

# 버섯 세균성갈색무늬병원균(*Pseudomonas tolaasii*)의 분비 독소(tolaasin)를 저해하는 미생물 *Pseudomonas* sp. HC1

이찬중\* · 유영미 · 한주연 · 전창성 · 정종천 · 문지원 · 서장선 · 한혜수<sup>1</sup> · 차재순<sup>2</sup>

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, <sup>2</sup>충북대학교 식물외과

## Isolation of the Bacterium *Pseudomonas* sp. HC1 Effective in Inactivation of Tolaasin Produced by *Pseudomonas tolaasii*

Chan-Jung Lee\*, Young-Mi Yoo, Ju-Yeon Han, Chang-Sung Jhune, Jong-Chun Cheong, Ji-Won Moon, Jang-Sun Suh, Hye-Su Han<sup>1</sup> and Jae-Soon Cha<sup>2</sup>

Mushroom Research Division, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea

<sup>1</sup>Heuksalim, Cheongwon-gun, hungbuk, 363-885, Korea

<sup>2</sup>Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**ABSTRACT :** A Gram-negative bacterium was isolated from mushroom media that markedly reduces the level of extracellular toxins (i.e., tolaasins) produced by *Pseudomonas tolaasii*, the most destructive pathogen of cultivated mushrooms. The HC1 strain was selected as detoxifying tolaasin by bioassay on potato and it was identified *Pseudomonas* sp. by the cultural, morphological and physiological characteristics, and analysis of the 16S rRNA.. The isolated bacterium is saprophytic but not parasitic nor pathogenic to cultivation mushroom. The isolated bacterium for *P. tolaasii* cell, was sufficient for detoxification *in vitro*. Inoculation of the isolated bacterium prevents the development of bacterial disease in *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes* and *Agaricus bisporus*. Control efficacy of brown blotch of strain HC1 treatment was 69, 68 and 55% on *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes* and *Pleurotus ostreatus*, respectively. The suppressive bacterium may be useful in future for the development of biocontrol system and the construction of genetically modified edible fungi resistant to the disease caused by *P. tolaasii*.

**KEYWORDS :** Control efficacy, Detoxify, Mushrooms, *Pseudomonas tolaasii*, Tolaasin

### 서론

버섯에 병을 일으키는 세균으로는 *Pseudomonas tolaasii*, *P. agarici*, *P. gingeri* 그리고 병원성 *P. reactans* 등이 보고되

었고(Wells *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1982; Young, 1970), 이외에도 *P. fluorescens* bv.와 비병원성 *P. reactans* 등과 같은 비병원성인 여러 종의 세균이 부생하는 것으로 알려져 있다(Wells *et al.*, 1996; Goor *et al.*, 1986; Wong *et al.*, 1982). 인공재배 버섯에 발생하는 세균갈색무늬병은 주로 버섯의 갓 부분에 갈색무늬를 형성하는 병으로서, 버섯의 양적, 질적인 저하를 초래하여 시장에서의 상품가치를 떨어뜨리는 하나의 큰 원인이 되고 있다. 세균갈색무늬병은 Tolaas(1915)에 의하여 처음으로 보고된 병으로, 이 병의 병원세균은 Paine(1919)에 의하여 *P. tolaasii*로 명명되었다. *P. tolaasii*는 버섯의 대표적인 병원균으로, 느타리, 양송이, 표고버섯 등에 갈색무늬병을 야기한다(Tsuneda *et al.*, 1995; Rainey *et al.*, 1992; Goor *et al.*, 1986). 분류학적으로 *P. tolaasii*는 버섯에서 분리되는 여러 종의 형광성 *Pseudomonas*종과 매우 유사하여, 생리적인 특성 및 영양요구성에 의한 방법으로는 뚜렷한 구분이 어렵다(Wells *et al.*,

Kor. J. Mycol. 2013 December, 41(4): 248-254  
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.4.248>  
 pISSN 0253-651X  
 © The Korean Society of Mycology

\*Corresponding author  
 E-mail: lchanj@korea.kr

Received October 1, 2013  
 Revised November 17, 2013  
 Accepted November 18, 2013

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1996; Goor *et al.*, 1986). 그리고 병징에 있어서는 *P. tolaasii*에 의한 갈색무늬 증상은 *P. gingeri*에 의해 발생하는 열은 갈색(yellow-brown)의 반점병인 ginger blotch disease와 유사한 특성을 갖는다(Cutri *et al.*, 1984; Wong *et al.*, 1982). 이 병은 병 발생의 예측이 매우 어렵고, 병 발생 후에는 방제가 거의 불가능하며, 한번 발생하면 재배사 전체로 급격하게 전염되어 심한 경우에는 버섯을 전혀 수확하지 못하게 하는 특성이 있다(Kim *et al.*, 1994). 특히 버섯의 생장온도 16와 습도, 80~90%에서 이와 같은 병원균들은 급격히 증식되어서 아민과 같은 세포의 독소를 형성하여 버섯 갓 부위에 갈색무늬병을 유발시킨다(Nair and Fahy, 1972). 갈색무늬병은 주로 버섯 수확전에 발생하지만 수확후 낮은 온도에서 저장하는 기간 중에도 발생한다.

*P. tolaasii*는 tolaasin이라는 독소를 생산하여 세포 밖으로 분비하는데, tolaasin은 아미노산 18개로 구성된 분자량 1,985 Da의 lipodepsipeptide로, N-말단이  $\beta$ -hydroxyoctanoic acid와 acylation되어 있으며, C-말단의 lysine은 14번째의 threonine과 lactone을 형성하여 환상결합을 하고 있는 2차 대사산물임이 밝혀졌다(Nutkins *et al.*, 1991; Jourdan *et al.*, 2003). 이 독소는 버섯 세포막에 유입되어 이온통로 형성과 물질이동 및 이에 따른 세포내 삼투압의 교란을 통한 세포막의 파괴, 조직의 괴사 등의 과정을 통하여 갈색무늬병을 일으키는 것으로 알려져 있으며(Brodey *et al.*, 1991; Rainey *et al.*, 1991; Cho and Kim, 2003) *P. tolaasii*가 병을 일으키는데 필요한 가장 중요한 병원성 결정인자로 보고되었다(Brodey *et al.*, 1991; Nair and Fahy, 1973; Rainey *et al.*, 1991).

따라서 본 연구는 병원균이 분비하는 독소(tolaasin)를 저해하여 병의 발생을 억제하고 버섯 병해의 친환경적 방제를 위한 독소저해 미생물을 선발하여, 항균력 및 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 미생물 분리

유용한 미생물을 분리하기 위해 재배중인 느타리버섯 폐면배지와 양송이 퇴비를 농가별 3점씩 채취하여 실험에 사용하였다. 미생물의 분리는 R2A배지(Reasoner and Geldreich, 1985)에 단계별로 희석 배양하여 50~60개의 colony를 형성한 plate로부터 독립적으로 분리하였다. 순수 분리한 미생물은 R2A배지에서 2일 동안 배양한 후 균체를 모아 20%(v/v) 글리세롤 용액에 넣어 70°C에 보존하면서 검정용 시료로 사용하였다.

### 독소저해균 선발

Tolaasin의 분리는 *P. tolaasii* 균주를 PS배지(Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.5 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2 g, peptone 5 g, sucrose 15 g, 300 g potato tube slice (pH 7.0)/1 l)에 접종 후 24°C

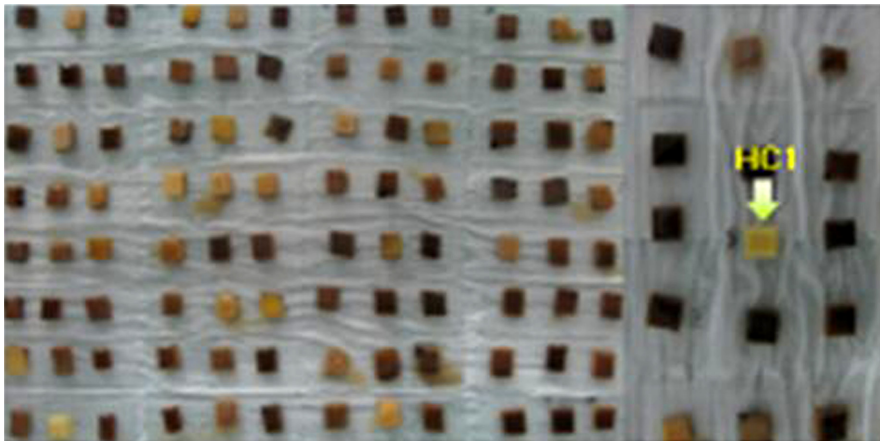
의 항온기에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 그 후 세균 배양액을 100°C의 물에 10분 동안 끓인 후 8,000 rpm (10,000×g)에서 30분간 원심분리하여 상등액을 동결 건조시켜 tolaasin 시료로 사용하였다(Shirata *et al.*, 1995). 독소 저해균의 선발은 동결건조된 tolaasin powder를 30%(w/v)로 희석하여 분리된 미생물과 1:1로 혼합하여 감자조각 위에 50  $\mu$ l씩 접종하여 25°C 항온기에 보관하면서 갈변정도를 조사하여 독소저해균을 선발하였다(Murata and Magae, 1996; Tsukamoto *et al.*, 1998).

### 선발균의 유전자 염기서열의 결정

DNA는 Quiagen Genomic DNA Isolation Kit(Quiagen, USA)을 사용하여 분리하였고, PCR 증폭은 Techne thermocycler(Techne LTD, Duxford, Cambridge, U.K.)로 수행하였다. PCR 반응혼합액은 1×buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin and 0.1% Triton X-100), 최종농도 200  $\mu$ M의 deoxyribonucleotide triphosphates(dATP, dCTP, dTTP), 0.6 U Taq DNA polymerase(Molecular Biochemicals, Mt Wellington, Auckland, New Zealand), 최종농도 2  $\mu$ M의 정, 역방향의 primers [fD1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 rP2(5'-ACGGCTACCTTGTT ACGACTT-3')] 그리고 10 ng template DNA로 이루어졌다. PCR은 94°C에서 1분, 56°C에서 1분 그리고 72°C에서 2분간 30cycles로 수행하였고, 반응 후 primer와 dNTP는 High Pure PCR Product Purification Kit(Bioneer Co., Chungbuk, Korea)을 사용하여 PCR 산물로부터 제거하였다. 정제된 PCR 산물은 pT7 blue Vector(Novagen Co., Madison, WI, USA)에 클로닝하여 Big Dye Terminator Kit와 ABI Prism 310 Genetic Analyzer(Perkin Elmer, New Jersey, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정한 16S rRNA 유전자의 염기서열은 GenBank Database에 등록하였다. 종 유사성 결정을 위해 Clustal W 분석프로그램(Thompson *et al.*, 1994)을 사용하여 GenBank에 있는 다른 염기서열들과 비교하였다. Jukes와 Cantor(1969) 방법을 이용하여 evolutionary distance matrix를 작성하고, MEGA 4의 Neighbor-joining 방법을 이용하여 계통수를 작성하였으며, tree의 안정성은 1000 반복의 bootstrap 분석으로 조사하였다.

### 선발균의 생리·생화학적 특성

선발 유용미생물의 생화학적 특성을 조사하기 위하여 기본배지(Stanier *et al.*, 1966)에 다양한 종류의 탄소원과 질소원, 유기산 등을 0.1%(w/w)씩 첨가하여 생육정도를 조사하였으며, 부가적으로 API 20E, API 20NE, 50CH 키트(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하였고, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Palleroni, 1984)에 준하여 실험을 하였다.



**Fig. 1.** Screening of tolaasin-inhibition bacteria on potato slices. Potato slices were treated with the mixture of bacterial suspension and the extracted tolaasins. No coloration of potato slice indicates that the bacteria or bacterial products inhibit browning by tolaasin activity.

**Fatty Acid Methyl Esters의 분석**

세포의 지방산 조성에 의한 분류동정은 상법에 따라 약 50 mg의 균체로부터 지방산을 추출하여(Sasser, 1990) fatty acid methyl esters(FAMES) 분석으로 수행하였다. FAMES profile은 25 mm × 0.2 mm의 methyl phenyl silicone fused silica capillary column을 사용하여 MIDI Hewlett-Packard Microbial Identification System(MIDI Inc., Newark, DE, USA) software를 가진 마이크로프로세스를 장착한 Gas Chromatography(HP 5890A, Avondale, Pa)로 분석하였다.

하여 온도 15°C, 습도 95%의 생육실에서 재배하면서 병 발생율을 조사하였다. 발병율 및 방제기는 다음 식으로 계산하였다.

$$* \text{ 발병율 } (\%) = \frac{\text{발병조사개체수}}{\text{조사개체수}} \times 100$$

$$* \text{ 방제기 } (\%) = \frac{(\text{무처리발병율} - \text{처리발병율})}{\text{무처리발병율}} \times 100$$

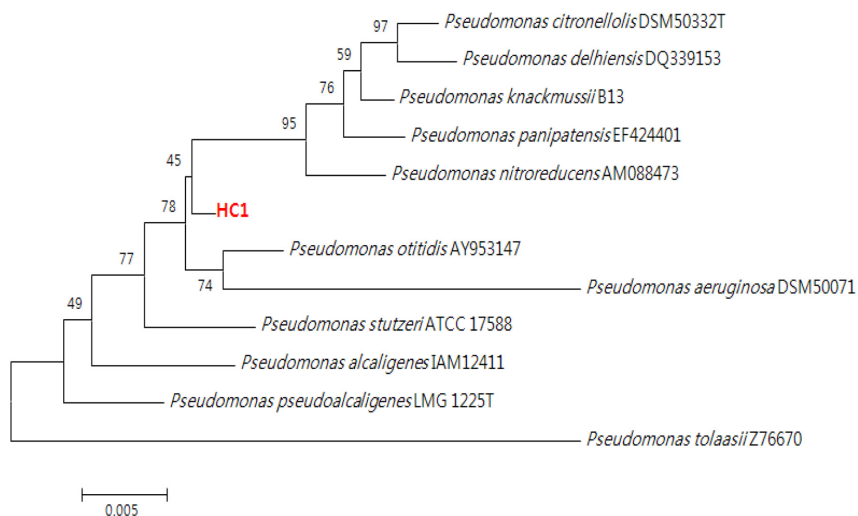
**선발균의 갈색무늬병 방제효과 검증**

세균갈색무늬병의 방제효과를 검증하기 위해 병재배된 느타리와 팽이버섯 그리고 풋트(90×30 cm)에 재배된 양송이버섯을 실험에 사용하였다. 버섯 자실체에 병원균 현탁액을 분무살포하고 30분 후 유용미생물 현탁액을 분무살포

**결과 및 고찰**

**독소저해균 선발**

병원균 *P. tolaasii*는 독소(tolaasin)를 분비하여 버섯에 병을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 이들 병원균이 분비하는



**Fig. 2.** Phylogenetic tree of HC1 based on 16S rRNA sequence similarity. Branching values determined using 1000 bootstraps. Bar, 1 substitution per 100 nucleotides.

**Table 1.** Phenotypic and biochemical characteristics of strain of *Pseudomonas* sp. HC1 and type strains of related *Pseudomonas* species

Characteristic	HC1	<i>P. otitidis</i> MCC 10330T	<i>P. aeruginosa</i> ATCCa 10145T	<i>P. citronellolis</i> ATCC 13674T	<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588T
Fluorescein production	+b	-c	+	+	-
Growth at:					
4°C	-	-	-	-	+
7°C	+	-	+	-	+
47°C	-	-	-	-	-
urease	+	-	d	-	-
Hydrolysis of:					
gelatin	+	+	+	-	-
Growth on NaCl agar:					
4% (w/v)	+	+	+	+	+
5% (w/v)	+	-	d	-	+
Utilization of:					
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	+	-	-
D-Arabitol	-	-	d	-	-
Glycerol	+	-	+	+	+
D-Mannitol	-	-	+	-	+
D-Sorbitol	+	-	-	-	d
D-Fructose	+	-	+	-	+
L-Fucose	d	-	d	-	d
D-Galactose	-	-	+	-	-
Gentiobiose	-	-	-	-	d
Maltose	-	-	-	-	+
Sucrose	-	-	-	-	d
D-Trehalose	+	-	-	d	d
D-Xylose	-	-	-	+	-
D-Galacturonic acid	+	-	+	+	+
D-Glucuronic acid	d	-	-	-	+
Clucuronamide	-	-	-	-	+
L-Arginine	+	+	+	+	-
L-Histidine	+	+	d	+	d
L-Isoleucine	-	+	-	-	-
L-Leucine	-	+	d	+	+
L-Ornithine	+	+	+	+	-
L-Phenylalanine	+	-	-	d	-
D-Serine	d	-	d	-	-
L-Serine	+	+	+	+	d
β-Phenylethylamine	+	+	-	-	-
Cytosine	-	-	+	+	+
γ-Aminobutyric acid	+	+	+	+	d
Acetic acid	-	-	+	+	+

a, Korean Agricultural Culture Collection; b, positive; c, negative; d, variable result. T, Type strain of each subspecies.

독소를 저해하는 미생물을 이용하여 병의 발생을 억제하고자 실험을 실시하였다. 병원균이 분비하는 독소에 대해 저해를 나타내는 미생물을 선별하기 위하여 버섯배지로 부터 약 3,500균주의 미생물을 분리하여 저해정도를 조사하였다. 독소저해균의 선별은 감자 조각 위에 독소(tolaasin)와 분리균을 일정한 비율로 혼합하여 접종한 후 24시간이 지난 후에 감자의 갈변정도에 따라 저해균을 선별하였다. 실험 결과 대부분의 분리 미생물은 저해정도가 약하거나 거의 없었지만 분리균 HCl1 균주가 높은 갈변 증상과 감자에 병원성을 보이지 않아 독소저해균으로 선별하였다(Fig. 1). *P. tolaasii*에 대해 길항력을 가지는 미생물로는 *P. fluorescens*가 보고되어 있으며(Nair and Fahy, 1972), 국내에서도 길항미생물로 *P. fluorescens*가 보고되어 있지만, 신속하고 정확한 방제 효과를 기대하기 어렵고, 병 발생 후의 치료 효과가 매우 낮으며 환경의 영향을 많이 받기 때문에 처리 효과가 일정하게 나타나지 않는 등의 단점으로 생물농약으로 실용화되지는 못하고 있는 실정이다(Park et al., 1992).

**독소저해균 HCl1의 염기서열 분석**

병원균 *P. tolaasii*에 대한 독소저해균 HCl1 균주를 16S rDNA의 PCR 증폭에 의해 약 1.5 kb의 유전자를 확보하였으며, 그 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열을 Ribosomal database project를 이용하여 표준균주와 상동성을 비교 분석하였다. 그 결과 *Pseudomonas otitidis*와 94% 유사성을 보였으며, *Pseudomonas aeruginosa*와는 93%의 유사성을 보였다. 그러나 Neighbor Joining방법을 이용한 유연관계를 분석한 결과 저해균 HCl1는 *P. otitidis*와 *P. aeruginosa*와는 다른 새로운 그룹을 형성하였다(Fig. 2).

**독소저해균 HCl1의 특성조사**

저해균 HCl1의 생육은 7°C에서 생장이 가능하였지만 4°C와 47°C에서는 성장하지 않았다. Urease를 이용하였고, gelatin을 액화시켰으며, 4% NaCl과 5% NaCl에서 생장이 가능하였다. 그리고 이 균은 glycerol, D-sorbitol, D-fruc-

tose, L-fucose, D-trehalose, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, L-arginine, L-histidine, L-ornithine, L-phenylalanine, D-serine, L-serine, 그리고 β-phenylethylamine 등과 같은 당과 산을 이용하였다. 그러나 N-Acetyl-D-glucosamine, D-arabitol, D-mannitol, D-galactose, Sucrose, D-xylose, gentiobiose, maltose, clucuronamide, L-isoleucine, L-leucine, cytosine 그리고 acetic acid 등은 이용하지 못했다(Table 1). 부가적인 특성조사는 API 20E, 20NE 그리고 50CH 키트를 사용하였다. 독소저해균에 대한 fatty acid의 구성성분은 Table 2에서 나타내었다. 전체 지방산 중에서 주요성분은 Sum In Feature 8(18:1 w7), Summed Feature 8(18:1 w6c) 였고, 낮은 양의 16:1 w5c의 fatty acid가 존재하였다. FAME 분석에서는 유사도가 0.94로 *P. aeruginosa*로 동정되었으나, 생리생화학적 특성과 16S rDNA의 분석결과를 종합해 보면 *P. aeruginosa*와 다른 특성을 보였다. Tsukamoto 등(2002)이 독소(tolaasin)를 저해하는 미생물로 *Mycetocola*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pedobacter*, *Sphingobacterium* 등이 분리 동정되었다는 보고와는 다른 균이 분리되었다. 따라서 독소(tolaasin)를 저해하는 *Pseudomonas* 균에 대한 정확한 동정을 위해서는 더욱 세밀한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

**독소저해균 HCl1의 갈색무늬병 방제효과**

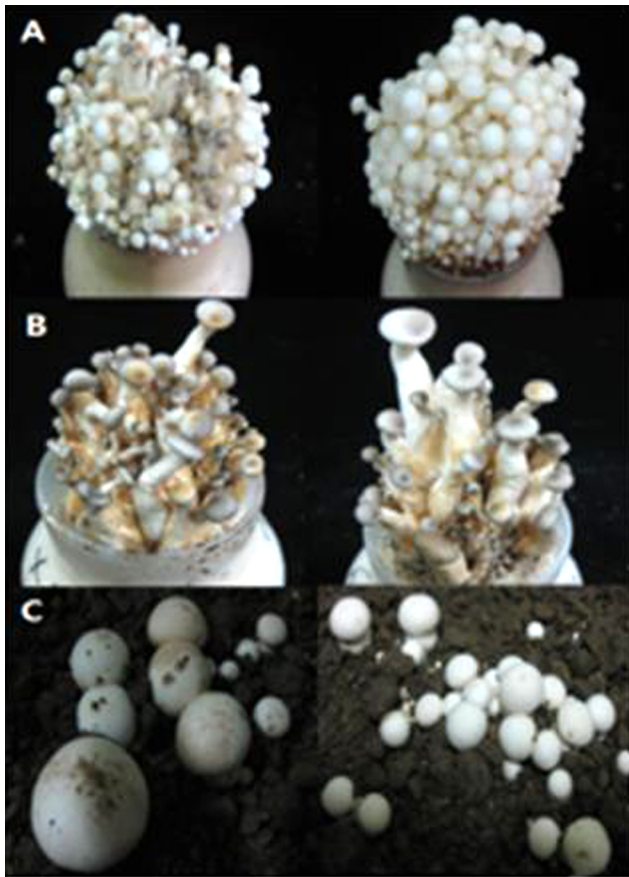
느타리버섯에 세균갈색무늬병균을 접종한 후에 HCl1을 처리한 결과 무처리구에서는 93.8%의 이병율을 보였지만 HCl1처리에서는 42.8%의 이병율을 보여 55%의 방제효과가 있었다. 양송이버섯에서는 무처리에서 56.3%의 이병율을 보였고, HCl1처리에서는 16.8%의 이병율을 보여 70%의 방제효과를 보였다. 그리고 팽이버섯에서는 무처리에서 89.8%의 이병율을 보였고, HCl1처리에서는 29.3%의 이병율을 보여 68%의 방제효과가 있었다. 이상의 결과로 HCl1균주는 세균갈색무늬병을 일으키는 거의 모든 버섯에 높은 병방제 효과가 있는 것으로 판단된다(Table 3, Fig. 3). *P. tolaasii*균의 생육을 억제하는 기작에 대한 연구는 거의 보고되어 있

**Table 2.** Fatty acid profile of strain of *Pseudomonas* sp. HCl1 by MIDI system

Fatty acid	HCl1	Fatty acid	HCl1
10:0	0.24	16:0	22.71
10:0 3-OH	3.44	17:1 w8c	0.18
12:0	3.36	17:0 cyclo	0.89
12:0 2-OH	3.56	17:0	0.08
12:1 3-OH	0.18	Sum In Feature 8 (18:1 w7)	42.40
12:0 3-OH	3.84	18:0	0.51
14:0	0.70	19:0 cyclo w8c	1.04
Sum in Feature 3 (16:1 w7c/16:1 w6c)	12.35	Summed Feature 3 (16:1 w6c/16:1 w7c)	16.79
Sum in Feature 3 (16:1 w7c/16:1 w7c)	4.44	Summed Feature 8 (18:1 w6c)	42.40
16:1 w5c	0.08		

**Table 3.** Control efficacy of brown blotch disease on different mushrooms by *Pseudomonas* sp. HC1 strain

Mushrooms	Treatments	Disease Occurrence (%)	Control value (%)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Non	93.8	55
	HC1	42.8	
<i>Agaricus bisporus</i>	Non	56.3	70
	HC1	16.8	
<i>Flammulina velutipes</i>	Non	89.8	68
	HC1	29.3	



**Fig. 3.** Effect of spraying of *Pseudomonas* sp. HC1 suspension on brown blotch disease development in *Flammulina velutipes* (A), *Pleurotus ostreatus* (B) and *Agaricus bisporus* (C). Left: Non, Right: HC1 treatment.

지 않으며, 이들 균에 대한 방제약제도 거의 없는 실정이다. 또한 세균갈색무늬병원균이 분비하는 독소(tolaasin) 물질을 억제시키는 세균을 선발하여 *in vitro* 실험을 한 결과는 보고되어 있지만(Tsukamoto *et al.*, 1998; 2002) 현재까지 세균갈색무늬병에 대한 생물적 제제가 개발되어 상품화된 것은 없으며 따라서 친환경적이고 인축에 해가 없으며 약제 저항성이 나타나지 않는 생물적제제의 개발이 시급하다.

## 적 요

*Pseudomonas tolaasii*에 의해 발생하는 세균갈색무늬병은 버섯재배에서 문제가 되는 대표적인 병해이다. 본 연구에서는 세균갈색무늬병의 생물학적 방제법에 이용할 수 있는 독소저해균의 항균활성과 선발된 독소저해균에 대해 포트 수준의 생물검정 실험을 실시하였다. 재배중인 느타리버섯 폐면배지와 양송이 퇴비에서 세균갈색무늬병원균이 분비하는 독소(tolaasin)를 가장 강하게 억제하는 미생물 HC1를 선발하였으며, 생리·생화학적 실험과 유전적 실험결과 HC1균주는 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다. 생물검정을 위하여 독소분해균 *Pseudomonas* sp. HC1을 양송이, 팽이, 느타리에 처리한 결과 각각 69%, 68%, 55%의 방제효과를 보였다. 따라서 *Pseudomonas* sp. HC1이 버섯 세균갈색무늬병 방제를 위해 합성농약을 대체할 수 있는 친환경적인 방제방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 기관고유연구과제(PJ0069262013)에 의하여 수행된 연구결과입니다.

## 참고문헌

- 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 Interact.* 4:407-411.
- Cho, K. H. and Kim, Y. K. 2003. Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 221:221-226.
- 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.
- 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.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, pp. 21-132. In: H. N. Munro (de.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, N. Y.
- Jourdan, F., Lazzaroni, S., Mendes, B. L., Lo Cantore, P., de Julio, M., Amodio, P., Iacobellis, N. S., Evidente, A. and Motta, A. 2003. A left-handed alpha-helix containing both L- and D-amino acids: the solution structure of the antimicrobial lipodepsipeptide tolaasin. *Proteins* 52:534-543.
- Kim, J. W., Kim, K. H. and Kang, H. J. 1994. Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushroom in Korea. 1. On the causal organisms of the rots of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Kor. J. Plant Pathol.* 10:197-210. (in Korean)
- Murata, H. and Magae, Y. 1996. Toxin production in a mushroom

- pathogenic bacterium, *Pseudomonas tolaasii* strain PT814 is activated by signals present in a host, *Pleurotus ostreatus*, and those accumulating in the medium in the course of bacterial growth. In: Mushroom biology and mushroom products, (ed. Royle, D. J.), pp. 483-494.
- Nair, N. G. and Fahy, P. C. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bacteriol.* 35: 439-442.
- 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.
- Paine, S. G. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Ann. Appl. Biol.* 5:206-219.
- Palleroni, N. J. 1984. Genus. *Pseudomonas*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. I, Ed. by N. R. Krieg and J. G. Holt, P. pp. 141-219. *Williams and Wilkins, Baltimore*.
- Park, B. S., Cho, N. C. and Chun, U. H. 1992. Identification of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and its cultivation. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 7:296-301. (in Korean)
- Rainey, P. B., Brodey, C. L. and Johnstone, K. 1992. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of cultivated mushroom. pp. 95-118 in: *Advances in Plant Pathology*, Vol. 8. J. H. Andrews and I. Tommerup, eds. Academic Press, Inc., New York.
- Reasoner, D. J. and Geldreich, E. E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:1-7.
- Stainer, R. Y., Palleroni, N. J. and Doudoroff, M. 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. General Microbiol.* 43: 159-271.
- Sasser, M. J. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical note 101. Newark, DE: Microbial ID Inc.
- 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. Japan* 61:493-502.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 34: 637.
- Tolaas, A. G. 1915. A Bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5:51-54.
- Tsuneda, A., Suyama, K., Muradami, S. and Ohira, I. 1995. Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed on *Quercus* logs. *Mycoscience* 36:283-288.
- Tsukamoto, T., Shirata, A., and Murata, H. 1998. Isolation of a Gram-positive bacterium effective in suppression of brown blotch disease of cultivated mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*, caused by *Pseudomonas tolaasii*. *Mycoscience* 39:273-278.
- Tsukamoto, T., Murata, H., and Shirata, A. 2002. Identification of non-Pseudomonad bacteria from fruit bodies of wild Agaricales fungi that detoxify tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:2201-2208.
- 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.
- 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.