

## RESEARCH ARTICLE

## 표고 품종 산백향과 설백향 구분을 위한 CAPS 마커 개발

문수윤<sup>1,†</sup>, 홍창표<sup>2,†</sup>, 류호진<sup>1,\*</sup>, 이화용<sup>3,\*</sup><sup>1</sup>충북대학교 생물학과, <sup>2</sup>테라젠바이오, <sup>3</sup>충북대학교 산림학과Development of Cleaved Amplified Polymorphic Sequence Markers of *Lentinula edodes* Cultivars Sanbaekhyang and SulbaekhyangSuyun Moon<sup>1,†</sup>, Chang Pyo Hong<sup>2,†</sup>, Hojin Ryu<sup>1,\*</sup>, Hwa-Yong Lee<sup>3,\*</sup><sup>1</sup>Department of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea<sup>2</sup>Theragen Bio, Suwon 16229, Korea<sup>3</sup>Department of Forest Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

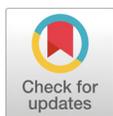
† Co-first authors

\* Corresponding authors: hjryu96@gmail.com, leehy@chungbuk.ac.kr

## ABSTRACT

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, the most produced mushroom in the world, is an edible mushroom with very high nutritional and pharmacological value. Currently, interest in the protection of genetic resources is increasing worldwide, and securing the distinction between new cultivars is very important. Therefore, the development of efficient molecular markers that can discriminate between *L. edodes* cultivars is required. In this study, we developed cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for the identification of *L. edodes* cultivars (Sanbaekhyang and Sulbaekhyang). These markers were developed from whole genome sequencing data from *L. edodes* monokaryon strain B17 and resequencing data from 40 cultivars. A nucleotide deletion existed in scaffold 19 POS 214449 in Sanbaekhyang (GT→G), and a single nucleotide polymorphism changed in scaffold 7 POS 215801 in Sulbaekhyang (G→A). The restriction enzymes *Hha* I and *Hpy*CH4IV distinguished Sanbaekhyang and Sulbaekhyang, respectively, from other cultivars. Thus, we developed two CAPS markers for the identification of the *L. edodes* cultivars Sanbaekhyang and Sulbaekhyang.

**Keywords:** Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker, Genome wide, Indel, *Lentinula edodes*, Single nucleotide polymorphism (SNP)



## OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X  
eISSN : 2383-5249Kor. J. Mycol. 2021 March, 49(1): 33-44  
<https://doi.org/10.4489/KJM.20210004>**Received:** January 20, 2021**Revised:** February 17, 2021**Accepted:** February 24, 2021

© 2021 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

표고는 세계에서 가장 가치 있는 식용버섯 중에 하나이다[1]. 지난 20여년간 표고의 생산량은 크게 증가하여, 현재는 세계 버섯 총 생산량의 약 22%를 구성하며 가장 큰 비중을 차지하고 있다 [2]. 표고는 단백질, 다당류, 지방산, 비타민, 식이섬유, 그리고 Ca, P, Fe과 같은 무기질이 풍부하여 영양학적 가치가 매우 높을 뿐만 아니라[3], 항암효과를 지닌 렌티난 등을 함유하고 있어 약리학적 가치 또한 높다고 알려져 있다[4].

우리나라는 2002년 국제식물신품종보호연맹(International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV)에 가입하였고 2008년부터는 ‘종자산업법’에 의거, 표고가 품종보호 대상 작물로 지정되었다[5]. 그리고 2010년 10월, 세계 194개국의 유엔 생물다양성협약(Convention on Biological Diversity, CBD) 회원국 들은 8년간 논의해오던 “유전자원 접근 및 이익공유”에 관한 “나고야 의정서”를 채택하였고, 2014년 7월 50개국이 나고야 의정서를 비준함에 따라 2014년 10월 당사국 총회에서 정식 발효되었다[6]. 또한 2017년 나고야 의정서가 국내에 발효되었다[7]. 이에 따라 각국의 유전자원에 대한 보호는 더욱 강화될 것이고, 우수한 특성을 지닌 신품종의 수도 점차 증가할 것으로 예상된다. 품종의 구별성을 확보하는 것은 매우 중요한 문제로 대두되고 있다. 그러나 표고 품종 간의 정확한 판별은 매우 어렵기 때문에[8,9], 외부적인 형태적 특성에 의한 판별법을 보완할 수 있는, 내부적인 유전적 특성을 기반으로 한 분자 마커를 개발하는 것은 매우 중요하다.

현재까지 표고의 품종 및 야생 균주에 대한 구분, 다양성, 형질 등을 분석하기 위해 restriction fragment length polymorphism (RFLP) [10], random amplified polymorphic DNA (RAPD) [11,12], simple sequence repeat (SSR) [13], inter-simple sequence repeat (ISSR) [12,14], sequence-characterized amplified region (SCAR) [15,16], cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) [17,18] 등의 분자 마커가 개발되었다. 분자 마커는 유전 현상의 본질인 DNA를 기반으로 하기 때문에 성장과 발달, 분화 등과 관계없이 안정적인 결과를 얻어낼 수 있고, 모든 조직에서 검출 가능하다는 장점을 지니고 있다[19].

DNA 염기서열에 생길 수 있는 변이로는 염기서열 하나의 치환인 single nucleotide polymorphism (SNP)와 염기서열 하나 이상의 삽입 또는 결실인 insertion and deletion (Indel)이 있다. CAPS는 SNP 나 Indel로 인해 생성되거나 소실되는 제한효소 인식부위를 탐지하여 이를 마커로 이용하는 방법이다[20]. CAPS를 이용한 분석은 고가의 장비를 필요로 하지 않고, 간단한 과정을 통해 안정적이고 명확한 결과를 얻어낼 수 있다는 장점이 있다[21].

산백향과 설백향은 mono-mono 교배법을 통해 개발된 톱밥재배용 표고 품종으로, 저장성이 우수하다[22]. 산백향은 생산성이 양호하고 배양일의 단축이 가능하여 산장향, 밤빛향과 같은 신품종 개발의 재료로도 이용되고 있고[23,24], 설백향은 주름살을 형성하지 않아 버섯 포자 날림이 적어 포자로 인한 알레르기 증세의 완화가 가능한 우수한 품종이다[22]. 본 연구에서는 산백향과 설백향을 구분할 수 있는 CAPS 마커를 개발하여 두 품종의 구별성을 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험균주와 DNA 추출

시험에는 표고 표준유전체 대상균주인 B17 [25]을 포함하여 산림과학원에서 개발한 14개 품종과 산림버섯연구센터에서 개발한 19개 품종을 포함하는 한국의 35개 품종, 그리고 일본의 3개, 중국의 2개 품종이 이용되었다(Table 1). 품종들의 균사는 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 25°C, 암배양하였다.

**Table 1.** List of strains analysed in this study.

| Strain No. | Strain name               | Origin |
|------------|---------------------------|--------|
| 1          | Sanlim7ho <sup>a</sup>    | Korea  |
| 2          | Sanlim9ho <sup>a</sup>    | Korea  |
| 3          | Yeoreumhyang <sup>a</sup> | Korea  |
| 4          | Gaculhyang <sup>a</sup>   | Korea  |
| 5          | Baekhwahyang <sup>a</sup> | Korea  |
| 6          | Chunbaekgo <sup>a</sup>   | Korea  |
| 7          | Pungnyungo <sup>a</sup>   | Korea  |
| 8          | Chunjang1ho <sup>a</sup>  | Korea  |
| 9          | Chunjang2ho <sup>a</sup>  | Korea  |
| 10         | Sanmaru1ho <sup>a</sup>   | Korea  |
| 11         | Sanbaekhyang <sup>a</sup> | Korea  |
| 12         | Chuje 2                   | China  |
| 13         | Kinko 135                 | Japan  |
| 14         | Kawamura K3               | Japan  |
| 15         | 808                       | China  |
| 16         | Chunjang3ho <sup>a</sup>  | Korea  |
| 17         | Sanjo101ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 18         | Sanjo102ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 19         | Sanjo103ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 20         | Sanjo108ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 21         | Sanjo110ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 22         | Sanjo111ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 23         | Sanjo501ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 24         | Sanjo502ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 25         | Sanjo701ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 26         | Sanjo704ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 27         | Sanjo705ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 28         | Sanjo706ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 29         | Sanjo707ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 30         | Sanjo708ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 31         | Sanjo709ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 32         | Sanjo710ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 33         | Chamaram <sup>b</sup>     | Korea  |
| 34         | Chamsongi                 | Korea  |
| 35         | Iseulsongi                | Korea  |
| 36         | Sanjo301ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 37         | KFRI 13 <sup>a</sup>      | Korea  |
| 38         | Akiyama A6                | Japan  |
| 39         | Sanjo302ho <sup>b</sup>   | Korea  |
| 40         | Sulbaekhyang <sup>a</sup> | Korea  |

<sup>a</sup>Strains developed by National Institute of Forest Science in Korea Forest Service;

<sup>b</sup>Strains developed by Forest Mushroom Research Center.

DNA 추출은 potato dextrose broth (PDB) 배지에 접종하여 약 2주간 암조건에서 25°C, 110 rpm 진탕배양한 균사체를 이용하였다. 배양한 균사체를 미라클로스 (miracloth)에 여과시킨 후 PBS buffer (135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)로 세척하고 키친타올로 물기를 제거하였다. 건조된 균사 100 mg을 액체질소에 얼려 막자사발로 곱게 갈은 후, GenEx™ Plant kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. DNA의 추출방법은 다음과 같다. 튜브에 옮겨 담은 균사체에 PL buffer 500 µL를 넣고 65°C에서 10분간 가열해준 후 pipette를 이용해 잘 섞어주었다. 13,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후, 분리한 상층액에 PP buffer를 상층액의 1/3만큼 넣고 볼텍서를 이용해 잘 섞어주었다. 얼음에서 5분간 방치 후 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 분리했다. 상층액에 동량의 PCI (phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1)를 넣고 섞어준 뒤, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 동량의 isopropanol을 넣고 섞어 준 뒤, 얼음에 10분간 방치 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% 에탄올로 세척하여 상온에서 1시간 동안 건조시킨 후, RE buffer에 녹였다. 추출된 DNA는 Micro-spectrophotometer K5600 (DaAn Gene, Guangzhou, China)으로 정량 후 20 ng/µL로 희석하여 사용하였다.

### CAPS 마커 개발

산백향과 설백향에 특이적으로 존재하는 SNP와 Indel은 Hillier 등[26]이 이용한 방법을 응용하였다. 2핵상태의 40개 품종에서 genomic DNA를 추출하여 Healey 등[27]의 방법을 응용하여 Hiseq 2500 platform을 이용하여 resequencing을 수행하였고, 40개 품종의 resequencing data는 Shim 등[28]이 단핵균주인 B17을 이용하여 분석한 표고버섯 전장유전체를 기준으로 정렬(alignment)하였다. 정렬된 40개 품종의 전장유전체를 비교하여 다형성을 탐색하였고, 산백향과 설백향에만 특이적으로 존재하는 SNP와 Indel을 선별하였다(Table 2 and 3). 선별한 SNP와 Indel을 중심으로 flanking sequence를 추출하였고, 추출된 flanking sequence에서 Primer3Plus (<http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)를 이용해 변이를 포함하는 마커 서열을 증폭할 수 있는 프라이머를 디자인하였다(Table 4).

프라이머 디자인 후 추출한 genomic DNA 20 ng을 주형으로 마커 서열을 증폭하였다. PCR 반응은 95°C에서 3분, 다시 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 20초로 35사이클을 증폭한 후, 추가로 72°C에서 5분간 반응시켰다. B17과 산백향, 설백향의 증폭된 마커 서열을 생어염기서열분석(Sanger sequencing) (Cosmogenetech, Seoul, Korea)을 통해 변이를 확인하였다. 변이가 확인된 서열을 dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)을 이용해 마커 서열에 특이적인 제한효소를 동정하였다(Table 2 and 3). 실험에 사용된 40개 품종에서 PCR을 통해 증폭한 마커 서열에 제한효소를 처리하고 2.5% agarose gel에 전기영동하여 각 단편(fragment)의 크기들을 비교하였다.

**Table 2.** The list of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and Indel in Sanbaekhyang.

| #Chr       | POS     | REF | ALT | Effect     | Codon                  | GENE      | Desc   | Restriction enzyme <sup>a</sup> |
|------------|---------|-----|-----|------------|------------------------|-----------|--|---------------------------------|
| Scaffold10 | 338361  | T   | C   | synonymous | c.453T>C               | GENE05058 | hypothetical protein STEHIDRAFT_165519 [Sterium hirsutum FP-91666 SS1] [Source:NCBI_NR EIM91132.1] | NlaIII, (-)                     |
| Scaffold5  | 1461089 | C   | T   | missense   | c.280G>A (p.Gly94Ser)  | GENE10073 | -  | -                               |
| Scaffold5  | 1461096 | C   | T   | synonymous | c.273G>A               | GENE10073 | -  | -                               |
| Scaffold1  | 1039230 | T   | C   | missense   | c.455A>G (p.Asp152Gly) | GENE12493 | -  | -                               |
| Scaffold19 | 214449  | GT  | G   | frameshift | c.290delA (p.Asp97fs)  | GENE00709 | short-chain dehydrogenase/reductase [Lentinula edodes] [Source:NCBI_NR AEN14449.1]                 | Hha I (+)                       |

#Chr: scaffold; POS: position; REF: reference bases; ALT: alternate bases; Desc: description.

<sup>a</sup>Restriction enzyme recognition site abolished (-) or created (+) due to mutations in the marker sequence was represented**Table 3.** The list of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Sulbaekhyang.

| #Chr       | POS     | REF | ALT | Effect                   | Codon                   | GENE          | Desc   | Restriction enzyme <sup>a</sup>                    |
|------------|---------|-----|-----|--------------------------|-------------------------|---------------|--|--|
| Scaffold22 | 310758  | C   | T   | synonymous               | c.96G>A                 | GENE00289     | hypothetical protein Moror_4037 [Moniliophthora roreri MCA 2997] [Source:NCBI_NR ESK90800.1]   | TspE I (+)   |
| Scaffold20 | 118723  | T   | C   | missense                 | c.620A>G (p.Asn207Ser)  | GENE00986     | hypothetical protein Moror_16151 [Moniliophthora roreri MCA 2997] [Source:NCBI_NR ESK89432.1]  | TspR I (+)   |
| Scaffold8  | 188228  | C   | T   | synonymous               | c.1008G>A               | Pdcd2l        | Programmed cell death protein 2-like [Source:UniProtKB/Swiss-Prot Q8C5N5]  |  |
| Scaffold8  | 287141  | G   | A   | missense & splice region | c.617G>A (p.Gly206Glu)  | end2          | Condensin complex subunit 2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot Q9Y7R3]   | Hpy188 I (+)                                       |
| Scaffold6  | 383326  | C   | T   | stop_gained              | c.991C>T (p.Gln331a)    | GENE03460     | predicted protein [Laccaria bicolor S238N-H82] gb EDR14455.1  predicted protein [Laccaria bicolor S238N-H82] [Source:NCBI_NR XP_001875014.1] |  |
| Scaffold6  | 1145331 | G   | A   | missense                 | c.1025C>T (p.Pro342Leu) | ape1          | Aminopeptidase 1 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot Q9USX1]  |  |
| Scaffold4  | 3102734 | C   | T   | missense                 | c.433C>T (p.Arg145Cys)  | GENE05839     | gag protein [Lentinula edodes] [Source:NCBI_NR BAF74361.1]   |  |
| Scaffold7  | 215801  | G   | A   | synonymous               | c.447C>T                | GENE07011     | hypothetical protein Moror_9778 [Moniliophthora roreri MCA 2997] [Source:NCBI_NR ESK86576.1]   | Aat II (-)<br>Acy I (-)<br>HpyCH4IV (-)            |
| Scaffold7  | 2023901 | G   | A   | missense                 | c.1318G>A (p.Val440Ile) | GENE06338     | hypothetical protein Moror_14808 [Moniliophthora roreri MCA 2997] [Source:NCBI_NR ESK88337.1]  |  |
| Scaffold7  | 5834108 | T   | C   | missense                 | c.202A>G (p.Asn68Asp)   | SPCPB16A4.05c | Uncharacterized urease accessory protein ureG-like [Source:UniProtKB/Swiss-Prot Q96WV0]  | Taq I (-)<br>TspE I (-)<br>Hpy188 I (+)            |
| Scaffold3  | 1161051 | T   | G   | synonymous               | c.273T>G                | GENE07933     | -  | Alu I (-)<br>CviI I (-)<br>HinF I (+)<br>Tfi I (+) |
| Scaffold3  | 2158130 | T   | C   | synonymous               | c.1005A>G               | ccc2          | Copper-transporting ATPase ccc2 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot O59666]   | Hpy99 I (+)<br>Hpy188 I (+)                        |
| Scaffold5  | 1078908 | A   | C   | missense                 | c.890T>G (p.Val297Gly)  | GENE09927     | hypothetical protein Moror_14968 [Moniliophthora roreri MCA 2997] [Source:NCBI_NR ESK84843.1]  | Rsa I (-)  |

**Table 3.** Continued

| #Chr      | POS     | REF | ALT | Effect     | Codon                      | GENE         | Desc   | Restriction enzyme <sup>a</sup>                    |
|-----------|---------|-----|-----|------------|----------------------------|--------------|--|--|
| Scaffold5 | 4757777 | C   | A   | missense   | c.429G>T<br>(p.Gln143His)  | SCYL1        | N-terminal kinase-like protein [Source:UniProtKB/Swiss-Prot A6QLH6]                                  | Ava II (+)<br>NlaIII (+)<br>Nsp I (+)<br>Sph I (+) |
| Scaffold5 | 4928048 | T   | C   | synonymous | c.834A>G                   | nfo          | Probable endonuclease 4<br>{ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_00152}<br>[Source:UniProtKB/Swiss-Prot A6LB99] |  |
| Scaffold1 | 241097  | G   | A   | synonymous | c.165C>T                   | CHGG_05463   | Putative fungistatic metabolite [Source:UniProtKB/Swiss-Prot P84675]                                 | Sml I (+)  |
| Scaffold1 | 241099  | T   | A   | missense   | c.163A>T<br>(p.Ile55Phe)   | CHGG_05463   | Putative fungistatic metabolite [Source:UniProtKB/Swiss-Prot P84675]                                 |  |
| Scaffold1 | 241100  | T   | C   | synonymous | c.162A>G                   | CHGG_05463   | Putative fungistatic metabolite [Source:UniProtKB/Swiss-Prot P84675]                                 |  |
| Scaffold1 | 579269  | G   | A   | missense   | c.44C>T<br>(p.Ala15Val)    | GENE12147    | hypothetical protein Moror_5372 [Moniliophthora roreri MCA 2997]<br>[Source:NCBI_NR ESK81776.1]      | Alu I (-)<br>CviI I (-)<br>Dde I (-)<br>Mse I (+)  |
| Scaffold1 | 1066007 | G   | T   | synonymous | c.3408C>A                  | pol          | RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey<br>[Source:UniProtKB/Swiss-Prot P21328]       |  |
| Scaffold1 | 2907894 | T   | C   | missense   | c.2345A>G<br>(p.Glu782Gly) | SPBC2F12.05c | Oxysterol-binding protein homolog C2F12.05c<br>[Source:UniProtKB/Swiss-Prot O14340]                  |  |
| Scaffold1 | 3598872 | A   | G   | missense   | c.1358A>G<br>(p.His453Arg) | trs120       | Transport protein particle subunit trs120<br>[Source:UniProtKB/Swiss-Prot O14251]                    | Dde I (-)  |
| Scaffold1 | 3598873 | C   | T   | synonymous | c.1359C>T                  | trs120       | Transport protein particle subunit trs120<br>[Source:UniProtKB/Swiss-Prot O14251]                    |  |

#Chr: scaffold; POS: position; REF: reference bases; ALT: alternate bases; Desc: description.

<sup>a</sup>Restriction enzyme recognition site abolished (-) or created (+) due to mutations in the marker sequence was represented.

**Table 4.** Characteristics of primer sets for identification of Sanbaekhyang and Sulbaekhyang.

| Primer name | Primer Sequence (5'-3') | Tm (°C) | Amplicon size (bp) |
|-------------|-------------------------|---------|--------------------|
| RL-LE-133 F | GGAGACATGAGCAGCATTGA    | 60.0    | 222                |
| RL-LE-133 R | GCTAAAGCAGGTGCTTCCAA    | 60.5    |                    |
| RL-LE-145 F | TTATGCTGGGCGATATGGCG    | 60.7    | 407                |
| RL-LE-145 R | GGGGTCTGATGGGAGAGAGT    | 60.0    |                    |

Tm: Annealing temperature; Amplicon size: Size of the fragment amplified with CAPS primers.

## 결과

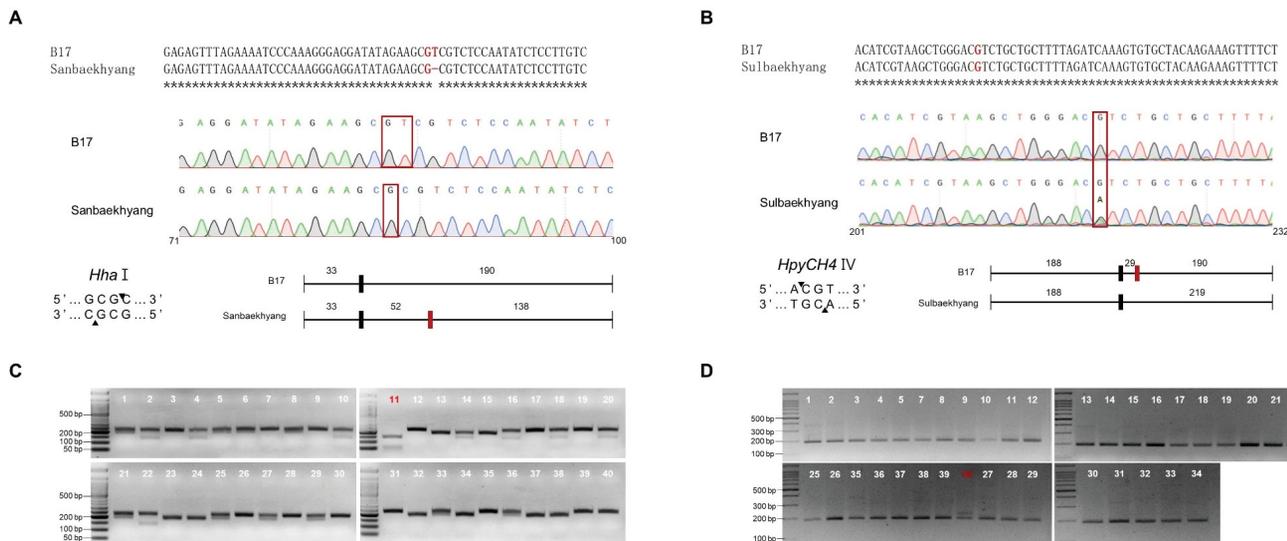
### 산백향과 설백향 특이적 CAPS 마커 선별

산백향과 설백향을 판별할 수 있는 마커 서열을 동정하기 위해 산백향과 설백향을 포함한 총 40개 품종의 DNA resequencing을 수행하여 시험 균주에 대한 전장유전체를 확보하였다. 확보된 40개 품종들의 전장유전체를 표고의 표준유전체인 B17의 전장유전체 정보와 비교하여 산백향과 설백향에 특이적으로 존재하는 SNP와 Indel을 동정하였다. 우선, coding region에 존재하는 동형접합(homozygotic) 변이를 우선적으로 선별하고자 하였다. 산백향에서는 동형접합 변이가 coding region에 동의(synonymous) SNP 2개와 과오(missense) SNP 2개, 그리고 해독틀변형

(frameshift)을 야기하는 결실(deletion)이 1개 존재했다. 설백향의 경우 coding region에 동형접합 변이가 존재하지 않아 이형접합(heterozygotic) 변이들을 선별한 결과, 번역(translation)의 종결을 야기하는 1개의 SNP를 포함하여 13개의 과오 SNP와 10개의 동의 SNP가 존재했다.

산백향과 설백향의 전장유전체에 존재하는 변이들을 생어염기서열분석을 통해 재확인하였고, dCAPS Finder 2.0을 이용하여 마커 서열에 발생한 변이로 인해 제한효소 인식부위가 생성되거나 소실되는 부분들을 이용 가능성 및 비용에 기초하여 동정하였다(Table 2 and Table 3). 산백향의 특이적인 마커 서열인 <RL-LE-133>과 설백향의 특이적인 마커 서열인 <RL-LE-145>에 존재하는 제한효소 인식부위를 확인해 본 결과, 산백향의 scaffold19번, 214449의 염기서열 GT가 G로 변한 동형접합 결실은 제한효소 *Hha* I의 인식부위가 염기서열 T의 결실로 인해 생성되었고, 설백향의 scaffold7번, 215801의 염기서열 G가 A로 변한 이형접합 치환(substitution)은 제한효소 *HpyCH4* IV의 인식부위 2개 중 하나가 염기서열 G에서 A로의 치환으로 인해 소실되어, CAPS 마커를 개발하기에 가장 적합한 서열로 판단되었다(Figs. 1A and 1B).

각 마커 서열과 제한효소를 이용한 산백향과 설백향의 판별을 확인하기 위해, resequencing에 사용한 40개 품종의 DNA에서 각 마커 서열을 증폭한 후 각 제한효소를 처리하였다. 40개의 품종들은 마커 서열 <RL-LE-133> 중 산백향에서만 제한효소 *Hha* I에 의하여 190 bp 크기의 PCR product가 52 bp와 138 bp로 절단되어 52 bp, 138 bp 크기의 밴드가 확인되었다(Fig. 1C). 마커 서열 <RL-LE-145>의 경우에는 2개 품종(천백고, 산조 111호)에서 마커 서열이 증폭되지 않아 각 마커 서열의 프라이머가 2개의 품종들에서 유전적 변이부분을 포함하는 것으로 추정된다. 그리고 38개 품종들 중 설백향을 제외한 나머지 품종들에서 제한효소 *HpyCH4* IV에 의하여 219 bp 크기의 PCR product가 29 bp와 190 bp 크기로 절단되어 설백향에서만 219 bp 크기의 PCR product가 확인되었다(Fig. 1D). 그 결과 산백향과 설백향이 다른 품종들과 구별되었다.



**Fig. 1.** A and B. Partial nucleotide sequences of each strains amplified with RL-LE-133 (A), RL-LE-145 (B) primer set respectively. Highlighted nucleotides were used for developing the cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker. The restriction enzyme used for development of CAPS marker and the position of the recognition site in each marker sequence are shown in a schematic diagram. C and D. The cleaved fragment patterns of each CAPS marker among 40 *L. edodes* cultivars. The name of cultivars corresponding the indicated number was represented in Table 1.

## 고찰

본 연구에서는 산백향과 설백향의 전장유전체에 존재하는 변이들을 이용하여 CAPS 마커를 개발하고자 하였다. CAPS 마커를 개발하기 위하여 표고 품종들의 전장유전체상의 변이를 찾았고, 이 변이를 이용하여 마커를 개발하였다. 변이들 중 coding region의 변이들은 단백질의 기능에 영향을 주기도 하는데, 동의 SNP의 경우에는 상응하는 단백질 서열에 변화를 주지 않지만 과오 SNP는 아미노산의 구성에 변화를 유발하거나 조기정지코돈(early stop codon)을 야기하고 단백질의 절단(truncation)을 유발하기도 한다[29]. Indel의 경우에는 발생한 indel이 해독틀변형을 일으키는가에 따라 단백질에 다양한 영향을 끼친다[30]. 또한 SNP와 indel은 이어맞추기 자리(splicing site)를 방해해 mRNA isoform을 바꾸기도 한다[31]. 변이가 끼치는 영향이 유익하든 해롭든, 과오 변이는 극적인 표현형 변화를 야기할 수 있다[32,33].

CAPS는 공우성 마커이기 때문에 이형접합상태 유전자형의 분석이 가능하고, 간단한 분석 과정을 통해 안정적인 결과를 얻어낼 수 있다는 장점을 가지고 있어[20,21], 딸기, 배, 올리브와 같은 작물에서 품종 간의 판별을 위해 이용되고 있다[34-36]. 뿐만 아니라, 고추, 밀, 아몬드와 같은 작물에서는 작물의 수량성, 병저항성 등 유용 형질에 관련된 유전자 기반 CAPS 마커 또한 개발되어 신품종의 개발이나 유용형질을 지닌 개체의 선발에 이용되고 있다[37-39]. 이러한 CAPS 마커의 장점과 유용성에도 불구하고, 벼의 경우 CAPS 마커 개발에 대한 연구가 매우 부족하다. 양송이에서 CAPS 마커 개발이 이루어졌고[40], 특히 표고는 상업적으로 개발된 품종인 산마루1호, 천장3호[17], 그리고 산마루2호[18]를 구분할 수 있는 CAPS 마커가 개발되었다.

CAPS 마커는 SNP나 indel로 인해 생성되거나 소실되는 제한효소 인식부위를 탐지하여 이를 마커로 이용하는 방법이다[18]. 전통적으로 SNP는 다수의 대표적인 계통 또는 개인의 중요한 유전자 또는 단편을 시퀀싱 한 다음 얻은 서열을 비교하여 SNP를 식별함으로써 발견된다. 이 접근 방식의 가장 큰 단점은 시간과 비용이 많이 든다는 것이다[41]. 따라서 높은 처리량의 SNP 개발에는 적합하지 않다[41]. 문수윤 등[17,18]이 개발한 CAPS 마커와 본 연구에서의 CPAS 마커 개발은 각 균주들의 전장유전체들을 비교하여 SNP와 InDel을 찾아 개발되었다. 차세대 염기서열 분석방법은 서열 다양성을 특성화하고 유전자 매핑, 유전적 다양성 분석, 유전자 식별 및 분자 육종에 필요한 다형성 및 유전형 데이터를 생성하는 데 사용할 수 있는 대규모 서열 데이터 세트를 생성하는 강력한 수단을 제공한다[42]. 이 방법을 이용하여 많은 주요 작물에 대해 빠른 속도로 유전체 정보를 해독하고 있으며, 데이터를 대량으로 생산하고 있다[43]. 차세대 시퀀싱(NGS) 기술은 비모델 종 대해 높은 처리량의 SNP 발견을 가능하게 하여[44,45], 마커 생산이 제한되어 있던 과거에 비해 빠른 시간에 대량의 SNP 마커를 생산할 수 있게 되었고, 표현형 데이터와 연계함으로써 실제 육종 현장에서 농업적으로 활용 가능한 정보를 만들어 줄 수 있다[46]. 따라서 전장유전체를 이용한 방법은 시간과 비용을 줄여 좀 더 효율적인 CAPS 마커의 개발이 가능하게 하였다.

## 적요

본 연구에서는 국내에 유통되고 있는 40개 표고 품종들로부터 산백향과 설백향의 구분이 가능한 CAPS 마커를 개발하였다. 제한효소 *Hha* I 과 *HpyCH4IV*를 이용한 밴드 패턴 분석을 통해 각 산백향과 설백향을 다른 균주들과 구분하여 구별성을 확보할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 CAPS 마커는 표고의 품종들 간에 유전적 다양성을 부여함으로써, 품종을 보호할 수 있는 분자생물학적 근거가 될 수 있다. 이로써 향후 유전자원에 대한 국가간 분쟁을 미연에 방지할 수 있을 것이다.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Golden Seed Project (Grant No. 216007-05-5-SBH20) from the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs of Republic of Korea and the research grant of the Chungbuk National University in 2020.

## REFERENCES

1. Chang S, Wasser S. The cultivation and environmental impact of mushrooms. New York: Oxford University Press; 2017.
2. Royse DJ, Baars J, Tan Q. Current overview of mushroom production in the world. Edible and medicinal mushrooms: technology and applications. In: Zied DC, Pardo-Giménez A, editors. Edible and medicinal mushrooms: technology and applications, Hoboken: Wiley-Blackwell; 2017. p. 5-13.
3. Bisen P, Baghel RK, Sanodiya BS, Thakur GS, Prasad G. *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Curr Med Chem* 2010;17:2419-30.
4. Maeda Y, Takahama S, Yonekawa H. Four dominant loci for the vascular responses by the antitumor polysaccharide, lentinan. *Immunogenetics* 1998;47:159-65.
5. Bak WC, Lee BH, Ka KH. Characteristics of new Shiitake strain “Sanlim No. 7” produced by Di-mon hybridization method. *Kor J Mycol* 2010;38:25-8.
6. Park CW, Chol KJ, Soh EH, Koh HJ. Study on the future development direction of plant variety protection system in Korea. *Korean J Breed Sci* 2016;48:11-21.
7. Jang YS, Kwon YR, Kim TH. Prospect and status of plant variety protection (PVP) of forest-sector in Korea. *Korean J Breed Sci* 2020;52:31-9.
10. Qin L-H, Tan Q, Chen M-J, Pan Y-J. Use of intersimple sequence repeats markers to develop strain-specific SCAR markers for *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;257:112-6.
11. Zhang R, Huang C, Zheng S, Zhang J, Ng TB, Jiang R, Zuo X, Wang H. Strain-typing of *Lentinula edodes* in China with inter simple sequence repeat markers. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74:140-5.
12. Kulkarni RK. DNA polymorphisms in *Lentinula edodes*, the shiitake mushroom. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:1735-9.

13. Zhang Y, Molina FI. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. *FEMS Microbiol Lett* 1995;131:17-20.
14. Fu LZ, Zhang HY, Wu XQ, Li H-B, Wei HL, Wu QQ, Wang LA. Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD, ISSR and SRAP markers. *World J Microb Biot* 2010;26:709-16.
15. Xiao Y, Liu W, Dai Y, Fu C, Bian Y. Using SSR markers to evaluate the genetic diversity of *Lentinula edodes*' natural germplasm in China. *World J Microb Biot* 2010;26:527-36.
16. Liu J, Wang ZR, Li C, Bian YB, Xiao Y. Evaluating genetic diversity and constructing core collections of Chinese *Lentinula edodes* cultivars using ISSR and SRAP markers. *J Basic Microbiol* 2015;55:749-60.
17. Li HB, Wu XQ, Peng HZ, Fu LZ, Wei HL, Wu QQ, Jin QY, Li N. New available SCAR markers: Potentially useful in distinguishing a commercial strain of the superior type from other strains of *Lentinula edodes* in China. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;81:303-9.
18. Liu JY, Ying ZH, Liu F, Liu XR, Xie BG. Evaluation of the use of SCAR markers for screening genetic diversity of *Lentinula edodes* strains. *Curr Microbiol* 2012;64:317-25.
19. Moon S, Lee HY, Kim M, Ka KH, Ko HK, Chung JW, Koo CD, Ryu H. Development of cleaved amplified polymorphic sequence markers for the identification of *Lentinula edodes* cultivars Sanmaru 1ho and Chunjang 3ho. *Kor J Mycol* 2017;45:114-20.
20. Moon S, Lee HY, Ka KH, Koo CD, Ryu H. Development of a CAPS marker for the identification of the *Lentinula edodes* cultivar, 'Sanmaru 2ho'. *J Mushroom* 2018;16:51-6.
21. Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 2008;27:617-31.
22. Konieczny A, Ausubel FM. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 1993;4:403-10.
23. Kaundun S, Matsumoto S. Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between *assamica* and *sinensis* varieties. *Theor Appl Genet* 2003;106:375-83.
24. Kim SH, Song JH, Lee U, Ga KH, Shin HN, Kim CW, Kim MS, Yoo L, Jang YS. New varieties of special forest products developed by NIFoS. Seoul: National Institute of Forest Science; 2019.
25. Park Y, Jang Y, Ryoo R, Lee B, Ka KH. Breeding and cultural characteristics of newly bred *Lentinula edodes* strain 'Sanjanghyang'. *Kor J Mycol* 2019;47:143-52.
26. Park Y, Jang Y, Ryoo R, Ka KH. Breeding and cultural characteristics of a newly bred *Lentinula edodes* strain, 'Bambithyang'. *J Mushroom* 2020;18:145-50.
27. Shim D, Park SG, Kim K, Bae W, Lee GW, Ha BS, Ro HS, Kim M, Ryoo R, Rhee SK. Whole genome de novo sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, *Lentinula edodes*. *J Biotechnol* 2016;223:24-5.
28. Hillier LW, Marth GT, Quinlan AR, Dooling D, Fewell G, Barnett D, Fox P, Glasscock JI, Hickenbotham M, Huang W. Whole-genome sequencing and variant discovery in *C. elegans*. *Nat methods* 2008;5:183-8.
29. Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry RJ. Protocol: A simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 2014;10:21.

30. Shim D, Park SG, Kim K, Bae W, Lee GW, Ha BS, Ro HS, Kim M, Ryoo R, Rhee SK, et al. Whole genome de novo sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, *Lentinula edodes*. *J Biotechnol* 2016;223:24-25.
31. Zhang Z, Miteva MA, Wang L, Alexov E. Analyzing effects of naturally occurring missense mutations. *Comput Math Methods Med* 2012;2012:805827.
32. Hu J, Ng PC. Predicting the effects of frameshifting indels. *Genome Biol* 2012;13:R9.
33. Hou L, Zhao H. A review of post-GWAS prioritization approaches. *Frontiers in genetics* 2013;4:280.
34. Ng PC, Henikoff S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006;7:61-80.
35. Pham AT, Lee JD, Shannon JG, Bilyeu KD. A novel FAD2-1 A allele in a soybean plant introduction offers an alternate means to produce soybean seed oil with 85% oleic acid content. *Theor Appl Genet* 2011;123:793-802.
36. Kuniyama M, Fukino N, Matsumoto S. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 2003;134:209-15.
37. Moriya Y, Yamamoto K, Okada K, Iwanami H, Bessho H, Nakanishi T, Takasaki T. Development of a CAPS marker system for genotyping European pear cultivars harboring 17 S alleles. *Plant Cell Rep* 2007;26:345-54.
38. Reale S, Doveri S, Diaz A, Angiolillo A, Lucentini L, Pilla F, Martin A, Donini P, Lee D. SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome* 2006;49:1193-205.
39. Caranta C, Thabuis A, Palloix A. Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. *Genome* 1999;42:1111-6.
40. Su Z, Hao C, Wang L, Dong Y, Zhang X. Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 2011;122:211-23.
41. Ricciardi F, Del Cueto J, Bardaro N, Mazzeo R, Ricciardi L, Dicenta F, Sánchez-Pérez R, Pavan S, Lotti C. Synteny-based development of CAPS markers linked to the sweet kernel LOCUS, controlling amygdalin accumulation in almond (*Prunus dulcis* (Mill.) DA Webb). *Genes* 2018;9:385.
42. Foulongne-Oriol M, Spataro C, Cathalot V, Monllor S, Savoie J-M. An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* × *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behaviour of the species. *Fungal Genet Biol* 2010;47:226-36.
43. Shu Y, Li Y, Zhu Z, Bai X, Cai H, Ji W, Guo D, Zhu Y. SNPs discovery and CAPS marker conversion in soybean. *Mol Biol Rep* 2011;38:1841-6.
44. Li D, Zeng R, Li Y, Zhao M, Chao J, Li Y, Wang K, Zhu L, Tian WM, Liang C. Gene expression analysis and SNP/InDel discovery to investigate yield heterosis of two rubber tree F1 hybrids. *Sci Rep* 2016;6:24984.
45. Huq MA, Akter S, Jung YH, Nou IS, Cho YG, Kang KK. Genome sequencing, a milestone for genomic research and plant breeding. *Plant Breed Biotech* 2016;4:29-39.
46. Montes I, Conklin D, Albaina A, Creer S, Carvalho GR, Santos M, Estonba A. SNP discovery in European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) by high-throughput transcriptome and genome sequencing. *PLoS One* 2013;8:e70051

47. Tsai HY, Hamilton A, Tinch AE, Guy DR, Gharbi K, Stear MJ, Matika O, Bishop SC, Houston RD. Genome wide association and genomic prediction for growth traits in juvenile farmed Atlantic salmon using a high density SNP array. *BMC genomics* 2015;16:969.
48. Lee YJ, Byeon EJ, Bae SH, Ji H, Lee GS, Yoon UH, Kim TH. Development of NGS-based new CAPS markers and QTL analysis of stem diameter using Milyang23/Gihobyeo recombinant inbred lines (MGRIL). *Korean J Breed Sci* 2016;48:217-233.