

Phytophthora 属菌の血清学的検出法および 同定法に関する研究

I. *Phytophthora syringae* 抗血清の作製とその 寒天ゲル内拡散法における反応*

西尾 健・川口 嘉久**・君島 悦夫
高山 睦雄・末次 哲雄
横浜植物防疫所

Studies on Serological Detection and Identification Methods for Species of *Phytophthora* I. Preparation of Antisera for *Phytophthora syringae* and Their Specificity in Agar Gel Immunodiffusion Tests. Takeshi NISHIO, Yoshihisa KAWAGUCHI, Etsuo KIMISHIMA, Mutsuo TAKAYAMA and Tetsuo SUETSUGU (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 19: 47-53 (1983).

Abstract: Antisera were prepared for soluble (S) and crude cell-wall (CW) antigens from *Phytophthora syringae* (Klebahn) Klebahn. These antisera were tested with S-antigens of 25 isolates of 23 fungal species, including 10 isolates of *Phytophthora* and 5 isolates of *Pythium*, in agar gel immunodiffusion plates to check their serological specificity.

S-antigens of isolates of *Phytophthora* except *P. macrospora* and some isolates of *Pythium* formed clear or faint precipitin lines with the both antisera. S-antigens of 3 isolates of *P. syringae* formed most clear and sharp lines. The precipitin lines produced with CW-antiserum was shorter and broader than those with S-antiserum. Adsorbed S-antiserum with S-antigen of *Py. vexans* positively reacted against S-antigens of 9 isolates of *Phytophthora*, but never reacted against those of *Pythium*.

Sharp single precipitin line was produced within 1 to 2 days in SDS agar gel plates, while the precipitin production in ordinary gel were more slowly. Although CW-antigens did not diffuse in ordinary agar plates, it could be diffused and formed single broader line in SDS gel plates with CW-antiserum.

ま え が き

Phytophthora 属菌の分類は、他の多くの糸状菌の分類と同様に、形態的特徴や培地上的諸性質をもとに行なわれている (NEWHOOK, 1978)。しかしながら、*Phytophthora* 属菌の内には、分類上最も重要と思われる有性器官や無性器官を非常に形成しにくいものや、培養条件などによって簡単にそれらの形態的特徴が変わるものが多く、場合によっては属内の種の同定だけでなく、近縁の *Pythium* 属菌との区別も困難な場合がある。このため、*Phytophthora* 属菌の正確な同定を行うためには、かなりの時間と、熟練した観察眼が必要であり、

一般に困難な場合が多い。

以上の理由から、形態観察にたよらず血清学的方法 (BURRELL *et al.*, 1966; MORTON & DUKES, 1967; MERZ *et al.*, 1969; MALAJCZUK *et al.*, 1975) や、菌体の可溶性タンパク質の電気泳動パターンによって (箕浦ら, 1977; GILL & ZENTMYER, 1978; 松本ら, 1979)、特定の種の同定や分類を行なおうとする試みがなされている。血清学的方法は、一旦特異的な抗血清を作製すれば、以後の操作はより簡単で迅速と思われる。

Phytophthora 属には、数多くの農業上重要な病原菌が含まれている (桂, 1971)。今のところ我が国には発生報告のない種も多いが、その内から比較的多くの果樹類を侵し、最近では特にイギリスのリンゴ生産に大きな被害をおよぼしている *Phytophthora syringae* (Klebahn) Klebahn について (WATERHOUSE & WATERSTON, 1964; EDNEY, 1978; HARRIS, 1979)、その血清学的な

* 本報告の概要は 1981 年日本植物病理学会大会において発表した。

** 現在、農蚕園芸局植物防疫課

検出, 同定が可能かどうかを調べる目的で抗血清を作製し, その性質を検討したのでここに報告する。

報告にあたり, 有益な御助言を賜わり, 又貴重な菌株を分譲下さった京都府立大学正子朔教授及び大阪府立大学一谷多喜郎博士, 並びに終始御指導を賜わった元当所病菌課松濤美文博士に心よりお礼申し上げる。

材料および方法

1. 供試菌株

本試験で使用した *P. syringae* 及び *P. erythroseptica* 並びに *Nectria haematococca* 及び *Verticillium tricorpus* は Commonwealth Mycological Institute (CMI) 及び American Type Culture Collection (ATCC) より農林大臣の特別許可を得て導入した*。その他菌株は財団法人醸酵研究所及び大阪府立大学一谷博士より分譲を受けたもの, 並びに当所病菌課にて保管中のものを使用した。これら菌株の来歴は, 第 1 表のとおりで, *Phytophthora* 属 8 種 10 菌株, *Pythium* 属 5 種 5 菌株, その他 10 種 10 菌株の計 23 種 25 菌株であった。なお, 抗血清の作製に用いたのは, *P. syringae* CMI 131191 株である。

2. 抗原の調整法

抗血清の作製や, 抗血清反応に用いるための抗原の調整法は第 1 図のとおりである。

100ml のコルベンに分注した約 40ml のジャガイモせん汁液体培地に, あらかじめジャガイモせん汁寒天培地で生育させた菌糸片を接種し, 約 10~20 日間, 20~25°C で静置培養した。生育した菌糸は, プフナーロート上で吸引しながら, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回よく洗滌した後, -20°C で凍結保存した。この凍結菌糸は少量の PBS を加えて, ワーリングブレンダーで粉碎した後, 径 0.5mm のガラスビーズをほぼ当容量加え, ビプロゲンセルミル (Edmund Bühler 社製) で 20 分間さらに破碎した後, 超音波細胞破碎装置 (久保田, 200M 型) で, 180W, 20 分間, 超音波処理した。次に, この菌糸破碎液は 10,000×g, 10 分間遠心し, この上清を可溶性 (S) 分画 (又は S 抗原) とした。又, 沈殿は再度 PBS にけんたくし, 同様の遠心操作を 2 回くりかえし洗滌した。この洗滌済みの沈殿は少量の PBS にけんたくした後, 上述の条件で再度ビプロゲンセルミル, 超音波処理した。得られたけんたく液中の成分の多くは, 菌糸細胞壁の破碎物と思われることから (MALAJCZUK, 1975), これを粗細胞壁 (CW) 分画 (又は CW 抗原) とした。以上の操作は, すべて 4°C 以下で行なった, 又得

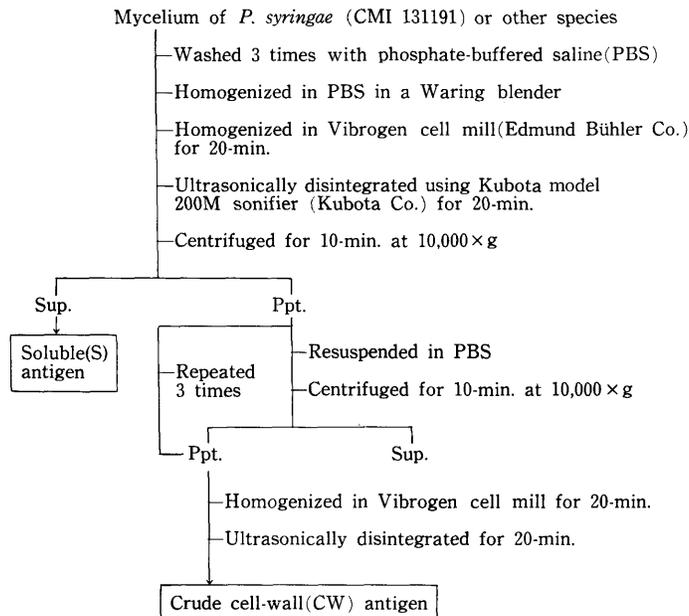


Fig. 1 Procedure for preparation of antigens

* 許可番号 54 横植第 1430 号, 第 1431 号, 第 1397 号および 53 横植第 2194 号

られた S 分画および CW 分画は 4°C 又は -20°C で保存した。

3. 抗血清の作製

S 抗原については、総タンパク量 1.2~2.5mg/ml 液に、等容量の Freund's complete adjuvant を加え、超音波処理 (180W, 10分間) で乳化し、これを家兎 1羽当り 2ml づつ 1週間おきに計 4回筋肉注射した。その後、S 抗原 1ml を静脈内に 2回注射して、最後の注射後 7~10日目に全採血し、S 分画抗血清 (S 抗血清) を得た。CW 分画については、同じく等量の adjuvant を加え乳化後、1羽当り 1~2ml づつ約 1週間おきに計 4回筋肉注射して、最終注射後 2週間して全採血し、CW 分画抗血清 (CW 抗血清) を得た。

吸収抗血清は、S 抗血清 10ml に、*Py. vexans*, 又は *P. parasitica* var. *nicotianae* の S 抗原を 3ml 加えて 37°C に 2~4 時間放置後さらに 4°C に 1晩放置した後、5000×g, 10分間遠心し、その上清を取り作製した。

4. 血清学的試験法

得られた S 抗血清の力価測定は、リングテスト法によった。その力価は 16~32 倍であった。CW 抗血清については、ホモ抗原の CW 分画液は静置するとすみやかに沈殿ができることから、リングテスト法、マイクロ凝集法などの通常用いられる簡便な方法によって、その力価を測定できなかった。しかし、CW 抗血清は、S 抗原とよく反応するので、この組合せでリングテスト法により測定したところ、S 抗血清とほぼ同じ力価であった。

両抗血清とも他菌 S 抗原との反応は、寒天ゲル内拡散法によった。well 外周間の距離は 8mm とし、用いた寒天ゲルは 0.8% 寒天, 0.1% NaNO₃ を PBS に溶解したものである。SDS ゲル (GARNSEY *et al.*, 1978) は、上記寒天ゲルに SDS を 0.3% となる様に加えて用いた。

タンパク質濃度の測定は LOWRY らの方法 (1951) によった。

結 果

1. S 抗血清と各種菌の S 抗原との反応

中央 well に S 抗血清を、周囲 6 穴に各種菌株の S 抗原、又は対照として PBS を入れ室温で 5~10 日間反応させた後に観察した。*P. syringae* 131191 株のホモ S 抗原との反応は、第 2 図のとおりで、1本の鮮明な沈降帯と 3~4本の不鮮明な沈降帯が形成された。

各種菌株の S 抗原との反応は第 1 表のとおりで、*P. syringae* 3 菌株が最も強く反応し鮮明な沈降帯を作った。その他の *Phytophthora* 属菌では、沈降帯の鮮明さやその数にちがいがあがるが、*P. macrospora* を除きよく

反応した。*Pythium* 属菌では、*Py. cucurbitacearum* を除き反応したが、*Phytophthora* 属菌の場合とは異なり、不鮮明な沈降帯しか形成しなかった。その他の属の菌株では全く反応は認められなかった。なお、出現した沈降帯の互いの異同については、形成された沈降帯の数が多いことや不鮮明なものも多いことから (第 3 図)、詳しい検討は行なわなかった。

2. CW 抗血清と各種菌の S 抗原との反応

CW 抗原は、通常の 0.8% 寒天ゲル中を拡散しないために、CW 抗血清との間に沈降帯を作らなかった。このため、各菌株の S 抗原との間の反応について調べた。

結果は第 1 表のとおりで、*P. syringae* 3 菌株が最もよく反応した。ただ、S 抗血清の場合に比較して、沈降帯は幅が太くシャープではなかった (第 4 図)。他の *Phytophthora* 属菌も、*P. macrospora* を除き反応し沈降帯を形成した。*Pythium* 属では、*Py. vexans* と *Py. ultimum* が、非常に不鮮明な沈降帯を作り反応したが、他は反応しなかった。又、他属菌も全く反応するものはなかった。

3. 吸収抗血清との反応

Py. vexans 吸収 S 抗血清および *P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収 S 抗血清とも、未吸収 S 抗血清の場合と同じ方法で、各菌株の S 抗原との反応を調べた。

Py. vexans 吸収 S 抗血清では、*Pythium* 属菌との反応が認められなくなったほか、*Phytophthora* 属の *P. porri* および *P. palmivora* との反応が弱くなった。

P. parasitica var. *nicotianae* 吸収 S 抗血清では、吸収前にホモ抗原との間に認められた数本の沈降帯のうち鮮明な 1本の沈降帯を残し、不鮮明な他の沈降帯は消失した (第 5 図)。ただ、この鮮明な沈降帯も吸収を再度くり返すと、順次不鮮明になった。2度吸収をくり返した抗血清は、*P. syringae* 3 菌株とのみ反応し、他菌株との反応は認められなかったが、形成される沈降帯は非常に不鮮明であった。

4. SDS ゲル中での反応

通常の寒天ゲルを用いた場合に形成される沈降帯は、数が多くかつ不鮮明なものが多いことはすでに述べた。そこで、SDS ゲルを用いて反応させたところ、通常 1本のシャープな沈降帯が、1~2日後に形成され、極めてすみやかに反応することがわかった (第 6 図)。

S 抗血清、*Py. vexans* 吸収抗血清および CW 抗血清と、各種菌株の S 抗原との反応を SDS ゲルを用いて調べた。その結果は、第 1 表のとおりで、S および CW 抗血清では通常の寒天ゲルを用いた場合と同じく、*Phytophthora* 属と *Pythium* 属菌に限って反応が認めら

Table 1 Reactions of S-antigens with antisera prepared for *P. syringae* (CMI 131191) soluble (S) and crude cell-wall (CW) antigens in ordinary and SDS agar gel immunodiffusion tests.

Species and isolate no.	Source ^{a)}	Antiserum reacted in ordinary agar gel			Antiserum reacted in SDS agar gel ^{b)}		
		S	CW	Adsorbed ^{c)} S	S	CW	Adsorbed ^{c)} S
<i>Phytophthora syringae</i> 131191	CMI	+	+	+	+	+	+
<i>P. syringae</i> 34002	ATCC	+	+	+	+	+	+
<i>P. syringae</i> 62472	CMI	+	+	+	+	+	+
<i>P. capsici</i> 8386	IFO	+	+	+	+	+	+
<i>P. castaneae</i> 9753	IFO	+	+	+	+	+	+
<i>P. erythroseptica</i> 181716	CMI	+	+	+	+	+	+
<i>P. macrospora</i> 9094	IFO	-	-	-	-	+	-
<i>P. palmivora</i> 9755	IFO	+	+	±	+	+	+
<i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> 4873	IFO	+	+	+	+	+	+
<i>P. porri</i> 30416	IFO	+	+	±	+	+	+
<i>Pythium aphanidermatum</i> 7030	IFO	±	-	-	-	+	-
<i>Py. cucurbitacearum</i> 23	OPU	-	-	-	±	+	-
<i>Py. irregulare</i> 30346	IFO	±	-	-	-	+	-
<i>Py. ultimum</i> 10034	OPU	±	±	-	±	+	-
<i>Py. vexans</i> 7	OPU	±	±	-	±	+	-
<i>Botrytis cinerea</i>	YPPS	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum graminicola</i> c 8-2-1	YPPS	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> 7157	IFO	-	-	-	-	-	-
<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i> 7708	IFO	-	-	-	-	-	-
<i>Nectria haematococca</i> 18280	ATCC	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis</i> sp.	YPPS	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	YPPS	-	-	-	-	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	YPPS	-	-	-	-	-	-
<i>Verticillium dahliae</i>	YPPS	-	-	-	-	-	-
<i>V. tricorpus</i> 71799	CMI	-	-	-	-	-	-

The degree of reactions were graded from + to -, +: clear precipitin lines appeared, -: precipitin lines appeared, but not clear, ±: very faint lines appeared, -: no lines

a) Stock culture of CMI: Commonwealth mycological institute, ATCC: American type culture collection, IFO: Institute for fermentation, Osaka, OPU: Osaka prefectural university (Plant pathological lab.), YPPS: Yokohama plant protection station (Research division)

b) Concentration of SDS was 0.3% (W/V)

c) Adsorbed with S-antigen of *Py. vexans*

れたが、通常ゲルとは多少異なる反応の認められたものもあった。両菌株のS抗原間に形成される沈降帯は互いに連続していた(第7図)。Py. vexans 吸収S抗血清との反応は通常ゲルを用いた場合と同じく、Pythium 属菌とは反応せず Phytophthora 属菌とは鮮明な1本の沈降帯を作り反応した。

通常の寒天ゲル中では反応しないCW抗原に、SDSを

少量加え(最終濃度約0.3%)、CW抗血清とSDSゲル中で反応させると、よく反応し比較的幅の広い沈降帯を作った。そこで、第8図のように、SおよびCW抗血清と、SおよびCW抗原を反応させた。CW抗血清は、SおよびCW抗原とよく反応したが、一方のS抗血清は、S抗原とはよく反応したものの、CW抗原とは非常に不鮮明な沈降を作りわずかに反応した(第8図)。

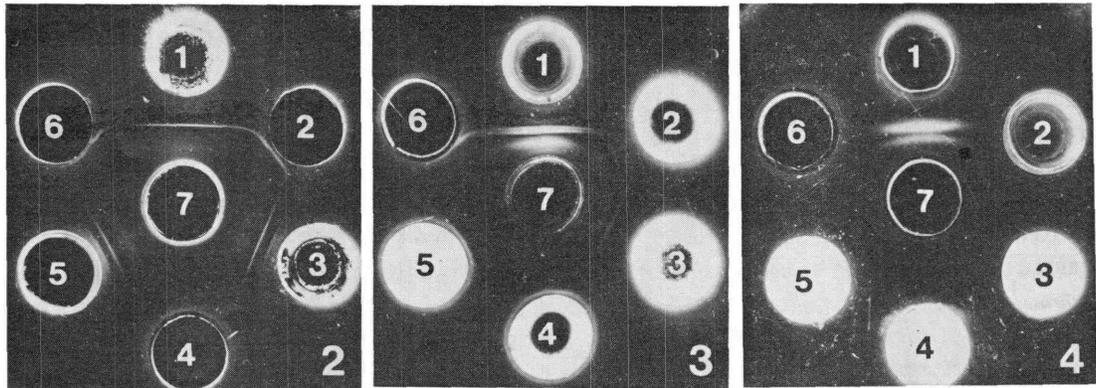


Fig. 2 to 5

Representative gel diffusion tests. The central well (7) contains antiserum prepared for *P. syringae* (CMI 131191). Outer wells contain S-antigens.

Fig. 2 well 1: *P. syringae* CMI 131191, 3: contents of well 1 diluted 2 times with PBS, 5: contents of well 1 diluted 4 times, 2, 4, 6: PBS as control, 7: S-antiserum

Fig. 3 well 1: *P. syringae* CMI 131191, 2: *P. erythro-septica*, 3: *P. parasitica* var. *nicotianae*, 4: *Py. vexans*, 5: *Py. ultimum*, 6: PBS, 7: S-antiserum

Fig. 4 well 1: *P. syringae* CMI 131191, 2: *Sclerotinia sclerotiorum*, 3: *Boytrtis cinerea*, 4: *Nectria haematococca*, 5: *Phomopsis* sp., 6: PBS, 7: CW-antiserum

Fig. 5 well 1: *P. syringae* CMI 131191, 3: *P. syringae* CMI 62472, 5: *P. syringae* ATCC 34002, 2, 4, 6: PBS, 7: Adsorbed S-antiserum with S-antigen of *P. parasitica* var. *nicotianae*

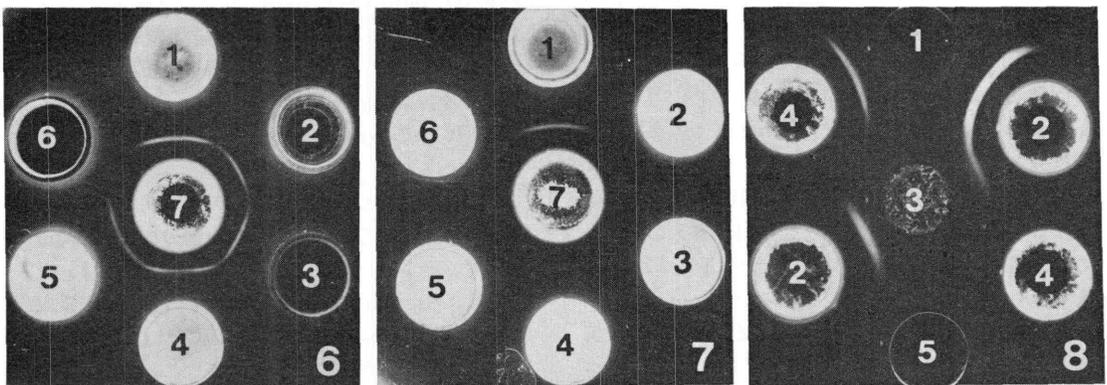
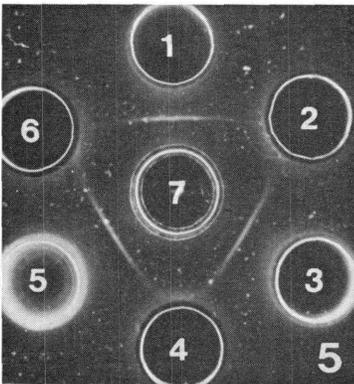


Fig. 6 to 8

Representative SDS-gel diffusion tests.

Fig. 6 well 1: *P. syringae* CMI 131191, 2: *P. syringae* ATCC 34002, 3: *P. syringae* CMI 62402, 4: *P. erythro-septica*, 5: *P. capsici*, 6: PBS, 7: S-antiserum

Fig. 7 well 1: *P. syringae* CMI 131191, 2: *Py. aphanidermatum*, 3: *Py. irregulare*, 4: *Py. vexans*, 5: *Py. cucurbitacearum*, 6: *Py. ultimum*, 7: S-antiserum

Fig. 8 well 1: S-antigen of *P. syringae* CMI 131191, 2: CW-antiserum, 3: CW-antigen of *P. syringae* CMI 131191, 4: S-antiserum, 5: PBS

考 察

今までに報告された *Phytophthora* 属菌の抗血清は、今回の我々の S 分画とよく似た抗原で作製されている。これら抗血清は、寒天ゲル内拡散法を用いた試験で、未吸収抗血清を用いた場合、種特異的な沈降帯が明らかに認められたとの報告はない (BURRELL *et al.*, 1966; MORTON & DUKES, 1967; MERZ, 1969)。ただ、BURRELL ら (1966) は、*P. cactorum* 抗血清を *P. erythroseptica* 抗原で吸収した抗血清は種特異的であったと報告した。又、*P. cinnamomi* の吸収抗血清も、かなり種特異性が高いと報告された (MERZ *et al.*, 1969)。

Pythium 属などを含む他属菌との反応では、*P. parasitica* var. *nicotianae* のリボゾームで作製した抗血清は、*Phytophthora* 属の他種のリボゾーム抗原とは幅広く反応するが、*Pythium* 属菌やその他属菌との反応は認められず、属特異的であったと報告され (箕浦ら, 1977)、又、*P. parasitica* var. *parasitica* 抗血清では、*Py. aphanidermatum* とホモ抗原との間に明らかな差が認められたとの報告がある (MORTON & DUKES, 1967)。

今回の我々の試験でも、*P. syringae* の S 抗血清、CW 抗血清ともに *Pythium* 属菌 S 抗原とも反応が認められたが形成された沈降帯は非常に不鮮明であった (第 1 表)。又、S 抗血清を、*Py. vexans* の S 抗原で吸収すれば *Pythium* 属菌 S 抗原との反応は認められなくなり、属特異的となった。さらに、*P. parasitica* var. *nicotianae* の S 抗原で吸収した S 抗血清は、種特異的と思われる沈降帯を作るようになったが、この沈降帯は非常に不鮮明であり、抗血清の作製法をさらに検討し、力価のより高い抗血清を作製し再検討する必要があると思われる。

今回供試した *Phytophthora* 属菌の内では、*P. macrospora* は、他菌に比べ *P. syringae* との血清学的性質に大きな違いがある様に思われた (第 1 表)。

通常の 0.8% 寒天ゲルを用いると、形成される沈降帯の数が多く複雑になるが (第 2, 3 図)、SDS 寒天ゲルを用いると、通常 1 本の沈降帯しか出現せず (第 6, 7 図)、反応もすみやかとなり、単に反応があるかないかを確認するのは容易となった。*Py. vexans* S 抗原で吸収した S 抗血清と SDS ゲルを用いれば、未同定菌が *Phytophthora* 属かどうかの確認は容易になると思われ、今後さらに多くの菌株について検討したい。

S 抗血清と CW 抗血清は、SDS ゲル中でホモ抗原とは両抗血清ともよく反応したが、S 抗血清は CW 抗原とはほとんど反応しなかった、一方 CW 抗血清は S 抗原ともよく反応した (第 8 図)。又、通常ゲル中でも、S 抗原と両抗血清との反応を比較すると、形成される沈降帯の

形状に違いがあった (第 2 図, 第 4 図)。これらのことは、両抗原の抗原物質の組成の違いを反映しているものと思われる。

今回の試験の目的は、血清学的方法によって *Phytophthora* 属菌、特に *P. syringae* の同定あるいは判別ができるかどうかを検討することにある。寒天ゲル内拡散法では、吸収抗血清を用いても、属までの判別は可能であるものの種の判別は困難であった。*P. syringae* 3 菌株の S 抗原は、S 抗血清に対して、他の *Phytophthora* 属菌と比べ沈降帯の数も多くかつ鮮明であることや、*P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収抗血清に対して、非常に不鮮明ながらも種特異的と思われる沈降帯を形成することから、種特異抗原を含んでいる可能性も考えられる。今後は、他の血清学的方法、すなわち蛍光抗体法 (BURRELL *et al.*, 1966; MERZ, 1969; MALAJCZUK, 1975) で蛍光の強さの差を利用したり、ELISA 法 (CLARK & ADAMS, 1977) により、血清学的な近縁関係を数値化したりして、種の判別あるいは同定が可能かどうかをさらに検討したい。

摘 要

Phytophthora syringae (Klebahn) Klebahn 菌糸の可溶性分画 (S) 抗血清と粗細胞壁分画 (CW) 抗血清を作製し、これら抗血清の特異性を 23 種 25 菌株 (*Phytophthora* 属 8 種 10 菌株, *Pythium* 属 5 種 5 菌株, その他 10 種 10 菌株) の S 抗原を用い寒天ゲル内拡散法にて調査した。

1. S および CW 抗血清とも、*Phytophthora* 属と *Pythium* 属菌の S 抗原に限り反応し沈降帯を作った。*Pythium* 属菌の S 抗原は、非常に不鮮明な沈降帯を作り反応した。*P. syringae* 3 菌株の S 抗原との間に形成された沈降帯が最も鮮明であった。*Phytophthora* 属菌の内 *P. macrospora* の S 抗原はいずれの抗血清とも反応しなかった。

2. S 抗血清と CW 抗血清では、形成された沈降帯の形状に差が認められた。CW 抗血清の場合、沈降帯は幅が太く、シャープではなかった。

3. S 抗血清を *Pythium vexans* の S 抗原で吸収した抗血清は、*Pythium* 属菌の S 抗原とは反応せず *Phytophthora* 属菌の S 抗原とのみ反応した。

4. SDS ゲルを用いると、反応は 1~2 日で完了し速かで、又沈降帯も通常 1 本で鮮明となった。又、CW 抗原は通常ゲル中では CW 抗血清と沈降帯を形成しなかったが、SDS ゲル中では沈降帯を作った。

引用文献

- BURRELL, R.G., C.W. CLAYTON, M.E. GALLEGLY, and V.G. LILLY (1966) Factors affecting the antigenicity of the mycelium of three species of *Phytophthora*. *Phytopathology* **56**: 422-426.
- CLARK, M.F., and A.N. ADAMS (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* **34**: 475-483.
- EDNEY, K.L. (1978) The infection of apples by *Phytophthora syringae*. *Ann. appl. Biol.* **88**: 31-36.
- GARNSEY, S.M., D. GONSALVES, and D.E. PURCIFULL (1978) Rapid diagnosis of citrus tristeza virus infection by sodium dodecyl sulfate immunodiffusion procedures. *Phytopathology* **68**: 88-95.
- GILL, H.S., and G.A. ZENTMYER (1978) Identification of *Phytophthora* species by disc electrophoresis. *Phytopathology* **68**: 163-167.
- HARRIS, D.C. (1979) The occurrence of *Phytophthora syringae* in fallen apple leaves. *Ann. appl. Biol.* **91**: 309-312.
- 桂 琦一 (1971) 植物の疫病, 誠文堂新光社, 東京, 128 pp.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MALAJCZUK, N., A.J. MCCOMB, and C.A. PARKER (1975) An immunofluorescence technique for detecting *Phytophthora cinnamomi* RANDB. *Aust. J. Bot.* **23**: 289-309.
- 松本高郎・正子朔・吉川正明 (1979) 菌体可溶性蛋白の二次元電気泳動法の疫病菌分類への適用. *日植病報* **45**: 110 (講要).
- MERZ, W.G., R.G. BURRELL, and M.E. GALLEGLY (1969) A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. *Phytopathology* **59**: 367-370.
- 箕浦勤・正子朔・吉川正明 (1977) 菌体リボゾームの抗原-抗体反応およびそのサブユニット蛋白の電気泳動パターンによる *Phytophthora* の分類の試み. *日植病報* **43**: 334 (講要).
- MORTON, D.J., and P.D. DUKES (1967) Serological differentiation of *Pythium aphanidermatum* from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Ph. parasitica*. *Nature* **587**: 923.
- NEWHOOK, F.J., G.M. WATERHOUSE, and D.J. STAMPS (1978) Tabular key to the species of *Phytophthora* DE BARY. *Mycological Papers* No. 143, 20pp., Commonw. Mycol. Inst., Kew, England.
- WATERHOUSE, G.M., and J.M. WATERSTON (1964) *Phytophthora syringae*. C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 32.