

느타리버섯 세균성갈색무늬병 병원균 *Pseudomonas tolaasii*의 특이적 DNA 클로닝

이혁인 · 차재순*
충북대학교 농과대학 농생물학과

Cloning of a DNA Fragment Specific to *Pseudomonas tolaasii* Causing Bacterial Brown Blotch Disease of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*)

Hyouk-Inn Lee and Jae-Soon Cha*

Department of Agricultural Biology, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763, Korea

ABSTRACT: A DNA fragment which is involved in tolaasin production was cloned to obtain a molecular marker of *Pseudomonas tolaasii*, a casual agent of bacterial brown blotch disease of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). Tolaasin is a lipodepsipeptide toxin and known as a primary disease determinant of the *P. tolaasii*. It is responsible for formation of white line in agar when *P. tolaasii* were cultured against white line reacting organisms (WLROs). White line negative mutants (WL⁻) were generated by conjugation between rifampicin resistant strain of *P. tolaasii* and *E. coli* carrying suicidal plasmid pSUP2021::Tn5. The ability of tolaasin production of the WL⁻ mutants was examined by hemolysis test, pathogenicity test, and high pressure liquid chromatography (HPLC) analysis of culture filtrate. All of the WL⁻ mutants were lost the ability of tolaasin production (Tol⁻). Genomic library of the Tol⁻ mutant was constructed in pLAFR3 and the cosmid clone containing Tn5 was selected. DNA fragment from framing region of Tn5 was cloned from the plasmid and used as a probe in Southern blot. DNA-DNA hybridization with the probe to total DNA from group of bacteria ecologically similar to *P. tolaasii* including WLROs, fluorescent *Pseudomonads* isolated from oyster mushroom, *P. agarici*, *P. gingeri*, and some of other species of *Pseudomonas* showed that some of the tested bacteria do not have any hybridized band and others have bands showing RFLP. The cloned DNA fragment or its nucleotide sequence will be useful in detection and identification of the *P. tolaasii*.

Key words: oyster mushroom, bacterial brown blotch, *Pseudomonas tolaasii*, tolaasin, specific DNA.

느타리버섯은 우리 나라 전체 버섯 생산량의 약 74%를 차지하고 있으며, 또한 단위면적당 가장 높은 소득을 올릴 수 있는 농가의 중요한 소득 작목이다(5). 이러한 느타리버섯의 재배에 큰 문제점 중의 하나는 버섯재배기간 동안 발생하는 세균병의 피해로 그 정도가 매우 심각하여 버섯재배 자체를 위협하고 있다(5, 14, 24). 우리 나라에서 느타리버섯에 발생하는 세균병은 여러 가지 형태의 병징을 가지고 있으며, 병 발생의 예측이 매우 어렵고, 병 발생 후에는 방제가 거의 불가능하며, 한번 발생하면 재배사 전체로 급격하게 전염되어 심한 경우에는 버섯을 전혀 수확하지 못하게 하는 특성을 가지고 있다.

우리 나라에서 느타리버섯의 세균병은 갈반병(褐斑病) 혹은 갈변병(褐變病)으로 불리며, 두종의 세균, 즉 *Pseudomonas tolaasii*와 *Pseudomonas agarici*가 병원세균으

로 보고되어 있으나(12, 24), 두 세균이외의 다양한 세균이 버섯으로부터 분리되는 것으로 알려져 있다(13, 14). 따라서 우리 나라에서 가장 많이 생산·소비되는 느타리버섯의 세균병의 병징과 병원세균과의 관계정립, 병원균의 보다 정확한 생태파악, 병발생 예측에 의한 병발생 예방, 그리고 효과적인 병 방제법의 확립 등이 시급한 실정이다.

*P. tolaasii*는 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)에 세균성 갈색무늬병(細菌性褐斑病; bacterial brown blotch, bacterial blotch) 또는 갈색무늬병(褐斑病; brown blotch) 병원세균으로 알려져 있으며, 양송이버섯 수량손실의 가장 중요한 생물적 요인으로 보고 되었다(1, 11, 16, 20, 27). 또한 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*), 팽이버섯(*Flammulina velutipes*) 그리고 표고버섯(*Lentinus edodes*)에도 병을 일으키는 것으로 알려져 있다(26, 28, 29). *P. agarici*는 양송이버섯에 drippy gill병과 느타리

*Corresponding author.

버섯에 yellow blotch(황색무늬병; 黃班病)을 일으키는 병원세균으로 보고되어 있다(3, 32). 이 두 세균 이외에도 *Pseudomonas gingeri*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas reactans*, *Arthrobacter* spp., 미동정 *Pseudomonas*들이 버섯에 다양한 병징의 세균병을 일으키는 것으로 알려져 있다(1, 2, 7, 23, 29, 30, 33).

*P. tolaasii*는 tolaasin이라는 저분자량의 lipodepsipeptide의 독소를 생산하여 세포 밖으로 분비하며, 이 독소는 다양한 생체 세포막에 pore를 형성하여 세포를 파괴할 수 있으며, 양송이버섯 갈색무늬병의 가장 중요한 병원성 결정인자로 보고되었다(4, 17, 19). 또한 tolaasin은 처음에 tolaasin I, II로 구조와 함께 보고되었으며(16, 18), 최근에는 일본의 Shirata 등에 의해 8가지의 tolaasin으로 세분되어 보고되었고(25, 26), 일부 식물병원 세균이 생성하는 독소인 syringomycin과 syringotoxin 처럼 non-ribosomal enzyme complex에 의해 합성되어 질 것이라고 알려졌다(20, 21). 또한 이 독소는 biosurfactant 특성을 가졌고, *P. tolaasii*가 WLROs(white line reacting organisms) 또는 *Pseudomonas "reactans"*라는 일군의 세균과 *Pseudomonas* Agar F(PAF) 평판배지에서 대치 배양되었을 때 흰침강선(white line) 형성에 관여하고, 이 흰침강선형성검정(white line test)은 *P. tolaasii*를 빠르게 동정하는 방법으로 보고되기도 하였다(20, 31). 그러나 *P. tolaasii*에는 병원성을 가지면서도 흰침강선을 형성하지 못하는 그룹이 존재한다고 보고되었으며, 또한 환경의 자극에 따라 tolaasin생성을 포함한 여러 가지 형질이 동시에 바뀌는 표현형변이현상(phenotypic variation)이 존재하며, 이 현상은 유전자의 재조합에 의해 조절되는 것으로 보고되었다(8-10, 14).

본 연구에서는 느타리버섯 세균병의 가장 중요한 병원 세균인 *P. tolaasii*의 특이적 검출 및 정확하고 빠른 동정에 사용될 수 있는 *P. tolaasii*에 특이적 DNA를 클론링하고자 하였다. *P. tolaasii*에 특이적인 DNA를 확보하는데 있어서 tolaasin 생성 유전자를 사용하고자 하였는데, 세균이 생산하는 독소는 일반적으로 세균의 종(種)에 특이성이 있으며, 특히 tolaasin은 병원성 결정인자로 알려져 있으므로 가장 좋은 target DNA라 판단되었다. 따라서 먼저 tolaasin 생성에 관여하는 유전자를 클론링하고, 클론된 DNA 절편을 probe로하여 이 DNA 절편의 *P. tolaasii*에 대한 특이성을 DNA-DNA hybridization을 통해 확인하였다.

재료 및 방법

세균균주. 본 연구에 사용된 *Pseudomonas*속 세균 및 WLROs 균주들은 Table 1에서와 같다. 본 연구동안 분리되어 사용된 균주는 충북지방의 느타리버섯 재배사에

서 수집된 시료에서 관행의 방법으로 순수 분리되어 사용되었다(15).

흰침강선형성검정(White line test). *P. tolaasii* 또는 검정하고자 하는 세균과 WLRO를 *Pseudomonas* Agar F(PAF; Bacto-tryptone 10 g, Bacto-proteose peptone No. 3 10 g, dipotassium phosphate 1.5 g, magnesium sulphate 1.5 g, glycerol 10 ml, agar 15 g per liter) 평판배지위에서 약 0.5~1.0 cm의 간격을 두고 streak한 후 25°C의 항온기에 배양시키면서 24시간 간격으로 1주일 간 두 균주사이에 흰침강선의 형성 유무를 조사하였다.

병원성 검정(Rapid pitting test). 병원성 검정은 양송이와 느타리버섯의 자실체를 이용하였다. 양송이를 이용한 검정은 양송이버섯의 갓조직을 멸균된 칼로 두쪽 혹은 네쪽으로 반듯하게 잘라내어 petri dish안의 멸균수로 적신 여과지에 올려놓고, 배양한 분리세균의 현탁액($10^8 \sim 10^9$ cells/ml) 10 μ l를 버섯 절단면에 접종하고 20~25°C의 항온기에 두면서 24시간 간격으로 변색과 버섯조직

Table 1. Pseudomonads and white line reacting organisms (WLROs) used in this study

Species	Strain	Description	Source
<i>P. acidovorans</i>	7185	ATCC11299a	KCTC1638
<i>P. agarici</i>	7177	ATCC25941	
<i>P. arvilla</i>	7189	ATCC23973	KCTC1643
<i>P. diminuta</i>	7200	ATCC19146	KCTC2473
<i>P. fluorescens</i>	7181	ATCC12633	KCTC1751
	7182	ATCC11250	KCTC1645
<i>P. fragi</i>	7195	ATCC27362	KCTC2345
<i>P. gingeri</i>	pf9	Path ⁺ , ATCC51311	Wells et al(29)
	pf31	Path ⁺ , ATCC51312	Wells et al(29)
<i>P. maltophilia</i>	7191		KCTC2437
<i>P. ovalis</i>	7193	ATCC8209	KCTC2349
<i>P. pseudoaeruginosa</i>	7196	ATCC12815	KCTC2347
<i>P. putida</i>	7188	ATCC17426	KCTC1639
<i>P. stutzeri</i>	7192	ATCC17588	KCTC1066
<i>P. taetrolens</i>	7187	ATCC4683	KCTC1064
<i>P. testosteroni</i>	7186	ATCC11996	KCTC1772
<i>P. tolaasii</i>	A	WL ⁺ Path ⁺	Kim et al(14)
	6041	WL ⁺ Path ⁺	This study
	6096	WL ⁺ Path ⁺	This study
	6372	ATCC33618	
	P3a	ATCC51309	Wells et al(29)
	PF29		Wells et al(29)
	AR	Spontaneous Rif mutant of strain A	This study
	6041R	Spontaneous Rif mutant of strain 6041	This study
WLROs	502-3		Kim et al(14)
	6679	ATCC14340	Wells et al(29)
	D ₂	Path ⁺ , ATCC51313	Wells et al(29)
	H ₃	Path ⁻	Wells et al(29)

ATCC: American Type Culture Collection, KCTC: Korean Collection for Type Cultures, WL: White line formation ability, Path: Pathogenesis on button mushroom or oyster mushroom

합몰 여부를 조사하였다. 느타리버섯을 이용한 검정은 평판배지에서 배양한 세균을 느타리버섯 자실체의 표면에 묻혀준 후 양송이와 동일한 조건에서 같은 방법으로 조사하였다.

적혈구용혈검정(Hemolytic activity test). 검정하고자 하는 세균의 배양여과액의 적혈구 용혈활성은 쥐의 적혈구(RBC; red blood cell)를 이용하여 측정하였다. 세균 배양여과액은 세균을 PAF broth에서 48시간동안 진탕 배양(200 rpm, 25°C) 후 세균세포를 원심분리와 막여과(0.45 µm)로 제거하여 준비하였다. 25 mM CaCl₂를 함유한 HEPES buffered saline(HBS; 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgSO₄, pH 7.4) 800 µl에 적혈구용액과 배양여과액을 각각 100 µl를 첨가하고 37°C 항온수조에서 30분간 둔 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였다.

Tn5 돌연변이체 유도. *P. tolaasii*의 선발 marker로 사용하기 위해서 rifampicin저항성(Rif^r) 자연돌연변이체를 100 µg/ml의 rifampicin이 함유된 KB(King's medium B; Bacto proteose peptone No. 3 20 g, dipotassium phosphate 1.5 g, magnesium sulphate 1.5 g, glycerol 10 ml, agar 15 g per liter) 평판배지에서 선발하였고, 선발된 *P. tolaasii* 두 균주 AR과 6041R을 Tn5 돌연변이체 유도에 사용하였다. 50 µg/ml의 kanamycin이 함유된 Luria-Bertani(LB; Bacto-tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, agar 15 g per liter) 평판배지에서 하룻밤 배양시킨 대장균 HB101(pSUP2021::Tn5)과 KB 평판배지에서 하룻밤 배양시킨 *P. tolaasii* AR 혹은 6041R 균주를 각각 10⁸~10⁹ cells/ml의 농도로 현탁시키고, 이 현탁액을 NA(nutrient agar; Beef extract 3 g, Peptone 5 g, Yeast extract 2 g, Agar 15 g per liter) 평판배지위에 놓인 멸균된 membrane filter위에 각각 10 µl씩 놓아 혼합시켜 28°C에서 하룻밤 배양 후, 각각 100 µg/ml와 50 µg/ml의 rifampicin과 kanamycin을 함유한 배지위에 도말하여 Tn5가 삽입된 균주를 선발하였다. 선발된 Tn5 돌연변이체들은 PAF 배지에서 WLRO 균주와 흰침강선형성검정을 통하여 흰침강선을 형성하지 못하는 균주(WL⁻)들을 선발하였다.

Tolaasin 분리 및 HPLC 분석. *P. tolaasii*와 선발된 WL⁻ 돌연변이체 균주의 배양여과액으로부터 tolaasin을 추출하고 HPLC로 분석하여 그 균주의 tolaasin 생성유무를 확인하였다. Tolaasin의 분리 및 정제는 Shirata 등(26)의 방법을 따랐다. 정제된 독소는 Waters의 HPLC system(600 controller, 626 pump, 486 tunable absorbance detector)을 이용하여 분석하였다. protein-pak 60 column(7.8×300 mm)과 C8 Rp column을 직렬로 연결하여 사용하였고, 용매는 0.1% trifluoroacetic acid를 함유한 acetonitrile(40%~60%)를 사용하였으며, to-

laasin는 220 nm에서 detection하였다.

Tolaasin 생성 유전자 클로닝. Tolaasin을 생성하지 못하는 돌연변이 균주(Tol⁻), 6009 균주의 전체 DNA를 분리하여, Sambrook 등(22)의 방법으로 pLAFR3에 그 균주의 genomic library를 만들었다. Genomic library를 가진 대장균 균주들을 50 µg/ml kanamycin이 함유된 LB 평판배지에 도말하여 Tn5를 가진 균주를 선발하였다. 선발된 kanamycin 저항성 대장균 균주로부터 플라스미드를 분리하여 Tn5 존재를 확인하고, pToltn5라 명명하였으며, pToltn5의 physical map을 작성하였다. 작성된 physical map을 바탕으로 Tn5가 삽입된 주변에 있는 BamHI 절편을 pBluescript SKII(+)에 subcloning하였고, pTol1이라 명명하였다(Fig. 2).

DNA-DNA hybridization. 플라스미드 분리 Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 pSUP2021::Tn5와 pTol1을 분리하였다. pSUP2021::Tn5를 HpaI 제한효소로 절단하여 agarose 겔에서 전기영동 후 3.7 kb DNA를 Gene Clean II Kit(Bio loll, Vista, CA, USA)로 분리하여 Tn5에 대한 probe로 사용하였다. 또한 pTol1을 BamHI으로 절단하여 삽입 DNA를 위와 같은 방법으로 회수한 후 *P. tolaasii*에 대한 특이성 확인을 위한 probe로 사용하였다. 세균으로부터 분리된 약 4~6 µg의 DNA를 적당한 제한효소로 완전히 절단하고 agarose 겔에서 전기영동 후 nylon membrane에 blot시켰으며, probe DNA의 labelling, hybridization, 그리고 detection은 DIG DNA Labeling and Detection Kit(Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA)의 방법에 따라 수행하였다.

결과 및 고찰

Tn5 돌연변이체 선발. *P. tolaasii* AR 및 6041R 균주와 pSUP2021::Tn5를 가진 대장균과의 접합에 의해 Tn5 돌연변이체가 만들어 졌으며, 각각의 돌연변이체는 WLRO 균주와 대치배양을 통해 흰침강선 형성능력을 확인하였다. AR균주에서 형성된 2000개의 Tn5 돌연변이체중 6개 균주가 흰침강선을 형성하지 못했으며(WL⁻), 6041R에서 만들어진 1500개의 Tn5 돌연변이체중에서 3개의 균주가 WL⁻으로 선발되어, 흰침강선 형성능력에 대한 돌연변이율은 0.2~0.3%로 계산되었다.

WL⁻ 돌연변이체에 Tn5가 삽입되었나를 확인하기 위해 AR균주로부터 유도된 6개의 Tn5 돌연변이체로부터 전체 DNA를 분리하여 Tn5내에 절단부위(restriction site)가 없는 EcoRI과 Tn5내에 한 개의 절단부위를 가진 BamHI으로 각각 절단 후 Tn5의 HpaI DNA절편을 probe로하여 DNA-DNA hybridization을 실시하였다. EcoRI으로 절단된 모든 Tn5 돌연변이체는 한개의 hy-

bridization band를 가졌고, *Bam*HI으로 절단한 경우에는 두개의 band를 가지고 있어서 Tn5의 삽입이 확인되었으며, *Bam*HI으로 절단한 blot에 나타난 hybridization band들의 다형성(polymorphism)에 의해 4개의 다른 위치에 삽입된 돌연변이체를 얻었음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

WL⁻ 돌연변이체의 병원성. 양송이 버섯의 갖조직을 이용한 병원성검정 결과 야생형 균주(AR)는 버섯 갖조직을 짙은 갈색으로 변색시키고 조직을 깊게 함몰시키는 강력한 병원성을 보여주었으나, WL⁻ 돌연변이체들은 아무런 병징을 유도하지 못하였다(Table 2). 또한 느타리 버섯 갖에 세균을 묻혀 실시한 병원성검정에서도 같은 결과를 얻었다. 이 결과는 흰침강선 형성능력이 병원성과 관계 있음을 말해주며, 결국 흰침강선 형성능력의 상실이 tolaasin 생성능력의 상실을 반영한 것이라 생각했

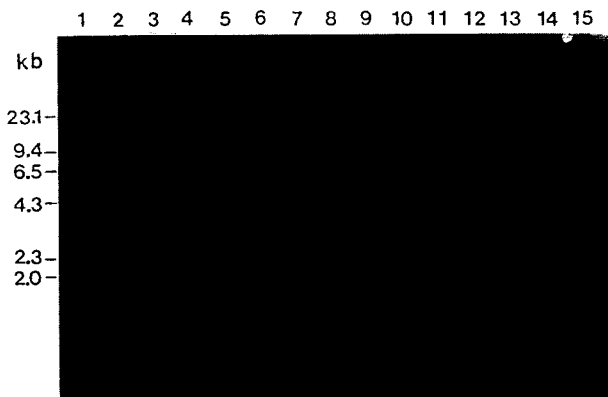


Fig. 1. DNA-DNA hybridization of Tn5 mutants to confirm Tn5 insertion. Total DNA from wild type strain (lane 1, 8) and Tn5 mutants (lane 2~7, 9~14) of *P. tolaasii* was digested with *Eco*RI (lane 1~7) and *Bam*HI (lane 8~14), and the DNA was hybridized with *Hpa*I fragment of Tn5 as a probe.

Table 2. Characteristics of Tn5 Mutants of *Pseudomonas tolaasii*

Mutants	White line test	Rapid pitting test	Hemolysis test (OD600)	Fluorescence on KB	Source
6007	-	-	1.14±0.04	+	AR
6008	-	-	1.02±0.09	+	AR
6009	-	-	1.05±0.03	+	AR
6010	-	-	1.03±0.03	+	AR
6130	-	-	1.04±0.02	+	6041R
6131	-	-	1.19±0.05	+	AR
6132	-	-	1.19±0.07	+	AR
6134	-	-	1.22±0.03	+	6041R
AR	+	+++	0.25±0.04	+	A
6041R	+	+++	0.25±0.01	+	6041
control(PAF)			1.41±0.01		

+++ : strong browning and pitting, + : positive, - : negative

을 때 tolaasin이 이 세균의 가장 중요한 병원성 인자임을 알 수 있다.

WL⁻ 돌연변이체의 tolaasin 생성능력. WL⁻ 돌연변이체의 tolaasin 생성 유무를 확인하기 위하여 돌연변이체 균주들의 배양여과액의 용혈활성을 측정해 본 결과 야생형 *P. tolaasii* 균주와 WL⁺ 돌연변이체의 배양여과액은 37°C에서 30분 경과 후 흡광도를 크게 감소시켰으나, WL⁻ 돌연변이체의 배양여과액처리에 의해서는 배지를 이용한 대조구에 비해서 흡광도의 감소정도가 크지 않았다(Table 2). 이러한 WL⁻ 돌연변이체의 적혈구 용혈능력의 상실은 이들 돌연변이체들이 tolaasin독소를 생성하지 못함(Tol⁻)을 말해주고 있다.

P. tolaasii 6041R의 배양여과액으로부터 tolaasin을 추출, 정제하여 HPLC로 분석해 본 결과 Sirata 등(26)의 보고와 같이 전형적인 8개의 tolaasin peak들이 나타났으며, Dr. Shirata로부터 분양 받은 tolaasin I을 동일한 조건에서 분석하여 그 retention time을 비교해 본 결과 6041R균주의 4번째 peak가 tolaasin I인 것으로 나타났다(Fig. 2B). 그러나 WL⁻ 돌연변이체 6130균주로부터 분리한 분획의 HPLC 분석에서는 야생형 균주에서 나타난 8개의 tolaasin peak들 대신 2개의 peak가 나타났다. 돌연변이체 분획에서 나타난 이들 2개의 peak는 야생형 균주의 분획에서 나타난 8개의 peak 어느 것과도 retention time이 일치하지 않았다(Fig. 2C).

WL⁻ 돌연변이체 6130균주의 분획에서 한 개의 tolaasin peak가 없어지는 대신 모든 peak가 없어진 것은 각각의 tolaasin이 유전자에 의해 coding되어 만들어지는 peptide가 아니고 non-ribosomal enzyme complex의 합성된다는 사실을 뒷받침해주며(20, 21), 따라서 돌연변이에 의한 non-ribosomal enzyme complex의 기능상실이 모든 종류의 tolaasin의 합성이 안되는 결과를 가져왔다고 생각된다. 돌연변이체의 배양여과액 분획에서 나타난 2개의 peak는 그 자체가 어떤 물질인지 앞으로 검토해 보아야 할 과제이다.

Tolaasin 생성 유전자 클로닝. Tolaasin을 생성하지 못하는 돌연변이체(Tol⁻)로부터 tolaasin생성에 관여 할 것으로 생각되는 Tn5 삽입 주변 DNA를 클로닝하기 위하여 Tol⁻ 균주 6009의 전체 DNA를 분리하고 pLAFR 3에 genomic library를 만들었다. 이 genomic library 각 클론을 가진 대장균중 kanamycin 저항성 균주를 선발하였으며, 그 균주로부터 분리된 플라스미드가 Tn5를 가지고 있는 것을 확인한 후 그 플라스미드를 pToltn5라 명명하였다. 몇 가지 제한효소로 pToltn5의 physical map을 작성한 결과 pToltn5는 Tn5를 포함하여 약 16.9 kb의 insert DNA를 가지고 있었다(Fig. 3). 이 플라스미드로부터 Tn5의 오른쪽에 있는 약 2.4 kb의 *Bam*HI DNA 절편을 pBluescript SKII(+)에 클로닝하였고

(pTol1), 이 DNA 절편을 *P. tolaasii*에 대한 특이성을 확인하기 위한 DNA-DNA hybridization에서 probe로 사용하였다.

클론된 DNA의 *P. tolaasii*에 대한 특이성. pTol1에

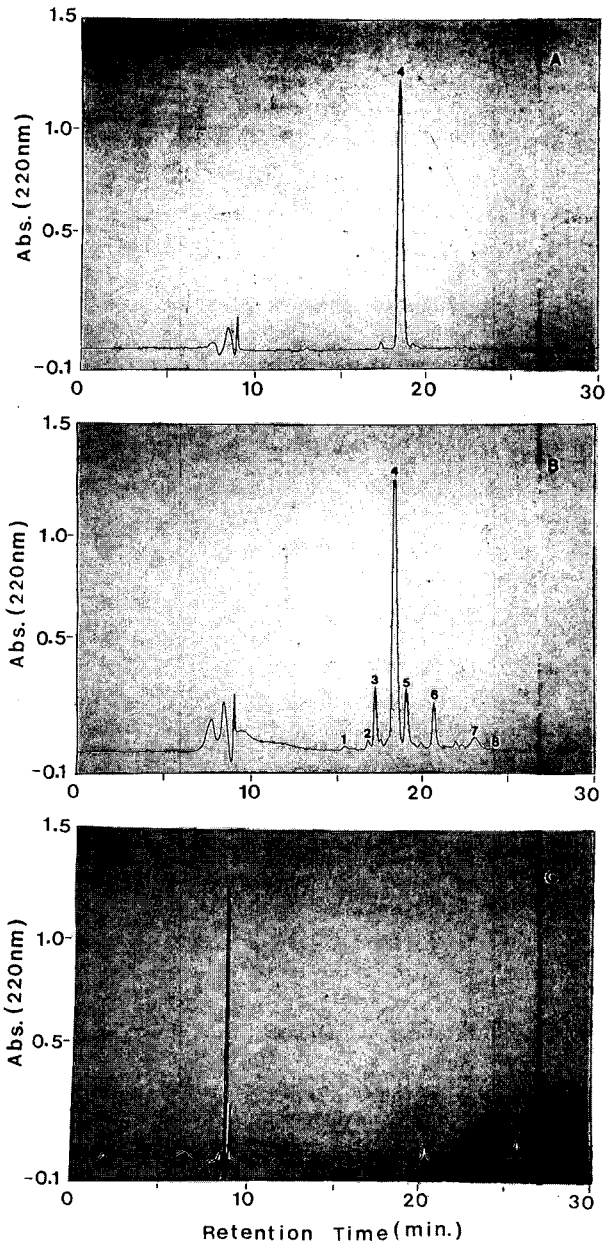


Fig. 2. HPLC chromatograms of tolaasin I from Dr. Shirata (A), tolaasins from *P. tolaasii* 6041R (B), and Tol⁻ 6130 (C). Peak 1~8 are tolaasin 1~8 based on Dr. Shirata's identification.

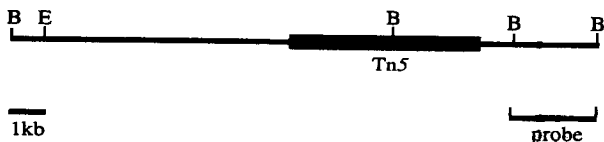


Fig. 3. Physical map of insert DNA of pToltn5.

클론된 DNA의 *P. tolaasii*에 대한 특이성을 확인하기 위하여 그 DNA를 probe로 하여 이미 동정된 *P. tolaasii*를 비롯하여 *P. agarici*, *P. gingeri*, WLROs, 그리고 느타리 버섯에서 분리된 형광성 *Pseudomonas*의 DNA와 DNA-DNA hybridization 실시하였다. 우리 나라에서 분리 동정된 세 균주(A, 6041, 6096)와 미국에서 분리된 두 균주(P3a, Pf29) 등 사용된 5개 균주의 *P. tolaasii*는 모두 같은 크기의 hybridization band를 가졌으나, 사용된 4개의 WLRO균주중 한 균주와 2개의 형광성 *Pseudomonas* 균주중 한 균주, 그리고 *P. agarici*에서는 어떠한 band도 나타나지 않았으며, 사용된 나머지 균주들도 *P. tolaasii*에 나타날 band와 크기 그리고 강도가 다른 band를 가졌

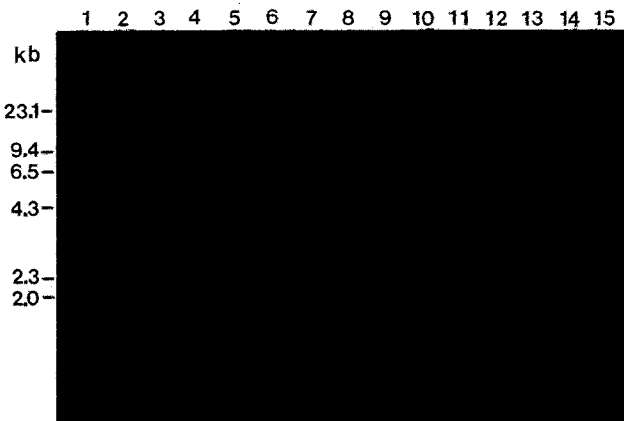


Fig. 4. Total DNA from *P. tolaasii* (lane 2-6; A, 6041, p3a, pf29, 6096), WLROs (lane 7~10; 502-3, 6679, D2, H3), *P. agarici* (lane 11; 7177), *P. gingeri* (lane 12~13; pf9, pf31), and fluorescent *Pseudomonads* (lane 14~15; 7023, 7053) was digested with *EcoRI* and *BamHI*, and hybridized with insert DNA of pTol1 as a probe.

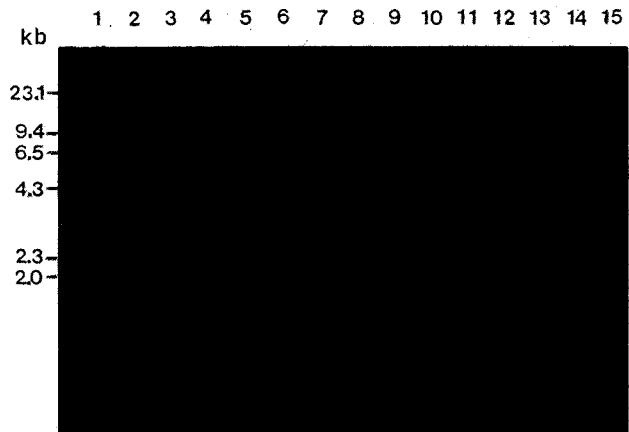


Fig. 5. Total DNA from *P. tolaasii* (lane 2; 6679) and other *Pseudomonads* (lane 3~15; *P. acidovorans*, *P. arvilla*, *P. diminuta*, *P. fluorescens* 7181, 7182, *P. fragi*, *P. maltophilia*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. taetrolens*, *P. testosteroni*) was digested with *EcoRI* and *BamHI*, and hybridized with insert DNA of pTol1 as a probe.

다(Fig. 4). 그리고 한국생명공학연구소에 부설된 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)로부터 분양 받은 13개의 *Pseudomonas*속 세균들의 DNA와 hybridization에서도 어떤 hybridization band도 나타나지 않았다(Fig. 5).

이러한 결과는 클론된 DNA가 일부 다른 세균에 hybridization되는 유사한 DNA가 존재함에도 불구하고 *P. tolaasii*에 특이적이며, RFLP pattern과 hybridization band의 색의 강도는 최소한 이 DNA절편의 염기서열이 *P. tolaasii*에 특이적임을 암시해 주고있다. 앞으로 이 DNA는 느타리버섯 갈색무늬병 병원세균인 *P. tolaasii*의 검출과 신속한 동정에 유용하게 사용될 것으로 생각된다.

요 약

느타리버섯 세균성갈색무늬병의 병원세균인 *Pseudomonas tolaasii*에 대한 특이적 분자marker를 얻기 위해 tolaasin 독소의 생성에 관여하는 DNA 절편을 클로닝하였다. Tolaasin은 lipodepsipeptide 독소로서 *P. tolaasii*의 병원성 결정인자로 알려져 있으며, 또한 *P. tolaasii*를 white line reacting organisms(WLROs)와 흰침강선 대치배양 하였을 때 흰침강선(white line) 형성에 관여하는 것으로도 알려져 있다. Rifampicin 저항성 *P. tolaasii* 균주를 pSUP2021::Tn5를 가지고 있는 대장균 균주와 접합을 통해 흰침강선을 형성하지 못하는 돌연변이체(WL⁻)를 유도하였다. WL⁻ 돌연변이체의 tolaasin 생성능력을 적혈구용혈검정과 병원성검정 그리고 배양여액의 HPLC분석에 의해 확인한 결과 모든 WL⁻ 돌연변이체들이 tolaasin 생성능력을 상실한 것(Tol⁻)으로 나타났다. Cosmid인 pLAFR3에 Tol⁻ 돌연변이체의 genomic library를 만들고, Tn5를 가지고 있는 클론을 선별하였다. 선별된 plasmid로부터 Tn5가 삽입된 주변의 DNA 절편을 클로닝하였고, *P. tolaasii*에 대한 특이성 확인을 위한 probe로 이용하였다. *P. tolaasii*와 생태적으로 유사한 WLROs와 형광성 *Pseudomonads* 그리고 *P. agarici*, *P. gingeri*와 여러 *Pseudomonas*속 세균들의 전체 DNA를 분리하여 DNA-DNA hybridization 결과 *P. tolaasii* 이외의 균주에서는 전혀 hybridization band가 나타나지 않거나 *P. tolaasii*의 band와는 다른 RFLP를 보여주었다. 본 연구에서 클로닝된 DNA절편과 그 염기서열은 *P. tolaasii*의 검출과 동정에 유용하게 사용될 것이다.

감사의 말씀

*P. tolaasii*와 WLROs 균주를 분양해주신 대구대학교 김종완 교수님과 미국 농무성 동부지역 연구소 J. M.

Wells 박사님, 충북지역 느타리재배 농가에서 시료채집에 도움을 주신 농촌진흥청 농업과학기술원 병리과 이승돈 연구사, 충북진흥원 장후봉 연구사, 그리고 적혈구용혈검정을 도와주신 충북대학교 농화학과 김영기교수님께 감사드립니다. 본 연구는 1996년도 학술진흥재단의 자유공모과제 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Bessette, A. E. 1984. Distribution of brown blotch bacteria in wild and cultivated species of Basidiomycetes. *Applied and Environmental Microbiol.* 48: 878-880.
- Bessette, A. E. 1985. Use of the mushroom tissue block rapid pitting test to detect brown blotch pathogens. *Applied and Environmental Microbiol.* 49: 999-1000.
- Bessette, A. E., Kerrigan, R. W. and Jordan, D. C. 1985. Yellow blotch of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiol.* 50: 1535-1537.
- Brodey, C. L., Rainey, P. B., Tester, M. and Johnstone, K. 1991. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Mol. Plant-Microbe Interaction* 1: 407-411.
- 차동열, 박정식, 유창현, 김광포, 전창성, 이두원. 1997. 느타리버섯 재배기술과 재배경영. 농민신문사. 374pp.
- Geijn, J. V. D. 1981. Bacterial diseases in practice. *Mushroom Journal* 102: 197-199.
- Gill, W. M. and Gole, A. L. J. 1991. Cavity disease of *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas cepacia*. *Can. J. Microbiol.* 38: 394-397
- Goor, M., Vantomme, R., Swings, J., Gillis, M., Kersters, K. and Deley, J. 1986. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *J. of General Microbiol.* 132: 2249-2264.
- Grewal, S. I. S., Han, B. and Johnstone, K. 1995. Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J. of Bacteriol.* 177: 4658-4668.
- Han, B., Pain, A., and Johnstone, K. 1997. Spontaneous duplication of a 661bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Molecular Microbiol.* 25: 211-218.
- 한국식물보호학회. 1986. 한국식물병·해충·잡초 명감. 한국식물보호학회. 633pp.
- 진경식, 김정준, 전항성, 이은중. 1994. 버섯 갈색무늬병 *Pseudomonas tolaasii*와 *Pseudomonas agarici*의 분리동정에 있어서 특성차이. 농업논문집 36: 343-348.
- 김종완, 권순익, 강희진. 1995. 인공 재배버섯에 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원세균에 관한 연구; 2. 버섯 세균성 갈색점무늬병의 병원세균 *Pseudomonas tolaasii*와 white line 형성균의 세균학적 특성. 한국식물병리학회지. 11: 353-360.
- 김종완, 김근희, 강희진. 1994. 인공 재배버섯에 질병을 일

- 으키는 *Pseudomonas*속 병원 세균에 관한 연구; 1. 인공 재배버섯의 부패 변성 원인세균에 대하여. 한국식물병리학회지. 10:197-210.
15. 이혁인, 이승돈, 박경선, 김영기, 차재순. 1997. 충청북도에서 분리한 느타리버섯 갈변병 병원세균의 병원성. 충북대학교 농업과학연구 14:121-132.
 16. Mortishire-Smith, R. J., Drake, A. F., Nutkins, J. C. and Williams, D. H. 1991. Left handed α -helix formation by bacterial peptide. *FEBS*. 278:244-246.
 17. Nair, N. G. and Fahy, P. C. 1973. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Aust. J. biol. Sci.* 26:509-512.
 18. Nutkins, J. C., Mortishire-Smith, R. J., Packman, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., Jonstone, K. and Williams, D. H. 1991. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Journal of American Chemical Society* 113:2621-2627.
 19. Rainey, P. B., Brodey, C. L. and Johnstone, K. 1991. Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:57-70.
 20. Rainey, P. B., Brodey, C. L. and Johnstone, K. 1992. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom. *Advances in Plant Pathology* 8:95-117.
 21. Rainey, P. B., Brodey, C. L., and Johnstone, K. 1993. Identification of a gene cluster encoding three high-molecular-weight proteins, which is required for synthesis of tolaasin by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Molecular Microbiol.* 8:643-652.
 22. Sambrook, J., Fritsh, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press.
 23. Schisler, L. C., Sinden, J. W. and Sigel, E. M. 1968. Etiology of mummy disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 58:944-948.
 24. 신관철, 전낙범. 1991. 느타리버섯 세균성갈변병의 병원균 분류 동정 및 생물학적 방제. 1991. 농시논문집 34:1-10.
 25. Shirata, A. 1996. Production of volatile components by *Pseudomonas tolaasii* and their toxic activity. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62:185-193.
 26. Shirata, A., Sugaya, K., Takasugi, M., and Monde, K. 1995. Isolation and biological activity of toxins produced by a Japanese strain of *Pseudomonas tolaasii* the pathogen of bacterial rot of cultivated oyster mushroom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61:493-502.
 27. Tolaas, A. G. 1915. A Bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5:51-54.
 28. Tsuneda, A., Suyama, K., Murakami, S., and Ohira, A. 1995. Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed Quercus logs. *Mycoscience* 36:283-288.
 29. Wells, J. M., Sapers, G. M., Fett, W. F., Butterfield, J. E., Jones, J. B., Bouzar, H., and Miller, F. C. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. 'reactans'*, and *P. 'gingeri'*. *Phytopathology* 86:1098-1104.
 30. 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*. *Journal of Applied Bacteriology* 52:43-48.
 31. Wong, W. C., and Preece, T. F. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *Journal of Applied Bacteriology* 47:401-407
 32. Young, J. M. 1970. Drippy gill: A bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici* n. sp. *New Zealand Journal Agricultural Research* 13:977-990.
 33. Zaayen, A. V., and Waterreus, H. A. J. I. 1974. Intracellular occurrence of bacteria in mummy-diseased mushrooms. *Phytopathology* 64:1474-1475.

(Received April 11, 1998)