



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ジャガイモやせいもウイルスの病原性と宿主トマトにおける病徴発現に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	直井, 崇
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14807号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85448
Type	doctoral thesis
File Information	Naoi_Takashi_summary.pdf



学位論文の要約

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 直井 崇

学位論文題名

ジャガイモやせいもウイルスの病原性と
宿主トマトにおける病徴発現に関する研究

1. 緒言

ウイルスは環状 1 本鎖 RNA をゲノムとする最小の植物病原体であり、自身の配列中にタンパク質をコードしていないため宿主の酵素を利用し自律的に複製する。ウイルスの病原性は感染した宿主植物によって異なり、これまでに野菜や果物、樹木、及び花卉を含む 15 種以上の作物における 25 種類以上の病気が報告されている (Sano, 2021)。またウイルスは数塩基の変異で病原性、宿主特異性、種子伝染性、移行能等が大きく変化するほか、環状分子内で形成する二次構造もまたウイルスの様々な性質に寄与することが報告されている。ウイルスが感染した宿主植物で病原性を発揮するか、またウイルスに感染した宿主植物が発病するかはウイルスと宿主の組み合わせによって異なる。そのためウイルス側に存在する病原性決定要因と宿主植物側に存在する発病要因、及びそれらの間の相互作用によって感染宿主が発病するか否か、または病徴の程度が決定されると考えられる。本研究では農業上重要な作物であるトマト (*Solanum lycopersicum*) においてジャガイモやせいもウイルス (PSTVd) の発病メカニズムを包括的に理解することを目的とし、トマト側と PSTVd 側の双方から病徴の程度を決定しうる要因に関して解析を行った。

2. 研究内容

① PSTVd の 1 量体 RNA による感染系の確立

ウイルスの複製や移行、病原性決定などの生物学的性質に寄与する塩基及びゲノムの高次構造は、変異を導入した際の性質変化を解析することで推定・特定が可能である。In vitro で大量に合成可能であり、かつ感染効率が低いことから、ウイルスの逆遺伝学的研究においてはクローン化 cDNA から作製したプラス鎖の 2 量体 RNA 転写産物

が使用される場合が多い。この 2 量体 RNA 転写系では、変異体を作製する際 1 量体ウイロイド cDNA に変異を導入した後に 2 組をタンデムにベクターへ挿入する必要がある。そのため作業工程が多く、複数の変異体を作製する場合には手間がかかる。そのため PSTVd の病原性解析を容易にすることを目的とし、従来の 2 量体 RNA 転写産物による感染系に代わり cDNA クローンから転写した非ウイロイド配列を含まない正確な 1 量体 RNA による感染系を構築した。3 カ所の異なる位置から転写した正確な 1 量体 PSTVd 転写産物はその転写開始位置に関わらずトマト品種 Rutgers に感染し、そのうち 2 種が 2 量体 PSTVd 転写産物と同等もしくはそれ以上の感染性を示した。また最も感染性の高かった 1 量体転写産物を接種した植物における PSTVd の初期蓄積量は、2 量体転写産物を接種した植物よりも高かった。

このように 1 量体線状 PSTVd RNA は一般的に高い感染性があると言われる 2 量体線状 PSTVd RNA と同等の感染性を示し、全身感染はむしろ早いように思われた。これらの結果は、これまで感染性がないと考えられてきた正確な 1 量体 PSTVd RNA が 2 量体 RNA 同様高い感染性を有することを示している。本研究ではこの 1 量体感染系を用いて PSTVd の接種試験及び病原性解析を行った。

② トマト側に存在する病徴発現に影響を及ぼす要因の解析

I. PSTVd 2 系統に対するトマト品種・近縁野生種の感受性及び耐病性評価

これまで PSTVd 感染に対する感受性の高い栽培作物へ交配により導入可能な抵抗性及び耐病性は報告されていない。また栽培トマトと交配可能な種が多く含まれるトマト野生種はその大部分で PSTVd 感染に対する反応が報告されておらず、トマト育種に利用可能な PSTVd 感染に対する抵抗性及び耐病性形質を有するものが存在する可能性が十分に考えられる。本研究では幅広い栽培・野生トマト及びトマト近縁野生種の PSTVd 感染に対する反応を明らかにし、かつトマト育種に利用可能な抵抗性及び耐病性形質を探索するため、1 種の栽培トマト (13 品種)、1 種の野生トマト (4 系統+1 品種)、及び 12 種のトマト近縁野生種 (14 系統) に病原性の異なる中間系統の PSTVd-Intermediate (-Int) と致死系統の PSTVd-AS1 を接種した。その結果、大玉・中玉のトマト品種は PSTVd 感染に対する感受性が高い傾向にあり、PSTVd 系統間の病原性差異も顕著に認められた。一方でミニトマト品種は PSTVd 感染に対して耐病性を示す傾向にあったが、果実においては顕著な病徴が認められた。そして果実の病徴では PSTVd 系統間の病原性差異が顕著に認められた。野生トマト *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* は 5 系統のうち 2 系統が過去の報告 (Singh, 1973) にあったように PSTVd 感染に対して耐病性を示した一方、3 系統が感受性を示した。このように野生トマト *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* には感受性の非常に高い系統が含まれることが明らかとなった。近縁野生種の大部分の種 (または系統) は PSTVd 感染時に発病し、その一部は特徴的な病徴を示

した. PSTVd の全身感染を阻害するような抵抗性を有するトマト近縁野生種は見つからなかったものの, *S. pimpinellifolium* LA0373 と LA0411 及び *S. chmielewskii* LA1028 は致死系統 PSTVd-AS1 感染時であっても病徴が認められない強い耐病性を示した. また PSTVd 感染に対して感受性を示した近縁野生種では PSTVd 系統間の病原性差異が顕著に認められたのに対し, 耐病性を示した種では病原性差異はほとんど認められなかった. また本研究ではこれまで PSTVd 感染に対する反応が不明であったトマト近縁野生種 7 種 (*S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum*, *S. neorickii*, *S. huaylasense*, 及び *S. pennellii*) が PSTVd 感染時に様々な反応を示し, それらの大部分が PSTVd の発病宿主であることを明らかにした.

以上より, 同一の PSTVd 分離株を接種した場合であっても病徴の種類や程度は大きく異なったことから, トマト側 (栽培・野生トマト及び近縁野生種) にそれらを決定しうる要因が存在していると考えられた. また PSTVd 系統間の病原性差異は PSTVd 感染に対して感受性の高い宿主植物で顕著であった一方, 耐病性の高い宿主植物では差異が小さい, または認められなかった. 同様の傾向はその他ナス属, トウガラシ属, 及びタバコ属植物においても認められた (Naoi and Hataya, 2021). これらの知見は, PSTVd 側の病原性決定因子の役割は宿主植物に依存し, その植物における病徴の程度は PSTVd 側の病原性決定因子と病徴発現に関連する宿主因子の間の相互作用によって決定されることを示唆している.

II. トマト近縁野生種 2 種で見つかった PSTVd 感染に対する耐病性の遺伝様式及び発現機構の解析

現在のところ, ウイロイドに対する抵抗性及び耐病性の発現機構及び遺伝様式はほとんど明らかになっていない. これまで作物において報告されている唯一のウイロイド抵抗性であるキクのキク矮化ウイロイド (*chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) 抵抗性はある程度解析されているものの, その遺伝様式は未だに不明な部分が多い (Matsushita *et al.*, 2012; Nabeshima *et al.*, 2018). PSTVd においてはジャガイモ野生種 (*S. berthaultii*) が汁液接種に対して抵抗性を示すことが報告され, さらに PSTVd に対する抵抗性及び耐病性はその他のジャガイモ近縁野生種でも報告された (Palukaitis, 2012; Singh, 1985; Sofy *et al.*, 2013). しかしながら, これらの PSTVd 感染に対する抵抗性はジャガイモの栽培種 (*S. tuberosum*) に導入できなかった (Palukaitis, 2012; Palukaitis, 2014). またトマトでは PSTVd 感染に対して感受性の品種と耐病性の品種の交配で得られた F1 雑種が PSTVd-AS1 感染時に発病し, 病徴を発現する形質 (感受性) が顕性であった (Matoušek *et al.*, 2007). このように, 交配により導入可能な PSTVd 感染に対する抵抗性及び耐病性はこれまで報告されていない. 上記の背景より, 本研究では I の接種試験においてトマト近縁野生種 *S. pimpinellifolium* LA0373 及び *S. chmielewskii* LA1028 で見つかった PSTVd 感染に対する強い耐病性の遺伝様式及び発現機構を明らかにするため, まず感

受性の高い野生トマト *S. lycopersicum*. var. *cerasiforme* LA1286 とそれら近縁野生種の間
の交配後代を作出し接種試験を行った。それぞれの F1 雑種は致死系統の PSTVd-AS1 感
染時に耐病性を示し、これらの近縁野生種における PSTVd 感染に対する耐病性はいず
れも顕性形質であった。また PSTVd 感染に対して耐病性を示したトマト近縁野生種 *S.*
pimpinellifolium LA0373 及び *S. chmielewskii* LA1028 における PSTVd の蓄積は、感受性を
示した野生トマト *S. lycopersicum*. var. *cerasiforme* LA1286 と比較して著しく低かった。
さらに F1 雑種における感染初期の PSTVd の蓄積も野生トマト *S. lycopersicum*. var.
cerasiforme LA1286 と比較して低く、病徴の程度と PSTVd の蓄積量が正の相関を示した。
次に F1 雑種のうち *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* LA1286 × *S. pimpinellifolium* LA0373 F1
を自殖して得た F2 集団に PSTVd-AS1 を接種し、PSTVd 感染に対する耐病性形質の分離
を解析した。その結果、F2 集団は少なくとも 4 つの発病パターンを示し、全体の約 63%
が PSTVd-AS1 に感染しても発病しなかった。発病パターンの分離比より、この耐病性
は寄与の大きな主働遺伝子と寄与の小さなその他の微働遺伝子によって支配される量
的形質である可能性が示唆された。さらに発病グループごとに PSTVd の蓄積を解析し
たところ、PSTVd の病徴が激しいグループほど PSTVd の蓄積量は多く、発病の程度と
PSTVd の蓄積量が正の相関を示した。

以上の結果より、トマト近縁野生種 2 種で見つかった PSTVd 感染に対する強い耐病
性は感染初期において PSTVd の蓄積が低く抑えられていることに起因すると考えられた。
そして PSTVd の蓄積に影響を及ぼす遺伝性の要因が PSTVd 感染に対する耐病性に寄与
していると考えられた。

III. トマトの RNA 依存 RNA ポリメラーゼ 6 の発現抑制が病原性の異なる PSTVd 2 系 統に及ぼす影響の解析

RNA 依存 RNA ポリメラーゼ 6 (RNA-dependent RNA polymerase 6; RDR6) はウイルス・
ウイロイドに対する植物の防御機構である RNA サイレンシングにおける重要な因子の 1
つである。RDR6 がウイロイドの増殖や病徴発現に及ぼす影響に関しては初めに *N.*
benthamiana とホップ矮化ウイロイド (hop stunt viroid, HSVd) の組み合わせで解析が行われ、
NbRDR6 の発現抑制は HSVd の病徴発現を抑制した (Gómez *et al.*, 2008)。その一方 *N.*
benthamiana と PSTVd の組み合わせでは NbRDR6 の発現抑制は PSTVd の病徴発現や病徴の
程度に影響を及ぼさず、PSTVd の蓄積量を増加させた (Di Serio *et al.*, 2010)。また *N.*
benthamiana では PSTVd は茎頂分裂組織 (shoot apical meristem, SAM) へ侵入しないことが
報告されていたが (Qi and Ding, 2003)、NbRDR6 の発現抑制により PSTVd は SAM および花
序分裂組織へ侵入した (Di Serio *et al.*, 2010)。これらの報告は、RDR6 がウイロイドの病徴発
現や増殖、分裂組織への侵入に関して "宿主-ウイロイド" の組み合わせにより異なる影響
を及ぼす可能性を示唆している。またウイルス・ウイロイドの SAM への侵入を抑制するとい
う RDR6 の役割からウイロイドの種子伝搬への関与が示唆されているが、これまでに解

析を行った例はない。それゆえに、本研究ではトマトと PSTVd の組み合わせで RDR6 の発現抑制が PSTVd の増殖、病徴発現、SAM への侵入、及び種子伝搬へ及ぼす影響を解析した (Naoi *et al.*, 2020)。まず PSTVd 耐病性トマト品種 Moneymaker において SIRDR6 の発現を抑制した SIRDR6i 植物と空ベクターを導入した EC 植物に病原性の異なる中間系統 PSTVd-Int と致死系統 PSTVd-RG1 を接種した。その結果、SIRDR6 の発現抑制により PSTVd 2 系統の病徴は変化せず、トマト品種 Moneymaker の PSTVd 感染に対する耐病性は失われなかった。その一方で SIRDR6 の発現抑制により PSTVd2 系統が同程度の侵入度・侵入率で SAM の基部へ侵入した。また PSTVd の蓄積量を解析したところ、EC 植物と比較して SIRDR6i 植物で感染初期における蓄積が低かった。そして PSTVd-Int に感染した SIRDR6i 及び EC 植物由来の果実から種子を採取し PSTVd の種子伝染率を解析したところ、形質転換植物間で PSTVd-Int の種子伝染率に顕著な差異は認められなかった。

以上の結果より、トマトの SIRDR6 はトマト品種 Moneymaker の PSTVd 感染に対する耐病性には寄与していないが、PSTVd 系統に関わらず SAM の基部への侵入を抑制すると考えられた。加えて SIRDR6i 植物における SAM 基部への PSTVd-Int の侵入は、次世代への種子を介した伝染率を変化させなかった。また SIRDR6 の発現抑制は感染初期における PSTVd の蓄積を増加させず、むしろ減少させた。過去の研究では RDR1 の機能が失われている *N. benthamiana* における NbRDR6 の発現抑制が感染初期における PSTVd の蓄積を増加させ、SAM への完全な侵入を可能にした (Di Serio *et al.*, 2010)。この報告を考慮すると、未分化の幹細胞を含む SAM 上部への PSTVd の侵入抑制及び感染初期における SIRDR6i 植物での PSTVd の蓄積の減少は、SIRDR1 をはじめとする他の宿主因子によって引き起こされる可能性が示唆された。

③ PSTVd 側に存在する病原性決定要因の解析

ウイロイドは同種であっても 1-数塩基の差異で病原性が大きく異なることが知られており、致死系統 PSTVd-AS1 は中間系統 PSTVd-Int と比較して二次構造上の病原性調節 (virulence-modulating, VM) 領域内の 4 塩基が異なる。そして PSTVd-AS1 は 4 塩基の変異により VM 領域内に位置する第 7 ステム中の 315 番塩基 C がバルジグループとなる。この二次構造変化が PSTVd-AS1 における強毒化の主要因であるかを明らかにするため、PSTVd の病原性と二次構造との関係を詳細に解析した。PSTVd-Int と PSTVd-AS1 の間の塩基置換変異体 6 種と第 7 ステムの二次構造を変化させる変異を導入した構造改変型変異体 14 種を作製しトマト品種 Rutgers へ接種、病原性の比較・解析を行った。その結果、第 7 ステムにおける 313 番塩基 A と 314 番塩基 C のバルジグループが弱毒の病原性、315 番塩基 A または C のバルジグループが致死の病原性と関連付けられた。全体をまとめると、PSTVd の VM 領域内の第 7 ステムにおけるバルジグループの有無、位置、及び塩基または第 7 ステムの長さが病原性決定要因の 1 つであるが、その病原性の発揮には周辺

構造との相互作用も重要であることが考えられた。また PSTVd 蓄積量の解析より、PSTVd の第 7 ステムの二次構造変化と感染初期における蓄積量の増加、及び病原性の強毒化が関連付けられた。次に二次構造変化が病原性変化につながる分子機構に関して、トマト品種 Rutgers における PSTVd の病原性と壊疽病徴の発症機構の観点から、宿主遺伝子の発現変動の関係を調べた。その結果、感染している PSTVd の病原性が強く葉における壊疽が激しいほど活性酸素種の蓄積量が多く、ストレス応答性の micro RNA (miR) 398 及び miR398a-3p の発現が高かった。そして miR398a-3p の発現は予測ターゲット遺伝子である活性酸素分解酵素をコードする *SISOD3* mRNA の発現と負の相関を示した。

以上の結果より、VM 領域内の第 7 ステムの二次構造変化に伴う PSTVd 蓄積量の変化により宿主植物の活性酸素種の代謝及び関連遺伝子の発現が変動することで、病原性が変化することが示唆された。そして PSTVd-AS1 の強毒化機構として以下の仮説が想定された; PSTVd-Int の VM 領域内の第 7 ステム中の 4 塩基が次第に変異したことで、第 7 ステム内に植物細胞における複製または細胞間/全身移行に特に有利であると想定される 315 番塩基 C バルジループが形成される。そして全身での蓄積が高くなり、宿主植物の正常な代謝及び遺伝子発現が大幅に攪乱される。結果として、PSTVd-Int よりも激しい致死性の病徴が発現する。現時点では VM 領域内の第 7 ステムの二次構造が PSTVd の蓄積に影響を及ぼす機構は不明であり、今後更なる解析が求められる

3. 総合考察

本研究ではトマトが PSTVd 感染により発病するメカニズムに関して包括的に理解するため、ウイロイド側・宿主側の双方から病徴の程度を決定しうる要因に関する解析を行った。ここでは本研究より得られた結果をもとにそれらの要因間の関係性を総合的に考察する。

① PSTVd の病原性決定要因は PSTVd 感染に対して耐病性を示すトマト近縁野生種では機能しなかった

本研究では、病原性の異なる中間系統 PSTVd-Int と致死系統 PSTVd-AS1 を様々なトマト品種及び野生種に接種した。その結果、PSTVd 系統間の病原性差異は PSTVd 感染に対して高い感受性を示したトマト品種及び野生種で顕著であった一方、耐病性を示したトマト近縁野生種では病原性差異はほとんど認められなかった。PSTVd-AS1 は PSTVd-Int と比較して二次構造上の VM 領域の第 7 ステム中に 4 塩基の変異を有しており、この 4 塩基が PSTVd-AS1 の致死の病原性に寄与する病原性決定配列である。そしてこの 4 塩基の変異に伴い第 7 ステム中の 315 番塩基 C がバルジループとなったことが蓄積量の増加及び致死の病原性と関連付けられた。以上の結果は、PSTVd 感染に対し

て耐病性を示したトマト近縁野生種では PSTVd-AS1 の 315 番塩基 C バルジループが病原性決定要因ではないことを示唆している。また第 7 ステムの構造により PSTVd の蓄積量が異なったことから、第 7 ステムと相互作用することで PSTVd の複製または細胞間/全身移行に寄与する因子が存在する可能性、及びその因子との第 7 ステムの構造の親和性が高いほど全身での蓄積量が多く高病原性である可能性が示唆された。これらの結果及び考察に基づくと、トマト近縁野生種では PSTVd-AS1 の蓄積が著しく低かったことから感受性トマト品種で存在が示唆された因子が存在していない、または存在するが結合部位の構造の違い等で利用できない可能性が示唆される。さらに弱毒の PSTVd は一般的に蓄積量が低く (Gruner *et al.*, 1995; Tsushima *et al.*, 2015), 本研究においても弱毒の塩基置換変異体は蓄積量が低かった。そして本研究及び過去の研究では、PSTVd の病原性が弱く蓄積が低いほど、宿主の病徴と関連付けられる遺伝子の発現変動は小さかった (Fujibayashi *et al.*, 2021; Kitabayashi *et al.*, 2020; Więsyk *et al.*, 2019)。以上の知見は、PSTVd が発病するには宿主体内である程度蓄積し病徴発現と関連する遺伝子の発現を大きく変動させる必要があり、蓄積に影響を及ぼす宿主因子及びそれに対応する PSTVd の一次・二次構造の間の相互作用によって PSTVd の病原性及び病徴発現の程度が決定される可能性を示唆している。

② 感染初期における PSTVd の蓄積量は PSTVd 感染に対して感受性を示すトマトでの病徴の程度と関連付けられた

本研究ではウイロイド側・宿主側の双方から病徴の程度を決定しうる要因を探るため、PSTVd の蓄積量の経時的な解析を行った。PSTVd 感染に対して感受性を示した野生トマトと耐病性を示した近縁野生種交配して作出した F1 雑種は感受性親と比較して感染初期における PSTVd の蓄積が低く、PSTVd-AS1 感染に対して耐病性を示した。また病原性の強い PSTVd 分離株及び塩基置換変異体ほど感染初期における蓄積が高かった。このように、感受性宿主における PSTVd の病徴の程度は感染初期における蓄積量と正の相関を示した。PSTVd の蓄積能が高い場合、植物が防御機構を十分に活性化する以前に大量の PSTVd が蓄積してしまい、蓄積を制御できなくなった結果より激しい病徴の発現につながるのかもしれない。また PSTVd の蓄積が低いことは過剰な防御・ストレス応答を誘導しないため、病徴が弱くなることも示唆されている (Fujibayashi *et al.*, 2021; Kitabayashi *et al.*, 2020; Sano, 2021)。本研究では、PSTVd の病原性が強く蓄積量が多いことがストレス応答性の miR398 及び miR398a-3p の過剰な発現、活性酸素の過剰な蓄積、及び激しい全身性壊疽症状と関連付けられた。これらの知見を考慮すると、感染初期における PSTVd の高蓄積は過剰な防御・ストレス応答を誘導し、正常な代謝が阻害された結果激しい病徴の発現につながる事が考えられる。

4. まとめ

本研究では、感染性の非ウイルス配列を含まない正確な1量体 PSTVd RNA による感染系を確立した。この系は転写鋳型プラスミド DNA を inverse PCR による部位特異的変異導入の鋳型として直接用いることで数多くの変異体転写用鋳型を容易に作製できる。またこの系で PSTVd と同様に転写したトマト退緑萎縮ウイルス、HSVd、及び CSVd の正確な1量体 RNA もまた PSTVd と同様に十分に感染性を示した (Hataya and Naoi, 2021) そのため非ウイルス配列を含まない正確な1量体 RNA による感染系は幅広いウイルスにおいてゲノム配列の生物学的機能を解析に用いるのに非常に適している。

また本研究では、トマトが PSTVd 感染により発病するメカニズムに関して宿主植物側・ウイルス側双方から病徴の程度を決定する要因に関する解析を行った。宿主植物側からの解析では、致死系統の PSTVd-AS1 に感染しても全く病徴を示さないトマト近縁野生種 *S. pimpinellifolium* LA0373 と LA0411 及び *S. chmielewskii* LA1028 を同定し、これら植物で認められた PSTVd 感染に対する強い耐病性の形質は顕性であることを明らかにした。さらにトマト栽培種により近縁である *S. pimpinellifolium* LA0373 における耐病性が PSTVd の蓄積に影響を及ぼすと考えられる主働遺伝子とその他の微働遺伝子によって支配される量的形質である可能性を示した。本研究で発見した PSTVd 感染に対するトマト近縁野生種の強い耐病性は交配により感受性作物に導入可能なウイルス耐病性の初めての例であり、PSTVd 耐病性トマト品種の育種への利用が期待できる。さらに RNA サイレンシングのキー因子である RDR6 はトマト品種 MoneyMaker の PSTVd 感染に対する耐病性には寄与していないが、PSTVd 系統に関わらず SAM の基部への侵入を抑制していることを明らかにした。ウイルス側からの解析では、PSTVd の VM 領域内の第7ステムにおけるバルジループの有無、位置、及び塩基または第7ステムの長さが病原性決定要因の1つであることを明らかにした。そして VM 領域の二次構造変化が蓄積に影響を及ぼし、それに伴い宿主植物の代謝及び遺伝子発現が変動することで病原性が変化する可能性を示した。

以上より、PSTVd の感染初期における蓄積量に影響を及ぼす PSTVd 及び宿主の要因、そしてそれらの間の相互作用がトマトにおける発病及び病徴の程度を決定するうえで特に重要であると考えられた。本研究の成果は、PSTVd 耐病性トマトの作出や弱毒 PSTVd ワクチンの開発といったウイルス病防除への応用が期待できる。

5. 引用文献

Di Serio F., Martínez de Alba Á.-E., Navarro B., Gisel A., Flores R. (2010) RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *J. Virol.* 84: 2477–2489.

Fujibayashi M., Suzuki T., Sano T. (2021) Mechanism underlying potato spindle tuber viroid affecting tomato (*Solanum lycopersicum*): loss of control over reactive oxygen species production. *J. Gen. Plant Pathol.* 87: 226–235.

Gómez G., Martínez G., Pallás V. (2008) Viroid-induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent on RDR6 activity. *Plant Physiol.* 148: 414–423.

Gruner R., Fels A., Qu F., Zimmat R., Steger G., Riesner D. (1995) Interdependence of pathogenicity and replicability with potato spindle tuber viroid. *Virology* 209: 60–69.

Hataya T., Naoi T. (2021) Precisely monomeric linear RNAs of viroids belonging to *Pospiviroid* and *Hostuviroid* genera are infectious regardless of transcription initiation site and terminal structure. *Cells* 10: 2971.

Kitabayashi S., Tsushima D., Adkar-Purushothama C.R., Sano T. (2020) Identification and molecular mechanisms of key nucleotides causing attenuation in pathogenicity of dahlia isolate of potato spindle tuber viroid. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 7352.

Matoušek J., Kozlová P., Orctová L., Schmitz A., Pešina K., Bannach O., Diermann N., Steger G., Riesner D. (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.* 388: 1–13.

Matsushita Y., Aoki K., Sumitomo K. (2012) Selection and inheritance of resistance to *Chrysanthemum stunt viroid*. *Crop Protect.* 35: 1–4.

Nabeshima T., Matsushita Y., Hosokawa M. (2018) *Chrysanthemum stunt viroid* resistance in *Chrysanthemum*. *Viruses* 10: 719.

Naoi T., Hataya T. (2021) Tolerance even to lethal strain of potato spindle tuber viroid found in wild tomato species can be introduced by crossing. *Plants* 10: 575.

Naoi T., Kitabayashi S., Kasai A., Sugawara K., Adkar-Purushothama C.R., Senda M., Hataya T., Sano T. (2020) Suppression of RNA-dependent RNA polymerase 6 in tomatoes allows potato spindle tuber viroid to invade basal part but not apical part including pluripotent stem cells of shoot apical meristem. *PLoS ONE* 15: e0236481.

Palukaitis P. (2012) Resistance to viruses of potato and their vectors. *Plant Pathol. J.* 28: 248–258.

Palukaitis P. (2014) What has been happening with viroids? *Virus Genes* 49: 175–184.

Qi Y., Ding B. (2003) Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell* 15: 1360–1374.

Sano T. (2021) Progress in 50 years of viroid research—Molecular structure, pathogenicity, and host adaptation. *Proc. Jpn Acad. Ser. B* 97: 371–401.

Singh R.P. (1973) Experimental host range of the potato spindle tuber 'virus'. *Am. Potato J.* 50: 111–123.

Singh R.P. (1985) Clones of *Solanum berthaultii* resistant to potato spindle tuber viroid. *Phytopathol.* 75: 1432–1434.

Sofy A.R., Mahfouze S.A., El-Enany M.A.M. (2013) Isozyme markers for response of wild potato species to *Potato spindle tuber viroid* egyptian isolate. *World Appl. Sci. J.* 27: 1010–1022.

Tsushima D., Adkar-Purushothama C.R., Taneda A., Sano T. (2015) Changes in relative expression levels of viroid-specific small RNAs and microRNAs in tomato plants infected with severe and mild symptom inducing isolates of *Potato spindle tuber viroid*. *J. Gen. Plant Pathol.* 81: 49–62.

Więsyk A., Iwanicka-Nowicka R., Fogtman A., Zagórski-Ostoja W., Góra-Sochacka A. (2018) Time-course microarray analysis reveals differences between transcriptional changes in tomato leaves triggered by mild and severe variants of potato spindle tuber viroid. *Viruses* 10: 257.