

느타리 버섯에서 수한 품종 특이 SCAR marker 개발

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

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ²건국대학교 식량자원학과

Development of Suhan 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.

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

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

ABSTRACT : In this study, 81 commercial strains of *Pleurotus* species cultivated in South Korea were analyzed with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Sequence characterized amplified region (SCAR) markers were developed by designing from one RAPD polymorphic band specific to Suhan strain. The SCAR primer pair 'S-OPA13-1' amplified a 590-bp fragment in the varieties originated from Suhan strain. The Blast search of S-OPA13-1 showed high homology to the POMFBO1 *P. ostreatus* cDNA clone MFB02-A05 and *Laccaria bicolor* S238N-H82. The results showed that this SCAR marker can clearly distinguish Suhan strains from *Pleurotus* spp.

KEYWORDS : *Pleurotus ostreatus*, RAPD, SCAR marker, Specific primers, Suhan strain

서 론

느타리버섯은 고사한 활엽수 원목에서 목재종의 리그닌과 셀룰로오스를 분해하여 얻은 영양분으로 생활하는 목재 부후균(Hashimoto and Takahashi, 1974)으로 국내에서는 옛날부터 미루나무버섯 또는 버드나무버섯 등으로 불려졌으며, 속명(*Pleurotus*)은 '측면의 귀모양'을, 종명(*ostreatus*)은 '굴맛이 난다'는 것을 뜻하는 것으로 명명되어 Oyster mushroom이라 하여 식용버섯으로 분류하였다(Song *et al.*, 1996). 국내에서 소비성이 좋으며 이제까지 많이 재배되었던 느타리 품종으로는 원형느타리, 춘추2호, 수한 품종이 있다. 종내 계통의 구분에 가장 일반적으로 사용되는 것은 RAPD 방법인데, 이 방법은 짧은 10 base의 oligonucleotide로 구성된 random primer를 이용하므로 재현성이 떨어지는 단점이 있다. 따라서 근래에는 이러한 RAPD의 재현성을 높이기 위하여 비교적 긴 약 20 base로 구성된 URP primer와 12~16 base로 구성된 ISSR primer가 품종구분을 하는데 많이 사용되고 있다. ISSR (Inter-Simple sequence repeat) marker는 AG..., CAG... 등과 같은 염기가 4~10회 반복되는 것으로서, 특정 primer에 의해 식물체 genome상의 SSR이 상보적으로 증폭되어 품종간에 다형성을 나타내며, PCR 수행시 annealing 온도가 높기 때문에 실험에 재현성도 높은 것으로 알려져 있다. Hoffman 등 (2003)은 ISSR과 RAPD를 이용하여 유전분석을 하였을 때

강력한 유전적 다양성을 볼 수 있다고 하였으며, Albami 등 (2004)은 ISSR marker를 Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) marker로 전환하기 용이하다고 하였다. Qin 등(2004, 2006)은 ISSR-PCR을 통해 *Lentinula edodes*(표고)의 strain-specific SCAR marker를 개발하였으며, *Lentinula*의 종간과 종내 계통간 다형성 분석에 ISSR marker를 이용하여 유전적으로 가까운 계통간의 차이를 볼 수 있다고 하였다. 최근 RAPD marker 또는 AFLP marker를 이용하여 SCAR (Sequence characterized amplified region; Paran and Michelmore, 1993) marker로의 전환에 관한 연구가 다양한 작물과 버섯에서 활발히 이루어졌다. RAPD marker의 SCAR marker로의 전환은 상추에서 downy mildew 병 저항성 marker로 처음 개발되었으며(Paran and Michelmore, 1993), Bang 등(2004)은 백출의 기원식물 판별에 이용하여 유통 건재약재를 판별하였다. 또한 Koveza와 Gostimsky (2005)는 다양한 완두 품종과 변종들을 식별하기 위한 SCAR marker를 개발하였고, Lee 등(2006)은 다른 동속식물로부터 애엽 (*Artemisia Herb*)을 선택적으로 감별하기 위해 특이 marker를 개발한바 있다. Hongyan 등(2007)은 약용으로 중국에서 많이 재배되고 있으며, 건강식품으로 상품화되어 판매되고 있는 *Ganoderma lucidum*(영지버섯)을 대상으로 SCAR marker를 개발하였다. 영지버섯은 중국에서 인기가 높아서 동일품종이 다른 품종명으로 판매되고 있고, 재배과정에서 원품종이 아닌 다른 품종을 재배하기도 하여 혼란을 야기시키기 때문에 이를 구별할 수 있는 marker를 개발하였다고 보고하였다.

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

현재의 품종보호등록과 생산수입판매신고의 이원화된 체계에서는 소비자에게 인기 있는 품종을 중심으로 복제하여 다른 이름으로 유통될 수 있다. 하지만 자실체의 모양으로는 복제된 품종을 구분할 수 없는 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 국내에서 등록 또는 신고되어 유통되고 있는 느타리 품종 판별 마커를 개발하는 것을 목적으로 하였다. 이를 위해, RAPD 분석 결과에서 생성된 특이 DNA band들을 대상으로 새로운 SCAR primer를 제작하여 국내에서 비교적 많이 재배되는 수한 품종의 특이 DNA marker 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

공시균주

이전에 서 등 (2008)이 URP primer 12개로 실험한 결과를

바탕으로 수한 품종과 같은 band 양상을 보인 품종을 제외시키고, marker 개발을 위하여 dendrogram상의 각 group에서 크게 총 18품종을 선정 하여 Operon primer에 대한 RAPD 분석을 수행하였다. 또한 개발한 SCAR 마커를 느타리버섯류 81 품종에 대해 적용하였다(Table 1).

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 이용하여

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	Baekdu1	<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
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

Table 1. Continued

Lane no.	ASI* no.	Commercial name	Species	Source	Year
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
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

Table 1. Continued

Lane no.	ASI* no.	Commercial name	Species	Source	Year
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

처음 DNA의 열변성을 위하여 94°C에서 5분간 1 cycle, 그리고 94°C에서 1분, 35°C에서 1분, 72°C에서 2분간으로 총 40 cycle 실시하였으며, 최종 DNA의 합성은 72°C에서 10분으로 하였다. 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 band를 확인하였다.

품종 특이 PCR 산물의 cloning

Operon primer로 PCR을 수행한 후 전기영동 하여 UV transilluminator에서 품종 특이 band 여부와 사이즈를 확인한 뒤 수한 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 mg/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 정도 배양한 후 positive clone으로부터 white colony를 선별하였다.

*E.coli*에 형질전환된 clone을 ampicillin (100 µg/ml, Sigma Co., USA)이 첨가된 LB액체배지 5 ml에 접종하여 37°C에서 약 18시간동안 진탕 배양한후 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

수한 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 제조는 (주) 바이오니아에 의뢰하였다. 특이 band를 기초로 하여 만들어진 각각의 primer가 SCAR marker로 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 전

체 20 µl의 혼합액을 제조하였다. PCR 증폭반응은 ABI PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems, Germany)을 이용하여 처음 DNA의 열변성을 위하여 94°C에서 5분간 1 cycle, 그리고 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분간으로 총 35 cycles 실시하였으며, 최종 DNA의 합성은 72°C에서 10분으로 하였다. 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 homology를 조사하였다.

결 과

느타리 품종의 RAPD 분석

PCR 과정을 통하여 증폭된 RAPD fragment는 약 100~4000 bp 사이의 구간에서 관찰되었다(Fig. 1). 실험에 사용된 Operon primer (Operon Technologies, INC.) 228개 중에서 수한 품종에서만 특이적으로 나타나는 PCR 산물이 2개 관찰되었다. 수한 품종 특이 band를 보인 primer는 OPF-03 (5'-CCTGATCACC-3')과 OPA-13 (5'-CAGCACCCAC-3')이었다(data not shown).

수한 품종 특이 SCAR marker 개발

OPA-13 primer를 이용한 PCR 결과, 약 600 bp 부근에서

수한 유사품종에 대한 특이 band를 관찰하였으며(Fig. 1), 이 특이 band를 대상으로 cloning과 sequencing을 거쳐 염기서열정보를 바탕으로 random primer를 포함한 염기에 10~12 bp의 염기를 추가하여 SCAR primer (S-OPA13-1) forward 22 mer, reverse 20 mer를 제작하였다(Table 2). 균주번호 2504에 나타난 특이 band clone의 염기서열은 Fig. 2에 나타내었다.

분석된 염기서열을 GenBank의 BLASTN search를 통하여 기존에 알려진 유전자 염기서열과 유사성이 있는지를 확인한 결과 POMFBO1 *Pleurotus ostreatus* cDNA clone MFB02-A05, mRNA sequence와 92%의 homology를 나타내었고, 이를 통해 각각의 염기서열들이 *Pleurotus ostreatus* 특유의 유전자 서열임을 확인할 수 있었다. BLASTX 검색을 통하여 이미 보고된 아미노산 서열과의 유사성을 확인한 결과 큰줄 각버섯인 *Laccaria bicolor*의 predicted protein과 가장 높은 sequence homology (BlastX score = 73.9, E value = 5e⁻²⁵)를 보였다(Table 3).

‘S-OPA13-1’ marker의 PCR 증폭은 ABI PCR SYSTEM 9700을 이용하여 처음 DNA의 열변성을 위하여 94°C에서 5분간 1 cycle, 그리고 94°C에서 1분, annealing 온도는 65°C에서 30초, 72°C에서 2분간 extension 과정을 총 30 cycle 수행하였을 때 가장 양호한 band를 형성하여 이 조건으로 수한 유사품종의 판별을 시도하였다(Table 4). PCR 조건이 맞지 않아도 non-specific한 band가 나올 수 있기 때문에 annealing 온도를 높여가며 실험을 하였고, 이 primer site가 수한 유사 품종들에만 특이적으로 작용하기 때문에 다른 품종들에서는 band가 나타나지 않았다. 느타리속 8종을 포함한 81개 품종을 대상으로 ‘S-OPA13-1’ primer를 이용하여

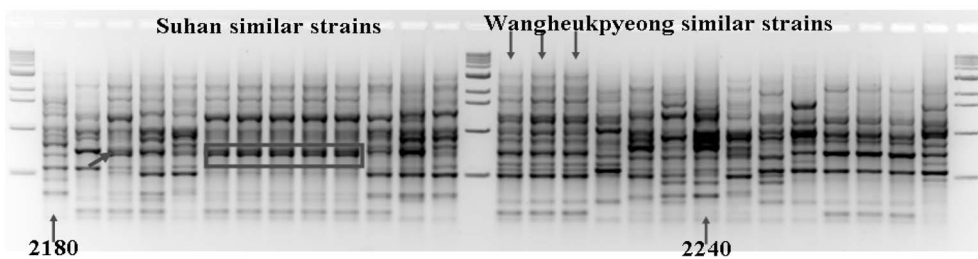


Fig. 1. RAPD fingerprinting patterns of *Pleurotus* species amplified by OPA-13 primers. Molecular weight marker are 1 kb DNA ladder (Bioneer). Arrows indicate strains-specific bands. Lanes 1~27; ASI 2180, 2344, 2504, 2851, 2710, 2829, 2721, 2709, 2796, 2734, 2737, 2535, 2790, 2733, 2826, 2722, 2594, 2001, 2018, 2240, 2593, 2072, 2228, 2487, 2505, 2792, 2181.

Table 2. Sequence of RAPD and SCAR primers used in RAPD and SCAR-PCR analysis of ASI 2504

RAPD primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	GC (%)	T _m (°C)
OPA-13	CAGCACCCAC		
SCAR primer	Nucleotide sequence (5' to 3')		
S-OPA13-1 (F)	CAGCACCCACATAGAAACAATC	45.45	59.50
S-OPA13-1 (R)	TACGCTGCCGGTTAGTATC	55.00	54.10

1 CAGCACCCACATAGAAACAATCTGCATCAAGTGTGACGATCCCAACGAAAGGGAAAGCGA
S-OPA-13-1F
61 TATTAACCATCACTGTTCCAACTCTCAGCTGGGGACACAACCTACCTGTCTCGAGCGT

121 CGACACACCTTCTACGCTCGTCTCAGACCCTAAAAGATCTGTATGACTGCCTCATATGCG

181 AATCCTCCGAATCCCCGAGGAATCATCGAGGACGGCGAGGCATTTGGCTATTCCGAGG

241 TTAATAATGCGGACAAAAACCCTGCGTCATGTGTATCGAAGGTCTTGGCTATGGCGATG

301 GCCAGTCCGATCCGGACTATGCTGAGTATGTGGTTTTTTCATCCGTTGGACGTCGGAGAA

361 CATTCCTTTCTAACCAAGTACCCCTAGCAAACCTTATCGAGCAGATAGGCTTGATCCCAGAG

421 GAGAAGCAACCAAAGATCACGAAGCTAACTCCACCATCGCCACGACCAGGCTCGACTCA

481 TTATTACTCCGAATCAACGAACCGTATTATATGCTCCACCACGGCAATTGGGAGCACTTC

541 GTCGTCGTAGACCAATCAGGCGAGTAACACCAACTTCCCGTCAATGTACAGAGATACTA
601 ACCCGGCAGCGTAGATTACAAAGGCCAACTGATCTTCTCTCCGATTTCCCAATAACCACT
S-OPA-13-1R
661 CATATAACGCCTGTTCTGCTCGATCTGTGTCGTTGGGTGCTGAATCACTAGTGAATTCCGG

721 GCCGCCTGCAGGTCCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCCTTGGATGCATAGCTTGAGTA

781 TTCTATAG

Fig. 2. Nucleotide sequences of ASI 2504 clone. Sequences of OPA-13 fragment used in RAPD analysis are red underlined. S-OPA-13-1F and S-OPA-13-1R were SCAR primers.

Table 3. Putative alignments of nucleotide and protein sequence encoded by ASI 2504 clone

Algorithm	Significant alignments	Score (bits)	E value
BLASTN	AT004523: AT004523 POMFB01 <i>Pleurotus ostreatus</i> cDNA clone MFB02-A05, mRNA sequence	425	1e ⁻¹¹⁵
	XP_001877784: predicted protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]	73.9	5e ⁻²⁵
BLASTX	YP_239367: hypothetical protein 3 [<i>Microplitis demolitor</i> bracovirus]	55.8	4e ⁻⁰⁶
	CAQ43070: putative puuroindoline b protein [<i>Triticum aestivum</i> subsp. <i>macha</i>]	52.0	5e ⁻⁰⁵

PCR 했을 때 URP-PCR에서 수한 유사품종으로 판별된 품종들이 수한과 똑같은 band를 보였으며, 590 bp에서 단일 band가 나타나 다른 품종들과 구분이 쉽고 random primer와 다르게 band의 재현성이 높으며, 진하고 명확한 band를 볼 수 있었다 (Fig. 3 and Fig. 4).

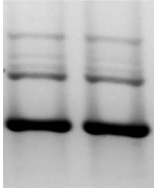

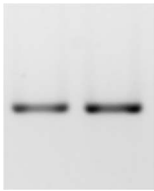
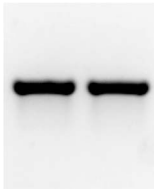
이상의 결과 RAPD 분석에 근거한 SCAR marker 개발이 가능함을 알 수 있었으며, ‘S-OPA13-1’ SCAR marker가 수한 유사품종을 다른 품종군 및 다른 종에 속하는 느타리버섯류와 명확히 구분할 수 있었으므로, 이를 이용하여 앞으로 느타

리 품종의 유통체계를 위한 자료로 유용하게 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

고 찰

느타리속 (*Pleurotus*)은 전세계에 광범위하게 분포를 하며 경제성장과 소득수준의 향상에 의해 매년 수요도 증가하고 재배하는 농가도 증가하고 있다. 국내에서 재배되고 있는 느타리 품종은 생산·판매 신고된 명칭으로 종균을 사용하고

Table 4. PCR condition test for ‘S-OPA13-1’ marker on 1.5% agarose gel

Primer	Annealing temp. (°C)	PCR cycles		
		25	30	35
S-OPA13-1	55	N*	N	
	58		N	N
	60	N		N
	65	N		N

*N: no amplification.

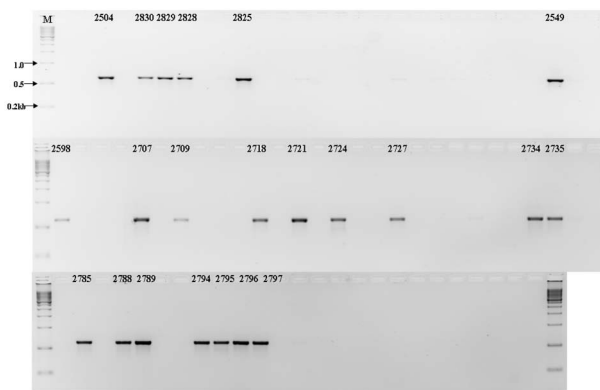


Fig. 3. SCAR-PCR product of *Pleurotus* species DNA amplified by ‘S-OPA13-1’ primer.

있으며, 품종의 정체성과 특성이 명확하게 알려져 있지 않아 재배농가에 혼선을 가져오며, 동일품종이 다른 이름으로 재배되는 경우도 있어 문제점으로 지적되고 있다. 또한 국내의 육종여건 또는 종자산업법 운영상 유통품종의 상당부분이 유사하고 그만큼 유통체계 질서가 혼란스러운 경우가 있다. 새로운 품종을 육성할 때 이미 존재하는 우수품종을 교배친으로 사용하는 것이 보편적이어서 교배친의 품종 수가 상당히

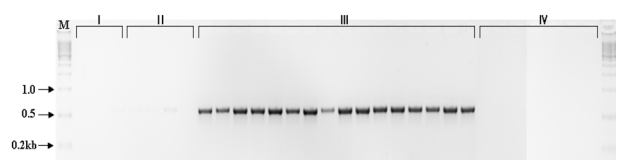


Fig. 4. Systematic classification of SCAR markers for Suhan similar strains obtained with the S-OPA13-1 (F) and S-OPA13-1 (R) primers. The 590 bp fragments were recovered in Suhan similar strains. M: 1 kb plus DNA ladder (TaKaRa). I, Weonhyeong similar strains; II, Wangheukpyeong similar strains; III, Suhan similar strains; IV, Chunchu-2 similar strains.

제한되어 있으며, 국내에서 재배·유통되고 있는 느타리 품종 간 유전적 다형성이 많은 차이가 나지 않아 DNA 분석으로 다형성의 발견이 쉽지 않고, 품종 특이적인 marker 개발이 쉽지 않다.

현재까지 품종구분에 적용된 인자로는 표현형 위주의 형태적 특성이 이용되어 왔지만 정확성이 떨어져, 품종식별에 직접 적용 가능한 보다 효과적인 기법을 도입할 필요성이 요구되고 있다. 또 품종개발자의 권리를 보호하고 차후 우수

한 품종의 지속적인 개발을 장려하기 위해서 무엇보다 품종의 명확한 식별과 특성을 이해하고 유사품종을 판별할 실질적인 수단과 기준을 확보해야 한다.

DNA 다형성 검정방법은 이러한 문제점을 보완하여 환경에 영향을 받지 않고, 품종자체의 고유성을 검정할 수 있는 기술로 인식되고 있으며, 품종 구별성 측면에서 표현형 특성을 대체 보완하는 것으로 활용도가 높다고 할 수 있다. 수한 품종 특이 marker로 개발한 'S-OPA13-1'은 공시한 국내 재배 느타리류 81품종 중 총 22품종에서 단일 band가 나타났는데, 이들 느타리 품종들은 중국에서 도입된 품종으로 추정되는 수한을 제외한 21품종 모두가 한국에서 생산·판매 신고된 품종들이며, 다양한 marker를 이용하여 실험을 하였어도 모두 동일 band pattern을 보이거나 고도의 유전적 유연관계를 보였던 품종들이다. 이러한 결과는 수한 품종의 특이적인 band의 선정에 따른 각각의 염기서열정보에 있어서 수한 유사 품종들간에 공통적인 site가 존재하고 있음을 의미하며, 21품종 모두가 수한 품종과 유전적으로 거의 차이가 없음을 보여 주는 것이다. 유전적인 차이가 극히 적은 이들 수한 유사 품종들이 만약 동일한 품종이 아니라고 하더라도 본 연구에서 수행한 여러가지 분자 marker 실험결과에 의해 이들 품종의 구별성은 인정되지 않았다. 느타리 품종판별에 'S-OPA13-1' marker를 이용한다면 조기에 수한 품종과 매우 유사한 품종을 쉽게 가려낼 수 있어 느타리 품종을 구분하는데 효율을 높일 수 있을 것이다. 동일 band를 나타낸 이들 품종의 육성경위나 품종명은 종균배양소에서 동일품종인 것을 다르게 명칭하였거나 ASI 2504품종을 조직배양한 것으로 추측된다. 또한, 여러가지 분자 marker를 이용한 실험에서 이러한 품종들은 고도의 근연관계를 보여, 공통 모계에서 비롯되었을 것으로 사료된다.

Qin 등 (2006)은 중국에서 많이 재배되는 *Lentinula edodes* (표고버섯) 품종들이 재배 지역에 따라 다른 품종으로 불리고, 지역에 따른 중국의 다양한 기후특성 때문에 고수량성, 고품질의 특성을 가진 버섯들이 고유의 특성을 잃어버리고 품종변이를 겪는다고 하였으며, 품종고유의 특성을 상실하지 않은 원품종을 육종에 올바르게 적용하기 위해 *Lentinula edodes*에 속하는 품종특이 marker를 개발하였다. 이처럼 품종의 보호차원에서 분자 marker의 개발이 필요하다. 본 연구에서 개발한 수한특이 SCAR marker는 수한과 유사한 유전적 구성 및 특성을 가진 품종을 조기에 재배를 거치지 않고 선별할 수 있어 비용과 시간절약을 통해 육종에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 유사품종들에 대한 형질 조사결과 구별성을 보이지 않았기 때문에 SCAR marker는 유사품종 분쟁 발생시 이를 해결하는 효과적인 하나의 수단으로 활용할 수 있을 것이다.

적요

현재 70개 이상의 느타리 품종이 유통되어 재배되고 있

다. 본 연구에서는 81개 품종을 수집하여 핵산지문법으로 분석하였다. 이중 수한과 그 유사품종에서 특이하게 나타나는 밴드를 이용하여 수한 품종에 특이적인 SCAR marker로 개발하였다. 수한 품종 특이 band에 대한 clone을 기존에 알려진 유전자 염기서열과 유사성이 있는지를 확인한 결과 POMFBO1 *Pleurotus ostreatus* cDNA clone MFB02-A05, mRNA sequence와 92%의 homology를 나타냈고, 등록된 아미노산 서열과의 유사성을 확인한 결과 큰줄가버섯인 *Laccaria bicolor*의 predicted protein과 가장 높은 sequence homology (BlastX score = 73.9, E value = $5e^{-25}$)를 보였다. 본 연구를 통하여 개발된 수한특이 마커는 정확한 품종구분이 요구되는 종균유통 과정에서 수한계통 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.
- Albami, M. C., Battey, N. H. and Wilkinson, M. J. 2004. The development of ISSR-derived SCAR markers around the Seasonal Flowering Locus (SFL) in *Fragaria vesca*. *Theor. Appl. Genet.* 109:571-579.
- Bang, K. H., Sung, J. S., Park, C. H., Jin, D. C., Park, C. G., Yu, H. S., Park, H. W. and Seong, N. S. 2004. Discrimination of atractylodes rhizome white using anatomical characteristics and SCAR Markers. *Kor. J. Medicinal Crop Science* 7:53-59.
- Hashimoto, K. and Takahashi, Z. 1974. Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Science* 9:585-593.
- Hoffman, D., Hang, A., Larson, S. and Jones, B. 2003. Conversion of a RAPD marker to an STS marker for barley variety identification. *Plant Mol. Biol.* 21:81-91.
- 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.
- Koveza, O. V. and Gostimsky, S. A. 2005. Development and study of SCAR marker in pea (*Pisum sativum* L.). *Russian J. of Genetics* 41(11):1254-1261.
- Lee, M. Y., Doh, E. J., Park, C. H., Kim, Y. H., Kim, E. S., Ko, B. S. and Oh, S. E. 2006. Development of SCAR marker discrimination of *Artemisia princeps* and *Artemisia argyi* from other *Artemisia* Herbs. *Biol. Pharm. Bull.* 29(4):629-633.
- Paran, I. and Michelmore, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based, markers linked to downey mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Qin, L. H., Zhang, H., Chen, M. J., Tan, Q. and Pan, Y. J. 2004. Microsatellite motif (TATG)_n in *Lentinula edodes*. *Acta Microbiol. Sin.* 44: 474-478.
- Qin, L. H., Tan, Q. I., Chen, M. J. and Pan, Y. J. 2006. Use of intersimple sequence repeats markers to develop strain-specific SCAR markers for *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 257:112-116.
- Song, Y. J., Jeong, M. J., Kim, B. G., Rho, Y. D., Ryu, J. C. and Yoo, Y. B. 1996. Genetic variability of *Pleurotus ostreatus* monospore isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Kor. J. Mycol.* 24(3):186-205.