Journal of Mushrooms 한국버섯학회지 Research Article

느타리버섯 품종 '흑타리'와 '미소'의 초위성체 특성구명

박보경[1] · 하병석[1] · 김민근[1] · 이병주[2] · 최종인[3] · 류재산[1,*]

[1]경상남도농업기술원
[2]충북농업기술원
[3]경기도농업기술원

Characterization of simple sequence repeats in the *Pleurotus ostreatus* cultivars, 'Heuktari' and 'Miso'

Bokyung Park[1], Byeong Seok Ha[1], Min Keun Kim[1], Byungjoo Lee[2], Jong In Choi[3], and Jae-San Ryu[1,*]

[1]*Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services, Jinju, Korea*
[2]*Chungcheongnam-do Agricultural Research & Extension Services, Yesan 340-861, Korea*
[3]*Mushroom Research Institute, GARES, Gwangju, 12805, Korea*

ABSTRACT: Simple sequence repeats (SSR), also referred to "microsatellites" consist of tandemly repeated short DNA sequence motifs and have been applied in various marker-based studies. SSRs were isolated and characterized from 'Heuktari' and 'Miso', which are major oyster mushroom cultivars in Korea, by genome sequencing and bioinformatic analysis. The genome sizes of 'Heuktari' and 'Miso' were estimated to be 40.8 and 40.3 Mb, respectively, which are larger than those of other *P. ostreatus* species (PC9 and PC10) and smaller than those of *P. eryngii* (KNR2312P5). In total, 949 and 968 SSRs were found in the 'Heuktari' and 'Miso' genomes, respectively. Comparative analysis of five mushrooms including *P. ostreatus* var. *florida* (PC9 and PC15) and *P. eryngii* revealed that the number of SSRs in 'Heuktari' and 'Miso' were the highest among them. All mushrooms studied showed similar SSR distribution patterns. Tri-, hexa-, and octanucleotide motifs accounted for the top three fractions of all SSRs.

KEYWORDS: Simple sequence repeat, *Pleurotus ostreatus*, Mushroom, Molecular marker

서 론

SSR은 진핵생물의 유전체에 광범위하게 존재하며 1~10개 정도의 짧은 DNA 서열이 병렬적으로 반복을 보이는 구조를 가진다. 반복서열의 반복수가 다양하므로 양쪽 측면의 프라이머로 PCR 증폭하면 크기가 다른 SSR을 전기영동을 통하여 확인 가능하다. 이들은 높은 빈도로 집단내나 집단간에 변이가 있고 공우성 방식으로 유전되며 빠르고 쉽게 판별이 가능하기 때문에 유전자간의 연관관계 파악, 유전자 지도 구축(Bindler *et al,* 2011; El-Rodeny *et al*, 2014), 유전적 다양성 관찰, 구축한 집단의 구조를 연구하고(Zhang *et al*, 2011; Yoon *et al*, 2012), 형질의 양적형질(QTL)을 연구하는(Collard & Mackill, 2008; Varshney *et al*, 2009; Im *et al*, 2016) 등 다양한 분야에서 사용되었다. SSR의 생물학적 기능에 대한 연구에 따르면, 이들은 세균의 기주내 환경적응에 활용되고(Moxon *et al*, 2006), 인간 질병의 원인, 진화과정이나 유전자 발현조절에 관여하는 것으로 보고되었다(Benson, 1999). 균류에서의 SSR의 역할에 대한 연구는 몇몇 균주에 대해 한정적으로 연구되었는데(Karaoglu *et al*, 2004; Labbé *et al*, 2011), 느타리버섯 유전체내의 초위성체는 대부분 exon외에 존재하여 유전자 사이의 영역에 존재하는 것으로 예측되었다(Qu *et al*, 2016). 유전체가 복제될 때 다양

J. Mushrooms 2016 December, 14(4):174-178
http://dx.doi.org/10.14480/JM.2016.14.4.174
Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
© The Korean Society of Mushroom Science
*Corresponding author
E-mail : coolmush@korea.kr
Tel : +82-55-254-1353, Fax : +82-55-254-1319
Received December 5, 2016
Revised December 14, 2016
Accepted December 16, 2016

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.

Table 1. Comparative statistics for the JHH021, HMS012 and other *Pleurotus* genomes.

Genome assembly	Characteristics				
Strain	PC9	PC15	JHH021	HMS012	KNR2312P5
Genome size(Mbp)	35.6	34.3	40.8	40.3	43
Number of scaffold(contig)	572	19	127	67	340
Largest scaffold(Mbp)	4.4	4.8	5.4	4.6	3.2
Sequencing platform	454+Sanger	Sanger	PacBio RSII	PacBio RSII	454+Hi-Seq

한 요인으로 인하여 복제효소의 작용으로 SSR에 돌연변이가 생길 수 있는데(Chistiakov *et al*, 2005), 이때 반복서열이 더해지거나 빠져나감으로써 SSR의 크기가 달라질 수 있다(Wei *et al*, 2015). SSR이 늘어나거나 줄어 드는 것은 유전체 전체의 안정성과 진화와 교차에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고되었다(Ellegren *et al*, 2004; Loire *et al*, 2013).

느타리버섯은 국내에서 가장 많이 생산되는 버섯종으로 2015년에 62,466톤이 생산되어 전체 버섯 생산량 167,366.14톤의 37.3%를 차지하였다(Ministry for Agriculture, Food, Rural Affairs, 2015특용작물생산실적, 2016). 다양한 품종이 개발되어 있는데, 그 중 '흑타리'버섯은 다수확이며 갓색이 진하고 고온생육성이 우수하여 인기가 높고(Choi *et al*, 2015), '미소'는 '원형1호'의 백색변이종으로 알려져 있는 품종이며 갓색이 백색이고 저온생육이 가능하다(Lee *et al*, 2010).

본 연구에서는 느타리버섯의 주요 품종 중 대립형질을 지닌 '흑타리'와 '미소'의 단핵균사를 선발하여 PacBio를 통하여 유전체를 해독하고 이로부터 SSR의 특징과 분포를 살펴보고자 하였다.

흑타리와 미소 유래 단핵균사의 유전체 특성

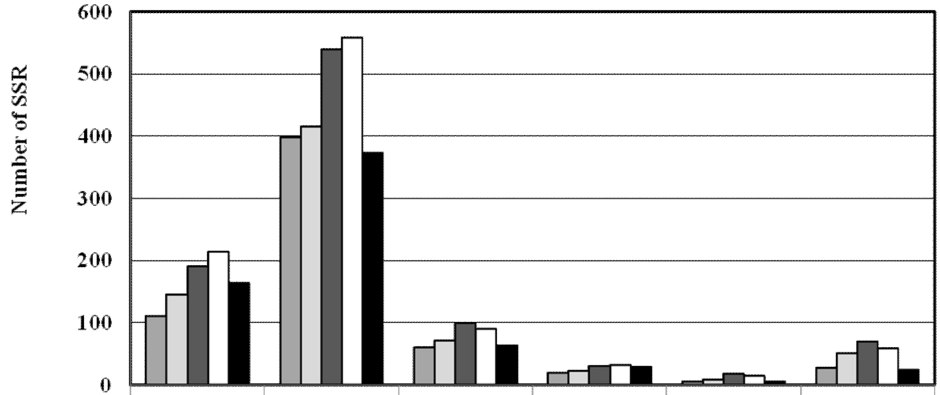
'흑타리(JHH)'와 '미소(HMS)'의 단포자에서 클램프 존재를 기준으로 각각 10개의 단핵균사(monokaryon)를 무작위로 선정하여 상호교배를 실시하고, 임성이 생긴 교잡주를 느타리 표준재배법으로 생육시켜 표현형질을 분석하였다. 교잡균주 JHH021×HMS012가 갓색, 대색, 수량성에 있어 집단의 평균값을 보여서(data not shown), JHH021와 HMS012계통을 연구대상으로 선발하였다. 이들 계통의 유전체는 어버이의 염색체가 감수분열 동안 일어나는 재조합의 결과이므로 어버이 유전체의 평균적인 특성을 지녔을 것으로 예측할 수 있다. gDNA 추출을 위하여 MCM 액체배지에 접종하여 25°C, 120 rpm으로 10일 이상 배양한 후 무균적으로 세척과 여과 후 동결건조하여 분쇄하였다. Wizard Genomic DNA purification Kit(Promega Corporation, Madison, WI, USA)를 이용하여 균사분말에서 gDNA를 추출하여 DNA template Prep Kit 2.0 (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA)와 Blue Pippin system(Sage Science, Inc, Bevery, MA, USA)이용하여 library를 구축하고 Pacific Biosciences SMRT (PacBio) sequencing system(Au *et al,* 2012)을 통해 유전체를 해독하여 PacBio 내장 프로그램으로 alignment를 통하여 contig로 조립하였다. JHH021와 HMS012계통의 유전체 크기는 각각 40.8 Mbp와 40.3 Mbp(Table 1)로 사철느타리(*P. ostreatus* var. *florida*)로 알려진 PC15과 PC9의 34.3 Mbp과 35.6Mbp에 비해 약 117% 컸다(Riley *et al*, 2014). 큰느타리의 유전체 크기인 43 Mbp보다는 크기가 적었다(Ryu *et al*, 2012). 유전체의 크기가 다른 것은 PC9가 PC15가 사철느타리라는 차이에 의한 것으로 판단되지만, 서열분석의 방법에 의한 가능성도 배제할 수 없다. PacBio sequenceing이전의 유전체 해독방법은 상대적으로 짧은 길이로 읽혀져서 많은 수의 contig가 생성되는데, 이로 인해 잘못 mapping 되거나 조립될 수 있으며, 유전체 상에 GC 비율이 매우 높거나 낮은 경우에는 제대로 읽혀지지 않을 수가 있다(Carneiro *et al*, 2012). 느타리류 유전체 해독보고의 예가 많치 않으므로 이것이 전형적인 느타리, 사철느타리, 큰느타리의 유전체 크기인지는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

SSR 분포와 특징

SSR Locator I (Maia *et al*, 2008)을 이용하여 최소한

Table 2. Occurrence of SSR in the five fungal genomes.

Repeat type	Number of SSR loci				
	PC9	PC15	JHH021	HMS012	KNR2312P5
Mononucleotide	8	18	16	15	18
Dinucleotide	18	28	24	40	43
Trinucleotide	105	112	131	125	203
Tetranucleotide	40	40	78	109	32
Pentanucleotide	56	70	88	90	74
Hexanucleotide	142	147	156	155	107
Heptanucleotide	77	67	85	90	33
Octanucleotide	99	126	109	155	66
Nanucleotide	39	49	116	83	47
Decanucleotide	14	18	93	63	27
Compound type	24	40	53	43	9
Total	622	715	949	968	659



	10-20mers	21-30mers	31-40mers	41-50mers	51-60mers	over 60mers
PC9	110	398	60	19	6	28
PC15	145	415	72	23	9	51
JHH021	191	539	100	31	18	70
HMS012	215	558	90	32	14	59
KNR2312P5	164	373	64	29	5	24

Fig. 1. Length-frequency distribution of the SSRs in the five fungal genomes.

monomers(×20), 2-mers(×10), 3-mers(×7), 4-mers(×5), 5-mers(×4), 6-mers(×4), 7-mers(×4), 8-mers(×3), 9-mers (×3) and 10-mers(×3)을 가지는 SSR을 각각의 유전체 정보에서 추출하였다(Table 2). JHH021와 HMS012의 SSR 갯수는 각각 949개와 968개로 사철느타리인 PC9과 PC15의 715개와 622개의 133%와 135% 수준으로 많았다. 또한, 큰느타리의 659개보다도 45%이상 많았다. 일반적으로 유전체의 크기와 SSR의 개수에는 큰 상관이 없다고 알려져 있으나(Karaoglu *et al*, 2004), 이번 결과는 일반 느타리인 JHH021와 HMS012계통의 유전체의 크기가 사철느타리 보다 크고 SSR의 개수도 많았다. 또한, 크기가 117% 큼에도 약 134% 많은 SSR의 개수를 보여 주어 근연종 내에는 기존과 다른 규칙이 있을 가능성이 제기된다. 그리고 전체 유전체 내에서 어느 정도의 빈도수로 나타나는 지를 분석한 결과, PC9의 경우, 17 SSRs/Mbp, PC15에서는 21 SSRs/Mbp, JHH021계통에서는 23 SSRs/Mbp, HMS012에서는 24 SSRs/Mbp, 마지막으로 큰느타리에서는 15 SSRs/Mbp로 분석되었다. 기존의 연구에서 다른 균류에서 SSR의 발현 빈도가 10-100여개 사이라고 했는데 본 연구에서의 결과는 이에 부합됨을 확인할 수 있었다(Karaoglu *et al*, 2004; Labbé *et al*, 2011). 분석결과, JHH021과 HMS012가 유전체 크기가 크지만, 오히려 SSR이 다른 종에 비해 평균적으로 좀더 촘촘히 분포되어 있음을 알 수 있었으며, PC9과 PC15와 함께 비교했을 경우, 유전체 크기에 비례할 가능성을 볼 수 있었다. 하지만 큰느타리의 경우, 앞선 느타리들에 비해 유전체 크기에 가장 컸지만, 적은 수의 SSR이 넓은 간격으로 분포된 것을 확인할 수 있었다.

반복서열의 분포 비율을 살펴보면, 비교한 5개 유전체 내에서 가장 높은 빈도를 보인 3가지 형태는 3-mers, 6-mers와 8-mers로 나타났다(Table 2), 그 중 6-mers는 큰느타리를 제외하고 가장 빈도수가 높은 패턴이었다. 자낭균문(Ascomycota) 곰팡이 유전체의 SSR 분포는 주로 monomer와 2-mers의 비중이 높고(70~80%), 5-mers 이상은 소수에 지나지 않아 담자균문과 다른 것으로 평가된다(Karaoglu *et al*, 2004). 또한 일반적으로 곰팡이의 유전체 내 SSR은 인간의 유전체에 있는 것보다 빈도수와 길이가 긴 경우가 적다고 알려져 있는데(Karaoglu *et al*, 2004), 본 연구결과에서는 10-mers가 3개 이상 반복된 경우가 흑타리의 9.8%, 미소의 6.5%로 다른 계통의 유전체보다 높은 비율을 보였다. SSR의 길이분포가 종간의 유연관계, 안정성, 유전자 발현과 관련있다는 보고가 있으므로(Li *et al*, 2004), 각 유전체 별로 분석해보았는데, 5개 유전체 모두 20-30 bp크기가 가장 높은 빈도를 보여주었고 길이가 길어질수록 빈도수가 낮아지는 경향이었다(Fig. 1). 이는 자낭균문 곰팡이의 SSR의 길이 분포와 일치하는 결과이다(Karaoglu *et al*, 2004). 그리고 같은 종 내에 있는 PC9, PC15, JHH021 그리고 HMS012를 비교했을 경우, 10 bp이상부터 60 bp이상의 크기를 포함한 SSR에서 JHH021과 HMS012가 어느 크기에서든 PC9과 PC15에 비해 더욱 많이 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 큰느타리의 경우, PC9, PC15, JHH021 그리고 HMS012에 비해 유전체 크기는 크지만 SSR의 크기에 따른 분포는 낮은 것으로 나타났다. 위의 결과들로 미루어 볼 때, 종에 따라서 유전체 크기 그리고 SSR의 특성에 따른 연관성은 달라지는 것으로 보이며, 이들간의 생물학적인 의미를 파악

하는 것은 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다.

분자마커는 버섯을 비롯한 생물의 표현형질과 연관된 유전인자를 관찰하는데 중요한 역할을 하며, 유전자의 genome 상의 위치 파악, 마커를 기반으로한 육종, 유전자 클로닝, 여교배 그리고 유연관계 분석과 같이 다양한 영역에서 활용되어 왔다(Miah *et al*, 2013). 다양한 종류의 분자마커가 개발되었으나, 빠르고 쉬우며 경제적으로 판별이 가능한 SSR은 집단 내에서도 다형성을 보여줄 정도의 다양성을 갖춤으로서 사용의 폭이 넓어지고 있다. 본 연구를 통하여, 갓형, 갓색, 수량, 생육 적온에서 서로 대립되는 형질을 지닌 흑타리와 미소에서 유래한 SSR은 향후 느타리의 농업적 중요 형질을 선발 할 수 있는 분자마커 개발과 형태학적인 판정이 어려운 품종 판별마커 개발 등의 다양한 분야에서 생물학적 활용도가 높을 것으로 사료된다.

적 요

SSR은 병렬적으로 반복되는 작은 DNA서열을 말하며, 다양한 마커 기반 연구에 활용되고 있다. 국내의 주요 느타리품종인 '흑타리'와 '미소'의 유전체를 Pacbio를 이용하여 해독하였고 이 서열 정보에서 생물정보학을 이용하여 SSR을 분리하여 특성구명을 하였다. '흑타리'와 '미소' 유래 단핵균사의 유전체의 크기는 각각 40.8 Mbp와 40.3 Mbp로 밝혀졌고, 이는 사철느타리의 단핵균사 PC9과 PC15보다 컸으나, 큰느타리보다는 작았다. 총 949개와 968개의 SSR이 '흑타리'와 '미소'의 유전체 분석을 통하여 각각 검출되었다. 5개의 느타리류 유전체의 SSR 분포와 특징을 비교분석한 결과 흑타리와 미소의 SSR 갯수가 가장 많았으며, 이들의 반복서열의 분포는 다른 느타리류와 비슷한 경향을 보였다. 3-mers, 6-mers와 8-mers가 가장 발견빈도가 높은 패턴이었다.

감사의 글

본 연구는 본 연구는 농림축산식품부 Golden Seed Project사업(원예종자사업단, 과제번호: 213003-04-3-SBY20)에 의해 이루어진 것으로 연구비 지원에 감사드립니다.

References

Au KF, Underwood JG, Lee L, Wong WH. 2012. Improving PacBio long read accuracy by short read alignment. *PLoS One.* 7: e46679.

Benson G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic acids research.* 27: 573.

Bindler G, Plieske J, Bakaher N, Gunduz I, Ivanov N *et al.* 2011. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. *Theoretical and Applied Genetics.* 123: 219-230.

Carneiro MO, Russ C, Ross MG, Gabriel SB, Nusbaum C, DePristo MA. 2012. Pacific biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data. *BMC Genomics* 13:375.

Chistiakov DA, Hellemans B, Haley CS, Law AS, Tsigenopoulos CS., Kotoulas G, Bertotto D, Libertini A, Volckaert FA. 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass Dicentrarchus labrax L. *Genetics.* 170: 821–1826.

Choi JI, Lee YH, Ha TM, Jeon DH, Chi JH, Shin PG. 2015. Characteristics of new mid-high temperature adaptable oyster mushroom variety "Heuktari" for bottle culture. *Journal of Mushroom.* 13: 74-78.

Collard BCY, Mackill DJ. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 557-572.

da Maia LC, Palmieri DA, de Souza VQ, Kopp MM, de Carvalho FIF, Costa de Oliveira A. 2008. SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation. *International Journal of Plant Genomics* 2008:1-9.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 5: 435–445.

El-Rodeny W, Kimura M, Hirakawa H, Sabah A, Shirasawa K *et al.* 2014. Development of EST-SSR markers and construction of a linkage map in faba bean (*Vicia faba*). *Breeding Science.* 64: 252-263.

Im CH, Park Y-H, Hammel KE, Park B, Kwon SW *et al.* 2016. Construction of a genetic linkage map and analysis of quantitative trait loci associated with the agronomically important traits of *Pleurotus eryngii*. *Fungal Genetics and Biology.* 92: 50-64.

Karaoglu H, Lee CMY, Meyer W. 2004. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. *Molecular Biology and Evolution.* 22: 639-649.

Labbé J, Murat C, Morin E, Le Tacon F, Martin F. 2011. Survey and analysis of simple sequence repeats in the *Laccaria bicolor* genome, with development of microsatellite markers. *Current Genetics* 57: 75-88.

Lee BJ, Kim YG, Kim HK, Yang ES, Lim YP. 2010. Studies on the development of mushroom media for bottle culture in new *Pleurotus ostreatus* 'Miso'. *J Mushroom Sci Prod.* 8: 37-40.

Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Nevo E. 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. Mol Biol Evol. 21(6): 991-1007

Loire E, Higuet D, Netter P, Achaz G. 2013. Evolution of coding microsatellites in primate genomes. *Genome Biol Evol.* 5: 283–295.

Miah G, Rafii M, Ismail M, Puteh A, Rahim H *et al.* 2013. A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. *Inter J Molecular Sci.* 14: 22499-22528.

Ministry for Agriculture, Food, Rural Affairs (MAFRA). Republic of Korea. 2016. The actual putout of oil seeds and cash crops in 2015:pp63

Moxon R, Bayliss C, Hood D. 2006. Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Annu Rev Genet.* 40: 307-333.

Qu J, Huang C, Zhang J. 2016. Genome-wide functional analysis

of SSR for an edible mushroom Pleurotus ostreatus. *Gene*. 575: 524-530.

Riley R, Salamov AA, Brown DW, Nagy LG, Floudas D *et al*. 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Pro Nat Acad Sci*. 111: 9923-9928.

Ryu JS, Kim KH, Im CH, Je HJ, Kim MK, Chae SM. 2012. Complete Genome Sequence of *Pleurotus eryngii* KNR2312 Using the Next Generation Sequencing (NGS). 80th meeting of the mycological society of America. The mycological society of America. New Haven, CT. USA.

Varshney RK, Bertioli DJ, Moretzsohn MC, Vadez V, Krishnamurthy L *et al*. 2009. The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theo Appl Genetics*. 118: 729-739.

Wei W, Davis RE, Suo X, Zhao Y. 2015. Occurrence, distribution and possible functional roles of simple sequence repeats in phytoplasma genomes. *Inter J syste evol microbiol*. 65: 2748-2760.

Yoon M-Y, Moe KT, Kim D-Y, Rho I-R, Kim S *et al*. 2012. Genetic diversity and population structure analysis of strawberry *(Fragaria x ananassa Duch.)* using SSR markers.

Zhang P, Li J, Li X, Liu X, Zhao X, Lu Y. 2011. Population Structure and Genetic Diversity in a Rice Core Collection (*Oryza sativa* L.) Investigated with SSR Markers. *PLoS One*. 6: e27565.