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—

津田 新哉

(茨城県農業総合センター生物工学研究所)

はじめに

トマト黄化えそウイルス (Tomato spotted wilt tospovirus; TSWV) は、1915年にオーストラリアで初めて発見された⁶⁾。植物ウイルスとして認知されてからの歴史は以外と古いが、完全ウイルス粒子の精製が困難であったことからタバコモザイクウイルスやブロムモザイクウイルスなどの他の植物ウイルスと比較して研究が立ち遅れていた。分子生物学の発展とともにウイルス学研究で使われる手法も大きく変化し、そのお陰でこのウイルスの遺伝的性質も明らかにされてきた。1990年ベルリンでの国際ウイルス分類委員会で動物ウイルスを中心とする *Bunyaviridae* 科に *Tospovirus* 属が新設され、そのタイプウイルスとしてようやく分類された植物ウイルスである^{34,50)}。TSWV の特徴は *Bunyaviridae* 科に属する他のウイルスと同様に、外被膜を有する直径約80~120nmの球状ウイルスであり、その中に長さの異なる3分節の閉環ひも状のヌクレオキャプシドがパッケージされている¹³⁾。

TSWV を筆頭に *Tospovirus* 属内のウイルス13種は熱帯、亜熱帯および日本を含む温帯地域を中心に全世界的に分布している。このウイルス属の宿主域は双子葉、単子葉植物併せて92科1050種 (1998年5月現在) と植物ウイルスの中でも群を抜いて広く、世界中でナス科、マメ科、キク科、ウリ科等の主要農作物に甚大な被害を与えている⁴³⁾。日本では1970年以降全国各地で小規模の発生は認められたものの、慢性的に被害を

及ぼしている箇所は余り多くはなかった⁵⁹⁾。ところがここ数年、キク、ガーベラ、トルコキキョウなどの花卉植物を中心にウイルス病害としては稀に見る猛威を全国的に振るっている⁶²⁾。近年のガーデニングブームに乗って花卉植物の流通が盛んになったことから、どうやらこの *Tospovirus* (*Tospovirus* 属内ウイルスの総称) の媒介昆虫や保毒植物も知らず知らずのうちに全国的に拡がってしまったらしい。そのためか、農林水産省農産園芸局では平成10年から総合的病害虫管理技術実証事業「トマト黄化えそウイルスの簡易同定法および伝搬経路解明」を予算化し、全国16府県の地方自治体がそれぞれの病害虫防除所を中心に参画し本病の被害防止対策に積極的に取り組んでいるところである。

一方分子ウイルス学としての *Tospovirus* は、基本的にマイナス鎖のゲノム構造であることからタバコモザイクウイルスなどに見られる感染型 cDNA を使ったウイルス遺伝子発現様式などの解析に関する研究が立ち遅れている。さらに、植物あるいは伝搬昆虫類の培養細胞を使った実用的な *in vivo* での実験系がないことから、ウイルスの複製・代謝などに関する研究も遅々として進んでいない²⁰⁾。しかしそのような過酷な条件下でも少しずつではあるが分子生物学的データは着実に蓄積されてきた。本稿では、TSWV を中心とした *Tospovirus* について現在までに知り得たゲノム構造、ウイルスタンパク質の役割、昆虫媒介機構など、ウイルス学としての分子生物学的側面を中心にご紹介したい。

1. *Tospovirus* の特性

(1) 一般的性状

TSWV 粒子は、直径80~120nmの球状粒子であり、植物ウイルスとしては珍しい外被膜を有し、内部の電

Tomato spotted wilt tospovirus : Plant-infecting bunyaviridae.

Shinya Tsuda

Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center,
3165-1 Ago, Iwama, Nishi-Ibaraki, Ibaraki 319-0292

〒319-0292 茨城県西茨城郡岩間町安居3165-1

図1 トマト黄化えそウイルスの粒子形態（上図）とその模式図（下図）

子密度が高い部分に閉環ひも状のヌクレオキャプシドが収まっている（図1）¹³⁾。このウイルスの宿主細胞内での複製の場は細胞質であり、ゴルジ体内にウイルスのタンパク質を蓄積させることにより、その膜の一部を自身の外被膜として取り込みながら完全粒子を形成していく。感染細胞内において、最終的なウイルスの蓄積場としては小包体内である²²⁾。

Tospovirus は他の植物ウイルスと比較して物理的に極めて不安定である。ウイルスの不活化温度は40～46℃10分、希釈限界は $2 \times 10^{-2} \sim 10^{-3}$ 、保存限界は2～5時間である³⁷⁾。

このウイルスが宿主植物に感染した際により引き起こされる病徴は、一般的に成長点近傍を中心とした激しい黄化とえそ症状である。汁液接種が比較的容易であるが、種子伝染並びに土壌伝染したという報告は今のところない³⁶⁾。汁液接種によりペチュニアなど一部の植物はこれらのウイルスに対して特徴的な病徴を現すことから、ウイルス病を診断するための検定植物として利用することができる²⁾。自然界では、専ら媒介昆虫アザミウマ類による伝搬が主な伝染ルートである⁴⁹⁾。この昆虫は成虫であってもその体長が1 mm にも満たない微小昆虫であり、主に花や果実に生息して

いる³⁵⁾。

一方、Tospovirus は機械的汁液接種を繰り返していると感染植物の病徴に変化を与えることがある。これは Tospovirus の L RNA（後述）が何らかの原因で短くなってしまったことに起因するらしい⁴⁶⁾。これを Defective interfering (DI) RNA または DI 粒子と呼んでいる。この DI 粒子の発生機構は、L RNA の塩基配列が作り出す特殊な二次構造の一部分が欠失するためといわれている⁴⁷⁾。どうやら感染植物が置かれている温度、接種源のウイルス濃度、感染植物種などがその現象を引き起こす引き金になっているようである¹⁸⁾。

（2）ウイルスゲノムおよびタンパク質

Tospovirus のゲノムは3分節の1本鎖 RNA であり基本的にマイナス鎖としての遺伝子翻訳系を経る（図2）。最短から S、M および L RNA と呼ばれ、TSWV ブラジル分離株（BR-01）での各分節の塩基配列の長さは S RNA から順に2,916、4,821および8,897鎖長である^{9,10,27)}。現在までに塩基配列の解析が行われた Tospovirus 各 RNA 分節の5'末端は、全てに共通してその何れもの8塩基が（5'-AGAGCAAU-3'）と完全に保存されている³⁶⁾。さらに、各 RNA 分節の5'と3'末端の12～15塩基は逆向きに相補的配列を有しており、閉環ひも状ヌクレオキャプシドを形成するときの「のりしろ」の役目を果たしている。それは結果的にインフルエンザウイルスなどで見られるヌクレオキャプシドと同様にフライパン構造を形成し、Tospovirus のウイルス粒子の形成やウイルス遺伝子の発動に必須なものと考えられている^{11,42)}。

Tospovirus の S RNA 及び M RNA 上には、2つのオープンリーディングフレーム（ORF）が並列に存在し、5'末端側の ORF は正方向（ウイルス鎖）に3'末端側の ORF は逆方向（ウイルス相補鎖）にコードされている。このような遺伝子構造は、*Arenaviridae* 科の *Arenavirus* 属、*Bunyaviridae* 科 *Phlebovirus* 属の各ウイルス、さらにイネ縞葉枯ウイルス（rice stripe virus; RSV, *Tenuivirus* 属）等に見られ ambisense gene coding strategy と呼ばれている^{8,50,54)}。L RNA ではウイルス相補鎖に一つの ORF が存在し、一般的なマイナス鎖の転写翻訳過程を経るとされている¹⁰⁾。さらに、S、M および L RNA ゲノムはそれぞれに対して完全長の相補性 RNA 鎖（cRNA）をウイルス粒子内に含んでいる^{26,55)}。同様の遺伝子構造を有する *Arenavirus* 属、*Phlebovirus* 属および *Tenuivirus* 属の各ウイルスにもそれぞれのゲノムに対応した cRNA が

図2 トマト黄化えそウイルスのゲノム構造とそれにコードされるタンパク質の遺伝子発現様式

粒子内に存在していることから、この cRNA が遺伝子情報発現に重要な機能を有しているものと考えられる^{8,54)}。

先にも述べたが、この Tospovirus は植物ウイルスの中でも最も広大な宿主域を有している⁴³⁾。さらに、熱帯から亜熱帯、温帯地域までその発生地域も広域である。これは、このウイルスが環境に対する適応性に優れていることを示している¹⁴⁾。この優れた適応性を示す最大の理由として、ウイルスの分節ゲノムの入れ換え現象が観察されている。性質が異なる複数の Tospovirus が感染している宿主植物細胞内では、あたかも「交配」しているかのように、しかし無作為にいくつかの分節が入れ代わり、ヘテロな遺伝（分節）構成と化したウイルスを形成している⁴⁴⁾。それは感染植物から何らかのストレス（抵抗性など）がウイルスに与えられた場合でも、各分節を入れ換えることにより結果として置かれた環境で試行錯誤しながらウイルスとして生き延びることを模索することになる。そしてその環境で生き残る（全身感染する）ことができたウイルスだけが、媒介昆虫で次の植物へと運ばれる。この中心的役割を果たしているのが、S RNA と M RNA であると思われる¹⁶⁾。それらの分節には、2つの ORF に挟まれた中ほどの塩基配列領域（intergenic re-

gion, IGR）にはヘアピン構造を推定させる A-U に富んだ配列が認められている（S RNA では500～600塩基、M RNA では200～250塩基）。その IGR の長さやある特定の配列が環境への適応をコントロールしているかも知れない⁴⁴⁾。さらに、各分節がウイルス間に入れ代わることにより発揮される適応力は、TSWV の N タンパク質遺伝子を導入したウイルス抵抗性タバコをも簡単に凌駕する能力を発揮した⁴⁵⁾。このウイルスは未来永劫生きていく上で合理的な戦略を持っているウイルスの一つであると言わざるを得ない。逆に言えば、人為的に作成した抵抗性植物などの少々の細工は、Tospovirus にとってそれは打破することはそう難しいことではないのであろう。

Tospovirus の構造タンパク質は4種類（N, G1, G2 および L）である^{12,13,53)}。分子量約28K ダルトン（Da）の N タンパクは S RNA にコードされており、ウイルス RNA と結合することにより閉環ひも状のヌクレオキャプシドを構成している。G1（分子量約75 KDa）および G2（分子量約46KDa）と呼ばれる2種類の構造タンパク質は、ヌクレオキャプシドを包む外被膜を貫通するように突出している。両者とも糖タンパク質であることから、構造タンパク質としてだけでなくウイルスの生活環において必須の機能、特に昆

虫伝搬に関わる重要な機構に関与していることが示唆されている^{3,11)}。これらは、M RNA にポリプロテインとしてコードされ、ウイルス自身が有する分解酵素により一定の位置で切断されて機能している¹⁾。L タンパクは、分子量が約335KDaであり、L RNA にコードされる。これは、ウイルス RNA を複製する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであることがそのアミノ酸配列から推定されている^{10,68)}。Tospovirus は、粒子を構成するタンパク質以外に2種類の非構造タンパク質 (M RNA 上に NSm タンパク、S RNA 上に NSs タンパク) をコードしている^{9,27)}。近年、NSm タンパクは植物感染細胞間でウイルスがプラズモデスマータを使って移動する際の移行に関与するタンパク質であることが判明したが^{28,52)}、NSs タンパクの機能は今もって不明である²⁵⁾。

2. Tospovirus の分類

先にも述べたように、Tospovirus は *Bunyaviridae* 科の5属の内唯一植物に感染するウイルス属である⁵⁰⁾。それ以外の4属は脊椎又は無脊椎動物を宿主とするウイルスである。1990年、Law and Moyer は、鑑賞植物ニューギニアインパチエンス (*Impatiens* sp.) 分離株がその当時のアメリカ産 TSWV の普通系統の M および S RNA と分子生物学的に明らかに異なっていることを報告した²⁹⁾。翌年、それは *Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV) と名付けられた^{30,31)}。INSV が報告されて以来、Tospovirus と思われるウイルスを N タンパク質遺伝子の塩基配列相同性を基準として種分けする試みが行われてきた。そして現在、13のウイルス種を数えるに至っている (表1)。今まで分離された Tospovirus の命名は、N タンパク質遺伝子の塩基配列の相同性と N タンパク質に対する血清型 (serogroup) が検討され、国際ウイルス分類委員会の規定に則って種名が付けられていた。しかしながら、近年新たな Tospovirus の急増により血清型の区別は省略され、いきなり N タンパク質遺伝子の相同性から種として分類する動きが定着した。従って、現在は serogroup としてのグループ化は血清関係のある別種の Tospovirus が出現するまで検討していない³⁶⁾。Tospovirus 属内のウイルス種とする規定は、先にも述べたように N タンパク質遺伝子の相同性を基準とする。N タンパク質遺伝子を選んだ理由としては、その遺伝子がコードされている S RNA が感染細胞内で大量に複製されることから格好の解析材料になりうることに以外に、N タンパク質とウイルスゲノム

表1 国際ウイルス分類委員会第7次報告における Tospovirus とその血清型

Tospovirus	略称
<i>TSWV serogroup</i>	
Tomato spotted wilt virus	TSWV
Groundnut ringspot virus	GRSV
Tomato chlorotic spot virus	TCSV
<i>WSMV serogroup</i>	
Watermelon silver mottle virus	WSMoV
Watermelon bud necrosis virus	WBNV
Groundnut bud necrosis virus	GBNV
<i>Serologically unrelated</i>	
Chrysanthemum stem necrosis virus	CSNV
Impatiens necrotic spot virus	INSV
Iris yellow spot virus	IYSV
Groundnut yellow spot virus	GYSV
Groundnut chlorotic fan-spot virus	GCFSV
Physalis severe mottle virus	PhySMV
Zucchini lethal chlorosis virus	ZLCV

RNA がヌクレオキャプシドを形成しウイルス遺伝子の複製・翻訳・粒子形成に深く関わる重要なタンパク質であることが考えられるからである³⁶⁾。

現在のところ、N タンパク質遺伝子の相同性から種分けをする際の目安としては、90%以上であれば系統、80~90%であれば他の性質 (例えば、宿主域、昆虫伝搬性など) も併せて考慮して系統もしくは種とする検討をしている。80%以下の相同性であればいきなり種として扱うことができる。また、80%以下の相同性であっても血清関係が確認される場合には、先にも述べたように血清型という概念も登場する (TSWV serogroup, WSMV serogroup など)³⁶⁾。しかし血清型によるグループ化は、「種」の概念と「血清型」という概念の間にどのような差があるのか他の植物ウイルスの分類形態から見て少々わかりずらいかも知れない。「血清型」の扱いに関しては、引き続き Tospovirus 研究グループ内で国際的に議論される必要があろう。

日本で分離された Tospovirus は、ウイルス粒子内のヌクレオキャプシドの生化学的特性およびウリ科植物での感染性の違いから、少なくとも2種が確認されている⁶⁰⁾。九州以北で発生した分離株の内トマト、ピーマンおよびタバコ分離株は、ヌクレオキャプシドの抗原性、S RNA の相同性が高く、N タンパクと S RNA の電気泳動的易動度が同様であることから、従来の TSWV (普通系統) とした⁵⁶⁾。この TSWV の N タンパク質遺伝子 (DDBJ accession No. AB 010997) は、

既に3分節のゲノム全ての塩基配列が明らかになったBR-01(ブラジル普通系統)のそれとの相同性が98%以上と極めて高い⁵⁸⁾。このことから、この分離株は国際的にタイプウイルスであると判断している。一方、沖縄県のスイカおよび鹿児島県のトウガンから分離されたTospovirusは、TSWVの局部病斑宿主であるペチュニアで接種葉に局部えそ斑を生じさせた後全身感染、ウリ科植物で全身感染、さらに全身感染宿主のタバコで接種葉に黄色斑点後軽い全身感染症状を呈した¹⁹⁾。これらの病徴はTSWVにより引き起こされるものとは明らかに異なっていた。また、モノクローナル抗体による特異的抗原決定基の存在⁵⁷⁾およびノーザンハイブリダイゼーションによりS RNA間に本邦普通系統との相同性がないことが証明された⁵⁶⁾。また、NタンパクおよびS RNAの電気泳動的易動度も異なることから、明らかに別種であることが証明された¹⁵⁾。さらに、この病原ウイルスは台湾のスイカなどにも発生しており、そのS RNAの塩基配列の解析からもTSWVとは一線を画すべきとして、Watermelon silver mottle tospovirus (WSMV)と命名された^{60,72)}。

3. Tospovirusのアザミウマ媒介特性

(1) 伝搬昆虫、アザミウマ類

Tospovirusのアザミウマ類による媒介様式は特異的である。Tospovirus伝搬アザミウマは、一齢幼虫時にウイルスを獲得し⁶⁷⁾、蛹から羽化までの10日前後の潜伏期間を経た後、成虫になって5分以上の加害吸汁で初めてウイルスを伝搬する⁴⁹⁾。また、一度保毒したアザミウマは終生ウイルス伝搬能力を保持するが、経卵伝染はしない⁶⁴⁾。このような伝搬様式を示す媒介虫は他に類をみない。Tospovirusの媒介虫は、ダイズウスイロアザミウマ、ネギアザミウマ、ヒラズハナアザミウマ、ミナミキイロアザミウマ、キイロハナアザミウマ、チャノキイロアザミウマ、ミカンキイロアザミウマ、*Frankliniell schultzei*, *F. fusca*, *F. bispinosa*、の10種類が知られており、その食性の違いにより葉棲性(ダイズウスイロアザミウマ等)と花棲性アザミウマ(ミカンキイロアザミウマ等)とに大別される³⁵⁾。Tospovirus伝搬性アザミウマ類の一種で、我々が実験材料として用いているダイズウスイロアザミウマは日本固有種であり、ピーマンやトマトなどのナス科植物にTSWVを伝搬する媒介昆虫として報告された種である²⁴⁾。また、13種のTospovirusはそれぞれ10種のTospovirus伝搬アザミウマとの間に相性があるらしく、組み合わせによってはウイルス伝搬が起こ

らないケースが観られる⁷¹⁾。

1993年オランダのグループから二齢幼虫アザミウマがTospovirusを伝搬するという結果が報告された⁶⁹⁾。従来のTospovirusとアザミウマ類の媒介様式は、一齢幼虫がウイルスを獲得し羽化後の成虫の加害吸汁で初めて伝搬するというものであった⁴⁹⁾。ところが、ミカンキイロアザミウマとペチュニアのリーフディスクを用いた簡易伝搬実験系で二齢幼虫後期のほとんどの個体が伝搬能を発揮するという実験結果が報告された。これは、人工的な環境ながら従来の仮説の「生育期に依存した伝搬様式」を見直すきっかけを与えた。今後のより詳細なデータの蓄積を待ちたい。

(2) 伝搬機構

媒介昆虫体内で増殖し永続型伝搬をする植物ウイルスはTospovirusを含めて5属49種のウイルスが報告されているが、その中であたかも媒介昆虫の生育期に関連したような伝搬様式を示すものはTospovirusとアザミウマ類の組み合わせだけである³⁾。TSWVのアザミウマ類による媒介機構に関する研究は少なく、兼ねてからアザミウマ類によるTospovirus伝搬は、なぜ幼虫期でウイルスを獲得し羽化後の成虫期で伝搬が成立するのか、そして伝搬能を獲得するまでの間ウイルスは昆虫体内のどの場所でどのような状態に置かれているかなど、昆虫体内でのTospovirusの生態に極めて大きな謎があった。

その答えの一部を最も早く世に示したのが、1993年アメリカとオランダのそれぞれ独立した二つのグループからであった。それらはほぼ同様の実験手法を用い全く同じとっていいほど似通った結果を報告した。それは、植物ウイルスであるTSWVがミカンキイロアザミウマの体内組織に取り込まれた後、明らかに代謝を繰り返しながら増殖しているというものであった^{65,70)}。これは、それまで各研究者が抱いていた「増殖しているであろう。」を「増殖している。」と決定づける歴史的に評価できる論文であった。先にも述べたが、Tospovirusは自身のゲノムには5つのORFに6つのタンパク質をコードしている。そのうちの2つはウイルス粒子形成に関与しない非構造タンパク質(NSm, NSs)である。ウイルスが宿主細胞に感染しその遺伝子が翻訳されるときにだけ登場するタンパク質である。これらのタンパク質が細胞から検出されれば、ウイルスがそこに「いる」だけではなくその遺伝子が翻訳されている、すなわちウイルスが「生活」しているといえる。その二つの論文では、それら非構造

図3 孵化幼虫期に TSWV を獲得吸汁した後の TSWV-N タンパク質の蓄積量の変化 DAS-ELISA 法により個体あたりの N タンパク質を定量した。
(・) は 1 個当たりの蓄積量を示し、図中の値は OD490nm の吸収値を示す。
(-) は、各時点での平均値を示す。H は陰性対象区を示す。

タンパク質の内の一つ NSs タンパク質を生化学的あるいは組織免疫学的にウイルス伝搬ミカンキイロアザミウマの中腸と唾液腺組織から顕在化することに成功したのである。これはまさに、アザミウマ類による伝搬様式が増殖型永続伝搬性であることを証明している。

しかし、その論文では時間経過に伴うウイルス濃度の変化さらにその組織局在性については言及していなかった。上記 2 つの論文が発表された時点で我々の研究室では、ダイズウスイロアザミウマの一齢幼虫にウイルスを獲得吸汁させた後その体内におけるウイルス濃度を成虫期に至るまでの 17 日間に渡って ELISA 法を用いて継続的に定量し、体内において N タンパク質濃度が劇的に変化することを確認していた (図 3)⁴⁰⁾。一齢幼虫時に TSWV を獲得した幼虫期アザミウマではその後直ちに N タンパク質が増加し、蛹期では極端に低下した。成虫期では蛹期に落ち込んだウイルス濃度を維持するかのように低濃度であった。これにより、幼虫期のダイズウスイロアザミウマに獲得吸汁された TSWV のその後の日数経過に伴う体内濃度変化を観察すると 2 つの時期、すなわち急性感染期

と持続感染期があることが認められた。この現象は、後にミカンキイロアザミウマにおいても観察された⁶⁷⁾。このような現象は、増殖性半永続型の伝搬様式を示すウイルス伝搬性昆虫として知られるヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) と *Togaviridae* 属の Sindbis virus (SV) の組み合わせにおいても観察されている。その体内ウイルス濃度は、ウイルス獲得後虫体内で急激なウイルスの増殖が起こり、その後の増殖が低く抑えられるという急性感染期と持続感染期の 2 つの時期が認められている⁵⁾。ヒトスジシマカは SV を成虫獲得・成虫伝搬するが、急性感染期後のウイルス濃度の低い持続感染期中ではヒトスジシマカの唾液腺組織にウイルスが局在し、結果として伝搬能を発揮するようになる。持続感染期の急激なウイルス蓄積量の減少は、ウイルス感染により媒介昆虫細胞から誘導・産生される抗ウイルス物質によるものであると報告されている^{5, 32, 39, 48)}。この抗ウイルス物質は、持続感染期にその産生量が最大となり、ウイルス RNA ゲノムの複製を強く抑制することで、ウイルスの増殖を低く抑える事が *in vitro* での研究から示されている^{32, 39)}。媒介昆虫細胞内では、持続感染した状態で SV は増殖し続け、媒

図4 一齢幼虫時にウイルス獲得吸汁した個体の二齢幼虫時（上図），および羽化後成虫（下図）における TSWV の組織局在性
幼虫時には中腸全体でウイルスが増殖しているが，羽化後の成虫では唾液腺に局在している（下図，矢印）。

介昆虫の生育に影響が出ない程度の低い割合で存続する事が示唆されている。アザミウマ体内において TSWV に対する抗ウイルス物質の誘導が起きているかは不明であるが，媒介昆虫体内で *Togaviridae* と同じ様な増殖型を持つウイルスとしてその可能性が示唆される。

我々は次に，ダイズウスイロアザミウマ各生育期における *Tospovirus* の組織局在性の変化について，間接蛍光抗体法を用いて観察を行った（図4）⁶¹⁾。TSWV の局在は，ウイルス獲得直後から中腸組織の前端部分に観察されその後中腸組織全体へと拡大して行った。その後，蛹期では胸部中央附近に蛍光シグナルが集積し幼虫時に見られた中腸全体の陽性反応は影を潜めた。ウイルス伝搬能を発揮している成虫期では唾液腺に局在していたことから，各生育期をまたいで中腸組織から唾液腺組織へのウイルスの組織間移行がアザミウマのウイルス伝搬を発揮するために重要な役割をな

すことが示唆された。また本年（1999年），オランダのグループが TSWV 獲得後のミカンキイロアザミウマ体内で時間経過とともにウイルスが組織間移動をどのようにするか詳細に調査した結果を報告した³⁸⁾。アザミウマの消化器系は大きく分けて，前腸，第1中腸，第2中腸，第3中腸および後腸から成る。さらにそれらの組織は筋肉細胞により取り囲まれている。幼虫でウイルスを獲得した後ウイルス伝搬能を示す羽化成虫に共通した現象は，その何れもが第1中腸から第3中腸までを取り囲む筋肉細胞でウイルスの局在が確認されていることである。また，それら伝搬能を示す成虫では一対ある唾液腺の両方でウイルスが増殖している傾向にある。これらの結果を先の ELISA 法による虫体内でのウイルス蓄積量の経時的变化並びに TSWV の局在部位の変化とを照らし合わせてみると，急激な TSWV の増殖期である幼虫期間の急性感染期では中腸組織がウイルスの増殖の場となり，その後の低レベルでの増殖期である成虫期間の持続感染期では主として唾液腺組織で増殖・維持され，それと同時にウイルス伝搬が発揮される事になる。また TSWV が中腸組織から唾液腺組織へと移行し，その移行過程が急性感染期から持続感染期に移る蛹期以前に行われることも明らかとなった。

一方，羽化後の健全成虫が TSWV 感染植物で獲得吸汁させてもなぜウイルスを伝搬できないのか，未だに不思議な現象がある。1992年アメリカのグループは，成虫期の健全ミカンキイロアザミウマに TSWV を3日間獲得させ，その後の昆虫体内のウイルス蓄積量を ELISA 法で，また実際のウイルスの局在性を免疫電子顕微鏡で検出した⁶³⁾。その結果，獲得直後のほとんどのウイルスは中腸内腔に集積し一部は上皮細胞に侵入してはいるものの，その後直ちに蓄積量が減少しそれら成虫アザミウマはウイルス伝搬能を示さなかったことを報告した。成虫期獲得後にアザミウマ成虫の排泄物中に TSWV が検出されたことから虫体内での急激な蓄積量減少は排泄物中への排出によるものであろうと考えている。このことから成虫がウイルスを獲得・伝搬しない理由として「midgut infection barrier」の存在を示唆する仮説を提示した。一般的にウイルスと媒介昆虫の伝搬能を阻止する要因として，Midgut infection barrier, Dissemination barrier, Salivary gland escape barrier, Transovarial and venereal transmission barriers の4つの概念が考えられている³⁾。これらは読んで字のごとく，中腸感染を阻止するバリアー，初期感染組織からの拡散を阻止するバリ

アー、ウイルス伝搬の最終感染組織となる唾液腺からのウイルス放出を阻止するバリアー、最後は継卵伝搬あるいは異性間伝搬を阻止するバリアーである。では我々が材料としているダイズウスイロアザミウマではどのようなパターンを示すのか、先の幼虫によるウイルス獲得後の解析手法を用いて健全成虫による獲得吸汁後の個体を調査した⁴¹⁾。その結果、健全ダイズウスイロアザミウマ成虫に TSWV を獲得させた後の体内ウイルス量は、3～5日かけて一旦増殖しその後減少する、すなわち急性感染期のパターンを示すことが明らかになった。そこで昆虫体内に侵入したウイルスが中腸やその他の組織に感染し増殖しているかどうかを確かめるために間接蛍光抗体法で更に解析した。そうすると成虫期で TSWV を獲得した後の ELISA 値が高い時期には、ウイルスの構造タンパク質 (N) と共にウイルスが代謝していることを示す非構造タンパク質 (NSs) が中腸組織に、しかも大量に検出された。しかしながら、成虫期獲得吸汁後15日まで中腸に感染しているウイルスの動態をモニターしたが、一向に唾液腺組織には移動しなかった。成虫中腸に感染した TSWV は、その後何らかの原因により TSWV が中腸組織以外の体内器官に移行できなかったのではないかと考えられる。この事実から「Dissemination barrier」の存在が浮き彫りになってきた。これは、ミカンキイロアザミウマにおいて観察された獲得吸汁後直ちに（一日後に）ウイルス蓄積量が減少する結果と大きく異なり、Tospovirus を伝搬するアザミウマ類でも昆虫体内でのウイルスの生態には大きな違いがあることを示す一例となった。Tospovirus を伝搬する上記2種以外の8種アザミウマ体内ではウイルスと体内組織の間でどのような現象が観察されるのか、また Tospovirus を伝搬しないアザミウマの体内ではどの段階でウイルス伝搬が阻止されるのか、アザミウマによる Tospovirus 伝搬の多様性という観点で極めて興味をもたれるところである。

これらのことから、アザミウマによる TSWV の増殖型永続伝搬が達成されるためには、中腸組織から唾液腺組織へのウイルスの組織間移行が成立しなければならないと結論できる。しかしながら現在まで得られた報告の何れもが現象の観察の積み重ねであり、それらの現象が発生するメカニズムを分子生物学的に明らかにしていくためには感染型 cDNA を使ったウイルスの遺伝子操作系や伝搬昆虫（アザミウマ）類の培養細胞を使った *in vivo* での実験系を早急に開発する必要がある。また、植物細胞内における TSWV の粒子

形成に関する研究は古くから行われているのに対し^{17, 23, 33)}、アザミウマ体内でのウイルス粒子の形成過程並びにウイルスタンパク質の微細構造に関する研究報告は今のところ僅かである⁶⁶⁾。TSWV が感染した一つの植物細胞内ではウイルスタンパク質の集会和共に多くのウイルス粒子の蓄積も容易に観察される¹²⁾。しかし、幼虫時に保毒した成虫アザミウマの体内では、唾液腺細胞から唾液管にウイルス粒子が吐き出されるところ以外の場所では被膜を纏った TSWV の完全粒子を目にすることは滅多にない^{41, 66)}。これも、植物細胞内と昆虫細胞内でウイルスの子孫を形成する機構に大きな異なりがあるためであろうと推察できる。

アザミウマと Tospovirus の関係をはじめ植物ウイルスの昆虫伝搬研究において、ウイルスの体内移行に関する分子レベルでの解析はようやく始まったばかりである^{4, 21)}。この伝搬機構解明に向けさらに慎重な研究を続けていかなければならない。

おわりに

Tospovirus の被害を受けた園芸栽培圃場では、必ずといって良いほど被害作物上にアザミウマ類の生息が確認される。アザミウマ類防除を目的として、紫外線カットフィルムやシルバーテープなどを利用した耕種の防除法や殺虫剤散布による化学的防除法が施行されるが、一時的効果しか得られていない⁵⁹⁾。アザミウマ類の忌避を目的とした長期的かつ持続的な防除対策の開発が急務とされている。

近年、植物ウイルスとその宿主植物に関する研究、とりわけシロイヌナズナやトマトに代表されるような植物のウイルス抵抗性（遺伝子）に関する研究は欧米を中心として花盛りである。1998年、3種の Tospovirus に対して抵抗性を示す野生トマト (*Lycopersicon peruvianum*) の TSWV 抵抗性遺伝子 (Sw5) がそのゲノムから単離された⁷⁾。これは今後の Tospovirus 抵抗性遺伝子の研究に一層の拍車をかけるであろう。また、Sw5抵抗性遺伝子の働きと似かよった Tospovirus 抵抗性を有するトマト野生種 (*L. chilense*) と栽培種を交配して得られた育成種が、南アフリカにおける野外ウイルス抵抗性栽培試験においてその F2 および F3 世代でも高い抵抗性を発揮し、その遺伝様式は単一優性遺伝であることが報告された⁵¹⁾。その様な植物のウイルス病抵抗性に関する研究成果は本病の被害減少あるいは撲滅に向け必須のものであろう。しかし一方、現在現場圃場で問題とされている植物ウイルス病の90%以上は媒介昆虫により伝搬されるものであ

る。我々はこの昆虫伝搬機構を解明することで、その生命現象の仕組みを逆手に取った新たな防除法が見つけられるのではないかという期待を込め、現在 Tospovirus の昆虫伝搬に関する研究を遂行している。近い将来、植物のウイルス病抵抗性に関する研究と同じように、ウイルスと媒介昆虫の分子応答の研究成果からウイルス病防御に役立つ知見が得られるものと信じている。本ウイルスはアザミウマ伝搬様式や遺伝子発現機構に代表されるように極めてユニークな生物学的特性がある。また、動物ウイルスとの類似性も高いことから、昆虫媒介機構の解明を含めその性質をさらに明らかにしていく必要があると思われる。

文 献

- Adkins, S., Choi, T.-J., Israel, B. A., Bandla, M. D., Richmond, K.E., Schultz, K. T., Sherwood, J. L., and German, T. L. (1996) Baculovirus expression and processing of tomato spotted wilt tospovirus glycoproteins. *Phytopathology* **86**, 849-855.
- Allen, W. R., and Matteoni, J. A. (1991) Petunia as an indicator plant for use by growers to monitor for thrips carrying the tomato spotted wilt virus in greenhouses. *Plant Dis.* **75**, 78-82.
- Ammar, E. D. (1994) Propagative transmission of plant and animal viruses by insects : factors affecting vector specificity and competence. *Adv. Dis. Vect. Res.* **10**, 289-331.
- Bandla, M. D., Campbell, L. R., Ullman, D. E., and Sherwood, J. L. (1998) Interaction of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology* **88**, 98-104.
- Bowers, D. F., Abell, B. A., and Brown, D. T. (1995) Replication and tissue tropism of the Alphavirus sindbis in the mosquito *Aedes albopictus*. *Virology* **212**, 1-12.
- Brittlebank, C. C. (1919) Tomato diseases. *J. Agric. Victoria* **17**, 231-235.
- Brommonschenkel, S. H., Tanksley, S. D., Frary, A., Frary, A., Otoni, W. C., and Cheavegatti, A. (1998) Positional cloning molecular characterization and heterologous expression of the tospovirus resistance gene Sw-5. 7th International Congress of Plant Pathology, Abst. No. 5.4.7.
- Buchmeier, M. J., Clegg, J. C. S., Franze-Fernandez, M. T., Kolakofsky, D., Peters, C. J., and Southern, P. J. (1995) *Arenaviridae*. In *Virus Taxonomy* (edited by Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D.), Arch. Virol. (suppliment 10), Springer-Verlag Wien New York, pp. 319-323.
- de Haan, P., Wagemakers, L., Peters, D., and Goldbach, R. (1990) The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* **71**, 1001-1007.
- de Haan, P., Kormelink, R., Resende, R. De. O., van Poelwijk, F., Peters, D., and Goldbach, R. (1991) Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **71** : 2207-2216.
- Elliott, R. M. (1990) Molecular biology of the Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* **71**, 501-522.
- Francki, R. I. B. and Hatta, T. (1981) Tomato spotted wilt virus. In *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis* (Kurstak, E. ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical press, pp. 491-512.
- German, T. L., Ullman, D. E., and Moyer, J. W. (1992) Tospoviruses : diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Ann. Rev. Phytopathol.* **30**, 315-348.
- Goldbach, R., and Peters, D. (1994) Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Sem. Virol.* **5**, 113-120.
- Hanada, K., Tsuda, S., Kameya-Iwaki, M., and Tochi-hara, H. (1993) Distinct properties of nucleocapsid of a watermelon strain of tomato spotted wilt virus. *Ann. phytopathol. soc. Jpn.* **59**, 500-506.
- Hoffmann, K., Qiu, W. P., and Moyer, J. W. (1997) Characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV) reassortments overcoming host- and pathogen-derived resistance. *Phytopathology* (Supplement) **87**, S42.
- Ie, T. S. (1971) Electron microscopy of developmental stages of tomato spotted wilt virus in plant cells. *Virology* **2**, 468-479.
- Inoue-Nagata, A. K., Kormelink, R., Nagata, T., Kitajima, E. W., Goldbach, R., and Peters, D. (1997) Effect of temperature and host on the generation of tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs. *Phytopathology* **87**, 1168-1173.
- Iwaki, M., Honda, Y., Hanada, K., Tochi-hara, H., Yonaha, T., Hokama, K., and Yokoyama, T. (1984) Silver Mottle Disease of watermelon caused by tomato spotted wilt virus. *Plant Dis.* **68**, 1006-1008.
- Kikkert, M., van Poelwijk, F., Storms, M., Kassies, W., Bloksma, H., van Lent, J., Kormelink, R., and Goldbach, R. (1997) A protoplast system for studying tomato spotted wilt virus infection. *J. Gen. Virol.* **78**, 1755-1763.
- Kikkert, M., Meurs, C., van de Werering F., Dorf-

- muller, S., Peters, D., Kormelink, R., and Goldbach, R. (1999) Binding of tomato spotted wilt virus to a 94-kDa thrips. *Phytopathology* **88**, 63-69.
- 22) Kikkert, M., van Lent, J., Storms, M., Bodegom, P., Kormelink, R., and Goldbach, R. (1999) Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. *J. Virol.* **73**, 2288-2297.
 - 23) Kitajima, E. W. (1965) Electron microscopy of virus-cabeça virus (Brazilian tomato spotted wilt virus) within the host cell. *Virology* **26**, 89-99.
 - 24) 小島博文, 尾崎武司, 芳岡昭夫, 井上忠男 (1976) Tomato spotted wilt virus によるトマトの黄化えそ病, *日植病報*, **42**, 287-294.
 - 25) Kormelink, R., Kitajima, E. W., de Haan, P., Zuidema, D., Peters, D., and Goldbach, R. (1991) The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. *Virology* **181**, 459-468.
 - 26) Kormelink, R., de Haan, P., Peters, D., and Goldbach, R. (1992) Viral RNA synthesis in tomato spotted wilt virus-infected *Nicotiana rustica* plants. *J. Gen. Virol.* **73**, 687-693.
 - 27) Kormelink, R., de Haan, P., Meurs, C., Peters, D., and Goldbach, R. (1992) The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J. Gen. Virol.* **73**, 2795-2804.
 - 28) Kormelink, R., Storms, M., van Lent, J., Peters, D., and Goldbach, R. (1994) Expression and subcellular location of the NSm protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology* **200**, 56-65.
 - 29) Law, M. D., and Moyer, J. W. (1990) A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *J. Gen. Virol.* **71**, 933-938.
 - 30) Law, M. D., Speck, J., and Moyer, J. W. (1991) Nucleotide sequence of the 3' non-coding region and N gene of the S RNA of a serologically distinct tospovirus. *J. Gen. Virol.* **72**, 2597-2601.
 - 31) Law, M. D., Speck, J. and Moyer, J. W. (1992) The M RNA of impatiens necrotic spot tospovirus (*Bunyaviridae*) has an ambisense genomic organization. *Virology* **188**, 732-741.
 - 32) Luo, T., and Brown, D. T. (1994) A55-kDa protein induced in *Aedes albopictus* (mosquito) cells by antiviral protein. *Virology* **200**, 200-206.
 - 33) Milne, R. G. (1970) An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in sections of infected cells and in negative stain preparations. *J. Gen. Virol.* **6**, 267-276.
 - 34) Milne, R. G., and Francki, R. I. B. (1984) Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family Bunyaviridae? *Intervirology* **22**, 72-76.
 - 35) Mound, L. A., Heming, B. S., and Palmer, J. M. (1980) Phylogenetic relationships between the families of recent Thysanoptera (Insecta). *Zool. J. Linnean. Soc. London* **69**, 111-141.
 - 36) Moyer, J. W. (1999) Tospoviruses (*Bunyaviridae*). In *Encyclopedia of virology* 3rd edition (edited by Granoff, A., and Webster, R. G.), Academic Press, San Diego, *in press*.
 - 37) 長井雄治 (1993) トマト, 作物ウイルス病辞典 (土崎常男, 栃原比呂志, 亀谷満朗, 柳瀬春夫 編), 全国農村教育協会, 東京, pp. 264-275.
 - 38) Nagata, T., Inoue-Nagata, A. K., Smid, H. M., Goldbach, R., and Peters, D. (1999) Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus. *J. Gen. Virol.* **80**, 507-515.
 - 39) Newton, S. E., and Dalgarno, L. (1983) Anti viral activity released from *Aedes albopictus* cells persistently infected with semliki forest virus. *J. Virol.* **47**, 652-655.
 - 40) Ohnishi, J., Tsuda, S., Fujisawa, I., Hosokawa, D., and Tomaru, K. (1996) Immunolocalization of tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein in larval and pupal thrips (*Thrips setosus*): A time-course analysis. *Acta Hort.* **431**, 325-332.
 - 41) Ohnishi, J., Hosokawa, D., Fujisawa, I., and Tsuda, S. (1998) Tomato spotted wilt tospovirus movement into the salivary glands during the development of thrips. *Thrips setosus*, is associated with the transmissibility. 7th International Congress of Plant Pathology, Abst. No. 1.13.4.
 - 42) Pardigon, N., Vialat, P., and Bouloy, M. (1982) Panhandle and hairpin structure at the termini of Germiston virus RNAs (bunyavirus). *Virology* **122**, 191-197.
 - 43) Peters, D. (1998) An updated list of plant species susceptible to tospoviruses. In *Forth international symposium on tospovirus and thrips in floral and vegetable crops*, Wageningen, The Netherlands, pp. 107-110.
 - 44) Qiu, W. P., Geske, S. M., Hickey, C. M., and Moyer, J. W. (1998) Tomato spotted wilt tospovirus genome reassortment and genome segment-specific adaptation. *Virology* **244**, 186-194.
 - 45) Qiu, W. P., and Moyer, J. W. (1999) Tomato spotted wilt tospovirus adapts to the TSWV N gene-derived resistance by genome reassortment. *Phytopathology* **89**, 575-582.
 - 46) Resende, R. de O., de Haan, P., de Avila, A. C., Kitajima, E. W., Kormelink, R., Goldbach, R., and Peters, D. (1991) Generation of envelope and defec-

- tive interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. J. Gen. Virol. **72**, 2375-2383.
- 47) Resende, R. de O., de Haan, P., van de Vosse, E., de Avila, A. C., Goldbach, R., and Peters, D. (1992) Defective interfering L RNA segments of tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. J. Gen. Virol. **73**, 2509-2516.
 - 48) Riedel, B., and Brown, D. T. (1979) Novel anti viral activity found in the media of Sindbis Virus persistently infected mosquito *Aedes albopictus* cell cultures. J. Virol. **29**, 51-60.
 - 49) Sakimura, K. (1962) The present status of thrips-borne viruses. In Biological transmission of disease agent. (edited by Maramoroschi, K.), Academic Press, New York and London, pp. 33-40.
 - 50) Schmaljohn, C. S., Beaty, B. J., Calisher, C. H., the late Dalrymple, J. M., Elliott, R. M., Karabatsos, N., Kolakofsky, D., Lee, H. W., Lvov, D. K., Marriott, A. C., Nuttall, P. A., Peters, D., Pettersson, R. F., and Shope, R. E. (1995) *Bunyaviridae*. In Virus Taxonomy (edited by Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D.), Arch. Virol. (supplement 10), Springer-Verlag Wien New York, pp. 300-315.
 - 51) Stevens, M. R., Canady, M., and Barineau, S. M. (1998) What we know about tospovirus resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) derived from the wild species *L. chilense*. In Forth international symposium on tospovirus and thrips in floral and vegetable crops, Wageningen, The Netherlands, pp. 19-20.
 - 52) Storms, M., Kormelink, R., Peters, D., van Lent, J., and Goldbach, R. (1995) The non-structural protein NSm of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. Virology **214**, 485-493.
 - 53) Tas, P. W. L., Boerjan, M. L., and Peters, D. (1977) The structural proteins of tomato spotted wilt virus. J. Gen. Virol., **36**, 267-279.
 - 54) Toriyama, S., and Tomaru, K. (1995) *Tenuivirus*. In Virus Taxonomy (edited by Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D.), Arch. Virol. (supplement 10), Springer-Verlag Wien New York, pp. 316-318.
 - 55) Tsuda, S., Hanada, K., Hidaka, S., Minobe, Y., Kameya-Iwaki, M., and Tomaru, K. (1992) The presence of three pairs of possibly complementary RNA species in isolated nucleocapsid material of tomato spotted wilt virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **58**, 393-404.
 - 56) Tsuda, S., Hanada, K., Minobe, Y., Kameya-Iwaki, M., and Tomaru, K. (1993) Tomato spotted wilt virus isolates in Japan are grouped in two strains. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **59**, 626-634.
 - 57) Tsuda, S., Hanada, K., Fujisawa, I., Kameya-Iwaki, M., and Tomaru, K. (1994) The demonstration of strain-specific antigenic determinants on nucleocapsid of tomato spotted wilt virus by monoclonal antibodies. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **60**, 216-220.
 - 58) 津田新哉, 藤沢一郎, 中野正明, 花田 薫, 亀谷満朗, 日高 操, 都丸敬一 (1994) トマト黄化えそウイルス (普通系統) S RNA の N タンパク質領域及び3'末端非翻訳領域の塩基配, 日植病報 **60**, 375. (講演要旨)
 - 59) 津田新哉 (1994) わが国に発生するトマト黄化えそウイルスとその特性. 植物防疫 **48**, 497-501.
 - 60) Tsuda, S., Hanada, K., Minobe, Y., Kameya-Iwaki, M., and Tomaru, K. (1996) Grouping of five tospovirus isolates from Japan. Acta Hort. **431**, 176-185.
 - 61) Tsuda, S., Fujisawa, I., Ohnishi, J., Hosokawa, D., and Tomaru, K. (1996) Localization of tomato spotted wilt tospovirus in larvae and pupae of the insect vector, *Thrips setosus*. Phytopathology **86**, 1199-1203.
 - 62) 津田新哉 (2000) トマト黄化えそ病, 農業および園芸, 75, 印刷中.
 - 63) Ullman, D. E., Cho, J. J., Mau, R. F. L., Westcot, D. M., and Custer, D. M. (1992) A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. Phytopathology **82**, 1333-1342.
 - 64) Ullman, D. E., Cho, J. J., Mau, R. F. L., Hunter, W. B., Westcot, D. M., and Custer, D. M. (1992) Thrips-tomato spotted wilt virus interactions: morphological, behavioral and cellular components influencing thrips transmission. Adv. Dis. Vector Res. **9**, 195-240.
 - 65) Ullman, D. E., German, T. L., Sherwood, J. L., Westcot, D. M., and Cantone, F. A. (1993) Tospovirus replication in insect vector cells immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. Phytopathology **83**, 456-463.
 - 66) Ullman, D. E., Westcot, D. M., Chenault, K. D., Sherwood, J. L., German, T. L., Bandla, M. D., Cantone, F. A., and Duer, H. L. (1995) Compartmentalization, intracellular transport, and autophagy of tomato spotted wilt tospovirus proteins in infected thrips cells. Phytopathology **85**, 644-654.

- 67) van de Wetering, F., Goldbach, R., and Peters, D. (1996) Tomato spotted wilt tospovirus ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathology* **86**, 900-905.
- 68) van Poelwijk, F., Boye, K., Oosterling, R., Peters, D., and Goldbach, R. (1993) Detection of the L protein of tomato spotted wilt virus. *Virology* **197**, 468-470.
- 69) Wijkamp, I., and Peters, D. (1993) Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology* **83**, 986-991.
- 70) Wijkamp, I., Van Lent, J., Kormelink, R., Goldbach, R., and Peters, D. (1993) Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.* **74**, 341-349.
- 71) Wijkamp, I., Almaraz, N., Goldbach, R., and Peters, D. (1995) Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology* **85**, 1069-1074.
- 72) Yeh, S.-D., and Chang, T.-F. (1995) Nucleotide sequence of the N gene of watermelon silver mottle virus, a proposed new member of the genus *Tospovirus*. *Phytopathology* **85**, 58-64.