

Dot Immunobinding Assay (DIBA) および Immunoenzymatic Staining Method (IESM)

による疫病菌の検出*

君 島 悦 夫・小 林 慶 範

横浜植物防疫所

Use of Dot Immunobinding Assay (DIBA) and Immunoenzymatic Staining Method (IESM) for Rapid Detection of *Phytophthora* spp.. Etsuo KIMISHIMA and Yoshinori KOBAYASHI (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shinyamashita, Naka-ku, Yokohama 231, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 26: 7-13 (1990)

Abstract: The application of dot immunobinding assay (DIBA) and immunoenzymatic staining method (IESM) for detecting *Phytophthora* spp. was described. Antigens from 43 isolates, including 15 isolates of *Phytophthora* spp. were tested for ELISA, DIBA and IESM with two antisera, obtained previously against *Phytophthora erythroseptica* and *P. capsici* (KIMISHIMA *et al.*, 1989). Soluble mycelial antigens were used in ELISA and DIBA. Intact mycelia were used in IESM. Genus specific-reactivities were shown in ELISA. Blue spots were formed on a nitrocellulose membrane with all isolates of *Phytophthora* spp. and a few isolates of other genus in DIBA. Hyphae of most of all isolates used were stained in IESM. DIBA proved to be applicable to discriminate between healthy and infected plants. Stained hyphae of *Phytophthora* spp. were observed on the leaf and fruit of the host plant using a dissecting microscope by IESM. ELISA and DIBA positive materials were detectable 3-4 days after inoculation before or at the same time macroscopic symptoms appeared.

Key words: *Phytophthora*, serological detection, DIBA, immunoenzymatic staining method

ま え が き

著者らは植物検疫の検査現場に応用可能な迅速かつ簡便な糸状菌の検出法を開発する目的で疫病菌の抗血清を作製し、血清学的検出法の試験を行っている（西尾ら, 1983a; 西尾ら, 1983b; 君島ら, 1984; 君島ら, 1989）。

ELISA および蛍光抗体法による疫病菌の検出についてはすでに報告（西尾ら, 1983b; 君島ら, 1984; 君島ら, 1988）したが、これらの方法は煩雑であったり、蛍光顕微鏡による観察が必要であった。近年、ELISA の反応原理に従ってその長所を生かしながら、かつ、その欠点を補う簡便で実用的な抗原タンパク検出法として開発された Dot immunobinding Assay (DIBA) は、植物ウイルスの実用的検出法として利用されている（吉川ら, 1986; 佐古, 1989; SOMOWIYARJO *et al.*, 1989）。また、GERIK ら（1987）は酵素反応を利用した

Immunoenzymatic Staining Method (IESM) により生物顕微鏡を用い、ワタの根に感染している *Verticillium* 菌の検出について報告している。本試験ではこれらの方法が、疫病菌の迅速で簡便な検出法として利用できないか検討したのでここに報告する。

試験に際し、貴重な菌株を分譲下さった元京都府立大学正子朔教授、元新潟大学富永時任教授、大阪府立大学一谷多喜郎助教授、東日本学園大学国永史郎講師、北海道農業試験場松本直幸博士に対し、ここに深く感謝の意を表する。

材料および方法

1. 供試菌株

Phytophthora 属菌 13 種 20 菌株, *Pythium* 属菌 16 種 18 菌株, その他の属 10 種 10 菌株を供試した。その来歴は Table 1 および 2 のとおりで, Commonwealth Mycological Institute (CMI), 京都府立大学, 大阪府立大学, 新潟大学, 北海道農業試験場, 財団法人発酵研究所 (IFO) および当所病菌課で保存中のものを使用

* 本報告の概要は平成元年度日本植物病理学会大会において発表した。

した。海外からの菌株の導入に際しては、農林水産大臣の許可を得た**。

2. 供試抗血清および抗原の調整

抗血清は *Phytophthora erythroseptica* (CMI 181716) および *P. capsici* (IFO 8386) を抗原として作製したもの(君島ら, 1989)を用いた。抗原の調整は西尾ら(1983a)に準じ、供試菌株の凍結菌糸を得、これに少量の0.02 M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加えて、ワーリングブレンダーで粉砕した後、10,000×g, 10分間遠心し、この上清を280 nmの吸光度が0.6になるように調整して、DIBAとELISAの試料とした。また、この沈澱を再度PBSに懸濁し、菌糸浮遊液をIESMの試料とした。

3. DIBA および IESM の手順

DIBAに使用した器具、試薬類および操作手順は日比(1984)に準じ、IESMの試薬類および染色手順はGERIKら(1987)に準じた。日比(1984)およびGERIKら(1987)は抗ウサギIgG-ヤギIgG液を用いる間接法を行っているが、本試験では直接法を用いた。

DIBA

ニトロセルロースシート(Millipore社製, HAHY, 孔径0.45 μm)を0.02 M トリス緩衝液(TBS=トリス・HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5)に15分間浸した後、ろ紙上で乾燥させた。このシート上にマイクロビペットを用い試料液を滴下し、乾燥後シートをブロック液(2% ポリビニルピロリドン:PVP, MW. 40,000-2% 仔牛血清アルブミン:BSA-0.05% Tween 20-TBS)に30分間浸した。次にアルカリ性リン酸分解酵素結合γ-グロブリン液(原液をTTBSPBで3,000倍に希釈した液)中で1時間反応させた後、シートを取り出し蒸留水で軽くすすぎ、TTBSPB(2% PVP-0.2% BSA-0.05% Tween 20-TBS)中で20分間洗浄した。この間1回TTBSPBを交換し、次にシートをAP 9.5緩衝液(0.1 M トリス・HCl-0.1 M NaCl-5 mM MgCl₂, pH 9.5)中に移し、20分間洗浄した。この間1回緩衝液を交換した。最後にシート上に基質・発色液を処理し、湿室、遮光状態で静置した。基質・発色液は次の手順で調整した。nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma社製) 1 mgをAP 9.5緩衝液3 mlに溶解した液と、5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate-P-toluidine salt (BCIP, Sigma社製) 0.5 mgを10 μlの

N, N-dimethylformamideに溶解した液を冷蔵保存(約5℃)しておき、使用直前に両液を混合して基質・発色液とした。基質・発色液に30~60分間反応させた後、シートを停止液(10 mM トリス・HCl-5 mM ethylenediamine tetraacetate: EDTA, pH 7.5)に浸し反応を止め、肉眼で青紫色のスポットの有無を検定し結果判定を行った。なお、これらの操作は全て室温(約25℃)で行った。

IESM

菌糸浮遊液をスライドガラス上で風乾固定し、菌糸上にアルカリ性リン酸分解酵素結合γ-グロブリン液(原液をPBS-Tで1,000倍に希釈した液)を滴下し、37℃ 湿潤条件下で、1時間静置した。PBS-T(PBS-0.05% Tween 20)を用いて静かに洗浄(緩衝液を5分ごとに3回交換)し、基質・染色液を滴下し、20℃ 湿室・遮光状態で、1~2時間静置した。基質・染色液は次の手順で調整した。ナフトール-AS-フォスフェート(naphthol-AS-phosphate, Sigma社製) 2.5 gを2.5 mlのN, N-ジメチルフォルムアミド(N, N-dimethylformamide)に溶解し、0.2 M トリス緩衝液(pH 9.1) 500 mlに全量加え、4℃ 暗黒状態で保存した。この溶液にファーストブルー-BBソルト(Fast blue BB salt, Sigma社製)を使用直前に溶解し(1 mg/ml)基質・染色液とした。反応終了後は蒸留水で軽くすすぎ、生物顕微鏡下で菌糸の染色程度を観察した。

4. 罹病植物からの検出

Table 2に示した *Phytophthora* 属菌を用い罹病植物を得た。果実・葉・葉柄への接種は湿潤条件に保ったベトリ皿内で行い、20~25℃で5~7日間放置し、え死症状を呈したものを供試した。根への接種は含菌寒天を混合した汚染土壌に発芽後1~2週間目の苗を移植し、ガラス室内(15~30℃)で管理し、立枯れ症状を呈したものを供試した。

DIBAには罹病組織および健全組織にTTBS(0.05% Tween 20-TBS)を加えてすり鉢で磨砕し、上清を試料とした。IESMには罹病組織を直接酵素結合γ-グロブリン液に浸し、染色を行った。

なお、これらの試験には *P. erythroseptica* 抗血清を用いた。

5. ELISA および DIBA の検出精度の比較

Fig. 3に示す疫病菌の汚染土壌に供試植物の苗を移植し、地上部に病徴が現れるまで、移植当日から毎日植物体を採集し、ELISA, DIBA および再分離試験に供試した。試験には *P. capsici* (IS-1) を接種したピー

** 許可番号: 54 横植第 1430 号, 第 1431 号
49 神植第 1445 号, 54 神植第 782 号

Table 1. Reactions of fungal isolates with soluble antisera prepared for *Phytophthora erythroseptica* (CMI181716) and *P. capsici* (IFO8386) in three serological methods

Species and isolate number	Source*	Antisera					
		<i>P. erythroseptica</i>			<i>P. capsici</i>		
		ELISA**	DIBA	IESM	ELISA	DIBA	IESM
<i>Phytophthora cactorum</i> PPCT-P72	KPU	1.29	+	+	0.30	+	+
<i>P. cambivora</i> 050	KPU	1.47	+	+	0.47	+	#
<i>P. capsici</i> PPCT-P66	KPU	1.26	+	#	0.48	+	#
<i>P. capsici</i> 30698	IFO	1.79	+	#	0.56	+	#
<i>P. castaneae</i> 9753	IFO	0.76	+	+	0.57	+	+
<i>P. cryptogea</i> S-16	Matsumoto	1.73	+	+	0.53	+	+
<i>P. erythroseptica</i> 181716	CMI	1.25	+	#	0.43	+	#
<i>P. megasperma</i> HS-57	Matsumoto	0.88	+	+	0.30	+	+
<i>P. melonis</i> 132	KPU	1.40	+	+	0.52	+	+
<i>P. palmivora</i> 040	KPU	1.70	+	#	0.68	+	#
<i>P. palmivora</i> 9755	IFO	1.35	+	+	0.37	+	+
<i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> 4873	IFO	1.67	+	#	0.56	+	#
<i>P. porri</i> 30416	IFO	1.39	+	+	0.55	+	+
<i>P. syringae</i> 131191	CMI	1.08	+	+	0.67	+	+
<i>P. syringae</i> 62472	CMI	1.17	+	+	0.42	+	+
<i>Pythium aphanidermatum</i> 7030	IFO	0.10	—	±	0.08	—	—
<i>Py. aphanidermatum</i> 292	UOP	0.08	—	±	0.09	—	—
<i>Py. butleri</i> 31214	IFO	0.11	—	—	0.07	±	NT
<i>Py. cucurbitacearum</i> 23	UOP	0.17	±	+	0.08	±	+
<i>Py. debaryanum</i> 7902	NU	0.08	+	#	0.05	+	+
<i>Py. debaryanum</i> 8002	NU	0.13	±	#	0.06	—	#
<i>Py. gracile</i> 30819	IFO	0.07	—	—	0.03	—	—
<i>Py. irregulare</i> 30346	IFO	0.14	—	#	0.08	—	+
<i>Py. iwayamai</i> 31990	IFO	0.15	±	NT	0.04	+	NT
<i>Py. paddicum</i> 31993	IFO	0.08	±	—	0.04	—	—
<i>Py. porphyrae</i> 30347	IFO	0.13	—	+	0.08	—	+
<i>Py. spinosum</i> 7031	IFO	0.09	—	—	0.05	—	—
<i>Py. sylvaticum</i> 31942	IFO	0.08	±	—	0.04	—	—
<i>Py. ultimum</i> 10034	UOP	0.15	—	+	0.10	—	—
<i>Py. vanterpoolii</i> 31923	IFO	0.08	—	—	0.07	—	—
<i>Py. vexans</i> 7	UOP	0.17	—	+	0.13	—	—
<i>Py. volutum</i> 31926	IFO	0.07	—	+	0.03	—	+
<i>Py. zingiberum</i> 30817	IFO	0.05	—	+	0.03	—	+
<i>Aphanomyces euteiches</i> F-2	HNGU	0.07	—	NT	0.03	—	NT
<i>A. iridis</i> Ap-1	UOP	0.06	+	#	0.18	+	#
<i>Botrytis cinerea</i>	YPPS	0.10	—	+	0.06	—	+
<i>Colletotrichum graminicola</i> C8-2-1	YPPS	0.07	—	+	0.08	±	+
<i>Fusarium oxysporum</i> 7157	IFO	0.07	—	+	0.10	—	±
<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i> 7708	IFO	0.08	—	+	0.06	—	+
<i>Phomopsis</i> sp.	YPPS	0.06	—	+	0.14	—	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	YPPS	0.14	—	+	0.17	—	+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	YPPS	0.06	—	+	0.04	±	+
<i>Verticillium dahliae</i>	YPPS	0.07	—	+	0.10	±	+
(phosphate buffered saline)		0.08	—		0.14	—	

The degree of reactions were graded from # to —. DIBA ; + : Extreme blue spot appeared, ± : poor blue spot, — : no blue spot. IESM ; # : Extreme blue hyphae observed, + : blue, ± : poor blue, — : no blue. DIBA ; Dot immunobinding assay. IESM ; Immunoenzymatic staining method. Soluble antigens were used in ELISA and DIBA. Intact mycelia were used in IESM.

* Isolates were obtained from Kyoto Prefectural University (KPU), University of Osaka Prefecture (UPO), Niigata University (NU), Higashi Nippon Gakuen University (HNGU), Institute for Fermentation, Osaka (IFO), Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England (CMI), N. Matsumoto, Hokkaido National Agricultural Experiment Station (Matsumoto) and Yokohama Plant Protection Station (YPPS).

** Absorbance value at 405 nm.

マンおよびトマトと *Phytophthora* sp. (SG-1) を接種したストックを供試した。ELISA および DIBA には *P. capsici* 抗血清を用い、植物試料 0.1 g に対し磨砕緩衝液を 4ml を加え試料を調整した。再分離には素寒天培地を用いて常法により行い、培養 (25℃) 5~7 日後培地上に形成された遊走子の有無を確認した。

結 果

1. ELISA, DIBA, IESM による供試菌株の反応

Table 1 に示した供試菌株の反応を ELISA, DIBA, IESM の 3 法により比較検討した。ELISA は CLARK and ADAMS (1977) および筆者ら (1984) が *Phytophthora* 属菌の検出に用いた方法に準じた。コーティング γ -グロブリン濃度は 2.5 μ g/ml, 酵素結合 γ -グロブリンは調整原液の 400 倍希釈液を用い、反応終了後は波長 405 nm における吸光度を ELISA 値とした。試験は 3 回反復した。

その結果、Table 1 に示すように *Phytophthora* 属菌 15 菌株は ELISA, DIBA, IESM いずれの方法でも両抗血清と顕著な反応を示した。*Pythium* 属菌 18 菌株は ELISA では両抗血清と反応しなかったが、*Py. debaryanum* (7902) が陽性反応を示した。また、*Py. cucurbitacearum*, *Py. iwayamai* などの菌株で弱い反応が認められた。一方、IESM では *Py. debaryanum*, *Py. cucurbitacearum*, *Py. irregulare*, *Py. zingiberum* など多くの菌株で反応が認められた。*Aphanomyces* 属菌などの菌株は ELISA では両抗血清と反応しなかったが、DIBA では *A. iridis* に反応が認められ、IESM では全ての菌株で反応が認められた。

2. 罹病植物からの検出

DIBA

植物試料 0.5 g に対し磨砕緩衝液 10 ml を加え、試料

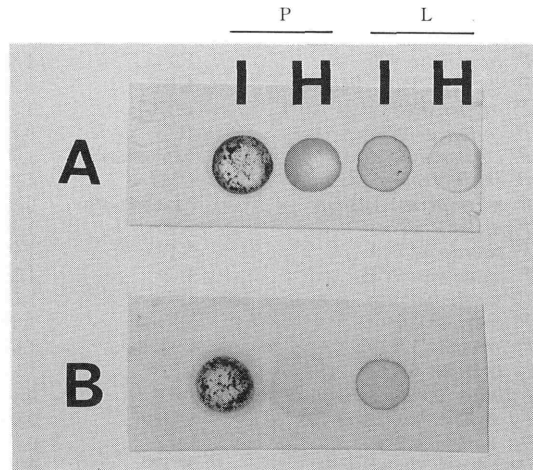


Fig. 1. Dot immunobinding assay (DIBA) for detecting *Phytophthora* antigens in extracts of infected (I) and healthy (H) pumpkin fruit (P) and lily leaves (L).

The dilution of rabbit anti-*Phytophthora erythroseptica* IgG-alkaline phosphatase conjugate was 1:3000. The DIBA procedure was done on a nitrocellulose membrane described in the literature (HIBI, 1984). After color development, the reaction was stopped (A) and then the membrane was cleared in about 1% NaClO for 20-30 min. at room temperature (B).

Table 2. Detection of *Phytophthora* antigens from artificially infected plants by DIBA

Plant	Part inoculated	Isolate used	Soruce*	Necrotic part	Healthy part
Sweet pepper	fruit	<i>Phytophthora capsici</i> 30696	IFO	+	-
Pumpkin	fruit	<i>P. capsici</i> 30696	IFO	+	-
Tomato	root	<i>P. capsici</i> IS-1	YPPS	+	-
Lilac	leaf	<i>P. syringae</i> 131191	CMI	+	-
Apple	fruit	<i>P. syringae</i> 131191	CMI	+	-
Lily	leaf	<i>P. megasperma</i> EL8702	YPPS	+	-
Alfalfa	root	<i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	YPPS	+	-
Cowpea	root	<i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	YPPS	+	-
Pea	root	<i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	YPPS	+	-
Gerbera	petiole	<i>Phytophthora</i> sp. SG-1	YPPS	+	-

*** See the footnote of Table 1.

を調整した。

その結果は Table 2 のとおりで、罹病組織は全て顕著な陽性反応を示したが、健全組織は全て陰性であった。なお、本試験のように葉緑素を含む植物組織を試料とした場合、試料を滴下した部位に緑色から茶褐色のスポットが形成されたので、脱色処理を行った。脱色剤には次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)が適切で、処理方法は基質・発色液処理後シートを停止液に浸し、その後約 1% NaClO に浸し、室温で 20~30 分間処理した。その結果、Fig. 1 に示すように葉緑素などの色素が脱色され、結果判定が容易になった。

IESM

P. nicotianae var. *parasitica* および *P. megasperma* に感染したユリの葉と *P. capsici* に感染したナスおよびシンシウガラシの果実を試料とした。その結果、寄主植物組織上に接種菌の菌糸が青紫色に染色されて観察された。ユリの場合、気孔から伸長している菌糸が明瞭に観察された (Fig. 2)。

3. ELISA と DIBA の検出精度の比較

土壌接種を行った幼植物を用い、ELISA と DIBA の検出精度を比較検討した。また、これらの抗血清による検出結果と比較するため、同一試料から供試菌の再分離を行った。試験は 4 回反復した。

その結果は Fig. 3 のとおりで、トマトおよびストックは移植後 4 日目に軽いしおれ症状を呈する株が見られ、その後立枯症状に進展した。ELISA では病徴発現の前日、つまり移植後 3 日目から、また DIBA では 4 日目から反応が認められた。なお、供試菌は 3 日目か

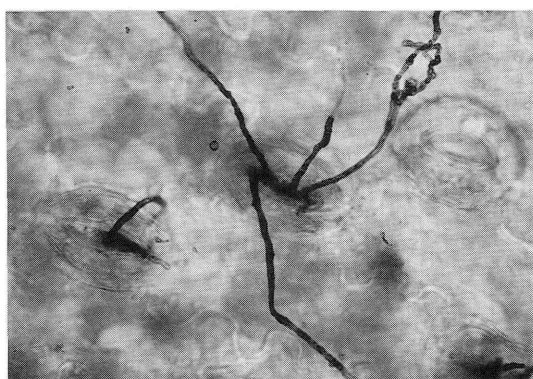


Fig. 2. Detection of *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* hyphae in artificially inoculated lily leaf by the immunoenzymatic staining method (Gerik *et al.*, 1987).

ら再分離された。一方、ピーマンの場合は病徴の発現と ELISA, DIBA での反応および供試菌の再分離は、3 日目から認められた。

考 察

日比(1984)および GERIK ら(1987)は抗ウサギ IgG-ヤギ IgG を用いた間接法を試み、また、日比(1984)は DIBA における抗原の磨砕・希釈液に TTBS を用いている。本試験では結果判定までの所要時間を短縮するため直接法を試みた。また、磨砕・希釈液については予備試験の結果 PBS でも抗原物質のニトロセルロースシートへの結合能に差異は認められなかったので、

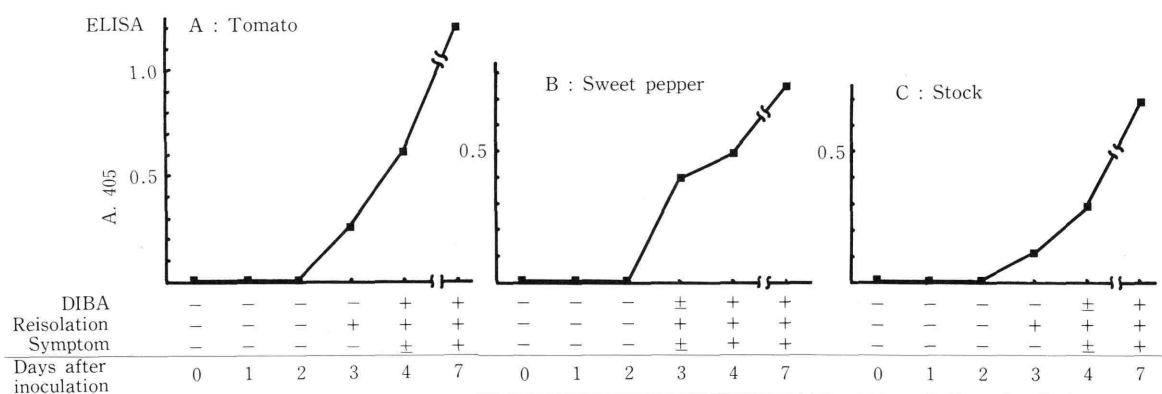


Fig. 3. Detection of *Phytophthora* antigens by ELISA and DIBA from extracts of tomato (A), sweet pepper (B) and stock (C) at different times after inoculation with *P. capsici* (A, B) and *Phytophthora* sp. (C). DIBA; +: blue spot appeared, ±: poor blue spot, -: no blue spot. Reisolation; +: sporangia formed on a water agar medium, -: no sporangia. Symptom; +: damping-off, ±: wilting, -: healthy.

PBS と TTBS を併用した。なお、抗原の磨砕・希釈時の緩衝液については SOMOWIYARJO ら (1989) も同様の報告を行っている。

本試験では3種の血清学的手法により Table 1 に示す菌株の反応を比較した結果、ELISA では前報(君島ら, 1989)と同様に属特異的の反応が認められた。DIBA では *Phytophthora* 属菌の他に *Py. debaryanum*, *A. iridis* などの菌株で反応が認められたが、ELISA と比較的類似する反応パターンを示した。一方、IESM ではさらに多くの供試菌株が反応し、ELISA で見られるような属特異的の反応は認められなかった。

DIBA では Table 2 および Fig. 1 に見られるように本法により罹病部と健全部を識別できた。また、本検出法は約3時間で結果判定ができ、操作も煩雑でない点から疫病の簡易診断法として利用できると考えられた。今後自然感染株からの病原菌の検出などへの応用および結果判定までの処理時間の短縮等についてさらに検討したい。

GERIK ら (1987) は IESM によりワタの根に感染している *Verticillium dahliae* の染色を試みた結果、根の表面上と皮層中の菌糸が染色されているのが観察できたと報告しているが、本試験では組織表面上の菌糸のみ染色された。Table 1 の結果から、本抗血清を用いた IESM では *Phytophthora* 属菌のみを特異的に染色することは困難と考えられた。しかし、寄主植物上での *Phytophthora* 属菌の生態を調査する際に、本法は菌糸観察法として有効であるものと考えられた。

ELISA と DIBA との検出精度を比較した試験結果に見られるように、接種菌の再分離と同様に血清試験により、病徴の発現と同日か1日早く病原菌を検出することができた。これはオランダイチゴ根腐病菌 (*Phytophthora fragariae*) を用いた MOHAN (1988) の結果とほぼ同様であった。ELISA と DIBA とを比較すると ELISA の方が検出精度はやや勝っているものと考えられた。今回の試験では接種から病徴発現まで3~4日と短時間であったため、検出精度に明瞭な差は認められなかったが、菌の感染から病徴発現まで長時間を要する場合、感染初期における疫病菌の検出に ELISA および DIBA は有効な方法と考えられた。

摘 要

P. erythroseptica および *P. capsici* の抗血清を用い、*Phytophthora* 属菌15菌株を含む43菌株の反応を ELISA, DIBA および IESM の3法を用い比較検討した。ELISA では *Phytophthora* 属菌のみが反応し、

DIBA では *Phytophthora* 属菌の他に数菌株で反応が認められた。一方、IESM では供試菌の多くが反応し、ELISA で見られるような属特異的の反応は認められなかった。

人工接種により得た罹病植物から *Phytophthora* 属菌の検出試験を試みた結果、DIBA により健全と罹病植物が識別できた。なお、本検出法は操作も煩雑でなく、短時間で結果判定可能であった。IESM により組織表面上の菌糸が青紫色に染色されて観察された。

土壌接種を行ったトマト、ピーマン、ストックの苗を用いて ELISA と DIBA による *Phytophthora* 属菌の検出を試みた結果、接種菌の再分離と同様に地上部の病徴発現と同日か1日早く接種菌を検出できた。

以上から DIBA は ELISA より疫病菌の迅速かつ簡便な検出法と考えられた。

引 用 文 献

- 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
- GERIK, J.S., S.A. LOMMEL and O.C. HUISMAN (1987) A specific serological staining procedure for *Verticillium dahliae* in cotton root tissue. *Phytopathology* **77**: 261-265
- 日比忠明 (1984) DIBA 法による植物ウイルスの検出法. *植物防疫* **38**: 380-384
- 君島悦夫・西尾 健・高山睦雄・長尾記明 (1984) *Phytophthora* 属菌の血清学的検出法および同定法に関する研究 III. ELISA による植物組織中の *Phytophthora syringae* KLEB. の検出. *植防研報* **20**: 1-6
- 君島悦夫・小林慶範・西尾 健 (1988) テッポウユリから新たに分離された疫病菌 *Phytophthora megasperma* Drechsler. *日植病報* **54**: 427-435
- 君島悦夫・小林慶範・西尾 健 (1989) 4種疫病菌抗血清の反応特異性. *植防研報* **25**: 1-6
- MOHAN, S.B. (1988) Evaluation of antisera raised against *Phytophthora fragariae* for detecting the red core disease of strawberries by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Pathology* **37**: 206-216
- 西尾 健・川口 嘉久・君島悦夫・高山睦雄・末次哲雄 (1983a) *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* の抗血清の作製とその寒天ゲル内拡散法における反応. *植防研報* **19**: 47-53
- 西尾 健・君島悦夫・高山睦雄・末次哲雄 (1983b) *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* の蛍光抗体

- 法による検出. 植防研報 **19**: 55-62
- 佐古 勇 (1989) ネギ属植物におけるニンニク潜在ウイルスの発生. 植物防疫 **43**: 389-392
- SOMOWIYARJO, S., N. SAKO and F. NONAKA (1989) Dot-immunobinding assay for Zucchini yellow mosaic virus using polyclonal and monoclonal antibodies. Ann. Phytopath. Soc. Japan **55**: 56-63
- YOSHIKAWA, N., P. POOLPOL and T. INOUE (1986) Use of a Dot Immunobinding assay for rapid detection of Strawberry pseudo mild yellow edge virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan **52**: 728-731