

の 2 × phosphate buffered saline (pH 7.5) (PBS; 273.8 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 16.0 mM Na₂HPO₄-12H₂O, 2.9 mM KH₂PO₄) と 30 μl の 脱イオン精製水 (DW) を加え、一本鎖 DNA (ssDNA) 溶液を調製した。次に、この ssDNA 溶液 90 μl に 10 μl の 1 M MgCl₂ を加えて 2 秒間攪拌し、直ちに白色マイクロプレートの 1well に全量を滴下した。この後、滅菌プレートシールで密閉して 37°C で 2 時間保温し、ssDNA をマイクロプレートのウェル上に固着させた。その後、well 内の溶液を捨て、well をすすぐために 0.2 ml の 1 × PBS を加えて直ちに除去した。この後、マイクロプレートを 2 時間程度静置して完全に風乾させた。本研究では、この際、DIG ラベルしてプローブとした真菌 DNA と同じ DNA、および市販の塩化セシウム密度勾配法による精製済みの子牛胸腺 DNA (affymetrix, Santa Clara, アメリカ) をそれぞれターゲット DNA として固着させ、それぞれをプローブ DNA に対するポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとした。

次に、プローブ DNA の作製を行った。プローブとなる DNA はジゴキシゲニン (DIG) でラベルした。ラベリングには Nik Translation Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京) および DIG-11-dUTP alkali-labile (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京) を用い、添付のマニュアルを参照して操作を行った。まず、10 μg の DNA に 50 μl の dNTP mixture、および 10 μl の 10 × buffer (vial 6) を加え、sterile double dist. Water により 90 μl にメスアップした。これに、10 μl の Enzyme mixture (vial 7) を加えてよく攪拌した。dNTP mixture は 10 μl の 0.4 mM Digoxigenin-11-dUTP に、2 倍量の dTTP (vial 5)、3 倍量の dATP (vial 2)、dCTP (vial 3) および dGTP (vial 4) を加えて作成した。その後 15°C で 1 時間 30 分保

温することで DNA をラベルし、1 μl の 0.5 M EDTA (pH 8.0) を加えて 65°C で 10 分保温することで酵素反応を停止させた。遊離の dNTPs を除くため、QuickSpin Columns Sephadex G-50 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いてプローブを精製した。この精製物をプローブ DNA 溶液とした。

得られたターゲット DNA 固着マイクロプレートとプローブ DNA を用いて、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションに際しては、DIG Wash and Block Buffer Set (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京) に含まれる洗浄用バッファー、ブロッキングバッファーおよび検出用バッファーを使用し、添付のマニュアルを参照して操作を行った。また、当セットのブロッキングバッファーを利用してハイブリダイゼーション用バッファー (50% ホルムアミド、5 × SSC、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDS、2% ブロッキングバッファー) を作製した。マイクロプレートに固着した DNA に対して、以下の方法でプローブをハイブリダイゼーションさせた。まず、ハイブリダイゼーションバッファーをターゲット DNA 固着マイクロプレートの 1well につき 100 μl 加え、今回ハイブリダイゼーションの温度として設定した 42°C で 60 分間インキュベートし、プレハイブリダイゼーションを行った。次に、必要量のプローブ溶液を沸騰水浴中で 20 分間加熱して変性させ、直ちに氷水で急冷した。ここにハイブリダイゼーションバッファーを適量加え、ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 中にプローブ DNA が 1 μg 含まれるプローブ/ハイブリダイゼーションバッファーを作製した。プレハイブリダイゼーションの後、well からハイブリダイゼーションバッファーを十分に除き、ただちにプローブ/ハイブリダイゼーションバッファーを加え、42°C で 10 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの後、well 中の

プローブ/ハイブリダイゼーションバッファーを十分に除き、200 µl の洗浄用バッファーを各 well に分注してただちに除去する操作を3回繰り返して洗浄した。

DNA-DNA ハイブリダイゼーションの後、DIG ラベルされたハイブリッド DNA の検出は、DIG Luminescent Detection Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を用い、添付のマニュアルに改変を加えて操作を行った。まず、プローブにラベルされた DIG に対する免疫抗体反応を行なった。DIG Wash and Block Buffer Set に含まれる洗浄用バッファー、ブロッキングバッファーおよび検出用バッファーを用いた。100 µl のブロッキングバッファーを well に分注して30分間室温でインキュベートした。この間、DIG Luminescent Detection Kit に添付のアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (抗 DIG-AP) 溶液をブロッキングバッファーで 0.01% に希釈した。マイクロプレートをインキュベートした後、バッファーを捨て、100 µl の 0.01% 抗 DIG-AP を分注しさらに 30 分間インキュベートした。その後、0.01% 抗 DIG-AP を除去し、さらに 300 µl の洗浄用バッファーを各 well に分注してただちに除去する操作を3回繰り返して well 内を洗浄した。次に、DNA-DIG-抗 DIG-AP 複合体が形成されている well に検出用バッファーを 200 µl 加えて3分間室温でインキュベートした後、DIG Luminescent Detection Kit に添付の chemiluminescent alkaline phosphatase substrate (CSPD) 溶液を検出用バッファーで 1% に希釈した1% CSPD を well に 100 µl 分注し、37 °C で 10 分間インキュベートして発光反応を安定化させた。その後、TriStar LB941 (ベルトールドジャパン株式会社、東京)を用いて各 well の発光強度の測定を行った。

5. 菌種間の相同性の評価

得られた蛍光強度測定値から、全ゲノムの相

同性を推定した。相同性の推定には、次式を用いた。

$$\text{DNA 相同性 (\%)} = 100 \times (A - N) / (P - N)$$

この際、A は相同性を推定したい菌種 DNA の発光強度、P は DNA プローブに用いたものと同じ DNA の発光強度 (ポジティブコントロール)、N は子牛胸腺 DNA の発光強度 (ネガティブコントロール) とした。

C. 結果

1. 塩化セシウム密度勾配法によるカビ DNA の精製

大量の DNA 抽出が *Fusarium* 属菌よりも簡単に行える *B. fulva* を選択して DNA 抽出を行い、これを用いて塩化セシウム密度勾配法による DNA の精製の超遠心条件を検討した。本 DNA 精製法によって得られた DNA 溶液の分画を、大きく上層・中層・下層に分けた場合に、DNA-DNA ハイブリダイゼーションに適した質の二本鎖 DNA は中層にバンドとなって分布する (図1)。24 時間超遠心を行った場合、305,000 g を下回るとこの DNA バンドの分離能が低下してシャープなバンドが得られず、本精製法での DNA 回収率が著しく低下することが明らかとなった。また、上層には超遠心前にチューブ内に含有されていた総核酸量のうち 200 分の 1 程度しか分布せず、中層には 20~50 分の 1 程度、下層には 2 分の 1 程度の核酸が分布した。よって、1 菌株対 1 菌株の DNA-DNA ハイブリダイゼーション実験を行うために必要な合計 DNA 量である約 13 µg の DNA を回収するためには、最低でも 650 µg の精製前 DNA 用意する必要があると考えられた。また、下層の核酸はエチジウムブロマイドでインターカレートされず、RNA などの二本鎖 DNA 以外の核酸であると考えられ、DNA-DNA ハイブリダイゼーションには適さないと考えられる。この核酸がいったい何なの

かということに関しては、複雑に高次構造を組んだ核酸である可能性も有り、今後の検討が必要である。

2. カビ DNA を用いたマイクロプレート DNA-DNA ハイブリダイゼーション法

Fusarium 属菌を含むカビ DNA を用いた場合のマイクロプレート DNA-DNA ハイブリダイゼーションの条件検討を行った。

塩化セシウム密度勾配法によって精製した *B. fulva* DNA を DIG ラベルしてプローブとした。また、マイクロプレートの well に固着させるプローブのターゲット DNA として、ポジティブコントロールとなる *B. fulva* DNA、およびネガティブコントロールとして子牛胸腺 DNA を用いた。マイクロプレートを用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションに適した温度、反応時間、ハイブリダイゼーションバッファー中のプローブ DNA 濃度、DIG ラベルされたプローブ DNA と免疫複合体を形成する抗 DIG-AP 分注量・濃度および AP の基質となる CSPD の分注量・濃度についての検討を行った。計測される発光強度をもとにプローブ DNA とターゲット DNA の塩基配列相同性を推定する場合、ポジティブコントロールの発するシグナルが高く、かつネガティブコントロールが発するシグナルが低い条件を選択する必要がある。この観点で決定したハイブリダイゼーションの条件は、至適温度が 42°C、ハイブリダイゼーションに要する反応時間が 10 時間であった。マイクロプレートに固着させる DNA 量は 1well あたり 1 μ g、およびハイブリダイゼーションバッファーに含まれるプローブ DNA の濃度がバッファー 1ml あたり 0.5 μ g が適当であった。

3. *Fusarium* 属複数菌種間での全ゲノムレベルの塩基配列相同率

本研究で検討して明らかとなった実験条件を用いて、*B. fulva*、*F. verticillioides* および *F. oxysporum* について化学発光を利用してハイ

ブリッド DNA を形成している割合を数値化した。この結果、*F. oxysporum* DNA をプローブに用いた場合、3回の繰り返し実験の発光強度の平均値 \pm 標準偏差は、子牛胸腺 DNA では 4920.3 \pm 471.8、*B. fulva* では 43216.7 \pm 974.1、*F. verticillioides* では 52728.0 \pm 1507.1、ポジティブコントロールである *F. oxysporum* では 53721.7 \pm 2429.5 を示した。この数値を用いて全ゲノムレベルでの塩基配列相同率を推定した。この結果を図4に示す。*F. oxysporum* との間の全ゲノムレベルでの塩基配列相同率は、*B. fulva* で 80.6%、*F. verticillioides* で 97.9%であった。また、真菌の系統解析のマーカーとして最もよく用いられる遺伝子の一つである β -*tub* 部分塩基配列を供試菌株から取得し相同率を算出したところ、*F. oxysporum* との間の相同率は、*B. fulva* で 78.4%、*F. verticillioides* で 97.2%であった。以上の結果から、DNA-DNA ハイブリダイゼーションから得られた相同率は、 β -*tub* 塩基配列相同率とよく相関することが示された。

D. 考察

Fusarium 属菌は遺伝子塩基配列による系統解析では明らかに別種と認識できる差異があるものの菌種特異的な形態的差異が乏しい分類群が、後述する”species complex”を形成する種を含め多数存在し、これが同定を困難にしている要因の一つとしても考えられている。このため、確からしい種の系統樹を反映した体系的な分類方法を確立することが分類・同定に関する問題を解決するために必要不可欠であり、確からしい系統関係の推定は対象菌種を正確に同定するための礎となると言える。近年、*Fusarium* 属菌の分類・同定の場においても、遺伝子塩基配列の解析をはじめとした分子生物学的手法が盛んに行われ、成果をあげてい

る。従来ひとつの種であるとみなされてきた *Fusarium graminearum* の多数の菌株を解析したところ、系統特異的な塩基配列があるためにいくつかの分類群に分けられることが示され、species complex を形成していることが明らかとなった。また、従来の形態学的な手法によって別々の菌種であるとみなされてきた *F. subglutinans*、*F. proliferatum*、*F. verticillioides* の複数菌株を解析したところ、それぞれの菌種は内部に異なる交配群を形成するグループを含み(3)、さらにそれぞれの菌種は単系統群を形成せず3菌種が入れ子状となった側系統群となることが明らかとなった。現在ではこれらのリネージをまとめて *Gibberella fujikuroi* species complex として認識するという分類体系が用いられつつある(5, 13)。また、側系統群は上記の交配群と一致しているという報告が次々となされたため、それぞれのリネージが *Fusarium* 属の新たな菌種として独立することも提唱されている(8)。渡辺ら(投稿中)は、*Fusarium* 属菌を幅広く用い、7つの遺伝子を指標とした系統解析を行って系統樹を構築し、上記の従来の *F. subglutinans*、*F. proliferatum*、*F. verticillioides* はそれぞれ側系統となるという系統仮説を支持した。さらに、当 species complex 内部の各リネージ間の系統関係を示すブランチの長さが短く解像度は低く、系統関係は明らかにされなかった。極めて短期間に種の分岐が起こったためであると推測されており、渡辺らが用いた7遺伝子の塩基配列は約 3,900 塩基と比較的大きい情報量であるにもかかわらず、このような状況が生じた分類群については系統推定は困難である。このような問題を解決するためには、解析に参加する情報量を多くすることによってより解像度の高い解析結果を得る必要がある。具体的には、DNA-DNA ハイブリダイゼーションや全ゲノムシーケンスといった手法

によるゲノム全体での塩基配列相同性を検証すればよい。

本研究において、従来のメンブレンに固着させる方法よりも簡便な、カビの DNA をマイクロプレートに固着させた DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド DNA を感度の高い DIG-AP-CSPD 反応系を用いて定量的に検出できる実験系の構築に成功した。これによって、カビの全ゲノムレベルでの塩基配列相同率が推定できることが示された。本研究において得られた全ゲノムレベルでの塩基配列相同率は、過去の研究で系統解析によく用いられ解像度の高い結果が得られることが知られる β -*tub* の塩基配列の相同率とよく相関していることが明らかとなった。よって、DNA-DNA ハイブリダイゼーションから得られた全ゲノムレベルでの相同率を *Fusarium* 属菌の系統解析に適用すれば、従来の系統樹よりも解像度の高い系統樹の構築できる可能性があることが示唆された。今後、複数遺伝子の塩基配列の系統解析では明らかにすることができなかった *Fusarium* 属菌をはじめとする真菌の系統推定のツールとして、マイクロプレートを用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションの活用が期待される。

E. 結論

カビ DNA を用いたマイクロプレートでの DNA-DNA ハイブリダイゼーションの実験系の確立、およびこの実験系を用いた *Fusarium* 属複数菌種間での全ゲノムレベルの塩基配列相同率の測定について、検討を行った。最初に、大量の DNA 抽出が *Fusarium* 属菌よりも簡単に行える *B. fulva* を選択して DNA 抽出を行い、これを用いて塩化セシウム密度勾配法による DNA の精製およびマイクロプレート DNA-DNA ハイブリダイゼーションの最適な条件を明らかにした。次に、*B. fulva*、*F. oxysporum* および *F.*

verticillioides を用いて DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った。その結果、DNA-DNA ハイブリダイゼーションから得られた全ゲノムレベルでの相同率を *Fusarium* 属菌の系統解析に適用すれば、従来の系統樹よりも解像度の高い系統樹の構築が可能となることが示唆された。

F. 参考文献

- 1) Fujikawa, H., *et al.* Contamination of microbial foreign bodies in bottled mineral water in Tokyo, Japan. *Journal of Applied Microbiology*. 82: 287-291, 1997.
- 2) Hosoi-Tanabe, S. and Sako, Y. Genetic differentiation in the marine dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* based on DNA-DNA hybridization. *Plankton & Benthos Research*. 1: 138-146, 2006.
- 3) Hsieh, W. H., *et al.* Mating Groups in *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. 67: 1041-1043, 1977.
- 4) Kumeda, Y. and Asao, T. Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* Section *Flavi* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4084-4090, 2001.
- 5) Leslie, J. F. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany*. 73: 282-291, 1995.
- 6) Marasas, W. F. O., *et al.* *Toxicogenic Fusarium* Species. University Park, The Pennsylvania State University Press. 1984.
- 7) Nelson, P. E., *et al.* *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. University Park, The Pennsylvania State University Press. 1983.
- 8) O'Donnell, K., *et al.* Molecular Systematics and Phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* Species Complex *Mycology*. 90: 465-493, 1998.
- 9) Park, B., *et al.* Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. *Nucleic Acids Research*. 39: D640-646, 2010.
- 10) Peterson, S. W. and Kurtzman, C. P. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*. 14: 124-129, 1991.
- 11) Price, C. W., *et al.* Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiological Reviews*. 42: 161-193, 1978.
- 12) Samson, R. A., *et al.* Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology*. 49: 175-200, 2004.
- 13) Steenkamp, E. T., *et al.* PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4378-4382, 2000.
- 14) Sugita, T., *et al.* Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 1985-1993, 1999.

- 15) Tamura, M., *et al.* Genetic relatedness among species in *Aspergillus* section *Clavati* as measured by electrophoretic comparison of enzymes, DNA base composition, and DNA-DNA hybridization. The Journal of General and Applied Microbiology. 45: 77-83, 1999.
- 16) Tamura, M., *et al.* Identity of the xerophilic species *Aspergillus penicillioides*: Integrated analysis of the genotypic and phenotypic characters. The Journal of General and Applied Microbiology. 45: 29-37, 1999.
- 17) Watanabe, M., *et al.* Rapid and Effective DNA Extraction Method with Bead Grinding for a Large Amount of Fungal DNA. Journal of Food Protection. 73: 1077-1084, 2010.

G. 研究発表

1. 論文発表

- Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. Journal of Food Protection. 73, 1077-1084, 2010.
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K. and Hara-Kudo, Y. Evaluation of genetic markers for identifying isolates to of the species of the genus *Fusarium*. Journal of the Science of Food and Agriculture. In revision.
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K. and Hara-Kudo, Y. Molecular phylogeny of

the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. BMC Evolutionary Biology. Submitted.

小沼 ルミ, 瓦田 研介, 井上 雅史, 宮崎 巖, 飯田 孝彦, 浜野 智子, 渡辺 麻衣子, 工藤 由起子. 桐たんすの変色部に生育した糸状菌の分離および同定. 防菌防黴, 印刷中.

2. 学会発表

渡辺 麻衣子, 米澤 隆弘, 李 謙一, 熊谷 進, 小西 良子, 後藤 慶一, 工藤 由起子. *Fusarium* 属菌の同定に適する遺伝子指標の評価. 第30回日本食品微生物学会学術総会, 大津, 2010. 9.

小沼 ルミ, 渡辺 麻衣子, 工藤 由起子, 小西 良子, 高鳥 浩介, 一戸 正勝, 瓦田 研介. 炭素源資化性分析を用いた糸状菌同定の検討. 第37回日本防菌防黴学会年次大会, 東京, 2010.9.

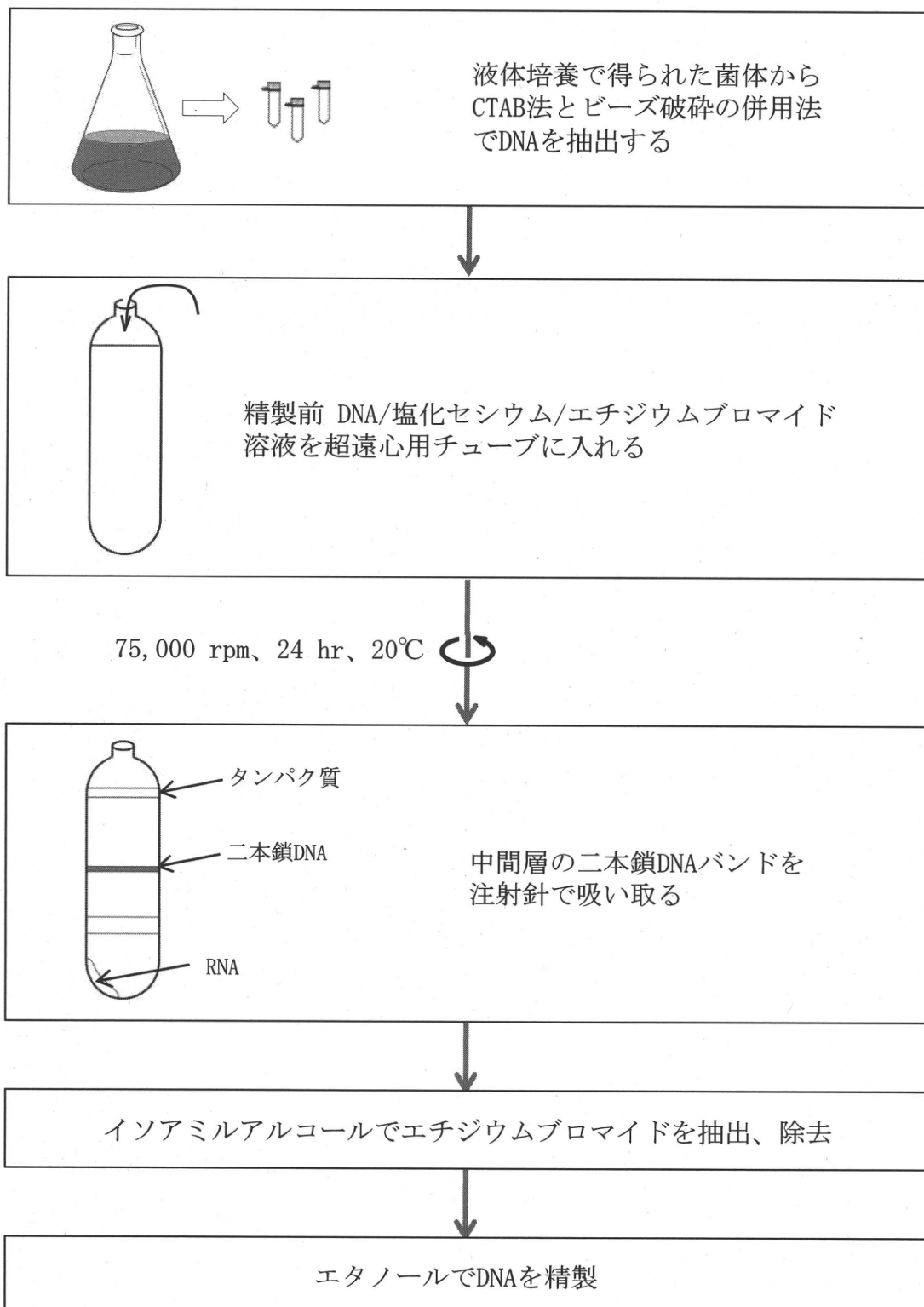


図1. 塩化セシウム密度勾配法の実験手順

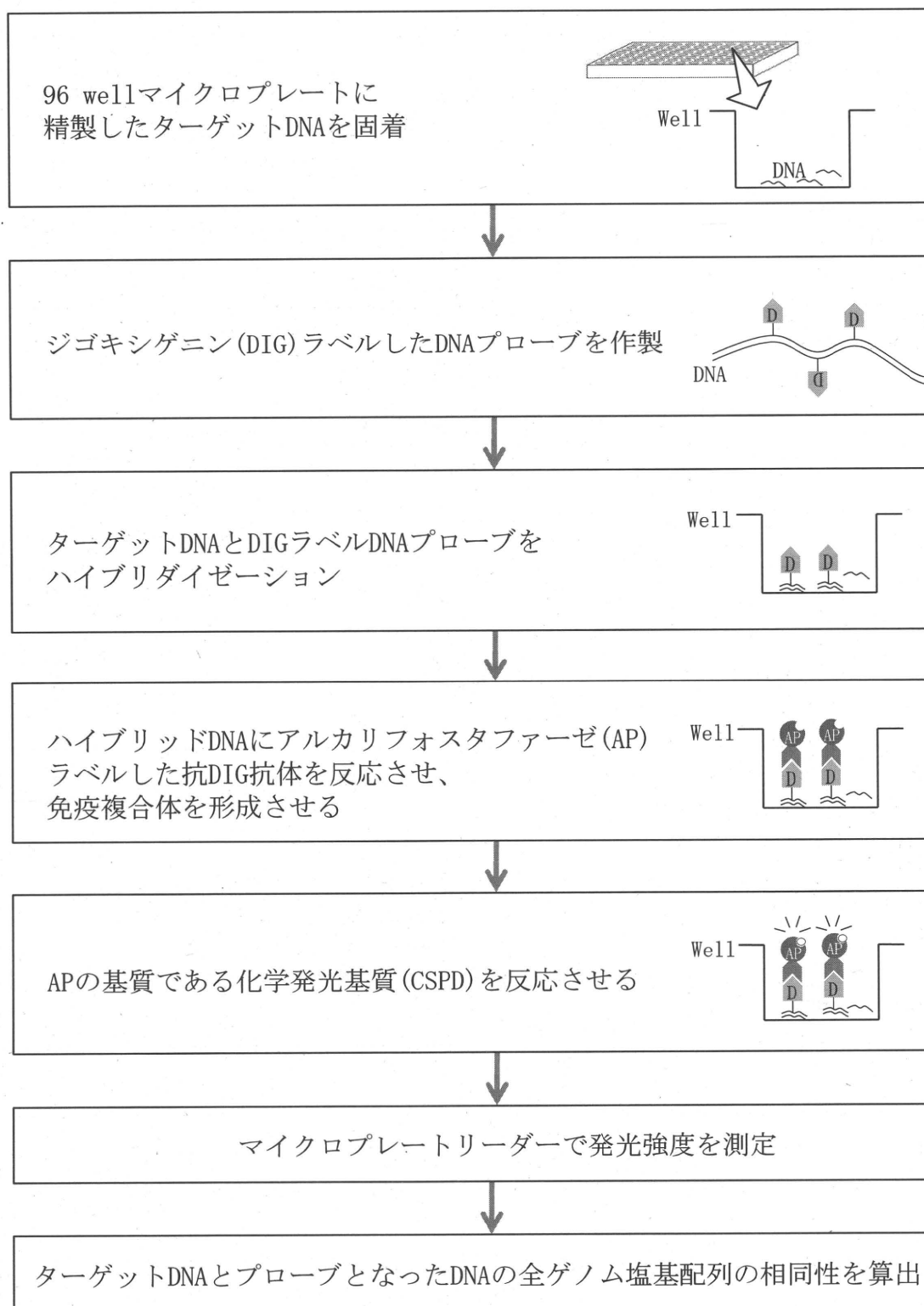


図 2. DNA-DNAハイブリダイゼーションによる真菌の全ゲノム相同性推定の実験手順

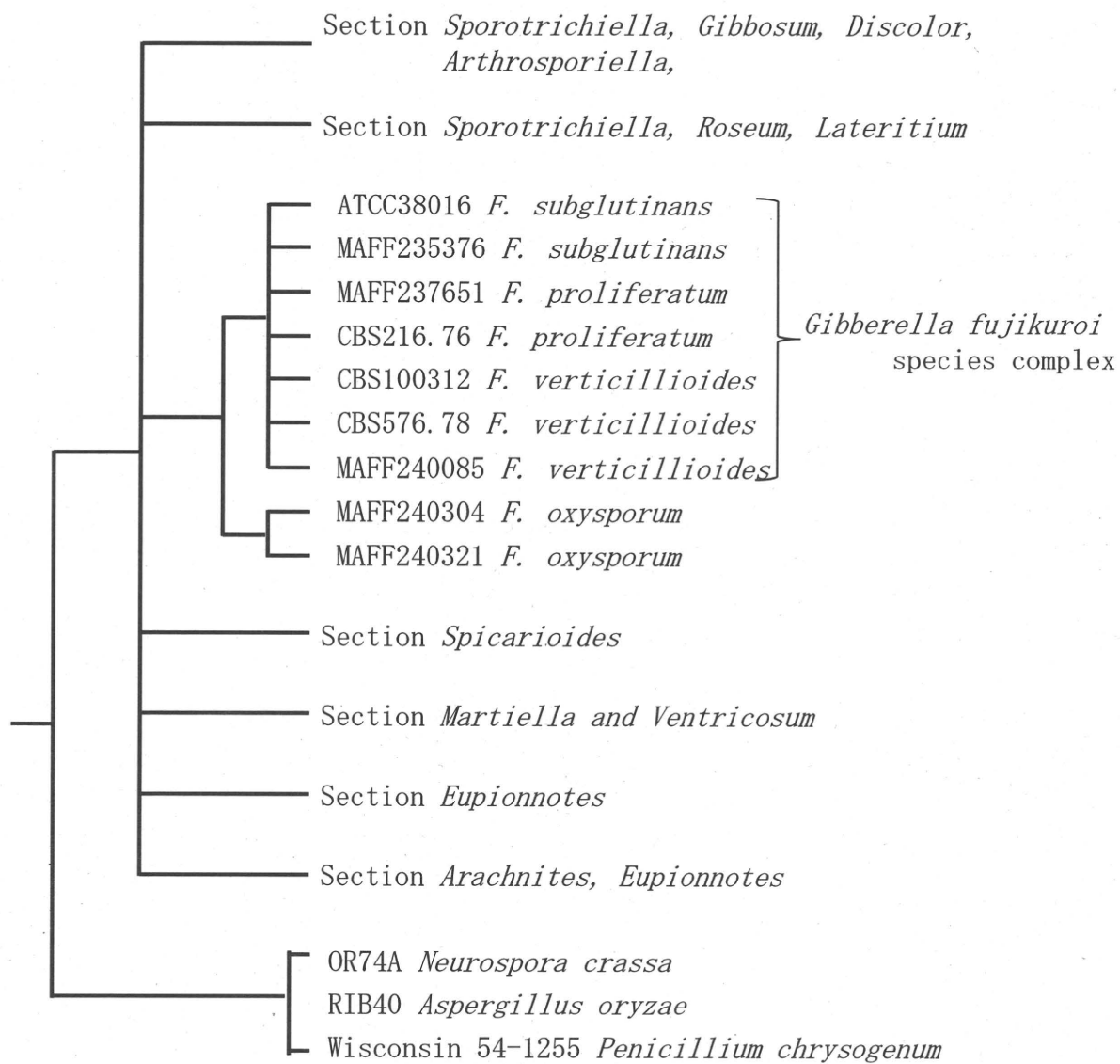


図3. 6つの遺伝子塩基配列に基づいて構築された*Fusarium*属菌の系統樹

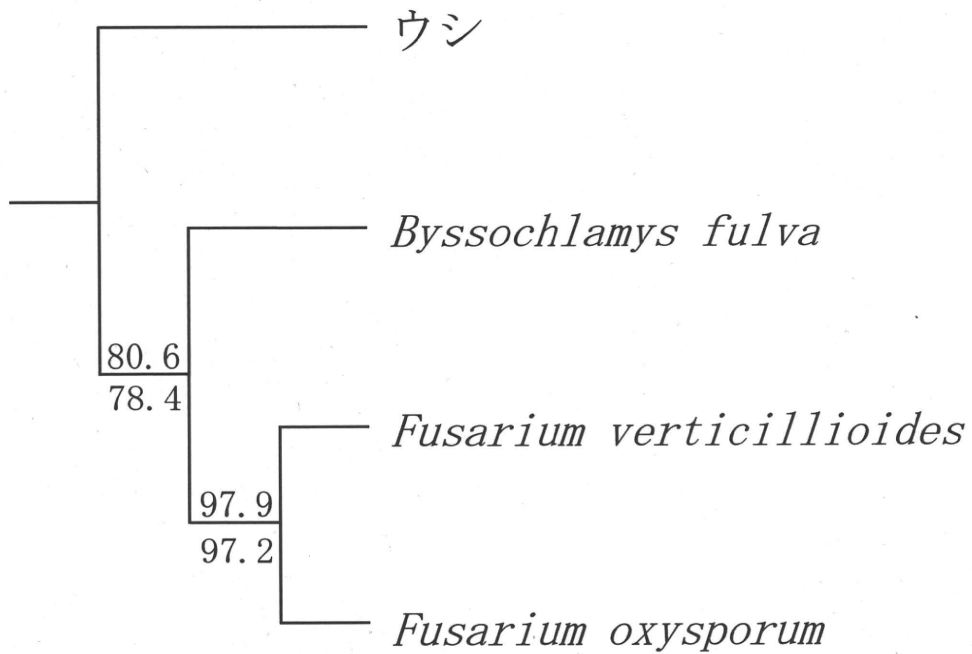


図4. DNA-DNAハイブリダイゼーションによって得られた全ゲノムレベルの塩基配列相同率

ウシをアウトグループとして用いた。各ブランチに書かれた数値は*F. oxysporum*との間の塩基配列相同率を示し、上段は本研究によって得られたDNA-DNAハイブリダイゼーションによる相同率、下段は β チューブリン遺伝子の部分配列から得られた相同率である。

分 担 研 究 報 告 書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための
微生物同定方法の確立

協力研究報告書

市販国産果実における真菌叢の解析

工藤 由起子

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金(食の安心・安全確保推進研究事業)

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

研究代表者 工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

分担研究報告書

清涼飲料水中の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

研究分担者 工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

協力研究報告書

市販国産果実における真菌叢の解析

研究要旨

近年、清涼飲料水の需要の増大とともに、原料となる果実の消費量および種類は多様化している。これら原料となる果実および清涼飲料水に対しては、風味が損なわれることを防ぐために、強い殺菌は施されておらず、微生物学的な汚染が発生しやすい。また、真菌は多くの耐酸性菌種を含む微生物群であり、果実は低い pH を持つことから真菌に汚染されやすい。本研究では、清涼飲料水の原料となる種類の複数の国産果実について真菌叢を定性的・定量的に把握し、汚染真菌の優占菌種を明らかにすることを目的とし、真菌叢の調査を行った。

清涼飲料水の原料となる種類の市販国産果実9種類計 27 検体について、真菌を網羅的に分離し、またこれら分離株を形態学的、分子生物学的および生化学的な手法を用いて同定を行った。本研究によって、清涼飲料水の原料となる種類の国産果実の真菌叢は、植物の自然の真菌叢および栽培環境から店頭で販売されるに至る間の環境の真菌叢を反映したものであることが明らかとなった。また、市場病害菌およびマイコトキシン産生菌の総生菌数に占める占有率は低いことも示され、健全な状態の果実を原料とする場合、これらの真菌による清涼飲料水の腐敗およびヒトへの直接の健康危害のリスクは低いことが示された。よって、清涼飲料水の原料となる果実については、腐敗を防止して健全性を守ることに留意し、果実の真菌叢の優占菌種となっている非病原真菌にも注目した管理を行うことが重要である。

研究協力者

渡辺麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)

堤 史行、小沼 博隆 (東海大学海洋学部)

小沼ルミ (東京都立産業技術研究センター)

A. 研究目的

近年、清涼飲料水の需要の増大とともに、原料となる果実の消費量および種類は多様化している。原料となる果実および清涼飲料水に対しては、食品の風味が損なわれることを防ぐために、加熱殺菌処理などの強い殺菌が施されておらず、微生物学的な汚染が発生し易い。よって、清涼飲料水の汚染源の一つとしての果物原料の微生物汚染をモニターすることの重要性が考えられる。

真菌は、多くの耐酸性菌種を含む微生物群である。果実の低い pH は、細菌など多くの競合微生物の発育を抑制し、真菌が発育しやすい環境を作り出すために、果実は真菌に汚染されやすい。これまで、果実を汚染する真菌の総生菌数については、本研究課題の平成 21 年度の成果で、果実汚染真菌の定量方法とともに汚染状況を報告した。また、汚染陽性検体の頻度についての調査が多く果実種および真菌種について行われ、報告されている(23, 24)。真菌は果実を汚染した場合にマイコトキシンを産生する場合もあることが知られ、フルーツジュースからマイコトキシンが検出された事例も報告されている(2, 6)。果実食品の真菌汚染菌数については、これまでの報告の中で最も高い総生菌数は、生食用果実で $6.7 \log \text{ cfu/g}$ (26)、清涼飲料水を含む最小限の加工果実食品で $9.7 \log \text{ cfu/g}$ (22)であった。また、ある特定の真菌種について、生菌数を測定した報告は複数ある(10, 27)。このように、加工後の製品や原料となる果実を汚染する真菌叢の定性的な研究報告はこれまで数多くあり、またある特定の種に絞って菌数を測定した定量的な報告はいくつかあるものの、果実を汚染する真菌叢について、網羅的に菌種を特定し定量的

に解析した報告はほとんどない。

食品の加工段階において、食品の適切な真菌殺菌方法を決定するには、原料の生菌数を知るとともに、どういった真菌種が優先的に汚染しているのかということ进行を明らかにすることが重要である。真菌種によって各種殺菌法に対しての感受性が異なる(25)ためである。さらに、汚染が発生するポイントを推定して重点的に衛生に気をつけなければならない製造過程を押さえるために有効な殺菌方法を考慮することも可能となる。よって清涼飲料水の原料となる果物の汚染真菌叢の定性的・定量的な解析を行う意義がある。

本研究では、清涼飲料水の原料となる種類の複数の国産果実について真菌叢を定性的・定量的に把握し、汚染真菌の優占菌種を明らかにすることを目的とし、真菌叢の調査を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

供試した果実は、2008年7月から11月までに東京都、神奈川県内のスーパーマーケット等の小売店で購入した。検体には、イチゴ、温州ミカン、ナシ、ブルーベリー、ブドウ、マスクメロン、モモ、リンゴおよびレモンの9種の果実を用い、各果実3検体の計27検体を供試した。検体は購入後、各個体ごとにビニール袋に入れ、二次汚染が生じないようにして実験室へ輸送した。

2. 検体の処理および試験液作製

果物表面に定着している真菌を定性的に調査するために、検体表面を滅菌水や次亜塩素酸で洗浄した後に定性的実験に供した研究は数多くあるが、栽培環境および流通環境などから受けた汚染状況をそのまま反

映した果物表面の真菌叢を調査した研究はほとんどない。本研究では、生のまま消費者に喫食される状態および工場加工ラインに入る状態における果物の真菌付着状況をそのまま反映するものを調査することを目的としたため、検体表面の洗浄は行わなかった。本研究では、検体として果実の表皮を用いた。採集には滅菌メスを用いた。リンゴ、ミカンのような種類の果実では果実1つの表皮および蒂を部位による偏りが生じないように均等に採取した。イチゴやブドウのように1個体が小さい果実については、5つの個体を目安とし、検体による偏りが生じないように均等に表皮を採取した。

検体5gをストマッカー袋に入れ、クロラムフェニコール添加(50mg/l) potato dextrose broth (PDB: Becton, Dickinson and company, アメリカ) 45 mlを加えてストマッカーにかけ、検体乳剤を作製した。この検体乳剤1mlを採取しPDB 9 mlに加えよく混合した。さらにその1mlをPDB 9mlに加えてよく混合した。この操作を繰り返し行い、6段階の希釈列(10^0-10^{-6})を作製した。

3. 検体の真菌数測定

塗抹培養法にて真菌数の測定を行った。2で作製した検体乳剤および希釈列(10^0-10^{-6})各濃度から0.1 mlずつを採取し、クロラムフェニコール添加(50mg/l) potato dextrose agar (PDA: 栄研化学株式会社, 東京) 平板培地5枚に塗抹し、25°Cで10日間培養を行った。培養期間中、2、4、7、9および10日目に、寒天平板培地上に形成されたコロニー数を計測した。この数値をもとに検体1g当たりの真菌数を換算し、colony forming unit (cfu) /gで示した。真菌数の測定に用いた希釈段は、寒天平板培

地に発育したコロニー数が10~100個となったものを用いた。分離培養で得られたコロニーをかきとりPDA斜面培地に接種した後、25°Cで1から2週間培養後、8°Cで保存した。

4. 真菌の同定

寒天平板培地上に発育した真菌を網羅的に同定するため、コロニーを目視による性状ごとに分類し、この分類群を網羅するように単離した。コロニーを白金鉤で釣菌し、dichloran rose bengal chloramphenicol Agar (DRBC: OXOID, イギリス) 培地に接種し、25°Cで1から2週間培養し、純培養を行った。発育した真菌をさらにPDAに接種し、25°Cで1から2週間巨大培養を行い、観察に供した。

分離された全てのコロニーを用いて、同定を行った。分離真菌株の同定手順を図1に示した。まず最初に、発育したコロニーを白金鉤でかきとり、プレパラートを作成して検鏡し、カビまたは酵母によって分類した。カビであった場合、さらに分離株を*Aspergillus* 属、*Cladosporium* 属、*Fusarium* 属、*Penicillium* 属および未同定株に分類し、それぞれに適した形態学的指標および分子生物学的指標によって総合的に判断し、同定を行った。酵母であった場合、最初に生化学的指標によって同定を行い、これで同定できなかった場合に、酵母に適した形態学的指標および分子生物学的指標によって総合的に判断し、同定を行った。以上の手法によって最終的に同定が不可能だった場合に、不同定株とした。

それぞれの分類群に適した形態学的同定手法については、以下のとおりである。*Aspergillus* 属または *Penicillium* 属とみなされた分離株については、Czapek yeast

extract agar (CYA: Czapek-dox broth (BD, Franklin Lakes, アメリカ) 35 g、酵母抽出物粉末 5g、寒天粉末 20 g、純水1リットル)、malt extract agar (MEA: Oxoid, イギリス) および Czapek agar (Cz: Czapek-dox broth 35 g、寒天粉末 15 g、純水1リットル) 平板培地にそれぞれ接種し、25°Cで14日間培養した。その後、Klichの方法(9)および Raperらの方法(17)をそれぞれ参照し、同定を行った。*Cladosporium* 属であるとみなされた分離株については、PDA 平板培地に接種し、25°Cで14日間培養した。その後、Samsonらの方法(19)を参照し、同定を行った。*Fusarium* 属であるとみなされた分離株については、カーネーションリーフ寒天培地 (CLA:16) および PDA にそれぞれ接種し、25°Cで14日間培養した。その後、Nelsonらの方法(12)を参照し、同定を行った。未同定株であるとみなされた場合には、孢子形成を促進するために CLA に、さらに PDA にも接種し、25°Cで14日間培養した。その後、Samsonらの方法(19)および Barnettと Hunterの方法(3)を参照し、同定を行った。CLA 上でも孢子形成が見られず同定が不可能だった場合には、不同定株とした。酵母とみなされた場合には、コーンミール寒天培地 (CMA: Oxoid, イギリス)、MEA および yeast malt broth (YM broth: 麦芽抽出物粉末 3 g、酵母抽出物粉末 3 g、ペプトン 5 g、グルコース 10 g、純水1リットル) にそれぞれ接種し、25°Cで7日間培養した。その後、Barnettらの方法(4)を参照し、同定を行った。

それぞれの分類群に適した分子生物学的同定手法については、以下のとおりである。最初に、全ての分離株の孢子または菌糸をかきとって2 ml マイクロチューブ内の PDB1

ml に接種し、25°Cで3日間培養した。その後、18,000×gで10分間遠心分離して上清を除去し、菌体を得た。この菌体を用いて、本研究課題の平成20年度の成果から得られた CTAB 法の改良法によって DNA を抽出した。本研究では、*Fusarium* 属以外とみなされた分離株については、18S リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA)、Internal Transcribed Spacer region 1 (ITS1)、5.8S rDNA、ITS2 および 28S rDNA を含む rDNA 関連遺伝子群の遺伝子塩基配列を用いた(図1)。*Fusarium* 属とみなされた分離株については、 β -tubulin 遺伝子 (β -*tub*) の遺伝子塩基配列を用いた。これらの遺伝子は、分子生物学的指標に基づく真菌の同定において幅広く用いられている遺伝子である。rDNA 関連遺伝子群は1組のプライマーセットを用いた1回の PCR によって増幅された。プライマーは、ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'; 28) および NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'; 13) を用いた。PCR 反応には、TaKaRa *ExTaq* (TaKaRa Bio Inc., 大津) およびサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystem, アメリカ) を用いた。PCR サイクルの詳細は、94 °C 5 分の前熱変性反応、35 回の増幅サイクル (94 °C 30 秒, 52 °C 40 秒, 72 °C 1分 10 秒) および 72 °C 3分の追加伸長反応である。得られた PCR 産物は、ExoSap-IT (USB; アメリカ) を用いて精製し、PCR に用いた上記の2プライマーに加えて ITS3 (5'-GCATCGATGAA-GAACGCAGC-3'; 28) ABI 3130 analyzer の合計3プライマーを用い、ABI 3130 Analyzer (Applied Biosystems, アメリカ) によってシーケンスを行った。 β -*tub* は1組のプライマーセットを用いた PCR によって増幅された。プライマーは、本研究においてデザインされた Btu-FuF01 (5'-CAGACCGGTCAGTGCCTAA-3') および

Btu-FuR01 (5'-TTGGGGTCGAACATCTGCT-3')を用いた。これらのプライマーは、O'Donnellと Cigelnik(13)によって報告されたプライマーセットを用いて得られた β -tub 塩基配列を参考にし、より *Fusarium* 属菌の増幅に適した配列を持つものである。PCR サイクル以外のPCR条件およびシーケンスの方法は、上記の rDNA 関連遺伝子群と同様に行った。PCR サイクルの詳細は、94 °C 5 分の前熱変性反応、35 回の増幅サイクル (94 °C 30 秒, 60 °C 40 秒, 72 °C 1分) および 72 °C 3 分の追加伸長反応である。National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST サ ー チ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によって、GenBank の登録配列に対する得られた遺伝子塩基配列の塩基配列相同率を算出し、この結果を参照して同定を行った。

酵母に対して用いた生化学的同定手法については、以下のとおりである。31 種類の炭素源の資化性を検査することができる市販キット ID 32C API (シメックス・バイオメリュ株式会社, 東京) を用いた。酵母とみなされた分離株については、PDA 上で 25°C で 24 から 48 時間培養した。これを用いて酵母懸濁液を作製し、キットに添付したマニュアルを参照して資化性を検査した。この結果を、apiweb (シメックス・バイオメリュ株式会社) を用いて解析し、同定を行った。

C. 結果

本研究では、市場に流通している9種の国産果実を用いて、真菌の種類ごとに生菌数を測定した。さらに合計 190 の真菌株を分離し、これらの同定を行った。分離株のうち、酵母 17 菌株は生化学的指標によって、カビ 103 菌株は形態学的指標によって、酵母 20

菌株およびカビ 26 菌株は形態学のおよび分子生物学的指標による総合的な解釈によって、それぞれ同定された。これらの結果を統合し、真菌種ごとの生菌数、すなわち網羅的な真菌叢を明らかにした。各果実の真菌叢における検出真菌種、およびそれらの検出頻度と生菌数を表1から9に示した。

3検体の平均真菌総生菌数について、最も高い値が検出された果物はマスクメロンで 7 log cfu/g であった(表6)。最も低い値が検出された果物はレモンで 3 log cfu/g であった(表9)。カビと酵母の間で、総真菌生菌数に占める3検体の平均占有率を比較したところ、酵母のほうが高かった果実はイチゴ、ナシおよびリンゴで、58 から 67% であった(図2, 表1, 3, 8)。残りの6果実では酵母はカビよりも低い平均占有率を示し、10 から 48% であった。カビと酵母それぞれの生菌数に占める主な属の占有率を図3, 4に示した。各果実における特定の真菌種の陽性検体数については、最も頻度高く検出された真菌の属は *Cladosporium* 属で全ての果物種から検出され、次いで頻度が高かったのは *Penicillium* 属で8つの果物種から検出された(図3, 表10)。

明らかにされた各果実の真菌叢について、以下で詳細を記述する。イチゴの真菌叢(表1)においては、3検体の総生菌数に占める平均占有率が最も高かったのは *Pseudozyma* 属菌で 43%、次いで *Cladosporium* 属菌で全ての検体から 38% で検出された。イチゴで頻度高く発生する植物病原菌であることから食品衛生学上重要な真菌としては *Botrytis cinerea* が知られるが(20)、本研究における *Botrytis* 属菌の検出状況は1検体から低い占有率で検出される

にとどまった。温州ミカンの真菌叢(表2)においては、3検体の総生菌数に占める平均占有率が最も高かったのは *Penicillium* 属菌で20%、次いで *Mucor* 属菌で12%であった。ナシの真菌叢(表3)においては、3検体の総生菌数に占める平均占有率が最も高かったのは *Cryptococcus* 属菌で38%、次いで *Cladosporium* 属菌で31%であった。ナシで頻度高く発生する植物病原菌であることから食品衛生学上重要な真菌としては *Tilletiopsis* 属菌が知られており(14)、本研究においては *Tilletiopsis* 属菌は1検体から4log cfu/g と比較的高い生菌数で検出された。ブドウの真菌叢(表4)においては、3検体の総生菌数に占める平均占有率が最も高かったのは *Candida* 属菌で33%、次いで *Aspergillus* 属菌で32%であった。*Aspergillus* 属菌は1検体のみからの検出であったが、7log cfu/g と高い生菌数であった。また、*Saccharomyces cerevisiae* はブドウにおいて重要な発酵菌であることが知られるが、本研究で供試した3検体からは検出されなかった。ブルーベリーの真菌叢(表5)においては、3検体の総生菌数に占める平均占有率が最も高かったのは *Aureobasidium* 属菌で全ての検体から64%で検出され、次いで *Cladosporium* 属菌で22%であった。*Alternaria* 属菌は2検体から検出されたがその総生菌数に占める占有率は低かった。マスクメロンの真菌叢(表6)においては、3検体の総生菌数に占める平均占有率が最も高かったのは *Acremonium* 属菌で全ての検体から48%で検出され、次いで *Pseudozyma* 属菌で35%であった。マスクメロンで頻度高く発生する“*Alternaria rot*”の病原菌として知られることからマスクメロンの汚染真菌として

食品衛生学上重要な *Alternaria* 属菌は、本研究で供試された検体からは検出されなかった。*Alternaria* 属菌と同様の理由からマスクメロンで重要だと考えられる *Cladosporium* 属菌および *Fusarium* 属菌(20)については、2または3検体から検出されたが低い平均占有率にとどまった。モモの真菌叢(表7)においては、3検体の総生菌数に占める平均占有率が最も高かったのは *Aureobasidium* 属菌で34%、次いで *Cladosporium* 属菌で18%であった。リンゴの真菌叢(表8)においては、3検体の総生菌数に占める平均占有率が最も高かったのは *Aureobasidium* 属菌で21%、次いで *Septobasidium* 属菌で13%であった。*Penicillium expansum* はリンゴを汚染し市場病害を引き起こすことで知られる。またマイコトキシンであるパツリンを産生することもある(6, 24)ことから食品衛生学上重要であるが、本研究で供試された検体からは検出されなかった。レモンの真菌叢(表9)においては、3検体の総生菌数に占める平均占有率が最も高かったのは *Sporobolomyces* 属菌で27%、次いで *Cladosporium* 属菌で24%であった。本研究ではかんきつ類として温州ミカンおよびレモンを用いた。かんきつ類で頻度高く発生する“blue rot”の病原菌として知られることからかんきつ類の汚染真菌として食品衛生学上重要な *Penicillium* 属菌は、温州ミカンで22%、レモンで5%の占有率で検出された。

D. 考察

これまで、果物の種類ごとにみたある種の真菌が検出される陽性検体率は様々な果実および清涼飲料水を含む果実を原料とした加工食品において報告されている(14, 23,

24)。しかし、果実に付着する真菌の網羅的な定量的解析結果の報告はない。そこで、本研究では、清涼飲料水の原料となる種類の9種類の市販の国産果実の真菌叢の網羅的および定量的調査を行った。

本研究の結果から、市販の国産果実の真菌叢においては、*Cladosporium* 属菌が最も頻度高く検出された真菌で9種類の果物の合計 23 検体から検出され(表 10)、本属菌の総生菌数に占める占有率は、イチゴ、ナシ、ブルーベリー、モモおよびレモンで比較的高く、18 から 36%であったことが示された(表1-9)。*Cladosporium* 属菌は圃場(15, 21)、果実仕分け場(7)および市場(8)など多様な場で幅広く分布する普遍的な真菌であることが知られており、本研究の結果はこれを反映したものであると考えられた。

また、*Penicillium* 属菌は *Cladosporium* 属菌に次いで頻度高く検出された真菌であった。本属菌はパツリンを産生する *P. expansum* (6)およびシトリニンを産生する *P. citrinum* (2)といったマイコトキシン産生菌を含むことから食品衛生学上重要な真菌である。さらに、本属菌はリンゴやナシの市場病害菌である *P. expansum* (5, 20, 24)およびかんきつ類の市場病害”blue rot”の原因菌である *P. digitatum* および *P. italicum* (20)を含み、市場で果実に甚大なポスト・ハーベスト被害をもたらし、また食品を汚染する頻度が高いといった意味でも重要な真菌である。本研究では、8種類の果物の合計 23 検体から検出された(表 10)。*Penicillium* 属菌は *Cladosporium* 属菌と同様に環境中で普遍的に分布する真菌であり(7, 10, 15, 27)、当属菌の検出頻度が高かったのは *Cladosporium* 属菌と同様の理由であると考

えられた。本属菌の検出頻度が高かった理由としては、さらに、前述の市場病害”blue rot”が関与している可能性がある。本病害はかんきつ類においてのみでなく、多くの果実に発生することが報告されている(20)。この植物病原菌は、果実個体の接触によって速やかに波及する。本研究の結果では、*Penicillium* 属菌の総生菌数に占める占有率は、2種類のかんきつ類を除き、比較的低かった(0から1%)。これは、*Penicillium* 属菌の胞子は果実表面に付着する頻度は高いものの、果実が傷ついていない健全な状態にあった場合には活着・増殖はしないということを示唆している。よって、市場病害として頻繁に検出されることが知られる菌種は、果物が健全な状態での真菌叢においては優位的な役割を果たしてはいないが、菌数が低くある程度の頻度で存在するので、果実の腐敗や完熟などで感染のファクターが高まった場合に一気に増殖するのであろうと推測された。よって、果実が過熟や流通過程において傷ついた場合には、汚染が広がり、重要な汚染真菌となりうるので注意が必要である。また、本研究の結果は、*Penicillium* 属菌はかんきつ類に関しては他の果実と比較して高い占有率を示した。これまでの多くの研究結果はかんきつ類の *Penicillium* 属菌に対する高い感受性を報告しており(7, 20, 23)、本研究の結果はこれと一致した。

Aspergillus 属菌は食品衛生学上重要な真菌であることが知られるが、本研究においては、ナシとブドウの各1検体から検出されるにとどまった(表1-9)。これまで、ブドウを除き、果実および清涼飲料水を含む果実の最小限の加工食品においては *Aspergillus* 属菌の検出頻度および検出生菌数は低いこと

(22, 23, 27)、また、ドライフルーツ等の水分活性の低い長期保存食品の真菌叢においては重要な役割を果たす(1, 27)ことが報告されている。本研究の結果はこれと一致した。

Aureobasidium pullulans、*Cryptococcus laurenti*および*Rhodotorula glutinis*といった果実表面の自然の真菌叢を構成する真菌種(15, 16, 21)は、リンゴおよびナシにおいて*P. expansum* (5)の、およびかんきつ類において*P. digitatum* および*P. citrinum* (29)の汚染を抑制する効果があることが報告されている。また、*Sporobolomyces roseus*、*Candida* spp.、*Pseudozyma* spp. および *Acremonium* spp.などの果実表面の自然の真菌叢を構成するその他の真菌種も、市場病害菌に対する拮抗作用を持つことが報告されている(4, 11, 18, 21)。本研究の結果では、過去に高い頻度で果実を汚染していることが報告されている市場病害菌の多くが検出されないかまたは検出されても低い頻度および占有率でしか検出されなかった。このことは、高い占有率で検出された真菌種が市場病害菌の増殖を抑えた可能性を示唆している。

本研究において、*P. citrinum* および *Alternaria* 属菌といった、マイコトキシンを産生する可能性のある真菌種が市販国産果実に生菌数は低いことが示され、果実を生食する場合の真菌によるヒトへの健康危害のリスクは低いものと思われた。しかし、本研究では分離株のマイコトキシン産生性は検討しておらずこれらの分離株がマイコトキシンを産生しているか否かは明らかではないが、上述したように、果実の状態によってはこれらの真菌種が果実上で増殖する可能性があるため、清涼飲料水の原料となる果実がマイコトキシンによる汚染を受けることも考えられた。真菌

による食中毒の発生を防止するためにも、汚染菌種を把握してそれらの生態学的特徴を考慮し、管理方法などの対策を行う必要がある。

本研究によって、清涼飲料水の原料となる種類の国産果実の真菌叢は、植物の自然の真菌叢および栽培環境から店頭で販売されるに至る間の環境の真菌叢を反映したものであることが明らかとなった。また一方で、過去の研究で注目されてきた市場病害菌およびマイコトキシン産生菌の総生菌数に占める占有率は低いことも示され、健全な状態の果実を原料とする場合、これらの真菌による食品の腐敗およびヒトへの直接の健康危害のリスクは低いことが示された。しかし、強い殺菌を施すことができない清涼飲料水などの最小限の加工食品で、果実の自然の真菌叢や環境分布真菌など非病原真菌が原料に付着して混入し、貯蔵が適切でない場合は増殖して食品の健全性を失わせる原因となることが考えられる。このことから、食品衛生的な観点において、清涼飲料水の原料となる果実については、清涼飲料水の腐敗を防止して食品の健全性を守ることに留意し、真菌叢の優占菌種となっている非病原真菌に注目した管理を行うことが重要である。

E. 結論

本研究の結果から、清涼飲料水の原料となる種類の国産果実の真菌叢は、植物の自然の真菌叢および栽培環境から店頭で販売されるに至る間の環境の真菌叢を反映したものであることが明らかとなった。また、過去の研究で注目されてきた市場病害菌およびマイコトキシン産生菌の総生菌数に占める占有率は低いことも示され、健全な状態の果実

を清涼飲料水の原料とする場合、これらの真菌による清涼飲料水の腐敗およびヒトへの直接の健康危害のリスクは低いことが示された。よって、清涼飲料水の原料となる果実については、腐敗を防止して健全性を守ることに留意し、果実の真菌叢の優占菌種となっている非病原真菌にも注目した管理を行うことが重要である。

F. 参考文献

- 1)Alghalibi, S. M. S. and Shater, A.-R. M. Mycoflora and mycotoxin contamination of some dried fruits in Yemen republic. Assiut University Bulletin of Environmental Research. 7: 19-27, 2004.
- 2)Aziz, N. H. and Moussa, L. A. A. Influence of gammaradiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. Food Control. 13: 281-288, 2002.
- 3)Barnett, H. L. and Hunter, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. Minnesota, APS press. 1998.
- 4)Barnett, J. A., et al. Yeast: Characteristics and identification. Cambridge, Cambridge University Press. 2000.
- 5)Chand-Goyal, T. and Spotts, R. A. Biological Control of Postharvest Diseases of Apple and Pear under Semi-commercial and Commercial Conditions Using Three Saprophytic Yeasts. Biological Control. 10: 199-206, 1997.
- 6)Doores, S. The microbiology of apples and apple products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 19: 133-149, 1983.
- 7)Fischer, I. H., et al. Characterisation of the fungal population in citrus packing houses. European Journal of Plant Pathology. 123: 449-460, 2009.
- 8)Kakde, U. B., et al. Seasonal variation of fungal propagules in a fruit market environment, Nagpur (India). Aerobiologia. 17: 177-182, 2001.
- 9)Klich, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2002.
- 10)Lennox, C. L., et al. Populations of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* spp. on pear fruit, and in orchards and packinghouses, and their relationship to postharvest decay. Plant Disease. 87: 639-644, 2003.
- 11)Lima, S., et al. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 23: 223-229, 1999.
- 12)Nelson, P. E., et al. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. University Park and London, The Pennsylvania State University Press. 1983.
- 13)O'Donnell, K. and Cigelnik, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution. 7: 103-116, 1997.
- 14)Park, Y.-S., et al. *Cladosporidium* sp. is