

한국산 외생균근균의 배양 특성

전성민 · 가강현*

국립산림과학원 화학미생물과

Cultural Characteristics of Korean Ectomycorrhizal Fungi

Sung-Min Jeon and Kang-Hyeon Ka*

Division of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

ABSTRACT : Many ectomycorrhizal fungi provide delicious foods for humans as symbiotic fungi forming ectomycorrhizas on roots of trees. Korea Forest Research Institute (KFRI) is focused on studying the pure culture, conservation, and fundamental characteristics of ectomycorrhizal fungi as well as their artificial cultivation. In this review, we described the cultural characteristics of many ectomycorrhizal fungi that are preserved in the cold room of KFRI. The aim of this article is to provide basic information that will be useful in investigating good forest resources for any researchers who are interested in this topic.

KEYWORDS : Basic information, Cultural characteristics, Ectomycorrhizal fungi

서론

균근(mycorrhiza)이란 살아있는 식물의 뿌리에 비병원성 또는 약한 병원성 균류가 침입한 후 식물의 어린 뿌리와 균류의 균사가 상리공생 관계를 유지하면서 형성한 상호 연결체를 의미하며 'fungus roots'라고도 한다. 균사가 기주 식물의 세포 안으로는 침입해 들어가지 않고 세포 밖에서만 존재하는 균근의 한 유형을 '외생균근(外生菌根, ectomycorrhiza)'이라 하며 이러한 균근을 형성하는 균류를 '외생균근균(ectomycorrhizal fungi)'이라 한다. 외생균근균은 양분을 흡수하기 위해 기주 식물의 뿌리에 균투(fungal sheath), 세포간 균사(intercellular hyphae), 하티그 망(Hartig net)을 형성하는 특징을 갖고 있다[1]. 균사가 식물 뿌리의 표면을 감싸며 성장함으로써 형성된 두꺼

운 균사층을 '균투' 또는 'fungal mantle'이라 하며, 식물 세포와 세포 사이에만 침입하여 성장하는 균사를 '세포간 균사'라 한다. 또한 균사들이 표피와 피층 세포 사이 사이를 뚫고 들어가 성장하여 '하티그 망'이라는 일종의 균사망을 형성하는데 이는 외생균근에서 볼 수 있는 전형적인 구조물로 기주 식물과 균류 간 영양분을 교환하는 중요한 장소가 된다[1].

이와 같은 특성을 갖는 버섯 분류군에는 자낭균류(Ascomycetes)에 주발버섯목(Pezizales), 담자균류(Basidiomycetes)에 그물버섯목(Boletales), 썩리버섯과(Ramariaceae), 턱수염버섯과(Hydniaceae), 사마귀버섯목(Thelephorales), 광대버섯과(Amanitaceae), 피꼬리버섯과(Cantharellaceae), 끈적버섯과(Cortinariaceae), 외대버섯과(Entolomataceae), 무당버섯과(Russulaceae), 송이과(Tricholomataceae) 등이 있다[2]. 2013년 한국균학회에서 발간한 '한국의 버섯 목록'에는 1,901종의 버섯들이 기록되어 있다[3]. 이 중 식물의 뿌리에 외생균근을 만들어 자라는 균근성 버섯은 35% 정도이며 세계적으로는 5,000~6,000종 정도로 추정하고 있다[4].

외생균근균은 산림에서 식물의 성장을 촉진할 뿐만 아니라 인류에게 식품으로도 제공되기 때문에 매우 중요한 가치를 지니는 생물자원 중 하나이다. 또한 식용버섯이긴 하지만 그들의 자실체 또는 균사체로부터 약리 효과나 환경 개선에 도움이 될만한 다양한 물질들이 분리되고 그 기능이 규명되면서 또 다른 가치를 지닌 새로운 생물자원으로 인식되고 있다. 식용버섯으로 널리 알려진 썩리버섯(*Ram-*

Kor. J. Mycol. 2015 March, 43(1): 1-12
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.1.1>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

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

Received March 6, 2015
 Revised March 9, 2015
 Accepted March 10, 2015

©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.

*aria botrytis*의 자실체에서 새로운 세라마이드(ceramide) 성분이 분리되었으며 [5] 그 추출물 또한 결장암이나 간암 세포의 성장을 억제하는 효과가 있다고 보고되어 [6] 화장품 보습제나 항암제 원료로 이용이 기대된다. 식용버섯인 접시결겉이그물버섯(*Leccinum extremiorientale*) 역시 국내에서 채취한 버섯의 메탄올 추출물이 높은 피브리노 용해 활성(fibrinolytic activity)을 나타내는 것으로 보고되었다 [7]. 이와 같이 외생균근균 중의 일부는 생물자원으로 충분히 활용 가치가 있다고 판단되지만 살아있는 식물과 공생하며 버섯을 발생시키는 균류의 특성상 인공재배는 매우 어려운 것으로 보고 있다. 물론 드물긴 하지만 균근성 버섯임에도 불구하고 상업적인 외생균근균의 인공재배에 성공한 버섯이 있으며, *Terfezia clavaryi*, *Tuber melanosporum*, *Tuber uncinatum*, 대리석덩이버섯(*Tuber borchii*), 붉은젓버섯(*Lactarius deliciosus*), 땅지만가닥버섯(*Lyophyllum shimeji*), 붉은알버섯(*Rhizopogon rubescens*), 젓비단그물버섯(*Suillus granulatus*) 등 여덟 종류가 해당된다 [8]. 따라서 이외의 많은 종류의 외생균근균들은 자연 채취에 의존하지 않으면 쉽게 얻을 수 없는 자원이기도 하다.

인공재배가 어려워 버섯이 발생하는 시기에만 산림에 직접 가서 채취해야만 하는 시기적 제한성 때문에 이들의 가격은 대체로 비싼 편이다. 세계적으로 상업적인 가치가 있는 외생균근균들은 수십 억분의 시장규모를 갖고 있으며 [9] 이에 대표적인 버섯으로는 그물버섯(*Boletus edulis*), 피꼬리버섯(*Cantharellus cibarius*), 송이(*Tricholoma matsutake*), 검은덩이버섯(*Tuber indicum*), 흰덩이버섯(*Tuber magnatum*) 등이 있다 [8]. Mortimer 등 [10]은 아시아 지역에서 상업적으로 중요한 10가지 버섯들을 소개하였는데, 이 중 외생균근균은 그물버섯, 곰보버섯류인 *Morchella conica*, 그물버섯류인 *Phlebopus portentosus*, 사마귀버섯류인 *Thelephora ganbajun*, 송이, 검은덩이버섯 등 6종에 달한다. 우리나라에서 상업적으로 중요하게 여겨지는 외생균근균은 송이, 향버섯(*Sarcodon aspratus*), 짜리버섯, 다색벚꽃버섯(*Hygrophorus russula*), 피꼬리버섯, 까치버섯(*Polyozellus multiplex*) 등이다. 외생균근균 중 비단그물버섯(*Suillus luteus*)은 캐나다에서 상업적으로 중요한 야생버섯으로 취급되고 있으며 [11] 스페인, 프랑스, 이탈리아와 같은 국제적인 시장에서도 상업적으로 거래되어 경제적인 가치를 인정받고 있는 중요한 버섯 중 하나이다 [12]. 이와 같은 종류의 외생균근균이 고가의 비목재 임산물로 취급되어 산촌 농가 수익에 기여한 면도 있으나 인공재배가 되지 않는다는 희소성과 가격이 비싸다는 이유로 보다 많은 이들이 이러한 자원의 혜택을 누리지 못하고 있다.

외생균근성 균류들은 기주가 되는 수목이나 식물들의 뿌리와 긴밀한 공생관계를 이루며 살아가기 때문에 이들 식물의 천이에 따라 균근성 버섯의 서식처가 직접적으로 영향을 받을 수 있다. 특히 기후 변화는 산림 내 식생뿐만 아니라 균근성 버섯 발생에도 큰 영향을 미치는 것으로 알려

져 있다 [13]. 외생균근균은 수목과 공생하는 특성 때문에 부후균보다 실험실 내 인공배지에서 배양하면 순수분리가 잘 되지 않거나 균 분리가 성공해도 부후균보다 생장이 느리고 계대배양을 하는 과정 동안 활성을 잃어 생존하지 못하는 경우가 있다. 그래서 여러 가지 방법을 이용하여 외생균근균의 균주를 보존하려 시도하고 있으나 그 생명력을 지속적으로 유지하는 데에는 아직까지 많은 어려움이 있다 [14].

국립산림과학원에서는 산림에 비목재 임산물로써 상업적으로 중요한 버섯류에 대한 연구 활동을 지속해 왔다. 특히 자원 정보 검색이나 균주 분양과 같은 산림미생물 서비스 기반을 구축할 뿐만 아니라 산림미생물 관련 연구와 산업을 활성화하기 위한 목적으로 타 연구기관과 연동할 수 있는 종합적인 정보 네트워크를 마련하고 있다. 이의 일환으로 2010년부터는 산림미생물 유전자원의 수집, 증식, 보존 기술 개발에 관한 연구를 시작하였으며, 나무의 뿌리에 공생하는 다양한 균류들 중 특히 버섯을 만드는 외생균근균에 중점을 두어 연구를 진행하고 있다.

본 총설에서는 국립산림과학원에 보존되어 있는 다양한 외생균근균 자원의 2010~2015년 최근까지 수행한 기초적인 배양특성을 조사한 결과를 소개하고자 한다. 아울러 여기에 소개된 내용들은 다른 연구자들이 균근성 버섯을 연구하고자 할 때 기본 정보로 활용하기를 기대한다.

배양특성 조사항목

국립산림과학원은 우리나라 산림에 분포하는 외생균근균의 수집과 순수배양체의 분리, 군사 생장 특성과 효소 활성에 관한 균류의 기초적인 배양 특성을 조사하고 있다 [15, 16]. 본 총설은 배지의 종류, 온도의 변화, pH의 변화 및 질소원의 종류에 따른 외생균근균의 배양 특성을 조사한 것으로 다음과 같은 방법을 이용하여 각 균주별로 균 생장력을 측정하였다. 외생균근균의 군사 생장이 가능한 기본 배지와 군사 생장에 가장 적합한 고체배지를 알기 위해 네 종류의 배지를 준비하였다. 상용 가능한 세 종류의 배지 즉 potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA), Sabouraud dextrose agar (SDA)는 제조사(Difco, Detroit, MI, USA)의 권장 방법에 따라 제조하였다 [17, 18]. 또 다른 종류의 배지는 비상용 배지로, 반합성 배지인 modified Melin-Norkrans (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% FeCl₃ 1.2 mL, thiamine-HCl 0.0001 g, agar 15 g per 1L)를 제조하여 사용하였다 [15, 17]. 각 시험 배지는 121°C에서 20분간 고압증기멸균한 후 멸균 petri dish (bottom 85 × height 15 mm)에 25 mL씩 분주하여 응고시켰다. Cork borer를 이용하여 고체배지에서 미리 배양한 각 시험 균주의 균총 선단부를 직경 6 mm의 크기로 취한 후 각 시험 배지의 중앙에 1개씩 접종하고, 25°C 항온 배양기에서 암배양하였다. 또한 외생균근균의

균사 생장이 가능한 온도 범위와 균사 생장에 가장 적합한 온도를 찾기 위해 PDA를 기본 배지로 하여 각각의 시험균을 접종하고, 다섯 종류의 온도 조건(10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C)에서 암배양하였다. 대부분의 외생균근균은 고체배지 상에서 생장이 매우 느리기 때문에 배지와 온도별 균사 성장 특성은 배양 60일 후 조사하였다[17]. 단, 곰보버섯(*Morchella esculenta*) 네 개 균주는 예비 실험을 통해 고체배지에서 균사 생장이 매우 빠른 특성이 관찰되어 60일이 아닌 5일간 배양한 후 조사하였다. 디지털 버어니어 캘리퍼스를 이용하여 접종원의 직경을 제외한 균총의 크기를 mm 단위로 측정 후 배양 조건에 따른 균 성장력을 비교하였다.

배지의 pH 변화에 따른 균 성장력과 최적 성장 pH를 조사하기 위해 제조사(Difco)의 권장 방법에 따라 potato dextrose broth (PDB)를 제조한 후 여기에 1M HCl 또는 1M NaOH 등을 가하여 시험배지의 최종 pH가 4, 5, 6, 7, 8이 되도록 하였다[17]. 다섯 종류의 시험배지를 유리 삼각플라스크에 20 mL씩 분주한 후 121°C에서 20분간 고압 증기멸균한 다음 상온에서 냉각시켰다. 시험배지가 들어 있는 삼각플라스크 한 개당 시험균(직경 6 mm)을 한 개씩 접종하고, 25±2°C에서 정치 상태로 암배양하였다. 곰보버섯을 포함한 모든 균주는 60일간 배양하였다. 균 성장력을 조사하기 위해 정성 원형 여과지(직경 110 mm, No.5A; Advantec, Tokyo, Japan)에 60일 배양체를 부어 균사체만을 회수한 후 균사체가 함유된 여과지를 70°C 건조기에 넣어 2일간 건조하였다. 삼각 플라스크 한 개에서 성장한 균사체의 건중량을 측정하여 mg/flask 단위로 기록한 후 배양 조건에 따른 균 성장력을 비교하였다. 외생균근균의 균사 생장에 무기 질소원이 끼치는 영향을 알기 위해 MMN 배지[19]의 일부 조성을 변경한 두 종류의 MMN 변형 액체배지 M1과 M2를 제조하였다. M1 배지(glucose 10 g, NH₄Cl 0.25 g, CaCl₂ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.15 g, NaCl 0.025 g, 1% FeCl₃ 1.2 mL per 1 L)는 MMN 배지 내 무기 질소원을 암모늄 형태의 NH₄Cl로 대체한 것이고, M2 배지(glucose 10 g, KNO₃ 0.25 g, CaCl₂ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.15 g, NaCl 0.025 g, 1% FeCl₃ 1.2 mL per 1L)는 MMN 배지 내 무기 질소원을 질산염 형태의 KNO₃로 대체한 것이다[20]. M1과 M2배지의 pH를 5.5로 조정 후, 유리 삼각플라스크에 20 mL씩 분주하였다. 배지의 멸균, 접종, 배양 방법, 균사체 회수와 건중량 측정 방법 등은 앞선 pH별 균사성장 특성 조사에서와 동일한 방법으로 하였다. 단, 곰보버섯을 포함한 모든 균주들은 56일간 배양하였으며 M1과 M2 배지에서 각각 성장한 균사체의 건중량(mg/flask)을 비교하여 질소원 선호도를 조사하였다(*t*-test, *p* < 0.05, *n* = 3). 또한 두 종류의 질소원에 대한 선호도 차이를 조사하기 위해 각 배지에서 평균 건중량을 토대로 M1/M2 ratio를 산출하였다.

배지별 성장특성 조사

산림에서 수집한 외생균근균을 순수분리하거나 영양세포 증균에 필요한 접종원으로 사용하기 위해서는 주로 고체배지에서 배양을 하며 천연배지, 합성배지 또는 반합성배지를 사용하여 배양한다. 이 중 합성배지는 다른 종류의 배지에 비해 균이 느리게 성장하는 경향이 있어 일반적으로 합성배지보다는 반합성배지 즉, 합성배지 성분에 화학적 조성이 밝혀지지 않은 천연물질을 첨가하여 만든 배지 사용을 선호하고 있다[15]. 특히 대부분의 외생균근균들은 반합성 배지인 MMN 배지에서 배양하는 경우가 많다[15, 19, 20]. 그러나 균종 또는 균주마다 선호하는 영양원의 종류가 다르고, 수집한 모든 균주가 이 배지에서 성장한다고 볼 수는 없기 때문에 그들의 균사체가 성장 가능한 기본 배지를 찾아야 한다. 외생균근균을 비롯한 모든 생물체 영양세포 생성에는 탄소원과 질소원이 중요한 역할을 하는데 일반적으로 대부분의 균류들은 다당류보다는 단당류를 선호하는 경향이 있어 외생균근균의 배양 시 glucose를 가장 널리 사용하고 있다[15]. 그러나 일부 외생균근성 균류들은 mannose와 같은 또 다른 화학구조의 단당류나 pectin이나 dextrin 같은 다당류를 이용하는 경우도 있다. 또한 감자나 전분과 같은 복합 탄수화물을 탄소원으로 배지에 첨가할 수도 있는데, Harvey [21]는 이와 같은 복합 탄수화물에 소량(0.1 g/L)의 glucose를 첨가하게 되면 균의 적응 효소(adaptive enzyme) 생산이 자극되어 탄소원 이용률을 크게 강화할 수 있다고 하였다. Glucose와 starch는 고체 배양뿐만 아니라 액체 배양 시에도 송이나 향버섯의 균사 생장을 위한 최적 탄소원인 것으로 보고되었다[22,23].

외생균근균이 성장할 수 있는 배지의 종류를 알기 위해 균 성장력을 조사한 결과 대부분의 외생균근균들은 MEA나 SDA 배지에서보다 PDA나 MMN 배지에서 생장이 우수하였다. MEA 배지에서는 많은 균주들이 아예 성장하지 못하거나 성장력이 미약했다(Table 1, Table 2). MEA 배지에서 전혀 성장하지 못한 외생균근균으로는 송이, 가송이(*Tricholoma bakamatsutake*), 활미송이(*Tricholoma saponaceum*), 땅송이(*Tricholoma terreum* KFR1 1268) 등 송이과에 속하는 균주들과 싸리버섯속(*Ramaria* sp.)에 속하는 대부분의 균주들 그리고 기타 애광대버섯(*Amanita citrina* KFR1 1666, 2011), 붉은점박이광대버섯(*A. rubescens* KFR1 1660, 2374), 일본연지그물버섯(*Heimioporus japonicus*), 다색뿔꽃버섯, 접시겉겉이그물버섯, 노란젓버섯(*Lactarius chrysorrheus*), 젓버섯아재비(*Lactarius hatsudake*), *Lactarius laeticolorus*, 제주쓴맛그물버섯(*Tylopilus neofelleus*), 당귀젓버섯(*Lactarius subzonarius* KFR1 1633) 등이다. 연기싸리버섯(*Ramaria fumigata* KFR1 2367, 2368)은 MMN 배지에서만 성장하는 특성이 있어 총 151개의 시험 균주들 중 균사 생장이 가능한 배지의 범위가 가장 좁았다. 이와 달리 광대버섯과에 속하는 *Amanita ibotengutake* KFR1 1170, 1189와 파리버섯(*Amanita melliceps* KFR1 581, 1180), 그

Table 1. Optimal conditions for mycelial growth of ectomycorrhizal fungi on medium, temperature, pH, and nitrogen sources

Family name	Scientific name	KFRI strain no.	Optimal culture condition			Effect of inorganic nitrogen source ⁴⁾				
			Medium ¹⁾	Temperature (°C) ²⁾	pH ³⁾	Dry weight of mycelium (mg/ flask/56 days)		M1/M2 ratio	Preference for nitrogen source	
						M1	M2		M1	M2
Albatrellaceae	<i>Albatrellus confluens</i>	837	PDA, MMN	20~25	4	35.3 ± 1.2	13.7 ± 0.4	2.6	●	
Amanitaceae	<i>Amanita abrupta</i>	2012	PDA, MMN	25	5, 6	28.4 ± 2.3	22.2 ± 1.3	1.3	●	
	<i>Amanita citrina</i>	1648	PDA, SDA	20	6, 7	32.7 ± 0.7	31.4 ± 0.3	1.0	●	
	<i>A. citrina</i>	1666	PDA	25	6	14.1 ± 0.5	18.7 ± 0.7	0.8		●
	<i>A. citrina</i>	2011	PDA, MMN	20~25	5	-	-			
	<i>Amanita cokei</i> f. <i>reseotinta</i>	1974	PDA	20~25	-	36.7 ± 0.9	15.5 ± 0.6	2.4	●	
	<i>Amanita hemibapha</i>	1674	MMN	25	5	40.5 ± 1.6	34.9 ± 1.7	1.2	●	
	<i>Amanita ibotengutake</i>	1170	PDA, MMN	25	-	41.0 ± 0.4	54.2 ± 0.6	0.8		●
	<i>A. ibotengutake</i>	1189	PDA, MMN	20~25	5, 6	39.1 ± 1.1	20.9 ± 0.7	1.9	●	
	<i>Amanita javanica</i>	1267	PDA	20~30	4, 5	49.1 ± 4.9	38.9 ± 2.6	1.3	●	
	<i>Amanita melleiceps</i>	581	MMN	25	4	-	-			
	<i>A. melleiceps</i>	1180	MMN	30	5	23.1 ± 0.3	24.0 ± 0.4	1.0		●
	<i>Amanita pantherina</i>	1567	MMN	20~25	4	25.9 ± 1.0	23.2 ± 0.7	1.1	●	
	<i>Amanita pseudoporphyria</i>	1483	PDA	25	6	53.2 ± 2.0	42.4 ± 2.8	1.3	●	
	<i>A. pseudoporphyria</i>	2013	MMN	25	6	12.8 ± 0.3	13.4 ± 0.1	1.0		●
	<i>A. pseudoporphyria</i>	2396	PDA	25~30	-	-	-			
	<i>Amanita rubescens</i>	1187	PDA, MMN	25	4, 5	61.7 ± 6.1	32.5 ± 1.9	1.9	●	
	<i>A. rubescens</i>	1660	MMN	20	5	14.9 ± 0.5	11.3 ± 0.6	1.3	●	
	<i>A. rubescens</i>	2374	PDA	25	-	-	-			
	<i>Amanita</i> sp.	1220	SDA	20~25	-	40.9 ± 5.0	29.1 ± 1.9	1.4	●	
	<i>Amanita</i> sp.	1457	PDA	25	-	35.2 ± 0.6	34.1 ± 1.7	1.0	●	●
<i>Amanita subjunquillea</i>	1023	MMN	25	5	-	-				
<i>Amanita verna</i>	1675	PDA, MMN	25	4	25.0 ± 0.2	23.7 ± 0.2	1.1	●		
<i>Amanita volvata</i>	2014	PDA	25~30	7	30.3 ± 0.8	27.5 ± 0.4	1.1	●		
Bankeraceae	<i>Sarcodon aspratus</i>	1676	PDA, SDA	20~25	-	21.7 ± 0.7	30.9 ± 1.0	0.7		●
	<i>S. aspratus</i>	1677	PDA	25	5	28.2 ± 0.8	24.4 ± 0.4	1.2	●	
	<i>S. aspratus</i>	2031	PDA	25	-	-	-			
	<i>S. aspratus</i>	2372	PDA	25	5	24.0 ± 0.9	18.4 ± 1.0	1.3	●	
Boletaceae	<i>Austroboletus gracilis</i>	2139	PDA, MMN	25	5	35.6 ± 0.5	28.7 ± 0.5	1.2	●	
	<i>Aureoboletus thibetanus</i>	2341	PDA	25	7	-	-			
	<i>Boletellus elatus</i>	2177	MMN	25	-	16.2 ± 0.2	17.6 ± 0.2	0.9		●
	<i>B. elatus</i>	2282	MMN	25	-	-	-			
	<i>Boletus edulis</i>	1191	MMN	25	8	27.2 ± 1.1	25.7 ± 0.3	1.1	●	●
	<i>Boletus griseus</i> var. <i>fuscus</i>	1362	PDA	20~25	4	54.1 ± 2.6	21.7 ± 0.6	2.5	●	
	<i>B. griseus</i> var. <i>fuscus</i>	2382	PDA, MMN	25	4	-	-			
	<i>Boletus laetissimus</i>	1489	MMN	20~25	6	21.0 ± 0.4	22.9 ± 0.8	0.9		●
	<i>Boletus obscureumbrinus</i>	2234	PDA	25	4, 5, 6	35.5 ± 0.6	31.6 ± 0.4	1.1	●	
	<i>Boletus pseudocalopus</i>	1973	PDA	25	4, 5, 6	20.0 ± 0.8	20.6 ± 0.9	1.0	●	●
	<i>B. pseudocalopus</i>	2107	PDA, MMN	25	5, 6	58.2 ± 3.7	37.2 ± 0.2	1.6	●	
	<i>Boletus</i> sp.	1371	PDA	20~25	-	31.0 ± 1.5	32.3 ± 0.3	1.0	●	●

Table 1. Optimal conditions for mycelial growth of ectomycorrhizal fungi on medium, temperature, pH, and nitrogen sources (continued)

Family name	Scientific name	KFRI strain no.	Optimal culture condition			Effect of inorganic nitrogen source ⁴⁾				
			Medium ¹⁾	Temperature (°C) ²⁾	pH ³⁾	Dry weight of mycelium (mg/ flask/56 days)		M1/M2 ratio	Preference for nitrogen source	
						M1	M2		M1	M2
	<i>Boletus</i> sp.	1462	MMN	25	8	23.9 ± 0.2	24.5 ± 0.6	1.0	●	●
	<i>Boletus umbriniporus</i>	2231	PDA	25	5	36.3 ± 0.4	31.5 ± 0.9	1.2	●	
	<i>Boletus violaceofuscus</i>	1162	MMN	25	7	42.4 ± 3.0	42.4 ± 2.0	1.0	●	●
	<i>B. violaceofuscus</i>	1976	MMN	25	4	-	-			
	<i>Heimioporus japonicus</i>	1224	MMN	25	7, 8	21.2 ± 2.6	19.6 ± 0.2	1.1	●	●
	<i>H. japonicus</i>	1225	MMN	20~25	6	23.1 ± 2.0	18.4 ± 0.2	1.3	●	
	<i>H. japonicus</i>	1482	PDA, MMN	25	-	37.7 ± 1.4	27.5 ± 0.5	1.4	●	
	<i>Leccinum extremiorientale</i>	1194	MMN	25	4	56.2 ± 1.1	32.8 ± 0.8	1.7	●	
	<i>L. extremiorientale</i>	1195	MMN	25	5	39.2 ± 1.6	25.7 ± 0.4	1.5	●	
	<i>Retiboletus ornatipes</i>	1400	PDA	25	5	-	-			
	<i>R. ornatipes</i>	1485	PDA	20~25	4	19.7 ± 4.3	18.3 ± 0.8	1.1	●	●
	<i>Strobilomyces strobilaceus</i>	2333	MMN	25	5	29.7 ± 0.2	27.0 ± 0.3	1.1	●	
	<i>Tylophilus alboater</i>	2241	PDA	25	-	25.7 ± 1.4	24.0 ± 0.4	1.1	●	●
	<i>Tylophilus castaneiceps</i>	1383	MMN	20	5, 6, 7	15.2 ± 1.3	18.2 ± 0.4	0.8		●
	<i>T. castaneiceps</i>	1484	MMN	20	4	29.8 ± 1.9	23.9 ± 1.6	1.2	●	
	<i>Tylophilus chromapes</i>	1373	PDA, MMN	20~30	-	40.6 ± 1.1	35.4 ± 0.9	1.1	●	
	<i>Tylophilus neofelleus</i>	1401	PDA, MMN	20~25	5	44.1 ± 2.1	24.2 ± 0.8	1.8	●	
	<i>T. neofelleus</i>	1480	PDA, SDA, MMN	20~25	4, 5	49.0 ± 1.1	41.7 ± 2.9	1.2	●	
	<i>T. neofelleus</i>	1481	PDA	25	4, 5	40.8 ± 0.6	31.8 ± 1.0	1.3	●	
	<i>T. neofelleus</i>	1631	PDA	25	6, 7	34.4 ± 1.3	22.1 ± 0.9	1.6	●	
	<i>Tylophilus nigerrimus</i>	1190	PDA	25	5, 6	-	-			
	<i>Tylophilus valens</i>	2267	MMN	20~25	4	24.0 ± 0.5	26.3 ± 0.9	0.9		●
	<i>Tylophilus virens</i>	1402	MMN	25	4, 5	24.8 ± 0.2	23.1 ± 0.3	1.1	●	
	<i>Xanthoconium affine</i>	1421	MMN	25	4, 5, 6, 7, 8	28.9 ± 2.3	34.3 ± 1.3	0.8		●
	<i>X. affine</i>	2247	MMN	25	6	17.9 ± 0.1	16.4 ± 0.5	1.1	●	
	<i>Xerocomellus rubellus</i>	1828	MMN	20-25	6	22.1 ± 1.0	26.8 ± 1.2	0.8		●
	<i>Xerocomus subtomentosus</i>	2394	PDA	20-25	5, 6	-	-			
Cantharellaceae	<i>Cantharellus</i> sp.	2033	PDA	25	8	27.8 ± 0.7	29.2 ± 0.3	1.0		●
Cortinariaceae	<i>Cortinarius elatior</i>	1995	PDA	20~25	-	14.2 ± 0.7	14.7 ± 0.7	1.0	●	●
Entolomaceae	<i>Entoloma cyanonigrum</i>	1343	PDA	20~25	6	27.6 ± 0.5	32.4 ± 1.5	0.9		●
	<i>E. cyanonigrum</i>	1407	PDA	20~25	6	27.9 ± 0.7	23.2 ± 0.5	1.2	●	
	<i>Entoloma</i> sp.	1575	PDA, SDA	10~25	-	35.8 ± 0.4	71.8 ± 5.2	0.5		●
	<i>Entoloma</i> sp.	1839	SDA	20	5	23.9 ± 1.4	55.9 ± 2.3	0.4		●
Gomphaceae	<i>Ramaria apiculata</i>	2138	MMN	15	-	-	-			
	<i>Ramaria botrytis</i>	1018	PDA	20	4	20.0 ± 1.0	15.7 ± 1.1	1.3	●	
	<i>Ramaria fumigata</i>	2367	MMN	ND	4, 5	13.3 ± 0.3	13.1 ± 0.3	1.0	●	●
	<i>R. fumigata</i>	2368	MMN	20	5, 6	-	-			
	<i>R. fumigata</i>	2371	MMN	15	-	19.9 ± 0.3	23.3 ± 5.4	0.9	●	●

Table 1. Optimal conditions for mycelial growth of ectomycorrhizal fungi on medium, temperature, pH, and nitrogen sources (continued)

Family name	Scientific name	KFRI strain no.	Optimal culture condition			Effect of inorganic nitrogen source ⁴⁾				
			Medium ¹⁾	Temperature (°C) ²⁾	pH ³⁾	Dry weight of mycelium (mg/ flask/56 days)		M1/M2 ratio	Preference for nitrogen source	
						M1	M2		M1	M2
Hygrophoraceae	<i>Ramaria</i> sp.	1670	MMN	20~25	4	27.5 ± 0.4	19.4 ± 1.0	1.4	●	
	<i>Ramaria</i> sp.	1679	MMN	20~25	4	23.5 ± 0.3	18.5 ± 0.6	1.3	●	
	<i>Ramaria</i> sp.	1680	MMN	20~25	4, 5, 6	30.7 ± 0.8	26.7 ± 0.4	1.1	●	
	<i>Ramaria</i> sp.	1825	PDA, MMN	25	5	31.2 ± 0.6	18.2 ± 0.6	1.7	●	
	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	1824	MMN	20~25	7, 8	51.0 ± 3.3	16.6 ± 0.2	3.1	●	
	<i>Hygrophorus russula</i>	818	PDA, SDA, MMN	20~25	-	22.7 ± 2.0	13.7 ± 2.1	1.7	●	
	<i>H. russula</i>	1022	PDA	25	5, 6	34.6 ± 0.2	40.0 ± 2.5	0.9		●
	<i>H. russula</i>	1487	PDA	20~25	5, 6, 7	27.8 ± 1.7	19.4 ± 1.4	1.4	●	
	<i>H. russula</i>	1488	SDA	20~25	5	18.1 ± 1.4	20.2 ± 0.4	0.9	●	●
	<i>H. russula</i>	1987	SDA	25	5	13.7 ± 0.1	13.5 ± 0.1	1.0	●	●
Morchellaceae	<i>Morchella esculenta</i>	2066	PDA, SDA	20~25	6, 7	24.3 ± 0.9	46.3 ± 0.5	0.5		●
	<i>M. esculenta</i>	2074	PDA	25	8	21.2 ± 0.3	27.1 ± 1.4	0.8		●
	<i>M. esculenta</i>	2075	PDA, SDA	20~30	5, 6, 7, 8	33.4 ± 1.2	64.4 ± 4.2	0.5		●
	<i>M. esculenta</i>	2078	PDA	20~30	5	27.0 ± 0.4	74.0 ± 3.3	0.4		●
Rhizopogonaceae	<i>Rhizopogon</i> sp.	1425	PDA, SDA	15~30	4	54.5 ± 3.1	54.5 ± 2.3	1.0	●	●
	<i>Rhizopogon</i> sp.	1440	PDA	20	7	39.4 ± 0.8	37.7 ± 2.0	1.0	●	●
	<i>Rhizopogon</i> sp.	1579	PDA, SDA	20~25	4	33.0 ± 0.6	40.4 ± 1.6	0.8		●
Russulaceae	<i>Lactarius akahatsu</i>	1020	PDA	20~25	-	29.9 ± 1.7	33.9 ± 0.5	0.9		●
	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	1245	PDA, SDA	20~25	5	32.5 ± 1.9	26.4 ± 0.4	1.2	●	
	<i>L. chrysorrheus</i>	2402	PDA, SDA, MMN	20~25	-	-	-			
	<i>Lactarius hatsudake</i>	1164	PDA	20~25	4, 5, 6, 7	21.4 ± 0.8	21.4 ± 0.2	1.0	●	●
	<i>L. hatsudake</i>	1682	PDA	20~25	5, 6, 7	40.8 ± 2.7	45.4 ± 0.5	0.9		●
	<i>L. hatsudake</i>	1993	PDA	25	4, 5	25.5 ± 0.8	24.6 ± 0.3	1.0	●	●
	<i>Lactarius laeticolorus</i>	928	PDA	25	4, 5, 6	26.9 ± 0.6	25.1 ± 0.3	1.1	●	
	<i>L. laeticolorus</i>	929	PDA	20	-	37.2 ± 0.6	46.2 ± 2.5	0.8		●
	<i>L. laeticolorus</i>	2242	PDA	25	-	21.3 ± 0.7	20.9 ± 2.3	1.0	●	●
	<i>Lactarius scrobiculatus</i>	1486	PDA, MMN	25	6	38.3 ± 0.7	26.4 ± 1.1	1.5	●	
	<i>Lactarius</i> sp.	1380	PDA	20	7	38.1 ± 1.1	25.2 ± 0.4	1.5	●	
	<i>Lactarius subzonarius</i>	1633	MMN	25	4	22.2 ± 1.7	20.5 ± 0.7	1.1	●	●
	<i>Russula mariae</i>	1422	PDA	25	6, 7, 8	21.8 ± 0.7	17.6 ± 0.3	1.2	●	
Sclerodermaeae	<i>Pisolithus arhizus</i>	1198	PDA	30	4	38.1 ± 0.2	52.0 ± 3.1	0.7		●
	<i>P. arhizus</i>	1403	PDA	25	4, 5, 6, 7, 8	21.4 ± 1.6	33.8 ± 3.8	0.6		●
	<i>P. arhizus</i>	1960	PDA	30	-	45.5 ± 1.1	53.9 ± 1.3	0.8		●
Suillaceae	<i>Suillus bovinus</i>	1231	SDA	20~25	5	53.1 ± 2.8	37.8 ± 2.4	1.4	●	

Table 1. Optimal conditions for mycelial growth of ectomycorrhizal fungi on medium, temperature, pH, and nitrogen sources (continued)

Family name	Scientific name	KFRI strain no.	Optimal culture condition			Effect of inorganic nitrogen source ⁴⁾				
			Medium ¹⁾	Temperature (°C) ²⁾	pH ³⁾	Dry weight of mycelium (mg/ flask/56 days)		M1/M2 ratio	Preference for nitrogen source	
						M1	M2		M1	M2
	<i>S. bovinus</i>	1435	PDA, SDA	20~25	-	55.8 ± 2.2	60.7 ± 3.1	0.9	●	●
	<i>S. bovinus</i>	1657	PDA, SDA	20~25	-	28.8 ± 2.2	36.1 ± 2.5	0.8		●
	<i>S. bovinus</i>	1968	PDA, MMN	25	-	45.3 ± 0.6	24.1 ± 0.7	1.9	●	
	<i>Suillus cavipes</i>	1683	PDA, MMN	25	6, 7, 8	23.0 ± 0.7	19.7 ± 0.9	1.2	●	
	<i>S. cavipes</i>	1980	MMN	20~25	6	61.4 ± 7.6	20.2 ± 0.1	3.0	●	
	<i>Suillus granulatus</i>	1211	PDA	20~25	4	57.3 ± 0.4	22.7 ± 0.4	2.5	●	
	<i>S. granulatus</i>	1997	MMN	20~25	8	17.5 ± 0.5	15.6 ± 0.8	1.1	●	
	<i>S. granulatus</i>	2240	PDA	25	5, 6, 7, 8	52.2 ± 1.1	40.4 ± 1.9	1.3	●	
	<i>Suillus grevillei</i>	1123	PDA, SDA	25	5, 6	43.8 ± 1.7	48.3 ± 2.0	0.9		●
	<i>S. grevillei</i>	1124	PDA, SDA	20~25	4, 5, 6	26.5 ± 2.2	20.9 ± 1.1	1.3	●	
	<i>S. grevillei</i>	1233	PDA, SDA, MMN	20~25	-	47.4 ± 0.6	33.6 ± 0.7	1.4	●	
	<i>S. grevillei</i>	1284	PDA, SDA, MMN	20	4, 5, 6	32.2 ± 1.7	27.4 ± 0.6	1.2	●	
	<i>Suillus luteus</i>	1232	PDA, SDA	25	5	44.1 ± 0.6	60.7 ± 3.2	0.7		●
	<i>S. luteus</i>	1246	PDA, MMN	20~25	4	48.9 ± 2.5	38.5 ± 0.2	1.3	●	
	<i>S. luteus</i>	1458	SDA	20	4	14.0 ± 2.8	17.1 ± 2.3	0.8	●	●
	<i>S. luteus</i>	2270	PDA, SDA	20~25	-	45.1 ± 0.2	37.2 ± 2.6	1.2	●	
	<i>Suillus pictus</i>	2021	PDA	25	-	51.9 ± 2.7	24.5 ± 0.5	2.1	●	
	<i>S. pictus</i>	2238	MMN	25	7, 8	63.0 ± 1.4	29.5 ± 0.9	2.1	●	
	<i>S. pictus</i>	2339	MMN, SDA	20	5, 6	46.3 ± 0.7	31.1 ± 0.4	1.5	●	
	<i>Suillus viscidus</i>	1975	PDA, SDA, MMN	20~25	4	23.4 ± 0.3	26.9 ± 1.1	0.9		●
Therephora-ceae	<i>Polyozellus multiplex</i>	1678	PDA, MMN	20~25	4, 5, 6, 7	21.6 ± 0.3	21.3 ± 0.9	1.0	●	●
Tricholomata-ceae	<i>Tricholoma bakamatsutake</i>	1981	PDA, MMN	20~25	5	20.3 ± 0.5	18.8 ± 0.2	1.1	●	
	<i>T. bakamatsutake</i>	1982	PDA	25	-	28.3 ± 0.7	19.6 ± 1.0	1.4	●	
	<i>T. bakamatsutake</i>	2236	PDA, MMN	20~25	5	-	-			
	<i>T. bakamatsutake</i>	2237	PDA	25	5	30.9 ± 0.3	29.6 ± 0.2	1.0	●	
	<i>T. bakamatsutake</i>	2253	PDA	20~25	-	21.0 ± 1.3	20.6 ± 0.3	1.0	●	●
	<i>T. bakamatsutake</i>	2254	PDA	25	5	17.0 ± 0.6	17.4 ± 0.2	1.0	●	●
	<i>Tricholoma matsutake</i>	1013	PDA	20~25	4	44.0 ± 0.6	37.1 ± 0.7	1.2	●	
	<i>T. matsutake</i>	1014	PDA	25	4, 5	45.2 ± 0.7	30.1 ± 0.1	1.5	●	
	<i>T. matsutake</i>	1015	PDA	25	4, 5	35.8 ± 0.7	29.9 ± 1.1	1.2	●	
	<i>T. matsutake</i>	1017	PDA	20~25	4	28.2 ± 1.2	15.3 ± 0.2	1.8	●	
	<i>T. matsutake</i>	1265	PDA	25	-	54.8 ± 1.0	40.9 ± 1.8	1.3	●	
	<i>T. matsutake</i>	1266	PDA	20~25	4, 5, 6, 7	31.1 ± 1.3	22.2 ± 1.4	1.4	●	
	<i>T. matsutake</i>	1681	PDA	25	-	53.4 ± 0.6	37.4 ± 2.0	1.4	●	

Table 1. Optimal conditions for mycelial growth of ectomycorrhizal fungi on medium, temperature, pH, and nitrogen sources (continued)

Family name	Scientific name	KFRI strain no.	Optimal culture condition			Effect of inorganic nitrogen source ⁴⁾				
			Medium ¹⁾	Temperature (°C) ²⁾	pH ³⁾	Dry weight of mycelium (mg/ flask/56 days)		M1/M2 ratio	Preference for nitrogen source	
						M1	M2		M1	M2
	<i>Tricholoma muscarium</i>	1990	PDA, MMN	20~25	6, 7	37.8 ± 0.4	20.3 ± 0.1	1.9	●	
	<i>T. muscarium</i>	1991	MMN	25	7	41.9 ± 1.7	14.5 ± 0.8	2.9	●	
	<i>Tricholoma saponaceum</i>	1969	PDA	25	8	17.6 ± 0.5	18.6 ± 0.5	0.9	●	●
	<i>T. saponaceum</i>	1970	PDA	25	5	20.9 ± 0.3	26.0 ± 1.9	0.8		●
	<i>Tricholoma terreum</i>	1268	PDA	20~25	7, 8	20.5 ± 0.4	14.9 ± 1.6	1.4	●	

KFRI, Korea Forest Research Institute; M1, modified Melin-Norkrans liquid medium containing ammonium nitrogen; M2, modified Melin-Norkrans liquid medium containing nitrate nitrogen; MEA, malt extract agar; MMN, modified Melin-Norkrans agar; PDA, potato dextrose agar; SDA, Sabouraud dextrose agar.

¹⁻⁴⁾Refer to the current article or related references [15,17-20] for the detailed media composition and culture conditions. M1/M2 ratio was calculated from the ratio of average mycelial biomass of ectomycorrhizal fungi grown in two different media (M1 and M2). The preference (●) for nitrogen source was determined by comparing the biomass between M1 and M2 (*t*-test, *p* < 0.05, *n* = 3).

Table 2. Summarized characteristics for mycelial growth of ectomycorrhizal fungi on different culture media

Mycelial growth characteristics	Representative fungal strain
No growth on MEA	<i>Amanita citrina</i> (KFRI 1666, 2011), <i>Amanita rubescens</i> (KFRI 1660, 2374), <i>Heimioporus japonicus</i> , <i>Hygrophorus russula</i> , <i>Lactarius chrysorrheus</i> , <i>Lactarius hatsudake</i> , <i>Lactarius laeticolorus</i> , <i>Lactarius subzonarius</i> (KFRI 1633), <i>Leccinum extremiorientale</i> , <i>Ramaria botrytis</i> , <i>Ramaria fumigata</i> , <i>Ramaria</i> sp., <i>Tricholoma bakamatsutake</i> , <i>Tricholoma matsutake</i> , <i>Tricholoma saponaceum</i> , <i>Tricholoma terreum</i> , <i>Tylopilus neofelleus</i>
Growth on only one medium (MMN)	<i>R. fumigata</i> (KFRI 2367, 2368)
Growth on four media (PDA, MEA, SDA, MMN)	<i>Amanita ibotengutake</i> , <i>Amanita melleiceps</i> , <i>Boletus griseus</i> var. <i>fuscus</i> , <i>Entoloma cyanonigrum</i> , <i>Entoloma</i> sp., <i>Suillus cavipes</i> , <i>Suillus granulatus</i> , <i>Suillus grevillei</i> , <i>Suillus luteus</i> , <i>Pisolithus arhizus</i> , <i>Retiboletus ornatipes</i> , <i>Rhizopogon</i> sp., <i>Xanthoconium affine</i>
Optimal growth on PDA	<i>E. cyanonigrum</i> , <i>L. hatsudake</i> , <i>L. laeticolorus</i> , <i>P. arhizus</i> , <i>R. ornatipes</i> , <i>Sarcodon aspratus</i> , <i>T. bakamatsutake</i> , <i>T. matsutake</i> , <i>T. saponaceum</i> , <i>T. terreum</i>
Optimal growth on SDA	<i>Amanita</i> sp. (KFRI 1220), <i>Entoloma</i> sp. (KFRI 1839), <i>H. russula</i> (KFRI 1488, 1987), <i>Suillus bovinus</i> (KFRI 1231), <i>S. luteus</i> (KFRI 1458)
Optimal growth on MMN	<i>A. melleiceps</i> , <i>Boletellus elatus</i> , <i>Boletus violaceofuscus</i> , <i>H. japonicus</i> , <i>L. extremiorientale</i> , <i>R. fumigata</i> , <i>Ramaria</i> sp., <i>Tylopilus castaneiceps</i> , <i>X. affine</i>

KFRI, Korea Forest Research Institute; MEA, malt extract agar; MMN, modified Melin-Norkrans agar; PDA, potato dextrose agar; SDA, Sabouraud dextrose agar

물버섯과(Boletaceae)에 속하는 *Boletus griseus* var. *fuscus* KFRI 1362, 2382, 밤색망그물버섯(*Retiboletus ornatipes* KFRI 1400, 1485), 황금씨그물버섯(*Xanthoconium affine* KFRI 1421, 2247), 외대버섯과에 속하는 가지외대버섯(*Entoloma cyanonigrum* KFRI 1343, 1407)과 외대버섯속(*Entoloma* sp. KFRI 1575, 1839), 비단그물버섯과(Suilla-ceae)에 속하는 황금비단그물버섯(*Suillus cavipes*), 짓비단그물버섯, 큰비단그물버섯(*Suillus grevillei*), 비단그물버섯, 그리고 모래발버섯(*Pisolithus arhizus*), 알버섯속(*Rhizopogon* sp.) 등에 속하는 균주들은 배지의 종류에 따라 균 생장력에 차이는 있지만 네 종류의 배지 모두에서 성장하였다.

외생균근균의 균사가 생장할 수 있는 배지 중 최적의 생장배지를 조사한 결과 송이, 가송이, 할미송이, 땅송이 등 송이과에 속하는 균주들과 가지외대버섯(*E. cyanonigrum*), 젓버섯아재비, *L. laeticolorus*, 모래발버섯, 밤색망그물버섯, 향버섯 등은 PDA 배지에서 균 생장력이 가장 높았다. 광대버섯속(*Amanita* sp. KFRI 1220), 외대버섯속(*Entoloma* sp. KFRI 1839), 다색벚꽃버섯(*H. russula* KFRI 1488, 1987), 황소비단그물버섯(*Suillus bovinus* KFRI 1231), 비단그물버섯(*S. luteus* KFRI 1458) 등은 SDA 배지에서 균 생장력이 가장 높았다. 긴대발그물버섯(*Boletellus elatus*), 흑자색그물버섯(*Boletus violaceofuscus*), 일본연지그물버섯, 접시겉껍이그물버섯, 끈적쓴맛그물버섯(*Tylopilus castaneiceps*),

황금씨그물버섯 등 그물버섯과(Boletaceae)에 속하는 여러 균주들을 비롯하여 파리버섯, 싸리버섯속(*Ramaria* sp. KFRI 1670, 1679, 1680, 1825)의 균주들은 MMN 배지에서 균 성장력이 가장 높았다.

송이류는 한국, 일본, 중국에서 상업적으로 중요하게 취급되어 왔는데 우리나라 산림에서 수집한 송이와 근연종인 가송이의 배양 특성을 비교한 결과 두 균종 모두 MEA에서는 전혀 성장하지 못했으며, SDA에서는 가송이보다 송이가 성장하지 못하는 빈도가 높았다. PDA와 MMN에서는 두 균종 모두 성장하였는데 송이의 최적 성장배지는 PDA, 가송이의 최적 성장배지는 PDA 또는 MMN이었다. 전반적으로 가송이의 균 성장력은 송이에 비해 약했는데, PDA, SDA, MMN에서 가송이의 균 성장대의 크기는 송이에 비해 각각 2~10배, 2.5배, 0.5~5배 정도로 작았다[24].

온도별 조사

온도는 균류의 생존과 생장에 중요한 영향을 미치며, 특히 상업적으로 활용 가치가 있는 외생균근균인 경우에는 순수배양체의 증식과 보존 효율을 높이기 위해 기본생장 온도(cardinal temperature)를 조사하는 일이 필요하다. 본 총설에서는 외생균근균의 균사체가 성장할 수 있는 최저 온도(minimum temperature), 최적 온도(optimum temperature) 및 최고 온도(maximum temperature)를 조사한 후, 총 151개 균주에 대한 최적 균사생장 온도를 Table 1에 제

시하였다. 조사 결과 대부분의 외생균근균들은 20~25°C 범위에서 균 성장력이 우수하였으며, 10°C 저온 또는 30°C 고온에서는 균이 전혀 성장하지 못하거나 성장력이 미약한 특성을 보였다(Table 1, Table 3). 외생균근균의 이러한 배양 특성은 균근균(mycorrhizal fungi)이 토양 미생물이기 때문에 이들의 최대 생장 온도가 30°C 근방이거나 그 이하일 거라는 Harvey [21]의 예측과도 일치하였다. 가송이, 연기싸리버섯을 비롯하여 긴대밤그물버섯, 흑자색그물버섯, 일본연지그물버섯, 접시꼴겉이그물버섯 등 그물버섯과(Boletaceae)에 속하는 많은 균주들은 10°C 저온에서 균사가 전혀 성장하지 못하였다(Table 3). 한편, *B. griseus* var. *fuscus*, 산속그물버섯아재비(*Boletus pseudocalopus*), 일본연지그물버섯, 제주쓴맛그물버섯(*T. neofelleus* KFRI 1401, 1480, 1481) 등 그물버섯과(Boletaceae)에 속하는 많은 균들을 비롯하여 노란젓버섯, *L. laeticolorus*, 연기싸리버섯, 큰비단그물버섯, 송이, 향버섯(*S. aspratus* KFRI 1676, 1677, 2031), 다색벚꽃버섯(*H. russula* KFRI 818, 1022, 1487, 1987) 등은 30°C 고온에서 전혀 성장하지 못하였다.

배양 온도 변화에 대한 민감도를 외생균근균의 과별로 조사한 결과 비단그물버섯과(Suillaceae)에 속하는 균종들은 저온보다 고온에서 배양 시 균 성장력이 약했으며, 그물버섯과(Boletaceae)는 다른 과에 비해 저온과 고온 모두에서 균 성장력이 취약한 것으로 분석되었다.

송이과의 경우 가송이와 송이의 최적 생장온도는 20~

Table 3. Summarized characteristics for mycelial growth of ectomycorrhizal fungi at different culture temperatures

Mycelial growth characteristics		Representative fungal strain
Temperature range for mycelial growth	No growth at 10°C	<i>Boletellus elatus</i> , <i>Boletus violaceofuscus</i> , <i>Heimioporus japonicus</i> , <i>Leccinum extremiorientale</i> , <i>Ramaria fumigata</i> , <i>Tricholoma bakamatsutake</i>
	No growth at 30°C	<i>Boletus griseus</i> var. <i>fuscus</i> , <i>Boletus pseudocalopus</i> , <i>H. japonicus</i> , <i>Lactarius chrysorrheus</i> , <i>Lactarius laeticolorus</i> , <i>R. fumigata</i> , <i>Suillus grevillei</i> , <i>Tricholoma matsutake</i> , <i>Hygrophorus russula</i> (KFRI 818, 1022, 1487, 1987), <i>Sarcodon aspratus</i> (KFRI 1676, 1677, 2031), <i>Tylopilus neofelleus</i> (KFRI 1401, 1480, 1481)
	Growth at 25°C only	<i>Amanita hemibapha</i> (KFRI 1674), <i>Boletus pseudocalopus</i> (KFRI 1973)
	Growth at 15~20°C	<i>R. fumigata</i> (KFRI 2368)
	Growth at 20~25°C	<i>Boletus edulis</i> (KFRI 1191), <i>Boletus laetissimus</i> (KFRI 1489), <i>H. japonicus</i> (KFRI 1224)
	Growth at 10~30°C	<i>Amanita citrina</i> , <i>Amanita melleiceps</i> , <i>Morchella esculenta</i> , <i>Rhizopogon</i> sp., <i>Suillus bovinus</i> , <i>Suillus granulatus</i>
Optimal temperature for mycelial growth	10~25°C	<i>Entoloma</i> sp. (KFRI 1575)
	15~30°C	<i>Rhizopogon</i> sp. (KFRI 1425)
	20~30°C	<i>Tylopilus chromapes</i> (KFRI 1373)
	25~30°C	<i>Amanita javanica</i> (KFRI 1267), <i>Amanita pseudoporphyria</i> (KFRI 2396), <i>Amanita volvata</i> (KFRI 2014), <i>M. esculenta</i> (KFRI 2075, 2078)
	30°C	<i>A. melleiceps</i> (KFRI 1180), <i>Pisolithus arhizus</i> (KFRI 1198, 1960)

25°C로 유사하였으나, 저온과 고온에서 배양 시 균 성장력은 뚜렷한 차이를 보였다. 송이의 모든 시험 균주들은 30°C 고온에서 전혀 성장하지 못하여 기본 성장온도 범위가 10~25°C인 반면, 가송이의 모든 시험 균주들은 10°C 저온에서 전혀 성장하지 못하여 기본 성장 온도 범위가 15~30°C였다. 송이와 가송이의 이러한 성장 특성은 자실체 발생 당시의 온도와의 연관이 있을 것으로 생각되는데, 가송이가 발생한 시기(8월 말~9월 초순)가 송이보다 약 20~50일 정도 빠르며 우리나라의 경우 대개 10월보다 9월의 온도가 조금 높기 때문에 송이의 균은 30°C의 고온에 대해, 가송이의 균은 10°C 저온에 대한 적응력이 낮아 균이 성장하지 못한 것으로 보인다[24]. 물론 버섯의 자실체가 발생할 수 있는 온도 범위와 균사가 성장할 수 있는 온도 범위가 거의 일치한다고 보기는 어렵다. 그러나 일반적으로 미생물이 성장할 수 있는 온도는 미생물이 서식했던 장소의 평균 온도 범위를 반영하는 경우가 많기 때문에 [25] 균주 수집 당시 서식지의 환경이 실험실 내 인공배지에서 배양 시 어느 정도 반영된 것으로 보인다.

애광대버섯, 파리버섯, 곰보버섯, 알버섯속(*Rhizopogon* sp.), 황소비단그물버섯, 젓비단그물버섯 등은 10~30°C의 넓은 온도 범위에서 균이 성장하였다. 이와 달리 몇몇 균주들은 균사 생장이 가능한 배양 온도 범위가 매우 좁아 하나 또는 두 종류의 온도에서만 균이 성장하였다. 달갈버섯(*Amanita hemibapha* KFR1 1674)과 산속그물버섯아재비(*B. pseudocalopus* KFR1 1973)는 한 종류의 온도(25°C)에서만 균이 성장하여 온도 변화에 매우 민감한 균주임을 알 수 있었다. 연기싸리버섯(*R. fumigata* KFR1 2368)은 15~20°C에서, 일본연지그물버섯(*H. japonicus* KFR1 1224), 피꼬리그물버섯(*B. laetissimus* KFR1 1489), 그물버섯(*B. edulis* KFR1 1191), 그물버섯속(*Boletus* sp. KFR1 1462) 등은 20~25°C에서 성장하였다.

균사 생장이 가능한 온도 범위(cardinal temperature) 중 최적 성장온도(optimal temperature)를 조사한 결과 외대버섯속(*Entoloma* sp. KFR1 1575)은 10~25°C, 알버섯속(*Rhizopogon* sp. KFR1 1425)은 15~30°C로 나타나 최적 성장 온도 범위가 매우 넓은 것을 알 수 있다(Table 1). 이외 최적 성장온도가 30°C 고온인 균주로는 파리버섯(*A. melleiceps* KFR1 1180), 모래발버섯(*P. arhizus* KFR1 1198, 1960) 등이 있으며, 20~30°C인 균주에는 노란대쓴맛그물버섯(*Tylopilus chromapes* KFR1 1373), 25~30°C인 균주에는 큰주머니광대버섯(*Amanita volvata* KFR1 2014), 암회색광대버섯아재비(*Amanita pseudoporphyria* KFR1 2396), 노란달갈버섯(*Amanita javanica* KFR1 1267), 곰보버섯(*M. esculenta* KFR1 2075, 2078) 등이 해당된다.

우리나라 산림에서 수집한 외생균근균의 온도별 균사 성장 특성을 부후균과도 비교하였다. 외생균근균과 부후균 모두 대부분의 균주에서 최적 성장 온도 범위는 20~25°C로 크게 다르지 않았다[18]. 그러나 외생균근균은 10°C 저

온보다 30°C 고온에 더 취약하였고, 목재 부후균은 30°C 고온보다 10°C 저온에 더 취약하여 외생균근균과 부후균은 극한 온도 변화에 대한 적응력이 서로 다를 수 있다[18].

pH별 균사 성장 특성 조사

균사체와 영양원과의 생리학적 관계를 구명하기 위해서는 고체배양보다는 액체배양을 실시하며 균사체에서 분비되는 유용한 물질들을 다량으로 얻고자 할 때에도 액체배지를 이용하여 균을 배양한다[15]. 대부분의 외생균근균들은 부후성균에 비해 액체배지에서도 중량 생장이 느린 경향이 있기 때문에 장기간 배양해야 하는 경우가 많으며, 배지의 성분이나 영양원의 이용 능력에 따라 액체 배지 내에서 화학적인 환경 변화가 일어날 수 있고, 심지어는 균의 대사산물이 균사 성장을 방해하는 요인으로 작용할 수도 있다. 따라서 액체배양을 통해 원하는 균주를 확보하고자 할 때에는 이러한 배지 내 환경 변화를 고려하여 배양 조건을 설정하는 것이 무엇보다 중요하다. 특히 액체배지 내 pH(수소이온농도)의 변화는 균사체 증식에 가장 큰 영향을 줄 수 있는 인자로 여겨지며, 인공배지에서 배양 시 실험자가 액체배지 내 화학적 환경을 인위적으로 변화시켜 균의 성장 특성을 간접적으로 조사할 수 있는 가장 간단한 방법이기도 하다. 따라서 본 총설에서는 구입이 용이한 상용 액체배지(PDB)를 기본으로 하여 pH 변화에 따른 최적 성장 pH 범위를 조사하여 그 결과를 Table 1에 제시하였다.

총 117개 균주를 대상으로 배양 특성을 조사한 결과 대부분의 외생균근균들은 pH 7~8보다 pH 4~6에서 균 성장력이 더 컸다. 균체량이 최대가 되는 최적 PDB pH가 4~5 범위인 외생균근균은 *B. griseus* var. *fuscus*, 접시겉결이그물버섯, 밤색망그물버섯, 파리버섯, 붉은점박이광대버섯, 싸리버섯속(*Ramaria* sp. KFR1 1643, 1670, 1679), 향버섯, 비단그물버섯, 송이, 가송이 등이었으며, 피꼬리큰버섯(*Hygrophoropsis aurantiaca* KFR1 1824)은 pH 7~8에서, 적색신그물버섯(*Aureoboletus thibetanus* KFR1 2341)과 큰주머니광대버섯(*A. volvata* KFR1 2014)은 pH 7.0에서, *B. griseus* var. *fuscus* KFR1 2382와 피꼬리버섯속(*Cantharellus* sp. KFR1 2033)은 pH 8.0에서 각각 균 생장이 우수하였다.

한편 송이(*T. matsutake* KFR1 1266), 까치버섯(*P. multiplex* KFR1 1678), 젓버섯아재비(*L. hatsudake* KFR1 1164) 등은 pH 4~7의 넓은 범위에서도 균체량이 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않아 PDB를 기본 배지로 액체배양하는 경우, 그들의 균사 성장에 배지의 pH가 끼치는 영향력이 적음을 알 수 있었다. 곰보버섯(*M. esculenta* KFR1 2075)과 젓비단그물버섯(*S. granulatus* KFR1 2240) 역시 pH 5~8에서 균체량에 유의한 차이가 없었으며, 이러한 양상은 모래발버섯(*P. arhizus* KFR1 1403)이나 황금씨그물버섯(*X. affine* KFR1 1421)에서도 유사한 것으로 조사되었다.

모든 미생물들은 제각기 생장에 유리한 최적 pH가 있는

며, 균류는 세균보다 산성 조건에 잘 견디는 내산성이 큰 경향이 있어 대개 많은 균류들은 pH 5.0 이하에서 최적 성장을 하는 것으로 알려져 있다[25]. 또한 대부분의 외생균근균들은 산성 환경에 근접하여 자라기 때문에 많은 이들은 외생균근균을 호산성 균류로 보고 있다[26]. 우리나라 산림에서 수집한 외생균근균 중 일부 균주들은 알칼리성 환경에서 자라기도 하였지만, 그 외 대부분의 균주들은 최적 성장 pH가 4~6인 경우가 많아 산성 환경에 더 잘 적응하며 자라 일반적인 균근성 균류처럼 호산성인 특성을 보여 주었다. 한편 동일 종이지는 하나 균주 간 최적 pH가 2~3 단위 이상 차이가 나는 경우도 있었는데, pH는 지수값으로 표시되기 때문에 pH 1 단위가 변화한다는 것은 수소이온 농도가 10배 변화함을 의미하므로[25] 균이 최대 성장할 수 있는 환경의 차이 또한 크다는 것을 알 수 있었다[15].

질소원 선호도 조사

균류의 생장에서 질소원은 각종 아미노산이나 효소 등을 합성하는 데에 필수적인 성분이 된다. 특히 균근을 형성하는 균류들은 토양으로부터 식물의 생장에 필요한 질소원을 공급해 주기 때문에 생태계 질소원 순환에 중요한 역할을 담당하고 있다. 이들은 간단한 무기 암모늄염에서부터 유기 질소화합물에 이르기까지 균종에 따라 다양한 형태의 질소원(예: 아미노산, 펩톤, 카제인 가수분해산물)을 이용하는 능력을 갖고 있다[15]. 산림에는 무기 형태의 질소원이 풍부하며 많은 균근균들은 암모늄이나 질산염 형태의 무기 질소원을 이용할 수 있는 능력이 있으며, 버섯을 형성하는 대부분의 균류들은 질산염보다 암모늄 형태의 무기 질소원을 더 선호하는 경향이 있다[27]. 이러한 특성들이 우리나라 산림에서 수집한 균주들에게도 적용되는지 알기 위해 질산염과 암모늄 형태의 무기 질소원이 각각 함유된 MMN 변형 배지(M1과 M2)에 배양하여 외생균근균들의 질소원 선호도를 조사하였다.

총 134개 균주를 대상으로 조사한 결과 송이, 독송이(*Tricholoma muscarium*), 황금비단그물버섯, 젓비단그물버섯, 붉은비단그물버섯(*Suillus pictus*), 접시껍질이그물버섯, 제주쓴맛그물버섯, 붉은점박이광대버섯 그리고 싸리버섯(*R. botrytis* KFRI 1018), 싸리버섯속(*Ramaria* sp. KFRI 1670, 1679, 1680, 1825) 등은 질산염보다 암모늄 형태의 질소원을 더 선호하였다. 특히 아홉 개 균주는 M1/M2 ratio가 2.0 이상으로 나타나 질산염보다 암모늄 형태의 질소원을 선호하는 경향이 더 뚜렷했다. M1/M2 ratio 분석 결과 비단그물버섯과(*Suillaceae*)에 속하는 균주들 중 황금비단그물버섯(*S. cavipes* KFRI 1980)은 3.0배, 큰비단그물버섯(*S. grevillei* KFRI 1211)은 2.5배, 붉은비단그물버섯(*S. pictus* KFRI 2021, 2238)은 2.1배, 흰겨스러미광대버섯(*Amanita cokei* f. *reseotinta* KFRI 1974)은 2.4배, *B. griseus* var. *fuscus* (KFRI 1362)는 2.5배, 다발방패버섯(*Albat-*

rellus confluens KFRI 837)은 2.6배, 독송이(*T. muscarium* KFRI 1991)는 2.9배, 그리고 피꼬리큰버섯(*H. aurantiaca* KFRI 1824)은 3.5배 더 암모늄염 형태의 무기 질소원에 대한 선호도가 높았다.

이와 달리 곰보버섯, 모래발버섯 그리고 외대버섯속(*Entoloma* sp. KFRI 1575, 1839)을 포함하여 M1/M2 ratio가 1.0 이하로 낮게 나타난 일부 균주들은 그들의 균사 성장을 위해 암모늄보다는 질산염 형태의 무기 질소원을 더 선호하여 이를 더 우선적으로 이용하는 것으로 추정된다.

송이와 가송이의 질소원 선호도를 비교한 결과 송이에 속하는 모든 시험 균주들과 가송이의 일부 균주들은 질산염보다 암모늄 형태의 질소원을 더 선호하였다. 가송이는 우리나라보다 일본에 더 많이 분포하는 것으로 알려져 있는데, Terashima [28]는 이미 실험실 내 배양을 통해 일본에서 수집한 가송이 균주의 질소원 이용 능력을 조사하였으며, 질산염 형태의 질소원(예: KNO_3 , NaNO_3)보다는 암모늄 형태의 질소원(예: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$)이 함유된 배지에서 더 잘 성장한다고 보고하였다.

이와 같이 암모늄 형태의 질소원은 외생균근균이 항상 이용할 수 있는 주요 이온성 화학물류(ionic chemical species)이기 때문에 많은 시험균들이 선호한 것으로 보인다. 암모늄 형태의 질소원 중에서도 인산수소암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), 염화암모늄(NH_4Cl), 또는 ammonium tartrate ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) 등이 함유된 배지에서는 외생균근성 균류들의 생장이 우세한 것으로 알려져 있는데 염화암모늄(NH_4Cl)은 피꼬리버섯, 젓비단그물버섯, 사마귀버섯(*Thelephora terrestris*), 모래발버섯의 균 생장에 적합한 질소원 중 하나인 것으로 보고 되었다[29]. 우리나라 산림에서 수집한 균주의 경우 젓비단그물버섯의 세 개 균주(KFRI 1211, 1997, 2240)는 질산염보다 염화암모늄(NH_4Cl)이 함유된 배지에서 더 잘 성장하여 외국 균주의 질소원 선호도와 비슷하였다. 그러나 피꼬리버섯속(*Cantharellus* sp. KFRI 2033)과 모래발버섯(*P. arhizus* KFRI 1198, 1403, 1960)은 NH_4Cl 보다 KNO_3 가 함유된 배지에서 균체량이 더 많아 암모늄염보다는 질산염 형태의 무기 질소원을 더 선호하는 특성을 나타냈다.

적 요

균근성 버섯은 나무의 뿌리에 외생균근을 형성하는 공생 균류로서 인류에게 맛있는 버섯을 제공하고 있다. 국립산림과학원에서는 이러한 균근성 버섯류의 인공재배뿐만 아니라 이들의 순수분리 배양과 보존, 기초 배양 특성 조사 등에 집중하여 연구를 진행하고 있다. 본 총설은 국립산림과학원에 보존된 많은 균근성 버섯들의 배양특성을 소개한 것으로 차후 균근성 버섯을 연구하고자 하는 이들이 유용한 산림자원을 발굴하는 데에 도움이 되는 기본 정보가 될 것 같다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant (FP 0801-2010-01) from Korea Forest Research Institute, Republic of Korea.

REFERENCES

- Peterson RL, Massicotte HB, Melville LH. Mycorrhizas: anatomy and cell biology. 1st ed. Ottawa: NRC Research Press; 2004.
- Agerer R. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Progress* 2006;5:67-107.
- Seok SJ, Lim YW, Kim CM, Ka KH, Lee JS, Han SK, Kim SO, Hur JS, Hyun IH, Hong SG, et al. List of mushrooms in Korea. 1st ed. Seoul: Korea Society of Mycology; 2013.
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen MF, editor. *Mycorrhizal Functioning: an integrative plant-fungal process*. New York: Routledge; 1992. p. 57-423.
- Yaoita Y, Satoh Y, Kikuchi M. A new ceramide from *Ramaria botrytis* (Pers.) Ricken. *J Nat Med* 2007;61:205-7.
- Kim HJ, Lee IS, Lee KR. Antimutagenic and anticancer effects of *Ramaria botrytis* (Fr.) Rick extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1999;28:1321-5.
- Kim, JH, Yoo KH, Seok SJ. Screening test of wild mushroom methanol extracts for fibrinolytic and α -glucosidase inhibitory activity. *J Exp Biomed Sci* 2007;13:245-9.
- Karwa A, Varma A, Rai M. Edible ectomycorrhizal fungi: cultivation, conservation and challenges. In: Rai M, Varma A, editors. *Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae*. London: Springer; 2011. p. 429-53.
- Hall IR, Yun W, Amicucci A. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends Biotechnol* 2003;21:433-8.
- Mortimer PE, Karunarathna SC, Li QH, Gui H, Yang XQ, Yang XF, He J, Ye L, Guo J, Li H, et al. Prized edible Asian mushrooms: ecology, conservation and sustainability. *Fungal Divers* 2012;56:31-47.
- Berch SM, Ka KH, Park H, Winder R. Development and potential of the cultivated and wild-harvested mushroom industries in the Republic of Korea and British Columbia. *J Ecosyst Manag* 2007;8:53-75.
- Barros L, Baptista P, Ferreira IC. Influence of the culture medium and pH on the growth of saprobic and ectomycorrhizal mushroom mycelia. *Minerva Biotechnol* 2006;18:165-70.
- Boddy L, Buntgen U, Egli S, Gange AC, Heegaard E, Kirk PM, Mohammad A, Kausrud H. Climate variation effects on fungal fruiting. *Fungal Ecol* 2014;10:20-33.
- Homolka L. Preservation of live cultures of basidiomycetes: recent methods. *Fungal Biol* 2014;118:107-25.
- Ka KH, Jeon SM, Ryoo R, Ryu SH, Kim MG, Bak WC, Park JW, Koo CD, Eom AH. Management of genetic resources of forest microorganisms. Seoul: Korea Forest Research Institute; 2011.
- Ka KH, Jeon SM, Ryoo R, Bak WC, Kang JA, Kim MS, Jeon HS, Jeong YS. Basic culture characteristics of ectomycorrhizal mushrooms. Seoul: Korea Forest Research Institute; 2014.
- Jeon SM, Kim MS, Ka KH. Effects of medium, temperature and pH on mycelial growth and cellulase activity of ectomycorrhizal fungi from Korean forests. *Kor J Mycol* 2012;40:191-203.
- Jeon SM, Ka KH. Mycelial growth and extracellular enzyme activities of wood-decaying mushroom strains on solid media. *Kor J Mycol* 2014;42:40-9.
- 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.
- Jeon SM, Ka KH. Nitrogen source-requirement and preference of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Kor J Mycol* 2013;41:149-59.
- Harvey LM. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. *Biotechnol Adv* 1991;9:13-29.
- Ohta A. Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. *Mycoscience* 1997;38:403-8.
- Jeon SM, Jeon HS, Ka KH. Mycelial growth of ectomycorrhizal fungi by different carbon sources in liquid culture. *Kor J Mycol* 2014;42:150-8.
- Jeon SM, Ka KH, Hong KS. Mycelial growth and *in vitro* ectomycorrhizal synthesis on *Pinus densiflora* seedlings of *Tricholoma bakamatsutake* in Korea. *Kor J Mycol* 2014;42:312-21.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Brock biology of microorganisms*. 12th ed. San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings; 2009. p. 151-67.
- Sánchez F, Honrubia M, Torres P. Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogam Mycol* 2001. 22:243-58.
- Read DJ, Leake JR, Langdale AR. The nitrogen nutrition of mycorrhizal fungi and their host plants. In: *Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi: symposium of the British Mycological Society held at the University of Birmingham, April 1988*. Manchester: British Mycological Society; 1989. p. 181-204.
- Terashima Y. Carbon and nitrogen utilization and acid production by mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma bakamatsutake* *in vitro*. *Mycoscience* 1999;40:51-6.
- France RC, Reid CP. Pure culture growth of ectomycorrhizal fungi on inorganic nitrogen sources. *Microb Ecol* 1984;10:187-95.