

균근 형성과 소나무 유묘 생장이 우수한 송이 균주의 선발

전성민¹ · 가강현^{2*}¹상명대학교 생명과학과, ²국립산림과학원 화학미생물과Korean *Tricholoma matsutake* Strains that Promote Mycorrhization and Growth of *Pinus densiflora* SeedlingsSung-Min Jeon¹ and Kang-Hyeon Ka^{2*}¹Department of Life Science, Sangmyung University, Seoul 03015, Korea²Division of Wood Chemistry and Microbiology, National Institute of Forest Science, Seoul 02455, Korea

ABSTRACT : Domestic and international production of *Tricholoma matsutake* has decreased owing to matsutake forests being left alone, host plant disease, forest fires, climate change, and so on. In order to identify strains that are suitable for the production of *T. matsutake*-inoculated seedlings, *Pinus densiflora* seedlings were inoculated with *T. matsutake* after in vitro rooting and mycorrhization was examined in the roots of *T. matsutake*-inoculated seedlings after 6 months. The mycorrhization rate was greater than 80% for 5 strains (NIFoS 421, 434, 1681, 1984, and 2001) out of 19 total strains. Seven strains (NIFoS 434, 441, 561, 562, 1016, 1807, and 1812) showed shoot/root ratios of less than 3.0 and had a seedling shoot biomass of 2.0 to 4.8 times higher than that of the root. Eight strains (NIFoS 441, 561, 562, 1016, 1807, 1812, 1984, and 2001) stimulated increases in shoot volume and three strains (NIFoS 441, 562, and 1812) promoted the growth of root biomass by mycorrhizal formation. In conclusion, 4 strains (NIFoS 434, 561, 1984, and 2001) out of 19 total strains tested showed higher mycorrhization rates and seedling growth than those of the other strains. We expect that the use of these four strains may contribute to *T. matsutake*-inoculated seedling production.

KEYWORDS : Mycorrhization, *Pinus densiflora*, Seedling growth, *Tricholoma matsutake*

서 론

예부터 송이(*Tricholoma matsutake*)는 우리나라를 비롯한 동아시아 지역에서 귀중한 산림자원으로 취급되어 왔다. 조선시대에는 임금님 진상품이나 사신 선물로[1], 중국에서는 수 천년 동안 질병 치료나 예방을 위한 전통 약재로 사용해 왔다[2]. 또한 송이 자실체나 균사체에 대한 다양한 생리활성 기능들이 밝혀지면서 의약품[3-5]이나 기능성 식

품의 소재[6, 7], 산림 생태계 복원[8] 등에 이용할 수 있는 가능성도 넓어졌다. 그러나 소나무 병해충 피해, 사람들의 인위적인 생태계 간섭이나 파괴, 자연적인 생태계 환경의 변화 등에 의한 송이 생산량 감소 현상은 20세기 동아시아 지역에 큰 문제로 대두되었다. 1941년 일본 내 송이 생산량은 약 12,000톤이었으나, 2차 세계대전 이후 도시 개발, 현대적인 산림 관리, 천연림의 노화, 송이균의 생장과 증식에 불리한 소나무림 내 부식토 축적, 소나무재선충병의 창궐 등으로 매년 생산량이 감소하였으며, 결국 2005년 일본의 송이 생산량은 연간 34톤으로 급감하였다[9, 10]. 우리나라 역시 1985년 1,313톤이던 송이 생산량이 2006년에는 329톤[11], 2014년도에는 89톤[12]으로 급감하였다. 이는 송이 발생지의 관리 소홀, 기후 변화, 소나무 병해충 확산, 산불 발생 등이 생산량 감소의 주원인으로 언급되고 있다[11]. 특히 2000년 동해안 지역에 동시다발적으로 발생한 산불은 23,794 ha 규모의 산림을 파괴하였으며, 송이 주산지의 소나무림 또한 소실되어 송이 생산량이 크게 감소하였다. 소나무재선충병에 의한 소나무림 감소도 송이 생산량에 크게 영향을 미치는 것으로 판단되는데 2012년도 5,286 ha였던 소나무재선충병 발생 면적은 2013년과 2014년에 11,550 ha

Kor. J. Mycol. 2016 September, 44(3): 155-165
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.3.155
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

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

Received August 18, 2016
Revised September 5, 2016
Accepted September 12, 2016

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

와 9,644 ha로 약 2배씩 증가하여[13] 송이 발생 환경이 더욱 더 악화되고 있다. 따라서 송이 생산량 감소를 막기 위해서는 산불이나 병해충의 피해를 입은 송이산의 소나무림 복원, 기존 송이 산지의 송이 생산량 증대 방법 모색, 송이 인공재배 기술 연구 등이 필요하다.

현재까지 송이 인공재배 연구를 통해 버섯 발생에 성공한 예는 송이 감염묘 법뿐이다[14]. 이 방법을 통해 송이 감염묘를 이식한 지 6년째인 1983년 일본 히로시마 임업시험장에서 1개의 버섯이 발생했다[14]. 우리나라는 1980년대 초부터 송이 감염묘법을 수행하였으며[14], 송이 감염묘를 이식한 지 6.5년째인 2010년 송이 감염묘로부터 1개의 버섯을 발생시켰다[15]. 이같이 송이 감염묘법을 이용하면 송이 인공재배가 가능하다는 것을 알게 되었으나 송이 감염묘 제작을 위해서는 송이산이 필요하고, 송이 균환을 별도로 찾는 작업이 필요하다. 또한 송이 감염묘가 완성되는 기간까지 송이균과 소나무 묘목 모두 생존해야 하는 데 송이산의 자연 환경 변화, 야생동물에 의한 묘목 피해 등으로 균환 내 송이균의 활력 유지와 묘목 생존율이 저하되게 되면 송이 감염묘 제작이 어려울 수 있다. 이러한 문제들 중 일부를 해결하기 위해 시도된 또 다른 송이 인공재배 방법이 송이 접종묘법이다.

송이 접종묘법은 실험실 내에서 종자를 발아시키고, 여기서 얻은 소나무 유묘에 인공배지에서 배양한 송이균을 인

위적으로 접종하여 균이 감염되도록 한 후, 이를 송이가 발생하지 않는 소나무림에 이식하여 새로운 송이 균환 형성을 유도함으로써 송이를 발생시키는 방법이다[11]. 이러한 방법을 통해 송이균이 감염된 묘목의 대량 생산은 가능하게 되었으나, 이식한 접종묘가 야외 조건에서 생존하여 송이 균환을 성공적으로 형성한 예는 아직 없다[11]. 따라서 야외 임지에서 생존하여 자실체를 발생시킬 수 있는 송이 접종묘를 개발하기 위해서는 기주식물인 소나무와의 균근 형성력도 중요하지만 송이균을 접종함으로써 묘목의 생장에 미치는 영향이나 생장 가능성도 고려해 볼 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 무균 배양병 내에서 소나무 유묘와 송이균 간의 외생균근 합성을 시도하여 송이균의 균근 형성력과 소나무 유묘 생장력을 조사함으로써 송이 접종묘 생산에 적합한 송이 균주를 선발하고자 하였다.

재료 및 방법

송이 균주의 선택 및 접종원 준비

국립산림과학원(National Institute of Forest Science, NIFoS)에 보존 중인 송이(*T. matsutake*) 균주들 중 발생 지역, 순수 배양체의 분리 기원 등을 고려하여 총 19개의 균주를 선택하였으며(Table 1), 이 중 8 균주는 2014년도 균근 합성 시험에, 나머지 11 균주는 2015년도 시험에 각각

Table 1. Origin of *Tricholoma matsutake* strains used in this study

NIFoSstrain No.	Location	Year of isolation	Host plant	Origin of strain
421	Yecheon, Gyeongbuk	1995	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
434	Samcheok, Gangwon	1996	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
441	Goseong, Gangwon	2009	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
561	Pohang, Gyeongbuk	2001	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
562	Yeongdeok, Gyeongbuk	2001	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
563	Geochang, Gyeongnam	2001	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
699	Boeun, Chungbuk	2005	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
702	Sancheong, Gyeongnam	2003	<i>Pinus rigida</i>	Basidiocarp tissue
1013	Hongcheon, Gangwon	2007	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
1015	Mungyeong, Gyeongbuk	2007	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
1016	Yangyang, Gangwon	2007	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
1266	Sancheong, Gyeongnam	2009	<i>Pinus rigida</i>	Basidiocarp tissue
1681	Hongcheon, Gangwon	2010	<i>Pinus densiflora</i>	Spores
1806	Hongcheon, Gangwon	2011	<i>Pinus densiflora</i>	Mycorrhiza
1807	Hongcheon, Gangwon	2011	<i>Pinus densiflora</i>	Mycorrhiza
1808	Hongcheon, Gangwon	2011	<i>Pinus densiflora</i>	Mycorrhiza
1812	Yeongwol, Gangwon	2011	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
1984	Yeongwol, Gangwon	2012	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue
2001	Yeongwol, Gangwon	2012	<i>Pinus densiflora</i>	Basidiocarp tissue

사용하였다. 이들은 1995년~2012년까지 강원, 경북, 경북, 충북 지역의 소나무림(*Pinus densiflora*) 또는 리기다소나무림(*Pinus rigida*)에서 7월 말~10월 경에 발생한 것으로, 순수 배양체는 송이 자실체 조직(15개 균주)이나 성숙한 자실체의 포자(NIFoS 1681) 또는 송이 발생지의 소나무 균근(NIFoS 1806, 1807, 1808)에서 분리한 균들이다. 접종균의 연령과 접종량, 소나무 묘령을 제외하곤 Table 2와 같이 2014년도와 2015년도 모두 균근 합성 조건을 동일하게 하였다. 송이 접종균 배양 배지로는 sucrose 대신 glucose가 첨가된 modified Melin-Norkran's medium (MMN; glucose 10 g, malt extract 3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g, CaCl_2 0.05 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, NaCl 0.025 g, 1% FeCl_3 1.2 mL, thiamine-HCl 0.1 mg per 1 L, pH 5.5)을 사용하였으며 [16], $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 35일 또는 56일간 각각 정지 배양(static culture)한 것을 사용하였다.

토양 매질 준비

유기물과 영양분의 함량이 적고 송이 자실체가 발생하는 지역의 토양으로 잘 알려진 마사토(granite soil)를 기본 매질로 사용하였다. 마사토는 Ka 등 [17]이 사용한 방법에 따라 준비하였다. 체눈 직경이 4 mm인 체(sieve)를 통과한 마사토를 풍건하여 식물조직배양용 유리 용기(규격 1.2 L)에 600 mL씩 담은 후, 여기에 통상의 농도에서 1/4로 희석한 potato dextrose malt peptone (PDMP) 배지 (potato dextrose broth 6 g, malt extract 0.75 g, peptone 0.25 g per 1 L, pH 5.5)를 100 mL씩 고르게 분주하였다. 이와 같이 준비된 토양 매질을 90분간 고압증기 멸균한 후 상온에서 냉각하였다.

소나무 종자 발아 및 유묘 배양

시험에 사용한 실생묘(seedlings)는 2013년 9월 국립산림

과학원 내 소나무(*P. densiflora*)에서 채취하여 4°C 에 보관 중이던 종자를 발아시켜 사용하였다. 소나무 종자를 수돗물에서 1일간 침수시킨 후, 수면 위로 부유한 종자들은 제거하고 가라앉은 종자들만을 모아 증류수에 3회 세척하였다. 30% H_2O_2 에 넣어 20분간 표면 소독한 종자를 살균수로 세척 없이 potato dextrose agar (PDA) 배지 위에 올려 놓은 후, $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 배양실에서 종자가 발아될 때까지 명배양하였다. 균 접종 전 소나무 묘령은 34일과 13일로 각각 다르나, 그 외 종자 소독법, 발아용 배지, 배양 온도 등은 2014년도와 2015년도 모두 동일하게 하였다. 2014년도에는 소나무 종자를 PDA 배지에서 24일간 무균 발아시킨 후, 시험 묘목이 배양 용기 내 제한된 환경에 적응하여 새로운 뿌리를 생성할 수 있도록 유묘를 무균 배양병 내 토양 매질로 옮겨 10일간 더 배양하였다. 한편 2015년도에는 PDA 배지에서 5일간 발아시킨 후 무균 배양병 내 토양 매질로 옮겨 8일간 더 배양한 유묘를 사용하였다.

소나무 유묘에 송이균 접종

Ka 등 [17]이 수행한 방법과 유사하게 소나무 유묘에 송이균을 접종하였다. 2014년도에는 MMN 액체배지에서 35일간 배양한 송이 균사체를 소나무 유묘(34일 묘령) 주변 4방위와 중앙에 각각 2 mL씩, 총 10 mL를 접종하였다. 한편 2015년도에는 56일간 배양한 송이 균사체를 소나무 유묘(13일 묘령) 주변 4방위와 중앙에 각각 1 mL씩, 총 5 mL를 접종하였다. 균을 접종한 소나무 유묘(처리구)는 균을 접종하지 않은 소나무 유묘(무처리구)와 함께 식물조직배양실에서 6개월간 명배양(3,500 lux, $23 \pm 2^\circ\text{C}$)하였다. 처리구와 무처리구는 각각 5병씩 준비하였다.

균근 형성 및 소나무 유묘 생장 조사

송이균을 접종한 처리구와 균을 접종하지 않은 무처리구

Table 2. Conditions for *in vitro* mycorrhizal synthesis between *Tricholoma matsutake* strains and *Pinus densiflora* seedlings

Comparison list		2014 year	2015 year
Inoculum	Liquid medium	MMN (pH 5.5)	MMN (pH 5.5)
	Culture temperature	$25 \pm 2^\circ\text{C}$	$25 \pm 2^\circ\text{C}$
	Age of mycelial-inoculum	35 days	56 days
	Amount of mycelial cells inoculated per container	10 mL	5 mL
Seedlings	Disinfection treatment of seed surface	Seed soaking in 30% H_2O_2 for 20 min	Seed soaking in 30% H_2O_2 for 20 min
	Solid medium for seed germination	PDA	PDA
	Germination temperature	$23 \pm 2^\circ\text{C}$	$23 \pm 2^\circ\text{C}$
	Age of <i>Pinus densiflora</i> seedlings	34 days	13 days
Soil substrate	Soil (particle size)	Decomposed granite (> 4 mm in diameter)	Decomposed granite (> 4 mm in diameter)
	Soil medium	1/4 PDMP (pH 5.5)	1/4 PDMP (pH 5.5)
	Soil to medium ratio (v/v)	6:1	6:1

의 뿌리 주변 흙을 제거한 후, 수돗물과 증류수로 뿌리를 수세하였다. 육안 및 해부현미경 (Leica DES8 APO; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 통해 균근 형성 유무를 관찰하여 균근이 형성된 경우에는 균근 형성률, 균근의 분지 형태 (ramification type), 균근의 표면 색상, 균사속 (rhizomorphs)의 존재 유무나 발달 정도 등도 조사하였다. 외생균근의 하티그망의 관찰은 균근 시료를 동결마이크로 톱 (Leica CM 1900; Leica Microsystems) 10 µm 두께로 잘라 광학현미경 (Leica DEDM 2500; Leica Microsystems) 1,000배로 관찰하였다. 균근 형성률(%)은 총처리구 중 균근 형성이 관찰된 처리구의 비율로 나타냈다.

송이균이 소나무 유묘의 지상부와 생물량(biomass) 생장에 미치는 영향을 조사하기 위해 처리구와 무처리구 모두 유묘의 신초 길이(shoot height), 지상부(shoot, S)와 지하부(root, R)의 건중량을 측정하였다. 해부현미경 하에서 유묘에 잔존하는 토양 입자를 모두 제거한 후, 증류수로 수세하였다. 유묘의 신초 길이(mm)는 digital vernier calipers를 이용하여 측정하였다. 생물량을 측정하기 위해 유묘의 지상부와 지하부를 잘라 분리한 후, 열전도율이 높은 알루미늄 사각 용기에 넣어 70°C에서 1일간 건조하였다. 지상부

와 지하부의 건중량을 각각 측정한 후, 지상부와 지하부의 건중량 비(S/R ratio)를 구하였다. 송이균 접종 6개월 후, 소나무 유묘의 생장과 관련된 모든 측정치는 평균과 표준편차로 기록하였으며, Duncan's multiple range test ($p < 0.05$, $n=5$)를 통해 시험 연도별로 시험군 간 측정치의 유의성을 비교하였다.

결과 및 고찰

송이 균근 형성률과 균근의 형태적 특성

송이균과 소나무 유묘 간 균근 합성은 해마다 시험 군주를 달리하여 시도하고 있다. 2014년도에는 NIFoS 421을 포함한 총 8개 송이 균주들의 균근 형성률을 조사하였다. 이 중 4 균주(NIFoS 421, 434, 1681, 1984)가 소나무 유묘와 균근을 형성하였고, 균근 형성률은 100%였다(Table 3). 균근의 형태는 분지가 되지 않은 단순형 균근 (simple mycorrhiza)과 Y자 형태의 차상분지형 균근 (dichotomous mycorrhiza)이 모두 관찰되었다. 균근의 표면 색상은 연갈색 (light brown, l-BR) 또는 암갈색 (dark brown, d-BR)이었으며, 흰색 또는 옅은 황백색의 균사가 균근의 표면을 감싸고 있었

Table 3. Mycorrhization ability, presence of rhizomorphs, and mycorrhizal morphotypes of *Tricholoma matsutake* strains

NIFoS strain No. ^a	Mycorrhization (%) ^b	Surface color of mycorrhiza	Type of ramification ^c	
			Simple	Dichotomous
421*	100 (5/5)	l-BR, d-BR	○	○
434*	100 (5/5)	l-BR, d-BR	○	○
441	40 (2/5)	l-BR, s-BR	○	○
561	60 (3/5)	d-BR	○	○
562	20 (1/5)	s-BR	○	○
563	0 (0/5)	-	-	-
699	0 (0/5)	-	-	-
702	0 (0/5)	-	-	-
1013*	0 (0/5)	-	-	-
1015*	0 (0/5)	-	-	-
1016	40 (2/5)	s-BR	○	○
1266*	0 (0/5)	-	-	-
1681*	100 (5/5)	l-BR, d-BR	○	○
1806	0 (0/5)	-	-	-
1807	20 (1/5)	l-BR, s-BR, d-rBR	○	○
1808*	0 (0/5)	-	-	-
1812	20 (1/5)	l-BR, s-BR, d-rBR	○	○
1984*	100 (5/5)	l-BR, d-BR	○	○
2001	80 (4/5)	d-BR	○	○

l-BR, light brown; s-BR, strong brown; d-rBR, dark reddish brown; d-BR, dark brown.

^aAsterisks (*) indicate the strains surveyed in 2014. Other strains were surveyed in 2015. ^bMycorrhizal synthesis was expressed as a percentage of the number of mycorrhizal groups out of total inoculated groups ($n=5$). ^cOpen circles (○) mean the morphotype of *Tricholoma matsutake* mycorrhizas observed on mycorrhizal seedlings. NIFoS, National Institute of Forest Science.

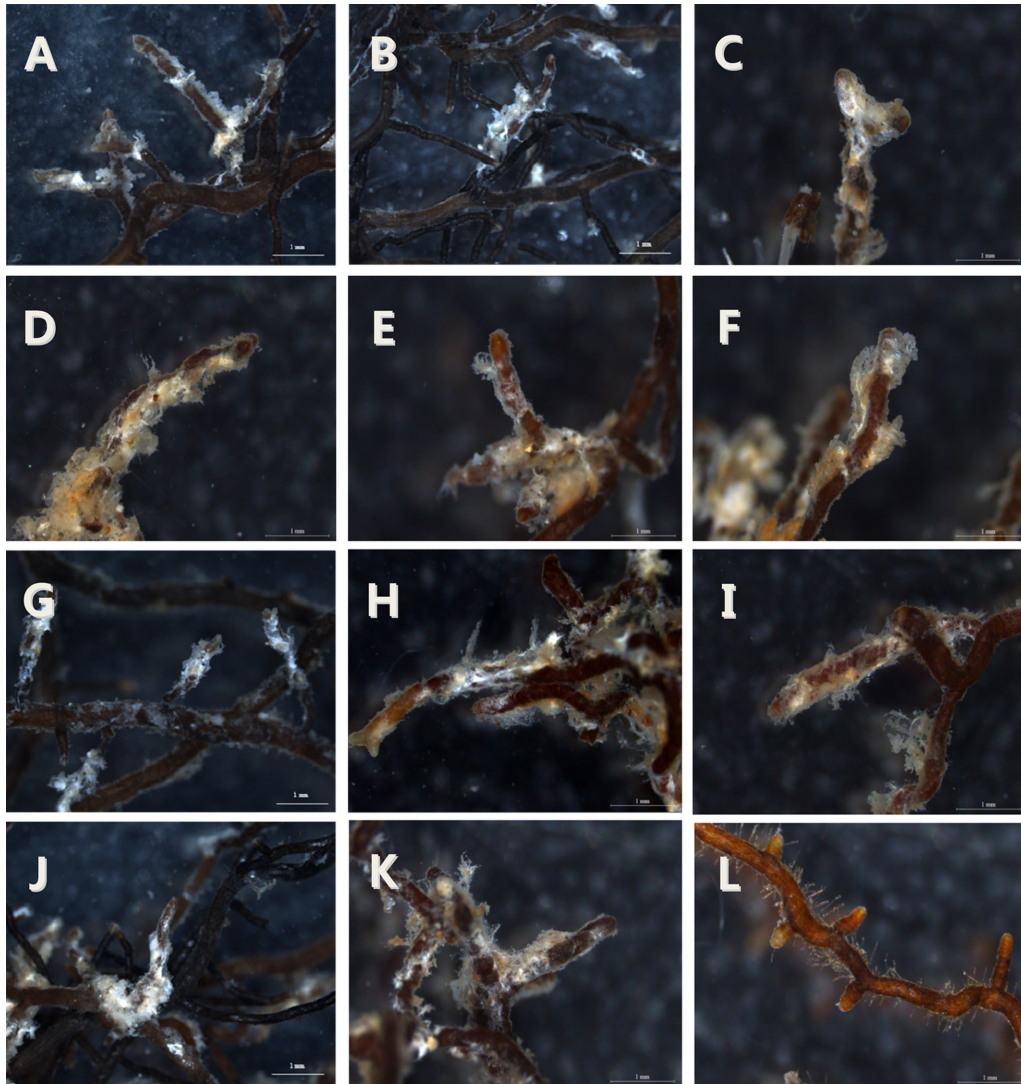


Fig. 1. Morphologies of *Tricholoma matsutake* ectomycorrhizas observed on *Pinus densiflora* seedlings after 6 months of inoculation. A, NIFoS 421; B, NIFoS 434; C, NIFoS 441; D, NIFoS 561; E, NIFoS 562; F, NIFoS 1016; G, NIFoS 1681; H, NIFoS 1807; I, NIFoS 1812; J, NIFoS 1984; K, NIFoS 2001; L, uninoculated control root (scale bar = 1 mm). NIFoS, National Institute of Forest Science.

다(Fig. 1). 균사들이 모여 굵은 다발을 형성하는 균사속(rhizomorph)은 균근을 형성했던 4 균주 모두에서 관찰되지 않았다. 2015년도에는 NIFoS 441을 포함한 총 11개 송이 균주들의 균근 형성률을 조사하였고, 이 중 4 균주를 제외한 7개 균주(NIFoS 441, 561, 562, 1016, 1807, 1812, 2001)가 소나무와 균근을 형성하였다(Table 3). 균근 형성률이 가장 높은 균주는 NIFoS 2001(80%)이었으며, NIFoS 561도 60%의 균근 형성률을 나타냈다. 2014년도와 같이 2015년도에도 단순형과 차상분지형 균근이 관찰되었다. 균근의 표면 색상은 연갈색(l-BR), 암갈색(d-BR), 진갈색(strong brown, s-BR) 또는 암적갈색(dark reddish brown, d-rBR)으로 다양하였다(Table 3, Fig. 1). 흰색 또는 옅은 황백색의 균사가 균근 표면을 감싸고 있었으며, 일부 균주들(NIFoS 1016,

1807, 1812)의 경우에는 몇몇 균사체가 모여 굵은 실 형태를 이루고 있었으나, 균사속으로 보기는 어려웠다. 관찰된 균근들은 하티그망의 관찰을 통해 균근 형성 유무 확인을 보완하였다(Fig. 2).

2014년과 2015년도의 결과로부터, 소나무 뿌리에 송이균이 감염된 정도는 균주별로 차이가 있으나 균근의 형태적 특징은 매우 유사함을 알 수 있었다. 균근 형성 처리구는 무처리구보다 주근에서 파생된 세균이 길게 신장되어 있었고, 뿌리털은 발달하지 않았으며, 주로 세균 말단과 그 주변부를 송이균이 감싸 비후화된 특성을 볼 수 있었다. 한편 무처리구의 뿌리 색상은 연갈색, 진갈색, 검정색 등이었으며, 세균의 길이가 짧고, 뿌리털이 발달해 있었다(Fig. 1L). Ka 등[17]은 국내 자생 송이 균주와 소나무 유묘 간 형성된

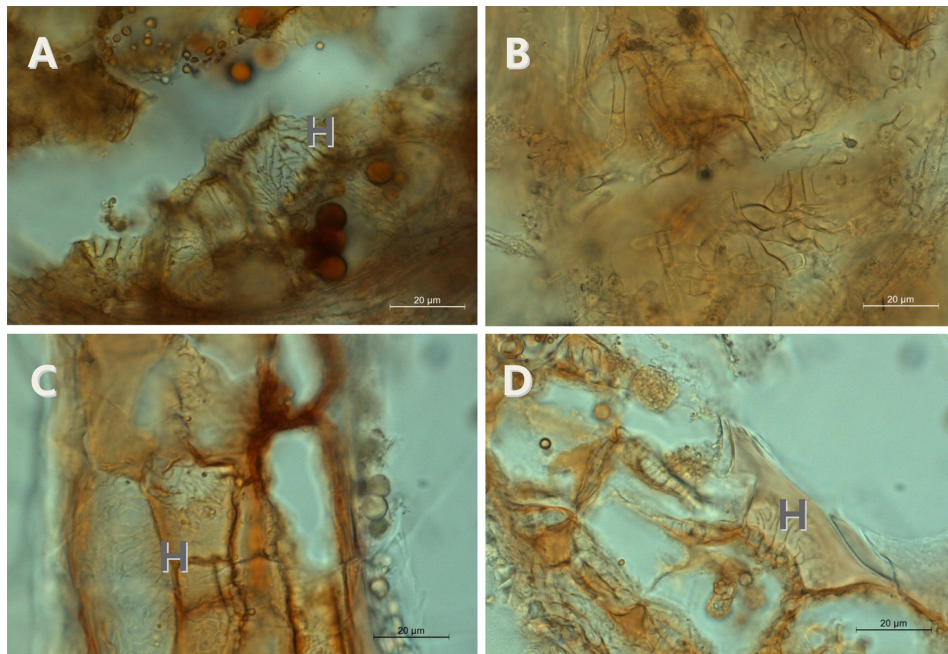


Fig. 2. Hartig-nets and fungal mantle of *Tricholoma matsutake* ectomycorrhizas observed on roots of *Pinus densiflora* seedlings after 6 months of inoculation. A, NIFoS 421; B, NIFoS 434; C, NIFoS 1681; D, NIFoS 1984 (scale bar = 20 μ m). H indicates Hartig-net. NIFoS, National Institute of Forest Science.

균근 형태는 비분지형과 가지 친 모양이며, 백색의 송이 균사가 황갈색~검은색의 균근 표면을 덮고 있다고 보고하였다. Yamada 등[18]은 polycarbonate 용기 내에서 무균적으로 소나무 유묘와 송이균 간 외생균근 합성을 시도하였으며, 토양 매질의 종류에 따른 소나무 유묘의 성장력도 함께 조사하였다.

본 연구 결과도 이와 매우 유사하여 균주의 종류나 소나무 유묘의 묘령이 다소 다르더라도 식물조직배양 용기 내에서 형성되는 균근의 형태적 특성에는 큰 영향을 끼치지 않음을 알 수 있었다. 80% 이상의 높은 균근 형성률을 나타낸 5개 균주(NIFoS 421, 434, 1681, 1984, 2001) 중 특히 NIFoS 421과 434는 균 채집과 보존 기간이 타 균주들에 비해 오래되었음에도 불구하고 우수한 균근 형성력을 유지하고 있었다.

2014년도와 2015년도 실험에서 균근 형성율이 다르게 나타난 이유는 2014년도가 2015년도보다 균 접종량이 2배로 초기 접종원의 차이로 인한 것으로 판단된다. 또한 균 접종시기에 있어 뿌리 발달이 많이 된 시점에서 균을 접종한 것이 송이균과 뿌리가 접촉할 수 있는 확률이 높아 2014년도가 2015년도보다 균근 형성률이 높게 나오지 않았나 생각된다.

자연계에서 송이는 소나무속(*Pinus* spp.), 가문비나무속(*Picea* spp.), 솔송나무속(*Tsuga* spp.), 전나무속(*Abies* spp.)과 같은 소나무과 수종이 분포하는 침엽수림 또는 자작나무(*Betula platyphylla* var. *japonica*)와 같은 활엽수림에서

발생하는 것으로 알려져 있어[19] 활엽수보다는 침엽수와 공생 관계 범위가 더 넓다는 것을 알 수 있다. 이같이 송이는 침엽수 기주 범위가 넓기 때문에 균 채집지의 식생이 다르더라도 같은 과 또는 같은 속에 속하는 수종과 외생균근을 형성할 수 있으며, 소나무림에서 발생한 송이 균주가 아니라도 소나무 유묘와 균근을 형성할 가능성이 있다고 생각되어 송이균 수집 당시 주변 식생과 균근 형성력과의 관계를 살펴 보았다. 소나무와 동일한 속인 리기다소나무림(*Pinus rigida*)에서 수집한 송이 균주들(NIFoS 702, 1266)은 소나무 유묘와 균근을 형성하지 못하였다(Tables 1, 3). 물론 국내 소나무림에서 수집한 균주라 할지라도 모든 균주들이 소나무 유묘와 균근을 형성한 것은 아니다(Table 3). 현재 우리나라에서 송이는 소나무림이나 리기다소나무림에 한정되어 발생하기 때문에 기주 범위가 매우 좁은 것만은 사실이다. 그러나 일본 소나무림에서 수집한 송이 균주가 잣나무(*P. koraiensis*)를 비롯한 다양한 침엽수종과 실험실 내에서 균근을 형성한 예가 있어[20], 기주식물과의 적합성도 중요하지만, 균근 형성 관련 효소 및 기타 인자들의 발현 능력을 조절하는 송이균 자체의 내재적 특성도 균근 형성력에 영향을 준 것으로 보인다.

순수 배양체의 분리 기원에 따른 균근 형성력을 조사한 결과, 자실체 조직에서 분리한 총 15개 균주 중 NIFoS 421을 포함한 9개 균주가 균근을 형성하였다(Tables 1, 3). 포자에서 분리한 1 균주(NIFoS 1681)도 높은 균근 형성률(100%)을 나타냈다. 송이 균근에서 분리한 3 균주들 중 NIFoS 1807

만이 균근을 형성하였으나, 균근 형성률은 20%로 매우 낮았다. 이러한 결과로부터 자실체 조직뿐만 아니라 포자나 균근 기원의 송이균도 소나무 유묘와 균근을 형성할 수 있음을 알게 되었다. 또한 송이균의 분리 기원보다는 그 균이 갖고 있는 생리적 특성이 균근 형성률에 영향을 끼치는 것으로 생각된다.

송이균 접종에 의한 소나무 유묘의 성장 특성

실험실 내에서 만들어진 송이 접종묘는 자연 환경에 적응하는 순화 과정이 필요하기 때문에 야외로 옮겨 심은 후에도 생존할 수 있는 건강한 묘목이어야 한다. 따라서 송이 접종묘 제작에 사용할 송이균은 소나무 유묘의 생장을 돕거나 적어도 묘목 생장의 방해 요인이 되어서는 안 된다. 균근균을 접종하지 않은 일반적인 종묘나 묘목에 대해서는 국내외적으로 양묘 규격이나 묘목의 건강성 평가를 위한 다양한 정보들이 제공되고 있으나[21, 22], 산림에 이식할 송이 접종묘의 외형적 및 생리적 품질 평가에 대해서는 관련 정보가 부족하거나 평가를 위한 기준 항목이 아직 정립되어 있지 않은 것으로 보인다. 이에 본 연구에서는 산림용 양묘의 질적 평가에 널리 사용되고 있는 외형적 평가 항목들 중 실험 방법이 비교적 용이한 3 종류의 항목(유묘의 신초 길이, 지상부와 지하부 건중량, S/R ratio)을 선택하여 송이 접종묘의 품질을 평가하는 데에 적용하였다.

Fig. 3는 송이균을 접종한 지 6개월 후 소나무 유묘의 신초 길이를 측정된 것으로, 2014년도에는 무처리균을 포함하여 총 9개 시험구에 대한 신초 길이를 비교하였다. NIFoS 1266 처리구의 신초 길이(35.7 ± 3.2 mm)는 무처리균(56.0 ± 5.1 mm)이나 나머지 7개의 처리구보다 통계적으로 유의하게 낮았다. 한편 균근을 형성했던 4개의 처리구(NIFoS 421, 434, 1681, 1984)와 균근을 형성하지 못했던 3개의 처리구(NIFoS 1013, 1015, 1808) 간 묘목 신초 길이에는 유의한 차이가 없었다. 그러나 평균 신초 길이만으로 비교했을 경우에는 NIFoS 1984 처리구의 신초 길이(64.2 mm)가 다른 3개의 균근 형성 처리구나 무처리구보다 높았다(Fig. 3A). 2015년도에는 무처리균을 포함하여 총 12개 시험구에 대한 신초 길이를 비교하였다. 11개 처리구의 신초 길이는 통계적으로 무처리구의 것(39.9 ± 7.7 mm)과 비슷하거나 높았다(Fig. 3B). 5개 처리구(NIFoS 561, 702, 1806, 1812, 2001)는 무처리구보다 높은 신초 길이를 나타내어 이들 처리구에 접종한 송이 균주가 소나무 유묘의 지상부 생장을 촉진하는 것을 알 수 있었다. 특히 NIFoS 561 처리구의 평균 신초 길이는 73.5 mm로 가장 높았는데, 이는 무처리구의 평균 신초 길이보다 약 1.8배 더 높은 값에 해당된다. 2014년과 2015년도의 실험 결과, 무처리구와 신초 길이가 비슷하거나 높게 나타난 12개의 처리구 중 균근 형성 처리구는 7개(NIFoS 421, 434, 561, 1681, 1812, 1984, 2001)였으며, 배양 6개월 후 7개 처리구의 평균 신초 길이의 범위는 47.5~73.5 mm였다.

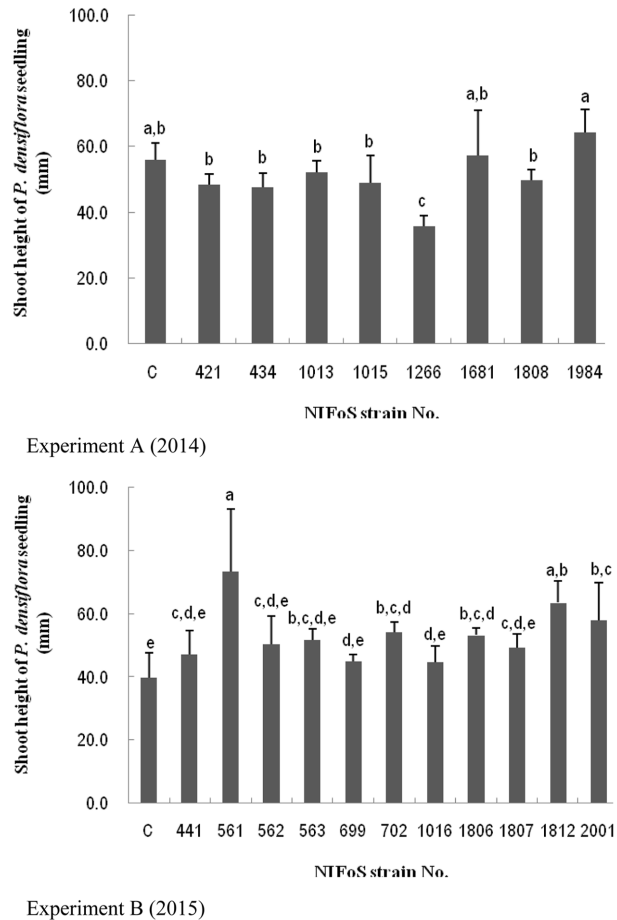


Fig. 3. Comparison of shoot height among *Pinus densiflora* seedlings inoculated with different *Tricholoma matsutake* strains. All seedlings were incubated in culture bottles filled with sterilized granite soil and liquid medium at 23°C for 6 months. Mycorrhizal synthesis was performed in 2014 (A) and 2015 (B), respectively. Bars with the same lowercase are not significantly different (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$, $n=5$). NIFoS, National Institute of Forest Science.

묘목의 신초 길이가 높으면 심한 잡초 경합(weed competition)에서 이길 수 있는 장점이 있지만, 증산 면적이 넓어지기 때문에 건조한 지역에서는 묘목이 활착되기 전 수분 스트레스를 받을 수 있고, 신초 길이가 너무 높은 경우에는 식재가 어렵고 쉽게 풍해를 받을 수도 있다[21]. 이와 같은 수분 스트레스나 풍해를 극복하고 묘목이 산림에 활착하고 생존할 수 있는 묘목의 적정 신초 길이 범위가 있을 것으로 생각되나, 산림에 이식할 균근균 접종묘의 신초 길이에 관한 규격은 아직 국내에 마련되어 있지 않다. 다행히 일반적인 산림용 묘목에 대해서는 몇 가지 규격이 제시되어 있어 본 실험의 결과를 해석하거나 접종묘 규격을 마련하는 데에 참고 자료로 활용할 수 있다. 산림청 예규 제599호 [별표 기] 산림용 묘목 규격표에는 소나무 실생묘에 대한 규격이 제시되어 있는데, 파종 후 옮겨 심지 않은 2년생 용

기묘(2-0)의 간장(stem length) 규격은 25 cm 이상인 것으로 기재되어 있다[22]. 신초 길이(shoot height)와 간장(stem length)의 의미가 엄밀히 다르긴 하지만, 둘 다 묘목 지상부의 성장력을 평가하는 항목이 되므로 이론적으로 배양 기간에 따른 평균 신초 길이 성장력을 예측해 볼 수는 있다. 묘목의 배양 기간에 따라 지상부가 비례적으로 증가한다고 가정할 경우, 4개 균주(NIFoS 561, 1984, 1812, 2001)를 각각 접종한 소나무 유묘의 2년 후 예측되는 평균 신초 길이는 25 cm 정도가 된다. 따라서 이론적으로는 산림용 소나무 묘목으로 적합한 규격이 된다. 그러나 균근균 접종묘와 일반 묘목은 배양 용기나 배양 조건이 같지 않으므로 신초 길이 성장 예측치와 실측치가 다를 수 있다. 따라서 송이균이 소나무 유묘의 신초 길이 성장에 끼치는 영향만으로 송이 접종묘 제작에 적합한 송이 균주를 선발하기 어렵다 판단되어 유묘의 생물량도 함께 조사하였다.

전반적으로 2014년도보다 2015년도 실험 조건 하에서 송이균이 소나무 유묘의 생물량 증가에 영향을 끼침을 알 수 있었다. 2014년도의 결과를 보면, 무처리구 유묘 1개당 총 생물량은 142.0 ± 39.8 mg으로 8개 처리구들의 것과 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 4A). 4개의 균근 형성 처리구들(NIFoS 421, 434, 1681) 간의 생물량도 크게 다르지 않았다. 2015년도 실험 결과에선, NIFoS 441을 포함한 9개 처리구와 무처리구(101.9 ± 31.6 mg) 간 총생물량이 유의한 차이를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 4B). 또한 신초 길이 성장 예측치가 높았던 3개의 균근 형성 처리구(NIFoS 561, 1812, 2001) 간 총생물량도 유사하였다.

산림용 묘목의 지상부와 지하부 생물량은 묘목의 생존력과 성장력을 반영하는 또 하나의 지표가 될 수 있다. 2014년도 결과를 보면, 8개 처리구 중 NIFoS 1984 처리구(140.5 ± 25.5 mg)만이 무처리구(106.3 ± 25.3 mg)보다 유의하게 지상부 생물량이 많은 것을 알 수 있다(Table 4A). 소나무 유묘 지하부의 생물량은 무처리구와 8개 처리구가 비슷하였으며, 4개의 균근 형성 처리구 간 지상부 생물량도 큰 차이가 없었다. 2015년도 실험 조건 하에서는 11개 처리구의 지상부 생물량이 무처리구(71.5 ± 16.8 mg)보다 유의하게 높아 송이균이 소나무 유묘 지상부 성장을 촉진하는 것을 알 수 있었다(Table 4B). 지상부 생물량 평균치는 7개 균근 형성 처리구 중 NIFoS 561(157.2 mg)과 NIFoS 2001(160.7 mg) 처리구가 가장 높았다. 지하부 생물량은 NIFoS 441을 포함한 6개 처리구가 무처리구(30.4 ± 16.1 mg)보다 유의하게 많았다. 균근 형성 처리구 중 NIFoS 1812 처리구의 지하부 생물량 평균치(74.8 mg)가 가장 높았다. 2014년도와 2015년도 결과를 통해 8 균주(NIFoS, 441, 561, 562, 1016, 1807, 1812, 1984, 2001)는 유묘의 지상부 부피 성장에, 3 균주(NIFoS, 441, 562, 1812)는 균근을 형성하면서 지하부 부피 성장을 돕는 것을 알 수 있었다.

묘목 지상부가 과도하게 성장하게 되면 묘목이 수분 스트레스를 받을 수 있어 건조한 지역에 이식 시 생장이 저해

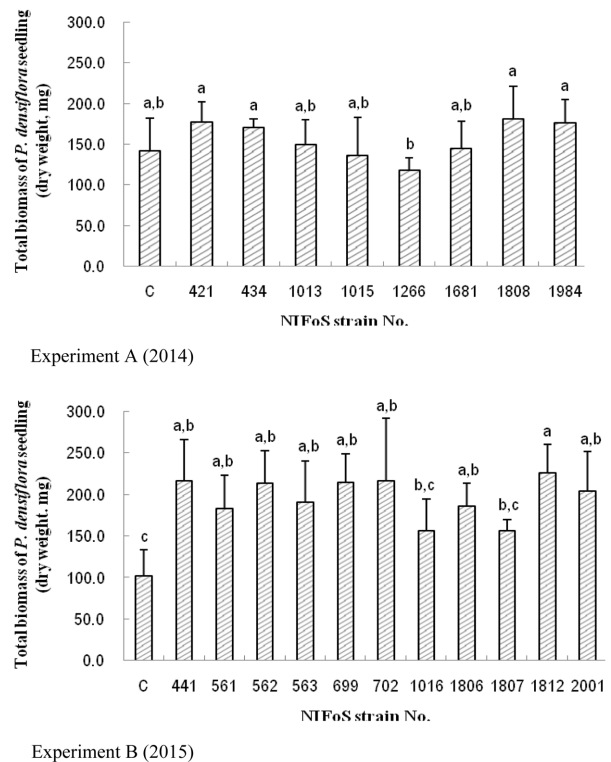


Fig. 4. Total biomass of *Pinus densiflora* seedlings inoculated with different *Tricholoma matsutake* strains. Mycorrhizal synthesis was performed in 2014 (A) and 2015 (B), respectively. Bars with the same lowercase are not significantly different (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$, $n=5$). NIFoS, National Institute of Forest Science.

될 우려가 있다. 또한 주근(tap root)이 굵은 묘목과 세균(fine root)이 많은 묘목의 생물량이 같을 수 있기 때문에 묘목 지하부의 생물량 수치만으로는 root fibrosity를 가늠할 수 없다[21]. 따라서 지하부 생물량 수치가 높다고 해서 산림에서의 활착률과 묘목 생존율이 높다고 확언할 수는 없다. 또한 통상적으로 산림용 묘목의 질을 평가하는 데에는 묘목 지상부와 지하부의 생물량보다는 그 둘 간의 균형이 중요하다고 생각해 왔으며, 묘목 이식 충격(transplanting shock)의 주원인 중의 하나도 묘목 지상부와 지하부의 생물량 비(shoot:root ratio, S/R ratio)의 불균형 때문이라는 것이 지배적인 견해였다[23]. S/R ratio는 증산 작용을 하는 지상부와 토양으로부터 물을 흡수하는 지하부의 수분 균형 측면을 고려한 개념으로, 용기에서 키운 침엽수 실생대목(container conifer seedling stock)의 품질을 평가하는 데에는 적합하지 않다는 보고도 있지만 나묘(bareroot seedlings)의 품질 평가와 실생묘의 가뭄 회피력(drought avoidance potential)을 평가하는 데에는 널리 사용돼 왔다[23]. 본 연구에 사용한 소나무는 송이균을 제외하고는 무균 상태의 배양 용기에서 자란 소나무 실생묘이긴 하지만, 흙분을 모두 제거한 후 묘목 생물량을 측정하였기 때문에 일반

Table 4. Shoot biomass, root biomass, and shoot-to-root ratio (S/R) of *Pinus densiflora* seedlings inoculated with different *Tricholoma matsutake* strains

Experiment A (2014)

NIFoS strain No.	Dry weight of seedlings (mg)		S/R ratio
	Shoot	Root	
C	106.3 ± 25.3 ^{bc}	35.7 ± 14.7 ^{ab}	3.1 ± 0.5 ^{bc}
421	135.3 ± 18.5 ^{ab}	42.0 ± 10.1 ^a	3.3 ± 0.5 ^{bc}
434	122.6 ± 11.5 ^{abc}	48.1 ± 10.7 ^a	2.7 ± 0.8 ^c
1013	103.2 ± 18.2 ^{bc}	46.2 ± 18.4 ^a	2.4 ± 0.7 ^c
1015	96.0 ± 32.0 ^c	40.4 ± 16.6 ^a	2.4 ± 0.6 ^c
1266	97.6 ± 14.6 ^c	20.4 ± 2.4 ^b	4.8 ± 0.8 ^a
1681	104.9 ± 16.6 ^{bc}	40.4 ± 24.2 ^a	3.2 ± 1.6 ^{bc}
1808	131.6 ± 30.3 ^{ab}	50.0 ± 9.8 ^a	2.6 ± 0.2 ^c
1984	140.5 ± 25.5 ^a	35.7 ± 5.3 ^{ab}	4.0 ± 0.6 ^{ab}

Experiment B (2015)

NIFoS strain No.	Dry weight of seedlings (mg)		S/R ratio
	Shoot	Root	
C	71.5 ± 16.8 ^d	30.4 ± 16.1 ^d	2.7 ± 0.7 ^{bc}
441	143.1 ± 28.0 ^{abc}	73.6 ± 22.4 ^{ab}	2.0 ± 0.2 ^c
561	130.9 ± 28.2 ^{abc}	52.0 ± 16.4 ^{abc,d}	2.6 ± 0.6 ^{bc}
562	157.2 ± 28.5 ^a	56.3 ± 16.6 ^{abc}	2.9 ± 0.7 ^b
563	130.5 ± 39.1 ^{abc}	60.7 ± 11.3 ^{abc}	2.1 ± 0.4 ^{bc}
699	147.1 ± 18.2 ^{abc}	67.6 ± 15.9 ^{abc}	2.2 ± 0.3 ^{bc}
702	151.2 ± 46.0 ^{ab}	65.0 ± 30.1 ^{abc}	2.5 ± 0.5 ^{bc}
1016	107.4 ± 30.5 ^c	48.8 ± 11.1 ^{bcd}	2.2 ± 0.5 ^{bc}
1806	136.4 ± 21.7 ^{abc}	49.7 ± 8.0 ^{bcd}	2.8 ± 0.3 ^{bc}
1807	111.4 ± 12.8 ^{bc}	45.0 ± 1.6 ^{cd}	2.5 ± 0.3 ^{bc}
1812	151.6 ± 18.1 ^{ab}	74.8 ± 17.9 ^a	2.1 ± 0.3 ^{bc}
2001	160.7 ± 31.6 ^a	44.0 ± 18.4 ^{cd}	4.0 ± 1.3 ^a

C, uninoculated control seedlings.

Mycorrhizal synthesis was performed in 2014 (A) and 2015 (B), respectively. Values with same superscript in each column are not significantly different (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$, $n=5$).

적인 산림용 나묘와 유사하다. 따라서 식상 감소와 가뭄 회피력 증가가 기대되는 송이 접종묘를 선발하기 위해 나묘의 이상적인 S/R ratio (또는 S:R ratio)에 가까운지를 각 처리구별로 비교하여야 한다.

일반적으로 우수한 나묘의 S/R ratio는 3:1 이하, 우수한 용기묘는 2:1 이하[21]라 하며, 토양이 건조한 곳에 이식한 실생묘의 경우 묘목의 S/R ratio와 묘목 생존량은 상관관계가 있으며, 이 때 나묘의 이상적인 S/R ratio는 2:1 (2 g/g)인 것으로 알려져 있다[23]. Table 4를 보면, 소나무 유묘 지상부의 생물량이 지하부보다 2.0~4.8배 정도 높은 경향이 있다. 2014년도 결과에선 NIFoS 1266 처리구(4.8 ± 0.8)를 제외한 7개 처리구와 무처리구(3.1 ± 0.5)의 S/R ratio가 통계적으로 유의한 차이가 없음을 알 수 있다(Table 4A).

4개 균근 형성 처리구(NIFoS 421, 434, 1681, 1984) 간 S/R ratio도 유사하였다. 2015년도에는 NIFoS 2001 처리구(4.0 ± 1.3)를 제외한 10개 처리구와 무처리구(2.7 ± 0.7) 간 S/R ratio에 유의한 차이를 볼 수 없었다(Table 4B). 7개 균근 형성 처리구 중 NIFoS 2001을 제외한 나머지 처리구의 평균 S/R ratio는 2.9 이하로, 앞서 언급한 우수한 나묘의 S/R ratio (3:1 이하)와 유사하였다. 따라서 S/R ratio 조사 결과, 균근 형성력과 S/R ratio 값은 거의 상관관계가 없다는 것을 알 수 있다. 또한 7개 송이 균주들(NIFoS 434, 441, 561, 562, 1016, 1807, 1812)은 평균 3.0 이하의 S/R ratio를 나타내어 식상 발생률이 낮고 가뭄 회피력이 높을 것으로 예측되며, 건조한 환경의 산림에 이식 시 생존력이 강한 묘목으로 생장할 가능성이 기대된다.

송이 접종묘 생산에 적합한 균주 선발

송이 균주별로 균근 형성률과 소나무 유묘의 생장력을 조사한 결과, 2014년도 실험 조건 하에서는 총 4균주(NIFoS 421, 434, 1681, 1984)가 소나무 유묘와 100% 균근을 형성했다. 특히 NIFoS 1984 처리구는, 2년간 용기에서 배양할 경우 이론상 신초 길이가 25 cm 이상이 될 것으로 예측되어 산림용 양묘 기준에 적합한 규격을 갖춘 묘목이 될 가능성이 있다. 묘목의 총생물량, 지상부 생물량, 지하부 생물량, S/R ratio 평균값은 4 균주를 접종한 처리구에서 모두 유사하였다. 2015년도 실험 조건 하에서는 총 7개 균주(NIFoS 441, 561, 562, 1016, 1807, 1812, 2001)가 균근을 형성하였으며, NIFoS 2001이 가장 높은 균근 형성률(80%)을 나타냈다. 3개 균주(NIFoS 561, 1812, 2001) 처리구의 신초 길이는 무처리구나 다른 균주들을 접종한 처리구보다 유의하게 높았으며, 2년간 용기에서 배양 시 산림용 양묘 기준에 적합한 규격으로 생장할 가능성이 있다. 이 중 NIFoS 561과 1812 처리구는 신초 길이뿐만 아니라 묘목 총생물량과 지상부 생물량이 무처리보다 높았으며, 지상부와 지하부의 비율이 3 이하인 것으로 조사되어 산림용 양묘 후보로 생각해 볼 수 있다. 우수한 균근 형성과 산림용 양묘 규격을 모두 만족하는 송이 균주를 선발하기는 어려우나, 송이 균주와 균근 합성 조건에 따라 시험 묘목의 외형적 생장 특성이 달라지므로 이에 따라 산림용 접종묘 제작에 적합한 송이 균주 후보를 선발해야 한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 관점에서 여러 평가 항목들을 고려했을 때, 2014년도의 실험 조건에서는 NIFoS 434와 1984, 2015년도 실험 조건에서는 NIFoS 561과 2001이 송이 접종묘 제작에 적합한 송이 균주라 생각된다.

적 요

송이산의 방치, 기주식물의 질병, 산불, 기후변화 등 다양한 원인에 의해 국내의 송이 생산량이 감소하고 있어 송이균의 생태적 특성을 이용한 인공재배 기술 개발이 필요한 실정이다. 본 연구에서는 송이 접종묘 생산에 적합한 균주를 선발하기 위해 무균 배양병 내에서 소나무 유묘와 송이균 간의 외생균근 합성을 시도하였다. 송이 균근 형성률은 총 19개 균주 중 5개 균주(NIFoS 421, 434, 1681, 1984, 2001)가 80% 이상을 나타냈다. 7개 송이 균주(NIFoS 434, 441, 561, 562, 1016, 1807, 1812)는 평균 3.0 이하의 S/R ratio를 나타내었고, 소나무 유묘 지상부의 생물량이 지하부보다 2.0~4.8배 정도 높았다. 8개 균주(NIFoS 441, 561, 562, 1016, 1807, 1812, 1984, 2001)는 유묘의 지상부 부피 생장에, 3개 균주(NIFoS 441, 562, 1812)는 균근을 형성하면서 지하부 부피 생장을 돕는 것을 알 수 있었다. 결론적으로 시험균을 접종한 지 6개월 후, 총 19개 시험균 중 4 균주(NIFoS 434, 561, 1984, 2001)는 타 균주들에 비해 송이균의 균근 형성과 소나무 유묘 생장력이 우수한 것으로 나

타나 송이 접종묘 제작에 있어 이들의 활용이 기대된다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant (FP 0801-2013-01) from the National Institute of Forest Science, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Ka KH, Koo CD. Research questions for artificial cultivation of *Tricholoma matsutake*. Trends Agric Life Sci 2002;2:1-6.
2. Zeng YW, Yang JZ, Pu XY, Du J, Yang T, Yang SM, Zhu WH. Strategies of functional food for cancer prevention in human beings. Asian Pac J Cancer Prev 2013;14:1585-92.
3. Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* Sing. (Pine mushroom). J Korean Soc Food Sci Nutr 2009;38: 555-60.
4. Lim HW, Yoon JH, Kim YS, Lee MW, Park SY, Choi HK. Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) Food Chem 2007;103:1337-42.
5. Kim JY, Byeon SE, Lee YG, Lee JY, Park J, Hong EK, Cho JY. Immunostimulatory activities of polysaccharides from liquid culture of pine-mushroom *Tricholoma matsutake*. J Microbiol Biotechnol 2008;18:95-103.
6. Choi SY, Kim NN, Kim YE, Lee Y, Kim SJ, Kim JH. Inhibitory effects of cultured *Tricholoma matsutake* mycelia on melanin biosynthesis. Korean J Food Sci Technol 2011;43:240-2.
7. Kim JS, Park JB, Jang SW, Kwon DH, Jang MH, Lee MO, Ha SJ. Determination of antibacterial activity from *Tricholoma matsutake* extract and its application to low salted Jeot-gal. Korean Soc Biotechnol Bioeng J 2015;30:253-6.
8. Guerin-Laguette A, Shindo K, Matsushita N, Suzuki K, Lapeyrie F. The mycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* stimulates *Pinus densiflora* seedling growth *in vitro*. Mycorrhiza 2004; 14:397-400.
9. Islam F, Ohga S. The response of fruit body formation on *Tricholoma matsutake* *in situ* condition by applying electric pulse stimulator. Int Sch Res Notices 2012. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/462724>.
10. Yamanaka T. Researches for development of the cultivation of 'matsutake', a prized mushroom produced by the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. Bull For For Prod Res Inst 2012;11:85-95.
11. Ka KH, Park H, Bak WC, Kim HS, Hur TC, Yoon KH, Ryu SR, Lee BH, Koo CD, Lee SI, et al. Artificial production of pine-mushroom using transplanted pine trees infected by *Tricholoma matsutake*. Seoul: Korea Forest Research Institute; 2010.
12. Korea Forest Service. 2015 Statistical yearbook of forestry. Daejeon: Korea Forest Service; 2015.
13. National Indicator System of the Statics Korea. Forest damage occurrence and prevention by forest pest insect and disease [Internet]. Daejeon: Statistics Korea; 2016. Available from http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=1310.
14. Ka KH, Kim HS, Hur TC, Park H, Bak WC. Artificial cultiv-

- ation of *Tricholoma matsutake* using matsutake-infected pine tree. Seoul: Korea Forest Research Institute; 2009.
15. Ka KH, Jeon SM, Park H, Lee WY, Oh DS, Choi JW. Development of mushroom cultivation technology on coniferous resources as a medium. Seoul: Korea Forest Research Institute; 2013.
 16. Marx DH. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 1969;59:153-63.
 17. Ka KH, Park H, Hur TC, Bak WC. Selection of ectomycorrhizal isolates of *Tricholoma matsutake* and *Tricholoma magnivelare* for inoculation on seedlings of *Pinus densiflora* *in vitro*. *Kor J Mycol* 2008;36:148-52.
 18. Yamada A, Maeda K, Kobayashi H, Murata H. Ectomycorrhizal symbiosis *in vitro* between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* seedlings that resembles naturally occurring 'shiro'. *Mycorrhiza* 2006;16:111-6.
 19. Palmen J. Matsutake: mushroom of the year - or millennium? *Fungi* 2016;8:40-8.
 20. Yamada A, Endo N, Murata H, Ohta A, Fukuda M. *Tricholoma matsutake* Y1 strain associated with *Pinus densiflora* shows a gradient of *in vitro* ectomycorrhizal specificity with Pinaceae and oak hosts. *Mycoscience* 2014;55:27-34.
 21. Haasse DL. Understanding forest seedling quality: measurements and interpretation. *Tree Planters' Notes* 2008;52:24-30.
 22. Instructions for forest seedling business: Established Rule No. 599 of Korea Forest Service. 2011.
 23. Bernier PY, Lamhamedi MS, Simpson DG. Shoot:Root ratio is of limited use in evaluating the quality of container conifer stock. *Tree Planter's Notes* 1995;46:102-6.