アルギン酸塩のウイルス感染阻止作用*

都丸 敬一**・大河 喜彦***

Keiichi TOMARU* and Yoshihiko OHKAWA**: The Inhibitory Activity
of Alginic Acid Against Tobacco Mosaic Virus Infection

Abstract

In the course of research studies to detect the antiviral substances for tobacco mosaic virus (TMV) and cucumber mosaic virus (CMV), it was found that some salts of alginic acid have a high inhibitory activity against TMV infection.

The methods used are the inoculation of mixture of chemical and virus, and the inoculation of virus after application of chemicals on the leaf surface. Na-, K-, NH₃- and triethanolamin-salt of alginic acid showed the same degree of inhibitory activity, 80-100 percent inhibition, in the tests using 0.1-1 percent concentration of chemicals and TMV-*Nicotiana glutinosa* as the test combination. Equally high inhibitory activity was observed also in the combination of TMV-French bean and TMV-Xanthi nc tobacco, by the test using Na alginate. In TMV-*Chenopodium amaranticolor*, however, the activity was lower than those in the other combinations mentioned above.

The mixture of Na alginate and casein (AC) showed higher inhibitory activity and retained the activity longer than Na alginate alone after application to *N. glutinosa* leaves. AC inhibited about 30 percent of the transmission of CMV to tobacco plant by green peach aphid in the green house experiment.

Mechanism of the inhibitory activity of alginic acid is not clear yet. However, following data were obtained; 1) When Na alginate was applied to the undersurface of leaf and TMV was inoculated on the opposite surface, no effect was observed. Accordingly, there was no sign of translocation of effective substances into the leaf tissues. 2) When mixed solution of TMV and Na alginate was centrifuged at low speed, most infectivity was found in the precipitation. This fact shows that AC has the effect to aggregate TMV particles. 3) No inhibitory activity was found when AC was applied after inoculation, except within 5 minutes after inoculation. 4) Infection of Bright Yellow tobacco which can be infected systemically with TMV was also inhibited by AC. This fact indicates the effect of AC is not the prevention of local lesion formation but the inhibition of infection itself. The results of further tests including practical application in the fields shall be reported elsewhere. (Received April 17, 1974)

緒 言

わが国のタバコ作におけるウイルス病は、その被害が毎年 2,000~7,000 ha に達し、主要病害のひとつとなっている。このウイルス病はタバコモザイクウイル

ス (TMV) およびキュウリモザイクウイルス (CMV) によるものを主とするが、これまでこれらのウイルスの感染あるいは増殖阻害剤の実用化されたものないことが、これらのウイルス病の防除を困難なものとしている。

* 本研究の一部は文部省科学研究費によった。

** 日本専売公社中央研究所 Central Research Institute, The Japan Tobacco and Salt Public Corporation, Yokohama, Japan.

*** 現在、環境庁水質保全局土壌農業課 Present address; Soil and Agricultural Chemical Division, Water Quality Bureau, Environment Agency.

筆者らは実用化し得る抗ウイルス物質の検索の目的から、公害のおそれの少ない天然物の抗ウイルス作用について検討を重ねてきた。

スキムミルクが TMV の感染阻止作用を持つことは、すでに知られているが⁴⁾、筆者らもこの感染阻止作用について検討し、ミルクカゼインがその主作用を示す物質であることを確認した⁵⁾。カゼインはタンパク質であり、ウイルス粒子の凝集性も認められ、また植物葉面への展着性も高い。カゼインと同様な作用を持ち、より有効な物質を検索するため、各種の物質を検討した結果、海藻多糖の1種であるアルギン酸塩に高い感染阻止作用のあることを見出した。ここにその阻止作用についての実験結果の概要を報告する。本報告に述べる実験は1969年から1971年にわたって秦野たばこ試験場において行ない、要旨の一部は日本植物病理学会昭和45年度大会⁶⁾で報告した。

実験材料および方法

抗ウイルス作用の検定に用いた各種物質は市販品あるいはイー・シー化学株式会社等に依頼加工した試料を供試した。これらの試料は、すべて水溶液あるいは水懸濁液として用いた。試料の純度は明らかでないものもあったが、アルギン酸塩は別に述べない限り、純度97%程度のものを供試した。アルギン酸はD-マンヌロン酸とL-グルクロン酸を含むポリウロン酸からなり、分子量は32,000~200,000とされているが⁷⁾、供試品は重合度中程度以上のものである。

供試ウイルスは当所保有の TMV 普通系 (TMV-OM) を主とし、TMV えそ系 (TMV-N 1), CMV 普通系 (CMV-O), CMV えそ系 (CMV-N), ジャガイモ×ウイルス (PVX) などを用い、TMV は精製ウイルスを、その他のウイルスは罹病タバコ葉搾汁液を用いた。ウイルス液の希釈には0.1 M, pH 7.0 のリン酸緩衝液を使用した。検定植物はガラス温室内で、直径12 cm の植木鉢に育て、*Nicotiana glutinosa*, タバコ (品種 Xanthi nc), インゲン (品種改良大手亡) および *Chenopodium amaranticolor* では半葉法⁹⁾により、またササゲ (品種黒種三尺) では対葉法⁹⁾によって感染阻止力を検定した。感染阻止力の検定には、ウイルス液と供試剤との混合液を接種する方法 (混合法) か、あるいは供試剤を葉面に絵筆で塗布するかまたは噴霧し、24時間後に同じ葉面にウイルスを接種する方法 (前処理法) によった。対照半葉または対葉には水を同様にして処理した。ウイルス液の接種には、綿球をウイルス液に浸漬して、あらかじめカーボランダム (500

メッシュ) をふりかけた処理および対照葉になすりつけ接種した。接種後接種葉を水道水で洗い、病斑数は4~5日後に数えた。1回の実験には少なくとも各区8半葉あるいは8葉以上を用い、これらの接種実験はすべて23~28°C または25°C に調節したガラス温室内で行なった。

実験結果

1. 各種物質の感染阻止効果

アルギン酸ソーダ、グルテン、ペクチン、casamino acid、ゼラチンなど、展着性がカゼインに類似する生体素材を主とする約20種の物質について、TMV-OM-*N. glutinosa* の系で抗ウイルス性を混合法で検定した。その結果、比較的高い感染阻止率を示したものは、動物カゼイン、ミルクカゼイン、アルギン酸ソーダ、genulacta carrageenan、ヒドロキシエチルセルロースなどであった。アルギン酸ソーダはその効果がもっとも高く、1% 液で96%、0.1% 液で78% の阻止率を示した。

2. 各種アルギン酸塩の効果

アルギン酸のソーダ塩、カリ塩、アンモニウム塩、およびトリエタノールアミン塩の各1% 液について、TMV-OM-*N. glutinosa* の系によって感染阻止効果を調べた。結果を Table 1 に示した。これらのアルギン酸塩はいずれも高い感染阻止作用を示した。

3. アルギン酸ソーダの各種ウイルスに対する感染阻止効果

アルギン酸ソーダを用い、TMV のほか、CMV, PVX と各種の局部病斑寄主との組合せにおける感染阻止効果を調べた。TMV は精製試料を、CMV および PVX は感染葉搾汁液を用い、TMV では混合法お

Table 1. Inhibitory activity of some salts of alginic acid against infection of *N. glutinosa* leaves with TMV^{a)}

Salt	Number of lesions per half leaf		Inhibition (%)
	Treat.	Cont.	
Na alginate	3.9	93.9	96
K alginate	4.3	88.4	95
NH ₃ alginate	1.3	90.3	99
Triethanolamin alginate	0.4	65.0	99

a) Purified TMV (0.25 µg/ml) was inoculated 24 hours after application of 1% solution of each chemical.

Table 2. Inhibitory activity of Na alginate against infection of different host plants with some viruses

Virus ^{a)}	Assay plant	Conc. of chemicals	Method of application	No. of lesions per half leaf		Inhibition (%)
				Treat.	Cont.	
TMV-OM	<i>N. glutinosa</i>	1	Mixture	0.0	40.3	100
"	"	0.1	"	3.9	72.8	95
"	"	1	Pre-application	3.9	93.9	96
"	"	0.1	"	44.3	122.4	64
"	<i>C. amaranticolor</i>	0.1	Mixture	88.8	155.0	43
CMV-O	Cowpea	1	Pre-application	18.1	76.3	79
"	"	0.1	"	39.0	79.8	51
"	"	0.01	"	104.5	104.1	0
Potato virus X	<i>G. globosa</i>	0.1	"	105.0	148.0	29

a) Purified TMV-OM (0.25 µg/ml), crude saps of CMV-O and potato virus X-infected tobacco leaves, diluted with 0.1 M, pH 7.0 phosphate bufferr, respectively, were used as inocula.

よび前処理法により、その他のウイルスでは前処理法によった。結果を Table 2 に示した。TMV-*N. glutinosa* では 1, 0.1% でいずれも高い阻止効果を示した。*C. amaranticolor* では *N. glutinosa* に較べて効果は低く、阻止率は約 50% であった。CMV-O ササゲの系では効果はやや低く、0.1% の濃度で阻止率は約 50% であった。PVX-センニチコウでは効果はさらに低かった。

4. アルギン酸塩の濃度と感染阻止効果

前項の実験で、アルギン酸塩の濃度と阻止効果とは比例することが認められたが、さらに詳細に TMV-*N. glutinosa* の系を用い薬剤の濃度と効果との関係を調べた。混合法および前処理法による実験結果を Fig. 1 に示した。この結果から混合法では 0.1% 以上の濃度で高い阻止効果があり、0.01% 以下の濃度ではその効果が急激に低下することがわかった。前処理では濃度の低下とともに阻止効果は低下し、0.5% の濃度で 79% の阻止率が見られた。

5. アルギン酸塩の葉裏処理と効果

前項までの実験では、前処理法としては葉の表面に薬剤を塗布し、そこに接種する方法によったが、葉の裏面に薬剤を塗布して 1~3 日後に葉表面に接種してその効果を調べた。

アルギン酸ソーダを用い、TMV-*N. glutinosa* の系における実験の結果、薬剤塗布 1 日後の接種では処理半葉および対照半葉の局部病斑数は、それぞれ 134, 156, 3 日後の接種では同じく 143, 128 であった。この結果から葉裏処理、葉表接種の効果は全く認められず、

Fig. 1. Inhibitory effect of Na alginate at different concentrations on the number of local lesions in *N. glutinosa* leaves inoculated with TMV.

Mixture: Mixture of Na alginate and TMV (0.25 µg/ml) was inoculated
Pre-application: TMV (0.25 µg/ml) was inoculated 24 hours after application of Na alginate

アルギン酸塩が塗布面から葉組織中に浸透移行して、反対側の葉面で効果を示すことはないことが明らかとなった。

6. アルギン酸塩と TMV 粒子との *in vitro* の反応

アルギン酸塩の感染阻止作用の機作を知る目的から、アルギン酸ソーダ 0.5% 液と精製 TMV 0.5 mg/

mlとの混合液について、6,000×g, 15分の遠心分離を行ない、遠心分離によるウイルス粒子の行動について検討した。結果を Table 3 に示した。普通にはウイルス粒子のほとんどが上清に残る低速遠心分離によって、この混合液ではウイルス粒子の大部分が沈澱することがわかった。この結果はアルギン酸塩との共存によってウイルスの凝集がおこることを示している。

7. AC 剤 (アルギン酸塩+カゼイン) の各種ウイルスに対する感染阻止効果

アルギン酸ソーダおよび水溶性動物カゼインを最終濃度で各 0.5% とした混合液を作り、アルギン酸ソーダ 0.5% 液を対照として、前処理法によって、処理後 1~7 日にわたって TMV の感染阻止力を調べた。こ

の予備試験の結果、混合剤の方が持続効果の高い結果が得られた。

そこで、アルギン酸ソーダと動物カゼインとを 8:2 の割合で混合し、水に可溶化した製剤とし、これを AC 剤と仮称した。これはカゼインによって葉面への展着性を増強し、あわせて感染阻止効果の強化を意図したものである。本剤について、各種ウイルス—局部病斑寄主の組合せで効果を調べた。結果を Table 4 に示した。TMV-*N. glutinosa*, TMV-タバコ (*Xanthi* nc), TMV-インゲンなどの組合せで高い阻止効果が得られた。CMV-ササゲでやや効果の低下する傾向はアルギン酸単剤のときと同様であった。前処理法でも同様な結果が得られた。CMV-N-タバコ (*Bright*

Table 3. Behavior of TMV mixed with Na alginate solution in the low speed centrifugation^{a)}

Sample	Number of lesions per half leaf		Relative infectivity
	Treat.	Cont.	
Before centrifugation	43.0	90.0	0.48
Pellet ^{b)}	474.0	90.8	5.29
Supernatant	2.0	96.1	0.04

a) Purified TMV (0.5 mg/ml) suspended in the 0.5% solution of Na alginate was centrifuged at 6,000×g, 15 minutes. TMV (0.25 µg/ml) and *N. glutinosa* were used for control inoculum and assay host, respectively. The control inoculum was not centrifuged.

b) Pellet was inoculated after resuspended in original volume of distilled water.

Table 4. Inhibitory activity of AC (Na alginate+Casein) against infection of different host plants with some viruses^{a)}

Virus	Assay plant	Conc. of chemicals (%)	Pre-application			Mixture		
			Treat.	Cont.	Inhibition (%)	Treat.	Cont.	Inhibition (%)
TMV-OM	<i>N. glutinosa</i>	1	3.3 ^{b)}	129.5 ^{b)}	98	0.25 ^{b)}	96.0 ^{b)}	99.7
"	"	0.1	7.3	60.1	88	2.9	97.1	97
"	"	0.01	70.3	79.4	12	34.8	151.1	77
"	Tobacco (<i>Xanthi</i> nc)	1	0.0	71.8	100	0.0	179.6	100
"	"	0.1	2.1	89.6	98	1.8	126.1	99
TMV-N1	Tobacco (<i>Bright Yellow</i>)	1	4.5	23.8	81	—	—	—
TMV-OM	French bean	1	5.9	56.4	90	0.0	44.8	100
CMV-N	Tobacco (<i>Bright Yellow</i>)	1	207.8	748.2	72	—	—	—
CMV-O	Cowpea	5	5.4	91.3	94	—	—	—
"	"	1	17.8	89.0	80	24.8	63.5	61
"	"	0.1	60.9	77.5	21	88.3	147.6	40
"	"	0.01	54.1	52.3	-4	—	—	—

a) Purified TMV (0.25 µg/ml), TMV-N1 (0.25 µg/ml) and crude extracts of infected tobacco leaves with other viruses were used as inocula.

b) Figures in the table are number of lesions per half leaf except cowpea, in which per leaf with opposite leaf method.

Yellow) では効果は TMV-タバコ (Xanthi nc) に較べてやや劣った。処理後 24 時間に接種を行なった本実験では、アルギン酸単剤に較べて効果の増強は概して顕著でなかった。

8. AC 剤およびアルギン酸ソーダの効果の持続性

AC 剤と、アルギン酸単剤の効果の持続性およびアルギン酸ソーダの灌水の有無と持続効果について、TMV-*N. glutinosa* によって比較検討した。結果を Fig. 2 に示した。AC 剤とアルギン酸単剤とでは前者の持続効果が優ることが明らかであった。1 日 2 回検定植物 1 本当たり約 20 ml の水を葉の上から小型噴霧器で灌水した区では、無灌水区に比べて、初期の効果がやや低下する傾向が見られた。また、アルギン酸 1% 液と比較しうる 0.1% 液とでは、実験期間を通じて効果に差が認められた。

Fig. 2. Duration of inhibitory activity of Na alginate and AC against infection of *N. glutinosa* leaves with TMV at different days after application of chemicals.

- AC 1%, no water sprinkling
- Na alginate 1%, no water sprinkling
- ▲—▲ Na alginate 0.1%, no water sprinkling
- △—△ Na alginate 0.1%, water sprinkling

9. 接種後の AC 剤処理の影響

アルギン酸剤の感染阻止作用の機作を知る目的から、TMV を接種後、経時的に接種葉を AC 剤で洗い、病斑数に及ぼす影響を調べた。*N. glutinosa* の半葉に精製 TMV を接種し、1, 5, 15 分および 30 分後に AC 剤の 1% 溶液中に、接種葉を 2~3 秒浸漬し、対照半葉は水道水に浸漬した。結果を Table 5 に示した。接種後 5 分までは有意な阻止効果が認められたが、時間の経過とともに効果は低下し、15 分以降では処理と対照の病斑数に有意な差は認められなかった。この結

果はウイルスの細胞への感染過程が進行した後では効果がないことを示している。

10. TMV の全身感染寄主における AC 剤の効果

TMV-OM に全身感染するタバコ品種 Bright Yellow を用い、*N. glutinosa* の半葉当たり 0.5 個程度の局部病斑を生ずる 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TMV-OM との混合接種によって、AC 剤の感染阻止効果を調べた。結果を Table 6 に示した。この結果から最終濃度 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TMV と 1% の AC 剤との混合液では、TMV のみを接種した対照の植物に較べて発病率が少なく、また病徴の発現も遅れることが明らかとなった。

Table 5. Post-application effect of AC on the number of local lesions in *N. glutinosa* leaves inoculated with TMV^{a)}

Time of application after inoculation (min.)	Number of lesions per half leaf		Inhibition (%)
	Treat.	Cont.	
0	0.25	96.0	99.7 ^{b)}
1	2.6	76.8	65 ^{b)}
5	85.1	135.4	37 ^{b)}
15	98.9	121.3	19
30	128.5	147.3	13

a) TMV (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was used as inoculum.

b) Significant difference was observed between treatment and control in 1% level of significance by t-test.

Table 6. Inhibitory activity of AC against infection of the systemic host, Bright Yellow tobacco, with TMV^{a)}

Day after inoculation	Number of plants exhibited symptoms	
	Treat.	Cont.
0	0	0
4	1	19
7	3	20
12	4	20
18	5	20
26	5	20

a) Twenty plants were inoculated with TMV-OM (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mixed with 1% AC solution. Twenty control plants were inoculated with TMV (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$) alone.

11. CMV のアブラムシ伝搬に及ぼす AC 剤の影響

3 および 7 項の実験で CMV-ササゲおよび CMV-N-タバコの系で汁液接種による感染阻止効果が認められたが、CMV は野外ではアブラムシによる伝搬が主体である。そこで、モモアカアブラムシを用いて AC 剤の伝搬阻止効果を検討した。モモアカアブラムシは健全ハナヤサイまたは健全タバコ上で育てた無翅アブラムシを用いた。毛筆でガラス器中に採集したアブラムシを 2~3 時間絶食させた後、CMV-O 感染タバコ葉上に移した。2~15 分放飼、吸汁させてから、1 日前にあらかじめ AC 剤を葉の表裏に散布した健全タバコ (Ky 57) に毛筆で移した。対照として健全タバコ上で吸汁させたアブラムシを同様に健全タバコの幼苗に移した。タバコ 1 本当たり 7~8 頭のアブラムシを移し、24 時間後に殺虫剤を噴霧した。結果を Table 7 に示した。4 回の実験結果から AC 剤の散布によって平均約 30% の阻止効果が認められた。

Table 7. Inhibitory activity of AC against the aphid transmission of CMV-O^{a)}

Experiment	Number of plants infected		Control
	AC (1) ^{b)}	AC (2) ^{b)}	
I	3	—	5
II	5	6	8
III	5	4	8
IV	3	4	6
Mean	4.0 ^{c)}	4.7 ^{d)}	6.8 ^{c,d)}

a) Ten plants of Ky 57 tobacco and 7-8 green peach aphids per plant were used in each experiment.

b) AC (1) and AC (2) are different lots of AC.

c, d) Differences between the same letters c and d were significant at 5% and 10% level, respectively, by t-test.

考 察

本研究の結果からアルギン酸塩には高い TMV の感染阻止作用のあることがわかった。この結果は、前報⁵⁾に示したカゼインの効果と同等あるいはそれ以上である。また抗ウイルス性を示す各種多糖類³⁾に較べても、もっとも効果が高い。また、アルギン酸塩をカゼインと混合すると持続効果が高まることも明らかとなった。CMV や PVX などの TMV 以外のウイルスに対する効果は、TMV に較べてやや劣る結果が得

られたが、これはこれらのウイルスの接種源として罹病葉搾汁液を用いたことによることも考えられ、さらに検討が必要である。

アルギン酸塩の感染阻止作用の機作については、今後さらに検討を要するが、今回の実験から次のことが明らかとなった。すなわち、葉裏処理、葉表接種の結果から感染阻止物質の葉組織内への浸透、移行はなく、TMV-C. *amaranticolor* で見られたように、寄主植物によって効果にやや差があること。さらにアルギン酸塩は *in vitro* で TMV を凝集させる性質があることなどである。また予備実験の結果からアルギン酸塩または AC 剤と TMV の混合液は希釈によって病原性を回復することも推察された。したがって、本剤は TMV 粒子を不可逆的に不活化するものでなく、接種葉面におけるウイルス、細胞および薬剤の接触による感染阻止作用と考えられ、増殖阻止作用のないことは明らかである。なお、抗ウイルス物質のうちには、局部病斑の出現を抑えるが、ウイルスの感染、増殖はそれほどには阻止しないものも知られている^{6,10)}。TMV の全身感染寄主における AC 剤の検定結果から、本剤が感染そのものを阻止しており、上記のような局部病斑形成阻止作用によるものでないことも明らかである。

これまで、スキムミルク、アカザ汁液などのウイルス感染阻止作用の機作について、寄主細胞の非特異的損傷や死^{2,7)}、あるいは不和合性物質に対する細胞の過敏反応によるものとする説^{7,11)}が挙げられている。アルギン酸塩の作用機構については、上記の説を含めて、さらに検討が必要であらう。

一般に、抗ウイルス剤は、糸状菌や細菌による斑点病などの防除剤と異なり、100% の阻止効果がないと、終局的には全身感染をもたらすことになる。しかし、*N. glutinosa* などの局部病斑寄主で、病斑の減少で示される抗ウイルス効果は、その阻止効果が高いものであるならば、たとえ終局的には全身感染をもたらすことはあっても、発病率の減少および発病の遅延によって被害を有意に軽減しうるものと思われる。AC 剤については、実用化試験を含めて、さらに検討を重ねているので、これらの結果については別に報告する予定である。

摘 要

タバコに被害の多い TMV や CMV などのウイルスに対する抗ウイルス物質検索の過程で、海藻多糖の 1 種アルギン酸塩が高い感染阻止効果を持つことを見出した。アルギン酸のソーダ、カリ、アンモニウム、

トリエタノールアミンなどのいずれの塩でも、同様な高い阻止効果を示した。TMV-*N. glutinosa* の系では、アルギン酸塩の阻止効果は0.1~1%の濃度で80~100%であった。ソーダ塩についての検討で、TMVと*N. glutinosa*, インゲン, タバコ (*Xanthi nc*) の組合せて、いずれも高い効果を示すが、*C. amaranticolor* では効果はやや劣った。CMV とササゲ, タバコ, *C. amaranticolor* の組合わせでは、TMV にくらべて効果はやや低かった。

アルギン酸ソーダに動物カゼインを混合し、助剤を加えた AC 剤では、アルギン酸塩単剤より効果が高く、感染阻止剤として有用と思われた。AC 剤は温室実験では CMV のアブラムシ伝播を20~50%阻止した。アルギン酸塩の作用機作については、さらに検討を要するが、有効物質の葉組織への浸透、移行性はなく、TMV 接種後の処理では接種後5分以降では効果はないことがわかった。また、アルギン酸塩は TMV を凝集させる性質もあることが明らかとなった。

謝辞: 本研究の実施に当って、前東京大学杉二郎教授、故岡英人博士、東京大学与良清教授、同米原弘教授にご指導およびご援助をいただいた。またイー・

シー化学および三菱化成農業関係各位に協力をいただいた。記して感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 江上不二夫 (監修) (1969). 多糖生化学 I, 化学篇 300-303.
- 2) Hein, A. (1970). Phytopath. Z. 69: 140-150.
- 3) 久保 進 (1970). 日植病報 33: 244.
- 4) Lucas, G. B. and Hare, W. W. (1959). Phytopathology 49: 544 (abstr.).
- 5) 大河喜彦・都丸敬一 (1970). 秦野たばこ試報 68: 95-102.
- 6) Singh, R. P., Wood, F. A. and Hodgson, W. A. (1970). Phytopathology 60: 1566-1569.
- 7) 都丸敬一 (1971). 化学と生物 9: 644-646.
- 8) 都丸敬一・大河喜彦 (1971). 日植病報 37: 207-208.
- 9) 都丸敬一・日高 醇 (1960). 植物ウイルス病一実験法と種類 (朝倉書店) 153-161.
- 10) Yasuda, Y., Takaoka, M. Hosotsuji, T. and Noguchi, T. (1971). 日植病報 37: 1-10.
- 11) 吉井 甫・佐古宣道 (1967). 日植病報 33: 244-252.