

Phytophthora 属菌の血清学的検出法および 同定法に関する研究

II. *Phytophthora syringae* の螢光抗体法による検出*

西 尾 健・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* II. Use of Fluorescent Antibodies for Detection of *Phytophthora syringae*. Takeshi NISHIO, Etsuo KIMISHIMA, Mutsuo TAKAYAMA, and Tetsuo SUETSUGU (Yokohama Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **19**: 55-62 (1983).

Abstract: Ten isolates (7 species) of *Phytophthora*, 7 isolates (7 species) of *Pythium* and 10 isolates (10 species) of other genera were tested serologically by means of the indirect immunofluorescence method. Soluble (S) and crude cell-wall (CW) antisera prepared for antigens from *Phytophthora syringae* were used. Each antiserum was adsorbed with S or CW antigens of *P. parasitica* var. *nicotianae* or *Pythium vexans*. Genus-specific staining was not observed in the tests with a nonadsorbed CW antiserum, but CW antiserum adsorbed with CW antigen of *Pythium vexans* was useful to distinguish *Phytophthora* spp. from 7 *Pythium* spp. and other isolates except *Sclerotinia sclerotiorum*. Nonadsorbed S antiserum restrictedly reacted with hyphae of the species of *Phytophthora*. Those results showed that S antiserum was more useful than CW antiserum for differentiation of the genus *Phytophthora* from 27 isolates by an immunofluorescence tests. It was necessary to dilute the γ -globulin solution up to appropriate concentration. The most intensive fluorescence were observed in preparations of 3 isolates of *P. syringae*. Only *P. macrospora* hyphae showed no staining among the species of *Phytophthora*. Intense fluorescence was observed in the young growing hyphal tips compared with older hyphae. *P. syringae* hyphae could be detected in the inoculated apple fruit tissue and seedling tissue by the immunofluorescent staining method.

ま え が き

植物検疫における病原菌の検出・同定に糸状菌抗血清の利用を検討するため、前報で西尾ら（1983）は我国未発生で果樹類の疫病菌である *Phytophthora syringae* (Klebahn) Klebahn の抗血清を作製し、ゲル内拡散法によりその性質を検討した。その結果、吸収抗血清を用いた場合、属までの判別は可能であるが、種の推定は困難であったと報告した。

本試験では、ゲル内拡散法よりさらに鋭敏な反応が期待される螢光抗体法を用い、血清学的な検討を行なった。*Phytophthora* 属菌の螢光抗体法による血清学的研究は、MALAJCZUK ら（1975）によって詳細に行なわれた。また、MERZ ら（1969）は螢光抗体法により *Phyto-*

phthora 属の数種間で、形態と血清学的比較を行なった。また、MACDONALD & DUNIWAY（1979）は、土壤中で *P. cinnamomi* の被のう胞子の状態を調査する手段として螢光抗体法を効果的に用いた。

本法には直接法と間接法がある。細菌を用いた試験ではあるが、間接法でよい結果が得られたという報告（SLACK *et al.*, 1978）があるので、今回の試験では間接法を用いた。本試験では、供試した *P. syringae* の抗血清の特異性を検討するとともに、罹病組織からの検出における螢光抗体法の利用を検討したのでここに報告する。

本試験に際し、有益な御助言を賜った京都府立大学正子朔教授並びに貴重な菌株を分譲下さった大阪府立大学一谷多喜郎博士、宇都宮大学寺中理明教授及び新潟大学富永時任教授、また終始御指導を賜った元当所病菌課松濤美文博士及び当所病菌課小林敏郎課長に厚くお礼申し上げる。

* 本報告の概要は 1981 年度日本植物病理学会夏季関東部会において発表した。

材料及び方法

1. 供試菌株

供試菌株は西尾ら (1983) が用いたものと、それ以外に宇都宮大学より *Aphanomyces euteichs*, 新潟大学より *Pythium debaryanum* の分譲を受け用いた。また, *P. syringae*, *P. erythroseptia* 及び *Nectria haematococca* は Commonwealth Mycological Institute (CMI) 及び American Type Culture Collection (ATCC) より農林水産大臣の特別許可を得て導入したものである。(許可番号: 54 横植第 1430 号, 1431 号及び 1397 号)。Phytophthora 属 8 種 10 菌株, Pythium 属 7 種 7 菌株, その他 10 種 10 菌株の計 25 種 27 菌株を使用した。

2. γ-グロブリンの純化

抗血清は西尾ら (1983) が作成した *P. syringae* の可溶性分画抗血清 (S 抗血清) 及び粗細胞壁分画抗血清 (CW 抗血清) を用いた。

γ-グロブリンの純化は CLARK and ADAMS (1977) の方法に準じて行なった。抗血清を蒸留水で希釈 (1:9v/v) 後, 飽和硫酸液 (pH 7.0) を等量加え室温で 30 分以上静置した。それを遠心 (9,000×G, 20 分) し, 沈殿を 2 倍希釈したリン酸緩衝生理食塩水 (1/2 PBS) に溶解し, さらに 1/2 PBS 中で透析 (3 回以上) を行ない DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー (DE52, Whatman) により分画した。これらの操作はすべて 4°C 以下で行ない, 純化 γ-グロブリンは 1mg/ml 液とした後, ガラス小試験管に分割し凍結保存 (-20°C) した。

吸収抗血清からの γ-グロブリン純化は硫酸塩析法 (KAWAMURA, 1969) によった。タンパク濃度は UV 法により測定した。

3. 抗血清の吸収

S 抗血清及び CW 抗血清を *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* 及び *Pythium vexans* の可溶性分画 (S 分画) と粗細胞壁分画 (CW 分画) を用いて吸収した。

S 分画及び CW 分画を得る方法は西尾ら (1983) が行なった抗原の調整法に準じた。S 抗血清には S 分画を, CW 抗血清には CW 分画を加え 37°C 2 時間静置後, 4°C で 1 晩静置した。この液を遠心 (9,000×G, 15 分) し上清を得, これを吸収抗血清とした。S 抗血清の場合は再度同様の吸収操作を行なった。CW 抗血清の場合は 1 度目の吸収で得られた上清から γ-グロブリン液を得, これをさらに CW 分画を用い再吸収した。

4. 間接蛍光抗体法の手順

染色方法は MALAJCZUK ら (1975) に準じ, 操作手順は第 1 図のとおりである。

Hyphae of tested isolates.

- added rabbit γ-globulin and then incubated for 30 min. at 37°C in a humidity chamber.
- washed with PBS.
- added anti-rabbit IgG conjugate FITC goat IgG and then incubated for 30 min. at 37°C in a humidity chamber.
- washed with PBS.

Observation with a ultraviolet microscope.

Fig. 1 The indirect method of an immunofluorescent stain.

供試菌は西尾ら (1983) の試験と同様に, 7~14 日間液体培養した菌糸に少量の PBS を加えワーリングブレンダーで破砕し, 菌糸浮遊液をスライドガラス上で風乾固定した。これに, S 又は CW 抗血清あるいは各々の吸収抗血清から得た γ-グロブリン液を滴下し, 湿潤条件下で 37°C, 30 分間静置した。PBS を用い静かに洗浄 (約 5 分間) し, 蛍光色素標識抗ウサギ IgG-ヤギ IgG 液 (FITC ラベル抗ウサギ IgG-ヤギ IgG, 医学生物学研究所) を滴下し, 湿潤条件下で 37°C, 30 分間静置した。PBS で洗浄し風乾後, 落射蛍光顕微鏡 (Nikon XF-EF) B 励起 (励起フィルター: IF 410~485, 吸収フィルター: 515 W) で観察した。

5. 罹病組織からの検出

P. syringae (CMI 131191) を供試菌とし, ライラックの葉柄及びリンゴ果実及び実生苗に接種し, 湿潤条件下で 25°C, 5~7 日間放置した。

凍結ミクロトームを用い罹病部の切片を作成し, スライドガラス上に風乾固定した。以後の蛍光染色は第 1 図に示すとおりに行ない, 蛍光顕微鏡で観察した。

結 果

1. CW 抗血清を用いた試験

FITC ラベル抗ウサギ IgG-ヤギ IgG 液の最適濃度を定めるため予備試験を行なった。その結果, タンパク濃度を 0.5mg/ml に希釈した区で *P. syringae* (CMI 131191) の菌糸に対し強い反応が見られたので, 以後の試験はこの条件で使用した。

P. syringae (CMI 131191), *P. parasitica* var. *nicotianae* (IFO 4873), *Py. vexans* (7), *Py. ultimum* (10034) 及び *Sclerotinia sclerotiorum* の 5 菌株を反応に供試した。CW 抗血清より純化した γ-グロブリン濃度を 0.5mg/ml に調整したもの (未吸収区) の他に, *P. parasitica* var. *nicotianae* 及び *Py. vexans* の CW 分画で 2 回吸収

Table 1. Fluorescent antibody tests with nonadsorbed and adsorbed rabbit antiserum prepared for *P. syringae* (CMI 131191) cell wall fraction

Species and isolate No.	^a Nonadsorbed	Adsorbed with <i>P. para.</i> *				Adsorbed with <i>Py. vex.</i> **			
		Dilution				Dilution			
		^b None	× 20	× 50	× 100	^c None	× 20	× 50	× 100
<i>P. syringae</i> 131191	+++	+++	++	+	—	+++	+++	+++	+
<i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> 4873	++	++	+	—	—	+++	++	++	+
<i>Py. ultimum</i> 10034	++	+	—	—	—	+	—	—	—
<i>Py. vexans</i> 7	++	++	—	—	—	++	—	—	—
<i>S. sclerotiorum</i>	++	++	—	—	—	++	(+)	(+)	—

The degree of fluorescence was graded from —: no fluorescence to +++: extreme brilliant yellow-green fluorescence.

* Adsorbed with cell wall fraction of *P. parasitica* var. *nicotianae* (4873)

** Adsorbed with cell wall fraction of *Py. vexans* (7)

a The protein content of the γ -globulin solution was 0.5 mg/ml.

b Absorbance at 280 nm was 1.78.

c Absorbance at 280 nm was 2.70.

() A partial fluorescent stain was observed.

を行なった, 吸収抗血清からの γ -グロブリン液 (*P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収区及び *Py. vexans* 吸収区) も用いた。これら両吸収区の 280 nm における吸光度は, *P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収区 $A_{280}=1.78$, *Py. vexans* 吸収区 $A_{280}=2.70$ であった。これらの γ -グロブリン液を 20 倍, 50 倍, 100 倍に PBS を使用し希釈して試験を行なった。

その結果 (Table 1), 未吸収区では供試 5 菌株全てに反応が見られた。*P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収区では, 20 倍に希釈した場合 *Phytophthora* 属 2 菌株に反応したが, *P. syringae* の反応が弱くなった。次に *Py.*

vexans 吸収区では, 無希釈では供試 5 菌株に反応したが, 20 倍及び 50 倍に希釈した場合 *Pythium* 属 2 菌株の反応がなくなった。ただし, *S. sclerotiorum* の菌糸では部分的に反応する時もあった。

反応程度は 4 段階 (—~++) に区分し, それぞれの反応例は第 2 図に示した。

2. S 抗血清を用いた試験

反応に供した菌は, CW 抗血清の場合と同じであった。未吸収区は希釈により γ -グロブリン濃度を変えて, 0.5 mg/ml 又は 0.025 mg/ml とし用いた。また, *P.*

Table 2. Fluorescent antibody tests with nonadsorbed and adsorbed rabbit antiserum prepared for *P. syringae* (CMI 131191) soluble fraction

Species and isolate No.	Nonadsorbed		Adsorbed with <i>P. para.</i> *		Adsorbed with <i>Py. vex.</i> **		
	^a 0.5	0.025	0.2	0.02	0.4	0.04	(mg/ml)
<i>P. syringae</i> 131191	+++	+++	+++	+	+++	++	
<i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> 4873	+++	++	++	—	++	+	
<i>Py. ultimum</i> 10034	++	—	—	—	+	—	
<i>Py. vexans</i> 7	+	—	—	—	—	—	
<i>S. sclerotiorum</i>	+	—	—	—	+	—	

The degree of fluorescence was graded from —: no fluorescence to +++: extreme brilliant yellow-green fluorescence.

* Adsorbed with soluble fraction of *P. parasitica* var. *nicotianae* (4873).

** Adsorbed with soluble fraction of *Py. vexans* (7).

a The protein content of the γ -globulin solution.

Table 3. Reactions of fungi to staining with fluorescent antisera prepared for *P. syringae* (CMI 131191) cell wall and soluble fractions

Species and isolate No.			Cell wall (CW) antiserum		Soluble (S) antiserum	
			Nonadsorbed	Adsorbed with	Nonadsorbed	Adsorbed with
			(a)	<i>P. para.</i> (b) <i>Py. vex.</i> (c)	(d)	<i>P. para.</i> (e) <i>Py. vex.</i> (f)
<i>P. syringae</i>						
	CMI	131191	+++	+++	+++	++
	ATCC	34002	+++	+++	+++	++
	CMI	62472	+++	+++	+++	++
<i>P. capsici</i>						
	IFO	8386	++	+	++	++
<i>P. castaneae</i>						
	IFO	9753	++	++	+	++
<i>P. erythroseptica</i>						
	CMI	181716	++	++	+++	++
<i>P. macrospora</i>						
	IFO	9049	+	—	—	—
<i>P. palmivora</i>						
	IFO	9755	++	++	++	++
<i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>						
	IFO	4873	++	+	++	++
<i>P. porri</i>						
	IFO	30416	++	++	++	++
<i>Py. aphanidermatum</i>						
	IFO	7030	++	+	—	—
<i>Py. cucurbitacearum</i>						
		23	+	—	—	—
<i>Py. debaryanum</i>						
		7659	*	*	*	—
<i>Py. irregulare</i>						
	IFO	30346	+	+	—	—
<i>Py. porphyrae</i>						
	IFO	30347	*	*	*	—
<i>Py. ultimum</i>						
		10034	+	—	—	—
<i>Py. vexans</i>						
		7	++	+	—	—
<i>Aphanomyces euteiches</i>			*	*	—	—
<i>Botrytis cinerea</i>			—	—	—	—
<i>Colletotrichum graminicola</i>						
	C	8-2-1	+	—	—	—
<i>Fusarium oxysporum</i>						
	IFO	7157	—	—	—	—
<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i>						
	IFO	7708	—	—	—	—
<i>Nectria haematococca</i>						
	ATCC	18280	—	—	—	(+)
<i>Phomopsis</i> sp.			—	—	—	—
<i>Rhizoctonia solani</i>			—	—	—	—
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			++	+	+	—
<i>Verticillium dahliae</i>			—	—	—	—

The degree of fluorescence was graded from —: no fluorescence to +++: extreme brilliant yellow-green fluorescence.

(a) The protein content of the γ -globulin solution was 0.5 mg/ml.

(b) Adsorbed with cell wall fraction of *P. parasitica* var. *nicotianae* and diluted 20 times with PBS. $A_{280}=0.089$

(c) Adsorbed with cell wall fraction of *Py. vexans* and diluted 20 times with PBS. $A_{280}=0.135$

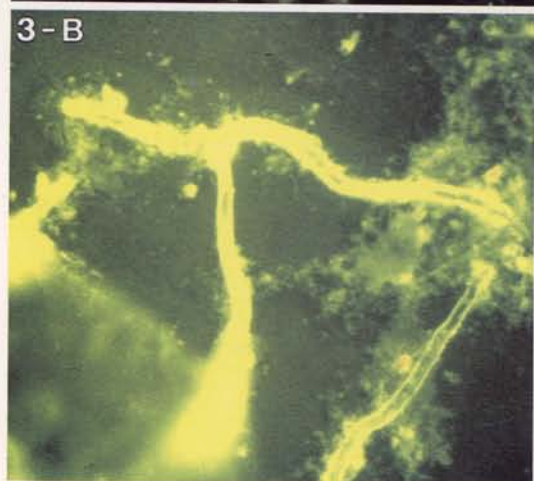
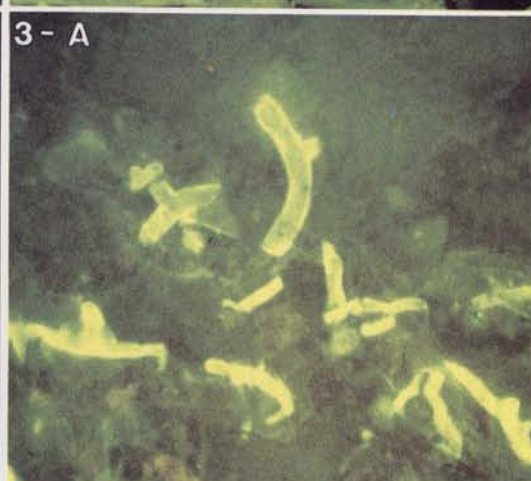
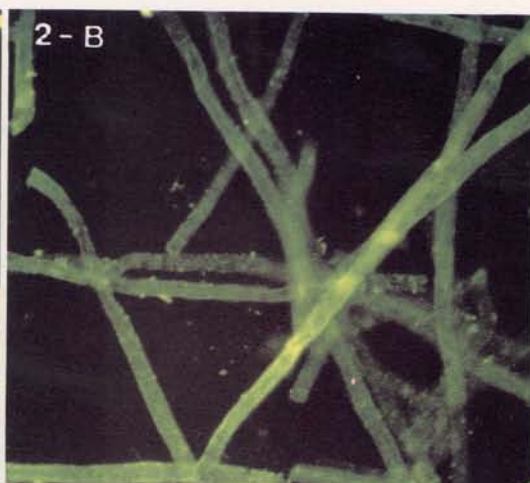
(d) The protein content of the γ -globulin solution was 0.025 mg/ml.

(e) The protein content of the γ -globulin solution was 0.2 mg/ml.

(f) The protein content of the γ -globulin solution was 0.04 mg/ml.

* Not tested.

() A partial fluorescent stain was observed.



Explanation of Plate

Fig. 2 The degree of fluorescence.

2-A +++: Extreme brilliant yellow-green fluorescence of *P. syringae* treated with CW antiserum adsorbed with *P. parasitica* var. *nicotianae*.

2-B ++: Green fluorescence of *Py. vexans* treated with nonadsorbed CW antiserum.

2-C +: Poor fluorescence of *Py. vexans* treated with CW antiserum adsorbed with *P. parasitica* var. *nicotianae*.

Fig. 3 Immunofluorescent staining of an apple tissue infected with *P. syringae*.

3-A A section of an infected seedling tissue.

3-B Hyphae around the fruit tissue with the autofluorescence of the host cell wall.

parasitica var. *nicotianae* 吸収及び *Py. vexans* 吸収区も各々 PBS で希釈して用いた。

その結果 (Table 2), 未吸収区の γ -グロブリン濃度が 0.5 mg/ml の区では供試した 5 菌株全てに反応したが, 20 倍希釈区 (0.025 mg/ml) では *Phytophthora* 属 2 菌株にのみ反応が見られた。*P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収区では γ -グロブリン濃度 0.04 mg/ml の区でやはり, *Phytophthora* 属 2 菌株にのみ反応がみられた。*Phytophthora* 属 2 菌株の間では, *P. syringae* の菌糸の方が, どの区においても強い蛍光反応が見られた。

3. CW 抗血清と S 抗血清の比較

CW 抗血清及び S 抗血清の特異性を調べるため, 25 種 27 菌株に対し, 前期の試験結果から *P. syringae* の菌株が最も強い反応 (反応程度: 卅) を呈すことを第 1 条件に, またその他の菌はできる限り反応しないことを第 2 条件にして, 次に示す各抗血清区を選び試験を行ない比較した。CW 抗血清の未吸収区 (γ -グロブリン濃度 0.5 mg/ml), *P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収区 ($A_{280} = 1.78$) を 20 倍希釈した区及び *Py. vexans* 吸収区 ($A_{280} = 2.70$) を 20 倍希釈した区。また S 抗血清の未吸収区 (γ -グロブリン濃度 0.025 mg/ml), *P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収区 (γ -グロブリン濃度 0.2 mg/ml), 及び *Py. vexans* 吸収区 (γ -グロブリン濃度 0.04 mg/ml)。

その結果 (Table 3), CW 抗血清の未吸収区では *Pythium* 属 5 菌株, *S. sclerotiorum* などに反応が見られたが, *Py. vexans* 吸収区では *Pythium* 属 5 菌株の反応は見られなくなった。*P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収区では *Pythium* 属 3 菌株, *S. sclerotiorum* に反応が見られた。S 抗血清の未吸収区で *Phytophthora* 属 9 菌株にのみ反応が見られた。*P. parasitica* var. *nicotianae* 吸収区では *Nectria haematococca* にかすかな反応が見られた以外は未吸収区とほぼ同じ反応を示した。この *N. haematococca* の反応は菌糸の切口部が特に反応し, 菌糸全体が反応する *P. syringae* の反応とは大きく違っていた。*Py. vexans* 吸収区では *Phytophthora* 属 9 菌株にのみ反応が見られたが, *P. syringae* の反応が他の区での反応より弱くなった。

CW 抗血清及び S 抗血清の全ての区で *P. syringae* 3 菌株の反応が他の菌株より顕著な反応が見られた。また, *P. macrospora* は試験を行なった 5 つの区でまったく反応が見られなかった。

4. 罹病組織からの検出

接種したライラックの葉柄及びリンゴの実生苗は凍結切片を作成し染色したが, リンゴ果実は PBS を加えワーリングブレンダーで破碎し, 浮遊液を風乾固定し染色し

た。CW 及び S 抗血清 (両方とも未吸収区) の γ -グロブリン濃度は 0.5 mg/ml に調整し用いた。

その結果 (Fig. 3), リンゴ実生の幼根部からの試験では, 供試菌の菌糸片が顕著な蛍光を発し観察された。リンゴ実生の双葉の試験でも同じく供試菌が顕著に観察され, 宿主の葉緑体は赤色に, 供試菌は黄緑色に反応していた。ライラック葉柄での試験では宿主の自己蛍光反応が強く, 供試菌は観察できなかった。自己蛍光は特に維管束部及び皮層部で顕著だった。リンゴ果実の試験では宿主細胞上に供試菌が観察されたが, 宿主細胞壁の自己蛍光反応も見られた。

考 察

以上の様に, 間接蛍光抗体法では, S 抗血清を用いた場合には未吸収区でも *Phytophthora* 属に特異的な反応が見られた。しかし, γ -グロブリン濃度が高いと特異性は低くなることから, 反応最適濃度があるものと思われた。一方, CW 抗血清では, 未吸収区では供試 *Pythium* 属の全菌株と, その他属菌との間でも反応が認められ, *Py. vexans* 吸収区で始めて *Pythium* 属菌との反応は認められなくなったが, *S. sclerotiorum* には依然として弱い陽性反応が認められた。このことから, S 抗血清の方がより特異性が高いものと思われた。MALAJCZUK ら (1975) は, *P. cinnamomi* を用いた試験で, CW 抗血清の方が S 抗血清より強く反応し, 菌糸はより鮮明な蛍光を呈しその反応部位にも差があったと報告したが, 我々の観察では, *P. syringae* (CMI 131191) 菌糸で, CW 抗血清と S 抗血清の反応において, 反応部位及び反応の強さに大きな差は認められなかった。

Phytophthora 属菌では, 両抗血清とも供試した菌株のうち, *P. macrospora* を除く他菌株とはよく反応し, 顕著な種特異的反応は見られなかった。これらの結果は, 西尾ら (1983) の寒天ゲル内拡散法による試験結果とはほぼ同様であり, 間接蛍光抗体法によって菌糸が蛍光を発するか否かを判定基準として, 種の同定を行なうことは困難であった。しかし, 供試菌が *Phytophthora* 属菌かどうかの判別は容易だった。WHITE (1976) は *Pythium graminicola* を用いた試験で, 種特異的反応は得られなかったが, 蛍光の強さによって *Py. graminicola* を判別できたと報告しているが, 我々の試験においても *P. syringae* 3 菌株が最も強い蛍光を発し, 他の *Phytophthora* 属菌との間に差が認められた。このことから, 菌糸の培養条件などにもよると思うが, 供試菌糸の蛍光の強さを判断基準として, ある程度の種の判定は可能ではないかと思われた。

BURRELL ら (1966) や MALAJCZUK ら (1975) は蛍光

抗体法で菌糸を観察した場合、菌糸の先端部や若い菌糸に特に強い反応が認められることから、菌糸の先端部付近に抗原物質が特に多く存在するものと考えた。今回の試験でも、特に CW 抗血清を用いた場合、同様に菌糸先端部付近が特に強く反応した。

罹病組織からの検出試験では、自己蛍光反応の弱い部位での検出に蛍光抗体法は有効と思われたが、ライラック葉柄のように自己蛍光反応の強い場合には、検出は困難と思われた。MALAJCZUK ら (1975) は植物組織と土壌中からの検出試験で、非特異蛍光を抑制するためローダミン-グリセリン混合液で再染色を行なっている。著者らもこの様な処理を検討し、植物組織や土壌中からの *Phytophthora* 属菌の検出に本抗血清が広く応用できるようにさらに検討したい。

摘 要

前に作成した *P. syringae* の可溶性分画 (S) 抗血清及び粗細胞壁分画 (CW) 抗血清よりそれぞれ γ -グロブリンを純化し、*Phytophthora* 属菌 10 菌株、*Pythium* 属菌 7 菌株、その他の属菌 10 菌株を供試し、間接蛍光抗体法によりこれらの抗血清の特異性を調べた。また、血清学的な特異性を高める目的で、*P. parasitica* var. *nicotianae* 又は *Pythium vexans* の S 又は CW 抗原を用いて吸収した吸収抗血清を作成し用いた。これらの抗血清を用いた間接蛍光抗体法により、罹病植物組織からの *P. syringae* の検出を試みた。

1. CW 抗血清では、吸収抗血清を用いた場合でも *Pythium* 属やその他属菌との間に反応が認められ、特異性は低かった。

2. S 抗血清では、純化 γ -グロブリンを最適濃度に希釈し用いた場合、未吸収抗血清を用いても、*Phytophthora* 属菌のみが反応した。

3. CW, S 抗血清のどちらを用いた場合でも、*P. syringae* 菌糸が最もよく蛍光染色され強く光った。また、蛍光染色された菌糸を観察したところ、細胞壁や細胞質など菌糸部位による蛍光の強さは両抗血清の間に大きな差は認められなかった。また菌糸の先端部付近は古い菌糸に比べ特に強く反応しているのが観察された。

4. リングの罹病組織中から、間接蛍光抗体法によって、*P. syringae* の菌糸片が検出できた。しかし、自家蛍光の強い試料を用いた場合、検出は困難であった。

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.
- KAWAMURA, A. (1969) Fluorescent antibody techniques and their applications. University of Tokyo Press. Tokyo. 203 pp.
- MACDONALD, J.D., and J.M. DUNIWAY (1979) Use of fluorescent antibodies to study the survival of *Phytophthora megasperma* and *P. cinnamomi* zoospores in soil. *Phytopathology* **69**: 436-441.
- MALAJCZUK, N., A.J. MCCOMB, and C.A. PARKER, (1975) An immunofluorescence technique for detecting *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Aust. J. Bot.* **23**: 289-309.
- MERZ, W.G., R.G. BURRELL, and M.E. GALLEGLY (1969) A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. *Phytopathology* **59**: 367-370.
- 西尾 健・川口嘉久・君島悦夫・高山睦雄・末次哲雄 (1983) *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* kleb. 抗血清の作成とその寒天ゲル内拡散法による反応。植防研報. **19**: 47-53.
- SLACK, S.A., A. KELMAN, and J.B. PERRY (1978) Comparison of three serodiagnostic assays for detection of *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology* **69**: 186-189.
- WHITE, D.G. (1976) The preparation and use of a fluorescent antibody reagent for the detection of *Pythium graminicola*. *Phytopathology* **66**: 523-525.