

RESEARCH NOTE

세균성갈색무늬병에 대한 양송이 내성 검증

김우현¹, 권태룡¹, 김용균², 권순욱³, 오연이⁴, 강민구^{1*}¹경상북도농업기술원, ²충청남도농업기술원, ³부산대학교 식물생명과학과, ⁴국립원예특작과학원 버섯과Tolerance of *Agaricus bisporus* to Bacterial Brown Blotch by PseudomonadsWoo-Hyun Kim¹, Tae-Ryong Kwon¹, Yong-Gyun Kim², Soon Wook Kwon³, Youn-Lee Oh⁴, Min-Gu Kang^{1*}¹Gyeongbuk Agricultural Research and Extension Services, Daegu 41404, Korea²Chungnam Agricultural Research and Extension Services, Yesan 32418, Korea³Department of Plant Bioscience, Pusan University, Miryang 50463, Korea⁴Mushroom Science Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Eumseong 27709, Korea

*Corresponding author: ilovegoje@korea.kr

Abstract

Pseudomonads cause bacterial brown blotch disease, which causes great damage to the common mushroom *Agaricus bisporus*. The tolerance of *A. bisporus* to pseudomonads was tested and found to not be correlated with mycelium growth ability. The offsprings of the tolerant strain (ASI1085) to pseudomonads were not as tolerant as their parents in the mycelium stage. But, tolerance decreased compared to mycelium in the fruiting body. The offsprings of the weakly tolerant strain (ASI1321) were even more weak in the mycelium stage. It is presumed that the tolerance of the parents is transferred to later generations. The tolerance in the mycelium was not correlated in the fruiting body. Therefore, the browning of the fruiting body is thought to be induced by other factors. *Pseudomonas tolaasii* caused higher browning than *Pseudomonas agarici*. *Pseudomonas reactans* did not have a significant effect on the mycelium, but affected the browning of the fruit bodies. *P. agarici* had higher ability to inhibit mycelium growth than fruiting body growth.

Keywords: *Agaricus bisporus*, Bacterial brown blotch disease, Disease tolerance, Pseudomonads

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2017 December, 45(4): 370-376
https://doi.org/10.4489/KJM.20170043pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249**Received:** 2 November, 2017
Revised: 28 November, 2017
Accepted: 28 November, 2017

© The Korean Society of Mycology



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

양송이 재배에서 *Pseudomonads*에 의한 병해는 매우 흔하게 발생한다. 그 중에서도 *Pseudomonas tolaasii*는 가장 대표적인 세균성갈색무늬병(bacterial brown blotch disease)의 원인균으로 알려져 있다[1, 2]. *P. tolaasii*는 주로 자실체, 복토, 배지에서 분리된다[3, 4]. 세균성갈색무늬병을 유발하는 대표적인 병원균으로는 *P. tolaasii*와 *Pseudomonas reactans*, *Pseudomonas gingeri* 등이 보고되어 있다[5]. *P. tolaasii*와 *P. gingeri*에 의한 감염 증상은 차이가 있다. *P. tolaasii*는 버섯의 갓과 대 표면을 변색시키며, 병반 부위는 점차 진갈색으로 변

하거나 옴폭 파이게 된다. 반면 *P. gingeri*는 갓을 황갈색으로 변색시키지만 감염 부위가 옴폭 파이지는 않는다. 병의 방제를 위해서는 물리적, 화학적, 생물학적 방제뿐만 아니라 버섯이 보유하고 있는 병에 대한 내성을 가지는 유전인자를 이용하기도 한다. 양송이에 피해를 주고 있는 *Verticillium fungicola*에 대한 저항성 연구에서 야생 계통의 동형핵균주에서 2개의 저항성과 연관된 양적형질위치(quantitative trait locus, QTL)를 발견하였으며, 이후 여교배를 통해 그 형질이 교잡계통에서 저항성이 발현되는 것이 확인되었다[6]. 또한 *Trichoderma aggressivum*이 생산하는 효소와 대사산물에 대한 저항성의 정도가 소수의 유전자에 의해 지배되어 양적으로 유전되고, 이는 linkage group IV에 있는 하나의 QTL과 관련되어 있는 것이 보고되었다[7]. 이를 통해 *T. aggressivum* 저항성과 감수성의 유전적인 요인의 정도는 양송이 계통에 따라 차이가 있을 것으로 제안하였다. 양송이에 대한 세균성갈색무늬병의 내성은 계통별로 큰 차이를 보이는 것으로 보고되었다[8]. 국내에서 육성된 양송이의 대부분은 수량과 품질에 육성 목표를 두고 개발된 품종들이며, 병해 저항성을 가진 계통의 개발은 진행되지 않았다. 본 시험에서는 세균성갈색무늬병에 내성이 높은 품종의 육성을 위하여 각 수집된 계통들이 가지는 내성의 정도와 후세대 단포자가 가지는 특성을 확인해 보았다.

시험균주 및 후세대 단포자 수집

세균성갈색무늬병에 대한 내성을 시험하기 위해 국립원예특작과학원 버섯과에서 품종육성하여 보존중인 균주와 국내외에서 수집된 균주 48종을 분양받아 시험에 이용하였다. 수집된 균주중 세균성갈색무늬병 내성 검증을 통해 내성이 강하였던 균주 ASI1085와 내성이 약하였던 균주 ASI1321을 선발하였다. 선발된 두 균주의 후세대 단포자에서 부모세대와 마찬가지로 세균성갈색무늬병에 대한 내성 정도를 확인하기 위해 두 균주를 재배하여 자실체를 발생시켰다. 발생된 자실체에서 단포자를 각 200개체씩 확보한 후 무작위로 50~60개체를 선발하여 후세대 세균성갈색무늬병 내성 검증에 이용하였다.

후세대 균사체의 세균성갈색무늬병 내성 검증

시험에 사용된 세균성갈색무늬병 유발균주는 국립원예특작과학원 버섯과에서 수집하여 분양받은 *P. tolaasii*, *P. reactans*, *P. agarici* 균주를 시험에 활용하였다. 양송이 균사체에 대한 내성 검증시험은 다음과 같이 진행하였다. 시험배지는 퇴비추출(compost extract dextrose agar, CDA) 배지와 R2A 배지를 1/2씩 혼합하여 제조하였다. 혼합된 합성 배지에 양송이 균주를 cork borer를 이용하여 5 mm 크기로 접종하여 7일간 배양하였다. 양송이를 7일간 배양한 후 원형으로 배양된 균총의 바깥쪽으로 10 mm 지점에 세균성갈색무늬병 유발균주를 사각형 형태로 도말해 주었다. 도말 후 20일간 배양하여 균사생장 양상을 관찰하여 내성 유무를 판정하였다.

후세대 자실체의 세균성갈색무늬병 내성 검증

양송이 자실체가 세균성갈색무늬병에 내성이 보이는가를 판단하기 위해서 내성이 강한 균주와 약한 균주의 재배를 통해 확보한 후세대 단포자를 재배하여 자실체를 확보하였다. 수확한 자실체는 5 × 5 × 5 mm의 정사각형 형태로 잘라주었다. 시험처리는 다음과 같이 구분하여 검

증을 진행하였다. 절단된 자실체 그대로 배양 접시에 보관한 경우, 증류수에 침지 후 보관한 경우, *P. agarici*에 침지 후 보관한 경우, *P. tolaasii*에 침지 후 보관한 경우로 진행하였으며, 배양 접시(90 × 15 mm, SPL)에 담아 24시간이 지난 후 자실체의 변색 정도를 육안으로 비교하여 세균성갈색무늬병에 대한 내성 정도를 조사하였다.

세균성갈색무늬병 내성 검증 및 자원 선발

세균성갈색무늬병을 유발하는 병원균 3균주에 대한 양송이 수집균주의 내성 정도는 다음과 같았다(Table 1). 양송이에서 세균성갈색무늬병을 유발하는 *P. tolaasii*, *P. reactans*, *P. agarici* 3균주를 이용하여 1주일간 배양시킨 양송이 균주와 대치배양 시킨 결과는 3가지 반응 형태로 구분이 가능하였다(Fig. 1). 대치선을 넘어 군사생장을 진행하는 내성이 강한 형태, 세균과 대치 이후 군사생장은 진행되지만 대치선을 넘지 못하거나 일부 사각으로 도달된 세균선을 용해하면서 군사생장이 일부 진행되는 형태, 세균대치배양 이후 군사생장이 정지되는 내성이 약한 형태로 구분되었다. 총 48점의 유전자원 중 내성이 강한 자원으로 ASI1085와 내성이 약한 자원으로 ASI1321을 선발하였다. 푸른곰팡이에 대한 버섯의 군사생장능력은 *Trichoderma*에서 발생하는 용해효소와 그 대사물질에 대해서 양송이가 경쟁하여 생존하는데 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다[7]. 세균성갈색무늬병에 내성의 강하거나 약한 균주의

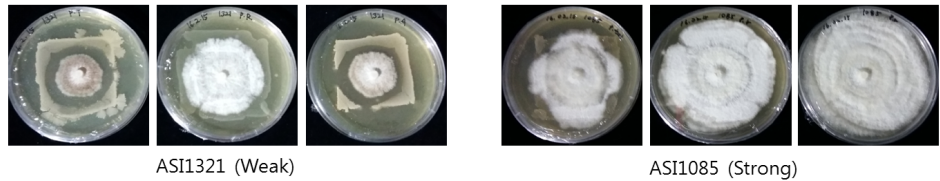
Table 1. Tolerance of strains of *Agaricus bisporus* against *Pseudomonas* sp.

Information of strain (45 strains)	Degree of tolerance to <i>Pseudomonas</i> sp.		
	<i>P. tolaasii</i>	<i>P. reactans</i>	<i>P. agarici</i>
ASI1007	+++	+++	+++
ASI1024	++	+++	++
ASI1032	++	+++	++
ASI1038	++	+++	+++
ASI1053	+	++	+
ASI1054	++	+++	++
ASI1074	+	+++	++
ASI1078	++	++	++
ASI1085	+++	+++	+++
ASI1086	+	+++	++
ASI1089	++	+++	++
ASI1096	++	+++	++
ASI1103	+	++	+
ASI1140	+	+	+
ASI1146	+	+	+
ASI1153	+	+++	++
ASI1159	+	+++	+
ASI1167	+	+++	+
ASI1177	+	++	+
ASI1183	+	++	+

Table 1. (Continued)

Information of strain (45 strains)	Degree of tolerance to <i>Pseudomonas</i> sp.		
	<i>P. tolaassi</i>	<i>P. reactans</i>	<i>P. agarici</i>
ASI1195	+	++	+
ASI1225	+	+++	+
ASI1246	+	+++	+
ASI1310	+++	+++	++
ASI1313	++	+++	++
ASI1320	+	+++	+
ASI1321	+	++	+
ASI1323	+	+++	+
ASI1324	+	+++	+
ASI1325	+	+++	+
ASI1326	+	+++	++
ASI1331	+	++	+
ASI1336	+	++	+
ASI1337	+	++	++
ASI1338	++	+++	+
ASI1339	+++	+++	+++
ASI1340	+	+	+
ASI1343	++	++	++
ASI1345	+	++	+
ASI1346	+	+++	+
ASI1347	+	+++	+
ASI1348	+	+++	+
ASI1350	+	+++	+
ASI1396	+	+++	+
ASI1415	+	+++	+

A. Mycelial test



B. Browning of fruiting body

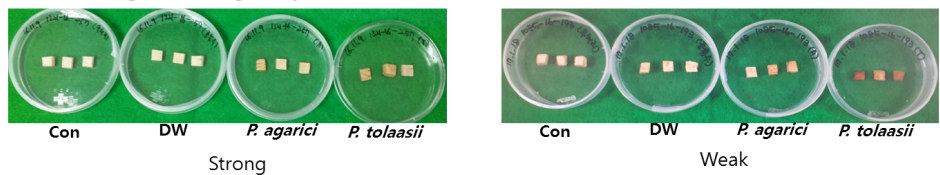


Fig. 1. Tolerance of offsprings from ASI1321 or ASI1085 against *Pseudomonads*. A, Mycelial growth; B, Browning of fruiting body; Con, control; DW, distilled water.

온도별 군사생장속도는 어떤지를 분석해 보았다(Table 2). 내성이 강한 ASI1085는 10°C에서는 상위 35.4%, 15°C에서는 상위 27.1%, 20°C에서는 상위 27.1%, 25°C에서는 상위 50%, 30°C에서는 상위 27.1%로 확인되었다. 내성만큼 군사생장속도에서 빠른 군사생장속도를 보이지는 않았다. 내성이 상대적으로 약한 ASI1321은 10°C에서는 상위 33.3%, 15°C에서는 상위 50.0%, 20°C에서는 상위 41.7%, 25°C에서는 상위 14.6%, 30°C에서는 상위 68.8%로 확인되었다. 내성이 약한 균주로 확인되었지만 25°C에서는 상위 14.6%로 군사생장이 왕성하였다. 위 결과를 볼 때, 세균성 병해는 곰팡이인 *Trichoderma*와는 다른 결과를 확인할 수 있었다.

Table 2. Comparison of mycelial growth at different temperatures

Strain		Mycelial growth rate (mm/day)				
		10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
Total 48	Maximum	1.83	2.69	3.83	3.96	2.88
Strains	Average	1.28	1.69	2.21	2.74	1.68
	Minimum	0.55	0.64	0.99	1.48	0.86
ASI1085 (Strong)		1.45	2.03	2.59	2.78	1.89
(Rank)		(17/48)	(13/48)	(13/48)	(24/48)	(13/48)
ASI1321 (Weak)		1.47	1.68	2.26	3.56	1.41
(Rank)		(16/48)	(24/48)	(20/48)	(7/48)	(33/48)

ASI1085 후세대의 군사체와 자실체의 세균성갈색무늬병 내성 검증

세균성갈색무늬병에 대하여 내성이 강하였던 ASI1085의 후세대 단포자 60개체에 대하여 군사체 단계에서 부모세대에서 가지고 있는 내성이 전달되는지 확인해 본 결과 *P. tolaasii*에 강한 계통은 10%, 보통인 계통은 65%, 약한 계통은 25%를 구성하였다. *P. reactans*에 강한 계통은 92%, 보통인 계통은 8%, 약한 계통은 0%를 구성하였다. *P. agarici*에 강한 계통이 3%, 보통인 계통이 30%, 약한 계통이 65%를 구성하였다. 자실체의 내성 검증을 진행한 결과는 다음과 같았다. ASI1085의 경우 군사체 검증에서 사용된 60계통 중 총 48계통에서 자실체가 발생하였다. 그 중 *P. tolaasii*는 강한 계통이 0%, 보통인 계통이 10%, 약한 계통이 90%를 구성하였다. 군사체의 결과에 비해 강한 계통과 보통인 계통이 대폭 감소하였다. *P. reactans*는 강한 계통이 6%, 보통인 계통이 65%, 약한 계통이 29%를 구성하였다. *P. agarici*는 강한 계통이 23%, 보통인 계통이 60%, 약한 계통이 17%를 구성하여, 군사체에 비해 내성이 강한 계통이 증가하였다(Table 3).

ASI1321 후세대의 군사체와 자실체의 세균성갈색무늬병 내성 검증

세균성갈색무늬병에 대하여 내성이 약하였던 ASI1321의 후세대 단포자 50개체에 대하여 군사체 단계에서 부모세대에서 가지고 있는 내성이 전달되는지 확인해 본 결과는 다음과 같았다(Table 3). 50개체 중 *P. tolaasii*는 강한 계통이 0%, 보통인 계통이 0%, 약한 계통이 100%를 구성하였다. ASI1321의 경우, 부모세대에서 *P. tolaasii*에 내성이 약하였던 특성이 그대로 재현되는 것을 확인할 수 있었다. *P. reactans*는 강한 계통이 94%, 보통인 계통이 6%, 약한

계통이 0%를 구성하였다. *P. agarici*는 강한 계통이 0%, 보통인 계통이 16%, 약한 계통이 84%를 구성하였다. ASI1321의 경우 균사체 검증에서 사용된 50계통 중 총 47계통에서 자실체가 발생하였다. 그 중 *P. tolaasii*는 강한 계통이 0%, 보통인 계통이 4%, 약한 계통이 96%를 구성하여 균사체와 자실체 모두에서 약한 내성을 보였다. *P. reactans*는 강한 계통이 11%, 보통인 계통이 43%, 약한 계통이 47%를 구성하여 균사체에서 강하였지만 자실체에서는 강한 계통이 큰 폭으로 감소하였다. *P. agarici*는 강한 계통이 23%, 보통인 계통이 51%, 약한 계통이 26%를 구성하였다.

Table 3. Tolerance of offsprings from ASI1085 and ASI1321 against *Pseudomonads*

Strain	Test parts	The offspring's tolerance rate to <i>Pseudomonas</i> sp.								
		<i>P. tolaasii</i>			<i>P. reactans</i>			<i>P. agarici</i>		
		+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
ASI 1085 (Strong)	Mycelium (n = 60)	15	39	6	0	5	55	39	18	3
	Percentage	25%	65%	10%	0%	8%	92%	65%	30%	5%
	Fruit body (n = 48)	43	5	0	14	31	3	8	29	11
	Percentage	90%	10%	0%	29%	65%	6%	17%	60%	23%
ASI 1321 (Weak)	Mycelium (n = 50)	50	0	0	0	3	47	42	8	0
	Percentage	100%	0%	0%	0%	6%	94%	84%	16%	0%
	Fruit body (n = 47)	45	2	0	22	20	5	12	24	11
	Percentage	96%	4%	0%	47%	43%	11%	26%	51%	23%

적 요

양송이 재배에서 큰 피해를 주고 있는 세균성갈색무늬병(bacterial brown blotch disease)을 유발하는 3가지 병원균에 대해 양송이가 가지는 내성이 후세대에 전달되는지 검증한 결과는 다음과 같았다. 세균성갈색무늬병에 대한 양송이의 내성 정도는 균사생장능력과 상관관계가 없었다. 세균성갈색무늬병에 내성이 강하였던 계통의 후세대 단포자들은 균사체 단계에서는 부모세대처럼 강한 내성을 보이지 않으며, 자실체에서는 균사체에 비해 내성은 감소하였다. 세균성갈색무늬병에 내성이 약하였던 계통의 후세대 단포자들은 균사체 단계에서는 부모세대와 마찬가지로 내성이 매우 약하여, 부모세대가 가진 내성이 후세대로 전달되는 것으로 추측되었다. 자실체에서의 내성은 균사체에서 내성 유무와는 상관관계가 없었다. 따라서 자실체의 갈변 현상은 다른 요인이 복합적으로 관여하여 유발될 것으로 판단된다. *Pseudomonas tolaasii*는 자실체에서 *Pseudomonas agarici*에 비해서 갈변을 더 높게 유발시켰으며, *Pseudomonas reactans*는 균사체에는 큰 영향을 주지 못했지만, 자실체의 갈변에는 영향을 주었다. *P. agarici*는 자실체보다 균사체 생장억제능이 높았다.

Acknowledgments

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Golden Seed Project, funded by

Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA, 213007-05-1-WTJ21).

REFERENCES

1. Grewal SI, Han B, Johnstone K. Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J Bacteriol* 1995;177:4658-68.
2. Seo GS, Jeon NB, Kim BR, Yu SH. Effect of some antibiotics on control of bacterial brown blotch of oyster mushroom caused by *Pseudomonas tolaasii*. *J Mushroom Sci Prod* 2003;1:15-20.
3. Fletcher JT, White PE, Gaze RH. *Mushrooms: pest and disease control*. Andover: Intercept; 1986.
4. Royle DJ, Wuest PJ. Mushroom brown blotch: effects of chlorinated wastes on disease intensity and bacterial populations in casing soil and on pilei. *Phytopathology* 1980; 70:902-5.
5. Rainey PB, Brodey CL, Johnstone K. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of cultivated mushroom. In: Andrews JH, Tommecup I, editors. *Advances in plant pathology*, Vol. 8. London: Academic Press; 1992. p. 95-118.
6. Sonnenberg AS, Baars JJ, Hendrickx PM, Kerrigan RW. Breeding mushrooms: state of the art. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*; 2005 April; Shanghai, China. Shanghai: SAAS; 2005. p. 163-73.
7. Foulongne-Oriol M, Minvielle N, Savoie JM. QTL for resistance to *Trichoderma* lytic enzymes and metabolites in *Agaricus bisporus*. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products Vol. 2*; 2011 Oct 4-7; Arcachon, France. Bordeaux: INRA; 2011. p. 17-25.
8. Kang MG, Jo WS, Kim WH, Lee SH, Kwon SW, Oh YL. Evaluation of traits of button mushroom *Agaricus bisporus*. *J Mushrooms* 2016;14:81-9.