

厚生労働科学研究費補助金  
(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書  
培養によらないかび毒産生菌種検出法の開発

研究分担者 小西 良子 (麻布大学)  
研究協力者 小林 直樹 (麻布大学)  
研究協力者 渡辺 麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

食品を汚染するかび毒産生菌の迅速検出法の開発を目的として、培養を行わずにかび毒産生菌を効率よく検出する方法の開発を行った。本年度は、今後モニタリングを強化していくべきかび毒として、ジアセトキシシルペノール(4,15-DAS)に着目し、*Fusarium*属菌のうち4,15-DAS産生菌種のみを検出する方法の開発を試みた。昨年度までに行ったSTC産生菌種の迅速検出法の開発に際して確立した、改変型DNA合成酵素を用いて標的菌種のみを増幅するPCR法を4,15-DAS産生菌種へ応用し、特異的検出法の開発を行った。まず*Fusarium*属菌の種間でβ-tubulin遺伝子およびLys2遺伝子の塩基配列を比較して、対象となる4,15-DAS産生菌種にのみ共通する塩基配列を検索し、菌種特異的な検出を行うためのプライマーを設計した。β-tubulin遺伝子の塩基配列をもとに設計した系では二つの独立したPCRを行うことで4,15-DAS産生菌種を特異的に検出することとした。さらに、Lys2遺伝子の塩基配列をもとに設計した系ではマルチプレックスPCRにすることによって、一度のPCRで4,15-DAS産生菌種を特異的に検出することとした。その結果、いずれの遺伝子を用いたPCR法においても、供試した全ての4,15-DAS産生菌種を検出することに成功した。以上の結果から、4,15-DAS産生菌種を効率的に検出する方法を確立することができた。初年度に開発した、食品または飼料に付着したカビ孢子から直接DNAを抽出する方法と組み合わせることで、培養を行わずに食品および飼料のから4,15-DAS産生菌種を検出することが可能であると考えられ、4,15-DAS汚染原因菌のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

## A. 研究目的

食品や飼料となる農作物や加工品において、かび毒産生菌が付着、増殖し、かび毒汚染が発生する場合がある。かび毒が検出されていない食品や飼料においても、その後の貯蔵、流通等の管理が不適切であった場合には、かび毒産生菌が増殖し、汚染が生じる可能性がある。例えば、米や麦などの貯蔵穀物においては、生産時にかび毒による汚染が検出されない場合にもかび毒産生菌種が存在していると、貯蔵中に増殖してかび毒が産生され、かび毒により汚染される恐れがある。したがって、食品や飼料のかび毒汚染を真にコントロールするためには、かび毒を検出するだけでなく、食品そのものや周辺環境におけるかび毒産生菌による汚染の有無を調べることにより、菌汚染のルートや増殖の原因を解明し、汚染防止に努めることが重要である。以上の理由から、かび毒産生菌を食品から検出する必要がある。また、かび毒はかび毒産生菌が死滅した後も食品中に残存することから死滅したかび毒産生菌の存在の有無を判定する必要がある。そこで、本研究では、培養を経ずに食品からかび毒産生菌を直接検出できる迅速簡便な方法を遺伝子レベルで開発することを目的とした。

本研究では、特に、輸入食品において今後モニタリングを強化していくべきかび毒として、昨年度までに、ステリグマトシスチン (STC) の代表的な産生菌種として知られる *Aspergillus section Versicolores* のうち STC 産生菌種にのみを検出する培養によらない PCR 法を確立した。本年度は、*Fusarium* 属菌におけるジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) 産生菌に着目した検討を行うこととした。

*Fusarium* 属菌は、トリコテセン系かび毒、フモニシン、ゼアラレノン、モニリフォルミン等、食品を汚染する複数のかび毒の産生菌とし

て知られる。4,15-DAS はこれらのうち最も毒性が強いトリコテセン系かび毒のタイプ A に属する(図1)。主な産生菌としては、*F. acuminatum*、*F. equiseti*、*F. graminearum sensu strict (s. str.)*、*F. langsethiae*、*F. longipes*、*F. poae*、*F. scirpi*、*F. semitectum* および *F. sporotrichioides* が挙げられる。これらの顕微鏡像を図2に示した。これらの菌種は世界各地で、米や麦をはじめとした穀類、豆類、イモ類、および青果物等、多くの農作物からの検出例が報告されている。そのため、4,15-DAS は多種類の食品、および多くの輸入相手国産の食品から検出される可能性がある。しかし 4,15-DAS 産生菌は同じトリコテセン系かび毒タイプ A の T-2 トキシンおよび HT-2 トキシン産生菌と比較して、環境や食品における分布実態が十分に把握されておらず、迅速に大量の検体から産生菌の有無を調査できる検出法の開発が必要である。

そこで、本年度は、STC 産生菌で確立した方法を応用して、*Fusarium* 属菌において 4,15-DAS 産生菌種のみを検出できる PCR 法の開発を行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

4,15-DAS 産生菌種として *F. acuminatum*、*F. equiseti*、*F. graminearum s. str.*、*F. langsethiae*、*F. longipes*、*F. poae*、*F. scirpi*、*F. semitectum* および *F. sporotrichioides* の 9 菌種、これらの菌種と近縁だが 4,15-DAS 非産生菌種と考えられる、*F. avenaceum*、*F. crookwellense*、*F. culmorum*、*F. kyushuense*、*F. lateritium*、*F. tritinctum* の 6 菌種、合計 15 菌種 15 株を用いた(表1, 図2)。

### 2. 培養真菌からのゲノム DNA 抽出

胞子をポテトデキストロース液体培地 (PDB) に接種して 25℃ で 2 日間培養し、その後菌系体

を回収した。ゲノム DNA の抽出は SDS 法<sup>1)</sup>または DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用いて添付のプロトコルに従って行った。抽出した DNA は使用するまで -20℃ で保存した。

### 3. 4,15-DAS 産生菌種特異的配列の検索

4,15-DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種およびその近縁種の  $\beta$ -tubulin 遺伝子および *Lys2* 遺伝子の登録配列を NCBI のデータベースからダウンロードし、MEGA6.0<sup>2)</sup> を用いて ClustalW によりアライメントを行った。使用した  $\beta$ -tubulin 遺伝子登録配列のアクセッション番号は以下の通り：AB587072 (*F. poae*)、AB587071 (*F. langsethiae*)、AB587036 (*F. semitectum*)、AB587076 (*F. sporotrichioides*)、AB587049 (*F. acuminatum*)、AB587047 (*F. equiseti*)、AB820716 (*F. longipes*)、AB587040 (*F. graminearum*)、AB820714 (*F. camptoceras*)、AB587077 (*F. tricinatum*)、AB587052 (*F. lateritium*)、AB820709 (*F. culmorum*)、AB587067 (*F. kyushuense*)、AB587059 (*F. verticillioides*)、使用した *Lys2* 遺伝子登録配列のアクセッション番号は以下の通り：AB586973 (*F. poae*)、AB586953 (*F. acuminatum*)、AB586972 (*F. langsethiae*)、AB586975 (*F. sporotrichioides*)、AB586944 (*F. graminearum*)、AB586951 (*F. equiseti*)、AB586940 (*F. semitectum*)、AB586968 (*F. kyushuense*)、AB586969 (*F. crookwellense*)、AB586942 (*F. culmorum*)、AB586954 (*F. lateritium*)、AB586979 (*F. tricinatum*)、AB586965 (*F. avenaceum*)。

### 4. 菌種特異的検出 PCR

3 において作成したアライメントを基に、標的菌種の塩基配列がその他の菌種と異なる部分にプライマーを設計し、HiDi DNA polymerase (myPOLLS Biotec GmbH) を用い、添付のプロ

トコルに従って PCR を行った。PCR 条件は、95℃ で 3 分間熱変性を行った後、95℃ 15 秒、60℃ 10 秒、72℃ 60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、72℃ で 120 秒間最終伸長を行った。その後、PCR 産物について 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅の有無を確認した。

### C. 研究結果

昨年度までに *Aspergillus* section *Versicolores* における STC 産生菌種の迅速検出法として確立した、改変型 DNA 合成酵素を使用した PCR 技術を、4,15-DAS 産生菌種の特異的検出に応用して、4,15-DAS 産生菌種の迅速検出系の開発を行った。

先行研究<sup>3)</sup>を基に、*F. acuminatum*、*F. equiseti*、*F. graminearum* s. str.、*F. langsethiae*、*F. longipes*、*F. poae*、*F. scirpi*、*F. semitectum*、*F. sporotrichioides* の 9 菌種を対象とする 4,15-DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種とし、これらの近縁種の中から 4,15-DAS を産生することが知られていない 6 菌種 (*F. avenaceum*、*F. crookwellense*、*F. culmorum*、*F. kyushuense*、*F. lateritium*、*F. tricinatum*) を加えた合計 15 菌種を用い、4,15-DAS 産生性 *Fusarium* 属菌種 9 菌種を特異的に検出する系を検討した。

#### (1) $\beta$ -tubulin 遺伝子部分配列を基にした 4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR

まず、4,15-DAS 産生菌種を含む *Fusarium* 属菌種について、データベースに登録されている遺伝子の塩基配列をダウンロードして比較し、4,15-DAS 産生菌種に特異的なサイトの検索を行った。

はじめに、真菌において種の同定に頻繁に用いられる  $\beta$ -tubulin 遺伝子について、4,15-DAS 産生菌種特異的塩基配列の検索を行った。対象

菌種のうち、 $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列がデータベースに登録されていた 4,15-DAS 産生性菌種 8 菌種および 4,15-DAS 非産生菌種 5 菌種について塩基配列を比較した。全菌種でアライメントが可能であった 871 bp において、4,15-DAS 産生菌種 (8 菌種) に共通し、4,15-DAS 非産生菌種 (5 菌種) とは異なるサイトを検索したが、条件を満たすサイトは存在しなかった。そこで、できる限り多くの 4,15-DAS 産生菌種に共通し、4,15-DAS 非産生菌種と異なるサイトを検索したところ、*F. graminearum* s. str. を除く 7 菌種にのみ共通するサイトが存在したため、当該サイトがプライマーの 3' 末端に来るようにプライマーを設計した (図 3A)。併せて、*F. graminearum* s. str. 特異的な領域にプライマーを設計し (図 3B)、二つの PCR を行うことで 4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出する系の確立を試みた。

培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートに HiDi DNA polymerase を用いた PCR を行なったところ、前者のプライマーセットでは 4,15-DAS 産生菌種 9 菌種のうち *F. graminearum* s. str. を除く 8 菌種において目的の増幅産物が得られ (図 4A)、後者のプライマーセットでは *F. graminearum* s. str. 特異的な増幅が得られた (図 4B)。以上より、これら二つの PCR を組み合わせることで、4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

## (2) Lys2 遺伝子部分配列を基にした 4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR

次に、 $\beta$ -tubulin 遺伝子と同様にしばしば真菌の系統解析に使用される Lys2 遺伝子について、4,15-DAS 産生菌種特異的塩基配列の検索を行った。

対象菌種の内、Lys2 遺伝子の配列がデータベースに登録されていた 4,15-DAS 産生性菌種 7

菌種および非産生菌種 6 菌種について塩基配列を比較した。全菌種でアライメントが可能であった 668 bp において、4,15-DAS 産生菌種 (7 菌種) に共通し、4,15-DAS 非産生菌種 (6 菌種) とは異なるサイトを検索したが、条件を満たすサイトは存在しなかった。そこで、4,15-DAS 産生菌種のうち *F. poae* を除く 6 菌種に共通する領域が存在したため、当該領域にプライマーを設計し (図 5A) 併せて、*F. poae* 特異的な領域にプライマーを設計した (図 5B)。この際、Forward 側のプライマーを同じ位置に設計することで、Reverse 側のプライマーを混合して用いたマルチプレックス PCR の系とすることとした。

培養菌株から抽出したゲノム DNA をテンプレートに、設計した 3 つのプライマーを用いた HiDi DNA polymerase によるマルチプレックス PCR を行ったところ、*F. poae* ではおよそ 220 bp の増幅産物が得られ、そのほかの 4,15-DAS 産生菌種 8 菌種においてはおよそ 400 bp の増幅産物が得られた (図 6)。4,15-DAS 非産生菌種についてはすべて増幅が見られなかった。以上より、設計したマルチプレックス PCR の系により、4,15-DAS 産生菌種を特異的に検出することが可能であることが明らかとなった。

## D. 考察

本研究では、食品において今後モニタリングを強化していくべきかび毒として 4,15-DAS に着目し、*Fusarium* 属菌のうち 4,15-DAS 産生菌種のみを検出する迅速検出法の開発を行った。昨年度までに *Aspergillus* section *Versicolores* のうち STC 産生菌種にのみを迅速に検出する系として確立した、配列特異性の高い改変型酵素を用いた PCR 法を 4,15-DAS 産生菌種に応用した。この系ではプライマーの 3' 末端の 1 塩基の違いを認識し、完全一致しない場合は増幅

効率が著しく低下することが報告されている HiDi DNA polymerase を用いる。そこで、4,15-DAS 産生菌種および近縁な 4,15-DAS 非産生菌種について  $\beta$ -tubulin 遺伝子および Lys2 遺伝子の塩基配列を比較し、4,15-DAS 産生菌種特異的な塩基配列にプライマーの設計を試みた。

$\beta$ -tubulin 遺伝子の配列比較においてはすべての 4,15-DAS 産生菌種に共通する特異的なサイトは見つからず、4,15-DAS 産生菌種 9 菌種のうち *F. graminearum* s. str.のみを認識するプライマーセットと当該菌種を除く 8 菌種をまとめて認識するプライマーセットの二つを併用することで、4,15-DAS 産生菌種をすべて検出可能な系を開発した(図 3 および図 4)。開発した系は特異的に 4,15-DAS 産生菌種を検出することが可能ではあったが、二つの PCR を行う必要があり、STC 産生菌種を対象に確立した迅速検出法に比べて煩雑であった。

一方、Lys2 遺伝子の配列比較においても 4,15-DAS 産生菌種に共通する特異的なサイトは見つけることができなかったが、配列上近い位置に *F. poae* 特異的なサイトとそのほかの 4,15-DAS 産生菌種 8 種にのみ共通するサイトが存在した。これらの位置にそれぞれ Reverse 側のプライマーを設計し、Forward 側のプライマーを共通にすることでマルチプレックス PCR の系を検討した。その結果、マルチプレックス PCR により、全ての 4,15-DAS 産生菌種を検出することに成功した(図 5 および図 6)。このことにより、4,15-DAS 産生菌種においても、STC 産生菌種を対象とした系と同様に一度の PCR により迅速に標的菌種のみを検出する系を確立することができた。

今後は、4,15-DAS により汚染された食品から培養を行うことなく直接抽出した DNA を用いて PCR を行い、4,15-DAS 産生菌検出のためのスクリーニング法として利用可能か検討することが望まれる。ただ、昨年度までの研究によっ

て、培養を経ずに食品に付着したカビ孢子から直接 DNA の抽出が可能であることを示しており、4,15-DAS 産生菌についても、食品や飼料からの直接検出が可能であると考えられる。

#### E. 結論

以上の結果から、4,15-DAS 産生菌種を特異的に、且つ迅速に検出することが可能な方法を確立することができた。この方法を利用することで、食品または飼料に付着した 4,15-DAS 産生菌種を培養することなく直接 PCR によって迅速に検出することができると考えられる。4 時間程度で 4,15-DAS を産生するカビの食品等からの検出が可能となり、4,15-DAS 汚染のスクリーニング検査として有効な手法となることが期待される。

#### F. 参考文献

- 1) Watanabe M, Lee K, Goto K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y: Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *Journal of Food Protection* (2010) 73: 1077–1084
- 2) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S: MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* (2013) 30: 2725–2729
- 3) Watanabe M, Yonezawa T, Sugita-Konishi Y and Kamata Y: Utility of the phylogenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin-producing potential. *Food Addit Contam Part A* (2013) 30: 1370–

## G. 研究業績

## 【論文発表】

Onami J<sup>†</sup>, Watanabe M<sup>†</sup>, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J: Fumonisin-production by *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Japanese Foods and Environments. *Food Safety* (2018) 6: 74-82 (†筆頭著者同等貢献者)

Kobayashi, N, Kubasaki, A, Takahashi, Y, Yanai, M., Konuma, R, Uehara, S, Chiba, T, Watanabe, M, Terajima, J and Sugita-Konishi, Y: Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Safety* (2018) 6: 67-73

## 【学会発表】

1) Sugita-Konishi Y, Takeda N, Watanabe M, Kobayashi N and Yoshinari T. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of the Modified 4,15-Diacetoxyscirpenol and their Occurrence in Japanese Retail Food. SOT 58<sup>th</sup> annual meeting (2019, 3, Baltimore)

2) 加田睦月、内ヶ島美岐子、吉成知也、三宅 司郎、小林直樹、小西良子. ステリグマトシ スティンの ELISA によるスクリーニング

3) 佐藤和貴、吉成知也、窪崎敦隆、小林直樹、小西良子、工藤由起子、渡辺麻衣子. 国内流通穀類におけるステリグマトシチン産生菌の分布に関する研究. 日本マイコトキシン学会第 83 回学術講演会(2019, 1, 川崎)

4) 小林直樹、古川優奈、佐藤悠人、渡辺麻衣子、栗林尚志、島津徳人、小西良子. Change of fungal microflora in the house by dogs. 平成 30 年室内環境学会学術大会(2018, 12, 東京)

5) 小池義浩、吉成知也、中川博之、上垣隆一、高橋治男、清水公德、工藤由起子、渡辺麻衣子. *Fusarium* 属菌におけるフモニシン類産生性に関する分類学的検討. 日本マイコトキシン学会第 82 回学術講演会 (2018, 8, 帯広)

6) Watanabe M, Onami J, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J. Study on fumonisin-productivity of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* derived from foods in Japanese markets and environment UJNR 2018 (2018, 5, Yokohama)

表 1 . 供試菌株

菌種	株番号
DAS産生菌種	
<i>F. acuminatum</i>	MAFF236716
<i>F. equiseti</i>	MAFF236434
<i>F. graminearum</i> sensu strict	MAFF240270
<i>F. langsethiae</i>	FRC T-1000
<i>F. longipes</i>	IFM50036
<i>F. poae</i>	MAFF305947
<i>F. scirpi</i>	CBS448.84
<i>F. semitectum</i>	MAFF236521
<i>F. sporotrichioides</i>	ATCC34914
DAS非産生菌種	
<i>F. avenaceum</i>	ATCC200255
<i>F. crookwellense</i>	MAFF101144
<i>F. culmorum</i>	IFM50210
<i>F. kyushuense</i>	MAFF237645
<i>F. lateritium</i>	MAFF235344
<i>F. tritinctum</i>	ATCC38183

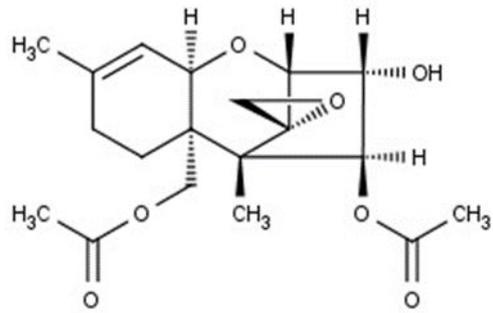
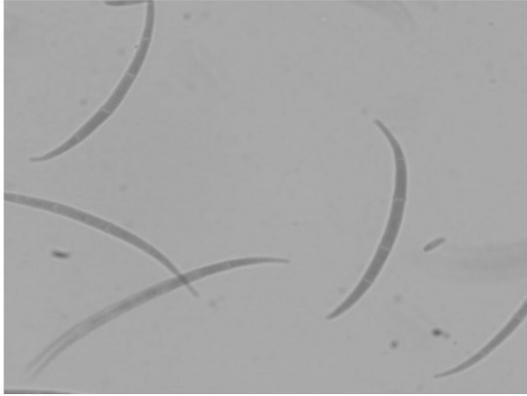
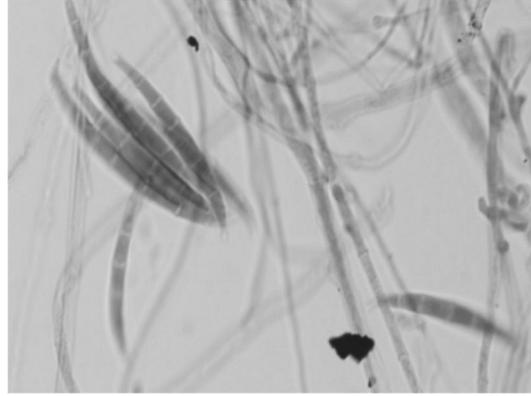


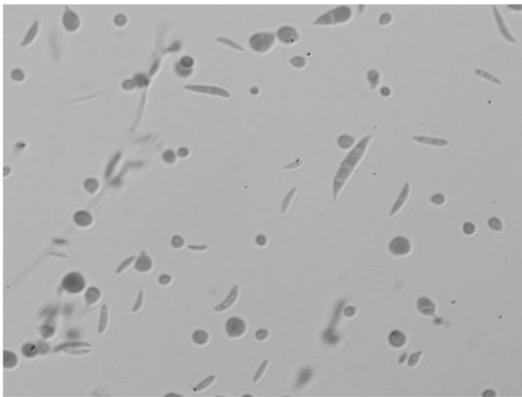
図 1. ジアセトキシシルペノール (4,15-DAS) 構造式



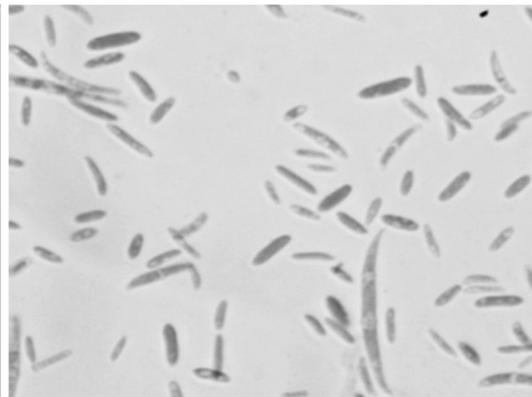
*Fusarium acuminatum*



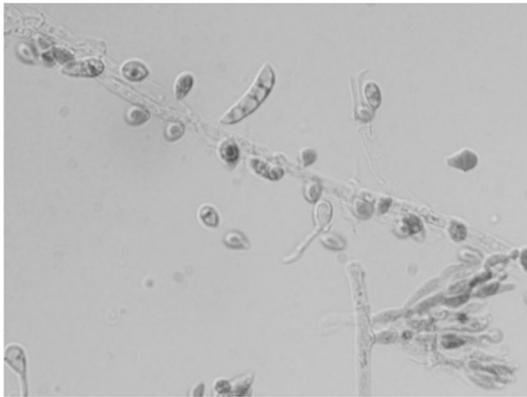
*Fusarium graminearum*



*Fusarium sporotrichioides*



*Fusarium equiseti*



*Fusarium poae*



*Fusarium semitectum*

図2 . 4,15-DAS 産生菌の顕微鏡像

A.

	Forward primer →	Reverse primer ←
<i>F. poae</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	-----CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. langsethiae</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	-----CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. sporotrichioides</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	-----CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. acuminatum</i>	ACTGGGCG ····TACTGAGGGAGCTG-----	-----CCTCTTACGGCGACC ····TCTCCGCC
<i>F. graminearum</i>	ACTGGGCC ····TACACCGAGGGGTGCTG-----	-----CCTCTTACGGCGACC ····TCTCTGCC
<i>F. equiseti</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	-----CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. longipes</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	-----CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
<i>F. semitectum</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	-----CCTCTTACGGCGACT ····TCTCCGCC
-----		
<i>F. kyushuense</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGAGCTG-----	-----CCTCTTATGGGAGACC ····TCTCCGCC
<i>F. culmorum</i>	ACTGGGCC ····TACACCGAGGGGTGCTG-----	-----CCTCTTACGGCGACC ····TCTCTGCC
<i>F. lateritium</i>	ACTGGGCC ····TACTGAGGGGTGCCG-----	-----CATCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCC
<i>F. tricinctum</i>	ACTGGGCG ····TACACCGAGGGAGCTG-----	-----CCTCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCC
<i>F. avenaceum</i>	ACTGGGCG ····TACTGAGGGAGCTG-----	-----CCTCCTACGGGAGACC ····TCTCCGCC

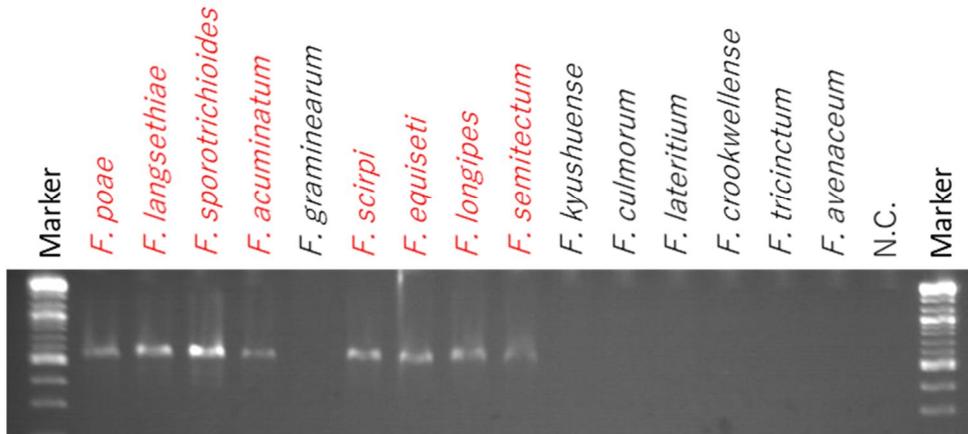
B.

	Forward primer →	Reverse primer ←
<i>F. poae</i>	CTTCAACG ····TCACTGTTGTCACGAA-----	-----ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. langsethiae</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	-----ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. sporotrichioides</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	-----ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. acuminatum</i>	CTTCAACG ····CCACTCATGCCACGAA-----	-----ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. graminearum</i>	CTTCAACG ····TCACTACTGCCACGAA-----	-----ACACCGAGGGGTGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. equiseti</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	-----ACACTGAAGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. longipes</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	-----ACACTGAAGGAGCTG ····CAACGTCT
<i>F. semitectum</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	-----ACACTGAAGGAGCTG ····CAACGTCT
-----		
<i>F. kyushuense</i>	CTTCAACG ····TCATTCCACACGAAA-----	-----ACACTGAGGGAGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. culmorum</i>	CTTCAACG ····TCACTCCTGCCACGAA-----	-----ACACCGAGGGGTGCTG ····CCAAGTTCT
<i>F. lateritium</i>	CTTCAACG ····ACATTGATTGCAAGAA-----	-----ACACTGAGGGGTGCCG ····CCAGGTCT
<i>F. tricinctum</i>	CTTCAACG ····ACACTGATTGCAAGAA-----	-----ACACCGAGGGAGCTG ····CCAGGTCT
<i>F. avenaceum</i>	CTTCAACG ····ATATTGATTTGAGAA-----	-----ACACTGAGGGAGCTG ····CCAGGTCT

図 3. 4,15-DAS 産生菌種特異的検出用 Primer の検討 (β-tubulin)

β-tubulin 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位を示す。A：4,15-DAS 産生菌種 8 菌種の内、*Fusarium graminearum* を除く 7 菌種特異的な領域。B：*Fusarium graminearum* 特異的な領域。

A.



B.

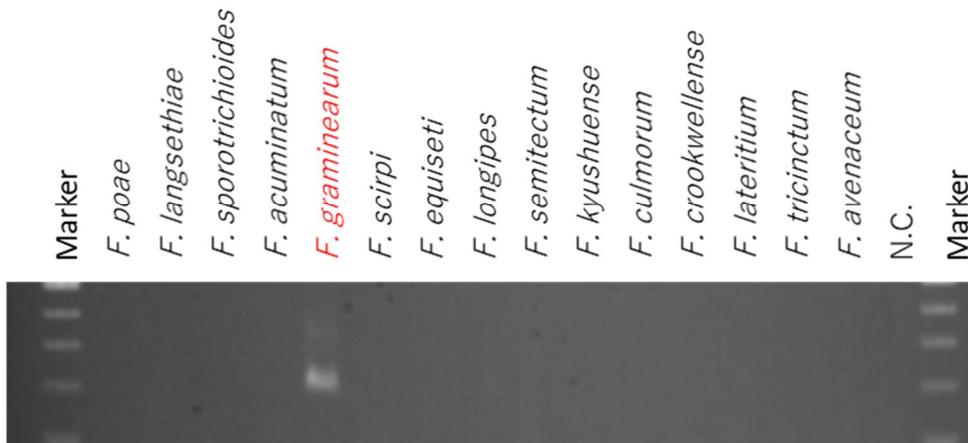


図 4. 4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR ( $\beta$ -tubulin)

A : 4,15-DAS 産生菌種 9 菌種の内、*Fusarium graminearum* を除く 8 菌種特異的な増幅.

B : *Fusarium graminearum* 特異的な増幅.

A.

	Forward primer →	Reverse primer 1 ←
<i>F. poae</i>	CCGCACTG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCGTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. langsethiae</i>	CCGCACTG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. sporotrichioides</i>	CCGCACGG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. acuminatum</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTATG
<i>F. graminearum</i>	CCGCACAG ····GCGTTACCTTGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTATG
<i>F. equiseti</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. semitectum</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTTGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
-----		
<i>F. kyushuense</i>	CCGCACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. crookwellense</i>	CCGCACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. culmorum</i>	CCGCACAG ····GCGTTACCTTGAGTCTG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. lateritium</i>	TCGTACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	GTCAGAACCCCTTGA ····TAAGGTACG
<i>F. tricinctum</i>	TTGCACAG ····ACGTCACTTTGAATCTT-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG
<i>F. avenaceum</i>	TCGCACAG ····ACGTTATCTTGAAATCCG-----	GCCAGAACCCCTTGA ····CAAGGTACG

B.

	Forward primer →	Reverse primer 2 ←
<i>F. poae</i>	CCGCACTG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····TCCTGAGTT
<i>F. langsethiae</i>	CCGCACTG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	AACCAACTCTCGTCA ····TCCTGAGTT
<i>F. sporotrichioides</i>	CCGCACGG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	AACCAACTCTCGTGA ····TCCCGAGTT
<i>F. acuminatum</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	AACCAACTCTCGTAA ····TCCTGAGTT
<i>F. graminearum</i>	CCGCACAG ····GCGTTACCTTGAGTCTG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····TCCTGAGTT
<i>F. equiseti</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTCGAGTCTG-----	AGCCAATTCTCGTCA ····TCCTGAATT
<i>F. semitectum</i>	CCGCACAG ····ACGTTACCTTGAGTCTG-----	AGCCAATTCTCGTCA ····CCCTGAGTT
-----		
<i>F. kyushuense</i>	CCGCACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····TCCCGAGCT
<i>F. crookwellense</i>	CCGCACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	AGCCAACTCTCGTCA ····TCCCGAGCT
<i>F. culmorum</i>	CCGCACAG ····GCGTTACCTTGAGTCTG-----	AACCAACTCTCGTCA ····TCCTGAGTT
<i>F. lateritium</i>	TCGTACAG ····ACGTTATCTCGAGTCTG-----	AGCCGATTCTCGTGA ····TCCCGAGTT
<i>F. tricinctum</i>	TTGCACAG ····ACGTCACTTTGAATCTT-----	AGCCAATTTTGTAA ····TCCCGAGTT
<i>F. avenaceum</i>	TCGCACAG ····ACGTTATCTTGAAATCCG-----	AGCCAATTCTCGTAA ····TCCTGAGTT

図 5. 4,15-DAS 産生菌種特異的検出用 Primer の検討 (Lys2)

Lys2 遺伝子塩基配列のアライメントと使用したしたプライマーのアニーリング部位を示す。  
 A : *Fusarium poae* 特異的な領域 . B : 4,15-DAS 産生菌種 7 菌種の内、*Fusarium poae* を除く 6 菌種特異的な領域 .

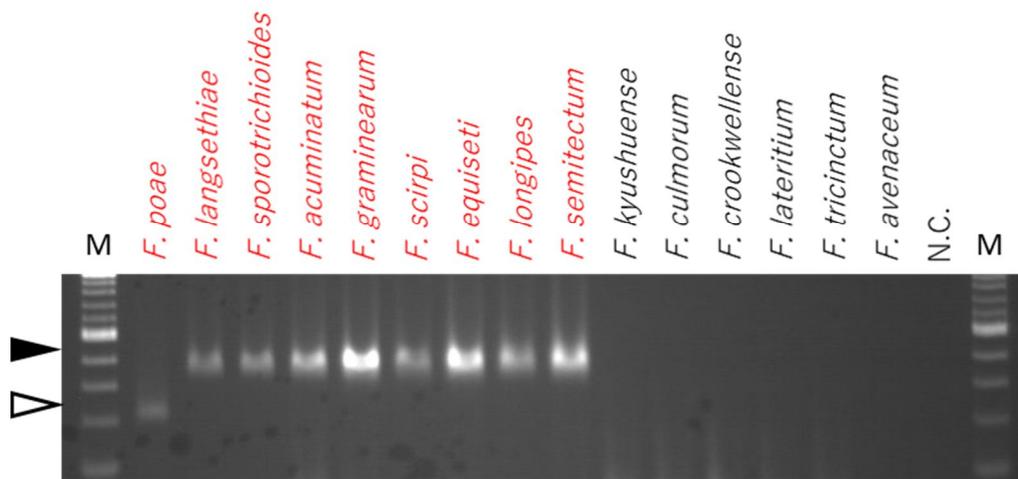


図 6. 4,15-DAS 産生菌種特異的検出 PCR (*lys2*)

*Fusarium poae* において約 220 bp の増幅産物(白矢頭)が検出され、他の 8 種の 4,15-DAS 産生菌種において約 400 bp の増幅産物(黒矢頭)が検出された。