

느타리 버섯에서 원형 품종 특이 SCAR marker 개발

서경인¹ · 장갑열¹ · 유영복¹ · 박순영¹ · 김광호² · 공원식^{1*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ²건국대학교 식량자원학과

Development and Application of Weonhyeong Strain-specific SCAR Marker in *Pleurotus ostreatus*

Kyoung-In Seo¹, Kab-Yeul Jang¹, Young-Bok Yoo¹, Soon-Young Park¹, Kwang-Ho Kim² and Won-Sik Kong^{1*}

¹Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²Department of Crop Science, KonKuk University, Seoul 143-701, Korea

(Received 21, March 2011., Accepted 28, March 2011)

ABSTRACT : Weonhyeong is one of important commercial strains. It has good characteristics of bundle formation, grey colored pilei and high productivity. We previously reported grouping of 70 strains of *Pleurotus ostreatus* in which one group contained 35 strains including Weonhyeong. Four strains in that group showed same profiles implicating no variety distinction for mushroom cultivation. Now we developed a specific marker for identification of Weonhyeong. Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) marker was developed from the RAPD amplicon. SCAR marker 'S-OPO5' produced only one band specific to 2183, 2240, 2595 and 2725 strains showing similar banding patterns to Weonhyeong in RAPD-PCR results. The sequence of 'S-OPO5' marker was unknown when compared with the data in the Genbank using BLASTN. BLASTX results indicated that the marker showed significant alignment with the protein sequences in *Tricholoma bakamatsutake* reverse transcriptase. The results indicate that this new SCAR marker ('S-OPO5') will be valuable to distinguish the Weonhyeong similar strains from *Pleurotus* spp.

KEYWORDS : *Pleurotus ostreatus*, RAPD, SCAR marker, Weonhyeong strain

서 론

동양인의 기호에 알맞은 느타리버섯은 한국을 비롯하여 중국, 일본에서 주로 재배되어 왔으나 근래에 이르러 미국, 캐나다, 그리고 유럽 여러 나라에서 양송이, 표고 다음으로 생산량이 증가하고 있다. 세계 버섯 생산량은 1997년에 6,158,000톤, 2002년에 12,250,000톤으로 꾸준히 증가하고 있으며, 매년 약 10~20% 생산량이 증가해왔다(Yoo *et al.*, 2005). 우리나라에서는 과거 20여년간 느타리버섯 대량재배기술과 품종개발에 많은 발전을 이룩하였으며 국내 느타리버섯류(*Pleurotus* spp. + *P. eryngii*) 생산량은 2005년 기준 연간 100,096톤이며, 전체 버섯 생산량의 49.6%를 차지하고 있다(유 등, 2008).

지금까지는 느타리버섯을 구분할 때 주로 자실체의 형태, 개체의 발달과정 등을 이용하여 왔으나 이러한 방법들은 환경에 따른 모양, 색깔, 크기의 변이성 때문에 정확한 버섯 품종구분의 요구에 부응하지 못하고 있다. 그렇기 때문에 유전적, 생화학적 방법들에 의한 분류가 요구되고 있다. 따라서 버섯 품종의 구분을 명확히 할 수 있는 분자 marker를

개발하는 것이 버섯 품종유통의 혼선을 피할 수 있으며, 버섯 품종육종에서도 큰 도움이 되리라 생각한다.

DNA 다형성 분석법 중 RAPD 방법은 분석이 쉽고, 간편하기 때문에 가장 보편적으로 이용되어 왔으나, 반응조건에 따라서 결과가 달라질 수 있기 때문에 정확한 실험결과를 기대하기가 어려웠다(Cutler *et al.*, 2006). 따라서 이러한 문제의 해결책으로 RAPD 분석결과에서 생성된 특이 band들을 cloning과 sequencing 과정을 거쳐 새로운 Sequenced Characterized Amplified Region (SCAR) primer를 제작하여 특정 DNA단편을 재현성 있게 증폭하는 SCAR marker가 개발되었다. RAPD는 우성유전자가 발현된다는 성질과 실험의 민감성 때문에 실용화 문제에 제한이 있으나, 우성인 RAPD marker의 공우성 SCAR로의 전환은 F2 집단에 대한 분석에 많은 도움을 주어 gene mapping 등에 유용하게 이용될 수 있다(Paran and Michelmores, 1993). 즉, SCAR는 RAPD 표지인자의 불안정성을 개선하기 위해 선발된 RAPD band의 염기서열을 분석하여 중간, 종내 특이 밴드의 염기서열 정보로부터 primer를 제작한 후 높은 annealing 온도에서 PCR을 수행하여 표지인자를 선발하는 방법으로서 단일 band로 나타나며 primer 설계를 바꾸어 공우성(co-dominant marker)으로 전환할 수 있기

*Corresponding author <E-mail : wskong@korea.kr>

때문에 유전분석에 유리하고 이형접합체의 분석이 가능한 장점을 가지고 있다(Negi *et al.*, 2000). Lee 등(2004)은 18S rDNA, RAPD, SCAR marker를 이용하여 *P. pyrifolia*(돌배)와 *P. communis*(서양배)의 품종을 구분하는 연구를 하였는데, 이들 marker가 *Pyrus*(배나무)종을 구분하는데 효율적이라고 보고하였다. Hongyan 등(2007)도 약용버섯인 *Ganoderma lucidum*(영지)을 확실히 구분할 수 있는 strain-specific SCAR marker를 ISSR marker를 전환하여 개발하였다. 또한 SCAR marker는 병 저항성 유전자나 온도 민감성 유전자의 탐색과 같은 분야에서도 효율적으로 이용되고 있다(Dedryver *et al.*, 1996; Lang *et al.*, 1999).

본 연구에서는 RAPD에서 특이적인 다형성 band를 cloning 한 후 SCAR marker로의 전환기법을 이용하여 SCAR primer를 제작하여 느타리 품종을 구분할 수 있는 확실한 표지인자를 찾는 것이 필요할 것으로 생각되었다. 따라서 본 연구에서는 느타리 품종 가운데 상품화율이 높아 소비성이 좋으며 많이 재배되어 왔던 원형느타리 품종을 감별할 수 있는 특이 marker를 개발할 목적으로 10염기의 Operon primer

set을 이용하여 RAPD를 수행하고, 특이 band를 찾아 SCAR 표지인자로 전환하는 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주

이전에 서 등(2008)이 URP primer (Seoulin, Korea) 12종류로 실험한 결과를 바탕으로 원형 품종과 같은 band 양상을 보인 품종을 제외시키고, marker 개발을 위하여 dendrogram상의 각 group에서 고르게 총 18품종을 선정하여 Operon primer에 대한 RAPD 분석을 수행하였다. 또한 개발한 SCAR 마커를 느타리버섯류 81 품종에 대해 적용하였다 (Table 1).

Total genomic DNA 분리

Genomic DNA 추출을 위한 균사 배양은 PDA plate에 균사를 접종하여 26°C의 incubator에서 7일간 배양하였다. 그 후 MCM 액체배지에 PDA (Potato dextrose agar) plate에서 자란 균사를 옮겨 접종하였고, 7일간 액체배지에서 배양하여

Table 1. *Pleurotus* strains used in this study

Lane no.	ASI* no.	Commercial name	Species	Source	Year
1	2851	Nongmin59	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2006
2	2830	Baekdul	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2005
3	2829	Jangpung	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC53972)	2005
4	2828	Samgu9	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2005
5	2827	Sinnong26	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2005
6	2826	Sinnong22	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC53909)	2005
7	2825	Sinnong14	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2005
8	2029	2029	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51372)	1978
9	2001	Nonggi2-1	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52243)	1971
10	2018	Nonggi201	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51362)	1978
11	2072	Nonggi202	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51410)	1980
12	2180	Wonhyeong	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51493)	1990
13	2194	Aeneutari1	<i>P. ostreatus</i>	Japan (KMACC51506)	1979
14	2183	Wonhyeong2	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51496)	1990
15	2240	Wonhyeong3	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52342)	1994
16	2228	Chunchu1	<i>P. ostreatus</i>	China (KMACC51529)	1994
17	2344	Chunchu2	<i>P. ostreatus</i>	Netherland (KMACC51632)	1995
18	2706	Heukpyeong	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52328)	2001
19	2535	Byeongneutari1	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51778)	2000
20	2506	Gyunhyeop1	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KACC360)	2000
21	2505	Oknong1	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KACC359)	2000
22	2477	Heukjinju	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51724)	1999
23	2487	Cheongpung	<i>P. ostreatus</i>	Korea	1999
24	2488	Myeongweol	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51732)	1999
25	2504	Suhan	<i>P. ostreatus</i>	China (KACC358)	2000

Table 1. Continued

Lane no.	ASI* no.	Commercial name	Species	Source	Year
26	2549	Sinnong94	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52282)	2000
27	2595	Suhan2	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51818)	2001
28	2596	Suhan3	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52325)	2001
29	2598	Sinnong46	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51820)	2001
30	2594	Ilseong2	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51817)	2001
31	2597	Sinnong8	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC51819)	2001
32	2593	JanganPK	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52326)	2001
33	2707	Kimjae9	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52311)	2001
34	2708	Kimjae10	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52312)	2001
35	2709	Jangan2	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52313)	2001
36	2710	Heungrim1	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52314)	2001
37	2711	Jangan3	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52315)	2001
38	2717	Nongmin1	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52320)	2002
39	2718	Kimjae7	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52321)	2002
40	2719	Kimjae8	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52322)	2002
41	2721	Jangan5	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2002
42	2722	Jangan6	<i>P. ostreatus</i>	Korea (KMACC52324)	2002
43	2724	Nongong99	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
44	2725	DH1012	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
45	2726	Sinnong11	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
46	2727	Sinnong12	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
47	2728	Sinnong13	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
48	2729	Cheongdo21	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
49	2730	Cheongdo22	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
50	2731	Wangheukpyeong	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
51	2732	Nongong98	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
52	2733	Chiak3	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
53	2734	Chiak4	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
54	2735	Bupyeongkirin2	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
55	2736	Bupyeongheukdan4	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
56	2737	Sodam	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
57	2738	Heukbaek	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2003
58	2785	Bupyeongsoyeop1	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
59	2786	Bupyeongbokhoe	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
60	2788	Jangan7	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
61	2789	Samguhwanghak	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
62	2790	SamguPJ	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
63	2791	Samgu01	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
64	2794	Chiak5	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
65	2795	Chiak7	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
66	2796	Samgu5	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
67	2797	Samgu8	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
68	2787	Yeongnong1	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004

Table 1. Continued

Lane no.	ASI* no.	Commercial name	Species	Source	Year
69	2792	Hanra1	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
70	2793	Hanra2	<i>P. ostreatus</i>	Korea	2004
71	2016	Sacheol	<i>P. florida</i>	Germany (KMACC51361)	1976
72	2181	Sacheol2	<i>P. florida</i>	Thailand (KMACC51494)	1990
73	2070	Yeoreum	<i>P. sajor-caju</i>	India (KMACC52247)	1982
74	2333	Yeoreum2	<i>P. sajor-caju</i>	Korea (KMACC51621)	1995
75	2479	Sambok	<i>P. sajor-caju</i>	Korea (KMACC52343)	1999
76	2079	Jeonbok1	<i>P. abalonus</i>	Thailand (KMACC50312)	1982
77	2302	Keunneutari1	<i>P. eryngii</i>	Japan (KMACC51595)	1995
78	2394	Keunneutari3	<i>P. eryngii</i>	Japan (KMACC52327)	1997
79	2720	Baeksongi	<i>P. nebrodensis</i>	Korea (KMACC52323)	2002
80	2859	Noeul	<i>P. salmoneostramineus</i>	Korea	2007
81	2858	Geumbit	<i>P. cornucopiae</i> var. <i>citrinopileatus</i>	Korea	2007

*ASI, Agricultural Sciences Institute, Suwon, Korea; KACC, Korea Agricultural Culture Collection; MKACC, Mushroom Korea Agricultural Culture Collection; Year, Collected year

수분을 제거한 뒤 균사를 동결 건조시킨 후 마쇄하여 본 실험에 사용하였다. DNA는 TOYOBO사의 Mag Extractor (Plant DNA purification kit, Osaka, Japan)를 이용하여 TOYOBO사에서 제공하는 방법에 따라 실시하였으며, 최종적으로 부피는 100 µl가 되도록 용출액을 사용하여 bead에서 DNA를 추출하였다.

RAPD primer

Operon primer (10 mer)는 OPAX 20개, OPB 18개, OPI 20개, OPF 20개, OPD 20개, OPA 16개, OPH 17개, OPG 20개, OPJ 20개, OPC 19개, OPE 20개 그리고 OPO 18개로 총 228개를 사용하였으며, PCR 조건은 다음과 같다. PCR을 위한 reaction mixture의 조성은 Genet Bio PCR Premix kit (Genet Bio, Korea)를 이용하여, Premix kit에 genomic DNA 50 ng 2 µl, primer 100 ng 1 µl, DDW 7 µl를 첨가하였다. PCR 증폭반응은 ABI PCR SYSTEM 9700을 사용하였고, 첫 번째 단계인 pre-denaturation은 94°C에서 5분 1 cycle, 두 번째 단계에선 denaturation 94°C 1분, annealing 35°C 1분, extension 72°C 2분으로 총 40 cycles 수행하고, 세 번째 단계인 post-extension은 72°C에서 10분간 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1× TAE (40 mM Tris; pH 8.0, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA) 완충용액에서 1.5%의 agarose gel로 전기영동한 후 ethidium bromide (Sigma, USA) 용액으로 염색하여 UV transilluminator상에서 나타나는 DNA band pattern을 확인하였다.

품종 특이 PCR 산물의 cloning

Operon primer로 PCR을 수행한 후 전기영동하여 UV transilluminator에서 품종 특이 band 여부와 사이즈를 확인한

뒤 원형 품종만의 특이 DNA band를 Gel extraction kit (Takara, Japan)를 이용하여 DNA를 추출하였으며, PCR 산물의 cloning 방법은 다음과 같다. Elution한 각 DNA를 pGEM- T easy vector system (Promega, USA)을 이용하여 ligation 하였다. 먼저 1 µl DNA와 1 µl pGEM- T easy vector, 1 µl T4 DNA ligase 그리고 5 µl T4 Rapid 2× buffer, 2 µl 3차 멸균수를 첨가하여 4°C에서 14시간 반응시켰다. 각 DNA fragment를 cloning하기 위하여 10 µl ligation mixture를 competent cell (JM109) 100 µl에 혼합하여 ice에 10분 두었다가 실험하였다. 유전자가 삽입된 transformant를 선별하기 위해서 100 µg/ml의 ampicillin (Sigma Co., USA), 100 µl isopropylthio-D-galactoside (IPTG, 100 mM, Promega, USA)와 20 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal, 50 µg/ml, Sigma Co., USA)가 첨가된 LB배지 (10 g bacto trypton/L, 5 g bacto yeast extract 10 g/L, bacto agar 15 g/L)에 도말하였다. 그리고, 37°C에서 16시간 배양한 후 positive clone으로부터 white colony를 선발하였다.

*E. coli*에 형질전환된 clone을 ampicillin (100 µg/ml, Sigma Co., USA)이 첨가된 LB액체배지 5 ml에 접종하여 37°C에서 약 18시간동안 진탕 배양한 후 원심 분리하여 얻은 pellet에 plasmid extraction kit (Omega Bio-Tek, USA)를 이용하여 250 µl resuspension buffer를 넣고 vortex 한 후 neutralization buffer 250 µl를 넣어주고, lysis buffer 250 µl를 넣은 후 원심 분리하여 침전물을 제거했다. Isopropanol을 상층액의 1/7 volume으로 넣고 천천히 섞이게 한 후 원심 분리하여 DNA를 침전시키고 70% 에탄올로 침전물을 세척한 후 상온에서 건조시키고 3차 멸균수 20 µl를 넣어 DNA를 녹였다. DNA를 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

품종 특이 band의 cloning 확인

원형 품종의 특이 band가 SCAR marker로 개발될 수 있는 band인가를 확인하기 위하여 이들 특이 단편들을 PCR 단편의 cloning이 가능한 pGEM- T easy vector에 cloning 하였다. 분리된 plasmid에서 cloning이 정확하게 되었는지 확인하기 위해 제한효소인 *EcoRI* 을 이용하여 분리된 plasmid DNA 1 µl, 1U *EcoRI* (TOYOBO Biochemicals, Osaka, Japan), 10× buffer 2 µl, 멸균수 6 µl와 혼합하여 전체 양을 10 µl로 하여 37°C에서 1~2시간 반응시킨 후 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 cloning이 되었음을 확인하였다.

SCAR marker 제작 및 염기서열 분석

SCAR marker 개발을 위한 primer 제작은 Primer 3 (Whitehead Institute/MT center) program을 사용하여 GC 함량이 40~60%이고, annealing 온도가 약 55°C가 되도록 20~22 mer forward와 reverse primer를 design 하였으며, primer 합성은 (주) 바이오니아에 의뢰하였다. 특이 band를 기초로 하여 만들어진 각각의 primer가 SCAR marker 이용이 가능한지 확인하기 위해 genomic DNA로부터 PCR을 수행하여 얻은 증폭산물의 SCAR marker로의 활용여부를 확인하였다. Bioneer PCR Premix (Bioneer, Korea)에 genomic DNA 100 ng과 primer 10 pmole, 그리고 DDW를 첨가하여 전체 20 µl의 혼합액을 제조하였다. PCR 실행 조건은 ABI PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems, Germany)을 이용하여 94°C에서 5분간 pre-denaturation 한 후 94°C에서 1분간 denaturation 하였다. Annealing 단계는 55°C에서 1분간 실행하였으며, extension은 72°C에서 2분간 실시하고 총 35 cycle을 반응하였으며, final extension은 72°C에서 10분간 실시하였다. Annealing 온도와 cycle 수는 PCR band 상태에 따라 조건을 다르게 하여 수행하였다. marker의 명확성의 여부는 PCR product size에서 나타나는 특이 band의 유무로 결정할 수 있었다. 특이적인 단편에 대한 각각의 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 설치되어 있는 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)에서 BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool-N)과 BLASTX (Basic Local Alignment Search Tool X)로 상동성 검색을 실시하였다.

SCAR marker로 PCR하여 생성된 특이 band들에 대한 염기서열을 밝혀낸 후 이를 토대로 EMBL EBI (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>)에서 온라인으로 제공하는 CLUSTALW (version 2.05) program을 이용하여 multiple sequence alignment를 수행하였다.

결 과

느타리 품종의 RAPD 분석

PCR 과정을 통하여 증폭된 RAPD fragment는 약 100~4000 bp 사이의 구간에서 관찰되었다(Fig. 1). 실험에

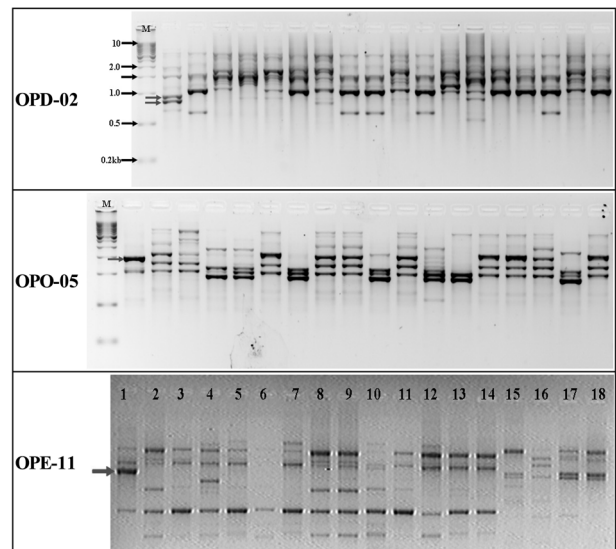


Fig. 1. RAPD polymorphism of *Pleurotus ostreatus* amplified by 10-based Operon primers. Lanes 1: 2180, 2: 2344, 3: 2504, 4: 2851, 5: 2830, 6: 2827, 7: 2477, 8: 2487, 9: 2488, 10: 2710, 11: 2711, 12: 2717, 13: 2730, 14: 2731, 15: 2732, 16: 2786, 17: 2790, 18: 2791. Arrows indicate strains-specific bands.

사용된 Operon primer (Operon Technologies, INC.) 228개 중에서 원형 품종에서만 특이적으로 나타나는 PCR 산물이 19개 관찰되었다. 원형느타리 품종만의 특이한 band를 가지는 primer는 OPAX-13, OPD-02, OPI-13, OPH-04, OPH-07, OPB-16, OPH-09, OPH-11, OPH-16, OPH-15, OPG-09, OPJ-03, OPJ-07, OPH-20, OPE-05, OPE-11, OPF-09, OPF-19 및 OPO-05였다.

원형 품종 특이 SCAR marker 개발

원형 품종 특이적인 DNA fragment는 1535 bp의 염기로 구성되어 있었다. 본 연구에서 primer를 합성한 방법은 RAPD 분석에서 원형느타리 품종에서 특이적으로 생산된 PCR 산물의 염기서열정보를 기초로 하여 RAPD primer 염기서열 부분을 함께 넣어 20~22 bp를 SCAR PCR을 위한 새로운 primer로 합성하였는데, 즉 10 bp의 RAPD primer에 안쪽에서 끝으로 10 bp 내지 12 bp의 염기를 추가하여 제작하였다(Fig. 2).

Table 2는 원형 품종 특이 clone을 nucleotide sequence와 amino acid sequence 수준에서 상동성 검색을 한 결과이다. BLASTN 검색결과 2180 clone (120 bits) nucleotide sequence는 역전사효소를 coding하는 나도가독송이버섯인 *Tricholoma bakamatsutake*의 pol gene과 68% 상동성(E value $2e^{-23}$)을 보였다. 또한, 아미노산 염기서열 분석에서는 *Tricholoma bakamatsutake*의 reverse transcriptase와 52% 상동성(E value $1e^{-115}$)을 나타냈으며, *Coprinopsis cinerea*의 conserved hypothetical protein과 54%의 상동성(E value $1e^{-109}$)을 보였다.

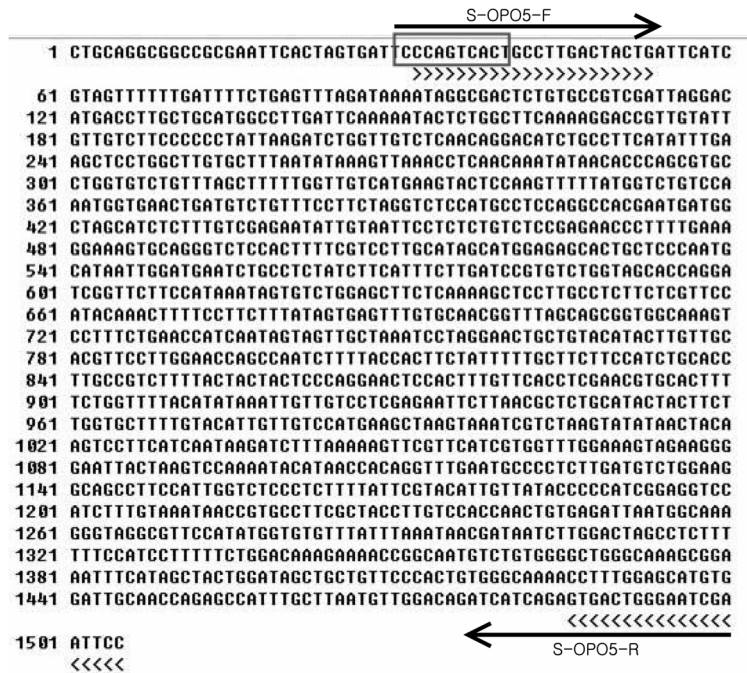


Fig. 2. Nucleotide sequences of 2180 clone. S-OPO5 (F) and S-OPO5 (R) primer sequences for a SCAR marker are shown as arrows. Sequences of OPO-05 primer used in RAPD analysis are red box.

Table 2. Putative alignments of nucleotide and protein sequence encoded by ASI 2180 clone

Algorithm	Significant alignments	Score (bits)	E value
BLASTN	AB036886: <i>Tricholoma bakamatsutake</i> pol gene for reverse transcriptase, partial cds	120	2e ⁻²³
	BAA92704: reverse transcriptase [<i>Tricholoma bakamatsutake</i>]	236	1e ⁻¹¹⁵
BLASTX	XP_001835330: conserved hypothetical protein [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	242	1e ⁻¹⁰⁹
	XP_001835233: hypothetical protein CC1G_07776 [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	241	4e ⁻¹⁰⁵

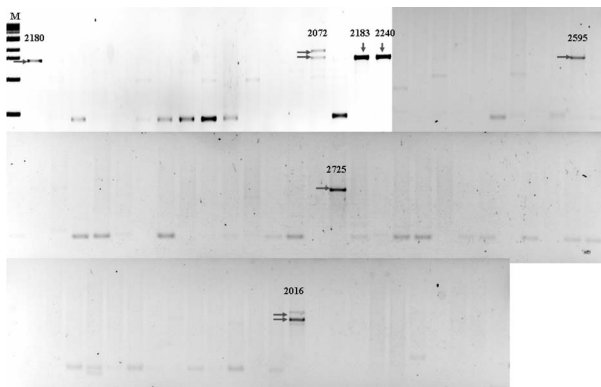


Fig. 3. SCAR-PCR product of *Pleurotus* spp. DNA amplified by 'S-OPO5' primer. 1436 bp SCAR markers were detected in 2180, 2183, 2240, 2595, 2725. Arrows indicate the specific SCAR markers.

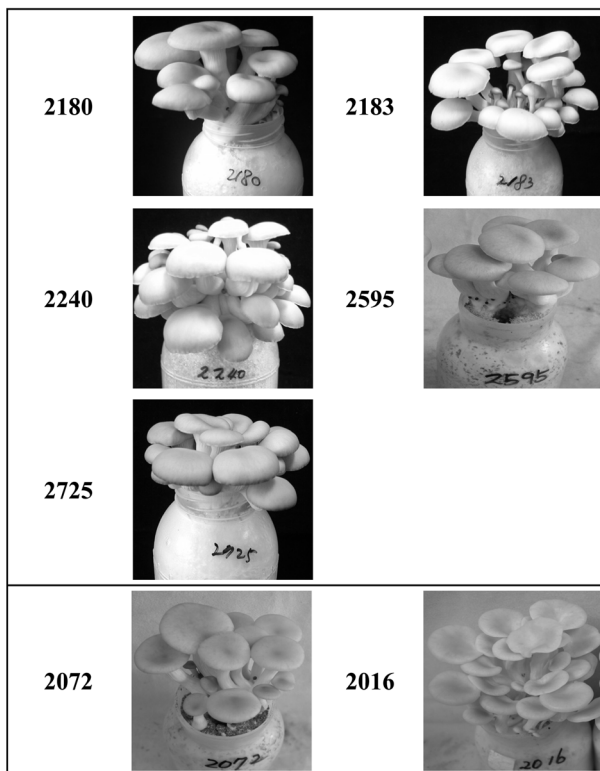
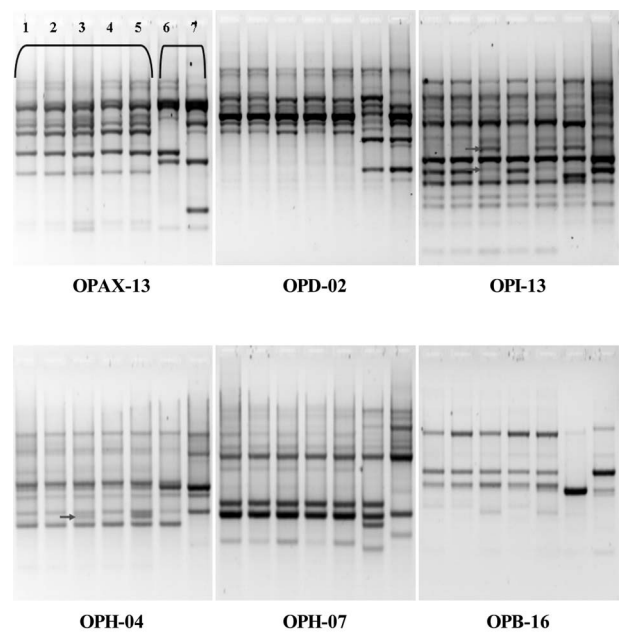
SCAR marker 개발은 특정 품종에만 나타나는 특이 band를 DNA marker로 개발하는 것으로 실험에 사용하지 않았던 다른 품종에서 동일한 band가 나타나는 경우도 발생할 수 있기 때문에 본 연구에서는 공시품종수를 느타리버섯류

(*Pleurotus* spp.) 81품종으로 하여 실험오차를 줄이고자 하였다. Table 3은 18품종에 대한 RAPD 분석에서 원형 느타리 특이 band를 보이는 Operon primer OPO-05 (5'-CCCAGTCACT-3')로부터 제작된 SCAR primer로 느타리 81 품종에 대해 PCR 분석한 결과이다. 본 연구에서 제작한 'S-OPO5' marker (F: 5'-CCAGTCACTGCTTGACTACTG-3', R: 5'-GGAATTCGATTCCCAGTCAC-3')는 다양한 느타리 품종에서 1436 bp, 1428 bp 그리고 450 bp 부분에서 band가 나타났다. 1436 bp 부분에서 band가 나타난 품종은 *P. ostreatus*에 속하는 2180, 2183, 2240, 2595, 2725 품종이었으며 2072, 2016 품종은 1428 bp와 1436 bp 부분에서 두 개의 PCR band를 보유하였다. 여기서 2072, 2016을 제외한 5균주들은 URP-PCR 분석 (서 등, 2008) 결과에서 고도의 근연적 관계를 이루고 있는 것으로 확인된 균주들이다.

Fig. 4는 제작한 'S-OPO5' primer로 PCR한 결과 공통된 같은 band를 보인 균주들의 자실체 형태를 비교한 사진이다. 사진에서 보는 바와 같이 7품종의 갓 색깔은 밝은 회색으로 거의 비슷한 색깔을 나타내었고, 갓 형태를 보면 2072, 2016을 제외한 5품종에서 모두 깔때기와 우산형의 중간형인 반구

Table 3. Nucleotide frequencies and alignment score of PCR product produced by 'S-OPO5' primer

Strain		Score
2016-1 (upper band)	2016-2	92
2016-1	2180	99
2016-1	2183	99
2016-1	2725	99
2016-2 (under band)	2180	92
2016-2	2183	92
2016-2	2725	92
2180	2183	99
2180	2725	99
2183	2725	99
Strain	T (U) (%) C (%) A (%) G (%) Length (bp)	
2180	33.8 23.1 23.5 19.6	1434
2183	33.7 23.1 23.7 19.4	1436
2725	33.8 23.0 23.8 19.4	1438
2016 (upper band)	33.7 23.0 23.7 19.5	1438
2016-2 (under band)	32.9 23.4 23.7 20.1	1426
Avg.	33.6 23.1 23.7 19.6	
S.D	0.38 0.16 0.11 0.29	
C.V	1.14 0.71 0.46 1.49	

**Fig. 4.** Fruitbodies of two *Pleurotus* strain groups showing same bands amplified by 'S-OPO5' primer.**Fig. 5.** RAPD fingerprinting patterns of two *Pleurotus* strain groups amplified by Operon primers. Lanes 1: 2180; 2: 2183; 3: 2240; 4: 2595; 5: 2725; 6: 2072; 7: 2016.

형으로 갓이 등근 모양을 보였다. 2072, 2016 품종은 double band를 나타낸 품종들로서, 2016의 경우 갓의 모양은 깔때기형으로 다발 형성이 잘되고 갓의 색깔은 연황색이나 고온에서는 점차 백색에 가까워지는 특성이 있다. 위 7가지 품종을 대상으로 Operon primer로 PCR하여 band pattern을 조사하였다(Fig. 5). 2180, 2183, 2595 품종은 6가지 primer로 PCR한 결과 모두 같은 band 양상을 보였으며, 2240과 2725는 원형 품종과 band pattern이 매우 유사하지만 OPI-13과 OPH-04에서 약간 다른 band pattern이 관찰되었다. 이 결과는 이전에 서 등(2008)이 보고한 URP-PCR 분석결과와 일치하였다. 본 연구에서 원형 품종 특이 marker로 개발한 'S-OPO5' primer는 품종의 유전적 특성과 생태형이 비슷하며, 품종육성에 이용된 교배모본의 계보가 유사한 품종들간에 나타난 band인 것으로 분석되었다. Specific primer 'S-OPO5'로 증폭된 band들 중 2180과 다른 위치에서 나타난 2016 품종의 band는 2180과 2016이 염색체상의 다른 allele에 위치하기 때문에 나타났으며, 2016이 2180의 모균주이므로 생성된 증폭산물로 추정되었다. 따라서 'S-OPO5' marker는 원형 유사품종을 구분하는데 이용할 수 있으며, 품종간에 특이성 지표로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

'S-OPO5' SCAR PCR 산물의 염기서열 분석

균주번호 2180을 포함한 총 4개 품종에서 1436 bp 부위와 1428 bp 부위에 나타난 PCR band의 염기서열을 확인하여 품종간 차이를 비교하였다. 2180, 2183, 2725, 2016 품종의 특이 band DNA 염기서열을 분석한 결과는 Fig. 6에 있다.

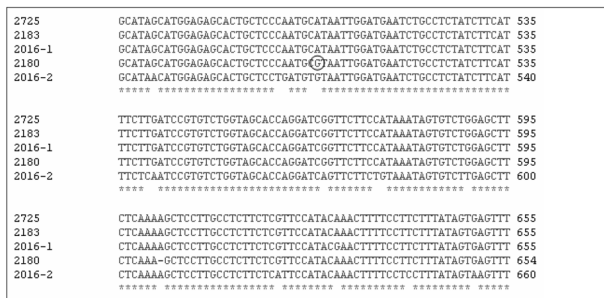


Fig. 6. Multiple sequence alignment of 'S-OPO5' PCR band nucleotide by the CLUSTALW program. The asterisk in the sequences denote same nucleotide state as the all taxon.



Fig. 7. UPGMA tree based on 'S-OPO5' PCR band sequence of *Pleurotus* species.

2180과 동일 band를 보인 품종들의 염기서열은 511 bp 부분에서 G 염기가 A 염기로 바뀐 것을 제외하고는 모두 같았다. Table 3은 4품종의 특이 band DNA의 염기서열이 얼마나 같은지를 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>에서 CLUSTALW로 분석한 결과이다. 같은 위치에서 band를 보인 품종들 간에는 99%의 상동성을 보였으나 다른 위치의 band를 나타낸 2016 품종의 under band (2016-2)의 경우는 92%로 낮은 상동성을 보였다. 'S-OPO5' primer의 PCR 결과 생성된 band들에 대한 nucleotide 빈도를 살펴보면 사철느타리인 2016에서 원형 품종과 같은 위치에서 나타난 2016-1 band의 경우 4개의 염기 비율이 원형 품종과 같은 위치에서 band를 나타낸 다른 품종들과 거의 같은 비율로 나타났지만 2016-2 band의 경우 T와 G 염기의 비율에서 차이가 나는 것을 볼 수 있다(Table 3). Fig. 7은 특이 band들을 sequencing하여 CLUSTALW multiple alignment 방법으로 각 품종의 결정된 염기서열을 정렬한 후 UPGMA법으로 분석한 결과이다. 이 결과 2180과 같은 위치에서 band를 보인 품종들은 모두 매우 밀접한 유연관계를 보였고 double band를 나타낸 2016의 아래 band (2016-2)의 sequence는 2180과 거리가 있음을 보였다.

'S-OPO5' primer로 PCR한 후 균주번호 2180, 2183, 2725, 2016의 특이 band를 sequencing하여 이 결과로 NCBI에서 제공하는 BLASTN program을 이용하여 등록되어 있는 nucleotide와의 일치성을 분석하였으나 일치되는 보고를 찾을 수 없었다. 따라서 BLASTX program을 이용하여 단백질 아미노산서열 수준에서 상동성 검색을 한 결과를 보면 2183, 2725, 2016 품종들의 단백질은 재목물버섯인 *Coprinus cinereus*의 hypothetical protein, 송이속에 속하는 *Tricholoma*

*bakamatsutake*의 reverse transcriptase와 72% 이상의 유사성을 보였다. 그러나 2180 품종은 *Tricholoma bakamatsutake*의 reverse transcriptase와 334개의 아미노산중 232개가 일치하여 69%의 유사성을 나타내 다른 품종들과 차이를 보였다. 품종은 gap도 다른 품종들과 비교하여 많은 편이었고, 2180 품종의 아미노산과 hypothetical protein의 아미노산 서열이 일치하는 정도를 나타내는 identity 값은 50%를 나타내어 다른 품종들보다 상동성이 적었다. Positive는 아미노산 서열간의 유사성 정도를 나타내는데, 2180 품종은 hypothetical protein과 65%의 유사성을 보였고, *Tricholoma bakamatsutake*의 reverse transcriptase와는 69%의 유사성을 보여 다른 품종들이 이들 2개의 아미노산 서열과 70% 이상의 유사성을 보인 것보다 상동성 정도가 낮았다 (data not shown). 본 연구에서는 'S-OPO5' SCAR PCR 산물을 대상으로 염기서열 분석을 한 결과 1436 bp 부근에서 단일 band를 보인 품종들은 nucleotide sequence도 99% 상동성을 보여 매우 유사하였으며 UPGMA 분석결과 명확하게 동일 분류군으로 분류되었다. 이들 nucleotide 염기서열은 NCBI database에서 상동성이 있는 유전자를 찾을 수 없었으며, 아미노산 서열을 분석한 결과 NCBI database내에 존재하는 모든 유전자들 중 송이 속에 속하는 *Tricholoma bakamatsutake*의 reverse transcriptase (Accession no. AB036886.1)와 가장 상동성이 높은 것으로 나타났다(data not shown).

고 찰

원형 품종 특이 marker로 제작한 것이 'S-OPO5' primer이다. 이 marker를 사용하여 PCR 분석을 하면 약 1436 bp 부분에서 단일 band가 나타나는데 이 band가 나타난 2183, 2240, 2595, 2725 품종들은 형태적 특성이 2180(원형)과 닮았고, nucleotide sequence도 99% 상동성을 보여 이 SCAR marker를 원형느타리와 유사한 품종을 구분하는 marker로 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 동일 band를 나타낸 이들 품종의 육성경위나 품종명은 종균배양소에서 동일품종인 것을 다르게 명칭하였거나 2180 품종을 조직배양한 것으로 추측된다. 또한, 여러가지 분자 marker를 이용한 실험에서 이러한 품종들은 고도의 근연관계를 보여, 공통모계에서 비롯되었을 것으로 사료된다.

느타리버섯은 지금까지의 계통선발이나 교잡에 의한 육종과 원형질체 융합에 의한 신품종 육성방법을 이용하고 있다. 본 연구에서 제작하여 사용한 'S-OPO5' SCAR marker PCR에서 생성된 특이 band들 중 2180 (원형)은 *P. ostreatus*에 속하는 품종으로 2018과 2016의 원형질체를 융합하여 p5를 선발하고, 다시 p5와 2001을 원형질체 융합하여 육성된 품종이며, 2016 (사철)은 *P. floridae*에 속하는 품종으로 2180의 모균주이다. 원형품종과 같은 band를 보인 2183은 2180과 동일한 방법으로 얻어진 원형질체 융합체중 하나이며, 2240은 2180과 2027을 원형질체 융합하여 육성된 품종이다.

또한, 2072와 2016 품종은 같은 위치에서 double band를 보였는데, 2072는 2018과 2016을 교배하여 얻은 품종으로 다수성인 특징을 가지고 있다. 이러한 품종육성 경위로 볼 때 2016 품종이 2180과 같은 위치에서 band가 나타난 것은 2016이 2180의 교배모본이므로 유사한 유전형질이 있기 때문인 것으로 판단되며, Paran과 Micheltore (1993)가 dominant RAPD locus를 codominant SCAR locus로 전환하는 것이 가능하며, RAPD 다형성은 primer가 인식하는 부위의 불일치로 생성되므로, 길이가 상대적으로 더 긴 SCAR primer를 사용함으로써 원래 양친 모두의 증폭산물을 얻을 수 있다고 보고한 내용과 일치한다. 실제로, 2016 품종의 PCR 산물에서 원형 품종과 같은 위치에서 나타난 band의 DNA 염기서열을 분석한 결과 99%의 상동성을 보였다.

원형 품종 특이적인 SCAR marker로 개발한 'S-OPO5' primer는 1436 bp 부분에서 원형 유사품종인 2183, 2240, 2595, 2725 품종에서만 특이적으로 단일 band를 보였다. 이들 원형 유사품종들의 SCAR PCR 산물을 대상으로 염기서열 분석을 한 결과 nucleotide 염기서열은 NCBI database에서 상동성이 있는 유전자를 찾을 수 없었으며, 이들 5품종간의 nucleotide sequence는 99% 상동성을 보여 매우 유사하였다. 아미노산 서열을 분석한 결과는 NCBI database내에 존재하는 모든 유전자들 중 송이속에 속하는 *Tricholoma bakamatsutake*의 reverse transcriptase와 가장 상동성이 높은 것으로 나타났다.

본 연구에서는 느타리 품종 중 원형느타리를 구분할 수 있는 marker를 개발하여 유사품종을 구분할 수 있는 기준을 제시하였으며, 이는 품종 판별을 위하여 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

적요

원형느타리버섯의 자실체는 다발형성이 잘되고 갓 색깔이 회색이면서 수량성이 높은 중요한 품종이다. 저자들은 핵산 지문법을 이용하여 느타리종에 속하는 70품종을 3 그룹으로 나누고 이 중 원형품종이 속한 그룹 35개 품종 중 원형품종과 동일하거나 구별성이 인정되지 않는 4개 품종을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 이들 품종을 구분할 수 있는 원형 품종 특이 분자마커를 개발하였다. 원형 품종 특이적인 SCAR marker로 개발한 'S-OPO5' primer는 1436 bp 에서 원형 유사 품종인 2183, 2240, 2595, 2725 품종에서만 특이적으로 단일 band를 보였다. 이들 원형 유사품종들의 SCAR PCR 산물을

대상으로 염기서열 분석을 한 결과 nucleotide 염기서열은 NCBI database에서 상동성이 있는 유전자를 찾을 수 없었으며, 이들 5품종간의 nucleotide sequence는 99% 상동성을 보여 매우 유사하였다. 아미노산 서열을 분석한 결과는 NCBI database내에 존재하는 모든 유전자들 중 송이속에 속하는 *Tricholoma bakamatsutake*의 reverse transcriptase와 가장 상동성이 높은 것으로 나타났다. 본 연구를 통하여 개발된 원형특이 마커는 정확한 품종구분이 요구되는 중균유통 과정에서 원형계통 품종을 구분하는 유용한 마커로 이용될 것으로 기대된다.

참고문헌

- 서경인, 장갑열, 유영복, 박순영, 김광호, 공원식. 2008. Universal Rice Primer (URP)에 의한 DNA 핵산지문법을 이용한 느타리의 유통 품종간 구분. 한국 균학회지. 36(2):130-137.
- 유영복, 공원식, 장갑열, 정종천, 오세종, 전창성. 2008. 버섯산업의 현황과 발전방향. pp 488. In: 2008년 농업환경분야 학술대회. 농촌진흥청 농업과학기술원.
- Cutler, R. W., Chundet, R., Handa, T. and Anuntalabhochai, S. 2006. Development of sequence characterized DNA markers linked to a temperature dependence for flower induction in lychee (*Litchi chinensis* Sonn) cultivars. *Scientia horticulturae* 107(3):264-270.
- Dedryver, F., Jubier, M. F., Thouvenin, J. and Goyeau, H. 1996. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene Lr24 in different wheat cultivar. *Genome* 39:830-835.
- Hongyan, Su, Lei, W., Yihe, G., Ermei, F., Jie, S. and Linde, L. 2007. Development of strain-specific SCAR markers for authentication of *Ganoderma lucidum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-007-9579-0.
- Lang, N. T., Subudhi, P. K., Virmani, S. S., Brar, D. S., Khush, G. S., Li, Z. and Huang, N. 1999. Development of PCR based markers for thermosensitive genetic male sterility gene tms3(t) in rice (*Oryza sativa* L.). *Heredity*. 131:121-127.
- Lee, G. P., Lee, C. H. and Kim, C. S. 2004. Molecular markers derived from RAPD, SCAR, and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *Pyrus pyrifolia* and *P. communis*. *Theor. Appl. Genet.* 108:1487-1491.
- Negi, M. S., Devic, M., Delsenny, M. and Lakshmikumaran, M. 2000. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR markers for rapid selection. *Theor. Appl. Genet.* 101:146-152.
- Paran, I. and Micheltore, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based, markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Yoo, Y. B., Kong, W. S., Oh, S. J., Cheong, J. C., Jang, K. Y. and Jhune, C. S. 2005. Trends of mushroom science and mushroom industry. *Korean J. Mushroom Sci.* 3(1):1-23.