

무균적인 송이버섯균감염소나무모육성에 관한 연구

김은철, 남걸, 김영찬

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《우리는 가까운 앞날에 전반적인 과학기술분야에서 세계를 디디고 올라설수 있다는 배심을 가지고 첨단돌파의 기적들을 련이어 창조하여야 합니다.》

우리는 송이버섯홍종균과 솥종균에서 소나무씨앗을 무균적으로 싹틔워 종균속에서 새 뿌리를 유도하고 송이버섯균에 의한 감염률을 90%이상으로 보장할수 있는 무균적인 송이버섯균감염모육성방법을 확립하였다.

재료와 방법

송이버섯종균으로는 전문연구소에 보관된 *Tricholoma matsutake* 1로 만든 흙과 소나무 솥종균, 2018년 9월에 채취한 붉은소나무씨앗을 리용하였다. 종균배양에 리용한 배지의 조성은 포도당 2%, 효모엑스 0.5%, 펩톤 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, 비타민 B₁ 0.004%이다.

소나무씨앗소독제로서 에틸알콜, 이산화염소수, 차아염소산소다, 과망간산칼리움을 리용하였으며 싹틔움재료로서 금강약돌, 송이버섯산지흙, 모래를 리용하였다.

1) 송이버섯종균에서 소나무씨앗을 무균적으로 싹틔우는 방법

씨앗준비 씨앗채취는 2018년 9월 중순에 자연림에서 우량개체들을 골라 솔방울채로 따는 방법으로 하였다. 씨앗털기는 솔방울을 해빛에 2일동안 말리운 다음 솔방울비늘쪽이 최대로 벌어진 때에 하였는데 솔방울을 때리고 그물주머니에 넣어 흔들어주는 방법으로 하였다.

싹틔우기방법 먼저 습도가 30% 되게 맞춘 모래를 비롯한 복토재료를 121℃에서 1h 30min 동안 멸균하였다. 다음 소나무씨앗을 씨앗소독제(이산화염소수, 에틸알콜, 차아염소산소다, 과망간산칼리움)로 일정한 시간 살균하고 멸균수에 씻어서 접종하였다. 무균조작대에서 먼저 종균병마개를 열고 거기에 복토재료를 1cm정도 되게 넣은 다음 살균한 씨앗을 2알 떨구었다. 다시 복토재료를 2cm정도 되게 덮어주고 멸균수 20mL로 복토재료를 골고루 적신 다음 마개를 닫았다. 종균병에서 종균이 보이는 부분은 검은 종이 또는 그라프트지로 감싸주어 빛을 막아주도록 하였으며 해빛이 잘 들고 25℃의 온도가 보장되는 배양장에서 60일동안 싹틔우기를 진행하였다.

2) 감염성확인방법

분자적검증방법으로 감염정도를 확인하기 위하여 세척한 뿌리를 취하여 선행연구[2]에 제시된 방법으로 PCR를 진행하고 그 결과를 해석하였다.

결과 및 논의

1) 송이버섯종균에서 소나무씨앗싹틔우기에 미치는 각이한 조건의 영향

소나무씨앗의 합리적인 무균적싹틔우기재료를 선택하기 위하여 금강약돌가루, 송이버섯산지흙, 모래를 소나무씨앗싹틔우기의 복토재료로, 이산화염소수를 씨앗소독제로 리용하여

썩트리기를 관찰하였다.(표 1)

표 1. 소나무씨앗썩트리기에 미치는 복토재료의 영향

복토재료	시험수/개	썩튼수/개	썩트리률/%	썩트는기간/d
금강약돌가루	20	8	40.3±0.9	16
송이버섯산지흙	20	15	75.3±0.8	24
모래	20	20	100	12

썩트리우기온도 25℃, 썩트리우기재료의 pH 5

표 1에서 보는바와 같이 소나무씨앗썩트리기를 보면 모래>송이버섯산지흙>금강약돌이었다. 이로부터 썩트는기간과 썩트리률에 있어서 모래가 제일 합리적이라는것을 알수 있다.

소나무씨앗의 무균적썩트기를 위한 썩앗소독제를 선택하기 위하여 과망간산칼리움, 차아염소산소다, 이산화염소수, 에틸알콜로 씨앗을 처리한 다음 썩트리효과와 오염정도를 비교하였다.(표 2)

표 2. 소나무씨앗소독제에 따르는 썩트리률

재 료	시험수/개	썩튼수/개	썩트리률/%	썩트는기간/d	오염률/%
0.5% 과망간산칼리움	20	16	80.7±0.5	18	25.0±0.7
0.03% 차아염소산소다	20	8	50.3±0.6	23	0
200ppm 이산화염소수	20	20	100	16	0
75% 에틸알콜	20	18	90.0±0.4	17	33.3±0.4

씨앗처리시간 15min, 썩트리우기는 모래에서 진행함.

표 2에서 보는바와 같이 썩트는기간과 썩트리률을 놓고 볼 때 이산화염소수>75% 에틸알콜>차아염소산소다>과망간산칼리움의 순서로 낮아졌다. 75% 에틸알콜은 썩트는기간과 썩트리률에서 이산화염소수보다는 조금 낮았지만 오염률이 높았다. 이로부터 우리는 씨앗소독제로 이산화염소수를 정하였다.

합리적인 소독농도를 결정하기 위하여 이산화염소수의 농도에 따르는 소나무씨앗의 소독효과를 보았다.(표 3)

표 3. 이산화염소수농도에 따르는 소나무 씨앗의 소독효과와 썩트리률

농도/ppm	50	100	150	200
오염률/%	60	40	0	0
썩트리률/%	100	100	100	100

n=10

표 3에서 보는바와 같이 이산화염소수농도가 150ppm이상에서부터는 오염이 없었다. 이것은 150ppm의 이산화염소수용액으로 소나무씨앗을 처리하면 무균적썩트리기가 가능하다는것을 보여준다.

2) 송이버섯특이프라이머를 리용한 송이버섯균 감염성확인

소나무모뿌리에 대한 송이버섯균의 감염정확성을 확인하기 위하여 60일동안 자란 소나무모뿌리에서 채취한 시료에서 선행방법[1]에 준하여 핵산을 추출하고 PCR로 증폭한 다음 아가로스겔전기영동을

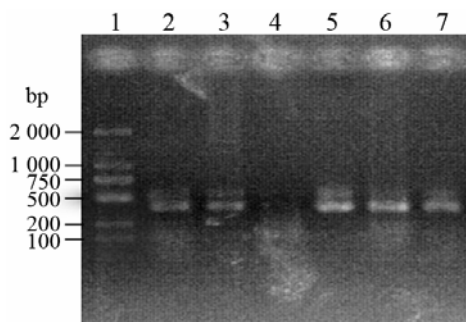


그림. 무균적인 송이버섯균감염나무모의 유전자검증을 위한 PCR산물의 아가로스겔전기영동상

- 1-DNA분자크기표식자(DL 2000),
- 2-송이버섯자실체, 3-송이버섯원균,
- 4-모래에서 썩트온 소나무뿌리,
- 5-7은 송이버섯종균에 무균적으로 감염된 소나무뿌리

진행하였는데 그 결과는 그림과 표 4와 같다.

그림과 표 4로부터 송이버섯종균에서 60일 자란 소나무모뿌리에서 추출한 핵산이 송이버섯균으로부터 기원된 것이며 90%이상이 송이버섯균에 감염되었다는 것을 알 수 있다.

표 4. 송이버섯특이프라이머를 리용한 소나무모뿌리에 대한 PCR분석결과

PCR시험구수/개	증폭된 수/개	감염률/%
30	28	93

맺 는 말

송이버섯종균우에 복토재료로 일정한 두께의 모래를 깔고 이산화염소수로 소독한 소나무씨앗을 무균적으로 싹틔우고 60일간 자래우면 90%이상의 감염률을 가진 송이버섯균 감염소나무모를 생산할 수 있다.

참 고 문 헌

- [1] 남결 등; 생물학, 2, 29, 주체107(2018).
- [2] Sumira Tyub et al.; Can. J. For. Res., 48, 923, 2018.

주체109(2020)년 10월 5일 원고접수

A Method of Breeding Pine Seedlings with Mycorrhiza Aseptically Infected with *Tricholoma matsutake*

Kim Un Chol, Nam Kol and Kim Yong Chan

We established the method of breeding pine seedlings with mycorrhiza infected with *T. matsutake* i.e. able to guarantee *T. matsutake* infection rate over 90% by germinating pine seeds in substrate filled with *T. matsutake* mycelium.

Keywords: *T. matsutake*, aseptic germination, infection