

느타리버섯 세균성갈반병균 *Pseudomonas tolaasii*의 효소면역검출법

이항범 · 전낙범 · 손동화¹ · 유승헌*

충남대학교 농과대학 응용생물화학학부

¹한국식품개발연구원 식품생물공학이화학연구본부

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays of *Pseudomonas tolaasii*, a Bacterial Brown Blotch Pathogen of Oyster Mushroom. Lee, Hyang-Burm, Nak-Beom Jeon, Dong-Hwa Shon¹, and Seung Hun Yu*. Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea, ¹Food Chemistry and Biotechnology Division, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-420, Korea - For simple and rapid detection of *Pseudomonas tolaasii* (PT), a bacterial brown blotch pathogen of oyster mushroom, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were developed. To produce specific antibody, PT (5×10^7 cfu) and Freund's adjuvant were subcutaneously immunized into rabbits several times. By using the antiserum showing the highest titer, we established noncompetitive and competitive ELISA's. Standard curves of the ELISA's showed that the detection limits were 2×10^2 cfu/ml and 3×10^2 cfu/ml, respectively. When investigated by noncompetitive ELISA, cross reactivities of the anti-PT antibodies against *P. agarici*, *P. reactans*, and other fluorescent *Pseudomonas* spp. were very low ($<1/10^3$), but those against *P. solanacearum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Streptococcus mutans*, *Xanthomonas citri*, and a fungus *Fusarium oxysporum* were almost none. However, when investigated by competitive ELISA, the reactivities against any other strains except PT were almost none. When the ELISA's were applied to 18 strains derived from mushrooms in order to identify PT, only 11 strains showing both pathogenicity and white line reactivity were obviously positive. These results showed that the ELISA's could be convenient tools to detect PT in accordance with existing methods.

Key words: ELISA, *Pseudomonas tolaasii*, polyclonal antibody, oyster mushroom

느타리버섯의 세균성갈반병(bacterial brown blotch)은 형광 *Pseudomonad*의 일종인 *Pseudomonas tolaasii* Paine에 의해 주로 발생하는 것으로 알려져 있다. 이 병원균은 1915년 Tolaas에 의해 처음 양송이에서 보고되었고 1919년 Paine에 의해 정식으로 명명되었다[10, 12]. *P. tolaasii*(PT)는 양송이 뿐 아니라 느타리버섯, 팽이버섯에도 발생하여 피해를 주며 생육중인 버섯 뿐 아니라 저장중인 버섯에도 썩음병을 일으켜 큰 피해를 준다[13]. 국내에서는 특히 느타리버섯에서 피해가 크며[4, 5] 이 균에 의한 세균성갈반병의 병징은 건조에 의한 갈변, 관수과다에 의한 갈변 및 부패증상과 유사한 경우가 많아 세심한 관찰을 하지 않으면 잘못 진단할 수가 있다. PT는 *Pseudomonas*속 세균중에서 WLRO(white line reacting organism)균주와 한천배지상에 대치배양할 경우 그 중앙부위에 백색 침강선(precipitate of white line)을 형성하는 특징이 있는데, 이 침강반응은 비교적 특이성이 높아 rapid pitting test와 함께 PT의 동정이나

검출에 자주 이용되어 왔다[14]. 그러나 이 방법도 때로는 특이성에서 문제가 제기되고 있어 병원세균의 정확한 동정을 위하여는 균의 세균학적 성질 및 병원성 조사와 같은 많은 노력과 시간이 소요되는 작업이 요구된다. 따라서 병원세균을 신속하고 정확하게 동정할 수 있는 간편한 진단법이 개발된다면 이 병의 예방 및 방제에 효과적으로 활용될 수 있을 것이다. 한편 식물병원균의 검출 및 동정을 위한 방법중에서 면역화학적 방법의 이용은 지금까지 몇몇 세균에 한정되어 이루어져 왔으나 점차 다양한 미생물들의 동정을 위한 신속하고 간편한 assay 방법으로서 주목받고 있다[1-3, 8, 9]. 본 연구에서는 *P. tolaasii*의 신속하고 정확한 동정을 위하여 항PT항혈청을 이용한 효소면역측정법(ELISA)을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 특이항체의 생산, ELISA의 조건확립, 다른 균주와의 교차반응조사, 그리고 버섯자실체로부터 분리한 여러균주에 대한 ELISA를 실시하였다.

재료 및 방법

재료

*Corresponding author
Tel. 82-42-821-5762, Fax. 82-42-823-8679
E-mail: shunyu@hanbat.chungnam.ac.kr

본 연구에 사용한 bovine serum albumin(BSA), goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate, Freund's complete adjuvant(FCA)와 Freund's incomplete adjuvant (FIA), 5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride(TMB), tris(hydroxymethyl) amino methane(TRIZMA, BASE), phosphate-buffered saline (PBS), sodium azide(NaN_3), Tween 20은 Sigma사의 제품을 사용하였고, ethanol 등 기타의 시약과 유기용매는 GR급 이상을 사용하였다. 면역용 실험동물은 체중 2.5 Kg가량의 웅성 New Zealand white 토끼로 삼육실험동물연구소(경기도 오산)에서 구입하였다. 흡광도 측정을 위한 spectrophotometer는 Colorimeter(Jenway, PCO_2)를, microtiter plate는 Nunc사의 MaxiSorp™ (#446612)를, microplate reader는 Molecular Devices사의 THERMOmax™를 사용하였다.

균주의 분리 및 동정

느타리버섯 세균성갈반병반으로부터 다수의 세균을 분리하였으며 그 동정을 위하여 세균학적 성질 및 병원성 검정을 실시하였다. 세균학적 성질로는 질산염환원, arginine dehydrolase, 형광색소생성, 젤라틴액화, indol생성, 당이용성, oxidase test, catalase test, white line test 등을 조사하였고 browning test를 비롯한 병원성 검정을 실시하여[7, 14] 그 결과를 Paine[10], Suyama 등[11]이 보고한 *P. tolaasii*의 특성과 비교하여 동정하였다.

White line 검정법

Wong과 Preece[14]의 방법에 따라 느타리버섯 이병자실체로부터 분리한 *Pseudomonas* 균주를 *Pseudomonas* Agar F(PAF)배지에 일직선으로 획선배양하고 이에 직각으로 일본 東京農業大學에서 분양받은 white line 형성균주(*P. reactans*)를 접종하여 25°C 항온기에서 24시간 배양한 다음 백색침강선의 형성유무를 조사하였다.

항PT항체의 생산

느타리버섯의 갈반병반에서 분리한 여러 PT균주중 P-1의 기호를 붙인 균주를 특이항체 생산을 위한 면역원으로 사용하였다. 이 균주를 nutrient액체배지에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하고 동결건조하였다. 건조균체 10^8 cfu를 phosphate buffered saline (PBS: 1.9mM Na_2HPO_4 , 154 mM NaCl, pH 7.4) 1 ml에 분산시키고 Freund's complete adjuvant와 동량비(1:1, v/v)로 만든 유탁액을 토끼 한 마리당 1 ml씩 뒷발 바닥에 피하주사로 1차 면역하였다. 이후 2주일 간격으로 Freund's incomplete adjuvant와 함께 등에 피하주사로 수차례 추가면역하였고 면역 1주일 후에 각각 귀의

정맥으로부터 채혈하였다. 채혈후 3시간 가량 실온에 방치하여 혈액이 응고된 다음 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 항혈청을 분리하였고 0.02% NaN_3 를 첨가하여 냉동보관하였다.

비경합 ELISA(noncompetitive ELISA)

특이항체의 역가검정 및 PT의 분석을 위한 비경합 ELISA를 다음과 같이 실시하였다. 즉 항원인 PT를 10^7 cfu/ml 밀도가 되도록 coating buffer(0.02M Tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 분산시켜 well당 100 μ l씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하여 표면에 흡착시킨 다음 washing buffer(0.02M Tris, 0.15M NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.4)로 150 μ l씩 3회 세척한 후 항PT항혈청(washing buffer로 1/10,000배 희석) 100 μ l씩 넣고 실온에서 1시간 항원 항체반응시켰다. 이후 다시 washing buffer로 3회 세척하고 2차 항체인 anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate(washing buffer로 1/15,000배 희석)를 well당 100 μ l씩 넣고 상온에서 1시간 방치하여 반응시킨 다음 washing buffer로 3회 세척하고 이어서 기질용액(0.01% TMB, 0.05% phosphate citrate buffer, pH 5.0, 사용용 H_2O_2 를 최종농도 0.02%가 되도록 첨가)을 well당 100 μ l를 넣고 30분간 방치하여 발색시킨 다음 반응정지액(2M H_2SO_4) 50 μ l를 첨가하고 microplate reader로 파장 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 다만 PT를 분석하기 위한 경우에는 균주의 coating시 coating buffer로 희석하여 밀도를 달리한 균주분산액을 사용하였다.

경합 ELISA(competitive ELISA)

PT를 분석하기 위한 경합 ELISA는, 10^7 cfu/ml의 PT분산액을 흡착시킨 다음 washing buffer로 희석한 균주분산액을 항혈청과 1:1로 혼합한 액 100 μ l를 각 well에 처리하여 항원-항체반응시 항체가 well 표면에 부착된 항원과 균주분산액중의 항원간에 경합시키는 점 이외에는 비경합 ELISA와 같이 행하였다.

항PT항체의 교차반응(cross-reactivity)

PT와 *P. agarici*, *P. reactans*, *P. solanacearum* 그리고 비병원성인 형광 *Pseudomonas*속균, *Erwinia chrysanthemi*, *Streptococcus mutans*, *Xanthomonas citri* 등의 균주에 대한 항PT항체의 반응성을 비경합 및 경합 ELISA로 조사하였다.

ELISA에 의한 PT의 검출

느타리버섯의 이병자실체로부터 분리된 다양한 형태의 colony를 배지에서 배양한 다음 병원성 test와 간이동정법으로 사용하는 white line test를 실시하여[14] 병원

세균인 PT를 간이동정 하였고 이들 균주에 대한 비경합 및 경합 ELISA 반응을 조사하였다.

비석출물로부터 PT검출

Coating buffer가 들어있는 막자사발에 느타리버섯을 넣고(0.1 g/ml) 잘게 마쇄한 다음 세포내용물이 침전된 후에 상등액으로 10⁷ cfu/ml에서 출발하여 10² cfu/ml까지 PT분산액을 만들어 well에 넣고 저온냉장고에 방치하여 흡착시킨 다음 세척, 항체반응, 발색 및 흡광도조사의 진행은 비경합 ELISA와 같이 행하였다.

결과 및 고찰

특이항체의 역가

본 연구에서는 PT(P-1)를 토끼에 면역하고 얻은 항혈청으로 비경합 간접 ELISA의 여러조건을 우선 검토하였다. 그 결과, microtiter plate의 well에 흡착시키는 항원의 농도, coating 조건, 항PT항체의 희석배율, 희석시의 사용 완충액과 2차 항체-효소 conjugate의 희석배율, 기질의 종류, 반응시간 등 확립한 조건은 '재료 및 방법'에서 언급한 바와 같다. 각 면역후 얻은 항혈청에 대한 비경합 ELISA를 실시하였을 때, 매번 면역에 의하여 항체역가가 높아졌으며 4차 면역 후 매우 높은 항체역가를 나타내었다(Fig. 1). 따라서 이후의 실험에서는 가장 높은 항체가를 보인 1번 토끼의 4차 항혈청(#1-4)을 사용하였다.

비경합 ELISA

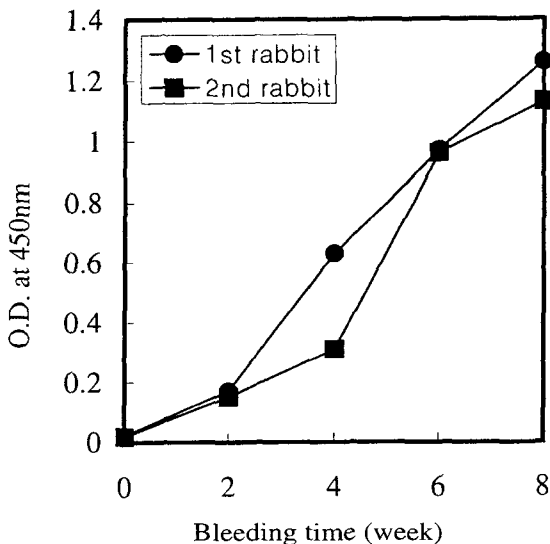


Fig. 1. Production of anti-*P. tolaasii* (PT) antiserum by two rabbits which were immunized with PT and Freund's adjuvant on weeks 0, 3, 5, and 7. Rabbits were bled 1 week after each immunization.

표준곡선 면역원으로 사용한 PT(P-1)를 coating buffer로 10⁷ cfu/ml에서 10² cfu/ml까지 각 밀도별로 희석하여 well에 흡착시킨 다음 비경합 ELISA를 시행하여 얻은 표준곡선은 Fig. 2와 같다. 각 처리별로 3반복하여 얻어진 흡광도의 평균값으로 결과를 나타내었는데 대체로 coating시 PT의 밀도가 높을수록 흡광도가 높게 나타났다. 이때 PT대신 bovin serum albumin을 처리한 음성대조구의 흡광도는 0.05이었다. 이는 PT의 밀도가 높을수록 well에 흡착된 PT의 양이 어느정도(10⁵ cfu/ml)까지는 급격히 증가하기 때문으로 생각된다. 한편 이 표준곡선상에서 PT의 검출한계는 음성대조구 흡광도의 2배를 나타내는 밀도인 2×10² cfu/ml가량이었으며, 전체적으로는 10³ cfu/ml이상의 밀도에서 안정적인 검출이 가능함을 보여주었다.

교차반응 항PT항체의 특이성을 조사하기 위하여 면역원으로 사용한 PT이외의 균주에 대한 항체의 반응성을 비경합 ELISA로 조사한 결과, 항 PT항체는 다른 속 균주와는 전혀 반응하지 않았으나 같은 속 균주에 대하여는 다소간 교차반응을 나타내었다(Fig. 2). 즉, *P. agarici*(ATCC25941)의 경우 10⁴ cfu/ml밀도까지는 반응성이 음성대조구(O.D.=0.05)와 유사하였으나 10⁵ cfu/ml이상의 밀도부터는 낮은 흡광도이기는 하지만 약간의 교차반응을 나타내었으며, white line 반응균인 *P. reactans*와 부생성인 *Pseudomonas* sp.도 매우 약한 반응을 보였다. 반면에 *P. solanacearum* 및 다른 속 세균인 *E. chrysanthemi*, *X. citri*, *S. mutans*, 곰팡이인 *Fusarium oxysporum* 등과는 반응성이 거의 없었다(Fig. 2/일부 data 생략).

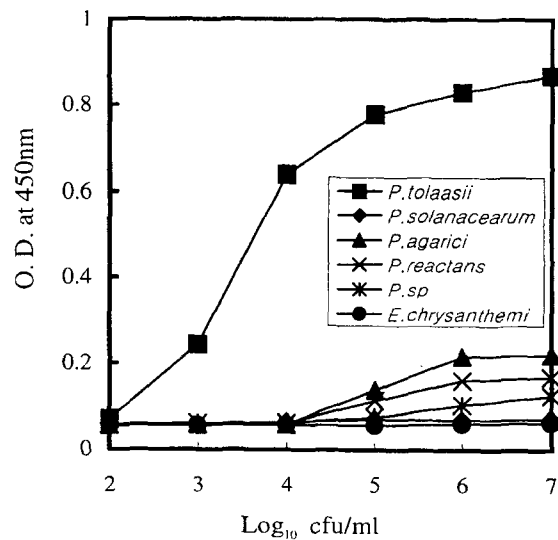


Fig. 2. Standard curves of noncompetitive ELISA for *P. tolaasii*, different species of *Pseudomonas* and *Erwinia chrysanthemi*. Wells of microplate were coated with each strain as a solid antigen.

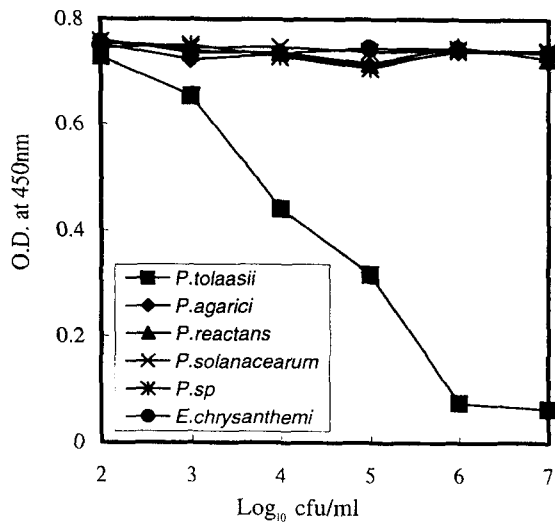


Fig. 3. Standard curves of competitive ELISA for *P. tolaasii* (PT), different species of *Pseudomonas* and *Erwinia chrysanthemi*. Wells of microplate were coated with standard PT as a solid antigen, which competed with each strain for the antibody binding.

경합 ELISA

표준곡선 실험방법에 따라 PT의 분석을 위하여 well에 흡착된 항원과 시료액중의 항원에 대한 항체의 경합적인 반응의 결과를 Fig. 3의 표준곡선으로 나타내었다. 즉 경합 ELISA에서 시료액중의 PT의 농도가 높을수록 항PT항체는 well에 흡착된 표준 PT항원과 결합하는 기회가 줄어들게 됨으로서 최종적으로 낮은 발색치를 보여 비경합 ELISA와는 반대로 나타났다. 여기에서 PT의 검출한계는 최고발색치의 90%를 나타내는 3×10^2 cfu/ml가량으로 나타났으며, 대체로 10^3 cfu/ml이상의 밀도에서 안정적인 검출이 가능하여 비경합 ELISA의 경우와 유사한 경향을 보였다. 그러나 비경합 ELISA의 경우 3×10^3 cfu/ml이상의 밀도에서 최고발색치의 50% 이상을 나타내었으나(Fig. 2) 경합 ELISA의 경우에는 3×10^4 cfu/ml이상의 밀도에서 최고발색치의 50% 이하의 반응을 보이기 시작하여(Fig. 3), 전체적으로 검출감도의 면에서 비경합 ELISA가 경합 ELISA보다 다소 우수하였다.

교차반응 경합 ELISA의 교차반응을 검토한 결과, 항

Table 1. Results of pathogenicity, white line and ELISA tests of different species of *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Streptococcus* and *Erwinia*

Isolate	Source	Pathogenicity	White line reactivity	ELISA ^d
<i>P. tolaasii</i>				
P-1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	+	+	+
P-4	"	+	+	+
P-6	<i>Flammulina velutipes</i>	+	+	+
P-105	<i>P. ostreatus</i>	+	+	+
P-170	"	+	+	+
P-205	"	+	+	+
P-218	"	+	+	+
P-237	"	+	+	+
A-54	"	+	+	+
P-252	<i>F. velutipes</i>	+	+	+
P-221	<i>Agaricus bisporus</i>	+	+	+
Nonpathogenic <i>Pseudomonas</i> spp.				
P-2	<i>P. ostreatus</i>	±	-	-
P-27	"	-	-	-
P-41	"	-	-	-
P-47	"	-	-	-
P-50	"	-	-	-
P-155	"	-	-	-
P-227	<i>A. bisporus</i>	-	-	-
<i>P. agarici</i>	^b ATCC 25941	+	-	-
<i>P. solanacearum</i>	Tomato	-	-	-
<i>X. citri</i>	^c KCTC 2499	-	-	-
<i>S. mutans</i>	KCTC 3303	-	-	-
<i>E. chrysanthemi</i>	Chrysanthemum	-	-	-

^a+: Positive - : Negative ±: Weak. ^bATCC: American Type Culture Collections, ^cKCTC: Korean Collection for Type Cultures. ^dThe results were derived from non- and competitive ELISA.

PT항체는 PT와 속이 다른 *E. chrysanthemi*, *X. citri*, *S. mutans*, *Fusarium oxysporum* 등은 물론 *P. agarici*, *P. reactans*, *P. solanacearum*, *Pseudomonas* sp. 등 같은 속의 균주일지라도 농도에 관계없이 반응성이 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 비경합 ELISA의 경우와 대조적인 결과로서 다음과 같이 설명이 가능하다. 즉, PT는 항PT항체와 매우 강하게 결합하는 반면 PT이외의 다른 균주는 항체와의 결합이 단독으로는 가능하지만 그 결합력이 지나치게 약하여, 경합시 항PT항체와 PT간의 결합을 다른 균주가 저해하지 못 하였기 때문으로 생각된다. Fig. 2의 비경합 ELISA에서 O.D.값이 약 0.25를 나타내는 *P. agarici*의 최저밀도가 10^6 cfu/ml인데 비하여 PT의 경우 10^3 cfu/ml이므로, PT이외의 균주는 PT에 비하여 그 결합력이 $1/10^3$ 이하로 현저히 약한 점이 이를 뒷받침하고 있다. 이상과 같이 본 연구에서 PT를 면역하여 얻은 항체는 다클론항체(polyclonal antibody)여서 *Pseudomonas*속 균주들의 공통항원에 대한 항체도 포함되어 있으리라 생각되에도 불구하고 경합 ELISA에서는 PT에만 특이적으로 반응하는 점은 주목할만 하다. 이러한 현상은 Kitagawa 등[6]이 보고한 *Fusarium*속 특정 곰팡이의 세포벽 성분에 대한 면역분석법에서 homologous competitive ELISA의 경우에는 면역한 F504균주에 대하여만 특이적으로 반응한 반면, heterologous competitive ELISA의 경우에는 검출감도가 떨어지기는 했지만 *Fusarium*속의 모든 균주에 대하여 반응이 가능한 점과 매우 유사하였다.

ELISA에 의한 PT균주의 검출

본 연구에서 개발한 비경합 및 경합 ELISA를 이용하여 느타리버섯의 이병자실체로부터 분리된 여러균주에 대하여 PT의 여부를 조사하였으며 이를 기존의 방법과 비교검토하였다(Table 1). 그 결과 분리한 균주중 병원성과 white line 반응성을 동시에 나타내었던 P-1 등 11균주는 경합 ELISA에서 모두 양성반응을 명확하게 보인 반면, 미약한 병원성을 갖는 다른 종 및 비병원성 *Pseudomonas* 7균주는 경합 ELISA반응이 모두 음성으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서 항PT항체를 이용하여 확립한 ELISA는 정확하고 간편하며 비교적 짧은 시간(3-4시간)이 소요되는 유용한 PT검출법임이 확인되었다.

버섯추출물로부터 PT검출

우선 항PT항체와 버섯을 마쇄한 추출액간의 교차반응성을 검토하였던 바 흡광도 0.07값으로 buffer액의 음성대조구(0.05)와 유사하여 버섯유래물질의 비특이적인 결합이 제거되어 교차반응이 거의 일어나지 않음을 확인하였고, 버섯추출물로부터 *P. tolaasii*의 검출을 비경합 ELISA로 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 버섯을 마쇄한 추출

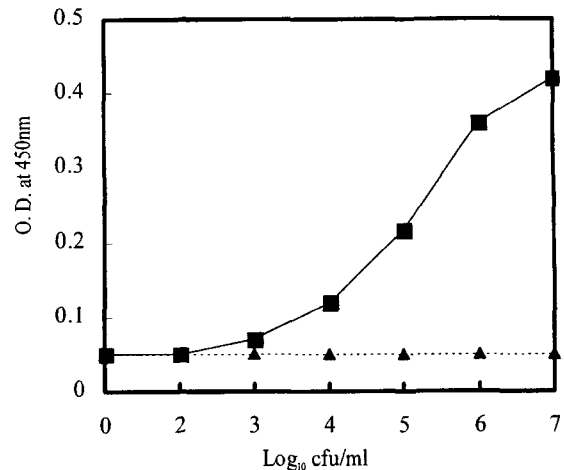


Fig. 4. Standard curve of noncompetitive ELISA for *P. tolaasii* in oyster mushroom extracts. Dashed line indicates negative control (O.D.=0.07).

물의 경우 최소 검출한계 밀도는 buffer의 검출밀도보다 약 10배 높은 10^3 cfu/ml인 것으로 나타났으나 안정적인 검출을 위하여는 음성대조구 2배 이상의 흡광도를 나타내는 밀도인 8×10^3 cfu/ml 이상 수준이어야 가능할 것으로 보였다. 한편 최고발색치의 50% 값을 나타내는 밀도는 9×10^4 cfu/ml 정도로 PT의 검출이 낮아져 전체적으로 O.D.값이 buffer용액에서 보다 떨어지는 경향이였다. 결국 실제 버섯자실체 시료의 추출물중의 PT를 대상으로 다클론항체를 이용하여 비경합 및 경합 ELISA를 실시하는 경우는 버섯유래의 물질이 함께 coating되거나 경합시 항원 항체반응에 방해작용을 함으로써 PT의 검출감도가 약 10배이상 낮아질 뿐아니라, 추출시 버섯의 높은 수분함량 때문에 완충액에 의한 희석으로 PT의 밀도가 낮아지는 등의 문제점이 있어 버섯추출물에 존재하는 PT의 밀도가 비교적 높아야(10^4 cfu/ml 이상) 안정적으로 검출이 가능하였다. 따라서, 버섯시료 및 균상배지 등으로부터 PT의 오염여부를 보다 직접적으로 간편하고 효율적으로 분석할 수 있도록 면역분석법(ELISA)을 더욱 개량한다면 느타리버섯 세균성갈반병의 예방 및 방제에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

느타리버섯의 세균성갈반병균인 *P. tolaasii*(PT)를 신속 간편하게 검출할 수 있는 효소면역측정법(ELISA)을 개발하였다. 특이항체를 생산하기 위하여 PT(5×10^7 cfu)를 Freund's adjuvant와 함께 토끼에 수차례 면역하였으며, 가장 높은 역가를 나타낸 항혈청을 이용하여 비경합 ELISA 및 경합 ELISA를 각각 확립하였다. 표준곡선으로부터 PT의 그 검출한계는 각각 2×10^2 cfu/ml 및

3×10^2 cfu/ml가량으로 나타났다. 교차반응은 비경합 ELISA의 경우 *P. agarici*, *P. reactans* 및 비병원성 *Pseudomonas*속 균주와 $1/10^3$ 이하의 매우 미약한 반응을 보였으나 *P. solanacearum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Streptococcus mutans*, *Xanthomonas citri* 및 곰팡이인 *Fusarium oxysporum* 등 다른 균주와의 반응성이 거의 없었으며, 경합 ELISA의 경우 PT이외에는 같은 속 균주에 대하여도 반응성이 거의 없었다. ELISA를 이용하여 버섯으로부터 분리된 18균주에 대하여 PT의 여부를 조사하였을 때 병원성과 white line 반응성을 동시에 나타내었던 11균주에 대하여만 명확한 양성으로 나타나, 본 연구에서 확립한 ELISA는 간편하고 정확한 PT검출법임이 확인되었다.

감사의 말

이 논문은 농림부에서 시행한 농림특정연구사업(94현장 애로기술개발사업)으로 수행된 연구 결과의 일부입니다.

참고문헌

- Comstock, J. C. and M. S. Irely. 1992. Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and Isolation techniques. *Plant Disease* **76**(10): 1033-1035.
- Duveiller, E. and C. Bragard. 1992. Comparison of immunofluorescence and two assays for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in seeds of small grains. *Plant Disease* **76**(10): 999-1003.
- Dewey, F. M. 1988. Development of immunodiagnostic assays for fungal plant pathogens. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Council*. Thornton Health, pp. 777-786.
- Kim, J. W., K. H. Kim, and H. J. Kang. 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*. *Korean J. Plant Pathol.* **10**(3): 197-210.
- Kim, J. W., S. I. Kwon, and H. J. Kang. 1995. Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushroom in Korea. 2. Bacteriological characteristics of *P. tolaasii* causing mushroom brown blotch and white line reacting organisms. *Korean J. Plant Pathol.* **11**(4): 353-360.
- Kitagawa, T., Y. Sakamoto, K. Furumi, and H. Ogara. 1989. Novel enzyme immunoassays for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucurmerinum* and for general detection of various *Fusarium* species. *Phytopathology* **79**(2): 162-165.
- Lelliott, R. A., E. Billing, and A. C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *J. Bacteriol.* **29**: 479-489.
- Lyons, N. F. and J. D. Taylor. 1990. Serological detection and identification of bacteria of plants by conjugated *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *Plant Pathology* **39**: 584-590.
- Norman, D. J. and A. M. Alvarez. 1994. Rapid detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* in Anthurium plants with a miniplate enrichment/ELISA system. *Plant Disease* **78**(10): 954-958.
- Paine, S. G. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Ann. Appl. Biol.* **5**: 206-219.
- Suyama, K. and H. Fujii. 1993. Bacterial disease occurred on cultivated mushroom in Japan. *J. Agric. Sci. Tokyo Nogyo Daigaku* **38**(2): 35-50.
- Tolaas, A. G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* **5**: 51-54.
- Wells, J. M., G. M. Sapers, W. F. Felt, J. E. Butterfield, B. Jones, H. Bouzar, and F. C. Miller. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and *P. gingeri*. *Phytopathology* **86**(10): 1098-1104.
- Wong, W. C. and T. F. Preece. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*; the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *J. Appl. Bacteriol.* **47**: 401-407.

(Received March 12, 1998)