

愛媛県におけるカンキツ幹腐病の発生と PCR による本病原菌の検出

三好 孝典^{1*}・小野 泰典²・清水 伸一¹

ABSTRACT

MIYOSHI, T.^{1*}, ONO, Y.² and SHIMIZU, S.¹ (2007). Occurrence of concave stem canker of citrus in Ehime Prefecture and detection of the pathogenic fungus *Lachnum abnorme* by PCR. Jpn. J. Phytopathol. 73: 9-14.

Brown lesions, a symptom of concave stem canker, were found on *Citrus junos* (Yuzu) in Hijikawa-cho, Ehime Prefecture, Japan in July 2000. The fungus isolated from the brown lesions by single-spore isolation was pathogenic on *C. junos*. By morphological characteristics of the specimen and culture and analysis of the ITS (internal transcribed spacer) region of the rDNA, the causal fungus was identified as *Lachnum abnorme* (Mont.) J. H. Haines & Dumont, and the disease was confirmed as concave stem canker of citrus. Based on small nucleotide differences in the ITS regions of seven isolates of *L. abnorme*, including pathogenic isolates on *C. junos* and eight other species of *Lachnum*, species-specific primers LAF (5'-CCTACCCTTGTGTATTATAACAAT-3') and LAR (5'-ATCCGAGGTCAACCTAAG-3') were selected. Primer pairs LAF and LAR amplified a fragment of 449 bp containing a portion of the ITS region in all the *L. abnorme* isolates tested, which originated from different hosts and regions of Japan, but did not amplify a fragment of any other species of *Lachnum*. In a PCR assay for concave stem canker, DNA was extracted from diseased branches of *C. junos* from Tokushima, Kochi and Ehime Prefectures using magnetic silica beads. Only a 449-bp fragment was amplified from DNA extracted from the brown lesions. The method developed may be useful for the rapid detection and identification of *L. abnorme* from both culture and plant tissue.

(Received March 27, 2006; Accepted August 11, 2006)

Key words: citrus, *Lachnum abnorme*, concave stem canker, ITS region, PCR

緒 言

2000年7月に愛媛県肱川町のユズ (*Citrus junos*) において、枝幹部にすり鉢状のくぼみを生じて木質部まで褐変して腐り込み、傷害部の表面に黄色で盃状の子のう盤を生じる症状が認められた。本症状は、徳島県や高知県で発生しているカンキツ幹腐病と類似した症状であった(貞野ら, 1988; 貞野・走川, 2000; 貞野, 2001; 森田ら, 2002)。このため、本症状がカンキツ幹腐病かどうかを調査するため、分離菌の同定および病原性の確認を行った。

カンキツ幹腐病の病原はすでに貞野ら (1998) により、*Lachnum abnorme* (Mont) J. H. Haines & Dumont と同定されているが詳細な形態観察の記載や遺伝子解析のデータは不十分であった。また、本邦においてカンキツ幹腐病菌

(*L. abnorme*) 以外の *Lachnum* 属菌の植物病原菌としての報告はなく (日本植物病名目録, 2000)、植物病原菌として *Lachnum* 属菌を扱った研究はほとんどないので、その診断は非常に困難である。

そこで、病原菌の rDNA の ITS 領域を解析して同定の基礎データにするとともに、PCR プライマーを作成して、PCR による本病原菌の検出についても検討した。

材料および方法

病原菌の分離および同定 2000年7月に愛媛県肱川町の約 10 a のユズ園において、枝幹部にすり鉢状のくぼみを生じて木質部まで褐変して腐り込み、傷害部の表面に黄色で盃状の子のう盤を生じて枯死する樹が園の約 3 割から認められた。このような発病枝を採取して子のう盤から

¹ 愛媛県立果樹試験場 (〒791-0112 松山市下伊台町1618) Ehime Fruit Tree Experiment Station, 1618 Shimoidai, Matsuyama, Ehime 791-0112, Japan

² 三共株式会社 創薬基盤研究所 (〒305-0841 つくば市御幸が丘33) Core Technology Research Laboratories Sankyo Co., LTD, 33 Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305-0841, Japan

本研究で明らかになった塩基配列は、GenBank/EMBL/DDBJ DNA データベースにアクセッション番号 AB267634~AB267650 として登録した。

* Corresponding author (E-mail: miyoshi-takanori@pref.ehime.jp)

子のう胞子の単胞子分離を行った。分離法および同定は、Hosoya and Otani (1997) の方法に従って行った。分離菌をPDA培地上で23°C、暗黒下で培養してコロニーの性状を調査した。コロニーの色は、Kornerup and Wanscher (1978) に従って判定した。

分離菌の病原性 分離菌株 (E1, E2 および E3) を用い、2001年3月にポット植えユズの新梢に対し虫ピンで傷を付け、その部分に菌そうを張り付けて接ぎ木テープで固定した。なお、1菌株当たり5新梢を用いた。2001年11月に枝の褐変状況を調査した。さらに褐変した組織を切り出し、70%エタノールおよび次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素約1%) 液で表面殺菌した後、PDA 平板培地に移して再分離を行った。

PCR と塩基配列の決定 第1表に示す17菌株を用いて、potato dextrose broth (Difco) 1 ml に供試菌を接種後、25°C、48時間培養した。その後、PrepMan™ Ultra Reagent (Applied Biosystems) のプロトコールに従いDNA抽出を行った。抽出したDNAを用いて、White *et al.* (1990) の方法に従いITS1 およびITS4のプライマーでrDNAのITS領域を増幅後、ダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

配列のアラインメントおよび系統解析 マルチプルアラインメントはMAFFT ver.5.8 (Katoh *et al.*, 2005) を用いてStrategyはFFT-NS-iにParameterはScoring matrix: BLOSUM62, Gap opening penalty: 1.5, Offset value: 0.14

に設定して行った。アラインメントの微調整はBioEdit version7.0.5.2 (Hall, 1999) を用いてマニュアルにて行った。分枝系統樹はMEGA version3.1 (Kumar *et al.*, 2004) を用いて近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) により作成した。距離推定にはKimura 2-parameter モデル (Kimura, 1980) を用い、すべての挿入・欠損は系統解析から除外した。系統樹の信頼性の評価にはブートストラップ法 (Felsenstein, 1985) を用いて、1000回繰り返して求めた。

病原菌検出のための特異プライマーの設計 分離菌株E1と*L. abnorme*以外の種8菌株とのITS領域塩基配列の相同性の低い配列から、449塩基の産物を増幅するLAF (5'-CCTACCCTTGTGTATTATAACAAT-3') とLAR (5'-ATCCGAGGTC AACCTAAG-3') を設計した。

分離菌株E2およびE3を除くITS領域を解析した15菌株を用い、PCRによりプライマーの有効性を確認した。すなわち、PCR反応はEx Taq DNA Polymerase (Takara) を用いて、10 µl に調整した反応液 (0.2 mM dNTP Mixture, 10×緩衝液, 2 mM MgCl₂, 0.2 µM 各プライマー, 0.5 µl DNA 溶液) を94°C 5分熱変性後、増幅反応 (94°C 15秒の熱変性, 62°C 15秒のアニーリングおよび72°C 30秒の伸長) を35サイクル、最後に72°Cの伸長を7分の条件で行った。PCR産物は、2%アガロース電気泳動し、臭化エチジウム染色により増幅断片を検出した。

発病枝からのPCR検出 徳島県、高知県および愛媛県で発生している本病発病枝 (各3枝) の褐変部分およ

第1表 rDNA ITS 領域を解析した菌株

菌株	宿主	病原性	部位	場所	採集日	アクセッション ^{a)} 番号
<i>Lachnum abnorme</i>	E1	○	枝	愛媛県	2001年7月	AB267634
<i>Lachnum abnorme</i>	E2	○	枝	愛媛県	2001年7月	AB267635
<i>Lachnum abnorme</i>	E3	○	枝	愛媛県	2001年7月	AB267636
<i>Lachnum abnorme</i>	Y9704-a1	○	枝	徳島県	1997年4月	AB267640
<i>Lachnum abnorme</i>	Y9704-a3	○	枝	徳島県	1997年4月	AB267641
<i>Lachnum abnorme</i>	Y9704-a5	○	枝	徳島県	1997年4月	AB267642
<i>Lachnum abnorme</i>	97	不明	樹皮	長野県	1990年7月	AB267639
<i>Lachnum abnorme</i>	458	不明	枝	静岡県	1992年2月	AB267638
<i>Lachnum abnorme</i>	1084	不明	枝	奈良県	1995年8月	AB267637
<i>Lachnum brevopilosum</i>	137	不明	樹皮	北海道	1990年7月	AB267643
<i>Lachnum ciliare</i>	622	ミズナラ	葉	群馬県	1992年7月	AB267644
<i>Lachnum fuscescens</i>	1037	ブナ属	葉	鳥取県	1994年5月	AB267645
<i>Lachnum nudipes</i>	1143	オオバイタドリ	枝	岩手県	1995年5月	AB267646
<i>Lachnum palmae</i>	663	ビロウ	葉	大分県	1992年9月	AB267647
<i>Lachnum papyraceum</i>	545	カシワ	葉	茨城県	1992年6月	AB267648
<i>Lachnum pulverulentum</i>	1471	マツ属	葉	長野県	1997年4月	AB267649
<i>Lachnum longispineum</i>	591	ネジキ	葉	長野県	1992年6月	AB267650

a) DDBJ/EMBL/GenBank

び褐変部から約 5 mm 離れた外観健全部分から、磁性シリカビーズによる DNA 抽出キット (Mag-Extractor Plant genome, 東洋紡) を用いて、全 DNA を抽出し、前述の条件により病原菌の PCR 検出を行った。なお、ポジティブコントロールは E1 の菌体 DNA を、ネガティブコントロールは滅菌水を用いた。

結 果

分離菌の同定および病原性

傷害部上に形成された子のう盤は、散在または集合性、短柄、高さ最大で 1 mm であり、盤面は浅い凹状から平坦で、まれにわずかに凸状、新鮮時は黄色であり、縁辺部は隆起する。托は灰白色から淡黄色、綿毛状、短い毛に覆われる。外皮層は二層からなり、外皮層外側は矩形菌糸組織 (*textura prismatica*) からなり、内側の外皮層は外側に向けて平行の細い菌糸の層からなる。毛は真直あるいは屈曲し、先端は鈍頭の円筒形、隔壁を有し、幅 2.5-3.5 μm で、全面に粒状を有し、樹脂や結晶は付着しない。未熟時は無色、成熟すると明褐色となる (第 1 図)。

子のうは、72.0-101.5 × 6.5-8.0 μm、棍棒状の円筒形で、基部は単純隔壁、先端は円錐形、頂部で平坦、先端構造は KOH 処理なしで、メルツァー試薬 (MLZ+) により青変する (第 1 図)。

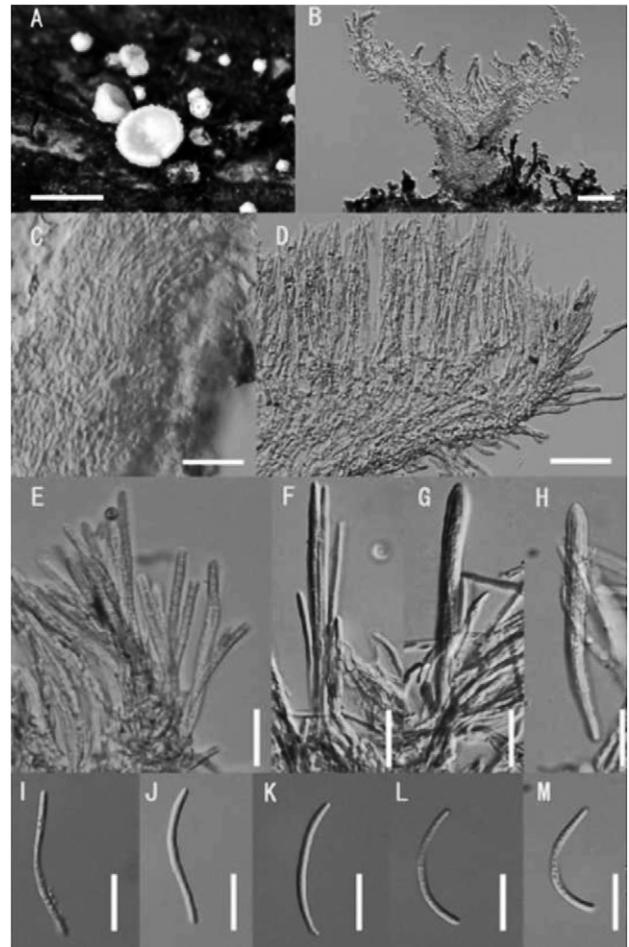
子のう胞子は 32.5-58.0 × 2.5-4.0 μm、円筒形から糸状、ほとんどが 3-5 隔壁、最大 7 隔壁あり、真直か、わずかに曲がるか、S 字状である。側糸は細い槍型、最も太い部分で幅 3.0-4.0 μm、子のうと同長または、わずかに長い (第 1 図)。

PDA 平板 23°C、30 日目のコロニーは 16-24 mm に達し、平坦、ピロード状、Brownish Grey (5C2) から White (5A1) で、裏面は Olive Brown (4F4) から Brownish Grey (4C2) を呈する。菌糸は無色で、隔壁があり、分枝し、直径 1.5-2.5 μm となる。気中菌糸はやや発達し、部分的に羊毛状の束となる。セクターおよび環紋は観察されない。周縁は不規則に切れ込む。また、菌叢周縁の培地に茶色の色素の蓄積が認められる。

分離菌株 E1~E3 をユズに対し接種して病原性を調査した結果、すべての菌株で褐変症状が認められ、褐変部分から同種の菌が再分離された。

分離菌の rDNA の ITS 領域による系統樹解析

rDNA の ITS 領域をダイレクトシーケンスして系統樹解析を行った結果、カンキツ幹腐病菌を含む *L. abnorme* 9 菌株は 100% のブートストラップ値で単系統群であることが支持された (第 2 図)。その中で、カンキツ類から病原



第 1 図 分離菌株 E1 の形態

A, 病斑部の新鮮な子のう盤; B, 子嚢盤 (縦断面); C, 柄の外皮層 (縦断面); D, 托 (縦断面); E, 托外皮層および毛; F, 側糸; G, H, 子のう; I-M, 子のう胞子
スケール: A, 1 mm; B, 0.1 mm; C, 20 μm; D, 40 μm; E-M, 20 μm.

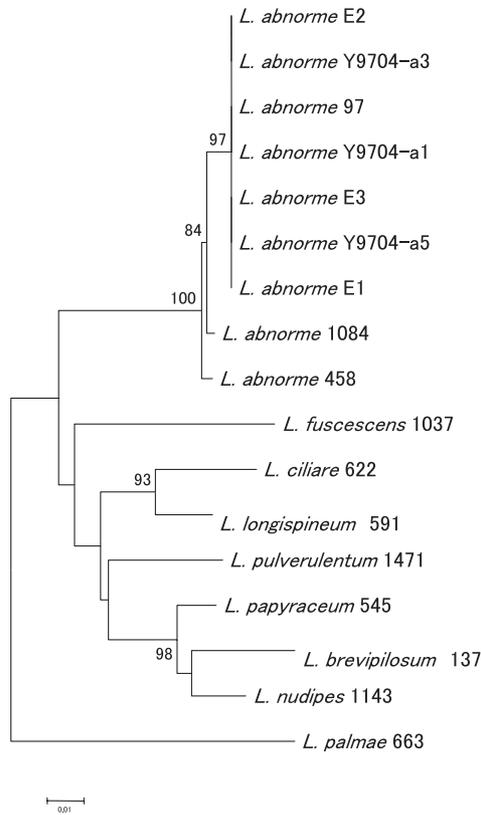
として分離された 6 菌株は 97% のブートストラップ値で支持される単系統群であることが明らかとなった。

病原菌検出のための特異プライマーの設計

分離菌株 E1 と *L. abnorme* 以外の種 8 菌株との ITS 領域塩基配列の相同性の低い配列から、449 塩基の産物を増幅する LAF と LAR を設計して PCR を行った結果、分離菌株 E1 を含む *L. abnorme* の 7 菌株のみに 449 塩基の産物が増幅され、*L. abnorme* 以外の種 8 菌株には産物が増幅されず、プライマーの有効性が示唆された (第 3 図)。

発病枝からの PCR 検出

発病枝の褐変部分および褐変部から約 5 mm 離れた外観健全部分から、磁性シリカビーズによる DNA 抽出キットを用いて全 DNA を抽出し PCR 検出を行った結果、褐変

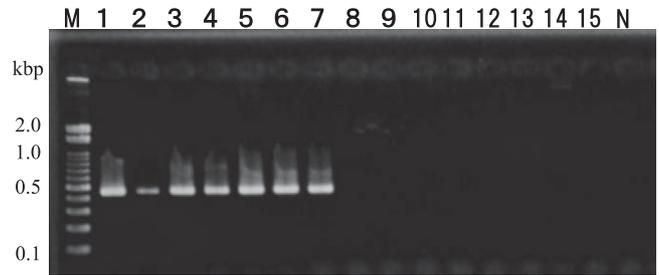


第2図 近隣結合法による *Lachnum abnorme* 類縁菌株の系統樹
枝上の数字は1000回反復によるブートストラップ値(%)
の70%以上の値を表す。

部分からのみ449塩基の産物が増幅され、褐変部から約5 mm 離れた外観健全部からは増幅されなかった(第4図)。

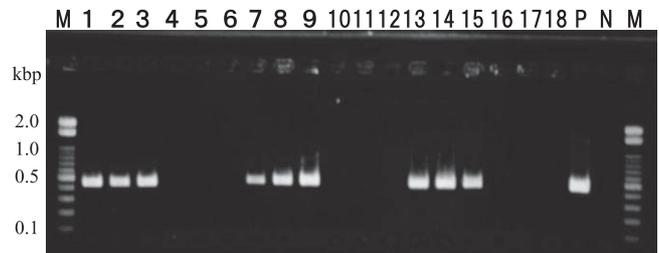
考 察

今回、新たにユズで発見された症状がカンキツ幹腐病であるかどうかについて検討した。灰白色から淡黄色で、短い毛に覆われ、矩形菌糸組織からなる托の特徴からユズで発見された盤菌を *Lachnum* 属 (Leotiomyces; Helotiales; Hyaloscyphaceae) と同定した (Spooner, 1987)。さらに子のうおよび子のう胞子の形態から、*L. abnorme* にもっとも近いと考えられ、既報告 (Haines and Dumont, 1984; 貞野ら, 1998) と子のう胞子の形態を比較すると、子のう胞子の大きさは分離菌株 E1 が $32.5\text{--}58.0 \times 2.5\text{--}4.0 \mu\text{m}$, 貞野ら (1998) は $45.0\text{--}67.5 \times 1.8\text{--}2.0 \mu\text{m}$, Haines and Dumont (1984) は $39.0\text{--}67.0 \times 1.4\text{--}2.2 \mu\text{m}$ で、分離菌株 E1 の子のう胞子の幅がやや広がったが、*L. abnorme* の変異の範囲内であると推測した。そして、これを確認するために、rDNA の ITS 領域を解析した結果、分離菌株 E1~E3 はユズから分離した *L. abnorme* Y9704-a1, Y9704-a3 および Y9704-a5 の3菌株を含む *L. abnorme* のクラスターに含ま



第3図 プライマーの有効性

M, マーカー (100 bp ラダー); 1, *L. abnorme* E1; 2, *L. abnorme* 1084; 3, *L. abnorme* 97; 4, *L. abnorme* 458; 5, *L. abnorme* Y9704-a1; 6, *L. abnorme* Y9704-a3; 7, *L. abnorme* Y9704-a5; 8, *L. brevopilosum* 137; 9, *L. ciliare* 622; 10, *L. fuscescens* 1037; 11, *L. nudipes* 1143; 12, *L. palmae* 663; 13, *L. papyraceum* 545; 14, *L. pulverulentum* 1471; 15, *L. longispineum* 591; N, ネガティブコントロール。



第4図 発病枝の褐変部および健全部からの PCR 検出

1~3, 徳島県発病枝褐変部; 4~6, 徳島県発病枝健全部; 7~9, 高知県発病枝褐変部; 10~12, 高知県発病枝健全部; 13~15, 愛媛県発病枝褐変部; 16~18, 愛媛県発病枝健全部; P, ポジティブコントロール; N, ネガティブコントロール; M, マーカー (100 bp ラダー)。

れることが100%のブートストラップ値で支持された。さらに、分離菌株 E1~E3 はユズの枝に対して病原性を有していた。以上の結果から、今回発見された症状の病原菌を *L. abnorme* (Mont) J. H. Haines & Dumont と同定し、カンキツ幹腐病と判断した。カンキツ幹腐病の発生は愛媛県内では初確認である。

形態学的に同一種と考えられていた9菌株の *L. abnorme* の rDNA の ITS 領域の解析結果で、カンキツ幹腐病の菌株を含む単系統群は ITS 領域の相同性が99.4~100%と高いのに対し、カンキツ幹腐病のクレードの菌株と菌株1084および454との ITS 領域の相同性は97.0~97.4%と低かった。このため、今後、遺伝学的に *L. abnorme* の再検討が必要と考えられる。

本病原菌は、PDA 培地上での生育が遅く、また、病原菌の同定を行うには子のう盤、子のうおよび子のう胞子

の形態を調査する必要があり、診断するには多大の時間を要する。近年、病原菌の診断では rDNA の ITS 領域の塩基配列の違いを利用した PCR 検出法が報告されている (Lindqvist *et al.*, 1998; Miyoshi *et al.*, 1998)。本法を利用すると、短期間で確実な診断が可能となるため、本病原菌のプライマーの開発を検討した。

rDNA の ITS 領域を解析した 9 菌株の *L. abnorme* と菌株 E1 との相同性は 97.0~99.8% を示し、他の菌株と菌株 E1 との相同性は 79.1~88.8% であった (データ省略)。そこで、*L. abnorme* 内では相同性が高く、他種とは相同性の低い領域を選択して、449塩基の産物を増幅する LAF および LAR のプライマーを設計した。

プライマー LAF および LAR の有効性を調査するため、ITS 領域を解析した 15 菌株を用いて PCR を行った。その結果、分離菌株 E1 を含む *L. abnorme* の 7 菌株のみに 449塩基の産物が増幅され、本プライマーは有効と考えられた。さらに、徳島県、高知県および愛媛県から分離した病原菌各 5 菌株、合計 15 菌株についても PCR を行ったところ、すべての菌株で 449塩基の産物が増幅された。このことより、本プライマーの有効性が示され、地理的分離源の異なる菌株すべて本プライマーで検出可能であると考えられた。

プライマー LAF および LAR の有効性が示されたので、実際に発病枝から直接 PCR 検出を試みた。なお、枝組織から全 DNA を抽出した場合、PCR 阻害物質も同時に抽出されるため、PCR 阻害物質を可能な限り取り除くことが重要とされている (Zhou *et al.*, 1996)。また、検定用の多くの試料を処理するためには、抽出操作が簡易でなければならない。そこで、清水ら (2002) がイチジク株枯病菌の土壌からの PCR 検出で報告している磁性シリカビーズ (東洋紡) を用いる方法を使用して、発病枝から全 DNA を抽出し、PCR 検出を行った。その結果、徳島県、高知県および愛媛県の発病枝褐変部位からは 449塩基の産物が増幅されたが、隣接する健全部からは増幅産物が検出されなかった。このことから、発病枝褐変部位には病原菌が存在し、褐変部位からの病原菌の PCR 検出が可能であることが明らかとなった。しかし、褐変部に隣接する健全部には病原菌は存在せず、PCR 検出は不可能であった。褐変部に隣接する健全部から病原菌が分離できないことは森田ら (2002) の報告と一致した。褐変部に隣接する健全部に病原菌が存在しないことは、病原菌の生育スピードが非常に遅いことに関係しているものと考えられる。

以上のことより、愛媛県におけるカンキツ幹腐病の発生が確認されるとともに、検出用プライマー LAF および

LAR を用いることにより、本病の PCR 検出が可能であることが明らかとなった。

和文摘要

2000年7月に愛媛県肱川町のユズに、枝幹部にすり鉢状のくぼみを生じて木質部まで褐変して腐り込み、傷害部の表面に黄色で盃状の子のう盤が発生する症状が認められた。その病斑部に発生した子のう盤から単胞子分離された菌株にはユズに対する病原性も認められた。形態観察、培養性状および rDNA の ITS 領域を解析した結果、本病原菌を *Lachnum abnorme* (Mont) Haines & Dumont と同定し、本症状を幹腐病と判断した。さらに、本病原菌を含む *L. abnorme* を 7 菌株と *Lachnum* 属のほかの 8 種との ITS 領域の塩基配列の差に基づいてプライマー LAF (5'-CCTACCCTTGTGTATTATAACAAT-3') と LAR (5'-ATCCGAGGTCAACCTAAG-3') を設計した。このプライマーの有効性を確認した結果、*L. abnorme* 7 菌株のみで 449塩基の産物が増幅された。また、徳島県、高知県および愛媛県の発病枝褐変部分から、磁性シリカビーズを用いて DNA を抽出して PCR を行ったところ、褐変部のみから 449塩基の産物が増幅された。本 PCR 法は培養菌および発病枝からの迅速同定に有用と考えられた。

引用文献

- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Haines, J. H. and Dumont, K. P. (1984). Studies in the Hyaloscyphaceae III: The long-spored, lignicolous species of *Lachnum*. *Mycotaxon* 19: 1-39.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hosoya, T. and Otani, Y. (1997). Hyaloscyphaceae in Japan (1): non-glassy-haired members of the tribe Hyaloscyphaeae. *Mycoscience* 38: 171-186.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. and Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. (describes the G-INS-i, L-INS-i and E-INS-i strategies) *Nucleic Acids Res.* 33: 511-518.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kornerup, A. and Wanscher, J. H. (1978). *Methuen Handbook of Colour*, 3rd ed. pp. 252, Eyre Methuen, London.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.* 5: 150-163.
- Lindqvist, H., Koponen, H. and Valkonen, J. P. T. (1998). *Peronospora sparsa* on cultivated *Rubus arcticus* and its detection by PCR based on ITS sequences. *Plant Dis.* 82: 1304-1311.

- Miyoshi, T., Sawada, H., Tachibana, Y. and Matsuda, I. (1998). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by PCR using primers from the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 249-254.
- 森田泰彰・松本宏司・川池直人・川田洋一 (2002). 高知県におけるユズ幹腐病の発生生態と防除. 高知農技セ研報 11: 7-19.
- 日本植物病理学会編 (2000). 日本植物病名目録. pp 857. 日本植物防疫協会, 東京.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- 貞野光弘・細矢 剛・川田洋一・大和浩国 (1998). *Lachnum abnorme* によるユズ幹腐病 (新称). 日植病報 64: 437.
- 貞野光弘・走川由希 (2000). ユズ幹腐病 (みきぐされびょう) の発生生態と防除薬剤の検討. 徳島果試研報 28: 11-23.
- 貞野光弘 (2001). ユズ幹腐病の発生生態と防除. 植物防疫 55: 14-17.
- 清水伸一・三好孝典・兼松聡子 (2002). 磁性シリカビーズを用いたイチジク株枯病菌のPCRによる土壌からの検出. 愛媛果樹試研報 15: 35-40.
- Spooner, B. M. (1987). Helotiales of Australasia: Geoglossaceae, Orbiliaceae, Sclerotiniaceae, Hyaloscyphaceae. *Bibl. Mycol.* 116: 1-711.
- White, T. J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp 315-322 in: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M. A. Gelfand, D. H. Sninsky, J. J. and White T. J. eds. Academic Press, San Diego, CA.
- Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 316-322.