

발간등록번호

11-1543000-001679-01

**버섯의 육종효율 증진 및 우량 품종  
육성을 위한 분자마커 개발**

(Development of molecular markers for  
improving breeding efficiency and  
breeding of new cultivar with good  
traits)

충북대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부장관 · 해양수산부장관 · 농촌진흥청장 · 산림청장 귀하

이 보고서를 “버섯의 육종효율 증진 및 우량품종 육성을 위한 분자마커 개발” 프로젝트의 보고서로 제출합니다.

2017 년 02 월 14 일

프로젝트 연구기관명 : 충북대학교

프로젝트 책임자 : 류 호 진

세부프로젝트 연구기관명 : 충북대학교

세부프로젝트 책임자 : 류호진

세부프로젝트 연구기관명 :경남농업기술원

세부프로젝트 책임자 : 류재산

세부프로젝트 연구기관명 : 부산대학교

세부프로젝트 책임자 : 권순욱

# 요 약 문

## I. 제 목

프로젝트명 : 버섯의 육종효율 증진 및 우량품종 육성을 위한 분자마커 개발

## II. 연구성과 목표 대비 실적

### 1. 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발

- 표고버섯주요형질관련 분자마커의 연구결과로 총 4 건의 특허출원과 SCI 논문 1편, 비SCI 논문 2편, 학술발표 3건, 홍보전시 6건, 인력양성 1건, 생명자원등록 25건을 달성하였다.

### 2. 느타리류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 느타리류 주요형질관련 분자마커의 연구결과로 2건의 특허출원과 SCI 논문 1편, 비SCI 논문 1편, 학술발표 4건, 홍보전시 8건, 인력양성 2건을 달성하였다. 논문과 특허는 목표 대비 1건씩 미달하였다. 마커개발이라는 목표가 분리집단 구축과 표현형질확인이라는 시간이 많이 소요되어 절대적인 시간이 부족하였다. 그나마도, 정해진 국가정책에 의해 당초의 연구기간이 짧아진 조에서 단축되었다. 현재 SCI 논문은 1건 심사를 받고 있다.

### 3. 양송이의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 양송이 주요형질관련 분자마커의 연구결과로 1건의 특허출원과 비SCI 논문 1편, 학술발표 1건, 생명자원등록 6건, 인력양성 1명을 달성하였다.

## III. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 목적

- 가. 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발
- 나. 느타리류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발
- 다. 양송이의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

### 2. 필요성

가. 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발

국내외 표고 버섯 분자표지기술 현황

표고류 분야 분자표지 기술현황

- 표고버섯의 경우 현재 표준유전체 정보가 완성되지 않은 상황임.

- 중국을 중심으로 표고의 mating에 관여하는 phermone 및 수용체에 관련된 유전자의 정보가

분석되어 있음.

- 현재 교차율에 따른 linkage map은 분석되었으나, 육종에 이용되기에는 아직 미흡한 부분이 많음.
- 국내의 경우 산림과학원, 농업과학원, 산림버섯연구센터에서 교배육종을 통한 새로운 품종을 개발하고 있으나, 현재까지는 대만, 일본 품종에 비해 우수성이 낮은 상태임.
- 중국 홍콩대학의 Kwan 교수를 중심으로 유전체 기반 연구를 하고 있으나, 가시적인 성과는 아직 나타나지 않은 것으로 파악됨.

#### □ 버섯품종 육성을 위한 분자마커 개발 필요성 및 전망

##### ○ 분자마커의 버섯 육종기법에 있어서의 역할

- 교배육종에서 가장 오랜 시간이 걸리는 선발과정에 목표형질과 연결된 분자표지를 활용할 경우 조기에 정확하고 신속하게 목표 형질을 지닌 개체를 선발함으로써 육종연한 및 비용을 극적으로 절감할 수 있음
- 색깔, 저항성 등 소수의 유전자좌에 의해 조절되는 형질의 도입 시 반복적인 분자마커를 활용하면 신속하게 목표형질을 우수 고정계통에 도입하여 개발 효율을 극대화 가능

#### 나. 느타리류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 버섯선진국의 기업들이 매우 빠른 속도로 재배자, 소비자, 유통전략에 맞는 고품질, 다수확의 새로운 신품종을 속속 개발함에 따라 육종경험이 일천한 국내재배기업의 경우에는 이를 극복하기 위한 분자마커 응용을 통한 빠른 육성과정이 필요한 현실임
- 수출용 느타리류 육성을 위하여 산업적으로 필요로 하는 육성 목표형질은 고품질, 수량성, 해외소비자 선호형, 내병성, 내서성, 기능성 등이 있으며 이를 전통적인 육종방법으로 신품종을 개발하기 위해서는 엄청난 시간과 비용이 초래되므로 효율적인 분자육종법 MAB(marekr assisted breeding)이 필요한 시점임

#### 다. 양송이의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 최근 국내 버섯육성 품종의 확대보급을 위해 품종육성이 추진되고 있지만, 국산품종 비율은 여전히 낮은 상태이며, 다양한 품종을 육성하여 농가에 제공할 필요가 있음.
- 양송이버섯은 국산품종비율이 가장 낮은 버섯에 속하여 품종육성을 위한 연구기반이 부족하고 재배기술은 선진국 수준의 50%정도로 평가되고 있음.
- 양송이버섯은 재배과정이 복잡하고 품종육성을 위한 단핵균주확보에 어려움이 있어 품종개발에 어려움을 겪어 왔음.
- 세균성 갈변병, 푸른곰팡이 등에 취약하여 생산량에 영향을 받음.
- 따라서 다양한 유전자원(야생자원 등)을 확보하고, 유전체 정보 분석을 통해 단핵균주 선발을 위한 분자마커 개발 및 수량성, 병저항성 등을 구분할 수 있는 분자마커개발이 요구됨.
- 또한 수출형 양송이 품종개발을 위해서는 국제품종보호제도(UPOV) 대비 외국품종에서 국내 개발품종을 구분하기 위한 마커개발이 절실히 요구됨

### IV. 연구개발 내용 및 범위

#### 가. 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발

- 분자 마커 기반 형질 연관성 분석용 표고 형질별 분리집단 육성 및 표고 품종별 형질조사
- 표고버섯 표준유전체 해독
- 표고 품종 구분을 위한 SSR marker 개발

나. 느타리류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 느타리류의 유전체 정보 획득을 위한 다양한 유전집단 작성
  - 수량, 품질, 맛, 색깔, 내병성, 내재해성 등 유전집단 작성
  - 재배상 문제가 되는 내병성 및 환경 내성 관련 고정계통 및 유전집단 육성
- 느타리류의 특성에 따른 유전체 비교분석에 의한 분자마커 개발
  - NGS기반 re-sequencing 유래 유전체정보 비교분석 및 이를 활용한 InDel, SNP 탐색
  - 탐색된 InDel, SNP 정보를 활용한 형질, 내병성, 내재해성 관련 분자마커, 품종판별 마커

다. 양송이의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 유전자원 확보 및 양송이버섯 주요형질 판별용 유전자원 특성자료 구축
- 유전자원의 유전체 정보 확보를 활용한 주요 형질특성 연관 유전자형 변이 탐색(SNP, InDel 등) 및 분자마커 개발
- 주요 형질 특성 평가 및 분자마커 개발
- 유전체 정보를 활용한 SSR 마커 개발 및 품종판별용 마커, 핵형 판별 분자마커 개발

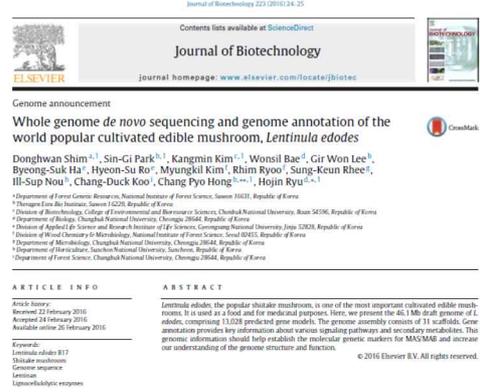
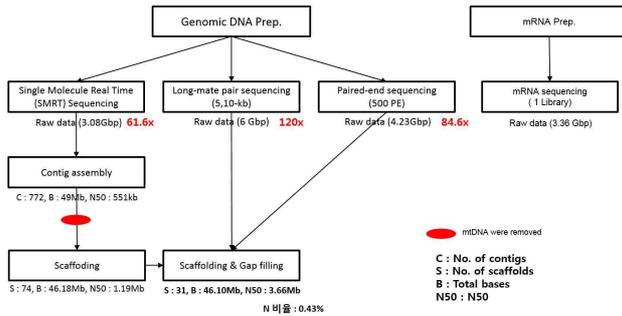
V. 연구개발결과

가. 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발

- 1) 분자 마커 기반 형질 연관성 분석용 표고 형질별 분리집단 육성 및 표고 품종별 형질조사
  - 표고의 발이온도 구분은 발이 최고 온도가 고온성 품종은 약 30 ℃, 중온성 품종은 약 27 ℃, 저온성 품종은 약 20 ℃이었고 발이 평균온도는 고온성과 중온성 품종이 약 18 ~ 21 ℃, 저온성 품종은 약 15 ℃이었다. 따라서 고온성 품종은 발이 최고 온도로, 저온성 품종은 발이 평균온도로 구분이 될 것으로 판단하였다.
  - 표고의 대표적인 양적형질로 갓의 직경, 갓의 두께, 대의 길이, 대의 굵기를 조사하였다. 갓의 직경은 산조 701호, JMS 5A-1에서 약 66.5 mm로 가장 컸고, 산조 705와 송고에서 약 58.2 mm로 가장 작았으며, 갓의 두께는 참아람, 산조 701호, 산조 706호에서 약 25.3 mm로 가장 두꺼웠으며, 산조 101호, 송고에서 18.3 mm로 가장 얇았다. 갓의 형질을 보았을 때 산조 701호는 갓의 직경과 두께가 가장 크고 두꺼웠으며, 송고는 가장 작고 얇았다. 대의 길이는 산조 705호에서 약 63.1 mm로 가장 길었으며, 송고, JMS 5A-1, 모리 468에서 약 39.7 mm로 가장 짧았다. 그리고 대의 굵기는 산조 705호와 산조 706호에서 약 16.9 mm로 가장 두꺼웠고, 산마루1호, 송고, JMS 5A-1, 모리 468에서 가장 가늘었다. 따라서 재배된 표고버섯의 품종중에서 대의 형질이 가장 두껍고 굵었던 품종은 산조 705호 이었고, 가장 작고 얇은 품종은 송고, JMS 5A-1, 모리 468이었다.

2) 표고 표준유전체 해독

- 표고 (참아람 단포자 B17 균주) 표준 유전체 46Mbp 해독 및 31개 scaffold 조립완료.
- 표고 유전체에 있는 유전자 13,028개의 정보 확보 완료 및 웹브라우저 구축 완료 (<http://112.220.192.2/led/>).



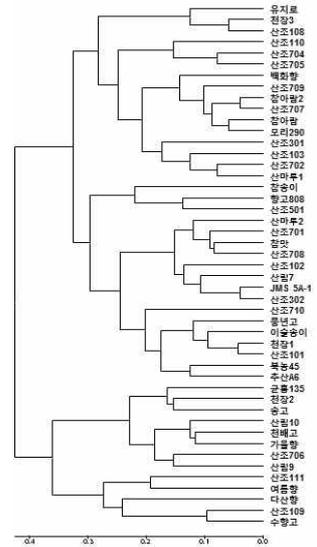
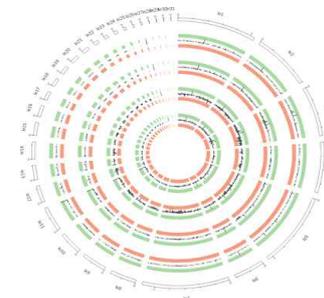
<표고버섯 유전체 de novo assembly 방법 및 결과 요약 및 논문 발표>

3) 표고 핵심자원 Resequencing을 통한 분자마커 개발

- 산림과학원과 컨소시엄 결성하여 표고 핵심자원 45 품종 Resequencing 및 SNP 분석완료.
- 표고 품종 구분을 위한 SSR 마커 13개를 개발하여 45개 품종 판별 가능함 (특허출원 완료)
- 표고 고온형 관련 유전자 동정.
- 참아람 균사 미갈변 관련 변이 동정.

번호	균주명	번호	균주명	번호	균주명
1	산림7호	21	산조101호	41	이슬송이
2	산림9호	22	산조102호	42	산조301
3	산림10호	23	산조103호	43	복농45
4	여름향	24	산조108호	44	추산A6
5	가을향	25	산조109호	45	산조302
6	백화향	26	산조110호	46	2X196
7	다산향	27	산조111호		
8	수향고	28	산조501호		
9	천백고	29	산조502호		
10	풍년고	30	산조701호		
11	천장1호	31	산조702호		
12	천장2호	32	산조704호		
13	산마루1호	33	산조705호		
14	산마루2호	34	산조706호		
15	참맛	35	산조707호		
16	추재2호	36	산조708호		
17	균흥135	37	산조709호		
18	하춘K3	38	산조710호		
19	모리468	39	참아람		
20	Cr04	40	참송이		

Type (alphabetical order)	Count	Percent
DOWNSTREAM	3,058,416	35.70%
EXON	540,578	6.31%
INTERGENIC	1,629,132	19.02%
INTRON	259,852	3.03%
NONE	327	0.00%
SPICE_SITE_ACCEPTOR	1,517	0.02%
SPICE_SITE_DONOR	1,574	0.02%
SPICE_SITE_REGION	46,631	0.54%
TRANSCRIPT	676	0.01%
UPSTREAM	3,028,018	35.35%



4) 표고 품종 구분을 위한 SSR marker 개발

- 표고 표준유전체 정보를 바탕으로 찾아낸 SSR을 품종구분을 위한 marker로 개발하였다.
- 개발된 44개의 SSR marker들은 di-, tri-, tetra-, 그리고 pentanucleotide DNA motif

로 구성되어 있었다. SSR motif는 59.09%가 dinucleotide repeat, 31.82%가 trinucleotide repeat, 6.82%가 tetranucleotide repeat, 그리고 2.27%가 pentanucleotide repeat로 구성되어 있다. SSR motif중 dinucleotide repeat는 AG/GA, CT/TC, AT/TA, AC/CA, CG/GC, TG, trinucleotide repeat는 AGG/AGA/GGA, CAG/CGA/GCA, AGA, GAT, GCT, GTT, TCA, TCG, tetranucleotide repeat는 TACT/TATC, CTTT, 그리고 pentanucleotide repeat는 CTTCC이었다.

- 개발된 44 SSR marker들을 23개의 표고 품종으로 분석하였다. major allele frequency(M<sub>AF</sub>)는 0.13 ~ 0.94, 평균 0.575. number of genotypes(N<sub>G</sub>)는 2 ~ 11, 평균 5.5, number of alleles(N<sub>A</sub>)는 2 ~ 11, 평균 4.9. observed heterozygosity(H<sub>O</sub>)는 0.00 ~ 1.00, 평균 0.309, expected heterozygosity(H<sub>E</sub>), 0.10 ~ 0.90, 평균 0.552, polymorphic information content(PIC) 값은 0.10 ~ 0.89, 평균 0.511 이었다.

#### 나. 느타리류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 새송이버섯의 유전체 정보를 이용하여 SSR프라이머 500개 이상을 디자인하였다. 주요농업형질을 기준으로 98개의 단핵군사로 이루어진 분리집단을 구축하였고, SSR프라이머로 유전형분석(genotyping)을 통하여 연관집단(linkage group) 11개로 분석하였다. 단핵군사 98개를 유전적으로 차이가 있어 모두와 교배가 이루어지는 KNR2532에서 유래한 testers로 교배하고 표현형분석(phenotyping)을 하여 win-cartographer를 통하여 QTL 분석을 하였다. 그 결과 수량, 맛색, 조생성 등 9개 형질의 71개 QTL 검출하였다. Fungal genetics and biology(SCI)에 게재하였다. 큰느타리버섯 교배형관별마커는 특허출원하였다.
- 동일 집단을 이용하여 새송이재배에서 가장 문제시 되는 푸른곰팡이(*Trichoderma* spp.)에 대한 저항성 정도를 측정하였다. 버섯에는 아직 병저항성을 가진 품종이 육종되거나 보고되지 않았으나, 계통별로 곰팡이균사나 포자에 대해 나타나는 증상이 다양하였다. 유전형분석과 병저항성 데이터를 이용하여 QTL 분석결과 대부분 농업형질의 유전자좌와 겹쳤는데, 일부는 저항성 단독 유전자좌에서 검출되어 유전자지도의 해상도 향상을 통하여 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다.
- 느타리버섯의 주요농업형질의 마커개발을 위하여 분리집단과 유전형분석을 실시하여 연관집단 11개를 분석하였다. 이외에 국내에서 재배되는 주요품종에 대한 품종관별마커를 SSR 프라이머를 이용하여 개발하였다. 품종관별 PCR 마커는 특허출원과 한국버섯학회에 게재하였다.

#### 다. 양송이의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 49점의 양송이버섯 유전자원의 군사체 및 자실체의 주요 특성을 평가하였다. 온도별 군사체 성장속도를 평가한 결과 25℃ > 20℃ > 15℃ > 30℃ > 10℃ 순으로 군사생장이 빨랐으며, 온도별 성장속도가 우수한 계통을 선발하였다. 세균성갈색무늬병을 유발하는 *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans*, *P. agarici* 와 대치배양 시 억제정도를 평가한 결과는 *P. tolaasii* 균주의 접종농도 7.5 x 10<sup>7</sup> CFU 였으며, 총 45개의 균주 중 14균주가 저항성을 보였으며, 31균주는 감수성을 보였다. 저항성 균주 중에서는 *P. tolaasii*를 넘어가는 강한 저항성을 보인 균주도 있었지만, *P. tolaasii*를 넘어간 후 다소 생장이 주춤해 지는 균들도

있었다. 감수성 균주들에서는 강한 감수성을 보인 균주들도 있었으며, 전체적인 균사 생장은 억제되었지만 균사상면으로 기중균사들은 다소 성장하는 모습도 관찰되었다

- 수집균주 중 42계통에서 버섯이 발생하였고, 평균 초발이일수는 16.5일이었고, 가장 짧은 계통은 ASI1415로 11.3일이 소요되었으며, 가장 긴 계통은 ASI1140으로 24.3 일이 소요되었다. 초발생후 평균 수확일수는 5.7일이 소요되었으며, 갓의 지름은 평균 44mm이고, 갓의 길이는 18.4mm이었으며, 수집자원의 평균 개체중은 16.5g (12.2g~22.7g)으로 조사되었다. 갓의 평균 경도는 11.5kg/cm<sup>3</sup> (8.5~14.2kg/cm<sup>3</sup>) 이었다. 갓 색은 42개 중 13계통의 갈색이고, 27계통은 백색이며, 2계통은 크림색(off-white)으로 조사되었다. 수집자원의 평균 수확량은 142.7kg/2kg bag이었으며, ASI1140계통은 37.8kg/2kg bag, ASI1038은 221.3kg/2kg bag으로 나타났다.
- 수집자원 중 38점에 대한 전장유전체 재분석을 수행하였고, 이들의 평균 depth는 91X (50~157X)였다. 이들에 대한 염기서열 변이(SNP, InDel) 분석을 완료하였고, 이들 중 국내 육성품종 6품종에 대한 정보를 NABIC에 등록하였다. 표준유전체 정보에서 339개 SSR 마커를 디자인 하였고, 16개 계통의 유전체 재분석 정보에서 450여개 SSR 마커를 디자인 하였으며, 이들 중 60여개 SSR marker를 이용하여 수집유전자원의 다양성 분석과 품종 구분 마커 개발을 수행하였다.
- 양송이 갓 색 연관 마커 개발을 위해 Re-sequencing을 통해 확보된 마커를 활용하여 23개 백색양송이, 13개 갈색양송이를 명확히 구분하는 4쌍의 마커를 선발하여 특허 출원하였고, 백색양송이와 갈색양송이의 단백질체 분석을 위해 양송이 버섯에서 발견되는 단백질 database를 구축하고, 백색 및 갈색양송이에서 특이적으로 발현하는 단백질체 분석을 수행하였다.
- 세균성 갈반병 저항성 마커 선발을 위해 저항성 균주와 감수성 균주로부터 각각 후대 계통을 육성하였고, 이들에 대한 저항성 평가를 완료하였다.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

### 가. 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발

- 본 연구에서는 표고의 표준유전체 정보를 확보하였고, 이 정보를 바탕으로 품종을 구분할 수 있는 SSR 마커를 개발하여 4개의 특허가 출원되었다. 이에 따라 국내에서 개발된 품종을 보호할 수 있으며, 품종 개발이 활발하게 진행되고 있는 국립산림과학원, 산림조합중앙회 산림버섯연구센터 그리고 민간 육종가와 함께 협조하여 개발된 품종을 구분할 수 있는 마커를 계속해서 개발할 것이다. 또, 본 프로젝트 연구기간 중에 확보한 표고 표준유전체 정보와 표고의 형질 자료를 이용하여 차후 프로젝트에서 한 품종에 특이적으로 확인되거나 형질에 관련된 SNP 마커를 개발할 것이며, 표준유전체를 완성하면서 구축된 실험과정을 다른 버섯 종 또는 다른 작물에 적용할 수 있을 것이다.

### 나. 느타리류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 큰느타리버섯 농업주요형질 QTL 마커 : 고효율 마커개발을 위하여 2단계사업에 활용하여 정밀도와 효율이 높은 분자마커 개발에 활용
- 새송이버섯의 교배형 판별 프라이머(특허출원) : 육종농가나 대형종균배양소에 교육지도

와 기술이전을 통하여 성과를 전파하여 실용화 계획

- 느타리버섯 주요품종 판별 프라이머(특허출원) : 품종을 육성하는 농가, 종균업체와 국립종자원, 국립식물검역소에 우수성을 홍보하여 기술이전과 통상실시 계약을 체결 계획
- 다양한 새송이, 느타리버섯의 분리집단은 2단계사업에서 활용하여 고해상도 QTL분석과 분자가위로 형질유전자 분리와 비교시험에 활용예정이다. 이를 토하여 글로벌한 고효율 분자마커개발 계획

다. 양송이의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 수집 유전자원의 군사체, 자실체 특성 정보 : 유용 자원에 대한 육종 소재로 활용
- 유전자원 re-sequencing 정보 : 양송이 유전체 정보 DB 구축 및 연구 논문으로 활용하고, 품종 특이적 마커 개발, 단핵 균주 선발용 마커 개발 및 다양한 형질 연관 유전연구 분야에 활용.
- 양송이 갓 색 구분용 프라이머(특허출원) : 군사체에서 DNA 평가를 통해 갈색 양송이를 선발할 수 있으므로 향후 갈색 양송이 품종 개발에 활용 가능
- 갓 색 관련 특이 발현 단백질체 정보 : 양송이 갓 색 관련 유전연구 분야에 활용 및 논문 게재
- 세균성 갈반병 관련 후대 계통 : 저항성 관련 유전연구 및 마커 개발 분야에 활용

## SUMMARY

### I . TITLE

Development of molecular markers for improving breeding efficiency and breeding of new cultivar with good traits

### II . OBJECTIVE AND NECESSITY OF THE STUDY

1. This study was conducted to develop molecular markers linked to agriculturally important traits in three major mushrooms, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* and *Agaricus bisporus* and construction of MAS(marker assisted selection) system that enable the selection of traits at mycelial state. Classical mating based breeding is time consuming works and expensive, thus development of the molecular markers allows breeders to efficiently breed new varieties which fulfill the demand of the market. Breeding new strains with improved traits is a long-standing goal of mushroom breeders that can be expedited by marker-assisted selection (MAS)
2. In case of shiitake mushrooms, the standard genome information is not available yet.
  - The linkage map according to the current cross rate has been analyzed, but there are still many parts that are not enough to be used for breeding in case of shiitake mushroom. In Korea, new varieties have been developed through breeding and the breeding program at the Forestry Academy, the Academy of Agricultural Sciences, and the Forest Mushroom Research Center. However, its superiority is low compared to Taiwanese and Japanese varieties.
3. *Pleurotus ostreatus* is one of the important mushrooms in the Asia. Many cultivars have been bred to meet the consumer' s needs. Identification of cultivars based on the morphological characteristics is restricted because fruit bodies are frequently capricious by environmental conditions, thus sequence based identification methods have to be adapted to differentiate cultivars.
4. Simple sequence repeats (SSR), also called "microsatellites" consist of tandemly repeated short DNA sequence motifs and have applied in various marker-based studies. Two major oyster mushroom cultivars, Heuktari and Miso genome were sequenced, it was needed to access their SSR properties.
5. Button mushroom is the most widely consumed mushroom in the world, and domestic consumption is increasing in Korea. Before 2000, most Korean mushroom farmers cultivated foreign varieties, but recently, Korean breeders are developing hybrid strain using molecular breeding tools.

6. Growth rate of mycelium, yield, quality of fruiting body are major agronomic character in button mushroom. Lately resistant cultivars are needed because increase disease and insect pest be caused by climate change. Also, button mushrooms are hard for secure mono-karyon and hard of develop cultivar.
7. Thus development of the molecular markers related to major traits allows breeders to efficiently breed new varieties which fulfill the demand of the market. Breeding new strains with improved traits is a long-standing goal of mushroom breeders that can be expedited by marker-assisted selection (MAS)

### III. METHODS

1. To develop SSR markers for the shiitake mushroom, 5 strains from the National Institute of Forest Science in Korea Forest Service and 18 strains from the Forest Mushroom Research Center were kindly provided. The list of strains is shown in the text. The mycelia of the strains were cultured for 10 days at 25 ° C in darkness. Over 1,000 SSR loci of the shiitake mushroom were found in whole genome sequencing performed by Shim et al. using *L. edodes* monokaryon strain B17 and comparing the resequencing data of 1 strain, Chamaram. We choose 205 SSR loci to test for polymorphism among the shiitake mushroom strains, and 44 SSR markers were finally selected for proper PCR conditions fixed in 23 strains. The primer design parameters were set as follows: length range, 18–23 nucleotides with 21 as the optimum; PCR product size range, 150–200 bp; optimum annealing temperature, 58 ° C; and GC content 50–61%, with 51% as the optimum. The extracted DNA for PCR templates was diluted to 20 ng/ $\mu$ L using a K5600 micro spectrophotometer (DaAn Gene, Guangzhou, China). The PCR reaction mixture consisted of 2  $\mu$ L template DNA, 1  $\mu$ L each forward and reverse primer (5 pmol), 10  $\mu$ L 2  $\times$  i-Taq Master Mix (Intron biotechnology, Seongnam, Korea), and 6  $\mu$ L distilled water. PCR reactions were performed as follows: 95 ° C for 3 min; 35 cycles of 95 ° C for 30 s, 58 ° C for 30 s, and 72 ° C for 30 s; and finally, 72 ° C for 20 min. The size of the PCR product was confirmed by fragment analyser (Advanced Analytical Technologies, ). The amplified SSR loci were scored for 23 shiitake mushroom strains. Major allele frequency (MAF), number of genotypes (NG), number of alleles (NA), observed heterozygosity (HO), expected heterozygosity (HE), and polymorphic information content (PIC) values were calculated using PowerMarkerV3.25.
2. We constructed a genetic linkage map of *Pleurotus eryngii* based on segregation analysis of markers in postmeiotic monokaryons from KNR2312. In total, 256 loci comprising 226 simple sequence-repeat (SSR) markers, 2 mating-type factors, and 28 insertion/deletion (InDel) markers were mapped.
3. SSRs were isolated and characterized from “Heuktari” and “Miso” , which are one of the major oyster mushroom cultivars in Korea by the genome sequencing and bioinformatic analysis.

4. A total of 546 SSR primers which were designed based on the genome sequences of two *P. ostreatus* cultivars (Heuktari and Mison) were screened to find polymorphic bands on the major cultivars of *P. ostreatus*.
5. We evaluated some traits of button mushroom strains.
  - Mycelial growth rate at different culture temperatures (10°C, 15°C, 20°C, 25°C, and 30°C)
  - Mycelium's resistance degree to bacterial brown blotch (*Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans*, and *P. agarici*)
  - Cultivation characteristics (Required days for pin-heading and harvest, diameter and thickness of pileus, individual weight, and color of pileus).
6. Re-sequencing analysis of genetic resources. genotype modification exploration (SNP, InDel etc.) and molecular marker large quantity development
7. Color of pileus, bacterial brown blotch resistant estimate and relation molecular marker development.

#### IV. RESULTS

1. Molecular marker-based trait correlation analysis for the isolation and cultivation of differentiated traits by highland traits
  - The average temperature was about 18 °C to 21 °C, the high temperature was about 27 °C and the moderate temperature was about 20 °C. The low temperature varieties were about 15 °C. Therefore, it was concluded that the highest temperature was observed in the high temperature varieties and the average temperature in the low temperature varieties.
  - The representative quantitative traits were examined for the diameter of the carp, the thickness of the carp, the length of the carp, and the thickness of the carp. The diameter of carp was the largest at 665 mm in Sanjo 701 and JMS 5A-1, and was the smallest at 705 in Sanjo and about 58.2 mm in Songgo. The thickness was about 25.3 mm, the thinnest at Sanjo 101 and 18.3 mm at Songgo. When we looked at the characteristics, Sanjo 701 had the largest diameter and thickness of the carps, and they were the smallest and thinnest. The length of the stalk was the longest at about 63.1 mm at Sanjo 705 and the shortest at 39.7 mm at JMS 5A-1 and Mori 468. The thickness of the stalks was the thickest at Sanjo 705 and Sanjo 706, about 16.9 mm, the thinnest at Sanrim 1, Songgo, JMS 5A-1 and Mori 468. Therefore, among the cultivated mushroom cultivars, the thickest and thickest varieties were Sanjo 705, and the smallest and thinnest varieties were Songso, JMS 5A-1, and Mori 468.
2. Elucidation of reference genome of shiitake mushroom
  - *Lentinula edodes* (Chamaram monokaryon Strain B17) 46 Mbp genome size and 31 scaffold assembly completed.

- Completion of 13,028 genes in high-level genome and construction of web browser ([Http://112.220.192.2/led/](http://112.220.192.2/led/)) for genome information.
3. Development of molecular markers through Resequencing of core population of shiitake.
    - Consortium formed with Forestry Academy to complete the analysis of 45 varieties of highland core resources and SNP analysis.
    - Developed 13 SSR markers to distinguish 45 different varieties (Patent application completed)
    - Identification of high temperature type related genes.
    - Identification of the mutation related to the brown film formation of Chamaram.
  4. Development of SSR markers for distinguishing shiitake mushroom varieties.
    - SSRs were developed as markers for breed identification based on information on standard reference genome information.
    - The 44 SSR markers developed consisted of di-, tri-, tetra-, and pentanucleotide DNA motifs. The SSR motif consists of 59.09% dinucleotide repeat, 31.82% trinucleotide repeat, 6.82% tetranucleotide repeat, and 2.27% pentanucleotide repeat. AGA / AGA / GGA, CAG / CGA / GCA, AGA, GAT, GCT, and GTT are the dinucleotide repeats in the SSR motif. TCA, TCG, tetranucleotide repeat were TACT / TATC, CTTT, and pentanucleotide repeat was CTTCC.
    - The developed 44 SSR markers were analyzed by 23 shiitake mushroom varieties. The major allele frequency (MAF) ranged from 0.13 to 0.94, with an average of 0.575. Number of genotypes (NG) ranged from 2 to 11, mean 5.5, number of alleles (NA) ranged from 2 to 11, mean 4.9. The observed heterozygosity (HO) ranged from 0.00 to 1.00, the mean was 0.309, the expected heterozygosity (HE) was 0.10 to 0.90, the mean was 0.552, and the polymorphic information content (PIC) was 0.10 to 0.89 and 0.511.
  5. The map consisted of 12 linkage groups (LGs) spanning 1047.8 cM, with an average interval length of 4.09 cM. Four independent populations (Pd3, Pd8, Pd14, and Pd15) derived from crossing between four monokaryons from KNR2532 as a tester strain and 98 monokaryons from KNR2312 were used to characterize quantitative trait loci (QTL) for nine traits such as yield, quality, cap color, and earliness.
  6. Using composite interval mapping (CIM), 71 QTLs explaining between 5.82% and 33.17% of the phenotypic variations were identified. Clusters of more than five QTLs for various traits were identified in three genomic regions, on LGs 1, 7 and 9. Regardless of the population, 6 of the 9 traits studied and 18 of the 71 QTLs found in this study were identified in the largest cluster, LG1, in the range from 65.4 to 110.4 cM.

7. The candidate genes for yield encoding transcription factor, signal transduction, mycelial growth and hydrolase are suggested by using manual and computational analysis of genome sequence corresponding to QTL region with the highest likelihood odds (LOD) for yield. The genetic map and the QTLs established in this study will help breeders and geneticists to develop selection markers for agronomically important characteristics of mushrooms and to identify the corresponding genes.
8. Only one SSR primer, JHH SSR 184 was found to show polymorphism on the major cultivars with similar morphology, Suhan 1ho, Whaseung 2ho and Kimje 9ho and additional 6 cultivars. Polymorphisms were dependent on copy number of three kinds of repeat and locus. The sequences of the loci showed variable tandem repeat loci-like feature thus might be applicable to a wide range of cultivars of *P. ostreatus*.
9. The genome sizes of “Heuktari” and “Miso” were estimated 40.8 and 40.3 Mb, respectively, it was larger than the other *P. ostreatus* species (PC9 and PC10) and less than *P. eryngii* (KNR2312P5). A total of 949 and 968 SSRs were found in the “Heuktari” and “Miso” genomes, respectively. A comparative analysis of five mushroom fungi revealed that SSR numbers from “Heuktari” and “Miso” were the highest among the *P. ostreatus* var. *florida* (PC9 ad PC15), *P. eryngii* and all fungi studied showed have similar SSR distributions. Tri-, hexa- and octanucleotide motifs accounted for the top three fractions of all SSRs.
10. Result in major character of 49 button mushroom genetic resource’ s mycelium and fruiting body, mycelial growth rate at different culture temperatures was investigated by 25°C > 20°C > 15°C > 30°C > 10°C. ASI1338 strain showed excellent mycelial growth rate at different temperatures. We confirmed that ASI1007, ASI1085, ASI1310, ASI1339 were strongly resistant to bacterial brown blotch, whereas ASI1053, ASI1103, ASI1140, ASI1146, ASI1177, ASI1183, ASI1195, ASI1321, ASI1331, and ASI1336 were relatively weakly resistant. The average number of days for pin-heading was 16.5 and that for harvest was 5.7. The average yield was 142.7g/2kg bag.
11. We finished SNP analysis by conducting re-sequencing about 38 mushroom’ s collection of resource and developed large quantity SSR marker from reference genome and re-sequencing. So those markers for collection of resource diversity estimate and cultivar division.
12. Through re-sequencing by using secured marker, we developed 4 pairs of marker for classify color of pileus that group clearly 23 white button mushroom and 13 brown

button mushroom and conducted proteome analysis being revealed specifically at white button mushroom and brown button mushroom on pin heading.

13. For developing bacterial brown blotch relation marker, we developed two segregation population derived from both of resistant strain and sensitivity strain, finally we evaluated resistance degree to bacterial brown blotch of two population.

## V. FUTURE PLANS

In this study, we obtained standard reference genome information of shiitake mushroom and developed SSR markers that can distinguish cultivars based on this information. Four patents were completed. As a result, it is possible to protect the varieties developed in the domestic country. In addition, we will develop SNP markers related to traits that are specific to the variety and their specific characteristics. These markers could be used for cultivar protection and breeding. These information and technologies could be applied to the established experimental procedure to other mushroom species or other crops.

The two molecular markers for identification of *P. eryngii* mating type and *P. ostreatus* cultivars will be distributed to mushroom breeders and public office for protection plant disease and seed reservation. The QTL markers and genetics maps for agronomic traits could be used in the next round of Golden Seed Project to improve their resolution and efficiency.

The information of major agronomic traits for 49 genetic resource will be distributed to mushroom breeder using breeding resource. Molecular markers developed in this study and whole genome sequence database of 38 button mushroom strains could be used for developing traits-related molecular markers.

## CONTENTS

Chapter 1 Overview of the project .....	17
Chapter 2 Domestic and worldwide trends in technology development .....	24
Chapter 3 Major Results .....	26
Chapter 4 Level of achievement and contribution to industry .....	130
Chapter 5 Major products and schedule of application .....	133
Chapter 6 Collected technological information .....	142
Chapter 7 References .....	144

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표 .....	17
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	24
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	26
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	130
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	133
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	142
제 7 장	참고문헌 .....	144

# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 제1절 연구개발과제의 개요

### 1. 프로젝트의 목표

- 우수형질 버섯 육종을 위한 최적의 gene based genome-wide SSR, InDel, SNP 마커 개발
- 목표형질 연관 분자표지 탐색 및 MAS용 분자표지 개발
- MAB용 SNP 표지 개발 및 MAS/MAB 통합 분자육종 지원 시스템 구축

<제1세부> 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발

- 표고의 주요형질 관련 유전자 탐색 및 분자마커 개발
- 표고의 내병성 관련 유전자 탐색 및 이를 이용한 분자마커 개발
- 표고의 버섯발이 온도 판별 관련 유전자 탐색 및 이를 이용한 분자마커 개발

<제2세부> 느타리류의 유전체 기반 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 느타리류의 유전체 정보 획득을 위한 다양한 유전집단 작성
- 전사체와 QTL 정보를 이용하여 주요형질, 고기능성, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발
- NGS 기반 염기서열 분석을 이용한 목표형질 관련 유전자 분자마커 개발목표형질 선발용 분자표지 개발

<제3세부> 양송이류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

- 양송이 유전체 정보 획득을 위한 다양한 유전집단 작성
- 양송이 균사체 생육에 영향을 미치는 형질의 유전자 탐색 및 분자마커 개발
- 양송이 자실체의 주요형질 관련 분자마커 개발
- 양송이 재배에서 문제가 되는 내재해성 관련 분자마커 개발
- 양송이 기능성 및 내병성 관련 분자마커 개발

### 2. 프로젝트의 필요성

#### 가. 버섯산업의 현황

세계 버섯 시장은 대량 생산의 기술적 뒷받침과 늘어나는 수요에 의하여 지속적으로 확대되는 추세에 있다. 세계 버섯생산액은 90년대 초 약 85억 달러에서 2010년 약 400억 달러로 4.7 배 증가하는 등 꾸준히 확대되는 양상을 보이고 있고, 버섯 생산량에 있어 중국이 전체의 70% 이상을 차지하고, 그 뒤로 미국, 일본, 네덜란드, 프랑스 순이며 한국은 약 10위 정도이다.

버섯의 영양학적 우수성이 밝혀지고, 웰빙기능성 식품으로 인식 되면서 버섯의 수요가 증가하고 있다. 그리고 버섯의 수요가 생버섯 위주에서 기능성식품, 약품, 생활용품 등으로 다양화

되며 시장규모는 꾸준히 확대되는 추세에 있다. 국내에서도 버섯의 생산량과 소비량이 늘고, 수출입량도 해마다 증가하는 등 산업으로서 버섯의 중요성이 증대되고 있다. 국내에서 2009년 기준, 생산액은 약 7,500억 원이며, 재배시설 자동화와 규모 확대로 연간 버섯생산량은 지속적으로 증가되는 추세이고 1인 소비량도 1995년 0.98(kg/명), 2000년 2.62(kg/명), 2005년 4.19(kg/명), 2009년 3.59(kg/명)로 해마다 증가하고 있다.

(1) 세계의 버섯 시장 규모

세계의 버섯 시장은 대량 생산의 기술적 뒷받침과 늘어나는 수요에 의하여 지속적으로 확대되는 추세이다. 버섯은 전세계 대부분의 국가에서 재배 및 소비되는 글로벌 작물이고, 버섯의 영양학적 우수성이 밝혀지고, 웰빙기능성 식품으로 인식되면서 버섯의 수요가 증가하여 '05-' 12 기간 동안 연평균 21%의 증가율을 보였다.

버섯의 생산은 중국, 미국, 네덜란드, 소비는 중국, 미국, 독일, 영국, 프랑스, 이태리, 캐나다 등의 전세계 소비의 85%를 차지하고 있다. 품목별 생산비율은 양송이(31%), 표고(24%), 느타리(14%), 목이(9%), 풀버섯(8%) 순이다. 버섯의 수출량은 약 467천톤이며 주요수출국은 폴란드(37.0), 네덜란드(24.8), 중국(8.9) 순이다.

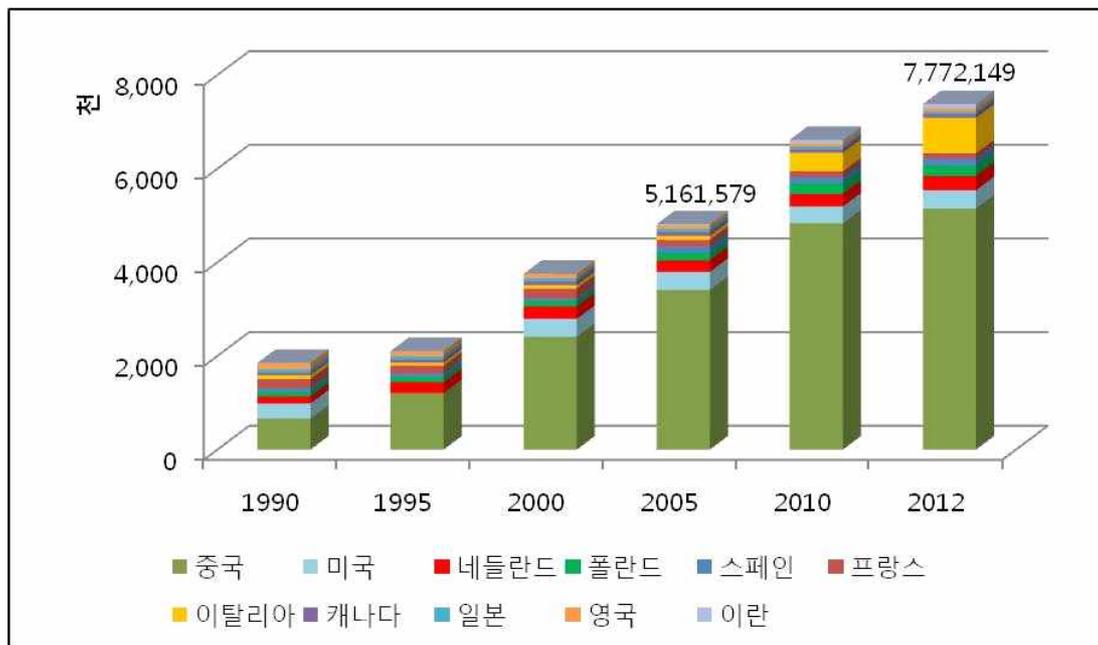


그림 3 전세계 버섯생산량 상위국가 (1990-2012) 출처: FAOStat(2004-2012),

표 3 버섯수출 현황 (1990-2012)

국가	수출량 (톤)					비중(%)
	2008	2009	2010	2011	2012	
폴란드	122,984	123,195	157,844	158,070	172,959	37.0
네덜란드	85,777	80,021	95,661	104,835	115,789	24.8
중국	67	317	436	1,318	41,529	8.9
아일랜드	72,388	43,764	41,305	37,267	37,522	8.0
캐나다	20,309	19,851	28,424	27,109	31,456	6.7
벨지움	32,613	25,814	25,790	28,603	30,534	6.5
리투아니아	32,621	32,876	21,585	24,955	27,657	5.9
독일	4,125	4,897	5,045	7,018	9,821	2.1
계	370,884	330,735	376,090	389,175	467,267	

출처 : Comtrade(2008-2012)

(2) 국내 버섯시장 현황

버섯총생산액은 6,162억원( '13)으로 전체 농산물 생산액 1.1%차지하여 감보다 높고 화훼류보다 낮다. 전체적인 생산량은 180-190천톤에서 안정세를 보이고 생산액은 단가하락으로 하향변동성 보이고 있다. 품목별 생산비율은 느타리(34%), 새송이(24%), 팽이(17%), 표고(16%), 양송이(4%)이다. 생산액은 느타리 66,039, 새송이 126,520, 양송이 43,323, 표고 176,788억원이다.

표 4 국내 버섯 생산 현황

구분		2009년	2010년	2011년	2012년	2013년
생산량(톤)	농산버섯	154,444	173,577	165,253	173,354	161,603
	임산버섯	27,033	26,250	24,857	26,281	19,742
	계	181,477	199,827	190,110	199,635	181,345
생산액(억원)	농산버섯	4,375	5,878	4,118	4,506	4,201
	임산버섯	2,760	2,983	2,606	2,871	1,961
	계	7,135	8,861	6,724	7,377	6,162

출처 : 2011 한국산업버섯연감, 2011-2013 농림축산식품부, 2013 산림청 임산물생산조사

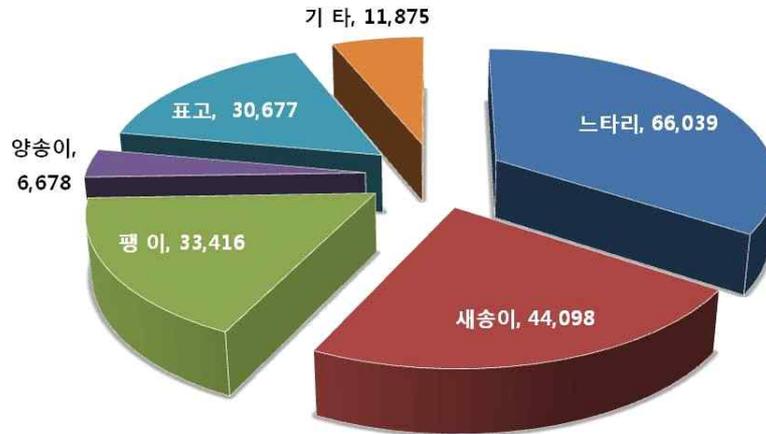


그림 4 국내 버섯품목별 생산량(톤)

### (3) 국내 버섯종류시장 현황

국내 버섯 종류시장 규모는 균상재배용이 약 100억-120억 원, 병·봉지재배용이 약 200-300억 원 등 총 400여 억 원에 이르고 있으나, 이 중 국산 비중은 40% 수준에 불과하다. 국내 육성품종 점유율은 2011년 기준 40%로 느타리 99.1%, 핑이 24.2%, 양송이 23.1%, 표고 20.1%, 큰 느타리버섯 13.3% 순이다. 그리고 종균의 수입량은 2000년 2,580톤, 2006년 6,246톤, 2008년 4,335톤, 2010년 6,706톤, 2011년 7,640톤으로 해마다 증가하고 있다.

### (4) 버섯수출입 현황

농산버섯의 수출액과 수출량은 꾸준히 증가하고 있으나, 임산버섯은 증가와 감소를 반복하고 있다. 핑이 수출량 10,235톤으로 1위, 새송이는 수출량 지속적으로 증가하여 2014년 4,116톤, 14,471천불을 달성하였다. 수입은 표고버섯이 가장 많았으며 17,507톤 51,382천불로 이에 대한 대책이 필요하다.

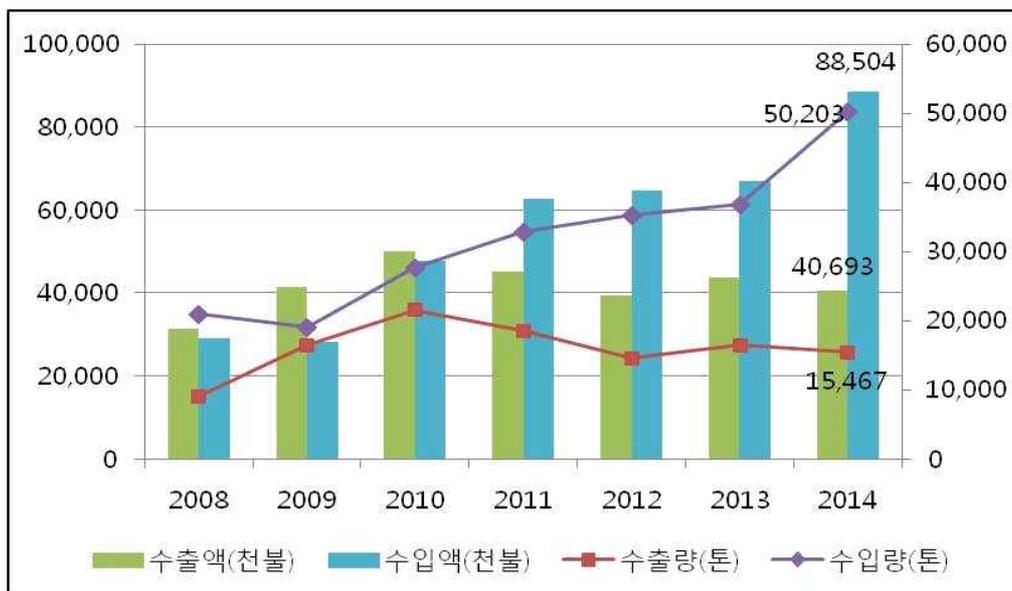


그림 5 국내 버섯 수출입량 및 수출액

표 5 국내 버섯품목별 수출입 현황(2014, KATI(농수산식품수출지원정보))

버섯종류	수출			수입		
	물량 (M/T)	금액 (천불)	주요수출국	물량 (M/T)	금액 (천불)	주요수입국
느타리	317	1,304	호주,미국,홍콩, 몽골	-	-	-
큰느타리	4,116	14,471	네덜란드, 캐나다, 일본, 미국, 호주	-	-	-
양송이	4	186	미국, 베트남	6,784	8,772	중국
영지	20	438	베트남, 일본	176	561	중국
팽이	10,236	18,131	미국, 베트남,호주, 일본, 싱가포르	13	8	중국
송이	8	2,406	일본	479	9,810	중국
표고	61	1,370	대만, 홍콩	17,507	51,382	중국
목이(건조)	-	-	-	765	3,685	중국
기타버섯	705	2,387	네덜란드, 싱가포르, 호주,미국	24,479	14,286	중국
계	15,467	40,693		50,203	88,504	

나. 버섯 품종육성의 경제적·산업적 중요성

국내 육종기술 고도화와 육종인력 확보를 통한 우수 품종 육성은 국내 재배품종의 국산화율을 35%에서 70% 증진시키고 농가의 로열티 부담을 줄여 농가소득 증대를 꾀할 수 있다. 고가의 외국품종을 대체하는 국내육성품종의 보급은 종자공급의 안정화를 이끌고 농촌 경제 안정화를 가져올 수 있다.

글로벌 브랜드 수준의 버섯 품종 개발은 수출을 확대하고 새로운 시장을 개척하여 국내 종자 산업이 발전하고 활성화 될 것으로 예상된다. 한정된 내수시장에서 탈피하여 거대 해외시장인 중국, 일본, 인도, 중동, 미국, 유럽 등에 진출할 수 있는 초석을 다질 수 있다. 이에 따라 수출용 품종 개발 역량을 강화하고 국내 버섯 산업 전반에 걸친 국가 경쟁력 향상시킬 수 있다.

버섯 품종의 개발은 복합내병성 품종의 개발로 최근 잦아진 이상기온, 집중호우 등 기상변화에 따른 버섯 병해충의 발생에 대응하며 복합내병성 품종의 육성으로 버섯 생산성 향상 및 생산비 절감효과를 가져온다.

다. 분자표지(Molecular marker)기술의 경제적·산업적 중요성

분자표지이용선발(Marker-assisted selection, MAS)기술은 목표형질을 유전자를 기반으로 선발(forground selection)함으로서 전통육종의 단점을 보완하고 우량개체선발효율을 극대화시킴과 동시에 육종연한과 투자비용을 현저히 감소시키므로 종자산업계에서 상위 경쟁력 확보를 위해서는 필수적인 기술로 인식되고 있다.

### (1) 표고류 분야 분자표지 기술현황

표고의 경우 현재 표준유전체 정보가 완성되지 않고 있었으나 본 과제와 중국 홍콩대학의 Kwan 교수 연구팀에서 각각 완성시켰다. 그리고 중국을 중심으로 표고의 mating에 관여하는 pheromone 및 수용체에 관련된 유전자의 정보가 분석되어 있고, 국내에서는 경상대학교 연구팀에 의하여 표고의 mating에 관한 분자마커가 개발되었다. 현재 교차율에 따른 linkage map은 분석되었으나, 육종에 이용되기에는 아직 미흡한 부분이 많다.

국내의 경우 산림과학원, 농업과학원, 산림버섯연구센터에서 교배육종을 통한 새로운 품종을 개발하고 있으나, 현재까지는 대만, 일본 품종에 비해 우수성이 낮은 상태이다.

### (2) 느타리류 분야 분자표지 기술현황

느타리류는 일반적인 작물보다 상대적으로 generation cycle이 짧아 분자마커개발에 대한 연구가 더디게 진행되었으나 최근 연구기관을 중심으로 유전체 정보를 활용하여 마커개발을 활발하게 진행하고 있다. 버섯의 형질이 한두개의 유전자로 결정되지 않는 경우가 많아 기존의 분자마커로는 적용하기 힘들었던 QTL의 mapping 등을 통하여 복합형질을 선발 할 수 있는 마커개발에 투자를 지속하고 있다.

국내의 경남농업기술원에서 새송이버섯의 혼종을 방지하기 위하여 단시간에 12종의 품종을 판별할 수 있는 SSR기반 품종판별용 마커가 개발되어 있다. 미국 JGI의 지원으로 사철느타리 (*Pleurotus ostreatus* sp. *florida*)의 34.3 Mb 유전체가 해독되고 11,000여개의 유전자가 annotation 되어 마커개발에 많은 도움이 될 것으로 예상된다. 스페인팀에서 느타리버섯의 수량, 수량 등 6개 형질에 대한 QTL 분석데이터를 발표하였고, 일본팀에서 AFLP 기반으로 새송이버섯의 무포자(sporeless) 선발형질 분자표지를 개발하였다.

현재까지 개발된 마커는 육종에 효율적으로 적용되어 활용되는 경우가 낮은 것으로 파악되며, 기본적인 수량성, 맛색 등의 선발효율이 높은 분자표지 개발뿐만 아니라, 양송이와 표고에서 발표된 푸른곰팡이, 세균성 갈반변에 대한 분자표지의 개발이 이루어져야 한다.

### (3) 양송이류 분야 분자표지 기술현황

차세대 유전체 해독기술(NGS)이 개발됨에 따라 독일에서는 양송이 Genome Sequencing이 완성되어 형질이 뛰어난 품종을 개발하기 위한 원천 정보를 획득하고 있다. 프랑스에서는 QTL(Quantitative Trait Locus)를 지도화하여 양송이 맛색에 영향을 미치는 유전 요인들을 연구하고 있고, 영국에서는 항암물질 등 특정 유용물질생산을 목적으로 양송이버섯의 형질전환 연구를 진행함하고 있다.

전 세계의 양송이를 포함한 버섯연구에서 기본적으로 형질 및 품종을 구분하기위해 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR(Simple Sequence Repeat), CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 등 마커들이 쓰이고 있고, Sylvan이 다양한 신품목 (RWK1913, J10165, J9277)을 개발하고 특허 출원하였다.

### (4) 버섯품종 육성을 위한 분자마커 개발 필요성 및 전망

교배육종에서 가장 오랜 시간이 걸리는 선발과정에 목표형질과 연결된 분자표지를 활용할 경우 조기에 정확하고 신속하게 목표 형질을 지닌 개체를 선발함으로써 육종연한 및 비용을 극적으로 절약할 수 있다. 색깔, 저항성 등 소수의 유전자좌에 의해 조절되는 형질의 도입시

반복친의 분자마커를 활용하면 신속하게 목표형질을 우수 고정계통에 도입하여 개발 효율을 극대화 가능하다.

느타리류 품종 육성에 있어 미국, 유럽 주도의 JGI에 느타리 유전체 정보를 바탕으로 시장 주도권을 잡기 위한 분자유종 기술개발이 활발히 진행되고 있으며, 이후 공개된 염기서열 정보를 바탕으로 관련유전자의 동정과 이를 이용한 고해상도 마커의 개발이 급속도로 이루어지고 국가간, 기업간 경쟁이 치열해질 것으로 전망됨에 따라 국내에서도 목적형질을 가진 계통의 resequencing, transcriptome, proteome 등을 실시하여 고효율 분자표지 개발 등과 같은 노력이 필요하다.

버섯선진국의 기업들이 매우 빠른 속도로 재배자, 소비자, 유통전략에 맞는 고품질, 다수확의 새로운 신품종을 속속 개발함에 따라 육종경험이 일천한 국내재배기업의 경우에는 이를 극복하기 위한 분자마커 응용을 통한 빠른 육성과정이 필요하다. 버섯은 단포자선발 → 교배 → 접종 → 형질평가 등의 과정이 복잡하여 분자마커적용이 효율이 높은 작물이다.

### 3. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	품종개발		특허		논문		분자 마커	유전자원		국내 매출액 (백만원)	종자 수출액 (만달러)	기술 이전	시장조사 및 정책조사 보고서	인력 양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
목표			10		3	6								
실적			7		2(1)	4	22		31					4
달성율(%)			70		67	67								

#### 0) 심사중

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발

#### 1. 표고의 분자마커 개발

국내에서는 표고의 품종을 구분하는 분자마커가 가강현 등 (2011)에 의하여 개발되어 있다. 이 마커는 NCBI에 등록된 DQ231475-DQ231480의 염기서열 정보를 이용하여 5개의 Microsatellite 마커를 개발하였다. 이 마커로 국립산림과학원에서 개발한 10개 품종, 산림버섯 연구센터에서 개발된 품종 9개, 농업과학기술원에서 개발한 1개의 품종을 구분하였다. 그리고 노현수 등 (2016)은 표고버섯의 유전체에서 나타날 수 있는 8종류의 A 교배형과 7종류의 B 교배형을 구분하여 검출할 수 있는 탐침 및 이를 이용하여 각 교배형, 품종 또는 계통을 판별하는 방법, 그리고 판별된 교배형 정보를 바탕으로 표고버섯을 교배하는 방법에 관한 특허를 출원하여, 표고버섯의 교배형, 품종 및 계통을 매우 정확하고 용이하게 판별할 수 있고 판별된 정보를 바탕으로 높은 성공확률로 교배를 수행할 수 있어 기존 무작위 교배방법에 비해 노동력 및 경제적인 비용 부담을 크게 줄일 수 있게 하였다.

이밖에 표고의 품종은 restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Kulkarni, 1991), random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Zhang와 Molina, 1995; Fu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010), amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Terashima와 Matsumoto, 2004), inter-simple sequence repeat (ISSR) (Zhang *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015), sequence-characterized amplified region (SCAR) (Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012), sequence-related amplified polymorphism (SRAP) (Fu *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2015), and simple sequence repeat (SSR) (Xiao *et al.*, 2010)을 포함하는 분자마커를 이용하여 구분하고 있다.

Zhang 등 (2007)의 ISSR marker는 표고 발이의 고온과 광온 그리고 저온과 중온을 구분하는 분자 마커를 개발하였다. Gong 등 (2014)은 표고의 147개의 단핵포자에 기초하여 sequence-related amplified polymorphism(SRAP), target region amplification polymorphism(TRAP), insertion-deletion(InDel) marker들, 그리고 mating-type loci를 이용하여 linkage map을 구축하여, 균사체의 성장 속도에 영향을 주는 유전체 부분이 있는 것을 암시하였다. 또한 2016년에 82개의 유전체 서열에 기초한 InDel marker로 QTL mapping하여 MAP kinase, blue-light photoreceptor, riboflavin-aldehyde-forming enzyme, cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase, cytochrome P450s과 같은 몇몇 유전자를 자실체 형질을 조절하는 후보유전자로 탐색하였다.

### 제2절 느타리류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

느타리류 분야 분자표지 기술현황은 일반적인 작물보다 상대적으로 generation cycle이 짧아 분자마커개발에 대한 연구가 더디게 진행되었으나 최근 연구기관을 중심으로 유전체 정보를 활

용하여 마커개발을 활발하게 진행하고 있다. 미국 JGI의 지원으로 사철느타리(*Pleurotus ostreatus* sp. *florida*)의 34.3 Mb 유전체가 해독되고 11,000여개의 유전자가 annotation 되어 마커개발에 많은 도움이 될 것으로 예상. 버섯의 형질이 한두개의 유전자로 결정되지 않는 경우가 많아 기존의 분자마커로는 적용하기 힘들었던 QTL의 mapping 등을 통하여 복합형질을 선발 할 수 있는 마커개발에 투자를 지속하고 있다. 스페인팀(LM Larraya)에서 느타리버섯의 수량, 수량 등 6개 형질에 대한 QTL 분석데이터를 발표하였다. 2008년에는 리그닌을 분해하는 효소에 관한 유전지도가 발표되었다. 사철느타리와 다른 버섯류의 유전체의 목재분해 유전자 측면에서의 보고서가 2016년에 발표되었다.

큰느타리버섯의 유전체는 미국균학회에 보고되었고(2012, 경남) 이후 JGI에서도 초판이 공개되었다. 품종혼종을 방지하기 위하여 단시간에 12종의 품종을 판별할 수 있는 SSR기반 품종판별용 마커와 교배형판별마커가 개발되었다(경남). 일본팀에서 AFLP 기반으로 새송이버섯의 무포자(sporeless) 선발형질 분자표지를 개발하였다. 현재까지 개발된 마커는 육종에 효율적으로 적용되어 활용되는 경우가 낮은 것으로 파악되며, 기본적인 수량성, 맛색 등의 선발효율이 높은 분자표지 개발뿐만 아니라, 양송이와 표고에서 발표된 푸른곰팡이, 세균성 갈반변에 대한 분자표지의 개발이 이루어져야 하겠다.

### 제3절 양송이의 분자표지기술 현황

차세대 유전체 해독기술(NGS)이 개발됨에 따라 독일에서는 양송이 Genome Sequencing이 완성되어 형질이 뛰어난 품종을 개발하기 위한 원천 정보를 획득하고 있다. 프랑스에서는 QTL(Quantitative Trait Locus)를 지도화하여 양송이 맛색에 영향을 미치는 유전 요인들을 연구하고 있으며, 영국은 항암물질 등 특정 유용물질생산을 목적으로 양송이버섯의 형질전환 연구를 진행하고 있다. 전 세계의 양송이를 포함한 버섯연구에서 기본적으로 형질 및 품종을 구분하기 위해 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR(Simple Sequence Repeat), CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 등 마커들이 쓰이고 있다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제1절 연구개발 수행내용

<제 1세부> 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발

### 1. 분자 마커 기반 형질 연관성 분석용 표고 품종별 형질조사

#### 가. 표고 발이 온도

충북대학교 표고 재배사에서 재배중인 산조 108호, 산조 111호, 산조 302호, 산조 502호, 927 품종의 발이 최저온도는 각 8.2 °C, 10.7 °C, 11.7 °C, 8.2 °C, 8.2 °C, 평균온도는 각 18.8 °C, 21.1 °C, 21.2 °C, 15.0 °C, 14.9 °C, 그리고 최고온도는 각 30.9 °C, 30.9 °C, 27.4 °C, 22.1 °C, 21.2 °C 이었다. 발이최저온도는 산조 108호, 산조 111호, 산조 302호, 산조 502호, 그리고 927이 각 8.2 °C, 10.7 °C, 11.7 °C, 8.2 °C, 8.2 °C로 각 품종의 발이 최저온도는 9.4 °C내외였다. 산조 108호, 산조 111호는 30.9 °C에서도 발이하어 고온성 품종으로 판단되고, 최고 발이온도가 27.4 °C인 산조 302호는 중온성 품종, 산조 502호와 927은 최고 발이온도가 각 22.1 °C, 21.2 °C로 저온성으로 판단되었다. 발이평균온도는 저온성 품종인 산조 502호와 927이 각 15.0 °C, 14.9 °C로 가장 낮았고, 고온성 품종인 산조 108호가 18.8 °C, 고온성 품종인 산조 111호와 중온성 품종인 산조 302호는 각 21.1 °C, 21.2 °C로 가장 높았다. 따라서 표고의 온도형은 발이 최고 온도로 구분되는 것이라 생각된다.

표 1-1. 재배된 각 품종별 발이 최저, 평균, 최고 온도

품종	최저온도	평균온도	최고온도
산조 108호	8.2 °C	18.8 °C	30.9 °C
산조 111호	10.7 °C	21.1 °C	30.9 °C
산조 302호	11.7 °C	21.2 °C	27.4 °C
산조 502호	8.2 °C	15.0 °C	22.1 °C
927	8.2 °C	14.9 °C	21.2 °C

#### 나. 표고 외부 형질 조사

충북대학교의 시설재배사에서 국립산림과학원과 산림조합중앙회 산림버섯연구센터에서 분양 받은 품종들 중 산마루 1호, 참아람, 산조 101호, 산조 111호, 산조 502호, 산조 701호, 산조 705호, 산조 706호, 송고, JMS 5A-1, 모리 468을 재배하여 자실체를 발생시켜 각 품종의 외부 형질을 확인하였다.

대표적인 질적형질로 갖의 색은 산조 101호와 산조 706호가 가장 짙은 갈색을 나타냈으며, JMS 5A-1이 가장 옅은 갈색을 나타내었다.

대표적인 양적형질로 갖의 직경, 갖의 두께, 대의 길이, 대의 굵기, 갖의 직경/대의 길이 비, 그리고 갖의 직경/대의 굵기 비를 조사하였다. 갖의 직경은 산조 701호, JMS 5A-1에서 약 66.5 mm로 가장 컸고, 산조 705와 송고에서 약 58.2 mm로 가장 작았으며, 갖의 두께는 참아람, 산조 701호, 산조 706호에서 약 25.3 mm로 가장 두꺼웠으며, 산조 101호, 송고에서 18.3 mm로

가장 얇았다. 갓의 형질을 보았을 때 산조 701호는 갓의 직경과 두께가 가장 크고 두꺼웠으며, 송고는 가장 작고 얇았다. 대의 길이는 산조 705호에서 약 63.1 mm로 가장 길었으며, 송고, JMS 5A-1, 모리 468에서 약 39.7 mm로 가장 짧았다. 그리고 대의 굵기는 산조 705호와 산조 706호에서 약 16.9 mm로 가장 두꺼웠고, 산마루1호, 송고, JMS 5A-1, 모리 468에서 가장 가늘었다. 따라서 재배된 표고버섯의 품종중에서 대의 형질이 가장 두껍고 굵었던 품종은 산조 705호 이었고, 가장 작고 얇은 품종은 송고, JMS 5A-1, 모리 468이었다. 갓의 직경과 대의 길이의 비는 대의 길이가 짧았던 송고, JMS 5A-1, 모리468에서 약 1.65로 가장 컸고, 대의 길이가 가장 길었던 산조 705에서 약 1.0으로 가장 작았다. 다른 품종은 약 1.2 ~ 1.4정도 이었다. 대의 갓직경과 대굵기의 비는 JMS 5A-1과 모리 468이 약 5.9로 가장 컸고, 산조 705호가 약 3.4로 가장 작았다.

표 1-2. 충북대학교 재배사에서 재배된 표고 품종들의 양적형질

	참아람 (n=87)	산조101호 (n=55)	산조111호 (n=25)	산조502호 (n=57)	산조701호 (n=23)	산조705호 (n=45)	산조706호 (n=67)	산마루1호 (n=60)	송고 (n=53)	JMS 5A-1 (n=69)	모리468 (n=35)
갓의 직경(mm)	63.5±8.02	64.3±11.16	60.2±10.37	62.2±12.04	<b>68.7±7.63</b>	<b>59.0±7.32</b>	64.0±6.92	61.6±7.94	<b>57.3±8.14</b>	<b>65.1±9.32</b>	<b>65.1±11.93</b>
갓의 두께(mm)	25.6±4.58	18.9±4.02	15.8±2.11	15.0±6.88	25.5±4.82	23.5±3.25	25.2±4.54	23.1±5.40	17.7±2.61	21.0±3.40	21.2±4.55
대의 길이(mm)	52.9±10.87	56.7±13.38	42.8±9.85	47.9±8.35	49.4±7.83	<b>63.1±10.59</b>	50.0±10.47	54.3±8.36	<b>37.0±9.25</b>	<b>40.8±9.82</b>	<b>41.3±10.20</b>
갓직경/대길이	1.2±0.26	1.2±0.31	1.4±1.05	1.3±1.44	1.4±0.31	<b>1.0±0.16</b>	1.3±0.31	1.2±0.19	<b>1.6±0.36</b>	<b>1.7±0.57</b>	<b>1.6±0.40</b>
대의 굵기(mm)	15.5±3.62	14.1±4.69	16.7±2.92	16.5±2.65	16.6±3.02	<b>17.8±3.51</b>	16.0±3.41	<b>11.3±2.73</b>	<b>11.3±2.87</b>	<b>11.6±2.54</b>	<b>11.2±2.93</b>
갓직경/대굵기	4.3±1.14	4.9±1.48	3.6±3.55	3.77±4.45	4.5±0.75	<b>3.4±0.75</b>	4.2±0.90	5.6±1.10	5.3±1.22	<b>5.8±1.34</b>	<b>6.0±1.16</b>



그림 1-1. 표고 품종 참아람, 산조 101호, 산조 701호, 산조 111호, 산마루 1호, 송고, JMS 5A-1, 산조 502호, 산조 705호, 산조 706호, 모리 468의 외부형태



그림 1-2. 표고 품종 참아람, 산조 101호, JMS 5A-5, 산마루1호, 송고, 모리 468, 산조 705호, 산조 706호의 단면

## 2. 표고버섯 유전체 해독

### 가. 표고버섯 유전체 *de novo* assembly 결과 생성

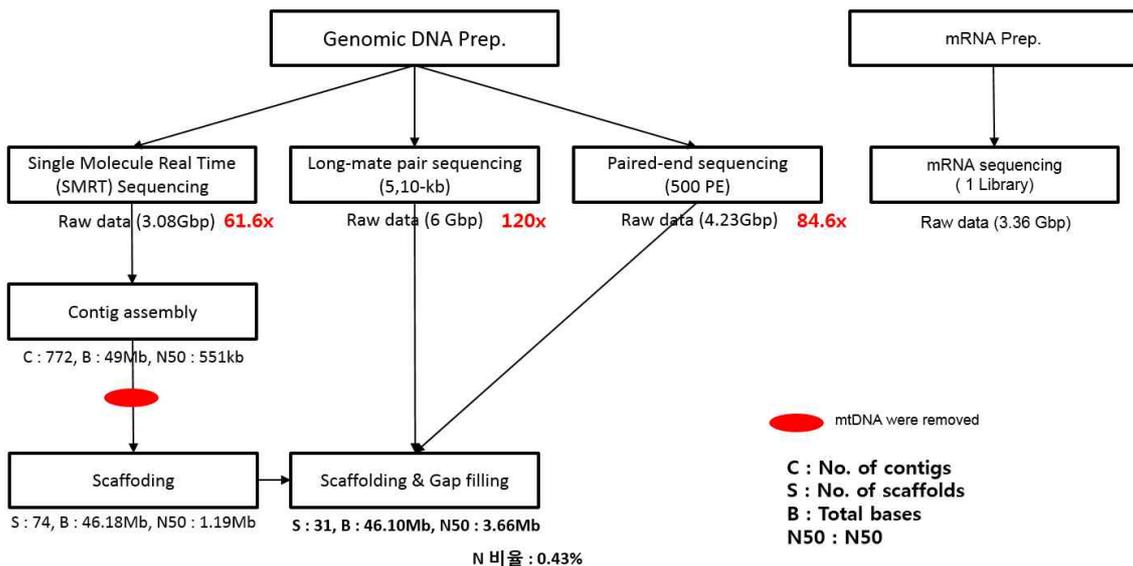


그림 1-3. 표고버섯 유전체 *de novo* assembly 방법 및 결과 요약

(1) 염기 서열 해독 데이터 QC

(가) 분석 방법

잘못된 염기 정보를 가질 수 있는 가능성을 가진 낮은 Quality Score(Q Score)의 서열 정도를 확인하기 위하여 생산된 염기 서열 해독 데이터에 대한 QC를 진행하였다(QC 통과 기준 : Q Score가 30인 염기서열의 비율이 80%이상 확보).

표 1-3. Q score에 따른 염기 서열 정확도

Quality Score	Error 율	서열정확도
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1000	99.9%
40	1 in 10000	99.99%
50	1 in 100000	99.999%

염기 서열 해독이 진행됨에 있어 샘플의 오염 정도를 확인하는 요소 중 하나인 염기 서열 비율 이상 확인 진행하였다.

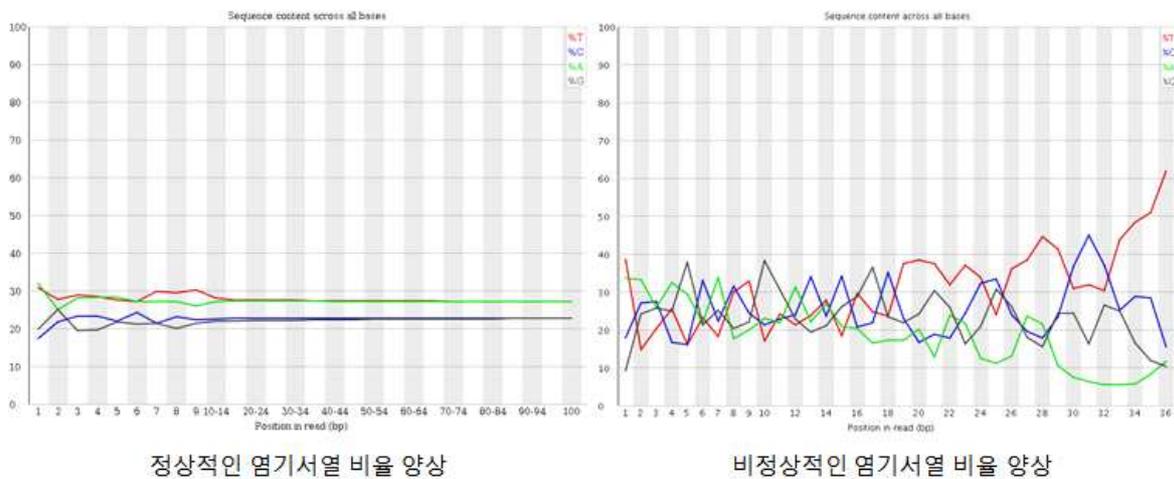
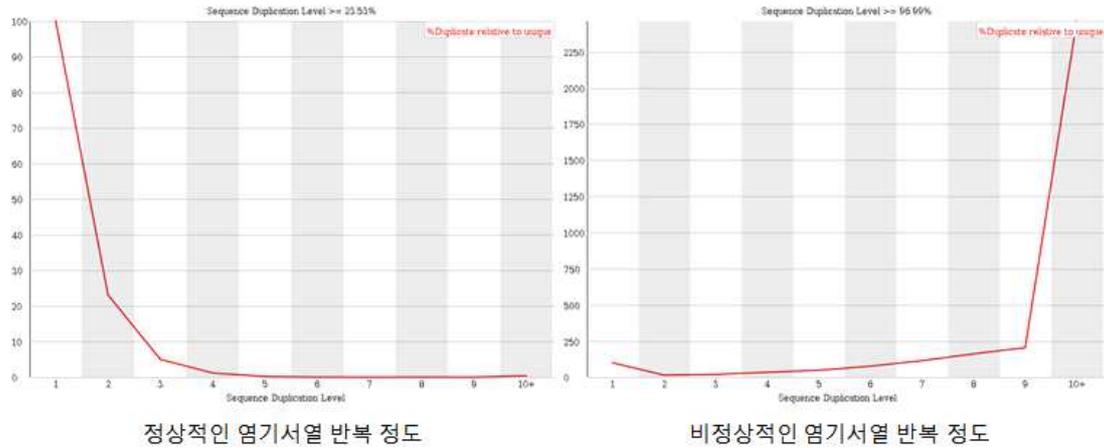


그림 1-4. 염기 서열 비율 이상 확인 방법 예시

풍부한 DNA에서 무작위로 염기서열을 해독이 되었는지에 대한 여부를 확인하기 위해 염기 서열 반복 정도(duplication level) 확인하였다.



정상적인 염기서열 반복 정도

비정상적인 염기서열 반복 정도

그림 1-5. 염기 서열 반복 정도 확인 방법 예시

Mate-pair long insert 라이브러리로 생산된 염기서열 해독 데이터는 self-ligation이 되는 부분에 junction adaptor가 삽입이 되어있고, PCR duplication 많기 때문에 사용할 수 있는 mate-pair 서열 junction adaptor trimming 및 PCR duplication 제거를 진행하였다. 사용된 Tool은 NextClip v1.3이고, mate-pair가 제대로 형성되지 않은 read들에 대해서는 아래의 그림 e)의 사례와 같이 trimming 되거나 제거가 되지 않기 때문에 a), d) type에 대한 서열들만 사용하였다.

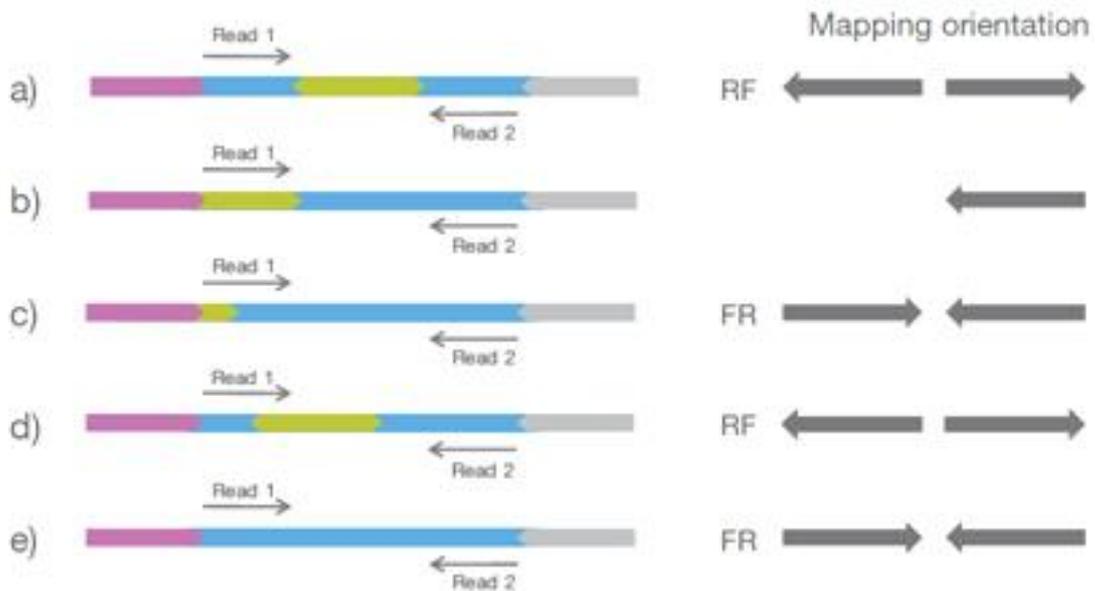


그림 1-6. Junction adaptor 필터 및 trimming 모식도

또한, Single-Molecule Real-Time (SMRT) sequencing 방법을 사용하여, 총 10개 SMRT cell로 평균 10Kb에 해당하는 Long-Read 제작을 수행하였다.

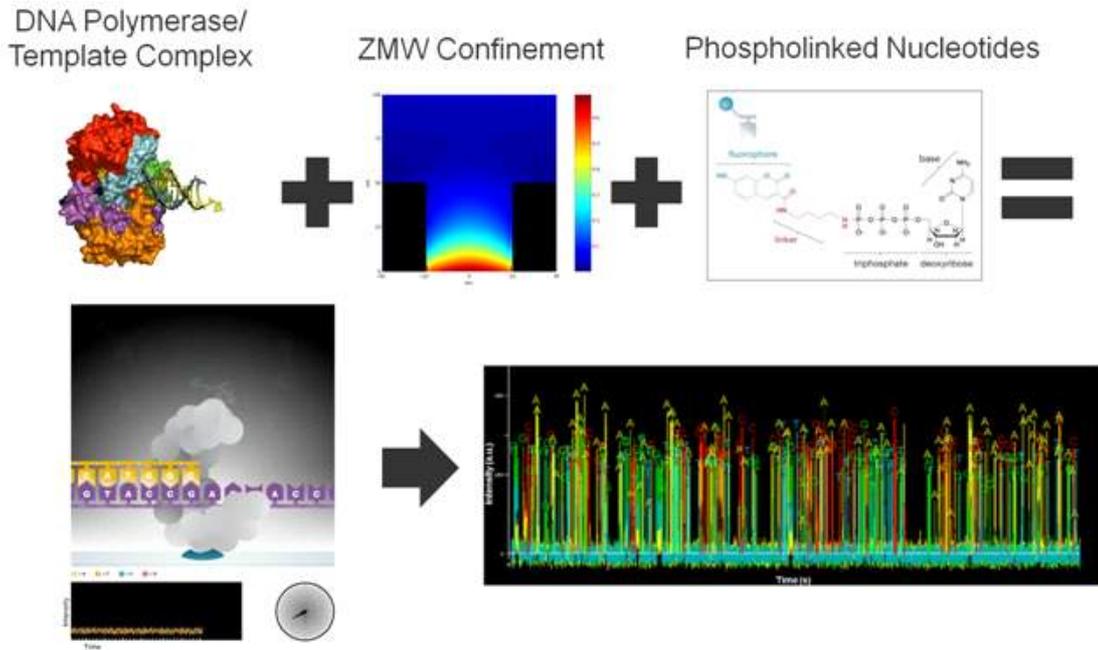


그림 1-7. Single-Molecule Real-Time (SMRT) sequencing 방법 모식도

(나) DNA 추출 및 QC 진행

표고버섯 표준유전체를 확보하기 위해 경상대학교 노현수 교수 연구팀으로부터 참아람 유래 단핵포자 B17균주를 확보하였다.



그림 1-8. 표고 단핵균사 B9, B17(좌)과 액체배양(우)

액체배지에 계대배양하여 Gene All genomic DNA prep kit를 사용하여 DNA를 추출하였다. DNA QC결과 아주 좋은 순도의 DNA가 준비되었음을 확인하였다.

<사진>전기영동 결과

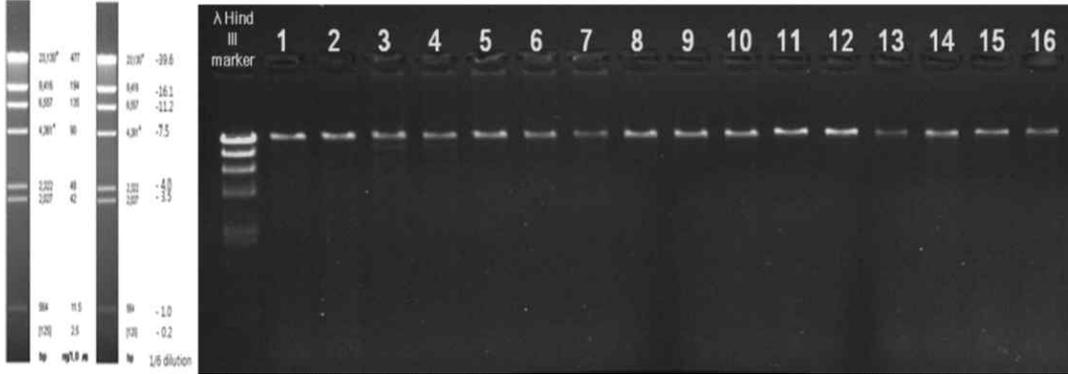


그림 1-9. DNA 추출 전기영동 사진 결과

4. 실험 결과

(Qubit & Nanodrop 결과)

NO	Delivery ID	Theragen ID	Conc_Quant-IT (ng/ul)	Volume_잔량(ul)	Fluorescence 기준_총량 (ug)	Conc_UV (ng/ul)	260 / 280	260/ 230	UV 총량(ug)	Level
1	B17_1	TN1508D0102	31	140	4.3	569.2	2	2.36	79.7	B-1
2	B17_2	TN1508D0103	24.3	140	3.4	513.7	2.01	2.33	71.9	B-1
3	B17_3	TN1508D0104	27.6	141	3.9	536.8	2	2.31	75.7	B-1
4	B17_4	TN1508D0105	24.3	150	3.6	384.4	1.99	2.32	57.7	B-1
5	B17_5	TN1508D0106	28.4	152	4.3	467.7	2	2.3	71.1	B-1
6	B17_6	TN1508D0107	17.1	153	2.6	385.6	2.01	2.37	59.0	B-1
7	B17_7	TN1508D0108	21.5	150	3.2	432.5	2	2.35	64.9	B-1
8	E13_1	TN1508D0109	16.8	99	1.7	343	1.98	2.24	34.0	B-1
9	E13_2	TN1508D0110	16.7	108	1.8	370.5	1.99	2.29	40.0	B-1
10	E13_3	TN1508D0111	20.1	150	3.0	325.6	2	2.26	48.8	B-1
11	E13_4	TN1508D0112	18.6	151	2.8	314.5	1.98	2.26	47.5	B-1

그림 1-10. DNA QC 결과

(다) 분석 결과

1개의 paired-end short insert 라이브러리를 (총 4.2G bases) 생산하였다.

표 1-4. Paired-end short insert 라이브러리 염기서열해독 데이터 생산 결과

Library	Total Reads	Total Bases	GC_Rate	≥Q30 (%)	≥Q20 (%)
500_L1	41,870,422	4,228,912,622	41.89%	77.81	90.51

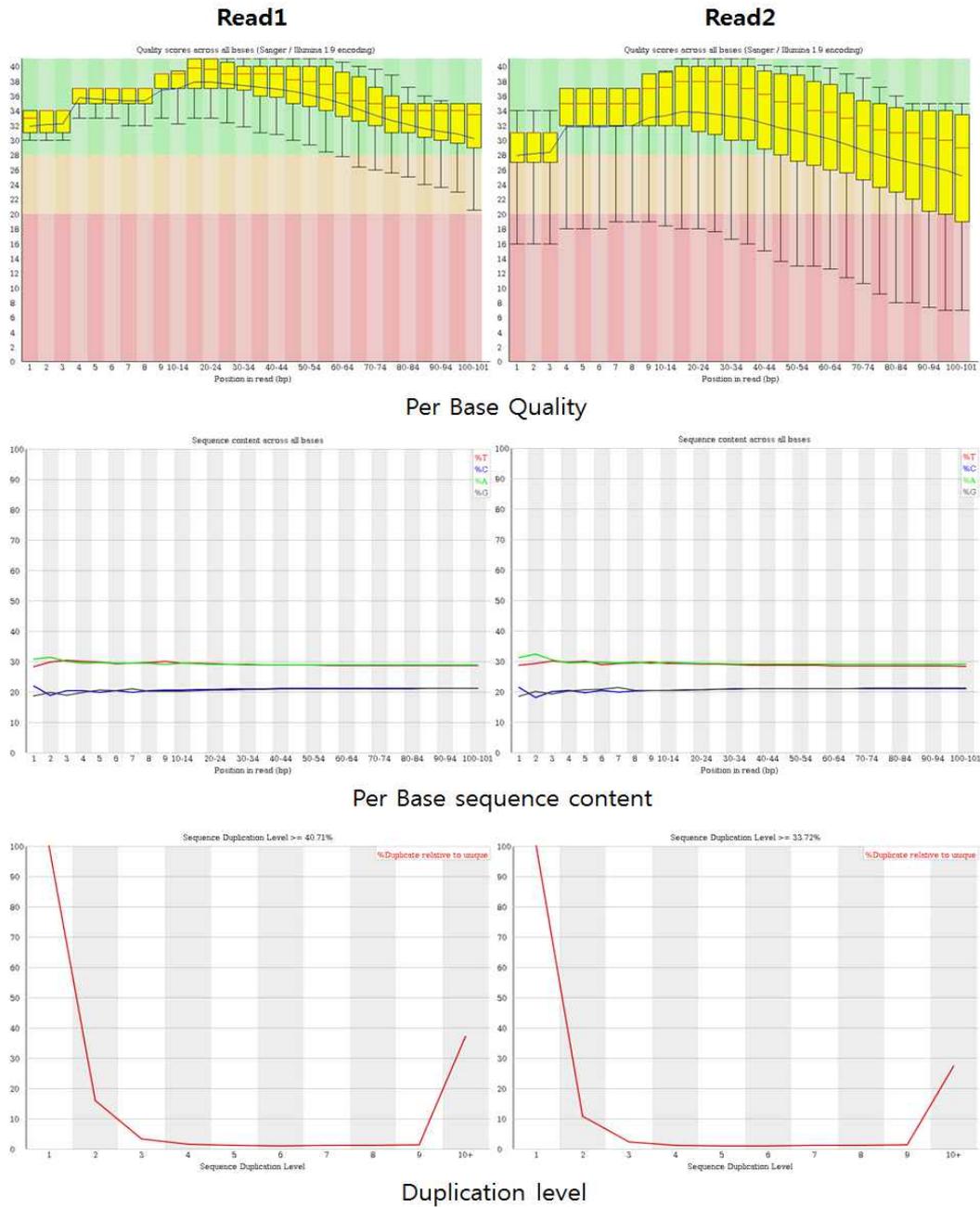
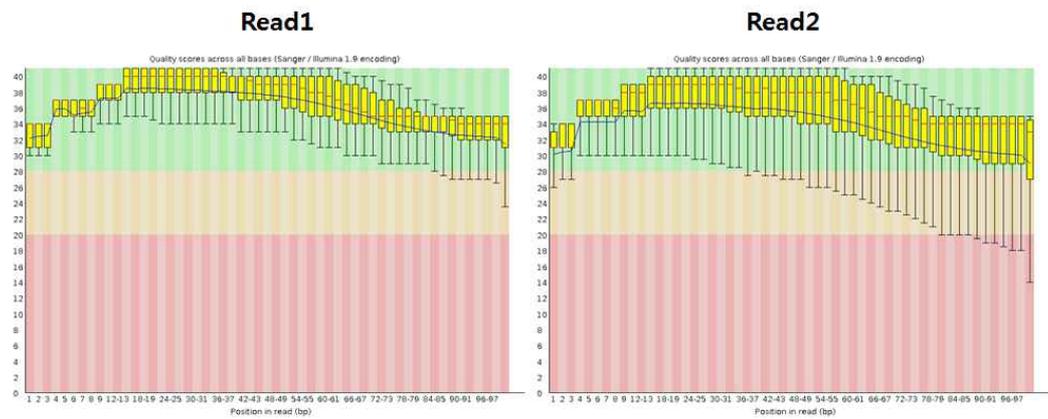


그림 1-11. 500\_L1

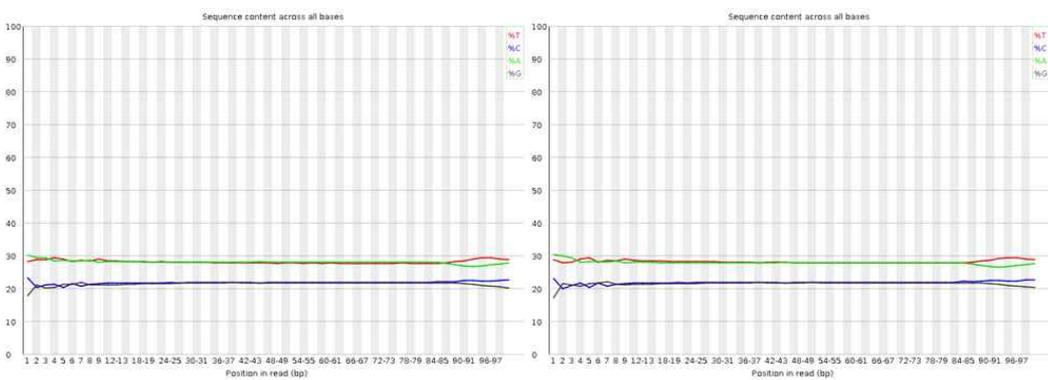
2개의 mate-pair long insert 라이브러리 (총 6G bases)에서 junction adaptor trimming 및 duplication 제거 결과 생산된 read의 53.30%, 22.21% read들만 통과되었다.

표 1-5. Mate-pair long insert 라이브러리 염기서열해독 생산량 및 junction adaptor trimming 및 duplication 서열 제거 결과

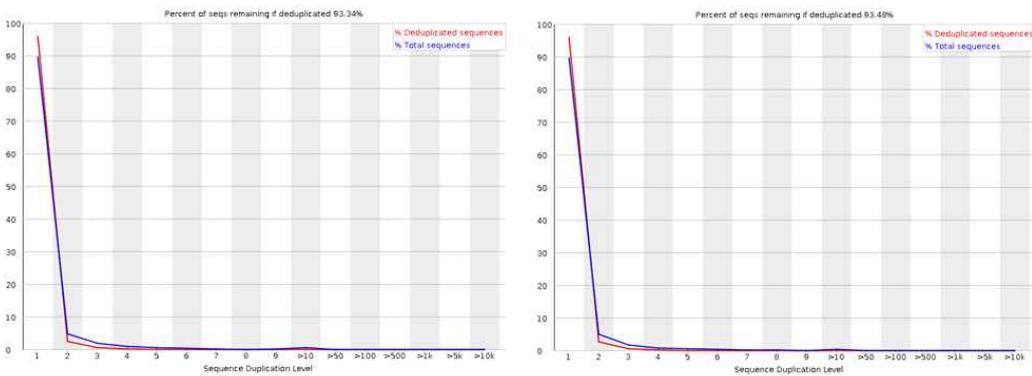
Library	Total Reads	Total Bases	> Q30 (%)	Trimmed Reads	Trimmed Reads (%)
5kb_L1	18,471,226	1,865,593,826	89.17	9,845,458	53.30%
10kb_L2	41,026,398	4,143,666,198	85.73	9,109,964	22.21%



Per Base Quality



Per Base sequence content



Duplication level

그림 1-12. 5kb\_L1

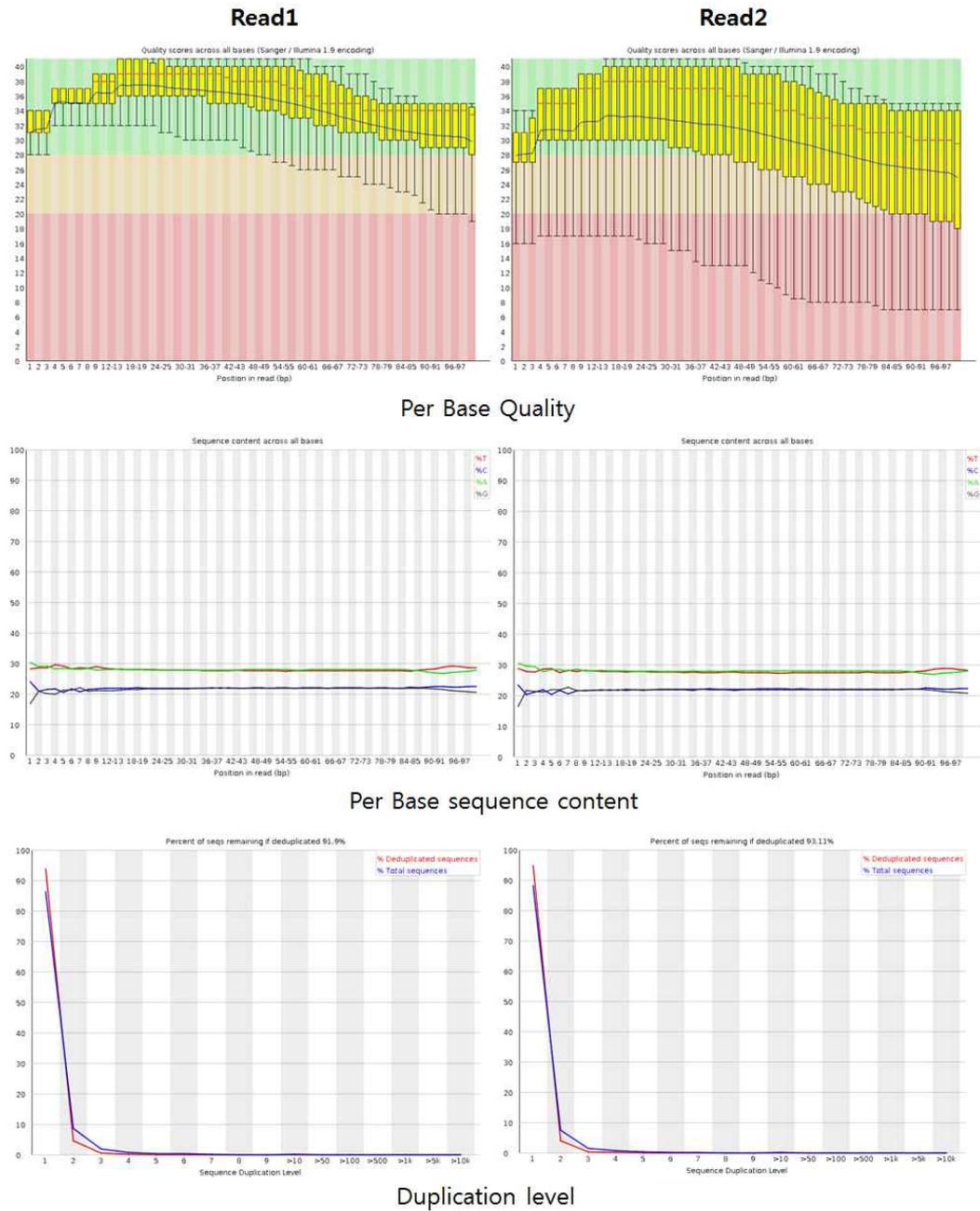


그림 1-13. 10kb\_L1

5개의 Single-Molecule Real-Time (SMRT) sequencing 으로 부터의 데이터 생산 결과 총 3.08G bases를 생산하였다.

표 1-6. Single-Molecule Real-Time (SMRT) sequencing 염기서열해독 생산량

Library	No. of Reads	No. of Bases	Longest	Ave.length
SMRT1	84,846	660,300,858	39,433	7,782
SMRT2	84,612	654,432,535	41,886	7,735
SMRT3	86,048	684,415,694	45,221	7,954
SMRT4	98,265	807,524,025	40,509	8,218
SMRT5	92,463	773,365,996	43,754	8,364

(2) 표고버섯 표준 유전체 조립

(가) 분석 방법

Overlap Layout Consensus (OLC) 알고리즘을 사용하여 repeat이나 diploid에서 나타나는 heterozygosity에 의해 나타나는 문제점을 수정하였다.

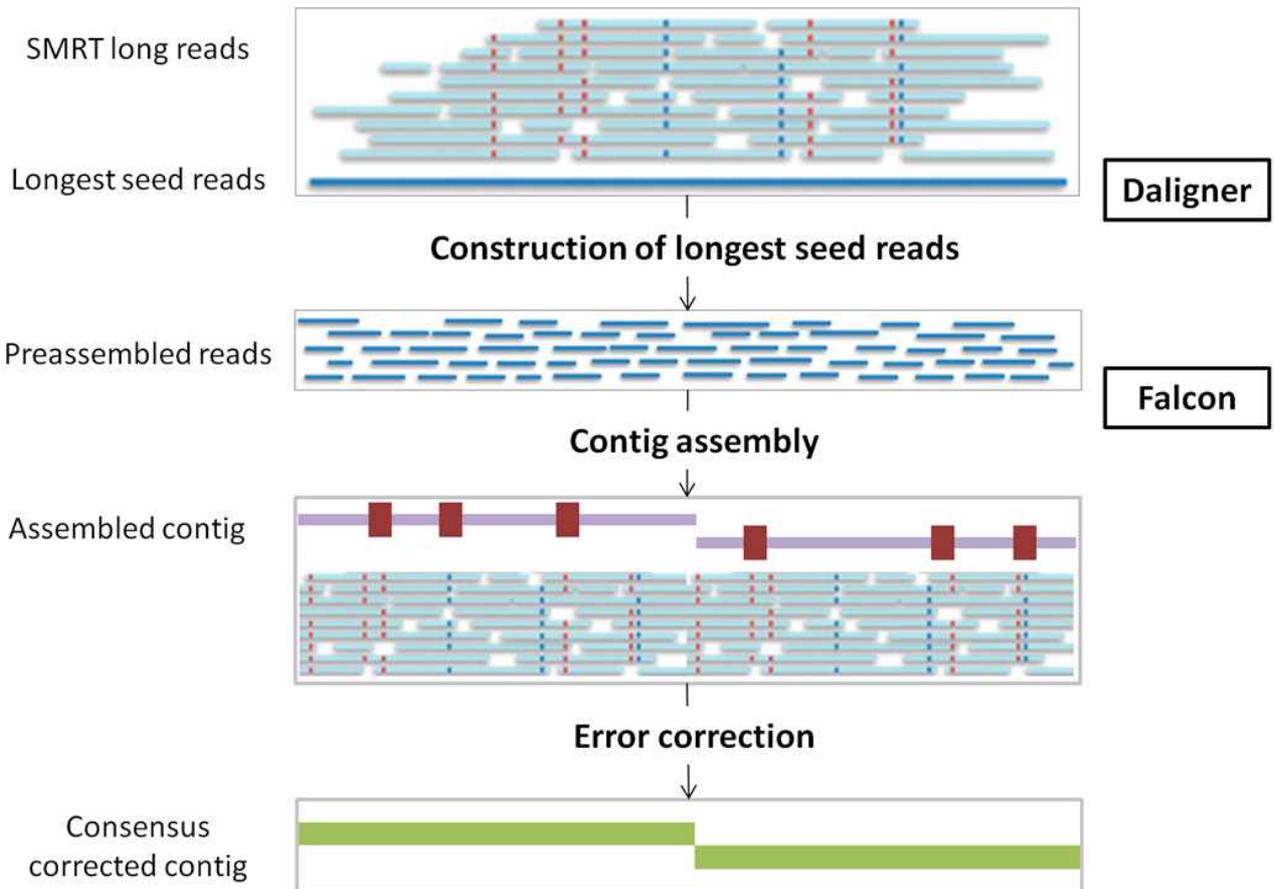


그림 1-14. SMRT sequencing 서열을 사용한 Contig 제작 모식도

SMRT sequencing은 long-read를 만들어 내지만, 그에 대한 평균 base error rate가 16%정도 되므로 depth coverage(x)를 50배수 이상 읽어 random base error를 보정 할 수 있는 FALCON assembler 패키지에 포함 되어있는 Daligner tool을 사용하여 long-read에 대한 보정을 수행하

였다. 그리고 보정된 read들을 가지고 pre-assembly를 수행하여 longest seed 서열을 만들어낸 뒤 Contig assembly를 만들어 낸 뒤 보정된 long-read를 사용하여 Contig assembly 결과에 대해 보정 수행하였다. Tool은 FALCON assembler를 사용하였다. 제작된 Contig 서열에 대해 먼저 mtDNA를 제거 한 후 SMRT sequencing read들을 사용하여 Scaffolding을 수행하였고, short insert paired-end library와 long insert mate-pair library sequencing 결과를 사용하여 다시한번 scaffolding 및 gapfilling을 수행(SSPACE, GapCloser)하였다. 표고버섯 표준 유전체 조립이 완료된 서열에 염기 서열 해독 데이터를 다시 alignment 시켜 선도 유전체 조립에 사용된 염기서열의 사용 비율 및 insert size 검증 작업을 진행하였다.

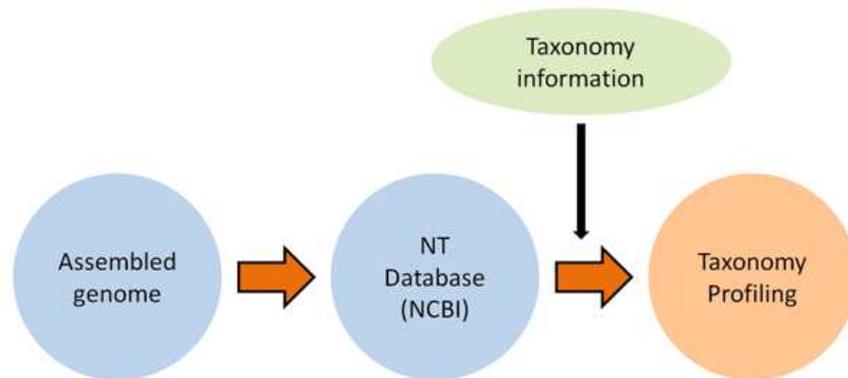


그림 1-15. Taxonomy profiling 방법 모식도

또한, 위 그림과 같이 *de novo* assembly가 최종 완료된 결과에 대한 genome 종에 대한 유효성을 파악하기 위해 megablast 알고리즘을 사용하여 NCBI의 non-redundant nucleotide database인 nr database에 alignment를 수행하였다. alignment가 완료된 결과에 대해 NCBI taxonomy 정보를 이용하여 Krona tool로 assembly 결과에 taxonomy assign을 수행하였고, assembly 결과의 assign된 taxon별 염기서열의 개수를 구하고, 이에 대해 총 염기서열의 수에 대한 비율을 계산하여 pie chart 및 유사종 6종을 추출하였다.

#### (나) 표고버섯 표준유전체 분석 결과

표고버섯 표준 유전체 조립은 유전체 조립 Tool인 FALCON과 SSPACE를 조합 사용하여 조립 성능을 높였다. 조립 성능의 평가기준의 첫번째는 전체 조립된 크기와 예측된 유전체 크기와 유사한 결과, 높은 전체 조립된 크기를 기준으로 높은 순의 scaffold 크기의 누적값이 50% 이상이 되는 값 (N50), 또한, 가장 긴 scaffold의 길이의 비교를 통하여 조립 성능 평가하였다.

표 1-7. 선도 유전체 조립 결과

Progress	No. of Sequences	No. of Bases	N50 (bp)	N90 (bp)	Longest (bp)
SMRT (Contig)	772	49,020,136	551,570	52,071	1,937,496
SMRT (Scaffold) - Removed mtDNA	74	46,188,591	1,194,430	396,964	4,000,281
<b>PE + MP + SMRT (Gap filled)</b>	<b>31</b>	<b>46,107,382</b>	<b>3,663,064</b>	<b>805,900</b>	<b>5,849,037</b>
ScaffoldID	Length	GC_Count	GC_content	Coverage	
Scaffold1	5,311,644	2,440,490	45.95%	60.43	
Scaffold2	4,000,690	1,850,279	46.25%	61.59	
Scaffold3	3,600,692	1,661,062	46.13%	59.18	
Scaffold4	3,662,990	1,678,546	45.82%	62.52	
Scaffold5	5,330,550	2,454,826	46.05%	61.05	
Scaffold6	2,065,898	954,205	46.19%	61.33	
Scaffold7	5,849,119	2,675,528	45.74%	60.13	
Scaffold8	1,789,215	819,470	45.80%	64.04	
Scaffold9	1,678,028	773,667	46.11%	58.79	
Scaffold10	1,585,523	732,009	46.17%	58.49	
Scaffold11	1,779,288	820,310	46.10%	59.22	
Scaffold12	1,205,196	546,282	45.33%	59.38	
Scaffold13	1,030,649	465,257	45.14%	64.61	
Scaffold14	1,231,013	569,663	46.28%	59.94	
Scaffold15	934,971	428,918	45.88%	61.72	
Scaffold16	805,900	363,988	45.17%	61.55	
Scaffold17	652,519	303,994	46.59%	58.37	
Scaffold18	619,333	289,057	46.67%	56.08	
Scaffold19	586,226	265,281	45.25%	59.56	
Scaffold20	561,984	261,733	46.57%	56.07	
Scaffold21	498,599	229,424	46.01%	60.25	
Scaffold22	344,103	157,701	45.83%	54.55	
Scaffold23	279,175	126,502	45.31%	59.09	
Scaffold24	236,933	107,717	45.46%	58.73	
Scaffold25	176,572	76,187	43.15%	500.98	
Scaffold26	98,480	46,613	47.33%	55.64	
Scaffold27	86,771	40,857	47.09%	67.77	
Scaffold28	34,043	16,000	47.00%	48.93	
Scaffold29	33,025	14,500	43.91%	1207.35	
Scaffold30	27,876	13,657	48.99%	106.22	
Scaffold31	9,736	2,523	25.91%	5192.37	

선도 유전체 조립이 완료 된 서열에 염기서열 해독 데이터를 다시 alignment를 시켜 선도 유전체 조립에 사용된 염기서열의 insert size를 검증하였다.

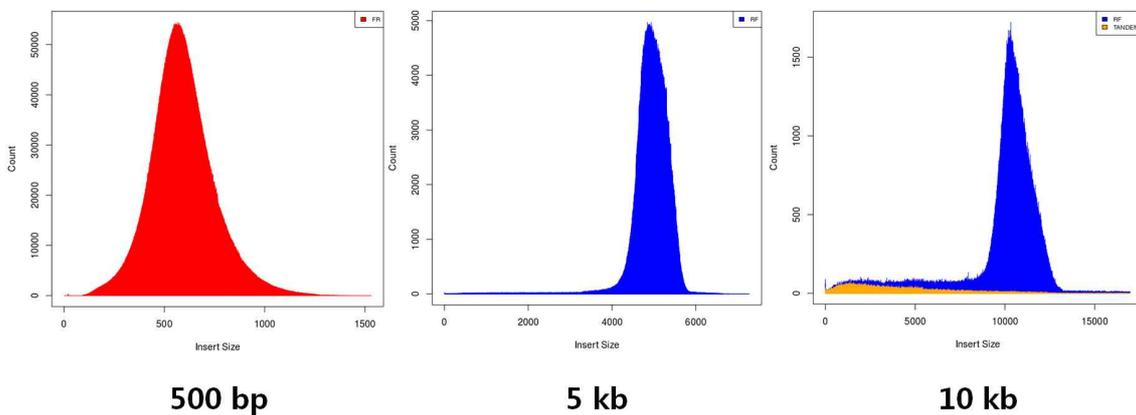


그림 1-16. Short, Long insert 라이브러리 insert size 검증 결과



그림 1-17. Taxonomy profiling 결과

표 1-8. 유사종 결과 리스트

Taxon Name	Taxon ID	Assigned Length	(%)
Lentinula_edodes	5353	46,078,865	99.93%

### (3) 미토콘드리아 서열 조립

#### (가) 분석 방법

미토콘드리아 서열을 제작하기 위하여 기존에 알려진 미토콘드리아 데이터베이스 (NCBI) 를 활용하여 시퀀싱 데이터를 alignment 시켰다. alignment 결과에서 미토콘드리아 데이터 베이스 (NCBI)에 alignmnet 된 read들만 추출하고, 추출된 read들을 대상으로 Assembly를 수행하여, 최종 mitochondira 서열을 제작하였다.

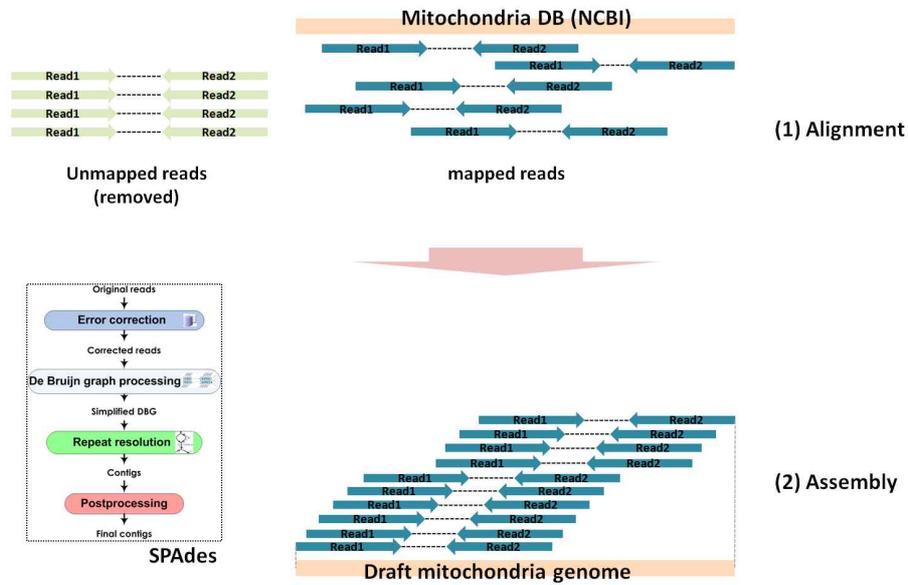


그림 1-18. 미토콘드리아 서열 제작 방법 모식도

(나) 분석 결과

미토콘드리아의 유사종을 찾기 위하여 미토콘드리아 데이터베이스에 alignment를 수행하였다.

표 1-9. 알려진 미토콘드리아 데이터베이스의 alignment 결과

Description	Length	GC_Count	GC_content	Coverage	Ave.Depth
Lentinula edodes mitochondrion, complete genome	121,394	37,269	30.70%	100.00%	6581.69
Penicillium solitum mitochondrion, complete genome	28,601	7,285	25.47%	62.82%	49.86
Penicillium roqueforti strain UASWS P1 mitochondrion, complete genome	29,908	7,595	25.39%	59.04%	36.69
Penicillium digitatum mitochondrion, complete genome	28,978	7,343	25.34%	58.48%	26.82
Aspergillus fumigatus mitochondrion, complete genome	30,696	7,822	25.48%	49.36%	20.23
Aspergillus oryzae mitochondrion, complete genome	29,202	7,637	26.15%	46.93%	8.19
Aspergillus oryzae 3.042 mitochondrion, complete genome	29,192	7,638	26.16%	44.44%	7.65
Aspergillus niger mitochondrion, complete genome	31,103	8,367	26.90%	35.49%	8.51
Canis lupus familiaris mitochondrion, complete genome	16,727	6,633	39.65%	33.59%	5.83

- \* Description : 종에 대한 미토콘드리아 설명
- \* Coverage : 전체 서열에 대해 alignment가 된 비율
- \* Ave.Depth : 전체 서열에 대한 alignment 평균 depth

표 1-10. 미토콘드리아 서열 제작 결과

Total size	Non - N Bases	N Bases
121,596	121,542	54

- \* Total size : 미토콘드리아 서열 총 염기서열 개수
- \* Non - N Bases : 알수없는 염기서열인 'N'이 아닌 염기서열 개수
- \* N Bases : 알수없는 염기서열인 'N'인 염기서열 개수

나. 표고버섯 유전체 genome annotation 수행 결과

(1) 주요 반복 서열 탐색

(가) 분석 방법

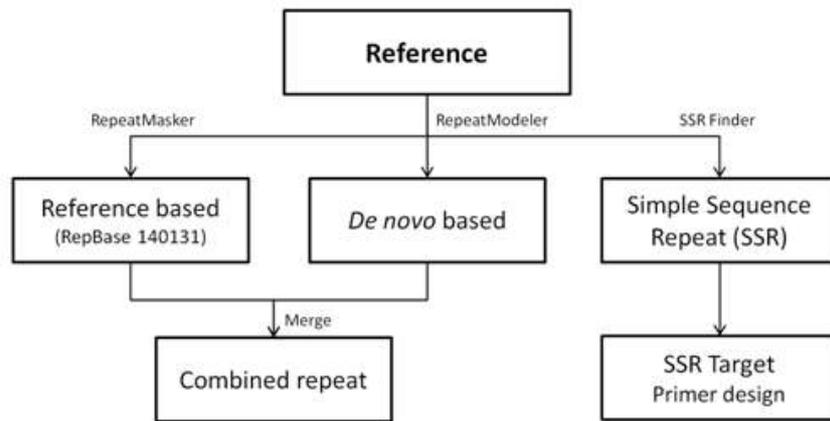


그림 1-19. 주요 반복 서열 탐색 방법 모식도

Repeat 모델을 이용한 Transposon 예측과 구조적 특성에 따른 분류 (Transposon 분류 및 풍부성의 결과는 유전체 크기 및 진화적 특성을 반영함)을 진행하였다. 자가-유전체 상동성 검색을 통한 종 특이적 반복서열을 확인하고, 위의 (Reference based, *de novo* based) 방법에 대해 RepeatMasker와 RepeatModeler Tool을 사용하였다. 유전체 서열상에서 motif별로 5반복 이상인 영역에서 Simple Sequence Repeat (SSR 또는 microsatellite)를 추출하였다.

추출된 SSR의 primer를 제작하기 위해 annealing 온도를 약 58°C (55-62°C), primer 길이는 18-26 bp, GC 함량은 50% 이상, 모든 반복 서열 영역을 제외한 (masked reference) 나머지 부분에서 primer 제작, primer 제작 후 유전체 내 또 다른 primer pair 발생 시 제작된 primer 제거를 기준으로 primer를 선별하였다. SSR 및 SSR target primer를 제작에 SSR Finder, primer3, blastn Tool을 사용하였다.

(나) 분석 결과

Rebase 모델을 이용한 트랜스포존 예측 및 데이터베이스에 존재하지 않는 종 특이적으로 반복서열 존재를 확인 작업 수행결과 유전체의 비율 중 25.25%가 반복서열임을 확인하였다.

표 1-11. 반복 서열에 대한 분포 확인

Type	RepBase (140103)		<i>de novo</i> based		Combined	
	Length(bp)	(%) in genome	Length(bp)	(%) in genome	Length(bp)	(%) in genome
Retrotransposons	2682296 bp	5.82%	8182280 bp	17.75%	8328116 bp	18.06%
SINEs	0 bp	0.00%	11267 bp	0.02%	11267 bp	0.02%
LINEs	11901 bp	0.03%	283731 bp	0.62%	291860 bp	0.63%
LTR elements	2670353 bp	5.79%	7887988 bp	17.11%	8028008 bp	17.41%
Retroposon	42 bp	0.00%	0 bp	0.00%	42 bp	0.00%
DNA transposons	35751 bp	0.08%	195446 bp	0.42%	222802 bp	0.48%
DNA	24870 bp	0.05%	81980 bp	0.18%	106850 bp	0.23%
RC	10881 bp	0.02%	113466 bp	0.25%	116078 bp	0.25%
Other	0 bp	0.00%	0 bp	0.00%	0 bp	0.00%
Inserted sequence	0 bp	0.00%	0 bp	0.00%	0 bp	0.00%
Segmental duplication	0 bp	0.00%	0 bp	0.00%	0 bp	0.00%
Unclassified	275 bp	0.00%	2858714 bp	6.20%	2858989 bp	6.20%
Small RNA	39891 bp	0.09%	0 bp	0.00%	39891 bp	0.09%
Satellites	0 bp	0.00%	0 bp	0.00%	0 bp	0.00%
Simple repeats	255998 bp	0.56%	165666 bp	0.36%	258562 bp	0.56%
Low complexity	66711 bp	0.14%	37480 bp	0.08%	67045 bp	0.15%
Total	3080544 bp	6.68%	11423026 bp	24.78%	11641447 bp	25.25%

또한, 게놈 서열상의 simple sequence repeat (SSR 또는 microsatellite) 타입을 분석 (Repeat motifs 5개 이상 반복 Search) 하였다.

표 1-12. SSR 분포 요약

RepeatType	Frequency	Frequency per million
Di-nucleotide	1,531	33.21
Tri-nucleotide	738	16.01
Tetra-nucleotide	108	2.34
Penta-nucleotide	15	0.33
Hexa-nucleotide	31	0.67
Hepta-nucleotide	9	0.2
Octa-nucleotide	4	0.09
Ennea-nucleotide	9	0.2
Deca-nucleotide	5	0.11

표 1-13. Di-nucleotide, Tri-nucleotide motif 세부 분류 현황

Motif	Frequency	(%)
AC (AC/CA/TG/GT)	254	16.59%
AG (AG/GA/TC/CT)	879	57.41%
AT (AT/TA)	314	20.51%
CG (CG/GC)	84	5.49%
AAT (AAT/ATA/TAA/ATT/TTA/TAT)	15	2.03%
AAG (AAG/AGA/GAA/CTT/TTC/TCT)	104	14.09%
AAC (AAC/ACA/CAA/GTT/TTG/TGT)	47	6.37%
ATG (ATG/TGA/GAT/CAT/ATC/TCA)	93	12.60%
AGT (AGT/GTA/TAG/ACT/CTA/TAC)	20	2.71%
AGG (AGG/GGA/GAG/CCT/CTC/TCC)	128	17.34%
AGC (AGC/GCA/CAG/GCT/CTG/TGC)	76	10.30%
ACG (ACG/CGA/GAC/CGT/GTC/TCG)	146	19.78%
ACC (ACC/CCA/CAC/GGT/GTG/TGG)	63	8.54%
GGC (GGC/GCG/CGG/GCC/CCG/CGC)	46	6.23%

추출된 SSR에 대해 위에 언급된 방법으로 primer 제작하였다.

표 1-14. SSR target primer 제작 결과

RepeatType	Primer pair 개수	(%)
Di-nucleotide	836	54.60%
Tri-nucleotide	436	59.08%
Tetra-nucleotide	40	37.04%
Penta-nucleotide	7	46.67%
Hexa-nucleotide	14	45.16%
Hepta-nucleotide	1	11.11%
Octa-nucleotide	2	50.00%
Ennea-nucleotide	3	33.33%
Deca-nucleotide	0	0.00%

다. 단백질 코딩 영역 검색 및 상동성 검색을 통한 기능 분석

(1) Gene prediction을 위한 RNA 추출 및 QC 진행

RNA가 거의 깨지지 않고 잘 분리되어져 있음을 확인할 수 있었고, 이를 이용하여 RNA-seq을 진행하였다.

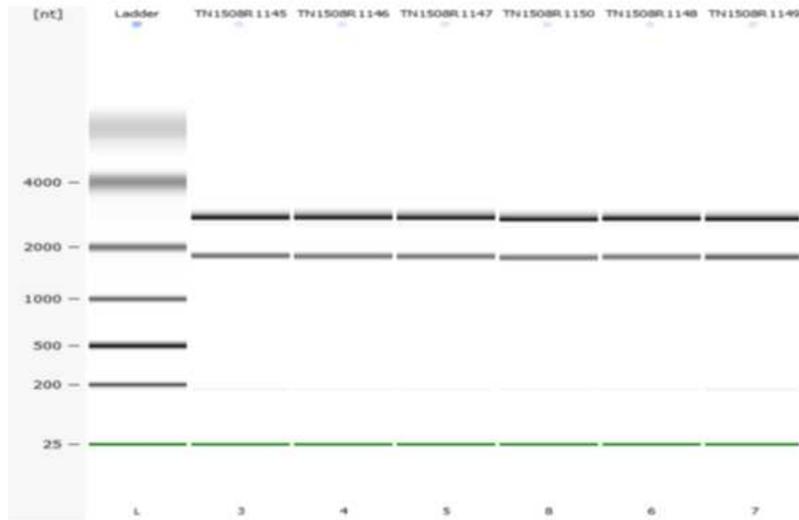


그림 1-20. B17균사에서 RNA 추출 및 전기영동 결과

NO	Delivery ID	Theragen ID	BA _Conc. (ng/ul)	RIN value	25s/18s ratio	Sample Vol.(ul)	BA 기준 _총량(ug)	결론
1	B17 RNA ①	TN1508R1145	1785	9.5	1.6	46	82.1	A
2	B17 RNA ②	TN1508R1146	1690	9.6	1.6	41	69.3	A
3	B17 RNA ③	TN1508R1147	1495	9.6	1.6	44	65.8	A
4	B17 RNA ④	TN1508R1148	1990	9.6	1.6	44	87.6	A
5	B17 RNA ⑤	TN1508R1149	2545	10	1.4	46	117.1	A
6	B17 RNA ⑥	TN1508R1150	2480	9.9	1.6	45	111.6	A

그림 1-21. RNA QC 결과

## (2) 분석 방법

Repeat masking된 genome에 대해 Tophat2를 사용하여 transcript alignment를 수행하였고, Transcript alignment 결과를 이용하여 GeneMark-ET Tool로 pre gene prediction을 수행하였다. 이 결과를 사용하여 AUGUSTUS tool의 고유종 gene model을 구축하였다.

앞선 taxonomy profiling 결과에 대해 유사종 1종에 대한 taxonomy 정보를 이용하여 NCBI non-redundant protein database인 nr database에서 유사종의 protein을 추출 후 exonerate tool을 사용하여 gene 영역에 대해 예측하였다.

앞서 만들어진 고유종 gene model를 사용하여 intron 정보만을 가지고 있는 transcript hint 파일과 exonerate tool 결과의 cording partial 정보 및 intron 정보에 대한 protein hin 파일을 조합하여 repeat masked gene set을 구축하였다.

repeat 부분의 simple repeat이나, TE가 일부 insertion 되어있는 유전자가 예측되지 않는 약점이 있는 부분을 고려하여, repeat masking 되지 않는 영역에서도 AUGUSTUS tool을 사용하여 유전자를 예측 수행하였다.

앞서 repeat masking 되지 않은 영역의 false positive gene을 제거하기 위하여, RepBase 데이터베이스의 Transposon element 서열들에 tblastx를 사용하여 match가 되는 유전자는 제거하

였고, 제거 후 남은 유전자들을 대상으로 RNA-Seq 데이터를 사용한 alignment 및 NCBI nr을 이용한 homology search로 확인유전자들로 최종 gene set을 구축하였다.

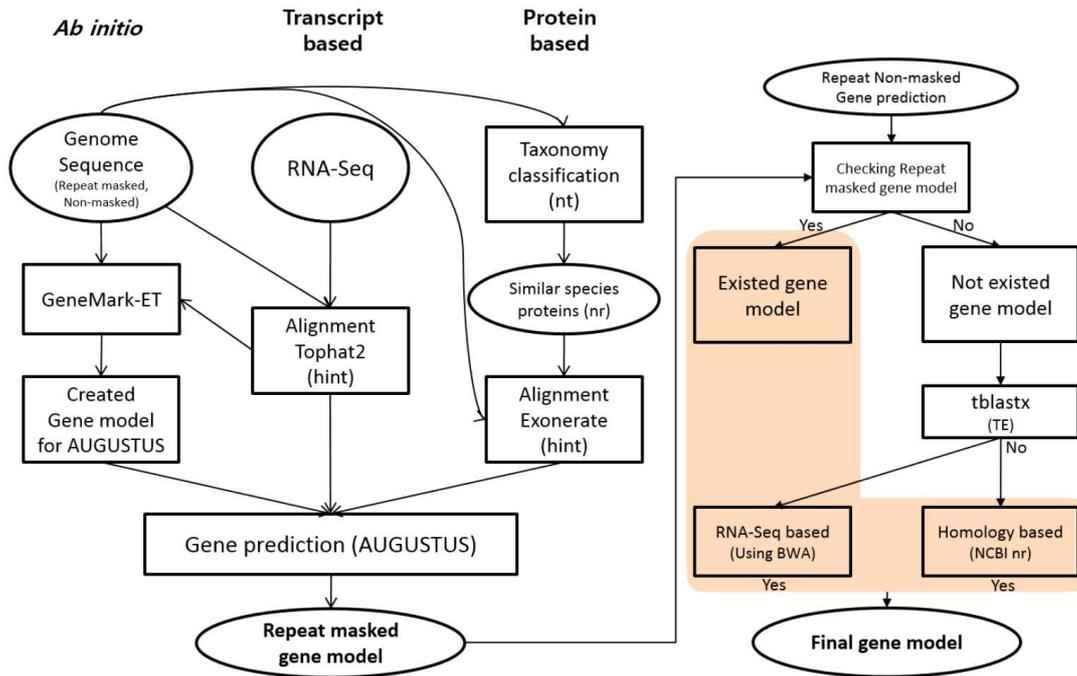


그림 1-22. 유전자 예측 방법 모식도

최종 gene set에 대해 Uniprot, NCBI nr, InterProScan database를 사용하여 상동성 검색을 기반으로 유전자 기능 예측하였고, BLAST2GO를 이용하여, GO 및 KEGG pathway를 예측하였다.

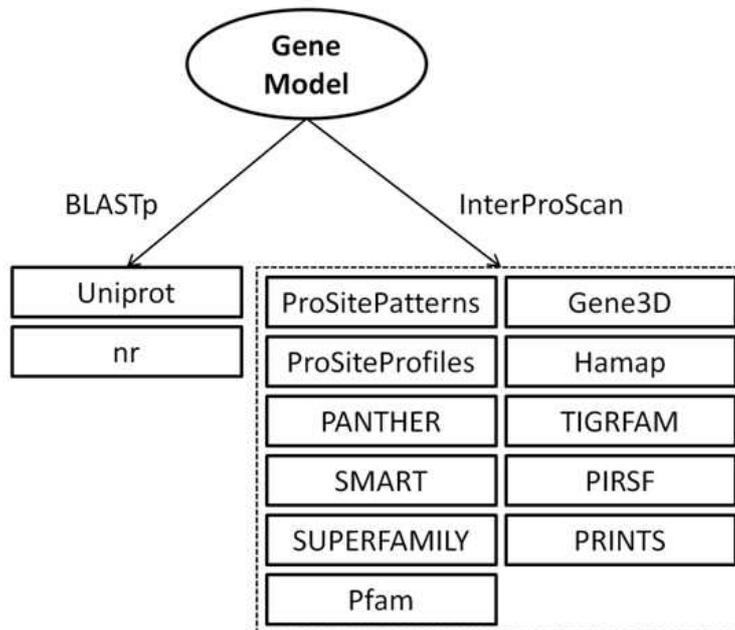


그림 1-23. 상동성 검색을 통한 기능 분석 방법 모식도

(3) 분석 결과

총 13,426개의 유전자가 예측이 되었으며, 이중 **13,028개**는 **Unique gene model**임을 확인하였다. 사용된 RNA-Seq 데이터에 alignment 되는 유전자는 12,165개로 확인 되었으며, genome 영역 내 46.94%가 유전자 영역으로 확인되었다.

표 1-15. 유전자 예측 결과

	Quantification
Total no. of gene models predicted	13,426
<b>Unique gene models (No.)</b>	<b>13,028</b>
Genes with isoforms (No.)	398
RNA-Seq supported gene model (No.) *	11,807
RNA-Seq supported gene model (No.)* - NonMasked	358
Homology supported gene model (No.)* - NonMasked	339
Average gene length (bp)	1,612 bp
Total bases of gene models (Mbp)	21.64 Mbp
%Genes in the draft genome	46.94%
No. of CDS	77,650
Average no. of CDS per gene	5.78
Average CDS length (bp)	204 bp
No. of intron	64,224
Average no. of intron per gene	4.78
Average intron length (bp)	90 bp

총 13,426개의 유전자중 11,024개의 유전자에 대해서는 기존 데이터베이스와의 상동성 검색으로 기능을 예측하였다.

표 1-16. 상동성 검색을 통한 기능 분석 요약 결과

Transcripts	Uniprot	NCBI nr	InterProScan	Annotated	(%)
13,426	5,874	10,829	8,449	11,024	82.11

GeneAcc	TranAcc	Symbol	Desc	Domain
GENE0091	GENE0091	zpr1	Zinc finger ZPR1 zinc-finger domain(PF03367),ZPR1 zinc-finger domain(PF03367) [Source:Pfam]	
GENE0751	GENE0751	-	ubiquitin cZn-finger in ubiquitin-hydrolases and other protein(PF02148) [Source:Pfam]	
GENE0663	GENE0663	WSS1	DNA-depe Zn-finger in Ran binding protein and others(PF00641),WLM domain(PF08325) [Source:Pfam]	
GENE0034	GENE0034	Nup153	Nuclear pcZn-finger in Ran binding protein and others(PF00641) [Source:Pfam]	
GENE0902	GENE0902	-	hypothetic Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain profile.(P550048) [Source:ProSite]	
GENE0837	GENE0837	-	hypothetic Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain profile.(P550048) [Source:ProSite]	
GENE0522	GENE0522	-	hypothetic Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain profile.(P550048) [Source:ProSite]	
GENE0334	GENE0334	pi067	Uncharact Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain profile.(P550048) [Source:ProSite]	
GENE0334	GENE0334	pi067	Uncharact Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain profile.(P550048) [Source:ProSite]	
GENE1103	GENE1103	Catsup	Protein cat ZIP Zinc transporter(PF02535),ZIP Zinc transporter(PF02535) [Source:Pfam]	
GENE0171	GENE0171	ZRT1	Zinc-reguli ZIP Zinc transporter(PF02535),ZIP Zinc transporter(PF02535) [Source:Pfam]	
GENE0801	GENE0801	slc39a9	Zinc trans ZIP Zinc transporter(PF02535) [Source:Pfam]	
GENE0041	GENE0041	zrt1	Zinc-reguli ZIP Zinc transporter(PF02535) [Source:Pfam]	
GENE0075	GENE0075	zrt1	Zinc-reguli ZIP Zinc transporter(PF02535) [Source:Pfam]	
GENE1096	GENE1096	-	predicted zinc-RING finger domain(PF14634) [Source:Pfam]	
GENE0800	GENE0800	-	hypothetic Zinc-finger of the MIZ type in Nse subunit(PF11789) [Source:Pfam]	
GENE0530	GENE0530	MS551	Protein MS Zinc-finger of mitochondrial splicing suppressor 51(PF13824) [Source:Pfam]	
GENE0859	GENE0859	-	hypothetic Zinc-finger of C2H2 type(PF12874),C2H2-type zinc finger(PF13894) [Source:Pfam]	
GENE0213	GENE0213	ESCO1	N-acetyltr zinc-finger of acetyl-transferase ESCO(PF13878),ESCO1/2 acetyl-transferase(PF13880) [Source:Pfam]	
GENE0744	GENE0744	SPC550.1	Cytoplasm Zinc-finger double-stranded RNA-binding(PF12171),C2H2 type zinc-finger (2 copies)(PF12756) [Source:Pfam]	
GENE0490	GENE0490	Zmat2	Zinc finger Zinc-finger double-stranded RNA-binding(PF12171) [Source:Pfam]	
GENE0543	GENE0543	znf593	Zinc finger Zinc-finger double-stranded RNA-binding(PF12171) [Source:Pfam]	
GENE1252	GENE1252	ZNF274	Neurotrop Zinc-finger double domain(PF13465),Zinc-finger double domain(PF13465),Zinc-finger double dom	
GENE0104	GENE0104	opa	Pair-rule p Zinc-finger double domain(PF13465),Zinc-finger double domain(PF13465),Zinc-finger double dom	
GENE0566	GENE0566	rds1	Protein rds Zinc-finger double domain(PF13465),Ferritin-like domain(PF13668) [Source:Pfam]	
GENE0984	GENE0984	iec1	INO80 con Zinc-finger double domain(PF13465),C2H2-type zinc finger(PF13912) [Source:Pfam]	
GENE0153	GENE0153	BCR1	Biofilm an Zinc-finger double domain(PF13465) [Source:Pfam]	
GENE0905	GENE0905	BCR1	Biofilm an Zinc-finger double domain(PF13465) [Source:Pfam]	
GENE0136	GENE0136	-	C2H2 type Zinc-finger double domain(PF13465) [Source:Pfam]	
GENE0557	GENE0557	creA	DNA-bind Zinc-finger double domain(PF13465) [Source:Pfam]	
GENE0959	GENE0959	-	predicted Zinc-finger double domain(PF13465) [Source:Pfam]	
GENE0459	GENE0459	CRZ1	Transcript Zinc-finger double domain(PF13465) [Source:Pfam]	
GENE0504	GENE0504	CRZ1	Transcript Zinc-finger double domain(PF13465) [Source:Pfam]	

그림 1-24. 포고 유전자 annotation 예

BLAST2GO 결과 총 109개의 KEGG pathway match가 되었고, 유전자의 개수는 1,867개로 확인되었다.

Pathway	Seqs in Pathway	Enzyme	Enzyme ID	Seqs of Enzyme	Seqs	Pathway ID
Aflatoxin biosynthesis	1	carboxylase	ec:6.4.12	1	GENE02054.1	map00254
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	transaminase (isomerizing)	ec:2.6.1.6	1	GENE09482.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	synthase	ec:5.2.44	2	GENE03531.1, GENE07984.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	ligase	ec:6.3.45	1	GENE01900.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	ligase	ec:6.3.12	3	GENE09695.1, GENE07838.1, GENE12296.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	lyase	ec:4.2.1	1	GENE14368.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	lyase	ec:4.2.22	1	GENE11170.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	carbamoyltransferase	ec:2.1.32	1	GENE03807.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	decarboxylase	ec:4.1.1.15	1	GENE10993.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	synthase (glutamine-hydrolyzing)	ec:5.5.4	3	GENE12594.1, GENE05045.1, GENE05045.2	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	phosphoribosyl(diphosphate, 5-amidotransferase	ec:2.4.2.14	1	GENE12265.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	dehydrogenase	ec:1.4.1.2	1	GENE02388.1	map00250
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	17	glutaminase I	ec:3.5.1.2	1	GENE05336.1	map00250
alpha-Linolenic acid metabolism	1	oxidase	ec:1.3.1.6	1	GENE05420.1	map00582
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	transaminase (isomerizing)	ec:2.6.1.16	1	GENE09482.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	hexokinase type IV, glucokinase	ec:2.7.1.1	3	GENE03009.1, GENE09777.1, GENE00270.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	galactokinase (phosphorylating)	ec:2.7.1.6	1	GENE04938.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	epimerase	ec:5.1.3.2	2	GENE04938.1, GENE05238.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	synthase	ec:1.1.1.271	1	GENE10422.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	deaminase	ec:3.5.99.6	1	GENE09691.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	isomerase	ec:5.3.1.8	1	GENE10341.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	isomerase	ec:5.3.1.9	1	GENE09872.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	hexosaminidase	ec:3.1.1.52	3	GENE03821.1, GENE00946.1, GENE02118.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	and alpha-L-arabinofuranosidase	ec:3.2.1.55	2	GENE11589.1, GENE03871.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	6-dehydrogenase	ec:1.2.1.47	1	GENE01373.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	uridylyltransferase	ec:2.7.7.12	1	GENE09752.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	mutase	ec:5.4.2.3	1	GENE04364.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	mannose phosphomutase	ec:5.4.2.8	1	GENE03817.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	6-dehydrogenase	ec:1.1.1.22	1	GENE05361.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	synthase	ec:2.4.1.16	4	GENE09004.1, GENE12115.1, GENE03995.1, GENE07529.1	map00520
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	33	chitoesterase	ec:3.2.1.14	8	GENE06196.1, GENE10533.1, GENE10333.1, GENE02398.1, GENE04625.1, GENE00711.1, GENE0541, map00520	
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.6	1	GENE12366.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.7	3	GENE04001.1, GENE07208.1, GENE07872.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.9	1	GENE05338.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.2	3	GENE10531.1, GENE04070.1, GENE11560.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.3	1	GENE10213.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.4	1	GENE10942.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.5	2	GENE04801.1, GENE00204.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.1	2	GENE00288.1, GENE04745.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.15	1	GENE09789.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.7	1	GENE04372.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.19	2	GENE01373.1, GENE00050.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.4	1	GENE09893.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.16	1	GENE01341.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.15	1	GENE03386.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.10	2	GENE06401.1, GENE06963.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.2	2	GENE00288.1, GENE02840.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.11	2	GENE10491.1, GENE04504.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.20	1	GENE03773.1, GENE12847.1	map00970
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	33	ligase	ec:6.1.1.22	4	GENE03321.1, GENE02275.1, GENE05597.1, GENE03338.1	map00970
Aminobenzoate degradation	52	nitrophenyl phosphatase	ec:3.1.4.1	52	GENE04851.1, GENE12896.1, GENE03311.1, GENE03497.1, GENE00897.1, GENE05467.2, GENE05001, map00970	
Aminobenzoate degradation	52	phosphatase	ec:3.1.3.2	9	GENE04701.1, GENE04473.1, GENE03913.1, GENE03381.1, GENE07617.1, GENE03718.1, GENE10202, map00970	
Arachidonic acid metabolism	1	peroxidase	ec:1.11.1.9	1	GENE11036.1	map00590
Arginine and proline metabolism	9	oxidase	ec:1.4.3.3	4	GENE02154.1, GENE05519.1, GENE12099.1, GENE00141.1	map00380
Arginine and proline metabolism	9	arginine amidinase	ec:5.5.1.1	1	GENE01541.1	map00380
Arginine and proline metabolism	9	5-kinase	ec:2.7.2.11	1	GENE05271.1	map00380
Arginine and proline metabolism	9	dehydrogenase	ec:1.2.1.41	1	GENE02041.1	map00380
Arginine and proline metabolism	9	racemase	ec:5.1.1.4	1	GENE11566.1	map00380
Arginine and proline metabolism	9	reductase	ec:1.1.1.12	1	GENE12205.1	map00380

그림 1-25. KEGG PATHWAY 예

### 3. 표고 품종 구분을 위한 SSR marker 개발

표고 표준유전체 정보를 바탕으로 찾아낸 SSR을 품종구분을 위한 marker로 개발하였다.

#### 가. 연구방법

표고 품종 구분을 위한 SSR marker를 개발하기 위하여 국립산림과학원의 5품종, 산림버섯연구센터에서 18개 품종을 분양받아 진행하였다. 균사체는 분양받은 균주로부터 25℃에서 약 10일 동안 암배양 후 사용하였다.

표 1-17. 실험에 사용된 표고 품종

번호	품종	분양기관
1	백화향	국립산림과학원
2	수향고	
3	풍년고	
4	산마루 1호	
5	산마루 2호	
6	산조 101호	산림조합중앙회 산림버섯연구센터
7	산조 102호	
8	산조 103호	
9	산조 108호	
10	산조 109호	
11	산조 110호	
12	산조 111호	
13	산조 301호	
14	산조 501호	
15	산조 702호	
16	산조 704호	
17	산조 705호	
18	산조 706호	
19	산조 707호	
20	산조 708호	
21	산조 709호	
22	산조 710호	
23	참아람	

DNA 추출을 위해, 배양 된 균사체를 액체 질소에서 동결시켜 분쇄하여 사용하였다. DNA 추출은 GenEX Plant Kit (Geneall, Korea)를 사용하였다. 추출한 DNA를 -80 °C에서 보관 하였다.

표고 표준 유전체정보에서 획득한 SSR과 참아람의 resequencing 결과에서 얻은 SSR을 비교하여 205개의 SSR을 선별하고, PCR 조건이 고정되는 44개의 SSR을 선택하였다. primer 디자인은 nucleotide길이가 18-23 최적 21, PCR 최종 산물 크기가 150-200 bp, annealing temperature 약 58 ° C, 그리고 GC content는 50-61% 최적 51%를 기준으로 하였다.

추출된 DNA는 micro spectrophotometer (K5600, DaAn Gene, Guangzhou, China)로 20 ng/μL로 희석하여 사용하였다. PCR 반응액은 2 μL template DNA, 1 μL의 각 forward와 reverse

primer (5 pmol), 10  $\mu$ L 2  $\times$  i-Taq Master Mix (Intron biotechnology, Seongnam, Korea), 그리고 6  $\mu$ L 증류수로 제조하였다. PCR 반응은 95 ° C에서 3분, 그다음 95 ° C에서 30초, 58 ° C에서 30초, 72 ° C에서 30초를 35반복하고, 마지막으로 72 ° C에서 20분 동안 반응시켰다. PCR 산물의 크기는 단편분석기 (Fragment Analyzer™ Automated CE System, Advanced Analytical Technologies, Ankeny, USA)로 분석하였다. 증폭된 SSR의 크기를 바탕으로 Power Marker V 3.25.를 이용하여 Major allele frequency (M<sub>AF</sub>), number of genotypes (N<sub>G</sub>), number of alleles (N<sub>A</sub>), observed heterozygosity (H<sub>O</sub>), expected heterozygosity (H<sub>E</sub>), and polymorphic information content (PIC) values를 계산하였다.

#### 나. 연구결과

44개의 SSR marker들은 di-, tri-, tetra-, 그리고 pentanucleotide DNA motif로 구성되어 있었다. SSR motif는 59.09%가 dinucleotide repeat, 31.82%가 trinucleotide repeat, 6.82%가 tetranucleotide repeat, 그리고 2.27%가 pentanucleotide repeat로 구성되어 있다. SSR motif중 dinucleotide repeat는 AG/GA, CT/TC, AT/TA, AC/CA, CG/GC, TG, trinucleotide repeat는 AGG/AGA/GGA, CAG/CGA/GCA, AGA, GAT, GCT, GTT, TCA, TCG, tetranucleotide repeat는 TACT/TATC, CTTT, 그리고 pentanucleotide repeat는 CTTCC이었다.

44 SSR marker들을 23개의 표고 품종으로 분석하였다. major allele frequency(M<sub>AF</sub>)는 0.13 ~ 0.94, 평균 0.575. number of genotypes(N<sub>G</sub>)는 2 ~ 11, 평균 5.5, number of alleles(N<sub>A</sub>)는 2 ~ 11, 평균 4.9. observed heterozygosity(H<sub>O</sub>)는 0.00 ~ 1.00, 평균 0.309, expected heterozygosity(H<sub>E</sub>), 0.10 ~ 0.90, 평균 0.552, polymorphic information content(PIC) 값은 0.10 ~ 0.89, 평균 0.511 이었다.

목이버섯(*Auricularia auricular-judae*) 품종 구분을 위하여 개발된 SSR marker는 PIC 값은 0.10 ~ 0.84, 평균 0.47, N<sub>A</sub> 는 2 ~ 11, 평균 4.7 (17개 SSR marker와 품종 16종을 사용)(Zhang *et al.*, 2014), 양송이(*Agaricus bisporus*) 품종 구분 SSR마커는 allele frequency가 0.02 ~ 0.94, 평균 0.18, H<sub>O</sub> 가 0.00 ~ 0.83, 평균 0.35 (33개 SSR marker와, 양송이 품종 6종, 야생형 17종, 그리고 *A. bisporus* var. *burnettii* 야생형 2종 사용)(Foulongne-Oriol *et al.*, 2009). 팽이버섯(*Flammulina velutipes*) 품종구분을 위하여 개발된 SSR marker는 PIC 값이 0.13 ~ 0.69, 평균 0.42 (55개 SSR marker와 품종 14종 사용)(Zhang *et al.*, 2010). 느타리(*Pleurotus ostreatus*) 품종구분을 위하여 개발된 SSR marker는 N<sub>A</sub> 평균이 약 4.7. H<sub>O</sub>는 0.027 ~ 0.946, 평균 0.398, H<sub>E</sub>는 0.027 ~ 0.810, 평균 0.549 (36개 SSR marker와 여름느타리(*P. sajor - caju*) 2품종, 그리고 새송이(*P. eryngii*), 노랑느타리(*P. cornucopiae* var. *citrinopileatus*), 백령느타리(*P. nebrodensis*) 각 1품종을 포함하는 37개의 느타리 품종을 사용)(Ma *et al.*, 2009). 이번에 개발된 표고 품종 구분을 위한 SSR marker들은 다른 식용버섯을 위하여 개발된 SSR marker와 유사하였고, PIC 값이 0.6 이상인 20개의 SSR marker는 표고 품종의 식별에 유용할 것으로 판단된다.

표 1-18. 표고 품종 구분을 위하여 개발된 SSR marker의 특징

Marker	Primer sequences (5'-3')	Expected size	Motif	GenBank AccessionNo.	Ta (° C)	Description
RL-LE-017	F:GTGCACTGTGCGATTGTTC R:CAGCAAGGATGACTCTTGGA	199	CA	NM-0418-000001	59	Subtilase family(PF00082), Pro-kumamolisin, activation domain(PF09236) [Source:Pfam]
RL-LE-018	F:CCCACAGGTTTACAGAGTTCCT R:GTGGACATCCACCTTTTGTCT	152	TA	NM-0418-000002	59	-

Marker	Primer sequences (5'-3')	Expected size	Motif	GenBank AccessionNo.	Ta (° C)	Description
RL-LE-019	F:TACTTTTGAAGCCAGCCA R:GTAGCTCTTAGGCTCGTTGG	191	CTTCC	NM-0418-000003	58	-
RL-LE-020	F:GACGGAGTTGTCAAGATCTACC R:ACCTAGGCTTTGTCTACACAG	173	AT	NM-0418-000004	58	-
RL-LE-021	F:GCTTGAAGAGCGAGTTTGG R:CAAGACACGCTTCGTAGTCA	200	AG	NM-0418-000005	58	Uso1 / p115 like vesicle tethering protein, head region(PF04869) [Source:Pfam]
RL-LE-022	F:CAAACGAAGGAGGAGGTAGTTC R:GAGTCCATTACTCATCGTCTG	199	GCA	NM-0418-000006	60	-
RL-LE-023	F:GAGGTAGCACCAGTTGAGGTAA R:ATAAGACTTGTCTCGTCTGC	150	AGA	NM-0418-000007	59	-
RL-LE-024	F:GTAAGGCTTTAGGACTCGTGG R:CCACAGATGTTTCCGAGTTG	187	TC	NM-0418-000008	59	-
RL-LE-025	F:TTGGGAGATGCGAGTAGTTC R:ATTCAGTCGCTCAGTAGGAGAC	200	AT	NM-0418-000009	58	PCI domain(PF01399), 26S proteasome subunit RPN7(PF10602) [Source:Pfam]
RL-LE-026	F:GATTTGACGCTCACATCCC R:CCCCTAAGTATGAGCTTCCGTA	197	AG	NM-0418-000010	59	-
RL-LE-027	F:GGGTACAAGAGCAATGTAGAC R:CTGTATGGTATCAAGGACGAG	192	CT	NM-0418-000011	59	-
RL-LE-028	F:GAGACGACACGAGGAATTTG R:GTCGTTCTCATTGGAGACTCTG	174	CA	NM-0418-000012	59	Ras family(PF00071) [Source:Pfam]
RL-LE-029	F:CAAGATCCGTCGGCCATATAC R:AACCTACCCTCGTCTACCTCTAC	178	GGA	NM-0418-000013	58	-
RL-LE-030	F:CTTGGAAAGGAGGAATGG R:GTGGGACCAATATGAGGACAGT	164	TACT	NM-0418-000014	59	-
RL-LE-031	F:ACTTCAGTTACAGCGACTCTGC R:GTCGGAGACTGTGCGTTTC	194	CAG	NM-0418-000015	58	PAS domain(PF13426), PAS domain(PF14598) [Source:Pfam]
RL-LE-032	F:GTAGAAGGTGCACCAGTTTCTG R:CGTCTCTTACCAGGAATCACAC	190	AGG	NM-0418-000016	59	-
RL-LE-033	F:GACAGAAGAAGACTTACCAGC R:CCAGAGCCCAAGGATAACTT	197	CT	NM-0418-000017	58	-
RL-LE-034	F:AGGTGGAGTTGAGTGTGTTGAGG R:AGTCTCAGGAGACCTCACTAGC	170	TA	NM-0418-000018	59	-
RL-LE-035	F:GTCGGAAGCTTTATGACACG R:TCAACTTCTGCTCCCTCAC	196	GAG	NM-0418-000019	58	-
RL-LE-036	F:TCTAGCTCGGTGAGCAATGT R:GAGACCTTGAGGAAGAGACTCC	181	CG	NM-0418-000020	59	-
RL-LE-037	F:CTCTCATCCTTAAGAACCCTCC R:GAGAAAGCTTACATATGGTCCCG	198	CGA	NM-0418-000021	59	-
RL-LE-038	F:CGTTTGAGTGTCAACGGTCT R:CATGTACAGACTAGTCAGGGGTC	199	AT	NM-0418-000022	59	-
RL-LE-039	F:GTACGAGGACAGCAATACAGC R:GCTTCTATATCTCTCTGCCCT	200	GA	NM-0418-000023	58	-
RL-LE-040	F:GGTTTCCTCTCACACCTTACCT R:GAAAATGTGCTGTAGCGAGC	178	CT	NM-0418-000024	59	-
RL-LE-041	F:GGTGATAAAGAGAGCCCTTGG R:CCCCTTATCCAGTCTACTGCTAC	153	AG	NM-0418-000025	59	SNF2 family N-terminal domain(PF00176), Ring finger domain(PF13639) [Source:Pfam]
RL-LE-042	F:TCCTCTGCTTCACTAAGTCTCC R:AGTACTCGCAAGGCAGGTAAG	167	TCG	NM-0418-000026	58	STAG domain(PF08514) [Source:Pfam]
RL-LE-043	F:GTTCTGCTACTCGGTACTTTCC R:AGATGCAGGAGTATGACCTGAC	177	AC	NM-0418-000027	58	-
RL-LE-044	F:GTAAGCCTAAGGAGGGTGGAG R:CACCTCCTTCACTGTGGTCC	198	GGA	NM-0418-000028	59	WH1 domain(PF00568), P21-Rho-binding domain(PF00786) [Source:Pfam]
RL-LE-045	F:ACATCTGAGAGGTCTGACGCT R:GTACCGAAGCGAGCAAGTT	164	CA	NM-0418-000029	59	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain(PF00173), Acyl-CoA dehydrogenase, C-terminal domain(PF00441) [Source:Pfam]
RL-LE-046	F:GCACGCAGTGAATAGAGAG R:ACACTTACGGATTTGGCAGG	154	AG	NM-0418-000030	60	Cytochrome P450(PF00067) [Source:Pfam]
RL-LE-047	F:CTACCACTCGTCACTCCTTAGGT R:GAAGGAGTGTGAAGCTGAAACC	194	TC	NM-0418-000031	60	-
RL-LE-048	F:GTGGTGAAGTTACCGACAGG R:AGGTGCCCAACTTCTGGT	197	GC	NM-0418-000032	58	Pectate lyase(PF00544) [Source:Pfam]
RL-LE-049	F:GCTACCTAGATCCTCCTAGATCG R:GACTACGTCAGTTGAGGATGC	184	GA	NM-0418-000033	58	-
RL-LE-050	F:TACCGAAGGAACTAACGAGTC R:GTCGTCGTATAACGACTCATCC	200	TG	NM-0418-000034	59	-
RL-LE-051	F:ACTCTGCTGCCACTCTTGAC R:GACCGTCTCTAGCTTCTTGATG	172	CT	NM-0418-000035	58	short chain dehydrogenase(PF00106) [Source:Pfam]
RL-LE-052	F:CTAAGCAACGGTAGAGCTAGG R:ACAACAAACGCTAGAGCGAG	178	GCT	NM-0418-000036	58	-
RL-LE-053	F:CTCAACGTCCTATTCCCTTC R:CTCGAGTTGAGGGTGAGGTTAT	179	GTT	NM-0418-000037	58	-
RL-LE-054	F:GAATCAGCTAGACCATCTCTGC R:TCTTTACCCGCTTGTCTGCG	200	GAT	NM-0418-000038	58	-

Marker	Primer sequences (5'-3')	Expected size	Motif	GenBank AccessionNo.	Ta (° C)	Description
RL-LE-055	F:CTGGGGATAGTGATATCGAGAG R:GTAAACCCGCTCCTTTGTGT	165	CTTT	NM-0418-000039	58	-
RL-LE-056	F:GCGGTCCTGACTACAAAGTAGT R:CTACGTACGGAGGAATCTAGTGC	159	TATC	NM-0418-000040	58	-
RL-LE-057	F:AGGAGAACGGAACCGAAGTTAC R:CAGTAGACGTTGCTTACTGCAC	160	AT	NM-0418-000041	59	Protein of unknown function DUF262(PF03235) [Source:Pfam]
RL-LE-058	F:GTCGTAGAACTTGCACGAGTC R:GAAGTTCTCCGCTATCCTCTC	163	GCA	NM-0418-000042	57	-
RL-LE-059	F:CGGAGATGTACCAATTCCTG R:GCATTCCGCGTCTATACGAT	193	TG	NM-0418-000043	59	-
RL-LE-060	F:ACTCAGCGCACATCTAGCTT R:CAGGGAGAAGAAAGTCACGA	191	TCA	NM-0418-000044	58	-

표 1-19. 23종의 표고 품종의 구분을 위하여 사용된 각 primer의 다양성

Marker	$M_{AF}$	$N_G$	$N_A$	$H_O$	$H_E$	$PIC$
RL-LE-017	0.13	11	11	0.00	0.9	0.89
RL-LE-018	0.29	6	6	0.08	0.77	0.74
RL-LE-019	0.41	7	5	0.87	0.68	0.63
RL-LE-020	0.67	3	3	0.00	0.5	0.45
RL-LE-021	0.52	11	10	0.43	0.68	0.66
RL-LE-022	0.70	5	4	0.04	0.48	0.45
RL-LE-023	0.63	6	5	0.09	0.55	0.51
RL-LE-024	0.80	4	4	0.13	0.33	0.31
RL-LE-025	0.43	7	6	0.64	0.72	0.68
RL-LE-026	0.34	9	6	0.68	0.74	0.69
RL-LE-027	0.50	5	5	0.26	0.64	0.58
RL-LE-028	0.37	6	4	0.35	0.73	0.68
RL-LE-029	0.81	3	3	0.00	0.32	0.29
RL-LE-030	0.65	4	3	0.26	0.51	0.46
RL-LE-031	0.46	4	6	1.00	0.68	0.63
RL-LE-032	0.87	3	4	0.22	0.24	0.22
RL-LE-033	0.46	10	9	0.48	0.72	0.69
RL-LE-034	0.50	6	6	0.22	0.68	0.64
RL-LE-035	0.65	5	5	0.17	0.52	0.47
RL-LE-036	0.72	3	3	0.04	0.42	0.35
RL-LE-037	0.50	6	4	0.39	0.62	0.55
RL-LE-038	0.39	7	9	1.00	0.72	0.68
RL-LE-039	0.50	3	3	0.13	0.56	0.46
RL-LE-040	0.52	6	5	0.52	0.66	0.61
RL-LE-041	0.43	4	5	0.09	0.65	0.58
RL-LE-042	0.80	4	3	0.04	0.33	0.3
RL-LE-043	0.87	2	2	0.00	0.23	0.2
RL-LE-044	0.76	3	3	0.42	0.37	0.32
RL-LE-045	0.39	6	5	0.35	0.73	0.69
RL-LE-046	0.43	7	6	0.09	0.71	0.66
RL-LE-047	0.48	10	6	0.35	0.69	0.65
RL-LE-048	0.43	8	5	0.39	0.7	0.66
RL-LE-049	0.41	4	5	1.00	0.66	0.6
RL-LE-050	0.94	2	2	0.00	0.1	0.1
RL-LE-051	0.28	9	6	0.65	0.79	0.76
RL-LE-052	0.70	5	5	0.09	0.47	0.43
RL-LE-053	0.39	10	10	0.61	0.79	0.77
RL-LE-054	0.76	5	3	0.09	0.39	0.36
RL-LE-055	0.72	4	4	0.13	0.44	0.38

Marker	$M_{AF}$	$N_G$	$N_A$	$H_O$	$H_E$	$PIC$
RL-LE-056	0.59	5	4	0.68	0.58	0.53
RL-LE-057	0.87	3	3	0.09	0.23	0.22
RL-LE-058	0.93	3	3	0.04	0.12	0.12
RL-LE-059	0.35	6	5	0.30	0.74	0.69
RL-LE-060	0.91	2	2	0.17	0.16	0.15
Mean	0.575	5.5	4.9	0.309	0.552	0.511

$M_{AF}$ : major allele frequency,  $N_G$ : number of genotypes,  $N_A$ : number of alleles,  $H_O$ : observed heterozygosity,  $H_E$ : expected heterozygosity,  $PIC$ : polymorphic information content

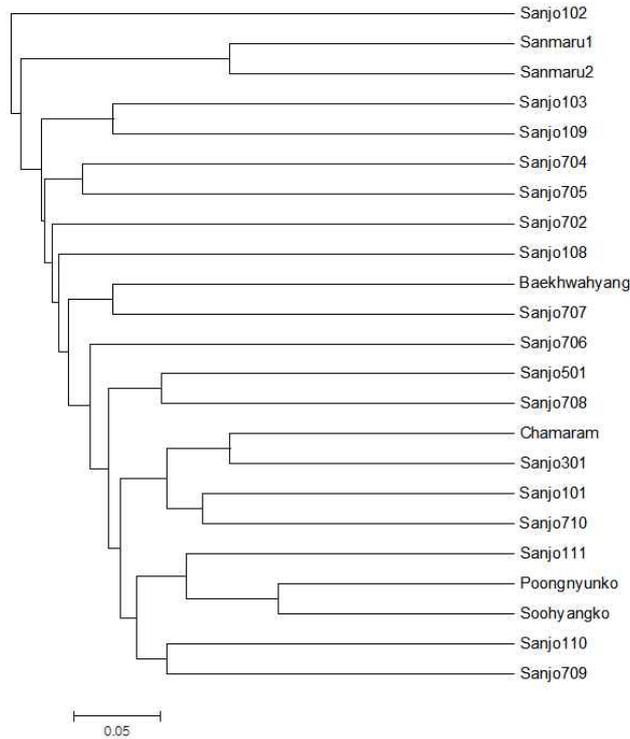


그림 1-26. 개발된 44개의 marker를 이용하여 구분된 23개 품종

- 스트레스 내성 관련 유전자들의 대량 발굴을 위한 microarray 및 RNA-seq 분석 데이터를 이용한 네트워크 분석 플랫폼 개발이 완료됨 (J. Plant Biotechnology 43: 347~358)
- 호르몬 브라시노스테로이드 신호전달 네트워크 관련 리뷰를 통해 유전자들의 기능연구에 대한 연구를 통해 최근 진행된 표고버섯 유전체 정보를 이용할 수 있는 가능성을 제시함 (광과학 세계, 54호)

<제 2세부> 느타리류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

2세부과제	<p>&lt;제2세부&gt; 느타리류의 유전체 기반 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발</p>
	<p>1. 느타리류의 유전체 정보 획득을 위한 형질별 유전집단 작성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 수량, 품질 : 애린이3 수량 130g, 품질 7.5 KNR2503 수량 30g, 품질 3.0</li> <li>- 갓색 : 애린이의 갓색 명도(L) 50, 애린이3 갓색 명도 80, 흑타리 갓색 명도 45, 미소 갓색명도 80</li> <li>- 갓형 : 계통A 갓두께 3.2 cm, KNR2502 갓두께 1.5</li> <li>- 내재해성 : 저온성/ 중온성/ 고온성 품종별 분리집단 작성</li> <li>- 내병성 : 푸른곰팡이 저항성 계통별 분리집단 작성</li> </ul> <p>2. NGS 기반 염기서열 분석을 이용한 목표형질 관련 유전자 분자마커 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- NGS기반 re-sequencing으로 형질계통과 대립계통내의 InDel, SNP 발굴</li> <li>- 목표유전자의 SNP, InDel을 분석하여 주요형질, 내병성, 내재해성 형질과 관련성 분석하여 분자마커 개발</li> <li>- NGS data기반 느타리 신품종 판별 가능한 마커 개발</li> </ul> <p>3. 전사체와 QTL 정보를 이용하여 농업적 중요 형질 분자마커 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 수량, 품질, 갓색, 갓형, 내병성, 내재해성 형질관련 발현 유전자 비교전사체</li> <li>- 수량, 품질, 갓색, 갓형, 내병성, 내재해성 형질 QTL mapping 분자마커 개발</li> <li>- 목표 형질의 유전양상을 토대로 하여 전사체, 유전체, QTL정보, 목표유전자 통합 분석으로 유망 후보 형질유전자 선별</li> <li>- 형질과 SNP, InDel의 연관성을 분석하여 고효율 분자마커 개발</li> </ul>

가. 큰느타리버섯의 유용형질마커 개발

(1) 유전형 분석 및 연관집단분석

큰느타리(새송이)버섯의 형질마커를 개발하기 위하여 먼저 형질별 분리집단을 작성하였다. 이를 위하여 KNR2312계통에서 유래한 100개의 단핵군사집단을 이용하였다. SSR, InDel 프라이머를 디자인하기 위하여 KNR2312의 원형질체를 분리하여 단핵군사를 만들었다. 그중 KNR2312P5을 GS-flx, Hi-seq방법으로 유전체 서열 분석하여 scaffolding하였고, KNR2312P6는 Hi-seq 방법으로 P5 유전체를 reference로 하여 re-sequencing하였다(그림 2-1). 단핵군사 100개(Pm1)의 gDNA를 추출하여 P5를 바탕으로 디자인한 SSR 프라이머와 P6를 바탕으로 디자인한 InDel 프라이머로 유전형 분석을 실시하여 JoinMap 프로그램으로 linkage grouping하였다. 이후 KNR2532-3, 8, 14, 15와 Pm1과의 교배로 4개의 이핵분리집단을 구성하여 표현형 분석을 실시하고 이를 바탕으로 연관집단 정보와 함께 QTL 분석을 수행하였다.

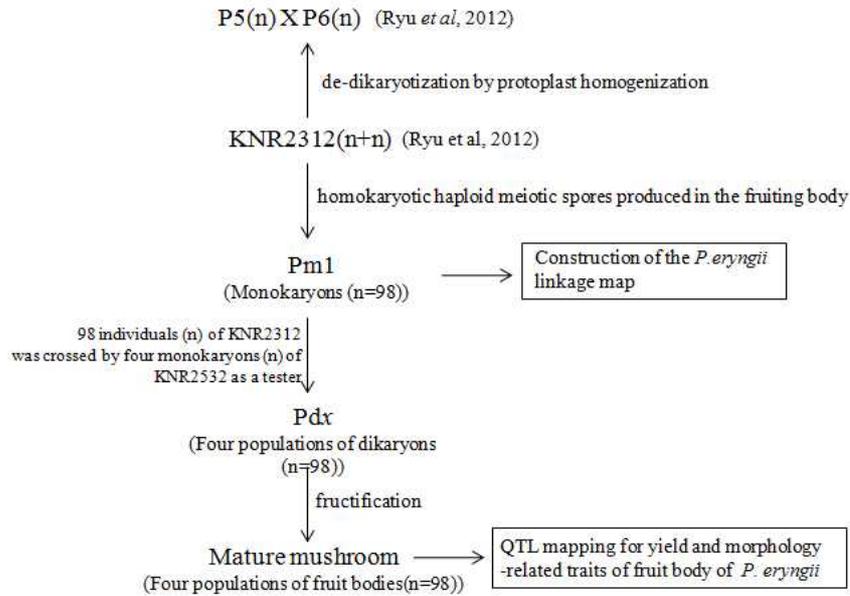


그림 2-1. 분리집단의 구축방법과 QTL 분석을 위한 유전지도 구성 모식도

큰느타리(새송이)의 형질별 분리집단을 작성할때와 자실체 관련 형질의 phenotyping에 사용한 모균주는 KNR2312와 KNR2532인데 이들의 생육특성을 표 2-1에 나타내었다. 두 균주의 mating type locus인 A, B loci의 교배형은 서로 달라서 어느 조합이든지 교배가 일어났다. KNR2312는 버섯에서 중요한 거의 모든 형질에서 KNR2532를 능가하였다. 수확량은 KNR2312가 79.6g(650cc 기준)이었고, KNR2532는 51.8g으로 153% 높았고, 품질도 KNR2312가 7.2인데 반해 KNR2532는 4.8로 대조적인 형질을 보였다. 조기수확성은 KNR2532가 16.3으로 KNR2312보다 1.8일 빨랐다(표 2-1).

표 2-1. 두 개의 어버이 계통의 표현형질의 특징 (KNR2312 and KNR2532).

Trait	Code	KNR2312			KNR2532		
		Mean(SD)	[Min-max]	CV(%)	Mean (SD)	[Min-max]	CV(%)
<b>Yield-related trait</b>							
Yield (g)	Y	79.6(11.6)	[64.0-99.0]	14.5	51.8 (10.28)	[40.0-65.0]	19.9
Earliness (day)	E	18.1 (0.4)	[18.0-19.0]	2.0	16.3 (0.50)	[16.0-17.0]	3.0
Period of spawn running (day)	S	47.4 (3.6)	[43.0-52.0]	7.7	26.3 (1.26)	[25.0-38.0]	4.8
Period of pin-heading (day)	P	7.4 (0.91)	[6.0-9.0]	12.3	7.5 (0.58)	[7.0-8.0]	7.7
<b>Morphology-related trait</b>							
Length (mm)	L	115.4 (5.4)	[107.0-125.0]	4.7	104.5(4.80)	[100.0-110.0]	4.6
Quality (1-9) <sup>a</sup>	Q	7.2 (0.7)	[6.0-8.0]	9.4	4.8 (0.96)	[3.5-5.5]	20.2
Stipe thickness (mm)	T	30.5 (3.2)	[27.0-35.0]	10.5	25.5 (2.38)	[22.0-27.0]	9.3
Pileus diameter (mm)	D	56.8 (6.0)	[49.0-54.0]	10.6	57.8 (9.57)	[47.0-70.0]	16.6
Cap color (LogitL)	C	0.14 (0.02)	[0.12-0.18]	14.3	0.16 (0.07)	[0.07-0.28]	41.9

<sup>a</sup> 9-point rating scale (1: bad to 9: good; Ryu *et al.*, 2006).

SSR locator를 이용하여 큰느타리버섯 KNR2312P5의 유전체에서 유래하는 SSR의 분포를 분석하여 표 2-2에 나타내었다. 반복형태는 Trinucleotide가 전체의 21%를 차지하여 가장 많은 빈도수를 보였고, hexanucleotide가 110개로 그다음을 차지하였다(표 2-2). Primer 3 프로그램을 이용하여 SSR을 증폭할 수 있는 프라이머를 디자인하였다. 이들 프라이머와 Resequencing한 데이터를 이용하여 InDel 프라이머를 디자인 하였다.

표 2-2. 큰노타리 유전체 유래 SSR의 크기별 분포

Type of repeat	Number of locus	Frequency
Mononucleotide	17	3%
Dinucleotide	41	8%
Trinucleotide	195	37%
Tetranucleotide	31	6%
Pentanucleotide	76	15%
Hexanucleotide	110	21%
Heptanucleotide	39	7%
Compound type	14	3%
Total	523	100%

KNR2312에서 유래한 단핵군사 100개를 이용하여 SSR 프라이머 430여개와 InDel 프라이머 50여개를 사용하여 유전형 분석을 실시하였다. 각 다형성이 관찰된 SSR 프라이머는 이론적으로  $\chi^2$  테스트에서 분리비가 1:1로 나와야 한다. 이전에 보고되었던 자료에 따르면 버섯균의 마커에 대한 분리비는 상당부분 이것에 따르지 않는 것으로 나타났는데, 본 실험의 마커들은 상당부분 1:1 분리비를 보였다. 단지 23개(8.9%;  $0.001 \leq P < 0.05$ )의 마커가 1:1의 분리비가 나타나지 않았고 6개(2.0%;  $P < 0.001$ )의 마커가 심각하게 1:1분리비가 나타나지 않았다(data not shown). 최종적으로 285개의 프라이머가 98개 단핵군사의 gDNA에서 다형성(polymorphism)을 보였는데, 이 중 174개(39%)가 공우성(codominant), 111개(25%)가 우성(dominant) 마커로 나타났다.

유전형분석 데이터를 Joinmap 프로그램으로 linkage grouping한 결과 총 14개의 그룹이 형성되었다. 이 중 2개의 경우 말단의 InDel 프라이머를 더 추가하여 본 결과 같은 그룹으로 판정되어 최종적으로는 12개의 그룹이 형성되었다(표 2-3). 각 그룹에 속하는 프라이머의 숫자는 LG1에 38개로 가장 많았고, LG9에 28, LG4, 5에 27개였다. 각 그룹에 형성된 마커의 구성은 226 SSR, 28 InDel, 2 mating type 마커였다. 총 1048.1 cM의 길이를 보였고, 평균적으로는 87.3 cM이었다. LG1이 130 cM으로 가장 길었고 다음이 121.9 cM의 LG5였다. LG12는 55.5 cM으로 가장 짧았고, 마커의 수도 7개로 가장 적었다.

표 2-3. 큰느타리 genetic map에서의 LG별 마커의 분포특성

Linkage group	Length (cM)	No. of markers <sup>a</sup>	Average marker interval (cM)
LG 1	130.0	38	3.42
LG 2	91.4	18	5.08
LG 3	88.4	24	3.68
LG 4	83.0	27	3.07
LG 5	121.9	27	4.51
LG 6	106.9	24	4.45
LG 7	76.8	17	4.52
LG 8	68.0	17	4.00
LG 9	63.3	28	2.26
LG 10	92.2	20	4.61
LG 11	70.7	9	7.86
LG 12	55.5	7	7.93
Ave	87.3	21.3	4.09
Total	1,048.1	256	

<sup>a</sup> 226 SSR markers, 28 InDel markers and 2 mating types.

(2) 표현형질분석과 연관집단을 이용한 QTL 분석

KNR2312로부터 유래한 KNR2312P5와 -P6 단핵균사의 특성을 파악하기 위하여 testers와 교배를 실시하여 생육특성을 조사하여 표 2-4에 나타냈었다. P6를 공통으로 가진 계통들의 무게, 품질, 대두께, 갓직경이 더 우수하였다. 반면 P5을 공통으로 가진 계통은 배양완료일, 발이 소요일과 생육소요일이 빨랐다.

표 2-4. KNR2312 구성 단핵 KNR2312P5와 -P6와 표현형질 확인 tester와의 교배계 생육특성

Trait	Co de	KNR2312P5*KNR2532-8			KNR2312P5*KNR2532-14			KNR2312P5*KNR2532-15		
		Mean (SD)	[Min-max ]	CV (%)	Mean (SD)	[Min-m ax]	CV (%)	Mean (SD)	[Min-max]	CV (%)
<b>Yield-related trait</b>										
Yield (g)	Y	31.5 (4.2)	[28.0-40.0 ]	13.3	42 (14.6)	[26.0-71. 0]	34. 8	49.1 (14.9)	[28.0-66.4]	29.7
Earliness (day)	E	15.0 (0.0)	[1.05-15.0 ]	0.0	15.8 (1.0)	[15.0-17. 0]	6.6	16.1 (0.8)	[15.0-17.0]	5.2
Period of spawn running (day)	S	27.8 (0.7)	[27.0-29.0 ]	2.5	27.0 (0.0)	[27.0-27. 0]	0.0	27.4 (2.7)	[27.0-29.0]	2.7
Period of pin-heading (day)	P	8.9 (0.4)	[8.0-9.0]	4.0	8.1 (0.4)	[8.0-9.0]	4.4	8.5 (0.5)	[8.0-9.0]	6.3

<b>Morphology-related trait</b>										
Length (mm)	L	73.1 (4.4)	[67.0-81.0]	6.0	72.9 (10.0)	[60.0-90.0]	13.7	79.6 (10.0)	[68.9-94.0]	12.6
Quality (1-9) <sup>a</sup>	Q	2.2 (0.5)	[1.3-2.7]	21.4	3.5 (0.9)	[2.3-5.3]	26.8	4.0 (0.8)	[2.8-4.9]	14.5
Stipe thickness (mm)	T	24.6 (2.9)	[22.0-31.0]	11.9	26.0 (2.5)	[22.0-30.0]	9.6	26.4 (4.7)	[23.0-37.0]	17.7
Pileus diameter (mm)	D	36.9 (3.5)	[30.0-41.0]	9.6	53.8 (12.9)	[2.0-77.0]	24.0	40.4 (6.2)	[30.6-48.1]	15.3
Cap color (LogitL)	C	0.10 (0.01)	[0.09-0.11]	11.8	-0.03 (0.00)	[-0.03-0.03]	0.0	0.02 (0.02)	[0.00-0.02]	120.0
Trait	Code	KNR2312P6*KNR2532-8			KNR2312P6*KNR2532-14			KNR2312P6*KNR2532-15		
		Mean (SD)	[Min-max]	CV (%)	Mean (SD)	[Min-max]	CV (%)	Mean (SD)	[Min-max]	CV (%)
<b>Yield-related trait</b>										
Yield (g)	Y	41.0 (7.1)	[31.0-51.0]	17.4	56.3 (6.3)	[46.0-66.0]	11.2	53.0 (6.7)	[39.0-60.0]	12.6
Earliness (day)	E	20.0 (1.1)	[19.0-21.0]	5.3	17.9 (0.6)	[17.0-19.0]	3.6	22.4 (0.7)	[21.0-23.0]	3.3
Period of spawn running (day)	S	32.8 (1.2)	[30.0-34.0]	3.6	28.9 (0.4)	[28.0-29.0]	1.2	33.6 (0.7)	[33.0-35.0]	2.2
Period of pin-heading (day)	P	9.0 (0.0)	[9.0-9.0]	0.0	10.5 (0.8)	[9.0-11.0]	7.2	10.5 (0.8)	[9.0-11.0]	7.2
<b>Morphology-related trait</b>										
Length (mm)	L	73.9 (4.9)	[69.0-84.0]	6.7	73.8 (4.7)	[67.0-81.0]	6.4	80.1 (6.6)	[68.0-87.0]	8.3
Quality (1-9) <sup>a</sup>	Q	3.3 (0.7)	[2.2-4.3]	22.5	4.1 (0.6)	[3.4-4.9]	14.0	4.3 (0.8)	[2.9-5.3]	12.6
Stipe thickness (mm)	T	30.1 (3.0)	[25.0-34.0]	9.9	34.6 (3.8)	[29.0-41.0]	11.0	34.9 (3.5)	[30.0-41.0]	10.0
Pileus diameter (mm)	D	43.8 (4.7)	[38.0-50.0]	10.8	55.9 (7.2)	[41.0-63.0]	12.0	43.4 (7.0)	[34.0-52.0]	16.3
Cap color (LogitL)	C	0.38 (0.03)	[0.36-0.40]	8.7	0.11 (0.01)	[0.11-0.12]	4.8	0.27 (0.00)	[0.26-0.27]	1.57

단핵균사의 표현형을 조사하여야 하는데, 단핵균사만으로는 자실체의 특징을 알지 못하므로 유전적으로 충분히 떨어져서 단핵균사 100개 모두와 교배가 되는 KNR2532유래 단핵균사를 이용하여 교배한 뒤 자실체를 발생시켜서 생육특성을 조사하였다. KNR2532-3, 8, 14, 15를 tester로 사용하여 이핵균사 그룹을 작성하여 Pd, Pd8, Pd14, Pd15로 명명하였다.

수확시기에 따라서 큰느타리버섯은 전체적으로 갓직경이 커지고 갓색이 연해지는 특성이 있어 수확기의 일률적인 조사시점의 설정이 필요하다. 모든 집단이 대두계와 갓직경의 비율은 약 1.4로 비슷하였으며, 이는 유통되고 있는 큰느타리버섯의 비율과 비슷한 수준으로 수확시기의 결정이 잘 되었음을 알 수 있었다(그림 2-2).

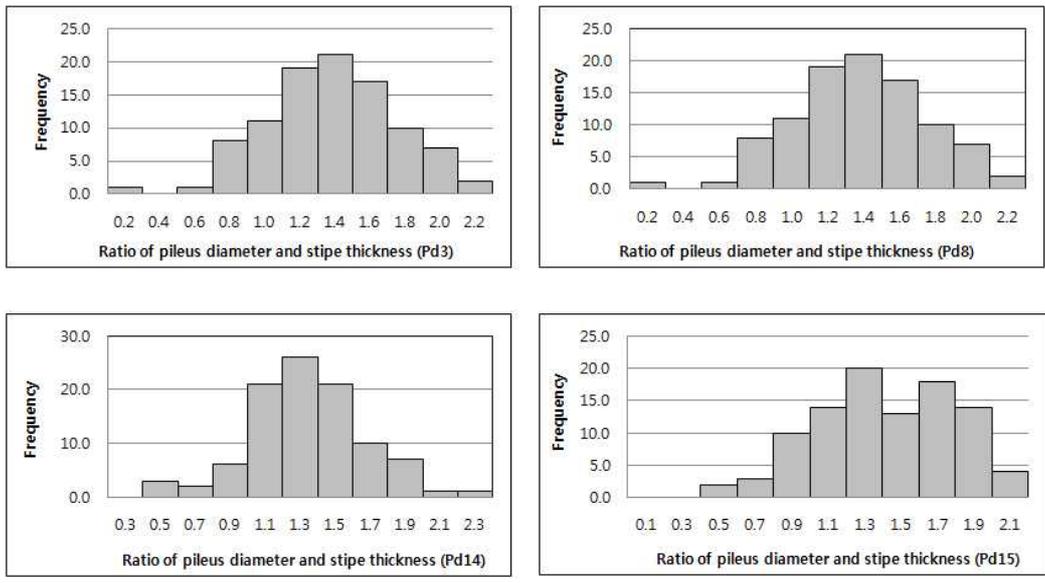


그림 2-2. 각 분리집단의 갓직경과 대두께의 비율

반복이 3번이라는 제한이 있지만, 모든 형질의 변수는 일관성을 보였기(그림 2-3) 때문에 각 집단내의 형질별 3반복간의 변이계수(CV)는 통계분석에 충분한 데이터로 판단된다.

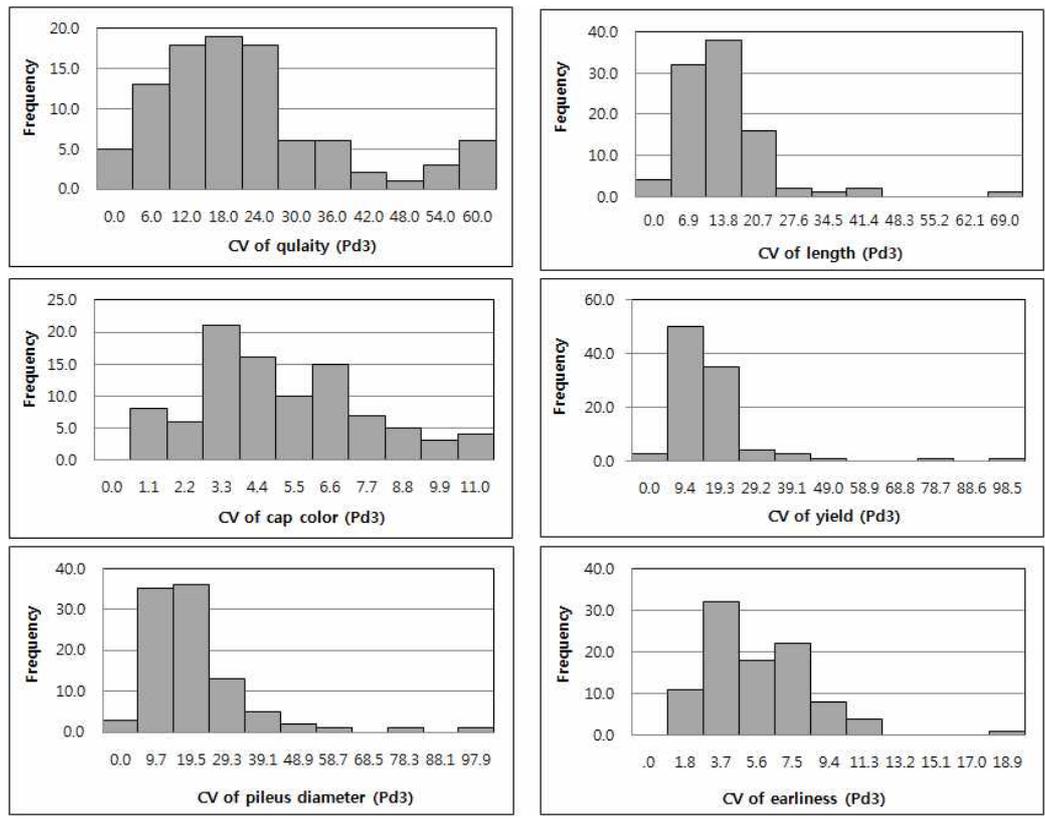


그림 2-3. Pd3 집단의 형질별 변이계수(CV)

4개 집단의 형질이 연속적인 변이와 정규분포 특징을 보여서 각 형질이 QTL에 의해 조절된다는 것을 알 수 있었으며(그림 2-4), 통계처리에 있어 별도의 가공공정 없이 바로 데이터를 사용할 수 있었다.

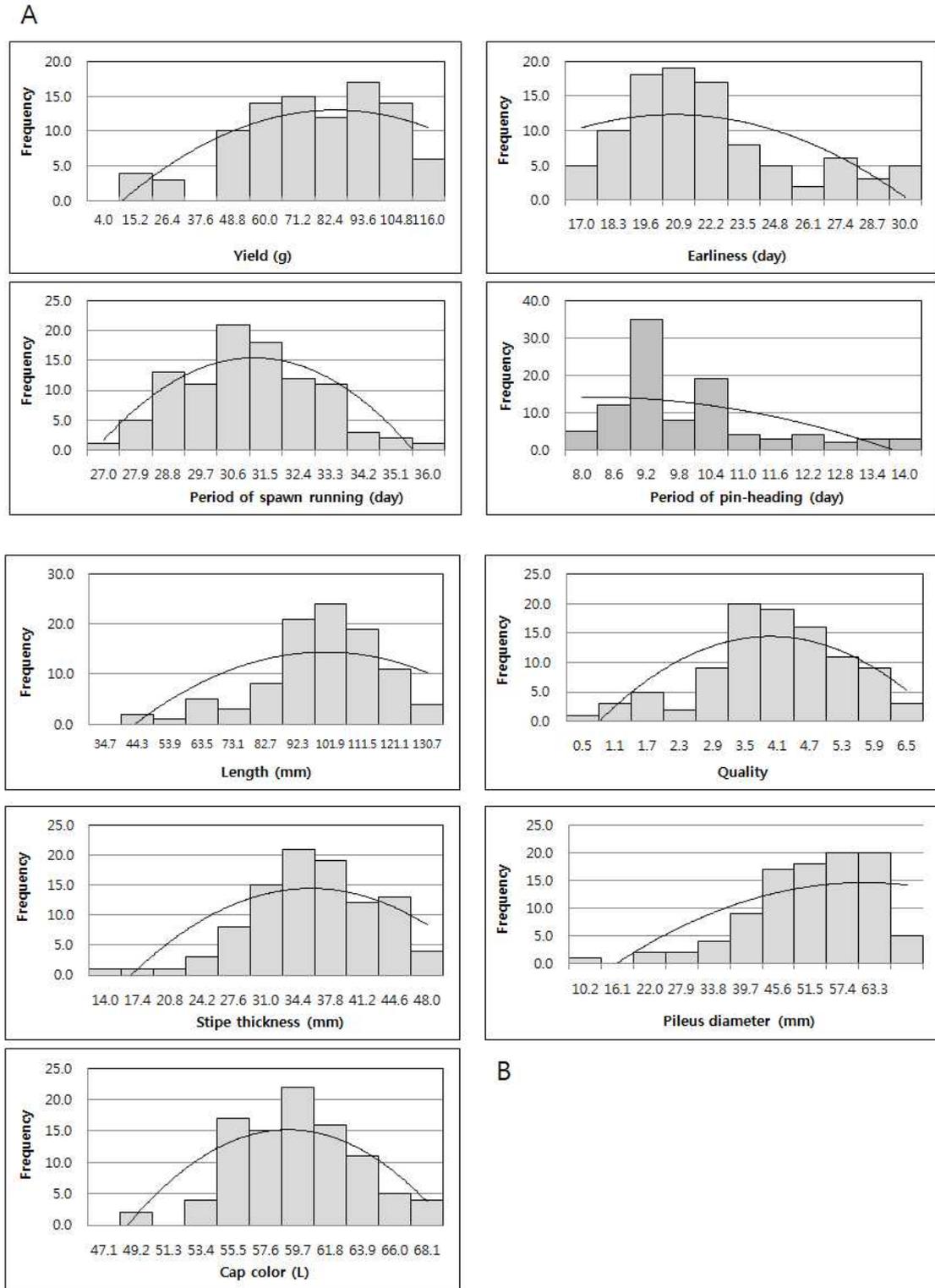


그림 2-4. 형질의 분포히스토그램

통계결과 각 집단(Rep)의 변이계수(CV)가 다르다는 것을 알 수 있는데, 전체적으로 Pd3의 CV가 다른 집단보다 높은 경향이였다(표 2-5). 자실체의 길이나 품질측면에서도 Pd3의 집단평균이 다른 집단에 비해 대체적으로 낮은 편이였다. 이는 Pd3를 구성하는 KNR2532-3 단핵균사가 다른 단핵균사에 비해 우수한 형질을 가지고 있지 않다는 것을 말해주는 것으로 예측할 수 있다. 다만 이렇게 낮은 형질의 단핵균사를 tester로 활용하였을 경우 필요로 하는 단핵균사의 형질을 더 쉽게 평가할 수 있는 장점이 있을 수 있을 것이다.

표 2-5. 이핵분리집단의 표현형 특성

Trait	Pd3				Pd8			
	Code	Mean (SD)	[min-max]	CV (%)	Code	Mean (SD)	[min-max]	CV (%)
<b>Yield-related traits</b>								
Yield (g)	Y3	70.4 (25.45)	[4.5-116.0]	36.2	Y8	79.0 (14.0)	[41.3-120.0]	17.8
Earliness (day)	E3	21.5 (3.36)	[16.7-30.0]	15.7	E8	17.5 (2.1)	[14.3-24.0]	12.0
Period of spawn running (day)	S3	30.6 (1.83)	[27.0-36.0]	5.98	S8	31.7 (2.1)	[27.0-36.0]	6.6
Period of pin-heading (day)	P3	9.6 (1.70)	[8.0-14.0]	17.7	P8	9.1 (1.48)	[7.3-15.0]	16.26
<b>Morphology-related traits</b>								
Length (mm)	L3	94.6 (18.70)	[35.0-130.7]	19.8	L8	101.6 (12.7)	[76.7-134.3]	12.5
Quality	Q3	3.8 (1.28)	[0.5-6.5]	33.7	Q8	4.2 (0.8)	[2.3-6.0]	18.2
Stipe thickness (mm)	T3	34.3 (6.67)	[14.0-48.0]	19.4	T8	31.8 (5.8)	[22.0-50.7]	18.3
Pileus diameter (mm)	D3	43.1 (11.57)	[4.0-63.3]	26.8	D8	53.9 (6.9)	[31.7-69.7]	12.8
Cap color (LogitL)	C3	0.15 (0.07)	[-0.05-0.33]	46.5	C8	0.24 (0.07)	[0.01-0.39]	30.5
Trait	Pd14				Pd15			
	Code	Mean (SD)	[min-max]	CV (%)	Code	Mean (SD)	[min-max]	CV (%)
<b>Yield-related traits</b>								
Yield (g)	Y14	75.8 (15.4)	[35.7-101.3]	20.3	Y15	75.1 (15.2)	[26.5-104.0]	20.2
Earliness (day)	E14	17.0 (1.6)	[11.7-24.0]	9.5	E15	18.3 (2.1)	[15.3-26.3]	11.4
Period of spawn running (day)	S14	30.6 (2.0)	[26.7-36.0]	6.6	S15	31.6 (2.0)	[27.5-36.0]	6.4
Period of pin-heading (day)	P14	8.7 (0.96)	[5.7-13.3]	11.03	P15	9.4 (1.12)	[5.7-13.0]	11.91
<b>Morphology-related traits</b>								
Length (mm)	L14	85.1 (15.0)	[47.7-119.3]	17.6	L15	102.3 (13.8)	[65.5-134.0]	13.5
Quality	Q14	3.5 (0.9)	[1.2-5.5]	26.0	Q15	4.4 (1.0)	[1.5-6.5]	21.6
Stipe thickness (mm)	T14	39.6 (6.5)	[25.7-59.0]	16.4	T15	34.6 (5.7)	[22.0-54.0]	16.6

Pileus diameter (mm)	D14	47.7 (9.4)	[17.7-69.3]	19.8	D15	44.4 (9.9)	[14.3-63.3]	22.2
Cap color (LogitL)	C14	0.15(0.07)	[-0.88-0.36]	47.1	C15	0.20 (0.08)	[0.02-0.39]	38.4

각 집단은 같은 tester로 교배가 되었기 때문에 집단내에 나타나는 변이는 많은 부분에 있어서 각 단핵균사의 genotype에서 유래한다고 볼 수 있다. 이들 tester의 genotype이 각 집단에 영향을 미치는지 분산분석(ANOVA)을 실시한 결과 무게, 생육소요일, 배양완료일, 발이일, 품질, 길이, 갓색 등 조사된 모든 형질에 있어서 고도로 유의하다는 수치가 나왔다(표 2-6). 따라서 이들의 추가적인 통계분석이 가능하였다.

표 2-6. 각 집단에 대한 tester의 영향 분산분석

Trait	F value	Pr(>F)
Yield (g)	3.71	0.0117
Earliness (day)	69.7	2.20E-16
Period of spawn running (day)	8.01	3.48E-05
Period of pin-heading (day)	6.79	0.000179
Length (mm)	26.75	9.58E-15
Quality	17.16	1.76E-10
Stipe thickness (mm)	27.14	5.95E-16
Pileus diameter (mm)	24.78	1.10E-14
Cap color (LogitL)	35.5	2.20E-16

Broad sense heritability는 어버이친으로부터 유전적으로 조절되는 형질이 얼마만큼 후손들에게 전해지는 지 알려주는 지표인데, Pd14와 Pd15의 유전력이 다른 집단에 비해 낮았다(표 2-7). Pd3의 경우 수확량, 조기수확성, 품질, 길이 등의 형질이 상대적으로 높아서 0.59에서 0.83의 수치를 보였다. Pd8의 경우 수확량, 조기 수확성, 갓직경의 경우 0.33에서 0.38로 아주 낮은 수치를 보였다. Pd3, Pd14, Pd15의 갓색의 유전력은 0.60으로 집단에 상관없이 높은 편이었다.

표 2-7. Broad-sense heritability of the yield-related and morphology-related traits.

Population		Pd3			Pd8		
Source of variation		Genotype <sup>b</sup>	Error	$h^2$	Genotype	Error	$h^2$
Yield (Y)	df	96	194	0.68	97	196	0.33
	MS <sup>a</sup>	1963.57	265.57		593.61	238.36	
Earliness (E)	df	97	196	0.83	97	196	0.59
	MS	34.3	2.21		13.32	2.47	
Period of spawn running (S)	df	94	190	0.32	94	190	0.53
	MS	15.81	6.48		13.72	3.17	

Length (L)	df	96	194	0.7	97	196	0.62
	MS	1059.53	131.78		493.56	83.56	
Quality (Q)	df	96	194	0.71	97	196	0.36
	MS	4.97	0.59		1.81	0.67	
Stipe thickness (T)	df	96	194	0.59	97	196	0.5
	MS	133.5	25.15		102.51	25.91	
Pileus diameter (D)	df	96	194	0.66	97	196	0.38
	MS	401.81	58.42		142.28	50.23	
Cap color (C)	df	94	190	0.63	97	196	0.65
	MS	56.49	9.13		44.63	6.76	
Population		Pd14			Pd15		
Source of variation		Genotype	Error	$h^2$	Genotype	Error	$h^2$
Yield (Y)	df	97	196	0.37	97	196	0.44
	MS <sup>a</sup>	714.2	259.19		697.34	207.78	
Earliness (E)	df	97	196	0.45	97	196	0.59
	MS	7.95	2.3		13.18	2.45	
Period of spawn running (S)	df	97	196	0.34	83	168	0.46
	MS	12.54	4.9		12.32	3.48	
Length (L)	df	97	196	0.68	97	196	0.56
	MS	681.34	92.83		577.48	119.31	
Quality (Q)	df	97	196	0.55	97	196	0.51
	MS	2.51	0.53		2.78	0.67	
Stipe thickness (T)	df	97	196	0.4	97	196	0.6
	MS	126.83	42		98.95	18.02	
Pileus diameter (D)	df	97	196	0.53	97	196	0.6
	MS	267.3	60.31		291.9	53.28	
Cap color (C)	df	97	196	0.6	97	196	0.37
	MS	49.83	9.2		61.62	22.57	

<sup>a</sup> MS, mean square. <sup>b</sup>98genotypes were evaluated however some traits were not able to be accessed.

각 형질별 집단별 상관계수를 분석하여 결과를 표 2-8에 나타내었다. 품질, 길이, 수량은 서로 정의 상관을 나타내었는데, 이는 이들 형질을 지배하는 유전자간의 상호작용을 암시한다. 이들 형질은 집단에 상관없이 0.63에서 0.93으로 매우 높은 상관을 보여주었고 통계적으로도 유의하였다( $P < 0.001$ ). 수량과 길이와 조기수확성은 부의 상관관계를 보여주었고, 이들 간의 상관계수는 집단마다 달랐다(-0.82 and -0.78 for Pd3 and -0.28 and -0.30 for Pd14). 갓의 색형질과 다른 형질간의 상관은 없는 것으로 나타나 이 형질은 다른 형질에서 독립적으로 작용한다는 것을 추정할 수 있었다(그림 2-5, 표 2-8).

표 2-8. 각 집단의 형질간 피어슨 상관계수

Pearson's correlation coefficient (significance)										
P15	P14	Y	L	T	D	Q	E	S	P	C
Y	-	0.64 (<0.001)	0.41 (<0.001)	0.35 (<0.001)	0.74 (<0.001)	-0.28 (<0.01)	0.08 (0.42)	-0.07 (0.51)	0.10 (0.33)	
L	0.72 (<0.001)	-	-0.24 (<0.05)	0.26 (<0.01)	0.90 (<0.001)	-0.30 (<0.01)	0.12 (0.24)	-0.04 (0.90)	0.10 (0.34)	
T	0.36 (<0.001)	-0.18 (0.08)	-	0.23 (<0.05)	-0.12 (0.23)	0.10 (0.34)	0.26 (<0.05)	0.03 (0.78)	0.35 (<0.001)	
D	0.51 (<0.001)	0.29 (<0.01)	-0.10 (0.308)	-	0.39 (<0.001)	0.25 (<0.05)	0.03 (0.78)	-0.05 (0.63)	0.28 (<0.05)	
Q	0.79 (<0.001)	0.76 (<0.001)	0.007 (0.94)	0.45 (<0.001)	-	0.36 (<0.001)	0.07 (0.52)	-0.04 (0.71)	-0.07 (0.49)	
E	-0.47 (<0.001)	-0.55 (<0.001)	0.31 (<0.01)	0.38 (<0.001)	0.58 (<0.001)	-	0.17 (0.08)	0.54 (<0.001)	0.13 (0.21)	
S	-0.08 (0.42)	-0.19 (0.07)	0.19 (0.08)	0.18 (0.32)	-0.13 (0.23)	0.16 (0.14)	-	0.35 (<0.001)	0.01 (0.91)	
P	0.14 (0.17)	0.38 (<0.001)	0.33 (<0.001)	0.08 (0.44)	0.23 (0.02)	0.55 (<0.001)	0.30 (<0.05)	-	0.14 (0.17)	
C	0.05 (0.60)	0.14 (0.17)	0.13 (0.21)	-0.02 (0.85)	0.003 (0.97)	0.22 (0.002)	-0.008 (0.93)	0.05 (0.62)	-	

Pearson's correlation coefficient (significance)										
Pd8	Pd3	Y	L	T	D	Q	E	S	P	C
Y	-	0.88 (<0.001)	0.51 (<0.001)	0.68 (<0.001)	0.93 (<0.001)	-0.82 (<0.001)	-0.06 (0.55)	-0.55 (<0.001)	-0.32 (<0.01)	
L	0.63 (<0.001)	-	0.28 (<0.01)	0.64 (<0.001)	0.89 (<0.001)	-0.78 (<0.001)	-0.13 (0.23)	-0.61 (<0.001)	-0.15 (0.16)	
T	0.43 (<0.001)	0.30 (<0.01)	-	0.23 (<0.05)	0.34 (<0.001)	-0.29 (<0.01)	0.05 (0.65)	-0.12 (0.25)	0.24 (<0.05)	
D	0.49 (<0.001)	0.08 (0.45)	0.23 (0.02)	-	0.72 (<0.001)	-0.70 (<0.001)	0.04 (0.99)	-0.47 (<0.001)	0.39 (<0.001)	
Q	0.67 (<0.001)	0.70 (<0.001)	-0.03 (0.80)	0.31 (<0.001)	-	-0.78 (<0.001)	-0.03 (0.75)	-0.56 (<0.001)	-0.14 (<0.05)	
E	-0.26 (0.05)	-0.41 (<0.001)	0.26 (<0.01)	-0.21 (<0.05)	-0.34 (<0.001)	-	0.06 (0.59)	0.73 (<0.001)	0.27 (<0.05)	
S	-0.30 (<0.01)	-0.38 (<0.001)	0.04 (0.69)	-0.12 (0.23)	-0.31 (<0.01)	0.23 (0.02)	-	0.08 (0.47)	-0.074 (0.48)	
P	-0.04 (0.06)	-0.37 (<0.001)	0.27 (<0.005)	-0.16 (0.11)	-0.22 (0.03)	0.88 (<0.001)	0.19 (0.06)	-	0.0001 (0.99)	
C	-0.05 (0.60)	-0.03 (0.70)	0.01 (0.95)	0.01 (0.91)	-0.07 (0.46)	0.10 (0.32)	-0.17 (0.02)	-0.06 (0.57)	-	

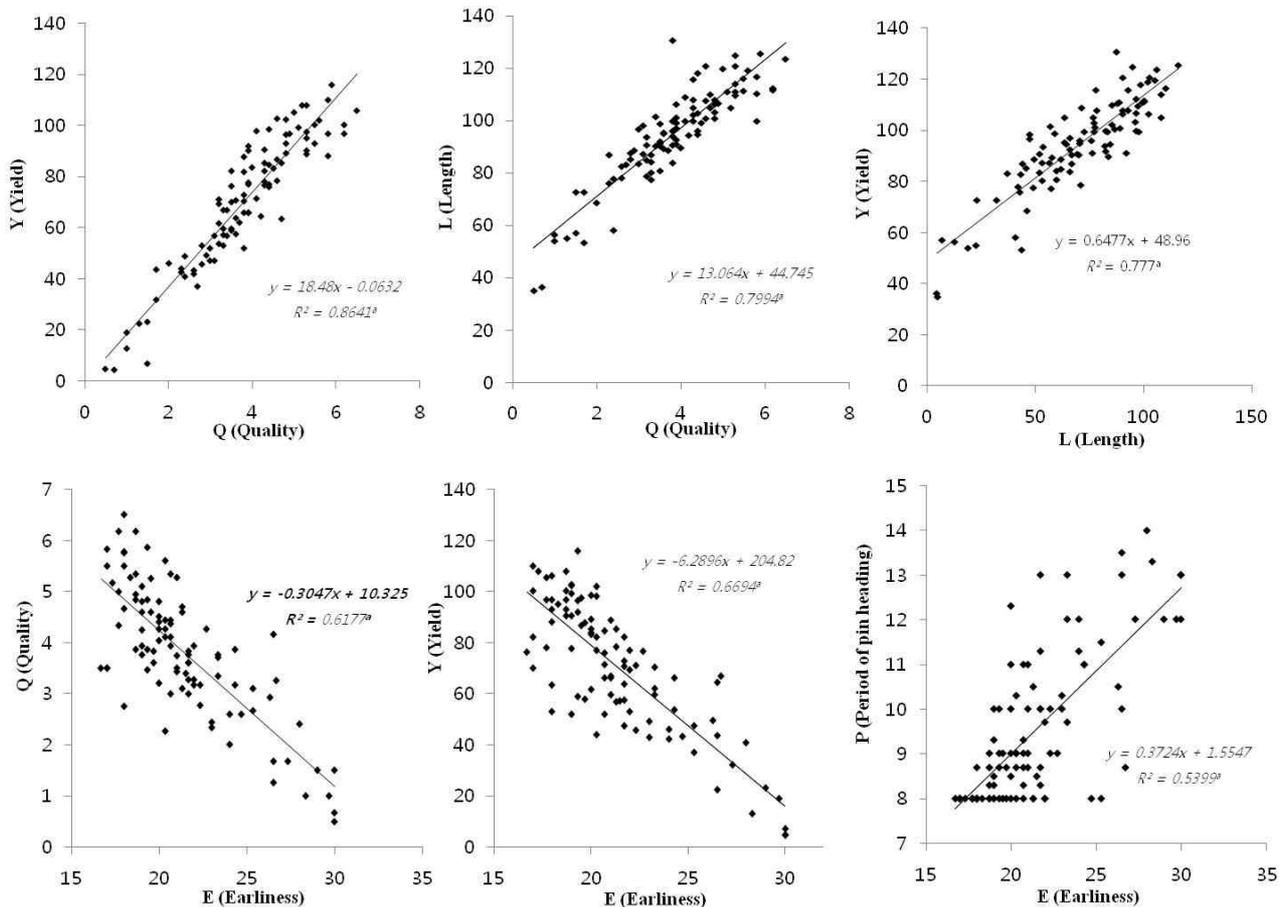


그림 2-5. 각 형질간의 상관 산포도

유효한 마커를 선정하기 위한 threshold는 1,000-permutation LR test를 통하여 형질별로 1.73과 5.17사이 에 있음을 추정하였고, 집단간의 평균을 구한 결과 2.29 to 3.24임을 알 수 있었다. 평균적인 값을 고려하여 LOD이 3.0이상이면 유효하다고 선언하였다. 발견한 QTL의 비교 분석을 위하여 2.5 - 3.0의 QTL로 구하여 표시하였다(표 2-9).

표 2-9. 유의한 LOD의 기준(permutation test with 1,000 LR, P<0.05)

Trait	Pd3	Pd8	Pd14	Pd15	Average
Yield (g)	3.01	2.75	2.85	2.78	2.85
Length (mm)	2.57	4.10	3.16	2.78	3.15
Quality	2.74	3.45	2.99	2.79	2.99
Thickness (mm)	2.57	2.80	2.64	2.82	2.71
Diameter (mm)	2.78	2.80	2.67	2.71	2.74
Earliness (days)	2.89	2.73	2.59	2.79	2.75
Period of spawn running (days)	1.73	1.80	2.92	2.69	2.29
Period of pin-heading (days)	5.17	2.58	2.46	2.76	3.24
Cap color (LogitL)	2.87	2.84	2.72	2.92	2.84
Average	2.93	2.87	2.78	2.78	2.84

큰느타리버섯의 형질발현에 관련하는 QTL분석을 QTL cartographer의 CIM 방식을 사용하여 QTL mapping을 실시하여 그 결과를 Table 10와 Figure 6에 나타내었다. 각 형질의 QTL의 LOD는 형질과 집단에 따라 2.5에서 9.4의 분포를 보였다. 갓 형질별로 집단의 결정계수( $R^2$ )는 5.82에서 32.57%로 나타났다. 가장 높은  $R^2$ 는 52.33%로 Pd3집단의 수량에 관계된 마커였다. 총 9개 형질의 마커는 각각 23, 23, 8, 17개의 마커가 Pd3, Pd8, Pd14 Pd15집단에서 발견되었다. 대부분의 형질마커들이 연결집단의 좁은 범위내에서 서로 겹치며 발견되었는데, 각 집단별로 특이하게 나타나는 마커(C3\_II on LG6 and L14\_I on LG5)도 있었지만, 많은 부분은 집단간의 차이없이 중복적으로 발견되는 것이었다. 수량과 형태에 관여하는 18개와 6개의 QTLs은 LG1의 65.4 cM과 115.3 cM사이와 LG7의 38과 65 cM 사이의 좁은 지역에서 발견되었다(그림 2-6, 표 2-10). 이는 유전자가 좁은 지역에 분포하거나 혹은 소수 유전자의 다면발현의 증거로 사료된다.

표 2-10. QTL for yield- and morphology-related traits found in fruiting bodies of the Pd3, Pd8, Pd14 and Pd15.

Trait	Pd3										Pd8							
	QTL	LG	CI (cM) <sup>a</sup>	LOD <sup>b</sup>	Nearest marker	Position (cM) <sup>d</sup>	R <sup>2</sup> (%)	Total of variance explained (%)	Additive effect	QTL	LG	CI (cM)	LOD	Nearest marker	Position (cM)	R <sup>2</sup> (%)	Total of variance explained (%)	Additive effect
Yield(g)	Y3_I	1	87.0-91.4	9.4	SSR428	88.4	22.89	52.33	12.9286	Y8_I	11	23.6-43.7	2.5	SSR201	34.2	16.96	16.96	6.0334
	Y3_II	1	76.7-81.7	5.1	SSR256	76.7	13.12		10.1500									
	Y3_III	7	38.1-52.2	5.0	SSR45	42.2	10.92		-8.8979									
	Y3_IV	9	21.1-30.4	2.8	SSR433	21.3	5.82		6.8132									
Length(mm)	L3_I	1	86.4-92.4	7.0	SSR428	88.4	13.70	38.00	8.1402	L8_I	1	85.8-91.8	4.6	SSR428	88.4	10.97	36.04	4.3632
	L3_II	1	76.8-80.9	4.5	SSR256	76.8	20.21		9.6914	L8_II	1	76.7-80.1	4.0	SSR256	76.9	12.32		4.6505
	L3_III	7	39.1-52.4	2.7	SSR86	49.6	11.59		-7.2423	L8_III	2	73.1-76.9	3.3	SSR53	73.9	29.09		-6.9447
										L8_IV	3	32.3-37.9	3.5	SSR3	33.5	9.02		-3.9262
Quality	Q3_I	1	87.3-94.0	8.5	SSR428	90.3	23.42	48.50	0.6613	Q8_I	1	85.5-97.1	2.7	SSR428	88.1	8.39	20.41	0.2295
	Q3_II	7	42.3-62.1	4.1	SSR86	54.6	11.25		-0.4550	Q8_II	8	48.7-66.0	2.5	SSR13	58.5	7.62		-0.2213
	Q3_III	9	25.2-29.4	5.2	SSR310	26.9	12.06		0.4732									
	Q3_IV	11	0-12.5	2.8	SSR340	0	9.49	9.49	2.4594	T8_I	2	62.4-67.6	3.9	SSR292	67.2	13.32	27.68	2.1705
Stipe thickness(mm)										T8_II	3	1.3-21.1	2.8	SSR381	14.8	8.88		1.7697
										T8_III	4	25.7-33.9	3.2	SSR18	31.3	9.99		-1.8967
										T8_IV	9	12.4-22.8	2.7	SSR101	20.5	8.51		-1.8001
										D8_I	4	41.0-57.5	3.5	SSR179	49.8	11.75	11.75	-2.4537
Pileus diameter(mm)	D3_I	2	64.0-68.1	2.7	SSR292	67.2	8.94	18.01	-3.7545									
	D3_II	6	68.6-74.9	4.3	Indel447638	68.7	13.81		6.8087									
Earliness(days)	E3_I	1	85.3-88.0	6.1	SSR428	87.2	16.47	49.11	-1.3967	E8_I	1	75.7-80.3	6.4	SSR256	76.5	17.25	40.32	-0.8936
	E3_II	1	76.8-83.1	4.8	SSR130	79.1	13.70		-1.2931	E8_II	1	65.4-74.9	5.3	SSR28	71.2	15.21		-0.5309
	E3_III	7	42.2-58.7	5.5	SSR86	53.0	13.77		1.2842	E8_III	1	83.4-87.8	4.8	SSR428	86.2	14.98		-0.8237
	E3_IV	9	21.1-31.0	2.9	SSR433	23.3	6.85		-0.9422	E8_IV	7	43.6-61.2	3.0	SSR86	52.5	6.97		0.5876
										E8_V	9	23.2-25.9	4.6	SSR216	24.3	11.89		-0.7578
Period of pin-heading(days)	P3_I	1	67.0-80.2	4.0	SSR256	76.8	12.05	33.39	-0.6128	P8_I	1	75.9-83.2	4.2	SSR256	76.8	13.13	13.13	-0.5465
Period of spawn running(days)	P3_II	6	53.6-79.6	3.1	Indel447638	67.6	9.81		-0.5521									
	P3_III	7	42.2-65.2	3.4	SSR86	50.1	12.17		0.5987									
Cap color(LogitL)	C3_I	5	79.0-93.0	4.3	SSR178	84.9	14.86	32.91	0.0297	S8_I	10	0-7.0	2.5	SSR295	0	8.60	8.60	-0.5502
	C3_II	6	1-12.1	3.1	SSR271	6.8	14.17		0.0288	C8_I	4	36.9-56.0	3.9	SSR179	50.1	10.62	35.24	-0.0251
	C3_III	10	46.1-53.8	4.8	SSR131	50.3	17.73		0.0322	C8_II	5	82.1-93.2	8.5	SSR178	88.4	33.17		0.0427
										C8_III	10	56.0-59.0	4.3	SSR289	57.5	11.91		0.0354
										C8_IV	10	49.3-54.8	3.0	SSR266	52.6	14.65		0.0375

Trait	Pd14										Pd15							
	QTL	LG	CI (cM)	LOD	Nearest marker	Position (cM)	R <sup>2</sup> (%)	Total of variance explained (%)	Additive effect	QTL	LG	CI (cM)	LOD	Nearest marker	Position (cM)	R <sup>2</sup> (%)	Total of variance explained (%)	Additive effect
Yield(g)										Y15_I	8	11.7-29.0	3.1	SSR221	17.9	11.16	17.53	-5.1725
										Y15_II	11	18.4-30.0	2.5	SSR201	29.4	8.95		5.4126
Length(mm)	L14_I	5	103.6-121.9	3.0	SSR60	115.7	16.47	18.00	6.3756	L15_I	2	72.8-75.7	3.0	SSR53	73.9	32.57	32.57	-8.0157
	L14_II	12	0-9.7	2.7	SSR431	0.0	9.36		-4.6879									
Quality	Q14_I	12	0-9.1	3.1	SSR431	3.1	21.58	21.58	-0.4453									
	T14_I	10	60.4-70.8	4.4	SSR52	67.1	20.07	4.15	-3.1906	T15_I	6	35.9-50.5	4.1	SSR84	43.9	13.82	9.25	-2.1928
Stipe thickness(mm)	T14_II	10	50.3-56.5	3.6	SSR266	54.2	14.62		-2.6685	T15_II	8	8.8-17.8	2.6	SSR128	15.0	10.15		-1.8785
										T15_III	8	19.6-30.9	2.7	SSR360	25.7	8.94		-1.7508
										D15_I	3	10.2-30.0	4.1	SSR381	20.2	16.71	27.98	3.2562
										D15_II	4	43.7-57.1	4.1	SSR179	50.1	12.14		-3.5193
Pileus diameter(mm)	D14_I	3	10.8-29.9	3.2	SSR381	17.8	11.60	28.37	3.2562	E15_I	1	88.4-98.8	3.1	SSR48	94.7	9.61	17.47	-0.6610
	D14_II	4	36.8-49.4	4.4	SSR179	45.1	16.59		-3.9357	E15_II	6	66.0-76.6	3.1	Indel447638	68.8	9.60		-0.6770
										E15_III	9	38.9-42.4	3.7	Indel596649	40.8	21.22		-0.970
										P15_I	3	19.5-55.5	2.5	SSR163	35.4	9.31	9.31	35.69
Period of pin-heading(days)									S15_I	6	26.0-43.3	2.5	SSR210	32.5	11.80	11.80	4.0544	
Period of spawn running(days)																		
Cap color(LogitL)	C14_I	3	17.8-46.1	3.0	SSR3	32.2	10.37	10.37	-0.0230	C15_I	1	88.8-100.1	7.2	SSR311	96.2	27.61	44.87	-0.0414
										C15_II	1	103.3-115.3	7.1	SSR64	110.4	22.63		-0.0376
										C15_III	5	82.2-94.1	6.2	SSR178	89.3	24.08		0.0393
										C15_IV	10	14.8-37.8	3.2	SSR85	32.9	9.89		0.0248

<sup>a</sup> 1-LOD support interval. <sup>b</sup> LOD score value at the LOD score peak. <sup>c</sup> Nearest marker to the LOD score peak. <sup>d</sup> Position of the LOD score peak in cM.

### (3) 형질별 QTL의 개수 및 분포

#### (가) 설명계수

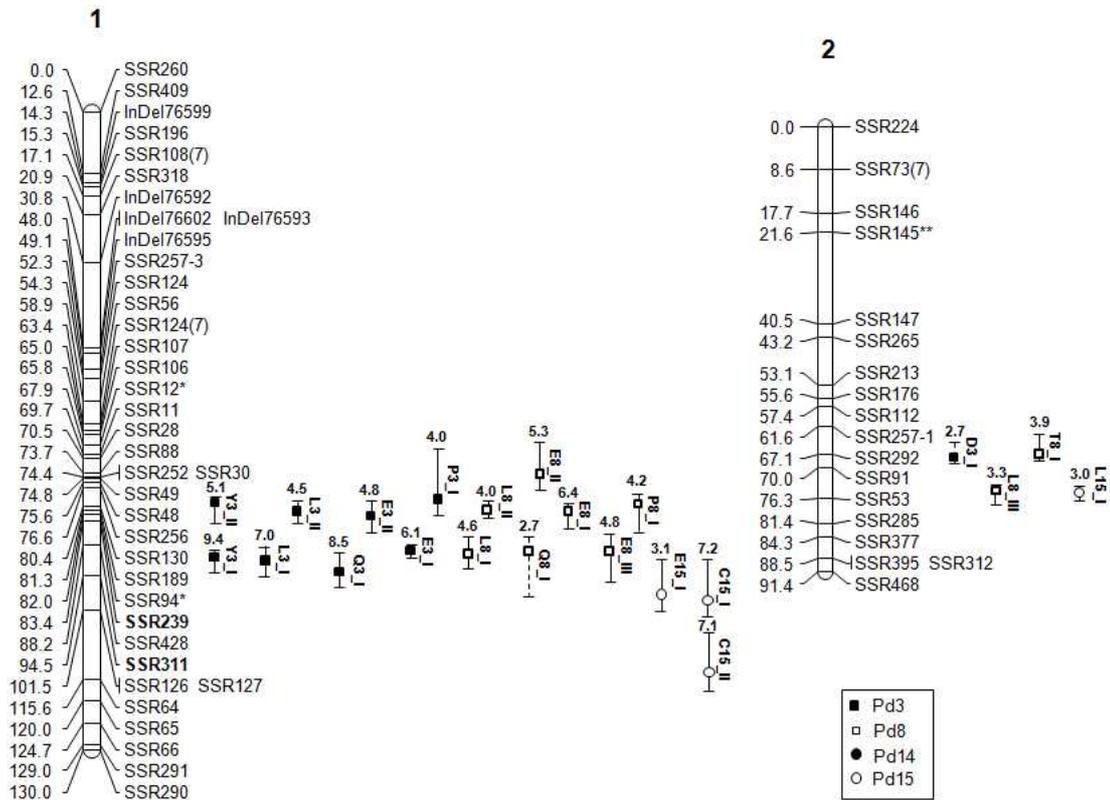
형질별로 QTL을 분석한 결과 개개의 QTL이 표현형을 설명할 수 있는 결정계수( $R^2$ )의 범위가 5.82%(Pd3집단, 수량)에서 32.57%(Pd15집단, 길이)까지 다양하였다. 한 집단내의 형질의 결정계수의 총합( $R^2$ )은 Pd3집단의 수량형질로 52.33%에 달하여 수량표현형질의 절반이상을 마커로써 탐색할 수 있는 수준이었다.

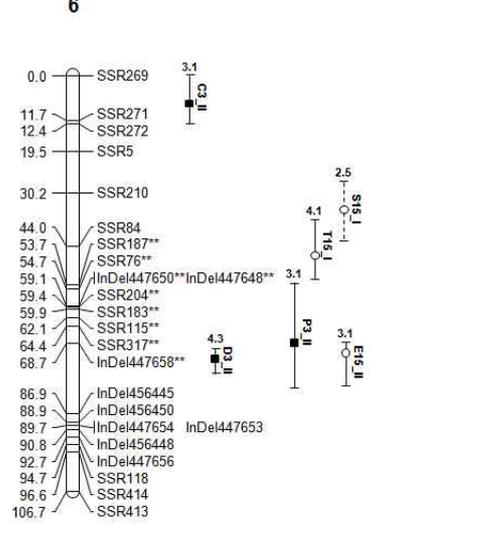
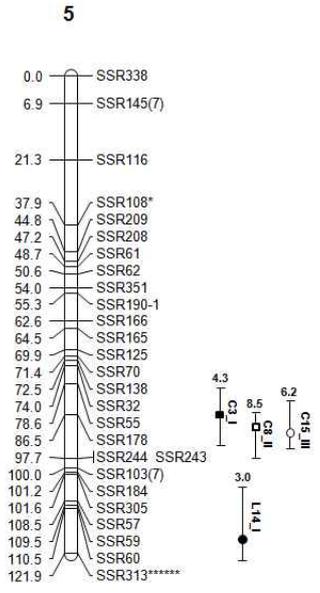
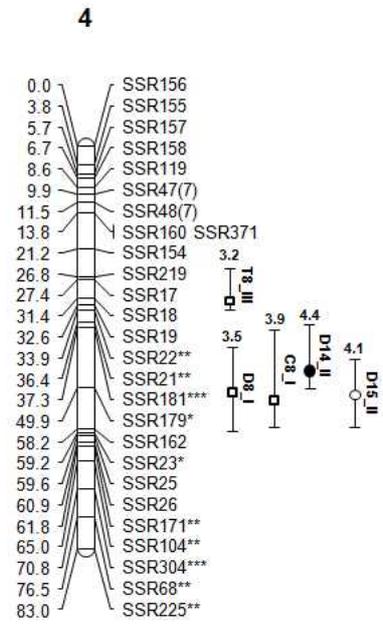
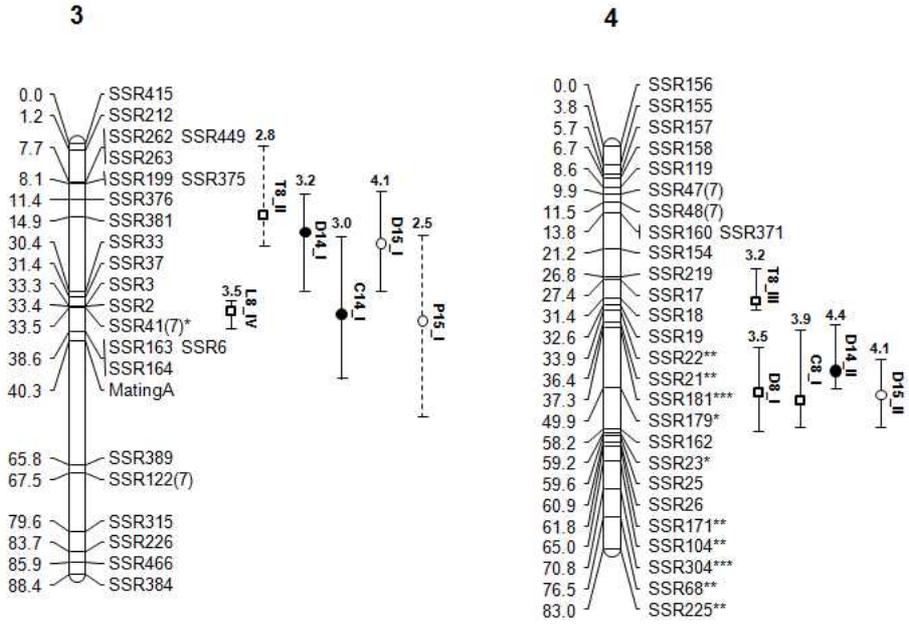
#### (나) 수량, 길이형질

7개의 수량관련 QTL이 3집단(Pd3, Pd8 and Pd15)에서 좁은 지역에 한정되어 나타났다. Y3\_I and Y3\_II는 LG1의 76.7 - 91.4 cM에서 발견되는데, 각각 표현형의 22.89%와 13.12%를 설명할

수 있었다. Pd3 집단의 LG1에서 발견된 수량관련 QTL은 길이, 수량, 조생성 형질과도 같이 발견되어 서로 연관이 있는 것으로 사료되었다. SSR428은 수량과 아주 강력하게 결합(LOD = 9.4)된 것으로 보여진다(그림 2-6).

길이형질은 3개 집단에서 검출되었는데, 가장 높은 LOD는 7.0으로 13.70%의 설명력을 가지는 L3\_I이다. LG1에서 검출된 길이 QTL은(L3\_I, L3\_II, L8\_I, L8\_II)은 길이, 품질, 조생성과 같이 발견되는데 반해서, LG2와 LG5의 길이관련 QTL은 독립적으로 존재하였다.







역에서 발견되었는데, 이것은 그 locus가 갖색관련 유전자가 확실하게 존재하는 것을 암시한다. Pd15의 갖색을 44.87% 설명하기 때문에 진한 갖색을 육조하는 마커로 활용가능할 것으로 사료된다.

(마) 조생성

조생성은 농가에서 버섯을 키우는데 걸리는 시간이라 짧을수록 경제적이어서 버섯농업인이 선호하는 형질이다. 총 12개의 QTLs이 LG1, LG6, LG7 and LG9에서 검출되었고, 설명력은 6.85%에서 21.22%수준이었다. 집단내 조생성 QTL의 설명력 총합은 Pd3집단에서 49.11%, Pd8집단에서 40.32%로 비교적 높은 수준이었다. 주로 KNR2532에서 유래된 형질로 조사되었다.

(4) 농업적 주요형질과 관련된 후보 유전자

최종적으로 QTL 마커가 육종계통에 상관없이 육종프로그램에서 자유롭게 활용되기 위해서는 형질을 조절하는 유전자의 동정이 중요하다. 여러 형질 중 농업인과 육종가가 가장 선호하는 수량에 관계되는 유전자를 찾기 위하여 본연구팀이 구축한 새송이 genomic browser를 활용하여 가장 중요한 수량 QTL주위의 유전자를 동정하였다. 수량 QTL 중 가장 가능성 높은 Y3\_I locus(LOD 9.4) 주변 유전자 탐색으로 약 310개의 유전자가 예측되었고 그중 수량과 관계가 있을 것으로 생각되는 유전자 13개를 선발하였다. 각 유전자의 기능은 균사생장에 관여하는 rDNA의 세포내 신호전달에 관여하는 cyclophilin이 포함되고, 느타리버섯의 균사생장과 관계있는 것으로 알려진 esterase의 유전자도 발견되었다. 특히, 균사가 목재를 분해할 때 사용되는 cellobiohydrolase의 유전자와 세포벽 생합성에 관여하는 glucan synthase도 동정되었다(그림 2-7). 양송이 균사생장에 관여한다는 보고가 있는 transcription factor, 유전자의 발현에 관여하는 helicase도 발견하였다. 이들 유전자들이 각 형질에 직접적으로 영향을 미치는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

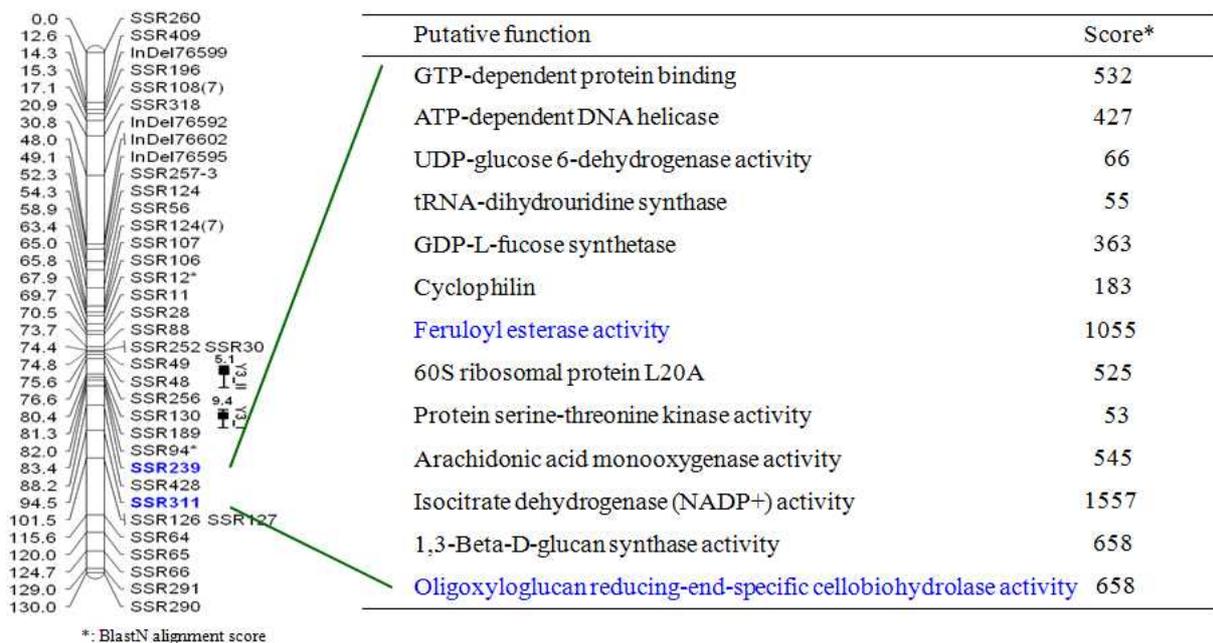


그림 2-7. 수량관련 QTL 마커 Y3\_I 주위의 수량관련 후보유전자

(5) 유전지도의 해상도 개선

유전지도의 해상도와 마커의 정확성은 분리집단의 수와 마커 숫자가 유전지도의 해상도에 절대적으로 영향을 미친다. 현재 구축한 유전지도의 해상도 향상을 위하여 98개인 분리집단 개체수를 303개로 늘리고 마커의 숫자도 InDel, SSR에 이어 SNP도 도입하여 해상도와 마커의 정확성을 높이고자 하였다.

표 2-11. KNR2312유래 분리집단(98+205)의 다형성 결과

다형성		무다형성	무증폭	계
codominant	dominant			
53	21	6	1	82

원래 주형 98개였으나 더 세밀한 작업을 위해 205개로 늘려서 진행하였고, Pd3, Pd8, Pd15 집단의 LOD 수치가 높은 yield, cap color 중심으로 총 86개의 프라이머를 사용하여 Indel596649, 456449, 456444, primer 111을 제외한 82개를 완료하였다. 다형화를 보인 것은 74개, 무다형성 6개, 무증폭은 1개 있었다(표 2-11). 공우성마커는 53개(그림 2-8) 우성 마커(그림 2-9)는 21으로 73개가 다형성을 보였고, 다형성이 없는 것은 6개 증폭이 이루어지지 않은 프라이머는 1개였다.

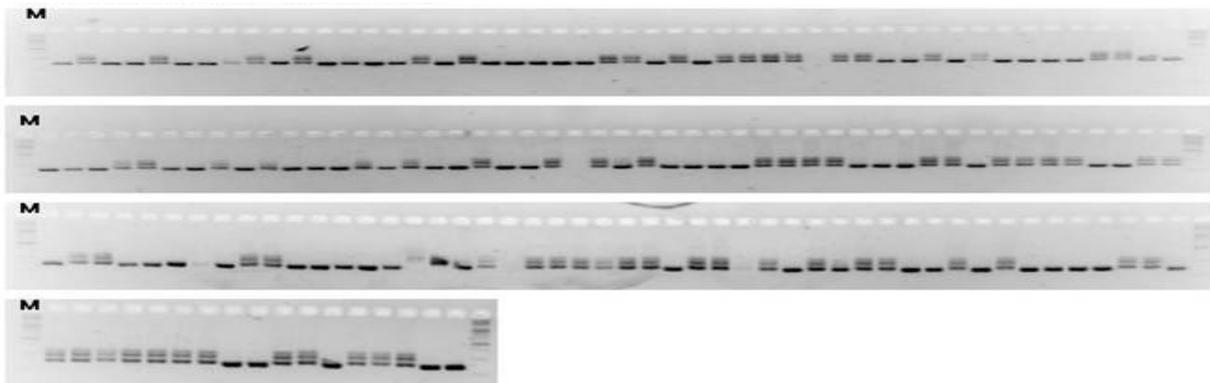


그림 2-8. 공우성마커(SSR 291)의 다형성 전기영동사진

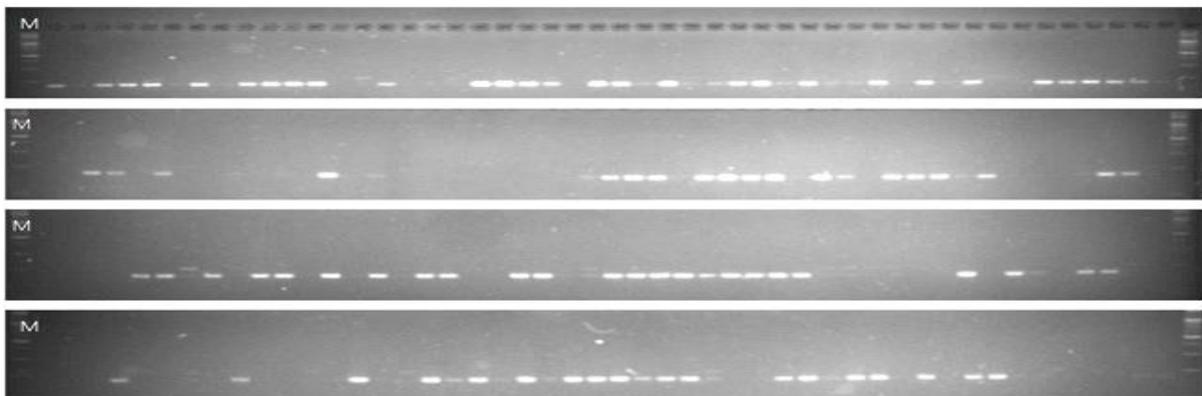


그림 2-9. 우성마커(재송이 SSR 30)의 다형성 전기영동사진

강력한 수량관련 QTL 마커 Y3\_1가 검출된 SSR239와 SSR311사이에 새로 추가한 데이터를 이용하여 QTL분석을 수행한 결과 이전에 없던 SSR28, SSR30, SSR48, SSR56, SSR189 프라이머가 SSR311과 SSR428사이에 추가되었다(그림 2-10). 부분적인 마커의 추가는 마커주위의 해상도를 고려했을 때는 마커의 순서와 간격이 유지되지만, 전체적인 유전지도의 틀이 안정되지 않은 문제가 발생할 수 있기 때문에 주요 마커 뿐만 아니라 유전지도에 사용된 전체 마커를 새로운 집단에 적용해야 할 것으로 판단되었다. 전체적인 유전지도의 정밀화는 추가적인 연구수행이 필요하다.

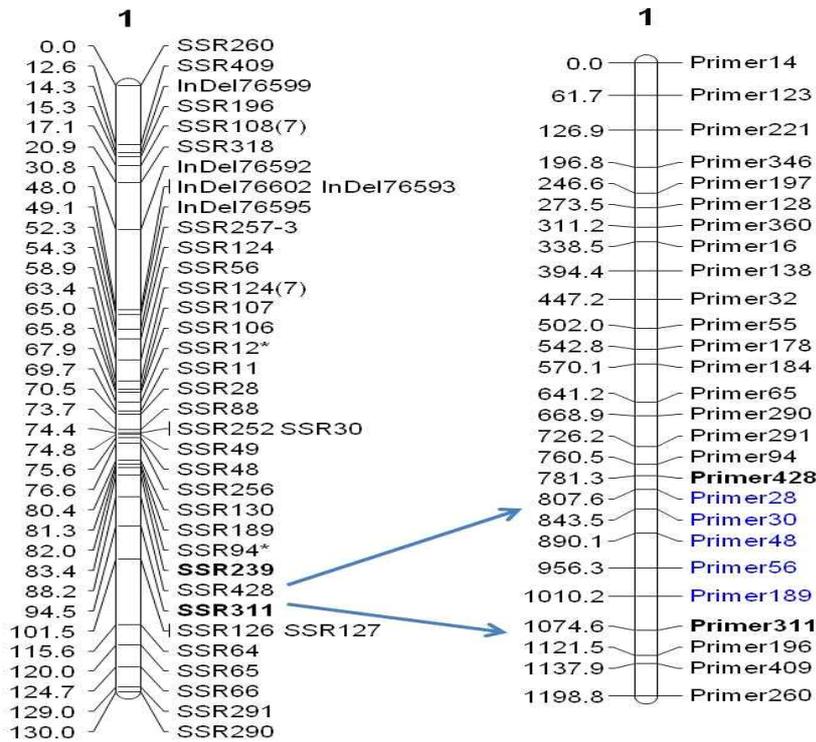


그림 2-10. 수량 QTL 주변 해상도 향상

## 나. 큰느타리버섯의 교배형판별 마커 개발

### (1) 교배형에 따른 다형화 마커 선발

큰느타리버섯은 맛과 조직감이 뛰어나서 국내에서 46,530톤이 생산되어 2위를 기록했으며, 수출량도 4,755톤 15,588불에 달하는 우리나라 대표버섯이다. 현재 국내등록 품종은 8종에 이르지만, 국내시장과 권역별 수출시장 소비자의 취향에 맞는 다양한 품종의 개발이 필요하다. 육종을 위해서는 단핵군사의 교배형을 알아야 하는데, 보통은 20일 이상 소요되어 육종효율에 걸림돌이 되어 왔다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 교배형에만 특이적으로 증폭되는 분자표지를 개발하고자 하였다.

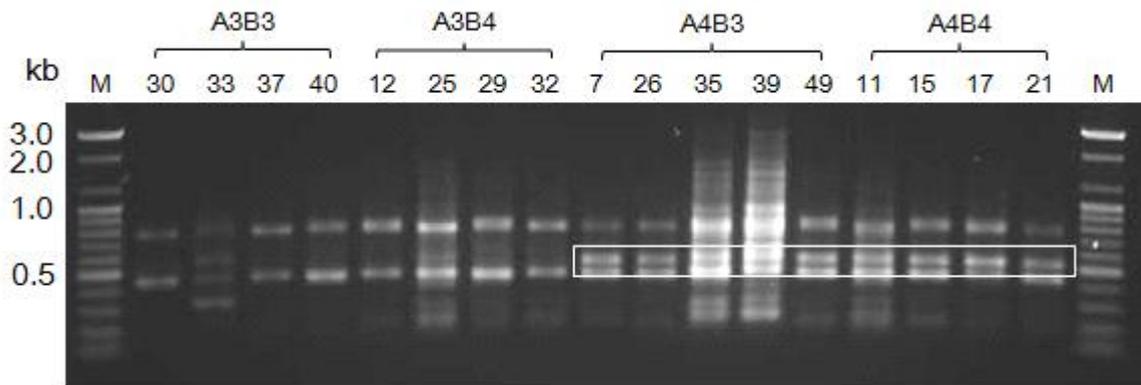


그림 2-11. RAPD를 통한 A4Bx특이 프라이머 탐색

큰느타리2호의 자실체를 발생시켜 단포자 100개를 분리하여 무작위로 20개를 선택한 후, 가능한 모든 조합으로 교배를 실시한 다음, 현미경으로 관찰하여 교배형에 따라 20개 균주의 교배형을 결정하였다. 이때, *A3B3*, *A3B4*, *A4B3*, 그리고 *A4B4*와 같은 총 4개의 교배형을 선택하고, 각 교배형으로부터 4균주씩을 선택하여 실험재료로 사용하였다. 무작위 10-mer(Operon, USA) 프라이머를 이용하여 큰느타리버섯의 단핵군사를 교배형에 따라 4균주씩 준비하여 이를 대상으로 Random amplify DNA polymorphism(RAPD)를 실시하였다.

단핵군사에서 특이한 밴드를 형성하여 이를 근간으로 재현성과 신뢰성이 있는 SCAR마커로 전환하였다(그림 2-11). 프라이머 A4-locus-F와 A4-locus-R이 재현성 있게 특이 밴드가 증폭되는지 확인하기 위하여 4가지 교배형을 가진 16개의 단핵군사에 적용하였는데, B locus의 교배형에 상관없이 A4를 가진 균주에서만 특이밴드가 확인되었다(그림 2-12).

이외에 다른 계통에서 유래한 단핵군사집단의 A4도 검출하는지 실험한 결과 동일한 결과를 얻었다(data not shown).

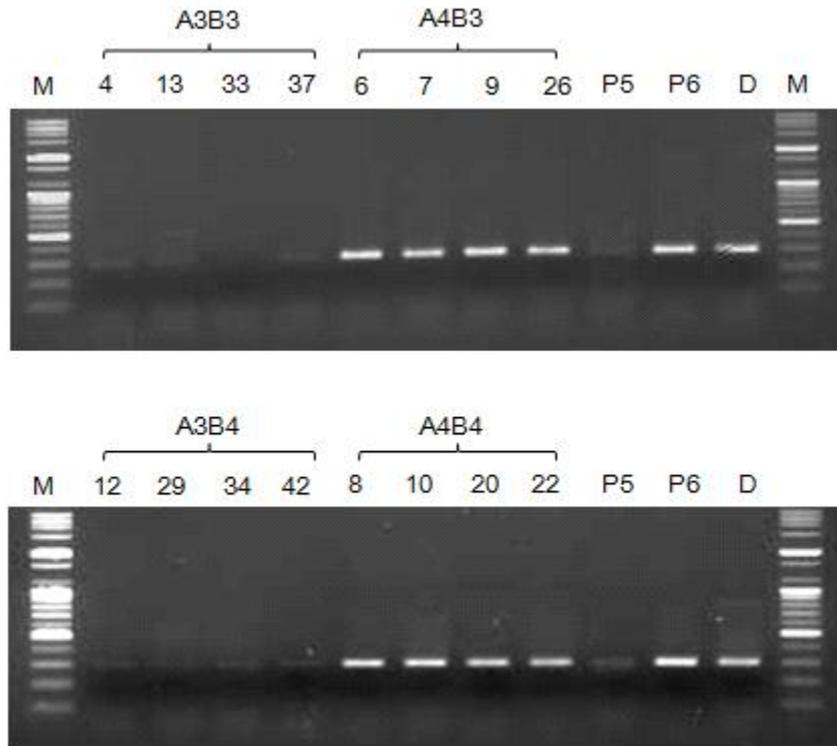


그림 2-12. SCAR마커에 의한 A4Bx의 균주 선발

#### 다. 느타리버섯의 유용형질마커 개발

##### (1) 느타리버섯 분리집단 구축

느타리버섯의 형질별 분리집단을 만들기 위하여 먼저 대립되는 형질을 가진 부모친으로 흑타리와 미소를 선정하여 단포자를 채취하고 단핵균사를 발이시켜 교배하였다(그림 2-13). 흑타리는 갓색은 흑색에 가깝고 수량성이 높은 품종임. 미소는 백색의 갓을 가지며 수량성이 낮은 품종이다(그림 2-14).

단핵균 분리는 포자희석법을 이용하여 흑타리 단핵균(JHH)과 미소(HMS)의 단핵균을 각각 분리하고 현미경으로 단핵균 임을 검경하여 50개씩 분리하였음. 분리한 단핵균은 계대를 하고 10% glycerol과 mineral Oil이 담긴 cryovial tube에 각각 넣고 냉장보관 하였다.

흑타리와 미소의 각 10개씩의 단핵균을 선발하여 교배하였다. 이렇게 하여 만들어진 100개의 교잡균에 대하여 현미경 검경을 통해 이핵균임을 확인하였다. 교잡균주는 계대를 하고 10%glycerol과 Mineral Oil이 담긴 cryovial tube에 각각 넣고 냉장보관 하였다. 100개의 교잡균을 시험병배지에 접종하여 배양하였다. 시험병배지는 포플라툽밥+미송툽밥+면실피+면실박+비트 펄프(24+24+30+10+12 = v:v)의 배합비에 수분함량은 68%정도로 맞추었다. 16일배양후 균굽기하였고 17℃의 생육실에서 생육시켰으며 상품성 있는 크기로 자란 다발을 수확하여 특성조사를 하였다(표 2-12, 그림 2-15).

갓색과 수량성이 중간에 가장 가까운 교잡균주로 HMS012xJHH021를 선정하고 포자를 수집하였다.

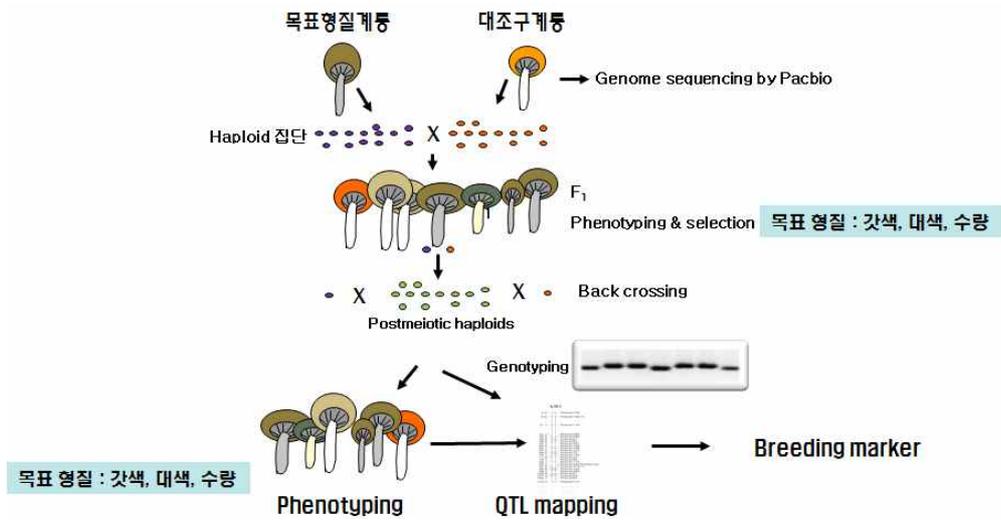


그림 2-13. 느타리분리집단 작성, 유전형분석, 표현형검증, QTL 분석의 절차도

## (2) 분리집단의 표현형 검증

흑타리와 미소에서 유래한 단핵균사 중 무작위로 10계통을 선발하여 교배한 결과 100개의 교배체가 형성되었다. 이들을 자실체로 성장시켜 phenotyping하여 각 형질의 계급치에 대한 분포도를 그렸을 때 대부분의 형질이 정규분포를 보였다. 이는 이들 형질이 QTL에 의해 조절됨을 보여주는 것으로 대의 명도와 길이는 좁은 지역에 분포하고 갯의 명도와 무게는 넓은 지역에 분포하였다. 이는 갯의 명도는 부모친인 흑타리와 미소의 극명한 명도차이에서 비롯되었으며 길이와 명도는 QTL에 의해 조절되는 형질의 폭이 넓지 않음을 보여준다 (그림 2-16).

현재 갯명도, 무게, 대의 명도에서 중간값을 보이는 H012×J021계통에서 나온 단핵균사 400개와 J021과 여교배를 시행하여 표현형을 검증하고자 하였는데, 여교배에 의해 약세가 나타나 30%의 자실체만 정상적으로 생육하는 결과가 나왔다. 추가적인 연구에서 여교배 방식보다 분리집단의 모든 교배형과 교배가 가능한 야생버섯으로부터 tester를 확보하여 표현형질 검증하는 방법이 필요할 것으로 사료된다.



품종	생육소 요일수	갓색	갓형태	갓길이	갓넓이	대굽기	대길이	경도	질긴 정도	대특성	수량 (g/850ml)
흑타리	7	진회 갈색	깊은깔	35.9	42.5	16.2	66.6	++	++	습주름	183.6
미소	8	흰색	우산형	23.4	25.8	10.1	63.2	+	+	백색	97.4

그림 2-14. 부모친 흑타리와 미소의 자실체 모습 및 특성

표 2-12. 흑타리와 미소의 교배체 배양, 생육특성

HMS JHH	갓색 <sup>a</sup>			대색 <sup>a</sup>			갓 단 면 <sup>b</sup>	갓 길이	갓 넓이	대 길이	대 굽기	수 확 량 <sup>c</sup>	유 효 경 수 <sup>d</sup>	대 단 단 <sup>e</sup>	대 탄 력 <sup>f</sup>	대 질 감 <sup>g</sup>	초 발 이	생 육 일 수
	L	a	b	L	a	b												
010-020	62.1	1.2	6.7	87.9	4.0	4.5	3	38.1	50.2	49.9	18.1	70.2	8.8	2	2	1	3	4
010-021	67.8	1.0	6.5	88.4	3.8	3.8	4	36.9	42.6	57.9	15.4	91.0	15.4	2	4	1	3	4
010-022	79.0	-0.9	1.4	86.7	3.7	5.1	2	37.0	50.6	62.6	22.9	114.8	20.2	2	4	2	5	4
010-023	67.4	1.6	5.6	89.1	3.7	2.5	3	36.5	42.0	62.5	15.5	107.2	28.6	2	1	1	6	4
010-024	83.8	-0.1	1.0	90.7	3.9	1.5	5	36.9	45.3	52.7	22.8	68.0	8.0	1	4	1	3	4
010-025	71.2	3.8	9.1	88.8	4.0	3.8	3	35.9	42.4	68.1	14.8	85.4	16.6	3	4	1	3	4
010-026	76.1	-1.9	0.3	87.7	3.3	3.6	3	36.4	40.0	57.2	15.9	94.8	12.6	4	4	2	3	4
010-027	73.7	3.4	7.7	90.5	3.7	2.2	3	41.1	50.4	54.0	15.8	98.6	14.6	5	5	5	3	4
010-028	65.7	2.3	6.7	85.5	3.3	4.6	3	37.9	38.5	62.7	14.0	90.0	13.8	1	2	1	3	4
010-029	58.8	4.4	11.5	82.9	4.6	9.3	3	41.2	49.6	57.7	20.5	67.6	8.2	2	4	1	4	4
011-020	61.2	0.0	3.1	84.5	3.3	4.2	3	34.4	39.0	57.1	12.3	96.8	22.0	3	4	1	3	4
011-021	64.5	2.0	7.1	83.3	2.8	5.0	2	35.1	39.3	67.0	10.7	80.0	25.0	3	4	2	5	4
011-023	59.7	3.9	10.3	88.7	3.7	3.8	2	35.4	44.1	52.1	13.6	73.0	24.8	4	5	2	6	5
011-024	59.7	1.7	7.5	84.2	3.6	5.8	3	36.4	41.9	71.8	15.7	87.2	12.6	2	4	1	4	4
011-025	56.2	4.3	11.0	84.5	3.1	5.5	3	36.0	41.7	63.2	15.1	81.6	20.6	4	4	2	6	5
011-026	69.2	1.4	5.6	87.4	3.2	3.3	3	33.0	38.4	60.8	12.6	107.2	39.6	3	4	2	5	4
011-027	67.9	1.1	4.6	84.2	2.4	4.6	3	32.7	39.4	57.8	18.7	93.4	30.0	3	4	2	5	4
011-028	54.2	4.9	11.9	82.9	3.1	6.7	3	37.7	40.7	66.3	13.1	94.8	20.0	3	4	1	5	4
011-029	56.9	2.7	8.3	86.6	3.6	5.6	2	38.7	44.8	47.7	12.6	64.6	14.8	3	4	1	6	6
012-020	58.2	2.9	8.5	84.4	3.1	5.7	3	36.7	39.3	66.6	13.0	115.0	32.4	3	4	2	4	4
012-021	60.4	3.3	9.9	85.2	2.9	4.7	2	34.0	37.5	72.8	9.5	123.0	39.2	5	5	2	4	4
012-022	73.2	0.3	3.9	88.2	3.8	3.2	3	35.8	44.6	55.0	18.4	93.0	23.0	3	4	2	6	4
012-023	53.7	4.5	11.4	84.1	3.2	5.8	3	34.6	42.4	64.0	12.9	129.4	32.2	3	4	2	6	5
012-024	60.7	0.3	5.4	84.0	3.1	5.6	3	36.6	40.5	78.9	14.5	124.8	26.0	3	4	2	4	4
012-025	51.6	4.6	11.6	83.8	2.8	5.7	3	34.2	38.5	64.4	13.0	122.0	39.0	3	4	2	6	6
012-026	61.9	2.0	7.9	86.5	2.7	3.7	2	32.9	38.8	61.7	10.2	148.0	55.2	3	5	5	6	4
012-027	63.1	1.8	7.2	84.9	1.6	3.5	2	36.5	43.5	68.4	9.6	137.0	39.2	4	4	2	5	4

012-028	53.4	3.6	10.2	83.0	2.5	5.6	3	34.7	38.0	80.0	11.9	116.6	28.2	3	4	2	6	4
012-029	49.8	4.4	10.6	85.4	3.5	5.8	3	32.6	41.5	60.2	14.4	105.4	24.8	3	4	1	6	5
013-020	53.0	4.1	11.7	89.7	3.7	3.1	3	32.0	36.8	62.3	14.6	108.6	27.6	3	4	1	3	4
013-021	63.5	1.9	9.4	87.6	3.3	3.8	2	32.6	37.7	74.5	12.5	120.6	38.4	3	4	2	4	4
013-022	82.2	2.5	4.1	90.9	4.0	2.3	3	37.2	46.0	58.9	17.9	97.8	16.4	2	4	1	4	4
013-023	61.2	3.6	10.6	87.8	2.7	2.4	2	33.3	39.1	68.6	12.0	136.6	38.0	3	4	2	5	4
013-024	67.2	1.2	7.0	90.2	3.7	1.7	3	34.5	39.4	76.1	43.5	132.0	26.6	2	4	1	3	4
013-025	66.8	3.6	10.9	85.9	3.4	5.8	3	37.2	45.3	67.1	15.7	111.0	23.4	3	4	2	5	4
013-026	72.8	2.2	8.3	90.1	3.7	2.7	3	35.4	43.4	60.7	13.6	148.0	38.4	3	4	2	5	4
013-027	70.3	-0.8	4.3	90.8	3.0	0.7	3	29.0	32.5	58.7	11.1	97.6	34.6	2	4	4	3	4
013-028	57.7	4.5	11.7	85.8	3.1	4.8	3	35.0	42.0	73.3	12.8	126.8	25.4	2	2	1	4	4
013-029	62.2	4.4	11.6	86.0	3.4	5.9	2	37.0	43.2	64.8	16.1	136.4	29.2	2	4	1	5	4
014-020	49.3	4.3	10.3	81.1	3.8	7.5	3	36.7	40.7	70.3	13.3	88.2	32.2	2	4	1	4	4
014-021	60.4	3.7	11.2	86.4	3.5	5.0	2	33.7	37.7	72.6	10.4	106.0	25.8	3	4	2	4	4
014-022	64.9	3.9	10.9	89.6	4.2	4.3	3	31.7	42.2	60.2	15.0	92.6	23.6	2	4	1	4	4
014-023	52.7	4.5	11.7	87.4	3.3	4.1	2	33.9	40.7	71.0	11.9	126.6	45.8	2	4	2	6	5
014-024	64.5	-0.8	2.8	87.5	3.0	3.0	3	36.6	39.9	73.7	14.3	147.0	25.8	2	4	1	3	4
014-025	53.2	4.3	12.1	83.9	3.1	5.9	3	33.0	37.9	67.6	13.7	138.4	34.2	3	4	2	4	4
014-026	64.1	3.0	9.8	88.3	2.9	2.6	3	35.5	42.7	67.2	11.0	142.6	42.2	3	5	4	3	4
014-027	48.8	4.2	10.3	89.9	3.4	1.2	2	34.1	40.0	66.8	11.4	107.2	33.0	3	4	2	4	4
014-028	51.1	3.4	12.2	83.8	1.4	4.5	3	34.7	41.9	69.3	11.9	149.8	32.2	3	4	1	5	4
014-029	52.5	4.3	11.5	85.6	3.6	5.8	2	33.4	34.7	68.4	12.8	118.8	41.0	3	4	1	5	4
015-020	56.1	3.0	8.9	85.9	3.9	4.9	5	35.2	40.1	59.2	14.4	81.6	9.6	2	4	1	3	4
015-021	56.6	5.3	12.9	83.5	4.0	7.6	5	39.4	43.4	75.4	14.3	92.2	12.6	3	5	2	4	4
015-022	76.0	2.1	6.0	87.4	4.2	7.1	3	36.7	58.4	58.1	25.9	77.6	6.4	1	1	1	6	5
015-023	58.7	4.4	11.8	88.3	3.9	4.4	3	37.2	40.8	59.3	15.7	110.0	29.8	1	2	1	6	5
015-024	53.1	3.4	9.7	84.3	3.6	6.2	3	37.2	42.7	73.1	22.1	141.4	18.4	2	2	1	4	4
015-025	59.0	4.4	10.8	85.0	3.5	5.3	5	41.1	49.7	62.4	24.8	92.6	53.2	2	4	1	6	4
015-026	65.4	4.2	9.9	87.5	4.0	5.3	3	34.4	39.1	56.5	17.6	137.4	29.8	3	4	2	4	4
015-027	62.8	4.2	11.6	84.2	3.5	7.0	4	38.8	42.9	68.0	12.9	118.8	18.8	3	4	2	4	4
015-028	45.6	6.2	12.7	85.1	3.8	6.5	4	34.1	36.9	66.7	18.0	100.6	15.0	2	4	1	4	4
015-029	50.3	6.3	14.0	84.4	4.7	7.9	3	28.8	33.0	54.0	17.7	80.0	14.3	2	4	1	4	4
016-020	51.9	4.2	10.3	81.5	3.1	6.1	2	32.0	37.0	71.6	10.8	152.8	69.4	3	4	2	5	4
016-021	59.7	3.3	10.0	85.5	2.7	3.5	2	34.2	40.8	62.7	11.0	93.4	27.0	3	4	2	5	4
016-022	66.0	2.1	7.7	87.1	4.2	5.9	3	36.3	46.6	61.4	19.7	74.4	19.2	2	2	1	6	4
016-023	47.5	5.5	12.9	83.7	3.2	5.6	2	32.3	37.5	67.1	11.8	118.0	51.2	3	4	2	6	6
016-024	52.9	3.0	9.6	86.6	3.4	4.5	3	35.9	39.0	73.0	15.1	122.4	34.4	2	4	1	4	4
016-025	49.6	5.4	13.1	80.2	3.4	8.0	2	36.2	42.2	59.0	15.1	111.2	21.2	3	4	2	6	6
016-026	55.7	4.3	11.5	87.1	3.4	4.4	3	34.7	38.8	60.4	12.9	143.0	47.0	3	4	1	6	4
016-027	58.5	2.6	7.4	84.1	2.5	4.6	2	33.9	40.5	67.2	11.0	124.4	44.8	3	4	2	6	4
016-028	45.0	5.4	12.8	84.7	2.6	4.5	1	31.5	36.6	69.0	12.1	130.4	46.6	3	4	1	5	4
016-029	46.8	4.8	11.4	85.4	3.8	5.7	3	34.9	42.3	58.2	15.9	110.8	31.4	2	4	1	6	6
017-020	51.6	1.4	5.5	86.8	2.9	2.9	3	29.7	33.7	64.2	11.3	142.8	36.0	3	4	1	3	4
017-021	54.1	4.3	11.7	83.4	3.2	6.6	2	34.2	36.3	66.7	11.1	118.2	53.0	3	5	2	4	4
017-022	71.8	0.1	3.7	87.2	3.8	4.8	3	37.5	45.7	65.5	24.1	102.2	18.8	3	4	2	5	4
017-023	61.9	3.0	9.7	84.3	2.1	3.2	2	31.5	35.3	69.1	12.1	157.6	59.0	2	2	2	6	4
017-024	61.0	-1.4	2.0	87.8	3.2	2.2	3	33.1	37.1	69.6	17.1	157.2	38.8	1	4	1	3	4
017-025	56.8	4.6	12.8	84.4	2.7	5.6	3	38.8	44.9	67.0	18.4	151.4	26.8	3	4	2	6	4
017-026	63.3	3.2	9.0	87.2	2.7	3.6	3	29.2	33.5	65.0	12.2	158.2	64.2	5	5	4	4	4
017-027	62.2	1.1	7.4	84.0	1.4	3.8	2	30.2	36.6	73.5	9.9	162.2	51.2	3	4	2	5	4
017-028	46.3	6.5	14.6	84.3	3.2	6.3	3	36.8	39.0	77.4	13.9	127.8	24.2	3	4	1	4	4

017-029	49.9	5.7	12.3	84.7	3.6	6.1	3	38.8	44.0	62.9	20.7	120.2	27.4	2	2	1	5	4
018-020	57.3	1.2	6.1	86.9	2.8	4.3	3	32.3	34.9	61.3	10.1	142.0	33.8	3	4	2	3	4
018-021	53.9	4.6	13.1	86.1	1.7	2.7	2	33.5	38.9	75.5	9.1	122.2	28.2	4	4	5	3	4
018-022	78.3	0.5	4.5	87.6	2.4	3.2	3	34.5	39.0	56.5	11.9	122.4	20.4	3	4	2	3	4
018-023	57.3	3.8	12.1	85.7	2.3	2.9	2	32.9	37.1	67.5	8.0	157.4	54.6	3	4	2	5	4
018-024	67.6	0.3	4.8	89.1	2.8	1.8	2	35.8	39.8	64.6	13.0	138.6	32.0	2	4	2	3	4
018-025	50.5	4.1	12.4	83.8	2.7	5.3	2	31.4	34.5	66.0	10.7	136.0	43.8	3	4	4	4	4
018-026	67.6	0.3	6.6	88.0	2.7	2.5	3	33.7	38.4	62.8	10.4	141.5	40.3	3	4	4	3	4
018-027	65.9	0.1	5.2	89.6	2.5	0.6	2	33.5	37.0	59.3	9.7	142.4	51.2	4	4	4	3	4
018-028	55.9	5.3	13.4	84.2	2.4	6.3	2	31.1	33.8	72.8	7.8	128.6	41.6	3	4	2	4	4
018-029	48.7	5.1	13.0	85.9	2.7	4.3	3	34.5	39.8	64.8	11.8	124.8	34.2	5	5	2	3	4
019-020	55.3	1.4	5.3	87.2	3.6	3.6	3	33.1	37.0	50.5	15.0	88.2	24.8	1	2	1	3	4
019-021	63.0	2.2	6.6	86.8	2.9	3.2	3	31.8	36.4	62.8	11.3	156.0	29.0	3	4	2	3	4
019-022	54.6	3.1	9.3	88.8	4.5	5.7	5	36.1	46.4	47.9	23.4	66.6	9.4	2	4	2	4	4
019-023	41.3	6.5	12.9	89.7	3.1	1.7	2	35.1	38.8	61.6	12.5	146.6	43.6	2	2	1	5	4
019-024	53.9	0.2	3.1	83.0	3.6	5.0	5	36.4	41.9	60.0	21.5	100.6	13.6	1	4	1	3	4
019-026	48.2	6.4	13.4	87.5	3.7	4.3	3	38.6	43.6	53.0	15.7	119.2	27.4	3	4	1	3	4
019-027	66.1	2.6	7.3	85.4	2.8	4.1	3	37.1	44.2	59.7	12.7	129.8	33.2	2	2	1	5	4
019-028	44.7	5.2	11.5	81.9	2.9	5.9	3	37.3	44.2	56.9	17.0	99.8	22.0	2	2	1	6	4
019-029	47.2	5.5	12.4	85.1	3.8	5.9	3	37.3	41.6	57.2	17.4	117.4	26.4	2	4	1	5	4
흑타리	42.6	4.6	11.3	80.4	4.0	10.1	5	31.8	39.8	77.4	17.0	105.4	22.6	3	4	2	5	4

<sup>a</sup> : Lab값측정 ; JCS-10 Colorimeter, Hangzhou CHNSpec Technology co.ltd

<sup>b</sup> : 갓단면 5:깊은갈, 4약간깊은갈, 3:얕은갈, 2:편평형, 1:얕은편평형

<sup>c</sup> : 수확량 ; g/850ml

<sup>d</sup> : 갯수

<sup>e</sup> : 대단단함; 5매우단단, 4단단, 3약간단단, 2약간무르다, 1무르다

<sup>f</sup> : 대탄력; 5매우탄력, 4탄력, 3보통, 2약간탄력, 1탄력없음

<sup>g</sup> : 대질감; 5매우질감, 4질감, 3보통, 2약간질감, 1안질감



H012J021



H012J024



H015J026



MS016-HH020



H016J024



MS017-HH020



MS017-HH022



MS017-HH029



MS018-HH022



MS018-HH029

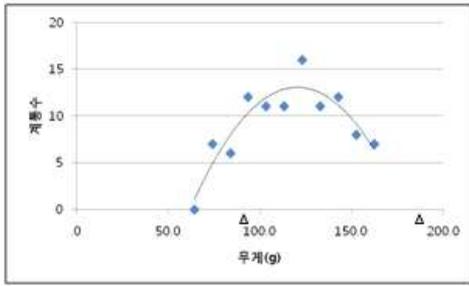


MS019-HH023

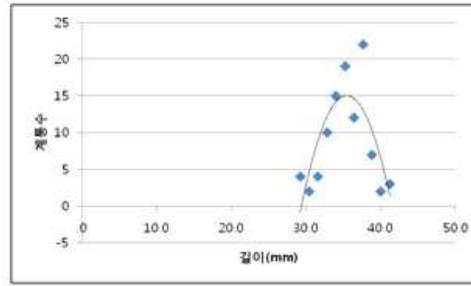


MS019-HH027

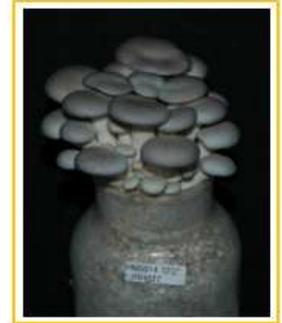
그림 2-15. HMS x JHH교배집단 자실체의 형태적인 특징



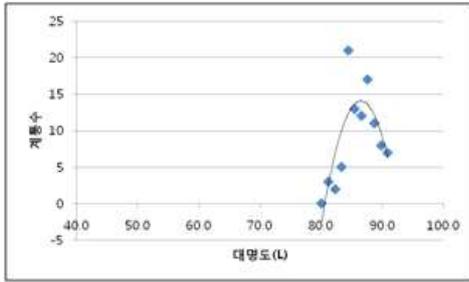
무게



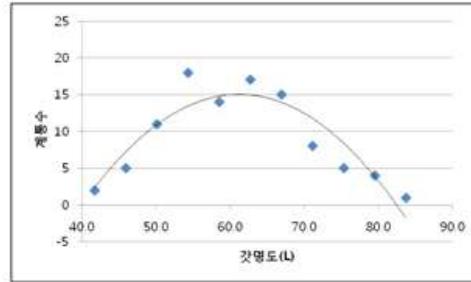
길이



HMS012xJHH021



대의 명도



갓의 명도



HMS016xJHH024

그림 2-16. 흑타리와 미소의 분리집단의 표현형 산포도 및 자실체 모습

### (3) 흑타리×미소 분리집단의 연관집단 구성

대립형질을 지닌 흑타리와 미소간의 교배를 통하여 선발한 평균적 F1에서 단핵군사 100개를 채취하여 분리집단을 구축하였다. 미소와 흑타리에서 유래한 SSR 프라이머를 이용하여 유전형 분석을 하고 Joinmap을 이용하여 11개의 연관집단(linkage group)을 구성하였다. 큰느타리버섯의 분리집단보다 분리비가 1:1이 안 되는 마커의 비중이 높았다. 추가적인 시험으로 표현형검증 데이터와 연관집단 데이터를 활용하여 QTL분석이 필요할 것으로 사료된다. 아울러 마커의 분리비가 1:1이 안 되는 비중이 지나치게 높다고 판단될 경우 새로이 단핵군사를 무작위로 채취하여 분리집단의 건전성을 높일 필요도 있다고 사료된다(그림 2-17).

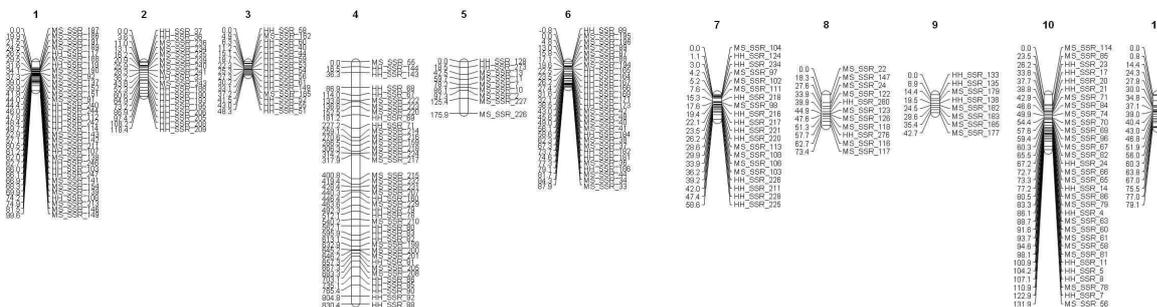


그림 2-17. 흑타리와 미소의 분리집단을 이용한 연관집단

라. 느타리버섯 흑타리와 미소의 유전체 및 SSR 분석

(1) 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 표준배법으로 생육시켜 표현형질을 분석하였다. 교잡균주 JHH021×HMS012가 갖색, 대색, 수량성에 있어 집단의 평균값을 보여서(data not shown), JHH021와 HMS012계통을 연구대상으로 선발하였다. 이들의 계통의 유전체는 어버이의 염색체가 감수분열 동안 일어나는 재조합의 결과이므로 어버이 유전체의 평균적인 특성을 지녔을 것으로 예측할 수 있다. 균사분말에서 gDNA를 추출하여 DNA template Prep Kit 2.0 (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA)와 Blue Pippin system(Sage Science, Inc, Beverly, MA, USA)을 이용하여 library를 구축하고 Pacific Biosciences SMRT (PacBio) sequencing system을 통해 유전체를 해독하여 PacBio 내장 프로그램으로 alignment를 통하여 contig로 조립하였다. JHH021와 HMS012계통의 유전체 크기는 각각 40.8 Mbp와 40.3 Mbp(표 2-13)로 사철느타리(*P. ostreatus* var. *florida*)로 알려진 PC15과 PC9 의 34.3 Mbp와 35.6Mbp에 비해 약 117% 컸다(Riley et al., 2014). 큰느타리의 유전체 크기인 43 Mbp보다는 크기가 적었다(Ryu et al., 2012). 느타리류 유전체 해독보고의 예가 많지 않으므로 이것이 전형적인 느타리, 사철느타리, 큰느타리의 유전체 크기인지는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다(표 2-13).

표 2-13. 흑타리단핵 JHH021, 미소단핵 HMS012와 다른 느타리류의 유전체 크기비교

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)	19	572	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	

(2) 흑타리와 미소 SSR 분포와 특징

SSR Locator I (Maia et al,2008)을 이용하여 최소한 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(표 2-14). 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 상관성이 없다고 알려져 있으나(Karaoglu et al., 2005), 이번 결과는 일반 느타리인 JHH021와 HMS012계통의 유전체의 크기가 사철느타리 보다 크고 SSR의 개수도 많았다. 또한, 크기가 117% 큼에도 약 134% 많

은 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 10-100여 개 사이라고 했는데 본 연구에서의 결과는 이에 부합됨을 확인할 수 있었다(Karaoglu, 2004; Labbé et al., 2011). 분석 결과, 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.

표 2-14. 버섯곰팡이 유전체내 SSR 분포

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

반복서열의 분포 비율을 살펴보면, 비교한 5개 유전체내에서 가장 높은 빈도를 보인 3가지 형태는 3-mers, 6-mers와 8-mers로 나타났다(표 2-14), 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, 2004). 또한 일반적으로 곰팡이의 유전체내 SSR은 인간의 유전체에 있는 것보다 빈도수와 길이가 긴 경우가 적다고 알려져 있는데(Karaoglu et al., 2005), 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 관련 있다는 보고가 있으므로(Li et al., 2004), 각 유전체 별로 분석해보았는데, 5개 유전체 모두 20-30 bp크기가 가장 높은 빈도를 보여주었고 길이가 길어질수록 빈도수가 낮아지는 경향이였다(그림 2-18). 이는 자낭균문 곰팡이의 SSR의 길이 분포와 일치하는 결과이다(Karaoglu, 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, 이들 간의 생물학적인 의미를 파악하는 것은 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다.

분자마커는 버섯을 비롯한 생물의 표현형질과 연관된 유전인자를 관찰하는데 중요한 역할을 하며, 유전자의 genome 상의 위치 파악, 마커를 기반으로 한 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, 갯형, 갯색, 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.

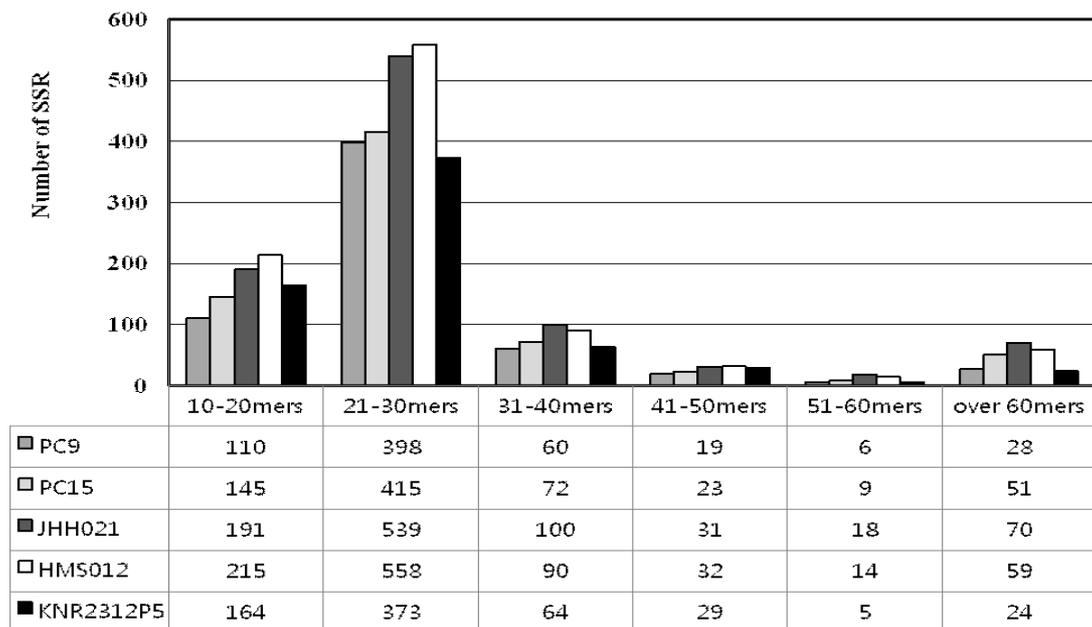


그림 2-18. 느타리류 유전체내에서의 SSRs의 길이 분포비교도

#### 마. 느타리버섯 품종판별 마커 개발

(1) RAPD와 큰느타리버섯 SSR을 이용한 품종간 다형화 단편 탐색

느타리버섯의 품종 중 국내에서 가장 많이 재배되고 있는 품종이 흑타리, 수한1호, 춘추2호, 화성2호, 곤지7호이다. 이들 품종은 균사상태와 배양상태에서는 구분이 되지 않음으로 품종혼종사고와 무등록품종의 불법유통의 원인이 되어 왔다. 이를 해결하기 위하여 품종판별마커를 개발하고자 한다. 새송이의 유전자 정보를 기반으로 하여 제작한 400여개의 SSR 마커를 사용하여 다형성을 나타내는 8개의 SSR 마커를 선별하였다. 그 중에서 곤지 7호, 수한 1호, 화성 2호, 춘추 2호와 흑타리 등 5개의 품종간의 다형성을 보이는 마커 중에서 3개의 SSR 마커를 선별하였다. 선별된 3개의 마커를 이용하여 품종간 특이적으로 나타난 PCR 증폭 밴드를 비교 분석한 결과, SSR 144 마커를 통해 300bp, 320bp에서 나타난 밴드를 통해 곤지 7호, 수한 1호, 화성 2호가 춘추 2호, 흑타리와 다른 밴드 증폭 양상을 보임을 알 수 있었다(그림 2-19).

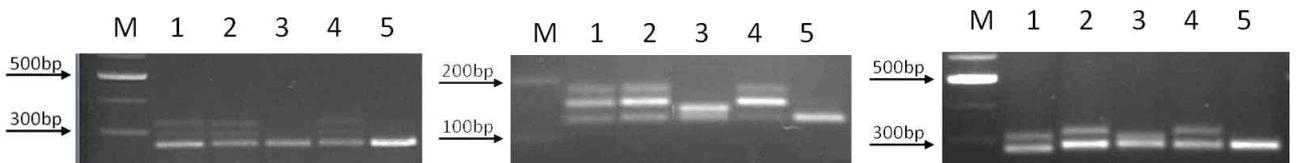


그림 2-19. 느타리버섯 품종별 다형성 밴드. 1: 곤지 7호, 2: 수한 1호, 3: 춘추 2호, 4: 화성 2호, 5: 흑타리 SSR 144, SSR 166, SSR 402

그리고 SSR 166 마커에서는 140bp, 150bp, 170bp 그리고 180bp에서 관찰되는 4가지 밴드 패턴을 보였다. 140bp에서는 5개 종간 모두 PCR 증폭 밴드가 나타났으며, 170bp와 180bp에서 관찰되는 PCR 증폭밴드는 SSR 114 마커에서 관찰된 바와 같이 곤지 7호, 수한 1호, 화성 2호와 춘추 2호 흑타리간의 구분이 됨을 확인할 수 있었다. 이와 달리 약 150bp에서 관찰된 PCR 증폭 밴드는 5개 품종 간에서 춘추2호에서만 관찰되었다(그림 2-19).

다음으로 SSR 402 마커에서는 3가지 밴드 양상이 관찰되었는데, 약 280bp에서는 5개 품종에서 모두 증폭되었다. 그리고 곤지 7호와 춘추 2호에서 300bp에서 밴드가 관찰됨에 따라 이들 품종이 수한 2호, 화성 2호, 흑타리와 구분되었다. 이와 달리 수한 1호, 화성 2호에서 310bp에서 PCR 증폭 밴드를 확인할 수 있었다(그림 2-19).

이를 통해서 이들 3종류의 SSR 마커를 통해서 5개 품종간의 구분을 할 수 있는 유용한 마커로 사용이 될 것으로 보인다. 이제까지 개발된 느타리버섯 판별마커는 한 품종에 대한 단일 마커라고 한다면 이번에 개발된 마커는 3개의 프라이머로 동시에 5개의 주요품종을 판별할 수 있는 것이다. 그렇지만 자실체의 특성이 비슷한 화성2호와 수한1호가 완전히 명확하게 판별되지 않는 문제가 남아있다.

#### (나) 느타리버섯 유전체 SSR을 이용한 품종간 다형화 단편 탐색

명확하고 간단하게 느타리버섯 주요품종을 판별하기 위하여 미소와 흑타리의 유전체서열에서 SSR을 추출하고 프라이머를 디자인하여 주요 느타리품종이지만 차이가 적은 수한1호, 화성 2호, 김제9호를 대상으로 품종판별에 적합한지 탐색하였다. 흑타리에서 유래된 SSR 프라이머가 더 다형화 현상이 많이 관찰되었다. JHH19, JHH222, JHH228, JHH234, JHH271 프라이머의 경우

수한1호 혹은 김제9호와 화성2호간의 구별은 되는데, 수한1호와 김제9호간의 구별은 되지 않았다(그림 2-20).

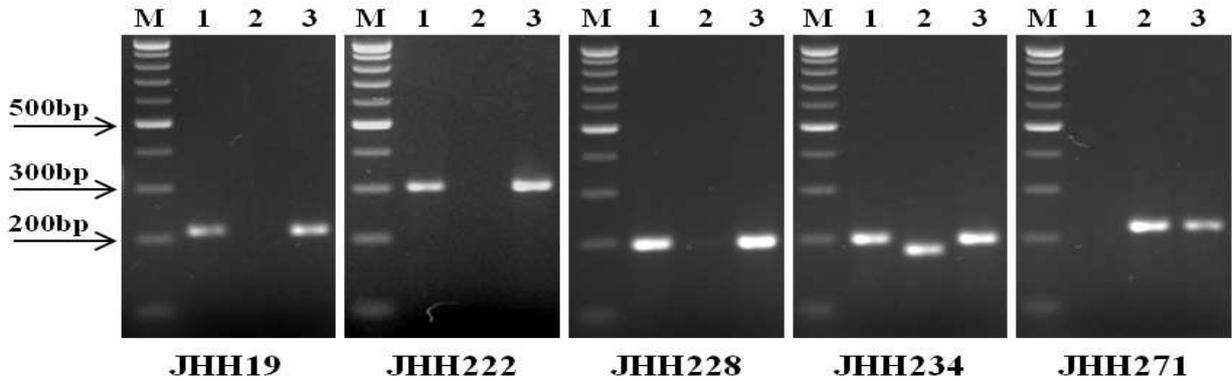


그림 2-20. 느타리유전체 유래 SSR을 이용한 주요느타리품종 판별 1 : 수한 1호, 2 : 화성 2호, 3 : 김제9호

JHH SSR 184 프라이머의 경우 수한1호, 화성2호, 김제9호를 동시에 판별할 수 있었다. 그런데, 한 개의 locus가 증폭된 것이 아니고 품종에 따라서 1-2개씩 증폭되었다. 처음의 전기영동사진에는 다른 비특이 밴드가 많았으나(data not shown) 프라이머 결합온도를 상향조절하고 나서는 품종에 특이적인 밴드만 증폭되었다(그림 2-21) 총 4군데의 약 168bp, 195bp, 393bp, 411bp DNA loci가 품종마다 다른 패턴으로 증폭되어 품종간의 다형화 현상을 보였다.

앞서의 주요 3품종 외에 곤지7호, 흑타리, 춘추2호, 원형1호, 구슬, 한라2호도 명확하게 구분할 수 있다(그림 2-21).

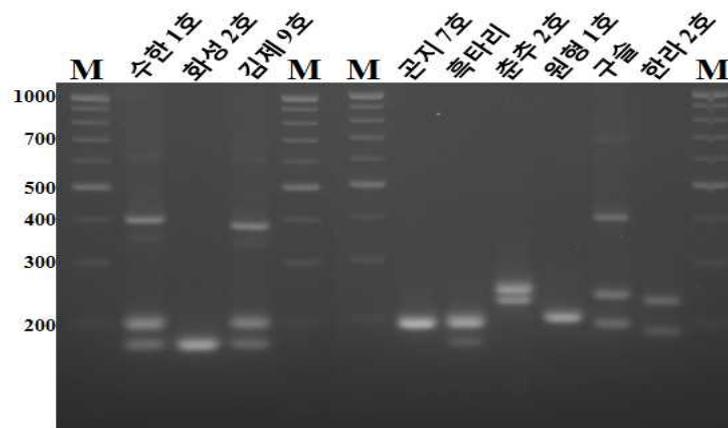


그림 2-21. 프라이머 JHH SSR 184의 주요 느타리버섯 품종판별 결과

다른 느타리품종을 포함하여 특이밴드를 모두 서열분석 하였더니 증폭되는 loci가 9개로 반복되는 서열이 4종류였다(표 2-15). 각 서열 중 가장 긴 서열은 다른 작은 서열을 포함하고 있었으며, 가장 작은 단위인 168 bp가 원형(proto type)으로 판단되었다. JHH SSR 184가 흑

타리의 유전체에서 유래된 것인데, 흑타리는 정확하게 예측된 크기대로 증폭되었다. 사본수는 원형으로 추정되는 168에는 1개, 그 외에는 1.8-14.1로 다양하였다. 아마도 감수분열과정에서 이러한 다양성이 생겨났을 것으로 추정된다. 본 품종판별 프라이머는 특허출원하였다.

표 2-15. 느타리품종별 특이밴드의 반복서열, 사본수 및 검출된 품종

Locus (length)	Cultivar detected	Repeat motif*	Copy number**
168 bp	Suhan 1ho, Hwaseong 2ho, Kimjae 9ho	<b>CGTCCTCGT</b>	1.0
187 bp	Halla 2ho	<u>CCTCGTCGA</u>	2.8
195 bp	Suhan 1ho, Kimjae 9ho, Gonji 7ho, Heuktari, Guseol	<u>CCTCGTCGA</u>	3.8
204 bp	Wonhyeong 1ho	<b>CGTCCTCGT</b>	4.7
231 bp	Chunchu 2ho, Halla 2ho	<b>CGTCCTCGTCGACCTCGT</b>	4.1
240 bp	Guseol	<u>CCTCGTCGA</u>	8.8
250 bp	Chunchu 2ho	<b>CGTCCTCGT</b>	10.1
393 bp	Kimjae 9ho	<b>CGTCCTCGTCGACCTCGT</b>	13.1
411 bp	Suhan 1ho, Guseol	<b>CGTCCTCGTCGACCTCGT</b>	14.1

\* Sequences in bold or underline are the same repeat motif. ND means not detected.  
 \*\* Copynumberin168bp was from a manual curation, for the rest, from tandem repeat finder(<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>).

#### 바. 결론

- (1) 큰느타리버섯의 유전지도 작성결과 12개 연관집단이 구성되었다.
- (2) 품질, 수량과 연관된 QTLs은 좁은 지역에 집적되어 있는 것으로 판단되었다.
- (3) 맛색과 수량관련 QTLs은 전체 표현형의 52.3%와 44.9%의 설명력( $R^2$ )을 보여주었다.
- (4) 수량과 관련된 후보 유전자는 전사인자와 많은 효소가 포함되었다.
- (5) 큰느타리버섯 분리집단을 303개로 늘리고 유전형분석결과 다형화 74개, 무다형성 6개, 무증폭은 1개로 조사되었다.
- (6) 추가적인 유전형 데이터를 기존결과에 결합결과 수량관련 locus에 해상도가 향상되었다.
- (7) 큰느타리버섯의 단핵군사 교배형 A4Bx를 단시간에 검출할 수 있는 마커를 개발하였다.
- (8) 느타리버섯 미소와 흑타리 유전체로부터 SSR 프라이머 264개와 282개를 제작하였다.
- (9) 흑타리×미소 분리집단에서 다형성을 보인 119개를 사용하여 11개 유전지도를 구축하였다.
- (10) 미소로부터 유래한 SSR 프라이머로 느타리버섯 주요 품종을 판별할 수 있는 PCR 프라이머를 개발하였다.

<제 3세부> 양송이의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

가. 유전자원 확보 및 양송이버섯 유전자원 주요형질 특성자료 구축

(1) 양송이 유전자원 수집

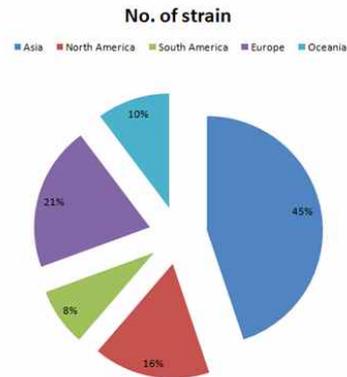
- 아시아지역 22점(한국 자원 13점), 북미 도입 8점, 남미지역 도입 4점, 유럽지역 10점 등 총 49점 (백색종 29점, 갈색종 20점)을 수집 및 분양받아 확보하였다(표 3-1, 표 3-2).

표 3-1. 양송이버섯 유전자원 수집자원의 기본정보 (49점)

계통명	도입지역	품종명	색상	계통명	도입지역	품종명	색상
ASI1337	한국	새아	백색	ASI1340	영국		백색
ASI1348	한국	새도	백색	ASI1343	브라질		백색
ASI1347	한국	새연	백색	ASI1345	호주	A15	백색
ASI1338	한국	새정	백색	ASI1400	일본		백색
ASI1350	한국	새한	백색	ASI1415	한국	호감	갈색
ASI1346	한국	737	백색	ASI0705	한국	705	갈색
ASI1024	대만		백색	ASI1007	한국		갈색
ASI1038	미국		백색	ASI1032	미국		갈색
ASI1054	프랑스		백색	ASI1053	프랑스		갈색
ASI1072	덴마크		백색	ASI1074	미국		갈색
ASI1085	캐나다		백색	ASI1078	미국		갈색
ASI1089	프랑스		백색	ASI1086	캐나다		갈색
ASI1096	스위스		백색	ASI1103	일본		갈색
ASI1140	독일		백색	ASI1146	한국		갈색
ASI1179	중국		백색	ASI1153	한국		갈색
ASI1183	미국		백색	ASI1159	캐나다		갈색
ASI1195	페루		백색	ASI1167			갈색
ASI1225	한국		백색	ASI1177	일본		갈색
ASI1246	한국		백색	ASI1320	네덜란드		갈색
ASI1310	중국		백색	ASI1323	뉴질랜드		갈색
ASI1313	슬로베니아		백색	ASI1325	뉴질랜드		갈색
ASI1321	네덜란드		백색	ASI1331	브라질		갈색
ASI1324	호주		백색	ASI1336	브라질		갈색
ASI1326	뉴질랜드		백색	ASI1396	한국		갈색
ASI1339	베트남		백색				

표 3-2. 수집자원 대륙별 분포현황

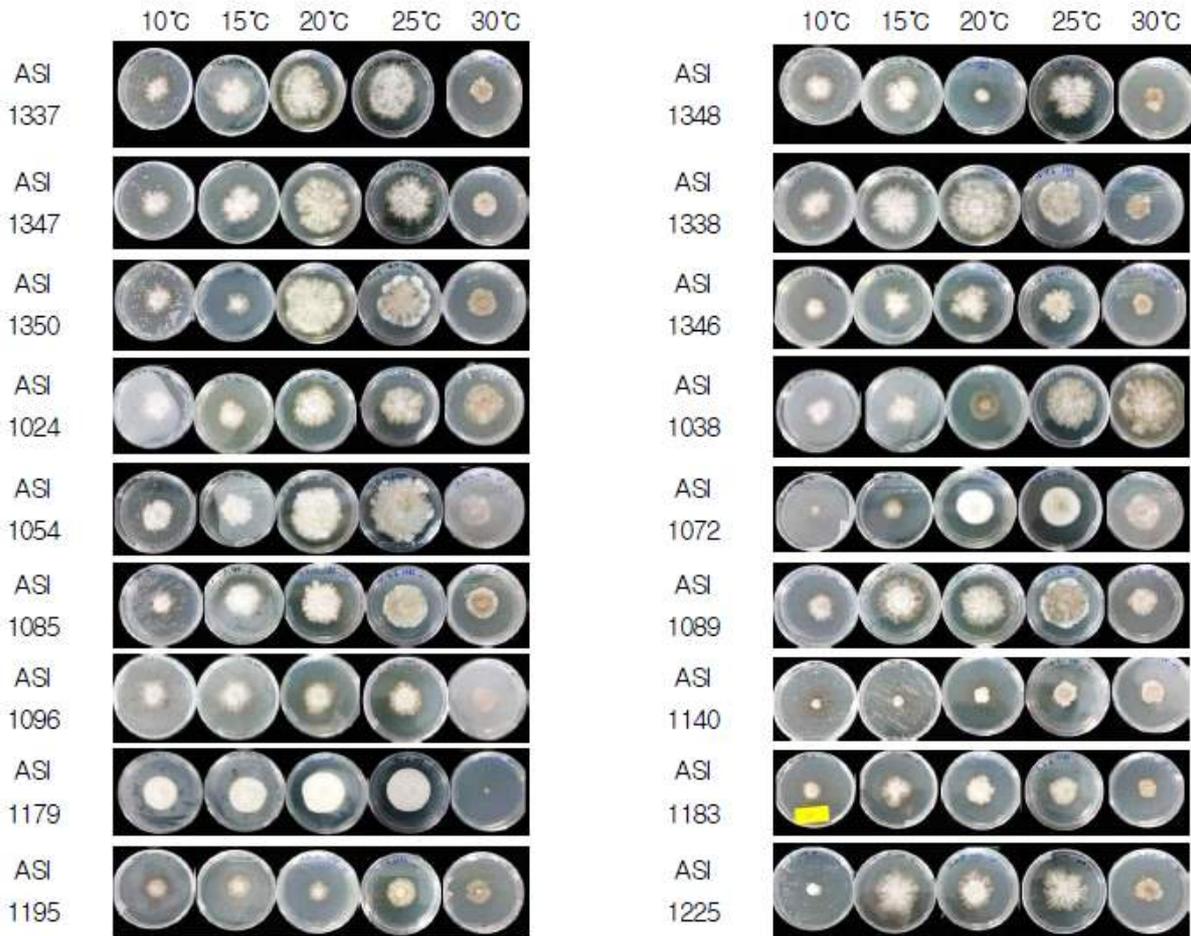
	구분	유전자원수	비고
대륙	Asia	22	
	North America	8	
	South America	4	
	Europe	10	
	Oceania	5	
계		49	
색상	White	29	
	Brown	20	
계		49	



(2) 양송이 수집 균주에 대한 주요 형질 특성 평가

(가) 온도별 양송이 버섯 균사 성장속도 조사

- 양송이 버섯 수집균주의 온도별 균사성장속도를 조사하기 위해 90mm 페트리디쉬에서 배양한 균주의 균총가장자리 부위를 직경 5mm cork borer로 잘라 PDA 배지에 접종한 다음, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃ 및 30℃의 배양기에서 14일간 배양 후 성장한 균총의 직경을 측정하였다(그림 3-1).



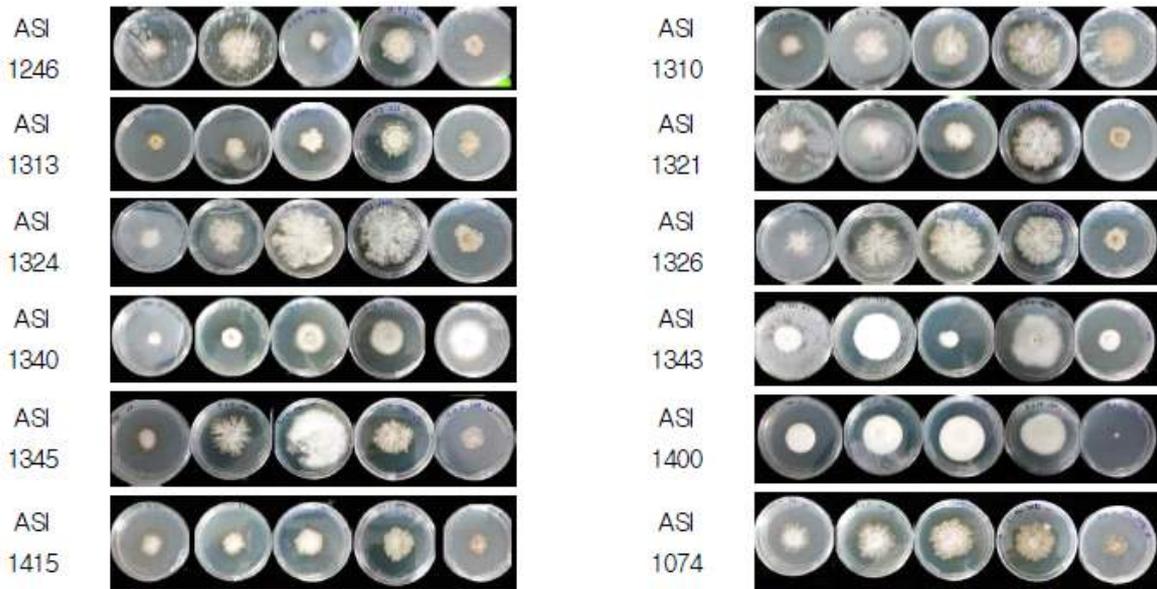


그림 3-1. 양송이 수집자원의 배양온도별 균사생장특징

- 10℃에서 하루 평균 성장길이는 1.28mm였고, ASI1024은 1.83mm으로 가장 생장이 우수하였으나 ASI1140은 0.55mm로 생장이 가장 저조하였으며, 3.3배 정도 성장속도의 차이가 확인되었다. 15℃에서 하루 평균 성장길이는 1.70mm였고(0.64mm~2.69mm), 20℃에서는 하루 평균 성장길이가 2.23mm (3.96mm~2.7mm) 였으며, 30℃에서는 하루 평균 성장길이는 1.69mm였고, ASI1340은 2.88mm로 가장 생장이 우수하였으나, ASI1153은 0.89mm로 생장이 가장 저조하였다(표 3-3).
- 양송이 버섯 수집자원의 온도별 균사생장 속도를 조사한 결과, 일반적으로 25℃에서 균사 생장이 가장 좋았고, 20℃ > 15℃ > 30℃ > 10℃ 순으로 균사생장이 빨랐다(그림 3-2).
- 특히 국내 육성종 중 ASI1338은 10, 15, 20℃에서 A등급으로 분류되었고, 25℃ B등급, 30℃에서 C등급으로 20℃이하의 낮은 온도에서 균사 생장이 우수하였다(표 3-4).

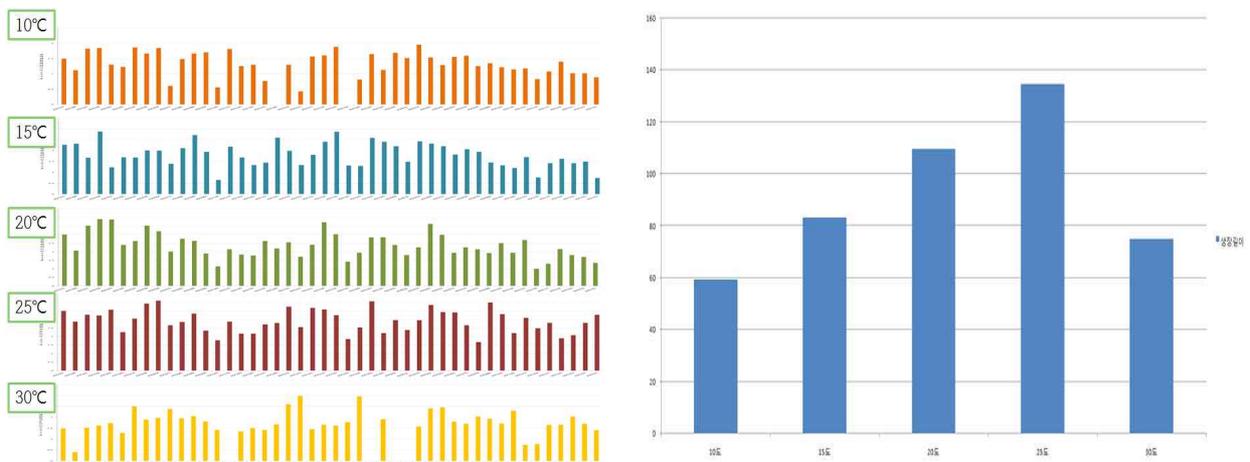


그림 3-2. 수집자원의 온도별 균사생장 속도

표 3-3. 온도별 양송이버섯 균사생장속도

Information of Strain (48 strains)	Colony characteristics	Mycelium growth rate (mm/day on PDA) by temperature				
		10℃	15℃	20℃	25℃	30℃
ASII007	Strand aerial	1.49±0.10	2.28±0.10	3.54±0.23	3.53±0.40	2.38±0.62
ASII024	Strand fluffier	1.83±0.11	1.71±0.07	2.28±0.30	2.92±0.25	2.30±0.20
ASII032	Strand aerial	1.26±0.24	2.15±0.18	2.79±0.23	3.28±0.48	2.36±0.16
ASII038	Strand fluffier	1.63±0.15	1.88±0.26	3.43±0.25	3.73±0.32	1.85±0.09
ASII053	Strand fluffier	1.50±0.11	1.77±0.26	1.81±0.66	3.31±0.30	1.73±0.37
ASII054	Strand fluffier	1.80±0.30	1.93±0.10	3.04±0.72	3.86±0.24	1.93±0.09
ASII072	Appressed	0.57±0.03	1.33±0.26	1.92±0.17	2.64±0.06	2.36±0.06
ASII074	Strand fluffier	1.57±0.13	1.96±0.21	2.18±0.25	2.57±0.15	1.65±0.12
ASII078	Strand fluffier	1.24±0.20	1.89±0.33	2.17±1.05	1.61±0.20	1.94±0.39
ASII085	Appressed	1.45±0.11	2.03±0.18	2.59±0.20	2.78±0.25	1.89±0.06
ASII086	Strand aerial	1.32±0.07	1.41±0.30	1.83±0.25	3.78±0.35	1.85±0.13
ASII089	Strand aerial	1.58±0.12	2.66±0.13	2.56±0.16	3.31±0.10	1.98±0.26
ASII096	Strand fluffier	1.67±0.17	1.88±0.19	1.87±0.23	2.26±0.11	1.72±0.11
ASII103	Strand aerial	1.13±0.16	1.30±0.29	2.32±0.43	3.10±0.27	1.68±0.06
ASII140	Strand fluffier	0.55±0.06	0.64±0.06	1.05±0.11	1.66±0.33	1.35±0.07
ASII146	Appressed	1.10±0.22	1.17±0.12	1.93±0.05	2.09±0.25	2.22±0.13
ASII153	Strand aerial	1.15±0.08	1.66±0.06	2.53±0.30	3.03±0.45	0.86±0.26
ASII159	Strand fluffier	0.87±0.04	0.74±0.06	0.99±0.20	2.35±0.60	0.89±0.32
ASII167	Strand aerial	1.01±0.09	1.39±0.06	1.09±0.09	2.17±0.45	1.34±0.31
ASII177	Strand aerial	1.07±0.19	1.36±0.36	1.27±0.44	2.67±0.52	1.37±0.42
ASII179	Appressed	1.79±0.08	2.10±0.26	2.14±0.49	2.86±0.09	-
ASII183	Strand fluffier	1.19±0.06	1.57±0.21	1.91±0.63	2.10±0.13	1.27±0.17
ASII195	Strand fluffier	1.27±0.25	1.30±0.05	1.62±0.46	2.12±0.08	1.43±0.13
ASII225	Strand fluffier	0.73±0.07	1.37±0.64	1.77±0.79	2.64±0.28	1.38±0.20
ASII246	Strand fluffier	1.35±0.10	2.26±0.52	1.92±0.24	2.66±0.88	1.42±0.16
ASII310	Strand fluffier	1.24±0.07	1.91±0.18	2.41±0.54	3.58±0.19	2.54±0.22
ASII313	Strand fluffier	1.02±0.23	1.38±0.21	1.63±0.25	2.45±0.22	1.95±0.52
ASII320	Strand fluffier	1.38±0.06	1.58±0.12	1.96±0.24	1.86±0.19	1.60±0.12
ASII321	Strand fluffier	1.47±0.16	1.68±0.36	2.26±0.73	3.56±0.07	1.41±0.05
ASII323	Strand fluffier	1.00±0.10	1.32±0.09	1.74±0.53	1.97±0.06	1.77±0.85
ASII324	Strand fluffier	1.51±0.16	2.23±0.26	3.60±0.05	3.54±0.48	1.61±0.28
ASII325	Strand fluffier	0.99±0.09	1.43±0.26	1.65±0.14	2.67±0.27	1.66±0.14
ASII326	Strand fluffier	1.80±0.08	2.69±0.20	2.96±0.25	3.24±0.38	1.53±0.14
ASII331	Strand fluffier	0.84±0.17	0.73±0.12	1.19±0.24	2.78±0.30	1.38±0.12
ASII336	Strand fluffier	1.02±0.09	1.16±0.21	1.45±0.24	1.71±0.45	1.34±0.18
ASII337	Strand fluffier	1.39±0.16	2.20±0.13	2.88±1.06	3.44±0.40	1.38±0.09
ASII338	Strand aerial	1.79±0.09	2.68±0.22	3.82±0.03	3.16±0.18	1.55±0.09
ASII339	Appressed	0.86±0.14	1.11±0.20	1.48±0.17	1.80±0.12	1.81±0.10
ASII340	Appressed	0.73±0.13	1.09±0.23	1.90±0.10	2.52±0.04	2.88±0.07
ASII343	Appressed	1.61±0.08	2.52±0.30	2.60±0.61	3.96±0.34	1.98±0.55
ASII345	Strand fluffier	1.07±0.03	2.23±0.11	2.72±1.00	1.98±0.55	1.75±0.53
ASII346	Strand fluffier	1.18±0.14	1.60±0.28	2.20±0.17	2.18±0.10	1.25±0.07
ASII347	Strand fluffier	1.77±0.37	1.63±0.32	3.36±0.17	3.18±0.16	1.49±0.15
ASII348	Strand fluffier	1.10±0.58	1.95±0.45	1.88±0.64	2.78±0.26	1.34±0.19
ASII350	Strand aerial	1.33±0.26	1.18±0.09	3.83±0.15	3.72±0.44	1.63±0.08
ASII396	Strand aerial	1.34±0.12	1.84±0.14	1.88±0.09	1.48±0.16	0.99±0.10
ASII400	Appressed	1.67±0.05	2.16±0.17	2.36±0.39	2.83±0.14	-
ASII415	Strand fluffier	1.43±0.12	1.43±0.07	1.77±0.16	2.32±0.21	1.63±0.40

표 3-4. PDA배지상 양송이버섯 수집자원의 배양온도별 균사생장속도에 따른 그룹정렬

Temperature (°C)	Group of Agaricus bisporus strains				
	A <sup>1</sup>	B	C	D	E
10	0705, 1024, 1054	1343, 1089, 1074	1320, 1246, 1396	1346, 1153, 1103	1323, 1325, 1159
	1326, 1338, 1179	1324, 1053, 1007	1086, 1350, 1195	1348, 1146, 1345	1339, 1331, 1225
	1347, 1096, 1400	1321, 1085, 1415	1032, 1310, 1078	1177, 1313, 1336	1340, 1072, 1140
	1038	1337	1183	1167	
15	1326, 1338, 1089	1348, 1400, 1032	1096, 1396, 1053	1415, 1325, 1086	1103, 1146, 1350
	1343, 0705, 1007	1179, 1085, 1074	1024, 1321, 1153	1167, 1313, 1225	1336, 1339, 1340
	1246, 1324, 1345	1054, 1310, 1078	1346, 1347, 1320	1177, 1072, 1323	1159, 1331, 1140
	1337	1038	1183	1195	
20	1338, 1350, 1324	1345, 1343, 1085	1321, 1346, 0705	1340, 1183, 1396	1325, 1313, 1336
	1007, 1038, 1347	1089, 1153, 1225	1074, 1179, 1246	1096, 1348, 1053	1339, 1331, 1177
	1054, 1326, 1337	1024, 1310, 1103	1320, 1078, 1146	1086, 1415, 1323	1167, 1140, 1159
	1032	1400	1072	1195	
25	1343, 1054, 1086	1089, 1053, 1032	1400, 1348, 1085	1074, 1340, 1313	1146, 1345, 1323
	1038, 1310, 1321	1326, 1347, 1338	1331, 0705, 1177	1159, 1415, 1096	1320, 1339, 1336
	1324, 1007, 1337	1103, 1153, 1024	1325, 1246, 1072	1346, 1167, 1195	1140, 1078, 1396
	1350	1179	1225	1183	
30	1340, 1310, 1024	1078, 1054, 1085	1323, 1103, 1350	1347, 1195, 1246	1167, 1336,
	1007, 1072, 1032	1038, 1415, 1086	1325, 1074, 1324	1321, 1337, 1225	1183, 1346,
	1146, 1343, 1089	1339, 1096, 1345	1320, 1338, 1326	1331, 1140, 1177	1396, 1159, 1153
	1313	1053	0705	1348	

<sup>1</sup> : A(Strong)>B>C>D>E(weak),

At Group A - Red color is Brown starin /Blue color is domestic breeding strain

- 온도조건별 상관분석 결과 10°C 조건은 15°C, 20°C, 25°C 조건과 정의 상관을 보였으며, 15°C 조건 또한 20°C, 25°C 와 유의한 정의상관을 보였으며, 20°C -25°C 간에 정의 상관을 보였으나, 30°C 조건은 다른 온도 조건과 상관이 없는 것으로 나타났다(표 3-5).
- 조사된 모든 균주는 20°C 에서 최대 성장속도를 보이는 균주(8점), 25°C 에서 최대 성장속도를 보이는 자원(32점)으로 분류되었으며, 특히 4개 균주는 30°C 까지 지속적으로 증가하는 양상을 보였다(그림 3-3).
- 슬로베니아 수집 균주인 ASI1313의 경우에는 30°C 까지 지속적으로 균사생장속도가 증가하는 것으로 조사되어 향후 고온 생장 적응 균주로 활용가치가 있을 것으로 판단되었다(그림 3-4).

표 3-5. 균사배양온도에 따른 상관관계분석

	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
10°C	1				
15°C	0.72**	1			
20°C	0.58**	0.61**	1		
25°C	0.48*	0.44*	0.63**	1	
30°C	0.069	0.13	0.23	0.27	1

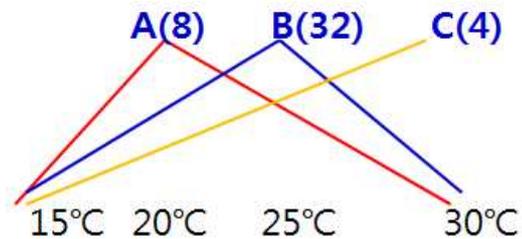


그림 3-3. 수집 균주의 온도별 균사생장 속도 반응

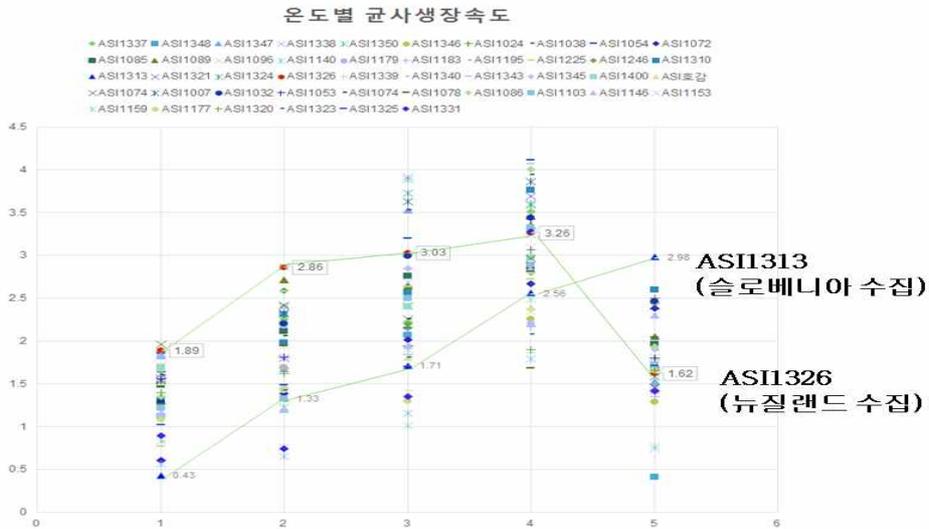
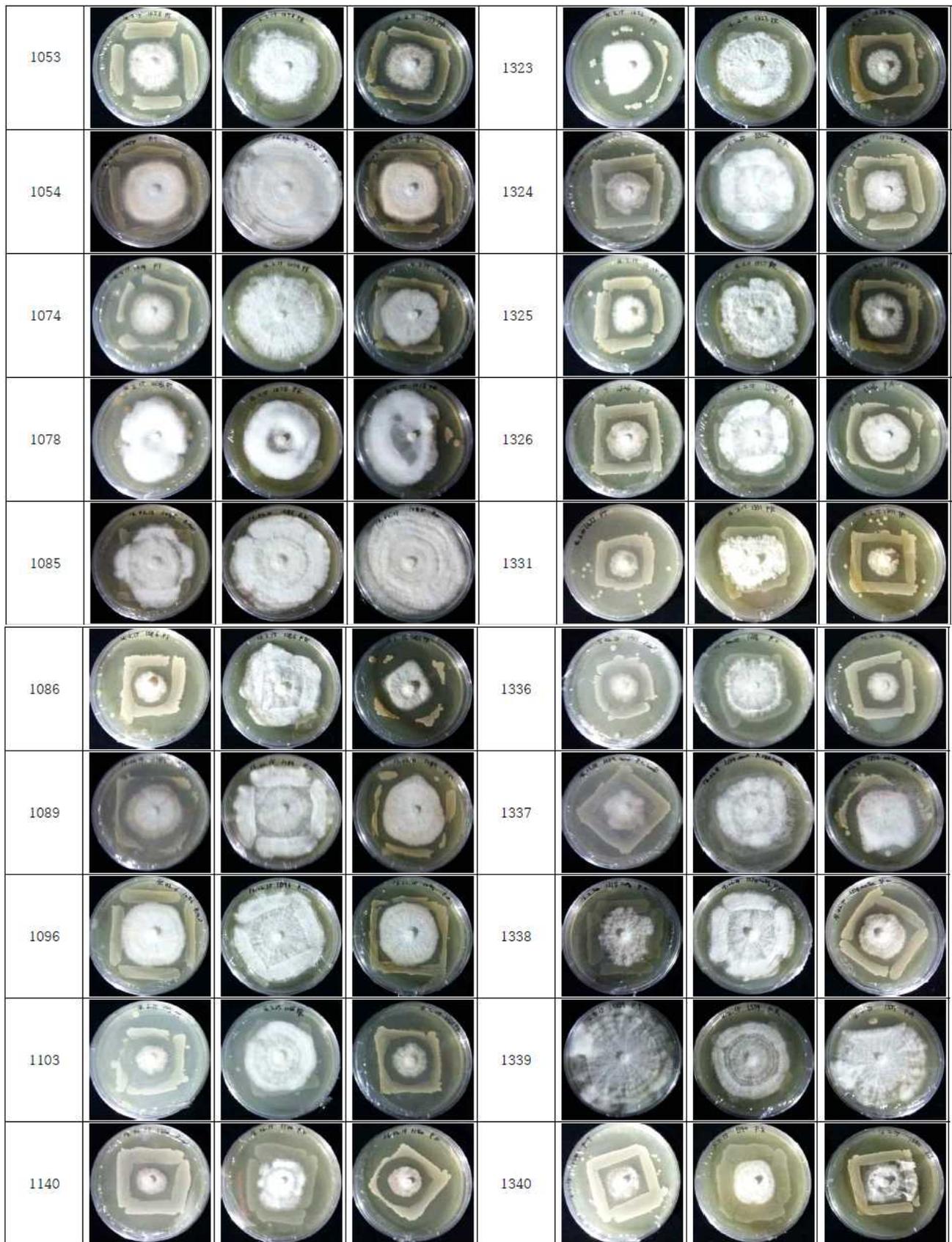


그림 3-4. 수집자원의 온도별 균사생장 속도

(나) 세균성갈색무늬병 저항성 검증

- 세균성갈색무늬병 유발균주는 국립원예특작과학원 버섯과에서 수집하여 분양받은 *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans*, *P. agarici* 균주를 시험에 활용하였다. 저항성 검증시험을 위한 시험배지는 자체제조한 CDA배지와 시판 중인 R2A배지(BD, USA)를 추천량의 1/2씩 혼합하여 제조하였다. 혼합된 합성배지에 양송이버섯 균주를 cork borer를 이용하여 5mm 크기로 접종한 다음 7일간 배양하였다. 7일간 배양한 후 원형으로 배양된 양송이버섯 균총의 바깥쪽으로 10mm 지점에 세균성갈색무늬병 유발균주를 사각형 형태로 도말해 준 후, 20일간 배양하여 균사생장양상을 관찰하여 저항성 유무를 검증하였다(그림 3-5, 표 3-6).

No. of ASI	Name of <i>Pseudomonas</i> sp.			Number of ASI	species of <i>Pseudomonas</i> sp.		
	<i>P. tolaasii</i>	<i>P. reactans</i>	<i>P. agarici</i>		<i>P. tolaasii</i>	<i>P. reactans</i>	<i>P. agarici</i>
1007				1310			
1024				1313			
1032				1320			
1038				1321			



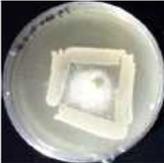
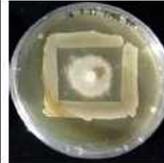
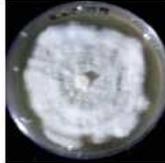
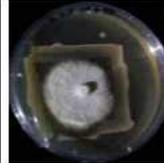
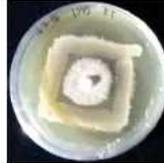
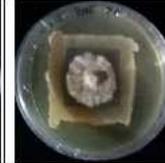
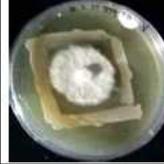
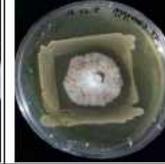
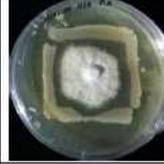
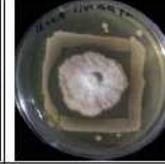
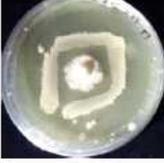
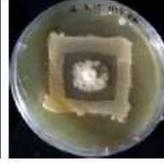
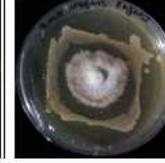
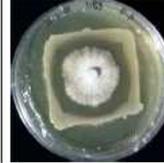
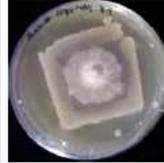
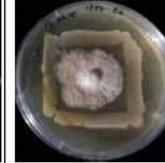
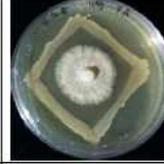
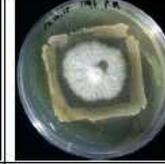
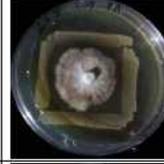
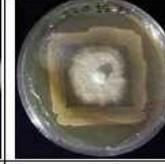
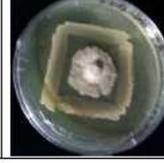
1146				1343			
1153				1345			
1159				1346			
1167				1347			
1177				1348			
1183				1350			
1195				1396			
1225				호감			
1246							

그림 3-5. 수집 양송이의 세균성 갈반병 저항성 조사 결과

표 3-6. 수집 양송이의 세균성갈반병 저항성 정도

Information of Strain (45 strains)	Degree of resistance to <i>Pseudomonas sp.</i>		
	<i>P. tolaasii</i>	<i>P. reactans</i>	<i>P. agarici</i>
ASII007	+++	+++	+++
ASII024	++	+++	++
ASII032	++	+++	++
ASII038	++	+++	+++
ASII053	+	++	+
ASII054	++	+++	++
ASII074	+	+++	++
ASII078	++	++	++
ASII085	+++	+++	+++
ASII086	+	+++	++
ASII089	++	+++	++
ASII096	++	+++	++
ASII103	+	++	+
ASII140	+	+	+
ASII146	+	+	+
ASII153	+	+++	++
ASII159	+	+++	+
ASII167	+	+++	+
ASII177	+	++	+
ASII183	+	++	+
ASII195	+	++	+
ASII225	+	+++	+
ASII246	+	+++	+
ASII310	+++	+++	++
ASII313	++	+++	++
ASII320	+	+++	+
ASII321	+	++	+
ASII323	+	+++	+
ASII324	+	+++	+
ASII325	+	+++	+
ASII326	+	+++	++
ASII331	+	++	+
ASII336	+	++	+
ASII337	+	++	++
ASII338	++	+++	+
ASII339	+++	+++	+++
ASII340	+	+	+
ASII343	++	++	++
ASII345	+	++	+
ASII346	+	+++	+
ASII347	+	+++	+
ASII348	+	+++	+
ASII350	+	+++	+
ASII396	+	+++	+
ASII415	+	+++	+

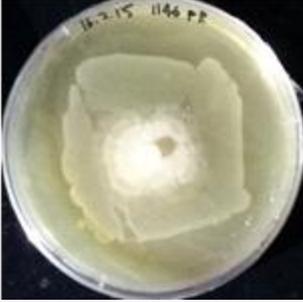
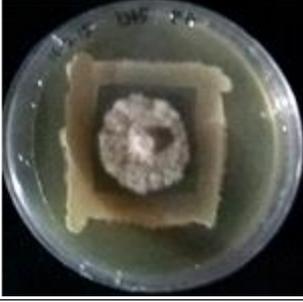
Strains	Degree of resistance		
	Strong(+++)	Medium(++)	Weak(+)
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (Collected strain from RDA, GBPT1601)			
<i>Pseudomonas reactans</i> (Collected strain from RDA, GBPR1601)			
<i>Pseudomonas agarici</i> (Collected strain from RDA, GBPA1601)			

그림 3-6. 주요 양송이버섯의 세균성갈반병 유발균주에 대한 저항성 정도

- 양송이버섯 균사체의 세균성갈반병 유발균주 *Pseudomonas tolaasii*와 대치배양 시 억제 정도를 평가한 결과는 다음과 같았다. *P. tolaasii* 균주의 접종농도  $7.5 \times 10^7$  CFU 였으며, 총 45개의 균주 중 14균주가 저항성을 보였으며, 31균주는 감수성을 보였다. 저항성 균주 중에서는 *P. tolaasii*를 넘어가는 강한 저항성을 보인 균주도 있었지만, *P. tolaasii*를 넘어간 후 다소 생장이 주춤해 지는 균들도 있었다. 감수성 균주들에서는 강한 감수성을 보인 균주들도 있었으며, 배지 바닥으로의 전체적인 균사생장은 억제되었지만 균사상면으로 기중균사들은 다소 성장하는 모습도 관찰되었다(그림 3-6).

(다) 수집 양송이버섯 자실체 재배특성 및 주요 형질 특성 평가

- 밀 곡립배지를 이용하여 종균을 제조하였고, 제조된 곡립종균을 수집 계통별 1%씩 혼합하여 발효배지에 접종하였다. 접종한 균주는 경상북도 농업기술원 버섯재배사에서 22~23°C, 습도 60~70%, 암상태의 환경조건에서 약 15~20일간 배양하였고, 배양이 80~90% 완료된 배지에 4cm 복토하여 자실체 발이를 유도하였다.

- 재배적 특성은 초발이일수, 수확일수, 갓의 크기, 두께, 경도를 비롯하여 갓의 색도는 색차계(CR-400, Chromamerter)를 이용하여 조사하였으며, 수확량을 조사하였다.
- 수집균주 중 42계통에서 버섯이 발생하였고, 평균 초발이일수는 16.5일이었고, 가장 짧은 계통은 ASI1415로 11.3일이 소요되었으며, 가장 긴 계통은 ASI1140으로 24.3 일이 소요되었다.
- 초발생후 평균 수확일수는 5.7일이 소요되었으며, ASI1103은 2.8일, ASI1053은 8.8일이 소요되었다. 갓의 지름은 평균 44mm이고, 갓의 길이는 18.4mm이었으며, 수집자원의 평균 개체중은 16.5g (12.2g~22.7g)으로 조사되었음. 갓의 평균 경도는 11.5kg/cm<sup>2</sup> (8.5~14.2kg/cm<sup>2</sup>) 이었다.
- 갓 색은 42개 중 13계통은 갈색이고, 27계통은 백색이며, 2계통은 크림색(off-white)으로 조사되었고, 백색양송이의 L값은 89.7, 갈색양송이의 L값은 63.4로 나타났다.
- 수집자원의 평균 수확량은 142.7kg/2kg bag이었으며, ASI1140계통은 37.8kg/2kg bag, ASI1038은 221.3kg/2kg bag으로 나타났다(표 3-7).
- 양송이버섯 자실체 특성조사결과의 상관분석 결과, 수확량은 초발이일수, 수확일수와 상관관계가 높았으며, 개체중과도 높은 유의성을 가지고 있었음. 또한 색도는 15, 20, 25℃의 균사생장과 높은 상관을 보였다(그림 3-7).

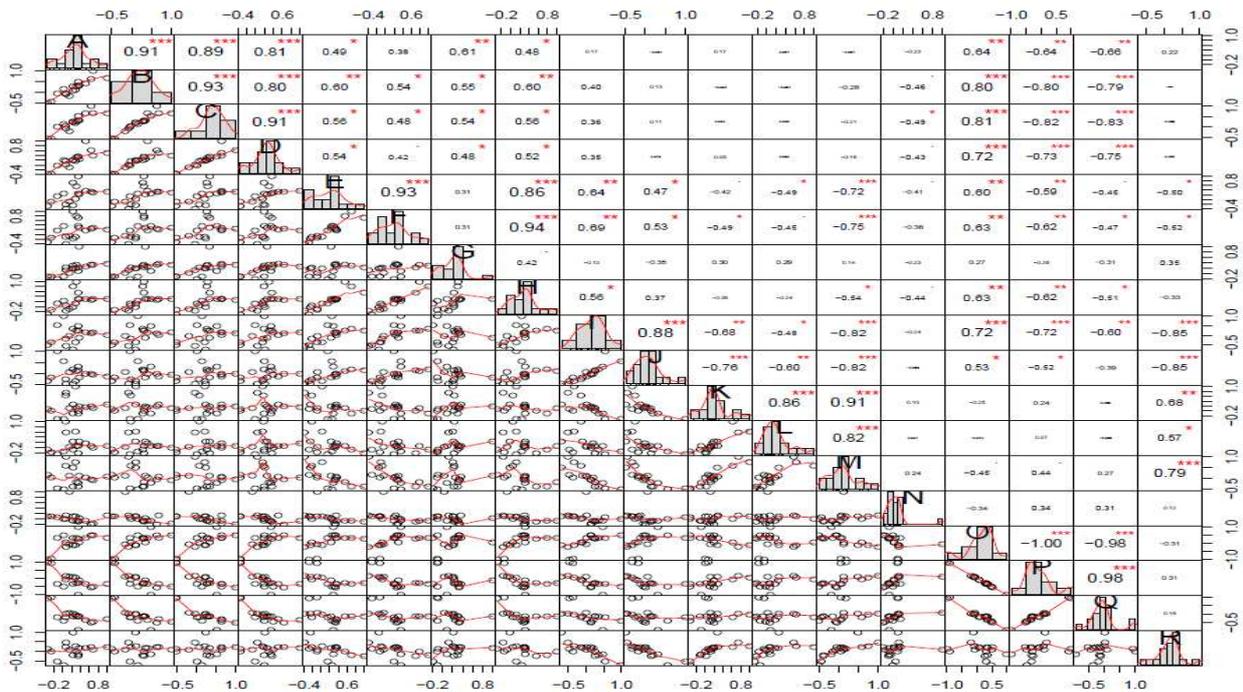


그림 3-7. 균사생장속도, 자실체 특성의 상관관계

A~E: Mycelial growth at 10,15,20,25,30°C, F: Resistance of *P. tolaasii*, G: Resistance of *P. reactans*, H: Resistance of *P. agarici*, I: Required day for pinhead, J: Required day for harvest, K: Diameter of pileus, L: Thickness of pileus, M: Individual weight, N: Hardness, O: L of Chromaticity, P: a of Chromaticity, Q: b of Chromaticity, R: Yield

표 3-7. 양송이 버섯 자실체의 주요 재배특성

Information of Strain (45 strains)	Required days for		Pileus (mm)		Individual weight (g)	Hardness (kg/cm <sup>2</sup> )	Color of Pileus	Chromaticity			Yield (g/2kg bag)
	pinheading	harvest	Diameter	Thickness				L	a	b	
ASI1007	19.3±1.2	4.0±2.0	44.0±2.5	19.3±1.2	12.5±1.0	11.0±0.2	white	88.9±1.9	2.2±0.6	13.5±1.8	159.0±14.9
ASI1024	16.2±2.6	6.4±0.9	43.9±3.0	17.0±1.3	14.3±2.3	11.4±0.3	white	85.6±3.7	2.6±0.9	15.4±1.8	113.2±30.3
ASI1032	17.6±0.9	5.4±1.1	43.8±3.4	16.9±1.2	12.3±2.2	11.2±0.1	white	87.7±4.0	1.4±0.8	11.3±1.9	139.7±21.9
ASI1038	14.4±0.6	4.8±1.2	45.2±5.5	20.2±2.0	18.1±4.2	12.4±0.3	white	91.1±1.6	1.2±0.4	10.2±1.5	221.3±28.0
ASI1053	23.8±2.6	8.8±3.4	43.5±3.4	18.1±2.8	15.3±6.0	12.9±0.3	white	87.2±3.6	1.9±0.8	13.3±2.8	66.9±36.6
ASI1054	17.4±1.1	4.0±1.2	45.9±3.2	18.8±1.6	21.0±4.5	13.5±0.4	white	90.3±1.6	1.2±0.2	10.7±1.6	162.0±18.8
ASI1074	21.8±0.5	6.0±1.8	45.8±3.1	19.5±2.0	17.6±4.3	12.3±0.2	white	89.9±1.9	1.2±0.4	11.6±2.1	82.2±9.2
ASI1078	17.6±1.8	7.4±2.1	44.8±3.5	15.7±4.1	14.6±5.2	11.9±0.3	off-white	76.8±3.8	3.9±2.3	14.8±3.7	97.0±25.0
ASI1085	17.7±0.6	5.7±2.9	42.8±3.8	16.5±3.1	15.4±4.7	10.5±0.2	white	88.1±3.1	2.2±1.4	12.0±2.7	167.1±41.6
ASI1086	17.8±4.4	5.8±0.8	42.5±1.3	18.0±1.3	14.0±2.5	11.3±0.1	brown	66.6±7.4	7.0±1.4	15.7±2.2	127.5±29.9
ASI1089	21.3±0.6	6.3±0.6	43.6±3.6	19.9±3.4	14.7±5.5	9.8±0.3	white	91.6±1.1	0.7±0.4	9.8±1.0	91.3±40.6
ASI1096	18.0±1.7	5.2±1.1	44.5±3.2	19.2±2.0	15.4±3.0	13.0±0.2	white	90.3±2.2	1.6±0.7	11.7±2.1	139.1±15.6
ASI1103	14.2±2.7	2.8±1.1	46.4±6.8	20.0±1.9	18.8±5.7	8.8±0.4	brown	59.6±6.3	8.6±0.7	18.4±1.4	112.2±16.5
ASI1140	24.3±5.4	7.3±1.7	41.5±1.6	17.2±1.5	13.3±1.2	11.3±0.3	white	90.8±1.4	0.7±0.4	8.1±0.6	37.8±14.6
ASI1146							Not occurred				
ASI1153	16.2±2.0	5.0±2.2	43.8±2.9	17.8±1.9	16.7±2.9	9.5±0.2	brown	61.3±8.2	6.8±1.7	16.9±3.2	170.0±20.7
ASI1159	15.0±2.9	3.0±1.3	45.0±5.3	20.6±2.4	19.3±5.5	12.5±0.4	brown	66.4±7.3	7.0±2.4	15.1±4.2	147.5±27.1
ASI1167	13.6±3.1	4.4±1.1	45.2±4.4	21.2±3.1	20.7±6.3	11.3±0.5	brown	66.2±5.4	7.2±0.8	17.1±2.2	214.7±4.3
ASI1177	12.0±1.7	5.0±1.0	42.9±2.5	18.7±1.1	15.8±1.9	10.6±0.2	brown	55.4±3.1	9.4±1.6	19.0±3.1	174.8±7.6
ASI1183	14.3±2.5	5.0±1.6	43.3±2.5	18.5±1.7	17.2±2.7	9.4±0.3	white	90.2±1.3	0.9±0.3	10.4±1.2	195.3±15.4
ASI1195	11.8±0.5	6.5±0.6	42.2±0.9	16.5±2.5	13.8±1.9	14.2±0.4	off-white	81.1±3.8	3.7±1.6	14.7±1.7	166.2±32.4
ASI1225	17.0±1.7	5.3±1.2	43.2±2.8	18.9±0.9	15.7±1.4	10.0±0.5	white	93.0±1.1	0.7±0.2	8.1±0.8	120.2±12.6
ASI1246	14.8±2.9	6.0±1.4	43.9±2.7	18.9±0.8	17.1±1.4	11.7±0.6	white	91.1±1.7	0.7±0.3	9.5±1.9	116.1±12.9
ASI1310	21.0±0.0	8.0±0.0	41.7±4.0	17.0±2.5	12.2±3.6	11.7±0.2	white	89.9±1.9	1.5±0.6	11.8±2.5	111.7±10.2
ASI1313	17.0±1.9	6.2±1.8	41.3±2.1	16.7±0.5	16.1±2.4	8.5±0.6	white	86.8±3.0	1.9±1.1	14.3±3.3	100.4±15.4
ASI1320	11.8±1.1	4.8±2.3	44.7±3.9	17.6±1.8	17.3±2.9	12.0±0.2	brown	57.5±4.5	8.5±0.8	17.9±0.9	146.3±7.9
ASI1321	16.8±2.7	5.2±1.1	42.3±1.8	16.6±2.7	14.5±2.5	12.0±0.1	white	88.7±3.2	1.4±0.6	11.8±2.7	196.1±46.8
ASI1323	12.4±2.6	5.8±3.6	43.8±5.6	17.1±2.0	16.5±4.2	12.4±0.6	brown	60.6±2.4	7.6±1.1	16.6±2.1	161.8±25.7
ASI1324	21.6±3.6	6.0±0.7	45.5±3.2	18.2±1.9	17.4±3.0	11.4±0.3	white	89.4±2.5	1.1±0.1	11.3±0.7	116.8±39.5
ASI1325	14.2±3.6	4.8±1.6	45.1±2.3	17.5±1.0	19.1±2.3	11.8±0.2	brown	67.8±6.4	6.5±1.2	14.5±3.8	154.2±28.0
ASI1326	12.0±0.7	4.6±0.5	46.7±5.4	19.6±3.0	20.1±6.7	10.6±0.4	white	90.1±2.8	1.1±0.3	9.7±1.3	170.8±13.3
ASI1331	19.2±1.1	8.4±3.8	43.5±2.2	18.6±1.2	16.0±1.8	13.8±0.6	brown	67.5±7.6	7.2±1.9	18.1±1.3	97.1±33.9
ASI1336	11.8±1.8	4.0±1.9	44.5±5.1	18.7±1.4	19.6±4.9	11.8±0.7	brown	63.3±5.7	8.2±0.5	18.4±2.4	158.1±12.3
ASI1337	15.8±3.8	5.6±1.7	45.8±2.7	19.2±3.1	22.7±4.2	11.7±0.2	white	91.0±1.1	1.1±0.1	10.1±0.7	203.7±52.7
ASI1338	20.5±2.1	6.5±2.1	42.3±1.7	18.1±1.6	13.8±2.4	11.2±0.1	white	91.5±1.5	0.7±0.4	9.9±2.2	122.6±14.6
ASI1339	19.5±1.7	8.8±1.3	45.9±3.6	21.1±2.5	16.9±4.4	12.3±0.6	white	87.1±2.5	2.2±0.7	13.9±1.5	90.0±27.5
ASI1340							Not occurred				
ASI1343							Not occurred				
ASI1345	16.6±1.9	6.8±1.6	43.4±3.1	17.4±2.4	13.7±2.2	8.9±0.3	white	89.0±3.3	1.4±0.8	12.3±3.6	115.5±21.3
ASI1346	18.6±1.5	6.0±1.0	41.7±2.0	18.4±2.1	14.6±2.2	11.0±0.2	white	91.2±1.2	0.8±0.2	10.0±0.9	109.3±17.7
ASI1347	13.4±4.4	6.0±1.0	47.0±5.5	21.8±2.9	20.4±4.8	11.9±0.4	white	91.3±2.7	0.9±0.5	8.8±1.1	217.0±29.8
ASI1348	13.6±2.1	4.8±0.8	44.5±2.4	19.8±0.8	19.9±3.1	13.0±0.2	white	91.0±1.6	0.9±0.2	9.8±1.8	194.5±26.0
ASI1350	15.6±3.1	7.2±0.4	44.0±3.7	18.7±1.8	17.1±4.8	11.1±0.6	white	91.4±1.0	0.7±0.3	9.0±1.4	186.3±27.6
ASI1396	17.4±0.5	4.4±0.9	41.6±1.0	16.8±1.4	15.3±2.3	13.5±0.3	brown	65.7±5.7	8.0±1.2	17.7±3.0	166.8±25.2
ASI1415	11.3±0.5	3.8±0.5	46.1±3.8	18.2±3.8	20.1±7.2	12.0±0.4	brown	62.7±4.9	7.4±0.7	16.5±1.3	154.3±14.6

나. 양송이 유전자원 유전체 정보 분석 및 마커 개발

(1) 양송이 유전자원 유전체 분석

- 수집 49개 균주에 대해 도입지역, 맛 색 및 기타 형질정보를 바탕으로 35개 자원에 대해 전장유전체 재분석을 추진하였다(그림 3-8). 선발된 38개 균주에 대해 DNA 추출 및 Fluorescence 및 Nanodrop을 이용한 순도 및 농도를 검정하였다(그림 3-9).



그림 3-8. 유전체 재분석 (Re-sequencing) 작업 흐름도

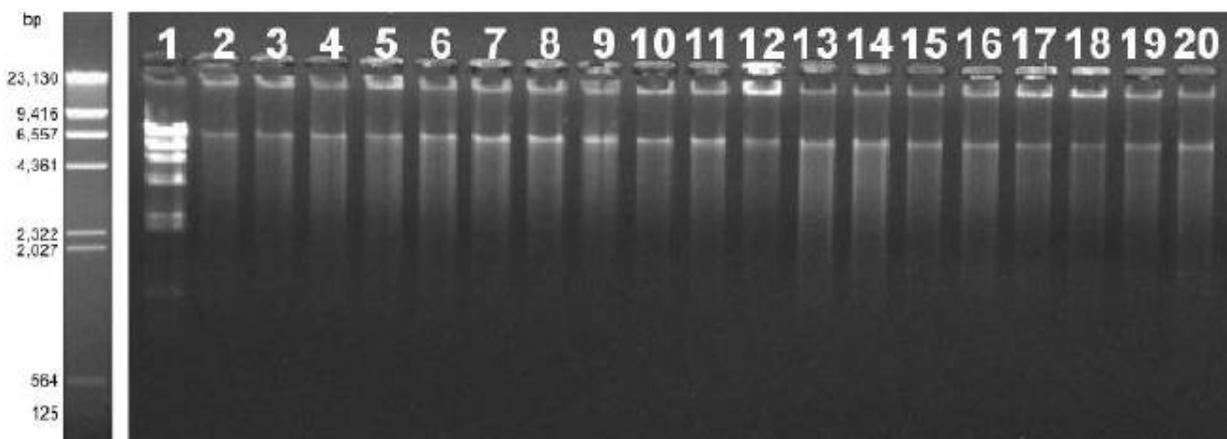


그림 3-9. DNA 순도 및 정량 검정

- 순도평가가 완료된 gDNA에 대해 유전체 분석을 위한 library를 제작하였다(그림 3-10).

- ① gDNA 1~5ug을 Covaris system을 이용하여 원하는 사이즈로 절단하고 QIAquick PCR purification kit로 정제한 후, bioanalyzer high sensitivity kit(Agilent)을 이용하여 크기를 확인함.
- ② TruSeq library sample prep kit(Illumina)을 이용하여 end repair, 3' overhang, adaptor ligation 과정을 거친 후, QIAQuick PCR purification kit으로 정제함.
- ③ 어답터가 붙은 샘플 전부를 2% Agarose gel(BioRad)에 전기영동 후, 목표 크기의 밴드를 잘라내어 gel extraction kit(QIAGEN)으로 정제함.
- ④ DNA polymerase를 이용하여 PCR 증폭 후, 정제하여 라이브러리 제작을 완료함.

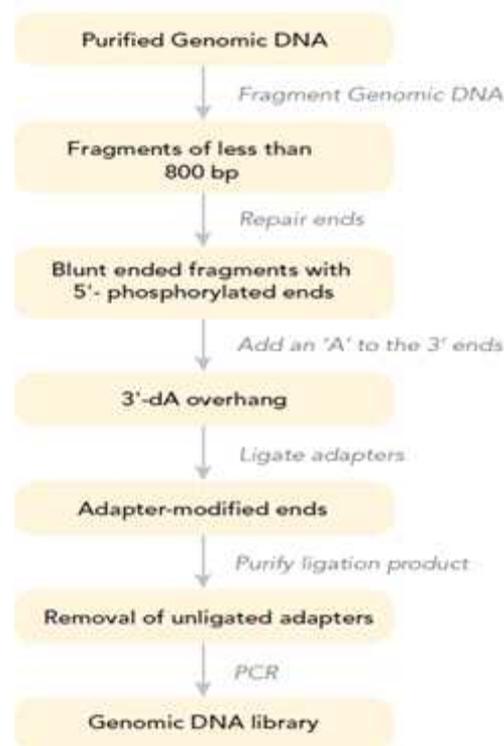


그림 3-10. 양송이 버섯 library 제작 순서도

- 제작된 library를 검토한 후 적정 크기의 DNA 단편을 확인한 후 최종적으로 전장 유전체 재분석을 수행하였으며(표 3-8), 양송이 표준 유전체 정보는 JGI genome portal에서 *Agaricus bisporus* var. *bisporus* H97 (assembly Agabi\_varbisH97\_2)의 유전체 서열을 활용하였다. 38 균주에 대한 유전체 재분석 결과 오염된 것으로 판단된 ASI1146(한국, 갈색)과 ASI1400(일본, 백색)을 제외한 36개 균주에 대한 유전체 정보를 확보하였고, 염기서열 변이 부위는 대부분 downstream과 upstream 부위에서 각각 39.29%, 38.64% 수준 이었고, exon과 intron 부위에서는 6.81%, 3.03%로 나타났음(그림 3-11), 분석된 유전체의 평균 depth는 91.38X 수준이었다(표 3-9).

표 3-8. 양송이 전장 유전체 분석을 위한 library 제작 결과

NO.	plant number	균주명	수집지역	품종명	색상	Tape Concentration (ng/ul)	Volume (ul)	Tape Quantity (ug)	Main peak Size (bp)
1	1-11	ASI1195	페루			1.6	15	0.02	562
2	1-17	ASI1339	베트남		백	2.9	30	0.08	554
3	1-19	ASI1400	일본		백	3	30	0.09	542
4	1-20	ASI1415	한국	호감	갈	6	30	0.18	534
5	1-28	ASI1323	뉴질랜드		갈	5.5	30	0.16	571
6	2-01	ASI1337	한국	새아	백	20.9	30	0.62	555
7	2-02	ASI1348	한국	새도	백	29	30	0.87	567
8	2-03	ASI1347	한국	새연	백	29.4	30	0.88	552
9	2-04	ASI1338	한국	새정	백	30.3	30	0.9	559
10	2-05	ASI1350	한국	새한	백	41.9	30	1.25	546
11	2-06	ASI1024	대만		백	38.4	30	1.15	538
12	2-07	ASI1072	덴마크		백	44.9	30	1.34	539
13	2-08	ASI1089	프랑스		백	39.6	30	1.18	530
14	2-09	ASI1096	스위스		백	26.6	30	0.79	575
15	2-12	ASI1310	중국		백	3.5	15	0.05	565
16	2-13	ASI1313	슬로베니아		백	24.7	30	0.74	555
17	2-14	ASI1321	네덜란드		백	22	30	0.66	547
18	2-15	ASI1324	호주		백	11.7	30	0.35	554
19	2-16	ASI1326	뉴질랜드		백	10	15	0.15	554
20	2-19	ASI1345	호주	A15(실반)	백	20.3	30	0.6	580
21	2-22	ASI1074	한국	705	갈	12.9	30	0.38	541
22	2-23	ASI1032	미국		갈	29.8	30	0.89	544
23	2-24	ASI1053	프랑스		갈	15.1	30	0.45	551
24	2-25	ASI1086	캐나다		갈	10.4	30	0.31	529
25	2-27	ASI1177	일본		갈	20	30	0.6	548
26	2-30	ASI1331	브라질		갈	10.5	30	0.31	530
27	2-31	ASI1336	브라질		갈	6.9	30	0.2	530

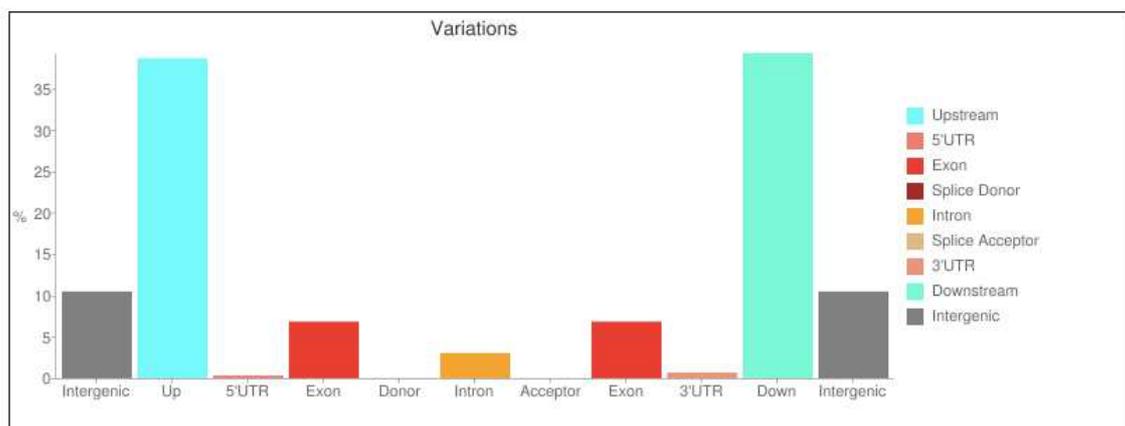


그림 3-11. 영역별 SNV 변이

표 3-9. 양송이 전장 유전체 분석 결과

연번	균주명	수집지역	품종명	색상	sequence base	clean base rate(%)	mapping rate(%)	Average depth	coverage 10X rate(%)	coverage 50X rate(%)
1	ASII007	한국		갈	3,458,237,636	94.69	84.84	82.82	96.5	87.97
2	ASII024	대만		백	4,287,763,686	88.67	86.19	100.87	99.75	95.36
3	ASII032	미국		갈	4,284,591,478	88.76	83.15	97.63	95.56	90.16
4	ASII038	미국		백	3,038,572,094	94.76	89.13	76.55	95.51	86.21
5	ASII053	프랑스		갈	3,764,085,720	84.04	81.84	80.83	95.66	86.75
6	ASII072	덴마크		백	3,828,596,846	88.41	89.04	93.73	99.88	93.85
7	ASII074	한국	705	갈	5,093,632,566	89.33	85.99	119.02	95.93	92.4
8	ASII085	캐나다		백	3,393,656,748	94.51	87.97	84.12	95.45	88.05
9	ASII086	캐나다		갈	4,309,867,670	89.5	80	94.31	96.59	90.76
10	ASII089	프랑스		백	4,143,431,846	88.44	83.92	95.42	95.76	89.34
11	ASII096	스위스		백	4,061,493,810	86.9	85.63	94.37	95.8	89.64
12	ASII103	일본		갈	3,499,645,460	94.23	85.47	84.25	96.51	88.09
13	ASII140	독일		백	3,307,898,412	95.6	91.49	85.37	99.83	92.59
14	ASII146	한국		갈	3,091,925,226	95.72	2.09	1.94	0.06	0.05
15	ASII153	한국		갈	3,347,654,296	94.8	89.37	85.42	99.85	92.25
16	ASII177	일본		갈	3,696,969,240	88.35	79.96	81.31	96.48	87.41
17	ASII195	페루		크	4,235,306,286	78.68	81	84.62	95.91	87.29
18	ASII225	한국		백	3,117,825,954	94.61	88	78.04	95.54	86.08
19	ASII246	한국		백	3,254,593,298	94.79	85.97	79.77	96.43	87.26
20	ASII310	중국		백	4,067,956,006	85.81	84.3	88.99	95.14	87.2
21	ASII313	슬로베니아		백	5,647,228,464	85.77	88.16	132.31	99.87	99.02
22	ASII320	네덜란드		갈	3,639,919,628	95.93	82.51	84.36	96.52	88.8
23	ASII321	네덜란드		백	4,137,448,320	88.91	87.76	99.49	99.86	95.7
24	ASII323	뉴질랜드		갈	4,640,097,120	81.91	81.07	95.04	96.61	90.56
25	ASII324	호주		백	3,758,310,272	86.65	87.28	88.39	99.85	92.71
26	ASII326	뉴질랜드		백	3,411,682,222	82.37	87.21	76.47	99.84	89.64
27	ASII331	브라질		갈	3,447,087,796	88.91	79.99	75.62	96.4	86.14
28	ASII336	브라질		갈	2,466,066,768	87.98	83.65	55.89	96.11	69.16
29	ASII337	한국	새아	백	4,445,504,628	83.03	87.12	99.86	99.85	94.84
30	ASII338	한국	새정	백	5,198,973,488	85.11	88.74	120.35	99.76	98.08
31	ASII339	베트남		백	4,999,318,570	83.72	81.44	104.31	95.28	90.15
32	ASII345	호주	A15	백	4,102,744,896	85.77	87.79	96.33	99.86	94.46
33	ASII346	한국	737	백	6,334,092,432	93.57	87.97	157.15	95.88	93.9
34	ASII347	한국	새연	백	5,055,399,970	85.3	88.17	117.96	99.87	98.47
35	ASII348	한국	새도	백	2,100,542,880	82.78	88.19	49.52	99.72	47.39
36	ASII350	한국	새한	백	3,210,457,508	83.21	89.1	76.98	99.86	89.88
37	ASII400	일본		백	2,105,750,266	82.04	0.3	0.14	0.03	0.03
38	ASII415	한국	호감	갈	3,458,280,218	81.15	79.51	72.16	96.3	84.41

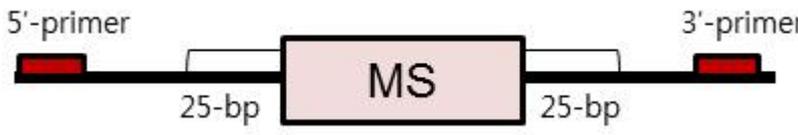
(2) 유전다양성 및 형질 연관 분석을 위한 신규 마커 제작

(가) 유전체 재분석 정보를 활용한 SSR 마커 개발

- 표준 유전체 정보로부터 SSR 부위를 탐색(SSR Finder)하여 annealing 온도 조건은 55~62°C, GC함량 50% 이상이며, PCR product 크기가 200bp 내외의 프라이머를 디자인하였다(그림 3-12). 이들 부위에 대해 16계통(표 3-10)의 유전체 재분석 정보를 통해 계통내 SSR 부위를 재검토하였고, 최종적으로 계통간 다형성을 보이는 부위를 선정하여 450 개 프라이머를 디자인 하였다.

**Step 1 : Draft(Reference) 서열로부터 SSR finding**  
 탐색 조건 Repeat type :  $\geq$  dinucleotide repeats Perfect SSR에 대해 탐색  
 SSR Finder : (<ftp://ftp.gramene.org/pub/gramene/archives/software/scripts/ssr.pl>)

**Step 2 : 탐색된 SSR 부위에 대한 프라이머 디자인**  
 - Annealing 온도 : 범위 55-62°C Primer 길이: 18-26 mer (Opt. 23 mer)  
 - GC 함량 : 50% 이상을 기준 PCR product size: 200 bases



**Step 3 : 품종 사이의 polymorphic SSR 탐색**  
 레퍼런스 서열(중1)에서 프라이머 디자인된 SSR loci에 16 품종들의 whole-genome resequencing data (중2)를 얼라인먼트 시킴

각 품종별로 SSR loci에 얼라인먼트된 리시퀀싱 데이터를 회수함

회수된 데이터를 이용하여 각 품종에 대해 드노보 어셈블리 수행

레퍼런스 loci와 드노보 어셈블리 loci 사이에 서열 비교하여 length polymorphism 탐색함

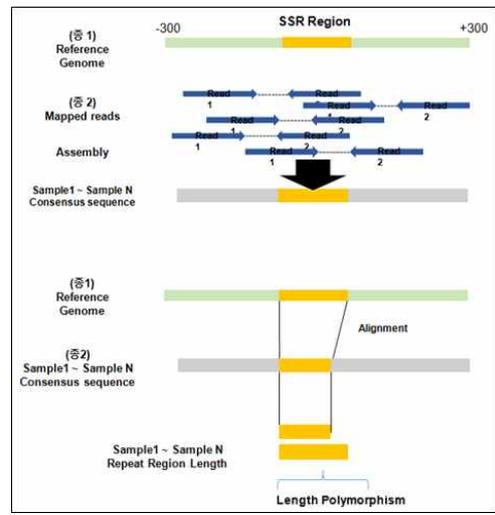


그림 3-12. 유전체 재분석 정보를 활용한 SSR 마커 개발 절차

표 3-10. SSR 마커 개발에 활용된 16개 계통 정보

순번	균주명	수집지역	품종명	가색	평균 depth	순번	균주명	수집지역	품종명	가색	평균 depth
1	ASI1337	한국	새아	백	99.86	9	ASI1321	네덜란드		백	99.49
2	ASI1348	한국	새도	백	49.52	10	ASI1324	호주		백	88.39
3	ASI1347	한국	새연	백	117.96	11	ASI1345	호주	A15	백	96.33
4	ASI1338	한국	새정	백	120.35	12	ASI1415	한국	호감	갈	72.16
5	ASI1350	한국	새한	백	76.98	13	ASI1074	한국	705	갈	119.02
6	ASI1024	대만		백	100.87	14	ASI1053	프랑스		갈	80.83
7	ASI1072	덴마크		백	93.73	15	ASI1086	캐나다		갈	94.31
8	ASI1313	슬로베니아		백	132.31	16	ASI1323	뉴질랜드		갈	95.04

- 450개 프라이머 중에서 반복되는 단일염기서열이 3개 이상이며 PIC value가 높은 부위를 우선적으로 선발하여 100개의 마커를 합성하였고, 일차적으로 capillary(모세관) 전기영동을 통해 활용성을 평가하고, 최종적으로 선발된 30개 마커에 대해 위 16개 계통에 대한 유전자형 평가를 수행하였다(표 3-11, 그림 3-13).

표 3-11. 유전체 재분석 정보로 분석된 16개 계통의 SSR 다형성 및 마커 정보

Name	F	R	Tm (°C)	Product size
PNMSSR-001	CTACCAGCAGAACTTGGTCCT	CTCCTACCCTCGTCACTCTTTA	58.5	199
PNMSSR-003	GTCGACTGGGTACTACTGGTAT	CAGAGTCTGACACAGCAGGC	58	195
PNMSSR-004	TCACTCCCTCCATGAGTGTT	CTTCATCATCTGCACCATCC	58.1	187
PNMSSR-006	CTGTGTAGACGTATGCGTAGTGG	AGGTGAAGATGAGAAGGACCTC	59.8	183
PNMSSR-012	CCAAATCCAAAGCCTGTCTC	ATAATCTTGGGCATGGGC	59.7	198
PNMSSR-018	CCTAACCTTTTCTGCGAAGC	CAAGAAGCCCAGAAACTCAG	59.1	164
PNMSSR-020	CCTCGGAATCCTCTGAATCT	GAGAAGGGATAGGCAGAGGTC	58.3	172
PNMSSR-023	CTCGTGCGACATCGACTAC	AGATCGATGGAGAGGGACTT	57.9	155
PNMSSR-027	GGCGGAGTTGCTTAAGAGATAC	TATGGATGTAGACGTTCCCG	59.4	200
PNMSSR-029	CACTCCACCATGCAAACCTC	ATAACAAAGGAGGAGGAGCG	57.6	185
PNMSSR-030	TCTGACGTTGTCCAGAGCTAC	AATCCACTGCTCGTAGAGTACC	58.1	163
PNMSSR-032	AGAGAAGACAGCAGGGTTGTAG	ATCCCCGTCATACCATACT	57.8	175
PNMSSR-042	CAACTGGTATGAGTGCTCCTCT	GTGTCAACCGACTCCGTATAG	58.5	181
PNMSSR-002	ATTATCTCAGCCAGCAGCC	GTTGCTCGTCTATGGAATCG	58.0	199
PNMSSR-006	CTGTGTAGACGTATGCGTAGTGG	AGGTGAAGATGAGAAGGACCTC	59.8	183
PNMSSR-007	ACGTCAGTCTTAACTGGGCTC	GGGGATACATCTACTCACCCA	58.5	198
PNMSSR-011	GCTACGGGAAGTATGCTTAGAG	TCAGATGATGGGGTATCAGG	57.4	176
PNMSSR-013	TAAGTCATATGCTGCCGAGC	GTTATACTCAGCGACACGTTGG	59.0	184
PNMSSR-014	GCAACGTTTCATCCTAAGGG	GTGTGTACGTTCTCAAGCCAG	58.2	196
PNMSSR-015	CTGAGGATGTCCATACCATAC	AATCGCAGTATGTGCCTCC	58.3	200
PNMSSR-016	AGACTACGATGGAGACATCAGC	GGTGGTGGAGGTGATTTAAC	58.4	180
PNMSSR-019	ATACGACGACTAGTTTCCCTCC	CGTCTCATCCTAAACAACGG	58.7	181
PNMSSR-025	TCTATGGTCAGCAAGAAGGG	TGAAAACGAGGCAGCTCTAC	57.9	152
PNMSSR-028	CTCAGCAACCAGGATGACTT	GAGGAAGAGGAACCAAATGC	57.9	191
PNMSSR-031	CCGAGTTTGAGGAACAACAG	GCAAGCGGTTATACATCTCG	58.3	166
PNMSSR-033	GTAGGCATCATTGAGGTAGTGG	GTCTCCTCTACAACCTGCTCC	58.6	186
PNMSSR-039	CTGGAATCGACTCAGAATGG	GGTGAGAGAGAACCAGGAGTAAC	58.2	186
PNMSSR-043	CCATTCGTGGGTGTTGAT	GAAATGAGGAAAACGGGC	57.6	166
PNMSSR-044	CACTTGACAAAGCTCCCAAG	TCACCCAGTTCCAACCTCT	58.5	160
PNMSSR-047	TACTGGAGATTTGACGGCAC	CTCTGCTCCACAACCTGTATTCCG	58.7	180

primer	PCR 결과	primer	PCR 결과
PNM 002		PNM 003	
PNM 004		PNM 007	
PNM 009		PNM 010	
PNM 015		PNM 030	
PNM 032		PNM 039	
PNM 001		PNM 012	
PNM 018		PNM 023	
PNM 025		PNM 027	
PNM 028		PNM 043	
PNM 044		PNM 047	
PNM 005		PNM 006	

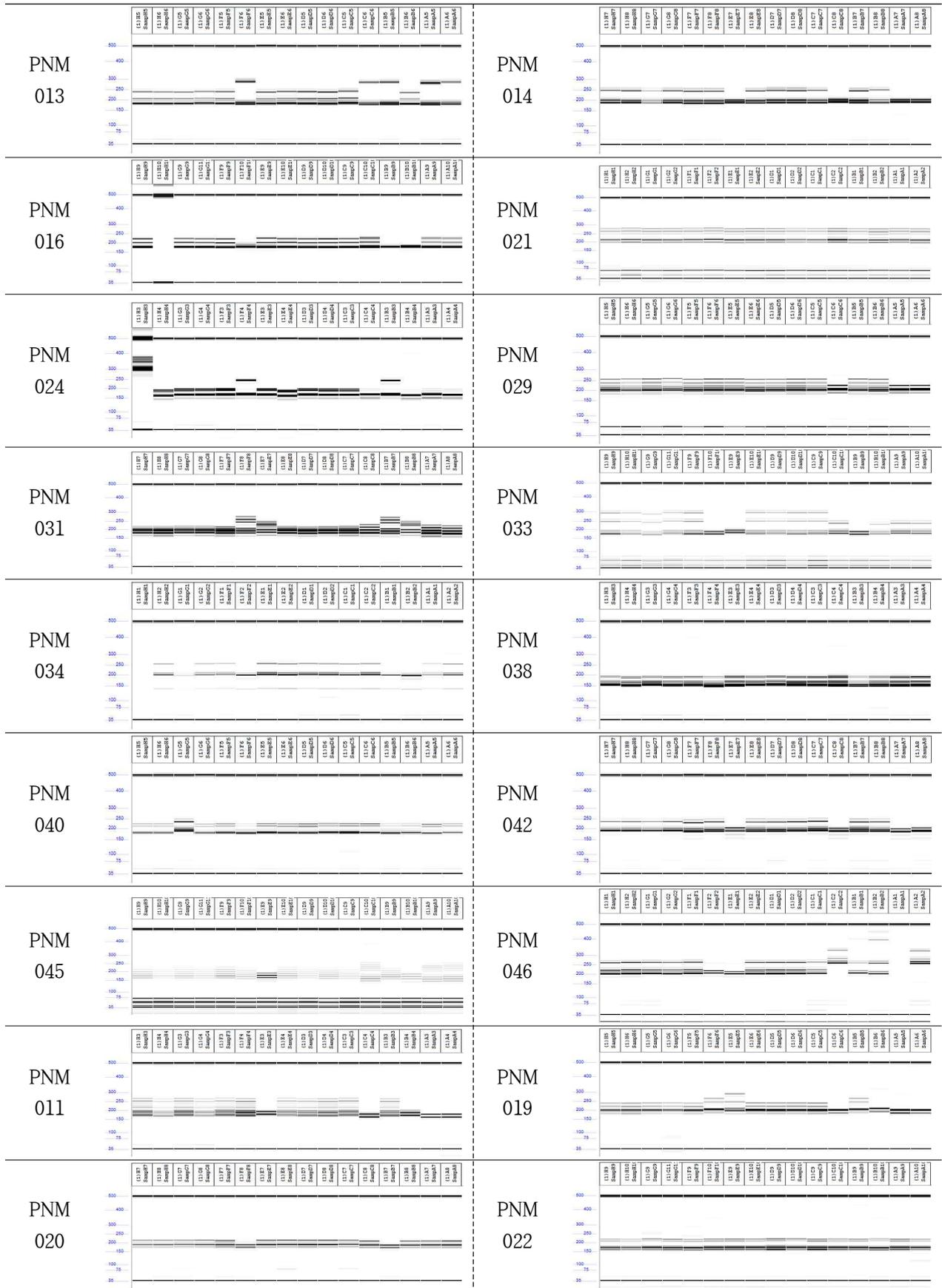
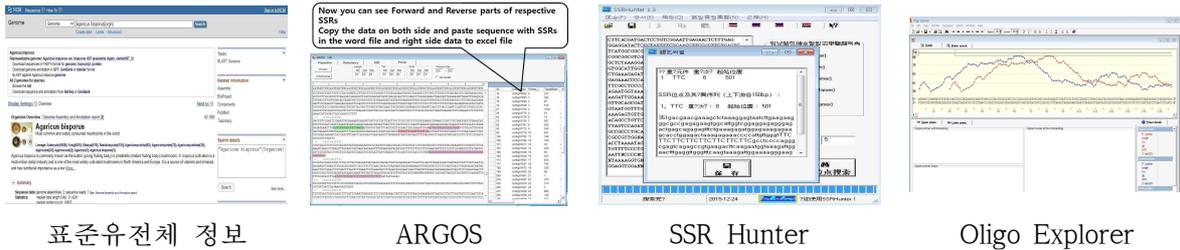


그림 3-13. 16개 양송이 계통에 대한 모세관 전기영동 결과

(나) 양송이 표준유전체 정보를 활용한 유전 분석용 SSR 마커 제작

- 표준 유전체 정보 확보 : Agaricus bisporus var. bisporus H97를 활용하여 ARGOS, SSR Hunter 1.3과 Oligo Explorer 1.1.0. 이용하여 SSR 부위를 대량 탐색하였다.



표준유전체 정보

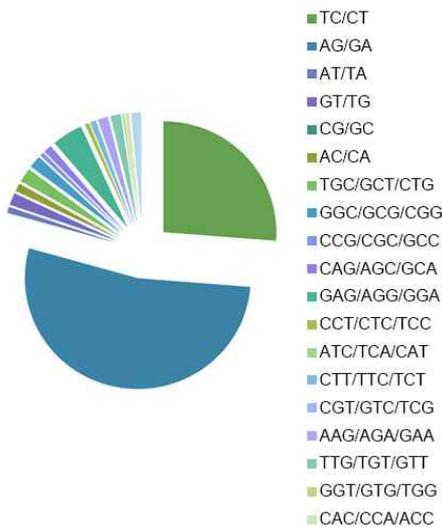
ARGOS

SSR Hunter

Oligo Explorer

그림 3-14. SSR 마커 제작을 위한 소프트웨어

- 총 339개 SSR 마커가 탐색되었고, di-motif를 갖는 부위가 282개로 전체 83% 수준이었고, 3개 이상의 반복서열을 갖는 부위가 57개(17%)로 탐색되었으며(그림 3-15). 분석의 정확성과 효율성을 높이기 위해 3개 이상의 반복서열을 갖는 부위에 대해 primer를 제작하였다(표 3-12).



Repeat motif	Repeat class	Numbers	(%)
<b>Di-nucleotide</b>	TC/CT	89	31.56
	AG/GA	180	63.83
	AT/TA	3	1.06
	GT/TG	6	2.12
	CG/GC	0	0
	AC/CA	4	1.42
	<b>Total</b>		<b>282</b>
<b>Tri-nucleotide</b>	TGC/GCT/CTG	7	12.28
	GGC/GCG/CGG	6	10.52
	CCG/CGC/GCC	2	3.51
	CAG/AGC/GCA	4	7.02
	GAG/AGG/GGA	15	26.32
	CCT/CTC/TCC	2	3.51
	ATC/TCA/CAT	0	0
	CTT/TTC/TCT	3	5.26
	CGT/GTC/TCG	0	0
	AAG/AGA/GAA	5	8.77
TTG/TGT/GTT	5	8.77	
GGT/GTG/TGG	1	1.75	
CAC/CCA/ACC	2	3.51	
AAC/ACA/CAA	5	8.77	
<b>Total</b>		<b>57</b>	<b>16.81</b>
<b>Total repeat motifs</b>		<b>339</b>	

그림 3-15. 양송이 표준 유전체 정보에서 탐색된 SSR 부위

표 3-12. 양송이 유전 분석을 위한 신규 제작된 SSR 마커 목록

No.	name	Forward primer	Reverse primer	F-Tm (°C)	R-Tm (°C)
1	Bra2A05	GAAGTGGCATTGGTTCG	GTCTTCACGGCTCTGACT	46.2	46.3
2	Bra2A07	AAAGGAGAAGTCGGG	ATGATTACGCCAAGC	40.6	39.9
3	Bra2E04	AAGGGCGGTTAAAGGACG	TTCCGACAATTCGAGTGGAT	53.9	54.1
4	Bra2F04	GCTGCTGCTGTTGTTGTT	GACCATGATTACGCCAAG	48.8	48
5	Bra2G09	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGA	CACCGACCACGCCGAAAT	55.8	58.7
6	Bra2H07	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGA	CGCAATCGGAGTTCAGACG	55.8	56.3
7	Bra2H11	AGGAGGAGGAGGAGGAGGGA	TTCACCGCCACCACTACCG	57.6	58.8
8	Bra3A04	TGCCAATCAAAATCAAAC	GACCATGATTACGCCAAG	45.9	48
9	Bra3A05	GCCAGTGAATTGTAACGAC	TACCTTGATTCCTCTACCG	49.4	48.4
10	Bra3A07	TCGAGTGGATGGCGTGGA	CAAACGGGCTGCTGAAAT	61.7	53.2
11	Bra3A12	AGTTGTTGAGGCTATCGA	ACGTTCTCCGTCTACTTG	44.5	43.9
12	Bra3E02	TTCGATTAGGAGGAGGAG	AAATTAGATTGGAGGCAC	45.9	43.3
13	Bra3F03	CTCCACCGCTGGCAAAC	CTATGACCATGATTACGC	55.7	42.4
14	Bra3G12	ACCTCGTGTAGAACTGATC	AGAAGTGTCCGTCTCCTT	45.1	44.9
15	Bra102-08	AACCATAGGGTCTCGTGC	AAGAACCCTCGTACTCG	49.1	47
16	Bra102-11	ACACTCCCAGTTTCAGCA	ACCACCAACTCATCCC	47.7	49.2
17	Bra102-12	TTGTAAACGACGGCCAGTG	TTCTCCTCCCGTTCTCTC	54.1	53.8
18	Bra102-13	TTATTGAAGACCGCTTTACC	AGAAGCCCGAGTAGGAGC	48.7	50.6
19	Bra102-16	ATTGACCGATAAGGAGGG	GCTATGACCATGATTACGC	48.3	47.5
20	Bra102-28	GGACTACTGTTCGGGTTTT	TACTCTAATCTCCGCCTC	47.8	48.8
21	Bra107-5_B01	TGGACTAACAGGTATCGGGATT	CGGTTGCTGGTTCAGAGGT	54	54.6
22	Bra107-5_C01	TCTTGCTCCGTAACCTCC	ATCTCCACTCCGCATCTC	49.5	48.9
23	Bra107-5_D01	GTGCGTCGAGATTGATGT	CAAGGGCGGTTGTAGGTC	48.1	52.4

- 합성된 23개 마커에 대해 Gradient 실험을 통한 PCR 조건을 탐색하였고(그림 3-16), 23개 마커 중 밴드가 단일로 나오는 마커들에 대해 47개 균주에 대한 유전자형 평가를 수행하였고(그림 3-17), 이들 중 각 마커 별로 05-ASI1350(새한), 14-ASI13260, 26-ASI1323, 27-ASI1331의 PCR 단편을 오려내어 DNA Sequencing을 수행하여 SSR 부위를 확인하였다(그림 3-18).

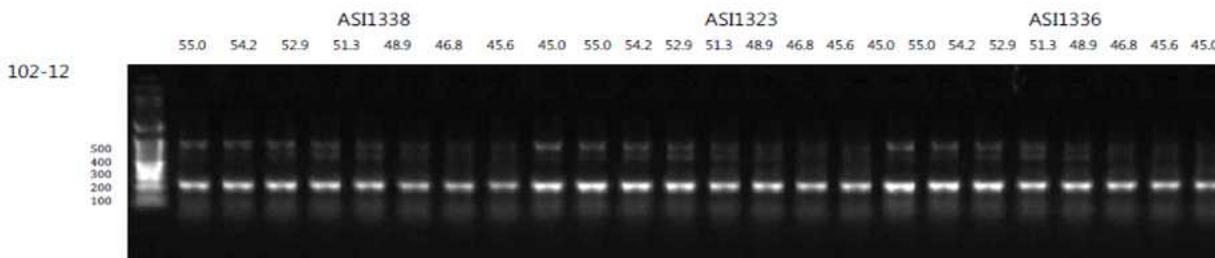


그림 3-16. 신규 SSR 마커의 PCR 조건 탐색

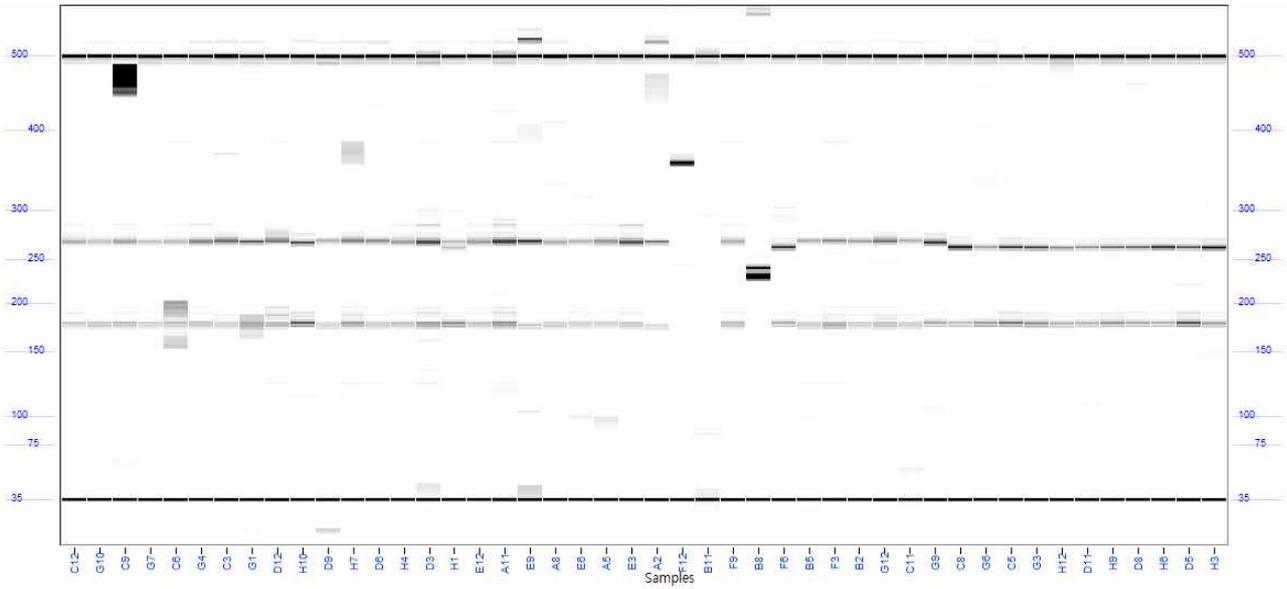


그림 3-17. 신규 SSR 마커를 활용한 양송이 수집균주의 다양성 평가

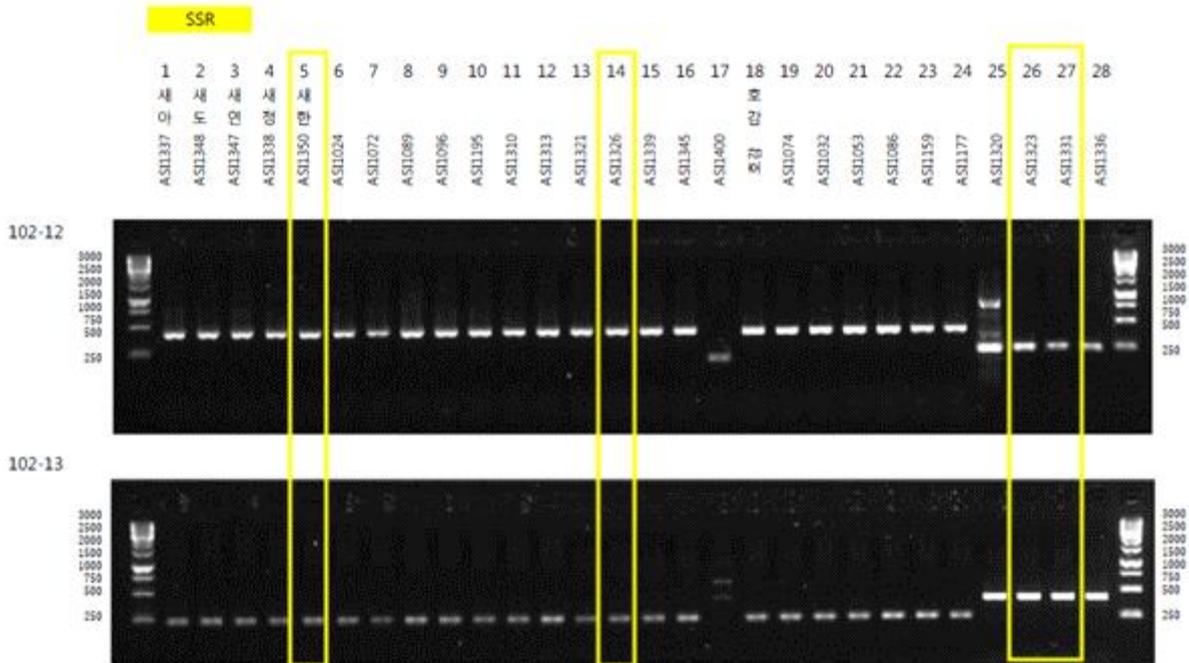


그림 3-18. 신규 SSR 마커의 PCR 단편 염기서열 분석

(다) 기존 보고된 양송이 마커 정보수집 및 PCR 조건 확립

- UFPF primer에 대해 gradient PCR을 통해 annealing 조건을 확인함(그림 19).

No.	Primer	Sequence (5-3)	GC content (%)	Polymorphic bands
1	UFPF1	ATCCAAGTCCGAGACAACC	50	5
2	UFPF2	GTGTGCGATCAGTTGCTGGG	50	7
3	UFPF3	CCCAGCAACTGATCGCACAC	50	9
4	UFPF7	AATGTGGGCAAGCTGGTGT	50	8
5	UFPF9	AAGAGGATTCTACCCACAC	50	7
6	UFPF10	CCATATTTGGCCGCTACC	55	2
7	UFPF11	AGAAGACGGGAAGCGCTAC	50	6
8	UFPF12	CCAGTTGCTATAAGAGGCAT	45	4

PCR 다형성에 의한 양송이(Agaricus bisporus) 계통의 유전적 다양성 분석

민영진<sup>1\*</sup>, 김중근<sup>2</sup>, 권민진<sup>1</sup>, 공원식<sup>1</sup>, 오연희<sup>1</sup>, 김혜원<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>안동대학교 미래융합기술대학원, <sup>2</sup>주요제이제이바이오벤처, <sup>3</sup>농촌진흥청 국립목사과학원 버섯과

Genetic Diversity of Agaricus bisporus Strains by PCR Polymorphism

Kyong-Jin Min<sup>1</sup>, Jung-Kun Kim<sup>2</sup>, A-Min Kwon<sup>1</sup>, Won-Sik Kong<sup>1</sup>, Youn-Hee Oh<sup>1</sup> and Hee-Wan Kang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Future Convergence Technology, Hanlyong National University, Anjuong 456-749, Korea

<sup>2</sup>JK BioTech Co. Ltd., Anjuong 456-749, Korea

<sup>3</sup>Mushroom Science Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Eumseong 369-873, Korea

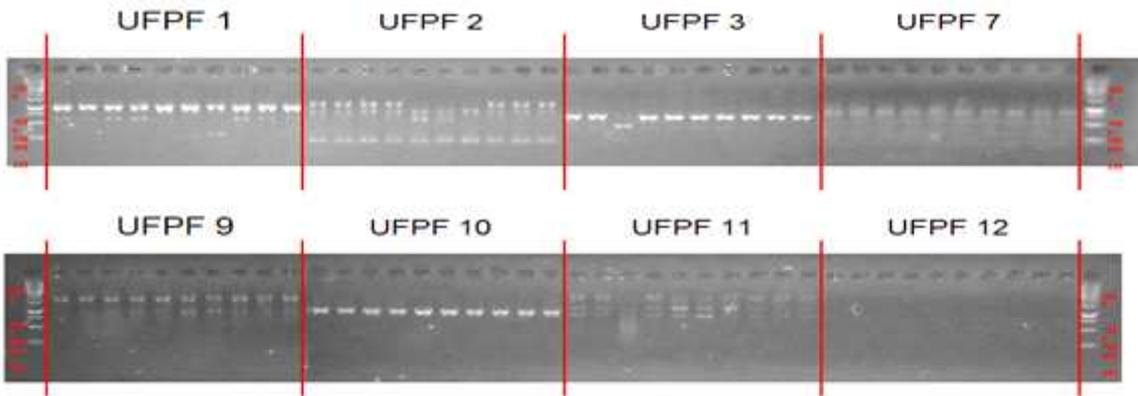


그림 3-19. UFPF primer의 PCR 반응 조건 탐색

- 기 보고된 SSR primer에 대해 gradient PCR을 통해 annealing 조건을 확인함(그림 20).

No.	Locus name	Forward primer	Reverse primer	SSR motif	TA (°C)	Size of the cloned allele (bp)	Size range (bp)
1	AbSSR05	ATCAACGACTTGATTGCTGAAG	TGCCGCCACTACTAACCCTACAA	(GCT)5	55	220	329-332
2	AbSSR09	ACAGAAAGGGGAGGATTGAG	ATAGTCGGTAAACCCCTCTT	(TGC)5	55	157	154-160
3	AbSSR23	TTTGGGATGTGACCAACTT	AACGTTGGGTTCAATGAAAA	(TG)5	55	180	174-180
4	AbSSR42	CGCCTGCTTCTCGACTAAC	TGCTATGGGGAGGAGGATC	(AG)5AA(AG)5	55	185	160-189
5	AbSSR50	GAGGGATTAAACGGACTGTT	GCTGCTGTCAAGAACATAAA	(TG)6	55	164	152-164
6	AbSSR53	TGATAAACAGAGACCGAAA	CACATCTACCCCTCTCG	(TA)5	55	197	193-200
7	AbSSR56	CACCACTAGCAGGCTCAGAG	CATCGCAATAAGGGGATAAC	(AG)8	55	226	217-228
8	AbSSR58	ATGTCGAGGAGGAGGAGGAT	AGGGAGAGGGAGGAGGATT	(GT)8	55	171	164-179
9	AbSSR62	GTTGGTACGAACTCATGCT	CCCACTACCTCTTGTGT	(TG)10	55	145	139-151
10	AbSSR65	ACCTCAACGATCCAAACGAC	TCCATAAACACCCCTCTCG	(TG)10	55	210	190-215

Appl Microbiol Biotechnol (2009) 84:1125-1135  
DOI 10.1007/s00253-009-2030-8

APPLIED GENETICS AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY

Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom Agaricus bisporus

Marie Foulongne-Oriol · Cathy Spataro · Jean-Michel Savoie

Received: 18 February 2009 / Revised: 28 April 2009 / Accepted: 28 April 2009 / Published online: 12 May 2009  
© Springer-Verlag 2009

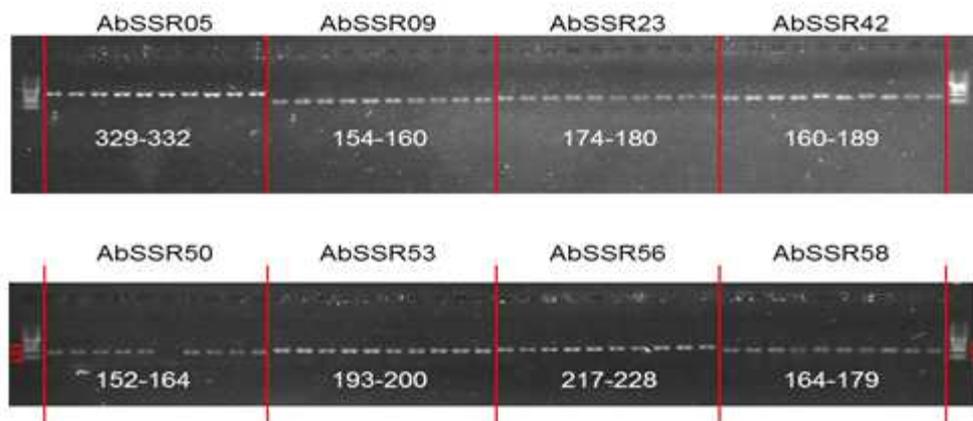


그림 3-20. SSR primer의 PCR 반응 조건 탐색

다. 수집양송이 유전자원의 다양성 분석

- 1차년도에는 28개 계통에 대해 기존에 보고된 UFPF, SSR 마커, 그리고 표준유전체로부터 얻어진 SSR 마커를 활용하여 유전다양성을 분석하였고, 2차년도에는 유전체 재분석을 통해 개발된 마커를 추가하여 47개 유전자원에 대해 유전다양성 분석을 수행하였다.
- 1차년도 28개 계통에 대해 6개 UFPF primer, 8개 SSR primer(2개 신규 마커 포함)를 이용하여 유전자형 평가를 수행함(그림 3-21).

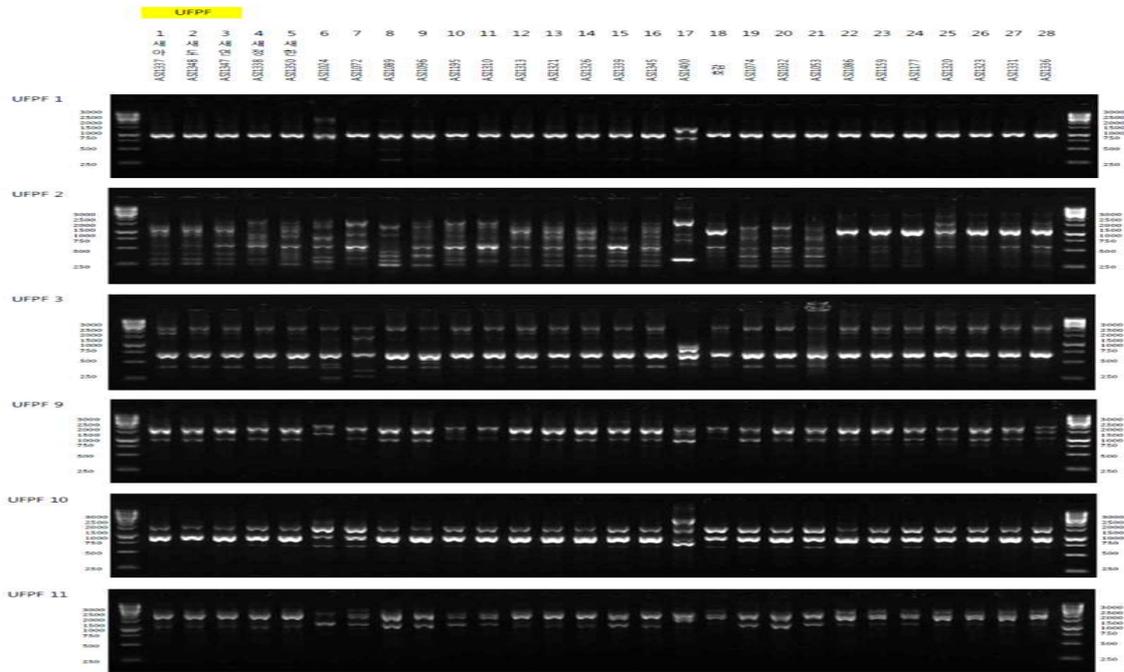


그림 3-21-1. 양송이 수집 균주의 유전자형 평가 결과 (UFPF primer)

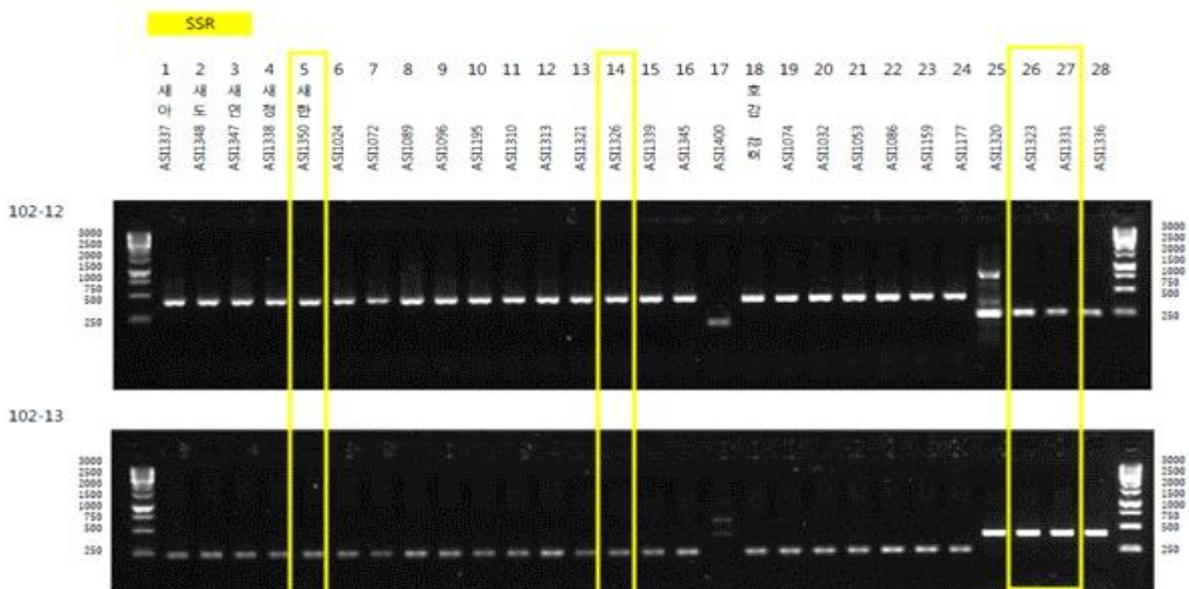
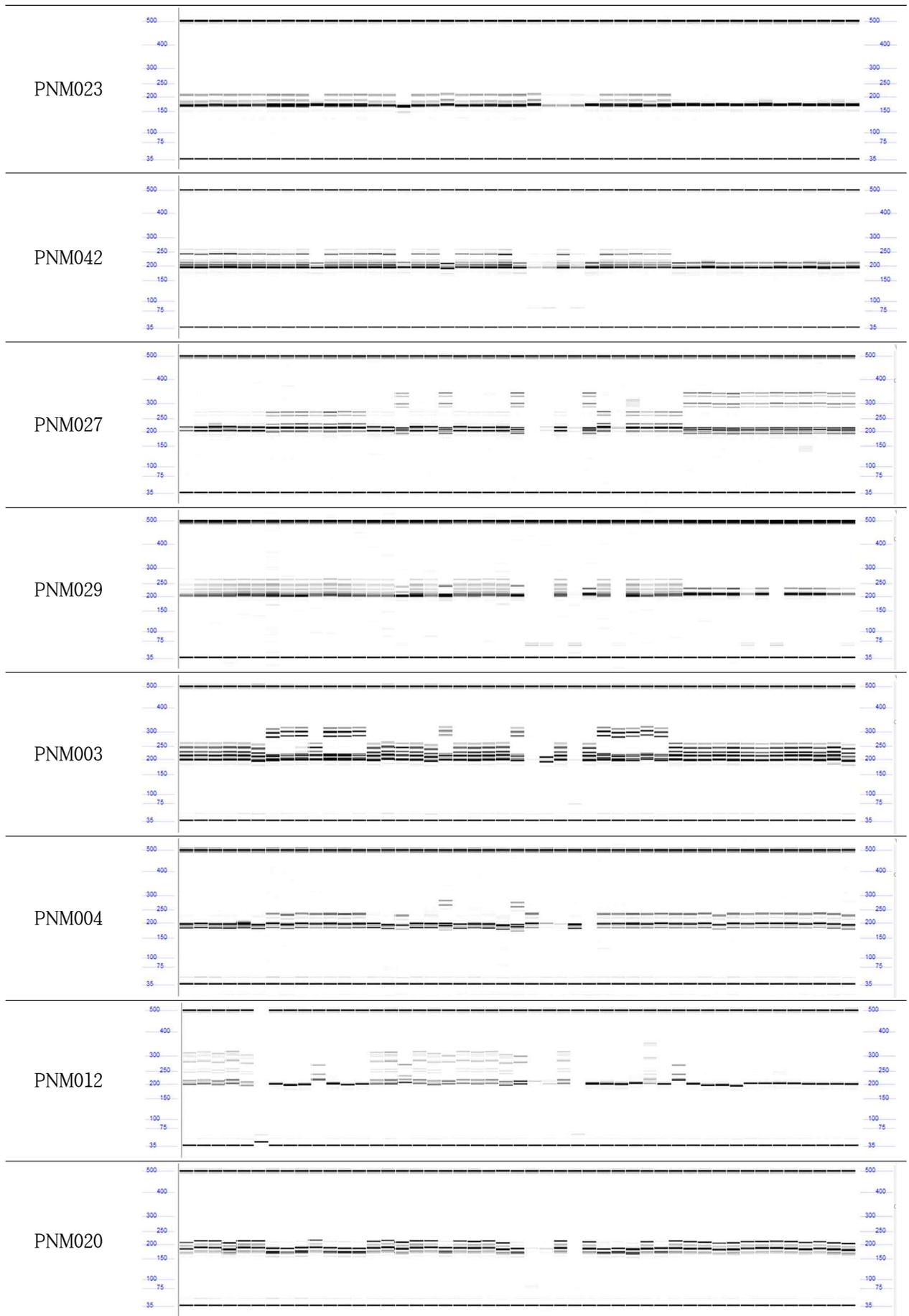


그림 3-21-2. 양송이 수집 균주의 유전자형 평가 결과 (SSR primer)





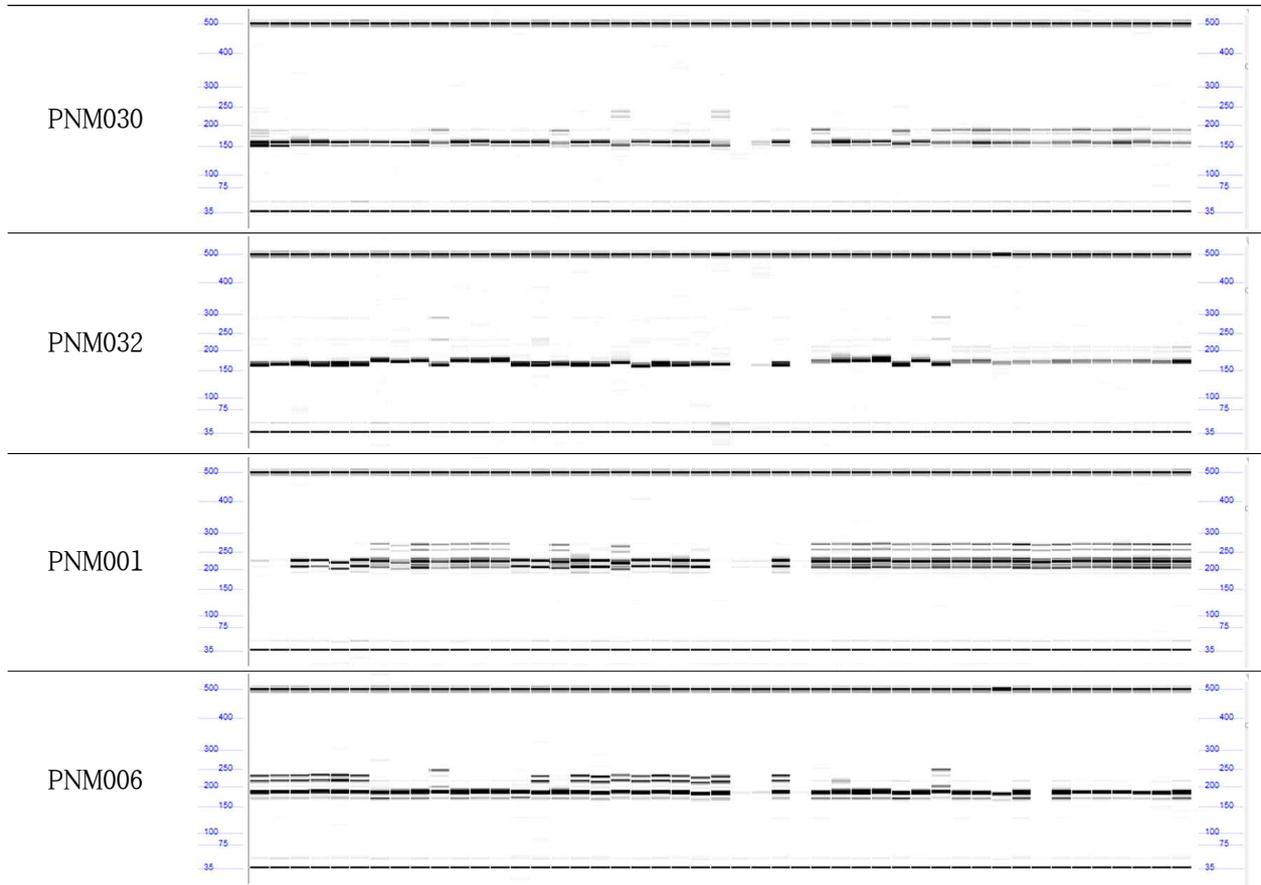


그림 3-22. 유전체 재분석 결과에서 얻어진 SSR 마커를 활용한 유전자형 평가

- 최종적으로 UFPPF, SSR 마커의 유전자형 결과를 토대로 46계통의 유전적 다양성을 분석한 결과, 크게 2개 그룹으로 구분되었는데, I 그룹에는 34개 계통이 포함되었으며, 1개 (ASI1078, 미국수집, 크림색) 자원을 제외한 모든 자원이 백색양송이였고, II 그룹에는 14개 계통이 포함되었으며, ASI1195(페루수집, 크림색)를 제외한 13개 자원이 갈색양송이로 조사되었다. 국내 육성 백색양송이인 새아, 새연, 새정, 새도, 새한은 모두 근연으로 나타났는데, 새아, 새연, 새정 그룹과 새도, 새한으로 구분되었으며, 30개 마커에서 국내 육성 백색양송이의 구분이 가능하였다(그림 3-23).

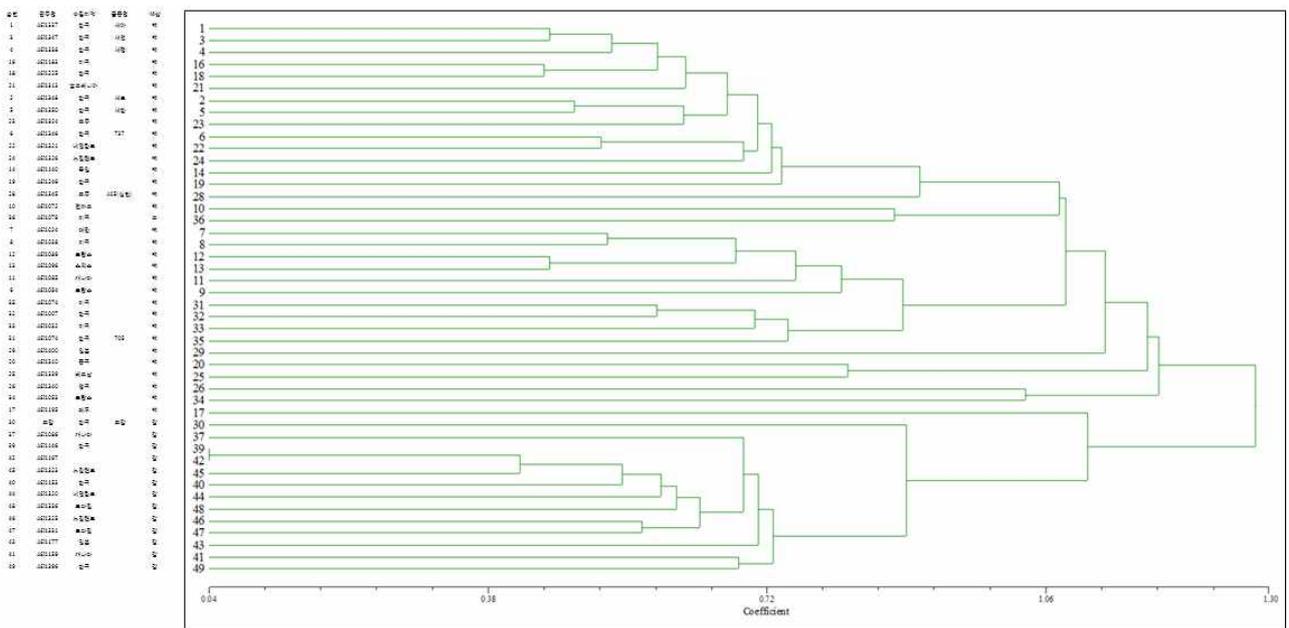


그림 3-23. 수집 양송이 유전자원 46점의 유전적 다양성

라. 주요 형질관련 분자마커 개발

(1) 갯 색 관련 분자마커 개발

- 유전체 재분석을 통해 얻어진 SSR 마커에 대한 16개 계통(백색 13, 갈색 3)에 대한 유전자형 평가 결과를 바탕으로 백색과 갈색 양송이에서 유의하게 차이를 보이는 마커정보를 활용하여 수집 유전자원 중 36개 계통(백색양송이 버섯 23개, 갈색양송이 버섯 13개)에서 갯 색을 구분할 수 있는 마커를 개발 실험을 수행하였다(표 3-13, 표 3-14).

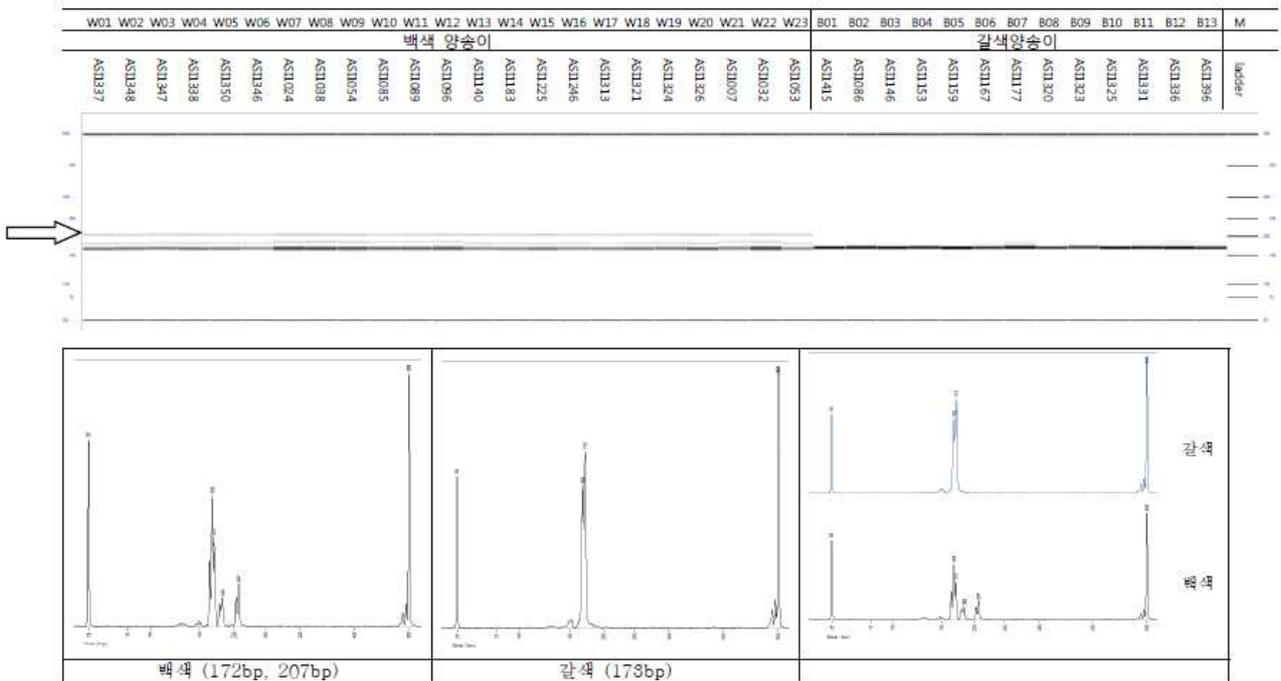
표 3-13. 갯 색 구분에 이용된 균주 목록

연번	균주번호	원산지	품종명	갯색	색도(L)
W01	ASI1337	한국	새아	백색	91.0
W02	ASI1348	한국	새도	백색	91.0
W03	ASI1347	한국	새연	백색	91.3
W04	ASI1338	한국	새정	백색	91.5
W05	ASI1350	한국	새한	백색	91.4
W06	ASI1346	한국	737	백색	91.2
W07	ASI1024	대만		백색	85.6
W08	ASI1038	미국		백색	91.1
W09	ASI1054	프랑스		백색	90.3
W10	ASI1085	캐나다		백색	88.1
W11	ASI1089	프랑스		백색	91.6
W12	ASI1096	스위스		백색	90.3
W13	ASI1140	독일		백색	90.8
W14	ASI1183	미국		백색	90.2
W15	ASI1225	한국		백색	93.0
W16	ASI1246	한국		백색	91.1
W17	ASI1313	슬로베니아		백색	86.8
W18	ASI1321	네덜란드		백색	88.7
W19	ASI1324	호주		백색	89.4
W20	ASI1326	뉴질랜드		백색	90.1
W21	ASI1007	한국		백색	88.9
W22	ASI1032	미국		백색	87.7
W23	ASI1053	프랑스		백색	87.2
B01	ASI1415	한국	호감	갈색	62.7
B02	ASI1086	캐나다		갈색	66.6
B03	ASI1146	한국		갈색	-
B04	ASI1153	한국		갈색	61.3
B05	ASI1159	캐나다		갈색	66.4
B06	ASI1167	일본		갈색	66.2
B07	ASI1177	일본		갈색	55.4
B08	ASI1320	네덜란드		갈색	57.5
B09	ASI1323	뉴질랜드		갈색	60.6
B10	ASI1325	뉴질랜드		갈색	67.8
B11	ASI1331	브라질		갈색	67.5
B12	ASI1336	브라질		갈색	63.3
B13	ASI1396	한국		갈색	65.7

표 3-14. 갓 색 구분에 이용된 프라이머 목록

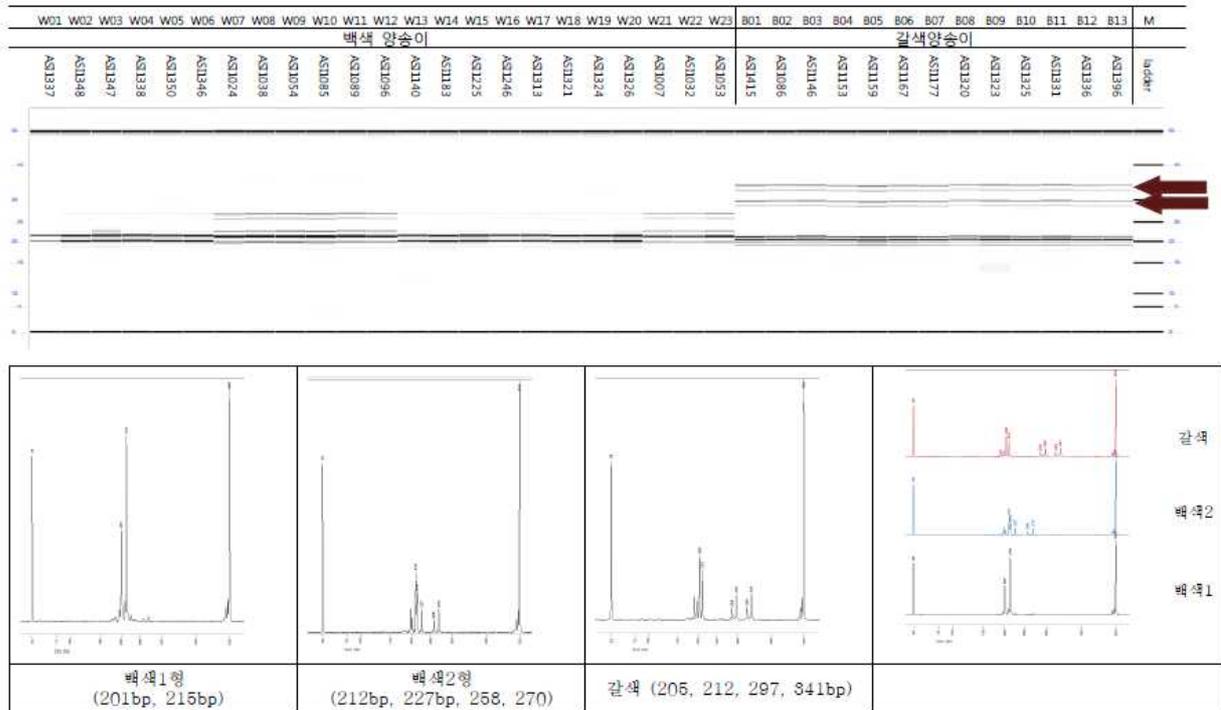
프라이머 명	프라이머 서열( 5' - 3' )
PMN 023	F : CTCGTGCGACATCGACTAC
	R : AGATCGATGGAGAGGGACTT
PMN 027	F : GGCGGAGTTGCTTAAGAGATAC
	R : TATGGATGTAGACGTTCCCG
PMN 029	F : CACTCCACCATGCAAATC
	R : ATAACAAAGGAGGAGGAGCG
PMN 042	F : CAACTGGTATGAGTGCTCCTCT
	R : GTGTCAACCGACTCCGTATAG

- PNM 023으로 증폭된 결과에서 23개 백색양송이에서 172bp, 207bp의 단편이 탐색되었고, 13개 갈색양송이 버섯에서는 173bp의 단편이 탐색되었다. PNM 027마커의 결과에서는 갈색양송이의 경우 297bp, 341bp에서 특이적인 단편이 출현하였다. PNM 029의 결과에서는 23개 백색양송이에서는 242bp, 260bp의 특이적인 단편이 출현하였고, 13개 갈색양송이에서는 228bp의 특이적인 단편이 출현하였다. PNM 042 마커에서는 241bp에서 백색양송이 특이적인 밴드가 출현하였고, 208bp의 갈색양송이 특이적인 밴드가 출현하였다(그림 3-24). 위 4개 마커를 조합함으로써 균사체에서 얻어진 DNA에서 갓 색을 구분할 수 있는 마커로 활용 가능할 것으로 판단된다. 특히 PNM 027과 PNM 042는 CDS 영역에서 얻어진 마커로서 차후 관련 유전연구에도 활용 가능할 것으로 판단된다.



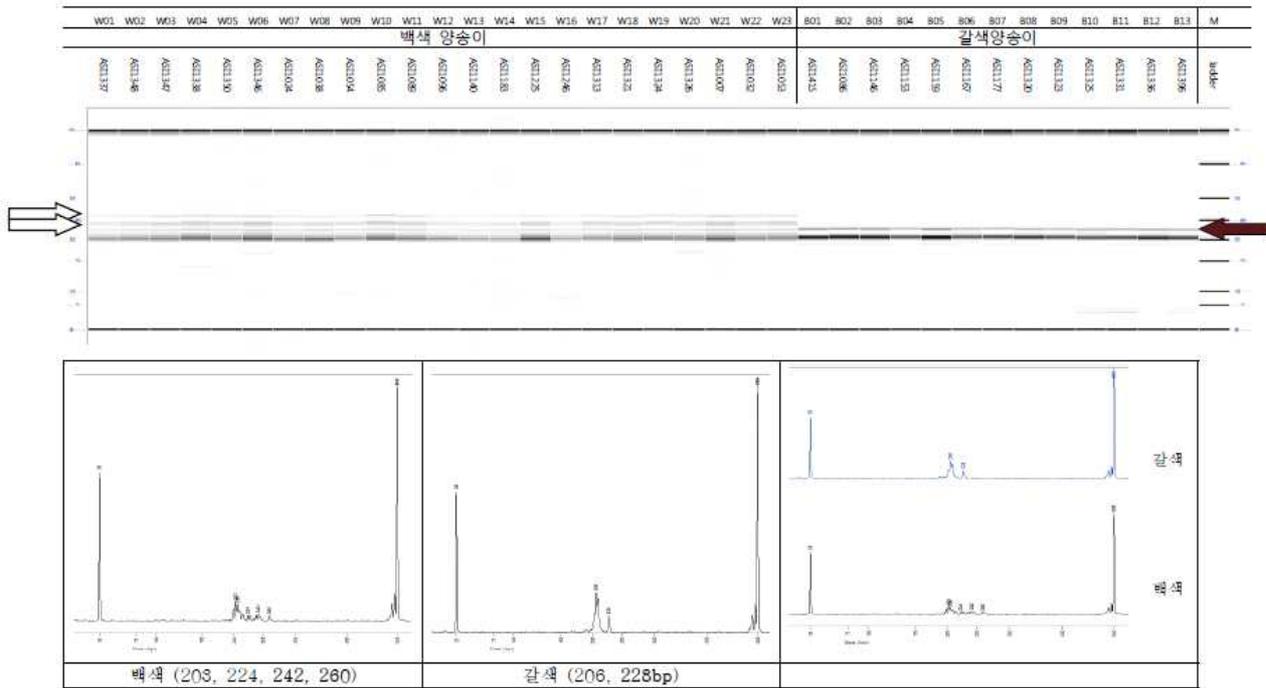
\* 백색 양송이에서 207bp 단편이 특이적으로 증폭됨

그림 3-24-1. PNM 023 PCR 결과



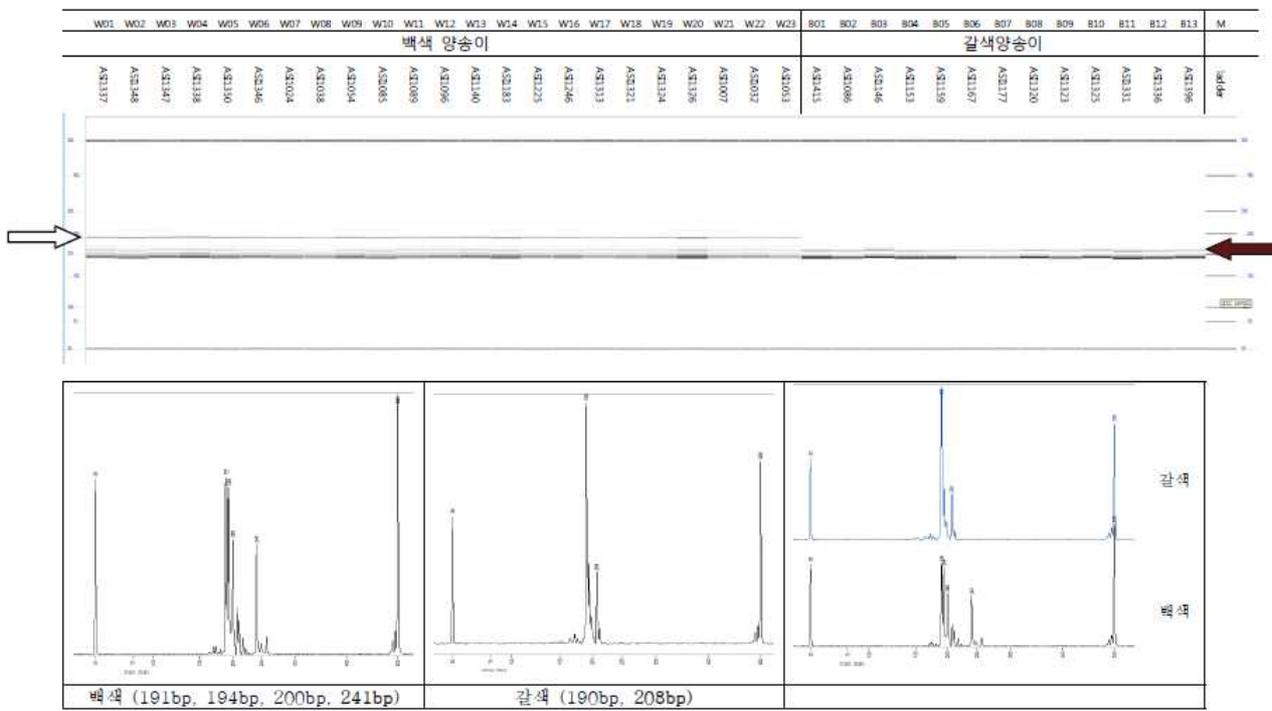
\* 갈색양송이에서 297bp, 341bp 단편이 특이적으로 증폭됨

그림 3-24-2. PNM 027 PCR 결과



\* 백색양송이에서 242bp, 260bp 단편, 갈색양송이에서 228bp 단편이 특이적으로 증폭됨

그림 3-24-3. PNM 029 PCR 결과



\* 백색양송이에서 241bp 단편, 갈색양송이에서 208bp 단편이 특이적으로 증폭됨

그림 3-24-4. PNM 042 PCR 결과

- 양송이 버섯의 갓 색에 대한 RNA-seq., RT-PCR 연구 등이 진행된 바 있으며, 본 연구에서는 단백질체 분석을 통해 특이 발현 단백질을 동정하고자 단백질체 분석을 수행하였다. 단백질체 분석은 Quantitative shotgun proteomics 분석법을 이용하였고, LTQ ion trap 질량분석장비를 활용하였다(그림 3-25).

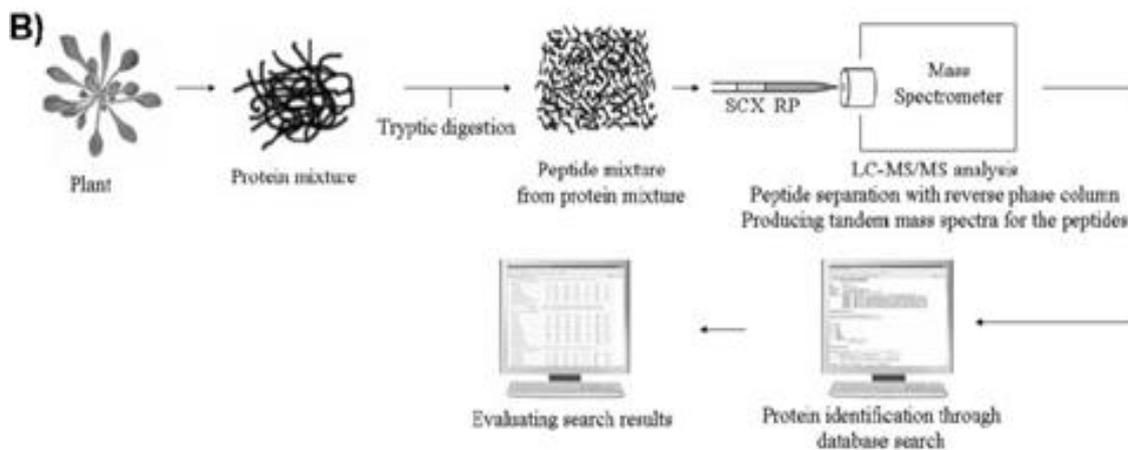


그림 3-25. shotgun proteomics 분석 체계

- 먼저 양송이에서 발현되는 단백질체 대량 동정을 위해 경상북도 농업기술원에서 분양받은 양송이 유전자원으로부터 단백질을 추출하여 동정한 결과, 총 2,132개의 단백질이 동정되었다. 이들의 분자생물학적 및 생물적 기능 등의 분석을 위해 Gene Ontology 분석을 수행한 결과, Biological process에서 11 항목, Cellular component에서 6 항목 그리고 Molecular function 5 항목에서 각각 차이를 보였다(그림 3-26, 그림 3-27). 또한 동정된 단백질 간 상대적인 양을 NSpC 방법을 이용하여 비교한 결과, K9HDE1 (Mismatched base pair and cruciform DNA recognition protein OS=Agaricus bisporus var. bisporus (strain H97 / ATCC MYA-4626 / FGSC 10389)), K9I6J8 (Nucleoside diphosphate kinase OS=Agaricus bisporus var. bisporus (strain H97 / ATCC MYA-4626 / FGSC 10389)) 등이 상대적으로 높은 양을 차지하였다(표 3-15).
- 갈색양송이와 백색양송이에서 특이 발현하는 단백질 분석을 위해 선행연구에서 사용된 백색양송이(새아)와 갈색양송이(703) 자실체에 색 발현 이전 시기, 색 발현 초기 시기의 샘플에서 단백질을 추출하여 단백질 발현 분석을 수행하였다.

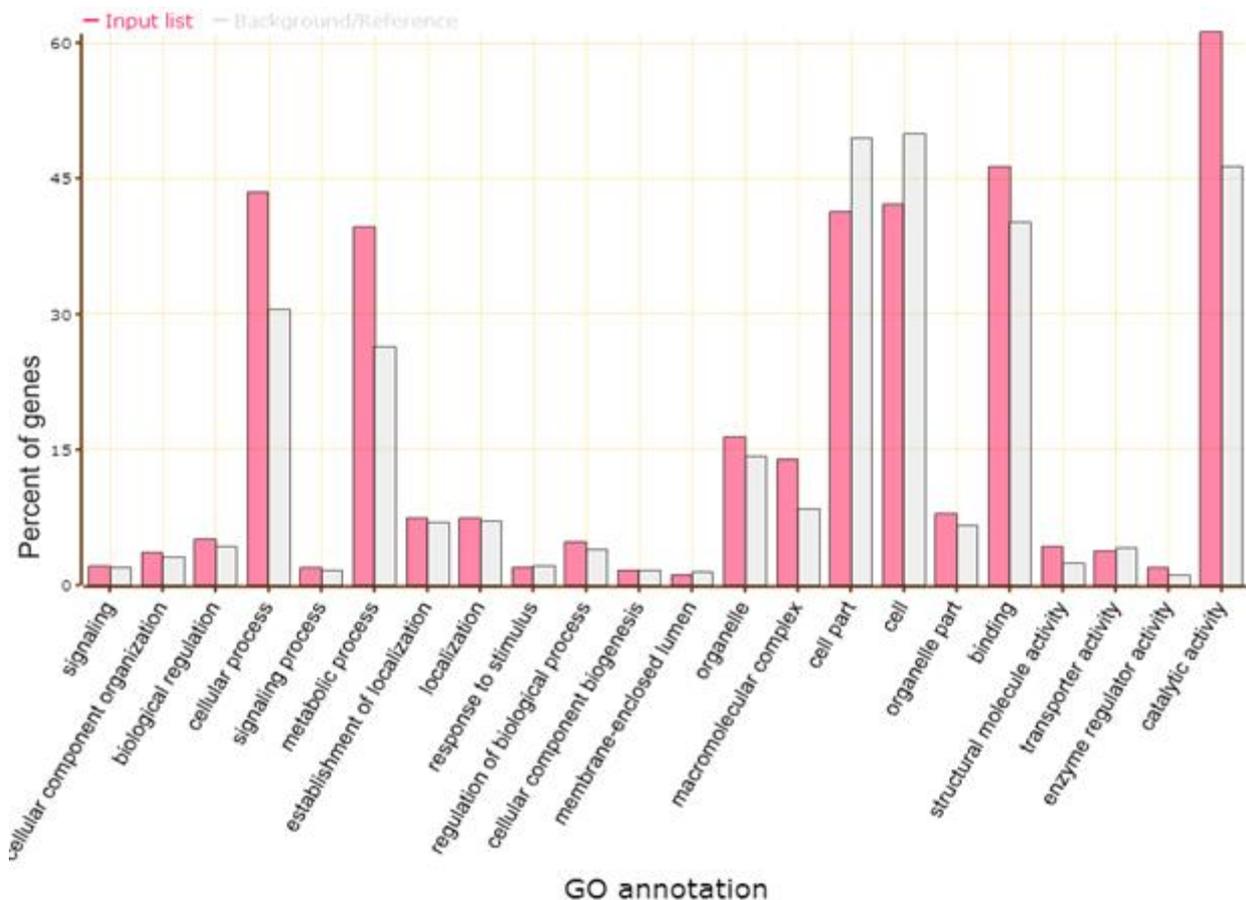


그림 3-26. 동정된 단백질체의 기능분석

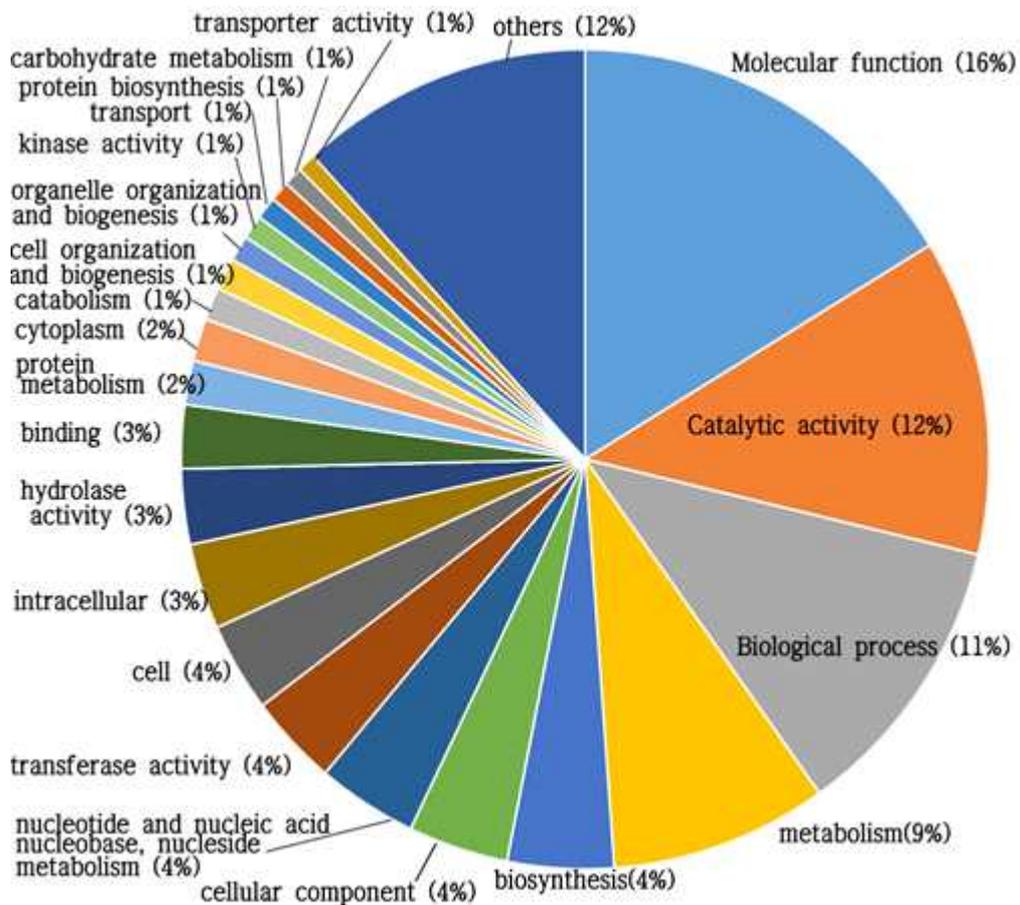


그림 3-27. 단백질 분류

표 3-15. 양송이버섯에서 발현량이 높은 단백질 목록

Accession	Description	AAs <sup>a)</sup>	MW [kDa]	calc. pI <sup>c)</sup>	NSpC
K9HDE1	Mismatched base pair and cruciform DNA recognition protein OS=Agaricus bisporus var. bisporus (strain H97 / ATCC MYA-4626 / FGSC 10389)	109	11.3	8.40	0.00183
K9HRY7	Uncharacterized protein OS=Agaricus bisporus var. bisporus (strain H97 / ATCC MYA-4626 / FGSC 10389)	562	61.0	9.13	0.00182
K9HUM8	Uncharacterized protein OS=Agaricus bisporus var. bisporus (strain H97 / ATCC MYA-4626 / FGSC 10389)	123	14.2	9.20	0.00182
K9HGS4	Uncharacterized protein OS=Agaricus bisporus var. bisporus (strain H97 / ATCC MYA-4626 / FGSC 10389)	246	27.9	5.53	0.00178
K9I6J8	Nucleoside diphosphate kinase OS=Agaricus bisporus var. bisporus (strain H97 / ATCC MYA-4626 / FGSC 10389)	151	16.7	8.15	0.00144
K9I3C6	Uncharacterized protein OS=Agaricus bisporus var. bisporus (strain H97 / ATCC MYA-4626 / FGSC 10389)	217	24.3	6.35	0.0014
K9HKX9	Uncharacterized protein OS=Agaricus bisporus var. bisporus (strain H97 / ATCC MYA-4626 / FGSC 10389)	51	5.7	8.24	0.00132

a) AAs is a number of amino acids, b) MW is molecular weight, c) Calculated pI value

라. 주요 형질관련 분자마커 개발

(2) 세균성 갈반병 관련 분자마커 개발

- 세균성 갈반병 관련 분자마커 개발을 위해 분리집단 후대의 양 극단인 저항성 집단과 감수성 집단의 bulk DNA의 염기서열을 분석하여 SNP를 탐지하는 QTL-seq. 방법을(그림 3-28) 활용하였다.
- 분리집단 육성을 위해 수집자원 중 세균성 갈반병에 감수성을 보이는 계통(ASI1321)과 저항성을 보이는 계통(ASI1085) 계통에서 포자를 받아 이들 후대를 분리집단으로 활용하였다.
- ASI1321은 *P. tolaasii*, *P. agarici*에 강한 감수성을 보였으며, *P. reactans*에 대해서는 약간 감수성을 보이는 계통이며, ASI1085는 *P. tolaasii*, *P. reactans*, *P. agarici* 모두에 강한 저항성을 보이는 계통으로 특히 *P. agarici*에 대한 저항성이 강한 계통이다(그림 3-28).

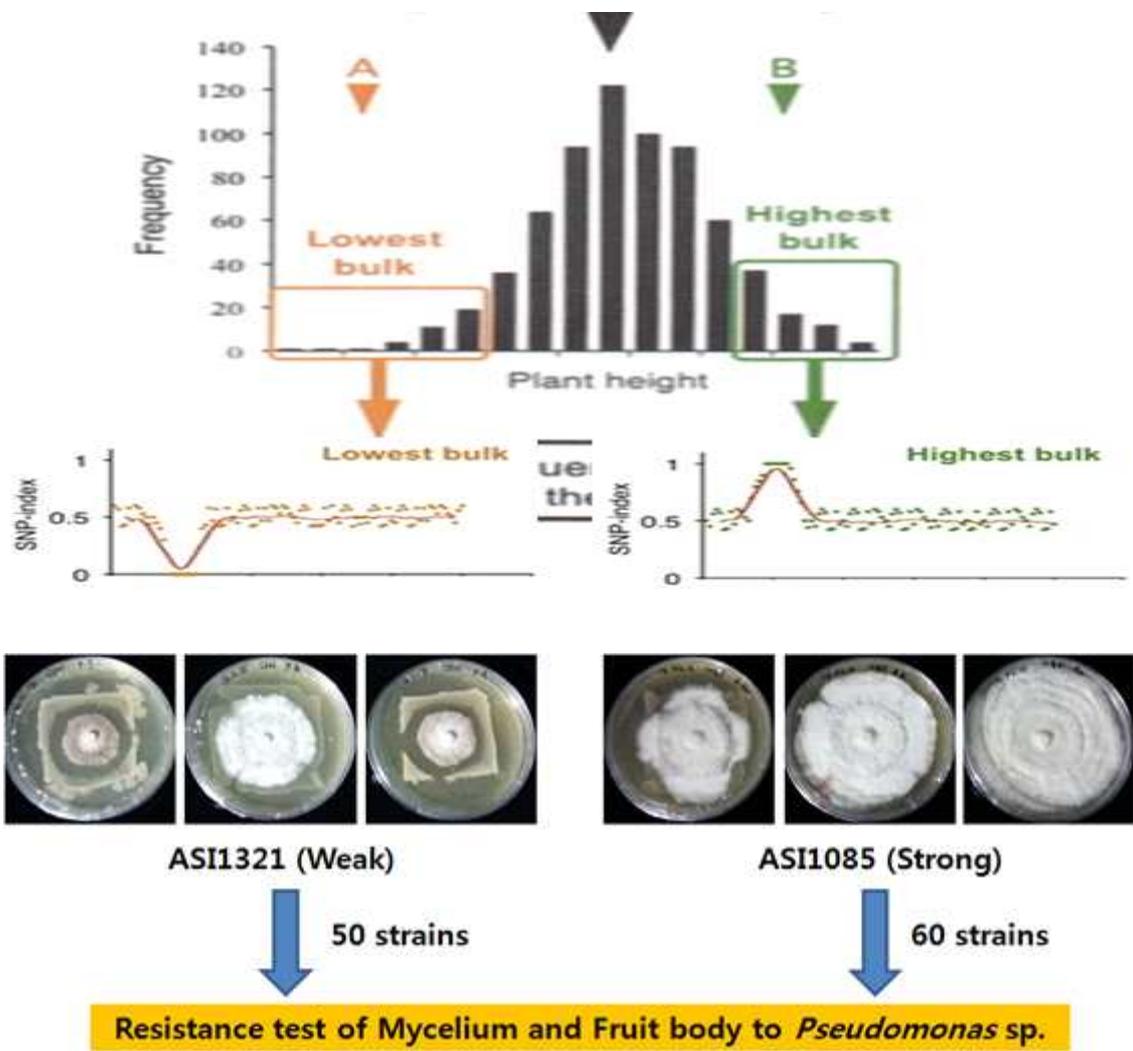


그림 3-28. 세균성 갈반병 저항성 평가를 위한 QTL-seq. 방법

- 감수성 계통인 ASI1321에서 50개의 후대 포자를 얻어 이들에 대해 균사체에서 3균주에 대한 저항성을 평가하였고(그림 3-29, 표 3-16), 자실체에 대해서는 물, *P. reactans*, *P. tolaasii*에 대한 갈변정도를 평가하였다(그림 3-30, 표 3-16).

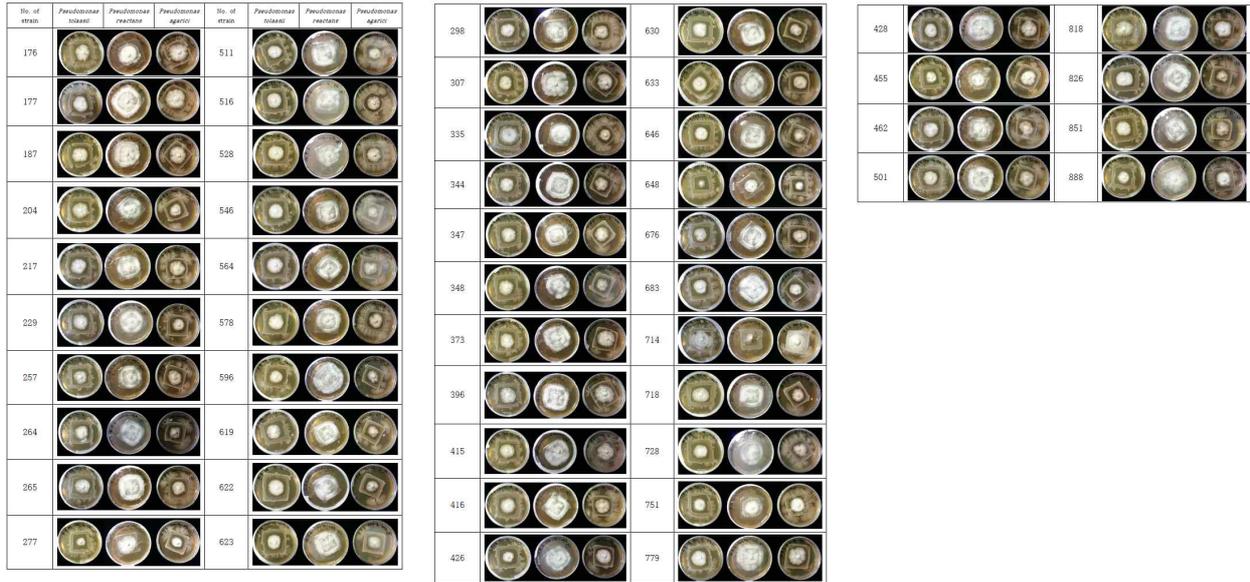


그림 3-29. 세균성갈반병 감수성계통(ASI1321) 후세대의 균사체 저항성 평가

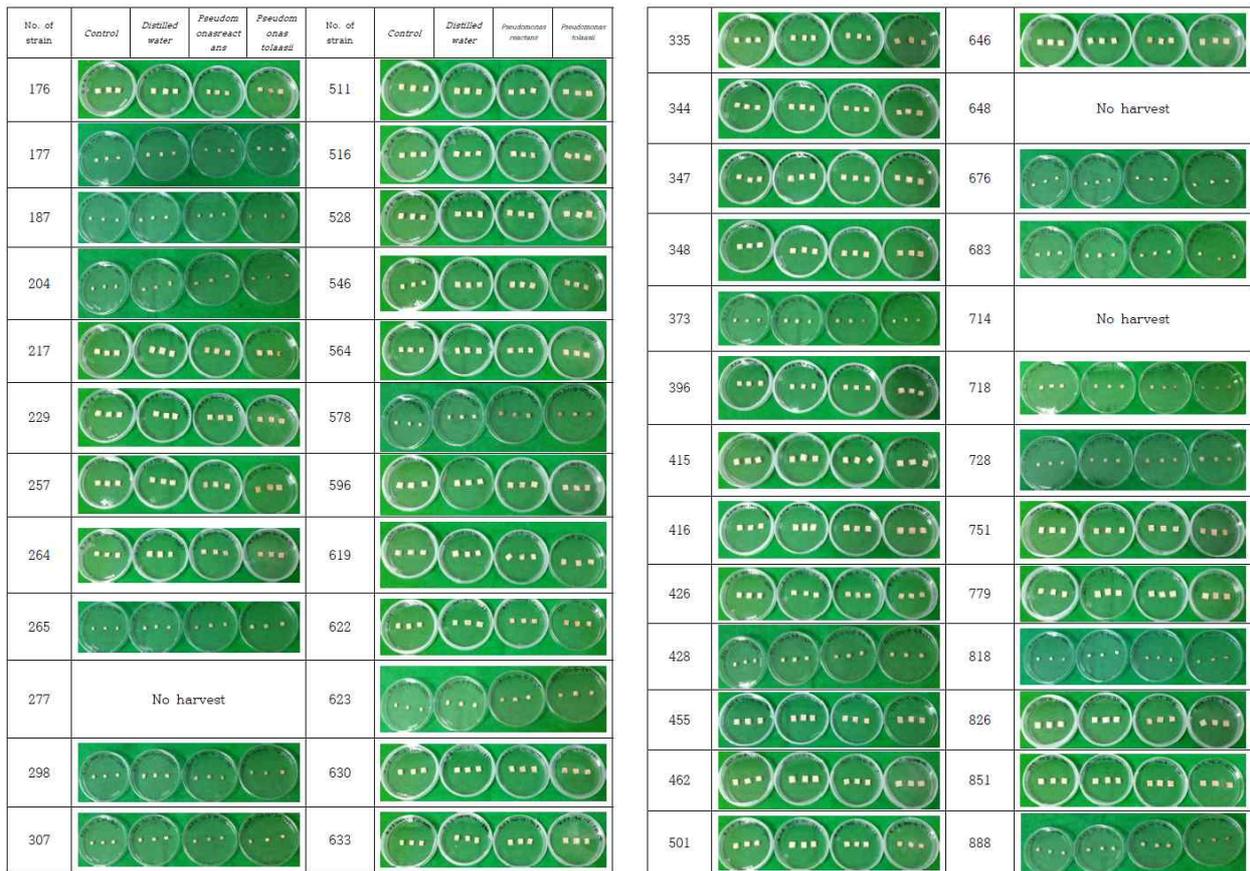


그림 3-30. 세균성갈반병 감수성계통(ASI1321) 후세대의 자실체 갈변도 평가

표 3-16. 세균성갈반병 감수성계통(ASII321) 후세대의 균사체 저항성 및 자실체 갈변도 평가

Information of Strain (strains)	Degree of resistance to <i>Pseudomonas sp.</i> <sup>a)</sup>			Degree of brown blotch to <i>Pseudomonas sp.</i> <sup>b)</sup>		
	<i>P. tolassi</i>	<i>P. reactans</i>	<i>P. agarici</i>	Distilled Water	<i>P. agarici</i>	<i>P. tolassi</i>
176	+	++	++	+	+	++
177	+	+++	++	+	++	++
187	+	+++	++	+	++	+++
204	+	+++	+	++	++	+++
217	+	+++	+	+	++	+++
229	+	+++	+	+	+	+
257	+	+++	+	+	++	+++
264	+	+++	+	+	+	+
265	+	+++	+	+	++	++
277	+	+++	+			
298	+	+++	+	+	++	++
307	+	+++	+	+	++	++
335	+	+++	+	+	+	++
344	+	+++	+	+	+	++
347	+	+++	+	+	+	+
348	+	+++	+	+	+	+
373	+	+++	++	+	++	++
396	+	+++	++	+	+	+
415	+	+++	++	+	+	+
416	+	+++	+	+	+	++
426	+	+++	+	+	+	+
428	+	+++	++	+	++	++
455	+	+++	+	+	+	++
462	+	+++	++	+	+	+
501	+	+++	+	+	+	++
511	+	+++	+	+	+	++
516	+	+++	+	+	++	++
528	+	+++	+	+	+	+
546	+	+++	+	+	+	++
564	+	+++	+	+	+	+
578	+	+++	+	+	+++	+++
596	+	+++	+	+	+	+
619	+	+++	+	+	+	++
622	+	+++	+	+	++	+++
623	+	+++	+	+	+++	+++
630	+	+++	+	+	++	++
633	+	+++	+	+	+	+
646	+	+++	+	+	+++	++
648	+	++	+			
676	+	+++	+	+	++	++
683	+	+++	+	+	++	++
714	+	++	+			
718	+	+++	+	++	+++	+++
728	+	+++	+	+	+++	+++
751	+	+++	+	+	++	++
779	+	+++	+	+	+	++
818	+	+++	+	+	++	+++
826	+	+++	+	+	++	++
851	+	+++	+	+	++	++
888	+	+++	+	+	++	+++

a) Mycelium, b) Fruit body

- 저항성 계통인 ASI1085에서는 60개의 후대 포자를 얻어 위의 방법으로 균사체의 저항성을 평가하였고(그림 3-31, 표 3-17), 자실체에 대해서는 물, *P. reactans*, *P. tolaasii*에 대한 갈변정도를 평가하였다(그림 3-32, 표 3-17).

No. of strain	<i>Pseudomonas agrippae</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>Pseudomonas reactans</i>	No. of strain	<i>Pseudomonas agrippae</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>Pseudomonas reactans</i>
6				104			
7				105			
11				106			
14				111			
22				112			
23				121			
26				127			
32				128			
39				130			
41				136			
44				154			

45		169	
46		170	
47		173	
53		175	
54		184	
61		186	
63		187	
65		190	
69		193	
72		195	
74		212	

75		213	
76		217	
78		218	
83		220	
84		225	
85		231	
86		240	
102		247	

그림 29.

그림 3-31. 세균성갈반병 저항성계통(ASI1085) 후세대의 균사체 저항성 평가

No. of strain	Control	Distal water	<i>Pseudomonas reactans</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	No. of strain	Control	Distal water	<i>Pseudomonas reactans</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
6					104	No. harvest			
7					105				
11					106				
14					111	No. harvest			
22					112	No. harvest			
23					121				
26					127				
32					128				
39					130	No. harvest			
41					136				
44					154				

46		170		
47		173		
53		175		
54		184		
61		186		
63		187		
65	No. harvest		190	
69	No. harvest		193	
72		195		
74		212	No. harvest	
75		213	No. harvest	
76		217	No. harvest	
78		218		

83		220		
84		225	No. harvest	
85	No. harvest		231	
86		240		
102	No. harvest		247	

그림 3-32. 세균성갈반병 저항성계통(ASI1085) 후세대의 자실체 갈변도 평가

- 세균성 갈반병에 저항성과 감수성인 2계통에 대해서 후세대 포자를 각 50, 60점을 수집하여 균사체와 자실체에 대한 저항성 정도를 평가한 결과, 균사체에서는 감수성인 계통의 후대에서도 감수성 비율이 높게 나타났고, 저항성 계통의 후세대에서도 저항성 비율이 상대적으로 높은 것으로 확인되었다. 반면, 자실체에서는 큰 차이를 확인할 수 없었다(표 3-18).

표 3-17. 세균성갈반병 저항성계통(ASII085) 후세대의 균사체 저항성 및 자실체 갈변도 평가

Information of Strain (strains)	Degree of resistance to <i>Pseudomonas sp.</i> <sup>a)</sup>			Degree of brown blotch to <i>Pseudomonas sp.</i> <sup>b)</sup>		
	<i>P. tolassi</i>	<i>P. reactans</i>	<i>P. agarici</i>	Distilled Water	<i>P. agarici</i>	<i>P. tolassi</i>
6	+	+++	+			
7	++	+++	++	++	+++	+++
11	++	+++	++	+	++	+++
14	++	+++	+	+	++	++
22	++	+++	+++	+	++	++
23	++	+++	++	+	++	++
26	++	+++	++	+	++	++
32	+	+++	+	++	++	++
39	++	+++	++	+	++	+++
41	++	+++	++	++	++	++
44	++	+++	+++	++	++	++
45	+	+++	+	+	++	+
46	++	+++	+	+	++	+++
47	++	+++	+	+	+	++
53	+	+++	+	+	++	+++
54	+++	+++	++	+	++	++
61	++	+++	+++	+	++	++
63	++	+++	+	+	++	++
65	++	++	+			
69	+	++	+			
72	+++	+++	++	+	+	+
74	++	+++	++	+	+	++
75	++	+++	+	+	+++	+++
76	++	+++	++	+	+	++
78	++	+++	++	+	+	++
83	++	+++	+			
84	++	+++	+	+	+	++
85	+	++	+			
86	+	+++	++	+	+	+
102	++	+++	+			
104	+	++	+			
105	+	+++	+	+	++	++
106	++	+++	++	+	+	+
111	++	+++	+			
112	++	+++	+	+	++	++
121	+	++	+			
127	++	+++	+	+	++	++
128	++	+++	+	+	++	++
130	+++	+++	++			
136	++	+++	+	+	++	+++
154	+	+++	+	+	++	++
169	++	+++	++	+	++	++
170	++	+++	+	+	++	++
173	++	+++	+	+	++	++

175	++	+++	+	+	+	+
184	+++	+++	+	+	+	+++
186	+++	+++	+	+	+++	+++
187	+++	+++	+	+	++	++
190	++	+++	+	+	++	+
193	++	+++	+	+	++	+++
195	++	+++	++	+	+	++
212	+	+++	+			
213	+	+++	+			
217	++	+++	+			
218	+	+++	+	+	+	++
220	++	+++	++	+	++	++
225	++	+++	++			
231	++	+++	+	+	+	+
240	+	+++	+	+	++	+
247	++	+++	+	+	+	++

a) Mycelium, b) Fruit body

표 3-18. 세균성저항성 및 감수성 계통의 후대 계통의 균사체 저항성 및 자실체 갈변도 분리

Strain	Test parts	The progeny' s resistance rate to <i>Pseudomonas</i> sp.								
		<i>P. tolaasii</i>			<i>P. reactans</i>			<i>P. agarici</i>		
		+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
ASI	Mycerial (n=50)	50	0	0	0	3	47	42	8	0
1321	Fruit body (n=47)	45	2	0	22	20	5	12	24	11
ASI	Mycerial (n=60)	15	39	6	0	5	55	39	18	3
1085	Fruit body (n=48)	43	5	0	14	31	3	8	29	11

마. 유전체 재분석 정보를 활용한 품종구분 마커, 단핵선발 마커 개발

- 유전체 재분석 정보를 활용한 품종구분 마커 개발을 위해 품종별 특이 동형접합 부위를 선별하고, 품종별 특이 haplotype 정보를 활용하여 품종 구분용 SNP를 얻어 최종적으로 품종구분용 마커를 개발하고, 품종별 이형접합 SNP를 탐색하고, 품종간 공통적인 부위에 대해 마커를 개발함으로써 단핵선발 마커를 개발하고자 하였다(그림 3-33).

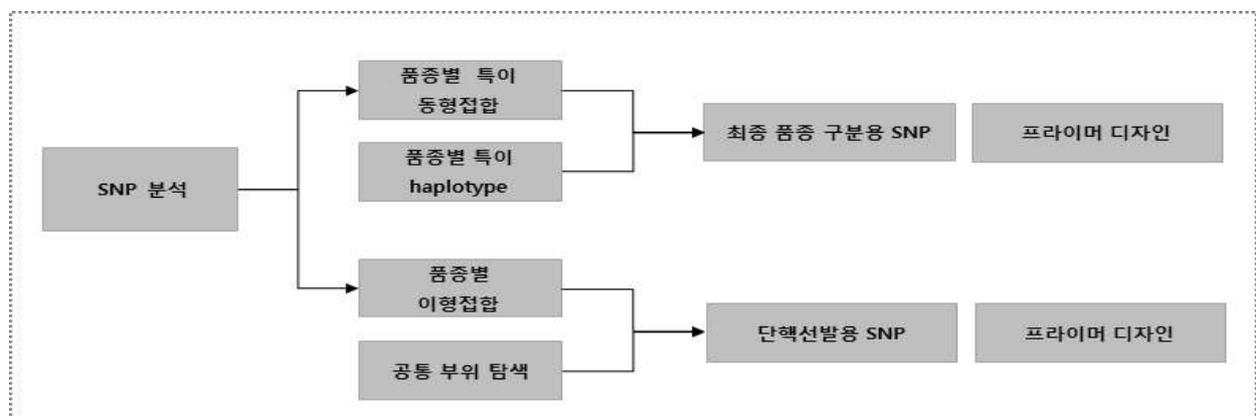


그림 3-33. 유전체 재분석 자료를 활용한 품종특이 마커 및 단핵선발 마커 개발 모식도

(1) 품종구분용 마커 개발

- 국내 육성 양송이버섯인 새아, 새도, 새연, 새정, 새한 및 호반의 6개 품종의 유전체 재분석 정보에서 품종별 특이 SNP는 각각 28, 22, 22, 23, 29, 34개를 얻어 이들에 대한 CAPs 마커 검정 중에 있으며(표 3-19), SSR 정보 분석에서 얻어진 결과를 활용하여 개발된 마커 60개에 대해 capillary 전기영동으로 분석하였다(그림 3-34).

표 3-19. 6개 계통에서 선발된 특이 SNP

품목	ASI337 (새아)	ASI348 (새도)	ASI347 (새연)	ASI338 (새정)	ASI350 (새한)	ASI1415 (호감)
총수	434,225	446,742	444,408	448,616	712,615	690,992
특이 SNP선발	28	22	22	23	29	34

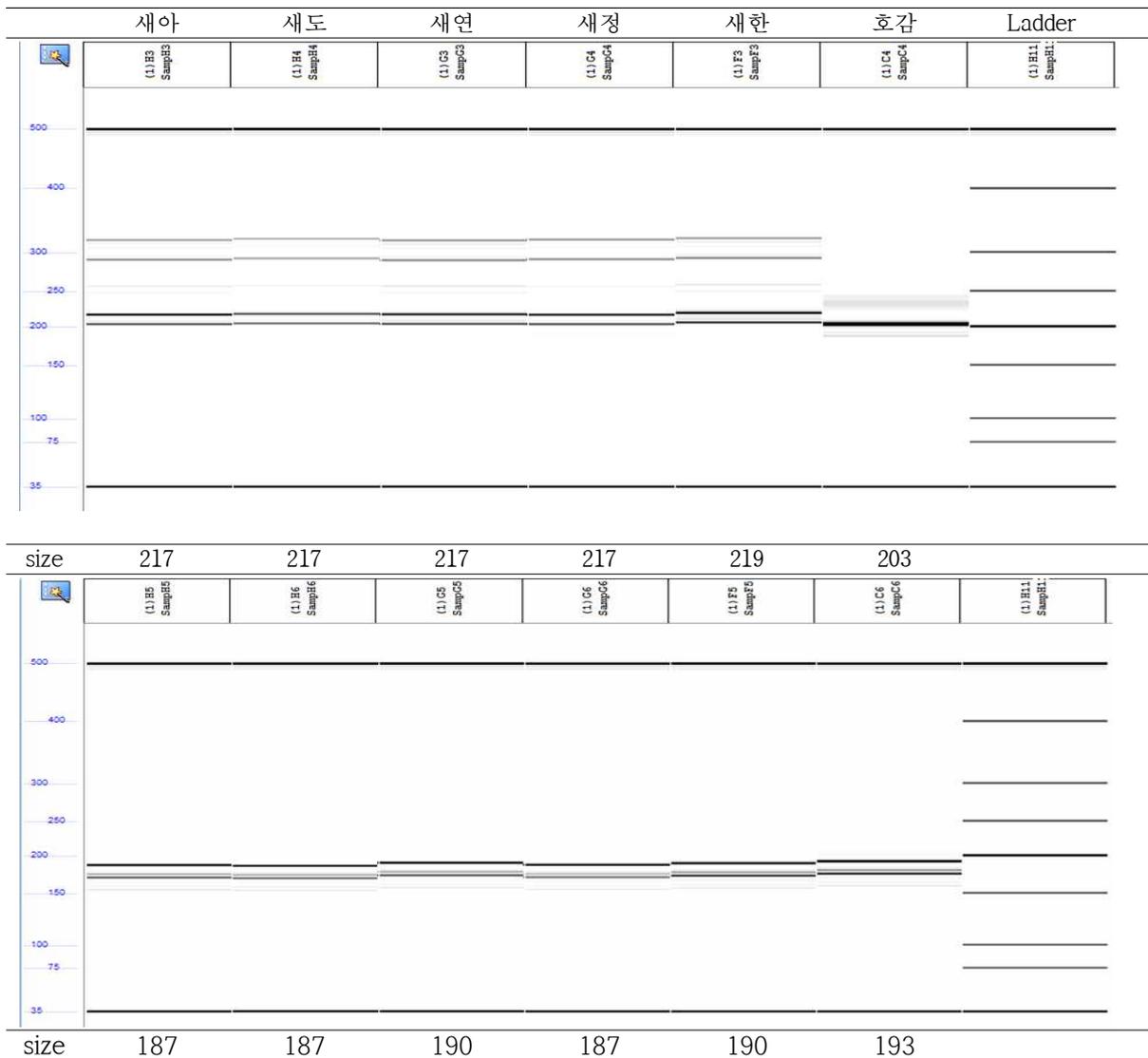


그림 3-34. 국내 육성 양송이버섯 판별용 마커

- Marker 1에서 새아, 새도, 새연, 새정은 모두 같은 단편 길이를 보였으나, 새한과 호감이 구분되었다. Marker 2에서는 백색양송이는 새아, 새도, 새정이 같은 단편을 보였고, 새연과 새한이 동일한 밴드를 보였다. 60여개 마커를 확인하였으나 새아, 새도, 새정을 구분할 수 없었고, capillary 방법으로 2bp의 미세한 차이를 안정적으로 구분하기는 어려울 것으로 판단된다. 추후 품종 특이 SNP에 대한 CAPs 마커 개발이 필요할 것이다.

(2) 단핵선발용 마커 개발

- 16개 계통의 유전체 정보에서 이형접합 빈도가 높은 영역에 대해 프라이머를 디자인하여 활용하였으며(표 3-20), 평가된 균주는 자실체 특성이 우수한 ASI1336(브라질 수집, 갈색), ASI1396(국내 수집, 갈색)에서 얻은 포자를 분양받아 평가하였다.
- 각 계통별 50개 후대에서 추출한 DNA에 대해 단핵포자로 예상되는 결과를 얻지는 못했다(그림 3-35). 충분한 후대에 대한 검토가 필요하며, CAPs 마커의 개발로 보다 효율적으로 검정할 수 있는 마커 개발이 필요하다.

표 3-20. 단핵선발 실험용 마커 목록

Mo	ASI 141	ASI 102	ASI 105	ASI 107	ASI 107	ASI 108	ASI 131	ASI 132	ASI 132	ASI 133	ASI 133	ASI 134	ASI 134	ASI 134	ASI 135	sequence(5' -3')		
1	TCC	-0.33	-1.00	-0.33	-0.33	-0.33	-0.33	.	0.00	-0.33	-1.00	.	.	0.00	-0.33	-1.00	-1.00	F: CTTCTCCTCCGTCCTCAAAC R: AAAGTGGTGGGGTTGGTC
2	CAA	-0.33	-0.33	-0.33	0.00	-0.33	-0.33	-0.33	0.00	-0.33	-0.33	-0.33	0.00	-0.33	-0.33	-0.33	0.00	F: GTATGCTTCCAGTCCTTTG R: AGCGTAGCTCCCATTAAC
3	TCT	-0.33	2.00	2.00	.	2.00	-0.33	2.00	2.00	-0.33	.	2.00	2.00	2.00	0.00	0.00	.	F: GGATACGTGGAACCATAACTC R: GTCGACTAGACTGCGAAAAC
4	AAC	-1.33	.	-1.33	-4.67	-4.33	-4.33	0.00	-1.33	-4.33	-1.33	0.00	-1.33	-1.33	0.00	-1.33	.	F: CTTTGACGGGGATGATACAG R: GGGCTGGACAAGTTGAGTC
5	GAC	-1.67	0.00	-5.00	.	-1.67	-1.67	.	.	-1.67	0.00	.	.	0.00	0.00	-1.67	-1.67	F: AACACAATGTCTCCACCAC R: GTAAGAGTGACTTCCAGCG
6	CAG	-1.67	-0.67	-2.00	0.00	.	-1.67	-1.00	0.00	0.00	-0.67	-0.67	0.00	-0.67	-0.67	-0.67	0.00	F: GAAGCTGTACCAGATCCAAGT R: GGGTTCTTTCTCTCCGTC
7	AT	0.50	0.50	0.50	0.00	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00	F: GTGTGTCCAGGTGTTGGCTATAC R: GATCACCAGTCTTCCGTACT
8	TCC	4.33	4.33	.	4.33	.	4.33	0.00	4.33	0.00	.	0.00	4.33	4.33	0.00	4.33	.	F: CTTCTCCTGGTTTGGGTGTT R: GAAGAGGACAAGAACCCCTTACG
9	CTC	-1.33	0.00	.	.	.	-1.33	0.00	0.00	-1.33	0.00	-1.33	.	-1.33	.	-1.33	.	F: CCCTGTGATAACAGTCTTCCAG R: CGTCTTGGAGGAGAAGAACTAc
10	ATC	-0.33	-3.33	-1.00	-3.33	-0.33	-3.33	0.00	0.00	-3.33	-3.33	-3.33	-4.67	-3.33	0.00	.	0.00	F: ATCCGGAGGAGATTCCGATAC R: CCACCTGAAGAAATGACGAC
11	AT	-3.50	.	-2.50	0.00	-3.50	-3.50	-3.50	-3.50	-3.50	.	-3.50	.	.	.	.	0.00	F: GCTCCCTTGACTTTGGTAGA R: CAGTCTGTCTCCCCCTAC

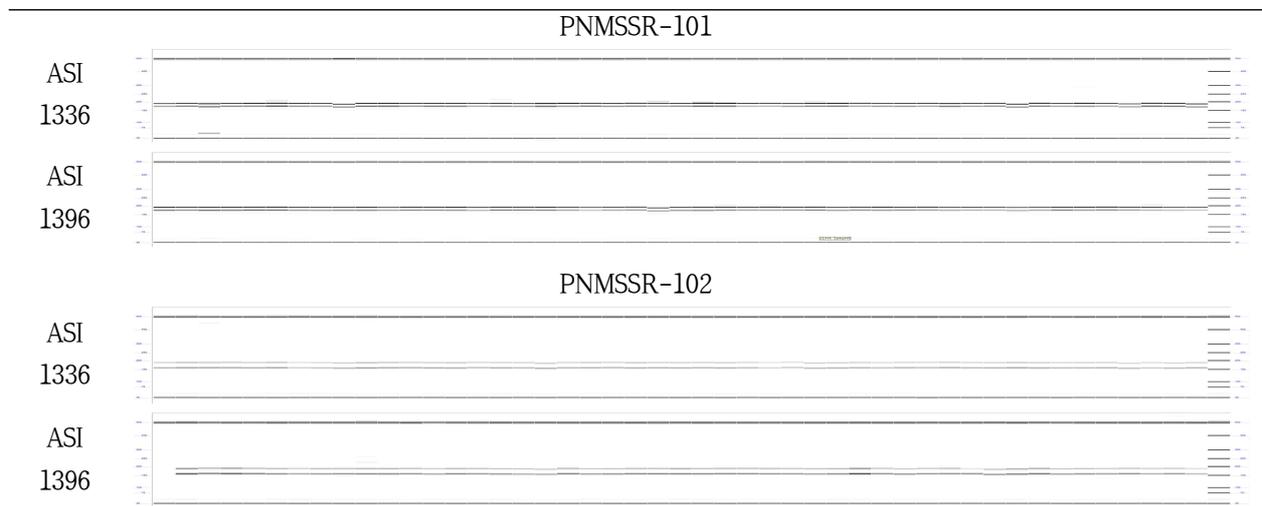


그림 3-34. 단핵균주 선발 결과

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절. 표고의 주요형질, 내병성 및 버섯발이 온도 판별 관련 분자마커 개발

본 연구팀은 세계 최초로 표고 표준유전체 정보를 완성하였다. 이를 이용하여 품종구분이 가능한 SSR 마커를 개발하였으며, 많은 품종에 관하여 resequencing을 수행하여 많은 자료를 보유하고 있다.

표고 표준유전체 확보하는데 사용한 전략을 다른 재배 버섯 및 작물에 응용하여 국내 식물 및 동물, 버섯의 유전체 분석기술 향상 및 분자 육종 수준에서의 국가 경쟁력을 제고할 수 있을 것이다. 또 확보한 표준유전체를 바탕으로 앞으로 분자표지이용선택(Marker-assisted selection, MAS)을 통한 육종 효율성 제고, 육종연한 단축 및 경비 절감으로 국제 경쟁력 있는 품종 육성이 가속화 될 것이다. 또 단핵군사 간의 교배 또는 단핵군사와 이핵군사와의 교배를 이용하는 고전육종과 분자육종기술의 접목을 통한 버섯육종 패러다임의 변화를 유도할 수 있다.

확보된 표고 표준유전체는 형질 선발 마커를 개발하는데 용이하다. 현재의 전통적인 육종방법으로 품종을 개발하는데 원목 품종은 7 ~ 10년, 톱밥 품종은 3 ~ 5년이 소요되는 상황에서 형질 선발 마커의 도입은 신속 정확하게 우량 품종육성이 가능하며, 국내 표고버섯의 육종기반을 구축하여 형질 관련 분자마커를 활용한 선발로 품종 육종 효율이 증대 될 것이다. 그리고 품종 구분 마커의 개발에도 용이하다. 현재 한중 FTA의 영향으로 중국산 표고버섯의 수입이 증가하고 있고, 표고버섯의 생산량보다 소비량이 많은 일본에서 중국산 표고버섯보다 한국산을 선호하고 있어, 동북아 3국의 표고버섯 시장이 급속히 변화하고 있다. 이에 따라 직접적인 버섯의 수출입 이외에 품종의 수출도 이루어 질 것으로 판단된다. 그리고 2010년 10월 제 10차 생물다양성협약 당사국 총회를 통해 나고야 의정서가 채택됨에 따라 각국은 현재 보유하고 있는 유전자원에 대한 보호를 강화할 것으로 생각된다. 그리고 우리나라는 1997년 종자산업법을 시행하여 국내에서 신품종 육성자를 보호하고 있고, 2002년에 UPOV에 가입하였다. UPOV의 가입으로 우리나라는 외국 품종을 이용할 때 로열티를 지불하게 되고 국외에 수출될 수 있는 국내 품종들도 보호받게 된다. 현재의 상황에서 품종 구분마커의 개발은 국외 품종에 대한 국산 품종의 구별성을 확보하여 국내에서 개발된 품종들을 보호하는데 도움을 줄 것이다.

따라서 표고 표준유전체 정보 확보는 형질 선발, 품종 구분 마커의 개발에 도움을 주어 우수 품종 개발로 국내 재배품종의 국산화율을 높일 뿐만 아니라 농가 소득에 기여하며, 해외 거대시장인 중국, 인도, 일본, 중동, 미국, 유럽 등 진출을 위한 수출용 품종을 개발 할 수 있는 기반 확보하는데 기초가 된다. 또, 형질 선발 마커와 유용유전자, 유전체 분석 원천기술에 대한 특허 획득으로 농업경쟁력 강화시키며, 각 수출 시장별 소비자 선호형 육종소재를 개발하여 민간육종회사와 공동 활용이 가능하고, 원산지로부터 유용형질 보유 유전자원 확보하여 국내 육종기술접목으로 글로벌 해외 버섯시장 진출이 가능하다.

## 2절. 느타리류의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

연차	연차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
3년차 (2015)	느타리류 형질별 분리집단 육성	- 큰느타리버섯, 느타리버섯 농업주요형질, 병저항성 등 분리집단 구축	-세계최초로 SSR을 이용한 큰느타리버섯 연관집단 작성 -농업적으로 중요한 형질 QTL 세계최초로 검출 -주요 느타리버섯 품종 흑타리, 미소의 유전체 분석으로 마커, 분자유전학 분야 기초자료로 사용될 수 있음.
	느타리류의 특성에 따른 유전체 비교분석에 의한 분자마커 개발	- 큰느타리버섯의 주요 농업형질 QTL 마커 발 - 느타리버섯 흑타리와 미소 유전체 서열 해독 및 SSR 분석	
4년차 (2016)	큰느타리버섯 전사체와 QTL 융합기술 및 reference 정보를 이용한 환경적, 양적형질 관련 분자마커 개발	-큰느타리버섯 수량관련 후보유전자 선발(13종) -큰느타리버섯 유전지도 해상도 향상	-세계최초로 큰느타리버섯 수량관련 후보유전자를 구명함으로써 향후 수량관련 유전자 발굴에 유리한 위치에 있음. -집단의 규모와 마커의 수를 늘림으로서 큰느타리버섯 유전자지도의 해상도를 향상시켰는데, 이는 마커의 정밀성과 재현성을 높일 수 있음.
	느타리버섯 전사체와 QTL 융합기술 및 reference 정보를 이용한 환경적, 양적형질 관련 분자마커 개발	-느타리버섯 품종판별 마커 개발 -느타리버섯 유전지도 작성	-느타리버섯 주요품종 판별마커 개발로 품종혼종사고 예방 가능하여 농업현장에서 안정적 버섯생산 기반 확립 -느타리버섯의 유전지도를 작성함으로써 농업적 주요형질의 QTL 마커 개발 기반 구축

### 3절. 양송이의 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발

연차	년차별 연구목표	연구목표 달성도	관련 분야에의 기여도
3년차 (2015)	NGS 기반 양송이 유전체 정보 확보 및 유전다양성 분석	-양송이 주요 품종 및 수집 유전자원 38계통에 대한 re-sequencing 수행 및 유전자형 변이 정보(SNP, InDel 등) 확보 -표준유전체 정보 활용, 대량 SSR 마커 개발	-양송이 유전자원의 전장유전체 및 SNP 정보의 database 구축을 통해 대량의 분자마커를 제공함으로써 다양한 형질 연관 마커 개발 연구에 활용할 수 있는 기반을 마련함.
	양송이 유전자원 수집 및 군사체 특성 평가	-원산지권역별 유전자원 (49점) 수집 -온도별 군사생장 특성 평가 및 세균성 갈반병 저항성 평가	-유전자원의 군사체 특성 정보 제공 및 유용 자원 선발을 통해 고온성 및 내병성 양송이버섯 신품종 개발을 위한 기초 정보 및 육종소재를 제공할 수 있음.
4년차 (2016)	유전체 정보 기반 형질 연관 마커 개발	-유전체 재분석 정보 기반 대량 SSR마커 개발 -수집 유전자원 유전다양성 분석 -갓 색 구분용 마커셋 개발 및 단백질체 분석 -세균성 갈반병 연관 마커 개발을 위한 후대 계통 육성 및 저항성 정도 평가 -국내 육성 품종 구분을 위한 마커 개발	-대량 분자마커 정보를 제공함으로써 양송이버섯의 유전연구 활성화에 기여함. -갓 색 구분용 마커개발로 갈색양송이 품종육종을 위한 효율성 개선 -발현 단백질에 대한 대량 정보 제공으로 양송이버섯의 단백질체 연구 분야에 기여함 -품종 구분 마커 개발로 품종 혼종 예방 등의 기반 확립
	형질 연관 마커 개발을 위한 양송이 유전자원 자실체 특성 평가 및 후대 집단 육성	-수집 유전자원의 자실체 특성평가 : 초발이 일수, 수확일수, 갓의 크기, 경도, 두께, 색도, 자실체 갈변성, 수확량 평가 -단포자 균주 선발을 위한 집단 구축	-유전자원의 군사체 특성 정보 제공 및 유용 자원 선발을 통해 고온성 및 내병성 양송이버섯 신품종 개발을 위한 기초 정보 및 육종소재를 제공할 수 있음.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절. 연구개발 성과

#### <제 1 세부>

### 1절. 연구개발 성과

구분	품종개발		특허		논문		분 자 마 커	유전자원		국내매 출액	종자 ‘ 수출액	기술 이전	마케팅 전략 및 보고서	인력 양성
	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비S CI		수 집	등 록					
최종목표			4		1	2								
연구기간내 달성실적			4		1	2	16		25					1
달성율(%)			100		100	100								

### 2절. 유형별 성과

#### 1. 논문게재

번호	논문명	학술지명	주저 자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	브라시노스테로이드 신호전달 네트워크 조절기작과 이용	광과학세계	이진수	52	대한민국	한국광과학회	비SCI
2	Whole genome de novo sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, Lentinula edodes	Journal of Biotechnology	심동환, 박신기, 김강민	223	네덜란드	ELSEVIER	SCI
3	Microarray와 Network 분석을 통한 병원균 및 스트레스 저항성 관련 주요 유전자의 대량 발굴	JOURNAL OF PLANT BIOTECHNOL OGY	김형민	43	대한민국	한국식물생명공 학회	비SCI

#### 2. 특허

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	표고버섯 품종 향 고 808, 산마루 1 호, 산조 705호 판별용 프라이머 세트 및 이의 용 도	대한민 국	충북대학 교 산학협 력단	2016. 9. 29	10-2016-0 125768				

발명특허	표고버섯 품종 산조 701호, 산조 707호, 산조 708호 및 참아람 판별용 프라이머 세트 및 이의 용도	대한민국	충북대학교 산학협력단	2016. 9. 29	10-2016-0125769				
발명특허	표고버섯 품종 판별용 프라이머 세트 및 이의 용도	대한민국	충북대학교 산학협력단	2016. 9. 29	10-2016-0125770				
발명특허	표고버섯 품종 판별용 프라이머 세트 및 이의 용도	대한민국	충북대학교 산학협력단	2016. 9. 29	10-2016-0125771				

### 3. 분자마커

번호	특성	보유건수	주요내용	활용년도
1	표고 품종 판별	14	향고 808, 산마루1호, 산조 705호, 산조 701호, 산조 707호, 산조 707호, 참아람, 산림7호, 산림9호, 산림10호, 여름향, 가을향, 백화향, 다산향, 수향고, 천백고, 풍년고, 천장1호, 천장2호, 천장3호, 산마루1호, 참맛, 산조 101호, 산조 102호, 산조 103호, 산조 108호, 산조 109호, 산조 110호, 산조 111호, 산조 301호, 산조 302호, 산조 501호, 산조 702호, 산조 7004호, 사늑 706호, 산조 709호, 산조 710호 판별	2016

### 4. 학술발표

번호	제목	날짜	학술대회명	비고
1	Whole Genome De Novo Sequencing and Genome Annotation of the world popular cultivated edible mushroom, <i>Lentinula edodes</i>	2016. 6. 10	2016년도 한국식물생명공학회 정기 학술발표회 및 총회	구두발표
2	Whole Genome De Novo Sequencing and Genome Annotation of the world popular cultivated edible mushroom, <i>Lentinula edodes</i>	2016. 6. 16	2016 International Symposium and Annual Meeting of the Korean Society for Applied Biological Chemistry	구두발표
3	표고의 유전체 정보 해독과 활용	2016. 10. 28	2016 한국버섯학회 추계학술대회	구두발표

5. 홍보실적

번호	제목	날짜	매체	비고
1	표고버섯 유전체정보 해독 완료	2016. 3. 2	뉴데일리, 뉴스1코리아, 충청투데이, 중부매일, 충북일보, 연합뉴스	6건

6. 인력양성

번호	분류	기준년도	인력양성 현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	박사후연구원	2015	1				1			1				

7. 유전자원 등록

번호	구분	생명자원(정보)명	등록번호	등록일
1	생명정보	표고버섯 참아람 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3074-000001	2016-10-19
2	생명정보	표고버섯 산조 301호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3484-000001	2016-11-02
3	생명정보	표고버섯 산조 110호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3461-000001	2016-10-31
4	생명정보	표고버섯 산조 501호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3463-000001	2016-10-31
5	생명정보	표고버섯 산조 701호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3466-000001	2016-10-31
6	생명정보	표고버섯 산조 704호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3468-000001	2016-10-31
7	생명정보	표고버섯 산조 705호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3469-000001	2016-10-31
8	생명정보	표고버섯 산조 706호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3471-000001	2016-10-31
9	생명정보	표고버섯 산조 709호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3474-000001	2016-10-31
10	생명정보	표고버섯 산조 102호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3456-000001	2016-10-31
11	생명정보	표고버섯 산조 103호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3457-000001	2016-10-31
12	생명정보	표고버섯 산조 108호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3458-000001	2016-10-31
13	생명정보	표고버섯 산조 502호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3465-000001	2016-10-31

14	생명정보	표고버섯 산조 702호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3467-000001	2016-10-31
15	생명정보	표고버섯 산조 707호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3472-000001	2016-10-31
16	생명정보	표고버섯 산조 708호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3473-000001	2016-10-31
17	생명정보	표고버섯 참송이 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3478-000001	2016-10-31
18	생명정보	표고버섯 산조 302호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3485-000001	2016-11-02
19	생명정보	표고버섯 복농 45호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3487-000001	2016-11-02
20	생명정보	표고버섯 추산 A6호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3489-000001	2016-11-02
21	생명정보	표고버섯 이슬송이 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3490-000001	2016-11-02
22	생명정보	표고버섯 산조 109호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3459-000001	2016-10-31
23	생명정보	표고버섯 산조 111호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3462-000001	2016-10-31
24	생명정보	표고버섯 산조 710호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3476-000001	2016-10-31
25	생명정보	표고버섯 산조 101호 품종에 대한 리시퀀싱 데이터	NN-3454-000001	2016-10-31

## <제 2 세부>

### 1절. 연구개발 성과

구분	품종개발		특허		논문		분 자 마 커	유전자원		국내 매출액	중자· 수출액	기술 이전	마케팅 전략 수립 보고서	인력 양성
	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비S CI		수 집	등 록					
최종목표			3		1	2								
연구기간내 달성실적			2		1 (1심사중)	1	2							2
달성율(%)			67		100	50								

### 2절. 유형별 성과

#### 1. 논문게재

번호	논문명	학술지명	주저 자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Construction of a genetic map and analysis of quantitative trait loci associated with the agronomically important traits of <i>Pleurotus eryngii</i>	Fungal Genetics and Biology	류재산	Vol. 92	미국	Elsevier	SCI
2	느타리버섯 품종 흑타리와 미소의 초위성체 특성구명	한국버섯학회지	박보경	Vol. 14	한국	한국버섯학회	비SCI
3	New Simple Sequence Repeats Markers Discriminating <i>Pleurotus ostreatus</i> Cultivars	Mycoscience	박보경	심사중	한국	한국균학회지	SCI

#### 2. 특허

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	느타리버섯 품종 수한1호, 화성2호, 김제9호의 판별을 위한 PCR 프라이머	대한민국	경상남도(류재산)	2016. 8. 11	10-2016-0103866				
발명특허	큰느타리버섯의 다수확 판별마커	대한민국	경상남도(류재산)	2016. 12. 26	10-2016-0181597				

### 3. 분자마커

번호	특성	보유건수	주요내용	활용년도
1	느타리품종판별	1	느타리주요품종 수한1호, 화성2호, 김제9호 판별	2016
2	큰느타리 교배형 마커	1	큰느타리버섯의 교배형 A4Bx 판별	2016

### 4. 학술발표

번호	제목	날짜	학술대회명	비고
1	Identification and Functional Analysis of Mating type loci in the <i>Pleurotus eryngii</i>	2015. 11. 5-6	한국미생물학회연합 국제학술대회	구두발표
2	느타리류의 유전체 기반 주요형질, 내병성 및 내재해성 관련 분자마커 개발	2015. 11. 12-13	한국버섯학회	구두발표
3	큰느타리버섯의 교배관련 유전자의 동정 및 기능분석	2016. 6. 9-10	한국버섯학회	구두발표
4	Development of molecular marker to differentiate <i>Pleurotus eryngii</i> cultivars using simple sequence repeats	2016. 6. 9-10	한국버섯학회	포스터발표

### 5. 홍보실적

번호	제목	날짜	매체	비고
1	새송이버섯 유전지도 구축	2015. 12.18-	국제신문, 연합뉴스 뉴시스, 경남일보, 경남도민신문, 전국매일, 경남매일, 경남일보	8건

### 6. 인력양성

번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	박사후연구원	2015				1		1			1		
1	박사후연구원	2016	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
						1		1			1		

### <제 3 세부>

#### 1절. 연구개발 성과

구분	품종개발		특허		논문		분 자 마 커	유전자원		국내 매출액	종자· 수출액	기술 이전	마케팅 전략 추립 보고서	인력 양성
	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비S CI		수 집	등 록					
최종목표			3		1	2						1		
연구기간내 달성실적			1			1	4		6					1
달성율(%)			33			50								

#### 2절. 유형별 성과

##### 1. 논문게재

번호	논문명	학술지명	주저 자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	양송이버섯 수집균주의 다양한 형질특성평가	한국버섯학회 지	강민구	Vol. 14	한국	한국버 섯학회	비SCI

##### 2. 특허

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	양송이 버섯 갓색 구분용 프라이머 세트 및 이의 용도	대한민국	부산대 학교 산학협 력단(권 순욱)	2017. 2. 10					

### 3. 분자마커

번호	특성	보유건수	주요내용	활용년도
1	양송이 갓 색 구분 마커	4	갈색양송이 13점과 백색양송이 23점을 구분	2016

### 4. 학술발표

번호	제목	날짜	학술대회명	비고
1	양송이버섯 품종육성용 수집자원의 주요 특징	2015. 11. 12-13	한국버섯학회	

### 5. 홍보실적

번호	제목	날짜	매체	비고

### 6. 인력양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	박사 수료	2016				1		1			1		

### 7. 생물정보 등록

- 양송이 버섯 re-sequencing 정보 등록 (6건)

### 제3절. 성과활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
표고버섯 표준유전체 정보	육종효율 증진 및 고효율 분자 마커개발을 위하여 2단계 사업에 활용
표고버섯 유전자원의 유전체 정보	표고버섯의 유전체 정보 DB구축 및 2단계 사업에 활용
표고버섯 품종 판별 마커	버섯육종가, 국공립연구소에 기술이전

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
큰느타리버섯 농업주요형질 QTL 마커	고효율 마커개발을 위하여 2단계사업에 활용, 육종효율 증진으로 맞춤형종신속 제공
느타리버섯 품종 판별 마커	버섯육종가, 종균배양소, 국공립연구소에 기술이전
큰느타리버섯 교배형 판별 마커	버섯육종가, 종균배양소에 기술이전

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
양송이 수집 유전자원 특성 정보	유용 형질에 대한 육종 소재로 제공
유전자원의 유전체 정보	양송이 유전체 정보 DB 구축 및 2단계 사업에 활용, 다양한 형질연관 유전연구에 활용
양송이버섯 갓 색 구분용 프라이머	버섯 육종 단위에 기술이전

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

버섯의 품종을 개발은 교잡육종, 돌연변이, 형질전환 등의 방법이 사용되고 있다(Chakravarty, 2011). 표고의 육종은 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 새송이(*P. eryngii*), 팽이버섯(*Flammulina velutipes*) 등의 다른 식용버섯들에 비하여 긴 시간이 소요되기 때문에 매우 어렵다(Sonnenberg *et al.*, 2011). 버섯과 개발된 DNA 마커간의 유전적 관계를 분석하는 것은 육종 효율을 효과적으로 향상시킬 수 있다(Sonnenberg *et al.*, 2011). 표고의 균주는 restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Kulkarni, 1991), random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Zhang와 Molina, 1995; Fu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010), amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Terashima와 Matsumoto, 2004), inter-simple sequence repeat (ISSR) (Zhang *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015), sequence-characterized amplified region (SCAR) (Li *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012), sequence-related amplified polymorphism (SRAP) (Fu *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2015), and simple sequence repeat (SSR) (Xiao *et al.*, 2010)을 포함하는 분자마커를 이용하여 구분하고 있다.

Zhang 등 (2007)은 표고의 발생형을 ISSR marker로 구분하고자 하였다. 이 마커로 실험에 사용한 17개 균주를 고온과 광온 한 그룹, 저온과 중온을 한 그룹으로 표고의 발생 온도형을 두 그룹으로 구분하는 분자 마커를 개발하였다. Gong 등은 2014에 표고의 147개의 단핵포자에 기초하여 sequence-related amplified polymorphism(SRAP), target region amplification polymorphism(TRAP), insertion-deletion(InDel) marker들, 그리고 mating-type loci를 이용하여 linkage map을 구축하여, 균사체의 생장 속도에 영향을 주는 유전체 부분이 있는 것을 암시하였으며, 2016년에 82개의 유전체 서열에 기초한 InDel marker로 QTL mapping하여 MAP kinase, blue-light photoreceptor, riboflavin-aldehyde-forming enzyme, cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase, cytochrome P450s과 같은 몇몇 유전자를 자실체 형질을 조절하는 후보유전자로 탐색하였다.

차세대 시퀀싱 기술은 저비용으로 신속하게 많은 수의 locus를 찾을 수 있는 매우 효과적인 방법이다(Ekblom과 Galindo, 2011). 이러한 기술을 이용하여 본 연구팀은 표고의 표준유전체 정보를 세계 최초로 확보하였다. 이 결과는 Shim 등 2016에 의하여 ‘Whole genome de novo sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, *Lentinula edodes*.’ 라는 제목으로 2016년 Journal of Biotechnology 223:24-25에 게재되었다. 이에 이어 중국의 Chen 등 (2016)도 표준유전체를 확보하였는데, Illumina Hiseq 2000 system을 이용하였고, 2016년 ‘Genome Sequence of the Edible Cultivated Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) Reveals Insights into Lignocellulose Degradation’ 이라는 제목으로 PLOS ONE 11(8):e0160336에 게재하였다. 이 두 표준유전체 정보에서 Shim 등 2016의 표준유전체정보의 Scaffold 수가 31개로 Chen 등 2016의 정보의 340개보다 약 11배 적어 보다 정확한 정보인 것으로 판단된다.

전통적인 버섯강국인 유럽의 프랑스, 네덜란드에서는 고전적인 교배육종으로 시장의 주도권을 지켜가고 있지만, 한편으로는 유전체 기술을 이용하여 교배육종의 효율을 증진시키는 많은 노력을 하고 있다. 특히, 자신들의 강점인 긴 육종역사를 통해 구축한 강력한 육종계통과 육종된 품종을 유전자원의 보호측면에서 유전체를 분석하고 마커를 개발하여 다른 곳에서 무단으로 사용되는 것을 막고자 노력하는 추세이다. 이에 더하여 미국, 유럽 주도의 JGI에 각종 버섯균류

(느타리, 양송이 등) 유전체 정보를 바탕으로 시장 주도권을 잡기 위한 분자유종 기술개발이 활발히 진행되고 있으며, 일본, 중국은 지역에서 인기 있는 표고나 팽이버섯 등에 집중하여 연구하는 것으로 사료된다. 이후 공개된 염기서열 정보를 바탕으로 관련유전자의 동정과 이를 이용한 고해상도 마커의 개발이 급속도로 이루어지고 국가간, 기업간 경쟁이 치열해질 것으로 전망된다.

## 제 7 장 참고문헌

- 가강현, 박원철, 김용율, 김기환, 배종순. 표고 품종을 동정할 수 있는 프라이머 및 이를 이용하여 표고 품종을 동정하는 방법. 1010368120000. 2011.05.18.
- 노현수, 하병석, 김신일, 박원철, 유림. 표고버섯의 교배형, 품종 또는 계통 판별용 탐침 및 이를 이용한 판별방법. 1020160003483. 2016.01.12
- Chakravarty B. 2011. Trends in mushroom cultivation and breeding. Aust. J. Agric. Eng. 2:102-109.
- Chen L, Gong Y, Cai Y, Liu W, Zhou Y, Xiao Y, Xu Z, Liu Y, Lei X, Wang G, Guo M, Ma X, Bian Y. 2016. Genome Sequence of the Edible Cultivated Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) Reveals Insights into Lignocellulose Degradation. PLoS One 11:e0160336.
- Ekblom R., Galindo J. 2011. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. Heredity. 107:1-15.
- Foulongne-Oriol M., Spataro M., Savoie J.M. 2009. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84:1125-1135.
- FAOStat <http://www.fao.org/faostat/en/>
- Fu L.Z., Zhang H.Y., Wu X.Q., Li H.B., Wei H.L., Wu Q.Q., Wang L.A. 2010. Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD, ISSR and SRAP markers. World J. Microbiol. Biotech. 26:709-716.
- Gong W.B., Li L., Zhou Y., Bian Y.B., Kwan H.S., Cheung M.K., Xiao Y. 2016. Genetic dissection of fruiting body-related traits using quantitative trait loci mapping in *Lentinula edodes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100:5437-5452.
- Gong W.B., Liu W., Lu Y.Y., Bian Y.B., Zhou Y., Kwan H.S., Cheung M.K., Xiao Y. 2014. Constructing a new integrated genetic linkage map and mapping quantitative trait loci for vegetative mycelium growth rate in *Lentinula edodes*. Fungal Biol. 118:295-308.
- Kulkarni R.K. 1991. DNA Polymorphisms in *Lentinula edodes*, the Shiitake Mushroom. App. Environ. Microbiol. 57:1735-1739.
- Li H.B., Wu X.Q., Peng H.Z., Fu L.Z., Wei H.L., Wu Q.Q., Jin Q.Y., Li N. 2008. 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. 81:303-309.
- Liu J.Y., Ying Z.H., Liu F., Liu X.R., Xie B.G. 2012. Evaluation of the use of SCAR markers for screening genetic diversity of *Lentinula edodes* strains. Curr. Microbiol. 64:317-325.
- Liu J., Wang Z.R., Li C., Bian Y.B., Xiao Y. 2015. Evaluating genetic diversity and constructing core collections of Chinese *Lentinula edodes* cultivars using ISSR and SRAP markers. J. Basic Microbiol. 55:749-760.
- Ma K.H., Lee G.A., Lee S.Y., Gwag J.G., Kim T.S., Kong W.S., Seo K.I., Lee G.S., Park Y.J. 2009. Development and characterization of new microsatellite markers for the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). J. Microbiol. Biotechnol. 19:851-857.

- Sonnenberg A.S.M., Johan J.P.B., Patrick M.H., Brian L., Wei G., Amrah W., Jurriaan J.M. 2011. Breeding and strain protection in the button mushroom *Agaricus bisporus*. In Proceedings of the 7 th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Arcachon, France, October 2011;pp.7-15.
- Shim D, Park S.G., Kim K., Bae W., Lee G.W., Ha B.S., Ro H.S., Kim M., Ryoo R., Rhee S.K., Nou I.S., Koo C.D., Hong C.P., Ryu H. 2016. Whole genome de novo sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom, *Lentinula edodes*. J. Biotechnol. 223:24-25.
- Terashima K., Matsumoto T. 2004. Strain typing of shiitake (*Lentinula edodes*) cultivars by AFLP analysis, focusing on a heat-dried fruiting body. Mycoscience 45:79-82.
- Wu X., Li H., Zhao W., Fu L., Peng H., He L., Cheng J. 2010. SCAR makers and multiplex PCR-based rapid molecular typing of *Lentinula edodes* strains. Curr. Microbiol. 61:381-389.
- Xiao Y., Liu W., Dai Y., Fu C., Bian Y. 2010. Using SSR markers to evaluate the genetic diversity of *Lentinula edodes*' natural germplasm in China. World J. Microbiol. Biotechnol. 26:527-536.
- Zhang R., Huang C., Zheng S., Zhang J., Ng T.B., Jiang R., Zuo X., Wang H. 2007. Strain-typing of *Lentinula edodes* in China with inter simple sequence repeat markers. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74:140-145.
- Zhang R., Hu D., Zhang J., Zuo X., Jiang R., Wang H., Ng T.B. 2010. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for the mushroom *Flammulina velutipes*. J. Biosci. Bioeng. 110:273-275.
- Zhang R.Y., Hu D.D., Gu J.G., Hi Q.X., Zuo X.M., Wnag H.X. 2012. Development of SSR markers for typing cultivars in the mushroom *Auricularia auricula-judae*. Mycol. Prog. 11:578-592.
- Zhang Y., Molina F.I. 1995. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. FEMS Microbiol. Lett. 131:17-20.

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

## 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	버섯의 육종효율 증진 및 우량품종 육성을 위한 분자마커 개발		
주관연구책임자	류호진	주관기관	충북대학교

### 1. 본 연구관련 국내의 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
수확량, 품질 분자마커	느타리류: 스페인 양송이: 프랑스 표고버섯: 일본(모리)	70%	65%	100%	
갓색, 인피, 주름 분자마커	느타리류: 일본(호쿠도) 양송이: 미국(실반) 표고버섯: 일본(모리)	70%	65%	100%	
내병성, 내재해성 분자마커	느타리류: 한국 양송이: 프랑스 표고버섯:	70%	70%	85%	큰느타리고온저온 BSA에 의한 육종마커 특허(출원)
기능성분 분자마커	느타리류: 양송이:  표고버섯:	70%	65%	80%	큰느타리베타글루칸 BSA에 의한 육종마커 특허출원
유전자원보유	느타리류: 일본(호쿠도) 양송이: 미국(실반) 표고버섯: 일본(모리)	70%	65%	90%	국내의 유전자원센터, 육성품종 수집, 원산지에서 채취 등으로 신청팀이 다양한 느타리류 유전자원 보유

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

## 2. 특허분석

### 가. 특허분석 범위

대상국가	국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), 통합DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

### 나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	육종관련 형질 분자마커	
Keyword	marker, trait, breed, mushroom, QTL, MAS, MAB	
검색건수	1,014	
유효특허건수	4	
핵심특허 및 관련성	특허명	느타리버섯 원형 계통 관별용 특이 프라이머 및 이의 용도
	보유국	한국
	등록년도	2012
	관련성(%)	20
	유사점	30
	차이점	느타리버섯의 품종 중 “원형” 만을 관별하여 효율성이 낮음
핵심특허 및 관련성	특허명	영지버섯의 분자 마커, 이에 특이적인 프라이머 및 이를 이용한 영지버섯의 특이적 관별방법
	보유국	한국
	등록년도	2014
	관련성(%)	20
	유사점	30
	차이점	영지버섯 계통간의 특이밴드를 이용한 구별성 판정
핵심특허 및 관련성	특허명	METHOD AND KIT FOR SELECTING FUNGUS BODY OF MUSHROOM
	보유국	일본
	등록년도	2012
	관련성(%)	20
	유사점	30
	차이점	팽이버섯의 돌연변이를 관별하는 마커임
핵심특허 및 관련성	특허명	SPORE-DEFICIENT MUTATION-DETECTING MARKER
	보유국	일본
	등록년도	2010
	관련성(%)	70
	유사점	30
	차이점	큰느타리의 무포자계통을 선별하는 마커

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

### 3. 논문분석

#### 가. 논문분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽을 포함한 전 세계)
논문 DB	google 학술검색, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), Naver 전문정보
검색기간	전체
검색범위	육종, 버섯, 병저항성, 분자마커, 양적형질

#### 나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		버섯 수량, 품질 선발 분자마커	버섯 내병성, 내재해성 선발 분자마커
Keyword		버섯, 분자마커, QTL	버섯, 병저항성, 분자마커, QTL
검색건수		22	1
유효논문건수		1	1
핵심논문 및 관련성	논문명	QTL mapping of yield-related components and oligogenic control of the cap colour in the button mushroom <i>Agaricus bisporus</i>	Relationship between yield components and partial resistance to <i>Lecanicillium fungicola</i> in the button mushroom, <i>Agaricus bisporus</i> , assessed by quantitative trait locus mapping
	학술지명	Applied and environmental microbiology	Applied and environmental microbiology
	저자	Marie Foulongne-Oriol, Anne Rodier, Thierry Rousseau <sup>2</sup> , Jean-Michel Savoie	Marie Foulongne-Oriola, Anne Rodierb, Jean-Michel Savoiea
	게재년도	2012	2012
	관련성(%)	60	50
	유사점	유전자 지도를 이용하여 수량, 맛 등의 형질마커 위치파악	유전자 지도를 이용한 병저항성의 QTL 분석
	차이점	표현형을 설명하는 정도( $R^2$ )가 낮음	버섯의 종류, 질병을 일으키는 병원체, 형질과 관련된 분자마커의 유무
핵심논문 및 관련성	논문명	Construction of a Genetic Linkage Map Based on Amplified Fragment Length Polymorphism Markers and Development of Sequence-Tagged Site Markers for Marker-Assisted Selection of the Sporeless Trait in the Oyster Mushroom ( <i>Pleurotus eryngii</i> )	QTL for resistance to Trichoderma lytic enzymes and metabolites in <i>Agaricus Bisporus</i>
	학술지명	Applied and environmental microbiology	Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)
	저자	Yasuhito Okuda Jun Ueda,a Yasushi Obatake Shigeyuki Murakami, Yukitaka Fukumasa, and Teruyuki Matsumoto	Marie Foulongne-Oriola, Nathalie Minvielle, Jean-Michel Savoiea

	게재년도	2012	2011
	관련성(%)	70	60
	유사점	유전자 지도를 이용한 무포자형질의 선발마커개발	유전자 지도를 이용한 푸른곰팡이 병저항성의 QTL 분석
	차이점	무포자형질 선발마커는 본 연구과제의 목표와 상이함	버섯의 종류, 자실체의 수량 및 품질과 병저항성 형질간의 관계 분석, 형질과 관련된 분자마커의 유무
핵심논문 및 관련성	논문명	Constructing a new integrated genetic linkage map and mapping quantitative trait loci for vegetative mycelium growth rate in <i>Lentinula edodes</i>	A Quantitative Trait Locus of <i>Agaricus bisporus</i> Resistance to <i>Pseudomonas tolaasii</i> Is Closely Linked to Natural Cap Color
	학술지명	Applied and environmental microbiology	Fungal Genetics and Biology
	저자	Wen-Bing GONG <i>et al.</i>	Frédéric Moquet <i>et al</i>
	게재년도	2014	1999
	관련성(%)	60	60
	유사점	유전자 지도를 이용하여 형질마커 탐색	세균병 저항성과 갓색과 연관성 연구
	차이점	균사의 특성을 목표로 삼아서 의미저하	병저항성 마커 아님

1

#### 4. 제품 및 시장 분석

##### 가. 생산 및 시장현황

###### 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내의 버섯분자마커의 개발은 품종판별위주로 진행되어 실제로 육종현장에서 사용되는 비율은 극히 낮은 수준이다. 표고, 양송이, 느타리의 육종이 기능성이나 내재해성으로 진행됨에 따라 마커의 요구도가 높아지고 있는 상황임.

###### 2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 일반적인 작물보다 상대적으로 generation cycle이 짧아 분자마커개발에 대한 연구가 더디게 진행되었으나 많은 버섯과 균류의 유전체가 공개발표됨에 따라 그간 유전학 등의 성과로 축적된 위치정보(QTL 등)를 근거로하여 직접적으로 형질관련 유전자에 접근하여 효율성이 높은 분자마커를 개발하려는 시도가 활발하게 진행되고 있음
- 표고류 분야 분자표지 기술현황
  - 표고의 경우 현재 표준유전체 정보가 완성되지 않은 상황임.
  - 중국을 중심으로 표고의 mating에 관여하는 pheromone 및 수용체에 관련된 유전자의 정보가 분석되어 있음.
  - 현재 교차율에 따른 linkage map은 분석되었으나, 육종에 이용되기에는 아직 미흡한 부분이 많음.
  - 국내의 경우 산림과학원, 농업과학원, 산림버섯연구센터에서 교배육종을 통한 새로운 품종을 개발하고 있으나, 현재까지는 대만, 일본 품종에 비해 우수성이 낮은 상태임.
  - 중국 홍콩대학의 Kwan 교수를 중심으로 유전체 기반 연구를 하고 있으나, 가시적인 성과는 아직 나타나지 않은 것으로 파악됨.

○ 느타리류 분야 분자표지 기술현황

- 미국 JGI의 지원으로 사철느타리(*Pleurotus ostreatus* sp. *florida*)의 34.3 Mb 유전체가 해독되고 11,000 여개의 유전자가 annotation 되어 마커개발에 많은 도움이 될 것으로 예상
- 스페인팀에서 느타리버섯의 수량, 수량 등 6개 형질에 대한 QTL 분석데이터를 발표함.
- 일본팀에서 AFLP 기반으로 새송이버섯의 무포자(sporeless) 선발형질 분자표지를 개발
- 본 연구팀에서 큰느타리버섯의 유전체를 해독, annotation하여 SSR, InDel 등의 서열정보를 보유하고 있고 큰느타리버섯의 표준균주를 대상으로 genetic map과 온도에 따른 균사체의 성장관련 QTL 정보를 보유하고 있어 유전체 정보와 더불어 분자마커개발에 효율적으로 사용될것으로 사료 됨

○ 양송이 분야 분자표지 기술현황

- 차세대 유전체 해독기술(NGS)이 개발됨에 따라 독일에서는 양송이 Genome Sequencing이 완성되어 형질이 뛰어난 품종을 개발하기 위한 원천 정보를 획득하고 있음.
- 프랑스에서는 QTL(Quantitative Trait Locus)를 지도화하여 양송이 갓색에 영향을 미치는 유전 요인들을 연구하고 있음.
- 전 세계의 양송이를 포함한 버섯연구에서 기본적으로 형질 및 품종을 구분하기위해 AFLP, SSR, CAPS 등 마커들이 쓰임.

## 나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

### 1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 분자마커의 기술이전

- 버섯의 형질선발 분자마커는 육종과정중 시간이 가장 많이 소요되는 선발단계의 과정을 단축시키는 기술로서 목적은 육종효율을 증진시킬 수 있는 경제적 효과를 창출하는 특징을 갖는다.
- 형질 분자마커를 개발하여 육종프로젝트 연구기관, 민간육종기관 등에 기술이전을 통하여 신품종을 육종함으로써 실시료수입과 같은 직접적인 경제효과와 우수 품종을 조기에 상품화 함으로써 간접적인 파급효과와 부가가치 창출

○ 버섯 우량 형질 육종모본 제공

- 버섯육종프로젝트 지원과제로서 국내외에 시판되고 있는 다양한 형질의 계통의 분리집단 구축과정에서 출현하는 우수형질 계통을 육종모본으로 육종기관에 공여함으로써 새로운 품종의 육성기반을 제공

○ 기대효과

- 고품질, 기능성, 병저항성 형질을 도입하여 버섯 우량품종개발로 농가소득과 아울러 새로운 수출화로 개척
- 병저항성을 포함한 고품질의 육종모본집단을 확보함으로써 시장과 소비자의 요구를 적극적으로 수용할 수 있는 새로운 품종의 개발을 신속하게 할 수 있는 기반을 갖추
- 농업적으로 중요한 다양한 형질의 버섯 분자 마커의 개발에 인한 MAS 시스템의 도입으로 육종연한을 단축함과 동시에 소비자의 선호와 변화에 민감한 시장 요구도에 충실한 버섯품종을 신속하게 육종보급 가능

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	3차년도	4차년도				계
직접 경제효과		10				10
경제적 파급효과		80				80
부가가치 창출액		120				120
합 계		210				

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

○ 버섯의 형질을 직접적으로 선발하는 분자마커의 특허건수는 극히 적었다. 유럽에서는 전통적으로 양송이에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔지만, 버섯자체의 육종이나 기능성 고함유 품종은 특허로 등록이 되어 있으나 형질의 분자마커 개발을 위한 유전학분석과 QTL분석은 유전체 연구와 더불어 이제 시작단계로 사료된다. 일본은 표고버섯에 대한 많은 연구가 있어왔으나 형질의 분자마커에 대한 부분은 활발하지 않다. 새송이버섯의 무포자 형질선발마커는 대표적인 분자마커성과 이다. 삼국특허(PCT) 내용은 각국에 대한 내용과 큰 차이가 없었다.

다만 한국을 비롯한 여러 나라에서 여러 가지 품종을 단시간에 동정하는 분자마커에 대한 특허는 다수 등록되어 있다. 양송이나 팽이는 육종에 사용된 유전자원의 범위가 좁아서 표현형으로는 구분이 어려울때가 많기 때문인 것으로 사료된다. 병 저항성 관련 유전자를 분리하고 이를 이용한 특허기술은 고추, 담배, 토마토 등 식물을 이용한 연구에서 약 60여건이 보고되었다. 또한, 식물을 이용하여 SSR, RAPD, SCAR 등의 병저항성 분자마커의 개발의 경우 약 6건에 그쳤다. 기존의 큰 느타리버섯 육종에 관한 특허는 다수확품종 또는 소비자 선호형 육종에 치중되어 있고, 병저항성 관련 특허는 현재까지 보고된 바가 없다. 본 연구과제에서는 농업적으로 중요한 수량, 맛, 내재해성, 병저항성 관련 유전학적인 연구와 이를 조기에 탐지할 수 있는 분자마커를 개발하여 육종가에게 기술이전을 하여 버섯 육종과정에서의 비용 절감 및 품질 향상을 도모하고 품질과 기능성을 겸비한 품종 육종을 유도할 계획이다.

2) 논문분석 측면

○ 버섯의 경우는 식물이나 동물보다 분자마커의 도입이 늦게 시작 되어 육종 기술에의 활용도가 낮은 실정이다. 최근 경제적으로 중요한 몇몇의 버섯 종인 양송이, 느타리와 표고버섯 등에서 RAPD, AFLP, SNP나 SSR 분자 표지를 이용하여 품종을 판별하거나 유전자 지도를 작성하는데

사용되어 왔다. 양송이의 유전학적지도와 농업적으로 중요한 수확량, 맛색 등의 양적형질의 지도상의 위치와 표현형질에 대한 설명정도가 발표되었다. 느타리의 수확량, 맛색, 조기 수확성 등의 형질을 선발하는 마커개발을 하기 위하여 QTL 분석결과가 보고되었다. 다만 이 연구에 사용된 느타리의 품종이 국제시장에서 생산량이 미미한 사철느타리 종류라 그 의미가 반감되고 있다. 큰느타리버섯의 경우 포자결핍 돌연변이종에서 AFLP를 이용한 유전자 지도 작성이 보고된 바 있다. 기존의 버섯 육종에 관한 논문은 교배형판별 분자마커 개발이나 품종확인 마커 개발에 치중되어있고 형질에 관련된 마커 개발에 관한 연구는 미비한 실정이다. 병저항성 형질 관련 연구는 양송이에서 흰곰팡이병 (dry bubble disease) 저항성 QTL과 양송이의 수량 및 품질관련 연구가 보고된 바 있다. 양송이버섯에서 green mold disease 저항성 QTL 분석에 관한 연구 보고서가 있으나 이는 양송이의 균사체와 *Trichoderma spp.*의 lytic enzyme과의 대치배양에 따른 조사로서 자실체를 이용한 재배환경에서의 병저항성과는 차이가 있다. 연구과제에서는 단포자 집단을 이용한 유전자 지도 작성 및 QTL 분석을 통한 병저항성과 관련된 유전자 좌 및 관련 분자마커를 개발하여 국내외 학술지에 게재할 계획이다.

### 3) 제품 및 시장분석 측면

- 버섯은 다른 동물과 작물과 다르게 분자마커의 개발과 상업적 사용이 더디게 진행되고 있으나, 빠르게 진행되는 소비자 선호도 변화와 새로운 기능성, 내재해성 형질의 요구가 높아서 이를 빠른 시간에 육종하기 위해 필요한 선발마커의 요구도는 높은 편이다. 따라서 본 연구과제에서 개발한 교효율의 마커를 육종에 직접적으로 활용 기술이전을 실시할 계획임.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 골든씨드프로젝트사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 골든씨드프로젝트사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.