

トマトかいよう病, 青枯病および茎えそ細菌病の

RIPA法と病徴診断による簡易判別

金田真人*・小河原孝司**・伊藤瑞穂***・鹿島哲郎

Discrimination between Tomato Bacterial Canker, Bacterial Wilt and Pith Necrosis By Symptom diagnosis and Using Rapid Immunofilter Paper Assay

Masato KANEDA, Takashi OGAWARA, Mizuho ITOH and Tetsuro KASHIMA

Summary

In this study, we have considered the possibility of application of Rapid Immunofilter Paper Assay(RIPA) for diagnosis of bacterial canker and bacterial wilt as well as the Analytic Profile Index(API) and Polymerase Chain Reaction(PCR) for the diagnosis of tomato pith necrosis in the Ibaraki prefecture. The bacterial detection sensitivity of RIPA is approximately 10^5 cfu/mL for bacterial canker and bacterial wilt. The viable bacterial count is above the detection limit at the diseased site where the symptoms are visible on the leaves and in the vascular bundle. In addition, tomato pith necrosis can be diagnosed more rapidly by PCR than by API method. In the bacterial canker or bacterial wilt occurred in local fields, the results by RIPA method agree with the result of isolated bacterial species from the infected tomato. Therefore, the RIPA is considered to be a practical method for diagnosis. Based on the characteristic symptoms of each disease, we have created a simple discrimination manual that associates the RIPA method results with symptom diagnosis, which can be used in local fields.

キーワード：トマト, かいよう病, 青枯病, 茎えそ細菌病, RIPA法, 簡易判別, 病徴

I. 緒言

茨城県のトマト栽培は、作付面積が892ha、収穫量が48,700tで全国第3位であり、産出額が142億円(平成24年農林水産省統計情報)と本県の主要な園芸品目となっている。主な作型は、5~7月に定植して11月まで収穫する抑制栽培、8~10月に定植して翌年の6月まで収穫する促成栽培、3月に定植して7月まで収穫する半促成栽培に分けられ、特に7月から11月の夏季の出荷量が全体の65%を占めている(平成24年度「茨城の園芸」)。

近年、県内のトマト栽培では、立枯性細菌病であるかいよう病、青枯病、茎えそ細菌病の発生が問題となっている。特に、かいよう病は発生に気がつかないうちに感染が拡大し、大きな被害をもたらす事例も確認されている。

これらの立枯性細菌病が発生した場合は、発病株の抜き取りや薬剤散布、次作の対応として土壌消毒や輪作、また青枯病の場合は抵抗性台木の利用等による防除対策が講じられている。

しかし、これらの病害は、生理障害の症状や互いの病徴が類似するため判別がしにくく、診断が困難な

*現 鹿行農林事務所経営・普及部門 **現 茨城県農業総合センター

***元 茨城県農業総合センター 園芸研究所

場合が多い。

細菌性病害の診断法として、抗原抗体反応を用いた ELISA 法（白川・佐々木, 1990）、DIBA 法、TPI 法（石井・嶽本, 2001）、遺伝子学的手法を用いた PCR 法（Dreier *et al.*, 1995）、細菌の培養性状を市販キットを用いて調査する API 法（西山ら, 1992）等が報告されている。

また、抗原抗体反応を利用した簡易検定法として RIPA 法 (Rapid immunofilter paper assay : 迅速免疫診断濾紙検定法) がウイルス病の簡易診断に役立てられている (Ohki and Kameya-Iwaki, 1996) が、細菌病の診断に活用した報告は少ない。RIPA 法は、発病株の組織を緩衝液で摩砕した溶液に試験紙を浸漬し、発色によって陽性か陰性かを判定できる簡易な方法であり、現場で活用可能な手法と考えられる。RIPA キットは国内でも市販されているが、現地での診断に活用するためには、かいよう病菌や青枯病菌に対する特異性や非特異反応の有無、検出感度、適切な診断部位等を明らかにする必要がある。

そこで、かいよう病および青枯病については、罹病株を用いた市販の RIPA キットの実用性および診断法を検討した。また、RIPA キットが市販されていない茎えそ細菌病については、特異的プライマーを用いた PCR 法 (Catara *et al.*, 2000) および API 法について検討した。さらに、これらの手法と各病害の病徴をもとに、診断のためのフローチャートを作成したので報告する。

II. 材料および方法

1. かいよう病菌および青枯病菌用 RIPA キットの検出感度と診断部位の検討

1) 検出感度の検討

試験には、農業生物資源研究所ジーンバンクより入手した、トマトかいよう病菌 2 菌株 (MAFF301493, MAFF730099) とトマト青枯病菌 2 菌株 (MAFF211541, MAFF311421) を用いた。いずれの菌株も、YP 培地で 28°C 振とう培養後、0.01M リン酸緩衝液で 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/ml に濃度調整した菌懸濁液を用い、agdia 社製の RIPA (かいよう病菌用 Immuno Strip CMM®, 青枯病菌用 Immuno Strip Rs®) の検出感度を検討した。

2) 発病部位別のかいよう病菌および青枯病菌の生菌数の計測

病原菌を効率的に検出するためのサンプリング部位について、トマトの病原細菌接種株を用いて部位別の生菌数を調査した。

かいよう病は、トマト品種‘ポンテローザ’の本葉 7~8 葉期の苗に、 10^8 cfu/ml のかいよう病菌懸濁液を腋芽部に穿刺接種または断根かん注接種し、26°C の人工気象室内で管理した。接種 20 日後に、発病葉、無病徴葉、茎部の生菌数について、CMM 選択培地 (Alvarez *et al.*, 2005) を使用した希釈平板法により計測した。なお、調査は 3 株で行った。

青枯病は、トマト品種‘りんか 409’の本葉 5~6 葉期の苗に、 4×10^7 cfu/ml の青枯病菌懸濁液を断根かん注接種して、30°C の人工気象室内で管理した。接種 7 日後に、萎凋した 5 株について、子葉直上の茎部の生菌数を、原・小野培地 (原・小野, 1982) を使用した希釈平板法により計測した。

2. 茎えそ細菌病に対する PCR 法および API 法の検討

県内で発生した茎えそ細菌病が疑われる立枯症状のトマト 10 検体から NA 培地で分離した細菌 10 菌株、また標準菌株とする農業生物資源研究所から入手した茎えそ細菌病菌 *Pseudomonas corrugata* 菌株 (MAFF311125) および *P. mediterranea* 菌株 (MAFF106669) を用い、PCR 法および API 法により茎えそ細菌病菌の検出を行った。PCR 法では、上記 12 菌株を YP 培地で振とう培養し、得られた培養細胞を約 10^8 cfu/ml に調整して菌懸濁液を作製した。この菌懸濁液 50 μ l を 100°C で 15 分間煮沸し、4°C、15,000rpm、10 分間で遠心分離した後、上清みを鋳型 DNA とした。特異的プライマーは、PC1/1 と PC2/1 (*P. corrugata*, 1100b. p.), PC5/1 と PC5/2 (*P. mediterranea*, 600b. p.) を用いて PCR 法による検定を行った (Catara *et al.*, 2000)。また、上記 12 菌株について、西山ら (1992) の方法に準じ、API20NE を使用した細菌学的性質検査による簡

易同定を行った。

3. 現地で発生したかいよう病および青枯病の罹病株における RIPA キットの有用性の検討

2009 年から 2011 年に県内で発生したかいよう病または青枯病が疑われるトマト 18 検体について、維管束褐変部または小葉の病徴部を RIPA 法による検定に供試した。検定には明瞭な病徴部位を約 0.15g 採取し、付属の専用バッファー 3ml に入れて磨砕した後、磨砕液に試験紙を 5 分間浸漬し、陽性バンドが確認されたものを陽性とした。病原菌の単離後に、かいよう病菌は特異的プライマー CMM5, CMM6 (Dreier *et al.*, 1995) を用いた PCR 法により、また青枯病菌は原・小野選択培地で流動性のコロニーが分離されることにより簡易同定を行った。

4. かいよう病、青枯病および茎えそ細菌病の病徴観察

上記の 2. および 3. の調査時に、茎、葉柄、葉、維管束等の各部位について病徴を観察し、各病害の診断に利用可能な特有の病徴を記録し、整理した。

III. 結果

1. かいよう病菌および青枯病菌用 RIPA キットの検出感度と診断部位の検討

1) 検出感度の検討

かいよう病菌を段階希釈して検出感度を比較した結果、供試した 2 菌株とも同様の傾向を示し、 10^5 cfu/ml の細菌濃度で陽性反応が確認され、 10^6 cfu/ml 以上では特に明瞭な陽性反応が認められた (表 1)。なお、非特異反応は認められなかった。青枯病菌においても 2 菌株とも同様の傾向を示し、 10^5 cfu/ml 以上の細菌濃度で明瞭に陽性反応が認められた (表 1)。なお、青枯病菌用の RIPA キットでは、菌の懸濁液作製に用いる緩衝液に数十分間浸漬しておいた場合でも薄い陽性反応のバンドが確認されることがあった。

表 1 RIPA 法による細菌懸濁液からのトマトかいよう病菌および青枯病菌の検出感度

供試菌株	細菌濃度 (cfu/ml)				緩衝液のみ	
	10^7	10^6	10^5	10^4		
かいよう病菌	MAFF730099	++	++	+	-	-
	MAFF301493	++	++	+	-	-
青枯病菌	MAFF211541	++	++	++	-	-
	MAFF311421	++	++	++	-	-

++: 明瞭な陽性反応 +: 陽性反応 -: 陽性反応なし

2) 発病部位別のかいよう病菌および青枯病菌の生菌数の計測

発病株の各部位における生菌数を調査した結果、かいよう病菌では維管束褐変部と病徴葉で 3×10^6 cfu/g 以上の生菌数であった (表 2)。無病徴葉では 2×10^5 cfu/g 以下であった。青枯病菌では子葉直上の茎部における生菌数は 7.2×10^7 cfu/g 以上であった

表 2 トマトかいよう病および青枯病罹病株における部位別生菌数

供試部位	生菌数 (cfu/g) ¹⁾			青枯病株
	かいよう病株 1	かいよう病株 2	かいよう病株 3	
茎 (維管束褐変部)	3×10^6	2×10^7	$1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$	$7.2 \times 10^7 \sim 9.3 \times 10^8$
葉 (病徴葉)	—	—	$6 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9 <$	—
葉 (無病徴葉)	3×10^4	2×10^5	N.D. ²⁾	—

1) 株 1, 2 は穿針接種、株 3 は断根かん注接種。

2) N.D. は検出限界以下 (約 1×10^2 cfu/g) を表す。

2. 茎えそ細菌病に対する PCR 法および API 法の検討

茎えそ細菌病菌の特異的プライマーを用いた PCR 法による検定を行った結果、県内から分離された 9 菌株および標準菌株 2 菌株は *P. mediterranea* であることを示す 600b. p., または *P. corrugata* であることを示す 1100b. p. の増幅バンドが検出された (図 1, 表 3)。なお、県内から分離された 1 菌株については増幅バンドは検出されなかった。

また、API20NE による細菌学的性質検査による簡易同定の結果、PCR 法で増幅バンドが検出された 9 菌株および標準菌株 2 菌株は茎えそ細菌病菌と判別されたが、増幅バンドが検出されなかった 1 菌株は、*P. corrugata* および *P. mediterranea* とは異なり、PCR 法の検定結果と一致した (表 3)。診断に要した日数は、PCR 法では約 3 日、細菌学的性質による同定法では約 7 日であった。

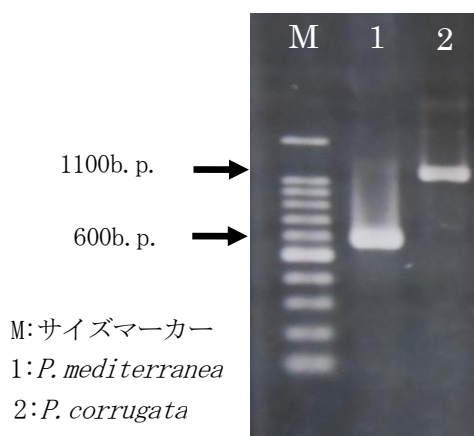


図1 PCR法による茎えそ細菌病菌診断例

表3 県内で発生した茎えそ細菌病様症状株から分離された菌株におけるPCR法および細菌学的性質による判別結果

供試菌株	PCR法による検定			細菌学的性質検査 ¹⁾	
	増幅バンド ²⁾	菌株数	検定結果	菌株数	同定結果
MAFF311125 (標準菌株)	600bp	1	<i>P.med</i> ³⁾	1	茎えそ細菌病菌
MAFF106669 (標準菌株)	1,100bp	1	<i>P.cor</i> ³⁾	1	茎えそ細菌病菌
県内分離菌株	600bp	7	<i>P.med</i>	9	茎えそ細菌病菌
	1,100bp	2	<i>P.cor</i>		
	なし	1	—		

1)B社製API20NEを用いた細菌学的性質検査による簡易同定を行った。

2)1,100bpもしくは600bpのどちらか一方の増幅バンドが検出されれば茎えそ細菌病菌である。

3)*Pseudomonas mediterranea*, *Pseudomonas corrugata* (茎えそ細菌病菌)を表す。

4)既知の立枯性病原細菌に該当なし。

3. 現地で発生したかいよう病および青枯病の罹病株における RIPA キットの有用性の検討

県内で発生したかいよう病または青枯病が疑われるトマト 18 株について、維管束褐変部または小葉の水浸状病斑部を用いて RIPA 法による検定を行った。その結果、18 検体中 13 検体で、かいよう病または青枯病、あるいは重複感染が確認され、さらに簡易同定においてもかいよう病菌または青枯病菌が同様に分離され、RIPA 法による結果と簡易同定結果が一致した (表 4)。また、RIPA 法による検定で陰性であった 5 検体について細菌の分離を行った結果、2 検体から茎えそ細菌病菌が分離されたが、3 検体からは病原菌が分離されず、生理障害と考えられた (表 4)。

なお、筑西市 No. 2 では、RIPA キットでかいよう病と青枯病が陽性であったが、青枯病菌は分離されなかった。

4. かいよう病、青枯病、茎えそ細菌病の病徴観察

各細菌病の病徴を観察し、特徴的な症状を整理した。

かいよう病は、茎に維管束褐変が認められる場合、葉脈間に脱水斑、下位葉～中位葉の一部の黄化や葉縁の巻き上がりが見られ、症状が進行した場合は茎の髓部に空洞化が見られた。維管束褐変が見られない場合は、葉が葉縁から黒褐色に枯死または葉縁からにじむような褐色の不整形病斑が見られた (図 2)。

青枯病は，既報（岸，1999）のように日中に葉が青いまま萎れる，茎に維管束褐変が認められる，褐変部の茎を水に漬けると白濁した菌泥の漏出が認められる場合が多かった。しかし，耐病性台木の使用や比較的低温期の感染で病勢進展が緩やかな場合は，葉が青いまま萎れずに下位葉の黄化が見られた（図3）。

茎えそ細菌病は，初期症状の株では感染部位付近の葉の黄化，茎や葉柄表面の黒色えそ条斑，維管束の黒～褐変，茎の髓部の黒色水浸状が見られた。症状が進行した株では株全体の葉の黄化，感染部位からの菌泥の流出，茎の髓部の組織崩壊も観察され，髓部を仕切るように組織が残る場合も散見された（図4）。

表4 現地で採集した細菌病様症状株におけるRIPA法による診断結果

採集場所	検体番号	供試部位	RIPA		分離結果
			Cmm ¹⁾	Rs ¹⁾	
小美玉市	No. 1	維管束褐変部	+	NT ²⁾	Cmm
筑西市	No. 2	維管束褐変部	+	+	Cmm
筑西市	No. 3	維管束褐変部	+	-	Cmm
筑西市	No. 4	維管束褐変部	+	-	Cmm
筑西市	No. 5	維管束褐変部	+	NT	Cmm
つくば市	No. 6	維管束褐変部	+	NT	Cmm
小美玉市	No. 7	葉の病斑部 (維管束褐変無し)	+	NT	Cmm
筑西市	No. 8	葉の病斑部 (維管束褐変無し)	+	NT	Cmm
桜川市	No. 9	維管束褐変部	+	NT	Cmm
筑西市	No. 10	維管束褐変部	+	+	Cmm、Rs
つくば市	No. 11	維管束褐変部	-	+	Rs
銚田市	No. 12	維管束褐変部	NT	+	Rs
筑西市	No. 13	維管束褐変部	-	+	Rs、P. cor
筑西市	No. 14	維管束褐変部	-	-	P. med
筑西市	No. 15	維管束褐変部	-	-	P. med
小美玉市	No. 16	葉の病斑部 (維管束褐変無し)	-	NT	分離されず
銚田市	No. 17	葉の病斑部 (維管束褐変無し)	-	NT	分離されず
桜川市	No. 18	葉の病斑部 (維管束褐変無し)	-	NT	分離されず

1) Cmmはかいよう病菌、Rsは青枯病菌、P. med及びP. corは茎えそ細菌病菌を示す。

2) +は陽性、-は陰性、NTは検定を行っていないことを表す。

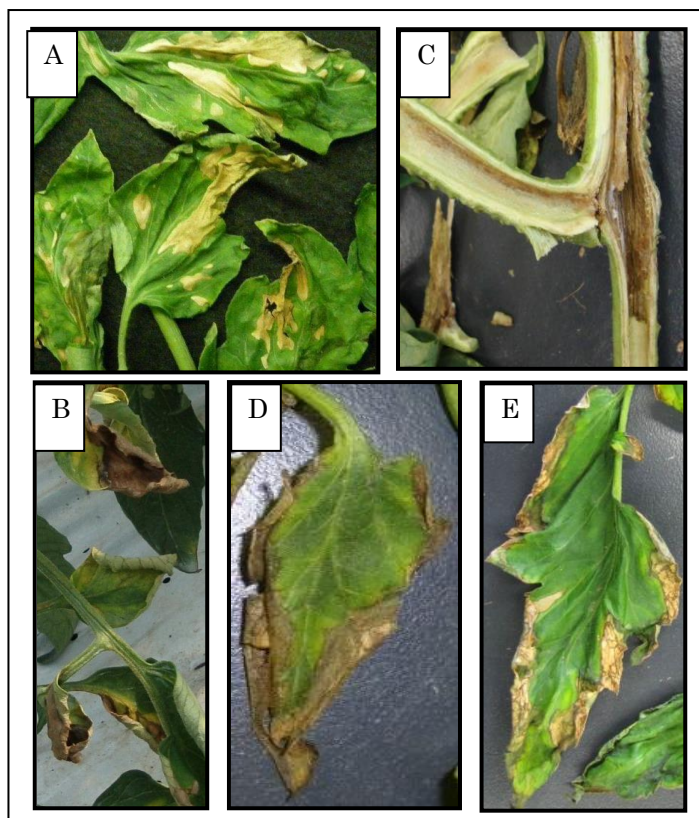


図2 かいよう病の特徴

- A: 葉脈間に脱水斑
- B: 下位葉～中位葉の一部が黄化
・葉縁の巻き上がり
- C: 維管束褐変・髓部の空洞化
- D: 葉縁から黒褐色に枯死
- E: 葉縁の褐色不整形病斑

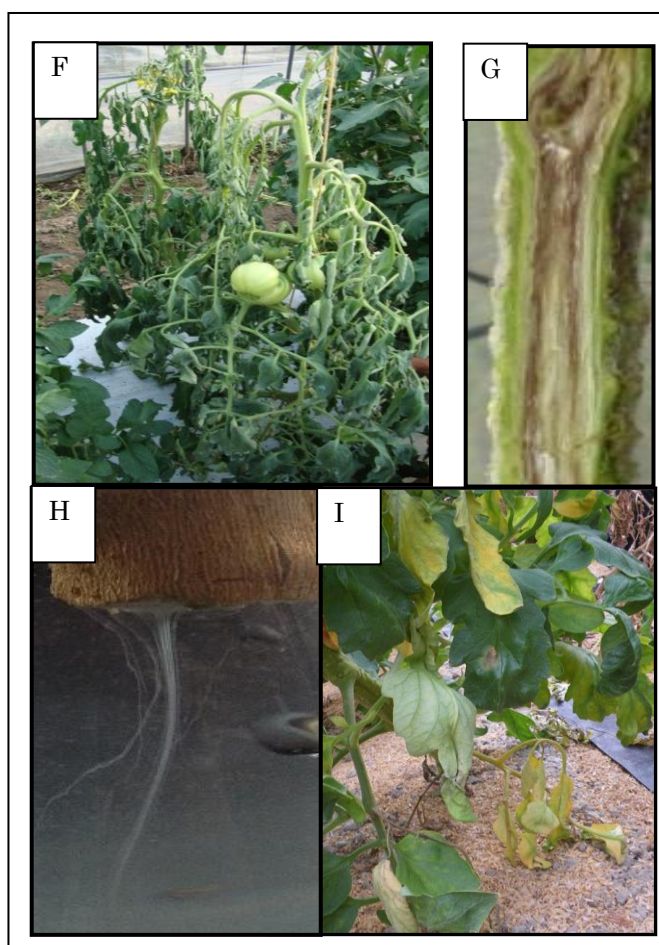


図3 青枯病の特徴

- F: 日中に青いまま萎れる
- G: 維管束褐変
- H: 褐変部から白い菌泥が流出
- I: 青いまま萎れず, 下葉の黄化が発生



図4 茎えそ細菌病の特徴
 J：茎表面の黒色えそ条斑
 K：葉柄に沿った黒色えそ条斑
 L：維管束茶褐色～黒褐色
 M：髓部の黒褐色水浸状・仕切り

IV. 考 察

トマトに立枯症状を引き起こす細菌病の被害が現地で拡大している中，防除対策を講じるうえで迅速かつ正確な診断が求められている。本研究では，市販されているかいよう病および青枯病用の RIPA キットならびに海外で報告されている茎えそ細菌病菌の特異的プライマーの実用性について検討した。

国内および本県で分離されたかいよう病および青枯病の菌株に対して，RIPA キットによる検定で陽性反応が確認され，その検出感度は 10^5 cfu/ml 程度であった。病徴が観察された株についてはすべて陽性バンドが確認され，発病株の診断での利用において十分の検出感度と考えられた。なお，筑西市 No. 2 の検体では，青枯病の陽性反応は認められたが，病原菌は分離されなかった。植物組織中の青枯病菌は，病徴が進行して培養できない状態の細胞が増加するが，ピルビン酸ナトリウムの添加により培養が可能になる（今崎，2008）ことから，本検体については NA 培地では分離できなかつたと推察される。なお，青枯病菌用の RIPA キットは，長時間反応させると陽性バンドが確認されることがあるため，RIPA キットの試験紙浸漬後 5 分程度で判定する必要がある。

茎えそ細菌病の特異的プライマーを用い，国内および県内で分離された菌株の反応を確認した結果，いずれの菌株からも増幅バンドが検出され，診断に利用可能と考えられた。また，県内で分離された菌株は *P. mediterranea* が多い傾向であったが，*P. fluorescense* biovar II も病原菌として報告されているため，今後発生した場合は検出方法を検討する必要がある。

また，各細菌病の病徴観察では，葉や髓部，葉柄に病徴の違いが認められたことから，これらの特徴的な

病徴を利用した診断は可能であると考えられた。

以上の結果を踏まえ、病徴とRIPA法を用いたかいよう病、青枯病および茎えそ細菌病の診断フローチャートを作成した(図5)。細菌病が疑われる株が発生した場合は、葉、茎、葉柄、維管束を観察して各細菌病の病徴で判断する。病徴で容易に判断できない場合は、かいよう病および青枯病のRIPA法により検定する。RIPA法による検定が陰性の場合、茎えそ細菌病の特異的プライマーを用いてPCR法による診断を行う。これらのいずれにも当てはまらない場合は、他の病害や生理障害等が考えられるため、改めて病原菌の分離・同定を行う。

かいよう病、青枯病および茎えそ細菌病は、土壌伝染だけではなく、汁液伝染もするため、発病株の細菌が管理作業等によって健全株へ二次伝染する恐れがある(橋本・渋川, 1984, 川口, 2010, Moura et al., 2009)。また、かいよう病は、葉面上で増殖した病原菌が、葉の接触、水滴、殺菌効果のない殺虫剤の散布による飛散等により、健全株へ二次伝染する可能性も指摘されている(大谷ら, 2007, 佐々木・梅川, 1986, 渡辺・白川, 2008)。そのため、被害を最小限に留め、次作への伝染源を減らすためには、病原菌の診断をいち早く行い、発病株の早期抜き取り(川口, 2010)やカルシウムハイポクロライドによる栽培管理用のハサミの消毒(漆原ら, 2002)、薬剤散布など、栽培中でも実施可能な防除対策を迅速に行うことが被害抑制に効果的である。現地で普及指導員、営農指導員、生産者が本診断法を利用することで、的確な防除対策に活用されることが期待される。

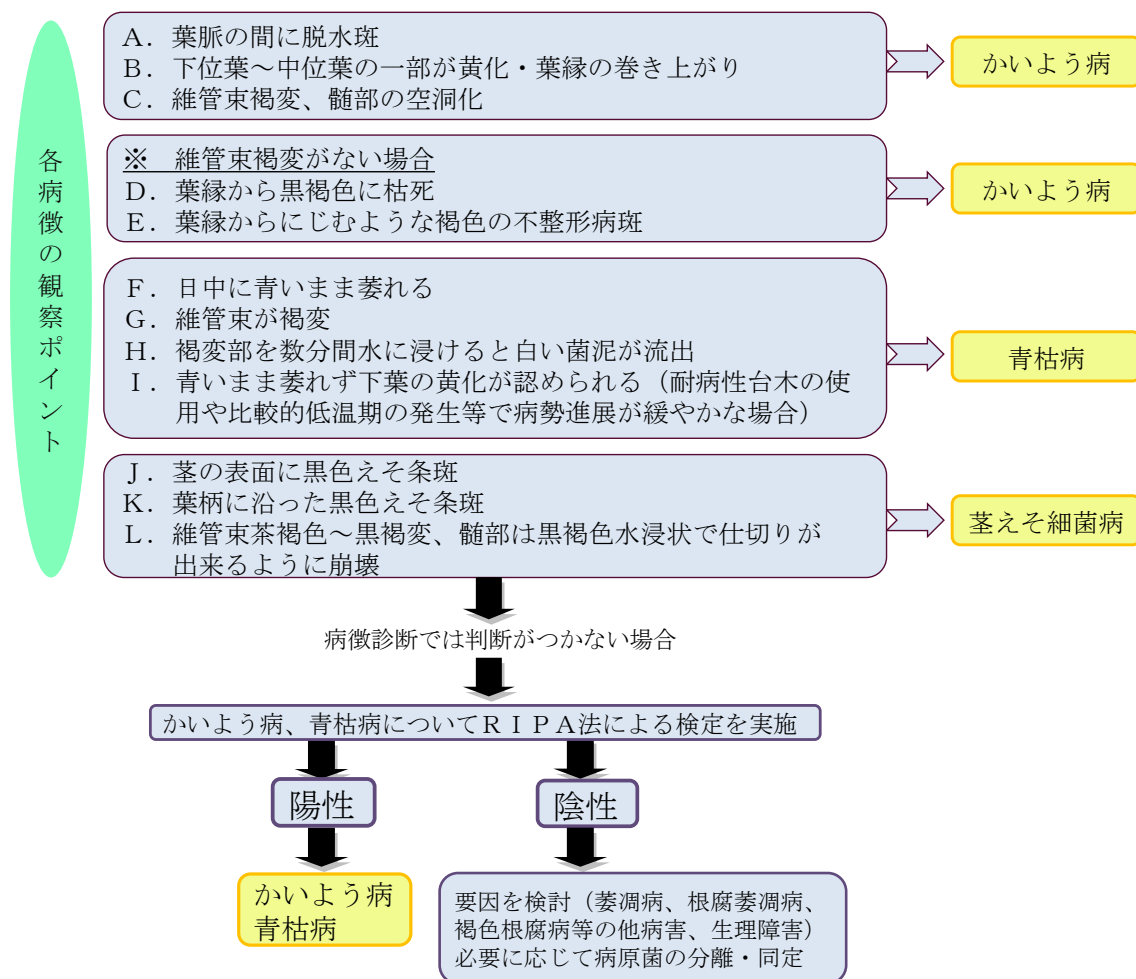


図5 トマトかいよう病、青枯病および茎えそ細菌病の現地診断のためのフローチャート

V. 摘要

1. RIPA キットの検出感度は，かいよう病菌および青枯病菌とも約 10^5 cfu/ml であり，維管束や葉の病徴部位には検出可能な生菌数が存在した。
2. 茎えそ細菌病菌は，PCR 法により迅速で高精度に診断が可能であると考えられた。
3. 現地で発生したかいよう病および青枯病の罹病株において，RIPA 法による検定結果と菌の分離結果が一致し，RIPA キットは実用性があると考えられた。
4. 各病害の診断に利用可能な特有の病徴を観察した結果，葉や髓部，葉柄の病徴に違いが認められ，診断に利用可能と考えられた。
5. 以上から，病徴診断と RIPA キットを組み合わせた，現地で活用可能な診断フローチャートを作成した。

謝辞 当研究を実施するに当たり，発病圃場の調査や現地発病株の提供に協力していただいた各農林事務所経営・普及部門，各地域農業改良普及センターの関係者各位に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- 石井貴明・嶽本弘之. 2001. トマトかいよう病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* の Dot Immuno-Binding Assay (DIBA) 法および Tissue Printing Immunoassay (TPI) 法による検出. 福岡農総試研. 20
- 今崎伊織. 2008. 青枯病菌の Viable-But-Nonculturable 状態に関連する研究について. 植物防疫. 62(2):22-25
- 漆原寿彦・原昌生・小林修武・酒井宏・白石俊昌. 2002. 消毒液自動噴霧ハサミによるトマトかいよう病の防除. 関東東山病虫研報. 43:39-41
- 大谷洋子・増田吉彦・白井雄祐. 2007. トマトかいよう病の伝染に及ぼす保菌残渣の土壌中分布と湿度の影響. 関西病虫研報(49):31-33
- 岸国平. 1999. 日本植物病害大辞典. pp. 468. 全国農村教育協会.
- 佐々木次雄・梅川学. 1986. トマトかいよう病の発生生態に関する研究 1. 小葉における病原細菌の増殖と発病との関係. 北日本病虫研報. 37:65-67
- 佐々木次雄・梅川学. 1986. トマトかいよう病の発生生態に関する研究 2. 雨よけおよび露地栽培におけるトマトかいよう病の発生と病原細菌の動態. 北日本病虫研報. 37:68-70
- 白川隆・佐々木次雄. 1990. トマトかいよう病細菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* の酵素結合抗体法による検出. 野菜・茶業試験場研究報告. 1:75-83
- 川口章. 2010. 雨除け栽培で発生するトマトかいよう病菌の疫学的解析による伝染源の解明—分子タイピングと空間分布解析の応用. EBC 研究会誌. 7. :1-10
- 西山幸司・掘田光生・落合弘和. 1992. アピ 20NE による植物病原細菌 type strain の類別. 日植病法. 58(4):595 (講演要旨)
- 橋本光司・渋川三郎. 1984. ナス青枯病の伝播様式. 関東東山病虫研報.
- 原秀紀・小野邦明. 1982. タバコ立枯病の発生生態に関する研究第 1 報病原細菌の検出・定量用培地. 岡山タバコ試報. 42:127-138
- 渡辺秀樹・白川隆. 2008. 薬剤散布がトマトかいよう病菌の二次伝染に及ぼす影響. 関西病虫研報(講演要旨). 50:193
- Alvarez, A. M., Kaneshiro, W. S. and Vine, B. G. 2005. Diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in tomato seed: What is the significance? Acta Horticulturae (ISHS) 695:205-214
- Dreier, J., Bermphohl, A., and Eichenlaub, R. 1995. Southern Hybridization and PCR for Specific

Detection of Phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology. 85:462-468

Moura, L., Darrasse, A., Jacques M. A. and Duclos, J. 2009. Differential Colonization Patterns of Tomato By Tomato Pith Necrosis Agents. Acta Hort. (ISHS) 808:235-242

Ohki, S.T., and Kameya-Iwaki, M. 1996. Simplifying of the Rapid Immunofilter Paper Assay for Faster Detection of Plant Viruses: Simplified RIPA. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62(3). 240-242.

Catara, V., Arnold, D., Cirvilleri, G. and Vivian, A. 2000. Specific Oligonucleotide Primers for the Rapid Identification and Detection of the Agent of Tomato Pith Necrosis, *Pseudomonas corrugata*, by PCR Amplification: Evidence for two Distinct Genomic Groups. Plant Pathology. 106(8):753-762