

항 *Pseudomonas tolaasii* 및 *Pseudomonas agarici* 항체의 면역측정법을 위한 평가와 그 이용

전낙범 · 이향범¹ · 손동화² · 유승헌^{3*}

국립식물검역소 중부지소, ¹한국생명공학연구원 생물소재연구부, ²한국식품개발연구원,
³충남대학교 농업생명과학대학

Evaluation of the antibodies against *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas agarici* for Immunoassays and Its Application

Nak-Beom Jeon, Hyang Burm Lee¹, Dong-Hwa Shon² and Seung Hun Yu^{3*}

Jungbu Regional Office, National Plant Quarantine Service, Cheonan 330-953, Korea

¹Biomaterial Research Division, Korea Research Institute of Bioscreen and Biotechnology Daejeon 305-600, Korea

²Korea Food Research Institute, Seongnam 463-420, Korea

³College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received on May 22, 2003)

To produce antibodies against *Pseudomonas tolaasii* and *P. agarici*, lyophilized *P. tolaasii* and *P. agarici* (5×10^7 cfu/ml) and Freund's adjuvant were immunized into rabbits 4 times. The specificity and sensitivity of the antibodies were evaluated by immunodiffusion test and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (id ELISA). The α -*P. tolaasii* antibody was very specific only against *P. tolaasii*, while α -*P. agarici* antibody was not specific and showed a high cross reactivity toward *P. tolaasii* with detection limit concentration of 2×10^3 cfu/ml. However, the cross reactivities of α -*P. agarici* antibody toward the related species including *P. reactans* were very low. Our results showed that α -*P. tolaasii* and α -*P. agarici* antibodies against *P. tolaasii* and *P. agarici*, respectively, might be useful for rapid and simple detection of the causal agents of bacterial brown and yellow blotches in cultivated oyster mushrooms.

Keywords : Antibody, ELISA, oyster mushroom, *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas agarici*

*Pseudomonas tolaasii*와 *P. agarici*는 느타리버섯을 비롯하여 양송이, 표고버섯 등 생육중인 버섯에 주로 갈색부패를 일으키고 또한 저장중인 버섯에도 썩음병을 일으켜 큰 피해를 주며(김 등, 1994; 陶山와 藤井, 1993; Tolaas, 1915; Wells 등 1996), 여러 나라에서 버섯재배의 성패를 좌우하는 중요한 병원세균으로 보고 되어왔다(Geels 등, 1993; 小松와 後藤, 1974; Paine, 1919; Wong과 Preece, 1979). 재배사에서 이들 병원세균의 전파속도는 매우 빠르기 때문에 그 피해가 빠르게 확산되는데, 특히 느타리버섯에서 *P. tolaasii*의 피해가 심하다(차 등, 1997; 전과 차, 1998). 본 병은 원기의 형성을 감소시키고, 자실체의

발달을 급격하게 저하시킬 뿐 아니라, 병이 급진전 되면 이를 차단하기가 매우 어려워 버섯 재배 농가의 경제적 손실이 크다.

*P. tolaasii*에 의한 초기 병징은 버섯 갓의 표면에 황갈색의 점무늬가 생기고 점차 진한 갈색의 불규칙한 큰 병반으로 확대된다. 발병이 심하면 버섯의 표면은 점액성을 띠고 부패하며 어린 자실체 전체가 갈변하며 부패한다. 한편, *P. agarici*에 의한 병징은 감염초기에 자실체 표면이 노란 유액의 형성으로 버섯이 위축, 변색되면서 기저 부위가 시들고, 발아초기에 발병이 심하면 자실체는 발육하지 못하고 황-갈변하는 부패증상으로 나타난다(Bessette 등, 1985; 신과 전, 1991).

정확한 병의 진단은 병원균의 분리, 세균학적 성질 조사 및 병원성 검정 등에 기초를 두면서 행하여지기 때문에 많은 노력과 시간이 소요된다. 따라서 재배사에서 병

*Corresponding author

Phone)+82-42-821-5762, Fax)+82-42-823-8679

E-mail)shunyu@cnu.ac.kr

원세균의 오염부위를 신속하게 확인할 수 있는 진단법의 개발은 병의 예방 및 방제에 절대적으로 필요하다. 한편 *P. tolaasii*는 *Pseudomonas*속 세균중에서 *P. reactans*(WLRO : white line reacting organism)균주와 PAF(*Pseudomonas* agar F)배지에 대치배양 할 경우 그 중앙부위에 흰 침강선(white line)을 형성하는 특징이 있는데, 이 침강선은 특이성이 높아 *P. tolaasii*의 신속한 간이검정법으로 자주 이용되어 왔다(Wong과 Preece, 1979).

본 연구는 느타리버섯의 세균병을 일으키는 *P. tolaasii*와 *P. agarici*를 면역원으로하여 특이적인 항체를 생산하고, 이를 이용하여 면역확산법으로 항체의 특성을 구명함과 동시에 자실체내 병원세균의 오염여부를 신속히 검출할 수 있는 ELISA법을 개발하고 그 활용 가능성을 조사하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

실험균주. 느타리버섯의 병든 자실체로부터 희석평판법으로 순수분리하여 동정된 세균성 갈색무늬병균 *Pseudomonas tolaasii*(CNU 0151)와 *P. agarici*(ATCC25941) 균체를 각각 항 *P. tolaasii* 항체(α -*P. tolaasii*항체) 및 항 *P. agarici* 항체(α -*P. agarici* 항체)의 생산을 위한 면역원으로 사용하였으며 효소면역측정법(ELISA)의 교차반응에 사용된 균주는 Table 1과 같다.

면역원 준비. *P. tolaasii*와 *P. agarici*를 *Pseudomonas* agar F(PAF; Bacto-tryptone 10 g, Bacto-proteose peptone 10 g, dipotassium phosphate 1.5 g, magnesium sulphate 1.5 g, agar 15 g, glycerol 10 ml/l) 배지가 들어있는 삼각 플라스크에 접종한 후 25°C에서 100 rpm으로 24시간 진탕하여 배양한 다음 원심분리(5,000 rpm, 10분)하여 균체를 회수하였다. 세포를 10⁸ cfu/ml로 조정하여 60°C에서 30분간 열처리 한 후 다시 원심분리 하여 회수된 세포를 -65°C의 deep freezer에 넣고 하룻밤 방치한 다음, -50°C에서 24시간 동결건조 시켰다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species	Isolate no.	Host
<i>Pseudomonas agarici</i>	ATCC 25941	Mushroom
<i>P. reactans</i> (WLRO)	CNU 0201	Oyster mushroom
<i>P. tolaasii</i>	CNU 0151	"
<i>Pseudomonas</i> sp.	CNU 0165	"
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CNU 0045	Tomato
<i>Ewinia chrysanthemi</i>	CNU 0065	Chrysanthemum
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	KCTC 2499	Citrus

항체의 생산. 동결건조 된 세균 균체를 phosphate buffered saline(PBS; 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)에 현탁 시켜 Freund's complete adjuvant로 동량비(1:1, v/v) 유탁액을 만들어 체중 2.5 kg의 수컷 뉴질랜드 흰 토끼의 뒷발바닥에 피하주사로 1차 면역하였고, 2차 면역부터는 토끼의 등에 피하주사 하였다. 그 후 2주일 간격으로 Freund's incomplete adjuvant로 동량비의 유탁액을 만들어 4차 면역을 실시하였고 최종 면역 1주일 후에 각각 귀의 정맥으로부터 채혈하였다. 채혈 후 3시간 동안 실온에 방치하여 혈액이 응고된 다음 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 얻은 항혈청을 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

면역확산(Immunodiffusion)법. 토끼에 4차례 면역 후 얻은 항-*P. agarici* 항혈청으로부터 다중클론 항체를 분리하고 그 특이성을 측정하기 위하여 면역확산법을 실시하였다. 검정용 배지는 PBS 완충액에 1.2% 한천과 3% polyethylene glycol 4000을 첨가하여 멸균한 후 샐레에 부어 조제하였다. 그다음 배지에 cork borer를 이용하여 구멍을 뚫고 중앙의 구멍(5 mm)에 항혈청을 채우고 3~5 mm의 간격을 두고 주변 구멍에 검정균인 *P. tolaasii*, *P. reactans*(WLRO), *P. agarici* 및 형광성의 *Pseudomonas* sp.를 washing buffer(PBS 완충액 + 0.05% tween 20)로 현탁한 세균현탁액 및 병든 버섯의 추출용액을 넣어 실온에 12시간 이상 방치한 후 항체와의 대치구간에서 형성되는 침강선을 관찰하였다.

비경합 간접 ELISA(Noncompetitive indirect ELISA)법. Coating buffer(0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)를 이용하여 *P. agarici*와 *P. tolaasii*를 10⁷ cfu/ml(A600 nm = 0.1)에서 10² cfu/ml까지 각 밀도별로 현탁한 후 microplate (Nunc Co, #446612)의 well에 100 μ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하여 세균을 흡착시킨 다음 washing buffer로 well을 3회 세척한 후 α -*P. agarici*, α -*P. tolaasii* 항체를 100 μ l씩 넣고 실온에서 항원-항체를 반응시켰다. 1시간 반응시킨 후 well을 washing buffer로 세척하고, 이어서 α -토끼항체-효소접합체(anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate)를 washing buffer로 1/15,000배 희석하여 well 당 100 μ l씩 넣고 1시간 반응시켰다. 다시 washing buffer로 세척하고 기질용액[0.05 M phosphate citrate buffer (Sigma Co, P-4560)에 TMB(ethanol에 녹임)를 0.01% 되도록 첨가하고, 사용 전 H₂O₂를 최종농도 0.02%가 되도록 첨가]을 well당 100 μ l씩 넣어 30분간 발색시킨 다음, 50 μ l의 반응정지액(2 M H₂SO₄)을 첨가하고 microplate reader(Molecular Deviec Co, THERMOMax™) 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

한편 버섯으로부터 직접 병원세균의 오염여부를 신속

하게 조사하기 위하여 채집한 자실체를 washing buffer(0.2 g/ μ l)에 세척한 다음 세척액을 비경합 간접 ELISA법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

면역확산법에 의한 조사. α -*P. tolaasii* 항혈청과 검정균의 대치구간 사이에 형성된 침강선을 조사한 결과, *P. tolaasii*의 대치구간에서만 침강선이 형성되었고 *P. agarici* 등 다른 균의 처리구에서는 침강선이 형성되지 않아 *P. tolaasii*만을 인식하는 특이적 항체가 생성되었음을 확인하였다. 한편 10^7 cfu/ml에서 10^2 cfu/ml까지 각 밀도별 희석된 *P. tolaasii*의 현탁액 중 10^7 cfu/ml 이상의 밀도처리구에서 침강선이 형성되었을 뿐 10^7 cfu/ml 이하의 처리구에서는 며칠간 보존하여도 침강선이 확인되지 않았다. 이와 반대로 중앙에 10^7 cfu/ml 밀도의 *P. tolaasii* 현탁액을 넣고 주변에는 α -*P. tolaasii* 항혈청을 1/10~1/10,000로 희석하여 넣은 다음 희석된 항혈청과 침강선 형성유무를 조사한 결과, 항혈청을 희석하지 않은 처리구에서는 선명한 침강선이 형성되었으나 10배 희석 시 극히 미약하였고, 100배 이상 희석 시 침강선이 형성되지 않았다. 한편 α -*P. agarici* 항혈청은 *P. agarici* 뿐 아니라 *P. tolaasii*, *P. reactans* 등 다른 유사 속 세균과도 침강선을 형성하지 않는 특징을 보였다.

항체의 역가 검정. 항체는 2차 면역 후 잘 생산되기 시작하였으며 면역횟수가 더해 감에 따라 항체역가도 증가하였고, 4차 면역 후 높은 항체 역가를 보였다. 비경합 간접 ELISA를 행하기 위하여 α -*P. tolaasii*, α -*P. agarici* 항체와 항토끼 항체-효소 접합체의 희석배율의 최적조건을 조사한 결과, α -*P. tolaasii* 항체가 10,000배 희석되었을 때 항토끼 항체-효소 접합체가 2,000~20,000배로 희석된 경우 높은 발색치를 나타내어 항원-항체반응이 잘 일어난다는 것을 확인하였다. 반면 20,000배 이상으로 희석되었을 경우 발색치가 낮아져 그 이상의 희석농도는 항원-항체반응의 최적 희석배율로 적합하지 못하였다.

비록, 항토끼 항체-효소 접합체가 5,000~10,000배 희석되었을 때 가장 높은 발색치를 보였지만 실제로 *P. tolaasii*를 각 밀도별로 현탁하여 검출반응을 분석하였던 바, α -*P. tolaasii* 항체는 10,000배, α -토끼 항체-효소 접합체는 15,000배가 이상적이었다. 반면 *P. agarici*의 검출을 위한 α -*P. agarici* 항체의 희석배율은 8,000배, α -토끼 항체-효소 접합체는 15,000배로 사용할 경우 안정적인 반응곡선을 나타내었다.

Norman과 Alvarez(1994)는 *Xanthomonas*속 균에 대한 단

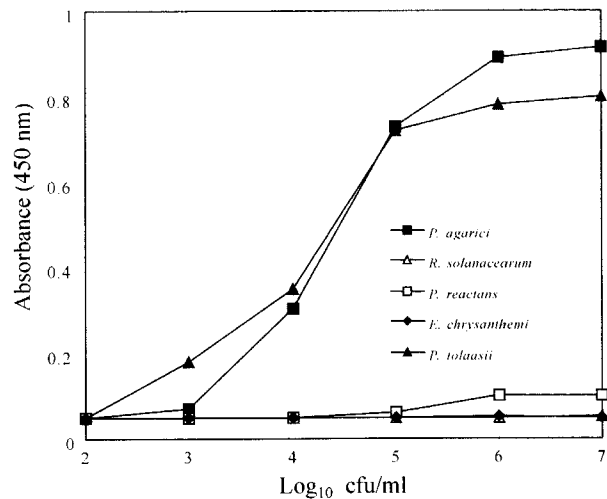


Fig. 1. Standard curves of non-competitive indirect ELISA for *Pseudomonas agarici*, *P. tolaasii*, *P. reactans*, *Erwinia chrysanthemi* and *Ralstonia solanacearum*, using α -*P. agarici* antibody. Wells of microplate were coated with each strain as a solid antigen.

클론 항체를 생산하였는데 이 항체는 1,000배로 희석하여 사용하였을 때 높은 검출반응을 나타낸다고 보고한 바 있다. 또한 Alvarez 등(1995)은 *Xanthomonas*의 동정과 *X. campestris* pv. *campestris* 균주의 grouping을 위하여 생산한 13개의 단클론 항체를 1,000배로 희석하여 사용하였다. 따라서 비록 균주 분석조건 등이 다르지만 본 연구에서 생산한 α -*P. tolaasii*, α -*P. agarici* 항체는 비교적 높은 역가를 보여 검출 시에 유용함을 나타냈다.

비경합 간접 ELISA의 표준곡선. α -*P. agarici* 항체의 *P. agarici*에 대한 반응감도와 다른 세균에 대한 교차반응을 비경합 간접 ELISA법으로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. *P. agarici*의 밀도가 높을수록 발색치가 높게 나타나는 반응성을 보였는데 검출한계는 4×10^3 cfu/ml로 α -*P. tolaasii*항체보다 약 10배 낮은 반응성을 보였다.

Rowhani 등(1994)과 Opgenorth 등(1996)은 *Xanthomonas fragariae*에 대한 다중클론 항체를 이용하여 본 균을 검출하고자 할 때 각각 음성흡광도의 3.5, 2배의 밀도를 안정적인 검출한계로 보았다. Irey와 Comstock(1991)은 사탕수수의 leaf scald을 일으키는 *X. albilineans*의 검출시 배양된 콜로니의 경우 2×10^5 cfu/ml의 농도에서 검출이 가능하였고, Alvarez와 Lou(1982)은 10^4 ~ 10^5 cfu/ml 밀도는 되어야 *X. campestris*를 검출할 수 있다고 하였다. 항-*P. agarici*항체를 이용한 *P. agarici*의 검출한계는 음성대조구(0.05)의 2배의 흡광도를 나타내는 밀도인 4×10^3 cfu/ml이었고, 전체적으로는 10^4 cfu/ml 이상의 밀도에서 안정적인 검출이 가능하여 α -*P. agarici* 항체는 이들의 항체보

다 최소 10배, 최대 100배 높은 검출감도를 보였다.

한편, α -*P. agarici* 항체는 *P. tolaasii*에 대하여 강한 교차반응을 나타내었고, *P. reactans*에 대해서는 10^5 cfu/ml 밀도까지는 반응성이 음성대조구와 유사하였으나 10^6 cfu/ml 이상의 농도에서는 반응이 미약하였다. 그러나 *Erwinia chrysanthemi*, *Ralstonia solanacearum*과 같은 다른 속 세균에 전혀 반응하지 않았다. 이는 *P. agarici*가 갖는 반응성에 비해 1,000배 이하로 낮기 때문에 검출감도의 면에서 *P. tolaasii*를 제외한 일부의 유사세균 군과 다른 속 세균에 대하여 특이성이 존재함을 짐작할 수 있었다. α -*P. agarici* 항체를 이용하여 균을 검출하고자 할 때 교차반응이 심한 *P. tolaasii*를 제외한 다른 세균의 흡광도는 *P. agarici*가 갖는 흡광도에 비하면 극히 낮기 때문에 콜로니 상태로 균을 검정하는데 유용할 것으로 판단되었다.

*P. tolaasii*에 대하여 교차반응을 보인 α -*P. agarici* 항체의 특이성이 낮은 이유로는 항원으로 사용된 *P. agarici*도 *Pseudomonas*속 세균이 갖는 공통 항원부위를 가지고 있지만 한편으로는 관련 유사세균 속과는 다른 표면구조를 갖고 있어서 이들에 대해 교차반응을 나타내지 못하였으나, 이 독특한 표면구조가 *P. agarici*뿐 아니라 *P. tolaasii*와도 결합할 수 있는 특징을 나타내는 것으로 판단되었다.

버섯으로부터 *P. tolaasii* 및 *P. agarici*의 검출. 충남

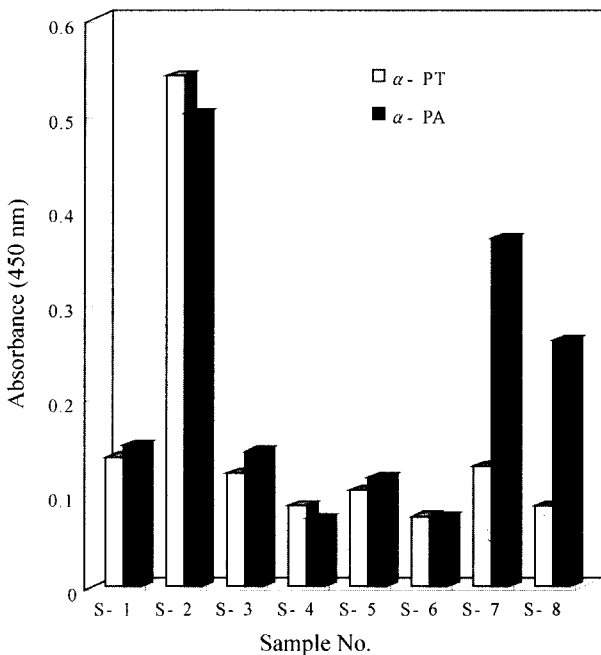


Fig. 2. Detection of *Pseudomonas tolaasii* and *P. agarici* by non-competitive indirect ELISA using α -*P. tolaasii* and α -*P. agarici* antibody from diseased fruit bodies of oyster mushroom collected from Duksan (S-1, S-2, S-3), Taean (S-4, S-5, S-6) and Annam (S-7, S-8) districts in Chungnam province.

의 덕산, 태안 및 안남 지역의 느타리버섯 재배지에서 채집한 갈변된 자실체를 세척하여 *P. tolaasii* 및 *P. agarici*의 오염여부를 비경합 간접 ELISA법으로 조사한 결과는 Fig. 2와 같다(data 일부 생략). 우선 α -*P. tolaasii* 항체를 이용한 ELISA법으로 검정한 결과, 덕산에서 채집한 느타리버섯 자실체중 갈변병의 전형적인 갈색반점을 갖는 S-2 자실체의 처리구에서 높은 흡광도가 나타나 *P. tolaasii*가 감염되어 있음을 간이진단 할 수 있었다.

일부 어린 자실체 처리구에서는 *P. tolaasii*에 오염된 것보다는 낮은 발색이지만 양성반응으로 인식할 수 있을 정도의 흡광도($A_{450} \approx 0.3$)를 나타내 병원균이 오염되어 있지 않음에도 오염된 것으로 잘못 진단할 수 있으나 음성대조구 2배 이상을 나타내는 밀도를 최소 검출 시점으로 보았을 때, 최소 1.5 이하의 흡광도를 나타내는 반응구는 *P. tolaasii*가 오염되어 있지 않은 것으로 판단되었다. α -*P. tolaasii* 항체와 결합력이 낮아 발색치가 높지 않은 S-2이외의 자실체는 *P. tolaasii*가 오염되어 있지 않고 다른 요인에 의하여 갈변된 것으로 분석되었다. 또한 α -*P. agarici* 항체와 반응시켜 *P. agarici*의 오염도를 조사하였던 바, S-2 처리구에서 *P. tolaasii*와 결합이 잘 이루어져 발색이 높게 나타나는 반응성을 확인할 수 있었으며, 결국 이러한 반응이 α -*P. agarici* 항체와 *P. tolaasii*간의 심한 교차 반응을 뒷받침 하였다. S-7과 S-8 처리구에서 발색치가 높게 나타나 이 버섯들이 *P. agarici*에 오염되어 있음을 간이 진단할 수 있었다(Fig. 2).

Rowhani 등(1994)에 의하면 병의 정확한 진단은 병원균의 분리, 병원성 검정 등에 기초를 두면서 실행되기 때문에 병원균을 순수분리 하여 배양하기까지 번거로움이 많고 또한 병원성 검정은 신뢰성은 높지만 시간과 절차가 많이 요구되므로, 이러한 문제점을 감안하였을 때 병징 발달의 초기단계에서 유용한 진단도구가 될 수 있다는 점이 무엇보다 중요하다고 하였다.

Alvarez와 Lou(1982)는 이중항체법을 개발하여 직접 재배사의 오염된 양배추 잎으로부터 10^6 세포/ml 밀도수준으로 존재하는 *X. campestris* pv. *campestris*를 검출하였으며 합성배지에서 4~5일 소요되는 검출시간을 5시간으로 줄일 수 있었다고 하였고, 본 실험에서도 α -*P. tolaasii* 및 α -*P. agarici*를 이용한 면역측정법은 균을 배양하지 않고 버섯으로부터 직접 병원세균의 오염여부를 3~4시간 이내에 판정할 수 있어서 신속한 검출법임을 확인하였다. 재배사에서 두 병원세균에 대한 ELISA의 검출감도와 진단한계를 높인다면 유용한 진단법으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다. α -*P. agarici* 항체의 *P. tolaasii*에 대한 교차반응성 때문에 *P. agarici* 검출시 2차적인 실험이 요구

되는 번거로움이 단점으로 지적되었으나 두 균의 오염을 동시에 확인할 수 있는 측면에서 추후 α -*P. agarici* 항체의 이용성에 대하여 더 많은 연구가 요구된다.

요 약

느타리버섯에 발생하여 갈색부패병을 일으키는 *P. tolaasii* 및 *P. agarici*를 면역화학적 방법으로 신속하게 검출하기 위한 항체를 생산하였고 면역확산법과 ELISA로 본 항체의 특이성을 조사하였다. α -*P. tolaasii* 항체는 *P. tolaasii*와 반응하여 선명한 침강선을 형성하였으나 다른 유사세균에 대하여는 침강선을 형성하지 않아 *P. tolaasii*에 대하여만 특이적으로 반응하는 항체임을 알 수 있었다. 한편 α -*P. agarici* 항체는 *P. agarici* 뿐만 아니라 다른 세균에 대해서도 침강선을 형성하지 않는 특징을 나타내었다. 비경합 간접 ELISA의 표준곡선으로부터 *P. agarici*의 검출에 대하여 최고 발색치의 50% 값을 나타내는 균의 밀도는 2×10^4 cfu/ml로 나타났으며, 검출한계농도는 2×10^3 cfu/ml이었다. α -*P. agarici* 항체는 *P. tolaasii*에 대하여 높은 교차반응을 보였으나 다른 속 세균에 대하여는 반응을 나타내지 않아 *P. agarici* 뿐만 아니라 *P. tolaasii*의 특이적인 검출에도 효과를 나타냈다. α -*P. tolaasii*, α -*P. agarici* 항체를 이용하여 확립한 ELISA법은 직접 균체나 버섯 자실체내 *P. tolaasii*와 *P. agarici*의 신속한 검출을 가능하게 하였고, *P. tolaasii*와 *P. agarici*에 오염된 시료를 간단하게 진단하는데 아주 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

참고문헌

- Alvarez, A. M. and Lou, K. 1982. Rapid field identification of a bacterial pathogen by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathology* (Abstr.) 72(7): 947.
- Alvarez, A. M., Benedict, A. A. and Mizumoto, C. Y. 1995. Identification of *Xanthomonas* and grouping of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with monoclonal antibodies. *Phytopathology* 75(6): 722-728.
- Bessette, A. E., Kerrigan, R. W. and Jordan, D. C. 1995. Yellow blotch of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Micro.* 50(6): 1535-1537.
- 차동열, 박정식, 유창현, 김광포, 전창성, 이두원. 1997. 느타리

- 버섯 재배기술과 경영. 신농민 강좌시리즈 26. 농민신문사. pp. 375.
- 전창성, 차동열. 1988. 느타리버섯 병해발생조사. 농업기술연구소 시험연구보고서 생물부편 794-800.
- Geels, F. P., Heslen, L. P. W. and Van Griensven, L. J. L. D. 1993. Brown discoloration of mushrooms caused by *Pseudomonas agarici*. *Phytopathology* 140(3): 249-259.
- Irey, M. S. and Comstock, J. C. 1991. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, in sugarcane. *J. Am. Soc. Sugarcan Technol.* 11: 48-52.
- 김종완, 김근희, 강희진. 1994. 인공 재배버섯에 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원 세균에 관한 연구-1. 인공재배버섯의 부패 변성 원인 세균에 대하여. *한국식물병리학회지* 10(3): 197-210.
- 小松光雄 · 後藤正夫. 1974. シイタケの細菌病について 菌叢研報 11: 69-82.
- Norman, D. J. and Alvarez, A. M. 1994. Rapid detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachias* in *Anthurium* plants with a miniplate enrichment/ELISA system. *Plant Disease* 78(10): 954-958.
- Opgenorth, D. C., Smart, C. D., Louws, F. J. and Kirkpatrick, B. C. 1996. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease* 80: 868-873.
- Paine, S. G. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Ann. Appl. Biol.* 5: 206-219.
- Rowhani, A., Feliciano, A. J., Lips, T. and Gubler, W. D. 1994. Rapid identification of *Xanthomonas fragariae* in infected strawberry leaves by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease* 78: 248-250.
- 신관철, 전낙범. 1991. 느타리버섯 세균성갈반병의 병원균 분류 동정 및 생물학적 방제. *농시 논문집* 34: 1-10.
- Tolaas, A. G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5: 51-54.
- 陶山一雄, 藤井薄. 1993.キノコに發生した細菌病. 東農大農學集報. 38(2): 35-50.
- Wells, J. M., Spapers, G. M., Felt, 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.
- Wong, W. C. and Preece, T. F. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*; the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 401-407.