

국내 송이 자생지에서 분리된 Terrabacteria에 의한 송이균사체 성장촉진 효과

최두호 · 한재구 · 이강호 · 안기홍*

농진청 국립원예특작과학원 인삼특작부 버섯과

Growth-promoting effect on *Tricholoma matsutake* mycelium by Terrabacteria isolated from pine mushroom habitats in Korea

Doo-Ho Choi, Jae-Gu Han, Kang-Hyo Lee, and Gi-Hong An*

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

ABSTRACT: To cultivate pine mushroom (*Tricholoma matsutake*) artificially, co-cultivation with microorganisms has been introduced. Here, experiments were performed to assess the growth-promoting effect of bacteria on *T. matsutake* mycelia. Bacteria were isolated from soil samples collected in Yangyang County, Korea. Four of the bacterial isolates (Y22_B06, Y22_B11, Y22_B18, and Y22_B22) exhibited a growth-promoting effect on *T. matsutake* mycelia (154.67%, 125.91%, 134.06%, and 158.28%, respectively). To analyze the characteristics of the bacteria, especially the antifungal activity, α -amylase and cellulase activity assays were performed. In comparison with the controls, the isolated bacteria exhibited low α -amylase and cellulase activity. 16S rRNA gene sequencing was performed to identify the four bacterial isolates. The isolates belonged to the Terrabacteria group and were identified as *Microbacterium paraoxydans*, *Paenibacillus castaneae*, *Peribacillus frigoritolerans*, and *P. butanolivorans*. These bacterial isolates are expected to have contributed to the growth promotion of *T. matsutake* mycelia and the artificial cultivation of *T. matsutake*.

KEYWORDS: Growth-promoting effect, Terrabacteria group, *Tricholoma matsutake*

송이버섯은 동아시아에서 대표적인 기호식품 중 하나로 사람들에게 많은 사랑을 받아왔다 (Amend *et al.*, 2010). 여타 다른 외생균근성 버섯들과 유사하게, 송이버섯은 그 기주식물인 소나무의 뿌리로부터 영양을 공급 받는 공생적 관계를 형성하고 있다 (Yamanaka *et al.*, 2014). 그러

나 채집에만 의존하는 송이버섯의 생산량이 지속적으로 줄고 있으며 (van gevelt, 2014; Wang *et al.*, 2017; Yamanaka *et al.*, 2020), 국내 생산량의 경우 최근인 2021년도 생산량이 170 톤으로 1985년도 생산량인 1,313 톤보다 그 양이 급감한 것이 확인되었다. 송이버섯의 생산량을 높이기 위한 다양한 시도들이 진행되고 있으며 최근에는 국내에서 송이균을 접종시킨 소나무 유묘를 이용한 인공재배에 성과를 보였다 (Ka *et al.*, 2018). 그러나 해당 인공재배법은 기주식물에 의존성이 크다는 점과 더불어 배양까지 걸리는 시간이 길다는 한계를 가지고 있다.

송이균의 직접적인 접종 이외에 송이와 미생물간 상호작용을 통한 송이버섯의 인공재배 실험 또한 진행되고 있다. 외생균근성 버섯의 균사체가 주변 미생물들과의 공생관계를 통해 생장이 촉진된다는 사례를 바탕으로 (Kiers *et al.*, 2011), 송이 균사체와 그 주변 미생물군집간의 관계성을 중심으로 성장촉진 실험이 발표되어 왔다 (Oh *et al.*, 2018a, Oh *et al.*, 2018b). 이에 2022년도 7월에 확보된 송이 근권토양 유래 미생물들을 이용한 송이 균사체

J. Mushrooms 2023 September, 21(3):190-193
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2023.21.3.190>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Jae-Gu Han(Researcher), Kang-Hyo Lee(Senior-Researcher), Gi-Hong An(Researcher), Doo-Ho Choi(Post-doctor)

*Corresponding author

E-mail : gamchoduh@naver.com

Tel : +82-43-873-5735, Fax : +82-43-873-5702

Received August 24, 2023

Revised September 5, 2023

Accepted September 17, 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.

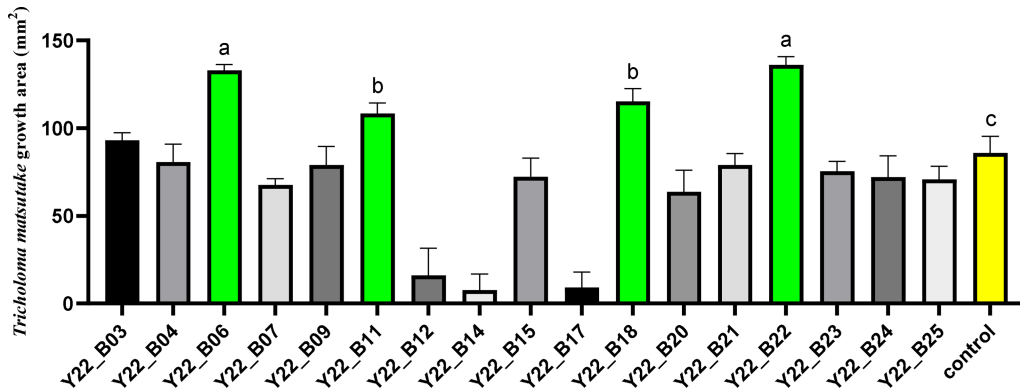


Fig. 1. Comparison of growth effect on *Tricholoma matsutake* mycelium by bacteria. The lowercase letters (a-c) denote a significant difference by the student's t-test ($P < 0.05$). Same lowercase letters denote a no significant difference ($P > 0.05$).

성장촉진 실험을 진행하였다.

모든 실험은 3회 반복을 수행하였으며 확보된 데이터는 GraphPad Prism과 InStat V.3 (GraphPad, San Diego, CA, USA)를 이용하여 통계처리 및 분석이 진행되었다. 실험 평균치에 대한 유의성 검사는 student's t-test를 통해 진행되었다.

본 실험은 2022년도 7월 강원도 양양의 균락지로부터 확보한 송이버섯과 그 근권토양 샘플을 이용하여 진행되었다. 확보된 토양샘플들은 항진균성 물질인 benomyl 300 ppm이 첨가된 Tryptic Soy Agar (TSA)(trypton 15 g/L, soyton 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 20 g/L)에서 배양시켜 진균을 배제한 상태로 세균을 배양하였다. 25°C, 암상태의 배양조건에서 2~5 일간의 배양 과정을 통해 세균 배양체들을 확보하였다.

세균 배양체에 의한 송이 균사체 성장 촉진확인은 기존의 사례와의 비교를 위해 같은 조건에서 진행되었다 (Oh *et al.*, 2018a). 송이 균사체 조직을 *Tricholoma matsutake* media (TMM) (glucose 20 g/L, yeast extract 1.5 g/L, soytone 1.5 g/L, agar 20 g/L) 배지 중앙에 위치시킨 후, 균사체를 중심으로 15 mm 떨어진 지점에 30 mm 길이의 세균 배양체 확산을 그렸다. 25°C, 암상태의 조건에서 1 개월간 대치배양이 진행되었으며 송이 균사체에 대한 세균의 성장촉진 여부는 아무런 처리도 되지 않은 송이 균사체 조직을 대조구를 대상으로 균사 성장면적이 15% 이상 더 클 경우로 상정하였다. 배양 결과, 4점의 세균 배양체들 (Y22_B06, Y22_B11, Y22_B18, Y22_B22)이 대조구 대비 각각 154.67%, 125.91%, 134.06%, 158.28%의 송이 균사체 성장면적 결과를 보였다 (그림 1). 성장촉진을 일으킨 4점의 세균 배양체들의 성장면적 결과를 대상으로 한 유의성 검사에서는, Y22_B06과 Y22_B18 그리고 Y22_B11과 Y22_B22 사이에서만 유의미한 차이를 보이지 않았으며 ($P > 0.05$), 이외에는 대조구를 포함하여 모두 유의미한 차이를 기록하였다 ($P < 0.05$).

토양 미생물군집에서 세균과 진균은 주요구성인자로서 서로 상생하거나 경쟁관계에 있기도 한다 (Leigh *et al.*,

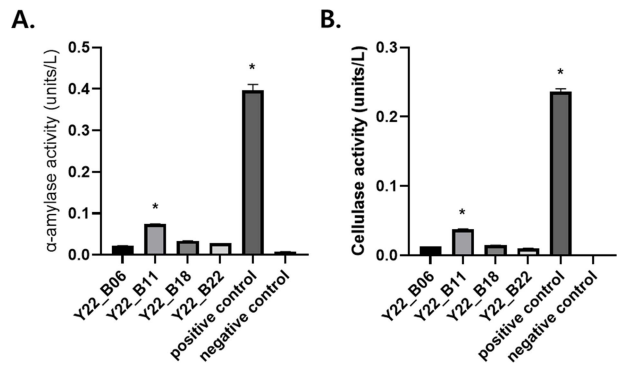


Fig. 2. α -Amylase activity and cellulase activity of bacterial cultures from the soil around *Tricholoma matsutake*. An asterisk (*) denotes a significant difference by the student's t-test ($P < 0.05$).

2011). 이에 세균은 휘발성 물질 등을 이용한 항진균성 활동을 일으켜서 경쟁자가 되는 진균의 성장을 억제한다 (Netzker *et al.*, 2020). 본 실험에서는 이러한 항진균성의 확인을 목표로 확보된 세균들을 대상으로 진균의 세포벽을 분해하는 것으로 알려진 α -Amylase와 cellulase의 활성도 측정을 진행하였다. 준비된 세균 배양액을 대상으로, α -Amylase의 활성도는 녹말로부터 분해되어 생성되는 maltose의 양을 측정하여 확인하였다 (Bhanja *et al.*, 2009). Cellulase의 활성은 carboxymethyl-cellulose (CMC)에 대한 분해정도로 그 활성 정도를 평가하였다 (Ang *et al.*, 2013). 활성 평가를 위해 1.0% (w/v) 농도의 CMC에 대한 CMCase의 분해작용을 통해 생성되는 glucose와 같은 환원당 말단의 양을 측정함으로써 CMCcase의 활성, 더 나아가 cellulase의 활성을 평가하였다. 두 활성도 측정에서 모두 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)를 이용하였으며, 540 nm 파장에서의 활성도를 통해 효소활성을 측정하였다. 측정된 세균 배양액들의 활성도들은 항진균성이 확인된 송이 배양액이 든 양성 대조구와 증류수가 든 음성 대조구와 효소활성도를 측정하였다 (그림 2). 측정 결과, 모든

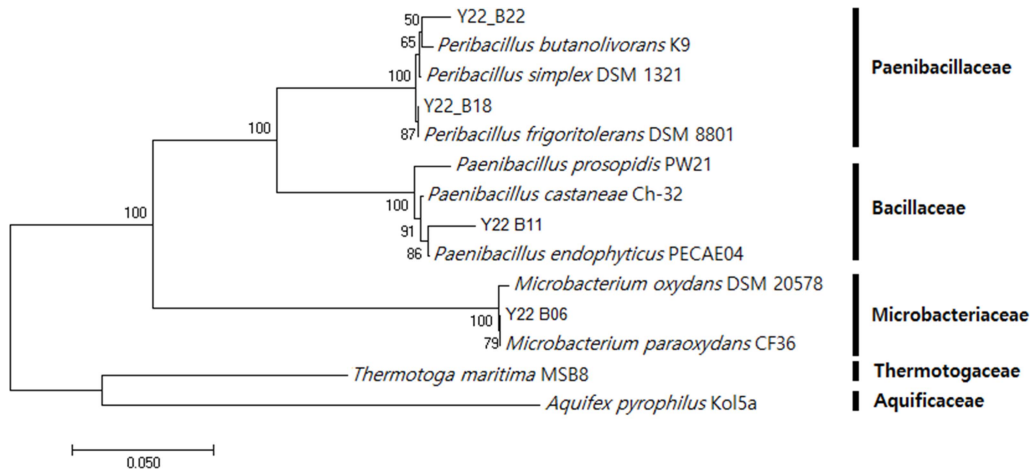


Fig. 3. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequences using neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates.

세균 배양액들이 양성 대조구보다 매우 낮은 수치를 보이는 것을 확인하였으며, 이를 통해 본 실험에서 확보한 4점의 세균들은 항진균성 작용이 낮은 것으로 판단된다.

확보된 4점의 세균들에 균 동정을 진행하기 위해 세균 유전서열 내 16S rRNA 영역을 대상으로 서열 분석이 진행되었다 (Clarridge, 2004). 분석이 완료된 유전 서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLASTn program을 통해 균주명을 확인하였다 (Visagie et al., 2014). BLASTn 결과, 4점의 세균들은 모두 Terrabacteria group에 속하는 것을 확인하였으며, 각각의 세균들은 다음의 균들과 연관성을 보였다; Y22_B06은 *Microbacterium paraoxydans*와 99.78%의 연관성을, Y22_B11은 *Paenibacillus castaneae*와 100%의 연관성을, Y22_B18과 Y22_B22는 각각 *Peribacillus frigiditolerans*와 *Per. butanolivorans*에 대해 100%의 연관성을 보였다. 확보된 세균과 동정결과의 유연관계를 확인하기 위해 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7 software의 Neighbor joining phylogenetic tree를 제작하였으며 *Thermotoga maritima*와 *Aquifex pyrophilus*을 outgroup으로 설정하였다 (Kumar et al., 2016) (그림 3). 확인된 세균 배양체들에 의한 송이 균사체 성장촉진은 *Paenibacillus* 속을 제외하고는 보고된 사례가 없었으며 (Oh et al., 2018b), 기존의 보고된 사례들과의 비교를 통해 송이의 균사 뿐만 아니라 송이버섯 자체의 성장촉진에 유효할 가능성이 있기에, 이에 대한 추가적인 확인 실험이 필요하다.

적 요

송이버섯을 인공재배하기 위하여 송이 근권토양의 미생물을 활용하여 본 실험을 진행하였다. 본 실험은 송이의 자실체가 나오기 전인 7월의 토양으로부터 세균을 확보하

여 진행되었으며 총 4점의 세균에 대해 송이 균사체 성장촉진을 확인하였다. 확보된 세균들, Y22_B06, Y22_B11, Y22_B18, Y22_B22는 각각 송이 균사의 면적을 각각 154.67%, 125.91%, 134.06%, 158.28%로 성장시키는 것으로 확인되었다. 또한 해당 균들에 대한 동정도 이뤄졌으며 각각 *Mic. paraoxydans*, *Pae. castaneae*, *Per. frigiditolerans*, *Per. butanolivorans*로 확인되었으며, 이 중 *Paenibacillus* 속을 제외하고는 송이 균사체 성장촉진 사례가 보고되지 않았다. 본 실험의 결과를 동일한 실험 조건인 기존 사례(Oh et al., 2018a)와 비교하였으며, *Pae. latus*에 의한 230%의 송이 균사 성장촉진의 사례 등과 비교하면 그 성장촉진능은 떨어진다고 볼 수 있다. 또한 세균 자체에 의한 항진균성이 낮아 송이 근권토양에서 진균과의 경쟁에서 우위에 있다고 보기 힘들다. 그러나 송이 균사체에 대해 유의미한 성장촉진을 이끌어냈기에 본 실험의 세균 4점은 송이 성장 촉진에 대한 유효성이 있다고 판단되며 해당 세균을 이용한 배양액을 직접적으로 송이 균사체 혹은 송이 자실체에 적용하였을 경우 송이 성장에 긍정적인 영향을 끼칠 것으로 기대되며 이에 대한 추가적인 실험이 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.
- Ang S, Shaza EM, Adibah Y, Suraini AA, Madihah MS. 2013. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochem* 48: 1293-1302.
- Bhanja T, Kumari A, Banerjee R. 2009. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. *Bioresour Technol* 100: 2861-2866.
- 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.
- 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, Vandenkoornhuysse 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.
- Leigh J, Fitter AH, Hodge A. 2011. Growth and symbiotic effectiveness of an arbuscular mycorrhizal fungus in organic matter in competition with soil bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 76: 428-438.
- Netzker T, Shepherdson EMF, Zambri MP, Elliot MA. 2020. Bacterial volatile compounds: functions in communication, cooperation, and competition. *Annu Rev Microbiol* 74: 409-430.
- 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, Lim YW. 2018. Root-associated bacteria influencing mycelial growth of *Tricholoma matsutake* (pine mushroom). *J Microbiol* 56: 399-407.
- 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. *Scientia 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. *Mycol* 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.