

RESEARCH ARTICLE

표고버섯 품종 산마루1호, 천장3호를 구분할 수 있는 CAPS Marker 개발

문수윤^{1†}, 이화용^{1,2†}, 김명길³, 가강현³, 고한규⁴, 정종욱⁵, 구창덕^{2*}, 류호진^{1*}

¹충북대학교 생물학과, ²충북대학교 산림학과, ³국립산림과학원 화학미생물과, ⁴산림조합중앙회 산림버섯연구센터, ⁵충북대학교 특용식물학과

Development of Cleaved Amplified Polymorphic Sequence Markers for the Identification of *Lentinula edodes* Cultivars Sanmaru 1ho and Chunjang 3ho

Suyun Moon^{1†}, Hwa-Yong Lee^{1,2†}, Myungkil Kim³, Kang-Hyeon Ka³, Han Kyu Ko⁴, Jong-Wook Chung⁵, Chang-Duck Koo^{2*}, Hojin Ryu^{1*}

¹Department of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea
²Department of Forest Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea
³Wood Chemistry and Microbiology Division, National Institute of Forest Science, Seoul 02455, Korea
⁴Forest Mushroom Research Center, National Forestry Cooperative Federation, Yeosu 12653, Korea
⁵Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

*Corresponding author: koocdm@chungbuk.ac.kr, hjryu96@gmail.com

†Co-first author

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 June, 45(2): 114-120
<https://doi.org/10.4489/KJM.20170014>

pISSN : 0253-651X
 eISSN : 2383-5249

Received: 7 March, 2017

Revised: 17 April, 2017

Accepted: 19 April, 2017

© 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.

Abstract

Lentinula edodes is an edible mushroom that is mainly cultivated in Asian countries. Recently, new cultivars of this mushroom have been developed in Korea; variety protection is very important, so the development of efficient molecular markers that can distinguish each variety is required. In this study, we developed cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for the identification of *L. edodes* cultivars (Sanmaru 1ho and Chunjang 3ho). These markers were developed from whole genomic sequencing data from *L. edodes* monokaryon strain B17 and resequencing data from 10 dikaryon strains. A single nucleotide polymorphism changed in scaffold 9 POS 1630048 in Sanmaru 1ho(G→T), and in scaffold 13 POS 920681 in Chunjang 3ho (G→A). The restriction enzymes *TspRI* and *XhoI* distinguished Sanmaru 1ho and Chunjang 3ho, respectively, from other strains. Thus, we developed 2 CAPS markers for the identification of the *L. edodes* cultivars Sanmaru 1ho and Chunjang 3ho.

Keywords: CAPS marker, Genome-wide, *Lentinula edodes*, Single nucleotide polymorphism

서론

표고버섯은 한국, 중국, 일본 등 아시아 국가에서 일반적으로 재배되는 버섯으로[1], 2014년 전세계 버섯 생산의 약 17%를 차지하였다[2]. 2014년과 2015년 국내 표고버섯의 생산액과 생산량은 국내 임산버섯 생산의 약 97%를 차지하고 있고[3], 우리나라 국민의 버섯 선호도는 표고버섯(20.6%), 새송이버섯(13.4%), 느타리버섯(12.9%), 양송이버섯(11.1%), 팽이버섯(8.9%) 순이었다[4]. 이처럼 표고버섯은 버섯 시장, 그리고 단기소득 임산물에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다.

우리나라는 2002년에 국제식물신품종보호동맹(International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV)에 50번째로 정식 가입하였으며, 2008년부터는 표고버섯이 ‘종자산업법’에 의거한 품종보호 대상 작물로 지정되었다. 그리고 2010년 10월 제 10차 생물다양성협약 당사국 총회를 통해 나고야 의정서가 채택됨에 따라 각국은 현재 보유하고 있는 유전자원에 대한 보호를 강화할 것으로 생각된다.

이에 따라 표고버섯의 품종을 개발할 때 품종의 구별성은 더욱 중요해지고 있으며, 우리나라에서는 산림청에서 제작한 표고버섯 특성조사요령에 의하여 품종간 구별을 하고 있다[5]. 하지만, 형태 표지 이외에 분자마커를 이용한다면 품종 구분에 있어서 더욱 객관적이고 효율적일 것이다. 따라서 국내에서 보급되고 있는 국산 표고버섯 품종을 분자마커로 구분하는 것은 우리나라 표고버섯 유전자원을 보호하는 한편 수입 품종에 대한 구별성 확보 등에 중요하다.

표고버섯의 품종 및 야생 균주에 대한 구분, 다양성, 형질 등을 분석하기 위하여 restriction fragment length polymorphism (RFLP) [6], random amplified polymorphic DNA (RAPD) [7-9], amplified fragment length polymorphism (AFLP) [10], simple sequence repeat (SSR) [11], inter-simple sequence repeat (ISSR) [8, 12, 13], sequence-characterized amplified region (SCAR) [9, 14-16], sequence-related amplified polymorphism (SRAP) [8, 13] 등의 분자마커를 이용하였다. 이러한 분자마커는 유전 현상의 본질인 DNA를 기반으로 하기 때문에 세포의 성장과 발달, 분화 등과 관계없이 안정적인 결과를 얻어낼 수 있고, 모든 조직에서 검출이 가능하다는 장점을 가지고 있다[17]. 최근 Shim 등[18]과 Chen 등[19]에 의하여 표고버섯의 genome sequencing이 수행되어 발표됨에 따라 앞으로 표고의 형질 관련 그리고 각 품종을 구분할 수 있는 분자마커 개발이 활발히 진행될 것으로 보인다.

DNA 염기서열 상에 생길 수 있는 변이로는, 염기서열 하나의 치환인 single nucleotide polymorphism (SNP)와 염기 서열 하나 이상의 삽입 또는 결실인 insertion and deletion (Indel)이 있다. 현재까지 개발된 다양한 분자마커 중 몇몇은 품종간의 판별과 다양성 분석에 이용되어 왔는데[8, 20], 그 중 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)는 DNA 염기서열의 변이로 인해 생기거나 사라진 제한효소 인식부위를 탐지하여 이를 마커로써 이용하는 방법이다[21]. CAPS를 이용한 분석법은 고가의 장비를 필요로 하지 않을 뿐만 아니라, 간단한 과정을 통해 안정적이고 명확한 결과를 얻어낼 수 있다는 장점이 있다[22]. 본 연구에서는 표고버섯 품종 산마루1호와 천장3호를 구분할 수 있는 CAPS 마커를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

시험균주와 DNA 추출

시험에는 표고의 표준유전체 대상균주인 B17 [18]을 포함하여 산림과학원에서 육성된 균주 5종(백화향, 산백향, 천장3호, 산마루1호, 산마루2호), 산림조합에서 육성된 균주 4종(산조701호, 산조707호, 산조708호, 참아람)이 이용되었다. 균주들은 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 25°C에서 암배양 하였다.

DNA 추출은 potato dextrose broth (PDB) 배지에 접종하여 약 2주간 암조건에서 25°C, 110 rpm 진탕배양한 균사체를 이용하였다. 배양한 균사체를 미라클로스(mira cloth)에 여과시킨 후 PBS buffer (135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄ 및 1.4 mM KH₂PO₄)로 세척하고 키친 타올로 물기를 제거하였다. 건조된 균사 100 mg을 액체질소에 얼려 막자사발로 곱게 갈은 후, 제조사의 프로토콜에 따라 GenEx Plant kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 튜브에 옮겨 담은 균사체에 PL buffer 500 µL를 넣고 65°C에서 10분간 가열해준 후 pipette을 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 녹여 Micro-spectrophotometer K5600 (BioFuture Inc., Toyko, Japan)으로 정량 후 20 ng/µL로 희석하여 다음 실험에 사용하였다.

CAPS 마커 개발

산마루1호와 천장3호에 특이적으로 존재하는 SNP와 Indel은 Hillier 등[23]이 이용한 방법과 유사한 방법을 이용하여 동정하였다. 9개 균주에서 추출한 genomic DNA의 resequencing data를 표고 전장유전체정보와 alignment하여 산마루1호와 천장3호에 특이적으로 존재하는 SNP와 Indel을 선별하였다. 표고 균주의 resequencing은 Healey 등[24]의 방법을 응용하여 Hiseq 2500 platform을 이용하여 수행하였다. 선별한 SNP와 Indel을 중심으로 flanking sequence를 추출하여 matrix를 만들었다. Primer3Plus (<http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)를 이용해 변이를 포함하는 마커 서열을 증폭할 수 있는 프라이머를 디자인하였다(Table 1).

프라이머 디자인 후 PCR은 추출한 genomic DNA 20 ng를 주형으로, 95°C에서 3분, 다시 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 20초로 35사이클을 증폭한 후, 추가로 72°C에서 5분간 반응시켰다. B17과 산마루1호, 천장3호의 증폭된 마커 서열을 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. 실험에 사용된 10개 균주에서 PCR을 통해 증폭한 마커 서열에 제한효소를

Table 1. Characteristics of primer sets for identification Sanmaru 1ho and Chunjang 3ho

	Primer name	Primer sequence	Target DNA sequence	T _m (°C)	Size (bp)
1	RL-LE-116 F	CTGGAAAAGGGCCTCATTCT	CTGGAAAAGGGCCTCATTCTaaagagtcactaagtacatgcaaatgatcatga	58	242
	RL-LE-116 R	GACATGCCCATTCGAAGACT	atttctcaagtcaaaagtctctgaattatttctcagggtctactacatagctactatcatcatcaTtgat ttgtttgacatgtgtacaaaagacaccagggaactgcttcaattgtcgggtggcagatagaccttgat gccggttggccgacacccataggcaaacatAGTCTTCGAATGGGCATGTC		
2	RL-LE-134 F	ACCTTTGCGGTGTGTCTTCT	ACCTTTGCGGTGTGTCTTCTcttctgtctgtaggaaaagggtctcatgcactcttc	58	183
	RL-LE-134 R	AGGTCCTTTCCATTCGCCTT	atcagcactatgctgacgaaacgcttggcgttttcagcctcgctcAaggaaatgaacgaattac ttcgagagatctttccgacgggagaataaacactgatagcaaAAGGCGAATGGAAA GGACCT		

T_m, annealing temperature; Size, size of the fragment amplified with CAPS primers.

처리하고 2.5% agarose gel에 전기영동하여 fragment들을 비교하였다.

결과 및 고찰

산마루1호와 천장3호 특이적 CAPS 마커 선별

산마루1호와 천장3호를 판별할 수 있는 마커 서열을 동정하기 위해 산마루1호와 천장3호를 포함한 총 9개 균주 DNA의 resequencing을 수행하여 시험균주에 대한 genome sequence를 확보하였다. 확보된 9개 균주들의 genome sequence를 표고의 표준유전체인 B17의 천장유전체 정보와 비교하여 SNP와 Indel을 동정했다. Sanger sequencing을 통해 확인해본 결과, 산마루1호의 scaffold9번, 1630048의 염기서열 G가 T로 변한 SNP, 천장3호의 scaffold13번, 920681의 염기서열 G가 A로 변한 SNP가 CAPS 마커를 개발하기에 가장 적합한 서열로 판단되었다(Fig. 1A, 1B).

산마루1호의 특이적인 마커 서열인 <RL-LE-116>과 천장3호의 특이적인 마커 서열인 <RL-LE-134>를 대상으로 하여 CAPS 마커를 동정했다. 산마루1호의 경우 제한효소 *TspRI*의 인식부위가 존재하지 않았고, 천장3호의 경우 제한효소 *XhoI*의 인식부위가 존재하지 않았다(Fig. 1A, 1B). 개발한 CAPS 마커를 이용해 산마루1호와 천장3호의 판별이 가능한지를 확인하기 위해, resequencing에 사용한 10개 균주에서 각각 마커 서열을 증폭한 후 제한효소를 처리하였다. 그 결과 산마루1호와 천장3호의 PCR 산물만이 제한효소에 의해 절단되지 않은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1C, 1D). 천장3호의 경우 산마루1호의 마커 서열이 증폭되지 않는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 산마루1호의 마커 서열 프라이머가 천장3호의 유전적 변이 부분을 포함하고 있기 때문일 것으로 추정된다.

CAPS 마커의 특성 및 개발 현황

CAPS는 공우성 마커이기 때문에 heterologous한 유전자형의 분석이 가능하고, 간단한 분석 과정을 통해 안정적인 결과를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다[21, 22]. 딸기, 배와 같은 작물에서는 이미 품종간의 판별을 위한 CAPS 마커가 개발된 바 있으며[20, 25], 또 고추, 밀과 같은 작물에서는 작물의 수량성, 병저항성 등 유용 형질에 관련된 유전자 기반 CAPS 마

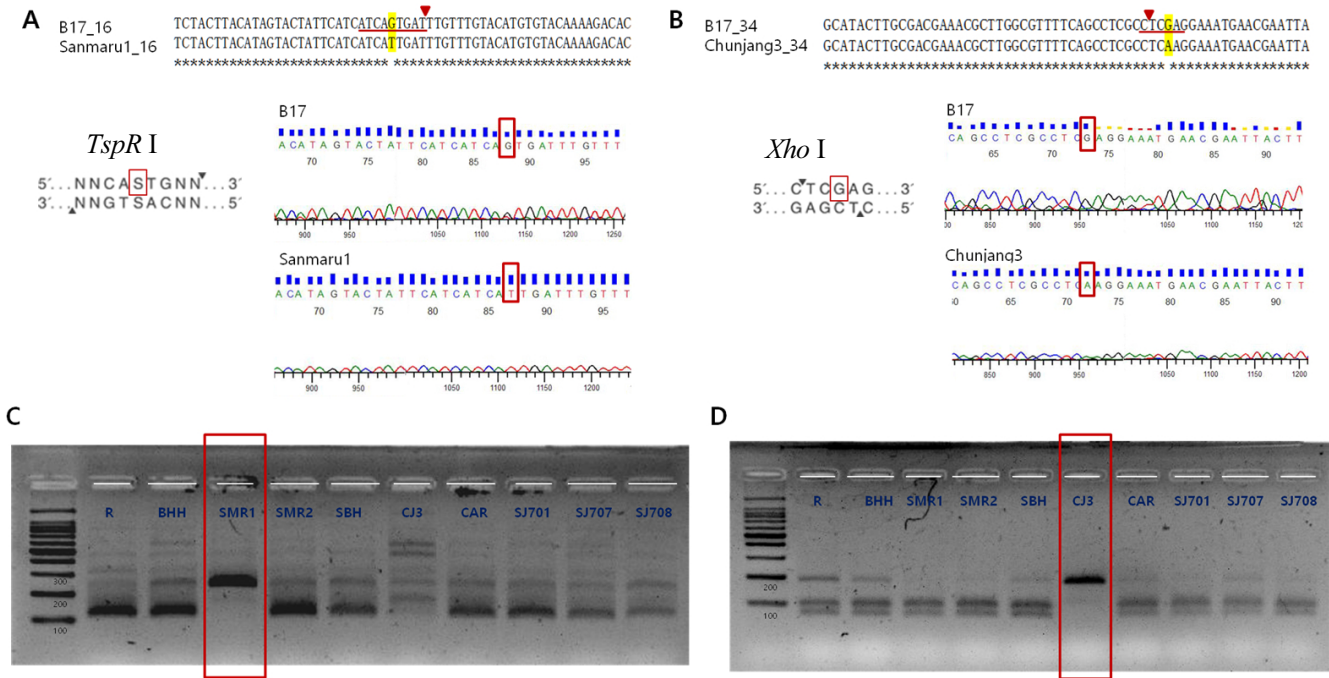


Fig 1. Identification of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for *Lentimula edodes* strains. Validation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in monokaryon B17 and *L. edodes* cultivars using Sanger sequencing and, detection of restriction enzyme site for CAPS marker (A, B). Restriction enzyme sites are underlined in sequence. Electrophoretic patterns produced by the CAPS method (C, D). Rectangles indicate the fragments amplified in Sanmaru 1ho, Chunjang 3ho respectively. R, reference (B17); BHH, Baekwahyang; SMR1, Sanmaru 1ho; SMR2, Sanmaru 2ho; CJ3, Chunjang 3ho; CAR, Chamaram; SJ701ho, Sanjo 701ho; SJ707ho, Sanjo 707ho; SJ708, Sanjo 708ho.

커가 개발되어 있다[26-28]. 버섯의 경우 양송이에 대한 CAPS 마커는 개발되어 있지만[29], 표고에 대한 마커는 RAPD, ISSR, SRAP, SCAR 등과 같은 마커들이 개발되어 있고[8, 11, 12, 14], 아직까지 CAPS 마커는 개발되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서 국내에 유통되고 있는 9개 표고 균주로부터 산마루1호와 천장3호의 구분이 가능한 CAPS 마커를 개발하였다. 이 연구에서 개발된 CAPS 마커는 표고버섯의 품종들 간에 유전적 다양성을 부여함으로써 균주에 대한 정보를 제공하고, 더 나아가 우리나라의 표고 품종을 보호할 수 있는 분자생물학적 근거가 되었다. 이로써 향후 유전자원에 대한 국가간 분쟁을 미연에 방지할 수 있을 것이다.

적요

표고버섯은 주로 아시아 국가에서 재배되는 식용 버섯이다. 표고버섯은 최근 국내에서 신 품종의 개발이 활발히 이루어지고 있으며, 국내외적으로 품종의 보호가 중요해짐에 따라 표고의 품종을 구분할 수 있는 효율적인 마커 개발이 요구되고 있다. 본 연구에서는 산마루1호와 천장3호를 구분할 수 있는 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 마커를 개발하였다. 이 연구에서 개발된 CAPS 마커는 단핵균주인 B17의 표준유전체 정보와 연구에 사용된 10개 균주의 resequencing 정보를 바탕으로 개발되었다. 산마루1호는 scaffold9번, 1630048의 염기서열 G가 T로 변한 SNP를 포함하여 PCR 후 제한효소 *TspRI*을, 천장3호는

scaffold13번, 920681의 염기서열 G가 A로 변한 single nucleotide polymorphism (SNP)를 포함하여 PCR 후, 제한효소 *Xho* I을 처리하였을 때 다른 균주들과 구분되었다. 따라서 이를 마커로 개발하였다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant Golden Seed Project (Center for Horticultural Seed Development, No. 213007-05-1-SBH20).

REFERENCES

1. Bak WC, Park YA, Park JH. Present situation and future of oak mushroom industry: KFRI forest policy issue 11. Seoul: Korea Forest Research Institute; 2013.
2. Royse DJ. A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*. In: Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products; 2014 Nov 19-22; New Delhi, India. Solan: ICAR-Directorate of Mushroom Research; 2014. p. 1-6.
3. Korea Forest Service. Statistical yearbook of forestry. Daejeon: Korea Forest Service; 2016.
4. Korea Rural Economic Institute. Forestry observation for *Lentinula edodes*, November. Naju: Korea Rural Economic Institute; 2016.
5. Yoon KH, Kim YY. Test guideline for Shiitake. Daejeon: Korea Forest Service; 2008.
6. Kulkarni RK. DNA Polymorphisms in *Lentinula edodes*, the Shiitake mushroom. Appl Environ Microbiol 1991;57:1735-9.
7. Zhang Y, Molina FI. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. FEMS Microbiol Lett 1995;131:17-20.
8. Fu LZ, Zhang HY, Wu XQ, Li HB, Wei HL, Wu QQ, Wang LA. Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD, ISSR and SRAP markers. World J Microbiol Biotechnol 2010;26:709-16.
9. Wu X, Li H, Zhao W, Fu L, Peng H, He L, Cheng J, Wei H, Wu Q. SCAR makers and multiplex PCR-based rapid molecular typing of *Lentinula edodes* strains. Curr Microbiol 2010;61:381-9.
10. Terashima K, Matsumoto T. Strain typing of shiitake (*Lentinula edodes*) cultivars by AFLP analysis, focusing on a heat-dried fruiting body. Mycoscience 2004;45:79-82.
11. 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 Microbiol Biotechnol 2010;26:527-36.
12. 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.
13. 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.
14. Qin LH, Tan Q, Chen MJ, Pan YJ. Use of intersimple sequence repeats markers to

- develop strain-specific SCAR markers for *Lentinula edodes*. FEMS Microbiol Lett 2006;257:112-6.
15. 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.
 16. 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.
 17. Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Rep 2008;27:617-31.
 18. 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;223:24-5.
 19. Chen L, Gong Y, Cai Y, Liu W, Zhou Y, Xiao Y, Xu Z, Liu Y, Lei X, Wang G, et al. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. PLoS One 2016;11:e0160336.
 20. Kunihiya M, Fukino N, Matsumoto S. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. Euphytica 2003; 134:209-15.
 21. Konieczny A, Ausubel FM. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J 1993;4:403-10.
 22. 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.
 23. Hillier LW, Marth GT, Quinlan AR, Dooling D, Fewell G, Barnett D, Fox P, Glasscock JI, Hickenbotham M, Huang W, et al. Whole-genome sequencing and variant discovery in *C. elegans*. Nat Methods 2008;5:183-8.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Minamiyama Y, Kinoshita S, Inaba K, Inoue M. Development of a cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker linked to pungency in pepper. Plant Breed 2005;124:288-91.
 29. Foulongne-Oriol M, Spataro C, Cathalot V, Monllor S, Savoie JM. 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.