

Nested-PCR法によるスイカ炭疽病の早期検出

高原 浩之・林 里紗

Hiroyuki TAKAHARA and Risa HAYASHI :

Early detection of watermelon anthracnose using a nested PCR

Abstract

Detection of pathogens before symptom development is crucial for preventing plant diseases. We evaluated a nested PCR assay for the early detection of *Colletotrichum orbiculare*, the causal agent of watermelon anthracnose. Primers were designed based on rDNA internal transcribed spacer sequences from 14 *Colletotrichum* isolates. The sensitivity of the nested PCR in detecting the pathogenic fungus from plant and soil samples was considerably higher than that of a single-round PCR. This assay may be useful in identifying soil contaminated by *C. orbiculare*, which will be helpful for estimating the risk of disease development.

Key words : スイカ病害, rDNA, ITS領域, 高感度検出, *Colletotrichum orbiculare*, watermelon, anthracnose, nested PCR

緒 言

スイカ炭疽病は、*Colletotrichum orbiculare*の感染によって葉や果実に茶褐色や黒褐色のくぼんだ病斑（Anthracnose）が形成される病害である。本菌は、不完全菌類に属する植物病原糸状菌であり、主にウリ科植物に多大な被害を及ぼす¹⁾。炭疽病菌の感染は、一般に、被害残渣とともに土中で越冬した胞子が、降雨などによる水の飛沫によって植物体に付着して起こる。付着した胞子は、数時間以内に発芽後、発芽管の先端部に褐色のドーム型の侵入器官である付着器を形成し、そこから植物体内に侵入菌糸を伸長させることで感染する^{8,9)}。また、スイカ炭疽病菌は葉や茎を侵すことで株を枯死させるだけでなく、果実にも激しい病徴を引き起こすことから、収穫後の果実被害（ポストハーベスト病）にも注意が必要であり、石川県内のスイカ栽培地においても重要な防除対象病害となっている。

本病の予防および防除技術を確立するうえで、病気の原因菌である炭疽病菌の存在を早期に把握することは極めて重要である。植物病原菌類の早期検出には、近年、

遺伝子診断技術を応用したPCR法が幅広く利用されている^{4,5,10,13,14)}。これは、特定の遺伝子領域をPCRによって増幅することで、病原菌の有無を検出する技術である。さらに、リアルタイムPCR技術を利用することで菌量を定量することも可能であり、病原体の量と実際の発病程度を基準に、そのリスクを推察する試みも行われている²⁾。しかしながら、リアルタイムPCR技術には精度の高いPCRプライマーの設計が必要であり、また、高額な機器や試薬を使用することなどから、圃場レベルの診断技術として一般的に広がっていない側面もある。そこで本研究では、接種実験や顕微鏡観察に加えて、Nested PCR法^{4,5,10)}を利用することで、高感度にスイカ炭疽病菌を検出する技術を確立することを目的とした。

材料および方法

1. 接種実験と顕微鏡観察

スイカ炭疽病菌は、石川県農林総合研究センター圃場の発病株（スイカ品種「縞無双HL」）から2010年に分離した分離株（#1~#3株：表1）を用いた。諸性質およ

びrDNAのITS領域の塩基配列の比較から、*Colletotrichum orbiculare*に分類されるスイカ炭疽病菌とした。本菌をPDA培地で培養して調製した孢子懸濁液（ 1×10^2 ， 1×10^3 ， 1×10^4 個/ml）を、播種2週間後の子葉が展開したスイカ幼苗全体に噴霧接種を行った。多湿条件下で、明期12時間、暗期12時間、気温24℃のインキュベーターに静置し、接種1，3，7日後の子葉を回収した。観察には実体顕微鏡（オリンパスSZ-ST）および光学生物顕微鏡（オリンパスBH-2）を用い、顕微鏡用デジタルカメラ（アズワンHDCEX3）で撮影した。植物体上の炭疽病菌の観察には、トリパンブルーによる組織染色¹²⁾を行った。

スイカ果実への接種は、 1×10^5 ， 1×10^6 個/mlに調製した孢子懸濁液20 μ lを果実表面に滴下し、上記の多湿条件下で1～2週間静置した。有傷区にはピペットの先端で軽く傷をつけてから孢子懸濁液を滴下し、無傷区にはそのままの孢子懸濁液を接種した。対照区には滅菌水を滴下した。いずれの接種試験にも、スイカ品種「縞無双HL」を用いた。

2. 塩基配列の解析とプライマー設計

スイカ炭疽病菌3株（#1～#3株）の他に、11種類の炭疽病菌（第1表）のゲノムDNAを鋳型にして、糸状菌一般のリボゾームDNAの共通配列から設計したプライマー対（Univ_F1およびUniv_R1：第2表）を用いてPCRを行った。PCR増幅にはQuick Taq HS Dye Mix（東洋紡社）を使用した。PCR反応は、94℃2分の反応

後、変性94℃30秒、アニーリング55℃30秒、伸長72℃30秒を1サイクルとし、27サイクル行った。PCR反応後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認した。得られた増幅産物をpGEM-T-Easyベクター（Promega社）にクローニング後、大腸菌に形質転換してプラスミドを回収した。シークエンス反応には、それぞれのプラスミドを鋳型に、プラスミドに特異的なプライマー配列（T7プライマーおよびSP6プライマー）を使用して、Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit（Applied biosystems社）を用いた。塩基配列の解読には、ABI Prism 3130 Genetic analyzer（Applied biosystems社）を用いた。得られた塩基配列は、塩基配列解析ソフトCLC main workbench（CLC bio社）にてアラインメントを行い、供試した炭疽病菌に共通する保存領域と、その配列をもとに新たにPCRプライマーを設計した。

3. 菌体、植物体および土壌からのDNA抽出

PDA培地で培養した菌糸体およびスイカ炭疽病菌を接種後の植物体（それぞれ約100mg）を液体窒素中で粉碎後、DNA抽出液（200mM Tris-HCl（pH8），250mM NaCl，25mM EDTA，0.5% SDS）を加えてよく混合した。遠心分離によって残渣を取り除いた上清にフェノール処理、クロロフォルム処理、エタノール沈殿を行い、ゲノムDNAを抽出した。風乾後、TEバッファーに溶解したものを試料として用いた。なお、接種実験の対照区としては、滅菌水を植物体に噴霧処理したものを使用した。

土壌からのメタゲノムDNAの抽出および精製は、E.Z.N.A. Soil DNA Kit（OMEGA bio-tek社）を用いて、プロトコールに沿って行った。炭疽病菌の人工汚染土壌は、それぞれ 1×10^2 ， 1×10^3 ， 1×10^4 個/mlに調製した孢子懸濁液1mlを、乾土1gの土壌に加えてよく混合したものを使用した。対照区には、滅菌水1mlを添加した培養土を用いた。一方、スイカ栽培圃場からの試料と

第1表 供試した炭疽病菌ゲノムDNA^{a)}

番号	菌名	菌株番号
1	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	分離株#1
2	<i>C. orbiculare</i>	分離株#2
3	<i>C. orbiculare</i>	分離株#3
4	<i>C. orbiculare</i>	104-T ⁷⁾
5	<i>C. higginsianum</i>	IMI 349063A ⁸⁾
6	<i>C. capsici</i>	LARS 141 ⁶⁾
7	<i>Glomerella magna</i>	LARS 688 ⁶⁾
8	<i>C. malvarum</i>	LARS 629 ⁶⁾
9	<i>C. gloeosporioides</i>	LARS 074 ⁶⁾
10	<i>C. trifolii</i>	LARS 972 ⁶⁾
11	<i>C. graminicola</i>	M1.001 ⁶⁾
12	<i>C. destructivum</i>	N150 ⁶⁾
13	<i>C. linicola</i>	IMI 103844 ⁶⁾
14	<i>G. cingulata</i>	LARS 225 ⁶⁾

a) 番号1～3は石川県農林総合研究センターにおいてスイカ炭疽病被害株から分離された菌株。4～14はドイツMax Planck研究所のRichard O'Connell博士よりゲノムDNAの譲渡を受けた。

第2表 設計したプライマーの名称と塩基配列

名称	塩基配列(5'-3')
GPS_F1	TTCCGGCGGGCGGGAGGTCCGCCT
GPS_R2	GAGGGCCCACGTCAGCCGTGGAA
GPS_F2	CCCGGCCCGCTCGCGG
Univ_F1	TCCGTAGGTGAACCTGCGGA
Univ_R1	TCCTCCGCTTATGTATATGCTTAAGTTC
Univ_F2	TAACAACGGATCTCTTGGTTCTGG
Univ_R2	GCTTGAGGGTTGAAATGACGCTC

して、石川県農林総合研究センター（石川県金沢市）の実験圃場で発生したスイカ炭疽病の発病株の株元4地点（a, b, c, d）、および炭疽病菌を人工接種して発病させた株の株元2地点（e, f）の計6地点から採取された土壌（砂土）から、それぞれメタゲノムDNAを抽出した。

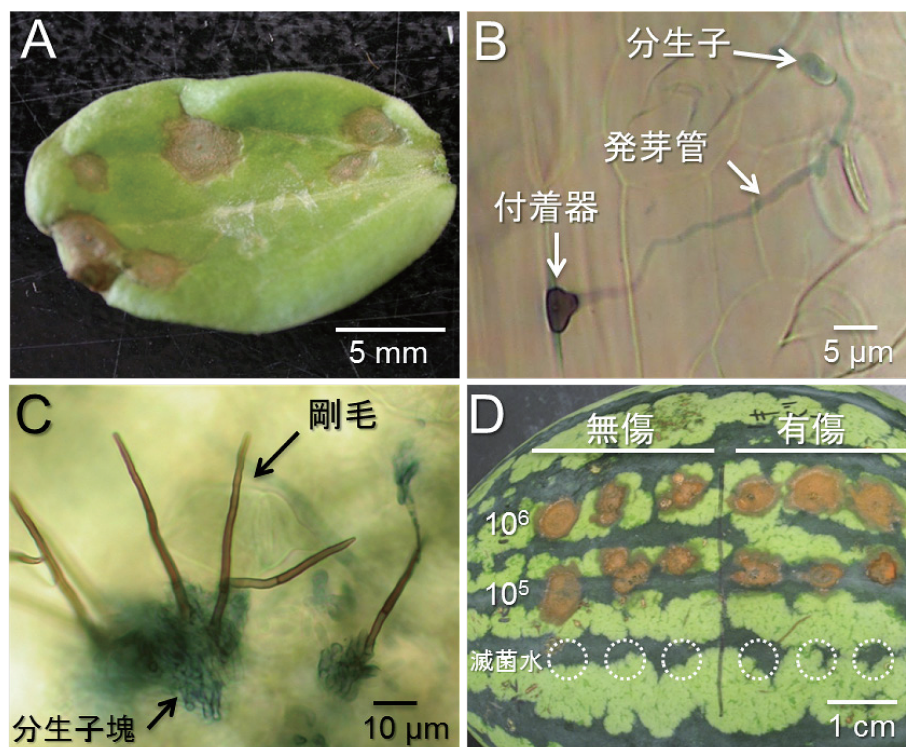
4. PCR法による炭疽病菌の検出

接種植物および土壌中から抽出したゲノムDNAを用いてPCRを行った。鋳型DNA量は10ngとし、設計したプライマー対（第2表）を用い、上記と同じ反応条件で35サイクルの反応を行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動によって確認した。さらに1回目のPCR増幅産物を滅菌水で100倍に希釈したものを鋳型として、Nestプライマー（第2表）を使用してNested-PCRを行った。なお、その際のサイクル数は25サイクルとした。

結果

1. 炭疽病菌のスイカへの接種実験

スイカ炭疽病菌の胞子をスイカ子葉に噴霧接種したところ、接種5～7日後に葉に褐色のくぼんだ病斑が観察された（第1図A）。接種3日後の子葉をトリパンブルー染色して光学顕微鏡で観察したところ、胞子から伸長した発芽管や付着器の形成が見られた（第1図B）。接種7日後では、分生子層上に*Colletotrichum*属菌に見られる暗褐色の剛毛の形成が観察された（第1図C）。以上のことから、スイカ葉に接着した分生子は、発芽管を伸長後、付着器形成を経て3日以内に侵入し、感染部位周辺の組織に蔓延後、約1週間程度で次世代の分生子形成に至ることが確認できた。一方、スイカ果実への接種実験では、有傷、無傷のどちらの区においても激しい病徴が見られた（第1図D）ことから、炭疽病菌はスイカ果実の表面からも組織内に侵入し、発病することが確認された。また、本実験に用いた胞子濃度の違いによる病



第1図 炭疽病菌のスイカへの侵入と病斑形成

- A：接種7日目の子葉に形成された病斑
- B：接種3日目の子葉表面に形成された侵入器官
- C：接種7日目の子葉表面に形成された分生子塊と剛毛
- D：接種2週間後の果実表面に形成された炭疽病の病斑

斑形成の差異は観察されなかった。以上のことを踏まえて、スイカ炭疽病菌を接種した植物体のサンプリング時期を、接種後1日（侵入前）、3日（侵入直後）、7日（蔓延時期）に決定した。

2. プライマーの設計

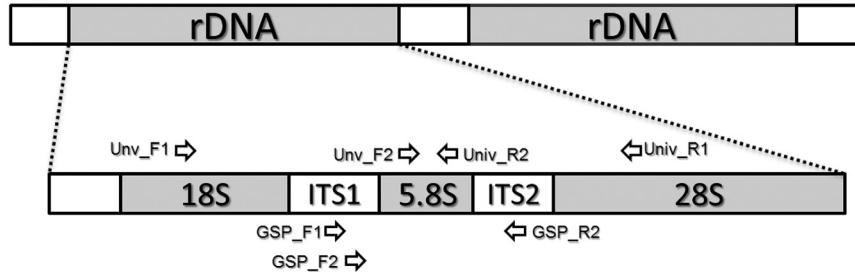
スイカ炭疽病菌3株のリボソームDNAのITS領域の塩基配列を決定したところ、ウリ科炭疽病菌*C. orbiculare*のITS領域と99%以上の相同性が認められた。そこで、*Colletotrichum*属病原菌から11菌種のITS領域の塩基配列を決定し、その配列をもとにプライマーを設計した（第2表）。炭疽病菌11種に共通するプライマー対を5.8SリボソームDNA内に新たに設計し（Unv_F2およびUniv_R2）、163bpのDNA断片の増幅が見込まれた（第2図）。また、スイカ炭疽病菌のITS領域をもとに設計されたプライマー対（GSP_F1およびGSP_R2）では、328bpのDNA増幅断片が見込まれた（第2図）。これらのプライマー対を用いて、炭疽病菌のゲノムDNAを鋳型にPCRを行ったところ、*C. orbiculare*に分類されるスイ

カ炭疽病菌とウリ科炭疽病菌から予測されるサイズに増幅バンドが検出された（第3図）。その一方で、*C. malvarum*および*C. trifolii*からも同様のサイズにバンドが認められた（第3図：レーン8, 10）。この両2菌株のITS領域は、*C. orbiculare*の塩基配列と99%以上が一致していたことから、この2菌を区別できる特異的な配列はITS領域には見出されなかった。また、スイカ炭疽病菌の検出感度を高める目的で、Forward側のみ28塩基内側にNested PCR用の内部プライマー（GSP_F2）を設計した。

3. 接種植物体および土壌からのスイカ炭疽病菌の検出

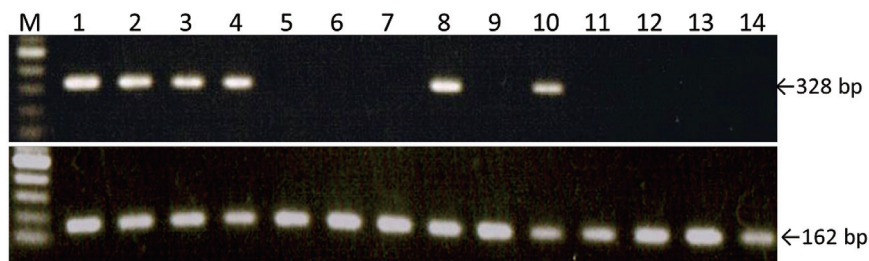
設計したプライマー対が、実際にスイカ炭疽病の発病リスクの予測に利用できるかを検証した。すなわち、スイカ炭疽病菌の孢子懸濁液を植物に接種、もしくは土壌に混和した人工汚染土壌を調製し、それらのサンプルからゲノムDNAを抽出し、スイカ炭疽病菌を検出するプライマーを用いてPCRを行った。

まず、植物体からのスイカ炭疽病菌の検出を試みたと



第2図 rDNAの模式図とPCRプライマーの位置^{a)}

a) 矢印はプライマーの向きと位置を示している。



第3図 炭疽病菌DNAを鋳型にしたPCR^{a)}

a) レーン1～14は、異なる炭疽病菌由来のDNA（第1表）に対応している。上段は特異的プライマー（GPS_F1とGPS_R2）、下段は共通プライマー（Univ_F2とUniv_R2）を使用。Mは100bpラダー。

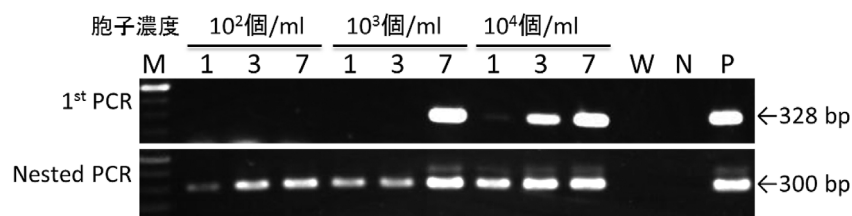
ころ、孢子濃度が 10^4 個/mlの接種区において、接種後1日から推定されるサイズの増幅バンドが確認できた。孢子濃度が 10^3 個/mlの接種区では、7日目のスイカ幼苗においてバンドを確認したが、 10^2 個/mlを接種したスイカ幼苗では、いずれのサンプルにおいても検出されなかった。そこで、1回目のPCR産物を希釈したものを鋳型として、Forward側に設計した内部プライマー（GSP_F2：第2表）を用いてNested PCRを試みたところ、すべてのサンプルで予測サイズのバンドが確認できた（第4図）。つまり、Nested PCRを用いることで、感染の早い時期からスイカ炭疽病菌を検出することが可能であった。

次に、土壌中からのスイカ炭疽病菌の検出を試みた。乾土1gあたり 10^2 から 10^4 個のスイカ炭疽病菌の孢子を混合した土壌を用いたところ、1回目のPCRではいずれのサンプルでも増幅産物を確認できなかった。そこで、上記と同様に1回目のPCR産物を希釈し、Nested PCRを試みたところ、すべてのサンプルでバンドを確認した（第5図）。よって、土壌中からも非常に高い感度でス

イカ炭疽病菌が検出することが可能であった。

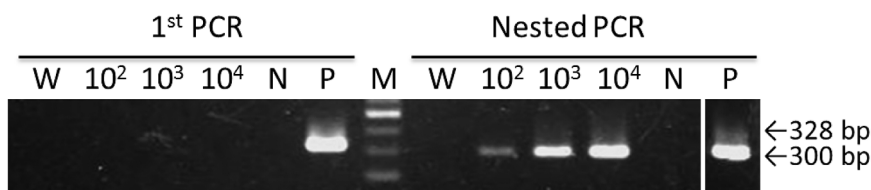
最後に、スイカ炭疽病の発病により被害が認められた圃場の土壌からの検出を試みた。それぞれ異なる6地点から採取した土壌から抽出したメタゲノムDNAを鋳型にしたPCRを行ったところ、地点bで強いシグナルを確認した（第6図）。その一方で、地点cおよびdでは、わずかなシグナルは確認できたものの、aでは全く検出されず、eおよびfでは非特異的なスミアなシグナルを検出するなど、不安定であった。しかしながら、これらのサンプルにおいても、同様にNested PCRを行ったところ、すべてのサンプルで目的サイズのバンドを確認できた（第6図）。

以上のことをまとめると、今回確立した方法は、1) スイカ炭疽病菌およびその類縁種を特異的に検出できること、2) 炭疽病菌の侵入前もしくは感染初期の無病徴の時期の植物体から検出できること、3) 土壌中の炭疽病菌をメタゲノム法により検出できること、が示された。



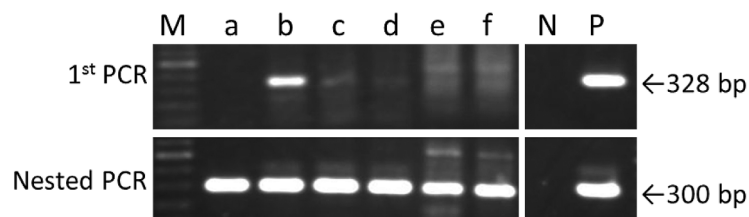
第4図 接種幼苗からのスイカ炭疽病菌の検出^{a)}

- a) 上段は炭疽病菌の接種1, 3, 7日後の植物体から抽出した全DNAを鋳型にして特異的プライマー（GPS_F1とGPS_R2）を用いたPCRの結果。下段は、1st PCR産物を鋳型にしたNested PCR（GPS_F2とGPS_R2）の結果を示している。M：100bpラダー、W：水接種、N：鋳型なし、P：ゲノムDNAの結果を示している。



第5図 土壌からのスイカ炭疽病菌の検出^{a)}

- a) 左は異なる濃度の孢子懸濁液を混合した土壌から抽出した全DNAを鋳型にして特異的プライマー（GPS_F1とGPS_R2）を用いたPCRの結果。右は、1st PCR産物を鋳型にしたNested PCR（GPS_F2とGPS_R2）の結果を示している。M：100bpラダー、W：水接種、N：鋳型なし、P：ゲノムDNAの結果を示している。



第6図 被害圃場からのスイカ炭疽病菌の検出^{a)}

a) 上段は炭疽病が発生した圃場の6地点の土壌から抽出した全DNAを鋳型にして特異的プライマー (GPS_F1とGPS_R2) を用いたPCRの結果。下段は、1st PCR産物を鋳型にしたNested PCR (GPS_F2とGPS_R2) の結果を示している。M:100bpラダー, N:鋳型なし, P:ゲノムDNAの結果を示している。

考 察

本研究は、スイカ炭疽病を早期に発見するため、近年、広く利用されているPCR法を用いた病原菌の検出技術を応用するものである。特に、炭疽病菌を高感度で検出するためにNested PCR法を利用した。Nested PCR法とは、まず増幅したいターゲットに対して1回目のPCR反応を行い、得られた産物 (1st PCR産物) を鋳型にして、その増幅産物の内部に新たに設計しておいたプライマーを用いて行うPCRのことである。計2回のPCRを行うことで、ターゲットの検出感度が高まると同時に、1st PCR産物に特異的な内部配列を2回目のPCRプライマーに利用することで、特異性が高まることが期待されるPCR技術である^{4,5,10)}。この方法を用いて、スイカ炭疽病菌を人工的に接種した植物試料および土壌より病原菌の検出を試みたところ、1回目のPCRでは検出できなかった検体であっても、Nested PCRを用いることで検出が可能であった。よって、今回確立したNested PCR法は、スイカ炭疽病菌を高感度で検出できる技術であることが示された。また接種実験では、病斑が出現するまで約7日、付着器から宿主細胞へ侵入して組織内に蔓延するには、およそ3日を要することが観察されたが、本法を用いることで、接種1日後という炭疽病菌が植物組織へ侵入する前の時期^{8,9,12)}、もしくは感染初期の無病徴の時期に病原菌の存在を確認することができた。またその検出感度は、接種濃度の違いを反映していた。以上のことから、本法は、病原菌の存在を早期に検出でき、さらにその汚染程度を定量する技術としても応用できることも考えられた。

今回の実験で設計したプライマー対では、スイカ炭疽

病菌とその類縁種が特異的に検出された。それは、PCRのターゲットとして利用したrDNAのITS領域に、スイカ炭疽病菌のみを特異的に識別する配列が見出されなかったことが原因である。一般に、病害の早期発見や土壌中からの菌検出を目的とした実験では、対象物の濃度が低いことから、rDNAなどの多コピー領域を利用することが有効とされている。実際に、*C. gloeosporioides*を検出するために、この領域を利用した特異的なPCRプライマーが設計されている¹¹⁾。その一方で、今回のように、rDNAのITS領域だけでは特異性が不十分な例もある。インゲンマメを宿主とする炭疽病菌*C. lindemthianum*とウリ科炭疽病菌*C. orbiculare*の間では、本領域の遺伝子配列の型が非常に類似していることから、両菌系統が同時に検出されることが報告されている^{13,14)}。この理由として、*C. orbiculare*は、複雑な菌系統を有するSpices complexを形成していることが挙げられる³⁾。近年、Dammらは、複数の遺伝子を対象とした系統解析から、*C. orbiculare* Clade内には、異なる農作物の炭疽病の原因菌である*C. lindemthianum*、*C. malvarum*、*C. trifolii*に加え、雑草類に炭疽病を引き起こす4種の炭疽病菌が混在していることを見出している³⁾。事実、本研究においても、スイカ炭疽病を含む*C. orbiculare*のITS領域は、アオイ科草本を宿主とする*C. malvarum*と、マメ科牧草のアルファルファに炭疽病を引き起こす*C. trifolii*と塩基配列で99%以上の相同性があった。このことは、*C. orbiculare*は、遺伝子型と宿主範囲の相関が明確でなく、分類が複雑化していることを示唆している。しかしながら、実際の圃場では、単一作物を栽培しており、他の菌種が病気の原因菌より多く存在しているとは考えにくい。よって、今回のように同属菌種が区別でき

ない場合であっても、例えば特異性を高めるために1コピー遺伝子などをターゲットにすることで検出感度が低下するよりは、rDNA領域といった多コピー配列を利用する方が現実的と考えられる。ただし、遺伝子診断の目的が菌種の同定まで含める場合には、対象となる同属菌間を区別するPCRプライマー対を新たに見出す^{13,14)}など、それぞれの目的に応じた技術が必要となる。

本実験では、Nested PCRにより、発病前の感染葉および土壌中からのスイカ炭疽病菌の検出が可能となった。この技術を、健全圃場や未発病株周辺の汚染度調査、発病株からの病原菌の飛散距離やその程度、また越冬と発病との関係などを調べるためのモニタリング法に利用することで、圃場におけるスイカ炭疽病の発病機構の解明につなげることができる。さらに、このような知見をもとに、本菌の菌量と発病程度との関係を解析することで、スイカ炭疽病の要防除水準を確立するなど、現場への応用が期待される。

謝 辞

圃場からのスイカ炭疽病菌の分離株を分譲いただいた石川県農林総合研究センターの濱田亜矢子技師、各種炭疽病菌のゲノムDNAを分譲いただいたドイツMax Planck研究所のRichard O'Connell博士に感謝いたします。

引用文献

- 1) Amin, K. S. and Ullasa, B. A. (1981) Effect of thiophanate on epidemic development of anthracnose and yield of watermelon. *Phytopathology* 71 : 20 ~ 22.
- 2) Cullen, D. W., Lees, A. K., Toth, I. K. and Duncan, J. M. (2002) Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology* 51 : 281 ~ 292.
- 3) Damm, U., Cannon, P. F., Liu, F., Barreto, R. W., Guatimosim, E. and Crous P. W. (2013) The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. *Fungal Diversity* 61 : 29 ~ 59.
- 4) Glen, M., Smith, A. H., Langrell, S. R. H. and Mohammed, C. L. (2007) Development of nested polymerase chain reaction detection of *Mycosphaerella* spp. and its application to the study of leaf disease in Eucalyptus plantations. *Phytopathology* 97 : 132 ~ 144.
- 5) Grote, D., Olmos, A., Kofeet, A., Tuset, J. J., Bertolini, E. and Cambra, M. (2002) Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by simple and nested-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108 : 197 ~ 207.
- 6) Kleemann, J., Rincon-Rivera, L. J., Takahara, H., Neumann, U., Ver Loren van Themaat, E., van der Does, H. C., Hacquard, S., Stüüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E. and O'Connell, R. J. (2012) Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathogens* 8 : e1002643.
- 7) Kubo, Y. and Takano, Y. (2013) Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of general plant pathology* 79 : 233 ~ 242.
- 8) O'Connell, R., Herbert, C., Sreenivasaprasad, S., Khatib M., Esquerré-Tugayé, M. T. and Dumas, B. (2004) A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Molecular plant-microbe interactions* 17 : 272 ~ 282.
- 9) Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J. and Green, J. R. (1999) *Colletotrichum* - a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27 : 186 ~ 198.
- 10) Pérez-Hernández, O., Nam, M. H. and Kim, H. G. (2008) Development of a nested polymerase chain reaction assay for detection of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Plant disease* 92 : 1655 ~ 1661.
- 11) Raj, M., Jeeva, M. L., Hegde, V., Vidyadharan, P., Archana, P. V., Sankar, M. S. A. and Nath, S. V. (2012) Polymerase chain reaction assay for rapid, sensitive detection, and identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing greater yam anthracnose. *Molecular Biotechnology* 52 : 277 ~ 284.

- 12) Takahara, H., Dolf, A., Endl, E. and O'Connell, R. (2009) Flow cytometric purification of *Colletotrichum higginsianum* biotrophic hyphae from Arabidopsis leaves for stage-specific transcriptome analysis. Plant Journal 59 : 672~683.
- 13) Tang, J.H., Wang, W. and Wang, Y.C. (2006) Molecular detection of *Colletotrichum orbiculare*. Zhongguo Nongye Kexue 39 : 2028~2035.
- 14) Wang, W., Tang, J.H. and Wang, Y.C. (2008) Molecular Detection of *Colletotrichum lindemuthianum* by Duplex PCR. Journal of Phytopathology 156 : 431~437.
- (2015年11月24日受理)
-