D.A. Publ. 1189. 225p.
- Marx, D.H., Bryan, W.C., Cordell, C.E. (1977). Survival and growth of pine seedlings with *Pisolithus* ectomycorrhizae after two years on reforestation sites in North Carolina and Florida. *For. Sci.* 23: 363-373.
- Seo, I.L. won, Sung Jae Lee, Doo Sik Chun, and Jong Kyu Lee. (2003) Mortality and growth of containerized pine seedlings transplanted in pine stands with abundant fruiting bodies of *Rhizina undulata* after forest fire. *Proceedings of the Ann. Meeting of Korean Society of Forestry*. pp.298-299. June 26-27. Sang-ju University.
- Seo, I.L. won and Jong Kyu Lee. (2003) Trenching effect of benomyl and wood vinegar from oak tree on ectomycorrhizal formation and seedling growth of *Pinus desiflora*. *Proceedings of the Ann. Meeting of Korean Society of Forestry*. pp.300-301. June 26-27. Sang-ju University.
- Seo, I.L. won and Jong Kyu Lee. (2003) Effects of ectomycorrhizal fungi on root pathogens and on red pine seedlings. p.89. *Proceedings of the Annual Meeting of Korean society of Plant Pathology*
- Seo, I.L. won, Sung Jae Lee, and Jong Kyu Lee. (2004) Root disease suppression of red pine seedlings by ectomycorrhizal formation. *Proceedings of the XVth International Plant Protection Congress*. p489. May 11-16, Beijing, China
- Sinclair, W.A., Sylvia, D.M., Larsen, A.O. (1982). Disease suppression and growth promotion in Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Forest Sci.* 28(2): 191-201.
- Sylvia, D.M. and Sinclair, W.A. (1983). Suppressive influence of *Laccaria laccata* on *Fusarium oxysporum* and on Douglas-fir seedlings. *Phytopathology* 73: 384-389.
- Schenck, N.C. (1981). Can mycorrhizae control root disease? *Plant Dis.* 65(3): 230-234.
- Strobel, N.E. and Sinclair, W.A. (1991). Role of flavanolic wall infusions in the resistance induced by *Laccaria bicolor* to *Fusarium oxysporum* in primary roots of Douglas-fir. *Phytopathology* 81: 420-425.
- Stack, R.W. and Sinclair, W.A. (1974). Protection of Douglas-fir seedlings against fusarium root rot by a mycorrhizal fungus in the absence of mycorrhiza formation. *Phytopathology* 65: 468-472.
- Sylvia, D.M. and Sinclair, W.A. (1983). Phenolic compounds and resistance to fungal

- pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology* 73: 390-397.
- Trappe, J.M. (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 203-222.
- Tinker, P.B. (1984). The role of microorganism in mediating and facilitating the uptake of plant nutrients from soil. *Plant Soil* 76: 77-91.
- Pawuk, W.H. and Brnnett, J.P. (1981). Benomyl stimulates ectomycorrhizal development by *Pisolithus tintorius* on *Shortleaf pine* grown in container. Southern Forest Experiment Station. Research Note.
- Wu, B., Nara, K. and Hogestu, T. (1999). Competition between ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza* 9: 151-159.
- Zak, B. (1964). Role of mycorrhizae in rot disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 377-392.

### 3. 리지나뿌리썩음병의 효과적인 방제기술 개발

- Egger, K. N., Paden J. W. 1986. Pathogenicity of post-fire ascomycetes (Pezizales) on seeds and germinants of lodgepole pine. *Can. J. Bot.* 64 : 2368-2371.
- Garbutt, R. 1988. Seedling mortality by Rhizina root disease, British Columbia, 1988. Forest Insect and Disease Survey Pest Report.
- Germmen, J. 1971. *Rhizina undulata*. A review of research in the Netherlands. *Eur. J. For. Path.* 1: 1-6.
- Ginns, G. H. 1968. *Rhizina undulata* pathogenic on Douglas fir seedlings in western north America. *Pl. Dis. Repr.* 52: 579-580.
- Hartig, R. 1892. Untersuchungen uber *Rhizina undulata*. *Bot. Zentble.* 45: 237-238.
- Jalaluddin, M. 1967. Studies *Rhizina undulata*. I Mycerial growth and ascospore germination. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 50: 449-459.
- Lundquist, J. E. 1984. The occurrence and distribution of Rhizina rot in South Africa and Swaziland. *S. Afr. For.* 131 : 22-24.
- Marx, D.H. (1968). The influence of mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Thompson, J. H. and T. A. Tattar. 1973. *Rhizina undulata* associated with disease of 80 - year - old red spruce in Vermont. *Pl. Dis. Repr.* 57: 394-396.
- Weir, J. R. 1915. Observation on *Rhizina inflata*. *J. Agr. Res.* 4: 93-95.



- 김병운 등. 2002. 채소와 화훼재배농가의 목탄과 목초액의 사용기준설정 및 토양개량용 목탄개발. pp. 202
- 박동진, 육연수, 김중진, 이상화, 김창진. 1999. 산불발생 후 토양미생물 밀도변화. 한국미생물학회 35 : 78-81.
- 呂運鴻. 1981. 樹木病原體의 分離同定에 關한 研究. 1981年度 試驗研究報告書(山林廳 林業 試驗場) pp.803-813.
- 이명보 등. 2003. 청양·예산 산불피해지 정밀조사 보고서. 청양·예산 산불피해지 공동조사단. pp. 390
- 李相龍. 金完圭. 1990. 소나무 리지나뿌리썩음병에 關한 研究 - *Rhizina undulata*의 生理的 特性 및 病原性. 韓國林學會誌 79: 322-329.
- 이원규, 김춘식, 차순형, 김영걸, 변재경, 구교상, 박재욱. 1997. 산불이 산림토양의 이화학적 성질에 미치는 영향. 한국생태학회 20 : 157-162
- 李昌根. 呂運鴻. 金教秀. 金京姬. 1982. 잣나무잎녹병等 樹木病害 3種에 關한 研究. 林試研報 29: 253-262.
- 兵 武人, 唐澤清. 1974. つちくらげ病の應急防除對策について. 森林防疫 23: 234-236.
- 兵 武人, 神津秀勝. 1979. 山災跡地に發生したマツのつちくらげ病. 森林防疫 28 : 147-148.
- 木村重義. 1968. 石巻クロマツ海岸林における 蟲害枯死木の 發生位置の推移. 昭和42年度林試東北支場年報 pp.229-238.
- 龍田利滿. 千村俊夫. 1984. マツのつちくらげ病發生條件の一考察. 森林防疫 33: 12-16.
- 赤祖父 豊雄. 1979. 富山縣雨晴 島尾海岸砂丘林に發生したマツのつちくらげ病 - 被害調査と試み - 森林防疫 28 :156-160.
- 佐藤邦彦. 1976. マツ類群像枯死を起こす [つちくらげ] 病とその防除對策. 森林防疫 25 : 81-87.
- 佐藤邦彦. 横澤良憲. 1973. つちくらげ病に關する研究 (II) 病原菌の病原性. 日林東北支誌 23: 233-236.
- 佐藤邦彦. 横澤良憲. 庄司次男. 1970. つちくらげ病に關する研究 (I) 東北地方における被害とその分布. 81回日林講 pp.249-251.
- 佐藤邦彦. 横澤良憲. 庄司次男. 1970. 山火事跡のアカマツ林に發生した病害. 昭和 44年度林試東北支場年報 pp.206-214.
- 佐藤邦彦. 横澤良憲. 庄司次男. 1974. マツ類の群狀枯死を起こす [つちくらげ] 病に關する研究. 林試研報 268: 13-48.
- 佐佐木 活. 1980. 德島縣下に 發生したつちくらげ病について. 森林防疫 29: 206-214.
- 陳野好之, 林 弘子, 兵 武人. 1978. 山火事跡に發生したつちくらげ病防除試驗. 89回日林論 : 305-306

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.