



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0106809
(43) 공개일자 2016년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2013.01)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0029086

(22) 출원일자 2015년03월02일

심사청구일자 2015년03월02일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

이현숙

경상남도 사천시 사천읍 수양로 96 405호 (정의리, 동해아트빌)

이송희

경상북도 포항시 남구 중앙로121번길 22-1 (대도동)

(74) 대리인

손민

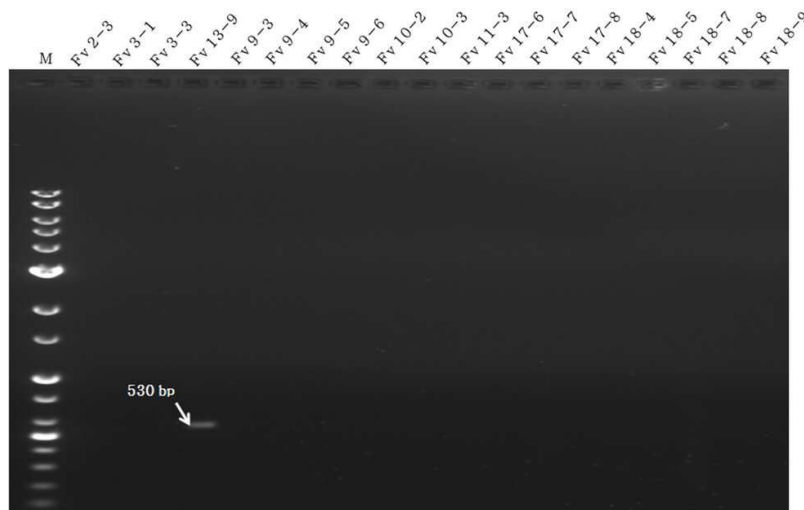
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 팽이버섯 품종 특이적 유전자 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 유전자 마커, 상기 유전자 마커를 검출할 수 있는 검출수단을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 그린피스 F6호 팽이버섯을 구별하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 유전자 마커를 사용하면, 그린피스 F6호 팽이버섯의 여부를 용이하게 구별하여, 상기 그린피스 F6호 팽이버섯의 품질관리 및 유사제품의 단속을 용이하게 실시할 수 있으므로, 그린피스 F6호 팽이버섯의 시장경쟁력 제고에 이바지할 수 있을 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 608005-05-4-HD340

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 수출전력기술개발사업

연구과제명 만가닥버섯 이중발이 현상 원인구명 및 진단법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 그린합명회사

연구기간 2012.01.20 ~ 2013.01.19

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 유전자 마커.

청구항 2

제1항의 유전자 마커를 검출할 수 있는 검출수단을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 검출수단은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드와 상보적으로 결합할 수 있는 염기서열을 포함하는 프로브 또는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 증폭시킬 수 있는 프라이머 염기쌍인 것인 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 프라이머 염기쌍은 서열번호 3 및 4의 염기서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 키트.

청구항 6

팽이버섯으로부터 분리된 시료의 DNA로부터 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 증폭시키고, 증폭여부를 확인하는 단계를 포함하는, 그린피스 F6호 팽이버섯 구별 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 증폭은 서열번호 4 및 5의 프라이머 염기쌍을 사용하여 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 팽이버섯 품종 특이적 유전자 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 유전자 마커, 상기 유전자 마커를 검출할 수 있는 검출수단을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 키트 및 상기 조성물 또는 키

트를 이용하여 그린피스 F6호 팽이버섯을 구별하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)은 분류학상 담자균아문(Basidiomycota), 주름버섯목(Agaricales), 송이과(Tricholomataceae), 팽나무버섯속(*Flammulina*)의 5종 가운데 하나인 벨루티페스(*velutipes*)로 분류된다. 야생 종의 경우, 온대에서 한대에 걸쳐 늦가을부터 초봄까지의 저온기에 활엽수의 그루터기나 고목에서 다발로 발생하는데 자실체 색상이 황갈색 내지 밤색이고 갓 직경과 대의 굵기가 크고 대의 길이가 짧다는 특징을 나타낸다.
- [0003] 현재, 식용버섯으로 재배되고 있는 팽이버섯은 1899년 일본에서 감나무 원목을 사용하여 자연기상조건에서 인공 재배가 시작된 이래 1926년 포자접종방법이 개발되어 골목재배가 성행되었고, 톱밥배지를 이용한 상자재배가 1928년에 처음으로 시도되었으며, 이후 미강을 이용한 영양원 첨가 등의 재배법이 발달하여 현재에 이르고 있다. 우리나라에서는 1936년에 처음 골목재배 방법이 언급되었으며, 이후 농촌진흥청 농업과학기술원에서 연구되어 1980년대 말부터 일반 농가에 보급되었다. 재배종의 특징은 야생종과는 달리 갓의 크기가 10mm이하, 대의 길이가 100 내지 140mm를 나타내고, 대직경이 2 내지 4mm정도인 것으로 알려져 있다.
- [0004] 지금까지 알려진 바에 의하면, 팽이버섯의 번식방법은 유성생식과 무성생식으로 나누어진다. 유성생식은 균사에서 자실체가 생장해 4극성의 담자포자를 형성하고, 이것이 발아되어 증식을 한다. 무성생식은 형성된 이핵균사가 끊어져서 생긴 분열자라는 무성포자가 발아되고 증식한다. 팽이버섯은 균사생장 중 무성생식과정이 특히 많이 이루어져 단핵균사와 이핵균사에서 1핵의 분열자의 형성이 쉽게 일어나는 특성이 있다. 이러한 팽이버섯의 육종은 경제성을 고려하여 생산성이 높고, 재배가 용이하고, 포자의 생산에 있어 유전적인 안정성이 중요하게 고려되었고, 특히 소비자의 선호도를 위한 백색종의 개발에 대한 연구가 두드러졌다. 육종방법으로는 재배중 우수한 형질을 나타내는 버섯을 선별하여 포자를 받아 종균을 배양하는 영양생식선발법(Senbatsu)과 균사생장시 형성된 단핵균주를 이용한 교배법에 의한 육종방법이 사용되고 있다.
- [0005] 한편, 상기 팽이버섯의 경우, 대규모 시설에 의한 재배량의 증가에 따라, 내수시장에서의 가격이 하락하고 있으며, 수출시장의 개척이 요구되고 있는 실정이다. 그러나, 2012년부터 확장되어 적용중인 품종에 대한 로열티로 인하여, 수출시장의 개척에 요구되는 가격경쟁력이 부족한 실정이며, 이에 따라, 로열티가 부가되지 않는 새로운 품종의 팽이버섯을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 한국등록특허 제523942호에는 종래의 팽이버섯에 비하여 높은 함량의 트레할로스 및 비타민을 포함하는 신규한 갈색 팽이버섯 품종이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1239641호에는 신규한 백색 팽이버섯 균주(기탁번호: KCCM 11134P) 및 신규한 백색 팽이버섯 균주로부터 형성된 신규한 백색 팽이버섯 자실체가 개시되어 있다. 이처럼 새로운 품종의 팽이버섯은 국내시장 뿐만 아니라 해외시장에서도 경쟁력을 갖을 수 있을 것으로 기대되고 있다. 그러나, 이들 팽이버섯은 외관에서 볼 때, 종래의 품종과 새로운 품종을 구별하기가 용이하지 않으므로, 해외시장에서 경쟁력을 갖기 위하여는, 새로운 팽이버섯 품종 뿐만 아니라 이들 새로운 품종을 구별할 수 있는 방법을 제공할 필요성이 있으나, 이들 새로운 품종의 팽이버섯을 구별할 수 있는 방법에 대한 연구에 대하여는 특별한 관심을 받지 못하고 있는 실정이다.
- [0006] 이러한 배경하에서, 새로운 품종의 팽이버섯을 구별할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 국내에서 개발된 신품종의 팽이버섯인 그린피스 F6호를 구별할 수 있는 신규한 유전자 마커 및 이의 검출수단을 개발하여, 이들 수단을 사용할 경우, 상기 그린피스 F6호를 종래의 팽이버섯과 명확하게 구별할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 유전자 마커를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자 마커를 검출할 수 있는 검출수단을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 조성물을 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 그린피스 F6호 팽이버섯을 구별하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명자들은 새로운 품종의 팽이버섯을 구별할 수 있는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, SSR(simple sequence repeat) 서열에 주목하게 되었다. 상기 SSR 서열은 2 내지 5개로 구성된 짧은 DNA 단편이 반복되는 서열을 의미하는데, 팽이버섯의 게놈 DNA에는 다양한 형태의 SSR이 존재한다고 알려져 있으므로, 상기 SSR 서열을 이용하여 새로운 품종의 팽이버섯을 구별하는 것이 가능할 것으로 가정하고, 농촌진흥청에서 수행한 팽이버섯 게놈 프로젝트를 통하여 규명된 국내 토종 식용 팽이버섯(*Flammulina velutipes* KACC 42777)의 전체 염기서열을 이용하여 적절한 형태의 SSR 프라이머를 설계하였다. 상기 설계된 SSR 프라이머를 사용하여 다양한 팽이버섯 품종의 게놈 DNA를 증폭시킨 결과, 그린피스 F6호 팽이버섯의 게놈 DNA에서 다른 품종의 팽이버섯에서는 발견되지 않는 독특한 증폭산물을 획득하였다. 상기 획득한 증폭산물의 염기서열을 분석한 결과, 종래의 다른 팽이버섯의 게놈 DNA에는 포함되지 않은 새로운 서열의 DNA 단편이 포함되어 있음을 확인하고, 이를 증폭시킬 수 있는 프라이머를 제작하였다. 상기 제작된 프라이머를 이용하여 다양한 팽이버섯 품종의 게놈 DNA를 증폭시킨 결과, 그린피스 F6호 팽이버섯의 게놈 DNA에서만 증폭산물을 획득할 수 있음을 확인하였다.
- [0012] 따라서, 상기 그린피스 F6호 팽이버섯의 게놈 DNA에 포함된 특이적인 증폭산물은 그린피스 F6호 팽이버섯을 특이적으로 구별할 수 있는 유전자 마커로서 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 이같은 그린피스 F6호 팽이버섯에 특이적인 유전자 마커 및 이를 검출할 수 있는 수단은 종래에 전혀 보고되지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.
- [0013] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 유전자 마커를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 용어 "그린피스 F6호 팽이버섯"이란, 그린피스 버섯연구소에서 개량된 팽이버섯 품종(품종보호출원등록: 공개번호 2010-275)으로서, 균총의 앞면과 뒷면의 색은 백색이고, 갓을 세로로 자른 면의 모양이 반구형이며, 약 7.64mm의 갓 높이, 약 11.62mm의 갓 너비, 약 128.17mm의 대 길이, 약 3.21mm의 대 굵기, 자실체발생부터 갓이 피기 전까지의 기간이 약 35일인 팽이버섯 품종을 의미한다.
- [0015] 본 발명의 용어 "유전자 마커"란, 목적하는 개체를 동정하기 위하여, 상기 개체에 포함된 개체특이적인 뉴클레오티드 서열을 의미한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 마커는 그린피스 F6호 팽이버섯의 게놈 DNA에 포함되어, 다른 품종의 팽이버섯과 그린피스 F6호 팽이버섯을 구별할 수 있는 판단대상이 되는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열이 될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 용어 "개체"란, 그린피스 F6호 팽이버섯인지의 여부를 구별하고자 하는 대상인 팽이버섯을 의미하며, 상기 팽이버섯으로부터 얻어진 검체를 이용하여, 상기 유전자 마커의 존재여부를 분석함으로써 상기 팽이버섯이 그린피스 F6호 팽이버섯인지의 여부를 판단할 수 있다. 상기 검체로는 팽이버섯의 포자, 갓, 균사체와 같은 시료 등이 될 수 있으나, 이에 특별히 제한되지는 않는다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 국내에서 육종하여 품종보호 출원된 팽이품종의 분자생물학적 인식 마커를 개발하기 위하여, 농촌진흥청에서 수행한 팽이버섯 게놈 프로젝트를 통하여 규명된 국내 토종 식용 팽이버섯(*Flammulina velutipes* KACC 42777)의 전체 염기서열을 대상으로 SSR(simple sequence repeat) 프라이머를 설계하고, 이를 이용하여 다양한 팽이버섯 품종의 게놈 DNA를 증폭시킨 결과, 그린피스 F6호 팽이버섯(Fv13-9) 품

종의 게놈 DNA에서는 618bp의 독자적인 증폭산물이 생성됨을 확인하고, 이의 염기서열(서열번호 1)을 분석한 결과, 13 내지 583번 단편이 종래의 다른 품종의 팽이버섯에서는 검출되지 않는 새로운 서열임을 확인하였다(도 1). 이에, 상기 서열번호 1의 염기서열을 증폭시킬 수 있는 새로운 프라이머를 설계하고, 이를 이용하여 다양한 팽이버섯 품종의 게놈 DNA를 증폭시킨 결과, 그린피스 F6호 팽이버섯(Fv13-9) 품종에서만 증폭산물이 검출됨을 확인하였다(도 2).

- [0019] 따라서, 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드는 그린피스 F6호 팽이버섯을 구별할 수 있는 유전자 마커로서 사용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0020] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 유전자 마커를 검출할 수 있는 검출수단을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 용어 "유전자 마커를 검출할 수 있는 검출수단"이란, 게놈 DNA에 포함된 목적하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나 상기 폴리뉴클레오티드를 증폭시킬 수 있는 수단으로서, 구체적으로는 게놈 DNA에 포함된 목적하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머일 수 있다.
- [0022] 더욱 구체적으로는 서열번호 1로 이루어지는 폴리뉴클레오티드를 증폭시킬 수 있는 서열번호 4 및 5로 이루어진 프라이머 쌍을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에서 제공하는 유전자 마커에 결합하여 인식하는 데 사용되는 프로브는 상기 유전자 마커의 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 상보적인 서열을 포함하며, 이에 제한되지 않으나 DNA, RNA 또는 DNA-RNA 잡종(hybrid) 형태일 수 있다. 또한, 육안으로 인식가능하도록 하기 위해 프로브의 5' 또는 3' 말단에 형광 표지인자, 방사선 표지 인자 등을 추가로 부착할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 염기서열을 의미한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 마커의 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오타이드의 크기로 사용될 수 있다. 상기 프라이머 서열은 상기 SNP 마커를 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드와 완전하게 상보적일 필요는 없으며, 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이면 사용가능하다.
- [0026] 또한, 프라이머는 변형시킬 수 있으며, 예를 들어 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 치환 또는 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있을 수 있다.
- [0027] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 조성물을 포함하는 그린피스 F6호 팽이버섯 구별용 키트를 제공한다. 구체적으로, 상기 키트는 이에 제한되지는 않으나 PCR(Polymerase Chain Reaction) 키트, DNA 분석용(예, DNA 칩) 키트일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 키트는 상기 조성물을 이용하여 본 발명에서 제공하는 유전자 마커의 증폭을 통해 검출함으로써, 확인대상 시료가 그린피스 F6호 팽이버섯 품종인지의 여부를 확인하는데 사용될 수 있다. 구체적인 일례로서, 본 발명에서 제공하는 상기 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다.
- [0029] 예를 들어, RT-PCR 키트는, 상기 유전자 마커에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다

른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 테옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0030] 또 다른 예로서, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 그린피스 F6호 팬이버섯 구별용 DNA 칩 키트일 수 있다.

[0031] 본 발명의 용어 "DNA 칩"이란, 수십만 개의 DNA의 각 염기를 한번에 확인할 수 있는 DNA 마이크로어레이의 하나를 의미한다.

[0032] 상기 DNA 칩 키트는, 일반적으로 편평한 고체 지지판, 전형적으로는 현미경용 슬라이드보다 크지않은 유리 표면에 핵산 종을 격자형 배열(grided array)로 부착한 것으로, 칩 표면에 핵산이 일정하게 배열되어, DNA 칩 상의 핵산과 칩 표면에 처리된 용액 내에 포함된 상보적인 핵산 간에 다중 혼성화(hybridization) 반응이 일어나 대량 병렬 분석이 가능하도록 하는 도구이다.

[0033] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 팬이버섯으로부터 분리된 시료의 DNA로부터 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키고, 증폭여부를 확인하는 단계를 포함하는, 그린피스 F6호 팬이버섯 구별 방법을 제공한다.

[0034] 상기 증폭시키는 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 예를 들면, 표적 핵산을 PCR을 통하여 증폭하고 이를 정제하여 얻을 수 있다. 그 외 리가제 연쇄 반응(LCR)(Wu 및 Wallace, Genomics 4, 560(1989), Landegren 등, Science 241, 1077(1988)), 전사증폭(transcription amplification)(Kwoh 등, Proc. Natl.Acad. Sci. USA 86, 1173(1989)) 및 자가유지 서열 복제(Guatelli 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874(1990)) 및 핵산에 근거한 서열 증폭(NASBA)이 사용될 수 있다.

[0035] 상기 증폭결과 증폭산물이 검출되는 경우에는 상기 개체가 그린피스 F6호 팬이버섯인 것으로 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명에서 제공하는 유전자 마커를 사용하면, 그린피스 F6호 팬이버섯의 여부를 용이하게 구별하여, 상기 그린피스 F6호 팬이버섯의 품질관리 및 유사제품의 단속을 용이하게 실시할 수 있으므로, 그린피스 F6호 팬이버섯의 시장경쟁력 제고에 이바지할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 SSR 프라이머를 이용하여 다양한 팬이버섯 품종의 게놈 DNA를 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 2는 F6 품종에 특이적인 염기서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 이용하여 다양한 팬이버섯 품종의 게놈 DNA를 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] **실시예 1: SSR(simple sequence repeat) 프라이머의 설계 및 제작**

[0040] 국내에서 육종하여 품종보호 출원된 팽이버섯의 분자생물학적 인식 마커를 개발하기 위하여, 농촌진흥청에서 수행한 팽이버섯 계능 프로젝트를 통하여 규명된 국내 토종 식용 팽이버섯(*Flammulina velutipes* KACC 42777)의 전체 염기서열을 대상으로, 공지된 SSR(simple sequence repeat) Locator I을 이용하여, 단량체가 20회 이상 반복, 이량체가 10회 이상 반복, 삼량체가 7회 이상 반복, 사량체가 5회 이상반복, 오량체가 4회 이상 반복 또는 칠량체가 4회 이상 반복된 서열을 검색하였다(Maia LC, et al., Int. J. Plant Genomics, 2008: article ID 412696). 상기 검색된 서열을 이용하여, 프라이머의 크기가 18 내지 26 nt, 연결온도(annealing temperature)가 45 내지 50℃, PCR 산물의 크기가 100 내지 350 bp 및 G/C 함량이 45 내지 55%인 SSR 프라이머를 다음과 같이 제작하였다.

[0041] ctg03-12 F: 5'-CGGTAAGAAGATGAGACAC-3'(서열번호 2)

[0042] ctg03-12 R: 5'-ATAGAGATGAGGACAGAGGA-3'(서열번호 3)

[0043] 실시예 2: SSR 프라이머를 이용한 팽이버섯 계능 DNA의 증폭

[0044] 다양한 팽이버섯 품종의 계능 DNA를 주형으로 하고, 상기 실시예 1에서 제작된 프라이머를 이용한 PCR을 수행하였다(도 1). 이때, 사용된 팽이버섯은 국내산 팽이버섯인 Backseol(Fv2-3), Pangyi-1(Fv3-1), Backro(Fv3-3), F6(Fv13-9), Fangyi-1(Fv9-3), Woori-1(Fv18-4) 및 Backzak(Fv18-5)과, 일본산 팽이버섯인 M50(Fv9-4), JA(Fv9-5), Yaganse-1(Fv9-6), TK(Fv10-2), Gosa(Fv10-3), G5(Fv11-3), T-011(Fv17-6), Omegumi-7(Fv17-7), Omegumi-8(Fv17-8)을 사용하였다.

[0045] 도 1은 SSR 프라이머를 이용하여 다양한 팽이버섯 품종의 계능 DNA를 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 1에서 보듯이, 대체로 동일한 PCR 산물이 검출되었으나, F6(Fv13-9, 그린피스 F6호 팽이버섯) 품종의 계능 DNA에서는 618bp의 독자적인 증폭산물이 생성됨을 확인하고, 이의 염기서열(서열번호 1)을 분석하였다. 그 결과, 13 내지 583번 단편이 종래의 다른 품종의 팽이버섯에서는 검출되지 않는 새로운 서열임을 확인하였다.

[0046] 실시예 3: 국내산 팽이버섯 특이적 마커의 증폭

[0047] 상기 실시예 2의 결과에 따라, 상기 확인된 새로운 서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 다음과 같이 제작하고, 상기 제작된 프라이머와 다양한 팽이버섯 품종의 계능 DNA를 주형으로 사용한 PCR을 수행하였다(도 2).

[0048] Fvp 13-9 F: 5'-ACAGAGGAAAGCGAGGATGAGAAG-3'(서열번호 4)

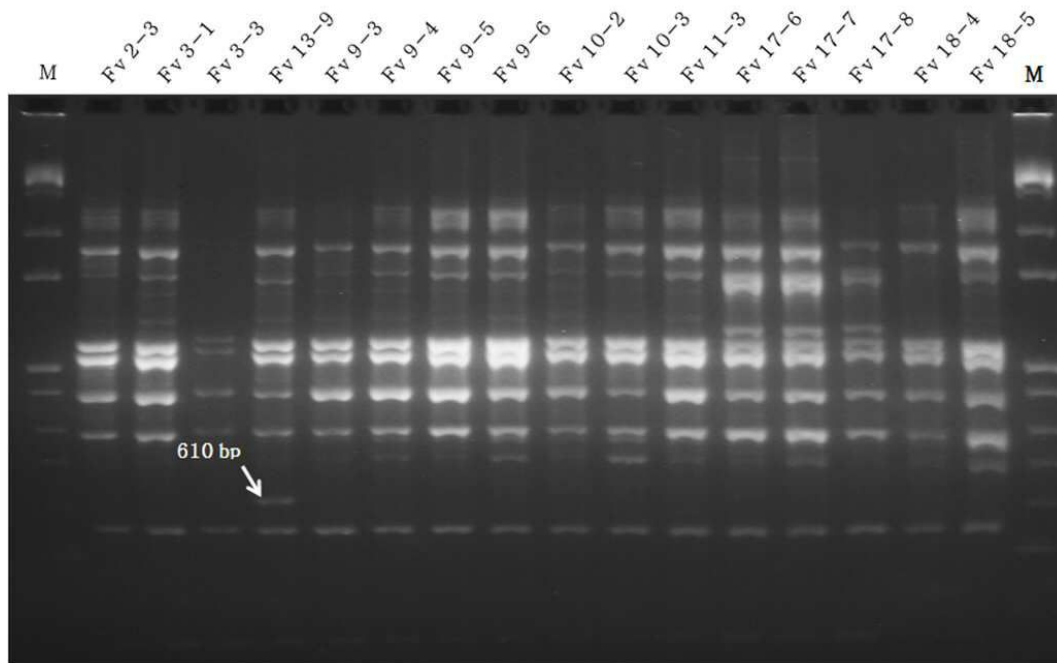
[0049] Fvp 13-9 R: 5'-GTTGGGTTTGGAGGGTTTGGTTA-3'(서열번호 5)

[0050] 도 2는 F6 품종에 특이적인 염기서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 이용하여 다양한 팽이버섯 품종의 계능 DNA를 증폭시킨 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 2에서 보듯이, 상기 프라이머를 사용한 PCR을 수행한 경우에는 F6(Fv13-9) 품종에서만 증폭산물을 수득할 수 있음을 확인하였다.

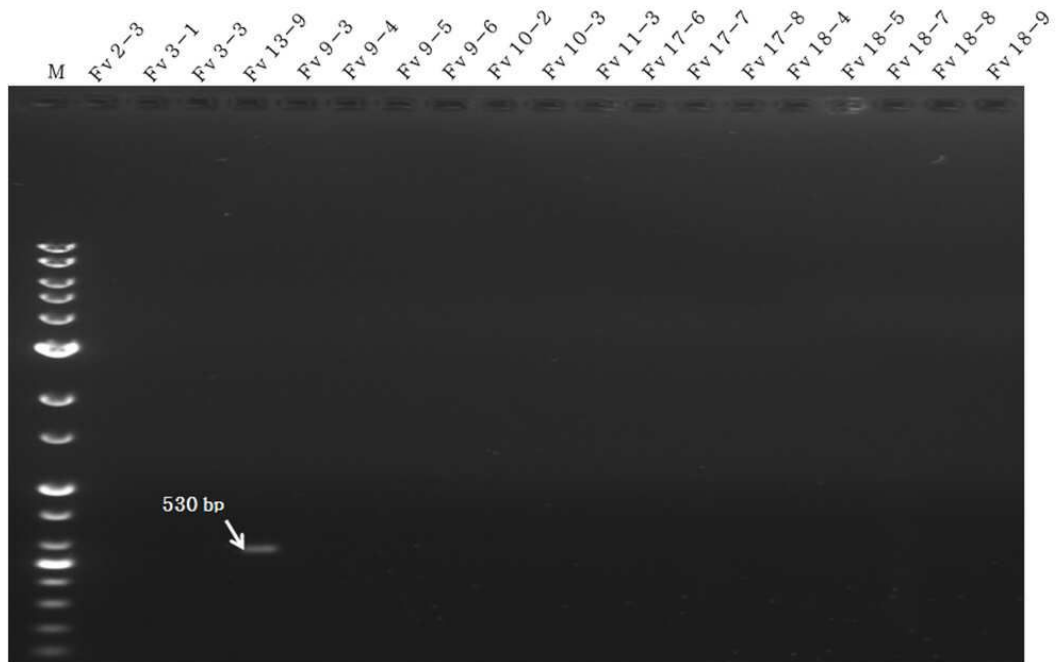
[0051] 따라서, 상기 서열번호 1의 DNA 단편은 국내산 그린피스 F6호 팽이버섯을 확인할 수 있는 마커로서 사용될 수 있고, 상기 서열번호 4 및 5의 프라이머 염기쌍은 상기 마커를 검출할 수 있는 수단으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Novel genomic marker for identifying *Flammulina velutipes* and uses thereof

<130> KPA140469-KR

<160> 5

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 618

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA marker

<400> 1

atagagatga ggacagagga aagcgaggat gagaagagag gaacgtataa gtccagctag 60

ggacgagagt gatgaggaaa ccgcacgaag acggggaaga cccatggaga acaagaccgg 120

ttttcacaaa gtagaggccc aatgggacga caccaaccca tggagtggaa taatcgcaaa 180

atggaaggaa ctggtcaagc ggcgaggag aacggagaag agagagaatg ccgcatatgg 240

caaaccacg tggaagataa cgtcttgtac aaaaacaacg atgtcccctc tcgaagaaaa 300

caatctatgt ctgccagcag acaagcttct cctacgccgt cgctatcatc tctaacgacg 360

cccaagtcac gatctcagtc tgtacaatca tctgactcag cgaactcagc gaaacgcgcg 420

aagaaacacg gaggcaacga cacgtcacag tcccgagaag acagagttcc cgactccccg 480

ctccgtagga aagagcccaa ccagatcccc aaatccagat cggaagctag actcccgatt 540

ggaactgcca tctgtagtga taaccaaacc ctccaaaccc aacctgacaa tggcacatcc 600

tctgtcctca tctctata 618

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

cggtagaag atgagacac 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

atagagatga ggacagagga

20

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

acagaggaaa gcgaggatga gaag

24

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gttgggtttg gagggtttgg tta

23