

팽이버섯(*Flammulina velutipes*)의 Genome-wide SNP (Single Nucleotide Polymorphism)에 의한 계통 분석

우성이^{1,3} · 김은선¹ · 한재구¹ · 장갑열¹ · 신평균¹ · 오연이¹ · 오민지¹ · 조성환² · 이정희² · 김경수³ · 공원식^{1,*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ²씨더스, ³강원대 응용생물학과

Genome-wide Single Nucleotide Polymorphism-based Assay for Phylogenetic Relationship of the *Flammulina velutipes*

Sung-I Woo^{1,3}, Eun-Seon Kim¹, Jae-Gu Han¹, Kab Yeul Jang¹, Pyung-Gyun Shin¹, Youn-Lee Oh¹, Min Ji Oh¹, Sung-Hwan Jo², Jeong-Hee Lee², Kyung-Soo Kim³ and Won-Sik Kong^{1,*}

¹Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Eumsung 27709, Korea

²SEEDERS, Daejeon 34015, Korea

³Department of Applied Biology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

ABSTRACT : Genome-wide reanalyzed data of 25 *Flammulina* strains were compared against the reference genome (KACC42780) to establish a genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP). The rate of mapping differences between the strains reflected in the strain variation in its result. Genome-wide SNPs distribution divided into types of homozygous SNP and heterozygous SNP moreover all of the strains demonstrated a wide variation in all of the regions. In the further study of topological relationship between the collected strains, phylogenetic tree was separated into 3 major groups. Group 1 contained *F. velutipes* var. related strains of ASI 4062, 4148, 4195. Group 2 contained strains that are different species of ASI 4188 *F. elastica*, ASI 4190 *F. fennae*, and ASI 4194 *F. rossica*. The other 19 strains *F. velutipes* were classified as a single group. However, further experiment to discriminate its genetic relationship between the white group and brown group did not verify its validity. The inferred tree exhibited a phylogenetic relationship between Korea white fruitbody forming strains of ASI 4210, 4166, 4178 and Japan white fruitbody forming strains of ASI 4209, 4167 confirmed to be genetically closely related.

KEYWORDS : *Flammulina velutipes*, SNP, Single nucleotide polymorphisms, Phylogenetic analysis

서 론

팽이버섯(*Flammulina velutipes*)은 국내에서 이용되는 대

표적인 담자균류 주름버섯목(Agaricales) 팽나무버섯과(*Phy-salacriaceae*)에 속하는 버섯으로 연중 재배 및 대량 생산이 가능하여 시기에 관계없이 항상 식용 가능하다[1]. 팽이버섯은 winter mushroom이라고도 알려져 있는데 이는 팽이버섯의 자실체가 4~12°C의 저온에서 발생되며 자연상태에서는 11월에서 다음해 4월 사이의 겨울철에 발생하는 것에 기인한다[2]. 팽이버섯은 일본에서 에노키다케라고 불리우며 저온성 버섯으로 분포지역 중 특히 아시아에서 많이 재배되고 있다[3]. 농림축산식품부 자료에 의하면 2014년도 한국의 팽이버섯 생산량은 33,259 톤으로 느타리, 큰느타리버섯에 이어 세 번째로 높았다. 2014년도 버섯류 수출통계를 보면 팽이, 새송이, 느타리, 송이, 표고, 영지, 양송이, 목이, 기타 순으로 수출하였으며, 수입은 표고, 송이, 양송이, 목이, 영지, 송로, 느타리, 새송이, 기타 순이었다. 팽이버섯의 수출량이 가장 많아(10,236 M/T, 18,131,000달

Kor. J. Mycol. 2015 December, 43(4): 231-238
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2015.43.4.231
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

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

Received November 9, 2015
Revised December 11, 2015
Accepted December 16, 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.

러), 한국의 팽이버섯이 산업적으로 중요하다는 것을 알 수 있다. 지금까지 한국의 팽이버섯 품종은 주로 일본에서 개발된 품종을 도입하여 우리의 재배조건에 적합한 계통을 선발하여 사용해 왔다. 그러나 이들 일본계 백색품종의 유연관계는 매우 가까우며[4], 최근 국내에서 육성된 백색품종이 보급되고 있어 버섯 자원의 주권 및 로열티 문제에서 버섯 자원의 유연관계 분석이 중요하였다[5]. 일반적으로 유연관계분석은 ribosomal DNA중에서 5.8S를 포함하는 internal transcribed spacer (ITS) 부위의 염기서열을 주로 비교하였다. 이는 염기서열을 결정하기가 간편하고 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 풍부한 정보량과 간편성으로 동일 속 내의 종간 및 속간의 유연관계의 연구에 유용하였기 때문이다[6]. 이번 연구에서는 본 연구진이 최초로 작성한 팽이버섯의 표준유전체 정보를 바탕으로[7], 팽이버섯 유전자원 중

대표적인 국내외 계통의 유전체 단일염기서열(single nucleotide polymorphism, SNP)을 분석함으로써 유전적 상동성을 밝히고, 유전적으로 매우 유사한 종내 계통간의 형태적 또는 지리적 차이를 분석하였다. 본 연구는 근래 발전되고 있는 유전체 분석기술을 바탕으로 자원의 기원과 품종을 구분하는 분자마커 개발을 위한 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

재료 및 방법

공시균주

공시균주에는 농촌진흥청 버섯과에서 수집 보존 중인 유전자원 중 팽이버섯속(*Flammulina*)에 속하면서 종이 다른 계통, 팽이버섯(*F. velutipes*) 종과 같은 종이지만 variety가 다른 계통, 그리고 동일 종내 수집지역과 특성이 상이한 대표적 계통들을 포함하였다(Table 1).

Table 1. List of *Flammulina* strains used in this study

ASI No.	Collection year	Scientific name	Geographic origin	Color
4188	2011	<i>F. elastica</i>	Korea	LB
4148	2005	<i>F. velutipes</i> var. <i>lactea</i>	Korea	B
4166	2009	<i>F. velutipes</i>	Korea	W
4209	2012	<i>F. velutipes</i>	Japan	W
4178	2010	<i>F. velutipes</i>	Korea	W
4195	2011	<i>F. velutipes</i> var. <i>lupinicola</i>	Korea	LB
4190	2011	<i>F. fenae</i>	Korea	B
4192	2011	<i>F. ononidis</i>	Korea	B
4194	2011	<i>F. rossica</i>	Korea	LB
4062	1994	<i>F. velutipes</i> var. <i>longispora</i>	USA	LB
4049	1993	<i>F. velutipes</i>	Korea	B
4064	1995	<i>F. velutipes</i>	Korea	B
4067	1995	<i>F. velutipes</i>	Korea	B
4083	1994	<i>F. velutipes</i>	Korea	B
4090	1994	<i>F. velutipes</i>	Korea	B
4175	2010	<i>F. velutipes</i>	Korea	B
4103	2003	<i>F. velutipes</i>	Korea	B
4210	2012	<i>F. velutipes</i>	Korea	W
4167	2010	<i>F. velutipes</i>	Japan	W
4069	1995	<i>F. velutipes</i>	Japan	B
4028	1989	<i>F. velutipes</i>	Taiwan	B
4057	1994	<i>F. velutipes</i>	China	B
4072	1997	<i>F. velutipes</i>	China	B
4169	1995	<i>F. velutipes</i>	Japan	B
Mono19	2012	<i>F. velutipes</i> , monokaryon	Korea	-

ASI, Agricultural Sciences Institute; B, brown; LB, light brown; W, white.

Genomic DNA 추출

시험에 사용된 25균주의 Genomic DNA를 분리하기 위하여 potato dextrose agar (PDA)에 균사를 접종하여 25°C의 incubator에서 7일간 배양한 후 균사를 수확하여 동결 건조시킨 후 실험에 사용하였다.

DNA는 1.5 mL 튜브에 샘플의 양을 tube의 0.05~0.1 mL 정도의 위치로 넣고 뚜껑을 닫고 액체 질소에 담아둔다. 샘플을 마쇄하기 위해서 급랭한 샘플들이 녹기 전에 액체질소에서 재빨리 꺼내어 멸균된 막대나 bead를 사용했다. 900 µL 정도 extraction buffer인 cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) buffer를 첨가한 후 샘플들을 다시 vortexing 작업을 했다. Water bath에서 65°C로 1시간 정도 처리한 후 450 µL의 chloroform을 첨가한 후 실온에서 반응시키기 위해서 약 5분 정도 tapping 해준 다음 12,000 rpm, 20°C에서 10~15분 원심분리하였다. 상층액을 600 µL 채취하여 새로운 튜브에 옮긴 후 5 µL RNase-A (10 mg/mL)를 넣고 37°C에서 30분 처리하였다. 처리 후에 600 µL Isopropanol을 첨가하여, 약 1분 정도 tapping 한 후 12,000 rpm, 20°C, 10~15분 원심분리한 후 튜브 아래에 pellet은 남기고 상층액만 버렸다. 500 µL의 70% 에탄올을 첨가하여 12,000 rpm, 20°C, 10분을 원심분리한 후 상층액을 버리고 다시 에탄올 작업으로 두 번씩 씻은 후, 상온에서 약 30분 건조시켜 3차 멸균수를 DNA pellet 양에 따라 조절해서 50~100 µL 정도 넣고 pellet이 다 녹도록 한 후 4°C에 보관했다.

팽이버섯 resequencing data를 이용한 genome-wide SNP 분석

Fig. 1은 팽이버섯 균주간의 계통 분석을 수행하기 위한 분석 절차를 나타낸 것이다. Short read의 정제과정(Solexa QA package)을 통하여 분석 가능한 품질의 데이터를 확보하고[8], read mapping BWA (Burrows Wheeler Aligner)을 통해 각 샘플의 consensus sequence를 추출하였다. SAM (Sequence Alignment/Map) 포맷의 파일을 읽고, 쓰고, 편집하고, 볼 수 있는 program인 SNP detection (SAM tools)을 사용하였다. 그 과정과 variation을 통해 filter된 SNP를 이용하여 팽이버섯 25개 균주의 시퀀스를 multiple sequence alignment (clustalW: 두 염기서열을 비교하는 EBI의 tool) 수행하고, 이후 phylogenetic tree (MEGA6)을 통해 샘플간의 계통적 유연관계를 분석하였다[9].

Sequence 전처리

차세대 염기서열 분석을 통해 생산된 팽이버섯의 sequencing data는 농촌진흥청 버섯과에서 운영하는 공개 데이터베이스(<http://112.220.192.2/mushroom/>)에서 수집하였다.

팽이버섯 25균주는 차세대 염기서열 분석 (Hi-seq 2000; Theragen Etx, Suwon, Korea) 데이터로 구성되었으며, 표준유전체인 KACC42780 (4019-20)과 비교 분석하여 ge-

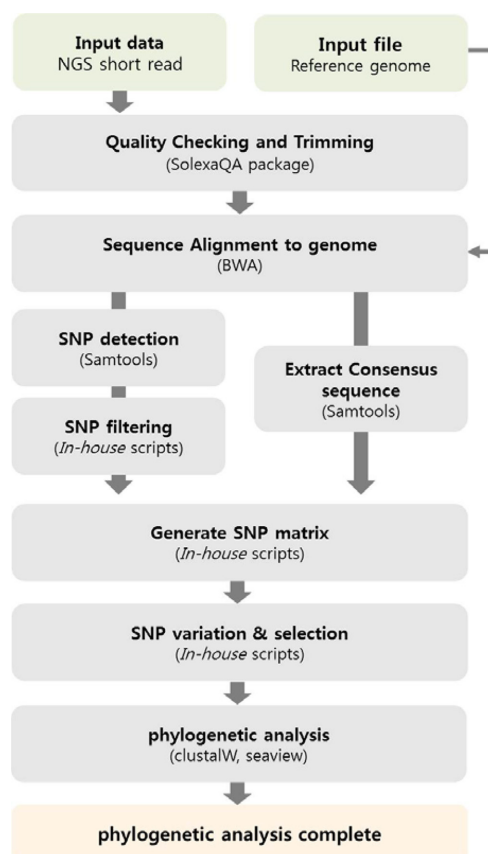


Fig. 1. Flowchart for single nucleotide polymorphism (SNP) detection and selection within *Flammulina velutipes* strains.

nome-wide SNP를 추출하였다[7].

서열의 품질(sequence quality)을 측정하고, 기준 이상 품질의 서열로 filtering 하는 Illumina Hiseq platform/Solexa QA (v.1.13) package의 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 이용하여 전처리 과정을 진행하였다[8]. Dynamic Trim은 phred score에 따라 short read의 양쪽 끝의 bad quality base를 잘라내고 양질의 cleaned read로 정제하는 과정을 수행하였다. LengthSort는 DynamicTrim에서 너무 많은 base가 잘린 read를 제거하는 과정을 수행하였다. Dynamic Trim의 phred score ≥ 20 을, LengthSort 과정은 short read length ≥ 25 bp 작업을 수행하였다[10, 11].

표준유전체의 alignment

BWA는 short read들로 표준유전체(reference genome)에 mapping하는 것이 계통을 위한 가장 기본적인 Bioinformatics의 분석이라고 할 수 있다. 그 전처리 과정을 통과한 cleaned reads를 BWA (0.6.0-r104)을 이용하여 표준유전체로의 alignment를 수행하였고, mapping은 표준유전체와 sequence한 샘플간의 raw SNP(In/Del)를 detection하기 위한 선행 과정으로서 Binary Alignment/Map(BAM) format의 파일을 생성하며, 적용한 옵션은 다음과 같다. Maximum

number of gap extensions (-e) = 50, seed length (-l) = 30, maximum differences in the seed (-k) = 1, number of threads (-t) = 16, mismatch penalty (-M) = 6, gap open penalty (-O) = 15, gap extension penalty (-E) = 8로 설정하였다. 유전체 재분석 데이터는 표준유전체와의 alignment 후에, 각각 1개의 파일로 합친 후, SNP 분석을 진행하였다[12].

Raw SNP detection 및 consensus sequence 추출

BAM과 SAM은 모두 sequence를 저장한 정보를 가지고 있으며, BAM 파일은 SAM 파일과 동일하지만, reference sequence names, length들이 헤더에 포함되어 있다. 또한 프로그램으로 원하는 sequence를 빨리 찾기 위한 indexing 기법을 활용하였다. Clean reads를 표준유전체에 mapping 하여 생성된 BAM format의 파일을 SAMtools (v0.0.16)를 이용하여 raw SNP (IN/Del)을 detection하고, consensus sequence를 추출하였다. SAM tools 사용 옵션 이외에는 기본값을 사용하였다. Minimum mapping quality for SNPs (-Q) = 30, minimum mapping quality for SNPs (-q) = 15, minimum read depth (-d) = 3, minimum read depth (-D) = 100, min indel score for nearby SNP filtering (-G) = 30, SNP within INT bp around a gap to be filtered (-W) = 15, window size for filtering dense SNPs (-W) = 15로 설정하였다. 추출된 SNP 결과에서 정확도 높은 SNP를 선별하기 위해 mapping quality 값을 기본값 25보다 높은 30으로 적용하고, raw reads를 갖는 SNP로 filtering 하였다[13].

SNP matrix의 작성

팽이버섯 분석 간의 SNP 비교분석을 수행하기 위해 샘플간 통합 SNP matrix를 작성하였다. 각 샘플을 표준유전체와 비교하여 얻은 raw SNP position을 후보로 하여 합집합의 list를 구축하고, 이 때 빈 영역(non-SNP loci)은 sample의 consensus sequence로부터 채워 넣는 filling 과정을 거쳐 matrix를 작성하였다[14]. 이후 샘플간의 SNP 비교를 통해 mis-calling된 SNP를 필터하고, SNP 유형 구분 기준은 SNP read depth 정확도 높은 것이 90% 이상일 때 homozygous이며, SNP read depth 50%일 때 heterozygous라고 하며, homozygous와 heterozygous 유형으로 구분할 수 없는 경우는 기타로 표현하였다(Table 3).

유연관계 분석

공시균주의 유전체 재분석 데이터를 확보한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용하여 DNA 데이터베이스와 유사한 염기서열을 비교하였다. Phylogenetic analysis (계통발생분석)은 MEGA version 6 program의 neighbor-joining, maximum likelihood, minimum evolution

방법에 의해 분석하였고 sequence distance는 1,000 replication의 bootstrap value에 의해 계산하였다[9, 15, 16]. Neighbor-joining는 근접군 연결 방법으로 가장 속도가 빠르며 격리된 근접군 쌍 사이와 나머지 가지를 연속해서 삽입하여 분석 이후 가장 가까운 근접군 쌍을 통합하였다.

결과 및 고찰

Genome-wide SNPs 분석

팽이버섯 25계통의 유전체 재분석 데이터를 표준유전체 (KACC42780)와 비교하여 genome-wide SNP를 선별하였다. Total reads는 ASI 4188의 51,018,766개로 가장 많았으며, 단핵균주인 mono19에서 3,331,674개로 가장 낮은 것을 볼 수 있었다. Total reads중 mapped reads는 ASI 4178에서 18,503,265개 (68.62%)로 보였으며, ASI 4188에서는 9,416,665개 (18.46%)로 낮은 것을 볼 수 있다. Reads-mapping region은 ASI 4175에서 가장 많은 32,294,244개 (90.61%)로 보였고, ASI 4190에서 22,653,709개 (63.56%)로 가장 낮은 것을 볼 수 있었다. 각 균주의 read mapping을 통해 팽이버섯 자원내에서도 변이가 아주 크다는 것을 알 수 있었다. 즉 표준유전체와 변이가 큰 균주일수록 mapping율이 낮고 N count (bp)가 높아지는 것을 알 수 있었다(Table 2).

이는 품종에 따른 표준유전체의 서열 유사 정도에 따라 나타난 polymorphism의 차이로 보인다[17, 18]. 각 균주의 SNP를 homozygous SNP와 heterozygous SNP로 추출하였다. ASI 4188의 homozygous SNP는 473,518개이고 heterozygous SNP는 3,124개, 그리고 구분이 안 되는 other가 10,513개로 총 476,642개의 SNP가 선별되었다. 확보된 genome-wide SNPs의 분포를 보면 homozygous SNP가 가장 많은 균주는 ASI 4188로 473,518개로 검출되었으며, 반면 ASI 4175는 가장 적은 89,009개를 보였다. 또한 heterozygous SNP에서는 가장 많은 균주는 ASI 4178로 86,287개이었으며, 가장 적은 균주는 단핵균주인 mono19로 1,945개를 볼 수 있었다(Table 3).

공시균주의 대부분이 이핵균주이므로 이형 핵의 존재로 hetero SNP가 검출되는 것은 당연하겠으나 이핵균주들 간의 편차가 가장 많은 것이 86,287개로 가장 적은 것이 2,096개로 보였으며 그 이유를 이형핵만으로는 설명하기 어렵다. 또한 단핵균주인 momo19는 핵이 하나이므로 hetero type이 나오지 않을 것으로 기대했으나 1,945개가 검출되었다. 그 이유는 추후에 더 깊은 연구가 필요하겠으나 균류에서 흔히 나타나는 염색체의 polymorphism과 관련이 있을 것으로 생각한다[19].

Genome-wide SNP에 의한 유연관계 분석

그룹 간의 근연적 거리를 살펴보기 위해, maximum likelihood 방법으로 보았을 때 Group I은 *F. velutipes* var. 계

Table 2. Summary of alignment against the *Flammulina velutipes* reference genome

ASI No.	No. of total reads	No. of mapped reads	Reads-mapping region ^a
4188	51,018,766	9,416,665 (18.46%)	23,366,949 (65.56%)
4148	33,269,118	14,836,048 (44.59%)	27,668,162 (77.63%)
4166	24,636,642	15,668,615 (63.60%)	30,726,346 (86.21%)
4209	28,681,372	18,503,265 (64.51%)	30,910,475 (86.72%)
4178	27,580,790	18,926,070 (68.62%)	32,282,214 (90.57%)
4195	35,430,804	13,368,081 (37.73%)	26,937,958 (75.58%)
4190	38,958,932	9,359,256 (24.02%)	22,653,709 (63.56%)
4192	22,345,690	12,874,763 (57.62%)	30,734,321 (86.23%)
4194	33,377,266	6,844,811 (20.51%)	23,174,023 (65.02%)
4062	35,441,818	15,903,744 (44.87%)	27,137,546 (76.14%)
4049	8,653,264	5,281,423 (61.03%)	29,921,356 (83.95%)
4064	6,968,234	4,166,354 (59.79%)	29,374,331 (82.41%)
4067	7,785,916	4,773,954 (61.32%)	29,041,571 (81.48%)
4083	8,152,620	5,093,132 (62.47%)	30,045,448 (84.30%)
4090	10,459,370	6,576,247 (62.87%)	30,546,976 (85.70%)
4175	16,365,432	11,046,797 (67.50%)	32,294,244 (90.61%)
4103	10,157,554	6,094,302 (60.00%)	30,131,407 (84.54%)
4210	65,320,820	43,100,880 (65.98%)	30,146,465 (84.58%)
4167	10,213,916	5,917,559 (57.94%)	28,982,467 (81.31%)
4169	12,972,292	7,860,828 (60.60%)	29,273,484 (82.13%)
4028	5,815,778	3,469,441 (59.66%)	27,492,970 (77.14%)
4057	6,351,910	3,755,874 (59.13%)	29,329,487 (82.29%)
4072	14,340,410	8,652,448 (60.34%)	30,204,372 (84.74%)
4069	7,477,960	4,697,390 (62.82%)	30,060,108 (84.34%)
mono19	3,381,674	1,703,377 (50.37%)	25,188,497 (70.67%)

ASI, Agricultural Sciences Institute.

^aReads-mapping region: consensus sequence of base = N (un-mapping region) deprived area. (Reads-mapping region / total length of reference genome) × 100

통인 ASI 4062, 4148, 4195이며, Group II는 ASI 4188 (*F. elastica*), ASI 4190 (*F. fennae*), ASI 4194 (*F. rossica*) 군주가 포함되었으며, 서로 다른 학명을 가졌으므로 상당히 떨어진 모습을 나타냈다. 그 외 *F. velutipes* 19개 계통은 같은 그룹으로 나타났다. 유연관계 분석은 radiation에 정확성을 알기 위해 3번 반복한 결과이며, 학명에 따라 그룹 간에는 같은 결과가 확인되었다(Fig. 2). 이와 같은 유연관계 분석은 ITS 분석에 의해서도 손쉽게 얻어질 수 있으나 [6, 20], genome wide의 SNP정보를 이용해도 동일한 결과를 보였다. 이는 ITS 염기서열의 변이가 전체 계통 내에서 일어난 진화적 변화 과정을 잘 반영하는 것으로 판단할 수 있다.

백색집단과 갈색집단의 유연관계 비교

Neighbor-joining, maximum likelihood, minimum evolution을 2번 반복으로 유연관계 분석을 하였다. 각 그룹별

로 백색팽이균 공통 SNP와 갈색팽이균 공통 SNP를 비교하여 자실체 색깔을 반영할 수 있는 SNP를 선발하고자 하였다.

팽이버섯의 계통간 비교에서 neighbor-joining 결과는 백색 group에는 한국 팽이버섯과 일본 팽이버섯이 함께 포함되었으며, 그 중 ASI 4175, 4103, 4028는 갈색임에도 불구하고 백색 팽이 group에 포함되었다. 갈색 group에서는 한국과 일본, 중국의 팽이가 한 그룹을 형성하였다. Neighbor-joining, maximum likelihood, minimum evolution의 방법을 이용하여 백색 팽이버섯과 갈색 팽이버섯 계통간 색깔 별 구분을 유연관계로 분석하고자 시도하였으나 색깔에 따른 group은 이루어지지 않았으며, 방법에 따라 grouping은 비슷한 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 분석에 사용된 공시균주의 선발에서 제한된 수에 기인했을 수도 있으며, genome-wide의 SNP를 사용함으로써 색깔 이외의 형질에

Table 3. Summary of SNPs detection obtained from *Flammulina* strains

ASI No.	No. of total SNP	No. of homozygous	No. of heterozygous	No. of other
4188	476,642	473,518	3,124	10,513
4148	466,184	462,045	4,139	10,866
4166	315,555	301,743	13,812	18,944
4209	317,750	302,852	14,898	18,825
4178	164,606	164,606	86,287	60,975
4195	467,572	462,493	5,079	13,031
4190	447,991	445,895	2,096	9,378
4192	299,122	293,026	6,096	13,487
4194	460,161	457,155	3,006	9,862
4062	480,163	439,736	40,427	30,276
4049	209,341	135,060	74,281	88,990
4064	197,244	129,359	67,885	80,278
4067	208,760	170,383	38,377	49,882
4083	205,618	133,835	71,783	89,045
4090	220,148	138,751	81,397	97,741
4175	170,190	89,009	83,181	110,154
4103	222,101	142,817	79,284	95,744
4210	269,001	246,907	22,094	28,398
4167	228,470	195,580	32,890	42,517
4169	240,410	205,162	35,248	44,299
4028	206,210	199,978	6,232	9,812
4057	191,377	125,051	66,326	77,741
4072	239,694	156,219	83,475	103,172
4069	204,203	131,577	72,626	86,910
mono19	154,200	152,255	1,945	4,660

SNP, single nucleotide polymorphism; ASI, Agricultural Sciences Institute.

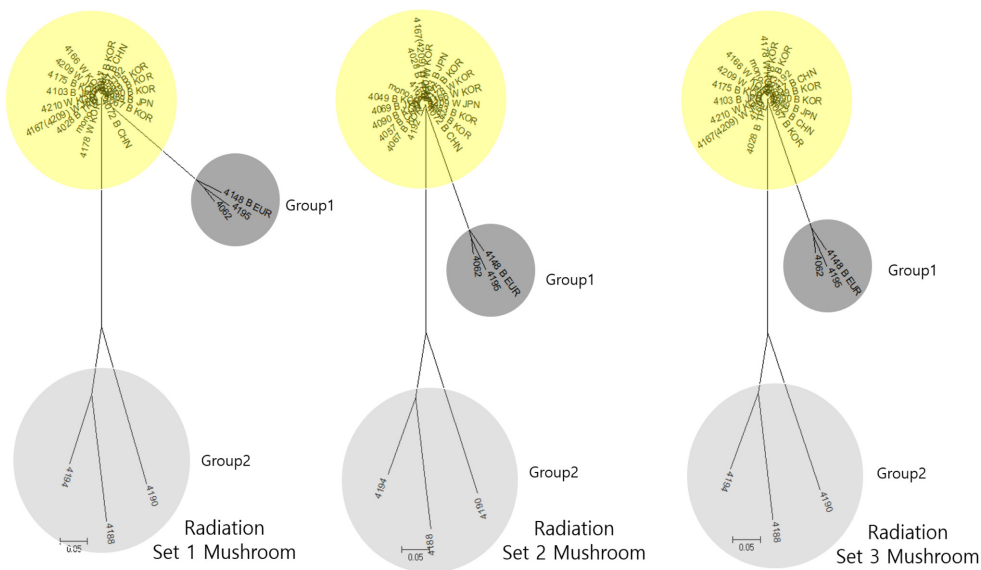


Fig. 2. Phylogenetic tree based on SNPs of *Flammulina* strains representing their phylogenetic relationship. SNP, single nucleotide polymorphism.

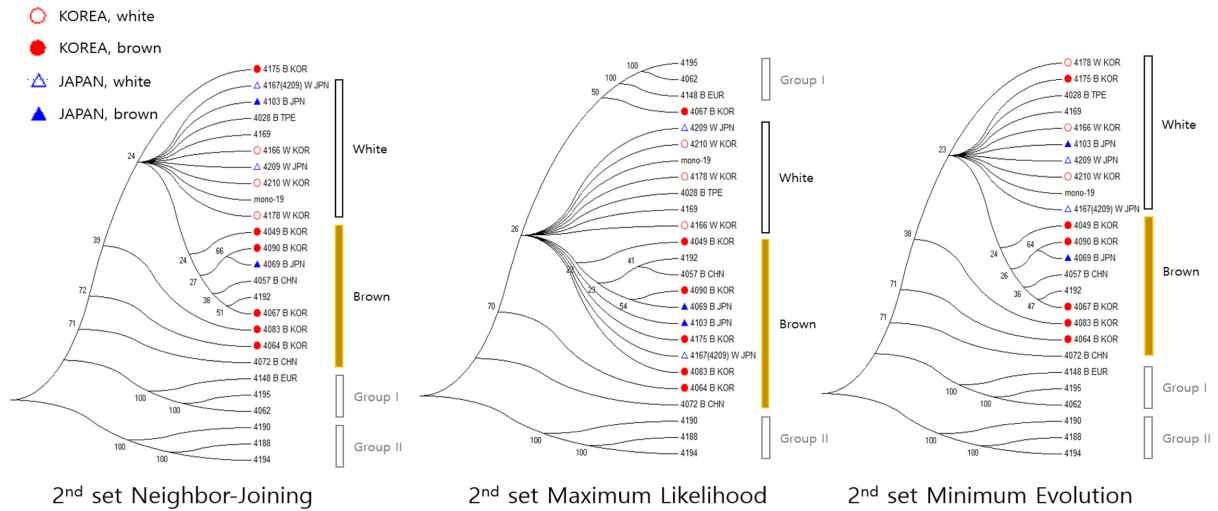


Fig. 3. Phylogenetic trees of SNPs among *Flammulina velutipes* strains inferred by neighbor-joining, maximum likelihood, and minimum evolution methods. SNP, single nucleotide polymorphism.

대한 변인 통제가 제대로 되지 않아 색깔 이외의 유전요인에 관련된 SNP가 분석에 동등하게 포함된 것이 원인으로 생각해 볼 수 있었다. 그러므로 phylogenetic tree를 만드는 방법에 따라 백색 팽이버섯과 갈색 팽이버섯 group간 구분할 수는 없으나, Group I과 Group II로 분석되었던 Fig. 2의 결과와는 일치하였다(Fig. 3).

Fig. 4에서는 백색 팽이버섯 중 한국 품종과 일본 품종간을 neighbor-joining으로 유연관계를 분석하였다. 한국 백색 균주인 ASI 4210, 4166, 4178과 일본 백색 균주인 ASI 4209, 4167이 하나의 그룹으로 형성되었다. Neighbor-Joining은 2번 반복으로 같은 결과가 나타났으며, 갈색 균주들과 백색균주가 3번째 노드에서 구분되었다. Phylogenetic tree 상에서 한국 백색 균주와 일본 백색 균주의 유전적 상동성이 매우 높음을 확인할 수 있었다. 비록 사용된 균주 수는 많지 않으나 이와 같은 결과를 이용하여 버섯을 발생시키지 않고 버섯 색깔을 예측할 수 있는 분자 마커를 개발할 수 있을 것으로 기대되며 더 나아가 상업적으로 이용되

고 있는 백색 품종들간에 지리적 기원을 밝힘으로써 종자주권 확립에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

적 요

팽이버섯(*Flammulina velutipes*) 25품종의 유전체 재분석 데이터를 표준유전체(KACC42781)와 비교하여 genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP)를 선발하였다. 균주에 따른 mapping율의 차이는 균주간 변이를 반영하였으며, genome-wide SNP분포는 homozygous SNP, heterozygous SNP로 구분되었으며 모두 균주에 따른 변이가 크게 나타났다. 수집균주들 사이의 유연관계를 살펴보기 위해, 계통수를 그려본 결과, Group I은 *F. velutipes* var. 계통인 ASI 4062, 4148, 4195이 묶여지고, Group II는 ASI 4188 *F. elastica*, ASI 4190 *F. fennae*, ASI 4194 *F. rossica*의 다른 종이 별도의 그룹을 형성하였다. 그 외 *F. velutipes* 19개 계통은 같은 그룹으로 나타났으며 그 유전적 자리를

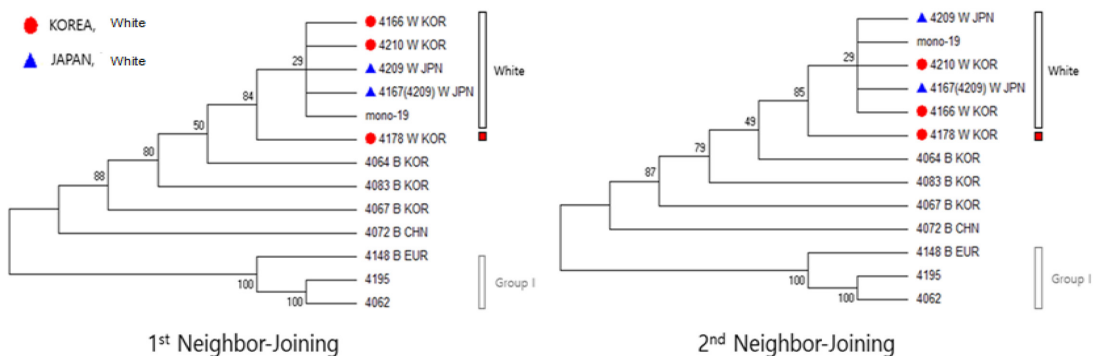


Fig. 4. Phylogenetic relationship of Korean and Japanese strains producing white fruit body.

잘 반영하였다. 한편 백색 group과 갈색 group을 유연관계로 분석하고자 시도하였으나 색깔에 따른 group은 이루어지지 않았다. 한국 백색 품종인 ASI 4210, 4166, 4178과 일본 백색 품종인 ASI 4209, 4167을 분석한 결과 phylogenetic tree상에서 한국 백색 품종과 일본 백색 품종간의 유전적 상동성이 매우 높음을 확인할 수 있었다.

Acknowledgements

This work was carried out with the support of Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ01016003) National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Republic of Korea.

REFERENCES

- Oh SI, Lee MS. Functional activities of ethanol extracts from *Flammulina velutipes*. Kor J Food Nutr 2010;23:15-22.
- Tonomura H. *Flammulina velutipes*. In: Chang ST, Hayes WA, editors. Biology and cultivation of edible mushrooms. New York: Academic Press; 1978. p. 409-21.
- Chang ST, Miles PG. Edible mushrooms and their cultivation. Boca Ration: CRC Press; 1989.
- Kitamoto Y, Nakamata M, Masuda P. Production of a novel white *Flammulina velutipes* by breeding. In: Chang ST, Buswell JA, Miles PG, editors. Genetics and breeding of edible mushrooms. Philadelphia: Gordon and Breach; 1993. p. 65-86.
- Kong WS, Jang KY, Lee CY, Koo J, Shin PG, Jhune CS, Oh YL, Yoo YB, Suh JS. Breeding progress and characterization of a Korean white variety 'Baek-A' in *Flammulina velutipes*. J Mushroom Sci Prod 2013;11:159-63.
- Mitchell JI, Roberts PJ, Moss ST. Sequence or structure: a short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. Mycologist 1995;9:67-75.
- Park YJ, Baek JH, Lee S, Kim C, Rhee H, Kim H, Seo JS, Park HR, Yoon DE, Nam JY, et al. Whole genome global gene expression analyses of the model mushroom *Flammulina velutipes* reveal a high capacity for lignocellulose degradation. PLoS One 2014;9:e93560.
- Cox MP, Peterson DA, Biggs PJ. SolexaQA: at-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. BMC Bioinformatics 2010;11:485.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013;30:2725-9.
- Ness RW, Siol M, Barrett SC. De novo sequence assembly and characterization of the floral transcriptome in cross- and self-fertilizing plants. BMC Genomics 2011;12:298.
- Garg R, Patel RK, Tyagi AK, Jain M. De novo assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification. DNA Res 2011;18:53-63.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 2009;25:1754-60.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 2009;25:2078-9.
- Kim JE, Oh SK, Lee JH, Lee BM, Jo SH. Genome-wide SNP calling using next generation sequencing data in tomato. Mol Cells 2014;37:36-42.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 2011;28:2731-9.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007;24:1596-9.
- Jiménez-Gómez JM, Maloof JN. Sequence diversity in three tomato species: SNPs, markers, and molecular evolution. BMC Plant Biol 2009;9:85.
- Jung JK, Park SW, Liu Wy, Kang BC. Discovery of single nucleotide polymorphism in *Capicum* and SNP markers for cultivar identification. Euphytica 2010;175:91-107.
- Park YJ, Kim JK, Kong WS, Song ES, Lee CS, Kim H, Hahn JH, Kang HW, Lee BM. Electrophoretic karyotyping and construction of a bacterial artificial chromosome library of the winter mushroom *Flammulina velutipes*. Microbiol Res 2010; 165:321-8.
- Hughes KW, McGhee LL, Methven AS, Johnson JE, Petersen RH. Patterns of geographic speciation in the genus *Flammulina* based on sequences of the ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 area. Mycologia 1999;91:978-86.