

큰느타리버섯의 저온적응성 형질에 관련된 SCAR Marker 개발

김수철¹ · 황혜성¹ · 조윤진¹ · 김혜수¹ · 류재산² · 조수정^{1*}
¹경남과학기술대학교 제약공학과, ²경상남도농업기술원 친환경연구과

Development of a psychrophilic-SCAR marker for *Pleurotus eryngii*

Su Chul Kim¹, Hye Sung Hwang¹, Yun Jun Cho¹, Hye Su Kim¹, Jae-San Ryu² and Soo Jeong Cho^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, 33 Dongjin-ro, Jinju 660-758, Korea

²Eco-friendliness Research Department, Gyeongnam-do Agricultural Research and Extension Services, Jinju 660-360, Korea

(Received July 17, 2013 / Revised July 22, 2013 / Accepted September 16, 2013)

ABSTRACT – Genomic DNAs of psychrophilic strains of *Pleurotus eryngii* were analyzed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) using OP-A, OP-B, OP-L, OP-P, OP-R and OP-S3 primers to develop the strain-specific DNA marker. A unique DNA fragment with the size of 480 bp was yielded by OP-S3 primer from the psychrophilic strain. A sequence characterized amplified region (SCAR) marker, designated as OP-S3-1, was designed on the basis of the determined sequence. The PCR analysis with the OP-S3-1 primer showed that this SCAR marker can clearly distinguish the psychrophilic strains from the control strains.

KEYWORDS – OP-S3-1 primer, *Pleurotus eryngii*, Psychrophilic-SCAR marker

최근 들어 우리나라에서는 웰빙과 더불어 친환경 농산물, 유기농 농산물에 대한 관심이 증가하고 있으며 이와 함께 버섯소비량이 증가하는 추세를 보이고 있다. 식용버섯 중에서 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)은 국내 버섯소비량의 대부분을 차지하고 있으며 느타리버섯 보다 육질이 단단하고 향이 있으며 요리적 가치가 우수하다고 알려져 있다. (Lewinsohn 등(2000) 유럽이 원산지인 큰느타리버섯은 1950년대에 유럽에서 인공재배에 성공하였다는 보고가 있으며(Rajaratnam과 Bano, 1987) 우리나라에서도 1970년대 이후부터 인공재배에 관한 연구가 시작되었다(김 등, 1997). 큰느타리버섯을 인공적으로 재배하기 위해서는 버섯배지와 함께 이산화탄소, 온도, 상대습도 등의 생육환경이 필수조건이다(Hashimoto와 Takahashi, 1974). 최근에는 큰느타리버섯의 재배기술이 발달하여 버섯재배 농가들이 자동화 설비를 갖추고 버섯을 연중 대량 생산하고 있지만 곡물가격 상승과 연료비 상승 등으로 많은 어려움을 겪고 있다. 우리나라의 경우 온난화의 영향으로 점차 심화되고 있는 여름철의 고온다습한 기후와 겨울철의 저온건조한 기후에서 큰느타리버섯의 생육 적온인 15°C를 유지하기 위해서는 많

은 연료비가 필요한 실정이며 버섯재배 농가에서는 연료비 절감을 위한 여러 가지 방안을 모색하고 있다. 육종학적인 측면에서 여름철 기후에 대비한 고온적응성 품종을 개발하거나 겨울철 기후에 대비한 저온적응성 품종을 개발하는 것도 버섯재배 농가의 연료비 절감을 위한 하나의 방법일 것이다. 그러나 품종 육종은 시간과 노력이 많이 필요하고 육종된 품종을 판별하는데도 많은 시간이 필요하므로 버섯의 경우 자실체를 발생하지 않고 육종된 품종을 판별할 수 있는 marker가 개발된다면 품종육종에 필요한 시간을 단축할 수 있을 것이다.

지금까지 품종 판별에는 10 bp의 염기서열로 구성된 random primer를 이용한 RAPD 법이 가장 많이 사용되어왔으나 재현성이 떨어진다는 단점이 있어서 최근에는 RAPD의 단점을 보완하기 위해 RAPD primer를 SCAR(Sequence characterized amplified region) marker로 전환하는 것에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Song 등, 1996; Bang 등, 2004; Koveza와 Gostimsky, 2005; Lee 등, 2006; Qin 등, 2006). Paran과 Michelmor(1993)은 처음으로 상추에서 RAPD primer를 SCAR marker로 전환한

*Corresponding author: sjcho@gntech.ac.kr

Table 1. List of primers used in this study

No.	Name	Seq.	No.	Name	Seq.	No.	Name	Seq.
1	OP A-01	CAGGCCCTTC	41	OP L-01	GGCATGACCT	81	OP R-01	TGCGGGTCCT
2	OP A-02	TGCCGAGCTG	42	OP L-02	TGGGCGTCAA	82	OP R-02	CACAGCTGCC
3	OP A-03	AGTCAGCCAC	43	OP L-03	CCAGCAGCTT	83	OP R-03	ACACAGAGGG
4	OP A-04	AATCGGGCTG	44	OP L-04	GACTGCACAC	84	OP R-04	CCCGTAGCAC
5	OP A-05	AGGGGTCTTG	45	OP L-05	ACGCAGGCAC	85	OP R-05	GACCTAGTGG
6	OP A-06	GGTCCCTGAC	46	OP L-06	GAGGGAAGAG	86	OP R-06	GTCTACGGCA
7	OP A-07	GAAACGGGTG	47	OP L-07	AGGCGGGAAC	87	OP R-07	ACTGGCCTGA
8	OP A-08	GTGACGTAGG	48	OP L-08	AGCAGGTGGA	88	OP R-08	CCCGTTGCCT
9	OP A-09	GGGTAACGCC	49	OP L-09	TGCGAGAGTC	89	OP R-09	TGAGCACGAG
10	OP A-10	GTGATCGCAG	50	OP L-10	TGGGAGATGG	90	OP R-10	CCATTCCCA
11	OP A-11	CAATCGCCGT	51	OP L-11	ACGATGAGCC	91	OP R-11	GTAGCCGTCT
12	OP A-12	TCGGCGATAG	52	OP L-12	GGGCGTFACT	92	OP R-12	ACAGGTGCGT
13	OP A-13	CAGCACCCAC	53	OP L-13	ACCGCCTGCT	93	OP R-13	GGACGACAAG
14	OP A-14	TCTGTGCTGG	54	OP L-14	GTGACAGGCT	94	OP R-14	CAGGATTCCC
15	OP A-15	TTCCGAACCC	55	OP L-15	AAGAGAGGGG	95	OP R-15	GGACAACGAG
16	OP A-16	AGCCAGCGAA	56	OP L-16	AGGTTGCAGG	96	OP R-16	CTCTGCGCGT
17	OP A-17	GACCGCTTGT	57	OP L-17	AGCCTGAGCC	97	OP R-17	CCGTACGTAG
18	OP A-18	AGGTGACCGT	58	OP L-18	ACCACCCACC	98	OP R-18	GGCTTTGCCA
19	OP A-19	CAAACGTCGG	59	OP L-19	GAGTGGTGAC	99	OP R-19	CCTCCTCATC
20	OP A-20	GTTGCGATCC	60	OP L-20	TGGTGGACCA	100	OP R-20	ACGGCAAGGA
21	OP B-01	GTTCGCTCC	61	OP P-01	GTAGCACTCC	101	OP S-01	CTACTGCGCT
22	OP B-02	TGATCCCTGG	62	OP P-02	TCGGCACGCA	102	OP S-02	CCTCTGACTG
23	OP B-03	CATCCCCCTG	63	OP P-03	CTGATACGCC	103	OP S-03	CAGAGGTCCC
24	OP B-04	GGACTGGAGT	64	OP P-04	GTGTCTCAGG	104	OP S-04	CACCCCCTTG
25	OP B-05	TGCGCCCTTC	65	OP P-05	CCCCGGTAAC	105	OP S-05	TTTGGGGCCT
26	OP B-06	TGCTCTGCC	66	OP P-06	GTGGGCTGAC	106	OP S-06	GATACCTCGG
27	OP B-07	GGTGACGCAG	67	OP P-07	GTCCATGCCA	107	OP S-07	TCCGATGCTG
28	OP B-08	GTCCACACGG	68	OP P-08	ACATCGCCCA	108	OP S-08	TTCAGGGTGG
29	OP B-09	TGGGGGACTC	69	OP P-09	GTGGTCCGCA	109	OP S-09	TCCTGGTCCC
30	OP B-10	CTGCTGGGAC	70	OP P-10	TCCCGCCTAC	110	OP S-10	ACCGTCCAG
31	OP B-11	GTAGACCCGT	71	OP P-11	AACGCGTCGG	111	OP S-11	AGTCGGGTGG
32	OP B-12	CCTTGACGCA	72	OP P-12	AAGGGCGAGT	112	OP S-12	CTGGGTGAGT
33	OP B-13	TTCCCCCGCT	73	OP P-13	GGAGTGCCTC	113	OP S-13	GTCGTTCCCTG
34	OP B-14	TCCGCTCTGG	74	OP P-14	CCAGCCGAAC	114	OP S-14	AAAGGGGTCC
35	OP B-15	GGAGGGTGT	75	OP P-15	GGAAGCCAAC	115	OP S-15	CAGTTCACGG
36	OP B-16	TTTGCCCGGA	76	OP P-16	CCAAGCTGCC	116	OP S-16	AGGGGGTTC
37	OP B-17	AGGGAACGAG	77	OP P-17	TGACCCGCCT	117	OP S-17	TGGGGACCAC
38	OP B-18	CCACAGCAGT	78	OP P-18	GGCTTGGCCT	118	OP S-18	CTGGCGAACT
39	OP B-19	ACCCCCGAAG	79	OP P-19	GGGAAGGACA	119	OP S-19	GAGTCAGCAG
40	OP B-20	GGACCCTTAC	80	OP P-20	GACCCTAGTC	120	OP S-20	TCTGGACGGA

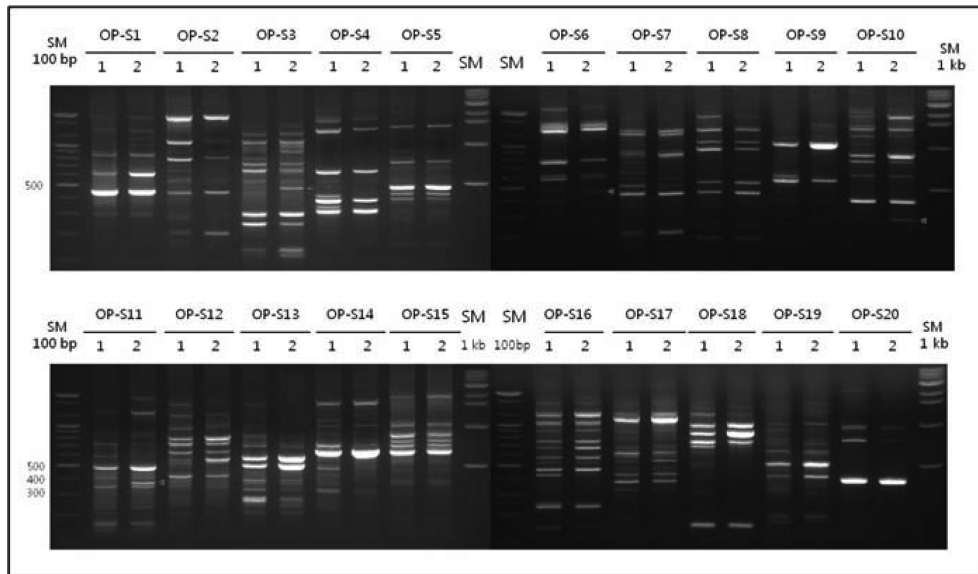


Fig. 1. RAPD analysis of *Pleurotus eryngii* using OPS primers. Molecular weight marker are 100 bp and 1 kb DNA ladder (Bioneer). Arrows indicate specific-bands associated with the psychrophilic strain. Lanes 1; bulked DNA of control, Lanes 2; bulked DNA of psychrophilic strain.

downy mildew 병 저항성 marker를 보고하였으며 Hongyan 등(2008)은 중국에서 약용버섯으로 많이 판매되고 있는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)의 품종을 구별할 수 있는 SCAR marker를 개발하였다고 보고하였다. 또한 서 등(2011)은 RAPD 분석에서 생성된 특이 DNA band들을 대상으로 새로운 SCAR primer를 제작하여 느타리버섯 수한 품종의 특이 DNA marker로 개발하였다고 보고하였다.

본 논문에서는 RAPD 분석을 통해 얻은 큰느타리버섯의 저온적응성과 관련된 특이적인 DNA band의 염기서열을 근거로 SCAR marker를 개발하여 자실체를 발생하지 않고 저온성 형질을 선발할 수 있는 기초자료를 제공하고자 하였다.

공시균주 및 저온적응성 계통 선발

저온적응성과 관련된 마커의 개발을 위해 경남농업기술원에서 수집한 유전자원인 KNR2540와 KNR2502를 큰느타리버섯 표준재배법(류 등, 2007)을 기준으로 표준온도(15°C)와 저온(12°C)에서 생육시켜 균류 기일부터 수확시까지의 생육소요일을 기준으로 저온적응성을 평가하였다. 저온(12°C)에서 KNR2540은 23.0일, KNR2502는 34.5일의 생육소요일을 나타내어 두 계통은 대조적인 형질을 보였다. 표준생육온도인 15°C에서는 KNR2540와 KNR2502 모두 20일의 생육소요일을 나타내어 KNR2540의 저온적응성이 KNR2502보다 우수한 결과를 보였다. KNR2540와

KNR2502에서 단포자를 분리한 다음 무작위로 20계통씩 선발하여 교배한 후 12°C에서 생육특성을 조사하였다. 12°C에서의 생육소요일에 따른 교배개체수를 분석한 결과 정규분포의 특성을 보이고 있어 저온적응성이 양적형질임을 암시하였다. 이 분포도를 기준으로 양말단의 조기 수확집단과 만기수확집단에서 각각 8균주를 선발하여 대조구와 저온성 계통의 공시균주로 사용하였다.

마커 탐색을 위한 RAPD

RAPD를 위한 주형 DNA는 선발된 저온성 계통의 8균주와 대조구 8균주의 genomic DNA를 30 ug/ml의 농도로 bulking하여 사용하였으며(Paran과 Michelmore, 1991) primer(10 mer)는 operon 사의 OPA(20개), OPB(20개), OPL(20개), OPP(20개), OPR(20개), OPS(20개) 등 총 120개를 사용하였다(Table 1). PCR은 bioneer premix kit(Bioneer, Korea)에 bulking한 genomic DNA(50 ng) 2ul, primer(20 pmole) 3 ul, 증류수 15 ul를 첨가하여 다음과 같은 조건으로 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성시킨 뒤 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분의 조건으로 40 cycle을 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 10분 동안 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 확인하였으며 4개의 후보자를 선발하였다. 저온성 계통에 특이적인 DNA band를 나타낸 primer는 OPS primer 시리즈였으며

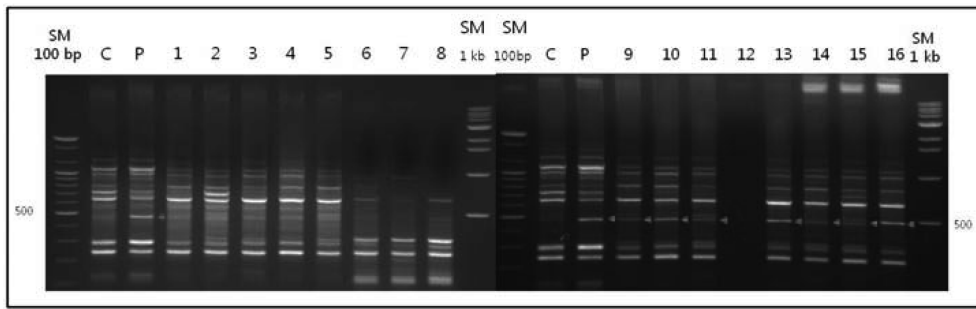


Fig. 2. RAPD analysis of *Pleurotus eryngii* using OP-S3 primers. Molecular weight marker are 100 bp and 1 kb DNA ladder (Bioneer). Arrows indicate specific -bands associated with the psychrophilic strain. Lanes C; bulked DNA of control, Lanes P; bulked DNA of psychrophilic strain, Lanes 1-8; control, Lanes 9-16; psychrophilic strain.

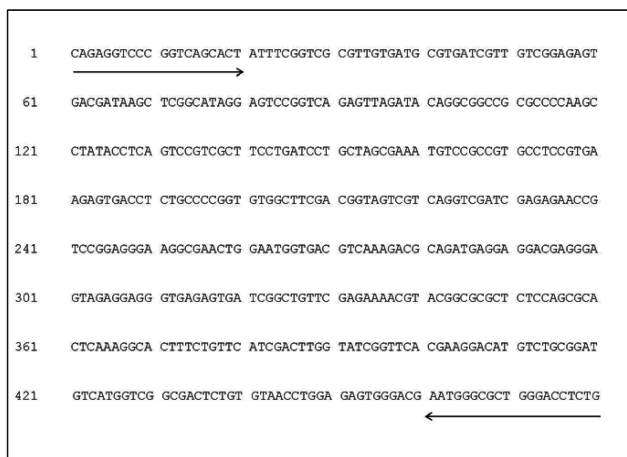


Fig. 3. Nucleotide sequence of OP-S3 fragment used by RAPD analysis. Sequences of SCAR marker OP-S3-1F and OP-S3-1R are underlined.

(Fig. 1) 이중에서 OP-S3 primer를 사용한 저온성 계통의 PCR 산물(480 bp)들이 대조구와 가장 뚜렷한 차이를 나타내었다(Fig. 2)

저온성 계통에 특이적인 PCR 산물의 Cloning 및 염기서열 분석

OP-S3 primer를 이용한 RAPD 결과, 약 480 bp 부근에서 저온성 계통에 특이적인 DNA band가 관찰되었으며 이 DNA band로부터 gel extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 T-blunt PCR cloning kit(SolGent, Korea)를 이용하여 cloning하였으며 cloning 여부는 액체배양한 clone의 plasmid를 plasmid isolation kit(Intron, Korea)를 이용하여 분리한 다음 제한효소인 *EcoRI*(Promega, USA)을 처리하여 확인하였다. 선발된 clone은 Macrogen(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였으며(Fig. 3) 그 결과는 National Center for Biotechnology Information

(NCBI)의 GenBank database에 등록하였다. 분석된 염기서열의 상동성은 NCBI에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 GeneBank database에 등록된 균주들의 염기서열과 계통학적 유연관계를 비교·분석하여 확인하였으며 선발된 clone의 염기서열과 상동성 있는 유전자가 존재하지 않음을 확인할 수 있었다(data not shown).

SCAR marker 디자인

Random primer인 OP-S3 primer를 사용하여 RAPD를 수행한 결과에서 확인된 저온성 계통에 특이적인 DNA band의 염기서열을 근거로 OP-S3 primer의 염기서열에 10 bp의 염기서열을 추가하여 SCAR marker로 사용할 specific primer인 OP-S3-1-F(5'-CAG AGG TCC CGG TCA GCA CT-3')와 OP-S3-1-R(5'-CAG CGC CCA TTC GTC CCA CTC-3')를 디자인하였다. SCAR marker OP-S3-1의 PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성시킨 뒤 94°C에서 1분, 62°C에서 1분, 72°C에서 2분의 조건으로 30 cycle을 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 10분 동안 수행하였으며 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동한 다음 대조구와 구별되는 저온성 계통의 DNA band를 조사하였다. SCAR marker OP-S3-1 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 저온성 계통에서만 480 bp 부근에서 대조구와 구별되는 DNA band를 확인할 수 있었으며 random primer인 OP-S3 primer를 이용하여 PCR을 수행했을 때보다 재현성이 높고 진한 DNA band를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 따라서 OP-S3-1 primer는 저온성 계통의 큰느타리버섯을 구분할 수 있는 SCAR marker로써 이용될 수 있으며 저온성 계통의 큰느타리버섯을 재배하지 않고 선발할 수 있어서 품종육종에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

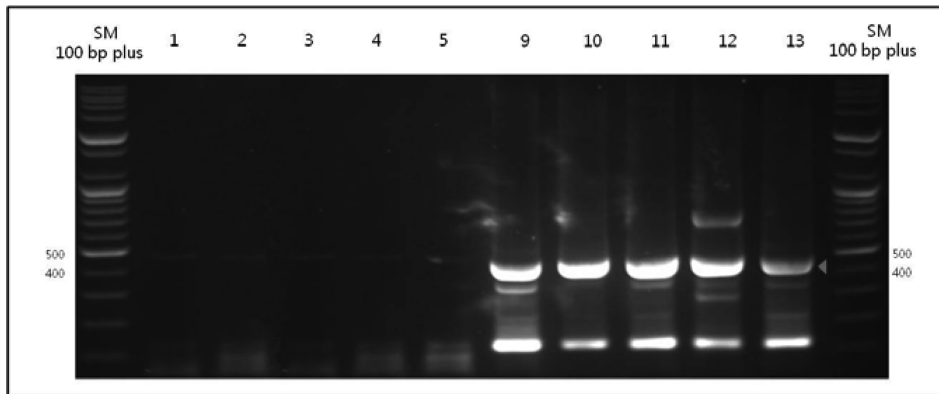


Fig. 4. SCAR-PCR analysis of *Pleurotus eryngii* using OP-S3-1F and OP-S3-1R primers. Molecular weight marker are 100 bp and 1 kb DNA ladder (Bioneer). Arrows indicate specific-bands associated with the psychrophilic strain. Lanes 1-5; control, Lanes 9-13; psychrophilic strain.

적 요

큰느타리버섯의 저온성적응성 형질에 관련된 SCAR marker를 개발하기 위하여 저온성 계통의 8균주와 대조구 8균주의 genomic DNA를 30 ug/ml의 농도로 bulking한 것을 주형 DNA로 사용하고 operon 사의 OPA(20개), OPB(20개), OPL(20개), OPP(20개), OPR(20개), OPS(20개) 등 총 120개 primer를 random primer(10 mer)로 사용하여 RAPD를 수행하였으며 이 중에서 OP-S3 primer를 사용한 PCR 산물들이 대조구와 가장 뚜렷한 차이를 나타내었다. OP-S3 primer를 이용한 RAPD 결과, 약 480 bp 부근에서 저온성 계통에 특이적인 DNA band가 관찰되었으며 이 DNA band의 염기서열을 근거로 SCAR marker로 사용할 specific primer인 OP-S3-1-F와 OP-S3-1-R를 디자인하였다. SCAR marker OP-S3-1 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과에서는 저온성 계통에서만 480 bp 부근에서 대조구와 구별되는 DNA band를 확인할 수 있었으며 random primer인 OP-S3 primer를 이용하여 PCR을 수행했을 때보다 재현성이 높고 진한 DNA band를 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농수산식품기술기획평가원(IPET)의 생명산업과제(과제번호 : 111077-03-SB010)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

김한경, 정종천, 석순자, 김광포, 차동렬, 문병주. 1997.

Pleurotus eryngii 균의 인공재배 (II). 한국균학회지. **25** : 311-319.

류재산, 김민근, 권진혁, 조숙현, 김낙구, 노치웅, 이춘희, 노현수, 이현숙. 2007. 큰느타리버섯의 자실체 생육특성. 한국균학회지. **35** : 47-53.

서경인, 장갑열, 유영복, 박순영, 김광호, 공원식. 2011. 느타리 버섯에서 수한 품종 특이 SCAR marker 개발. 한국균학회지. **39** : 31-38.

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.

Hongyan, S., Lei, W., Yihe, G., Ermei, F., Jie, S. and Linde, L. 2008. Development of strain-specific SCAR markers for authentication of *Ganoderma lucidum*. World J. Microbiol. Biotechnol. **24** : 1223-1226.

Koveza, O. V. and Gostimsky, S. A. 2005. Development and study of SCAR marker in pea (*Pisum sativum* L.). Russian J. of Genetics **41** : 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** : 629-633.

Lewinsohn, D., Nevo, E., Hadar, Y., Wasser, S. P. and Beharav, A. 2000. Ecogeographical variation in the *Pleurotus eryngii* complex in Israel. Mycol. Res. **104** : 1184-1190.

Paran, I. and Michelmore, R. W. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 9828-9832.

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., 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.
- Rajarithnam, R. and Bano, Z. 1987. *Pleurotus* mushrooms. Part 1A. Morphology, Lifecycle, Taxonomy. Breeding and cultivation. *CRC Critical in Food Science and Nutrition.* **26** : 157-222.
- 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** : 186-205.