

느타리 갓 표면의 소수성이 세균갈색무늬병 발병도에 미치는 영향

이기영¹ · 양승업¹ · 한종우¹ · 윤건식¹ · 장후봉² · 차재순^{1*}

¹충북대학교 식물의학과, ²충북농업기술원

Effect of Hydrophobicity of Oyster Mushroom on the Severity of Brown Blotch

Ki Young Lee¹, Seung Up Yang¹, Jong Woo Han¹, Kun Sik Yoon¹, Hoo Bong Jang² and Jae-Soon Cha^{1*}

Department of Agricultural Biology, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763, Republic of Korea
¹Chungbuk Agricultural Research & Extension services, Ochang, 363-883, Republic of Korea

(Received April 17, 2010. Accepted May 7, 2010)

ABSTRACT: The 2 strains of *Pleurotus ostreatus* showing very severe and mild symptom of brown blotch were selected, and their F1 hybrid strains were made by mating of their single spore isolates. Hydrophobicity of fruiting body surface and brown blotch severity of the parental and their 11 F1 hybrid strains showing different level of severity of brown blotch were determined. Correlation coefficient (R) between disease severity and hydrophobicity were 0.68 and 0.70 on two independent experiments. Correlation coefficient between disease severity and disease incidence that was determined in the oyster mushroom farm were 0.46 and 0.52 on two independent experiments. When GFP-tagged *Pseudomonas tolaasii* was monitored with confocal microscope on cap surface of fruiting body, more cells of the pathogen were clustered on the severe strain than the mild strain, which indicates that the bacterial pathogen proliferates more on the severe strain. These results suggest that hydrophobicity of oyster mushroom fruiting body affects disease severity of the brown blotch disease; the longer the bacterial suspension stays on fruiting body surface more severe symptom of the blotch develops.

KEYWORDS : Bacterial brown blotch, Confocal microscope, Disease severity, Hydrophobicity, *Pseudomonas tolaasii*

느타리는 우리나라에서 인공재배에 의해 생산되고 소비되는 중요한 버섯 중 하나이다(차 등, 1997; 주 등, 2008). 이러한 느타리를 재배하는 과정에서 여러 가지 병이 발생하는데, 그 중에서 피해가 심한 병이 세균갈색무늬병(brown blotch)이다(신과 전, 1991; 김 등, 1994). 느타리에 발생하는 세균갈색무늬병은 병 발생의 예측이 매우 어렵고 한 번 병이 발생하면 재배사 전체로 급격하게 전염되어 매우 심각한 피해를 가져온다(신과 전, 1991; 김 등, 1994; 차 등, 1997).

느타리 세균갈색무늬병의 병징으로는 발병 초기에는 갓의 일부가 물에 젖은 것 같은 작은 수침상 병반이 나오거나 갈색 반점이 생기고, 며칠이 지나면 갈색반점이 커지고 버섯 갓 전체를 갈색으로 변화시키거나 움푹해지며, 점액성 물질이 덮이고 생선 비린내가 난다(김 등, 1994; 이, 1999). 어떤 경우에는 버섯 발생 초기에 버섯 다발 전체가 엷은 노란색으로 변하고 생장이 멈추면서 썩기도 하고, 어린 버섯이 투명한 점액질 물질로 완전히 뒤덮여 썩기도 한다. 느타리를 재배하는 균사에서 심하게 발생될 때는 균상 표면이 진한 갈색으로 변하면서 버섯이 발생하지 않게 된다(진 등, 1994; 조 등 1999).

느타리에서 세균갈색무늬병을 일으키는 병원균은 *Pseudomonas*

*tolasii*와 *Pseudomonas agarici*로 보고되었는데, *P. tolaasii*가 주된 병원균으로 알려져 있다(김 등, 1994; 신과 전, 1991; 진 등, 1994). *P. tolaasii*는 편모를 가지고 있으며 그람음성의 짧은 간균이고, 아포와 피막을 형성하지 않으며 1~3개의 운동성 극모를 가진 형광을 띤 호기성 세균이다(김 등, 1994; 조 등 1999). 이 세균은 4°C의 낮은 온도에서도 잘 자라는 저온성 세균으로(Munsch *et al.*, 1991), 병원성 인자로 독소인 tolaasin을 생성하며, 이 tolaasin은 세포막에 구멍을 형성하여 기주세포를 파괴하는 것으로 보고되었다(Nair *et al.*, 1973; Brodey *et al.*, 1991; Nutkins *et al.*, 1991; Rainey *et al.*, 1991; Rainey *et al.*, 1993; Grewal *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1998). 또한 이 세균은 느타리뿐만 아니라 양송이, 팽이, 새송이, 표고 등 거의 모든 재배버섯에서 병을 일으킨다(Shirata *et al.*, 1995; Tsuneda *et al.*, 1995; Wells *et al.*, 1996).

느타리에서 세균갈색무늬병의 발생이 매우 흔하고 그 피해도 심하지만 아직까지 양송이뿐만 아니라 느타리에서 이 병에 대한 저항성 균주는 알려져 있지 않다. 또한 느타리 균주별로 세균갈색무늬병의 발생에 차이가 있는 것으로 알려져 있지만 균주의 어떤 특성이 세균갈색무늬병의 발생에 영향을 미치는지 밝혀져 있지 않다. 그런데 버섯 갓 위에서 세균의 증식에 가장 중요한 요인은 버섯 갓 위의 유리 수분으로 알

*Corresponding author <E-mail : jscha@cbnu.ac.kr>

려져 있다. 버섯 갓 표면에 충분한 수분이 있으면 병원세균의 밀도가 급속히 증가한다(Munsch *et al.*, 1991; Soler-Rivas, 1999). 버섯 갓 표면의 유리 수분은 버섯 재배 온도, 공기 중의 습도, 관수정도, 환기량 등에 의하여 결정되어진다. 느타리 세균갈색무늬병은 봄·가을 재배보다는 여름·겨울 재배에서 병 발생이 많은데, 이것은 *P. tolaasii*가 저온성 세균인 점과 함께 재배사의 안과 밖의 온도 차이에 의해 버섯 갓 위에 응결수가 쉽게 생기기 때문으로 생각된다(조 등, 1999; 주 등, 2008). 이러한 결과들은 느타리 자실체 표면에서 수분 유지가 세균갈색무늬병 발생에 영향을 미칠수 있음을 암시하고 있다.

따라서 본 연구에서는 느타리 자실체 표면의 소수성이 세균갈색무늬병 발생에 미치는 영향을 조사하였다. 세균갈색무늬병의 발생이 적은 느타리 균주와 발생이 심한 균주를 모균주로 사용하여, 이들의 단포자 분리균주의 교배를 통해 자손을 만들었고, 병원세균의 인공접종을 통해 병반 형성 장도가 차이는 균주를 선발하였다. 이렇게 선발된 균주들과 모균주의 자실체 표면의 물방울 맺힘과 유지정도를 세균갈색무늬병 발병도(disease severity)와 비교하여 느타리 자실체 갓 표면의 특성과 발병도와의 관계를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 느타리 균주 교배

국내에서 재배되는 느타리 약 30여 품종을 국립원예과학원 버섯과에서 분양받아 봉지재배를 통해 자실체를 얻은 후, 각 품종의 느타리 자실체에 병원세균 *Pseudomonas tolaasii* 6041 현탁액을 접종하였다. 가장 약한 병징이 나타난 사철느타리2호 (*Pleurotus florida* ASI 2181)와 가장 심한 병징을 형성하는 신농 (*Pleurotus ostreatus* ASI 2549)을 각각 모균주로 선발하였다. 이 두 균주의 자실체로부터 단포자를 분리하여 균사를 얻은 후 각 균사의 격쇠연결체(clamp connection)를 조사하여 단핵균사를 얻었다.

ASI 2181로부터 89개의 단핵 균주를 분리하였고, ASI 2549에서는 119개의 단핵 균주를 분리하였으며 이들을 MEA에 대치 배양하여 균사융합을 유도하였다. 균사융합 여부는 DAPI 염색을 통한 격쇠연결체 조사를 통해 격쇠연결체가 형성된 643개의 이핵 교배균주를 얻었다.

2. F1 교배 균주의 선발

총 643개의 F1세대 교배균주로부터 자실체를 얻어 병원세균 *P. tolaasii* 6041의 현탁액을 접종하여 발병도를 조사하였다. 발병도가 다른 11개의 균주를 선발하여 본 연구에 사용하였다. 교배 모균주를 포함한 각 균주를 톱밥 병배지에 접종하여 28°C 배양기에서 약 한 달간 배양한 뒤, 4°C에서 48시간 두어 저온처리 하였다. 저온처리 한 균주는 15°C의 버섯재배사로 옮겨 자실체를 얻은 후, 병원균의 접종실험에 사용하였다.

3. 느타리 자실체 갓에서의 소수성 조사

느타리 자실체 갓 표면의 소수성은 물방울 맺힘 정도로 조사하였다. 실험에 사용할 느타리 자실체를 재배사에서 얻어 버섯 갓만 남게 잘라낸 후, *P. tolaasii* 6041의 세균 농도를 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml로 조절하여 느타리 자실체 갓 위에 3 μ l씩 두 곳의 다른 위치에 접종하였다. 자실체 표면에 접종한 세균현탁액이 방울을 형성하고 30초 이상 유지되면 3, 물방울이 유지되지 않고 퍼지면 2, 접종한 세균현탁액이 버섯 갓에 곧바로 완전히 스며들면 1로 조사하였다. 소수성 판정 실험에는 3개의 자실체를 사용하였고, 3번의 독립적 접종 실험을 하였다. 반복 처리별 관측값은 분산분석 (ANOVA) 과 Duncan 다중검정을 하여 처리 평균 간의 차이를 비교하였다.

4. 발병도 조사

느타리 모균주와 선발한 11개의 F1 교배 균주를 톱밥배지에서 배양한 후, 버섯 재배사에서 자실체를 얻었다. 직경 3cm 정도 크기의 자실체를 습실처리한 플라스틱 상자 안에 놓고 갓 위에 각각 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml로 농도의 *P. tolaasii* 6041 현탁액을 3 μ l씩 접종하였다. 접종한 느타리 갓을 습실처리한 플라스틱 박스에 넣어 20°C 배양기에서 48시간 둔 후, 형성된 병징의 발병도를 A(0)는 병반이 형성하지 않음, B(1)는 접종 부위가 약간 변색됨, C(2)는 접종부위의 뚜렷한 변색, D(3)는 변색과 함께 접종부위의 함몰의 기준으로 조사하였다(Fig. 1). 모든 처리에서 3개의 자실체를 사용하였고, 3번의 독립적 접종 실험을 하였다. 처리별 관측값은 분산분석(ANOVA)과 Duncan 다중검정을 하여 처리 평균간의 차이를 비교하였다.

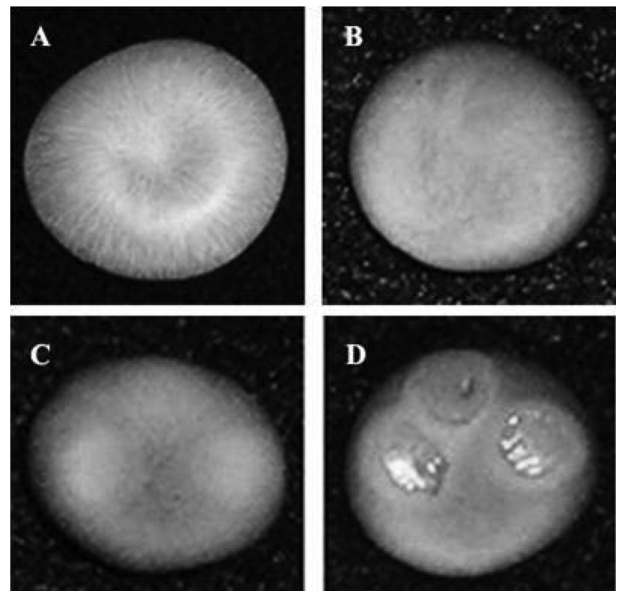


Fig. 1. Disease severity of brown blotch on cap of oyster mushroom was rated 0-3 based on severity of symptom formed by bacterial suspension inoculated. No symptom as seen on A, slight discoloration on B, discoloration with slight pit on C, and discoloration with severe pit on D were rated 0, 1, 2, and 3 respectively.

5. 버섯재배사에서 발병을 조사

세균갈색무늬병이 상습적으로 발생하는 진천군 문백면 소재 느타리 재배사에서 2개의 모균주와 11개의 F1 교배 균주의 세균갈색무늬병 자연 발병율(disease incidence)을 조사하였다. 실험에 사용한 균주의 균사를 표준 톱밥배지에 접종하여 28°C에서 배양 후, 4°C에서 저온처리하고 균균기를 하여 재배사의 난괴법으로 배치하였다. 원기 형성 후 자실체가 올라오는 시기에 2~3일 간격으로 발병율을 조사하였다. 발병율은 병당 전체 자실체 중에서 병든 자실체의 백분율로 조사하였다.

6. GFP 생성 *P. tolaasii-gfp* 균주 제작

느타리 자실체에서 접종한 병원세균이 공초점현미경(confocal microscope)에서 잘 관찰되도록 녹색형광단백질(GFP, green fluorescence protein)을 생산하는 *P. tolaasii* 6041의 형질전환 균주를 만들었다. 본 연구에 사용한 *gfp* 유전자는 pPROBE-NT 플라스미드에 있는 유전자 (Robert *et al.*, 2003)로, 이 *gfp* 유전자는 promoter-less *gfp*이므로 *P. tolaasii*의 16S rDNA의 promoter를 클로닝하여 *gfp* 유전자 5말단 부위에 삽입하였다.

*P. tolaasii*의 전체 DNA로부터 16S rDNA의 프로모터 부위는 프라이머 P-16S rRNA F(CAT TTG CAG CAC CGA CTA CA)/P-16S rRNA R(CAA TCG GAT CGG TAA AGG AA)를 이용하여 증폭하였다. PCR 산물은 Zymo™ DNA recovery kit (Zymo Research)를 이용하여 정제 및 농축하여 T&A cloning vector (Real Biotech Corporation)에 클로닝하고 (pTA16SP), 클로닝 한 DNA가 목표한 16S rDNA의 프로모터 영역을 가진 것인지 염기서열분석을 통하여 확인하였다.

플라스미드 pTA16SP에서 16S rDNA 프로모터 DNA를 가진 *HindIII-BamHI* 절편을 pPROBE-NT의 *HindIII*와 *BamHI* site에 삽입하여 pPT16SP-*gfp*를 만들었다. 이 플라스미드를 electroporation를 통해 *P. tolaasii* 6041에 형질전환하였다.

7. 공초점현미경으로 *P. tolaasii* 관찰

톱밥 병배지에서 배양을 통해 얻은 느타리 자실체 표면에 *P. tolaasii-gfp* 균주 현탁액 10⁸ CFU/ml 3 μl씩 접종하였다. 접종 0시간 후, 6시간 후, 12시간 후에 접종부위의 증앙을 3 mm × 3 mm 크기로 자르고 자실체의 갓 표면을 약 1 mm 이하의 두께로 얇게 잘랐다. 슬라이드글라스에 permount를 이용하여 얇게 자른 자실체의 갓을 고정 시켰다. 시료를 480 nm의 파장의 공초점현미경으로 관찰 하였다.

결 과

느타리 균주별 자실체 표면의 소수성과 세균갈색무늬병 발병도

사용한 느타리 균주별 자실체 표면의 소수성 지수는 첫 번째 실험에서 1.13~2.24 범위이었고, 두 번째 실험에서는 1.45~2.93이었다(Table 1). 여기서 소수성 지수의 크기가 클수록 세균현탁액의 맺힘이 강하고 오래 유지되는 소수성이 큼을 나타낸다. 두 번의 실험결과에서 나타난 지수의 범위는 숫자적으로 크지 않았지만 두 번의 실험 모두에서 통계적으로 균주별 소수성의 차이가 인정되었다. 또한 2번의 실험결과에서 균주별로 비슷한 경향의 소수성 지수를 보임을 알 수 있었다. 즉, 모균주인 ASI 2181의 경우 두 번의 실험결과 1.15

Table 1. Hydrophobicity index and disease severity of fruiting body and disease incidence of parental and F1 hybrid strains of oyster mushroom

Strain	Hydrophobicity index ¹⁾				Disease servery ²⁾				Disease incidence (%) ³⁾			
	I		II		I		II		I		II	
ASI 2181	1.15 ± 0.13	bc	1.45 ± 0.45	c	0.86 ± 0.22	e	0.50 ± 0.28	c	5.00 ± 0.00	b	0.60 ± 0.89	c
ASI 2549	1.87 ± 0.68	ab	2.86 ± 0.16	a	1.50 ± 0.33	bcd	1.07 ± 0.27	ab	26.67 ± 5.77	ab	5.20 ± 2.86	ab
925-49	1.72 ± 0.49	abc	2.24 ± 0.39	b	1.31 ± 0.19	de	0.60 ± 0.21	c	26.67 ± 5.77	ab	1.40 ± 1.14	abc
925-50	1.85 ± 0.45	abc	2.71 ± 0.54	ab	1.67 ± 0.19	a-d	0.80 ± 0.27	abc	26.67 ± 20.82	ab	4.20 ± 3.56	abc
925-97	1.13 ± 0.18	c	2.85 ± 0.20	a	0.89 ± 0.45	e	1.06 ± 0.38	ab	10.00 ± 0.00	ab	2.00 ± 2.00	abc
925-235	2.30 ± 0.56	a	2.79 ± 0.27	a	1.50 ± 0.38	bcd	0.89 ± 0.20	abc	8.33 ± 2.89	ab	3.60 ± 1.10	abc
925-243	2.31 ± 0.51	a	2.70 ± 0.28	ab	1.59 ± 0.31	a-d	1.02 ± 0.48	ab	23.33 ± 5.77	ab	3.80 ± 1.10	abc
925-366	1.92 ± 0.62	a	2.71 ± 0.47	ab	1.48 ± 0.19	bcd	0.68 ± 0.27	bc	16.67 ± 12.58	ab	1.80 ± 1.92	abc
925-450	1.70 ± 0.38	abc	2.73 ± 0.38	ab	1.20 ± 0.20	de	0.80 ± 0.33	abc	6.67 ± 2.89	ab	1.20 ± 0.84	bc
925-505	1.95 ± 0.32	a	2.48 ± 0.46	ab	2.07 ± 0.30	a	0.61 ± 0.17	c	36.67 ± 11.55	a	2.40 ± 0.89	abc
925-509	1.78 ± 0.36	abc	2.42 ± 0.39	ab	1.34 ± 0.15	cde	0.60 ± 0.22	c	5.00 ± 0.00	b	1.40 ± 0.89	abc
925-510	1.65 ± 0.32	abc	2.47 ± 0.78	ab	1.92 ± 0.20	ab	1.08 ± 0.58	ab	30.00 ± 25.98	ab	4.20 ± 3.27	abc
925-524	2.24 ± 0.40	a	2.93 ± 0.14	a	1.89 ± 0.17	abc	1.07 ± 0.42	a	21.67 ± 7.64	ab	5.60 ± 2.97	a

¹⁾Hydrophobicity was rated 1-3 with level of formation and staying time of the bacterial suspension on the cap.

²⁾Disease severity was rated 0-3 with level of severity of symptom formed on cap by the bacterial suspension.

³⁾Disease incidence was determined on bottle cultivation in the oyster mushroom farm.

와 1.45이었고 ASI 2549의 경우 1.87과 2.86으로, 두 번 모두에서 ASI 2181은 소수성 지수가 낮게 나오고 ASI 2549는 소수성 지수가 높았다(Table 1).

병원세균 현탁액 접종에 의한 조사한 느타리 균주별 자실체에서의 발병도도 첫 번째 실험결과에서 0.86~2.07 범위 이었고, 두 번째 실험에서는 0.50~1.08이었다(Table 1). 여기에서 발병도가 클수록 병반형성정도가 심함을 의미한다. 자실체의 소수성처럼 발병도의 범위로 숫자적으로 크지 않았지만 두 번의 실험 모두에서 통계적으로 균주별 차이가 인정되었다. 또한 2번의 실험에서 균주별로 발병도가 유지됨을 알 수 있었다. 즉, 모균주인 ASI 2181의 경우 두 번의 실험결과 0.86과 0.50이었고 ASI 2549의 경우 1.50과 1.07로, 두 번 모두에서 ASI 2181은 발병도 지수가 낮게 나오고 ASI 2549는 발병도 지수가 높았다(Table 1).

이상의 결과는 세균현탁액 맺힘과 유지되는 정도로 조사한 자실체 표면의 소수성과 병원세균 현탁액 접종에 의한 발병도가 균주별로 유의한 차이가 있음을 의미한다.

자실체 표면의 소수성과 발병도의 상관관계

느타리 균주별 자실체 표면의 소수성과 발병도 조사결과 균주의 소수성 지수가 높으면 발병도 지수도 높은 경향을 보였다. 즉, CBNU 925-524의 경우 실험 1과 2 모두에서 소수성 지수가 다른 균주에 비해 높았고 발병도 지수도 높게 나왔다. CBNU 925-97의 경우 실험 1에서 소수성 지수가 다른 균주에 비해 낮았고 발병도 지수도 낮게 나왔으며, CBNU 925-49는

실험 2에서 소수성 지수도 낮았고 발병도 지수도 낮게 나왔다. 느타리 자실체 표면의 소수성과 발병도와의 관계를 알아보기 위하여 느타리 균주의 소수성과 발병도와의 상관계수를 구하여 비교하였다. 실험 1에서 얻은 소수성과 발병도와의 상관계수는 0.68이었고, 실험 2의 결과의 상관계수는 0.70이었다(Fig. 2). 두 번의 실험 결과 모두에서 자실체 표면의 소수성과 발병도는 정의 상관이 있는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 자실체 표면의 소수성이 높으면 그 자실체에서 세균갈색무늬병의 병반이 더 심한 병반을 형성하는 것을 의미한다.

자실체의 발병도와 버섯 재배사에서 발병율과 관계

실험실에서 인공접종을 통해 조사한 느타리 균주별 자실체의 발병도와 버섯 재배사에서 조사한 균주별 발병율과의 관계를 조사한 결과 자실체 의 발병도가 높으면 재배사에서 세균갈색무늬병 발병율도 높은 경향을 보였다. 인공접종 실험에서 낮은 발병도를 보인 ASI 2181의 경우 실험 1과 2 모두에서 다른 균주에 비해 낮은 발병율을 보여주었고, 상대적으로 높은 발병도를 보여준 ASI 2549는 다른 균주에 비해 높은 세균갈색무늬병의 발병율이 높았다(Table 1). 느타리 자실체의 발병도와 버섯재배사에서 발병율과의 상관계수를 구하여 비교하였을 때 실험 1에서 얻은 발병도와 발병율의 상관계수는 0.46이었고, 실험 2의 결과의 상관계수는 0.52이었다(Fig. 3). 두 번의 실험 결과 모두에서 인공접종에 의한 자실체에서의 발병도와 재배에서의 발병율 사이에는 정의 상관이 있는 것으로 나타났다.

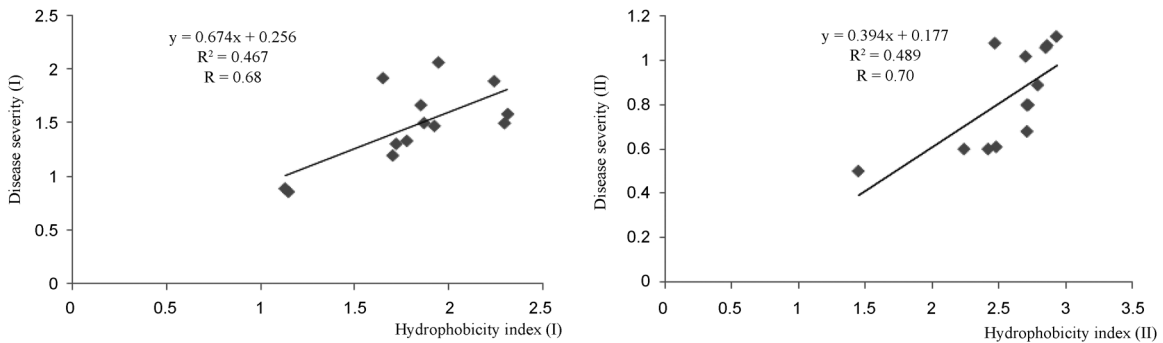


Fig. 2. Co-relation coefficient between disease severity and hydrophobicity index of cap of parental and F1 hybrid strains of oyster mushroom.

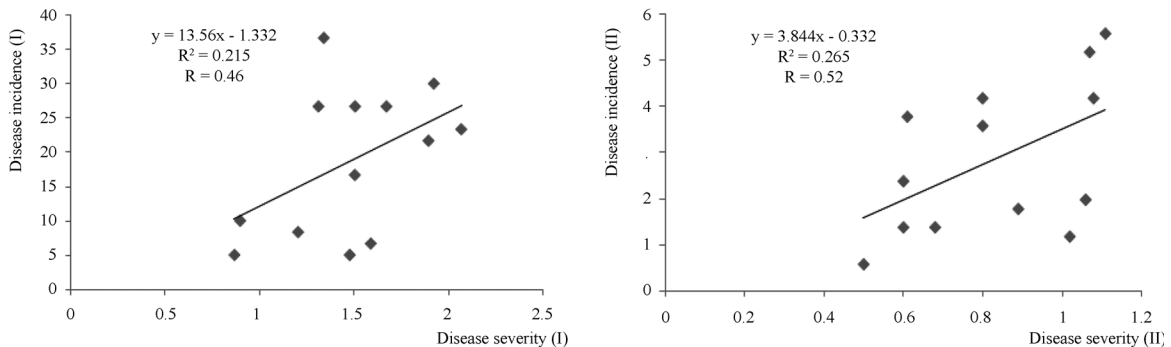


Fig. 3. Co-relation coefficient between disease severity of cap and disease incidence of parental and F1 hybrid strains of oyster mushroom.

공초점현미경으로 관찰한 느타리 자실체와 균사에서의 세균 밀도 변동

녹색형광을 내는 *P. tolaasii gfp* 균주의 세균현탁액을 접종한 느타리 자실체표면에서의 세균 밀도변동을 공초점현미경으로 관찰한 결과 ASI 2181과 ASI 2549 모두 접종직후인 0시간에는 세균이 자실체 표면에 균일하게 분포하고 있었다 (Fig. 4). 하지만 접종 후 6시간 및 12시간 후에는 병원세균이 ASI 2181에 비해 ASI 2549 표면에서 더 강한 집단화 되는 것이 관찰되었다(Fig. 4). 자실체 표면에서 세균의 집단화는 느타리 갓 표면에서 세균의 증식을 보여주는 것으로 생각되며, 사진 결과는 발병도가 상대적으로 높은 ASI 2549 균주의 표면에서 세균이 더 잘 빨리 증식함을 의미한다고 생각된다.

고 찰

본 연구에서는 느타리 자실체 표면의 소수성과 자실체에서 나타나는 세균갈색무늬병 발병도와의 관계를 세균갈색무늬병 발병정도가 다른 두 균주와 두 균주를 모균주로하여 교배한 교배균주에서 세균갈색무늬병 병반형성 정도가 다른 선발된 교배균주에서 알아보았다. 연구결과 느타리 자실체 표면의 소수성과 발병도는 정의 상관관계가 있었다. 즉 자실체 표면에서 물방울이 잘 맺히고 그 물방울이 오래 유지될수록 더 심한 병반을 형성하는 것을 의미한다. 자실체 표면에서 세균 현탁액이 오래 유지된다는 것은 자실체 표면에서 세균의 증식에 필요한 수분을 충분히 제공한다는 의미와 함께 물방울이

퍼져나가지 않기 때문에 자실체 표면 단위면적당 세균의 밀도를 더 높게 해주는 의미가 있는 것으로 생각된다. 즉, 자실체 표면에서 세균현탁액이 퍼지게 되면 주어진 물방울 안의 세균이 퍼진 만큼 넓은 면적으로 흩어지는 것으로 단위면적당 세균밀도는 낮아진다는 것을 의미한다.

버섯재배사에서 자연 발생하는 발병율과 균주별 자실체 표면의 발병도 및 소수성과의 관계에서도 정의 상관관계가 있었다. 이 결과는 느타리 자실체 표면의 소수성이 자연 발생 조건에서도 세균갈색무늬병 발생 정도에 영향을 미치는 결과로 생각된다. 느타리 표면에서 세균의 분포를 모니터링한 결과 발병도와 발병율이 높은 것은 낮은 것에 비해 세균이 집단화되는 경향이 강하였다. 이 결과로 보아 느타리 표면에서 단위면적당 세균 밀도를 높여주는 것은 세균이 집단화에 의한 것으로 이로 인해 발병도와 발병율이 높아지는 것으로 생각된다.

양송이 갓에서 병징 형성을 위한 최소세균밀도는 보고에 따라 다르지만 갓 당 10^8 cells 또는 당 $10^4 \sim 10^8$ cells로 다양하며, 병징은 갓이나 원기의 나이나 크기와는 상관없다고 보고되었다(Soler-Rivas, 1999). 느타리 갓에서 세균갈색무늬병 병징을 형성하기 위해 필요한 병원세균의 밀도에 대한 정확한 조사결과는 없지만, 버섯 갓에 인공 접종하여 세균갈색무늬병 병반을 얻기 위해서는 접종 병원세균의 밀도가 $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml 가 필요하였다(김, 2002). 이러한 점들은 자실체 갓 표면에서 증식하는 병원세균의 밀도가 병 발생에 매우 중요한 영향을 미침을 의미한다.

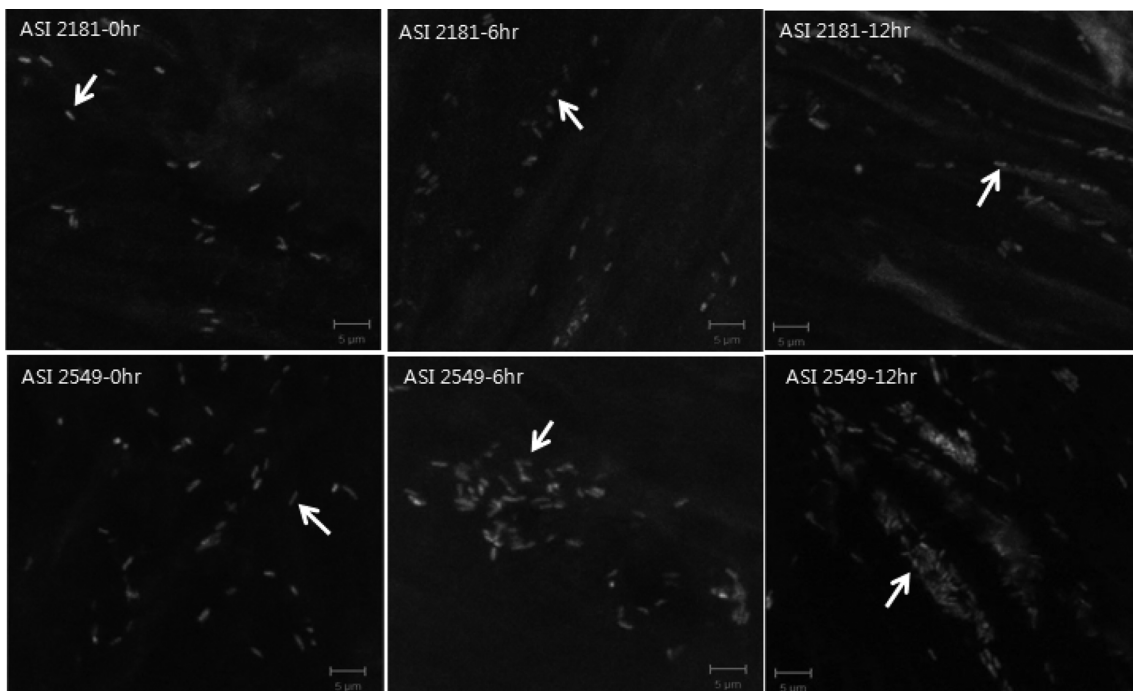


Fig. 4. A change of *Pseudomonas tolaasii-gfp* population on surface of the cap of parental strains the oyster mushroom, ASI 2181 and ASI 2549. The 3 μ l of *P. tolaasii-gfp* suspension 10^8 CFU/ml was inoculated on the cap which was placed inside the moisture plastic box, and the plastic box was incubated at 20°C. Scale bar size is 5 μ m.

본 연구에서는 느타리 자실체 표면의 소수성과 세균갈색 무늬병 발병도와 관계있으며, 자실체 표면의 소수성이 클수록 수분이 오래 유지되고 단위면적당 세균의 밀도가 높아지는 것을 보여주었다. 앞으로 느타리 자실체 표면의 소수성의 원인이 무엇이며 어떤 기작에 의해 결정되는지 대한 연구가 필요하다.

적요

세균갈색무늬병 병원균의 접종에 의해 심한 병징을 보이는 느타리 균주와 매우 약한 병징을 보이는 균주를 모균주로 선발하고, 각각의 모균주로부터 얻은 단핵균주의 교배를 통해 F1 교잡균주를 얻었다. 세균갈색무늬병 발병도가 다른 11개의 F1균주와 모균주의 자실체 표면의 소수성과 발병도를 조사하였다. 발병도와 소수성 사이의 상관계수는 2번의 독립된 실험에서 각각 0.68과 0.70이었다. 자실체의 발병도와 버섯 재배사에서 조사한 발병율 사이의 상관계수는 각각 0.46과 0.52이었다. GFP를 발현시킨 *Pseudomonas tolaasii*을 자실체 표면에 접종 후 공초점현미경으로 관찰한 결과 발병도가 낮은 균주의 자실체 표면에서보다 높은 균주의 자실체 표면에서 보다 많은 세균의 집단화가 관찰되었는데, 이 결과는 발병도가 높은 균주의 갓 표면에서 더 많은 세균이 증식하였음을 의미한다. 이상의 결과는 느타리 자실체 표면의 소수성이 세균갈색무늬병 발병도에 영향을 미치는 것을 암시한다. 즉 세균현탁액 방울이 갓 표면에 오래 유지되면 더 심한 병징이 형성된다.

감사의 글

이 논문은 2008년 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- 김우재. 2002. 세균성갈색무늬병에 대한 느타리 품종저항성. 농학석사학위논문. 충북대학교.
- 김종완, 김근희, 강희진. 1994. 인공 재배버섯에 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원세균에 관한 연구; 1. 인공 재배버섯의 부패 변성 원인세균에 대하여. 한국식물병리학회지 10:197-210.
- 신관철, 전낙범. 1991. 느타리 세균성갈색반병의 병원균 분류 동정 및 생물학적 방제. 농시논문집 34:1-10.
- 이혁인. 1999. 느타리 세균성갈색무늬병균 *Pseudomonas tolaasii*의 검출 및 동정을 위한 PCR방법 개발. 농학석사학위논문. 충북대학교.
- 조용섭, 박창석, 이순규, 이영근, 임춘근, 차재순, 최용철, 최재을, 허성기, 황인규. 2002. 식물세균병학. 서울대학교출판부. pp. 295-297.
- 주영철, 하태문, 이윤혜, 이한범, 전대훈, 최종인, 김정환, 장명준. 2008. 버섯재배 바로알기. pp. 12-164.
- 진경식, 김정준, 전창성, 이은중. 1994. 버섯 갈변병균 *Pseudomonas*

- tolasii*와 *Pseudomonas agarici*의 분리동정에 있어서 특성차이. 농업논문집 36:343-348
- 차동열, 박정식, 유창현, 김광포, 전창성, 이두원. 1997. 느타리 재배 기술과 재배경영. 농민신문사 p374.
- 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.
- 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. Bacteriol.* 177:4658-4668
- Munsch, P., Olivier J., and Houdeau, G. 1991. Experimental control of bacterial blotch by bacteriophages. *Science of cultivation edible fungi*. Maher(ed) Balkema. Rotterdam. pp. 389-396.
- Murata, H., Tsukamoto, T., and Shirata, S. 1998. rtp A, a gene encoding a bacterial two-component sensor kinase, determines pathogenic traits of *Pseudomonas tolaasii*, the causal agent of brown blotch disease of a cultivated mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* 39:261-271.
- Nair, N. G., and Fahy, P. C. 1973. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Aust. J. biol. Sci.* 26:509-512.
- Nutkins, J. C., Mortishire-Smith, R. J., Packman, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., Johnstone, K., and Williams, D. H. 1991. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* 113:2621-2627.
- 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* Paine. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:57-70.
- 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*. *Mol. Microbiol.* 8:643-652.
- Robert, C., Levente, B., Jozsef, K., Colin M. J., and Kornel L. K. 2003. Genes involved in the copper-dependent regulation of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath): cloning, sequencing and mutational analysis. *Microbiology* 149: 1785-1795.
- 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.
- Soler-Riveas, C., Jolivet, S., Arpin, N., Oliver J. M., and Wichers, H. J. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Reviews* 23:591-614.
- 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.
- 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.