

# 福岡県のパプリカ (*Capsicum annuum*) における トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*: TSWV) の発生およびDot Immuno-Binding Assay (DIBA) 法による検出

石井貴明<sup>1)</sup>・奥田 充<sup>2)</sup>・花田 薫<sup>2, 3)</sup>・嶽本弘之<sup>1)</sup>・

福岡県のパプリカ栽培圃場においてえそ輪紋症状を呈する株を5種類の植物ウイルス抗体を用いて検定したところ、本病はトマト黄化えそウイルス (TSWV) によるものであることが明らかとなった。福岡県においてTSWVの発生は未確認であったため、分離したTSWVの性質について検討した。ウイルス分離株の指標植物に対する反応を調べたところ、供試した6科16種の植物すべてに感染し、既報のTSWVとの相違点は認められなかった。また、RT-PCR法でSRNAにコードされるinternal transcribed spacer (ITS)領域およびヌクレオキャプシドタンパク質遺伝子 (N遺伝子) を含む領域をそれぞれ増幅し、それぞれの塩基配列を決定した。ITS領域にはトスポウイルス属に特有のA-Uに富む配列を認めた。また、得られたN遺伝子の塩基配列から推定されたアミノ酸配列はTSWV (普通系統) である BR-01株と98.1%の相同性を有していた。以上の結果からウイルス分離株をTSWV (普通系統) と同定した。市販の抗体を利用したDIBA法によるTSWVの検出についてピーマン、タバコ、トマト、ナスの発病葉を対象に検討した結果、すべて陽性反応を示した。また、酵素標識した抗TSWV抗体を1次抗体とする変法により所用時間の短縮化が可能であることが示唆され、本法およびその変法がTSWVの簡易検定に利用できることが確認された。

[キーワード: トマト黄化えそウイルス, パプリカ, DIBA法, 簡易診断]

Occurrence of *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) of Pepper in Fukuoka Prefecture and its Detection of TSWV with application of Dot Immuno-Binding Assay (DIBA). ISHII Takaaki, Mitsuru OKUDA, Kaoru HANADA and Hiroyuki TAKEMOTO, (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) Bull., Fukuoka Agric. Res. Cent. 22:56-60 (2003)

Unidentified necrotic ringspot disease was found on paprika (*Capsicum annuum*) plants in Fukuoka Prefecture. Because the symptoms suggested a viral infection, some diseased leaves were tested with antibodies against *Cucumber mosaic virus*, *Pepper mild mosaic virus*, *Potato virus X*, *Potato virus Y* and *Tomato spotted wilt virus* using DAS-ELISA. Positive reactions were observable only with anti-TSWV antibodies. An isolate was obtained by application of a local lesion isolation method using a *Chenopodium quinoa* plant. The host range of the isolate was identical with that of TSWV, in the 16 plant species in 6 families tested. The nucleotide sequence of the nucleocapsid protein gene (N gene) was identified. The deduced amino acid sequence of the N gene was found to have a homology of 98.1% with an ordinarily TSWV strain BR-01 isolate. Therefore the paprika isolate was categorized as TSWV (Ordinary strain). The nucleotide sequence of the internal transcribed spacer region (ITS region) linked with the N gene of the paprika isolate was also determined, and the presence of an A-U rich region specific for tospovirus was confirmed. Leaves of pepper, tobacco, tomato, and egg plant showing necrotic symptoms were examined to detect the virus with anti-TSWV antibodies using the DIBA method. Both the DIBA method and modified DIBA method using alkali-phosphatase-conjugated IgG against TSWV were successfully identified TSWV from leaves with necrotic symptoms of plants. The modified DIBA method may be promising for effective means of diagnosing diseases of eggplant, which is one of a major vegetable crops in Fukuoka prefecture.

[Key words: Tomato spotted wilt virus, Paprika (*Capsicum annuum*), DIBA, simplified diagnosis]

## 緒 言

トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*: TSWV) は、ブニヤウイルス科トスポウイルス属のタイブウイルスであり、ミカンキイロアザミウマを主としたアザミウマ類による虫媒伝染性と極めて広い宿主範囲を特徴としている。本ウイルスは熱帯～亜熱帯を中心に広く世界に分布し、多くの種類の野菜花き類に甚大な被害

を与えている農業上重要なウイルスである<sup>6)</sup>。TSWVのゲノムは長さの異なる3分節の1本鎖RNAであり、短い方からS、MおよびLRNAと呼ばれている。SRNAにはヌクレオキャプシド (N) 遺伝子および非構造タンパク質遺伝子 (Nss遺伝子) がコードされている。また、両遺伝子間にはA-Uに富む配列をもつInternal transcribed spacer region (ITS領域) が存在し、トスポウイルス属の特徴となっている。

TSWVのわが国における初発生は1972年であり、現在までほぼ全国的に発生が確認されているが、福岡県におけるTSWVの発生は認められていなかった<sup>7)</sup>。1998年に福岡県の施設栽培パプリカにおいて下葉に激しいえそ輪

1) 生産環境研究所病害虫部

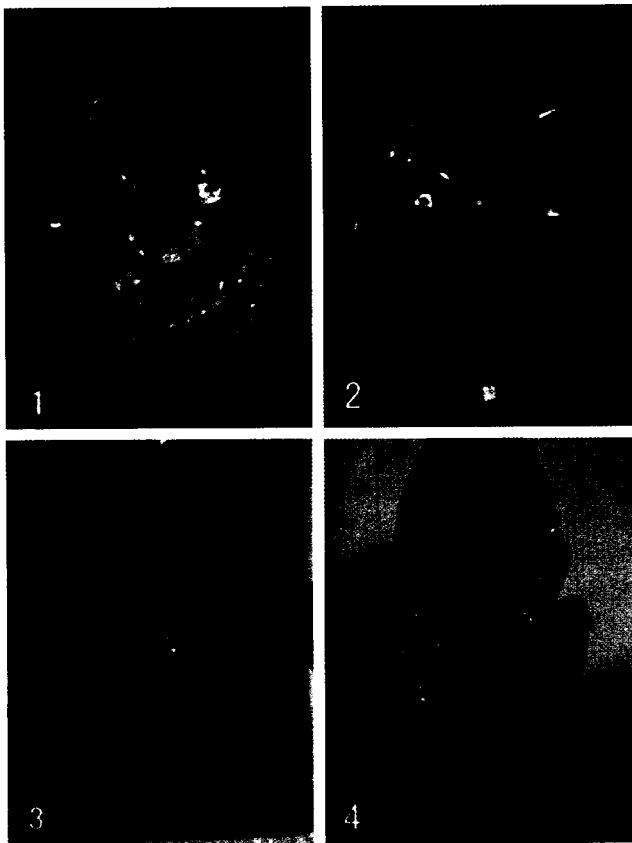
2) 独立行政法人農業技術研究機構九州沖縄農業研究センター

3) 現独立行政法人農業生物資源研究所

紋を生じ、生長点付近が萎縮、枯死する株が発生した。症状からTSWVによるものと考えられたため、原因の究明が重要となった。

トスポウイルス属はTSWVを含め13種のウイルスが確認されている。この内わが国ではTSWV, *Watermelon silver mottle virus* (WSMV: 旧TSWV-W系), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV: 旧TSWV-I系), *Melon yellow spot virus* (MYSV) および *Iris yellow spot virus* (IYSV) の5種の発生が確認されている<sup>13)</sup>。トスポウイルス属の分類はヌクレオキャプシドタンパク質 (Nタンパク質) の血清学的性質またはN遺伝子の塩基配列、もしくは推定されるアミノ酸配列の相同性に基つき分類されている<sup>11), 2)</sup>。

本研究では福岡県で初めて発生したTSWVについて血清学的性質および宿主範囲を検討するとともに、S RNAにコードされているN遺伝子を同定し、N遺伝子から推定されるアミノ酸配列を解析することによりウイルス分離株の分子遺伝学的同定を試みた。また、得られたS RNAのITS領域の塩基配列について検討を加えた。さらに、今後県内の野菜栽培でTSWVの発生が拡大することが懸念されるため市販の抗体を利用したDIBA法によるTSWVの簡易検出法について検討した。



第1図 TSWVによる各種植物の病徴

- 1: ピーマン接種葉のえそ輪紋症状 2: *N. rustica* 上位葉のえそ  
3: *D. stramonium* のモザイク、縮葉 4: トマト接種葉のえそ斑

## 材料および方法

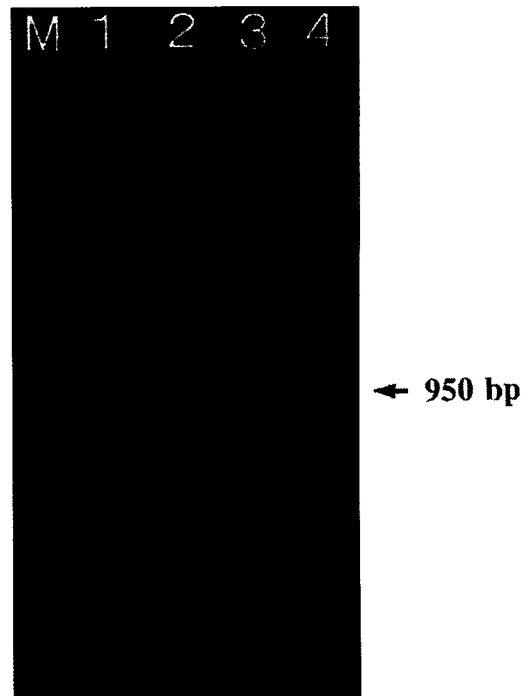
### 1 血清学的ウイルス診断

1998年本県北部の発生圃場から採集した罹病株のウイルス診断は、*Cucumber mosaic virus*, *Pepper mild mosaic virus*, *Potato virus X*, *Potato virus Y* および *Tomato spotted wilt virus* に対する抗血清を用いてDAS-ELISA法<sup>12)</sup>により行った。供試した抗血清はTSWVについてはBIOREVA社 (スイス) のELISA検定用キットを、それ以外はすべて (社) 日本植物防疫協会 (東京) から購入した。

第1表 TSWV福岡分離株に対する指標植物の反応

供試植物 (品種名)	接種葉	位葉
ナス科 ピーマン (早生ハイグリーン)	退線輪紋, えそ	モザイク, 縮葉
<i>Nicotiana benthamiana</i>	モザイク, えそ	退線
<i>N. glutinosa</i>	えそ斑点	えそ斑点
<i>N. rustica</i>	えそ	えそ斑点
<i>Datura stramonium</i>	モザイク, えそ	モザイク, 縮葉
トマト (ハウス桃太郎)	えそ斑点	えそ斑点
ナス (筑陽)	退線, モザイク	—
ペチュニア	えそ	—
ウリ科 キュウリ (ときわ地遣)	えそ斑点	—
アカザ科 <i>Chenopodium amaranticolor</i>	えそ斑点	—
<i>C. quinoa</i>	えそ斑点	—
マメ科 ソラマメ	えそ斑点	—
インゲン (ドーバー)	えそ斑点	—
ササゲ (黒種三尺)	えそ斑点	—
キク科 ヒャクニチソウ	えそ斑点	退線
ヒユ科 センニチコウ	えそ斑点	退線

1) —: 病徴なし



第2図 RT-PCR法によるTSWVの検出

レーン1及び2: *N. rustica* 感染葉由来の全RNAを鋳型とした産物  
レーン3: *N. rustica* 健全葉由来, レーン4: 鋳型なしの対照  
M: サイズマーカー

上段 TSWV BR-01株  
下段 TSWV 福岡パブリカ分離株

```

1
ATGTC TAAGG TTAAG CTCAC TAAGG AAAGC ATTGT TGCTT TGTTC ACACA AGGCA AAGAC CTTGA 65
GTTTG AGGAA GATCA GAATC TGGTA GCATT CAACT TCAAG ACTTT TTGTC TGGAA AACAT CGACC 130
AGATC AAGAA GATGA GCGTT ATTTC ATGTC TGACA TTCCG AAAGA ATCTC CAGAG TATAA TGAAG 195
GTTAT CAAAC AAAGC GATTT TACTT TTGGT AAAAT TAGCA TAAAG AAAAC TTCAG ACAGG ATTGG 260
AGGCA CTGAC ATGAC CTTC A GAAGG CTGTA TAGCT TGATC AGGGT CAGGC TTGTT GAAGA AAC TG 325
GGAAT TCTGA GAATC TCAAT ACTAT CAAAT CTAAG ATTGC TTCCC ATCCT TTGAT TCAAG CCTAT 390
GGATT ACCTC TCGAT GATGC AAAGT CTGTG AGACT TGCCA TAATG CTGGG AGGTA GCTTA CCTCT 455
TATTG CTTCA GTTGA TAGCT TTGAG ATGAT CAGTG TTGTC TTGGC TATAT ATCAG GATGC AAAAT 520
ACAAG GACCT CGGGA TCGAC CCAAA GAAGT ATGAC ACCAA GGAAG CCTTA GGAAA AGTTT GCACT 585
GTGCT GAAAA GCAAA GCATT TGAAA TGAAT GAAGA TCAAG TGAAG AAGGG GAAAG AGTAT GCTGC 650
TATAC TTAGC TCCAG CAATC GTAAT GCTAA AGGGA GTGTT GCTAT GGAAC ATTAC AGTGA AACCT 715
TTAAC AAGTT CTATG AAATG TTGGG GBTTA AAAAG CAGGC AAAAC TCGCA GAACT TGCTT GAA 780

```

### 第3図 スクレオキャプシドタンパク質遺伝子の塩基配列の比較

※福岡株については、TSWV BR-01株と異なる塩基のみを示した。  
スクレオキャプシドタンパク質の開始コドン及び終止コドンは↓で示した。

## 2 ウイルス分離株

供試ウイルスは1998年に発生したえそ輪紋症状を呈したパブリカの罹病葉磨砕液をアカザの1種である *Chenopodium quinoa* に接種し、単病斑分離後、タバコの1種である *Nicotiana rustica* で増殖し、接種源とした。また、分離したウイルスは $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 3 指標植物の反応

分離したウイルスを藤らの方法<sup>5)</sup>に従って、汁液接種法により6科16種の植物に接種した。接種植物はガラス温室内で3週間維持し、接種葉および上位葉での発病の有無を調べた。接種試験は1回当たり各植物3~5株を用い、6~7月および9~10月の計2回繰り返した。

## 4 N遺伝子の塩基配列の同定

TSWVのN遺伝子領域を特異的に増幅するように設計したプライマー（上流プライマー：5'-CTGCTTTAAGC AAGTTCTGC-3'および下流プライマー：5'-AGAGCAAT TGTGTCAAATTTT-3'）を用い、*Nicotiana benthamiana* 感染葉由来の全RNAを鋳型としたRT-PCRを行った。得られた増幅DNAの塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。なお、*N. benthamiana* 葉からの全RNAの抽出は大貫・花田<sup>10)</sup>の方法に準じた。また、RT-PCR法はTsudaら（1994）の方法<sup>1)</sup>に準じ、1.0% (W/V) 濃度のアガロースゲル電気泳動で増幅産物の有無とその大きさを確認した。

## 5 Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域の塩基配列の決定

TSWVのITS領域を特異的に増幅するように設計したプライマー（上流プライマー：5'-TGGAAGATAGACTT TGCCAG-3'および下流プライマー：5'-AACAAAGTTCTA TGAAATGTT-3'）を用い、4と同じ全RNAを鋳型としたRT-PCRを行い、得られた増幅DNAの塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。全RNAの抽出、RT-PCR法およびアガロースゲル電気泳動法は4の方法に

準じた。

## 6 DIBA法によるTSWVの検出

DIBA法は日比らの方法<sup>9)</sup>に準じた。支持体にはポアサイズ0.45 $\mu\text{m}$ のニトロセルロース膜 (ADVANTEC, Toyo Roshi, LTD, Japan) を用い、1次抗体および2次抗体は室温で1時間反応させた。1次抗体は500倍、1,000倍および2,000倍希釈で供試し、2次抗体は3,000倍希釈で供試した。ブロッキング、1次抗体および2次抗体の希釈はTBSTPB [最終濃度0.85% NaCl, 0.02% Tween20, 2.0% (W/V) ポリビニルピロリドン (Sigma社) および0.2% (W/V) Bovine serum albumin (Sigma社) を含む50mM Tris-HCl緩衝液, pH7.6] を用いた。1次抗体には1の血清学的診断で用いた抗TSWV抗体を供試し、2次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG-ヤギIgG (EY laboratories社, San Mateo, CA) を供試した。検出用の発色基質および発色剤にはBCIP / NBT Color Substrate (Promega社, Madison, WI, USA) を供試した。発色の有無は肉眼で観察した。

### (1) 感染葉からの試料液の調整

抗原としてタバコ (*N. rustica*)、ピーマン、ナスおよびトマト感染葉および健全葉を10倍量のTBSTで磨砕後、8,000 $\times$ gで10分間遠心した上清を用いた。遠心上清を原液として5段階希釈で625倍まで希釈し、各希釈液の2 $\mu\text{l}$ をスポットした。なお、感染葉にはウイルス接種後えそ症状を呈した発病葉を供試した。

### (2) DIBA法所用時間短縮化の検討

DIBA法の所用時間の短縮化を目的として1次抗体および2次抗体の処理を兼ねてアルカリフォスファターゼ標識抗TSWV抗体 (1のウイルス診断で用いたELISAキットのコンジュゲート) を供試した。酵素標識抗体の希釈倍率の設定、ブロッキング、反応および洗浄に要する時間は通常のDIBA法と同一の条件とした。

## 結 果

### 1 ウイルスの血清学的診断

抗CMV、抗PMMV、抗PVX、抗PVYおよび抗TSWVの5種類の抗体を用いてDAS-ELISA法により検定を行った結果、抗TSWV抗体に対してのみ陽性反応が認められた (データ省略)。

### 2 指標植物の反応

汁液接種により6科16種の植物の反応を調べた結果、供試植物のすべてが接種葉にえそ症状もしくはモザイク症状を示した (第1図)。また、ナス、ペチュニアを除くナス科の供試植物、キク科のヒャクニチソウおよびヒユ科のセンニチコウでは上位葉にもウイルスが移行し病徴が認められた (第1表)。

### 3 N遺伝子の塩基配列の解析

供試したプライマー対によるRT-PCR法で *N. benthamiana* の感染葉由来の全RNAから約950塩基対のDNA断片が増幅された (第2図)。増幅断片の塩基配列

からウイルス分離株のN遺伝子の配列を同定した結果、774塩基から構成されており、258残基のアミノ酸をコードしていた。分離株のN遺伝子の塩基配列および推定されるアミノ酸配列をTSWV-BR01株（普通系統）のN遺伝子の塩基配列および推定されるアミノ酸配列と比較した結果、互いの相同性はそれぞれ96.7%および98.1%であった（第3図および第4図）。

第4図 ニュクレオキャプシドタンパク質のアミノ酸配列の比較

上段 TSWV BR-01株  
下段 TSWV 福岡パプリカ分離株

```

MSKVKLTKES I VALLTQGGKDLFEEDONLVAFNFKTFGLEI DQ I KKMSV      50
                                                                 A
ISCLTFLKNRQS I MKV I KQSDFTFGK I T I KKTSDR I GGTDMTFRRDLSL I 100
                                                                 A
RVRLVEETGENSENLT I KSK I ASHPL I QAYGLPLDDAKSVRLA I M LGGSL 150
                                                                 V
PL I ASVDSFEM I SVVLA I YQDAKYKDLG I DPKKYDTKEALGKVC T VLKSK 200
                                                                 R
AFEMNEDQVKKGKEYAA I LSSSNPNAKGSVAMEHYSETLKNFYEMFVGVKK 250
                                                                 I
OAKLAELA 258
                                                                 T
    
```

※福岡株についてはTSWV BR-01株と比較し、相違点のみを示した。

```

                                                                 65
UCCUGCUUUUGUCCAGGUUUUCUAAUUAUGUUUAUGUUUUUUUUUUUUUUUCUUUUACUUGAAGUUUUUUU
                                                                 130
UCUGUUUGUGCAUUUUUUUAAGUUCUUCUGUUUUUAUAGAAACCAUAAAAUAAAAUAAAAUAAAA    150
AAUCAAUUUUUGAUAUAAAACAAAAUCAAUUUUUUUAAGUAAACAAAAUAAAAUAAAAUAAAAUAAAAU
                                                                 195
CAAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
                                                                 260
GGGUUUUGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
                                                                 325
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
                                                                 390
GUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
                                                                 455
AAAU 459
    
```

第5図 福岡パプリカ分離株のS RNAのITS領域の塩基配列  
注) A-Uに富む領域を下線で示した。

4 ITS領域の塩基配列

*N. benthamiana*の感染葉由来の全RNAから供試したプライマー対を用いてRT-PCR法で増幅したDNA断片の塩基配列を第5図に示した。

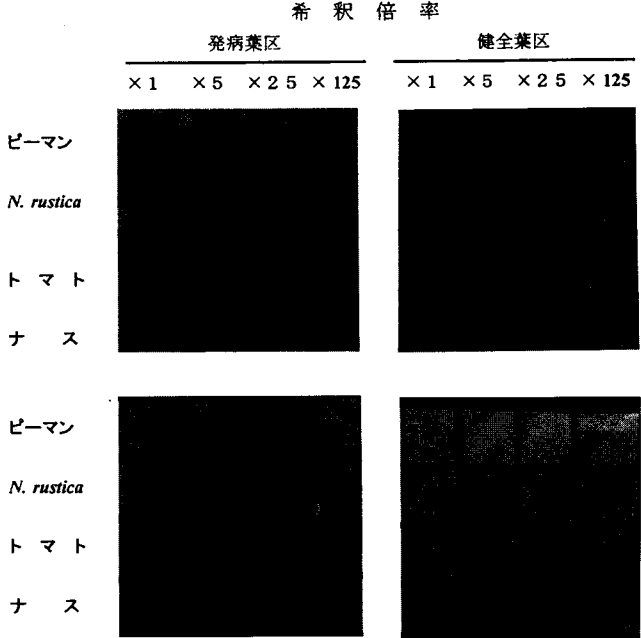
5 DIBA法によるTSWVの検出

DIBA法および酵素標識抗体を1次抗体としたDIBA法によりタバコ、ピーマン、ナス及びトマト発病葉からのTSWV検出を試みたところ、DIBA法では1次抗体の500倍、1,000倍および2,000倍のいずれの希釈倍率でも125倍希釈液をスポットした区まで発色が認められた。DIBA法の变法では500倍の抗体希釈区で125倍希釈試料液をスポットした区まで陽性反応が認められたが、通常のDIBA法と比較して試料の各希釈倍率区で発色程度が劣っていた。なお、健全葉由来の試料では原液のスポッ

ト区で植物由来の色素と考えられるスポットが残った以外はいずれのスポット区においても発色は認められなかった（第6図）。

考 察

福岡県のパプリカに激しい退緑輪紋やえそ症状を引き起こした病原ウイルスは、5種の抗体を用いたDAS-ELISAによる診断の結果、TSWVであることが明らかとなった。ウイルス分離株は、汁液接種により6科16種の供試植物すべてに感染した。このようにトマト、*N. glutinosa*、センニチコウ等の指標植物を含む供試植物の病徴がこれまでのTSWVの宿主範囲に関する報告と一致していたことは、本分離株がTSWVに属するという血清学的な調査結果を支持するものである。また、分離株のN遺伝子の塩基配列および配列をもとに推定されるNタンパク質のアミノ酸配列は、TSWV（普通系統）として国際的に最も研究されているTSWV-BR01株と比較したところ、それぞれ96.7%および98.1%の相同性を有していた。これに対して同属他種でNタンパク質に対する血清型 (serogroup) がTSWVと同じGroundnut ringspot virus (GRSV) ではN遺伝子およびNタンパク質のアミノ酸配列はそれぞれ78.4%および81.4%であった<sup>2)</sup>。トスポウイルス属の分類ではN遺伝子の相同性が90%以上ならば同一系統、80~90%ならば宿主範囲等の性質を併せて系統か種かを検討する。80%未満であれば、他種として扱うことができる<sup>16)</sup>。以上のことから、本分離株をTSWV（普通系統）と同定した。花田らは、国内の野菜花き類に発生したTSWVについて原株や植物における病徴が互いにほとんど同一であることやNタンパク質のアミノ酸配列において互いに大きな違いが認められなかったことから、これまでに国内で発生しているTSWVはす



第6図 DIBA法（上段）及びDIBA法の变法（下段）によるTSWVの検出  
注) 抗体濃度はDIBA法では2,000倍、变法では500倍希釈

べて普通系統であり、新系統の発生を含めて複数の系統の存在の可能性が極めて低いことを示唆した<sup>7)</sup>。福岡県のTSWV分離株が普通系統に属するという本試験の結果は、この推定を裏付けるものと考えられる。

今回、TSWV分離株のSRNA上のITS領域の塩基配列を調べたところ、トスポウイルス属に特徴的なA-Uに富む配列が認められた。このA-Uに富む配列はヘアピン構造をとることによりSRNAにコードされた2種の遺伝子の発現への関与が推測されている<sup>16)</sup>。ITS領域は遺伝子をコードしていないため、変異が比較的大きく、種内系統の解析に用いられる<sup>3)</sup>。わが国で発生したTSWV株についてN遺伝子を用いた系統解析の結果2つのグループに分かれることが示唆されたが<sup>12)</sup>、地理的由来や感染植物の違いは明瞭ではなかった。本知見を基にITS領域の塩基配列情報を蓄積することで、わが国に発生しているTSWVの特性がより明らかになると考えられる。

一般的な植物ウイルスの診断には、ウイルス特異抗体によるELISA法やDIBA法などの血清学的手法が簡便な診断技術として広く利用されている。藤らは、精製したTSWVのNタンパク質を抗原として作成したポリクローナル抗体を用いたDIBA法によりトマトおよびキクの発病葉からウイルス検出が可能であることを報告した<sup>4)</sup>。本試験でも、市販の抗体を用いたDIBA法によりタバコ、ピーマン、ナスおよびトマトの発病葉からTSWVを検出できることを確認した。従って、抗体を作出する設備が整っていない機関でも購入した抗TSWV抗体を用いたDIBA法によるTSWV診断が可能である。また、酵素標識抗体を用いてDIBA法の所用時間の短縮について検討したところ、通常のDIBA法と比較するとやや感度が劣るものの、十分に検出が可能であることが示唆された。これにより2時間程度の操作時間の短縮が可能になると考えられる。今後は他の市販の抗TSWV抗体との比較やDIBA法よりもさらに簡便な方法のTissue Printing Immuno-assay法(TPI法)<sup>10)</sup>についても検討を加える必要がある。今回の試験においてDIBA法は発病葉を試料とすればTSWVの検出が可能であった。しかし無病徴株の葉からの検出については未検討である。藤らはTSWVによるキクえそ病の血清学的診断法について検討し、DIBA法およびELISA法では無病徴(潜在感染)株の葉からウイルス検出が不可能であったと報告した<sup>5)</sup>。このことと併せて、現時点での診断の際には発病葉を試料する必要があると考えられる。

## 謝 辞

本研究を行うに当たりウイルス株の収集に協力いただいた福岡県病害虫防除所國武孝弘主任技師、河口道功技師および中堀裕二技師に対し厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) de Avila, A. C., C. Huguenot, R. de O Resende, E. W. Kitajima, D. Goldbach, and D. Peters. (1990) Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *J. GEN. Virol.* 71 : 2801-2807.
- 2) de Avila, A. C., P. de Hann, R. Kormelink, R. de O. Resende, D. Goldbach, and D. Peters. (1993) Classification of tospovirus based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J. Gen. Virol.* 74 : 153-159.
- 3) Dewey, R. A., L. C. Semorile, O. Grain, and J. V. Crisci. (1997) Cladistic analysis of Tospovirus using molecular characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8 : 11-32.
- 4) 藤 晋一 (1997) 愛知県に発生したトマト黄化えそウイルスの諸特性. *愛知農総試研報* 29 : 151-156.
- 5) 藤 晋一 (1998) キクえそ病 (TSWV) の診断. *今月の農業* 6月号 : 42-46.
- 6) German, T. L., D. E. Ullman, and J. W. Moyer (1992) Tospoviruses: Diagnosis, Molecular biology, and Vector relationships. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30 : 315-348.
- 7) 花田 薫 (1999) 西日本におけるトマト黄化えそウイルス (TSWV) の発生動向とその特徴. *植物防疫* 53 : 312-315.
- 8) 花田 薫 (2001) 植物ウイルスの遺伝子診断. *植物防疫* 55 : 491-494.
- 9) 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.
- 10) Lin, N. S., Y. H. Hsu, H. T. Hsu (1990) Immunological detection of plant viruses and mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80 : 824-828.
- 11) 大貫正俊・花田 薫 (1996) RT-PCR法を利用したサツマイモウイルス病の高感度簡易診断. *植物防疫* 50 : 102-105.
- 12) 奥田 充・酒井淳一・花田 薫 (2002) 九州で発生したトマト黄化えそウイルス (TSWV) のSRNA3'末端の比較. *九病虫研報* 56 : 21-24
- 13) 奥田 充 (2002) 我が国におけるトスポウイルス病の発生状況. *植物防疫* 56 : 18-21.
- 14) 高橋義行 (1988) ELISA法—その特徴と実施上の注意点—. *植物防疫* 42 : 88-92.
- 15) Tsuda, S., I. Fujisawa, K. Hanada, S. Hidaka, K. Higo, I. Kameya, and M. Tomaru (1994) Detection of tomato spotted wilt virus S RNA in individual thrips by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 60 : 99-103.
- 16) 津田新哉 (1999) 特集: 植物ウイルス 3. トマト黄化えそウイルス —植物と昆虫に感染する *Bunyaviridae*科ウイルス— *ウイルス* 49(2) : 119-130.