

好乾性糸状真菌 *Aspergillus penicillioides* の種内系統解析

加瀬谷泰介, 青木 俊介^a, 田辺 卓^b, 竹治 仁詩^b, 小椋 真美^b, 一色 淳憲^c, 吉田 充裕^c

A phylogenetic analysis of a xerophilic fungal species, *Aspergillus penicillioides*

Taisuke Kasetani, Shunsuke Aoki^a, Suguru Tanabe^b, Hitoshi Takeharu^b,
Mami Kokaji^b, Atsunori Isshiki^c and Mitsuhiro Yoshida^c

Xerophilic fungi can grow under condition of reduced water activity, and deteriorate cereal grains, dried or high sugar content foods, etc. Monitoring of storage condition and early detecting of the harmful fungi are both important to prevent the deterioration. Thus, a DNA microarray to detect and distinguish rapidly such xerophilic fungi was developed. However, the array required two oligonucleotide-probes designed from rDNA ITS1 region for detecting of *Aspergillus penicillioides*. So, to confirm the function of the two probes, 11 reference strains and 51 wild strains of aspergilli belonging to Sect. *Restricti* were collected, and then molecular phylogenetic analysis by ITS 1 & 2 and β -tubulin regions was carried out.

A. penicillioides strains were divided into three groups (G2 - G4) in each phylogram (N-J tree). G2 included two '*A. vitricola*' related strains that was a synonym of *A. penicillioides*, and the group was close to *A. restrictus* rather than *A. penicillioides*. G3 included JCM 22961, ex-neotype of the species, and other reference and nine wild strains; G4 included four thirds of tested wild strains.

It demonstrated relationship of strains in *A. penicillioides* that one probe detects G2 and other detects G3 and G4, so the DNA microarray has high function to detect and distinguish rapidly 'sub-species' of it.

Key words: Fungi, Xerophilic, *Aspergillus*, *Aspergillus penicillioides*, *Aspergillus vitricola*, molecular phylogeny, DNA microarray, rDNA ITS, β -tubulin

低水分活性下でも、あるいはそのような環境でのみ生育できる一群の糸状菌を好乾性菌と称する。鰹節や生ハムなど、ある種の醗酵食品の製造に欠かせない有用菌を含む一方で、貯蔵穀類や塩乾物などの乾燥した、あるいは糖・食塩含量の高い食品¹⁾、さらには清潔で低湿度環境に保存されている様々な文化財を、生物・非生物素材を問わず、劣化させる害菌も多い²⁾。劣化を防止するには、保存環境の監視と危害真菌の早期発見がいずれも重要である。

しかし、その検出には専門家と、時には数週間かそれ以上の時間を費やさざるを得ない培養が必要である。さらに、環境から得た試料では、培養しても菌糸しか増殖せず、同定の基準となる孢子や生殖器官を欠くものも、ある程度の頻度で検出されるが、それらは当然のこと、形態的特徴による同定は不可能である。

筆者らは、このような環境中の好乾性真菌類を短時間に検出、識別する DNA マイクロアレイを報告したが³⁻⁶⁾、対象種の一つである *Aspergillus penicillioides* の検出には複数のプローブが必要であることから^{3,6)}、同種内菌株間の系統関係とプローブとの対応を調べたので報告する。

材料・方法

供試菌株

Aspergillus penicillioides Spegazzini は、基準株の JCM 22961^T を始めとして、来歴の明白な計 11 系統を ATCC (American Type Culture Collection), JCM ((独)理化学研究所バイオリソースセンター), NBRC ((独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター) より購入し、標品として供試した。併せて、*A. penicillioides* が属する *Restricti* 節の基準種である *Aspergillus restrictus* G. Smith についても、基準株 JCM 1727^T を購入し、供試した。

文化財等を保管する 8 箇所の施設 (A ~ H) で屋内空気を吸引して浮遊孢子等を採取した後、分離培養した野生株から、形態と塩基配列 (rDNA ITS1-ITS2 および β -チューブリンの一部領域) をキーとした BLAST 検索 (DNA Data Base of Japan; www.ddbj.nig.ac.jp/) によって *Aspergillus* 属 *Restricti* 節と推定された 51 株を供試した。これらの野生菌株には、コード WAX-# (Wild *Aspergillus* Xerophiles) を付与した。

a 食品科学研究室

b 東洋製罐(株)テクニカル本部

c 東洋製罐グループ総合研究所

系統解析における外群 (Out group) には, 同科異属 (Trichocomaceae *Penicillium*) の *Penicillium corylophyllum* Dierckx の基準株である NBRC 6030^T の公開データ (SequeceID 00603002) から, 他の株と相同な領域である,

前半部 507 bp を供試した (<http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/SequencSearchServlet?ID=NBRC&CAT=00006030&DNA=10>).

供試菌株の一覧を表 1 に示す.

表 1 供試菌株一覧

Table 1 List of Strains

Number of Reference Strain	Species	Sequence for Phylogram		Origin
		ITS1&2	β -tubulin	
ATCC 66597	<i>Aspergillus. penicillioides</i> Spegazzini	✓	✓	Clinical
JCM1727 ^T	<i>A. restrictus</i> G. Smith ; ex-type	✓	✓	Cloth
JCM 10256	<i>A. penicillioides</i>	-	✓	Dried fish
JCM 22670	<i>A. penicillioides</i>	✓	✓	Rice grain
JCM 22961 ^T	<i>A. penicillioides</i> ; ex-neotype	✓	✓	Human palm
JCM 22962	<i>A. penicillioides</i>	✓	✓	Peanut
JCM 22963	<i>A. penicillioides</i>	✓	✓	Jute
JCM 22968	<i>A. penicillioides</i>	-	✓	Dried fish
JCM 22971	<i>A. penicillioides</i>	✓	✓	Tablet
NBRC 8155	<i>A. penicillioides</i> ex-holotype of 'A. vitricola'	✓	✓	Lens
NBRC 100539	<i>A. penicillioides</i>	✓	✓	Noodle
Code of Wild Strain	Results of BLAST(N) ITS 1 - 2 / β -tubulin			Location (code)
WAX-01	<i>A. spergillus penicillioides</i> / -	✓	✓	C
WAX-02	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	C
WAX-03	'A. vitricola' / -	✓	✓	C
WAX-04	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	C
WAX-05	'A. vitricola' / -	✓	✓	D
WAX-06	<i>A. gracilis</i> or <i>A. conicus</i> or <i>A. restrictus</i> / -	✓	✓	D
WAX-07	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	D
WAX-08	<i>A. gracilis</i> or <i>A. restrictus</i> or <i>A. caesiellus</i> / -	✓	✓	D
WAX-09	<i>A. gracilis</i> or <i>A. restrictus</i> or <i>A. caesiellus</i> / -	✓	✓	D
WAX-10	<i>A. gracilis</i> or <i>A. restrictus</i> or <i>A. caesiellus</i> / -	✓	✓	D
WAX-11	<i>A. gracilis</i> or <i>A. restrictus</i> or <i>A. caesiellus</i> / -	✓	✓	D
WAX-12	'A. vitricola' / -	✓	✓	D
WAX-13	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	D
WAX-14	'A. vitricola' / -	✓	✓	D
WAX-15	<i>A. conicus</i> or <i>A. restrictus</i> or <i>A. caesiellus</i> / -	✓	✓	D
WAX-16	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	D
WAX-17	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	F
WAX-18	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	F
WAX-19	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	F
WAX-20	<i>A. restrictus</i> or <i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	A
WAX-21	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	B
WAX-22	<i>A. penicillioides</i> or <i>A. conicus</i> or <i>A. gracilis</i> / -	✓	✓	C
WAX-23	<i>A. penicillioides</i> ? / -	✓	✓	D
WAX-24	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	D
WAX-25	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	-	E
WAX-26	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	-	E
WAX-27	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	F
WAX-28	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	✓	F
WAX-29	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	-	F
WAX-30	<i>A. penicillioides</i> / -	✓	-	F
WAX-31	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-32	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-33	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-34	<i>A. sp. (A. sydowii ?) / A. sydowii</i>	-	-	G
WAX-35	<i>A. sp. (A. sydowii ?) / A. sydowii</i>	-	-	G
WAX-36	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-37	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-38	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-39	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-40	<i>A. restrictus</i> / 'A. vitricola'	✓	✓	G
WAX-41	<i>A. restrictus</i> / <i>A. restrictus</i>	✓	✓	G
WAX-42	<i>A. restrictus</i> / <i>A. restrictus</i>	✓	✓	G
WAX-43	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-44	<i>A. restrictus</i> / <i>A. restrictus</i>	✓	✓	G
WAX-45	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-46	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-47	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-48	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-49	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-50	<i>A. penicillioides</i> / <i>A. penicillioides</i>	✓	✓	G
WAX-51	<i>A. restrictus</i> / 'A. vitricola'	✓	✓	H

ゲノム DNA 抽出・精製

M40Y (麦芽エキス 20 g, 酵母エキス 5 g, ショ糖 400 g, 寒天末 20 g: 前二者は Difco Laboratories, 後二者は和光純薬工業(株)) 平板培地で培養した菌叢から数 mm 角に切り出した菌糸体片を, ジルコニア・ビーズを充填したねじ口バイアル瓶イーザー・ビーズ (エーエムアール(株)) に封入, 液体窒素中で凍結, ミニビードピーター (BioSpec Products Inc.) による振盪で破碎したものより, 自動核酸抽出装置 QuickGene-810 およびその専用試薬キットである組織抽出用 DT-S (富士フイルム(株)*) を用いて, 定法に従って精製ゲノム DNA を抽出した。

*現在, 同装置と試薬キットは倉敷紡績(株) (大阪市) に移管されている。

PCR 反応: プライマー, 試薬&反応条件

DNA ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法に用いるプライマーは, rDNA 配列中の内部転写スペーサー (ITS) 領域とその間の 5.8S rDNA を一括して増幅する ITS1 / ITS4⁷⁾, ハウスキーピング遺伝子の一種である β -チューブリン遺伝子の一部を増幅する Bt2a/Bt2b⁸⁾ の二組を用いた。その配列を表 2 に示す。

表 2 PCR プライマーの配列
Table 2 Sequences of PCR Primers

name	sequence (5' → 3') / region
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ribosomal DNA : ITS1・5.8S rDNA・ITS2
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTTGGC
	β -tubulin : 342nd・847th nucleotides

ITS1 / ITS4⁷⁾, Bt2a / b⁸⁾

PCR 反応には遺伝子増幅用試薬 Ampdirect[®] (株島津製作所) および NovaTaq Hot Start DNA Polymerase (Novagen[®], メルク(株)) を用いた。

塩基配列解析

標品については, 可能であれば公開されている情報を用いた。公開されていない領域および野生株の塩基配列は, GenomeLab™ GeXP Basic (ベックマン・コールター(株)) とその専用試薬 (DTCS クイックスタートキット) を用いて, あるいは, 外部に依頼して解析した。

系統樹作成

ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (以下 ITS 領域) および β -チューブリン (以下 bt 領域) それぞれについて得られた塩基配列は, 遺伝子情報を処理するソフトウェア MUSCLE 3.6⁹⁾ で整列, 整形した後, Genetyx[®] Ver. 10.0.3 (株)ゼネティクス) を用いて, 近隣結合 (neighbor-joining) 法で系統樹を作成した。Boot strap trial = 10000 とし, Kimura's 2

parameter method (Genetyx の通常設定) を用いた。

結果と考察

Aspergillus penicillioides ('*A. vitricola*' 含む) の 10 株と *A. restrictus* 1 株の標品, 形態と相同性検索で *Restricti* 節に属する種とされた野生株の ITS 領域および bt 領域の N-J 法系統樹を, それぞれ図 1, 図 2 に示す¹⁰⁻¹¹⁾。なお, 標品のうち ITS 領域の配列を得られなかった JCM 10256 と JCM 22968 と, 供試した野生株 51 株のうち bt 領域の配列を得られなかった 4 株 (WAX-25, -26, -29, 30) はそれぞれの系統樹から除外し, データの信頼性が低いと判断された野生株 2 株 (WAX-34, -35) は両系統樹から除外した。また, bt 領域には *A. penicillioides* JCM 22961^T のクローン株である NRRL 4550 の公開データ (DDBJRELEASE:EF651929) を付加した。

ITS 領域の系統樹は, *A. restrictus* (JCM 1727^T, 基準株) を含む群 (Group 1; G1), *A. penicillioides* NBRC 8155 などを含む群 (Group 2; G2), JCM 22961^T (基準株) を含む群 (Group 3; G3), 標品系統を含まない *A. penicillioides* 野生株のみの群 (Group 4; G4) に四大別された。

bt 領域の系統樹については, 全体として ITS 領域のものと同様の傾向を示したが, ITS 領域よりも配列の変異が大きいため, 枝長が長く, ブートストラップ値も大きくなり, より細分化される傾向が示された。このため, G1 と G2 がそれぞれ二分割され (^{bt}G1, ^{bt}G1' など), 六つに分かれた。

両基準種を含む, 種・来歴の明白な標品系統はそれぞれ同じグループに配置されており, 提示した系統樹はある程度, 種を反映した形になっていると考えられた。概ね G1 が *A. restrictus*, G2, G3, G4 が *A. penicillioides* となる。ブートストラップ値から, ITS 領域でも bt 領域でも G2 (^{bt}G2/^{bt}G2'), G3, G4 は明瞭に分離しているが (>9,000), 形態同定や主に ITS 領域の配列によるデータベース検索の結果 (最も相同性が高いもの) から 3 グループに属する菌株はいずれも *A. penicillioides* であるか, それにごく近縁なものといえる。

筆者らが試作した DNA マイクロアレイで *A. penicillioides* の全菌株を検出するためには, ITS1 領域由来のプロープが複数必要であったが, それは G2 に属する菌株に対するものと G3 および G4 に属する菌株に対するものにそれぞれ対応している^{3,6)}。

G2 には, 標品株の NBRC 8155 と JCM 22670, 野生株の WAX-05 以下 4 株が属している。NBRC 8155 は '*A. vitricola*' が新種記載された際の基準株 (ex-holotype) であるが¹²⁾, この名は後に分類学的に差異はないとして, より記載¹³⁾ が古い *A. penicillioides* の synonym (同種異名) とされ¹⁴⁾, 菌株機関でも *A. penicillioides* としている。しかしながら, 図 1, 2 に示すとおり遺伝子配列の解析では, ITS 領域でも bt 領域でも NBRC 8155 を含む数菌株は, *A. penicillioides* の新基準株 (ex-neotype) である JCM

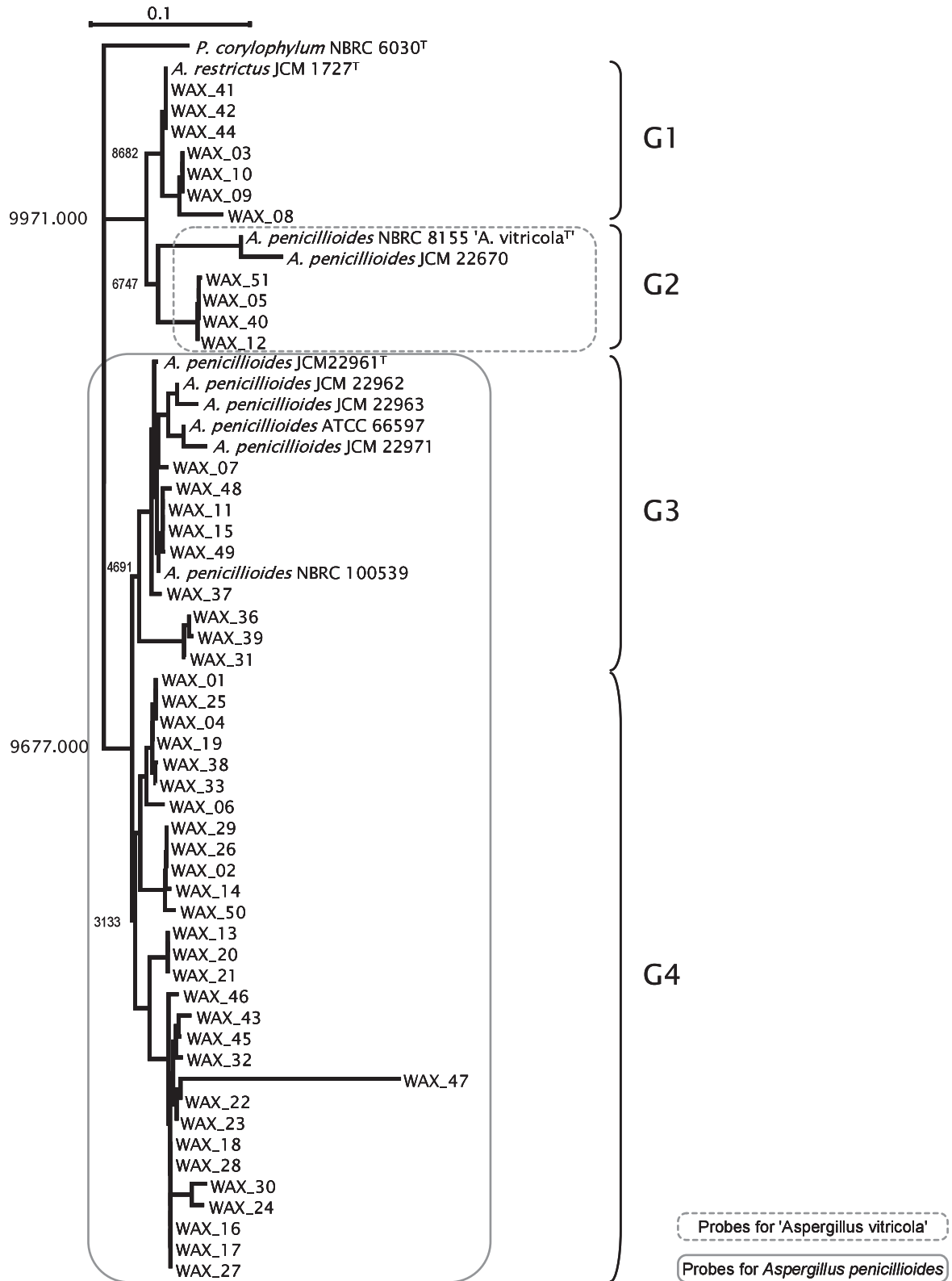


図1 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域による *Aspergillus penicillioides* とその近縁種の系統樹

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Aspergillus penicillioides* and its relatives based on ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region Neighbor-Joining Method; Bootstrap trial = 10,000, Kimura's 2 parameter method

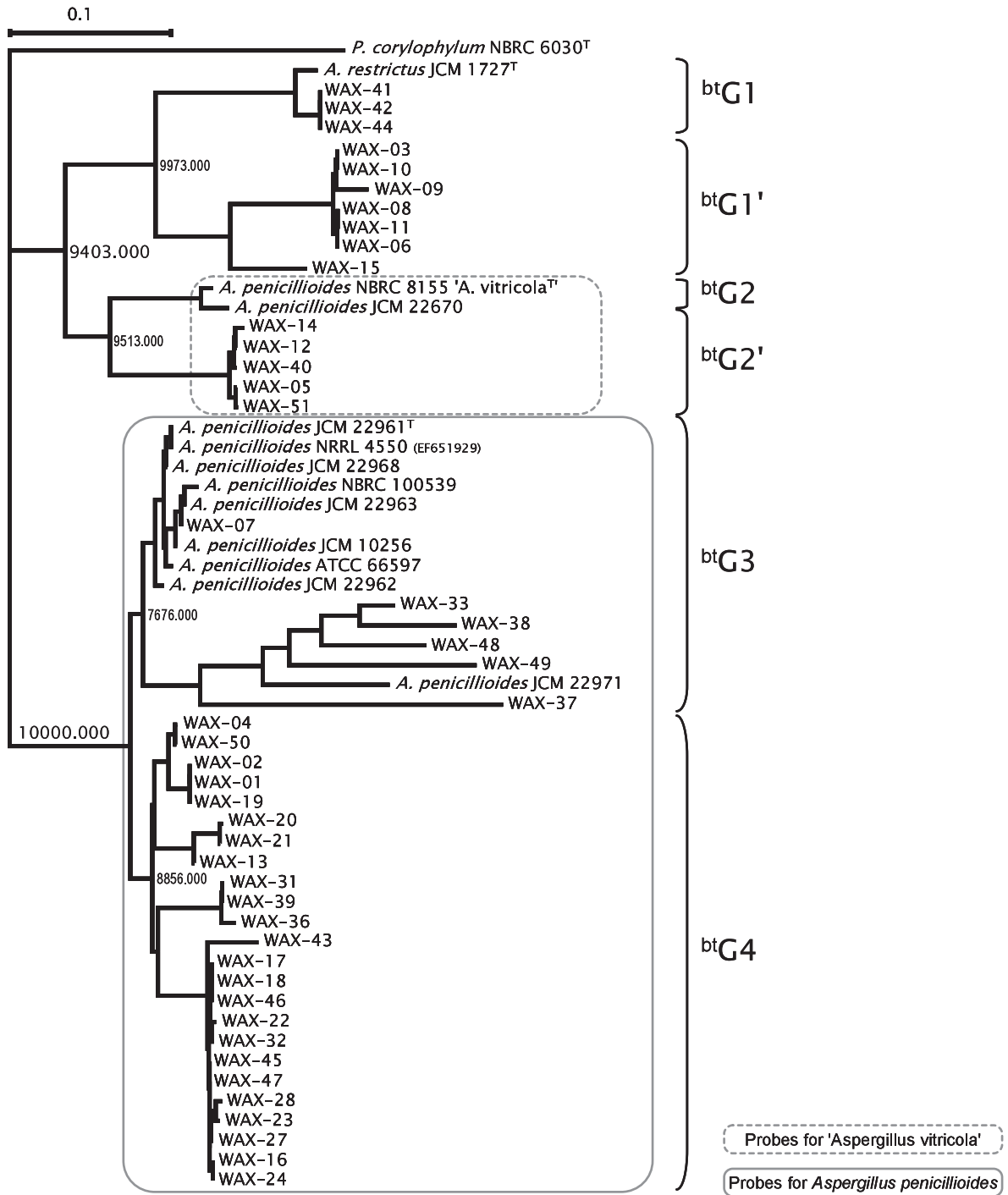


図2 β-チューブリン部分領域による *Aspergillus penicillioides* とその近縁種の系統樹

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Aspergillus penicillioides* and its relatives based on β-tubulin region (partial)

Neighbor-Joining Method; Bootstrap trial = 10,000, Kimura's 2 parameter method

22961^Tを含む他の *A. penicillioides* 菌株とは別の、むしろ別種である *A. restrictus* に近い位置に配置された。

また、NBRC 8155 と同じ G2 に含まれる JCM 22670 は日本の貯蔵精米より分離された菌株で、*A. penicillioides* として菌株機関に保管されているが、原記載では、*A. penicillioides* の記載¹⁴⁾ との一致点は多いとしつつも、その定義に合わない部分がある、即ち、より好乾性が強いとして、‘*A. vitricolae*’ (原文のまま) とされている¹⁵⁾。

‘*A. vitricolae*’ を *A. penicillioides* の同種異名とすることについては議論があり、超微細形態や化学組成、5.8S rDNA-ITS2 領域の遺伝子配列比較から別種とすべきとの Tamura *et al.* (1999) の主張もある¹⁶⁾。上記に ITS1 を加えた領域および β -チューブリンの一部領域による本報のデータでも、Tamura *et al.* と同じく、むしろ形態的には *A. penicillioides* より差異が大きい *A. restrictus* に近い位置に配置された。さらに、RNA Polymerase II 遺伝子ほかを加えた計 4 遺伝子の配列データを用いた Peterson (2008) の解析でも、同様の結果¹⁷⁾ が得られている。両菌種の異同については、今後、専門家による更なる検討を要すると考えられる。

以上のことから、*A. penicillioides* の菌株を網羅的に検出するために複数のオリゴ DNA プローブが必要であったことについては、プローブ設計の不備や DNA マイクロアレイの性能の問題ではなく、‘*A. vitricolae*’ という「別系統」を包含している *A. penicillioides* の定義によるものである。

また、NBRC 8155 が双眼鏡のレンズ上に生育していたこと、Ito *et al.* (1973) が JCM 22670 について指摘する好乾性の強さ¹⁵⁾などを考えると、‘*A. vitricolae*’ と呼称し、別種とするかはともかく、*A. penicillioides* 内に他よりも好乾性が強く、*A. restrictus* に近い位置に配置される系統群が存在すると考えられる。本報で示した G2 および G3/G4 の二群に分かれる系統間に、好乾性の強弱、言い換えるなら低湿度環境における危険度の強弱があるのなら、DNA マイクロアレイによって両者を迅速に識別することは、食品もしくは文化財の保存環境を監視し、改善するための有効な情報となることが期待される。

まとめ

Aspergillus restrictus, *A. penicillioides* の標品、文化財保管施設の雰囲気中より採取した *Aspergillus* 亜属 *Restricti* 節に属する野生株の ITS1-5.8S rDNA-ITS2 領域ならびに β -チューブリン遺伝子の一部領域を元に、近隣結合法によってそれぞれの系統樹を作成した。その結果、ITS 領域では、*A. restrictus* (Group 1: G1) 標品を含むグループ、*A. penicillioides* から成り、NBRC 8155 を含むグループ (G2)、JCM 22961 を含むグループ (G3)、野生株のみのグループ (G4) に分離した。bt 系統樹でも傾向は同様であったが、全体に配列変異が大きく、G1 と G2 が更に二分された。ここで、G2 は他の *A. penicillioides* (G3/G4) よりもむしろ *A. restrictus* に近い位置に配置された。

DNA マイクロアレイで *A. penicillioides* を検出するには、G2 と G3/G4 にそれぞれ異なるオリゴ DNA プローブが必要であったが、G2 に含まれる標品が、元来 ‘*A. vitricolae*’ とされていたもので、*A. penicillioides* との異同について議論もある系統であって、その ITS1 領域の配列に基準株とは異なる部分を有することによる。つまり、本種が多系統からなる可能性を反映したものと考えられる。種内部の系統について検出、識別できることは、有用な情報となり得る可能性がある。

謝辞

NPO 法人カビ相談センターの高鳥 浩介氏には、野生株の形態同定などご支援をいただいた。ここに記して感謝する。

参考文献

- 1) Frisvad, J. C., Andersen, B. and Samson, R. A., Association of moulds to foods, Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food, Dijksterhuis, J. and Samson, R. A. (ed.), CRC Press (Boca Raton, FL), pp.199-239 (2007)
- 2) Montanari, M., Melloni, V., Pinzari, F. and Innocenti, G., Fungal biodeterioration of historical library materials stored in Compactus movable shelves, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **75**, pp.83-88 (2012)
- 3) 加瀬谷泰介, 青木俊介, 平山幸一, 文化財を劣化させる真菌の検出識別用 DNA マイクロアレイ, 日本防菌防黴学会第 36 回年次大会講演要旨集, p.69 (2009)
- 4) 田辺 卓, 竹治仁詩, 小梶真実, 加瀬谷泰介, 青木俊介, 一色淳憲, 吉田充裕, カビ検査における DNA マイクロアレイの有効性, 日本防菌防黴学会第 37 回年次大会講演要旨集, p.224 (2010)
- 5) Isshiki, A., Takeharu, H., Kokaji, M., Tanabe, S., Aoki, S., Kasetani, T. and Yoshida, M., DNA Microarray Assay System for Multiplex Detection of Fungal Species in Indoor Environments, *Program of International Union of Microbiological Societies 2011 Congress* (IUMS Sapporo), p.244 (2011)
- 6) 青木俊介, 加瀬谷泰介, DNA マイクロアレイを用いた文化財劣化真菌検出法の開発, 東洋食品研究所 研究報告書, **29**, pp.85-92 (2013)
- 7) White, T. J., Burns, T. D., Lee, S. S. and Taylor, J. W., PCR protocols, a guide to methods and applications, Academic Press (Waltham, MA) (1990)
- 8) Glass, N. L. and Donaldson, G. C., Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes., *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(4), pp.1323-1330 (1995)
- 9) Edgar, R. C., MUSCLE: multiple sequence alignment

- with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, **32**(5), pp.1792-97 (2004)
- 10) 加瀬谷泰介, 青木俊介, 田辺 卓, 竹治仁詩, 小梶 真実, 一色淳憲, 吉田充裕, 文化財を劣化させる真菌の検出識別用 DNA マイクロアレイ 2 — *Aspergillus penicillioides* Spegazzini の種内系統 —, 日本防菌防黴学会第 37 回年次大会講演要旨集, p.224 (2010)
 - 11) Kasetani, T., Aoki, S., Tanabe, S., Takeharu, H., Kokaji, M., Isshiki A. and Yoshida, M., DNA Microarray to Detect and Identify several Xerophilic Fungi and Phylogenetic Analysis of a Target Species, *Aspergillus penicillioides*, *Program of International Union of Microbiological Societies 2011 Congress* (IUMS Sapporo), p.245 (2011)
 - 12) Ohtsuki, T., Studies on the glass mould: On two species of *Aspergillus* isolated from glass, *Bot. Mag. Tokyo*, **75**, pp.436-442, (1962)
 - 13) Spegazzini, C., Hongos de la caña de azúcar., *Revista Fac. Agron. Univ. Nac. La Plata*, **2**(19), pp.227-258, (1896)
 - 14) Raper K. B. and Fennell, D. I., The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins, p.233, (1965)
 - 15) Ito, H., Iizuka, H. and Sato, T., Identification of Osmophilic *Aspergillus* Isolated from Rice and Their Radio-sensitivity, *Agr. Biol. Chem.*, **37**(4), pp.789-798 (1973)
 - 16) Tamura M., Kawasaki, M. and Sugiyama, J., Identity of the xerophilic species *Aspergillus penicillioides*: Integrated analysis of the genotypic and phenotypic characters, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **45**(1), p.29-37 (1999)
 - 17) Peterson, S. W., Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci, *Mycologia*, **100**(2), pp.205-226 (2008)