

平菇和双孢蘑菇细菌性褐斑病研究进展

张瑞颖¹ 胡丹丹² 左雪梅¹ 王贺祥³ 姜瑞波^{1*}

(1. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081; 2. 北京自然博物馆, 北京 100050; 3. 中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要: 目前我国平菇和双孢蘑菇的年产量分别为 248.8 万 t 和 133.0 万 t, 在我国食用菌产业中居第一和第三位。随着周年生产的实行和栽培规模的日益扩大, 平菇和双孢蘑菇的细菌性褐斑病也日益严重。子实体被感染后, 菌盖表面出现圆形或椭圆形褐色凹陷斑, 在潮湿条件下, 尤其是菌盖表面有水膜时, 该病最容易发生。细菌性褐斑病的病原菌是托拉氏假单胞菌 *Pseudomonas tolaasii*, 主要致病因子是托拉氏毒素 (tolaasin)。该文作者从病原菌研究、致病机制和防治等几个方面对平菇和双孢蘑菇褐斑病进行了综述。

关键词: 褐斑病; 托拉氏假单胞菌; 托拉氏毒素

Research advancement on brown blotch disease of oyster mushroom and button mushroom

Zhang Ruiying¹ Hu Dandan² Zuo Xuemei¹ Wang Hexiang³ Jiang Ruibo^{1*}

(1. Chinese Academy of Agricultural Sciences Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Beijing 100081, China; 2. Beijing Museum of Natural History, Beijing 100050, China; 3. College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The oyster mushroom and button mushroom are important cultivated edible fungi, and the yields of them are 2 488 and 1 330 thousand tons respectively per year in China. The bacterial brown blotch disease deteriorated and caused heavily economic loss when the cultivation scale was enlarged with year-round technology during last several years. The typical symptoms were that there were superficial brown lesions on pileus. The pathogen factor is tolaasin produced by *P. tolaasii*. The review presents recent studies about *P. tolaasii*, disease mechanism and control strategies.

Key words: brown blotch disease, *Pseudomonas tolaasii*, tolaasin

细菌性褐斑病 (brown blotch disease) 又称为细菌性斑点病、锈斑病, 主要危害平菇 *Pleurotus ostreatus* 和双孢蘑菇 *Agaricus bisporus*^[1], 在香菇 *Lentinula edodes*^[2]、金针菇 *Flammulina velutipes*、杏孢菇 *Pleurotus eryngii*^[3] 等食用菌上也有发生。随着周年生产的实行和栽培规模的日益扩大, 平菇和双孢蘑菇的细菌性褐斑病日益严重, 尤其春秋季节。菇场内一旦发生褐斑病, 就很难彻底防治, 并经常是逐年加

重, 严重时发病率甚至达到 80% 以上。褐斑病不仅影响食用菌产量, 更重要的是降低食用菌品质, 每年给食用菌产业造成非常严重的损失。

1 细菌性褐斑病症状

病原菌只侵染子实体的表面组织, 不危害菌肉, 感染深度一般不超过 2~3 mm。被感染后, 菌盖表面出现圆形或椭圆形褐色凹陷斑, 在潮湿条件下, 病

基金项目: 国家科技基础条件平台建设项目 (2005DKA21201)

作者简介: 张瑞颖, 男, 1976 年生, 博士研究生, 主要从事食用菌学研究, email: ruiying.zhang@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: accc@caas.ac.cn, Tel: 010-68918636

收稿日期: 2007-08-24

斑表面有一薄层菌脓,当斑点干燥后,菌盖开裂。菌柄上偶尔也发生纵向凹陷斑,但菌褶很少被感染。如果感染原基或菇蕾,可导致子实体发育畸形甚至停止发育。褐斑病不仅发生在菇场内,采摘后的子实体在加工、包装、运输和销售过程中的褐变有时也与褐斑病有关,尤其是在低温高湿的条件下,严重影响蘑菇的商品性状,缩短保鲜食用菌的货架期。

2 病原菌的分离、鉴定与分类学研究

Tolaas^[1]最早对蘑菇细菌性褐斑病进行描述,随后 Paine 将病原细菌鉴定为 *Pseudomonas tolaasii*。致病性测试^[4]和 WLT(white line test)^[5]是鉴定 *P. tolaasii* 常用的方法。致病性测试是将 *P. tolaasii* 的菌悬液接种到新鲜健康的子实体菌盖表面,控制湿度和温度,培养 24~72 h,观察发病症状。WLT 是将 *P. tolaasii* 和 *Pseudomonas* “*reactans*” 间隔几毫米的距离同时接种在金氏 B 培养基平板,25℃培养 24~48 h,*P. tolaasii* 分泌的 tolaasin 和 *P. “reactans”* 产生的 WLIP(white line inducing principle)能特异性地反应形成白色沉淀线。除此之外,生理生化^[6]和嵌套 PCR^[7]也是鉴定 *P. tolaasii* 常用的方法。

传统分类学上 *P. tolaasii* 属于 fluorescent *Pseudomonas* biotype II^[8],新的分类学研究发现 *P. tolaasii* 可能是高度异源的^[9-10]。除了 *P. tolaasii* 之外,*Pseudomonas gingeri*^[11]、*Pseudomonas reactans*^[12] 和 *Pseudomonas costantini*^[13] 也能引起蘑菇斑点性病害。*P. gingeri* 感染菌盖表面产生黄色斑点,*P. gingeri* 的 WLT 反应呈阴性。*P. reactans* 感染菌盖表面形成浅黄色斑点。*P. costantini* 感染子实体产生的症状以及 WLT 反应与 *P. tolaasii* 相同,但是根据数值分类、siderotyping、DNA-DNA 杂交以及 16S rDNA 系统发育学分析的结果,Munsch 等^[13] 将其鉴定为假单胞菌属的一个新种。

根据菌落形态 *P. tolaasii* 可分为光滑型(S型)和粗糙型(R型)。S型也称为野生型,在金氏 B 培养基或 PAF 培养基上的菌落表面光滑、粘稠、有光泽、边缘整齐、不透明、不产荧光色素,具有致病性;而 R 型,即突变型,菌落粗糙、半透明、边缘不整齐、产荧光色素、无致病性^[14]。在人工培养条件下,R 型比较稳定,而 S 型易于发生突变形成 R 型^[15-17]。

P. tolaasii 的菌体形态明显受环境条件的影响。生长条件适宜时,菌体为杆状;在逆境条件下,如温度、紫外线(UV)、乙醇、氯化钠等逆境胁迫下,菌体

为球状^[18]。*P. tolaasii* 在 *P. ostreatus*、*A. bisporus* 等宿主上也是球状,而在分离培养基上则为杆状,因此在褐斑病病原菌的分离鉴定时要注意菌体形态的变化。

3 致病机制

3.1 毒素的结构

细菌性褐斑病的主要致病因子是 *P. tolaasii* 产生的细胞外毒素 tolaasin^[19-22]。Nutkins 等^[23] 首先分离纯化了 Tol I 和 Tol II 两种 tolaasin,其分子量分别为 1985 D 和 1941 D,其中以 Tol I 为主。Tol I 是由 1 个 β -羟基辛酸和 18 个氨基酸残基组成的环脂肽,大多数氨基酸残基为 D 型,少数为 L 型,其中包括高丝氨酸(Hse)、2,4-2 氨基丁酸(Dab)、脱氢氨基丁酸(Δ But)4 种不常见氨基酸。Tol I 的氨基酸残基和脂肪酸的序列为: β -hydroxyoctanoyl- Δ But-D-Pro-D-Ser-D-Leu-D-Val-D-Ser-D-Leu-D-Val-L-Val-D-Gln-L-Leu-D-Val- Δ But-D-alloThr-L-Ile-L-Hse-D-Dab-L-Lys。N 端为左手 α -螺旋,C 端的脂肽环为舟式构象,整个 tolaasin 形状像一个高尔夫球杆^[24]。后来 Bassarello 等^[25] 纯化分离到了 A、B、C、D、E、Tol I 和 Tol II 7 种 tolaasin,其中 Tol II、A、B、C、D、E 的结构与 Tol I 相似,其差异主要是个别氨基酸残基不同。所有的 tolaasin 都是两性化合物,具有亲水基(电离的氨基)和疏水基(非极性 R 基氨基酸残基和 β -羟基丁酸组成的脂肽链),是一种生物表面活性剂。

3.2 毒素的产生

tolaaasin 是非核糖体机制合成的,其合成需要多种酶参与。Raine 等^[26] 利用转座子 Tn5 诱变 *P. tolaasii* 发现染色体上至少有 5 个位点与 tolaasin 合成有关,其中包括 3 个蛋白编码基因 TL1、TL2 和 TL3。

tolaaasin 的合成还受 pheN 基因和 glp 系统的调节。pheN 基因与双组分调控系统中的感应蛋白基因同源,属于 *P. tolaasii* 的一个双组分调控系统,该双组分调控系统通过对大量基因的调节来调控 *P. tolaasii* 的代谢,同时 pheN 基因自身的表达又受环境和自身代谢产物的调控^[15]。pheN 基因 ORF 内一段 661 bp 的序列发生重复(duplication)会导致 S 型转变为 R 型,失去合成 tolaasin 的能力,丧失致病性^[16,27]。对 glpD 基因的插入失活会导致 *P. tolaasii* 发生多效突变,失去致病力,由此推断 glp 系统与 *P. tolaasii* 的生态密切相关^[28]。

不同的研究报道中,*P. tolaasii* 的生长曲线和 tolaasin 的产生规律有所不同。Nair 等^[29]报道 tolaasin 的产生开始于对数生长的初期,对数生长的后期停止。Raney 等^[21]报道 tolaasin 的产生开始于对数生长的中期,一直持续到稳定期的后期。并且在开始产生 tolaasin 的时候,细菌数量明显下降,然后继续增加,目前 tolaasin 产生初期 *P. tolaasii* 菌体自溶的机制还并不清楚。

3.3 毒素作用机制

tolaasin 通过与细胞膜相互作用,最终导致蘑菇菌盖表面产生黄褐色斑点,除此之外, tolaasin 还有抑制革兰氏阳性细菌和真菌,以及溶血活性^[21]。

通过与马红血细胞的相互作用发现 tolaasin 与细胞膜的作用机制有两种方式。一是当 tolaasin 浓度较低时, tolaasin 的脂肽结构使其能够插入膜脂层中形成孔道^[21],改变了细胞膜的通透性,影响离子跨膜运输,使离子外泄,导致细胞代谢紊乱。利用渗透保护剂 PEG 测定孔道的直径约为 0.6 ~ 1.0 nm。Zn²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 等二价金属离子可以抑制 tolaasin 的溶血作用,因为二价金属离子与质膜外表面上孔道形成位点附近的负电基团发生螯合,抑制了孔道的形成。二是当 tolaasin 浓度较高时, tolaasin 直接通过表面活性剂作用破坏细胞膜,而不受 Zn²⁺ 等二价金属离子的影响, Hutchison 等^[30]测定 tolaasin 能将水的表面张力降低到 40 ~ 42 mN m⁻¹。

3.4 褐变机制

平菇和双孢蘑菇等蘑菇子实体在感染 *P. tolaasii*、受损伤或衰老过程中会发生褐变,原因是酚类物质(phenolic substrates)在酶的作用下氧化生成醌类物质(quinones),在酶的催化下继续氧化并聚合生成黑色素(melanin)。蘑菇子实体中的酚类物质主要包括酪氨酸(tyrosine)、 γ -谷氨酰胺酰-4-羟基苯(γ -L-glutaminy-4-hydroxybenzene, GHB)和 γ -谷氨酰胺酰-3,4-二羟基苯(γ -L-glutaminy-3,4-dihydroxybenzene, GDHB)。

真菌中催化这些反应的酶类主要包括多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPOs)和过氧化物酶(peroxidases),其中多酚氧化酶包括漆酶(laccase)和酪氨酸酶(tyrosinases)。过氧化物酶和漆酶主要存在于菌丝体中,而酪氨酸酶主要分布在菌盖和菌柄中,尤其是菌盖表皮中的酪氨酸酶含量最高,但是这些酪氨酸酶绝大多数是以无活性的酶原状态存在。同时

由于质膜的分隔作用,正常状态下酪氨酸酶和酚类物质存在于细胞的不同部位。因此褐变的发生需要两个过程,首先是质膜的分隔遭到破坏,导致酪氨酸酶与酚类物质接触,然后是酪氨酸酶的活化^[31]。

如前所述, tolaasin 可以通过两种方式破坏质膜,导致酪氨酸酶与酚类物质接触。而酪氨酸酶的激活比较复杂,需要蛋白酶,或者是其它能打开蛋白的折叠或改变蛋白构象的物质,如脂肪酸、表面活性剂或变性剂等。Soler-Rivas 等^[32]通过体外和体内试验证实,在不需蛋白酶的条件下, tolaasin 可以独立的激活酪氨酸酶。

4 防治

4.1 农业防治

P. tolaasii 在自然界分布极广,培养料、覆土以及不洁净的水中均有,在 15℃ 以上、空气湿度大于 85% 时,尤其是菌盖表面有水膜时病菌非常活跃,通过人体、气流、虫类和工具等渠道广泛传播。农业防治又称为环境管理或栽培防治,涉及食用菌的栽培料的配方、栽培场所的卫生、周围环境、菌种制作、接种、发菌、出菇管理、子实体采摘等各个方面,目的是最大限度的控制 *P. tolaasii* 菌的生长、繁殖和传播,预防褐斑病的发生和蔓延。栽培之前,清理并保持周围环境的卫生,对菇棚、床架、用具等彻底消毒,同时菇房应安装纱门、纱窗防虫;培养料和覆土材料应按要求发酵、灭菌或消毒;使用清洁水源,喷水后立即通风 30 ~ 60 min,使菌盖表面干燥,避免表面长时间存有水膜;发现病菇及时摘除,并在料面撒一层石灰粉。

4.2 化学防治

食用菌病害的化学防治往往比较困难,防治措施不当,会两败俱伤。因为食用菌作为一类食品,子实体生长期比较短,用药时一定要选用高效、低毒、绿色环保、特异性强的药剂,防止对人体或食用菌本身造成危害。目前还没有非常有效的控制褐斑病的化学防治药剂,常用的防治褐斑病的化学制剂主要有农用链霉素、春日霉素^[33]、漂白粉液^[34]和溴硝醇(bronopol)^[35]等,但在实际应用中效果并不很理想。

4.3 生物防治

目前褐斑病生物防治的研究主要集中在拮抗菌和 tolaasin 毒素降解或中和菌的筛选和研究方面。Fermor 等^[36-37]从菇场、土壤、植物材料上分离筛选了一批 *P. tolaasii* 的拮抗菌,能显著降低褐斑病的

危害程度,具有一定研究和应用价值。Soler-Rivas等^[38]发现 *P. reactans* 产生的 WLIP(white line inducing principle)能中和 tolaasin,在褐斑病生物防治中具有应用开发的潜力。Tsukamoto等^[39]从腐烂的平菇 *P. ostreatus* 子实体上分离到一株 gram-positive bacterium,该细菌能显著降低 *P. tolaasii* 产生 tolaasin 的水平。Tsukamoto等^[40]从伞菌目(Agaricales)子实体上分离的 *Mycetocola tolaasinivorans*、*Mycetocola lacteus*、*Acinetobacter* sp.、*Bacillus pumilus*、*Sphingobacterium multivorum*、*Pedobacter* sp. 都具有解除 tolaasin 毒性的能力。但目前褐斑病的生物防治大多数处于研究阶段,尚没有实际应用的报道。

4.4 抗病品种

利用抗病品种控制细菌性病害是最经济、最有效的方法之一。遗传学抗性的利用可以为病害的长期控制策略提供有效手段。目前已经发现了一些与抗病性相关的性状、基因或分子标记。Moquet等^[41]报道褐色双孢蘑菇品种的抗病性比白色品种强,而平菇恰恰相反,白色品种往往比灰色或黑色品种的抗病能力强。Moquet等^[42]发现与褐斑病抗性有关的数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)与 PPC1(pileipellis color 1)位点连锁。但是目前还没有培育出有效抗褐斑病的平菇或双孢蘑菇品种。

5 展望

我国作为食用菌生产大国,总产量约占全世界的70%以上,平菇和双孢蘑菇是我国两个重要的栽培种类。褐斑病已经严重影响了菇农的经济效益和种菇积极性,因此加快细菌性褐斑病的防治研究,探索有效的预防控制手段迫在眉睫。

抗病品种的培育是细菌性褐斑病预防控制最有前景和最有效的措施。食用菌生长发育所需的环境条件本身有利于细菌性褐斑病的发生,考虑到环境和食品安全的要求,以及大多数的杀菌剂对食用菌本身的危害,人们对抗病品种的培育越来越重视。虽然目前还没有成功获得抗细菌性褐斑病的平菇或双孢蘑菇品种,但在植物抗病品种的选育中已经有许多成功的经验可以借鉴。培育抗病品种的第一步是对广泛的种质资源进行抗性鉴定,然后将筛选到的抗病种质直接栽培利用,也可以通过杂交或分子育种手段将抗性基因与其它基因型结合进行新品种培育。

平菇和双孢蘑菇丰富的种质资源为抗病性鉴定和筛选提供了基础。平菇是侧耳的俗称,已知侧耳属有50种,商业化栽培的有10余种,主要有糙皮侧耳 *P. ostreatus*、黄白侧耳 *P. cornucopiae*、紫孢侧耳 *P. sapidus*、肺形侧耳 *P. pulmonarius*、佛罗里达侧耳 *P. florida*、鲍鱼侧耳 *P. abalonus*、金顶侧耳 *P. citrinopil-eatus*、红侧耳 *P. djamor*、白灵侧耳 *P. nebrodensis* 和刺芹侧耳 *P. eryngii* 等,并且这些近缘种之间大多数可以杂交^[43]。目前世界上所用双孢蘑菇品种大多数来源于同一菌株,导致商业栽培品种的遗传多样性非常匮乏^[44]。为了改变这种状况,加拿大真菌学家 Kerrigan等^[45]于1988年发起了全球性收集鉴定双孢蘑菇种质资源的计划。虽然目前栽培品种的遗传资源比较单一,但是可以供抗病性筛选和鉴定的野生种质资源非常丰富。

参考文献(References)

- 1 Tolaas A G. A bacterial disease of cultivated mushroom. *Phytopathology*, 1915, 5: 51 - 54
- 2 Tsuneda A, Suyama K, Murakami S, et al. Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed on *Quercus* logs. *Mycoscience*, 1995, 36(3): 283 - 288
- 3 Russo A, Filippi C, Tombolini R, et al. Interaction between gfp-tagged *Pseudomonas tolaasii* P12 and *Pleurotus eryngii*. *Microbiological Research*, 2003, 158(3): 265 - 270
- 4 Gandy D G. A technique for screening bacteria causing brown blotch of cultivated mushrooms. // Annual report. Littlehampton, UK: Glasshouse Crops Research Institute, 1968: 150 - 154
- 5 Wong W C, Preece T F. Identification of *Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *Journal of Applied Bacteriology*, 1979, 47(3): 401 - 407
- 6 Lelliott R A, Billings E, Hayward A C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 1966, 29(3): 470 - 489
- 7 Lee H I, Jeong K S, Cha J S. PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 35(4): 276 - 280
- 8 Goor M, Vantomme R, Swings J, et al. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *Microbiology*, 1986, 132(8): 2249 - 2264
- 9 Godfrey S A C, Harrow S A, Marshall J W, et al. Characterization by 16S rRNA sequence analysis of *Pseudomonads* causing blotch disease of cultivated *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4316 - 4323

- 10 Munsch P, Geoffroy V A, Alatossava T, et al. Application of siderotyping for characterization of *Pseudomonas tolaasii* and '*Pseudomonas reactans*' isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4834–4841
- 11 Wong W C, Fletcher J T, Unsworth B A, et al. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1982, 52(1): 43–48
- 12 Wells J M, Sapers G M, Fett W F, et al. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. 'reactans'*, and *P. 'gingeri'*. *Phytopathology*, 1996, 86(10): 1098–1104
- 13 Munsch P, Alatossava T, Martinen N, et al. *Pseudomonas costantini* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(6): 1973–1983
- 14 Cutri S S, Macauley B J, Roberts W P. Characteristics of pathogenic non-fluorescent (smooth) and non-pathogenic fluorescent (rough) forms of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas gingeri*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1984, 57(2): 291–298
- 15 Grewal S I S, 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*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(16): 4658–4668
- 16 Han B, Pain A, Johnstone K. Spontaneous duplication of a 661 bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Molecular Microbiology*, 1997, 25(2): 211–218
- 17 Himansu S, Pain A, Johnstone K. Analysis of the role of *recA* in phenotypic switching of *Pseudomonas tolaasii*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(22): 6532–6535
- 18 Murata H. Characteristics of stress response in a mushroom-pathogenic bacterium, *Pseudomonas tolaasii*, during the interaction with *Pleurotus ostreatus* and carbon/nitrogen starvation *in vitro*. *Mycoscience*, 1999, 40(1): 81–85
- 19 Brodey C L, Rainey P B, Tester M, et al. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1991, 4(4): 407–411
- 20 Rainey P B, Brodey C L, Johnstone K. Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1991, 39(1): 57–70
- 21 Rainey P B, Brodey C L, Johnstone K. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom. *Advances in Plant Pathology*, 1992, 8: 95–117
- 22 Moquet F, Mamoun M, Olivier J M. *Pseudomonas tolaasii* and tolaasin; comparison of symptom induction on a wide range of *Agaricus bisporus* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 142(1): 99–103
- 23 Nutkins J C, Mortishire-Smith R J, Packman L C, et al. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Journal of the American Chemical Society*, 1991, 113(7): 2621–2627
- 24 Jourdan F, Lazzaroni S, Mendez B L, et al. A left-handed alpha-helix containing both L- and D-amino acids; the solution structure of the antimicrobial lipodepsipeptide tolaasin. *Proteins*, 2003, 52(4): 534–543
- 25 Bassarello C, Lazzaroni S, Bifulco G, et al. Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(5): 811–816
- 26 Rainey P B, Brodey C L, Johnstone K. 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 Microbiology*, 1993, 8(4): 643–652
- 27 Murata H, Tsukamoto T, Shirata A. *rtpA*, 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*, 1998, 39(3): 261–271
- 28 Murata H. Molecular cloning of *glpFKRD* of a mushroom-pathogenic bacterium, *Pseudomonas tolaasii* strain PT814; induction of an avirulent mutant carrying a single mini-Tn5km1 insertion in *glpD*. *Mycoscience*, 1999, 40(4): 353–358
- 29 Nair N J, Fahy P C. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1973, 26(2): 509–512
- 30 Hutchison M L, Johnstone K. Evidence for the involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1993, 42(5): 373–384
- 31 Jolivet S, Arpin N, Wichers H J, et al. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycological Research*, 1998, 102(12): 1459–1483
- 32 Soler-Rivas C, Arpin N, Olivier J M, et al. Activation of tyrosinase in *Agaricus bisporus* strains following infection by *Pseudomonas tolaasii* or treatment with a tolaasin-containing preparation. *Mycological Research*, 1997, 101(3): 375–382
- 33 Geels F P. *Pseudomonas tolaasii* control by kasugamycin in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79(1): 38–42
- 34 Wong W C, Preece T F. *Pseudomonas tolaasii* in cultivated

- mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: effects of sodium hypochlorite on the bacterium and on blotch disease severity. *Journal of Applied Bacteriology*, 1985, 59(3): 259 – 267
- 35 Wong W C, Preece T F. *Pseudomonas tolaasii* in mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: activity of formulations of 2-bromo-2-nitropropane-1, 3-diol (bronopol) against the bacterium and the use of this compound to control blotch disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 1985, 58(3): 275 – 281
- 36 Fermor T R, Lynch J M. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*: screening, isolation and characterization of bacteria antagonistic to the pathogen (*Pseudomonas tolaasii*). *Journal of Applied Bacteriology*, 1988, 65(3): 179 – 187
- 37 Fermor T R, Henry M B, Fenlon J S, et al. Development and application of a biocontrol system for bacterial blotch of the cultivated mushroom. *Crop Protection*, 1991, 10(4): 271 – 278
- 38 Soler-Rivas C, Arpin N, Olivier J M, et al. WLIP, a lipodepsipeptide of *Pseudomonas reactans*, as inhibitor of the symptoms of the brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 86(4): 635 – 641
- 39 Tsukamoto T, Shirata A, Murata H. 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*, 1998, 39(3): 273 – 278
- 40 Tsukamoto T, Murata H, Shirata A. Identification of non-pseudomonad bacteria from fruit bodies of wild *Agaricales fungi* that detoxify tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, 66(10): 2201 – 2208
- 41 Moquet F, Mamoun M, RamosGuedes-Lafargue M, et al. Differences in susceptibility of *Agaricus bisporus* strains to bacterial blotch and in natural cap colour related to compost composition. *Plant Breeding*, 1998, 117(4): 385 – 388
- 42 Moquet F, Desmerger C, Mamoun M, et al. A quantitative trait locus of *Agaricus bisporus* resistance to *Pseudomonas tolaasii* is closely linked to natural cap color. *Fungal Genetics and Biology*, 1999, 28(1): 34 – 42
- 43 Bao D, Kinugasa S, Kitamoto Y. The biological species of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) from Asia based on mating compatibility tests. *Journal of Wood Science*, 2004, 50(2): 162 – 168
- 44 Sánchez C. Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(6): 756 – 762
- 45 Kerrigan R W, Royer J C, Baller L M, et al. Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. *Genetics*, 1993, 133(2): 225 – 236