

第6章 総合論議

テンサイは北海道で約7万ha栽培され、畑作の基幹作物として重要である。テンサイそう根病はテンサイの重要病害の一つであり、日本では1965年に初めて発見され、現在、20%の圃場が汚染されている(阿部, 1987)。罹病テンサイは根中糖分が減少し、激しい場合は著しく減収するため、テンサイの安定生産を阻害している。そう根病はBNYVVによって起こるウイルス病で、土壌菌 *Polymyxa betae* によって媒介されるため防除が困難で、抵抗性品種の開発等が進められている(Asher, 1993)。

BNYVVは、通常4種のRNA(RNA-1~RNA-4)から成り、RNA-1は複製、RNA-2は粒子形成、菌伝搬性、細胞間移行、RNA-3は病原性、RNA-4は菌伝搬性に関与していることが明らかにされている(Richards and Tamada, 1992)。日本、中国、フランスの一部の地域の分離株にはRNA-5が含まれている(Kiguchi *et al.* 1996; Koenig *et al.* 1997b; Miyanishi *et al.* 1999)。本研究では、日本産分離株の遺伝子構造解析、フランス産分離株との比較、欠失変異株の解析を行い、遺伝子組換えによる抵抗性植物の作出を試みた。さらに、BNYVVのRNA-3, RNA-4, RNA-5を検出するための遺伝子診断法を確立した。

第3章第1節では、北海道産分離株(BNYVV-S)に含まれるRNA-1~RNA-4, BNYVV-D-5, -R83, -S44, -K79分離株に含まれるRNA-5の塩基配列を決定し、各RNAの遺伝子構造を明らかにし、これまでに報告された塩基配列と比較した。日本産とフランス産(BNYVV-F2)とを比較した結果、RNA-1~RNA-4の塩基の違いはそれぞれ、1.7%, 4.1%, 2.9%, 3.6%で、アミノ酸の置換の頻度は0.5~7.0%と、ORFごとにさまざまであった。Koenigらのグループ(Kruse *et al.* 1994; Koenig *et al.* 1995)は、RFLPとSSCP解析によって世界各地に分布するBNYVVを大きく2つのグループ(A型とB型)に分けた。それによるとF2はB型に属し、ユーゴスラビア産分離株(BNYVV-Yu2)はA型に属する。本研究から、S分離株は、F2よりYu2に近縁であり、A型に属すると考えられた。複数の分離株で比較が可能な領域について、A型とB型の分離株の塩基配列の違いを比較すると、CP遺伝子で3.5%、TGB領域で3.2~3.7%、RNA-3で2.7~2.9%、RNA-4で1.5~3.4%であった。これに対して、A型に属する分離株間の塩

基配列の違いは、CP遺伝子で0.7~1.4%、TGB領域で1.6%、RNA-3で1.5%、RNA-4で3.0%であった。

ヨーロッパの分離株のそれぞれのグループ内の塩基配列の差異は非常に小さいが、それに比べると、同じA型に属するBNYVV-SとBNYVV-Yu2、中国産分離株(BNYVV-NM)とのCP遺伝子、BNYVV-SとBNYVV-Yu2とのTGB領域の塩基配列の違いは大きく、BNYVV-Sとドイツ産分離株(BNYVV-G1)とのRNA-4の違いはA型とB型との違いに匹敵するほど大きかった。RNA-4のグルーピングについてはさらに検討を要する。日本では、そう根病は1965年に初めて発見され、その後北海道の主要なテンサイ栽培地帯に広がっている(阿部, 1987)。北海道には、CPの塩基配列からB型に属すると考えられる分離株も存在し(Miyanishi *et al.* 1999)、さらに、日本産分離株のRNA-5は、塩基配列の違いから少なくとも2つのグループに分けられ、フランス産分離株のRNA-5とは異なる(Miyanishi *et al.* 1999)。BNYVVの分離株間の塩基配列の違いや変異を明らかにするためには、今後さらに多くの分離株の塩基配列の解析、直接的な比較が必要である。

第3章第2節では、欠失変異について解析を行った。BNYVVは、自然界では *Polymyxa betae* によって伝搬されるが、汁液による機械的接種を繰り返すとRNA-2, RNA-3, RNA-4, RNA-5には内部欠失変異が生じる(Richards and Tamada, 1992)。本研究では、まず、2種のRNA-2欠失変異株(S-0a, G-0b)(Tamada and Kusume, 1991)について解析したところ、いずれもCP読み過ぎタンパク質のC末端領域に480および579塩基の欠失が認められた。これらは菌伝搬性が欠如していた。さらに、内部欠失変異のメカニズムを解析するため、野外分離株について汁液による継代接種を行い、欠失変異の出現と欠失領域について検討した。その結果、40株の野外分離株のうちの12分離株からRNA-3の変異が、13分離株からRNA-4の変異が検出された。また、RNA-5を含む11分離株のうちの2分離株からRNA-5の変異が検出された。これらの変異はすべて内部欠失で、欠失はORF内に起こっていた。一方、単一局部病斑分離を行って得た正常のRNA-3を含む分離株を10~15回継代させても欠失は起こらず、欠失変異の起こる頻度は高くなかった(玉田, 未発表)ことから、汁液接

種で得られた欠失変異は、圃場から分離した野外分離株に少量含まれていたものが継代接種中に増幅されたものと考えられる。Bouzoubaa *et al.* (1991)は、BNYVVの感染性クローンからの転写産物をキノアに接種し、RNA-3とRNA-4の欠失変異の出現について解析した結果、1回あるいは数回の継代でRNA-3、RNA-4の欠失変異が検出されたと報告している。このように、欠失変異がなぜどれぐらいの頻度で起こるかについては、さらに解析が必要である。

本研究で得られた内部欠失変異では、欠失のジャンクションが近接した分離株があり、変異の集中している領域 'hot spot' や反復配列の存在が認められたが、Turnip crinkle virus (TCV) にみられるモチーフ配列 (Cascone *et al.*, 1990 ; 1993) , スプライシングやイントロンに特徴的な配列 (Brown, 1986) などの顕著な特徴は認められなかった。BNYVVでは、RNAの複製の間にジャンクションの反復配列や高次構造による複製酵素のジャンプ (template switching) が起こったと考えられ、変異のメカニズムは「複製でのコピーチェイス」 (Simon and Bujarski, 1994) であることが示唆される。BNYVVでは欠失変異が多く生じていた。この現象の生物学的意義は不明であるが、ゲノムの中に変異を含みながら自然界で多様性を保っていると考えられる。

また、RNA-3の欠失変異は、*P. betae* 菌でも伝搬され、正常のウイルスと同様にテンサイに感染し増殖することができるが、そう根症状は示さない (Tamada *et al.* 1999) 。さらに、欠失RNA-3は野生株に対して干渉作用のあることが認めれており、RNA-3の欠失変異は弱毒ウイルスとして機能する可能性があり、応用が期待される。

第4章では、ウイルス抵抗性植物を得るため、BNYVVの細胞間移行に関与するTGBの遺伝子から、6種類の遺伝子を構築して *Nicotiana benthamiana* に導入し、形質転換体の次世代 (R₁世代) のウイルス抵抗性を汁液接種により検定した。P13とP15遺伝子およびP13に変異を導入した遺伝子とP15を導入した植物の一部の系統 (M1315-2, 4, M1315M-1, 2, 7) は、非形質転換体に比べて上位葉でのウイルス検出率が低く、抵抗性を示した。これに対して、P42, P13, P15遺伝子、P42の変異遺伝子を導入した植物は抵抗性を示さなかった。本研究で得られた抵抗性はウイルス移行の遅延である。試験管に移植後の *N. benthamiana* の生育期間は約40

日であり、20~30日のウイルス移行の遅延は、抵抗性として十分であると考えられる。テンサイにこの遺伝子を導入し発現させた場合に同様の現象が起こるかどうかはわからない。

移行タンパク質遺伝子を導入した形質転換植物のウイルス抵抗性は、いくつかのRNAウイルスについて報告されている (Malyschenko *et al.* 1993 ; Lapidot *et al.* 1993 ; Beck *et al.* 1994 ; Seppanen *et al.* 1997) 。これらの形質転換体では、変異体の移行タンパク質も野生型の移行タンパク質とほぼ同様に機能して競合が起こり、全身へのウイルスの移行が阻害され、タンパク質レベルで抵抗性が起こっていると考えられている (Lapidot *et al.* 1993 ; Seppanen *et al.* 1997) 。TGBをもつ他のウイルスでは、3番めのタンパク質は抵抗性に関与していないが、BNYVVでは、3番めのタンパク質P15が抵抗性に大きく関与していると考えられる。BNYVVのP15を過剰に発現させるとウイルスの細胞間移行が阻害され、P15の変異は野生型のウイルスに complement されなかった (Bleykasten-Grosshans *et al.* 1997) 。これには、同じサブゲノムRNAから転写されるP13とP15の遺伝子の相対比の制御が関与していると考えられている (Lauber *et al.* 1998) 。このような現象からみると、本研究でP15単独の形質転換により抵抗性が現れてもよいはずである。しかし、実際はP15単独では抵抗性は得られず、P13とP15の複合体を導入した形質転換体のみが抵抗性を示した。移行タンパク質遺伝子導入による抵抗性のメカニズムを明らかにするためには、さらに、遺伝子産物等の詳細な解析が必要である。

第5章では、遺伝子診断法について検討した。BNYVVを構成する4種のRNAは異なる機能をもっており、機械的に接種した室内分離株からはこれらのRNAの欠失変異が検出される (Richards and Tamada, 1992) 。また、通常4種類のRNAに加えてRNA-5をもつ分離株は、通常分離株よりさらに病原性が強い (Tamada *et al.* 1996a) 。RNA種を検出するための遺伝子診断は、診断においても遺伝子解析においても重要である。

まず、第5章第1節では、遺伝子診断法を確立するため、ハイブリダイゼーションによる方法として、BNYVVのRNA-1~RNA-5のcDNAクローンをランダムプライム法 (Feinberg and Vogenstein, 1983 ; 1984) によりジゴキシンゲン標識し、ウイルスRNAを検

出する方法を検討した。BNYVVの5種類のRNAは、これらのcDNAプローブを用いてノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより簡便に検出、同定でき、ウイルス分離株のRNAの解析に用いることができた。BNYVVのRNA-3, RNA-4, RNA-5の間では、ハイブリダイゼーションの条件によってクロス・ハイブリダイゼーションが起こったが、これは、3'末端領域の約200塩基の塩基配列の相同性(約70%)によるものと考えられた。ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションよりドット・ブロット・ハイブリダイゼーションの方が簡便で診断に適しているが(Miller and Martin, 1988), BNYVVの場合にはドット・ブロット・ハイブリダイゼーションではクロスハイブリダイゼーションが起こり、さらに、非特異的なプラスのシグナルが検出され、RNA種の検出に適当ではなかった。この点についてはさらに検討が必要である。

BNYVVのツルナ感染葉から直接抽出した核酸からハイブリダイゼーションのシグナルが得られたが、テンサイの根から直接調製した核酸からは非特異バンドが検出され、目的とするバンドはかすかであるか、ほとんど検出されなかった。これは、テンサイの根のウイルス量が少ないか、あるいは、検出を阻害する物質が含まれているためと考えられた。そこで、本研究では、超遠心により濃縮した標品から核酸を調製することにより検出が可能となった。根から直接調製したサンプルでは、ハイブリダイゼーションでの阻害物質も報告されており(Borja and Ponz, 1992), それを除去する核酸調製法の検討も必要である。

本研究で得られたドット・ブロット・ハイブリダイゼーションでのBNYVVのRNAの検出感度は10pgであった。この感度は、植物RNAウイルス、ウイロイドで報告されている感度と同等か、少し劣った。テンサイ根でのウイルス量は通常少なく、ウイルスは細根や主根の一部に局在するが、本研究では、1~10ngのRNAで十分な結果が得られた。この感度は日常的な診断には十分であるが、テンサイの根からウイルスRNAを検出する場合、ウイルスを濃縮する必要があり、複雑で手間がかかり、多サンプルを検定することができないので、さらに簡便で直接的な手法の開発が必要である。

そこで、第5章第2節では、多検体処理が可能なRT-PCRによりBNYVVのRNAを検出する手法を検討

した。RNA-3, RNA-4, RNA-5を検出するためのプライマーを設定し、その条件について検討した。テンサイの根にはPCRの阻害物質が含まれており、阻害物質の影響を除くための核酸の調製法の検討が必要であった。また、プライマーの選択は検出の感度、特異性に重要な因子であると考えられた。さらに、土壤にテンサイを移植してウイルスを捕捉する方法(内野ら, 1990; 阿部ら, 1991)により、テンサイの根からELISAと同等以上の感度でウイルスRNAを検出でき、土壤検診が可能となった。

本研究で得られたRT-PCRによるBNYVVのRNAの検出感度は、RNA-3に対するプライマー3B/3Dを用いた場合、1pgであった。この感度は、BNYVVで報告されている感度(Henry, 1995; Fenby *et al.* 1995)とほぼ同じであった。しかし、他の植物RNAウイルスについてWetzel *et al.* (1991), Kohnen *et al.* (1992), Lim *et al.* (1993)によって報告されている1-10fgの検出感度より劣った。

遺伝子診断法は、BNYVVの遺伝子解析はもとより、本病の生態を研究する上でも不可欠な技術である。RT-PCRは、ジゴキシゲニン標識プローブを用いたハイブリダイゼーションによる検出法より簡便で非特異反応がなく、感度が高まり、BNYVVの実用的な遺伝子診断法として適当である。本研究で得られた検出感度は、他の報告に比べると高くはなかった。適切な核酸調製法、検出法等を組み合わせることで、特異性と感度をさらに高めることが可能であり、さらに検討が必要である。

摘要

1. *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) はテンサイそう根病の病原ウイルスで、*Polymyxa betae* によって媒介される。BNYVV分離株は4~5種類のRNAゲノムから構成されている。BNYVVの日本産分離株 (BNYVV-S) のRNA-1~RNA-4およびBNYVV-D-5, -R83, -S44, -K79の分離株に含まれていたRNA-5の全塩基配列を決定した。その結果、RNA-1は6746塩基で、237kdaのタンパク質 (P237) をコードする一つのORFを有していた。P237にはN末端側からメチルトランスフェラーゼ・ドメイン、dNTP結合・ドメイン、ポリメラーゼ・ドメインの、ウイルスゲノムの複製に機能するドメインを有していた。RNA-2は4609塩基で、6個のORFを有し、5'末端からORF1は21kdaの外被タンパク質 (CP), ORF2にはCPのシストロンのアンバー終止コドンからその読み過ぎタンパク質として54kdaがコードされている。これはCPとの融合タンパク質75kda (P75) として翻訳される。ORF3, 4, 5には、それぞれ42kda (P42), 13kda (P13), 15kda (P15) の、トリプル・ジーン・ブロック (TGB) と呼ばれるタンパク質がコードされていた。ORF6には、システイン豊富な14kdaのタンパク質 (P14) がコードされていた。RNA-3は1774塩基で、25kdaのタンパク質 (P25), RNA-4は1465塩基で、31kdaのタンパク質 (P31), RNA-5は1347~1342塩基で、26kdaのタンパク質 (P26) をそれぞれコードしていた。以上のRNA-1~4の遺伝子構造は、すでに報告のあるフランス産分離株F2のそれと酷似していた。

2. BNYVV-Sと-F2の塩基配列を比較すると、RNA-1で1.4%, RNA-2で4.1%, RNA-3で2.9%, RNA-4で3/6%の違いがみられた。各ORFのアミノ酸の違いは、P237で1.4%, CPで2.1%, P42で0.5%, P13で1.7%, P15で3.0%, P14で7.0%, P25で6.4%, P31で3.5%あった。それに対してS株とユーゴスラビア株 (Yu2) のCPとTGBの塩基レベルの違いはそれぞれ0.7%, 1.0%であった。このようにS株はF2株よりYu2株に近縁であることがわかった。Koenig *et al.* (1995) の類別に従うとF2はB型に属するのに対して、S分離株はYu2株と同様、A型に属すると考えられた。日本から分離された4種のRNA-5には、わずかの差 (0.3~0.9%) がみられたが、フランスから分離されたRNA-5とは、塩基レベルで3.5~3.6%

、アミノ酸レベルで3.9~4.8%の違いがみられた。

3. 汁液接種で継代接種により生じたBNYVVの欠失変異株について解析した。2種のRNA-2変異株 (480~579塩基欠失) の欠失領域について解析した結果、いずれもCP読み過ぎタンパク質のC末端領域に欠失が生じていることがわかった。40の野生分離株から継代接種によって生じた13種のRNA-3変異株、13種のRNA-4変異株、3種のRNA-5変異株について解析したところ、すべてでORF内に欠失が生じていた。欠失塩基数は、RNA-3では69~607塩基、RNA-4では303~549塩基、RNA-5では303~366塩基であった。欠失領域のジャンクション近傍の塩基配列をみると、いくつかの分離株に4~16塩基の一部不完全な反復配列が認められ、また、欠失のジャンクションの集中している領域があったが、他の変異には顕著な特徴が認められなかった。変異の生じるメカニズムとして、コピー・エラーが考えられる。

4. 形質転換によりウイルス抵抗性植物を得るため、BNYVVのRNA-2にコードされている3つのTGB遺伝子 (P42, P13, P15) をそれぞれ単独、または組み合わせて、アグロバクテリウムにより *Nicotiana benthamiana* に導入した。その結果、P13とP15の遺伝子をつないだ遺伝子、P13の変異遺伝子とP15遺伝子とをつないだ遺伝子を導入した *N. benthamiana* の一部の系統で、接種葉から上位葉へのウイルスの移行が遅れる傾向が認められ、抵抗性が獲得された。しかし、P42, P13およびP15をそれぞれ単独で導入した植物は抵抗性を示さなかった。

5. BNYVVの5種類のRNAのcDNAクローンをジゴキシゲニン標識してプローブとして用い、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより各ウイルスRNAを特異的に検出することができた。ドット・ブロット・ハイブリダイゼーションでは10pgのRNAの検出が可能であった。テンサイ根から直接核酸を抽出した場合には非特異反応がみられ、検出が不十分であったが、サンプルを濃縮することにより検出が可能となった。

6. RT-PCRによってBNYVVのRNA-3, RNA-4, RNA-5を検出するためのプライマーを設計した。検

出感度は1pgであった。テンサイの根から効率よく検出するための核酸抽出法を検討し、土壌検診法を確立した。RT-PCRの検出感度はELISAと同等またはそれ以上であった。この手法を用いて北海道内におけるRNA-5の分布を明らかにした。

Summary

Sequence analysis of Japanese isolates of BNYVV and comparison with European isolates

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) is a causal agent of rhizomania of sugarbeet and is transmitted by *Polymyxa betae*. Isolates of BNYVV contain four or five RNA species. Complete nucleotide sequences of RNA-1,-2,-3 and -4 of a Japanese isolate (BNYVV-S) and RNA-5 of three Japanese isolates were determined. RNA-1 (6746 nucleotides (nts)) encoded one open reading frame (ORF) of 237kDa polypeptide (P237). P237 possessed domains needed for virus genome replication. RNA-2 (4609 nts) encoded six ORFs. ORF1, 5'-proximal ORF, is the coat protein of 22kDa, followed by an in-phase 54k ORF (ORF2), which is expressed by translational readthrough of the CP cistron amber termination codon (readthrough protein, P75). ORF3, 4 and 5 encoded three proteins, 42kDa (P42), 13kDa (P13) and 15kDa (P15) known as the triple gene block (TGB). ORF6 encoded cystein-rich 14kDa protein (P14). RNA-3 (1774 nts) and RNA-4 (1465 nts) encoded 25kDa protein (P25) and 31kDa protein (P31), respectively. RNA-5 species were between 1342 and 1347 nts long and encoded 26kDa protein (P26).

Nucleotide sequence differences between BNYVV-S and the French isolate (BNYVV-F2) were 1.4% (RNA 1), 4.1% (RNA-2), 2.9% (RNA-3) and 3.6% (RNA-4). Amino acid sequence differences between them were 1.4% (P237), 2.1% (CP), 0.5% (P42), 1.7% (P13), 3.0% (P15), 7.0% (P14), 6.4% (P25) and 3.5% (P31). There were 0.3-0.9% sequence differences in RNA-5 of four Japanese isolates and 3.5-3.6% between the Japanese and French P isolates. Nucleotide sequence differences of CP and TGB regions between BNYVV-S and Yugoslavian isolate (BNYVV-Yu2) were 0.7% and 1.0%, respectively, indicating that BNYVV-S is more closely related to Yu2 than to F2. Based on sequence differences, BNYVV-S and Yu2 belong to the A type, whereas BNYVV-F2 belongs to the B type.

Sequence analysis of spontaneous deletion mutants of BNYVV

Deletion mutants generated during serial passages of BNYVV by mechanical inoculation on *Tetragonia expansa* leaves were analyzed. Two mutants of RNA-2 lacked 480 and 579 nts of the readthrough region of P75. Internal deletions with various sizes from 69 to 607 nts were found in each ORF of RNA-3 (11 isolates), RNA-4 (13 isolates) and RNA-5 (2 isolates) in 40 field isolates. In some mutants, deletion junction sites were very close. In some other mutants, repeated sequences of 4 to 16 nts, some of which were incomplete, were found in deletion junctions, suggesting that these mutations would occur by a copy choice mechanism.

Production of virus resistant plants by gene transformation

TGB genes encoded by RNA-2 were introduced into *Nicotiana benthamiana* using *Agrobacterium*, and virus resistance was tested by mechanical inoculation on leaves. Some plants transformed with P13 and P15 or mutated P13 and wild-type P15, showed resistance, but plants transformed with each of P42, P13 and P15 were susceptible. Symptom development in resistant plants was delayed as compared with control non-transformed plants.

Diagnosis of BNYVV by nucleic acid hybridization and RT-PCR

cDNA clones corresponding to five RNAs of BNYVV were used as digoxigenin-labeled probes. Suitable conditions for detection of each RNA in leaves and roots of sugarbeet were examined. The limit of detection was about 10pg of RNA by dot blot hybridization. Each RNA present in BNYVV isolates was easily detected by northern blot hybridization.

To detect RNA-3, RNA-4 and RNA-5 of BNYVV by RT-PCR, primer combinations and sample preparation methods were examined. The limit of detection was about 1pg RNA. Sensitivity of detection by RT-PCR is similar or higher than that of ELISA. Smaller RNA species were detected from roots of sugarbeet seedlings grown in infested soils. Geographical distribution of BNYVV containing RNA-5 in Hokkaido was surveyed by RT-PCR.

引用文献

- 阿部秀夫 (1987) テンサイそう根病のウイルス媒介者, *Polymyxa betae* の生態と防除に関する研究, 北海道立農業試験場報告, 60, 1-99.
- Abe, H. and Tamada, T. (1986) Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 52, 235-247.
- 阿部秀夫, 齊藤美奈子, 玉田哲男 (1991) テンサイそう根病の簡易土壌検診法, てん菜研究会報, 33, 68-75.
- Asher, M. J. C. (1993) Rhizomania. The sugar beet crop science into practice (in Cooke, D. A. and Scott, R. K., eds). Chapman and Hall, London, pp.331-346.
- Bartsch, D., Schmitt, M., Pohl-Orf, M., Haag, C. and Schuphan, I. (1996) Competitiveness of transgenic sugar beet resistant to beet necrotic yellow vein virus. *Molecular Ecology*, 5, 199-205.
- Baulcombe, D. C. (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell*, 8, 1833-1344.
- Beck, D. L., Van Dolleweerd C. J., Lough, T. J., Balmori, E., Voot, D. M., Andersen, M. T., O'Brien, I. E., and Forster, R. L. (1994) Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 10310-10314.
- Benvenuto, E., Ordas, R. J., Tavazza, R., Ancora, G., Biocca, S., Cattaneo, A., and Galeffi, P. (1991) 'Phytoantibodies': a general vector for the expression of immunoglobulin domains in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 17, 865-874.
- Bleykasten-Grosshans, C., Guilley, H., Bouzoubaa, S., Richards, K. E. and Jonard, G. (1997) Independent expression of the first two triple gene block proteins of beet necrotic yellow vein virus complements virus defective in the corresponding gene but expression of the third protein inhibits viral cell-to-cell movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, 240-246.
- Borja, M. J. and Ponz, F. (1992) An appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leafroll virus. *Journal of Virological Methods*, 36, 73-83.
- Bouzoubaa, S., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. E. and Putz, C. (1985) Nucleotide sequence analysis of RNA-3 and RNA-4 of beet necrotic yellow vein virus, isolates F2 and G1. *Journal of General virology*, 66, 1553-1564.
- Bouzoubaa, S., Guilley, H., Jonard, G., Jupin, I., Quillet, L., Richards, K. E., Scheidecker, D. and Ziegler-Graff, V. (1988) Genome organization and function of beet necrotic yellow vein virus. *Developments in Applied biology II. Viruses with fungal vectors.* (Cooper, J. I. and Asher, M. J.C., eds.) Welles-bourne: Association of Applied Biology, pp.99-110.
- Bouzoubaa, S., Niesbach-kloesgen, U., Jupin, I., Guilley, H., Richards, K. E. Jonard, G. (1991) Shortened forms of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 and RNA-4: internal deletions and a subgenomic RNA. *Journal of General Virology*, 72, 259-266.
- Bouzoubaa, S., Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G. and Richards, K. E. (1987) Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-1. *Journal of General Virology*, 68, 615-626.
- Bouzoubaa, S., Ziegler, V., Beck, D., Guilley, H., Richards, K. E. and Jonard, G. (1986) Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-2. *Journal of General virology*, 67, 1689-1700.
- Brown, J. W. S. (1986) A catalogue of splice junctions and putative branch point sequences from plant introns. *Nucleic Acids Research*, 14, 9549-9559.

- Burgermeister, W., Koenig, R., Weichi, H., Sebald, W. and Lesemann, D.E. (1986) Diversity of the RNAs in thirteen isolates of beet necrotic yellow vein virus in *Chenopodium quinoa* detected by means of cloned cDNAs. *Journal of Phytopathology*, 115, 229-242.
- Cascone, P. J., Carpenter, C. D., Li, X. H. and Simon, A. E. (1990) RNA recombination between satellite RNAs of turnip crinkle virus. *The EMBO Journal*, 9, 1709-1715.
- Cascone, P. J., Haydar, T. and Simon, A. E. (1993) Sequences and structures required for recombination between virus-associated RNAs. *Science*, 260: 801-805.
- Chen, J., MacFarlane, S. A. and Wilson, T. M. A. (1994) Detection and sequence analysis of a spontaneous deletion mutant of soil-borne wheat mosaic virus RNA2 associated with increased symptom severity. *Virology*, 202, 921-929.
- Chen, J., Macfarlane, S. A. and Wilson, T. M. A. (1995) An analysis of spontaneous deletion sites in soil-borne wheat mosaic virus RNA2. *Virology*, 209, 213-217.
- Clark, M. F. and Adams A. N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J. A., Dodds, J. A. and Beach, R. N. (1995) A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology*, 206, 307-313.
- DeBorde, D. C., Naeve, C. W., Herlocher, M. L. and Maassab, H. F. (1986) Resolution of a common RNA sequencing ambiguity by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Analytical Biochemistry*, 157, 275-282.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helsinki, d., R. (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 7347-7351.
- Fecker, L.F., Koenig, R., and Obermeier, C. (1997) *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Archives of Virology*, 142, 1857-1863.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132:6-13.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1984) Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 137:266-267.
- Fenby, N. S., Scott, N. W., Slater, A. and Elliott, M. C. (1995) PCR and non-isotopic labeling techniques for plant virus detection. *Cellular and Molecular Biology*, 41, 639-652.
- Fitchen, J. H. and Beachy, R. N. (1993) Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annual Review of Microbiology*, 47, 739-763.
- Forster, A. C., McInnes, J. L., Skingle, D. C. and Symons, R. H. (1985) Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucleic Acids Research*, 13, 745-761.
- Gilmer, D., Allmang, C., Ehresmann, C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. and Ehresmann, B. (1993) The secondary structure of the 5'-noncoding region of beet necrotic yellow vein virus RNA 3: evidence for an role in viral RNA replication. *Nucleic Acids Research*, 21, 1389-1395.
- Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K. E. and Jonard, G. (1992a) Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology*, 189, 40-

47.

- Gilmer, D., Richards, K. E., Jonard, G. and Guilley, H. (1992b) Cis-activesequences near the 5'-termini of beet necrotic yellow vein virus RNAs 3 and 4. *Virology*, 190, 55-67.
- Goldbach, R. and Wellink, J. (1988). Evolution of plus-strand RNA viruses. *Intervirology*, 29, 260-267.
- Gubler, U. and Hoffman, J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25, 163-169.
- Habili, N., McInnes, J. L. and Symons R. H. (1987) Nonradioactive, photobiotin-labelled DNA probes for the routine diagnosis of barley yellow dwarf virus. *Journal of Virological Methods*, 16: 225-237.
- Hackland, A. F., Ryvbicki, E. P. and Thomson, J. A. (1994) Coat protein mediated resistnace in transgenic plants. *Archives of Virology*, 139, 1-22.
- Haeberle, A. M., Stussi-Garaud, C., Schmitt, C., Garaud, J. C., Richards, K. E., Guilley, H. and Jonard, G. (1994) Detection by immunogold labelling of P75 readthrough protein near an extremity of beet necrotic yellow vein virus particles. *Archives of Virology*, 134, 195-203.
- Hataya, T., Inoue, A. K. and Shikata E. (1994) A PCR-microplate hybridization method for plant virus detection. *Journal of Virological Methods*, 46, 223-236.
- Hehn, A., Bouzoubaa, S., Bate, N., Twell, D., Jacqueline, Marbach, K., Richards, K., Guilley, H. and Jonard, G. (1995) The small cysteine-rich protein P14 of beet necrotic yellow vein virus regulates accumulation of RNA 2 in Cis and coat protein in Trans. *Virology*, 210, 73-81.
- Henry, C.M., Barker, I., Morris, J. and Hugo, S. A. (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus using reverse transcription and polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 54, 15-28.
- Henson, J. M. and French, R. (1993) The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31:81-109.
- Hobbs, S. L., Warkentin, T. D. and DeLong, C. M. (1993) Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Molecular Biology*, 21, 17-26.
- Holmstrom, K., Rossen, L. and Rasmussen, O. F. (1993) A highly sensitive and fast non-radioactive method for detecton of polymerase chain reaction roducts. *Analytical Biochemistry*, 209, 278-283.
- Hsu, Y. H. and Brakke, M. K. (1985) Cell-free translation of soil-borne wheat mosaic virus RNAs. *Virology*, 143, 272-279.
- Ipach, U., Altmayer, B. and Eichorn, K. W. (1992) Detection of arabis mosaic virus using the polymerase chain reaction (PCR). *Vitis*, 31, 213-219.
- 石田功, 小川俊也 (1997) ウイルス抵抗性の分子育種, 分子レベルからみた植物の耐病性 (山田哲治, 島本功, 渡辺雄一郎監修, pp204), pp177-184, 秀潤社, 東京, 1997
- Jones, T. D., Buck, K. W. and Plumb, R. T. (1991) The detection of beet western yellows virus and beet mild yellowing virus in crop plants using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 35, 287-296.
- Jupin, I., Guilley, H., Richards, K. E. and Jonard, G. (1992) Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *The EMBO Journal*, 11, 479-488.
- Jupin, I., Richards, K.E., Jonard, G., Guilley, H. and Pleij, C.W.A. (1990) Mapping sequences required for productive replication of beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Virology*, 178, 273-280.
- Kallerhoff, J. Perez, P., Bouzoubaa, S., Tahar, S. B. and

- Perret, J. (1990) Beet necrotic yellow vein virus coat protein-mediated protection in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. *Plant Cell Reports*, 9, 224-228.
- 神沢克一, 宇井格生 (1972) サトウダイコンのそう根病, 日本植物病理学会報, 38, 343-345.
- Kaufmann, A., Koenig, R. and Lesemann, D. E. (1992) Tissue print-immunoblotting reveals an uneven distribution of beet necrotic yellow vein virus and beet soil-borne viruses in sugar beets. *Archives of Virology*, 126, 329-335.
- Kiguchi, T., Saito, M. and Tamada, T. (1996) Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. *Journal of General Virology*, 77, 575-580.
- Klyachenko, O. L., Meldraiss, Ya. A. and Kremetsova, E. B. (1994) Comparison of different methods of diagnosis of beet necrotic yellow vein virus. *Mikrobiologicheskii Zhurnal*, 56, 41-46.
- Koenig, R. and Burgermeister, W. (1989) Mechanical inoculation of sugarbeet roots with isolates of beet necrotic yellow vein virus having different RNA compositions. *Journal of Phytopathology*, 124, 249-255.
- Koenig, R., Burgermeister, W., Weich, H., Sebald, W. and Kothe, C. (1986) Uniform RNA patterns of beet necrotic yellow vein virus in sugar beet roots, but not in leaves from several plant species. *Journal of General Virology*, 67, 2043-2046.
- Koenig R, Haeberle A. M, Commandeur U. (1997) Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Archives of Virology*, 142, 1499-1504.
- Koenig, R., Jarausch, W., Li, Y., Commandeur, U., Burgermeister, W., Gehrke, M. and Lueddecke, P. (1991) Effect of recombinant beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *Journal of General Virology* 72, 2243-2246.
- Koenig, R., Lueddecke, P. and Haeberle, A. M. (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-stranded conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology*, 76, 2051-2055.
- Kohnen, P. D., Dougherty, W. G. and Hampton, R. O. (1992) Detection of pea seedborne mosaic potyvirus by sequence specific enzymatic amplification. *Journal of Virological Methods*, 37, 253-258.
- Koonin, E. V., Boyko, V. P. and Dolja, V. V. (1991) Small cysteine-rich proteins of different groups of plant RNA viruses are related to different families of nucleic acid-binding proteins. *Virology*, 181, 395-398.
- Koonin, E. V. and Dolja, V. V. (1993) Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28, 375-430.
- Korshineck, I., Himmler, G., Sagl, R., Steinkellner, H. and Katinger, H.W.D. (1991) A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. *Journal of Virological Methods*, 31, 139-146.
- Kruse, M., Koenig, R., Hoffmann, A., Kaufmann, A., Commandeur, U., Solovyev, A. G., Savenkov, I. and Burgermeister, W. (1994) Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Virology*, 75, 1835-1842.
- Kummert, J. (1993) Viruses transmitted by *Polymyxa*. Diagnosis of viral agents: immunological techniques and molecular hybridization. II. Diagnosis of beet necrotic yellow vein virus by molecular hybridization in dot blot. *Parasitica*, 49, 89-106.
- Kuszala, M., Ziegler, V., Bouzoubaa, S., Richards, K.E.

- Putz, C., Guilley, H. and Jonard, G. (1986) Beet necrotic yellow vein virus: different isolates are serologically similar but differ in RNA composition. *Annals of Applied Biology*, 109, 155-162.
- Lai, M. M. C. (1992) RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological Reviews*, 56, 61-79.
- Lapidot, M., Gafny, R., Ding, B., Shmuel, W., Lucas, W. J. and Beachy, R. N. (1993) A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *The Plant Journal*, 4, 959-970.
- Lauber, E., Bleykasten-Grosshans, C., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Jonard, G., Richards, K. E. and Guilley, H. (1998) Cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus: I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 618-625.
- Lemaire, O. and Merdinoglu, D. (1988) New tools for detecting beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), responsible for sugarbeet rhizomania (cDNA probe, cRNA probe). *Proceedings of the 2nd International Conference on Plant Diseases*, vol. 3, pp. 1629-1638.
- Lim, S. T., Wong, S. M., Yeong, C. Y., Lee, S. C. and Goh, C. J. (1993) Rapid detection of cymbidium mosaic virus by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Virological Methods*, 41, 37-46.
- Lomonosoff, G. P. (1995) Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 33, 323-343.
- Malysenko, S. I., Kondakova, O. A., Nazarova, Ju. V., Kaplan, I. B., Taliansky, M. E. and Atabekov, J. G. (1993) Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins. *Journal of General Virology*, 74, 1149-1156.
- Maniatis, T., Fritsch, D. F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Mannerloef, M., Lennerfors, B. L. and Tenning, P. (1996) Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. *Euphytica*, 90, 293-299.
- Manohar, S. K., Guilley, H., Dollet, M., Richards, K. and Jonard, G. (1993) Nucleotide sequence and genetic organization of peanut clump virus RNA-2 and partial characterization of deleted forms. *Virology*, 195, 33-41.
- 増田昭芳, 加川勝久, 神沢克一 (1969) てん菜の連作に関する研究 第1報 連作障害様異常てん菜の発生, てん菜研究報告 補巻 11, 77-84.
- Meulewater, F., Soetaert, P. and van Emmelo, J. (1989) Structural analysis of the coat protein gene in different BNYVV isolates. *Mededeling van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijkuniversiteit Gent* 54/2b, 465-468.
- Miller, S. A. and Martin, R. R. (1988) Molecular diagnosis of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 26:409-432.
- 三浦豊雄 (編) (1997) 農作物優良品種の解説 (1987-1995), 北海道立農業 詞験場資料, 26, 72-87.
- Miyaniishi, M., Kusume, T., Saito, M. and Tamada, T. (1999) Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA 5. *Archives of Virology*, 144, 879-892.
- Morozov, S. Y., Dolja, V. V. and Atabekov, J. G. (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *Journal of Molecular Evolution*, 29, 52-62.
- Morozov, S. V., Miroshnickenko, N. A., Fedorkin, O. N., Solovyev, A. G., Zelenina, D. A., Lukasheva, L. I., Karasev, A. V., Dolja, V. V. and Atabekov, J. G. (1991) Expression strategy of the potato virus X triple gene block. *Journal of General Virology*, 72, 2039-2042.

- Mumford, R. A. and Seal, S. E. (1997) Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. *Journal of Virological Methods*, 69, 73-79.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Mushegian, A. R. and Koonin, E. V. (1993) Cell-to-cell movement of plant viruses. Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Archives of Virology*, 133, 239-57.
- Niesbach-Kloesgen, U., Guilley, H., Jonard, G. and Richards, K. E. (1990) Immunodetection in vivo of beet necrotic yellow vein virus encoded proteins. *Virology*, 178, 52-61.
- Nolasco, G., De Blas, C., Torres, V. and Ponz, F. (1993) A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods*, 45, 201-218.
- Powell-Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. and Beachy, R. N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232, 738-743.
- Putz, C., Pinck, L., Fritsch, C. and Pinck, M. (1983) Identification of the 3'- and 5'- ends of beet necrotic yellow vein virus RNAs. Presence of poly A sequences. *FEBS Letter*, 156, 41-56.
- Reavy, B., Arif, M., Cowan, G. H. and Torrance, L. (1998) Association of sequences in the coat protein / read-through domain of potato mop-top virus with transmission by *Spongospora subterranea*. *Journal of General Virology*, 79, 2343-2347.
- Richards, K. E. and Tamada, T. (1992) Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 291-313.
- Robinson, D. J. and Romero J. (1991) Sensitivity and specificity of nucleic acid probes for potato leafroll luteovirus detection. *Journal of Virological Methods*, 34: 209-219.
- Roy, B. P., AbouHaidar, M. G., Sit, T. L. and Alexander, A. (1988) Construction and use of cloned cDNA biotin and ³²P-labeled probes for the detection of papaya mosaic potyvirus RNA in plants. *Phytopathology*, 78, 1425-1429.
- Rush, C. M., French, R. c. and Heidel, G. B. (1994) Differentiation of two closely related furoviruses using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 84, 1366-1369.
- Sabanadzovic, S., Saldarelli, P. and Savino, V. (1996) Molecular diagnosis of grapevine fleck virus. *Vitis*, 35, 137-140.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saito, M., Kiguchi, T. and Tamada, T. (1997) Nonradioactive, digoxigenin-labeled DNA probes for the detection of five RNA species present in beet necrotic yellow vein virus. *Bulletin of the Research Institute for Bioresources, Okayama University*, 5, 79-96.
- Saito, M., Kiguchi, T., Kusume, T. and Tamada, T. (1996) Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of beet necrotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates. *Archives of Virology*, 141, 2163-2175.
- Sambrook, J., Fritsch, D. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

- Schmitt, C., Balmori, E., Jonard, G., Richards, K. E. and Guilley, H. (1992) In vitro mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA 2: evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89, 5715-5719.
- Scholten, O. E., Paul, H., Peters, d., Van lent J. W. and Godlbach, R. W. (1994) In situ localisation of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. Archives of Virology, 136, 349-361.
- Seppanen, P., Puska, R., Honkanen, J., Tyulkina, L. G., Fedorkin, O., Morozov, S. Yu. and Atabekov, J. G. (1997) Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. Journal of General Virology, 78, 1241-1246.
- Shirako, Y. and Brakke, M. (1984) Spontaneous deletion mutation of soil-borne wheat mosaic virus RNA II. Journal of General Virology, 65, 855-858.
- Simon, A. E. and Bujarski, J. J. (1994) RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. Annual Review of Phytopathology, 32, 337-362.
- Singh, M. and Singh, R. P. (1995) Digoxigenin-labelled cDNA probes for the detection of potato virus Y in dormant potato tubers. Journal of Virological Methods, 52, 133-143.
- Tamada, T. (1975) Beet necrotic yellow vein virus. CMI/AAB. Description of Plant viruses, No. 144.
- Tamada, T. (1999) Benyviruses. Pages 154-160 in: Encyclopedia of Virology, 2nd edition. Webster R. G. and Granoff, A. (eds) Academic Press, London.
- Tamada, T. and Abe, H. (1989) Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*. Journal of General Virology, 70, 3391-3398.
- Tamada, T. and Baba, T. (1973) Beet necrotic yellow vein virus from rhizomania-affected sugar beet in Japan. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 39, 325-332.
- Tamada, T. and Kusume, T. (1991) Evidence that the 75k readthrough protein of beet necrotic yellow vein virus RNA-2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. Journal of General Virology, 72, 1497-1504.
- Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T. and Harada, T. (1989) Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. Journal of General Virology, 70, 3399-3409.
- Tamada, T., Saito, M., Kiguchi, T. and Kusume, T. (1990) Effect of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different RNA components on the development of rhizomania symptoms. Proceedings of Symposium of International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, 1st., ed. Koenig, R., pp.41-44. Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH.
- Tamada, T., Kusume, T., Uchino, H., Kiguchi, T. and Saito, M. (1996a) Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. Proceedings of the 3rd Symposium of International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, pp.49-52.
- Tamada, T., Schmitt, C., Saito, M., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. (1996b) High resolution analysis of the readthrough domain of beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. Journal of General Virology, 77, 1359-1367.
- Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T. and Saito, M. (1999) RNA 3 deletion mutants of beet necrotic yellow vein virus do not cause rhizomania disease in sugar beets. Phytopathology, 89, 1000-1006.

- Thompson, D. and Dietzgen, R. G. (1995) Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *Journal of Virological Methods*, 54, 85-95.
- Torrance, L., Cowan, G. H., Sokmen, M. A. and Reavy, B. (1999) A naturally occurring deleted form of RNA 2 of Potato mop-top virus. *Journal of General Virology*, 80, 2211-2215.
- Torrance, L. and Mayo, M. A. (1997) Proposed re-classification of furoviruses. *Archives of Virology*, 142, 435-439.
- Torrance, L., Peard, M. T. and Buxton, G. (1988) Production and some characteristics of monoclonal antibodies against beet necrotic yellow vein virus. *Annals of Applied Biology*, 113, 519-530.
- 内野浩克・阿部秀夫・玉田哲男・神沢克一 (1990) テンサイを捕捉植物とするそう根病の土壌検診法について, てん菜研究会報, 32, 86-93.
- 宇井格生 (1973) てん菜そう根病をめぐる諸問題. てん菜研究会報, 15, 233-265.
- Unger, R. E., Chuang, R. Y., Chuang, L. F., Doi, R. H. and Osburn, B. I. (1988) Comparison of dot-blot and Northern blot hybridization in the determination of genetic relatedness of United State bluetongue virus serotypes. *Journal of Virological Methods*, 22, 273-282.
- Vunsh, R., Rosner, A. and Stein A. (1990) The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Annals of Applied Biology*, 117:561-569.
- Vunsh, R., Rosner, A. and Stein, A. (1991) Detection of bean yellow mosaic virus in gladioli corms by the polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology*, 119, 289-294.
- Weekes, R, Barker, I and Wood, K. R. (1996) An RT-PCR test for the detection of tomato spotted wilt tospovirus incorporating immunocapture and colorimetric estimation. *Journal of Phytopathology*, 144, 575-580.
- Wesley, S. V., Miller, J. S., Devi, P. S., Delfosse, P., Naidu, R. A., Mayo, M. A., Reddy, D. V. R. and Jana, M. K. (1996) Sensitive broad-spectrum detection of Indian peanut clump virus by nonradioactive nucleic acid probes. *Phytopathology*, 86, 1234-1237.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1992) A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39, 27-37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1991) A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33, 355-365.
- Wilson, T. M. A. (1993) Strategies to Protect Crop Plants Against Viruses: Pathogen-Derived Resistance Blossoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 3134-3141.
- Yao, H, Liu, Y., Zhunan, C. and Yu, Z. (1993) The cloning and sequencing of coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2, 147-151.