

RESEARCH ARTICLE

*Calocybe indica*의 배양적 특성과 군사 배양 적합 조건 설정

민경진, 박혜성, 이은지, 이찬중*

농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 버섯과

Culture Characteristics and Optimal Conditions for Mycelial Growth of *Calocybe indica*

Gyeong-Jin Min, Hea-sung Park, Een-ji Lee, Chan-Jung Lee*

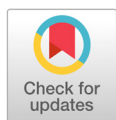
Mushroom Science Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Korea

*Corresponding author: lchanj@korea.kr

ABSTRACT

Calocybe indica is an edible mushroom commercially cultivated in India and other tropical countries. In this study, the culture characteristics and optimal conditions of milky mushroom strains were determined. The growth temperature and pH range of milky mushrooms was extensively investigated between 15–35 °C and pH 3–11. For efficient cultivation, 20 types of nutrient sources were selected that consisted of one of 21 types of carbon sources, 6 organic nitrogen sources, 6 inorganic nitrogen sources, 13 amino acids, 6 organic acids and 12 inorganic salts. The impact of each of the selected nutrition sources and their concentration on growth was investigated. The optimum pH and temperature were determined to be pH 6.0 and 15 °C, respectively. The optimum concentration of medium elements for the mycelial growth of *C. indica* was determined to be as follows: carbon source, 2% maltose; organic nitrogen source, 1% yeast extract; inorganic nitrogen source, 0.1% NaNO₃; amino acid, 0.7% asparagine; organic acid, 0.07% acetic acid; inorganic salt, 0.07 mM MnSO₄.

Keywords: *Calocybe indica*, Culture characteristics, Milky mushroom, Optimal conditions, White summer mushroom



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 September, 48(3): 273-284
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200027>

Received: June 01, 2020

Revised: July 13, 2020

Accepted: August 25, 2020

© 2020 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



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.

서론

Calocybe indica (Prukay. & A. Chandra)는 주름버섯강 주름버섯목 밤버섯속 송이버섯과에 속하는 고온성 열대 버섯이다[1]. *C. indica*는 1974년 인도에서 처음 보고되었으며 연중 내내 평균 기온이 25°C에서 35°C 사이 습한 열대 및 아열대 지역 부식질이 많은 땅에서 5-8월 우기에 발생한다[2,3]. 자실체는 양송이처럼 유백색에 크기는 10-15 cm, 무게는 평균 개체 당 35-40 g으로 포자는 백색에 타원형이며 크기는 $4-6 \times 3.5-4 \mu\text{m}$ 이다[3,4]. 이 버섯이 자생하는 인도 지역에서는 'Kuduk' 또는 'Dudhichhata' (milk white umbrella) 이라고 불리며 'Milky white mushroom', 'White summer mushroom', 'Milky mushroom' 등 다양하게 불린다[5,6,7]. *C. indica*는 1997년 Krishnamoorthy에 의하여 처음 재배법이 소개되어 본격적으로 버섯재배를 이용한 생산 기술을 표준화하기 시작했다[4,5]. *C. indica*는 영양가가 매우 높은 버섯으로 건조 버섯 100 g 기준 단백질 21.4%, 지질 4.9%, 섬유 12.9%, 회분 13.1% 및 탄수화물 48.5%를 포함하고 있다[6,8]. 또한 건조 버섯 100 kg 당 신선버섯 약 140 kg을 생산할 수 있으며 저장성이 우수하여 양송이와는 같이 저장 중에 갈변, 반점 등 쉽게 변질되지 않는다는 장점이 많은 버섯이다[4,9,10]. 2000년 초반 재배법이 소개된 이래 버섯, 밀짚 등을 기질로한 *C. indica*의 재배 및 복토 재료 관련 연구는 진행되었으나 대량생산을 위한 균사체의 생리학적 배양적 특성에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 *C. indica*의 분자생물학적 동정 및 균사체 배양 및 자실체의 대량 안정생산을 위한 균사 최적 배양조건을 구명한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양배지

본 연구에 사용된 균주는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과 KMCC (Korean Mushroom Culture Collection, Eumseong 27709, Korea)에서 보존 중인 *C. indica* 균주 KMCC04965를 분양 받아 사용하였다. 시험에 사용된 균주는 PDA (Potato Dextrose Agar)상에 접종하여 암 배양 상태로 30°C 항온기에서 배양 후 3회 이상 계대를 거쳐 본 시험에 사용하였다.

Genomic DNA 추출

균주로부터 Genomic DNA를 추출하기 위하여 PDA 평판 배지 상에 미리 배양된 균사체를 수거하여 동결건조하였다. 동결 건조한 균사체를 곱게 마쇄한 후 100 μg 을 1.5 mL test tube에 옮기고 추출 완충액(200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) 650 μL 와 Proteinase K (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)를 첨가하여 buffer와 철저히 섞어 65°C에서 1시간 동안 반응하였다. 반응 후 Chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 넣고 혼합한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 새 튜브에 옮겨 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하고 -20°C에서 10분간 방치 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA를 침전하였다. 70% ethanol로 DNA 침전물을 세척하여 진공 건조한 후 TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA) 50 μL 에 용해하였다. RNase (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 2 μL 를 넣어 37°C에서 30분 처리하여 RNA를 제거한 후 template DNA로 사용하였다.

ITS (internal transcribed spacers) rDNA 염기서열 분석

추출한 DNA를 주쇄로 ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATATGC-3') primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 분석을 수행하였다. ITS 염기서열 분석방법은 균류의 계통분류에 많이 사용되는 방법으로[11] *C. indica*의 종명을 분석하고자 수행하였다. PCR 증폭 조건은 DNA 변성 94°C 4분, 94°C 1분, annealing 55°C 1분, 합성 72°C 2분, 35 cycle 실시 후 최종 DNA 합성 72°C 10분으로하였다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 UV lamp를 통해 관찰 후 PCR clean-up gel extraction kit (Macherey-nagel Co., Duren, Germany)를 사용하여 PCR 산물을 정제하였다. 정제된 PCR product를 Genotech (Daejeon, Korea)사에 의뢰하여 염기서열 분석하였다. 분석한 염기서열은 MEGA X program (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <https://www.megasoftware.net/>)을 이용하여 Neighbor-joining 방법으로[12] 계통수를 작성하였으며, 계통수의 각 그룹에 대한 신뢰도는 bootstrap 1000번 복하여 분석하였다.

균사배양 적온 선발

균사의 최적 온도를 구명하기 위하여 선발된 PDA배지 상에 공시균주를 5 mm cork borer를 이용하여 절체 하여 접종하였다. 접종 후 2, 3°C 간격으로 온도를 좁게 설정하여 각각의 항온기에서 암 배양하고 2일 간격으로 균사생육 정도를 조사하였다.

균사배양 적합 초기 pH 선발

초기 pH에 따른 *C. indica*의 생육 정도를 조사하기 위해서 1 N NaOH와 1 N HCl을 이용하여 pH 3.0에서 pH 11.0 까지 pH 1.0 간격으로 PDB (potato dextrose broth)를 조성하였다. test tube 상에 9 mL 씩 각각 3개씩 분주하여 121°C 30분간 멸균시킨 뒤 14일간 배양한 *C. indica* 균사체 선단부분을 5 mm cork borer를 이용하여 5조각씩 접종하였다. 진탕배양기를 이용하여 30°C에서 2주간 배양하여 균사체를 수거하여 무게를 측정하였다.

균사 배양 적합 탄소원의 선발

공시 균주의 균사 생육시 적합한 탄소원을 선발하기 위하여 1 L 기준 M9 (Na₂HPO₄ 6.6 g, KH₂PO₄ 3.34 g, NaCl 0.56 g, NH₄Cl 1.12 g, MgSO₄ 0.56 g, CaCl₂ 0.012 g) 배지를 첨가한 배지를 기초 배지로하여 단당류, 이당류, 다당류 등 adonitol을 포함한 총 21종 탄소원을 1%가 되도록 조제하였다. PDA 상에 배양한 균주 선단 부위를 5 mm cork borer를 이용하여 절체 하여 배지 종류별로 동시에 접종하였다. 기초 배지 pH는 동일하게 6.0으로 고정했으며 항온기에서 14일간 암 배양하여 균사 생육 속도를 2일 간격으로 조사하였다. 선택된 탄소원은 최적 균사 생육 조건을 설정하기 위하여 농도별 실험을 실시하였다.

균사 배양 적합 무기 및 유기질소원의 선발

탄소원 선발 과정과 동일하나 선발된 탄소원을 최적 농도를 pH 6.0로 고정하여 기초배지로 $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 등 무기질소원 7종, malt extract 등 유기질소원 7종을 각 1%의 농도로 조제하였다. 각 배지에 *C. indica* 균사를 동시에 접종하고 위 실험과 동일한 방법으로 균사 생육 정도를 조사하였으며 선택된 무기 및 유기질소원은 최적 배양 조건을 설정하기 위하여 농도별 실험을 실시하였다.

균사 배양 적합 아미노산의 선발

선발된 탄소원 및 무기, 유기질소원 최적 농도별로 포함된 배지를 pH 6.0로 고정하여 기초배지로 alanine 등 아미노산 14종을 각 1%의 농도로 첨가하여 배지를 조제하였다. 아미노산 선발시 위 실험들과 동일한 방법으로 균사 생육 조사를 실시하였으며, 선택된 아미노산은 최적 배양 조건을 설정하기 위하여 농도별 실험을 실시하였다.

균사 배양 적합 유기산의 선발

선발된 탄소원 및 무기, 유기질소원과 아미노산이 최적 농도별로 포함된 배지를 위와 같이 동일한 방법으로 고정한 배지에 acetic acid 등 유기산 7종이 각각 0.1%가 포함 되도록 조제하였다. 선택된 유기산은 농도별 실험을 진행하였으며 균사 생육 실험은 위 실험들과 동일하게 실시하였다.

균사 배양 적합 무기염류의 선발

탄소원 및 유기, 무기질소원과 아미노산, 유기산이 최적 농도별로 포함되어있는 배지를 고정으로 AgNO_3 을 포함한 무기염류 13종을 1 mM 농도로 조제하여 무기염류를 선발하였다. 선발 후 최적 농도를 구명하기 위하여 농도별 실험을 진행하였으며 균사 생육 속도를 위 실험들과 동일하게 실시하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 평균(meane)±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었으며 3회 반복 실시하였다. 각 실험군의 통계적 유의성 검정은 SAS 9.4 software (statistical analysis system; SAS Institute, Cary, NC, USA) 이용하여 Duncan's multiple test를 통해 유의성($p<0.05$)을 검증하였다. 선발배지 유의성 차이에 있어서는 Student's t-test를 이용하여 paired t-test하였고 유의성($p<0.05$)을 검증하였다.

결과 및 고찰

ITS rDNA 염기서열에 의한 분자생물학적 동정

균주에 대한 ITS 염기서열을 분석한 결과 730 bp의 증폭산물을 얻었으며 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 정보에 등록되어 있는 종들과 상동성을 비교하여 분석한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. GenBank에 BLAST한 결과 KMCC04965 (GenBank accession no. MT636315)는 인도 타밀 cbe1503 (GenBank accession no. MH327512)과 99.6% (512/514 bp) 상동성을 보였다. *Macrocybe gigantea* (Gene Bank accession no. KJ463731)와 92.0% (555/604 bp), *Tricholoma giganteum* (Gene Bank accession no. JN006792)과 92.2% (560/607 bp) 상동성을 보였다. *Macrocybe gigantea*, *Tricholoma giganteum*는 중국, 인도, 네팔 등 아시아 국가에서 발견되는 대형버섯 종으로[13] *C. indica*와 근접한 근연관계에 있는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 대형버섯 종에 속하나 개체로 발생하는 특성이 강한 *C. indica*와 다르게 대형다발 형태로 발생하는 *Macrocybe* 속은 형태학 및 생태학적으로 Tricholomataceae에 속하기 때문에 근접하게 검색된 결과라고 판단하였다. *C. indica*를 포함하는 *Macrocybe* 및 *Tricholoma*는 분류학적 위치 및 계통에 관련하여 추후 연구가 더 필요할 것으로 판단된다.

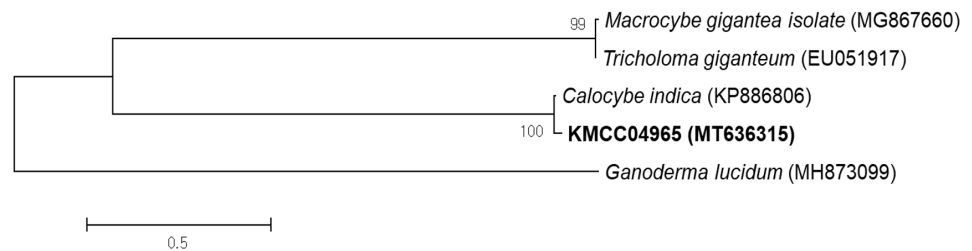


Fig. 1. Phylogenetic relationship of *Calocybe indica* based on internal transcribed spacer (ITS) rDNA sequences. Number on branch is bootstrap values of 1,000 replicate analysis. Scale bar means the genetic distance between samples.

온도 및 pH에 따른 균사 생육 특성 및 밀도

*C. indica*의 균사 생육 적정 온도를 확인하기 위하여 15°C에서 35°C까지 2-3°C 간격으로 조밀하게 설정하여 암배양 조건으로 배양하였으며 2일간격으로 조사하였다. 그 결과 25°C 까지 생육이 저조 하였으나 28°C 부터 생육이 점차 왕성하였으며 32°C 이상에서는 생육 저하가 되는 것을 확인하였다. *C. indica*의 최적 온도는 30-32°C로 확인되었다(Fig. 2). pH 조사 결과 *C. indica*은 pH 3-4 낮은 산도에서는 생육이 저조하였으나 pH 6.0에서 가장 밀도가 높고 왕성하였으며 pH 9 이상 부터는 균사의 생육이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Subbiah 등[4]이 30°C 범위에서 *C. indica*의 생육이 가장 좋았다는 보고와, Phutela와 Phutela[14]가 pH 6.0에서 최적 균사 생육을 보였다는 보고와 일치하였다.

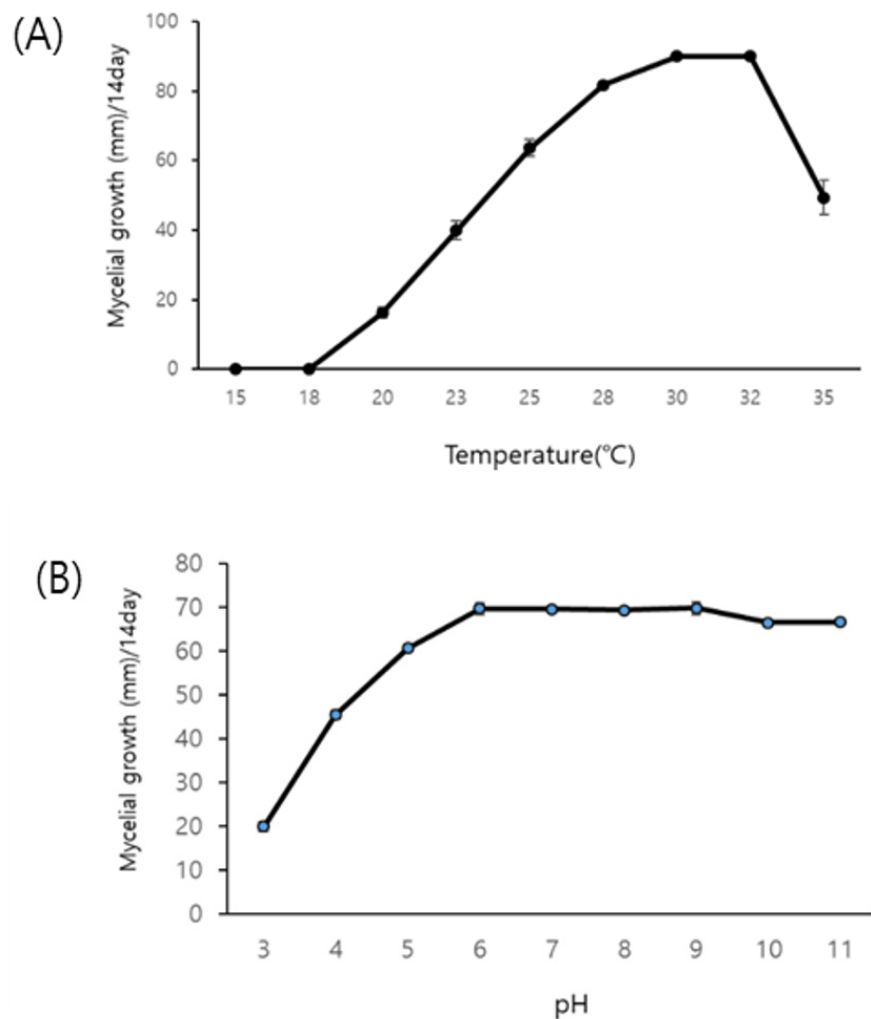


Fig. 2. Effect of temperatures and pHs on the growth of *Calocybe indica*. Each graphs show mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments performed. (A) Effect of temperatures on the growth of *C. indica*, (B) Effect of pHs on the growth of *C. indica*.

탄소원의 선발에 따른 균사 생육 및 밀도

탄소원으로 adonitol 등 21종의 탄소원에 따른 *C. indica*의 균사 생육 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 나무로부터 분리된 목당인 단당류 xylose에서 14일간 배양했을 때 39 mm로 가장 생육이 저조하였다. 대체로 21종의 모든 탄소원에서 평균 55.3-66.5 mm로 생육이 좋은 편이었으나 균사의 밀도가 녹말의 핵심구조 아밀로스의 2단위 구성원인 환원성 이당류 maltose에서 가장 왕성하였다. 최적 탄소원으로 선발된 maltose를 대상으로 농도별로 처리하여 생육한 결과 maltose 2%에서 *C. indica*의 균사 밀도가 치밀하고 왕성한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9A). 이러한 결과는 Subbiah 등 [4]이 Xylose에서 균사 생장이 가장 좋았다는 보고와는 다른 결과를 보였다.

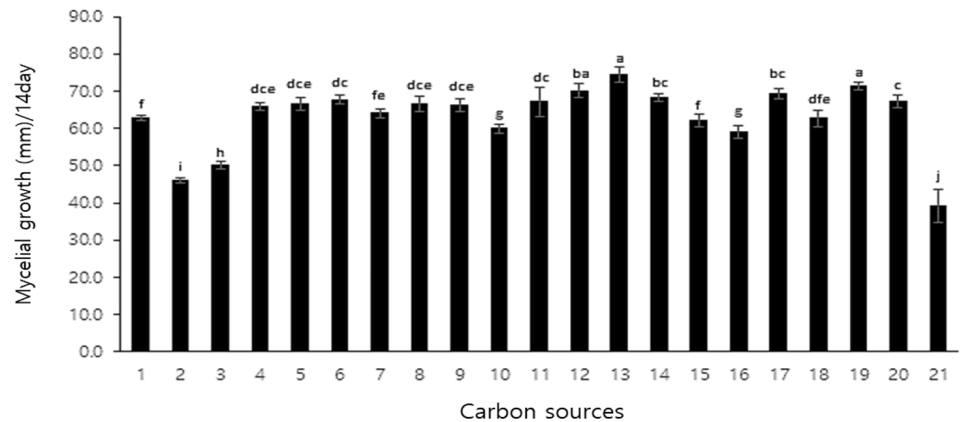


Fig. 3. Effect of carbon sources for the growth of *Calocybe indica* in basal medium. 1, adonitol; 2, arabinose; 3, cellobiose; 4, dextrin; 5, dextrose; 6, ethanol; 7, fructose; 8, galactose; 9, glucose; 10, glycerol; 11, inositol; 12, lactose; 13, maltose; 14, mannitol; 15, mannose; 16, Na-CMC; 17, raffinose; 18, salixine; 19, soluble starch; 20, sucrose; 21, xylose. The results are obtained from three replications. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

무기질소원 및 유기질소원의 선발에 따른 균사 생육 및 밀도

유기질소원은 malt extract를 포함하여 7종에 따른 균사 생육에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과 urea에서는 생장 하지않았고 yeast extract에서 69.0 mm로 가장 생육이 우수하고 왕성한 모습을 확인하였다. 균사 생육의 최적 농도는 yeast extract 1%로 확인되었고 그 이상 첨가 시 생육이 저하되는 것을 확인하였다(Fig. 9B). 무기질소원 $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 등 7종에 따른 *C. indica* 균사 생육을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. NH_4NO_3 와 NaNO_3 를 제외한 모든 처리구에서 생육이 저조하였다. 최적 무기질소원으로는 NaNO_3 가 선발되었으며 농도는 0.1%에서 가장 왕성하였다(Fig. 9C). Phutela와 Phutela[10]은 *C. indica* 균사가 질소원인 yeast extract에서 가장 잘 자랐다는 결과와 일치하였다.

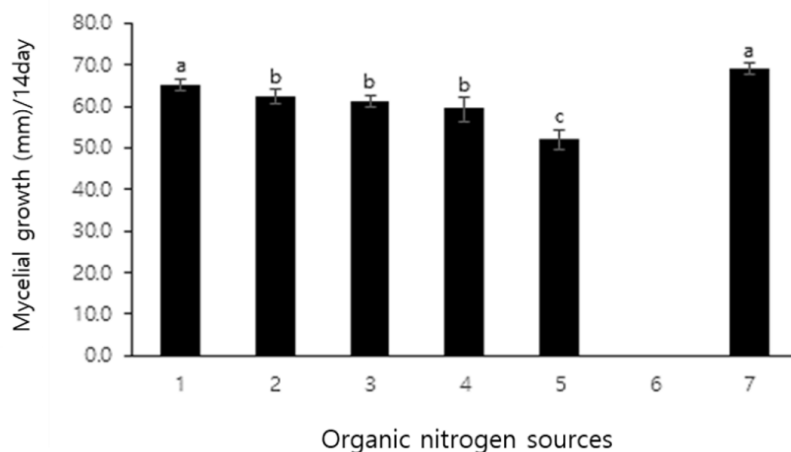


Fig. 4. Effect of organic nitrogen sources for the growth of *Calocybe indica* in basal medium. 1, casamino acid; 2, malt extract; 3, peptone; 4, soytone; 5, tryptone; 6, urea; 7, yeast extract. The results are obtained from three replications. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

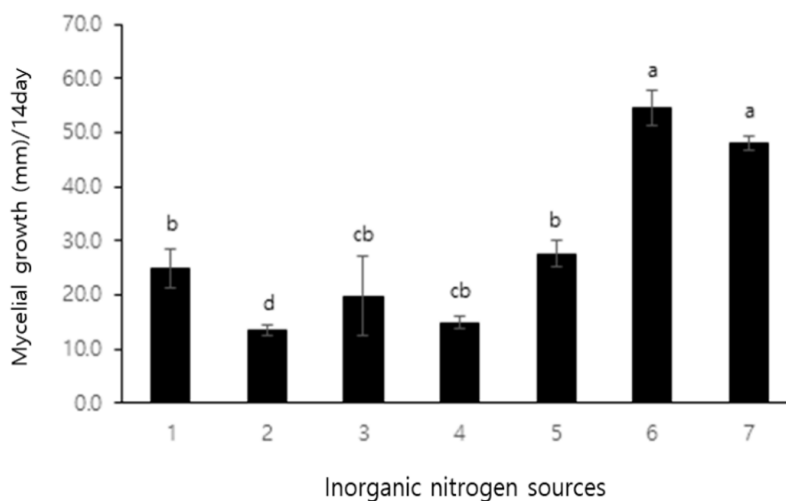


Fig. 5. Effect of inorganic nitrogen sources for the growth of *Calocybe indica* in basal medium. 1, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$; 2, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$; 5, $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$; 6, NaNO_3 ; 7, NH_4NO_3 . The results are obtained from three replications. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

아미노산 선발에 따른 균사 생육 및 밀도

아미노산 alanine을 포함한 13종에 대한 생육조사 결과 arginine, histidine, tyrosine, proline 첨가 배지에서 모두 생육이 저조하였다(Fig. 6). asparagine 첨가 배지에서 가장 생육이 우수하였으며 asparagine 최적 농도는 0.7%였다(Fig. 9D). 그 이상 첨가할 시 균사의 생육이 완만하게 낮아지다 2% 이상 첨가 시 생육이 저조해지는 것을 확인할 수 있었다.

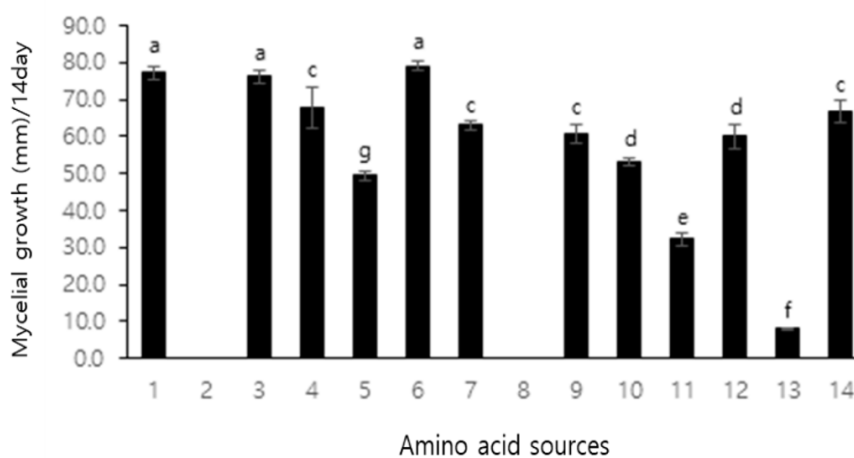


Fig. 6. Effect of amino acid sources for the growth of *Calocybe indica* in basal medium. 1, alanine; 2, arginine; 3, asparagine; 4, aspartic acid; 5, cysteine; 6, glutamic acid; 7, glutamine; 8, histidine; 9, leucine; 10, methionine; 11, proline; 12, threonine; 13, tyrosine; 14, valine. The results are obtained from three replications. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

유기산의 선발에 따른 군사 생육 및 밀도

유기산 acetic acid 등 8종에 따른 *C. indica* 군사 생육을 조사한 결과 유기산 8종 모두 생장 및 생육 상태가 양호하였다. 8종 통계분석시 유의미한 차이는 없었으나 군사 생육시 밀도가 가장 높으며 왕성하게 자라는 유기산은 합성 카르복실산인 acetic acid였다(Fig. 7). Acetic acid의 최적 농도는 0.07%로 가장 효과적이었으며(Fig. 9E), acetic acid 0.1% 이상 첨가시 군사 생육이 급격하게 저조해지는 것을 확인하였다.

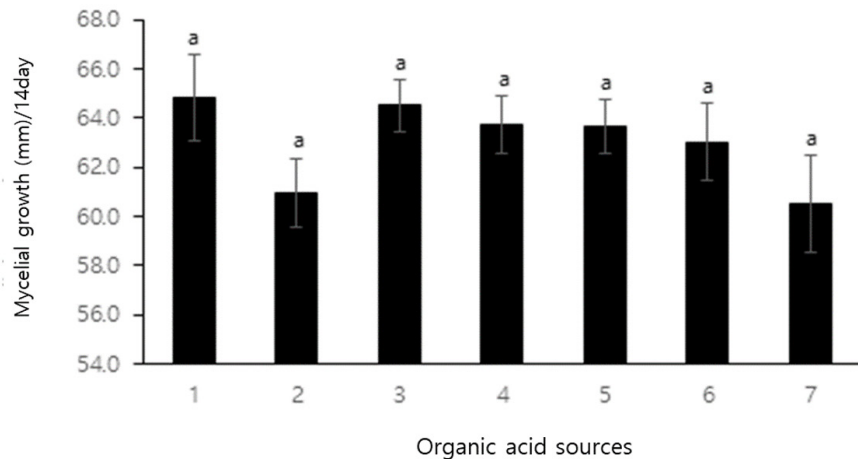


Fig. 7. Effect of organic acid sources for the growth of *Calocybe indica* in basal medium. 1, acetic acid; 2, citric acid; 3, glutamic acid; 4, lactic acid; 5, maleic acid; 6, propionic acid; 7, succinic acid. The results are obtained from three replications. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

무기염류의 선발에 따른 군사 생육 및 밀도

무기염류로는 AgNO_3 를 포함한 13종에 따른 *C. indica* 군사 생육을 조사한 결과 몰리브덴산나트륨(Na_2MoO_4), 황산리튬(LiSO_4), 질산은(AgNO_3), 염화코발트(CoCl_2)에서는 *C. indica*이 거의 생육하지 못하였다(Fig. 8). 황산마그네슘(MgSO_4), 황산망간(MnSO_4)에서는 평균 생육 속도 65mm로 가장 왕성하였으며 황산망산(MnSO_4)에서 최적이었으며 농도는 0.7mM이었다(Fig. 9F).

*C. indica*의 안정적 군사체 생육을 위한 최적 조건 확립

*C. indica*의 안정적인 군사체 생육을 위한 최적 배지 선별 결과를 Table. 1에 나타내었다. *C. indica*의 최적 배양 온도는 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 였으며, pH는 6.0에서 생육이 가장 왕성하였다. 또한 탄소원은 maltose 2%, 유기질소원 yeast extract 1%, 무기질소원 NaNO_3 0.1%, 아미노산 asparagine 0.7%, MnSO_4 0.7 mM이 최적 생육조건이었으며 MYNA라고 명명하였다. 이 결과는 PDA 배양시 10일차에 67.2 mm 생육하는 반면 MYNA는 74.0 mm로 평균 6.7 mm의 생육 속도가 차이가 났으며 PDA 배지의 배양기간과 비교하였을 때 10.5% 단축하는 효과가 있었다. 이는 p 값 0.0389로 유의성 있는 차이를 나타내었다(Fig. 10). 또한 MYNA 상에서 *C. indica* 군사체의 생육은 생육 간 편차 문제가 발생하지 않고 균일하게 생육하는 것을 확인하였다.

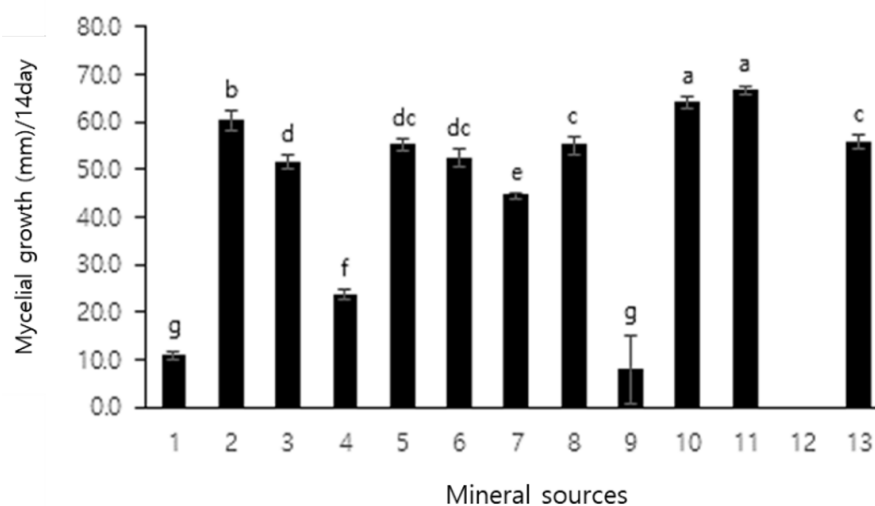


Fig. 8. Effect of inorganic salts sources for the growth of *Calocybe indica* in basal medium. 1, AgNO₃; 2, BaCl₂; 3, CaCl₂; 4, CoCl₂; 5, FeCl₃; 6, FeSO₄; 7, KCl; 8, KH₂PO₄; 9, LiSO₄; 10, MgSO₄; 11, MnSO₄; 12, Na₂MoO₄; 13, ZnSO₄. The results are obtained from three replications. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

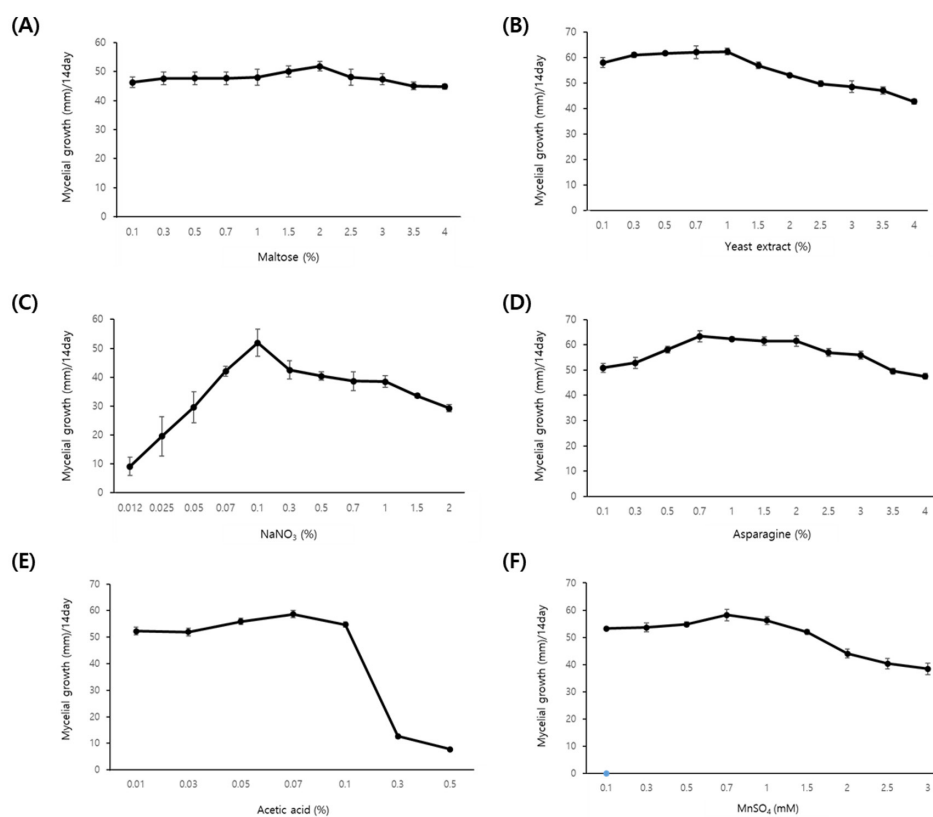


Fig. 9. Effect of nutritional sources concentration for the growth of *Calocybe indica* in basal medium. (A) Maltose, (B) yeast extract, (C) NaNO₃, (D) asparagine, (E) acetic acid, (F) MgSO₄.

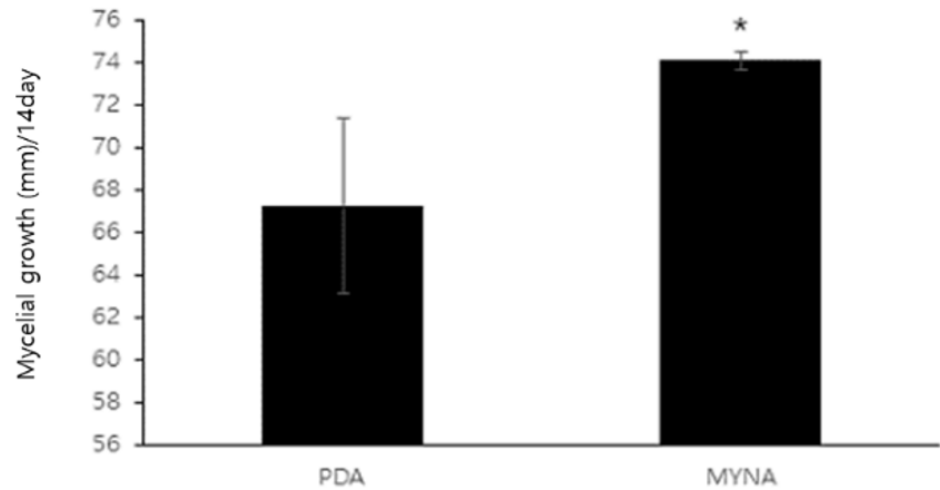


Fig. 10. Effect of optimal conditions MYNA media for the *Calocybe indica*. The marker (*) at each concentration indicates significant difference between the PDA(Potato Dextrose Agar) media and MYNA media by t-test ($p < 0.05$).

Table 1. Culture condition of *Calocybe indica* for the optimal conditions.

Optimal culture condition	
Induction temperature	30-32°C
Initial pH	6.0
Carbon source	2% Maltose
Organic N-source	1% Yeast extract
Inorganic N- source	0.1% NaNO ₃
Amino acid	0.7% Asparagine
Organic acid	0.07% Acetic acid
Inorganic salts	0.7 mM MnSO ₄

적요

본 연구에서는 *C. indica* 자실체의 안정적인 대량생산에 기반이 되는 필수적인 균사체 생산을 위한 최적 배양조건을 구명 하고자하였다. *C. indica* 균사체의 효율적 배양을 위한 조건은 최적 배양 온도 30-32°C, pH 6.0, 탄소원 maltose 2%, 유기질소원 yeast extract 1%, 무기질소원 NaNO₃ 0.1%, 아미노산 asparagine 0.7%, 유기산 acetic acid 0.1%, 무기염류 MnSO₄ 0.7 mM가 최적 배양조건 이었다. 새로이 MYNA로 명명한 *C. indica*의 최적 배지는 기존의 PDA 배지보다 균사의 생장이 균일하고, PDA 배지의 배양기간과 비교하였을 때 10.5% 단축하는 효과가 있었다. MYNA 배지는 추후 *C. indica*의 재배에 널리 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. Patel P, Trivedi R. Yield performance of *Calocybe indica* on different agricultural substrates. *Int Re J En Sci* 2016;2:66-71.
2. Purkayastha RP, Chandra A. New species of edible mushroom from India. *Trans Br Mycol Soc* 1974;63:415-418.
3. Barman S, Roy SC, Chakraborty U, Chakraborty BN. Cultivation practices of *Calocybe indica* (P&C) and use of spent mushroom substrate for leafy vegetables in north bengal. *MR Journals* 2015;4:74-80.
4. Subbiah KA, Balan V. A comprehensive review of tropical milky white mushroom (*Calocybe indica* P&C). *Mycobiology* 2015;43:184-94.
5. Krishnamoorthy AS, Muthuswamy MT, Nakkeeran S. Technique for commercial production of milky mushroom *Calocybe indica* P&C. *Indian J Mush* 2000;18:19-23.
6. Kumar V, Singh G, Singh S, Kannaujia JP. Effect of different inorganic and organic additives on spawn growth of two strains (CI-17-04 and CI-17-08) of milky mushroom (*Calocybe indica*). *J Pharmacognosy Phytochemistry* 2019;8:2716-19.
7. Mohit GS, Singh R, Mishra P, Singh DV, Kumar A. Effect of sugarcane leaves as substrate on production milky mushroom (CI.-16-02 and CI.-16-03). *J Pharmacognosy Phytochemistry* 2018;5:523-6.
8. Alam N, Amin R, Khan A, Ara I, Shim MJ, Lee MW. Nutritional analysis of cultivated mushrooms in bangladesh - *Pleurotus oysterus*, *Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus florida* and *Calocybe indica*. *Mycobiology* 2008;36:228-32.
9. Krishnamoorthy AS. Commercial prospects of milky mushroom (*Calocybe indica*) in the tropical plains in India. In: *Current vistas in Mushroom Biology and Production*. (eds: R.C. Upadhyay, S. K. Singh, R. D. Rai). *J Mushroom India*; 2003;1:131-5.
10. Sharma SK, Lall AM. Non-enzymatic antioxidant expression and nutritional composition of *Calocybe indica* under different organic supplementations. *J cell and tissue research* 2013;13:3541-4.
11. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 2010;10:189.
12. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
13. Razaq A, Nawaz R, Khalid AN. An Asian edible mushroom, *Macrocybe gigantea*: Its distribution and ITS-rDNA based phylogeny. *Mycosphere* 2016;4:525-30
14. Phutela UG, Phutela RP. Effect of physical and chemical factors on growth of *Calocybe indica* (P & C). *Int J Adv Life Sci* 2012;2:8-16.