

종 특이 DNA probe를 이용한 버섯 세균성 갈반병 병원균(*Pseudomonas tolaasii*)의 검출

권순우* · 고승주 · 전명숙 · 강희완 · 오세종¹ · 장후봉² · 류진창
농업과학기술원 분자유전과, ¹농업과학기술원 응용미생물과,
²충북 농업기술원

Detection of *Pseudomonas tolaasii* Causing Brown Blotch Disease of Mushroom with Species-specific DNA Probe

Soon Wo Kwon*, Seung Joo Go, Meung Sook Cheun, Hee Wan Kang,
Se Jong Oh¹, Who Bong Chang² and Jin Chang Ryu

Division of Molecular Genetics, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

¹Division of Applied Microbiology, NIAST, RDA, Suwon 441-707, Korea

²Chungbuk Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 360-270, Korea

ABSTRACT: This study was carried out to develop the molecular marker for the detection of *Pseudomonas tolaasii*, a causative agent of bacterial brown blotch disease of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). When several primers designed from repetitive sequences and pectin lyase genes of bacteria were used to produce DNA polymorphism from different *Pseudomonas* spp. isolated from edible mushrooms, PEU1 primer derived from pectin lyase gene produced polymorphic bands differentiating *P. tolaasii* strains from other *Pseudomonas* species. Two bands, 1.0 kb and 0.4 kb, found commonly in 6 isolates of *P. tolaasii* were cloned into pGEM-T vector which were designated as pPTOP1 and pPTOP2, respectively, to use as probe. The 0.4 kb insert of pPTOP2 hybridized to only 6 isolates of *P. tolaasii*, but did not to the other *Pseudomonas* species. As few as 1.5×10^3 colony forming unit (cfu) of *P. tolaasii* could be detected by dot blot hybridization with the cloned 0.4kb DNA in pPTOP2.

KEYWORDS: Brown blotch disease, Mushroom, PCR, Probe, *Pseudomonas tolaasii*

우리나라의 버섯 재배 면적은 매년 증가하여 1997년 약 12만톤이 생산되었다(농촌진흥청, 1998). 그러나, 버섯 생산의 안전성을 저해하는 여러 가지 요인에 의해 농가의 피해는 계속 증가되고 있는 추세이다. 그 중에서도 세균성 병원균에 의한 수확량 감소와 품질 저하는 커다란 손실을 초래하고 있어, 이들에 대한 적절한 방제대책의 수립이 요구된다.

버섯에 병을 일으키는 세균으로는 *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas agarici*, *Pseudomonas 'gingeri'* 그리고 pathogenic *Pseudomonas 'reactans'* 등이 보고되었고(Wells 등, 1996; Wong 등, 1982; Young, 1970), 이외에도 *Pseudomonas fluorescens*의 생리종(biovars)과 nonpathogenic *Pseudomonas 'reactans'* 등과 같은 비병원성인 여러 종의 세균이 부생하는 것으로 알려져 있다(Wells 등, 1996; Goor 등, 1986; Wong 등, 1982).

이들 중 *P. tolaasii*는 버섯의 대표적인 병원균으로, 느타리, 양송이, 표고버섯 등에 갈반병(brown blotch disease)을 야기한다(Tsuneda 등, 1995; 김 등, 1995; 김 등, 1994; Rai-

ney 등, 1992; 신과 전, 1991; Goor 등, 1986). 이 병원균은 주로 버섯의 갓에 갈색 병반을 형성하고 심한 경우 갓과 대에 수침상을 형성한다. 분류학적으로 *P. tolaasii*는 버섯에서 분리되는 여러 종의 형광성 *Pseudomonas*종과 매우 유사하여, 생리적인 특성 및 영양요구성에 의한 방법으로는 뚜렷한 구분이 어렵다(Wells 등, 1996; Goor 등, 1986). 그리고, 병징에 있어서는 *P. tolaasii*에 의한 갈반 증상은 *P. 'gingeri'*에 의해 발생하는 열은 갈색(yellow-brown)의 반점 병인 ginger blotch disease와 유사한 특성을 갖는다(Cutri 등, 1984; Wong 등, 1982).

*P. tolaasii*는 소수성의 특징적인 lipodepsipeptide인 tolaasin을 생성하고, 이는 *P. 'reactans'*가 분비하는 유사한 화합물인 WLIP(white line inducing principle)와 반응하여 독특한 흰색의 침강선(white line)을 형성하며, 이러한 white line formation은 pitting test와 함께 *P. tolaasii*를 동정하는 간이적인 방법으로 이용되고 있다(Bessette, 1985; Wong과 Preece, 1979). 그러나, 이러한 생리적, 병리적 특성을 이용한 간이 검정을 위해서는 이들 균의 순수 분리가 필요하며, 많은 시간과 노력이 소요되는 단점이 있다. 더구나 병원균의 방제대책 수립을 위해서는 병원균의 생리적 특성 평가

*Corresponding author

에 의한 동정뿐 아니라 생태적(ecological), 역학적(epidemiological) 특성평가가 요구된다. 이를 위해서는 병원성 미생물의 monitoring을 위한 방법의 개발이 전제되어야 하며, 현재 다양한 동식물의 병원균에 대한 특이 DNA probe를 이용하거나 PCR 방법을 통해 이러한 세균의 생태학적 및 역학적인 연구가 이루어지고 있다.

특이 DNA probe의 개발방법으로는 ribosomal DNA의 변이 부분을 이용하거나 기존에 알려진 유전자를 진단용 DNA probe로 이용하는 방법이 사용되고 있다(Wullings 등, 1998; Khan과 Cerniglia, 1994). 그러나, 버섯으로부터 분리된 형광성 *Pseudomonas* 균주들의 ribosomal DNA 염기서열의 상동성이 매우 높게 나타나(권 등, 1998) probe를 제작하는데 이용이 불가능하며, 갈반병 세균에 대한 분자 생물학적인 연구 또한 미진한 수준이다. DNA marker를 개발하는 다른 방법으로 genomic subtraction method(Darrasse 등, 1994; Bjourson과 Cooper, 1988) 혹은 genomic library를 이용한 probe 선발 방법(Ghadersohi 등, 1997) 등이 이용되기도 하나 이는 선발에 많은 시간과 노력이 소요된다는 단점이 있다. PCR을 이용한 방법중 random primer를 이용한 RAPD 분석은 생물종으로 부터 DNA 다형성(polymorphism)을 유도하고 유연관계를 분석하거나 특이 DNA marker를 유도하는데 이용되고 있다(강 등, 1998; Quere 등, 1997). RAPD에 의한 probe의 선발방법은 다형성을 유도할 수 있는 적절한 primer의 선발이 이루어지면 비교적 용이하

게 특이 유전자 marker를 개발할 수 있는 장점을 갖는다.

본 실험은 느타리버섯 갈반병의 원인균인 *P. tolaasii*를 특이하게 검출할 수 있는 DNA probe의 개발을 목적으로 수행되었다. 이를 위해 세균종에 흔히 존재하는 유전자로부터 RAPD를 위한 primer를 선발하고 여기에서 유래한 다형성 밴드(polymorphic band)로 부터 *P. tolaasii*의 특이적 검출을 가능케 하는 DNA probe를 개발하여 이를 *P. tolaasii*의 동정에 이용하는 과정을 소개한다.

재료 및 방법

공시 균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 형광성 *Pseudomonas* 세균중 국내 수집 균주는 느타리와 팽이 버섯에서 분리된 것이며 미국기원의 균주는 J. M. Wells (Wells 등, 1996)로부터 분양 받은 재배 버섯 분리 균주이다(Table 1). 공시 균주는 25°C에서 24시간 동안 PAF(*Pseudomonas* Agar F, DIFCO) 배지에서 배양되었다.

Genomic DNA의 분리 및 PCR 조건

형광성 *Pseudomonas* 균주들의 genomic DNA는 Ausubel 등(1987)의 방법에 의해 분리되었다. PCR을 이용해 DNA 다형성을 유도하기 위하여 PEU1 primer(5'-ATATCATC-GAAGCCGE3')를 이용하였다. 각각의 PCR 반응 용액은 총

Table 1. Strains of fluorescent *Pseudomonas* spp. used in this study

Species	Strains ^a	Geographical origins ^b	Sources
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	KACC 10038	Kyungnam, Korea	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	KACC 10039	Chungbuk, Korea	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	KACC 10040	Chungbuk, Korea	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	CB 8	Chungbuk, Korea	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	KN 10	Kyungnam, Korea	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	KG 306	Kyunggi, Korea	<i>Flammulina velutipes</i>
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	CB 3-1	Chungbuk, Korea	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas agarici</i>	LMG 2115	United Kingdom	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas agarici</i>	LMG 2112	New Zealand	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas agarici</i>	LMG 2111	United Kingdom	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas 'reactans'</i>	H22	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas 'reactans'</i>	H3	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas 'reactans'</i>	Pf1	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas 'reactans'</i>	KACC 10041	Kyunggi, Korea	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas 'gingeri'</i>	Pf11	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas 'gingeri'</i>	Pf3	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas 'gingeri'</i>	Pf2	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar A	L8	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar B	D20	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar C	L6	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar C	G10	USA	<i>Agaricus bisporus</i>

^a KACC, Korea Agricultural Culture Collection, NIAST, RDA, Suwon, Korea; LMG, Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgium.

^b The strains of origin of USA were provided from Dr. J. M. Wells, USDA, USA.

50 μ l로 하였으며, 이때 조성은 20 pmol primer, 200 μ M의 dNTP, *Taq* polymerase buffer, genomic DNA 50 ng, 2.5 unit의 *Taq* polymerase이었다. PCR 증폭을 위해 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Co., Norwalk, Conn.)를 이용하였으며, 증폭조건은 94°C에서 4분간의 denaturation, 94°C 1분, 58°C 1분, 72°C 2분간 35 cycle의 중합반응을 실시하고, 72°C에서 4분간 extension과정을 거쳤다. PCR 산물은 TBE buffer에서 1.8%의 agarose gel을 이용하여 전개시켰으며, ethidium bromide용액에서 염색하여 UV를 이용하여 관찰하였다.

PCR 산물의 분리와 cloning

PEU1 primer를 이용해 증폭된 PCR 산물중 *P. tolaasii*로부터 관찰된 약 1.0 kb와 0.4 kb 크기의 두 가지 단편을 agarose gel로부터 분리한 후 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물의 cloning을 위해 pGEM-T easy vector system(Promega Co., USA)를 이용하였으며, Wizard Plus SV minipreps DNA purification system(Promega Co., USA)를 이용하여 plasmid를 분리한 후 *Eco*RI으로 절단하여 insert DNA를 확인하였다.

Southern blot hybridization

버섯으로부터 분리된 형광성 *Pseudomonas* 균주들의 genomic DNA 각 5 μ g을 *Eco*RI으로 절단, 0.9% agarose gel에 전기영동(5 V/cm)한 후 nylon membrane(Hybond+, Amersham)에 흡착시켰다. PEU1 primer로부터 증폭된 PCR 산물이 cloning된 pTOP1과 pTOP2를 *Eco*RI으로 절단하여 분리한 insert DNA를 준비하였다. 이들 DNA를 Megaprime DNA labelling system(Amersham, UK)을 이용해 α -³²P dCTP로 표지하여 probe로 이용하였다. Hybridization과정은 Amersham사의 방법에 준하여 실시하였으며, X-ray film에 24시간 노출시킨 후 현상하였다.

Dot blot 분석

Dot blot 분석은 PAF매지에서 24시간 배양된 각각의 균주로부터 colony를 모은 후 증류수에 희석하여 사용하였다. *P. tolaasii*의 진단을 위해서 각각의 세균은 1 \times 10⁶ cfu/ml의 농도로 조정되었으며, *P. tolaasii*의 검출 농도를 결정하기 위한 실험에서는 *P. tolaasii* KACC 10038의 초기 농도를 3 \times 10⁴ cfu로 맞춘 후 여러가지 농도로 희석하였다. 이들 세균세포 5 μ l를 nylon membrane에 dot blot한 후 10% SDS용액으로 적신 3 MM paper에 10분동안 정치하고 denaturing solution(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 7분, neutralizing solution(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA)에 3분간 둔 후 0.4 M NaOH가 흡수된 3 MM paper에 10분 동안 고정된 다음 membrane을 2 \times SSC로 세척하였다. Membrane은 위의 Southern blot 방법에 따라 분석되었다.

결과 및 고찰

RAPD를 위한 primer의 선발 및 RAPD 양상

버섯에서 분리되는 형광성 *Pseudomonas* 균주들로부터 DNA 다형성 밴드를 유도하기 위해 *Escherichia coli*의 repetitive sequence, *Erwinia* 및 *Pseudomonas* 등에 존재하는 pectin 분해효소 유전자와 같이 세균에 흔히 존재하는 것으로 보고된 유전자를 GenBank로부터 얻은 후 여러 개의 RAPD용 primer를 제작하였다. 이들 primer중 버섯으로부터 분리된 형광성 *Pseudomonas* 균주들에 대해 다양한 DNA 다형성 밴드를 형성하는 PEU1 primer를 선발하였다. Fig. 1은 PEU1 primer를 이용해 형광성 *Pseudomonas* 종으로 분류되는 여러종의 버섯분리 세균의 genomic DNA로부터 유도된 RAPD 양상을 나타내고 있다. 밴드 양상의 분석에 의하면 갈반병 세균 *P. tolaasii* 6균주는 유사한 밴드 양상을 나타내었으며, *P. tolaasii* KG 306은 다른 균주와는 다소 다른 밴드양상을 보였다. *P. agarici* LMG 2115와 LMG 2111은 동일한 밴드 양상을 나타내었으며, *P. 'gingeri'*로 분류된 Pf11 등 3균주 또한 종내 동일한 밴드 양상을 나타내었다. 하지만 부생균인 *P. 'reactans'*와 *P. fluorescens*의 생리종들(biovars)은 종내 계통들간의 밴드 양상이 서로 다르게 나타났다(Fig. 1). *P. fluorescens*와 *P. 'reactans'*에서 나타나는 종내 계통들간의 서로 다른 RAPD 양상은 종내 계통의 다양성(heterogeneity)을 반영하는 것으로 생각된다. *P. fluorescens*는 다섯 가지 생리종(biovars)으로 분류되고 있으며 이들의 특성은 생리종과 계통에 따라 매우 다양하며 (Palleroni, 1984), *P. tolaasii*와 대치 배양시 white line을 형성하는 균들로 정의되는 *P. 'reactans'*의 생리적, 유전적 특성 또한 계통간 상당한 차이가 있는 것으로 보고되고 있다 (권 등, 1998; Wells 등, 1996; Goor 등, 1986; Zarkower 등, 1983).

한편, 중간 혹은 계통간 구분에 일반적으로 사용되는 RAPD용 random primer는 약 10 mer 정도이다. 하지만 이러한 종류의 random primer에 의한 RAPD는 PCR 조건에 영향을 받기 쉽고 재현성이 떨어지는 단점을 갖는다. 반면, 본 실험에서 사용된 PEU1 primer는 16개의 oligomer로 이루어져 있어, 50°C 이상의 annealing temperature에서도 높은 재현성을 갖는 PCR 다형성을 유도할 수 있었다.

P. tolaasii 특이 밴드의 검출

PEU1 primer를 이용해 생성된 다양한 PCR 밴드양상에 따르면 갈반병 세균인 *P. tolaasii*에 공통적으로 나타나는 여러 개의 밴드를 관찰할 수 있다(Fig. 1). 이들 밴드 중 *Pseudomonas tolaasii* KACC 10038로부터 약 1.0 kb와 0.4 kb 크기의 두 가지 밴드를 분리하고 이들을 각각 cloning한 후 pTOP1과 pTOP2로 명명하였다. 그리고 두가지 DNA 단편을 probe로 이용하여 *P. tolaasii*의 특이적 검출이 가능한지를 검토하기 위해 Southern blot을 실시하였다. 먼저, *P. tolaasii* 6균주와 *P. agarici* 2균주, *P. 'gingeri'* 2균주, *P.*

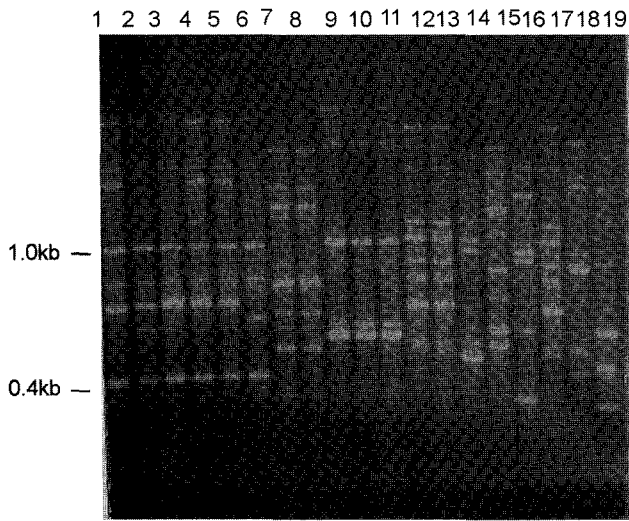


Fig. 1. Amplified polymorphic DNA from fluorescent *Pseudomonas* spp. with PEU1 primer. Aliquots of 20 μ l from PCR products were electrophoresed on 1.8% agarose gel. Arrows indicate two bands common in *P. tolaasii* strains. Lanes 1; *P. tolaasii* KN 10, 2; *P. tolaasii* KACC 10040, 3; *P. tolaasii* KACC 10039, 4; *P. tolaasii* KACC 10038, 5; *P. tolaasii* KG 306, 6; *P. tolaasii* CB 3-1, 7; *P. agarici* LMG 2115, 8; *P. agarici* LMG 2111, 9; *P. 'gingeri'* Pf11, 10; *P. 'gingeri'* Pf3, 11; *P. 'gingeri'* Pf2, 12; *P. 'reactans'* H22, 13; *P. 'reactans'* H3, 14; *P. 'reactans'* Pf1, 15; *P. fluorescens* biovar B D20, 16; *P. fluorescens* biovar A L8, 17; *P. fluorescens* biovar C L6, 18; *P. fluorescens* biovar C G10, 19; *P. fluorescens* biovar C J14.

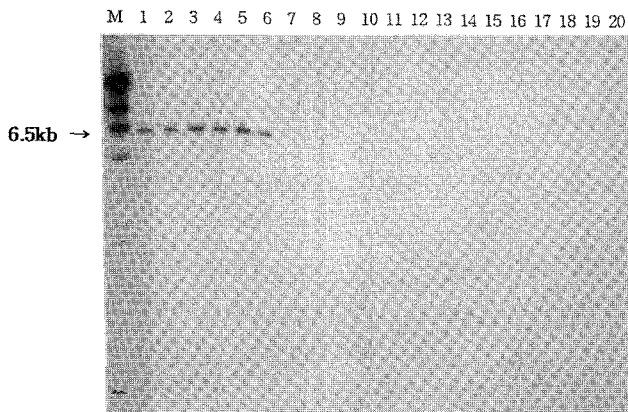


Fig. 2. Southern hybridization of total DNAs of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from mushroom with 0.4 kb insert DNA of pPTOP2. DNAs of bacterial strains were digested with *Eco*R I, electrophoresed on 0.9% agarose gel, and blotted onto a nylon membrane. Lane M; λ /*Hind*III DNA marker, 1-6; *P. tolaasii* strains, 7-8; *P. agarici* strains, 9-10; *P. 'gingeri'* strains, 11-14; *P. 'reactans'* strains, 15-20; *P. fluorescens* biovars.

'reactans' 4균주 그리고 *P. fluorescens* 5균주 등 총 19균주의 형광성 *Pseudomonas*로부터 genomic DNA를 분리하고 *Eco*RI으로 절단한 후 각각의 probe와 반응여부를 조사하였다. 1.0 kb 크기의 probe인 pPTOP1의 insert DNA는 *P. to-*

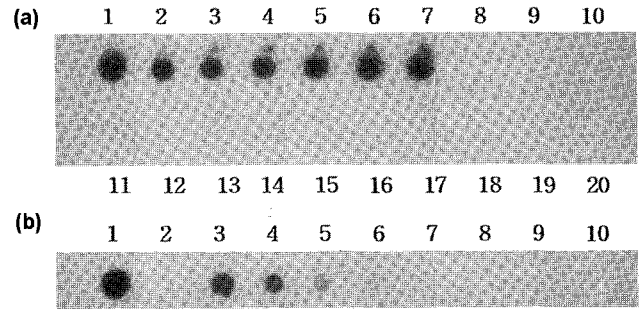


Fig. 3. Dot blot hybridization of bacterial cells of fluorescent *Pseudomonas* spp. from mushroom with 0.4 kb insert DNA of pPTOP2. Panel (a) Each dot consisted of 1×10^5 cfu of bacterial cells. Dot 1-7; *P. tolaasii* strains, 8; negative control (water), 9-11; *P. agarici* strains, 12-14; *P. 'gingeri'* strains, 15-17; *P. 'reactans'* strains, 18-20; *P. fluorescens* strains. Panel (b) dot blot hybridization of *P. tolaasii* KACC 10038 with serial dilutions. A cell concentration of 3×10^4 cfu was loaded in dot 1. Dot 2 was water as negative control. Dot 3-10 are 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 and 1/256 dilutions of dot 1, respectively.

*laasii*를 포함하는 *P. 'gingeri'* 등의 여러 균주와 교차 반응 (cross reaction)을 일으켜 *P. tolaasii* 검출을 위한 특이 유전자 marker로서는 부적절한 것으로 나타났다(자료 미제시). pPTOP2의 insert DNA인 0.4 kb 유전자 단편을 probe로 이용한 경우 *P. tolaasii* 6균주와 특이적으로 결합하여 약 6.5 kb의 크기의 단일밴드를 형성한 반면, 다른 종의 형광성 *Pseudomonas*와는 반응하지 않았다(Fig. 2). 따라서 pPTOP2는 갈반병 세균인 *P. tolaasii*를 특이적으로 검출할 수 있는 probe로 이용이 가능함을 알 수 있었다.

Dot blot 분석

버섯에서 분리된 형광성 *Pseudomonas* 균주의 cell을 이용한 dot blot 검정을 위하여, 각각의 cell 농도를 약 1×10^6 cfu/ml로 맞추어 다음 pPTOP2의 insert DNA를 probe로 이용하였다. Southern blot과 동일하게 dot blot 검정에서도 pPTOP2의 insert DNA는 *P. tolaasii* 균주들에서만 양성반응을 나타내었다(Fig. 3(a)). 그리고, dot blot 검정에 의한 *P. tolaasii*의 검출 한계농도를 결정하기 위해서 *P. tolaasii* KACC 10038 균주를 다양한 농도로 희석하여 dot blot을 실시하였다. Fig. 3(b)에 나타난 바와 같이 cell수준에서는 약 1.5×10^3 cfu의 농도까지 dot blot에 의해 검출이 가능함을 알 수 있었다. Ward 등(1990)은 *Erwinia carotovora*의 검출에 있어서 DNA hybridization 방법이 혈청학적 분석 (immunoassay)에 비해서 감도(sensitivity)가 우수하며, 검출의 한계농도는 약 10^3 cfu로 보고한 바 있으며, 본 실험에서 얻은 *P. tolaasii*의 검출 한계 농도인 1.5×10^3 cfu는 Ward 등의 결과와 유사하였다. PAF 배지에서 24시간 배양한 *P. tolaasii*가 형성하는 단일 colony(single colony)의 세균농도는 약 10^5 cfu 이상으로 나타났는데, 이는 dot blot에 의해 *P. tolaasii*를 colony 상태에서 간이적으로 검출하는 것이 가

능하다는 것을 보여 주었다.

본 실험에서 개발된 probe를 이용한 dot blot 분석은 기존의 생리적 특성이나 병원성 검정에 의한 동정방법에 비해 노력과 시간이 적게 소요될 뿐 아니라, 많은 수의 시료로부터 *P. tolaasii*를 동시에 검출할 수 있다. 게다가 dot blot 검정은 갈반병 세균의 생태적, 역학적 연구의 기초가 되는 monitoring을 용이하게 할 것으로 기대된다.

적 요

본 연구는 느타리 버섯 갈반병 병원균인 *Pseudomonas tolaasii*의 진단을 위한 분자 marker를 개발하기 위해 수행되었다. 세균의 반복염기서열과 펙틴 분해효소 유전자로부터 제작된 여러개의 primer들을 이용해 식용버섯으로부터 분리된 *Pseudomonas*종들로부터 DNA 다형성을 유도한 바 펙틴 분해 효소로부터 제작된 PEU1 primer는 다른 *Pseudomonas*종들로부터 *P. tolaasii*를 구분시키는 다형성 밴드를 생성하였다. *P. tolaasii* 6균주에 공통적으로 나타나는 1.0 kb와 0.4 kb의 두 가지 밴드를 pGEM-T에 클로닝하고 이들을 각기 pPTOP1과 pPTOP2로 명명하고 probe로 이용하였다. 0.4 kb 크기의 pPTOP2의 삽입 DNA는 *P. tolaasii* 6균주와 hybridization이 이루어진 반면 다른 *Pseudomonas* 종과는 반응하지 않았다. 0.4 kb 크기의 pPTOP2의 삽입 DNA를 probe로 이용해 dot blot hybridization한 결과 *P. tolaasii*는 1.5×10^3 cfu까지 검출이 가능함을 확인하였다.

참고문헌

- 강희완, 고승주, 권순우. 1998. PCR 다형성 밴드 유래 DNA probe에 의한 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 특이적 검출. 한국식물병리학회지 14(2): 164-170.
- 권순우, 고승주, 강희완, 전명숙, 류진창. 1998. 버섯에서 분리한 형광성 *Pseudomonas* spp.의 ITS I 영역 분석에 의한 계통 분류. 한국식물병리학회지 14(4): 350-357.
- 김종완, 권순익, 강희진. 1995. 인공재배버섯에서 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원세균에 관한 연구 2. 버섯 세균성 갈색점무늬병의 병원세균 *Pseudomonas tolaasii*와 White line 형성균의 세균학적 특성. 한국식물병리학회지 11(4): 353-360.
- 김종완, 김근희, 강희진. 1994. 인공재배버섯에서 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원세균에 관한 연구 1. 인공 재배버섯의 부패 변성 원인세균에 대하여. 한국식물병리학회지 10(3): 197-210.
- 농촌진흥청. 1998. '99 새해영농설계교과교육용 교재. 과수·버섯편. pg. 177.
- 신관철, 전낙범. 1991. 느타리 버섯 세균성 갈반병의 병원균 분류 동정 및 생물학적 방제. 농시논문집(농업산학협동편). 34: 1-10.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1987. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, N. Y.
- Bessette, A. E. 1985. Use of the mushroom tissue block rapid pitting test to detect brown blotch pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 999-1000.
- Bjourson, A. J. and Cooper, J. E. 1988. Isolation of *Rhizobium loti* strain-specific DNA sequences by subtraction hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2852-2855.
- Cutri, S. S., Macauley, B. J. and Roberts, W. P. 1984. Characteristics of pathogenic non-fluorescent (smooth) and non-pathogenic fluorescent (rough) forms of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas 'gingeri'*. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 291-298.
- Darrasse, A., Kotoujansky, A. and Bertheau, Y. 1994. Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 298-306.
- Ghadersohi, A., Coelen, R. J. and Hirst, R. G. 1997. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology* 56: 87-98.
- Goor, M., Vantomme, R., Swings, J., Gillis, M., Kersters, K. and de Ley, J. 1986. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2249-2264.
- Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. 1994. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3739-3745.
- Palleroni, N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas*, p. 141-199. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Quere, F., Deschamps, A. and Urdaci, M. C. 1997. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *J. Applied Microbiol.* 82: 783-790.
- Rainey, P. B., Brodey, C. L. and Johnstone, K. 1992. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of cultivated mushroom. Pages 95-118 in: *Advances in Plant Pathology*, Vol. 8. J. H. Andrews and I. Tommerup, eds. Academic Press, Inc., New York.
- Tsuneda, A., Suyama, K., Murakami, S. and Ohira, I. 1995. Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed on *Quercus* logs. *Mycoscience* 36: 283-288.
- Ward, L. J. and De Boer, S. H. 1990. A DNA probe specific for serologically diverse strains of *Erwinia carotovora*. *Phytopathology* 80: 665-669.
- Wells, J. M., Sapers, G. M., Fett, W. F., Butterfield, J. E., Jones, J. B., Bouzar, H. and Miller, F. C. 1996. Postharvest discolorization of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. 'reactans'*, and *P. 'gingeri'*. *Phytopathology* 86: 1098-1104.
- Wong, W. C., Fletcher, J. T., Unsworth, B. A. and Preece, T. F. 1982. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of

- the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 43-48.
- Bessette, A. E. 1985. Use of the mushroom tissue block rapid pitting test to detect brown blotch pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 999-1000.
- Wullings, B. A., Van Beuningen, A. R., Janse, J. D. and Akkermans, A. D. L. 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4546-4554.
- Young, J. M. 1970. Drippy gill: a bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici* n. sp. *N. Z. J. Agr. Res.* **13**: 977-990.
- Zarkower, P. A., Wuest, P. J., Royse, D. J. and Myers, B. 1983. Phenotypic traits of fluorescent pseudomonads causing bacterial blotch of *Agaricus bisporus* mushrooms and other mushroom-derived fluorescent pseudomonads. *Can. J. Microbiol.* **30**: 360-367.