

# 국내 양양 송이 자생지 내 균환 유래 토양미생물과 송이균사체 성장촉진 효과

최두호 · 이은지 · 이강호 · 안기홍\*

농진청 국립원예특작과학원 인삼특작부 버섯과

## Growth-promoting effect of microorganisms from a fairy ring in Yangyang, Korea on *Tricholoma matsutake* mycelium

Doo-Ho Choi, Eunji Lee, Kang-Hyo Lee, and Gi-Hong An\*

Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong, Chungbuk 27709

**ABSTRACT:** *Tricholoma matsutake* is a traditional favorite food in East Asia, cultivated in fairy rings called “shiro,” which are found near *Pinus densiflora*. For effective artificial cultivation of *Tri. matsutake*, microorganisms from symbiotic fairy rings are co-cultivated. In this study, one bacterial isolate (Y22\_B35) and two fungal isolates (Y22\_F64 and Y22\_F68) displayed growth-promoting effects on *Tri. matsutake* mycelium (158.47, 125.00, and 122.26% enhanced growth, respectively). For identification, 16S rRNA or ITS regions from the microorganisms’ genomes were sequenced. Other sequences, including BenA, CaM, and RPB2 were sequenced in the fungal isolates. The bacterial isolate Y22\_B35 was identified as *Bacillus cereus*. Y22\_F64 and Y22\_F68 were identified as *Umbelopsis nana* and *Aspergillus parvulus*, respectively. To identify the effects of the dominant microorganisms on *Tri. Matsutake* cultivation, metagenomic analyses were performed. Discovery of these *Tri. matsutake* mycelium growth-promoting microorganisms and metagenomics analyses are expected to contribute to our understanding of *Tri. matsutake* fruiting body growth and construction of biomimicry.

**KEYWORDS:** Fairy ring, Growth promoting effect, Metagenomic analysis, Microorganisms, *Tricholoma matsutake*

동아시아의 대표적인 기호식품 중 하나인 송이버섯은 (Amend *et al.*, 2010), 외균근성 버섯의 일종으로 기주식물인 소나무로부터 물과 영양염류 등을 공급받고 그 기주식물의 뿌리에 무기물을 제공하는 공생적 관계를 형성하고 있다 (Yamanaka *et al.*, 2014). 이러한 공생적 관계로 인해 송이버섯에 대한 인공재배는 그 기주식물인 소나무의 활용에서

벗어나질 못하고 있는 실정이다 (Ka *et al.*, 2018). 송이버섯의 인공재배에 대한 새로운 접근이 요구되고 있으며 이에 송이버섯과 그 주변의 미생물 사이의 상호관계가 소개되었다 (Yamanaka *et al.*, 2020).

미생물을 이용한 기존의 실험들은 송이버섯 자체에서 분리한 미생물들을 이용하여 송이 균사에 대한 촉진을 유도하였다 (Oh *et al.*, 2018). 그러나 이후 실행된 실험에서는 송이버섯 균환인 shiro로부터 분리한 미생물을 이용하여 송이 균사에 대한 촉진을 유도하였다 (Oh *et al.*, 2019). 송이버섯이 발생하는 균환을 shiro라고 부르며 균근성버섯이 활성화되는 영역으로도 통칭된다 (Ohara, Hamada, 1967). 이 shiro 내에서 담자균의 포자 발아 등을 통해 송이 버섯의 균사 덩어리가 발생함이 확인되었다 (Narimatsu *et al.*, 2016). 따라서 본 실험에서는 2022년도 9월 국내 양양의 송이 균락지 내에 존재하는 shiro 내의 토양샘플로부터 미생물들을 분리하여 같은 균락지에서 확보한 송이의 균사에 대한 성장촉진 여부를 확인하였다.

모든 실험은 3회 반복을 기본으로 수행됨으로써 결과의 신뢰성을 확보하고자 하였다. 또한 확보된 데이터는 GraphPad Prism

J. Mushrooms 2024 March, 22(1):22-26  
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2024.22.1.22>  
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853

© The Korean Society of Mushroom Science  
 Doo-Ho Choi(Postdoctoral Researcher), Eunji Lee(Agricultural Researcher),  
 Gi-Hong An(Senior Researcher), Kang-Hyo Lee(Agricultural Researcher)

\*Corresponding author  
 E-mail : gamchoduh@naver.com  
 Tel : +82-43-873-5716, Fax : +82-43-873-5702

Received November 14, 2023

Revised December 6, 2023

Accepted December 12, 2023

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.

과 InStat V.3 (GraphPad, San Diego, CA, USA)를 이용하여 통계 처리 및 분석이 진행되었다. 실험 평균치에 대한 유의성 검사는 one-way ANOVA를 통해 진행되었다.

본 실험은 2022년도 9월 강원도 양양의 송이 버섯 균락지를 대상으로 진행되었으며, 송이 버섯의 균환에서부터 토양 샘플을 확보하였다. 확보된 토양샘플들로부터 송이 버섯의 균사 발달에 영향을 끼칠 것으로 기대되는 세균과 진균을 분리·배양하기 위해 다른 조건의 두 배지를 이용하였다. 세균을 배양시키기 위해 토양샘플을 항진균성 물질인 benomyl 300 ppm이 첨가된 Tryptic Soy Agar (TSA)(회사명)에서 균 배양을 진행했으며, 진균을 배양시키기 위해 토양샘플을 항세균성 물질인 streptomycin 300 ppm이 첨가된 Potato Dextrose Agar (PDA)(회사명)에서 균 배양을 진행했다. 25°C, 암상태의 배양조건에서 각각의 토양샘플들을 2-5 일 동안 배양하였으며, 최종적으로 순수 분리된 세균·진균 배양체들을 확보하였다.

미생물에 의한 송이 균사체 생장 촉진 여부를 확인하기 위해 양양 균락지 내 송이의 균사체 조직과 균환 토양 유래 세균 또는 진균을 *Tricholoma matsutake media* (TMM) (glucose 20 g/L, yeast extract 1.5 g/L, soytone 1.5 g/L, agar 20 g/L) 배지 위에서 함께 배양하였다. 본 실험을 위해 배양조건은 2018년, 2019년에 진행된 송이 균사-미생물 혼합배양 실험과 같은 조건 하에 설정되었다 (Oh *et al.*, 2018; Oh *et al.*, 2019).

송이 균사체와 세균의 혼합배양은 배지 중앙에 위치한 균사체 기준으로 30 mm 길이의 세균 배양체 획선이 15 mm 떨어진 상태로 25°C, 암상태의 조건에서 1 개월간 진행되었다. 진균의 경우 진균 자체에 존재하는 균사조직이 송이 균사체 성장확인을 방해하는 문제가 있다. 따라서 filter를 이용하여 진균의 균사와 포자가 제거된 배양여과액을 확보하여 송이 균사체에 접종 후, 25°C, 암상태의 조건에서 1 개월간 진행되었다. 각각 배양이 완료된 혼합배양체들로부터 미생물에 의한 송이균사 생장촉진여부는 대조구인 아무런 처리가 되지 않은 송이 균사체 조직의 균사 성장면적보다 15% 이상 큰 균사 성장면적을 보일 경우로 설정하였다. 배양결과, 세균 배양체들 중 오직 Y22\_B35만이 대조구 대비 158.47%의 송이 균사체 성장면적을, 진균 배양체들 중 Y22\_F64와 Y22\_F68이 대조구 대비 각각 125.00%와, 122.26%의 송이 균사체 성장면적을 보였다 (Fig. 1). 비록 Y22\_F64와 Y22\_F68은 송이 균사에 대한 생장촉진 결과에 유의미한 차이가 없으나 ( $P>0.05$ ), 생장촉진을 보인 3개의 균체들은 다른 균체들에 비해 유의미한 생장촉진 결과를 보였다 ( $P<0.05$ ).

확보된 3점의 미생물들에 균 동정을 진행되었으며 세균 Y22\_B35와 진균 Y22\_F64와 Y22\_F68의 유전자분석 영역이 서로 상이하여 각각에 대한 동정 결과를 따로 분류하였다. 세균 Y22\_B35는 16S rRNA 유전자 영역을 대상으로 27F, 1492R 두 primer를 이용한 서열 분석이 진행되었다 (Clarridge, 2004). 두 진균, Y22\_F64와 Y22\_F68는 Internal transcribed spacer (ITS) 유전자 영역을 대상으로 ITS4, ITS5

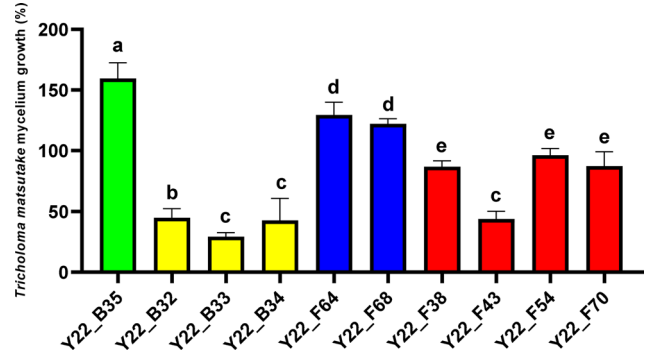


Fig. 1. Comparison of growth effect on *Tricholoma matsutake* mycelium by bacteria. The lowercase letters (a-e) denote a significant difference by one-way ANOVA ( $P<0.05$ ). Same lowercase letters denote a no significant difference ( $P>0.05$ ).

두 primer를 이용한 서열 분석이 진행되었으며, 이후 beta-tubulin (BenA), Calmodulin (CaM), RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) 영역 또는 large subunit(LSU) 영역에 대한 추가적인 서열 분석이 진행되었다 (Visagie *et al.*, 2014). 분석된 미생물 유전자 서열정보는 National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLASTn program 과 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7 software의 Neighbor joining phylogenetic tree를 제작하여 다른 균체와의 유연관계를 증명하였다 (Visagie *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016). 동정 결과는 아래와 같다; Y22\_B35는 Y22\_B35는 *Bacillus cereus*와 99.86 - 99.93%의 연관성을 보이며 *E. coli*를 outgroup으로 지정한 phylogenetic tree가 제작되었으며 (Fig. 2), Y22\_F64는 *Umberopsis nana*와 98.32 - 100.00%의 연관성을 보이며 *Mortierella verticillata*를 outgroup으로 지정한 phylogenetic tree가 제작되었으며 (Fig. 3), Y22\_F68는 *Aspergillus parvulus*와 98.57 - 100.00%의 연관성을 보이며 *Penicillium citreonigrum*을 outgroup으로 지정한 phylogenetic tree가 제작되었다 (Fig. 4). 동정이 완료된 해당 미생물들은 기존 연구에서 송이균사에 대한 생장촉진결과를 보인 것으로 확인 되었다 (Oh *et al.*, 2018; Oh *et al.*, 2019).

확보된 미생물들과 송이의 발생 연관관계 확인을 위해 (Choi *et al.*, 2020), 2022년도에 송이가 발생한 shiro 영역을 포함하여, 송이가 발생하지 않은 shiro 영역, shiro 외부 영역에서의 미생물군집 정보를 확보하였다. 각 지점들로부터 확보한 토양 샘플로부터 DNA를 추출한 후 Macrogen Inc. (Seoul, Korea)의 illumina Hiseq 4000 platform을 활용하여 미생물 군집을 분석하였으며 본 분석에는 9월에 확보한 샘플들을 활용하였다. 분석된 군집 내 미생물과 본 실험에서 송이 균사체 생장촉진 효과를 보인 균의 우점도를 송이가 발생한 shiro 영역인 Shiro\_P를 대상으로 분석하였다. 분석 결과, 세균의 경우 Shiro\_P에서 *Ktedonobacter* 속이 우점도 5.97%로 다른 지점들보다 높은 우점도를 보였으며 반면 다른 지점과 달리 *Stella* 속은 1.76%로 다른 지

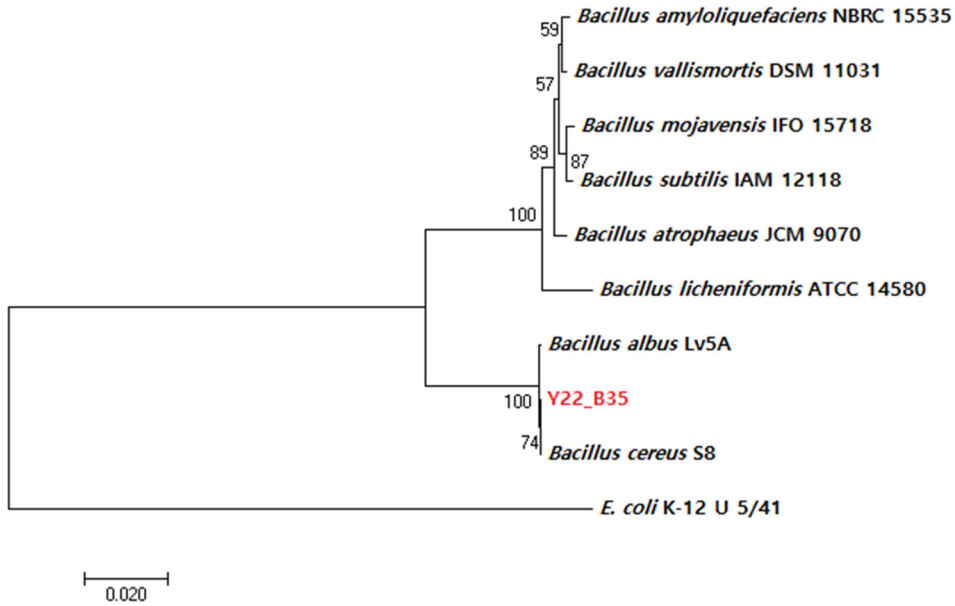


Fig. 2. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequences using neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates.

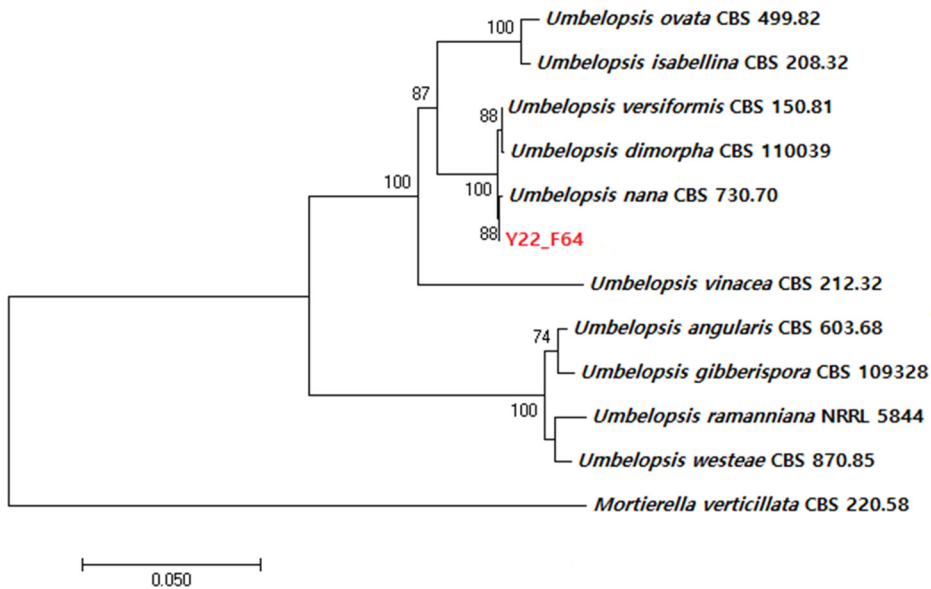


Fig. 3. Phylogenetic analysis based on combination of ITS and LSU sequences using neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates.

점보다 낮은 우점도를 보였다. 성장촉진균 Y22\_B35가 속하는 *Bacillus* 속의 경우 Shiro\_P에서 다른 지점들에 비해 낮은 우점도 수치를 보였다. 진균의 경우 Shiro\_P에서 *Clitocella* 속과 *Hypoxylon* 속이 각각 6.32%와 2.29%로 다른 지점보다 높은 우점도 수치를 보였다. 미생물 존재가 확인된 *Umbelopsis* 속 (Y22\_F64 포함)의 경우 4 지점의 우점도가 차이가 없었다. 다만 위 미생물 군집 측정결과는 송이 자실체 발생이 활발한 9월을 대상으로 한 군집도 측정이기 때문에 균사체의 활동이 활발할 것으로 기대되는 5월의 미생물 군집 조사 또한 추가적으로 필요한 것으로 판단된다 (Hur *et al.*, 2004).

### 적 요

본 실험은 송이버섯의 인공재배에 있어 기주식물에 대한 의존성을 줄이기 위한 일환으로 송이 균환의 토양 미생물을 활용하여 진행되었다. 이를 위해 송이 자실체가 발달하는 9월을 대상으로 송이 자생지 내 균환으로부터 토양 내 균주들을 분리하였으며, 1점의 세균과 2점의 진균을 대상으로 대조구 대비 성장한 송이 균사체의 크기 퍼센트를 이용한 성장 촉진 결과를 확인하였다. 또한 확보된 균주들에 대한 동정을 위해 NCBI blast 과정과 phylogenetic tree 제작 과정을 거쳤다. 다만 본 실험에서 확보한 미생물과 동일한 동정명의 균을 이용

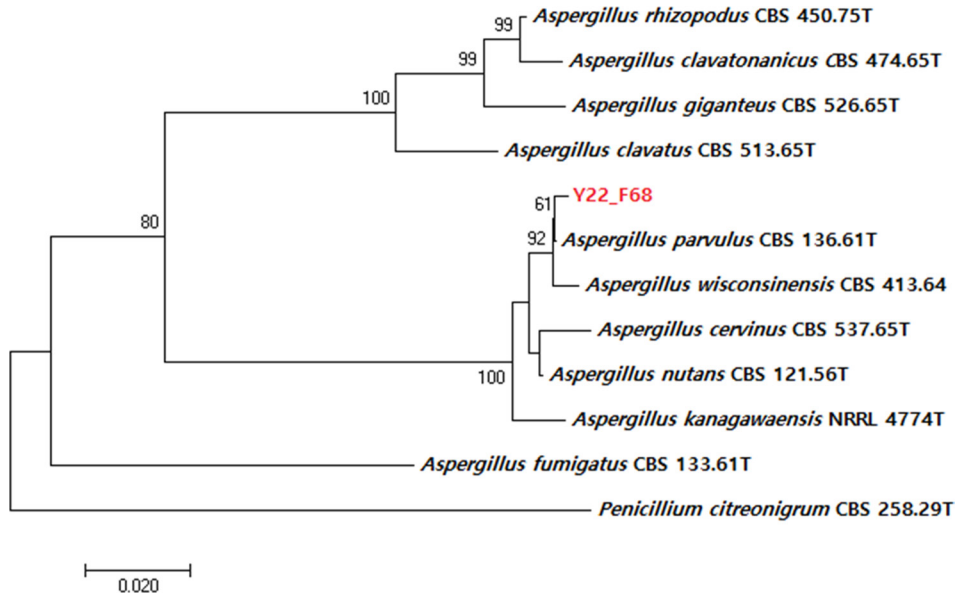


Fig. 4. Phylogenetic analysis based on combination of ITS, BenA, CaM, and RPB2 sequences using neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates.

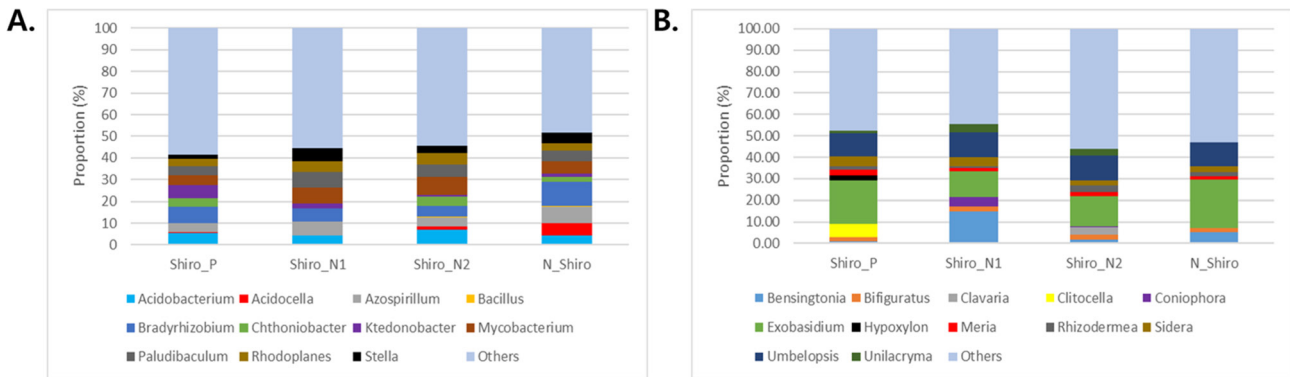


Fig. 5. Dominance of microorganisms in different site at genus level. A) Bacteria. B) Fungi.

한 동일 조건의 실험 결과와 비교하였을 때, 본 실험에서 확보한 미생물에 의한 송이 균사에 대한 성장촉진 정도가 다소 낮게 나타남을 확인하였다. 그러나 실제 자연계에서 송이와 같은 외근균성 버섯과 작용하는 미생물의 사례가 매우 다양하기 때문에 송이에 대해 균사 성장을 촉진시키는 미생물 데이터베이스 축적에 있어 그 의미가 있다고 볼 수 있다. 또한 축적된 미생물 데이터베이스를 토대로 송이 균사의 성장촉진 나아가 송이 자실체의 발달촉진에 공통적으로 작용하는 미생물 유래 분비물질 고찰에 있어서도 본 실험의 결과가 기여하는 바가 크다고 볼 수 있다. 이에 더해 미생물 군집 내 촉진균 우점도 및 송이 발생지와 미발생지 사이에 있는 미생물 우점도 차이에 대한 추가적인 분석을 통해 향후 송이 발생에 활용할 수 있는 생태모방에 활용할 가능성 또한 존재한다. 추후 지속적인 연구를 통해 균환 유래 토양 미생물에 의한 송이 작용에 대한 실험이 계속 진행되어야 할 필요가 있다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 시험연구사업(과제번호 PJ014766022023)에 의하여 수행된 결과의 일부로서 국립원예특작과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

Amend A, Garbelotto M, Fang Z, Keeley S. 2010. Isolation by landscape in populations of a prized edible mushroom *Tricholoma matsutake*. *Conserv Genet* 11: 795–802.

Choi DH, Jeong MJ, Kwon HJ, Kim MG, Kim DH, Kim YG, Kim JG. 2020. Metagenomic analysis of bacterial communities in *Rhododendron mucronulatum* in Biseul Mountain County Park, Daegu, Korea. *J Life Sci* 30: 32–39.

Clarridge III, JE. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and



- infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17: 840–862.
- Hur TC, Park H, Ka KH, Joo SH. 2004. Dynamic changes of soil physicochemical properties in the fairy-rings of *Tricholoma matsutake*. *J Korean For Soc* 93: 26–34.
- Ka KH, Kim HS, Hur TC, Park H, Jeon SM, Ryoo R, Jang Y. 2018. Analysis of environment and production of *Tricholoma matsutake* in matsutake-infected pine trees. *Korean J Mycol* 46: 34–42.
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuyse P, Jansa J, Bücking H. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880–882.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870–1874.
- Narimatsu M, Koiwa Y, Sakamoto Y, Natsume S, Kurokuchi H, Lian C, Nakajima Y, Nakade K, Yoshida K, Tawaraya K. 2016. Estimation of novel colony establishment and persistence of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* in a *Pinus densiflora* forest. *Fungal Ecol* 24: 35–43.
- Oh SY, Kim M, Eimes JA, Lim YW. 2018. Effect of fruiting body bacteria on the growth of *Tricholoma matsutake* and its related molds. *PLoS One* 13: e0190948.
- Oh SY, Park MS, Lim YW. 2019. The influence of microfungi on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. *Microorganisms* 7: 169.
- Ohara H, Hamada M. 1967. Disappearance of bacteria from the zone of active mycorrhizas in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Singer. *Nature* 213: 528–529.
- van Gevelt T. 2014. Community-based management of *Tricholoma matsutake* (S. Ito and S. Imai) Singer: a case study of South Korean mountain villages. *Int J Commons* 8: 134–154.
- Visagie C, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol* 78: 343–371.
- Wang Y, Yu F, Zhang C, Li S. 2017. *Tricholoma matsutake*: an edible mycorrhizal mushroom of high socioeconomic relevance in China. *Sci Fungorum* 46: 55–61.
- Yamanaka T, Ota Y, Konno M, Kawai M, Ohta A, Neda H, Terashima Y, Yamada A. 2014. The host ranges of conifer-associated *Tricholoma matsutake*, Fagaceae-associated *T. bakamatsutake* and *T. fulvocastaneum* are wider *in vitro* than in nature. *Mycologia* 106: 397–406.
- Yamanaka T, Yamada A, Furukawa H. 2020. Advances in the cultivation of the highly-prized ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 61: 49–57.