

# 국내 봉화 송이 자생지 내 균환 유래 토양세균의 송이균사체 성장촉진 효과

최두호 · 이은지 · 이강호 · 안기홍\*

농진청 국립원예특작과학원 인삼특작부 버섯과

## Growth promoting effect on *Tricholoma matsutake* mycelium by bacteria from fairy Ring in Bonghwa-gun, Korea

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:** As a member of ectomycorrhizal fungi, *Tricholoma matsutake* has a symbiotic relationship with its host, *Pinus densiflora*. To cultivate *T. matsutake* artificially, the co-cultivation of *T. matsutake* mycelia and bacteria from shiro was introduced. In this study, bacteria were isolated from soil samples in Bonghwa-gun, and seven bacterial isolates (B22\_7\_B05, B22\_7\_B06, B22\_7\_B07, B22\_7\_B08, B22\_7\_B10, B22\_7\_B13, and B22\_7\_B14) promoted the growth of *T. matsutake* mycelia (147.48, 232.11, 266.72, 211.43, 175.17, 154.62, and 177.92%, respectively). Sequencing of the 16S rRNA region of the isolated bacteria was performed. B22\_7\_B05 and B22\_7\_B10 were identified as *Bacillus toyonensis*, B22\_7\_B06 and B22\_7\_B08 as *Paenibacillus taichungensis*, B22\_7\_B07 and B22\_7\_B14 as *P. gorilla*, and B22\_7\_B13 as *P. odorifer*. These bacterial isolates were associated with the shiro community and are expected to contribute to the cultivation of *T. matsutake*.

**KEYWORDS:** Bacteria, Growth promoting effect, Shiro, *Tricholoma matsutake*

외생균근성 버섯과 기주식물은 공생적인 관계를 형성하고 있으며, 이러한 공생 관계를 통해 버섯은 식물의 뿌리로부터 탄소원을 공급받고 기주식물은 버섯으로부터 물과 영양염류를 공급받는다 (Yamanaka *et al.*, 2014). 이러한 공생관계는 외생균근성 버섯의 한 종인 송이에서도 잘 나타나며, 국내에서는 이러한 송이와 소나무의 공생관계를 활용하여 송이의 인공재배에 성공하였다 (Ka *et al.*, 2018). 그러나 해당 인공재배

방법은 재배기간이 6년 이상으로 길어 상업화에는 한계가 있어 송이의 성장촉진을 유도하기 위한 다른 방법이 요구되고 있으며 국내외로 다양한 방법을 통한 송이 인공재배 관련 연구들이 활발히 진행되고 있다 (Yamanaka *et al.*, 2020). 위 연구들 중 송이 자실체 유래 미생물 혹은 송이 근권 토양 미생물과 같이 송이와 직접적인 연관이 있는 미생물을 활용한 송이 성장촉진 유도 실험이 존재하며 (Oh *et al.*, 2018a; Oh *et al.*, 2018b), 본 연구실에서도 해당 실험을 참조하여 균환 유래 토양 미생물을 활용한 송이균 *Tricholoma matsutake*의 성장촉진을 위한 실험을 진행하였다.

송이는 균근성 버섯의 일종으로 shiro라고 지칭되는 균환 영역에서만 특이적으로 균사체의 발달이 이뤄지는 것으로 알려져 있으며 (Ohara, Hamada, 1967; Narimatsu *et al.*, 2016), 본 연구실에서는 송이의 발생 영역에 초점을 맞추어 송이의 생산촉진을 유도하고자 하였다. 이에 2022년도부터 송이와 송이가 발생하는 shiro의 토양 미생물 사이의 상호작용에 중점을 두어 실험을 진행하였으며 (Kiers *et al.*, 2011), 이전 실험에서는 2022년 7월 양양의 송이 균락지로부터 확보한 shiro 유래 토양 미생물에 의한 송이 균사체 성장촉진에 성공하였다 (Choi *et al.*, 2023). 토양 미생물을 활용한 추가적인 송이 균사체 성장촉진 사례를 확보하기 위해 양양 이외에 다른 송이 균락지를 대상으로 동일한

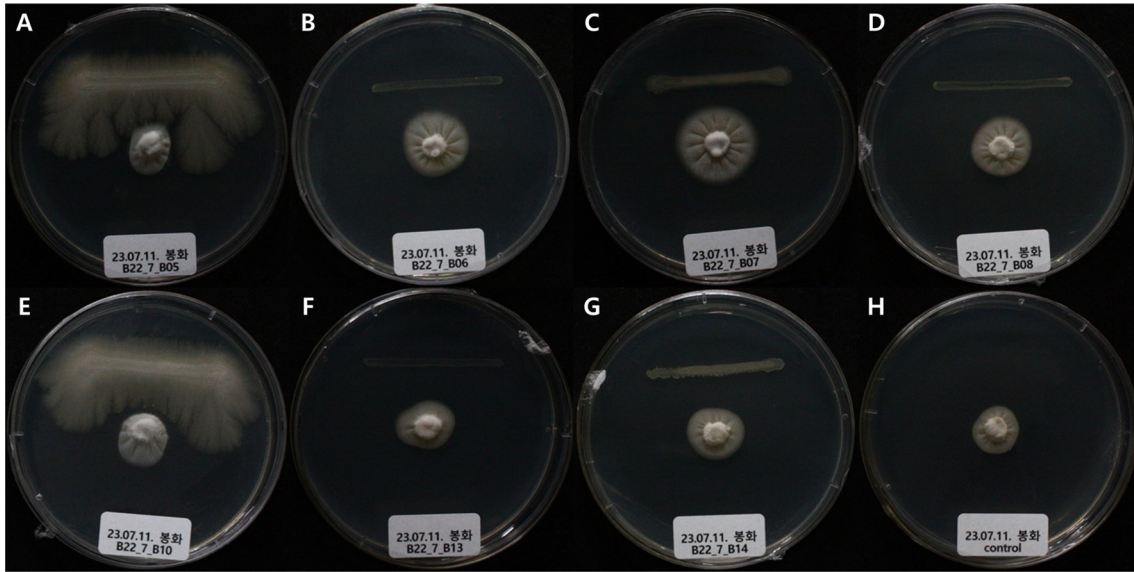
J. Mushrooms 2024 March, 22(1):27-30  
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2024.22.1.27>  
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853

© 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 : gamchduho@naver.com  
 Tel : +82-43-873-5716, Fax : +82-43-873-5702

Received January 18, 2024  
 Revised February 14, 2024  
 Accepted March 19, 2024

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.



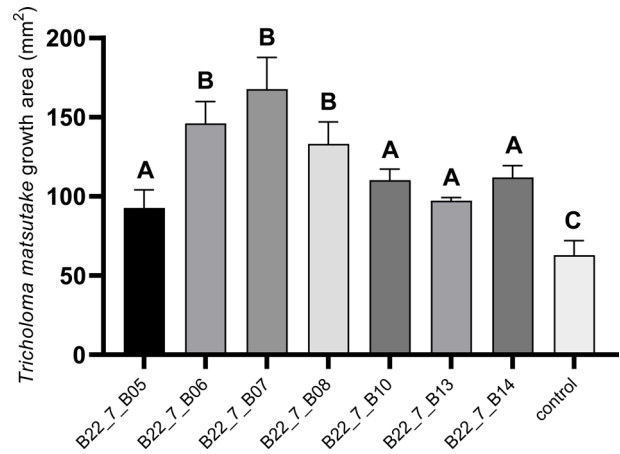
**Fig. 1.** Co-cultivation of bacteria with *Tricholoma matsutake* mycelium A) B22\_7\_B05. B) B22\_7\_B06. C) B22\_7\_B07. D) B22\_7\_B08. E) B22\_7\_B10. F) B22\_7\_B13. G) B22\_7\_B14. H) control.

실험을 진행하였으며 해당 실험에서의 송이 균사체 성장속진의 양상과 기존 결과 사이에 차별점을 확인하였다.

### 재료 및 방법

본 실험은 2022년 7월 경상북도 봉화의 송이 균사체 shiro로부터 확보한 근권 토양샘플을 활용하여 진행하였다. 확보된 토양샘플을 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 각각의 독립된 세균 균주들을 분리 및 배양하였다. 송이 균사체에 대한 성장속진 여부를 확인하기 위해 각각의 배양된 세균 균주들을 동일한 자생지에서 확보한 송이 균사체와 함께 대치배양을 진행시켰다. 대치배양은 기존에 진행하였던 실험과 동일한 조건에서 진행이 되었으며 (Choi *et al.*, 2023), 본 실험은 *Tricholoma matsutake media* (TMM) (glucose 20 g/L, yeast extract 1.5 g/L, soytone 1.5 g/L, agar 20 g/L) 배지를 활용하여 진행되었다. 배지 중앙에 위치한 송이 균사체로부터 15 mm 떨어진 지점에 30 mm 길이의 세균 배양체 획선을 그어 25 °C, 암상태의 조건에서 1 개월간의 배양 후 성장한 균사의 면적을 Image J program을 통해 측정하였다 (Fig. 1). 균사체의 성장속진 여부는 무처리 상태인 대조구 대비 처리구의 송이 균사체 성장면적이 15% 이상 더 큰 경우에 한해 생장이 촉진한 것으로 판단하였다.

성장속진 효과를 보인 세균 7점의 균 동정을 진행하기 위해 27F 정방향 primer와 1492R 역방향 primer를 이용하여 세균의 16S rRNA 영역 유전서열을 분석하였다 (Clarridge, 2004). 분석이 완료된 서열들은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLASTn program으로 분석하였으며 각각의 서열에 해당하는 균주명을 확인하고 GenBank에 등록하여 관련 Accession



**Fig. 2.** Comparison of growth effect on *Tricholoma matsutake* mycelium by each bacterium. The letters (A-C) denote a significant difference by the Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Same letters denote a no significant difference ( $P > 0.05$ ).

번호를 받았다 (Visagie *et al.*, 2014). 이후 NCBI 동정결과와 확보된 세균의 연관성의 증명을 위해 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7 software를 활용하여 phylogenetic tree를 제작하였다 (Kumar *et al.*, 2016). 제작을 위해 대조구로써 *E. coli* K-12의 16S rRNA 서열영역을 outgroup으로 설정하였으며, Kimura-2 parameter 모델을 활용하여 Neighbor joining 수준에서의 phylogenetic tree를 제작하였다 (Fig. 3).

### 통계 처리

모든 실험은 3회 반복을 수행하였으며 확보된 데이터는 GraphPad Prism과 InStat V.3 (GraphPad, San Diego, CA, USA)를

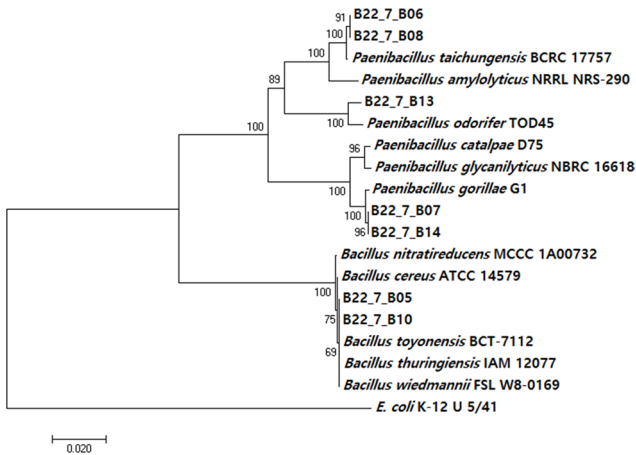


Fig. 3. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequences using neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replicates.

이용하여 통계처리 및 분석이 진행되었다. 실험 평균치에 대한 유의성 검사는 one-way ANOVA를 통해 진행되었으며, 통계 결과는 Turkey HSD test를 활용하여 사후 검증을 진행하였다.

### 결과 및 고찰

대치배양 결과, 7점의 세균 배양체들이 (B22\_7\_B05, B22\_7\_B06, B22\_7\_B07, B22\_7\_B08, B22\_7\_B10, B22\_7\_B13, B22\_7\_B14) 대조구 대비 각각 147.48%, 232.11%, 266.72%, 211.43%, 175.17%, 154.62%, 177.92%의 송이 균사체 성장면적 결과를 보임으로써 송이 균사체에 대한 성장촉진을 유도하였다 (Fig. 2). 세균에 의한 성장촉진 결과값들 사이 유의성 평가를 진행하였으며 송이 균사체 성장촉진 결과가 가장 높았던 3 개의 결과값 (B22\_7\_B06, B22\_7\_B07, B22\_7\_B08) 사이에서 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다 ( $P>0.05$ ). 그러나 위 3개 결과값들 각각은 대조구를 포함한 다른 성장촉진 결과값들과 유의적인 차이를 보이며 ( $P<0.05$ ), 본 실험에서 확보한 성장촉진 결과에 대한 신뢰성을 확보할 수 있었다. 덧붙여, 본 실험을 포함한 기존의 실험들은 송이 균사체 배양 기간을 1 개월로 제한하였으나 송이의 초기 성장촉진 효과나 2, 3 개월과 같은 장기간의 배양 기간 설정이 없기에 이에 대한 추가적인 실험을 진행하고자 한다.

세균의 유전영역인 16S rRNA 영역을 중심으로 확보된 세균 7점에 대한 동정결과와 그 accession 번호는 다음과 같다; B22\_7\_B05는 *Bacillus toyonensis*와 99.93~100.00%의 연관성(*B. toyonensis* BCT7112와 유사도 100.00%)과 등록번호 OR717514를, B22\_7\_B06은 *Paenibacillus taichungensis*와 99.30~99.72%의 연관성(*P. taichungensis* BCRC 17757과 유사도 99.65%)과 등록번호 OR717515를, B22\_7\_B07은 *P. gorillae*와 97.98~99.79%의 연관성(*P. gorillae* G1과 유사도 99.58%)과 등록번호 OR717516을, B22\_7\_B08은 *P. taichungensis*와 99.16~99.86%의 연관성(*P. taichungensis* BCRC 17757과 유사도 99.72%)과 등록번호 OR717517을, B22\_7\_B10은 *B. toyonensis*와 99.93~100.00%

의 연관성(*B. toyonensis* BCT7112와 유사도 100.00%)과 등록번호 OR717518을, B22\_7\_B13은 *P. odorifer*와 98.26~99.79%의 연관성(*P. odorifer* TOD45와 유사도 98.47%)과 등록번호 OR717519를, B22\_7\_B14는 *P. gorillae*와 97.90~99.51%의 연관성(*P. gorillae* G1과 유사도 99.37%)과 등록번호 OR717520을 확보하였다. 위의 동정결과를 토대로 phylogenetic tree를 제작하였으며, 5점의 세균에 대한 유의미한 유연관계를 확인하였다. 다만 B22\_7\_B05와 B22\_7\_B10의 경우 *B. toyonensis*와 phylogenetic tree 내에서 가장 가까운 유연관계를 가지는 것으로 확인되었으나, bootstrap 가치가 매우 낮아 직접적인 유연관계 확인이 힘들었다. 위의 두 세균에 대한 유연관계 확인을 위해 추후 16S rRNA 영역 이외에 다른 유전 영역을 추가적으로 분석하여 phylogenetic tree를 제작함으로써 해결하고자 한다.

동정된 송이 균사체 성장촉진 세균 7점에 의한 성장촉진 결과를 본 연구실에서 앞서 실시한 실험결과와 비교하였을 때 (Choi et al., 2023), 동일한 속의 세균 *Paenibacillus* 군에 관련하여 본 실험에서 더 높은 송이 균사체 성장촉진 효과를 확인하였다. 또한 다른 연구실에서의 실험결과를 비교하였을 때도 마찬가지로 (Oh et al., 2018b), 동일한 세균 종인 *P. taichungensis* 군에 관련하여 더 높은 송이 균사체 성장촉진 효과를 확인하였다. 위 결과를 토대로 본 연구실에서는 세균의 속이 같더라도 종의 종류에 따라 송이 균사체에 적용하는 성장촉진 효과가 다르다는 결론과 세균의 종이 같더라도 송이가 발생한 서식지에 따라 미생물에 의한 송이 균사체의 성장촉진 효과가 다양할 수 있다는 추론을 내렸다.

### 적 요

본 연구실에서는 송이의 인공재배 조건 확립을 목표로 세균을 활용한 성장촉진 유도실험을 진행하였으며, 봉화에서 확보한 7점의 세균에 의한 송이 균사체의 성장촉진 결과를 확인하였다. 성장촉진 효과가 가장 높았던 3 점의 세균 B22\_7\_B06, B22\_7\_B07, B22\_7\_B08은 *Paenibacillus* 속으로 확인되었다. 그러나 이러한 배양된 송이 균사체의 성장면적 측정 이외에 다양한 방식을 통한 균사체 성장결과 확인 기준이 필요한 실험이며, 이에 향후 확보된 세균들이 모두 그람 양성균인 것에 착안하여 각 세균들로부터 대사산물을 추출한 후 (Eltokhy et al., 2021), 추출한 대사산물을 활용하여 송이 균사체의 세포의 효소활성 변화 정도를 측정하여 보다 체계적인 송이 균사체 성장촉진 데이터를 확보하고자 한다. 더불어 미생물에 의한 송이 균사체 성장촉진 사례 데이터를 지속적으로 축적하여 송이 종류에 따른 미생물의 성장촉진 효과의 다양성을 확보하고 확보된 촉진균으로부터 추출한 물질이 함유된 영양 배지를 활용하여 송이 인공재배를 위한 생태모방에 기여하고자 한다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 시험연구사업(과

제번호 PJ014766022023)에 의하여 수행된 결과의 일부로써 국립원예특작과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Choi DH, Han JG, Lee KH, An GH. 2023. Growth-promoting effect on *Tricholoma matsutake* mycelium by Terrabacteria isolated from pine mushroom habitats in Korea. *J Mushrooms* 21(3): 190–193.
- 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.
- Eltokhy MA, Saad BT, Eltayeb WN, Yahia IS, Aboshanab KM, Ashour MSE. 2021. Exploring the nature of the antimicrobial metabolites produced by *Paenibacillus ehimensis* soil isolate MZ921932 using a metagenomic nanopore sequencing coupled with LC-mass analysis. *Antibiotics (Basel)* 11(1): 12.
- 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 Ecology* 24: 35e43.
- Oh SY, Kim M, Eimes JA, Lim YW. 2018a. Effect of fruiting body bacteria on the growth of *Tricholoma matsutake* and its related molds. *PLoS One* 13: e0190948.
- Oh SY, Lim YW. 2018b. Root-associated bacteria influencing mycelial growth of *Tricholoma matsutake* (pine mushroom). *J Microbiol* 56: 399–407.
- Ohara H, Hamada M. 1967. Disappearance of bacteria from the zone of active mycorrhizas in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) singer. *Nature* 213: 528e529.
- 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.
- 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.