

Diversity and cluster analysis of pine mushroom's endophytes using metagenome analysis

Jong Beom Seo, Ah Hyeon Choi, Butoto Imani wa Rusaati, Jun Won Kang*

School of Forest Sciences and Landscape Architecture, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

*Corresponding author: jwkang15@knu.ac.kr

Abstract

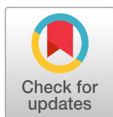
Tricholoma matsutake (Pinus mushroom, PM) is one of the most valued ectomycorrhizal fungi in Asia because it is an expensive forest product with a unique flavor and taste. Therefore, many studies have tried to successfully cultivate *Tricholoma matsutake* artificially in Korea and other countries. However, its physiological and ecological characteristics are still unknown. Thus, we need to understand the diversity and clusters of microorganisms related to *Tricholoma matsutake* and to identify their core microorganisms related to their growth and production. In this study, we obtained an average of 11,661 fragments from three pine mushrooms with metagenome (an assemblage of genes of all microorganisms in the natural world) analysis from a pine forest located in Pohang, Gyeongsang-Bukdo. Of these, the valid reads were on average 5,073 per sample available for analysis, and the average length of a read was 456 bp. There were an average of 33.3 phyla in the metagenome analysis. Firmicutes phylum made up on an average 46% of the phyla and was dominant among the phyla. The next dominant phylum was Proteobacteria at 27% followed by Bacteroidetes at 17%, Actinobacteria at 5% and Verrucomicrobia at 2%. The Proteobacteria phylum consisted of the γ -proteobacteria class at 54% followed by β -proteobacteria at 37%, α -proteobacteria at 6%, δ -proteobacteria at 2% and ζ -proteobacteria at 0%. The metagenome consisted of the Ruminococcaceae family at 17% followed by Pseudomonadaceae at 13%, Burkholderiaceae at 7%, Bacteroidaceae at 7%, Lachnospiraceae at 7% and Clostridiaceae at 6%.

Keyword: fimicutes, fungi, metagenome, Proteobacteria, *Tricholoma matsutake*

Introduction

송이(*Tricholoma matsutake*)는 *Tricholoma* 속의 몇 없는 식용 가능한 버섯 중 하나이며, 그 자체의 독특한 맛과 향을 가진 귀한 버섯이다(Yun et al., 1997; Amend et al., 2010). 이 종은 주로 한국, 중국, 일본에 분포하며 북미, 유럽, 북아프리카, 아시아 전역에 걸쳐 위도 20°- 50° N 사이의 불연속적인 온대에서도 발견된다(Ogawa and Ito, 1989).

임업통계연보에 의하면 한국의 송이 소비량은 2018년에 654,000 kg으로 지난 5년 동안 꾸준히 늘고 있는 것으로 나타났다. 그러나 이 중 32%만을 국내에서 생산하고 있으며, 나머지



OPEN ACCESS

Citation: Seo JB, Choi AH, Rusaati BI, Kang JW. Diversity and cluster analysis of pine mushroom's endophytes using metagenome analysis. Korean Journal of Agricultural Science 48:493-503. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20210039>

Received: March 15, 2021

Revised: June 30, 2021

Accepted: July 09, 2021

Copyright: © 2021 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

68%를 수입에 의존하는 실정이다(KFS, 2019). 산림청의 임산물 수출입 통계 자료에 의하면 2019년도에 450,000 kg 송이를 수입하였으며, 이 중 99.99%는 중국에서 수입한 것으로 나타났다. 이처럼 송이는 한국에서 수요가 높아 경제적으로 중요한 임산물이지만(He, 2010; Faier, 2011; Van Gevelt, 2014), 최근 한국의 송이 수확량은 수확기간의 기후변화와 수확 압력으로 감소하고 있는 것으로 나타났다(Iwase, 1997; Van Gevelt, 2014; Wang et al., 2017). 산채와 같은 임산물은 기후변화에 대한 동태를 살피기 위한 재배 모형을 제작한 사례가 있지만(Choi and Lee, 2019), 송이는 아직 기후변화에 따른 수확 감소에 관한 연구도 미비한 실정이다.

송이균은 소나무와 공생하여 자실체를 만들어 내며, 지중온도가 19°C 이하로 떨어지는 9월과 10월에 버섯 원기를 형성하면서 발생한다(Ogawa, 1991). 송이는 생육조건이 까다로워 인공적인 자실체 형성이 불가능하기 때문에(Cho et al., 2002), 송이의 인공재배에 대한 연구들이 전 세계적으로 활발하게 진행되고 있다(Ka and Koo, 2002). 특히 1983년 일본과 2010년 한국에서는 송이 감염묘를 이용하여 인위적으로 송이버섯 발생에 성공하였다는 연구가 보고된 바 있다(Masuhara, 1992; Ka et al., 2013; Jeon and Ka, 2016). 송이 감염묘 방법은 현재까지 송이를 인공재배 할 수 있는 유일한 방법으로, 국내에서 2010년과 2017년에 송이 발생 재현에 성공하였다(Ka et al., 2018), 송이 감염묘를 통한 인공재배 외, 온도와 습도를 인위적으로 관리하여 송이를 재배를 가능하게 하는 연구(Na, 2003; Shim et al., 2007)도 진행되었지만 실질적인 인공재배 기술과 송이의 적정 생육환경을 규명하지 못한 상태이다.

버섯은 직접적으로 토양과 주변 식생 및 기주식물의 영향을 받고 살아가는 생명체이기 때문에 주위 미생물에 더욱 큰 영향을 받는다(Antony-Babu et al., 2014; Pent et al., 2017). 특히, 송이버섯은 토양에서 균환을 형성하며 자라는 특성으로 인해 토양 미생물 집단과 송이의 연관성에 대한 연구가 수행되어 왔다(Vaario et al., 2011; Kim et al., 2013; Oh et al., 2016). 이들 선행연구에서는 균환에서 추출된 소수의 박테리아 종이 송이 균사체의 성장을 촉진시킨다는 연구 결과를 보고한 바 있다(Oh and Lim, 2018a, 2018b). 하지만 송이버섯 내 미생물에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 토양 미생물뿐만 아니라 메타게놈 즉, 자연계에 존재하는 모든 미생물의 유전체 집합 분석을 통하여 송이와 관련된 미생물의 다양성과 군집을 이해하고, 생육 및 생산과 연관성이 있는 미생물-바이오마커를 탐색하고자 연구를 진행하였다.

Materials and Methods

조사지 개황

경북 포항시 북구 청하면 상대리 산213, 17임반 소나무림에서 송이 3개체를 채취하였다(Fig. 1).

송이 내 박테리아 DNA 추출

송이 내생미생물의 DNA 추출은 DNA isolation kit (MoBio, CA, USA)를 사용하였으며, 각 송이 시료 5 g으로부터 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA로부터 내생균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 중합 효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)을 2회 수행하였다. 16S rRNA 유전자의 V3에서 V4의 영역을 증폭하기 위하여 341F (5'-TCGTCGGCAGCGTC-AGATGTGTATAAGAGACAG-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 프라이머와 805R (5'-GTCTCGTGGGCTCGG-AGATGTGTATAAGAGACAG-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') 프라이머를 사용하였다(Herlemann et al., 2011). 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 PCR 절차는 다음과 같다. 초기 변성(initial denaturation) 95°C 3분, 변성(initial denaturation) 95°C 30초, 프라이머 결합(primer annealing) 55°C 30초, 합성(extension) 72°C 30초

25회 반복, 최종 신장반응(final elongation) 72°C 5분. 2차 PCR은 illumine NexTera barcode를 부착하기 위해 i5 forward primer (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-XXXXXXXX-TCGTCGGCAGCGTC-3')와 i7 reverse primer (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-XXXXXXXX-GTCTCGTGGGCTCGG-3') 프라이머를 사용하였다(Kim et al., 2019). i5 forward primer와 i7 reverse primer의 X 부분은 각 송이 시료 대상에 따라 달리하는 바코드 영역이다. PCR 절차는 증폭을 8회로 시행한 것을 제외하고 1차 PCR 절차와 동일하게 진행하였다.

1% Agarose gel 전기용동을 사용하여 Gel Doc system (BioRad, Hercules, CA, USA)에 따라 시각화하여 확인하였다. PCR 증폭 산물은 CleanPCR (CleanNA, Waddinxveen, Netherlands) 제품으로 정제하여 불순물을 제거하였다. 최종 증폭 산물의 품질과 크기를 측정하기 위해 DNA 7500 chip을 사용한 Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA)을 사용하였다. 이후 illumina MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., San diego, USA)을 사용하여 Chunlab, Inc.에서 시퀀싱을 수행하여, 송이 내생균의 16s rRNA 유전자 염기서열을 해독하였다.



Fig. 1. Place where research material was extracted. (A) Three pine mushrooms used in the study. (B) Compartment 17, mountain 213, Sangdae-ri, Cheongha-myeon, Buk-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea. (C) Pine forest in which the mushroom is collected.

송이 내생미생물의 계통 및 군집 특성 분석

Trimmomatic 0.32를 사용하여 Q25보다 적은 단편을 필터링하였다. QC 단계가 끝난 후, vsearch를 사용하여 Paired-end sequencing 데이터들을 병합하였다. 프라이머는 ChunLab's in-house program (Chunlab Inc., Seoul, Korea)을 활용하여 유사도 0.8까지 제거하였다 증폭 산물에서 16S rRNA가 검출되지 않는 비특이한 경우는 HMMER's hmmsearch program (<http://hmmmer.org/>)을 사용하여 감지하였다. DUDE-Seq를 사용하여 Miseq sequencing 분석 과정에서 발생하는 무작위적 오류를 제거하고, 중복되지 않은 단편은 UCLUST 클러스터링으로 추출하였다. 분류학적 동정을 수행하기 위해 vsearch 프로그램(<https://github.com/torognes/vsearch>)을 사용하였으며, 유사성이 97% 보다 낮은 단편에서 키메라 서열을 확인하기 위해 non-chimeric 16S rRNA database를 사용하였다. 종 수준(유사율 97%)으로 식별되지 않은 단편들을 편집하고, 추가적인 OTUs를 생성하기 위해 de-novo 클러스터링을 수행하는데 UCLUST를 사용하였다.

Results and Discussion

송이 내생미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열분석

경북 포항시 북구 청하면 상대리 산213, 17임반 소나무림에서 3개의 송이 시료로부터 평균 11,661개의 단편을 얻었다. 이 중, 분석에 사용할 수 있는 유효 단편(valid read)은 시료 당 평균 5,073개였으며, 유효 단편의 평균 길이는 456 bp였다. 각 송이 시료 당 문 다양도는 32 - 35로 나타났다. 각 송이의 내생미생물을 구성하는 문 중에서는 Firmicutes가 평균 45.92%, Proteobacteria가 평균 27.47% 점유하면서 송이내에서 우점하는 것으로 나타났다.

송이 내생미생물 군집의 비교 분석

송이 내 박테리아 문(phylum)의 비율

송이 내 문(phylum) 수준의 다양도를 분석한 결과 3개체의 송이 내에는 평균 33.3개의 문이 존재하는 것으로 나타났다. 송이 시료 내 Firmicutes 문은 평균 45.9%이며 송이 내생미생물의 가장 많은 비율을 차지한다. 다음으로 Proteobacteria 문이 평균 27.5%, Bacteroidetes 평균 16.9%, Actinobacteria 평균 4.6%, Verrucomicrobia 평균 2.8%로 나타났다. 1% 미만의 비율을 가진 문은 Acidobacteria, Cyanobacteria, Planctomycetes, Tenericutes 등으로, 이들은 Other로 분류하여 평균 2.3%로 나타났다 (Fig. 2A).

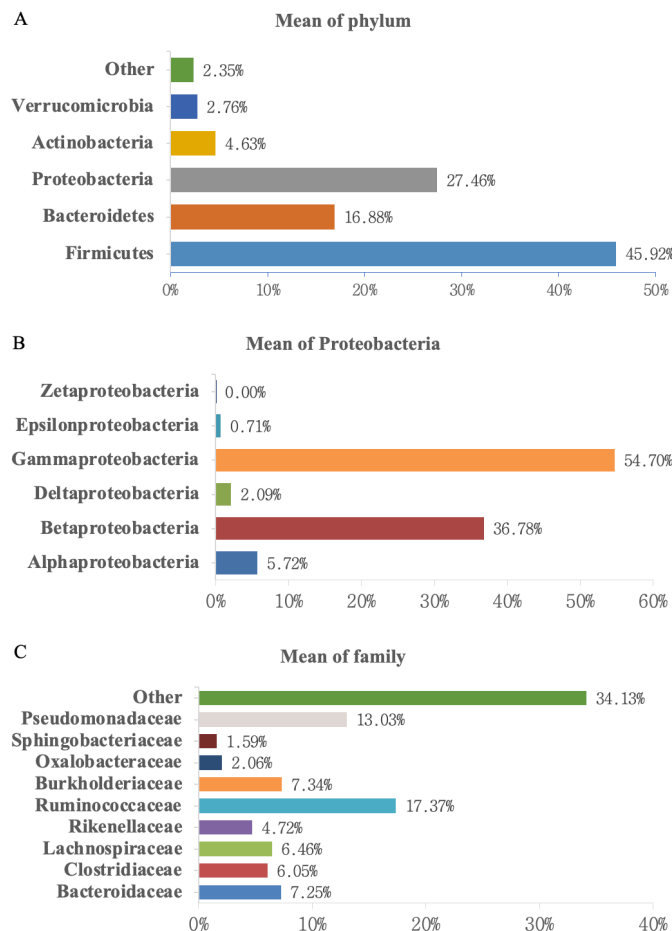


Fig. 2. (A) Average phylum ratio of three pine mushrooms. (B) Average class of Proteobacteria ratio of three pine mushrooms. (C) Average family ratio of three pine mushrooms.

PM1에서는 주된 문(phylum)은 5개 그룹으로 나눌 수 있었다. 가장 큰 비율은 Firmicutes (59.6%)로 나타났고, 그 다음으로 Bacteroidetes (19.5%), Proteobacteria (9.4%), Actinobacteria (4.8%), Verrucomicrobia (4.1%)와 같은 순서로 나타났다. PM2에서는 Firmicutes (58.7%)가 가장 큰 비율로 나타났으며, 그 다음으로 Bacteroidetes (19.7%), Proteobacteria (8.4%), Actinobacteria (7.1%), Verrucomicrobia (2.9%)와 같은 순서로 나타났다. PM3에서는 가장 큰 비율로 Proteobacteria (68.4%), 다음 순서로 Firmicutes (16.8%), Bacteroidetes (10.9%), Actinobacteria (1.7%), Verrucomicrobia (1.2%)와 같이 나타났다(Fig. 3).

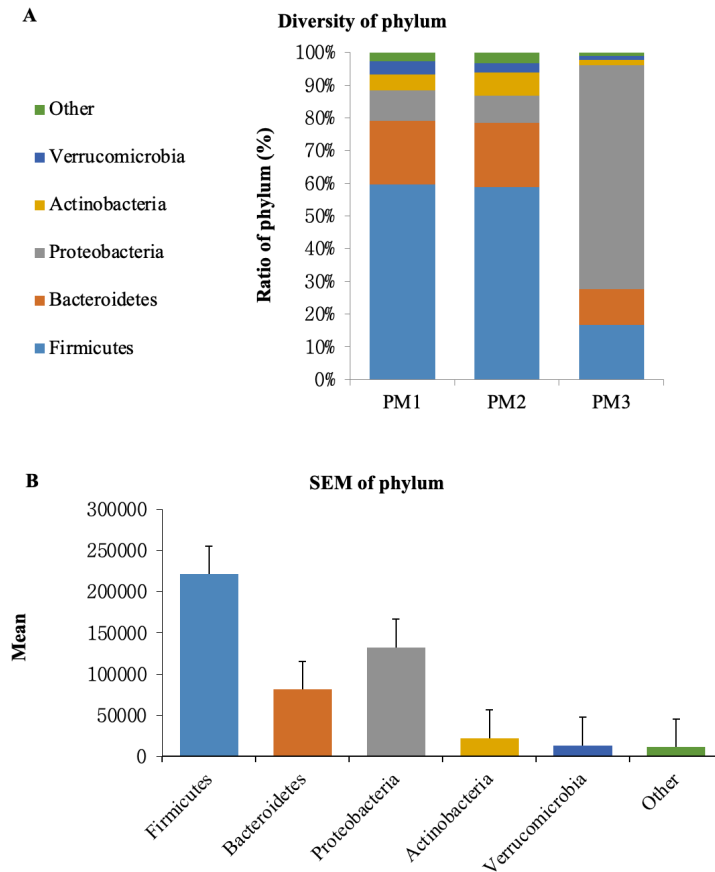


Fig. 3. (A) Percentage of bacteria phylum in pine mushrooms. (B) Standard error of the mean (SEM) of phylum in pine mushrooms.

PM3의 Proteobacteria의 강(class), 목(order)

PM3은 PM1과 PM2와 다른 구성비를 보이는데(Fig. 3 - Fig. 6), Proteobacteria 문의 비율이 상당히 높았다(Fig. 3A). 일반적으로 Proteobacteria의 강(class)은 α -, β -, δ -, γ -, ϵ -, ζ -proteobacteria로 구성된다. 세 송이 내 Proteobacteria 문의 평균 강(class)의 비율은 γ -proteobacteria 강이 평균 54%, β -proteobacteria 평균 37%, α -proteobacteria 평균 6%, δ -proteobacteria 평균 2%, ζ -proteobacteria가 평균 0% 순으로 나타났다(Fig. 2B). PM3 내 Proteobacteria의 강은 γ -proteobacteria (58.92%)와 β -proteobacteria (39.78%)가 두드러졌다. 나머지 강은 2% 미만이다(Fig. 4).

PM3 내 가장 큰 비율을 가지는 강(class)인 γ -proteobacteria는 Pseudomonadales 목(order)을 97.93%로 가장 많이 가졌다(Fig. 5A). 그 다음으로 큰 β -proteobacteria 강은 Burkholderiales 목(order)이 99.58%로 대부분을 차지했다(Fig. 5B).

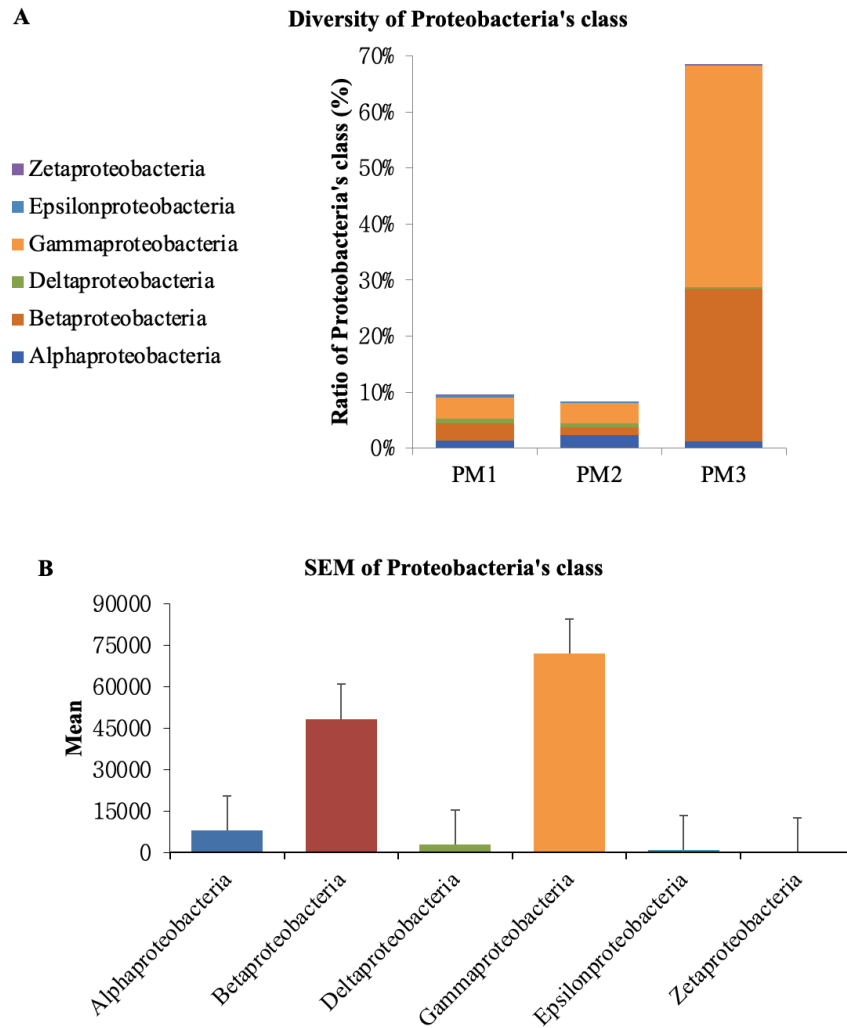


Fig. 4. (A) Percentage of Proteobacteria class in pine mushrooms. (B) Standard error of the mean (SEM) of Proteobacteria class in pine mushrooms.

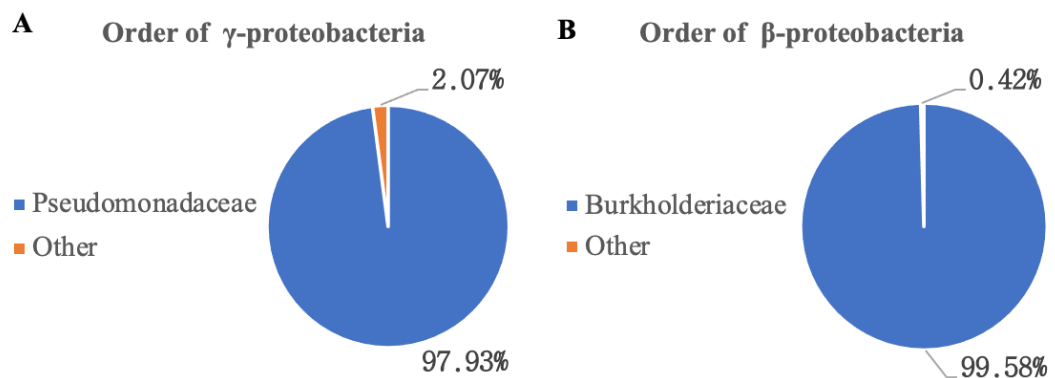


Fig. 5. (A) Percentage of γ -proteobacteria order in pine mushrooms. (B) Percentage of β -proteobacteria order in pine mushrooms.

송이 내 박테리아 과(family)의 비율

송이 시료 내 Ruminococcaceae과가 평균17%으로 송이 내에서 가장 많은 비율을 차지한다. 다음으로 Pseudomonadaceae 평균13%, Burkholderiaceae 평균7.5%, Bacteroidaceae 평균7.3%, Lachnospiraceae 평균6%, Clostridiaceae 평균6% 순으로 나타났다(Fig. 2C).

PM1에서 주된 과로 5그룹이 나왔다. PM1 내에서 가장 큰 비율을 차지하는 과는 Ruminococcaceae (22.84%)였다. 다음으로 Bacteroidaceae (9.08%), Lachnospiraceae (8.24%), Clostridiaceae (7.79%), Rikenellaceae (5.65%)순이었다. 4% 이하를 차지하는 과들은 Other (46.4%)로 분류하였다. PM2에서 주된 과로 5개 그룹으로 나누어 졌으며, PM1과 비슷한 양상을 가진 것으로 나타났다. PM2 내에서 가장 큰 비율을 차지하는 과는 Ruminococcaceae (21.74%) 였다. 다음으로 Bacteroidaceae (9.31%), Lachnospiraceae (8.13%), Clostridiaceae (8.04%), Rikenellaceae (6.51%)순이었다. 4% 이하를 차지하는 과들은 Other (46.27%)로 분류했다. PM3에서 주된 과로 5그룹이 나왔다. PM3 내에서 가장 큰 비율을 차지하는 과는 Pseudomonadaceae (38.72%)이며, 다음으로 Burkholderiaceae (20.27%), Ruminococcaceae (6.56%), Oxalobacteraceae (6.54%), Sphingobacteriaceae (4.84%)순이었다. 4% 이하를 차지하는 과들은 Other (23.07%)로 분류했다(Fig. 6).

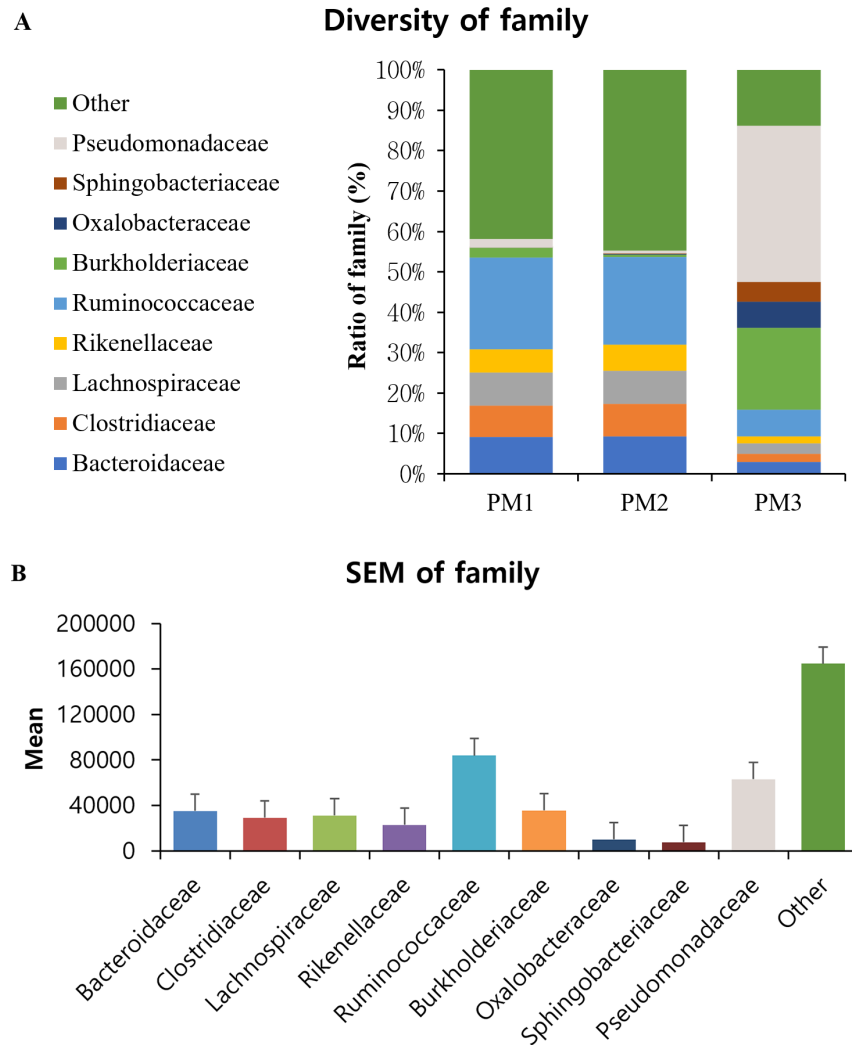


Fig. 6. (A) Percentage of bacteria family in pine mushrooms. (B) Standard error of the mean (SEM) of family in pine mushrooms.

Conclusion

세 개체의 송이버섯 내 마이크로바이옴을 조사한 결과, 문(phylum) 수준에서 평균 Firmicutes문이 가장 많은 비율을 차지하였으며, 다음으로 Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia 순으로 나타났다. 그러나 개체 각각을 보면 PM1과 PM2는 대체로 비슷한 비율의 문이 존재하였지만, PM3은 PM1, PM2와 전혀 다른 비율의 문이 존재하는 것으로 나타났다.

PM1과 PM2에서 우점하고 있는 Firmicutes문의 Ruminococcaceae과는 사람과 동물의 내장에 많이 분포하고 있다 (Tap et al., 2009; Ma et al., 2019). Ruminococcaceae과의 일부 종은 식물 세포벽의 주성분인 cellulose를 분해할 수 있는 cellulase를 생성하는 것으로 알려져 있다(Brulc et al., 1948; Biddle et al., 2013). 송이는 소나무의 근권에서 균환을 형성하는 외생균근균이며, cellulose 활성이 탁월하다는 결과가 보고된 바 있다(Jeon et al., 2012). 이를 바탕으로, Ruminococcaceae과의 미생물이 cellulose를 분해하여 송이의 소나무 근권 활착에 도움을 주는 것으로 사료된다.

송이버섯의 균환 내 미생물 다양성에서 Proteobacteria가 우점하는 연구결과가 보고된 바 있다(Kim et al., 2014). 또한 송이버섯 국내외 연구결과에서 Proteobacteria 문의 비중이 타 미생물 문보다 높았으며, PM3와 같이 Pseudomonadaceae과가 가장 큰 비중을 가진다는 결과가 나타났다(Li et al., 2015; Oh et al., 2018). PM3에서 가장 큰 비율을 가지는 목인 Pseudomonadales의 기준이 되는 속은 Pseudomonas이며, 일부 종은 사람을 포함한 식물과 동물에 질병을 일으킬 수 있다(Sadikot et al., 2005; Stoyanova, 2014; Xin et al., 2018). 또한, 버섯에 병원성을 나타내는 종도 발견된 바 있다(Raine et al., 1991). 다음으로 많은 Burkholderiales 목의 기준이 되는 속은 Burkholderia이며, 이 속의 특정 균주는 식물 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Suárez-Moreno et al., 2012). 그러나 Burkholderia 속의 많은 종이 식물이나 동물의 병원체인 것으로 알려져 있다(O'Carroll et al., 2003; Ura et al., 2006). 따라서 PM3의 경우, 토양에 의해 병원성 미생물에 감염됐거나 연구실로 옮기는 중 오염이 발생했다고 추측할 수 있다. 정상적인 송이는 PM1과 PM2 같은 마이크로바이옴을 가질 것으로 예측된다.

본 연구 결과를 토대로 PM1과 PM2에서 송이 내 주된 마이크로바이옴을 알 수 있었으며, 이는 송이의 생육 및 생산과 연관성이 있는 미생물-바이오마커를 찾는 데 활용될 수 있을 것이다. 그러나 송이가 고가의 임산물이라는 점에서 적은 개체만이 연구에 사용되었다. 이는 PM3과 같은 결과를 나타낼 수 있으므로 향후 연구에서는 좀 더 많은 개체에 대한 조사가 필요할 것이다. 또한 세균은 송이 내 생물 다양성의 일부이며, 송이의 생태적 특성을 전반적으로 파악하기 위해서는 송이와 토양 균류에 대한 분석이 병합되어 수행되어야 할 것이다.

Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgements

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업 (FTIS-2019149A00-2123-0301)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

Authors Information

Jong Beom Seo, <https://orcid.org/0000-0003-3641-4654>

Ah Hyeon Choi, <https://orcid.org/0000-0002-5114-5512>

Butoto Imani wa Rusaati, <https://orcid.org/0000-0001-8092-8682>

Jun Won Kang, <https://orcid.org/0000-0003-3641-4654>

References

- Amend A, Garbelotto M, Fang Z, Keeley S. 2010. Isolation by landscape in populations of a prized edible mushroom *Tricholoma matsutake*. *Conservation Genetics* 11:795-802.
- Antony-Babu S, Deveau A, Van Nostrand JD, Zhou J, Le Tacon F, Robin C, Frey-Klett P, Uroz S. 2014. Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environmental Microbiology* 16:2831-2847.
- Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S. 2013. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by lachnospiraceae and ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity* 5:627-640.
- Brulc JM, Antonopoulos DA, Berg Miller ME, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA, Edwards RE, Frank ED, Emerson JB, Wacklin P, Coutinho PM, Henrissat B, Nelson KE, White BA, Banfield JF, Performed BH. 1948. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 106:1948-1953.
- Choi JY, Lee SH. 2019. Projecting suitable habitats considering locational characteristics of major wild vegetables and climate change impacts. *Korean Journal of Agricultural Science* 46:661-670. [in Korean]
- Cho N, Tsunoda M, Asawa K. 2002. Artificial cultivation of the mycorrhizal edible mushrooms. *Journal of the Korean Wood Science and Technology* 30:180-189. [in Korean]
- Faier L. 2011. Fungi, trees, people, nematodes, beetles, and weather: Ecologies of vulnerability and ecologies of negotiation in matsutake commodity exchange. *Environment and Planning A* 43:1079-1097.
- He J. 2010. Globalised forest-products: Commodification of the matsutake mushroom in Tibetan Villages, Yunnan, Southwest China. *International Forestry Review* 12:27-37.
- Herlemann DPR, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The International Society for Microbial Ecology* 5:1571-1579.
- Iwase K. 1997. XIII. Cultivation of mycorrhizal mushrooms. *Food Reviews International* 13:431-442.
- Jeon SM, Ka KH. 2016. Korean *Tricholoma matsutake* strains that promote mycorrhization and growth of *Pinus densiflora* seedlings. *The Korean Journal of Mycology* 44:155-165. [in Korean]
- Jeon SM, Kim MS, Ka KH. 2012. Effects of medium, temperature and pH on mycelial growth and cellulase activity of ectomycorrhizal fungi from Korean forests. *The Korean Journal of Mycology* 40:191-203. [in Korean]
- Ka KH, Jeon SM, Park H, Lee WY, Oh DS, Choi JW. 2013. Development of mushroom cultivation technology on coniferous resources as a medium. Korea Forest Research Institute, Seoul, Korea. [in Korean]
- Ka KH, Kim HS, Hur TC, Park H, Jeon SM, Ryoo R, Jang YS. 2018. Analysis of Environment and production of *Tricholoma matsutake* in Matsutake-infected Pine Trees. *The Korean Journal of Mycology* 46:34-42. [in Korean]
- Ka KH, Koo CD. 2002. Research questions for artificial cultivation of *Tricholoma matsutake*. *Trends in Agriculture & Life Science* 2:1-6. [in Korean]
- KFS (Korea Forest Service). 2019. 2019 Statistical yearbook of forestry. KFS, Daejeon, Korea. [in Korean]
- Kim JY, Kim J, Cha IT, Jung MY, Song HS, Kim YB, Lee C, Kang SY, Bae JW, Choi YE, Kim TW, Roh SW. 2019. Community structures and genomic features of undesirable white colony-forming yeasts on fermented vegetables. *Journal of Microbiology* 57:30-37.

- Kim MA, Yoon HJ, Kim YE, Kim YJ, Kong WS, Kim JG. 2014. Comparative analysis of bacterial diversity and communities inhabiting the fairy ring of *Tricholoma matsutake* by barcoded pyrosequencing. *Journal of Applied Microbiology* 117:699-710.
- Kim MA, Yoon HJ, You YH, Kim YE, Woo JR, Seo YG, Lee GM, Kim YJ, Kong WS, Kim JG. 2013. Metagenomic analysis of fungal communities inhabiting the fairy ring zone of *Tricholoma matsutake*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:1347-1356.
- Li Q, Li X, Chen C, Li S, Huang W, Xiong C, Jin X, Zheng L. 2015. Analysis of bacterial diversity and communities associated with *Tricholoma matsutake* fruiting bodies by barcoded pyrosequencing in sichuan province, southwest china. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:89-98.
- Masuhara K. 1992. Growth of pine saplings to be infected by *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. *Bulletin of the Hiroshima Prefectural Forestry Experiment Station (Japan)* 26:45-61. [in Japanese]
- Ma Y, Ma S, Chang L, Wang H, Ga Q, Ma L, Bai Z, Shen Y, Ge RL. 2019. Gut microbiota adaptation to high altitude in indigenous animals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 516:120-126.
- Na HJ. 2003. Design of digital monitoring system for *T. matsutake* habitat atmosphere. Master dissertation, Chonnam national Univ., Gwangju, Korea. [in Korean]
- O'Carroll MR, Kidd TJ, Coulter C, Smith HV, Rose BR, Harbour C, Bell SC. 2003. *Burkholderia pseudomallei*: Another emerging pathogen in cystic fibrosis. *Thorax* 58:1087-1091.
- Ogawa M. 1991. *Biology of matsutake mushroom*. 2nd edit. Tsukiji Shokan Co., Tokyo, Japan. [in Japanese]
- Ogawa M, Ito I. 1989. Is it possible to cultivate matsutake. Sou Shin, Tokyo, Japan. [in Japanese]
- Oh SY, Fong JJ, Park MS, Lim YW. 2016. Distinctive feature of microbial communities and bacterial functional profiles in *Tricholoma matsutake* dominant soil. *PLoS ONE* 11:1-18.
- Oh SY, Kim MS, Eimes JA, Lim YW. 2018. Effect of fruiting body bacteria on the growth of *Tricholoma matsutake* and its related molds. *PLoS ONE* 13:1-15.
- Oh SY, Lim YW. 2018a. Effect of fairy ring bacteria on the growth of *Tricholoma matsutake* *in vitro* culture. *Mycorrhiza* 28:411-419.
- Oh SY, Lim YW. 2018b. Root-associated bacteria influencing mycelial growth of *Tricholoma matsutake* (pine mushroom). *Journal of Microbiology* 56:399-407.
- Pent M, Põldmaa K, Bahram M. 2017. Bacterial communities in boreal forest mushrooms are shaped both by soil parameters and host identity. *Frontiers in Microbiology* 8:1-13.
- Raine PB, Brodey CL, Johnstone K. 1991. Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:57-70.
- Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. 2005. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171:1209-1223.
- Shim KM, Ko CS, Lee YS, Kim GY, Lee JT, Kim SJ. 2007. Correlation coefficients between pine mushroom emergence and meteorological elements in Yangyang County, Korea. *Korean Journal of Agricultural and Forest Meteorology* 9:188-194. [in Korean]
- Stoyanova M. 2014. *Pseudomonas fluorescens*-a primary and secondary pathogen of bulbous plants. *Science & Technologies* 4:51-55.
- Suárez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG, Mendonça-Previato L, James EK, Venturi V. 2012. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. *Microbial Ecology* 63:249-266.
- Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DLE, Nalin R, Dore J, Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology* 11:2574-2584.
- Ura H, Furuya N, Iiyama K, Hidaka M, Tsuchiya K, Matsuyama N. 2006. *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. *Journal of General Plant Pathology* 72:98-103.
- Vaario LM, Fritze H, Spetz P, Heinonsalo J, Hanajik P. 2011. *Tricholoma matsutake* dominates diverse microbial communities in different forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* 77:8523-8531.

- van Gevelt T. 2014. Community-based management of *Tricholoma matsutake* (S. Ito and S. Imai) Singer: A case study of South Korean mountain villages. *International Journal of the Commons* 8:134-154.
- Wang Y, Zhang C, Li S. 2017. *Tricholoma matsutake*: An edible mycorrhizal mushroom of high socioeconomic relevance in China. *Revista Mexicana de Micología* 46:55-61.
- Xin XF, Kvitko B, He SY. 2018. *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 16:316-328.
- Yun W, Hall IR, Evans LA. 1997. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 1. *Tricholoma matsutake* and related fungi. *Economic Botany* 51:311-327.