特異的プライマーを用いた PCR による罹病タバコ種子 からの *Stemphylium lycopersici* の検出

黒瀬 大介^{1)†}・Hoang, H. L.²⁾・古屋 成人³⁾・松本 優³⁾
竹下 稔⁴⁾・對馬 誠也⁵⁾・土屋 健一³⁾

(¹⁾CABI Europe-UK・(²⁾Department of Molecular Plant Pathology, Agricultural Genetics Institute, Hanoi.

(³⁾九州大学農学部・(⁴⁾宮崎大学農学部・(⁵⁾東京農業大学農学部)

Detection of *Stemphylium lycopersici* from tobacco seeds using PCR with specific

primers. Daisuke Kurose^{1)†}, Long H. Hoang²⁾, Naruto Furuya³⁾, Yu Matsumoto³⁾, Minoru Takeshita⁴⁾, Seiya Tsushima⁵⁾, and Kenichi Tsuchiya³⁾ (¹⁾CABI Europe-UK, Egham, Surrey TW20 9TY, UK. (²⁾Department of Molecular Plant Pathology, Agricultural Genetics Institute, Tu liem, Hanoi, Vietnam. (³⁾Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan. (⁴⁾Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan. (⁵⁾Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Atsugi, Kanagawa 243-0034, Japan)

Stemphylium lycopersici is a common pathogen on vegetable crops causing severe disease in the world. In 2009, a preemergence damping-off caused by *S. lycopersici* was observed on tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L.) in Fukuoka, Japan. However, the etiology and mode of infection of this pathogen in tobacco seeds have not been clarified yet. In the present study, a primer pair was designed for direct, rapid and specific detection of *S. lycopersici* based on the sequences of the internal transcribed spacer regions including the 5.8S rDNA. A PCR product of approximately 449 bp was obtained only when the DNA extracted from pure cultures of *S. lycopersici* was used. No amplification was observed for other *Pleospora*/*Stemphylium* species or other genera of fungi. The PCR amplified as little as 100 fg of genomic DNA of *S. lycopersici*. Furthermore, *S. lycopersici* was detected from resultant tobacco seeds after the flowers were inoculated with this pathogen. Therefore, the designed primer pair is useful for the specific detection of *S. lycopersici* in tobacco seeds.

Keywords : molecular marker, *Nicotiana tabacum*, *Pleospora*, preemergence damping-off, rDNA-ITS

緒 言

Stemphylium lycopersici (Enjoji) Yamamoto は子囊菌門に属し、世界中の16科22属の植物に病害を引き起こす病原菌である (Farr and Rossman 2016)。本菌は1931年、灰褐色の斑点を形成後、枯死したトマト葉から世界で初めて発見された (山本 1960)。それ以降、日本ではカラコンエ (Tomioka et al., 1997)、キク (Nishi et al., 2009)、ピーマン (Tomioka and Sato 2011)、シュッコンネメシア (野澤ら, 2016) 等、現

在までに9科11属において病害が報告されている (農業生物資源データベース, 2016)。

2009年、九州大学実験温室内においてタバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow) 種子の発芽が阻害される現象が確認された (Kurose et al., 2014)。本現象は *S. lycopersici* により引き起こされ、発芽不全を引き起こした種子には黒褐色の壊死斑が認められた。また、本菌はタバコ葉への直接接種により病原性を示すとともに、種子伝染性であることが示唆された。そのため、今後露地栽培タバコでの発病に至る可能性も考えられる。しかしながら、現在までのところ本菌のタバコへの感染経路は不明である。壊死斑

† D.Kurose@cabi.org

を呈した罹病種子は健全なものとの判別が困難であることから、被害拡大を防ぐためには本発芽阻害の原因菌である *S. lycopersici* の迅速な検出法の開発が必要である。

PCR法は、短時間で目的とするDNA断片を大量に増幅することができるため、病原菌の検出として利用されている。PCRを利用した植物病原糸状菌の検出については、リボソームDNAのinternal transcribed spacer (rDNA-ITS) 領域に注目した菌種特異的プライマーを設計する例が多く報告されている (Zhang et al., 2005; Raj et al., 2012; Pravi et al., 2014)。rDNA-ITS領域は、保存性の高い5.8S rDNA遺伝子と変異に富む塩基配列を有する2つのITS領域から構成されている。同領域は菌種に特異的な塩基配列になっていることが多く、菌の高精度な検出や近縁菌種の同定に有効である。

本研究では、タバコ種子において発芽阻害症状を引き起こす *S. lycopersici* を迅速に検出することを目的とし、本種菌を特異的に検出できるプライマーを設計するとともに、タバコ種子からの検出に適したPCR法を開発した。

材料および方法

1. 供試菌株

罹病タバコ (*N. tabacum* L. cv. Bright Yellow) 種子より分離した *S. lycopersici* KuNBY1~KuNBY4 (MAFF 306895-306898) の計4菌株を供試した (Kurose et al., 2014)。また、本研究において設計したプライマーに関する特異性の確認には、CABI Genetic Resources Collection (Egham, UK) 保存の *Pleospora/Stemphylium* 属の10菌種11菌株 (*P. gracilariae*, *P. herbarum*, *P. tarda*, *P. triglochicola*, *S. globuliferum*, *S. lycopersici* 2菌株, *S. majusculum*, *S. sarciniforme*, *S. solani* および *S. vesicarium*) を、また他属糸状菌として、*Alternaria alternata*, *Bionectria ochroleuca*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Glomerella cingulata*, *Mycosphaerella polygona-cuspidati*, *Nigrospora sacchari*, *Pestalotiopsis microspora*, *Phoma nebulosa* および *Phomopsis obscurans* の10属10菌株を参照菌として、それぞれ供試した (Table 1)。

2. 供試菌株からのDNA抽出

タバコ種子由来菌 *S. lycopersici* 4菌株 (KuNBY1~KuNBY4) および参照菌 *M. polygona-cuspidati* について、以下の方法でDNAを抽出した。

S. lycopersici はV8寒天平板培地 (Miller 1955) で、また *M. polygona-cuspidati* はジャガイモ・ニンジン寒天 (PCA) 平板培地 (Kurose et al., 2015) において、それぞれ25℃で約4週間培養した後、火炎滅菌したメスを用いて菌糸体を掻き取り、滅菌乳鉢で5分間磨砕した後、-20℃に静置した。静置30分後、磨砕した菌糸体の入った乳鉢を取り出し、DNA抽出キット DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社製) を用いて磨砕液から菌体DNAをそれぞれ抽出した。なお、抽出方法はプロトコールに従って行った。一方、*M. polygona-cuspidati* を除く参照菌20菌株は、PCA 平板培地で25℃、約1週間培養し、火炎滅菌したメスを用いて掻き取った菌糸体を MicroLYSIS-Plus (Microzone 社製) 20 µl に懸濁後、プロトコールに従って菌体DNAをそれぞれ抽出した。得られた菌体DNAは-20℃で凍結保存した。

3. 特異的プライマーの設計

S. lycopersici KuNBY1~KuNBY4 および MAFF 744030, *S. herbarum* MAFF 305562, *Stemphylium* sp. MAFF 731071 および *A. alternata* ATCC 46561 の塩基配列情報を日本DNAデータバンクより取得した。その後、これらの情報を用いてアライメントを行うことにより、rDNA-ITS領域における相同性の低い塩基配列の部分を選択し、プライマーを設計した。

4. プライマーの特異性の検討および検出限界の測定

設計したプライマー対 (SLIF および SLIR) について特異性を確認するため、タバコ種子由来の *S. lycopersici* 4菌株に近縁な *Pleospora/Stemphylium* 属10種および他属糸状菌10属、計25菌株を供試した。

設計したプライマーを用いてPCRを行う前に、rDNA-ITS領域を増幅するユニバーサルプライマー ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') および ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) を用いてPCRを行い、増幅されることを予め確認した。反応液は各DNA溶液2 ngを鋳型とし、各10 µM プライマー (ITS1/ITS4, SLIF/SLIR) 0.5 µl および MegaMix-Royal (Microzone 社製) 10 µl を加えて合計20 µl とした。増幅反応はサーマルサイクラー (PCR Express; Thermo Hybaid 社製) を用いて、96℃ 5分を1サイクル、続いて95℃ 5分、50℃ (ITS1/ITS4) あるいは65℃ (SLIF/SLIR) 30秒および72℃ 1分のサイクルを36回繰り返した後、72℃ 10分伸長させた。PCR後、得られたPCR産物を1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い、泳動後の増幅産物を SafeView Nucleic Acid Stain

Table 1. Fungal isolates used to screen the specificity of the primer

Species	Isolate no ^{a)}	Isolation source	Location of collection	PCR amplification	
				ITS1/ITS4	SLIF/SLIR
<i>Stemphylium lycopersici</i>	KuNBY1 (MAFF306895)	<i>Nicotiana tabacum</i>	Fukuoka, Japan	+ ^{b)}	+
	KuNBY2 (MAFF306896)	<i>N. tabacum</i>	Fukuoka, Japan	+	+
	KuNBY3 (MAFF306897)	<i>N. tabacum</i>	Fukuoka, Japan	+	+
	KuNBY4 (MAFF306898)	<i>N. tabacum</i>	Fukuoka, Japan	+	+
	IMI 274147	<i>Platycodon</i> sp.	New Zealand	+	+
	IMI 274303	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Australia	+	+
<i>Pleospora gracilariae</i>	IMI 339835	<i>Gracilaria</i> sp.	Israel	+	–
<i>P. herbarum</i>	IMI 276975	<i>Medicago sativa</i>	India	+	–
<i>P. tarda</i>	IMI 135456	<i>M. sativa</i>	Canada	+	–
<i>P. triglochynicola</i>	IMI 122774ii	<i>Triglochin maritima</i>	United Kingdom	+	–
<i>S. globuliferum</i>	IMI 135458	<i>Commelina</i> sp.	United States	+	–
<i>S. majusculum</i>	IMI 135459	<i>Lathyrus maritimus</i>	United States	+	–
<i>S. sarciniiforme</i>	IMI 140707	<i>Cicer arietinum</i>	United States	+	–
<i>S. solani</i>	IMI 280800	<i>Ly. esculentum</i>	United States	+	–
<i>S. vesicarium</i>	IMI 135457	<i>Pisum sativum</i>	Canada	+	–
<i>Alternaria alternata</i>	IMI 81622	Wood block submerged in sea water	United Kingdom	+	–
<i>Bionectria ochroleuca</i>	IMI 71095	<i>Lilium auratum</i>	United States	+	–
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	IMI 49627	<i>P. sativum</i>	United States	+	–
<i>Fusarium oxysporum</i>	IMI 338113	<i>Ly. esculentum</i>	United Kingdom	+	–
<i>Glomerella cingulata</i>	IMI 356876	<i>Citrus medica</i>	United States	+	–
<i>Mycosphaerella polygona-cuspidati</i>	IMI 395028	<i>Fallopia japonica</i>	Nagasaki, Japan	+	–
<i>Nigrospora sacchari</i>	IMI 129007	<i>Saccharum officinarum</i>	Ecuador	+	–
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	IMI 307944	Textile sample	Panama	+	–
<i>Phoma nebulosa</i>	IMI 194766	<i>Urtica dioica</i>	Austria	+	–
<i>Phomopsis obscurans</i>	IMI 166238	<i>Fragaria vesca</i>	United States	+	–

a) IMI: Genetic Resource Collection, CABI, Egham UK, MAFF: NARO Genebank, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan. b) +: positive, -: negative.

(NBS Biologicals 社製) で染色し、紫外線照射下で観察した。

PCR による *S. lycopersici* KuNBY1 の菌体 DNA の検出限界については、滅菌蒸留水による 10ng/μl から 1 fg/μl までの 10 倍段階希釈液を作製し、それぞれ 1 μl における PCR 増幅の有無を確認した。

5. タバコ花器への供試菌株の接種

供試植物としてタバコ (*N. tabacum* L. cv. Bright Yellow) を用いた。九州大学大学院農学研究院植物病理学研究室保存の種子を、2% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 5 分間浸漬し、滅菌蒸留水で 3 回洗浄した。同種子を 1/2 ムラシゲ・スクーグ基礎 (MS)

平板培地 {Murashige and Skoog Basal Medium (Sigma-Aldrich 社製) 2.2g, Phytigel™ BioReagent (Sigma-Aldrich 社製) 6.0g, 蒸留水 1 L, pH5.8} に播種し、生育させた後、プラスチックポットに移植し、花器を形成させた。接種源とした供試 4 菌株 KuNBY1~KuNBY4 は以下のように調製した。まず、V8A 平板培地上で前培養した各菌株の菌糸を培地ごとコルクボーラーでくり抜き、ディスク 3 個を 200 ml 三角フラスコに入れた PD 液体培地 (Difco 社製) 150 ml に移植し、25℃, 170 rpm で 2 週間振とう培養した。次いで、培養液ごと菌糸をホモジナイザー (Ace Homogenizer; 日本精機製作所製) を用いて

15,000rpm, 5 秒間破碎した懸濁液を接種源とし, タバコ花器に塗抹接種した。対照区として PD 液体培地に塗抹接種した。

6. タバコ種子からの接種菌株の検出

前述の方法により, 花器感染させたタバコから得られた種子について, Tween 80 (0.5% v/v) 加用の 2% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 5 分間浸漬し, 滅菌蒸留水で 3 回洗浄し, 1/2MS 平板培地への播種および DNA 抽出に供試した。種子からの DNA 抽出は種子 15 粒の磨砕液から DNeasy Plant Mini Kit を用いて行った。なお, 抽出方法はプロトコールに従い, 得られた菌体 DNA は -20℃ で凍結保存した。この DNA を鋳型として特異的プライマーを用いて PCR を行い, タバコ種子中の感染菌の存在を確認した。反応液の組成は鋳型 DNA 10ng, 10× PCR Buffer for Brend *Taq* 2.5 μl, 2 mM dNTPs 2.5 μl, 各 10 μM プライマー (SLIF/SLIR) 0.5 μl, Brend *Taq* (東洋紡社製) (1U/μl) 0.25 μl の合計 25 μl とし, 合成反応はサーマルサイクラー (MyCycler™ Thermal Cycler; Bio Rad 社製) を用いて行った。反応条件は, 96℃ 5 分を 1 サイクル, 続いて 94℃ 45 秒, 60℃ 30 秒, および 72℃ 90 秒を 36 サイクルとした。得られた PCR 増幅産物は, Kurose et al., (2014) の方法に準じ, 精製およびシーケンス解析を行った。

結 果

1. 特異的プライマーの設計

アライメントの解析に基づき, *S. lycopersici* の rDNA-ITS 領域を使用した特異的プライマーとして, 上流プライマー SLIF (5'-GCGGGCTGGGACCTTAC TT-3') および下流プライマー SLIR (5'-GCTCAAC CAAGGCTGATTCAA-3') を設計した。

2. プライマーの特異性および検出限界の検討

ユニバーサルプライマーである ITS1 および ITS4 を用いた PCR では全ての供試菌株で DNA の増幅が認められた。一方, SLIF および SLIR プライマーではタバコ種子由来の 4 菌株を含む *S. lycopersici* 全 6 菌株のみで予想される大きさ約 449bp の DNA が増幅され, その他の菌株ではいずれも増幅されなかった (Table 1)。以上から, 本プライマーの *S. lycopersici* 特異性が確認された。また, 本 PCR 法の検出限界は 100 fg/μl であった (Fig. 1)。

3. タバコ種子からの *S. lycopersici* の検出

特異的プライマーを用いて PCR を行ったところ, 菌糸体懸濁液を花器接種した植物体から採取した種子

Fig. 1. PCR sensitivity assay using the primer pair SLIF/SLIR for detection of *Stemphylium lycopersici*. Lanes: M, 100 bp DNA ladder (Invitrogen); 1, 10 ng; 2, 1 ng; 3, 100 pg; 4, 10 pg; 5, 1 pg; 6, 100 fg; 7, 10 fg; 8, 1 fg; 9, negative control (without DNA).

の抽出 DNA からは予測される約 449bp の増幅産物のみが検出された (Fig. 2)。また, 菌糸体懸濁液を接種した個体から得られた種子を播種した 1/2 MS 平面寒天培地には, 発芽を阻害する糸状菌の存在が認められた (Fig. 3)。一方, 対照区では糸状菌は観察されなかった。そこで, 培地上に生育した菌から抽出した DNA を鋳型とし, 特異的プライマーを用いて PCR を行った結果, *S. lycopersici* に特異的な増幅産物のみが検出された (データ省略)。さらに, 両増幅産物についてシーケンス解析を行ったところ, 両者の塩基配列は供試菌株のものとそれぞれ 100% 一致した。以上から, 菌糸体懸濁液を花器接種したタバコから得た種子は本種菌が感染していることが確認された。

考 察

近年, *Pleospora*/*Stemphylium* 属菌は rDNA-ITS 領域, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) 遺伝子, elongation factor 1 α (*EF-1 \alpha*) 遺伝子および intergenic region between the vacuolar membrane ATPase catalytic subunit A gene and a gene involved in vacuolar biogenesis (*vmaA-vpsA*) 領域の計 4 遺伝子領域の塩基配列を連結した塩基配列データに基づく分子系統解析により種同定が行われている (Inderbitzin et al., 2009; Kurose et al., 2015)。一方, 各遺伝子領域の塩基配列に基づく分子系統解析において, *S. lycopersici* が属する clade A はそれぞれ独立したクレードを形成することから, これらの遺伝子領域に着目することにより *S. lycopersici* に特異的なプライマーを設計できる可能性が高い。そこで今回は, 糸状菌のゲノム上において他の遺伝子と比較してコピー数が多い rDNA-ITS 領域に着目し, *S.*

Fig. 2. Detection of *Stemphylium lycopersici* from resultant tobacco seeds after flower inoculation with *S. lycopersici*. Lanes: M, 100 bp DNA ladder (TOYOBO); 1, KuNBY1; 2, KuNBY2; 3, KuNBY3; 4, KuNBY4.

Fig. 3. Fungi isolated from tobacco seeds on 1/2 MS agar obtained after flower inoculation with *S. lycopersici* KuNBY1 and inhibition of seed germination.

lycopersici 検出用プライマー SLIF および SLIR を設計した。*Pleospora/Stemphylium* 属菌10種およびその他糸状菌10属10菌株を用いて本プライマーの特異性を検討したところ、*S. lycopersici* 6菌株のみでDNA増幅が認められたことから、本プライマーは本種菌に特異性を有することが明らかとなった。ところで、*Pleospora/Stemphylium* 属菌の分子系統解析において *S. lycopersici* が属する clade A には、*S. xanthosomatis*, *S. platycodontis* および *S. subglobuliferum* の3菌種が属することが報告されている (Inderbitzin et al., 2009; Deng et al., 2014; Kurose et al., 2015)。しかしながら、*S. xanthosomatis* は *S. lycopersici* の異名であると示唆されていること (Câmara et al., 2002)、また *S. platycodontis* および *S. subglobuliferum* は、それぞれ韓国と中国においてのみ報告されており (Xue et al., 2005; Deng et al., 2014)、これまで日本では発生が確認されていないことから、現時点では本プライマーは *S. lycopersici* 検出用として有効であることが示唆された。

rDNA は通常の遺伝子と比較してコピー数が多いことから高感度の検出が期待される (銀ら, 2007)。これまでに *Pleospora/Stemphylium* 属他種における検出限界に関する知見はないが、近縁種の *A. alternata* および *A. radicina* では10-20ng が検出限界であると報告されている (Simmons and Roberts 1993)。一方、本研究において設計された特異的プライマーを用いたPCR法では、鋳型DNAが100fg/μlであってもバンドが増幅されたことから、より高い検

出精度が得られることが明らかとなった。よって、今回設計したプライマーは、タバコにおける *S. lycopersici* の感染経路の解明において活用できる可能性が示された。

花器接種により感染したタバコ由来の種子から、特異的プライマーを用いたPCR法、および培地への播種により *S. lycopersici* の検出を試みたところ、いずれの場合にも本種菌の存在が確認された。また、得られたPCR増幅産物の塩基配列は、両者とも供試菌株のものとそれぞれ同一であった。以上から、本プライマーを用いたPCR法により、本種菌はタバコ種子からも検出可能であることが明らかとなった。

引用文献

- Câmara, M. P. S., N. R. O'Neill and P. van Berkum (2002) Phylogeny of *Stemphylium* spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 94 : 660-672.
- Deng, J. X., N. C. Paul, M. J. Li, H. S. Cho, H. B. Lee and S. H. Yu (2014) *Stemphylium platycodontis* sp. nov., isolated from *Platycodon grandiflorus* in Korea. *Mycol. Progress* 13 : 477-482.
- Farr, D. F. and A. Y. Rossman (2016) Fungal databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (2016年6月15日アクセス確認).
- 銀玲・景山幸二・浅野貴博・千田昌子・渡辺秀樹・須

- 賀晴久・福井博一 (2007) 種特異的プライマーを用いたPCRによる花き生産環境からの *Pythium helicoides* の検出. 日植病報 73 : 86-93.
- Inderbitzin, P., Y. R. Mehta and M. L. Berbee (2009) *Pleospora* species with *Stemphylium* anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the *Pleospora herbarum* clade. Mycologia 101 : 329-339.
- Kurose, D., L. H. Hoang, N. Furuya, M. Takeshita, T. Sato, S. Tsushima and K. Tsuchiya (2014) Pathogenicity of *Stemphylium lycopersici* isolated from rotted tobacco seeds on seedlings and leaves. J. Gen. Plant Pathol. 80 : 147-152.
- Kurose, D., T. Misawa, T. Suzui, K. Ichikawa, G. Kisaki, L. H. Hoang, N. Furuya, K. Tsuchiya, S. Tsushima and T. Sato (2015) Taxonomic re-examination of several Japanese *Stemphylium* strains based on morphological and molecular phylogenetic analyses. J. Gen. Plant Pathol. 81 : 358-367.
- Millar, P. M. (1955) V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. Phytopathology 45 : 461-462.
- Nishi, N., T. Muta, Y. Ito, M. Nakamura and T. Tsukiboshi (2009) Ray speck of chrysanthemum caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 75 : 80-82.
- 農業生物資源データベース (2016) 日本植物病名データベース http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php (2016年4月27日アクセス確認).
- 野澤俊介・堀井直哉・石崎孝之・渡辺京子 (2016) シュッコンネメシアにおける *Stemphylium lycopersici* による葉枯病と *Botrytis cinerea* による灰色かび病の発生. 日植病報 82 : 19-23.
- Pravi, V., M. L. Jeeva and P. V. Archana (2014) Rapid and sensitive detection of *Sclerotium rolfsii* associated with collar rot disease of *Amorphophallus paeoniifolius* by species-specific polymerase chain reaction assay. Mol. Biotechnol. 56 : 787-794.
- Raj, M., M. L. Jeeva, V. Hegde, P. Vidyadharan, P. V. Archana, M. Senthil alias Sankar and S. Vishnu Nath (2012) Polymerase chain reaction assay for rapid, sensitive detection, and identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing greater yam anthracnose. Mol. Biotechnol. 52 : 277-284.
- Simmons, E. G. and R. G. Roberts (1993) *Alternaria* themes and variations (73). Mycotaxon 48 : 109-140.
- Tomioka, K. and T. Sato (2011) Fruit rot of sweet pepper caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 77 : 342-344.
- Tomioka, K., T. Sato, T. Sasaya and H. Koganezawa (1997) Leaf spot of kalanchoe caused by *Stemphylium lycopersici*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63 : 337-340.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White eds.) . Academic Press (San Diego), pp. 315-322.
- Xue, F., X. G. Zhang, Y. Wang and H. Z. Wang (2005) Taxonomic studies of *Stemphylium* from China II: *Stemphylium subglobuliferum* sp. nov., and four new records. Mycosystema 24 : 322-329.
- 山本和太郎 (1960) 日本における *Alternaria* と *Stemphylium* に属する同種異名の種類. 日菌報 2 : 88-93.
- Zhang, Z., J. Zhang, Y. Wang and X. Zheng (2005) Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. FEMS Microbiol. Lett. 249 : 39-47.

(2016年4月30日受領, 7月22日受理)